

**Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Analyse von Regulatorproteinen des *Yersinia* Typ
III Sekretionssystems:
Bedeutung Typ III-spezifischer Chaperone und
Kontrolle der Aktivität der
Phosphoenolpyruvatcarboxylase**

vorgelegt von

Annika Schmid

aus München

München 2008

angefertigt

am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Erstgutachter	Prof. Dr. K. Jung
Zweitgutachter	Prof. Dr. A. Hartmann
Sondergutachter	Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Eingereicht am: 15.05.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 04.08.2008

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	VI	
A	EINLEITUNG	1
A.1	Die Gattung <i>Yersinia</i>	1
A.1.1	Der Pesterreger – <i>Yersinia pestis</i>	2
A.1.2	Die enteropathogenen Erreger – <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> und <i>Yersinia enterocolitica</i>	2
A.1.3	Einteilung nach Biotypen und Serotypen	3
A.1.4	Evolution der pathogenen Yersinien	4
A.2	Pathogenitätsfaktoren	5
A.2.1	Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren	5
A.2.1.1	Das Enterotoxin Yst	5
A.2.1.2	Das Invasin Inv	6
A.2.1.3	Das Membranprotein Ail	6
A.2.1.4	Die Myf Fibrillen	6
A.2.2	Plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren	7
A.2.2.1	Der Typ III Sekretionsapparat	8
A.2.2.2	Das Adhäsın YadA	10
A.2.2.3	Die Yop-Effektoren	11
A.2.2.4	Die Chaperone	12
A.3	Die Sekretion und Translokation der Effektoren	14
A.3.1	Das Sekretionssignal	14
A.3.2	Die Sekretion der Effektoren über den Typ III Sekretionsapparat	16
A.3.3	Die Energie für die Typ III Sekretion	17
A.4	Regulation der Typ III Sekretion	18
A.4.1	Kontrolle durch Temperatur und das Flagellen Typ III Sekretionssystem	18
A.4.2	Regulation durch die „Low calcium response“ (Lcr)	20
A.4.3	Die Regulatoren LcrQ/YscM1 und YscM2	20
A.4.4	Das <i>lcrGVH-YopBD</i> -Operon	21
A.4.5	YscY und YscX – zwei weitere Regulatoren der Typ III Sekretion?	22
A.5	Verknüpfung zwischen Stoffwechsel und Virulenz bei Pathogenen	23
A.6	Zielsetzung	23
B	MATERIAL UND METHODEN	25
B.1	Material	25
B.1.1	Geräte	25
B.1.2	Bezugsquellen für Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme	26
B.2	Organismen, Plasmide und Primer	27
B.2.1	Organismen	27
B.2.2	Plasmide	28
B.2.3	Primer	30
B.3	Nährmedien, Antibiotika und Medienzusätze	31
B.3.1	Nährmedien	31
B.3.2	Antibiotika und Medienzusätze	32
B.4	Kultivierung und Stammhaltung von Organismen	33
B.4.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>Yersinia</i> sp.	33
B.4.2	Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien	33

B.4.3	Stammhaltung	33
B.4.4	Messung der optischen Dichte	34
B.4.5	Zellzahlbestimmung mit einer Neubauer Zählkammer	34
B.5	Molekularbiologische Methoden	34
B.5.1	Isolierung, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA	34
B.5.1.1	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA	34
B.5.1.2	DNA-Fällung	35
B.5.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	35
B.5.2	DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
B.5.3	Agarose-Gelelektrophorese	37
B.5.3.1	Auftrennung von DNA im Agarosegel	37
B.5.3.2	Ethidiumbromidfärbung und Dokumentation von Agarosegelen	38
B.5.4	Sequenzierung von DNA	38
B.5.5	Enzymatische Modifikation von DNA	38
B.5.5.1	Restriktionsverdau	38
B.5.5.1.1	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	39
B.5.5.1.2	Restriktionsverdau von PCR-Produkten	39
B.5.5.2	Dephosphorylierung von DNA	39
B.5.5.3	Ligation linearer DNA-Fragmente	39
B.5.5.4	Generierung von 3' Adenosin-Überhängen nach der Amplifikation durch PCR	40
B.5.6	Transformation mit DNA	41
B.5.6.1	Herstellung elektrokompetenter Zellen	41
B.5.6.2	Elektroporation von <i>E. coli</i> und <i>Yersinia</i> sp.	41
B.6	Proteinbiochemische Methoden	41
B.6.1	Quantitative Proteinbestimmung (mod. nach Bradford (1976))	41
B.6.2	Auftrennung von Proteinen durch Polyacrylamid-Elektrophorese (PAGE)	42
B.6.2.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
B.6.2.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970)	42
B.6.2.1.2	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)	44
B.6.2.1.2.1	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese basierend auf einem HEPES-Puffersystem	45
B.6.2.1.2.2	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese basierend auf einem Tris-Puffersystem (mod. nach J. A. King, http://wes.mit.edu/king-lab/www/cookbook/rngel.htm)	45
B.6.3	Detektion von Proteinen	46
B.6.3.1	Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue (mod. nach Sambrook <i>et al.</i> (1989))	46
B.6.3.2	Proteinfärbung mit PonceauS Rot	46
B.6.3.3	Transfer und Detektion von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran	47
B.6.3.3.1	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran („Western Blot“)	47
B.6.3.3.2	Immunodetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz (Immunoblot) (Towbin <i>et al.</i> 1979)	47
B.6.3.3.3	Entfernen von Antikörpern von Nitrozellulose-Membranen („Strippen“)	48
B.6.3.4	Detektion von Proteinen mittels ELISA („Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay“)	49
B.6.4	Quervernetzung von Proteinen in Lösung	49
B.7	Proteinproduktion und Proteinreinigung	50
B.7.1	Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen	50
B.7.1.1	Überproduktion von Glutathion-S-Transferase(GST)-Fusionsproteinen	50
B.7.1.2	Reinigung von GST-Fusionsproteinen durch Affinitätschromatographie	51
B.7.2	Produktion und Reinigung von Proteinen mit His ₆ -„Tag“	51
B.7.2.1	Überproduktion von Proteinen mit His ₆ -„Tag“	51
B.7.2.2	Reinigung von Proteinen mit His ₆ -„Tag“ durch „Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography“ (IMAC)	52
B.7.3	Produktion und Reinigung nativer Proteine	53
B.7.3.1	Reinigung von nativen Proteinen	53
B.7.3.1.1	Ammoniumsulfat-Fällung	53
B.7.3.1.2	Ionenaustauschchromatographie	54
B.7.3.1.3	Hydrophobe Interaktionschromatographie	54
B.7.4	Reinigung von Proteinen aus Einschlusskörpern („inclusion bodies“)	55
B.7.5	Spaltung von Fusionsproteinen	55
B.7.6	Gelfiltration (Größenausschluss-Chromatographie)	56

B.7.7	Einengen von Proteinen	56
B.7.8	Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung)	57
B.8	Herstellung von Antisera	57
B.8.1	Herstellung polyklonaler Antisera	57
B.8.2	Herstellung monoklonaler Antisera	58
B.8.2.1	Immunisierung der Mäuse	58
B.8.2.2	Fusion der Lymphozyten	58
B.8.2.3	Durchmusterung der Hybridomaüberstände	59
B.9	PEPC-Aktivitätsassay	59
B.10	Wachstumsversuche in M9-Medium	60
B.11	Analyse der Yop-Sekretion von <i>Yersinia enterocolitica</i>	60
B.11.1	Analyse der Yop-Sekretion von <i>Yersinia enterocolitica</i> in BHI	60
B.11.2	Analyse der Yop-Sekretion von <i>Yersinia enterocolitica</i> nach ¹³ C-Markierung in F12-Medium	61
B.12	Zellbiologische Methoden	62
B.12.1	Infektion von eukaryotischen Zelllinien mit <i>Yersinia enterocolitica</i>	62
B.12.2	Apoptose-Assay mit <i>Yersinia enterocolitica</i>	63
B.12.3	Invasions-Assay mit <i>Yersinia enterocolitica</i>	63
B.12.4	Nachweis intrabakterieller cytoplasmatischer Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz-technik	64
B.13	Circulardichroismus(CD)-Spektrometrie	65
B.14	Massenspektrometrie	65
B.15	Kleinwinkelstreuung	66
C	ERGEBNISSE	68
C.1	Reinigung von SycD	68
C.1.1	Klonierung von SycD in den Expressionsvektor pET-24b	69
C.1.2	Expression und Reinigung von SycD	70
C.1.3	Analyse der Struktur von SycD	72
C.1.3.1	Analyse der Struktur von SycD durch Circulardichroismus(CD)-Spektrometrie	72
C.1.3.2	Sekundärstrukturvorhersagen und Homologie-basierte Strukturberechnung von SycD	72
C.1.4	Oligomerisierung von SycD	74
C.1.4.1	Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von SycD	74
C.1.4.2	Analyse der Oberflächenform von SycD mittels Kleinwinkelstreuung (SAXS)	75
C.1.5	Interaktion von SycD mit YscM1 und YscM2	76
C.2	Reinigung verkürzter SycD Proteine	78
C.2.1	Reinigung eines N- und C-terminal verkürzten SycD Proteins	78
C.2.1.1	Bestimmung des zu klonierenden Bereichs von SycD	78
C.2.1.2	Klonierung des verkürzten SycD ohne Affinitätsmarker	79
C.2.1.3	Reinigung des verkürzten SycD ₉₋₁₆₃	80
C.2.2	Reinigung von N- bzw. C-terminal verkürzten SycD Proteinen	81
C.2.2.1	Klonierung der N- bzw. C-terminal verkürzten SycD Proteine mit His ₆ -„Tag“	81
C.2.2.2	Reinigung der verkürzten Proteine SycD _{Δ2-8} und SycD _{Δ164-168}	81
C.2.2.3	Interaktion von SycD _{Δ2-8} und SycD _{Δ164-168} mit YscM1 und YscM2	81
C.3	Das Chaperon SycO	82
C.3.1	Oligomerisierung von SycO	83
C.3.2	Interaktion von SycO mit YscM1 und YscM2	83
C.4	Reinigung von YscY	84
C.4.1	Klonierung von YscY in den Expressionsvektor pWS	85

C.4.2	Expression und Reinigung von YscY	86
C.4.3	Expression und Reinigung von YscY im Komplex mit SycD	86
C.4.4	Oligomerisierung von YscY	87
C.4.5	Sekundärstrukturvorhersagen und Homologie-basierte Strukturberechnung von YscY	88
C.5	Reinigung von YscX	89
C.5.1	Klonierung von YscX in den Expressionsvektor pET-21b	90
C.5.2	Expression und Reinigung von YscX	90
C.5.3	Expression und Reinigung von YscX im Komplex mit YscY	90
C.5.4	Sekundärstrukturvorhersagen und Homologie-basierte Strukturberechnung von YscX	92
C.5.5	Stöchiometrie des YscY/YscX-Komplexes	92
C.6	Reinigung von SycE	93
C.6.1	Klonierung von SycE in den Expressionsvektor pET-21b	94
C.6.2	Expression und Reinigung von SycE	94
C.6.3	Überprüfung der Funktionalität von SycE	95
C.7	Der Virulenzfaktor YscM1 moduliert die Enzymaktivität der PEPC	96
C.7.1	Einfluss von YscM1 und YscM2 auf die Enzymaktivität der PEPC	96
C.7.2	Der N-Terminus von YscM1 moduliert die Enzymaktivität der PEPC	101
C.7.3	YscM1 wirkt als Antagonist des allosterischen Aktivators Acetyl-CoA	102
C.7.4	Einfluss der Chaperone der Typ III Sekretion auf die Enzymaktivität der PEPC	103
C.7.5	PEPC-abhängiges Wachstum von <i>Yersinia enterocolitica</i>	105
C.7.6	Modulation der Aktivität der PEPC durch YscM1 <i>in vivo</i>	107
C.7.7	YscM1 und YscM2 führen zu Konformationsänderungen der PEPC	109
C.8	Einfluss der PEPC Reaktion auf die Yop-Biosynthese	110
C.8.1	Analyse der Yop-Sekretion von <i>Yersinia enterocolitica</i> Mutanten in <i>ppc</i> , <i>yscM1</i> und <i>yscM2</i> in verschiedenen Medien	111
C.8.2	¹³ C-Markierungsversuche deuten auf einen Einfluss der anaplerotischen PEPC Reaktion auf die Yop-Biosynthese hin	113
C.9	Einfluss der Modulation der PEPC durch YscM1 während der Infektion	117
C.9.1	Einfluss der Modulation der PEPC Aktivität bei der Infektion von J774-Makrophagen	118
C.9.2	Einfluss der Modulation der PEPC auf die Phagozytose von Yersinien durch HeLa-Zellen	119
C.10	Der Effektor YopH moduliert die Enzymaktivität der PEPC	119
C.10.1	Einfluss von YopH auf die Enzymaktivität der PEPC	120
C.10.2	YopH wirkt als Antagonist des allosterischen Aktivators Acetyl-CoA	121
C.10.3	Modulation der Aktivität der PEPC durch YopH <i>in vivo</i>	122
D	DISKUSSION	125
D.1	Die Chaperone der Typ III Sekretion	126
D.1.1	Die Klasse I-Chaperone	126
D.1.2	Das Klasse II-Chaperon SycD	127
D.1.3	YscY - Chaperon und Regulator?	130
D.2	Die Wechselwirkung von Virulenzfaktoren mit der Phosphoenolpyruvatcarboxylase	133
D.2.1	Die Wechselwirkung von YscM1 und YscM2 mit der PEPC	133
D.2.2	Die Wechselwirkung von YopH mit der PEPC	139
D.2.3	Die Bedeutung der PEPC Reaktion und ihrer Regulation für <i>Yersinia</i>	140
D.3	Modell für den Mechanismus der „Low calcium response“	143
D.4	Die biologische Bedeutung der Modulation der Enzymaktivität der PEPC	147
E	ZUSAMMENFASSUNG	149

LITERATURVERZEICHNIS

150

PUBLIKATIONSLISTE

171

TAGUNGSBEITRÄGE

172

LEBENS LAUF

173

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin, Ampere
Å	Angström
AAT	Alpha1-Antitrypsin
Abb.	Abbildung
ÄM	äußere Membran
Ail	Attachment invasion locus
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-6-chlor-3-indolylphosphat
BHI	Brain-Heart-Infusion
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CBD	Chaperonbindedomäne („chaperone binding domain“)
CCCP	Carbonylcyanid <i>m</i> -chlorophenylhydrazon
CDS	kodierende Sequenzen („coding sequence“)
cfu	“colony forming unit“
cm	Zentimeter
CREB	„cAMP-response-binding“ Protein
Δ	Delta
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DC	dendritische Zelle
demin.	demineralisiert
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DSP	Dithiobis[succinimidylpropionate]
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGS	Ethylene glycolbis[succinimidylsuccinate]
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure

ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ERK	„extracellular signal-regulated kinase“
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	et alteri: und andere
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum
ft3SS	Flagellen Typ III Sekretionssystem
g	Gramm
G	Guanin, Glycin
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HA	Hypoxanthin/Azaserin
HCF	Hybridoma Cloning Factor
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
His	Histidin
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
HRPO	Meerrettichperoxidase
HS	Humanserum
IB	Einschlusskörperchen („inclusion bodies“)
IKK β	Inhibitor von NF- κ B
IM	innere Membran
Inv	Invasin
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
IS	Insertionssequenz
k-	Kilo- (10^3)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K _i	Inhibitor konstante
Km	Kanamycin
konz.	konzentriert
l	Liter
JNK	c-jun-N-terminale Kinase
λ	Wellenlänge
lat.	lateinisch
LB	Luria-Bertani
Lcr	Low calcium response
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Wiederholungssequenz
m	milli (10^{-3}), Meter
M	molar, Mega-
μ	mikro (10^{-6})

MAC	Membranangriffskomplex
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MBP	Maltosebinde-Protein
MCS	multiple cloning site
MDH	Malatdehydrogenase
MEK	MAP Kinase Kinase
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MOI	multiplicity of infection
mod.	modifiziert
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
MRW	mittlerer Aminosäurerest („mean residue weight“)
Myf	mucoid <i>Yersinia</i> factor
n-	nano (10^{-9})
N-	Amino-
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
Nal	Nalidixinsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMR	Kernspinresonanz („nuclear magnetic resonance“)
NTA	„nitriolo triacetic acid“
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen („open reading frame“)
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvatcarboxylase
PG	Peptidoglycan
pH	pondus hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration in einer wässrigen Lösung
pI	isoelektrischer Punkt
PMF	protonenmotorische Kraft („proton motive force“)
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRK	„protein kinase C-like“
PS	Phosphatidylserin
psi	„pounds per square inch“; 1 psi = 6,895 kPa
PTPase	Protein-Tyrosinphosphatase
P_{lac}	Hybridpromotor des <i>lac</i> - und <i>trp</i> -Operons
pYV	<i>Yersinia</i> virulence
r	resistent
R	Arginin
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RSK	„ribosomal S6 protein kinase“

RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S	Serin
S.	<i>Shigella, Salmonella</i>
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SAXS	Kleinwinkelstreuung („small angle X-ray scattering“)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
Sm	Streptomycin
sp.	Species
Sulfo-EGS	Ethylene glycolbis[sulfosuccinimidylsuccinate]
Syc	specific Yop chaperone
T	Thymin
T3SS	Typ III Sekretionssystem („type three secretion system“)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
TEV	tobacco etch virus
TOF	„time of flight“
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
TPR	Tetratricopeptid
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität); Uracil
u.	und
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
ÜK	Übernachtskultur
usw.	und so weiter
UTR	nicht-translatierte Region („untranslated region“)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.	von
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen, Volumina
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation („World Health Organisation“)
w/v	Masse pro Volumen
Y.	<i>Yersinia</i>
YadA	<i>Yersinia</i> Adhäsion A
Yop	<i>Yersinia</i> outer protein
YpkA	<i>Yersinia</i> protein kinase A
Ysc	Yop secretion
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

A EINLEITUNG

Obwohl die Pest als Infektionserkrankung heute kaum noch eine Rolle spielt, hat sie ihrem Namen (Pest v. lat. *pestis* = Seuche) in der Geschichte der Menschheit alle „Ehre“ gemacht. Neben kleineren lokalen Ausbrüchen der Pest gab es drei große Pandemien im 6.-8. Jahrhundert (Justinianische Pest), im 14. Jahrhundert („Schwarzer Tod“) und in der 2. Hälfte des 19. Jahrhunderts. Von den beiden letzten Pandemien schätzt man, dass sie insgesamt 32-37 Millionen Leben gefordert haben. Während der letzten Pandemie gelang es dem schweizerisch-französischen Arzt Alexandre Jean Emil Yersin den Pesterreger zu identifizieren. Dies und das fortschreitende Verständnis für Übertragungswege und die Notwendigkeit von Hygienemaßnahmen legte den Grundstein für eine erfolgreiche Bekämpfung des Erregers. Allerdings ist der Erreger in Nagetierreservoirs in Amerika, Asien und Afrika noch immer weit verbreitet (Perry & Fetherston 1997). Außerdem registriert die WHO heute noch 1000-3000 Pestinfektionen pro Jahr, wobei Afrika der am stärksten betroffene Kontinent ist. Alleine in der Demokratischen Republik Kongo sind bis zu 1000 Infizierte und 100 Tote pro Jahr zu vermelden. Der letzte Ausbruch mit 18 Toten wurde Anfang 2008 in Madagaskar gemeldet.

A.1 Die Gattung *Yersinia*

Phylogenetisch gehört die Gattung *Yersinia* zur Familie der *Enterobacteriaceae* (Frederiksen 1964) (*Bacteria*, *Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Enterobacteriales*, *Enterobacteriaceae*, *Yersinia*), zu der auch *Escherichia*, *Salmonella* und *Shigella* gehören. Namensgebend für die Gattung war der Arzt Yersin, der 1894 in Hongkong den Pesterreger entdeckte und die erste Reinkultur anlegte. Die Gattung *Yersinia* umfasst 11 Arten (*Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. ruckeri*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*), von denen drei für die Humanmedizin relevant sind. Neben dem Pesterreger *Y. pestis* sind das die Enteropathogene *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*. Bei Yersinien handelt es sich um gramnegative psychrotrophe Stäbchen, die sich fakultativ aerob vermehren. Das Wachstumsoptimum liegt bei 27°C, aber aufgrund ihrer Psychrotoleranz ist die Vermehrung bei 4°C nicht zu vernachlässigen. *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* zeichnen sich außerdem durch Beweglichkeit bei 27°C aus, die bei 37°C verloren geht. Für die Therapie einer Pest-Erkrankung werden Antibiotika (Tetracycline, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfadiazin) eingesetzt. Infektionen mit enteropathogenen Yersinien (Yersiniosen) sind in der Regel selbstlimitierend und werden nicht antibiotisch behandelt. Ausnahmen sind systemische Infektionen, wie sie besonders bei Menschen mit einer Grunderkrankung (Diabetes mellitus, hämolytische Anämie, Leberzirrhose, usw.) vorkommen. Die Therapie hängt maßgeblich vom Erreger und Verlauf der Erkrankung ab, da sich speziell das Krankheitsbild von *Y. pestis* stark von dem von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* unterscheidet (Knapp 1988).

A.1.1 Der Pesterreger – *Yersinia pestis*

Bei der Pest handelt es sich um eine typische Zoonose, die bei frei lebenden Nagetieren (z.B. Murmeltiere, Eichhörnchen, Ratten) eine natürlich vorkommende Krankheit ist, wobei Ratten das wichtigste Reservoir darstellen. Der Mensch spielt im Langzeit-Überlebenszyklus der Bakterien vermutlich keine Rolle (Perry & Fetherston 1997). Während Ratten meist kurz nach Einsetzen der Infektion sterben, kann der Pesterreger monatelang in Kot, Speichel, Eiter oder Parasiten überleben. Rattenflöhe (*Xenopsylla cheopsis*) als Zwischenwirte können den Erreger auf den Mensch übertragen. Im Floh vermehrt sich der Keim im Vormagen und sichert die Übertragung auf den Säuger durch die Aggregation der Blutmahlzeit im Vormagen des Flohs. Dieser Blutklumpen wird beim Biss des Flohs zusammen mit dem Erreger in den Wirt „injiziert“ (Cavanaugh 1971). Der Erreger dringt in das Gewebe ein und wandert über die Lymphgefäße zu den Lymphknoten. Dadurch werden die typischen Symptome der Beulenpest hervorgerufen, d.h. die Lymphknoten schwellen aufgrund des Befalls stark an. Dort vermehrt sich der Erreger und kann in den Blutkreislauf gelangen, wo dann eine allgemeine Septikämie entstehen kann. Begleitet wird dieser Vorgang durch die Bildung zahlreicher Hämorrhagien der Haut, die zum historischen Namen „Schwarzer Tod“ führten. Außerdem geht das Fortschreiten der Infektion mit dem Befall innerer Organe wie Leber und Milz einher (Jawetz & Meyer 1944; Wayson *et al.* 1946). Bei rechtzeitiger Behandlung lässt sich die Mortalität auf ca. 5 % der Infizierten senken, andernfalls führt die Beulenpest mit 50-60 %iger Wahrscheinlichkeit innerhalb von drei bis fünf Tagen zum Tod. Weitaus gefährlicher ist die Lungenpest, die entweder auftritt, wenn der Keim während der Beulenpest die Lunge erreicht oder wenn der Erreger über Aerosole eingeatmet wird. Meist tritt innerhalb von zwei Tagen der Tod ein. Die Lungenpest ist folglich hoch infektiös und meist tödlich (Wren 2003). Bei der Pestsepsis breitet sich der Erreger so schnell im Körper aus, dass der Tod häufig eintritt bevor die Symptome einer Pesterkrankung sichtbar werden. Sowohl die Lungenpest als auch die Pestsepsis können behandelt werden, aber meist setzt die Antibiotikatherapie durch den schnellen Krankheitsverlauf zu spät ein.

A.1.2 Die enteropathogenen Erreger – *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica*

Y. pseudotuberculosis und *Y. enterocolitica* sind wie *Y. pestis* typische Zoonoseerreger und in der Natur vor allem in tierischen Reservoiren weit verbreitet. Während *Y. pseudotuberculosis* primär ein tierischer Erreger ist, der bei Nagetieren eine Pseudotuberkulose hervorruft, kommt er beim Menschen selten vor. Beim Menschen tritt meist eine Lymphadenitis mesenterica mit terminaler Dünndarm-entzündung (Ileitis terminalis) auf. *Y. enterocolitica* dagegen ist ein häufiger Krankheitserreger beim Menschen, der eine enterale Yersiniose verursacht. Meist erfolgt die Infektion oral über kontaminierte Lebensmittel (Black *et al.* 1978). Besonders ist hier das Schwein als Überträger zu nennen, das als Hauptreservoir für humanpathogene *Y. enterocolitica*-Stämme gilt und damit eine wichtige Infektions-

quelle darstellt, wenn kontaminiertes Fleisch vor dem Verzehr nicht ausreichend erhitzt wird (Wauters 1979; Tauxe *et al.* 1987; Bottone 1997). Die Inkubationszeit beträgt drei bis sieben Tage. Das Spektrum an Symptomen für eine enterale Yersiniose reicht von leichter Diarrhö bis zum septisch-typhösen Erscheinungsbild. Besonders häufig sind die Symptome einer akuten Enteritis (Bauchschmerzen, Durchfall, Erbrechen, Fieber), z.T. auch eine Enterokolitis (Cover & Aber 1989; Bottone 1997). Bei Jugendlichen ist häufig eine mesenteriale Lymphadenitis mit Ileitis (Pseudoappendizitis) zu beobachten. Infolge einer Infektion mit *Y. enterocolitica* kann es darüber hinaus zu immunpathologischen Komplikationen in Form einer reaktiven Arthritis oder des Erythema nodosum kommen. Bei ca. 1 % der Patienten erfolgt eine extraintestinale Manifestation der Infektion. Es entsteht eine Septikämie mit Abszessbildung in Leber und Milz. Besonders betroffen sind Patienten mit Immunodefizienz oder Eisenüberladung (Mofenson *et al.* 1987). Der septische Verlauf einer Yersiniose ist unbehandelt meist tödlich (Rabson *et al.* 1975). Die Yersiniose fällt in Deutschland unter die meldepflichtigen Erkrankungen und tritt vor allem bei Kleinkindern auf. Im Jahr 2006 wurden dem Robert Koch-Institut (RKI) 5.161 Fälle gemeldet (Robert Koch-Institut 2007).

Als besonders problematisch bei der Eindämmung des Erregers erweist sich seine hohe Psychrotoleranz. Sowohl in Metzgereien als auch im privaten Haushalt wird Fleisch in Kühltheken oder im Kühlschrank bei ca. 4°C gelagert. Dort vermehrt sich der Keim auf den gekühlten Produkten und kann so zu einer Erkrankung führen. Es ist also wichtig, bereits bei der Schlachtung darauf zu achten, dass das Fleisch nicht kontaminiert wird. Dennoch ließen sich 2004 bei bakteriologischen Untersuchungen im Raum München in sechs von acht Metzgereien humanpathogene *Y. enterocolitica*-Stämme nachweisen (Fredriksson-Ahomaa *et al.* 2004).

A.1.3 Einteilung nach Biotypen und Serotypen

Bakterienarten können nach ihrer metabolischen Leistung differenziert werden, was die Grundlage der Biotypisierung ist. *Y. enterocolitica* kann auf der Grundlage von biochemischen Eigenschaften in sechs Biotypen unterteilt werden: 1A, 1B, 2, 3, 4, 5 (Wauters *et al.* 1987). Zum Biotyp 1A gehört der überwiegende Teil apathogener Stämme, während die anderen fünf Biotypen die pathogenen europäischen (Biotyp 2, 3, 4, 5) und amerikanischen (Biotyp 1B) Stämme umfassen. Nur Biotyp 1 enthält sowohl pathogene als auch apathogene Varianten (Wauters *et al.* 1987). Die Einteilung in verschiedene Serotypen erfolgt durch Antiseren gegen Oberflächenantigene. Bei Yersinien beruht die O-Serotypisierung auf der unterschiedlichen Zusammensetzung der Lipopolysaccharide (O-Antigen). Bisher wurden bei *Y. enterocolitica* 28 Serotypen identifiziert (Neubauer *et al.* 2001). In Europa treten v.a. die Serotypen O:3, O:5,27 und O:9 auf (Calos & Miller 1980; Bolin *et al.* 1982). In Amerika dagegen gibt es v.a. die Serotypen O:4,32, O:8, O:13a, O:13b, O:18, O:20 und O:21 (Bottone 1977; Cornelis *et al.* 1987a). Der vorherrschende *Y. enterocolitica* Serotyp in Deutschland ist mit 90 % der Serotyp O:3. Die europäischen Serotypen gehören zu den Biotypen 2-4, die amerikanischen zum

Biotyp 1B. Die Serotypisierung alleine ist jedoch nicht ausreichend für die Pathogenitätsbestimmung, da entsprechende O-Serotypen auch bei apathogenen *Yersinia*-Arten gefunden werden (Aleksic & Bockemühl 1990; Fredriksson-Ahomaa *et al.* 2002).

Eine Einteilung von *Y. pseudotuberculosis* in Biotypen ist nicht praktikabel. Anhand der Kettenlänge des O-Antigens werden in *Y. pseudotuberculosis* jedoch 15 Serotypen unterschieden, von denen die Serotypen O:1, O:2, O:4 und O:5 in weitere Untertypen unterteilt werden. Dadurch ergeben sich für *Y. pseudotuberculosis* insgesamt 21 Serotypen.

Bei *Y. pestis* werden drei Biotypen (Antiqua, Mediaevalis, Orientalis) unterschieden (Brubaker 1972), die jeweils mit einer der drei Pandemien assoziiert sind. Biotyp Antiqua ist hauptsächlich in Afrika zu finden und gilt als Auslöser der Justinianischen Pest. Biotyp Mediaevalis gilt als Auslöser des „Schwarzen Todes“ und kommt vor allem in Zentralasien vor. Die „moderne Pest“ wurde durch das weit verbreitete Biotyp Orientalis verursacht. Zhou *et al.* (2004) haben in China ein weiteres Biotyp identifiziert (Biotyp Microtus), das sich aufgrund von biochemischen und molekularen Merkmalen und dem Verlust der Pathogenität für den Menschen deutlich von den anderen Biotypen abgrenzen lässt. Eine Einteilung von *Y. pestis* in Serotypen ist aufgrund einer Mutation im O-Antigen-Kluster, die die Synthese des O-Antigens verhindert, nicht möglich (Skurnik *et al.* 2000).

A.1.4 Evolution der pathogenen Yersinien

Mit der Sequenzierung der Genome aller drei humanpathogenen *Yersinia*-Spezies (Song *et al.* 2004; Thomson *et al.* 2006; Eppinger *et al.* 2007) wurden genauere Aussagen über ihre Verwandtschaft möglich. Obwohl die Krankheitsbilder von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*/*Y. enterocolitica* sehr unterschiedlich sind, sind alle drei pathogenen *Yersinia*-Spezies dennoch eng miteinander verwandt. Überraschend ist vor allem, dass die Genome von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* trotz der sehr unterschiedlichen Krankheitsbilder nahezu identisch sind (Bercovier *et al.* 1980; Achtman *et al.* 1999). *Y. pestis* stammt von *Y. pseudotuberculosis* Serotyp O:1b ab (Skurnik *et al.* 2000). Die Trennung der beiden Spezies erfolgte erst während der letzten 1.500-20.000 Jahre (Achtman *et al.* 1999; Radnedge *et al.* 2002). Der signifikanteste genomische Unterschied zwischen den Organismen liegt darin, dass *Y. pestis* zwei zusätzliche Plasmide (9,5 und 110 kb) besitzt. Außerdem existieren in *Y. pestis* 149 Pseudogene, die in *Y. pseudotuberculosis* noch aktiv sind. 317 Gene von *Y. pseudotuberculosis* sind in *Y. pestis* komplett verloren gegangen (Chain *et al.* 2004). Das hängt wahrscheinlich mit dem stark veränderten Lebenszyklus der Erreger und den damit verbundenen unterschiedlichen Anforderungen zusammen. Im Gegensatz dazu trennten sich *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* in ihrer Evolution bereits vor 41-186 Millionen Jahren (Achtman *et al.* 1999). Ein Vergleich der Genomsequenzen

aller drei Spezies zeigt, dass sie sich insgesamt 2.747 kodierende Sequenzen (CDS) teilen (Thomson *et al.* 2006). *Y. enterocolitica* hat zusätzlich 94 CDS mit *Y. pseudotuberculosis* und 30 CDS mit *Y. pestis* gemeinsam, wohingegen *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* zusätzlich 789 CDS gemeinsam haben (Thomson *et al.* 2006).

A.2 Pathogenitätsfaktoren

Entscheidend für die Pathogenität der humanpathogenen *Yersinia*-Spezies ist das Vorhandensein eines 70 kb Virulenzplasmids (Portnoy & Martinez 1985). Dieses pYV (*Yersinia* *y*irulence) Plasmid kodiert für die Komponenten eines Typ III Sekretionssystems (T3SS) (Cornelis *et al.* 1989b; Straley *et al.* 1993). Die Pathogenität hängt aber auch von chromosomal kodierten Virulenzfaktoren ab. Um die volle Virulenz entwickeln zu können, müssen sowohl die chromosomalen als auch die plasmidkodierten Faktoren vorhanden sein (Heesemann *et al.* 1984). Die Expression der meisten Pathogenitätsfaktoren wird durch den Kontakt von Yersinien mit der Wirtszelle induziert (Pettersson *et al.* 1996).

A.2.1 Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren

Der größte Teil der für die Virulenz von Yersinien verantwortlichen Faktoren wird auf dem pYV Plasmid kodiert. Außerdem gibt es vier wichtige, chromosomal kodierte Faktoren, die für die Infektion von Bedeutung sind: das Enterotoxin Yst, das Invasin Inv, das Membranprotein Ail und die Fibrillen.

A.2.1.1 Das Enterotoxin Yst

Y. enterocolitica bildet ein 30 Aminosäuren großes Peptid, das auch im Kulturüberstand nachweisbar ist (Pai & Mors 1978; Takao *et al.* 1984). Dieses Peptid wurde als hitzestabiles Enterotoxin Yst identifiziert, das im Darm die Guanylat-Cyclase aktiviert und damit für den typischen wässrigen Durchfall bei einer Infektion mit *Y. enterocolitica* verantwortlich ist (Delor & Cornelis 1992). *Y. pseudotuberculosis* besitzt dieses Enterotoxin nicht (Pai & Mors 1978), deshalb tritt bei einer Infektion auch kein wässriger Durchfall auf.

A.2.1.2 Das Invasin Inv

Da die Aufnahme von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* in der Regel oral über kontaminierte Lebensmittel erfolgt (Bottone 1997), wird zunächst der Darm kolonisiert. Von dort können die Erreger über die M-Zellen in die darunter liegenden Peyer'schen Plaques einwandern (Hanski *et al.* 1989), woraufhin die Disseminierung in die mesenterialen Lymphknoten und über das Lymphsystem in Leber und Milz erfolgt. Für die Wechselwirkung mit dem Darmepithel spielt unter anderem das äußere Membranprotein Inv (Invasin) eine große Rolle. Inv wird nur von *Y. pseudotuberculosis* (Isberg *et al.* 1987) und *Y. enterocolitica* produziert (Miller & Falkow 1988). In *Y. pestis* ist das *inv* Gen durch die Insertion eines IS-Elements inaktiviert (Simonet *et al.* 1996). Inv interagiert spezifisch mit β 1-Integrinen (Isberg & Leong 1990) auf der Oberfläche von M-Zellen und vermittelt so die Transzytose in die Peyer'schen Plaques (Pepe & Miller 1993). *In vitro* wird Inv bei 23-27°C exprimiert (Isberg *et al.* 1988), während *in vivo* die Expression bei 37°C durch die hohe Osmolarität im Darm angeregt wird (Pepe *et al.* 1995). Vermutlich ist Inv bei der Initiierung der Infektion wichtig (Isberg 1990). Dennoch ist Inv für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* nicht essentiell (Pepe *et al.* 1995).

A.2.1.3 Das Membranprotein Ail

Ein weiterer chromosomal kodierter Virulenzfaktor für die Adhäsion an Wirtszellen ist Ail (Attach-invasion locus). Das membranassoziierte Protein Ail kann unabhängig von Inv die Internalisierung in verschiedene Zelltypen ermöglichen (Miller & Falkow 1988). Die maximale Expression von Ail wird bei 37°C beobachtet (Pierson & Falkow 1993). Dennoch ist es ebenso wie Inv für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* nicht essentiell (Pepe *et al.* 1995). Im Gegensatz zu Inv spielt es wohl bei der Initiierung der Infektion keine große Rolle, sondern ist hauptsächlich für die extrazelluläre Disseminierung von Bedeutung (Isberg 1990). Ail vermittelt außerdem neben YadA Serumresistenz von *Y. enterocolitica*, die die Erkennung durch den Membranangriffskomplex (MAC) der Komplementantwort verhindert (Bliska & Falkow 1992).

A.2.1.4 Die Myf Fibrillen

Fibrillen werden temperatur- und pH-abhängig auf der Zelloberfläche pathogener *Yersinia*-Stämme exprimiert (Diaz *et al.* 1985; Lindler *et al.* 1990; Iriarte & Cornelis 1995). *Y. enterocolitica* bildet 2 μ M lange Myf („mucoid Yersinia factor“-Fibrillen (Iriarte *et al.* 1993). Die Fibrillen sind ein Polymer, aufgebaut aus 21 kDa großen MyfA Untereinheiten (Iriarte *et al.* 1993). Diese Untereinheiten sind zu 44 % identisch zum Antigen pH 6 aus *Y. pestis* (Crumpton & Davies 1957; Lindler *et al.* 1990) und Psa aus *Y. pseudotuberculosis* (Yang *et al.* 1996). Sowohl das pH 6 Antigen als auch Psa können die Adhärenz an rote Blutkörperchen und unter bestimmten Bedingungen an Epithelzellen vermitteln

(Lindler *et al.* 1990; Yang *et al.* 1996). Soto und Hultgren (1999) haben gezeigt, dass das pH 6 Antigen zu einer Klasse von Adhäsinen gehört, die über einen Chaperon/Usher-Weg sekretiert und assembliert werden. Darüber hinaus konnte die Expression des pH 6 Antigens in Makrophagen nachgewiesen werden (Lindler *et al.* 1990). Dies ist konsistent mit der Annahme, dass sich *Y. pestis* innerhalb des Makrophagen in einem Phagolysosom mit saurem pH befindet. Die genaue Bedeutung der Fibrillen für die Pathogenität ist aber unklar.

A.2.2 Plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren

Das für die Virulenz aller drei *Yersinia*-Spezies essentielle pYV Plasmid kodiert für den Hauptteil an Virulenzfaktoren (Cornelis *et al.* 1989b; Straley *et al.* 1993). Dabei ist vor allem der Typ III Sekretionsapparat zu nennen, der die innere und äußere Membran durchspannt und für den Transport der Effektoren unerlässlich ist. Außerdem von großer Bedeutung sind die Yop(*Yersinia* outer protein)-Effektoren, die im Wirt verhindern, dass die angeborene Immunantwort auf die Infektion aufmerksam wird und dass der Erreger durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) und Makrophagen phagozytiert wird (Rosqvist *et al.* 1988; Rosqvist *et al.* 1990; Forsberg *et al.* 1994; China *et al.* 1994; Fallman *et al.* 1995; Ruckdeschel *et al.* 1996; Hueck 1998; Cornelis 1998). Typ III Sekretionssysteme (T3SS) werden von vielen gramnegativen Pflanzen- und Tierpathogenen verwendet, um Effektorproteine in das Zytoplasma von Wirtszellen zu translokieren und so der Immunantwort zu entgehen. Neben den drei humanpathogenen *Yersinia*-Spezies wird dieses System von den human- und tierpathogenen Gattungen *Bordetella*, *Chlamydia* und *Shigella* verwendet. Auch enteropathogene und enterohämorrhagische *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella enterica* nutzen ein oder mehrere Typ III Sekretionssysteme. Bei Pflanzenpathogenen wird das System u.a. in den Gattungen *Xanthomonas* und *Rhizobium* und in *Pseudomonas syringae* genutzt (Troisfontaines & Cornelis 2005). Besonders der Aufbau des äußerst komplexen Translokationsapparates ist zwischen den Spezies stark konserviert. Die größte Variabilität liegt bei den ins Wirtszellzytoplasma translozierten Effektoren, da sie dem entsprechenden Wirt und den Infektionsbedingungen angepasst werden (Hueck 1998; Tampakaki *et al.* 2004). Aufgrund der großen Ähnlichkeit des membrandurchspannenden Translokationsapparates der T3SS zum Flagellenapparat wurde zunächst postuliert (Aizawa 2001), dass das Flagellensystem der Vorläufer des T3SS ist (Macnab 1999; Nguyen *et al.* 2000). Genomanalysen von Gophna *et al.* (2003) deuten hingegen auf eine parallele Entwicklung beider Systeme aus einem gemeinsamen Vorläufer hin.

In Abbildung 1 ist das 70 kb große pYV Plasmid mit allen bisher identifizierten und potentiellen Genen dargestellt. Insgesamt liegen auf dem Plasmid ca. 70 Gene, von denen 25 Proteine für den Aufbau des Sekretionsapparates notwendig sind. Weitere 15 Gene kodieren für Proteine, die durch den Typ III Sekretionsapparat transportiert werden. Sechs von diesen Proteinen wurden als Effektorproteine charakterisiert, die dazu beitragen, Immunzellen zu paralisieren. Des Weiteren werden die Gene für sieben Chaperone der Typ III Sekretion von dem Plasmid kodiert, die meist in Operons mit den Sekretionssubstraten/Effektorproteinen kodiert sind, denen sie als Chaperon dienen.

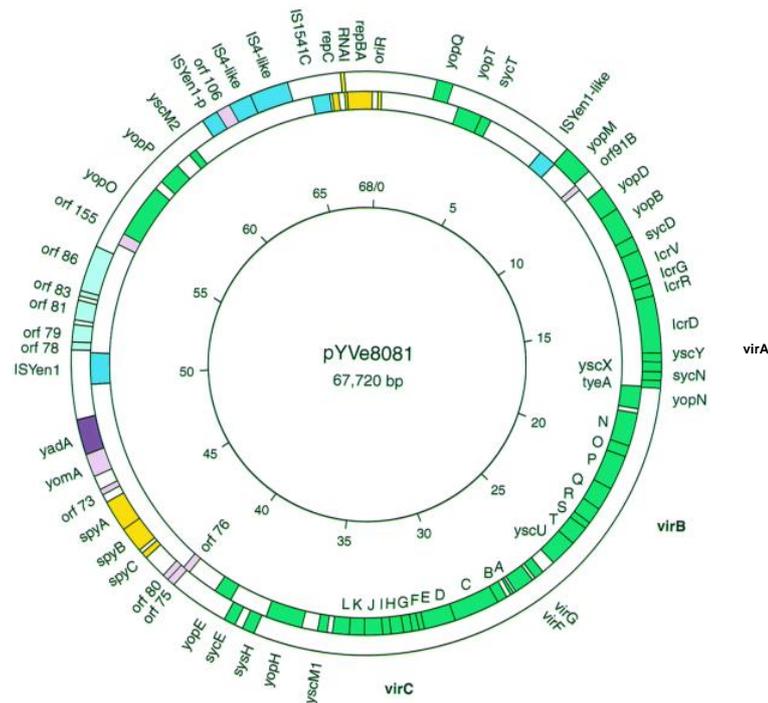


Abbildung 1: Plasmidkarte des pYV Plasmids aus *Y. enterocolitica* 8081 (mod. nach Snellings *et al.*(2001)).

Die Transkription der Gene im äußeren Ring erfolgt gegen den Uhrzeigersinn, die im inneren Ring im Uhrzeigersinn. Die Gene des *yop*-Regulons sind grün dargestellt und *yadA* lila. Gene, die an der Replikation beteiligt sind, sind gelb markiert. Die Funktion rosa markierter Gene ist bislang unbekannt, wobei das Genprodukt von *orf155* inzwischen als das Chaperon SycO identifiziert wurde (Letzelter *et al.* 2006). Potentielle neue Gene sind hellblau und IS-Elemente dunkelblau dargestellt.

A.2.2.1 Der Typ III Sekretionsapparat

Der Sekretionsapparat von *Y. enterocolitica* wird durch vier Operons auf dem pYV Plasmid kodiert: *virA*, *virB*, *virC* und *virG* (Abbildung 1). Der Ysc(Yop secretion)-Apparat besteht aus einem basalen Teil, der das Peptidoglycan und die innere und äußere Membran durchspannt (Kubori *et al.* 1998), dem sich eine nadelähnliche Struktur anschließt (Hoicyk & Blobel 2001). Aufgrund dieser Nadelstruktur wird der Typ III Sekretionsapparat auch als Injektisom bezeichnet. Die Expression aller T3SS-Gene erfolgt temperaturabhängig und führt bei 37°C zur Bildung von etwa 50-100 Nadeln auf der Bakterienoberfläche (Hoicyk & Blobel 2001). Die Nadel hat eine Länge von 60-80 nm, einen

inneren Durchmesser von ca. 25 Å und wird aus 200-300 kDa großen YscF Nadel-Proteinen gebildet, die zu einer helikalen Struktur polymerisieren (Hoiczyk & Blobel 2001). Die Länge der Nadel wird durch YscP bestimmt, das als „molekulares Maßband“ fungiert (Journet *et al.* 2003). Den Abschluss der Nadel bilden mehrere LcrV-Moleküle, die möglicherweise als Grundgerüst für YopD und YopB dienen, welche eine Pore in der Wirtszellmembran bilden (Mueller *et al.* 2005). Der basale Bereich des Translokationsapparates von *S. flexneri* und *S. enterica* Serotyp *Typhimurium* konnte detailliert mittels Kryo-Elektronenmikroskopie dargestellt werden und zeigt eine zylinderähnliche Struktur aus zwei Ringen, die die Membranen durchspannen (Blocker *et al.* 2001; Marlovits *et al.* 2004). In diesen Darstellungen konnte erstmals ein Kanal von 2-3 nm Länge gezeigt werden, der den basalen Bereich durchspannt (Blocker *et al.* 2001). Man vermutet, dass durch diesen Kanal und die Nadel die Effektorproteine in die Wirtszelle transloziert werden. YscQ bildet wahrscheinlich einen multimeren Ring, der die Basis des Injektisoms darstellt (Morita-Ishihara *et al.* 2006). YscQ interagiert mit der ATPase YscN (Jackson & Plano 2000), die als Energielieferant der Typ III Sekretion dient (Woestyn *et al.* 1994). Für die ATPase InvC aus *S. enterica* Serotyp *Typhimurium* wurde gezeigt, dass sie unter ATP-Hydrolyse Chaperon/Substrat-Komplexe auflöst und die Substrate entfaltet (Akedo & Galan 2005). YscQ interagiert außerdem mit YscL, das seinerseits mit der ATPase YscN wechselwirkt (Blaylock *et al.* 2006). Der Ring in der inneren Membran wird aus ~ 24 Untereinheiten des hochkonservierten Lipoproteins YscJ gebildet, das vermutlich auf der Außenseite der inneren Membran lokalisiert ist (Crepin *et al.* 2005; Yip *et al.* 2005b). Des Weiteren sind die Proteine YscD (Plano & Straley 1995), YscR (Fields *et al.* 1994), YscS, YscT, YscU (Allaoui *et al.* 1994) und YscV (Plano & Straley 1993) Teil der basalen Struktur des Injektisoms. Ihre exakte Lokalisierung und Stöchiometrie ist aber nicht geklärt. Das Sekretin YscC bildet einen Doppelring aus 12-14 YscC Monomeren mit einer Masse von ~ 1 MDa, der die äußere Membran und das Peptidoglycan durchspannt (Plano & Straley 1995; Koster *et al.* 1997; Burghout *et al.* 2004b). Der äußere Durchmesser des Rings beträgt 20 nm (Marlovits *et al.* 2004). Die Oligomerisierung und Einlagerung von YscC in die Membran wird durch das Lipoprotein YscW, das in der äußeren Membran verankert ist, unterstützt (Burghout *et al.* 2004a). In Abbildung 2 sind alle Komponenten des T3SS von *Yersinia* und ihre Lage schematisch dargestellt.

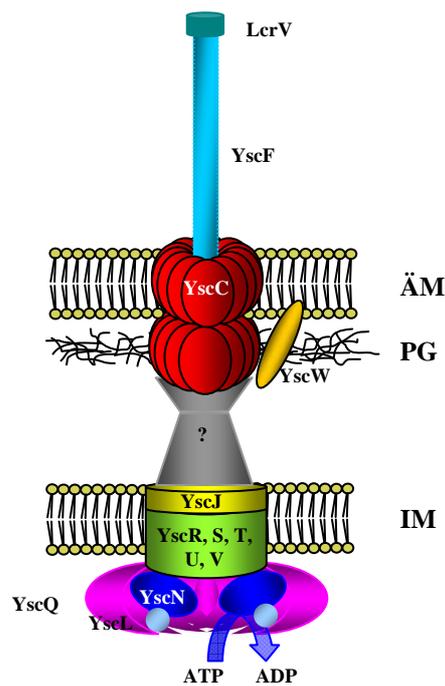


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Typ III Sekretionsapparates von *Yersinia* (mod. nach Cornelis (2006)).

Der basale Teil des Sekretionsapparates ist im Bereich der inneren Membran aus den Proteinen YscR, S, T, U, V und J aufgebaut, in der äußeren Membran bildet YscC eine Pore. Durch Polymerisierung von YscF entsteht die 60-80 nm lange Nadel, durch die Proteine von der Bakterienzelle in die eukaryotische Wirtszelle transportiert werden. LcrV dient an der Nadelspitze vermutlich als Gerüst für die Polymerisierung von YopB, YopD. ÄM: äußere Membran; PG: Peptidoglycan; IM: innere Membran

A.2.2.2 Das Adhäsın YadA

YadA (*Yersinia* Adhäsın A) ist das einzige plasmidkodierte Adhäsın (Bolin & Wolf-Watz 1984; Balligand *et al.* 1985). YadA bildet in der äußeren Membran ein 200 kDa großes Oligomer, das an eine Vielzahl von Zielstrukturen bindet. Zunächst wurde YadA als Protein beschrieben, das bei 37°C auf der Zelloberfläche der Erreger Fibrillen ausbildet (Lachica *et al.* 1984; Kapperud & Namork 1987). Inzwischen weiß man, dass YadA den Prototyp einer neuen Klasse von nicht-fimbrillären Adhäsinen darstellt, die als oligomere „coiled coil“-Familie der Adhäsine bezeichnet wird (Roggenkamp *et al.* 2003). Durch die Zusammenlagerung von drei YadA-Molekülen entstehen Trimere mit einer charakteristischen „Lollipop“-Struktur bestehend aus Kopf, Hals, Stiel und Membrananker (Hoiczky *et al.* 2000). Die Kristallstruktur des Kopf- und Halsbereichs zeigt, dass der Kopf aus β -Strängen besteht, die sich im Trimer zu einer linksgerichteten β -Rolle zusammenlagern (Nummelin *et al.* 2004). Koretke *et al.* (2006) haben ein Modell für den Stiel und Anker erstellt, in dem sie den Stiel als rechtsgerichtete „coiled coil“-Struktur beschreiben. Der Anker besteht ebenfalls aus einer „coiled coil“-Struktur, die von vier β -Strängen umgeben ist (Koretke *et al.* 2006). Diese Ankerregion bewirkt den Transport des N-terminalen Segments (Kopf und Stiel) an die Oberfläche (Autotransporter) (Roggenkamp *et al.* 2003). Neben einer direkten Bindung von YadA an extrazelluläre Matrixproteine wie

Kollagen, Laminin und Fibronectin (Heesemann & Grüter 1987; Emody *et al.* 1989; Schulze-Koops *et al.* 1992; Schulze-Koops *et al.* 1993; Flugel *et al.* 1994; Skurnik *et al.* 1994) wurde auch eine indirekte Bindung an β -Integrine beschrieben (Eitel & Dersch 2002). Außerdem ist YadA daran beteiligt, die Phagozytose der Yersinien zu unterbinden (Heesemann & Laufs 1985; Heesemann & Grüter 1987; Rosqvist *et al.* 1988). Anders als Inv und Ail ist YadA für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* essentiell (Pepe *et al.* 1995; Roggenkamp *et al.* 1995). Neben Ail trägt YadA außerdem zur Serumresistenz von *Y. enterocolitica* bei (Martinez 1989; Pilz *et al.* 1992).

A.2.2.3 Die Yop-Effektoren

Bisher wurden sechs Yop(*Yersinia* outer protein)-Effektorproteine identifiziert, die es den pathogenen Yersinien ermöglichen, der angeborenen Immunantwort des Wirts zu entgehen: YopH, YopE, YopT, YopO/YpkA, YopP/J und YopM (Cornelis 2002; Aepfelbacher *et al.* 2007; Trosky *et al.* 2008). Nach Translokation in die Wirtszelle entfaltet sich ihre Wirkung durch das Eingreifen in zelluläre Signalkaskaden und Zytoskelettlagerungen.

Bei dem von Guan & Dixon (1990) als Protein-Tyrosinphosphatase (PTPase) identifizierten Effektor YopH handelt es sich um eine der aktivsten bekannten PTPasen (Zhang *et al.* 1992). Der N-Terminus des Proteins beinhaltet das Sekretionssignal und die Bindungsstelle für das Chaperon SycH (Wattiau *et al.* 1994; Sory & Cornelis 1994). Der C-Terminus ähnelt eukaryotischen Tyrosinphosphatasen mit einem Phosphat-bindenden Loop (Guan & Dixon 1991). YopH verhindert den „oxidativen Burst“ von Makrophagen (Bliska & Black 1995) und dephosphoryliert Proteine des fokalen Adhäsionskomplexes (z.B. FAK, p130^{Cas}), um der Phagozytose entgegen zu wirken (Hamid *et al.* 1999). Der YopH Effekt ist nach Translokation in die Wirtszelle innerhalb weniger Sekunden nachweisbar (Andersson *et al.* 1996; Anderson *et al.* 1999).

Neben YopH wirken auch YopE, YopT und YopO/YpkA anti-phagozytisch. Alle drei Yops interagieren mit monomeren GTPasen der Rho-Familie. Zu den Mitgliedern dieser Gruppe eukaryotischer GTPasen gehören Rho, Rac und Cdc42. Sie kontrollieren Zytoskelettlagerungen und Signaltransduktionswege. Essentiell für ihre Funktion ist eine Verankerung an der Innenseite der Plasmamembran durch einen Prenyl-Rest am C-Terminus der GTPasen. YopE wirkt als GTPase aktivierendes Protein (GAP), das Rho, Rac und Cdc42 durch Hydrolyse des GTP in ihre GDP-bindende inaktive Form konvertiert (Black & Bliska 2000; Pawel-Rammingen *et al.* 2000; Andor *et al.* 2001). YopT hat einen stark depolymerisierenden Effekt auf Aktin (Iriarte & Cornelis 1998), da es zur Freisetzung von Rho GTPasen von der Plasmamembran führt (Zumbihl *et al.* 1999; Sorg *et al.* 2001). YopT ist eine Cysteinprotease, die von Rho, Rac und Cdc42 den C-terminalen Geranyl-Geranyl-Cysteinrest abspaltet (Shao *et al.* 2002). *In vivo* wird allerdings nur RhoA inaktiviert (Aepfelbacher *et al.* 2003). YopO (YpkA in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) ist eine autophosphorylierende Serin/Threonin-Kinase (Galyov *et al.* 1993), die ebenfalls die Dynamik des Zytoskeletts moduliert (Hakansson *et al.* 1996a).

YopO bindet an die GTPasen RhoA und Rac1, wirkt aber nicht als GAP (Dukuzumuremyi *et al.* 2000; Barz *et al.* 2000). Es interferiert vermutlich mit der für die Phagozytose nötigen Signaltransduktionskaskade, die über Galphaq kontrolliert wird (Navarro *et al.* 2007).

Bei YopP (YopJ in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) handelt es sich um eine Acetyltransferase (Mukherjee *et al.* 2006), die in Makrophagen (Monack *et al.* 1997; Mills *et al.* 1997) und dendritischen Zellen (DCs) (Erfurth *et al.* 2004) den programmierten Zelltod auslöst, nicht aber in anderen Zelltypen (Monack *et al.* 1997; Mills *et al.* 1997). Es blockiert die proinflammatorische Reaktion, indem es die Aktivierung von NF- κ B verhindert (Schesser *et al.* 1998; Boland & Cornelis 1998; Ruckdeschel *et al.* 1998). Dadurch wird die Freisetzung des Tumornekrosefaktors α (TNF α) durch Makrophagen (Boland & Cornelis 1998) und von Interleukin 8 (IL-8) aus Epithel- (Schesser *et al.* 1998) und Endothelzellen (Denecker *et al.* 2002) unterbunden. Darüber hinaus inhibiert es die Aktivierung der MAP Kinasen JNK, p38, ERK1 und ERK2 (Ruckdeschel *et al.* 1997; Boland & Cornelis 1998; Palmer *et al.* 1998). Des Weiteren verhindert YopP durch die Inhibition des MAPK-Wegs die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB („cAMP-response-binding“), der an der Immunantwort beteiligt ist (Meijer *et al.* 2000). Vermutlich ist die Ursache für die apoptotischen Vorgänge in Makrophagen der Verlust der NF- κ B (Ruckdeschel *et al.* 2001) und der MAP Kinase Aktivität (Zhang *et al.* 2005).

Der Effektor YopM ist stark anionisch und enthält 13-20 leucinreiche Wiederholungssequenzen (LRRs). Vier YopM Monomere bilden einen Zylinder mit einem inneren Durchmesser von 35 Å (Evdokimov *et al.* 2001a). YopM ist ein essentieller Virulenzfaktor bei der Infektion von Mäusen (Mulder *et al.* 1989; Leung *et al.* 1990). In der Wirtszelle wandert es über den vesikelassoziierten Transport in den Nukleus (Skrzypek *et al.* 1998; Benabdillah *et al.* 2004). YopM beeinflusst die angeborene Immunantwort und führt zur Depletion von NK-Zellen (Kerschen *et al.* 2004). Außerdem interagiert YopM mit den Kinasen RSK1 und PRK2, die beim Zellzyklus von Bedeutung sind (McDonald *et al.* 2003). Dies ist konsistent mit der Entdeckung, dass YopM die Expression von Genen beeinflusst, die für den Zellzyklus und das Wachstum wichtig sind (Sauvonnet *et al.* 2002). Die Bedeutung der kürzlich beschriebenen Interaktion mit Alpha1-Antitrypsin (AAT) dagegen ist völlig unklar (Heusipp *et al.* 2006).

A.2.2.4 Die Chaperone

Chaperone sind an Faltungsprozessen und an der Aggregationsinhibition von Proteinen beteiligt. Diese Funktionen spielen auch für die Erhaltung der Transportfähigkeit von Proteinen bei der Translokation über Membranen eine Rolle. Den meisten Proteintransportsystemen, unter die auch das Flagellensystem fällt, kann man eigene spezifische Chaperone zuordnen. SecB dient beispielsweise im Sec-abhängigen Transport als Chaperon (Driessen 2001) und FliS, FliT und FlgN sind Chaperone des Flagellensystems. All diesen Chaperonen ist gemeinsam, dass sie keine ATPase Aktivität besitzen.

Typische Merkmale der Chaperone von Typ III Sekretionssystemen ist ihre geringe Molekularmasse (~ 15 kDa), ein saurer isoelektrischer Punkt (pI) und die Bindung an die N-terminale Chaperonbinde-domäne (CBD) ihres zugehörigen Substrats. Alle bekannten Chaperone des Typ III Sekretionssystems bilden darüber hinaus Homo- oder Heterodimere. Die Chaperone des Flagellensystems binden ihre Substrate am C-Terminus und liegen als Monomere vor (Evdokimov *et al.* 2003). Bisher wurden in *Yersinia* fünf Chaperon/Effektor-Paare und das Chaperon/Translokator-Paar identifiziert: SycE/YopE, SycT/YopT, SycH/YopH, SycO/YopO und SycD/YopB/YopD (Syc für specific yop chaperone). Für die Effektoren YopP und YopM wurde bisher kein spezifisches Chaperon identifiziert. Neben den Chaperonen für die Effektoren gibt es weitere spezifische Chaperone für andere Komponenten des T3SS. YscE/YscG dienen als Chaperone für das Nadelprotein YscF (Day *et al.* 2000; Sun *et al.* 2008), SycN/YscB als Chaperone für den Regulator YopN (Day & Plano 1998) und SycH bindet neben YopH auch an YscM1 und YscM2 (Cambronne *et al.* 2000).

Parsot *et al.* (2003) haben die Chaperone der T3SS in verschiedene Klassen eingeteilt. Klasse I-Chaperone assoziieren mit einem (Klasse IA; z.B. *Yersinia* SycE) oder mehreren (Klasse IB; z.B. *Shigella* Spa15) Effektoren. Klasse II-Chaperone (z.B. *Yersinia* SycD) binden die zwei Translokatoren. Die Chaperone des Flagellensystems stellen eine eigene Klasse dar (Klasse III; z.B. *Salmonella* FliS). Wilharm *et al.* (2007) haben dieses System aufgrund neuer Erkenntnisse durch hochauflösende Strukturen um zwei weitere Klassen ergänzt: Klasse IV, die CesA aus *E. coli* beinhaltet (Yip *et al.* 2005a), und Klasse V, die YscE aus *Yersinia* und PscE aus *Pseudomonas* umfasst (Phan *et al.* 2005; Quinaud *et al.* 2007). Klasse I-Chaperone haben untereinander nur geringe Homologie was die Aminosäuresequenz betrifft, bilden aber dennoch sehr ähnliche Sekundärstrukturen. Alle bisher kristallisierten Chaperone dieser Gruppe bilden Homodimere, wobei die Monomere aus drei α -Helices und fünf antiparallel angeordneten β -Faltblättern bestehen: SycE (Birtalan & Ghosh 2001; Evdokimov *et al.* 2002; Trame & McKay 2003), SycH aus *Yersinia* (Phan *et al.* 2004), SicP (Stebbins & Galan 2001) und SigE (Luo *et al.* 2001) aus *Salmonella*, CesT aus *E. coli* (Luo *et al.* 2001), AvrPphF aus *Pseudomonas* (Singer *et al.* 2004) und Spa15 aus *Shigella* (van Eerde *et al.* 2004). Ausnahmen bilden SycT, das nur zwei α -Helices besitzt (Locher *et al.* 2005; Büttner *et al.* 2005), und das einzige Heterodimer SycN/YscB (Schubot *et al.* 2005). Erst kürzlich sind die Strukturen von drei völlig anders gefalteten T3SS-Chaperonen entschlüsselt worden: das Klasse II-Chaperon SycD (Büttner *et al.* 2008) und YscG (Sun *et al.* 2008) aus *Yersinia* und das homologe PscG aus *Pseudomonas* (Quinaud *et al.* 2005). YscG bildet mit seinem Kochaperon YscE einen Komplex, um die vorzeitige Polymerisation des Nadelproteins YscF zu unterbinden. SycD und YscG gehören zur Familie der Proteine mit Tetratricopeptid-Motiv (TPR) (Pallen *et al.* 2003; Sun *et al.* 2008), einem Motiv, das häufig bei Protein-Protein-Interaktionen mitwirkt und in Proteinen aller drei Domänen von Lebewesen vorkommt (D'Andrea & Regan 2003). Das TPR-Motiv besteht aus etwa 34 Aminosäuren, die ein „helix-turn-helix“-Motiv bilden (Hirano *et al.* 1990; Sikorski *et al.* 1990). Die Sequenz von SycD enthält drei TPR-Motive (Pallen *et al.* 2003), die an beiden Seiten von einer weiteren α -Helix flankiert werden (Büttner *et al.* 2008).

Damit bildet das Klasse II-Chaperon eine komplett andere Struktur als alle bisher bekannten Klasse I-Chaperone. YscG enthält drei aufeinanderfolgende TPR-Motive und zusätzlich eine weitere α -Helix (Sun *et al.* 2008). Auch YscE bildet Dimere und ist ein α -helikales Protein (Phan *et al.* 2005), gehört aber nicht zur Familie der TPR-Proteine.

Die Funktion der T3SS-Chaperone ist vielfältig. In einigen Fällen stabilisieren Chaperone die Effektorproteine. Der Effektor YopE wird beispielsweise nur in geringen Mengen synthetisiert und transloziert, wenn sein Chaperon SycE fehlt (Frithz-Lindsten *et al.* 1995; Woestyn *et al.* 1996; Cheng & Schneewind 1999). In anderen Fällen können Chaperone auch als Anti-Aggregationsfaktoren fungieren. Möglicherweise wird die Anlagerung von LcrV an den YopB/YopD-Komplex durch Bindung des Chaperons SycD verhindert (Holmström *et al.* 2001). Darüber hinaus sinkt die Sekretion der meisten Effektoren ohne ihr Chaperon stark ab (Wattiau *et al.* 1994). Dies hat zu der Hypothese geführt, dass die Chaperone ihre Substrate zum Sekretionsapparat leiten (Wattiau & Cornelis 1993; Feldman & Cornelis 2003). Sie könnten ein dreidimensionales Sekretionssignal für die Typ III Sekretion darstellen und gleichzeitig die Reihenfolge der Transportsubstrate festlegen (Birtalan *et al.* 2002). Unterstützt wird diese These durch die Tatsache, dass alle anti-phagozytotisch wirkenden Yops, die schnell in die Wirtszelle transportiert werden müssen, mit einem Chaperon assoziiert sind. Außerdem sind die Chaperone an der Regulation der Typ III Sekretion beteiligt. So exprimiert eine *lcrH* Deletionsmutante (*sycD* in *Y. enterocolitica*) konstitutiv Yops, was vermuten lässt, dass LcrH/SycD an einem negativen Rückkopplungsmechanismus zur Regulation der Yop-Synthese beteiligt ist (Francis *et al.* 2001). Eine *sycH* Mutante synthetisiert und sezerniert deutlich weniger Yops, während die Überexpression von *sycH* einen Anstieg der produzierten und sezernierten Yop-Menge bewirkt (Cambronne *et al.* 2000). Die Überexpression von SycO dagegen führt zu einer Verminderung der sezernierten Yop-Menge (Dittmann *et al.* 2007). Ein weiterer Hinweis auf den regulatorischen Einfluss der Chaperone liefern die Interaktionen von SycH (Cambronne *et al.* 2004), SycO (Dittmann *et al.* 2007), SycD (Swietnicki *et al.* 2004; Schmid *et al.* 2006) und SycE (Swietnicki *et al.* 2004) mit den Regulatoren der Typ III Sekretion YscM1 und YscM2 (Cambronne *et al.* 2000).

A.3 Die Sekretion und Translokation der Effektoren

A.3.1 Das Sekretionssignal

Normalerweise benötigen Substrate für die spezifische Sekretion bzw. Translokation über Membranen durch eine Transportmaschine Signalsequenzen, die meist während des Sekretionsvorgangs abgespalten werden. Im Fall der Typ III Sekretion ist der Mechanismus, der die Typ III Substrate für das T3SS determiniert, nicht völlig geklärt. Im Vergleich zu anderen Protein-Sekretionssystemen konnte in der Aminosäuresequenz der T3SS-Substrate keine Konsensussequenz oder ein strukturelles Motiv iden-

tifiziert werden, das als Erkennungssequenz dient. Daher wurde diese Problematik in den vergangenen Jahren sehr kontrovers diskutiert. Sicher ist lediglich, dass sich ein Signal innerhalb der ersten ~ 15 Codons der mRNA oder Aminosäuren befindet. So kann ein YopE₁₋₁₅-Fusionsprotein sezerniert (Sory *et al.* 1995; Schesser *et al.* 1996; Anderson & Schneewind 1997), nicht aber transloziert werden (Sory *et al.* 1995; Boyd *et al.* 2000). Ähnliche Ergebnisse existieren auch für YopH, YopQ und YopN von *Yersinia* und Proteine von *Salmonella* oder *P. syringae* (Sory *et al.* 1995; Mudgett *et al.* 2000; Ramamurthi & Schneewind 2002; Rüssmann *et al.* 2002; Ramamurthi & Schneewind 2003; Goss *et al.* 2004). Von den Sekretionssignalen in YopE, YopN und YopQ wurde gezeigt, dass sie trotz einer Verschiebung des Leserasters und damit einer dramatischen Veränderung der Aminosäuresequenz funktionell bleiben (Anderson & Schneewind 1997; Anderson *et al.* 1999; Ramamurthi & Schneewind 2003). Diese Ergebnisse deuten auf ein Sekretionssignal auf mRNA-Ebene hin. Andere Daten weisen jedoch auf ein Signal auf Proteinebene hin. So kann eine Verschiebung des Leserasters bei einer YopE₁₋₁₂-Fusion die Sekretion verhindern (Lloyd *et al.* 2001b). Darüber hinaus verhindert ein umfangreicher Austausch von Nukleotiden, der zu einer Veränderung der mRNA-Sequenz, nicht aber der N-terminalen Aminosäuresequenz führt, die Sekretion des Proteins nicht (Lloyd *et al.* 2001b). Außerdem erwies sich eine Sequenz, die für alternierende Serine und Isoleucine von Position zwei bis acht von YopE kodiert, als ausreichend, um als Sekretionssignal zu dienen (Lloyd *et al.* 2001b). Ähnliches konnte für weitere synthetische Peptide gezeigt werden (Lloyd *et al.* 2002). Bisher konnte weder für das Protein-basierte Sekretionssignal noch für das mRNA-Signal eine Konsensussequenz ermittelt werden. Möglich wäre daher auch eine Kombination aus Signalen auf Protein- und mRNA-Ebene (Sorg *et al.* 2005).

Auch im Flagellen-T3SS (fT3SS) ist die potentielle Natur des Sekretionssignals nicht endgültig geklärt. Zum einen existieren Daten, dass ein 173 bp langer nicht-translatierter Bereich stromaufwärts des Gens für Flagellin den Transport einiger Proteine vermitteln kann (Majander *et al.* 2005). Dies würde auf ein mRNA-basiertes Signal hindeuten. Andererseits deuten Deletionsanalysen von FliC und FliK in *E. coli* auf ein proteinbasiertes Signal hin (Kuwayama *et al.* 1989; Minamino *et al.* 1999). Weber-Sparenberg *et al.* (2006) konnten das Sekretionssignal von FlgD für das fT3SS innerhalb der ersten 71 Aminosäuren lokalisieren. Zusätzlich wurden Mutationen am N-Terminus von FlgD eingeführt, die den Leserahmen verschieben und damit die Aminosäuresequenz dramatisch verändern, während die Nukleotidsequenz nahezu unangetastet bleibt (Weber-Sparenberg *et al.* 2006). Diese Mutationen führen zu einem deutlichen Absinken der Sekretionseffizienz von FlgD (Weber-Sparenberg *et al.* 2006). Die Analyse von Mutanten mit Basenaustauschen deutet ebenfalls auf ein proteinbasiertes Signal im fT3SS hin (Weber-Sparenberg *et al.* 2006). Neben dem mRNA- und proteinbasierten Sekretionssignal wird sowohl im T3SS als auch im fT3SS die Bindung des Chaperons an das Yop als mögliches dreidimensionales Sekretionssignal diskutiert (Lloyd *et al.* 2001a; Birtalan *et al.* 2002; Weber-Sparenberg *et al.* 2006). Dieses Signal könnte gleichzeitig die Reihenfolge der Sekretionssubstrate festlegen, da die Chaperon/Substrat-Komplexe unterschiedliche dreidimensionale

Struktur annehmen (Birtalan *et al.* 2002). In *Salmonella* wurde gezeigt, dass die Chaperone einiger Effektoren wichtig sind, um die Spezifität der Sekretionssubstrate für das T3SS zu vermitteln (Lee & Galan 2004). In Abwesenheit der entsprechenden Chaperone wurden die Effektoren über das fT3SS exportiert (Lee & Galan 2004).

A.3.2 Die Sekretion der Effektoren über den Typ III Sekretionsapparat

Bei der Kultivierung von Yersinien in Abwesenheit eukaryotischer Zellen kann die Sekretion von Yops bei 37°C artifiziell durch die Depletion von Ca^{2+} -Ionen ausgelöst werden (Heesemann *et al.* 1983; Heesemann *et al.* 1986; Michiels *et al.* 1990). Es wird vermutet, dass der Sekretionsapparat in Anwesenheit von Ca^{2+} durch YopN, LcrG und TyeA blockiert wird (Forsberg *et al.* 1991; Sarker *et al.* 1998; Iriarte *et al.* 1998). Durch die Chelatierung von Ca^{2+} wird YopN freigesetzt und in die Wirtszelle transloziert, so dass der Sekretionskanal frei wird und der Transport der Effektorproteine beginnt (Forsberg *et al.* 1991; Rosqvist *et al.* 1994; Boland *et al.* 1996; Lee *et al.* 1998).

Der natürliche Stimulus für die Yop-Translokation ist der Kontakt mit einer eukaryotischen Wirtszelle (Rosqvist *et al.* 1994; Pettersson *et al.* 1996). Für die Translokation der Effektoren spielen LcrV und die Translokatoren YopD und YopB eine wichtige Rolle (Sory & Cornelis 1994; Rosqvist *et al.* 1994; Persson *et al.* 1995; Hakansson *et al.* 1996b; Pettersson *et al.* 1999; Holmström *et al.* 2001). YopD und YopB enthalten potentielle Transmembrandomänen (Hakansson *et al.* 1993) und binden LcrV (Sarker *et al.* 1998). Hakansson *et al.* (1996b) konnten zeigen, dass Yersinien eine YopB- und kontaktabhängige lytische Aktivität auf Schaferthozyten haben. Aufgrund der Fähigkeit von YopB und YopD Poren in der Zellmembran zu bilden, wird vermutet, dass so die Yops in die Wirtszelle transloziert werden (Tardy *et al.* 1999; Neyt & Cornelis 1999a). Bereits geringe Mengen YopB und YopD sind für die Translokation von Effektorproteinen ausreichend (Edqvist *et al.* 2007). LcrV ist für die korrekte Einlagerung von YopD und YopB in die Zielmembran wichtig (Cornelis & Wolf-Watz 1997; Goure *et al.* 2005). Vermutlich bestimmt LcrV die Größe der Pore (Holmström *et al.* 2001). Dies ist konsistent mit den Ergebnissen von Müller *et al.* (2005), dass LcrV an der Nadelspitze einen Komplex bildet und damit das Grundgerüst für den Aufbau der Pore bilden könnte. Darüber hinaus wurde auch beschrieben, dass LcrV, YopD und YopB in die Wirtszelle transloziert und ins Medium sezerniert werden (Lee & Schneewind 1999; Lee *et al.* 2000). In Abbildung 3 ist schematisch ein Modell des Ysc-Apparates für die Yop-Sekretion dargestellt.

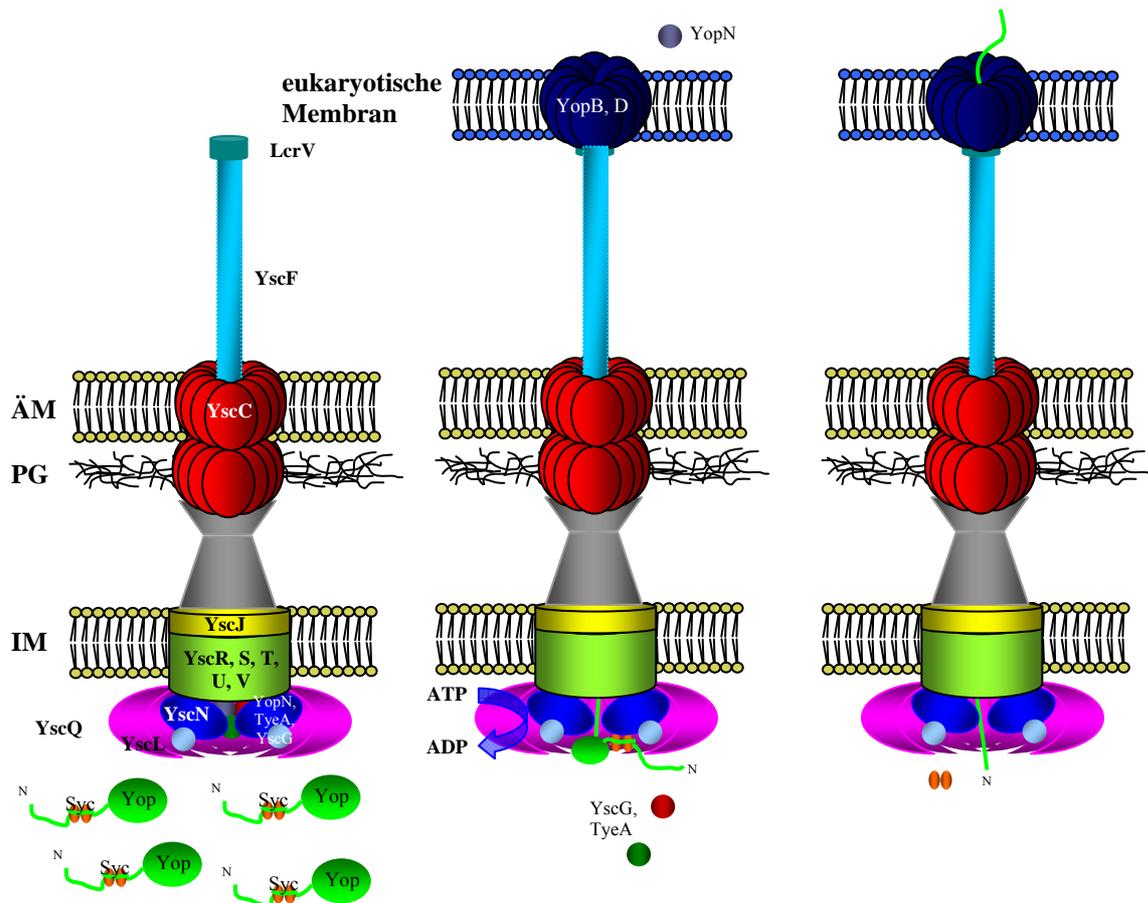


Abbildung 3: Modell für die Substraterkennung und der Proteinsekretion durch den Typ III Sekretionsapparat.

Die N-Termini der meisten Yop-Effektoren binden vor Initiierung des Sekretionsvorgangs gebunden an ihr zugehöriges Chaperondimer vor. Bei Kontakt des Sekretionsapparates mit einer Wirtszelle wird mit Hilfe von LcrV, YopB, YopD eine Pore in der Wirtszellmembran gebildet. Außerdem wird die Blockade des Sekretionskanals durch YscG, YopA, YopN aufgehoben. Der Chaperon/Effektor-Komplex kann nun mit Komponenten des Transportkanals interagieren und die ATPase YscN entfernt unter ATP-Hydrolyse das Chaperon vom Yop. Anschließend erfolgen die Entfaltung und der Transport des Yops in die Wirtszelle. Dort faltet sich der Effektor wieder in seine natürliche Konformation und übt seine Funktion aus.

A.3.3 Die Energie für die Typ III Sekretion

Die meisten Sekretionsapparate über Membranen haben ihre eigene spezifische ATPase. Beim *Yersinia* T3SS ist das YscN (Jackson & Plano 2000), von der bereits gezeigt wurde, dass sie unter anderem ein wichtiger Energielieferant der Typ III Sekretion ist (Woestyn *et al.* 1994). In *S. enterica* Serotyp *Typhimurium* ist die ATPase InvC dafür verantwortlich, dass unter ATP-Hydrolyse Chaperon/Substrat-Komplexe aufgelöst und die Substrate entfaltet werden (Akeda & Galan 2005). Der Transport über Membranen erfordert neben einer ATPase auch die protonenmotorische Kraft (PMF) (Alder & Theg 2003). In *Yersinia* wurde gezeigt, dass das Protonophor CCCP innerhalb weniger Sekunden die Typ III Sekretion unterbindet (Wilharm *et al.* 2004). Dafür ist vermutlich die ΔpH Komponente der PMF verantwortlich (Wilharm *et al.* 2007). Es wäre möglich, dass eine intakte PMF vor allem dafür notwendig ist, dass der Transportkanal geöffnet bleibt. Alternativ könnte der Einstrom von

Protonen in eine Proteinbewegung nach außen übersetzt werden. Mögliche Kandidaten für diese Funktion sind integrale Membranproteine der inneren Membran, die direkt mit dem Exportsubstrat interagieren können (Wilharm *et al.* 2007). Vom τ T3SS weiß man, dass die Membranproteine FlhA und FlhB, die homolog zu YscV und YscU von *Yersinia* sind, mit Sekretionssubstraten wechselwirken (Minamino & Macnab 2000). Obwohl bisher keine direkte Interaktion mit Substraten gezeigt werden konnte, ist YscU ähnlich wie FlhB am Wechsel der Substratspezifität beteiligt (Edqvist *et al.* 2003). Für das τ T3SS wurde postuliert, dass die zytoplasmatischen Domänen von FlhA und FlhB mit dem ATPase/Substrat-Komplex wechselwirken und so die Funktion der PMF und ATPase koordinieren (Minamino & Macnab 2000). Kürzlich wurde von zwei Arbeitsgruppen nahezu zeitgleich gezeigt, dass für den Export von Substraten über das τ T3SS vor allem die PMF und weniger die ATPase von Bedeutung ist (Paul *et al.* 2008; Minamino & Namba 2008). Dies macht deutlich, dass die ATPase für den Sekretionsvorgang an sich entbehrlich ist und ihre Funktion vermutlich vor allem darin besteht die Sekretion zu beschleunigen. Minamino und Namba (2008) schlagen vor, dass die Entfaltung und Translokation der Sekretionssubstrate ausschließlich durch die PMF erfolgt, während die ATPase FliI das Andocken und Einfädeln der Sekretionssubstrate an den Exportapparat unterstützt und ATP-Hydrolyse nur erforderlich ist, um einerseits die Freisetzung des Substrats von der ATPase und andererseits die Freisetzung der ATPase vom Exportapparat zu vermitteln. Dadurch würde der Transportkanal wieder in eine transportkompetente Form überführt werden (Minamino & Namba 2008). Da das N-terminale Exportsignal im nativen Protein ungefaltet ist, wäre die ATPase für den Andockprozess und den Eintritt in den Exportkanal nicht unbedingt erforderlich, sondern diene lediglich dazu die Sekretionseffizienz zu steigern (Minamino & Namba 2008). Galan (2008) gibt allerdings zu bedenken, dass weder Minamino und Namba (2008) noch Paul *et al.* (2008) ausschließen können, dass eine andere Entfaltungsmaschine das Fehlen von FliI kompensiert oder gar das Fehlen von FliI und FliH, das vermutlich den Transportkanal in Abwesenheit von FliI blockiert, eine weniger restriktive Selektion der Sekretionssubstrate zur Folge hat. Aus diesen Gründen sind weitere Studien notwendig, um zu klären in welchem Umfang PMF und ATP-Hydrolyse an welchen Schritten des Sekretionsvorgangs beteiligt sind (Galan 2008).

A.4 Regulation der Typ III Sekretion

A.4.1 Kontrolle durch Temperatur und das Flagellen Typ III Sekretionssystem

Die Expression der Gene auf dem pYV Virulenzplasmid wird temperaturabhängig reguliert. Bei einer Erhöhung der Wachstumstemperatur von 27°C auf 37°C wird das T3SS aktiviert (Cornelis *et al.* 1986; Cornelis *et al.* 1987b). Der Transkriptionsfaktor VirF, der spezifisch bei 37°C exprimiert wird, steuert die Transkription des *yop*-Regulons (Cornelis *et al.* 1989a; Wattiau & Cornelis 1994). Dadurch wird die Expression des Sekretionsapparates und der Effektorproteine induziert. VirF gehört zur Familie

der AraC-Transkriptionsregulatoren, die in vielen gramnegativen Bakterien zu finden sind (Cornelis *et al.* 1989a; Gallegos *et al.* 1993). Die Aktivität von VirF wird durch das Protein YmoA (*Yersinia* moulator) beeinflusst, das einige histonähnliche Merkmale aufweist (Cornelis *et al.* 1991; Rohde *et al.* 1994). Neben VirF ist für den Beginn der Transkription eine Konformationsänderung der DNA im Bereich der *yop*-Promotoren bei 37°C erforderlich (Lambert *et al.* 1992; Rohde *et al.* 1994; Rohde *et al.* 1999). Es wird vermutet, dass YmoA an diesem Vorgang beteiligt ist, indem es bei Temperaturen unter 30°C an den Promotorbereich VirF-sensitiver Gene und anderer thermoregulierter Gene bindet (Rohde *et al.* 1994). Darüber hinaus aktiviert YmoA die Expression des Transkriptionsregulators RovA (Heroven *et al.* 2007), der wiederum die Transkription des *inv*-Gens, das für das Yersinia Invasins (Inv) kodiert, reguliert (Heroven & Dersch 2006). Dieser Einfluss von YmoA auf RovA wird über RovM vermittelt (Heroven *et al.* 2007), das die Transkription von *rovA* negativ reguliert (Heroven & Dersch 2006).

Außerdem ist bekannt, dass *Y. enterocolitica* nur bei Temperaturen unter 30°C beweglich ist, also Flagellen bildet, während das T3SS erst bei 37°C exprimiert wird. Eine temperaturabhängige Regulation verschiedener Flagellengene konnte in *Yersinia* bereits vor über 10 Jahren gezeigt werden und es wurde vermutet, dass FliA diese Temperatursensitivität vermittelt (Kapatral & Minnich 1995; Kapatral *et al.* 1996). An der Spitze der Hierarchie für die Transkription der Flagellengene befindet sich das *flhDC*-Operon, das für zwei Transkriptionsaktivatoren kodiert, die für die Expression aller anderen Flagellengene notwendig sind (Bartlett *et al.* 1988). Um eine mögliche regulatorische Verknüpfung zwischen Flagellensystem und *yop*-Regulon zu überprüfen, haben Bleves *et al.* (2002) eine *flhDC* Mutante überprüft. In dieser Mutante war neben *virF* das *yop*-Regulon hochreguliert, d.h. sowohl Transkription als auch Sekretion stiegen bei 37°C im Vergleich zum Wildtyp an und erfolgten auch bei Raumtemperatur. Dies lässt vermuten, dass FlhD und/oder FlhC oder ein Genprodukt stromabwärts von *flhDC* das *yop*-Regulon reprimiert (Bleves *et al.* 2002). Es wurde postuliert, dass FlhD/FlhC über einen bisher unbekanntem Faktor die Expression von *ymoA* induzieren, das wiederum das Virulenzplasmid in einer für die RNA-Polymerasen nicht zugänglichen Form hält (Bleves *et al.* 2002). Vor kurzem wurde gezeigt, dass FliA neben der positiven Regulation von Klasse III Genen des Flagellums einen negativ-regulatorischen Einfluss auf plasmidkodierte Virulenzgene (*yadA*, *virC*, *YopQ*) hat (Horne & Prüß 2006). Bei FliA handelt es sich um einen alternativen δ -Faktor (Ohnishi *et al.* 1990; Iriarte *et al.* 1995). Dabei wird der negative Einfluss von FliA vermutlich über eine direkte Bindung von FliA an den Promotor des Transkriptionsaktivators VirF vermittelt (Horne & Prüß 2006). In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigt eine *fliA* Mutante eine verringerte Temperaturabhängigkeit der Expression von fT3SS- und T3SS-Genen (Horne & Prüß 2006). Damit trägt FliA vermutlich zu der inversen Temperaturregulation der fT3SS- und T3SS-Gene bei. Außerdem tragen FlhD/FlhC und FliA zur Expression des frühen Virulenzgens *inv* auf dem Chromosom (Young *et al.* 2000) und von *yplA* auf dem pYV Plasmid bei (Schmiel *et al.* 2000).

A.4.2 Regulation durch die „Low calcium response“ (Lcr)

Wird die Wachstumstemperatur von virulenten *Yersinia*-Stämmen von 27°C auf 37°C erhöht, verlangsamt sich die Vermehrung von *Y. enterocolitica*. Die Vermehrungsinhibition ist bei *Y. pestis* am stärksten ausgeprägt und nimmt über *Y. pseudotuberculosis* nach *Y. enterocolitica* ab (Carter *et al.* 1980). Außerdem wird die verlangsamte Vermehrung von der Synthese und Sekretion von Yops begleitet (Brubaker 1983; Straley *et al.* 1993). Als Ursache für die Vermehrungsinhibition wurde die massive Produktion von Effektorproteinen vermutet (Zahorchak *et al.* 1979; Ramamurthi & Schneewind 2002). Die Vermehrungsinhibition und die Yop-Sekretion können durch Supplementierung des Mediums mit Ca²⁺-Ionen unterbunden werden (Kupferberg & Higuchi 1958; Higuchi *et al.* 1959; Brubaker & Surgalla 1964). Dieser Phänotyp wird als „Low calcium response“ (Lcr) bezeichnet. Neben Ca²⁺-Ionen können auch Ionen wie Sr²⁺ oder Zn²⁺ (Kupferberg & Higuchi 1958; Higuchi *et al.* 1959; Brubaker & Surgalla 1964) oder Glutamat, Aspartat und Natriumhydrogencarbonat (Delwiche *et al.* 1959; Surgalla *et al.* 1964) die beschriebenen Phänomene aufheben. Es wurde postuliert, dass die Lcr als negativer Rückkopplungsmechanismus dient, der die *yop*-Transkription nur erlaubt, wenn die Typ III Sekretion induziert wurde (Forsberg & Wolf-Watz 1988; Forsberg *et al.* 1991). Da die Ca²⁺-Konzentration im eukaryotischen Zytoplasma sehr niedrig ist, wurde postuliert, dass das niedrige Ca²⁺-Signal während der Infektion als physiologischer Induktor der Typ III Sekretion dient (Lee *et al.* 2001). Der Lcr-Phänotyp ist spezifisch für virulente Stämme und mit der Anwesenheit eines intakten Virulenzplasmids assoziiert (Ben Gurion & Shafferman 1981; Ferber & Brubaker 1981; Portnoy *et al.* 1983; Yother *et al.* 1986). Wie die Wachstumskontrolle mit der Expression und Sekretion der Effektorproteine koordiniert wird, ist nicht bekannt.

A.4.3 Die Regulatoren LcrQ/YscM1 und YscM2

Während bei 37°C in Ca²⁺-haltigem Medium die Yop-Sekretion komplett unterbunden wird und die Yop-Expression nur in geringem Maß erfolgt, wird die Expression der Komponenten des Sekretionsapparates nicht beeinflusst. Dem oben erwähnten von Cornelis *et al.* (1987a) postulierten negativen Rückkopplungsmechanismus, der die Yop-Expression bei nicht funktionsfähigem Sekretionsapparat kontrolliert, konnte mit der Charakterisierung von LcrQ in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* erstmals ein möglicher Regulator zugeordnet werden (Pettersson *et al.* 1996). In *Y. enterocolitica* gibt es mit YscM1 und YscM2 zwei homologe Proteine zu LcrQ, die vermutlich aus einer Genduplikation hervorgegangen sind (Stainier *et al.* 1997). In anderen Typ III Sekretionssystemen konnten bisher keine Homologe zu LcrQ/YscM1 und YscM2 identifiziert werden. LcrQ/YscM1 und YscM2 sind kleine Proteine von 13 kDa. LcrQ ist zu 99 % mit YscM1 identisch. Die Identität von YscM1 und YscM2 liegt bei 57 % (Stainier *et al.* 1997). Trotz der hohen Homologie der beiden Proteine liegt der isoelektrische Punkt (pI) von YscM1 bei 6,05 und der pI von YscM2 bei 9,79. Bei 37°C werden in

einer *lcrQ* Mutante in Gegenwart von Ca^{2+} Yops überproduziert (Rimpiläinen *et al.* 1992), während die Deletion von *yscM1* oder *yscM2* alleine in *Y. enterocolitica* keine Deregulierung verursacht (Stainier *et al.* 1997). Erst die Deletion beider *yscM* Kopien führt auch in *Y. enterocolitica* zu dem in der *Y. pseudotuberculosis lcrQ* Mutante beobachteten Phänotyp, der durch die Sekretion von LcrV und YopD in Anwesenheit von Ca^{2+} gekennzeichnet ist (Stainier *et al.* 1997). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden YscM1 und YscM2 als funktionell gleichwertig eingestuft (Stainier *et al.* 1997). Die Überproduktion von LcrQ, YscM1 oder YscM2 hat die Repression der Transkription der *yop*-Gene zur Folge (Rimpiläinen *et al.* 1992; Stainier *et al.* 1997). LcrQ, YscM1 und YscM2 wirken folglich konzentrationsabhängig auf die Yop-Expression. Cambronne *et al.* (2004) konnten außerdem zeigen, dass die letzten 35 bzw. 36 Aminosäuren von YscM1 bzw. YscM2 essentiell für die negative Regulation der Yop-Synthese sind. Darüber hinaus können alle drei Proteine über das T3SS sezerniert, aber auch in die Wirtszelle transloziert werden (Pettersson *et al.* 1996; Stainier *et al.* 1997; Cambronne *et al.* 2000; Cambronne *et al.* 2004). Dies legt die Vermutung nahe, dass bei funktionsfähigem Sekretionsapparat LcrQ bzw. YscM1 und YscM2 aus dem bakteriellen Zytoplasma entfernt werden und dadurch die Inhibition der Yop-Expression aufgehoben wird (Cambronne *et al.* 2004).

Alle drei Proteine zeigen eine hohe Homologie zum N-Terminus des Effektors YopH (Rimpiläinen *et al.* 1992; Stainier *et al.* 1997). Bei YopH befindet sich in diesem homologen Bereich das Sekretionssignal und die Chaperonbindedomäne für SycH (Cambronne *et al.* 2000; Cambronne *et al.* 2004). Dadurch können LcrQ/YscM1 und YscM2 ebenfalls mit dem Chaperon SycH interagieren (Wattiau *et al.* 1994; Sory *et al.* 1995) und durch einen chaperonabhängigen Mechanismus in Wirtszellen transloziert werden. Die Bindung von LcrQ/YscM1 und YscM2 an das Chaperon SycH verhindert gleichzeitig die Repression der Yop-Synthese. Übereinstimmend damit führt die Überexpression von SycH ebenso wie die Deletion von *lcrQ* bzw. *yscM1/yscM2* zu einem Ca^{2+} -blinden Phänotyp (Cambronne & Schneewind 2002).

A.4.4 Das *lcrGVH-YopBD*-Operon

Für den negativen Rückkopplungsmechanismus sind neben LcrQ/YscM1 und YscM2 weitere plasmidkodierte Faktoren nötig (Stainier *et al.* 1997). Als essentielle Interaktionspartner für die Regulation des durch LcrQ/YscM1 und YscM2 wurden YopD und sein Chaperon LcrH (SycD in *Y. enterocolitica*) identifiziert (Rimpiläinen *et al.* 1992; Williams & Straley 1998). Obwohl eine Regulation auf Transkriptionsebene vermutet wird (Rimpiläinen *et al.* 1992), konnte keine direkte Bindung von LcrQ/YscM1 und YscM2 an Nukleinsäuren gezeigt werden. Cambronne und Schneewind (2002) postulieren daher einen Mechanismus, bei dem bei 37°C ein Komplex aus YopD, SycD, YscM1 und YscM2 entsteht, wobei YopD die Bindung des Komplexes an *yop*-mRNA vermittelt. Sobald die Sekretion durch den Kontakt mit der Wirtszelle induziert wird, wird YopD transloziert, dadurch kann die *yop*-mRNA abgelesen werden und somit die Synthese der Effektorproteine

beginnen. Eine andere Theorie ist, dass LcrQ zusammen mit seinem Chaperon SycH das Eintreten der Yops in den Sekretionskanal durch Bindung an das innere Kanalprotein LcrG kontrolliert (Wulff-Strobel *et al.* 2002). Dies wiederum wäre konsistent mit der Hypothese, dass die Chaperone den Effektoren eine Sekretionshierarchie auferlegen (Boyd *et al.* 2000).

Der genaue Regulationsmechanismus bleibt aber nach wie vor unklar und es zeichnet sich immer mehr ab, dass der Mechanismus sehr komplex reguliert ist. In den vergangenen Jahren konnten nicht nur für LcrQ/YscM1 und YscM2 neue Interaktionspartner identifiziert werden (Swietnicki *et al.* 2004; Dittmann *et al.* 2007; diese Arbeit), sondern auch die Bedeutung der Chaperone für die Regulation der Typ III Sekretion wird immer deutlicher (Francis *et al.* 2001; Wulff-Strobel *et al.* 2002; Cambronne *et al.* 2004; Dittmann *et al.* 2007).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Mutante in *lcrG* in Anwesenheit von Ca^{2+} Yops sezerniert, d.h. dass sie einen Ca^{2+} -blinden Phänotyp hat (Skryzpek & Straley 1993). Es wird jedoch vermutet, dass LcrG direkt mit dem Sekretionsapparat wechselwirkt. Es wurde die Theorie aufgestellt, dass der Sekretionsapparat in Anwesenheit von Ca^{2+} durch YopN, LcrG und TyeA blockiert wird (Forsberg *et al.* 1991; Sarker *et al.* 1998; Iriarte *et al.* 1998). Da LcrG im Zytoplasma lokalisiert ist, könnte LcrG den zytoplasmatisch gelegenen Bereich des Sekretionskanals blockieren, während YopN/TyeA tiefer im Kanal einen Block bilden (Nilles *et al.* 1997). Der YopN/TyeA-LcrG Komplex wird dann auf die Ca^{2+} -Depletion oder ein geeignetes *in vivo* Signal hin entfernt und die Translokation der Effektorproteine kann stattfinden (Abbildung 3).

Eine *lcrV* Mutante unterscheidet sich dagegen signifikant von anderen Mutanten im *lcrGVH-YopBD*-Operon, da sie konstitutiv auf Transkriptionsebene die Yop-Expression unterbindet (Price *et al.* 1991; Bergman *et al.* 1991). Die Yop-Sekretion dagegen bleibt Ca^{2+} -abhängig (Skryzpek & Straley 1995). Da LcrV einen stabilen Komplex mit LcrG bildet, lautet eine Theorie, dass LcrV durch Bindung an LcrG die negative Wirkung von LcrG auf die Yop-Sekretion verhindert (Nilles *et al.* 1997).

A.4.5 YscY und YscX – zwei weitere Regulatoren der Typ III Sekretion?

Die Analyse von Mutanten in *yscX* oder *yscY* zeigte, dass YscY und YscX an der Yop-Sekretion beteiligt sind (Iriarte & Cornelis 1999). Sowohl die *yscX* als auch die *yscY* Mutante sezerniert unter permissiven Bedingungen keine Yops und dieser Mechanismus ist unabhängig von YopN (Iriarte & Cornelis 1999). YscY bildet vermutlich über „coiled-coiled“-Wechselwirkungen einen Komplex mit YscX (Day & Plano 2000). YscX wird in den Kulturüberstand sezerniert und YscY besitzt typische Eigenschaften von T3SS-Chaperonen (13 kDa, pI 6,5), weshalb postuliert wurde, dass YscY das Chaperon von YscX darstellt (Day & Plano 2000). Außerdem weisen Daten von Iriarte und Cornelis (1999) darauf hin, dass YscY und YscX ein Teil des Sekretionsapparates sind. Darüber hinaus könnte die Interaktion von YscY mit LcrH (SycD in *Y. enterocolitica*) auf einen weiteren Aspekt der Regulation der Typ III Sekretion hindeuten (Bröms *et al.* 2005).

A.5 Verknüpfung zwischen Stoffwechsel und Virulenz bei Pathogenen

Bereits vor 50 Jahren wurde bei *Yersinia* erstmals ein Zusammenhang von Virulenz und Stoffwechsel beschrieben und als Phänotyp der „Low calcium response“ (Lcr) definiert (Kupferberg & Higuchi 1958; Higuchi *et al.* 1959). Virulente *Y. pestis* Stämme werden bei 37°C in ihrer Vermehrung gehemmt (Higuchi *et al.* 1959). Für dieses Phänomen ist das Virulenzplasmid, das für die Komponenten des Typ III Sekretionssystems kodiert, notwendig (Gemski *et al.* 1980; Portnoy *et al.* 1984; Portnoy & Martinez 1985). Es ist bisher jedoch nicht gelungen auf molekularer Ebene eine Interaktion zwischen Virulenz und Stoffwechsel nachzuweisen. Da die Wachstumsinhibition bei *Yersinia* durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat aufgehoben werden kann (Delwiche *et al.* 1959), wurde eine Beteiligung der CO₂-Fixierung am Lcr-Phänotyp in Erwägung gezogen. CO₂ kann über die Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) zu Oxalacetat umgesetzt werden (anaplerotische Reaktion). Fowler und Brubaker (1994) betonen speziell für *Y. pestis* die Bedeutung der CO₂-Fixierung über Oxalacetat, da *Y. pestis* nicht über das Enzym Aspartase verfügt (Dreyfus & Brubaker 1978). Im Gegensatz dazu können *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* L-Aspartat über die Aspartase, Fumarase oder Malatdehydrogenase abbauen und so den Oxalacetatpool regenerieren (Dreyfus & Brubaker 1978). Diese metabolischen Unterschiede sind konsistent mit der unterschiedlich starken Inhibition der Vermehrung von *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* (Carter *et al.* 1980).

In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise zur Verknüpfung zwischen Stoffwechsel und Virulenz pathogener Mikroorganismen. So konnte von Munoz-Elias und McKinney (2006) gezeigt werden, dass sich der Metabolismus von Pathogenen während der Infektion und unter *in vitro* Bedingungen grundlegend unterscheidet. Darüber hinaus konnte für die Typ III Sekretion in *Pseudomonas* (Dacheux *et al.* 2002; Rietsch *et al.* 2004; Rietsch & Mekalanos 2006), aber auch für das nahe verwandte Flagellensystem von *Salmonella* gezeigt werden (Kim & Surette 2004; Wang *et al.* 2004), dass der metabolische Status der Zelle mit der Regulation des entsprechenden Systems verknüpft ist. Außerdem ist die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) des Pflanzenpathogens *Agrobacterium tumefaciens*, die die Bildung von Phosphoenolpyruvat (PEP) aus Oxalacetat katalysiert, für die Ausbildung der vollen Virulenz des Erregers von Bedeutung (Liu *et al.* 2005).

A.6 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung verschiedener Regulatorproteine des Typ III Sekretionssystems, die ein regulatorisches Netzwerk bilden könnten. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die pYV-kodierten Proteine des T3SS YscM1 und YscM2 von *Y. enterocolitica* gelegt werden, die in einer vorangegangenen Promotion als Interaktionspartner der Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) identifiziert worden waren (Neumayer 2005). Bisher galten die YscM Proteine als funktionell äquivalente negative Regulatoren der Typ III Sekretion. Da sich die isoelektrischen Punkte der Pro-

teine jedoch deutlich voneinander unterscheiden (YscM1: 6,05, YscM2: 9,79), wäre eine unterschiedliche Entwicklung bezüglich ihrer Wirkung auf die PEPC denkbar. Daher sollte die Bedeutung der Interaktion von YscM1 und YscM2 mit der PEPC unter strukturellen, kinetischen und zellbiologischen Aspekten untersucht werden. Dies sollte dazu beitragen ein besseres Verständnis der Wechselwirkung der PEPC mit den YscM Proteinen einerseits und der Bedeutung dieser Wechselwirkung während der Infektionssituation andererseits zu erhalten. Darüber hinaus sollten die Chaperone des *Y. enterocolitica* Typ III Sekretionssystems (T3SS) auf eine Beteiligung an der Regulation des Stoffwechsels überprüft werden. Da von einigen T3SS-Chaperonen zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannt war, dass sie mit YscM1 und/oder YscM2 interagieren (Swietnicki *et al.* 2004; Cambronne *et al.* 2004), sollte ein Einfluss dieser Wechselwirkung auf die Interaktion der YscM Proteine mit der PEPC überprüft werden. Außerdem sollten weitere T3SS-Chaperone auf eine Interaktion mit den YscM Proteinen hin untersucht werden. Das Chaperon SycD sollte zusätzlich für biochemische und kristallographische Ansätze gereinigt werden, da keine hochauflösende Struktur von SycD zur Verfügung stand. Da SycD ebenfalls an der Regulation der Typ III Sekretion beteiligt ist und eine Vielzahl von T3SS-assoziierten Proteinen zu seinen Wechselwirkungspartnern zählt, sollten diese Studien außerdem zum besseren Verständnis der regulatorischen Funktion von SycD beitragen. Weiter sollten YscY und YscX untersucht werden, die ebenfalls zu den Regulatoren der Typ III Sekretion zählen. Von YscY wurde postuliert, dass es sich um das Chaperon von YscX handelt (Day & Plano 2000). Darüber hinaus können die Proteine in das komplexe Typ III-Interaktom eingegliedert werden, da YscY neben YscX auch SycD zu seinen Interaktionspartnern zählt. Neben der Strukturaufklärung sollten biochemische Ansätze verwendet werden, um eine Charakterisierung der Proteine und ihrer Interaktionspartner *in vitro* zu ermöglichen.

B MATERIAL UND METHODEN**B.1 Material****B.1.1 Geräte**

In Tabelle 1 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Geräte	Modell	Firma
Analysenwaage	R160P, Pt 1200	Sartorius, Göttingen
Blot-Apparatur	Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Brutschrank	INP-500	Memmert, Schwabach
	Typ B20	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern für PAGE	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad, München
	SE400	Hofer Scientific, San Francisco
Elektroporationsgerät	GenePulser II	Bio-Rad, München
	ECM399	BTX (Genetronics), San Diego
	Pulse Controller II	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammern für Agarosegele		Kreutz
French Press	French Pressure Cell 40K	SLM Aminco, Silver Springs
Filmentwickler	Fujifilm FPM-100A	Fuji, Düsseldorf
Fermenter	Biostat B 5l	B. Braun Biotech, Melsungen
Gel-Dokumentation	GelDoc EQ	Bio-Rad, München
Heizblock	Typ 50126101	Liebisch, Bielefeld
Lyophilie	Christ Loc-1m Alpha 1-4	Christ, Osterode am Harz
Mikroskop	Olympus BX61 (Kamera: Olympus U-CMAD3)	Olympus, Hamburg
	Leitz DMRBE (Kamera: Leitz DMRD)	Leica, Wetzlar
Mikrowelle	KOC-985TBA	Daewoo Electronics, Butzbach
Mixer	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
PCR-Cycler	GeneAmp, PCR System 2400	Perkin Elmer, Waltham
	Unocycler	VWR, Darmstadt
pH-Meter	pH 211	Hanna Instruments, Kehl
Photometer	Ultraspec 3100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg
Pipetten	Pipetman P10-P1000	Gilson, Bad Camberg
Ultraschallbad	Sonorex RK 100H	Bandelin, Berlin
Schüttelinkubator	Certomat BS-1	B. Braun Biotech, Melsungen
	Excella E24	New Brunswick, Nürtingen
Proteinreinigungssystem	SMART™ System	Amersham Pharmacia Biotech, München
	ÄKTA Explorer	Amersham Pharmacia Biotech, München
Spannungsquellen	Power Pac 300	Bio-Rad, München

Sterilwerkbank	Herasafe HS 12	Heraeus, Hanau
Transilluminator	UVT-20M/W	Herolab, Wiesloch
Waage	Kern KB, Kern PLS 10-3	Kern & Sohn, Balingen
Wasserbad	WB7	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	3K30, 1K15, 112	Sigma, Osterode
	Varifuge 3.OR	Heraeus, Hanau
	Sorvall RC5C	Kendro, Langenselbold

B.1.2 Bezugsquellen für Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien und Antibiotika über die Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Fluka (Buchs), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck Biosciences (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Enzyme wurden bei Gibco BRL (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt am Main) gekauft. Verwendete Nährmedien wurden von der Firma Difco Becton Dickinson (Detroit) und Zellkulturmedien und deren Zusätze von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Standardantikörper stammten von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Becton Dickinson (Detroit), Dianova (Hamburg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Nitrozellulose-Membran wurde von Schleicher & Schüll (Dassel) bezogen und Plastikverbrauchsmaterial von den Firmen Brand (Wertheim), Eppendorf (Hamburg), Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden). Konzentratoren stammten von Vivascience (Hannover). D-TubesTM zur Dialyse von Proteinproben wurden von Novagen (Darmstadt) bezogen.

Spezielle Chemikalien und Biochemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Tabelle 2: Bezugsquellen für Chemikalien

Chemikalie	Firma
Agar	Becton Dickinson, Detroit
Agarose	Genaxxon, Biberach
Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Benzonase	Merck Biosciences, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
BSA	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
BugBuster	Novagen, Darmstadt
Carboxypeptidase B	Roche Diagnostics, Mannheim
Dithiobis (DSP)	Perbio Science, Bonn
DMSO	Merck Biosciences, Darmstadt
dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Enterokinase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Ethylene Glycol-bis (EGS)	Perbio Science, Bonn
Faktor-Xa	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Hefeextrakt	MP Biomedicals; Eschwege
HEPES	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
Protease (Newlase) Typ XVIII	Sigma, Taufkirchen

PreScission Protease	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Primer	biomers.net, Ulm
Protease Subtilisin	Sigma, Taufkirchen
Protease Typ XIII	Sigma, Taufkirchen
Protease X	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Invitrogen, Karlsruhe
Protogel (Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %))	Serva, Heidelberg
Sulfo-EGS	Perbio Science, Bonn
Thrombin	Amersham Biosciences, Freiburg
Tween 20	AppliChem, Darmstadt

B.2 Organismen, Plasmide und Primer

B.2.1 Organismen

In Tabelle 3, Tabelle 4 und Tabelle 5 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme und Zelllinien aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete *Y. enterocolitica*- und *Y. pseudotuberculosis*-Stämme

Stamm	Relevanter Phäno ^a - bzw. Genotyp	Referenz
<i>Y. enterocolitica</i>		
WA-314	Serotyp 0:8, Biogruppe 1B mit pYV Plasmid, Nal ^r	Heesemann <i>et al.</i> (1984)
WA-C	Plasmid-lostes Derivat von WA-314, Nal ^r	Heesemann <i>et al.</i> (1984)
WA-C Δ inv	inv Mutante von WA-C, Nal ^r , Km ^r	Ruckdeschel <i>et al.</i> (1996)
WA-314 Δ yscM1	yscM1 Mutante von WA-314, Nal ^r , Km ^r	Dittmann <i>et al.</i> (2007)
WA-314 Δ yscM2	yscM2 Mutante von WA-314, Nal ^r , Km ^r	Dittmann <i>et al.</i> (2007)
WA-314 Δ ppc	ppc Mutante von WA-314, Nal ^r , Km ^r	Schmid <i>et al.</i> (2008)
WA-C(pYV-515)	Tn5-Transposoninsertionsmutante von WA-314 in lcrD, Nal ^r , Km ^r	Ruckdeschel <i>et al.</i> (1996)
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		
IP32955	klinisches Isolat, Serotyp 0:1	E. Carniel

^a: Phänotypbezeichnung: Nal^r: Nalidixinresistenz, Km^r: Kanamycinresistenz

Tabelle 4: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Relevanter Phäno ^a - bzw. Genotyp ^b	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ , supE44, Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	Hanahan (1983)
BL21	F ⁻ , ompT, hsdS(r _B ⁻ , m _B ⁻), gal, dcm	Studier & Moffatt (1986)
BL21 (DE3)	F ⁻ , ompT, hsdS(r _B ⁻ , m _B ⁻), gal, dcm, (DE3)	Stratagene, La Jolla
BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ , ompT, hsdS(r _B ⁻ , m _B ⁻), gal, dcm, (DE3), pLysS, Cm ^r	Stratagene, La Jolla

^a: Phänotypbezeichnung: Cm^r: Chloramphenicolresistenz

^b: Genotypbezeichnungen für *E. coli* siehe Bachmann (1990)

Tabelle 5: Verwendete eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Merkmale	Referenz/Bezugsquelle
HeLa	stammt aus einem Zervixkarzinom, (Ursprung: menschlichen Epithelzellen)	Scherer <i>et al.</i> (1953)
J774.A1	murine Makrophagenzelllinie	DSMZ, Braunschweig
P3-X63-Ag8.653	murine Myelomzelllinie mit Stoffwechseldefekt in der Purinbasen-Synthese, durch das Fehlen des Enzyms Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase	DSMZ, Braunschweig

B.2.2 Plasmide

Tabelle 6 und Tabelle 7 geben eine Übersicht über die verwendeten Klonierungs- und Expressionsvektoren und über die rekombinanten Plasmide.

Tabelle 6: Verwendete Vektoren

Plasmid	Relevanter Geno- ^a bzw. Phänotyp ^b	Größe (kb)	Referenz-Quelle
pACYC184	Klonierungsvektor, Cm ^r , Tet ^r	4,2	Chang & Cohen (1978)
pACYC177	Klonierungsvektor, Km ^r , Amp ^r	3,9	Chang & Cohen (1978)
pGEM-T	Klonierungsvektor, <i>lacZ</i> , T7-Promotor, SP6-Promotor, T-Überhang, Amp ^r	3,0	Promega, Mannheim
pMBL-T/A	Klonierungsvektor, fl ori, P _{lac} , T-Überhang, Amp ^r	3,0	Genaxxon, Biberach
pMOSBlue	Klonierungsvektor, <i>lacZ</i> , fl ori, „blunt-end“-Enden, Amp ^r	2,9	Amersham Biosciences, Freiburg
pET-21b	Expressionsvektor, T7-Promotor, C-terminaler His ₆ -, Tag ^{cc} , Amp ^r	5,4	Novagen, Darmstadt
pET-24b	Expressionsvektor, T7-Promotor, C-terminaler His ₆ -, Tag ^{cc} , Km ^r	5,3	Novagen, Darmstadt
pCDF-Duet-1	Expressionsvektor, T7-Promotor, zwei „multiple cloning sites“ (MCS), N-terminaler His ₆ -, Tag ^{cc} an der ersten mcs, C-terminaler S-„Tag“ an der zweiten mcs, Sm ^r	3,9	Novagen, Darmstadt
pGEX-4T-3	Expressionsvektor, <i>gst</i> , Trombin-Schnittstelle, Amp ^r	5,0	Amersham Biosciences, Freiburg
pGEX-6P-3	Expressionsvektor, <i>gst</i> , PreScission TM , Proteaseschnittstelle, Amp ^r	5,0	Amersham Biosciences, Freiburg
pWS	Expressionsvektor, Derivat von pMS470Δ8; über die Schnittstellen <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> wurde ein Linker eingefügt, der durch Hybridisierung der Oligonukleotide pWS-Linker-5'-P und pWS-Linkerkompl-5'-P entstanden ist, <i>oriV</i> , <i>lacI^q</i> -Repressor, P _{lac} , <i>rrnB</i> -Terminator, Amp ^r	4,0	Locher <i>et al.</i> (2005)

^a: Genotypbezeichnung: *lacPOZ*: Promotor, Operator und α-Peptid der β-Galaktosidase aus *E. coli*; siehe Bachmann (1990)

^b: Phänotypbezeichnung: Amp^r: Ampicillinresistenz, Km^r: Kanamycinresistenz, Sm^r: Streptomycinresistenz

Tabelle 7: Rekombinante Plasmide

Plasmid	Relevantes Merkmal ^a	Referenz-Quelle
pGEX-ppc	pGEX-4T-3 mit <i>ppcEcoRI-NotI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	Neumayer (2005)
pGEX-6-yscM1	pGEX-6P-3 mit <i>yscM1EcoRI-NotI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	Wilharm <i>et al.</i> (2003)
pGEX-6-yscM2	pGEX-6P-3 mit <i>yscM2EcoRI-NotI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	Wilharm <i>et al.</i> (2003)
pGEX-6-yopH	pGEX-6P-3 mit <i>yopHBamHI-NotI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	S. Richter
pACYC-ppc	pACYC184 mit <i>ppcXbaI-SalI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Cm ^r	Neumayer (2005)
pWS-yscM1	pWS151 mit <i>yscM1NdeI-SalI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	Neumayer (2005)
pWS-yscM2	pWS151 mit <i>yscM2NdeI-SalI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	S. Richter
pET24b-sycD-His	pET-24b mit <i>sycD-HisNdeI-NotI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Km ^r	Schmid <i>et al.</i> (2006)
pET24b-His-TEV-sycD	pET-24b mit <i>sycD-HisTEVNdeI-NotI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Km ^r	diese Arbeit
pMOS-sycE-His	pMOSBlue mit <i>sycE-HisNdeI-NotI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pET21b-sycE-His	pET-21b mit <i>sycE-HisNdeI-NotI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pWS-yscY	pWS151 mit <i>yscYNdeI-SalI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pWS-yscY-His	pWS151 mit <i>yscY-HisNdeI-SalI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pWS-sycD ₉₋₁₆₃	pWS151 mit <i>sycD₂₅₋₄₈₉NdeI-SalI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pET21b-sycD _{Δ163-168}	pWS151 mit <i>sycD₁₋₄₈₉-HisTEVNdeI-SalI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pET21b-sycD _{Δ2-8}	pWS151 mit <i>sycD₂₅₋₅₀₇-HisTEVNdeI-NotI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pET21b-yscX-His	pET-21b mit <i>yscX-HisNdeI-XhoI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pMBL-yscX-His	pMBL-T/A mit <i>yscX-HisNdeI-XhoI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pET24b-yscX-His	pET-24b mit <i>yscX-HisNdeI-XhoI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Km ^r	diese Arbeit
pCDF-yscX-His	pCDFDuet-1 mit <i>yscX-HisNdeI-XhoI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> in der zweiten mcs, Sm ^r	diese Arbeit
pWS-YopH	pWS151 mit <i>yopHNdeI-SalI</i> PCR-Fragment aus <i>Y. enterocolitica</i> , Amp ^r	diese Arbeit

^a: Phänotypbezeichnung: Amp^r: Ampicillinresistenz, Km^r: Kanamycinresistenz, Sm^r: Streptomycinresistenz

B.2.3 Primer

In Tabelle 8 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer aufgeführt. Verwendet wurden Primer der Firma biomers.net (entsalzt, lyophilisiert und HPLC-gereinigt). Diese wurden in H₂O_{bidest.} gelöst. Die Konzentration der Primer-Stammlösung betrug 100 pmol/μl.

Tabelle 8: Verwendete Primer

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Schnittstelle
SycD_NdeI_for	CATATG CAACAAGAGACGACAGACACTC	<i>NdeI</i>
SycDHis_NotI_rev	GCGGCCGCT CAGTGATGGTGATGGTGATGC GATCCTCTTGGGTTATCAACGAACTCATGTT C	<i>NotI</i>
SycDdelta_NdeI_for	GGCATAG CATATG CAAGAATACCAGCTGGC AATGG	<i>NdeI</i>
SycDdelta_Sall_rev	GTAC GTCGACT CACTCATGTTCCATCTCCTT TTTCA	<i>Sall</i>
SycDHis_TEV_NdeI_for	GGCATAG CATATG CATCACCATCACCATCAC GAAAACCTGTACTTCCAAATGCAACAAGAG ACGACAGACACTC	<i>NdeI</i>
SycDdeltaHis_TEV_NdeI_for	GGCATAG CATATG CATCACCATCACCATCAC GAAAACCTGTACTTCCAAACAAGAATACCAGC TGGCAATGG	<i>NdeI</i>
SycD_NotI_rev	GCGGCCGCT CATGGGTTATCAACGAACTCA TG	<i>NotI</i>
SycD_TEV_BamHI_for	AGGGATCCT GAAAACCTGTACTTCCAAATG CAACAAGAGACGACAGACACT	<i>BamHI</i>
SycE_NdeI_for	CATATG TATTCATTTGAACAAGCTATCAC	<i>NdeI</i>
SycEHis_NotI_rev	GCGGCCGCT CAGTGATGGTGATGGTGATGC GATCCTCTACTAAATGACCGTGGTGGTG	<i>NotI</i>
SycE_XbaI_for	TATCTAGA ATGTATTCATTTGAACAAGCTAT C	<i>XbaI</i>
SycE_HindIII_rev	ATATA AAGCTTT CAGTGATGGTGATGGTGATG CGATCCTCTACTAAATGAGGGTGGTGGTG	<i>HindIII</i>
YscX_NdeI_for	AACGGT CATATG GTGAGTCGCATAATAACT GCCCC	<i>NdeI</i>
YscXHis_XhoI_rev	TCTCTCGAGT CAGTGATGGTGATGGTGATGC GATCCTCTTACTTTGTGCAACAGGTTAAGG	<i>XhoI</i>
YopH_NdeI_for	CATATG AACCTTATCATTAAAGCGATCTTC	<i>NdeI</i>
YopH_Sall_rev	GTCGACTT AGCTATTTAATAATGGTCGCCC	<i>Sall</i>
YscY_NdeI_for	AAAAAAC CATATG AATATTACTTTAACCAAA CGACAAC	<i>NdeI</i>
YscY_XhoI_Sall_rev	ACTCGAGGTCGACT CATGGGGATTCATTAT GATCTTTCAAC	<i>XhoI, Sall</i>
YscY_His_Sall_rev	AGTCGACT CAGTGATGGTGATGGTGATGCG ATCCTCTTGGGGATTCATTATGATCTTTCAAC	<i>Sall</i>
pWS_seq_for	CAGGAAACAGAATTCGAGCTCG	
pWS_seq_rev	GGCTGAAAATCTTCTCTCATCC	
pWS-Linker-5'-P	TATGAAGCTTAGATCTGTCGACGGATC	
pWS-Linkercompl-5'-P	AGCTGATCCGTCGACAGATCTAAGCTTCA	

Bei fettgedruckten Basen handelt es sich um Schnittstellen für Restriktionsenzyme.

B.3 Nährmedien, Antibiotika und Medienzusätze

B.3.1 Nährmedien

Die verwendeten Nährlösungen wurden durch Autoklavieren bei 121°C, 1 bar, 20 min sterilisiert. Feste Nährböden wurden durch den Zusatz von 15 g Agar pro Liter zu der entsprechenden Nährlösung hergestellt. Der Agar wurde durch Erhitzen aufgeschmolzen und in Petrischalen gegossen. Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Medium, die Anzucht von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* in BHI-Medium.

Luria-Bertani(LB)-Medium	10 g Trypton 5 g Hefe 5 g NaCl ad 1 l H ₂ O _{dest} mit NaOH pH auf 7,4 – 7,6 einstellen
Brain-Heart-Infusion (BHI)	37 g BHI ad 1 l H ₂ O _{dest}

Wachstumsversuche, die ein PEPC-abhängiges Wachstum von *Y. enterocolitica* erforderten, wurden in M9-Medium durchgeführt.

M9-Medium	100 ml M9 Salze (autoklaviert) 1 ml 1 M MgSO ₄ 1 ml 0,1 M CaCl ₂ 50 ml 20 % Glukose ad 1 l H ₂ O _{dest} Glukose, MgSO ₄ , CaCl ₂ wurden steril filtriert
M9-Salze (10 x)	75 g Na ₂ HPO ₄ 30 g KH ₂ PO ₄ 10 g NH ₄ Cl 5 g NaCl ad 1 l H ₂ O _{dest}

Als Transformationsmedium wurde reichhaltiges SOC-Medium verwendet.

SOC-Medium	10 g Trypton
	5 g Hefe
	0,3 g NaCl
	0,09 g KCl
	1,02 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	1,23 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	ad 500 ml H ₂ O _{dest.}
	nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 20 mM Glukose (steril filtriert) zugesetzt

B.3.2 Antibiotika und Medienzusätze

In Tabelle 9 sind die verwendeten Antibiotika und Medienzusätze aufgeführt. Antibiotika wurden als Stammlösungen angesetzt, steril filtriert (Sterilfilter der Porengröße 0,22 µm, Millipore, Bedford) und bei -20°C gelagert. Stammlösungen wurden den Nährmedien nach Abkühlen auf weniger als 55°C zugesetzt.

Tabelle 9: Verwendete Antibiotika und andere Zusätze

Zusätze	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Antibiotika			
Ampicillin (Amp)	H ₂ O _{dest.}	10 mg/ml	100 µg/ml
Carbenicillin (Cb)	50 % Ethanol	50 mg/ml	250 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	70 % Ethanol	2 mg/ml	20 µg/ml
Gentamicin (Gm)	H ₂ O _{dest.}	10 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin (Km)	H ₂ O _{dest.}	5 mg/ml	50 µg/ml
Nalidixinsäure (Nal)	0,5 N NaOH	6 mg/ml	60 µg/ml
Spectinomycin (Sp)	H ₂ O _{dest.}	5 mg/ml	50 µg/ml
Streptomycin (Sm)	H ₂ O _{dest.}	100 mg/ml	100 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	70 % Ethanol	2 mg/ml	20 µg/ml
andere Zusätze			
CaCl ₂	H ₂ O _{dest.}	100 mM	0,2 mM, 1 mM
Casaminosäuren	H ₂ O _{dest.}	1 %	0,01 %
EGTA	H ₂ O _{dest.}	500 mM	5 mM
Glukose (¹² C/ ¹³ C)	H ₂ O _{dest.}	20 %	0,1 – 0,2 %
IPTG	H ₂ O _{dest.}	1 M	1 mM
MgCl ₂	H ₂ O _{dest.}	1 M	10 mM
Thiamin	H ₂ O _{dest.}	1 mg/ml	10 µg/ml

B.4 Kultivierung und Stammhaltung von Organismen

B.4.1 Kultivierung von *E. coli* und *Yersinia* sp.

Die Kultivierung von *E. coli* und *Yersinia* sp. erfolgte aerob bei 37°C bzw. 27°C auf Festmedium in einem Brutschrank oder in Flüssigmedium in einem Schüttelinkubator (160-200 rpm), um eine ausreichende Belüftung der Kultur sicherzustellen. Bei Bedarf wurden die Flüssig- und Festmedien mit den entsprechenden Zusätzen versehen (Tabelle 9).

B.4.2 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und Wasser-gesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Medien wurden jeweils mit 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin/Streptomycin-Lösung und 2 mM Glutamin supplementiert. Bevor Zellen mit den Medien in Kontakt kamen, wurden diese auf 37°C vorgewärmt. Die Anzucht erfolgte in 250 ml-Kulturflaschen oder Petrischalen (Ø 10 cm), wobei die Zellen beim Erreichen einer Zelldichte von ca. 70-80 % in frischem Medium ca. 1:1 verdünnt wurden. Die adhärenenten HeLa- und J774-Zelllinien wurden dafür mechanisch mit einem Zellschaber von der Plastikoberfläche gelöst und pelletiert (5 min, 1.200 rpm). Anschließend wurden neue Kulturflaschen mit frischem Medium beimpft.

Folgende Medien wurden für die Kultivierung der einzelnen Zelllinien eingesetzt:

HeLa-Zellen	RPMI 1640
J774-Makrophagen	D-MEM
Hybridomazellen	Opti-MEM

B.4.3 Stammhaltung

Bakterienstämme können bei 4°C auf Agarplatten bis zu sechs Wochen unter entsprechendem Selektionsdruck gelagert werden. Zur Langzeitlagerung wurden Stammkulturen aus flüssigen Übernachtskulturen angelegt. Die Konservierung der Stämme erfolgte in 30 % [v/v] Glycerin bei -80°C. Das verwendete Glycerin wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

Die Stammhaltung eukaryotischer Zelllinien erfolgte in Einfriermedium (10 % DMSO in FCS). Die Zellen einer 250 ml- Zellkulturflasche ($8,4 \times 10^6$ Zellen bei Konfluenz) wurden in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und zunächst für 1-24 h bei -20°C gelagert, dann auf -80°C überführt. Dort können sie bis zu einem Jahr gelagert werden. Bei längerer Lagerung müssen die Zellen in flüssigen Stickstoff (-198°C) überführt werden.

B.4.4 Messung der optischen Dichte

Die Bestimmung der Zelldichte von Bakterien in Flüssigkultur wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600nm (OD_{600nm}) durchgeführt. Als Leerwert diente das jeweilige Medium. Um eine größere Messgenauigkeit zu gewährleisten, wurden Proben ab einer $OD_{600nm} \geq 1,0$ mit Medium verdünnt.

B.4.5 Zellzahlbestimmung mit einer Neubauer Zählkammer

In einer Neubauer Zählkammer ist die Bestimmung der Zellzahl eukaryotischer Zelllinien in Suspension möglich. Um zwischen vitalen und nicht-vitalen Zellen zu unterscheiden, wird die Trypanblaufärbung verwendet. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der an Zellproteine bindet, bei defekter Zellmembran aber bis ins Zytoplasma der Zellen vordringt. Dadurch werden tote Zellen tiefblau gefärbt. Für die Färbung wurde die Zellsuspension 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung (0,4 % Trypanblau [m/v]) gemischt und auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen. Es wurden mindestens zwei der vier Großquadrate ausgezählt (je in 4 x 4 Quadrate unterteilt) und daraus die Zellzahl berechnet. Dafür wird der Mittelwert für die Zellzahl (Anzahl gezählte Zellen/Anzahl gezählte Großquadrate) pro Großquadrat mit dem konstanten Faktor 10 multipliziert, um die gegebene Schichthöhe von 0,1 mm auf 1 mm hochzurechnen. Das Ergebnis entspricht der Zellzahl pro 1 μ l in der 1:1-Verdünnung mit Trypanblau-Lösung.

B.5 Molekularbiologische Methoden

B.5.1 Isolierung, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA

B.5.1.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA

Für geringere DNA-Mengen von bis zu 15 μ g für die Sequenzierung oder Transformation wurde das Aufreinigungssystem NucleoSpin PlasmidPure (Macherey & Nagel, Düren) verwendet, für DNA-Mengen von bis zu 100 μ g das Nucleobond AX 100 (Macherey & Nagel, Düren). Bei beiden Systemen werden die Zellen zunächst durch alkalische Lyse aufgeschlossen, die Proteine denaturiert und anschließend abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wird auf eine Silica-Säule gegeben, an die die Plasmid-DNA unter der Wirkung chaotroper Salze bindet, so dass die gebundene DNA zunächst gewaschen und dann mit $H_2O_{bidest.}$ eluiert werden kann. Die Durchführung erfolgte wie vom Hersteller empfohlen. Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

B.5.1.2 DNA-Fällung

50 µl DNA-Lösung wurden mit 180 µl 100 % EtOH und 6 µl 3 M Natriumacetat-Lösung vermischt, um der DNA die Hydrathülle zu entziehen, und durch eine 30-minütige Inkubation bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 rpm, 15 min) wurde das DNA-Pellet mit eiskaltem EtOH (70 % [v/v], unvergällt) gewaschen. Anschließend wurde der Alkohol komplett entfernt, das Pellet für 5-30 min bei 37°C getrocknet und im gewünschten Volumen H₂O_{bidest.} aufgenommen.

B.5.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte bei 260nm in einer 1:50 Verdünnung in H₂O_{bidest.} Die Absorption wurde in einer Quarzküvette (d=1 cm) gegen H₂O_{bidest.} bestimmt. Dabei entspricht eine OD_{260nm} von 1,0 etwa 50 µg/ml. Die Verunreinigung der DNA mit Proteinen wurde durch eine parallele Messung bei 280nm abgeschätzt. Ein Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} > 1,8 gilt als Kriterium für eine ausreichende Qualität der DNA für anschließende Manipulationen wie Sequenzierung, Ligation oder Restriktionsverdau.

B.5.2 DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können *in vitro* ausgewählte DNA-Fragmente amplifiziert werden. Als DNA-Polymerasen wurden verschiedene *Taq*-Polymerasen (AmpliTaq, Applied Biosystems, Foster City; BIOTAQ, Bioline, Witten) ohne 3'-5'-Korrekturlese-Exonuclease-Aktivität oder Pwo- (peqlab, Erlangen) bzw. Accuzym-Polymerase (Bioline, Witten) verwendet, die beide über eine „Proofreading“-Aktivität verfügen. Diese Eigenschaft ermöglicht eine weniger fehlerhafte Amplifikation, was besonders für große Gene wichtig ist.

Die zur Amplifikation eingesetzten Starteroligonukleotide (Primer) hatten einen Bindebereich an das Template von 18-25 bp. Sollte der zu amplifizierende DNA-Bereich mit Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende oder einem „Tag“ versehen werden, so wurden diese Sequenzen zusätzlich als Überhänge am 5'-Ende des Primers angefügt. Gegebenenfalls wurden zusätzliche Basen am 5'-Ende vor der Restriktionsschnittstelle angefügt, um einen Direktverdau des DNA-Fragments nach Amplifikation zu ermöglichen. Die Primer wurden so gewählt, dass sie einen möglichst identischen Schmelzpunkt (T_m) zwischen 55°C und 65°C hatten.

Die Berechnung des Schmelzpunktes erfolgt nach folgender Formel (Chester & Marshak 1993):

$$T_m = 69,3 + 0,41 \times (\% \text{ GC-Gehalt des Primers}) - 650/\text{Länge des Primers}$$

Als Template wurde entweder aufgekochtes Gesamtzell-Lysat von Bakterien oder isolierte DNA verwendet. Zur Gewinnung der DNA aus Gesamtzell-Lysat werden Bakterien von einer Agarplatte abgenommen, in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ resuspendiert, für 10 min bei 95°C aufgekocht und dann die Zelltrümmer und Proteine bei 14.500 rpm für 5 min abzentrifugiert.

Die PCR-Reaktion wurde in einem Eppendorfgesäß wie folgt angesetzt:

Matrizen-DNA	Plasmid-DNA 300 ng bzw. Gesamtzell-Lysat 10 μl
Primer 1	10 pmol
Primer 2	10 pmol
10 x Polymerasepuffer	5 μl
dNTP-Lösung (2 mM)	5 μl
Polymerase	0,2 μl
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad 50 μl

Die Amplifikation wird durch eine Reihe von Temperatur-Zeit-Zyklen ermöglicht. Die Dauer der Elongation ist jeweils abhängig von der Länge des zu vervielfältigenden Bereichs. Bei der Festlegung der Temperatur zur Hybridisierung der Primer muss deren Schmelztemperatur berücksichtigt werden. Die Temperatur zur Primeranlagerung wurde in der Regel etwas unterhalb der Schmelztemperatur gewählt. Für die benötigte Zeit zur Kettenverlängerung wurde in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase die Annahme zugrunde gelegt, dass eine Synthesegeschwindigkeit von 15 kb/sek bis 2 kb/min vorliegt. Während der PCR-Reaktion wird zuerst die DNA denaturiert, dann erfolgt die Hybridisierung der Primer, die den Bereich der Amplifizierung festlegen, und im letzten Schritt verlängert eine thermostabile DNA-Polymerase die Primer entlang der DNA-Matrize.

1. Schritt	5 min	94°C	(Denaturierung der Matrize)
2. Schritt	30 sek	94°C	(Denaturierung der Matrize)
3. Schritt	45 sek	$T_m-(0 \text{ bis } 5^\circ\text{C})$	(Anlagerung der Primer)
4. Schritt	x min	72°C	(Kettenverlängerung)
5. Schritt	7 min	72°C	(finale Kettenverlängerung)
6. Schritt	∞	4°C	(Aufbewahrung der DNA)
35 x Wiederholung der Schritte 2-4			

Nach erfolgter PCR wurde der Ansatz im Agarosegel (B.5.3) überprüft und das PCR-Produkt mittels Nucleospin Extract II (Machery & Nagel, Düren) gereinigt.

B.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

B.5.3.1 Auftrennung von DNA im Agarosegel

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Molekülen entsprechend ihrer Größe und zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld. Die negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA führen dazu, dass die DNA-Fragmente in der Agarosematrix zur Anode wandern. Lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente bewegen sich im Agarosegel umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts. Je kleiner ein Fragment also ist, umso schneller kann es durch die Poren der polymerisierten Agarose wandern. Die bei der Agarose-Gelelektrophorese eingesetzte Agarosekonzentration ist abhängig von dem DNA-Molekulargewichtsbereich, in dem eine effektive Auftrennung der Fragmente erfolgen soll. In dieser Arbeit wurden Konzentrationen von 1,0-1,5 % [w/v] Agarose verwendet. 1 x TAE-Puffer diente sowohl als Lösungsmittel für die Agarose als auch als Laufpuffer.

Es wurden horizontale Mini-Gelkammern der Maße 7,5 cm x 7,5 cm bzw. 11 cm x 7,5 cm (Länge x Breite) verwendet. Analytische Gelläufe wurden bei 100 V und präparative Gelläufe bei 80 V für jeweils 30-60 min durchgeführt. Zum Färben und Beschweren der DNA-Lösungen für die elektrophoretische Auftrennung wurde 1/10 des Probenvolumens an DNA-Auftragspuffer zugegeben. Das enthaltene Glycerin lässt die DNA beim Auftragen in die Taschen absinken, während der Farbstoff Bromphenolblau zur optischen Überwachung des Elektrophoreselaufs dient. Als Größenstandard zur Größenbestimmung linearer DNA-Moleküle wurde die 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet (Abbildung 4). Die DNA-Isolierung aus Agarosegelen erfolgte mittels Nucleospin Extract II (Macherey & Nagel, Düren) nach Anweisung des Herstellers.

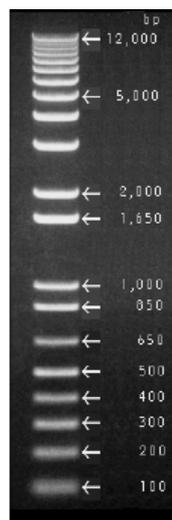


Abbildung 4: 1 kb plus DNA Ladder, DNA-Längenstandard

Auftrag von 0,7 µg 1 kb plus DNA Ladder pro Spur auf ein 0,9 %iges Agarosegel

Elektrophoresepuffer (1 x TAE)	40 mM Tris-HCl pH 8,2 20 mM Essigsäure 2 mM EDTA
DNA-Auftragspuffer (10 x)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 30 % Glycerol in 1 x TAE

B.5.3.2 Ethidiumbromidfärbung und Dokumentation von Agarosegelen

Die Gele wurden nach der Elektrophorese für 15-30 min in einer Ethidiumbromid-Färbelösung (1 µg Ethidiumbromid pro 1 ml H₂O_{dest.}) gefärbt und anschließend kurz gewässert, um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen. Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein und macht die DNA-Banden durch Fluoreszenz auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254nm sichtbar. Mittels einer Videodokumentationsanlage wurde das Bandenmuster abgelichtet.

B.5.4 Sequenzierung von DNA

Plasmid-DNA wurde wie beschrieben gereinigt (B.5.1). Die Sequenzierung wurde bei Agowa (Berlin) durchgeführt. Dafür wurden 10 µl Plasmid-DNA mit einer Konzentration von mindestens 80 ng/µl benötigt. Standardprimer zur Sequenzierung wurden von Agowa gestellt, spezielle Primer mussten dem Sequenzieransatz in einem Volumen von 4 µl (5 pmol/µl) selbst zugesetzt werden.

B.5.5 Enzymatische Modifikation von DNA

B.5.5.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die doppelsträngige DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen schneiden. Dadurch entstehen spezifische Fragmente mit definierten Enden, die anschließend ein gezieltes Zusammenfügen verschiedener DNA-Fragmente ermöglichen. Die Restriktionsspaltung diente der Isolierung von DNA-Fragmenten zur Umklonierung, der Linearisierung von Vektoren zur Ligation mit einem Insert, dem Direktverdau von PCR-Produkten und zur Kontrolle der umklonierten Plasmide.

B.5.5.1.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte in Reaktionsansätzen von 10-50 µl bei 37°C im vom Hersteller empfohlenen Puffersystem. Die Inkubationszeit für einen vollständigen Verdau der Plasmide betrug bei Verwendung der FastDigest™ Enzyme (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) 30 min, bei herkömmlichen Restriktionsenzymen 3-16 h. Es wurden 1-5 U Enzym pro 1 µg DNA eingesetzt. Da die Restriktionsenzyme in 50 % Glycerol aufbewahrt werden, muss beachtet werden, dass die Glycerol-Konzentration im Restriktionsansatz 5 % nicht übersteigt, da es sonst zu einer Hemmung der Enzymaktivität kommen kann. Die Spaltung wurde im Agarosegel überprüft und bei Bedarf entsprechende Banden aus dem Agarosegel eluiert (B.5.3).

B.5.5.1.2 Restriktionsverdau von PCR-Produkten

PCR-Produkte, bei denen während der PCR durch die Primer Restriktionsschnittstellen mit entsprechendem Überhang an den 5'-Enden eingefügt worden waren und die ohne Subklonierung direkt in den Zielvektor kloniert werden sollten, wurden über Nacht verdaut. In Abhängigkeit vom verwendeten Restriktionsenzym wurde die Länge der 5'-Überhänge gewählt. Mengen und Vorgehen entsprechen den unter B.5.5.1.1 beschriebenen. Die erhaltenen DNA-Fragmente können nach Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen direkt für die Ligation in den Zielvektor verwendet werden (B.5.5.3). Für die Inaktivierung müssen die Ansätze 20 min bei 65°C bzw. 80°C inkubiert werden.

B.5.5.2 Dephosphorylierung von DNA

Um die Religation linearisierter Vektor-DNA, speziell einfach geschnittener Vektor-DNA, zu verhindern, wurden lineare DNA-Fragmente an den 5'-Enden mittels Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP, Roche Diagnostics, Mannheim) dephosphoryliert (Sambrook *et al.* 1989). Für die Dephosphorylierung wurden 20 µl Restriktionsansatz mit 2 µl 10 x SAP-Puffer und 1 µl SAP-Phosphatase (1 U/µl) versetzt und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch 15-minütiges Erhitzen auf 65°C wurde die Phosphatase inaktiviert. Die so behandelte Vektor-DNA wurde für die Ligation eingesetzt (B.5.5.3).

B.5.5.3 Ligation linearer DNA-Fragmente

Bei der Ligation wird eine Phosphodiesterbindung zwischen einem freien 3'-Hydroxy-Ende und einer freien 5'-Phosphat-Gruppe zweier doppelsträngiger DNA-Fragmente unter gleichzeitiger Spaltung von ATP gebildet. Zu ligierende Fragmente (Inserts) wurden in mindestens fünffachem Überschuss zur Vektor-DNA (ca. 50-200 ng) gegeben. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 10 µl und enthielt ne-

ben Insert und Vektor 1 μ l 10 x Ligasepuffer und 1 μ l T4-DNA-Ligase (5 U/ μ l, Invitrogen, Karlsruhe). Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht. Bei Verwendung des Rapid DNA Ligation Kits von MBI Fermentas erfolgte die Ligation für 30 min bei 22°C. Der Ligationsansatz kann direkt zu Transformation von *E. coli* eingesetzt werden (B.5.6.2).

Eine Besonderheit stellt die Ligation von PCR-Fragmenten in die Klonierungsvektoren pMBL-T/A und pGEM-T dar. *Taq*-Polymerasen haben die Eigenschaft, unabhängig vom Template an die 3'-Enden ein Desoxyadenosin anzuhängen. Die Vektoren pMBL-T/A und pGEM-T sind mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* im Bereich der „multiple cloning site“ (MCS) geschnitten und an die beiden entstandenen 3'-Enden wurde je ein Thymidin-Rest angehängt. So ist einerseits die Gefahr der Religation des Vektors gering und andererseits stellt er kompatible Überhänge für die PCR-Produkte der *Taq*-Polymerasen zur Verfügung. PCR-Produkte können also ohne vorherigen Schnitt mit einer Restriktionsendonuklease in die MCS kloniert werden. Der Klonierungsvektor pMOS*Blue* hingegen erlaubt die Klonierung von „blunt-end“-PCR-Fragmenten, die nach Herstellerangaben vor der Ligationsreaktion phosphoryliert werden müssen.

B.5.5.4 Generierung von 3' Adenosin-Überhängen nach der Amplifikation durch PCR

Die Möglichkeit 3'A-Überhänge an „blunt-end“-PCR-Produkten von „Proofreading“-Polymerasen zu produzieren, war vor allem für die Ligation von PCR-Produkten in die Vektoren pMBL-T/A und pGEX-T (Tabelle 6) von Bedeutung. Diese Vektoren werden vom Hersteller linear mit einem 5'T-Überhang geliefert. Alternativ zu einer PCR (B.5.2) mit einer „Proofreading“-Polymerase könnte auch eine PCR mit einer *Taq*-Polymerase durchgeführt werden, die automatisch 3'A-Überhänge anfügt. Da allerdings die Fehlerrate der *Taq*-Polymerase sehr hoch ist, eignet sich deren Verwendung speziell für lange und zur Überexpression eingesetzte PCR-Produkte schlecht.

Um 3'A-Überhänge an ein PCR-Produkt anzufügen, wurde zum PCR-Produkt 1 μ l *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) und 1 μ l dATPs (Roche Diagnostics, Mannheim, 250 μ mol) zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 72°C inkubiert. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis kann das PCR-Produkt für die Ligation eingesetzt werden.

B.5.6 Transformation mit DNA

B.5.6.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Aus einer Übernachtskultur wurden 200-500 ml LB-Medium 1:50 bis 1:100 beimpft. Die Kultur wurde bei 37°C (*E. coli*) oder bei 27°C (*Yersinia*) unter Schütteln bis zu einer OD_{600nm} 0,5-0,7 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde dann sofort auf Eis gestellt. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C mit vorgekühlten Geräten und Lösungen durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert (4.000 g, 10 min) und zweimal mit 50 ml $H_2O_{bidest.}$ gewaschen. Ein letzter Waschschrift erfolgte in 10 ml 10 % Glycerol. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 0,5-1,0 ml 10 % Glycerol resuspendiert und in Aliquots von 90 µl sofort bei -80°C eingefroren.

B.5.6.2 Elektroporation von *E. coli* und *Yersinia* sp.

Zur Transformation von elektrokompenten Zellen mit DNA wurde die entsprechende DNA (100-500 ng) mit 40 µl Zellsuspension gemischt und in eine Elektroporationsküvette (Eurogentec, Seraing) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit einem Bio-Rad Gene Pulser oder BTX ECM399 entsprechend der Betriebsanleitung der Hersteller bei einer Spannung von 2.500 V, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF. Danach wurde sofort 1 ml SOC-Medium zugegeben. Die Bakterien wurden dann 30 min bei optimaler Temperatur (37°C für *E. coli*, 27°C für *Yersinia* sp.) inkubiert und auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

B.6 Proteinbiochemische Methoden

B.6.1 Quantitative Proteinbestimmung (mod. nach Bradford (1976))

Zur Quantifizierung von Proteinen in Lösung wurden 1-5 µl der Probe mit $H_2O_{bidest.}$ auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Protein-Assay (Bio-Rad, München) versetzt. Der Assay basiert darauf, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250-Lösung von 465nm auf 595nm verschiebt, wenn eine Bindung an Proteine stattfindet. Als Nullwert wurden 800 µl $H_2O_{bidest.}$ mit 200 µl Protein-Assay vermischt. Nach einer 1-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595nm bestimmt. Als Referenz diente eine Eichgerade mit einer BSA-Eichlösung. Bei einer $OD_{595nm} \geq 1,0$ wurden die Proben zur Proteinbestimmung verdünnt.

B.6.2 Auftrennung von Proteinen durch Polyacrylamid-Elektrophorese (PAGE)

B.6.2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

B.6.2.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der elektrophoretischen Trennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht (MG). Dafür ist es erforderlich, denaturierende Bedingungen zu schaffen. Dies erreicht man durch das anionische Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (SDS) und Erhitzen. Es lagert sich an Proteine an und zerstört nicht-kovalente Bindungen der nativen Proteine. Durch Zugabe von DTT und β -Mercaptoethanol werden außerdem Disulfidbrücken gespalten. SDS, DTT und β -Mercaptoethanol tragen konzertiert dazu bei, die Quartär- und Tertiärstruktur von Proteinen zu zerstören. Da SDS sich relativ gleichmäßig, also sequenzunabhängig, an Proteine anlagert, ist die Ladung des Proteins näherungsweise proportional zu seiner Masse, so dass die elektrophoretische Auftrennung der Proteine aufgrund ihrer Molekularmasse erfolgt.

Für die Elektrophorese wurde eine Minigel-Kammer von Bio-Rad (München) mit einer Gelgröße von 8 cm x 7 cm (Breite x Höhe) oder die SE400-Kammer von Hoefer (San Francisco) mit einer Gelgröße von 14 cm x 16 cm (Breite x Höhe) verwendet. Um einen optimalen Trennbereich von 10-200 kDa zu gewährleisten, wurden 8-16 %ige Polyacrylamidgele hergestellt (Tabelle 10). Dafür wurden die Glasplatten mit 70 % Ethanol gereinigt und in den Gießstand eingesetzt. Zuerst wurde das Trenngel bei der Minigel-Kammer bis ca. 2 cm unter die Oberkante der kleinen Glasplatte und bei der SE400 bis ca. 4 cm unter die Oberkante der Glasplatten gegossen und mit 2-Butanol überschichtet, um Blasenbildung zu verhindern. Zum Aushärten des ca. 3 mm dicken Trenngels der SE400-Gelkammer wurde das Gel für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Polymerisierung der Gelmatrix wurde der Alkohol abgenommen, das Sammelgel aufgegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach etwa 15 min war die Polymerisierung abgeschlossen, der Kamm konnte gezogen und die Gele verwendet werden.

Tabelle 10: Verwendete Mini- und SE400-SDS-Systeme

Trenngel Mini-SDS-System							
	6 %	8 %	10 %	11 %	12 %	14 %	16 %
Protogel	2,0	2,7	3,3	3,7	4,0	4,7	5,3 ml
1 M Tris pH 8,8	3,75 ml						
10 % SDS	0,2 ml						
10 % TEMED	0,2 ml						
10 % APS	0,04 ml						
H ₂ O _{dest.}	4,0	3,2	2,6	2,2	1,9	1,2	0,6 ml
Trenngel SE400-SDS-Systeme							
	10 %			15 %			
Protogel	11,7 ml			17,5 ml			
1,5 M Tris pH 8,8	8,7 ml			8,7 ml			
10 % SDS	0,35 ml						
10 % TEMED	0,088 ml						
10 % APS	0,0875 µl						
H ₂ O _{dest.}	14 ml			8,2 ml			
Sammelgel Mini-SDS-System				Sammelgel SE400-SDS-Systeme			
Protogel	0,83 ml			Protogel	2,0 ml		
750 mM Tris pH 6,8	0,7 ml			1 M Tris pH 6,8	1,88 ml		
10 % SDS	0,1 ml			10 % SDS	0,15 ml		
10 % TEMED	0,2 ml			10 % TEMED	0,15 ml		
10 % APS	0,04 ml			10 % APS	0,075 ml		
H ₂ O _{dest.}	3,2 ml			H ₂ O _{dest.}	10,88 ml		

Im Sammelgel wird ein Feldstärkegradient erzielt, der zur Konzentrierung bzw. Stapelung der in einer Probe vorhandenen Proteine führt. Im Trenngel wird dieser Gradient nicht mehr aufrechterhalten und die Proteine werden aufgrund ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Man erhält durch das Sammelgel schärfere Proteinbanden bei der späteren Auftrennung.

Die Proben wurden 1:1 bis 1:5 mit Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht, um die Proteine zu denaturieren. Das im Probenpuffer enthaltene Glycerol führt beim Auftragen zum Absinken der Proben in die Geltaschen. Die Gelkammer wurde mit 1 x Laufpuffer gefüllt und die Proben in die Geltaschen aufgetragen. Als Größenstandard wurde die Benchmark Protein Ladder oder die Benchmark Prestained Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet (Tabelle 11). Die Elektrophorese mit der Minigel-Kammer erfolgte bei 150-220 V für ca. 1 h, die Elektrophorese mit der SE400-Kammer bei 200-220 V für 3-4 h.

Tabelle 11: Proteinstandards

Benchmark Protein Ladder (kDa)	Benchmark Prestained Protein Ladder (kDa)
220	180
160	115
120	82
100	64 ^b
90	49
80	37
70	26
60	19
50 ^a	15
40	6
30	
25	
20 ^a	
15	
10	

^a: intensivere Banden; ^b: violette Bande

Laufpuffer (1 x)	3,02 g Tris 14,24 g Glycin 0,1 % SDS ad 1 l H ₂ O _{dest.}
Auftragspuffer (Treck <i>et al.</i> 2002)	100 mM Tris pH 8,8 10 % Glycerol 10 % SDS 100 mM MgCl ₂ 5 % β-Mercaptoethanol (für Quervernetzungsexperimente nur 0,5 %) 0,005 % Bromphenolblau

B.6.2.1.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

In der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE) werden Proteine und deren Komplexe unter nicht denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Dazu werden Komponenten wie SDS, DTT und β-Mercaptoethanol, die bei der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Zerstörung der Proteinstruktur führen, weggelassen. Die Vorgehensweise zum Gießen der Gele entspricht der unter B.6.2.1.1. beschriebenen, mit dem einzigen Unterschied, dass kein Sammelgel gegossen wird.

Es wurden zwei verschiedene native Systeme zur Auftrennung der Proteine eingesetzt: ein HEPES-Puffer-basiertes (pH 7,5) und ein Tris-Puffer-basiertes (pH 8) System. In beiden Systemen werden Proteine und Komplexe nach ihrem individuellen Masse/Ladungsverhältnissen aufgetrennt, weshalb auch kein Größenstandard verwendet wurde. In Abhängigkeit vom isoelektrischen Punkt (pI) der zu analysierenden Proteine und Proteinkomplexe wurde das geeignete Puffersystem gewählt, da Proteine,

deren pI basischer als der pH-Wert des Gels ist, nicht in das System einlaufen. Um dieses Problem zu umgehen, ist es möglich Anode und Kathode beim Anschließen der Elektrophoresekammer an das Netzgerät zu vertauschen. Nun laufen basische Proteine in das Gel ein, saure dagegen nicht. Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde bei 80 V für 2-3 h durchgeführt, wobei darauf zu achten ist, dass das System nicht zu heiß wird.

B.6.2.1.2.1 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese basierend auf einem HEPES-Puffersystem

Das HEPES-Puffer-basierte System hat einen pH von 7,5, was bedeutet, dass Proteine mit einem $pI \geq 7,5$ nicht in das Gel einlaufen.

Nativgel	2 ml Protogel
	0,25 ml 1 M HEPES
	0,01 ml 5 M NaCl
	0,2 ml 10 % TEMED
	0,04 ml 10 % APS
	7,5 ml H ₂ O _{dest.}
Laufpuffer	25 mM HEPES
	5 mM NaCl
Auftragspuffer	25 mM HEPES
	5 mM NaCl
	10 % Glycerol
	0,005 % Bromphenolblau

B.6.2.1.2.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese basierend auf einem Tris-Puffersystem (mod. nach J. A. King, <http://wes.mit.edu/king-lab/www/cookbook/rngel.htm>)

Das Tris-Puffer-basierte System hat einen pH von 8. Das bedeutet, dass Proteine mit einem $pI \geq 8$ nicht in das Gel einlaufen. Dieses System kam dann zum Einsatz, wenn der pH von 7,5 des HEPES-basierten Systems nicht ausreichend für die eingesetzten Proteinproben war. Außerdem ergeben sich beim Tris-basierten System stärker fokussierte Banden als beim HEPES-basierten System.

Nativgel	3 ml Protogel
	3 ml 4 x Gellaufpuffer
	0,2 ml 10 % TEMED
	0,16 ml 10 % APS
	5,0 ml H ₂ O _{dest.}

Gellaufpuffer (4 x)	1,5 M Tris pH 8,9
Laufpuffer (50 x)	250 mM Tris 1,92 M Glycin
Auftragspuffer	3 ml Glycerol 0,6 ml 50 x Laufpuffer 0,5 mg Bromphenolblau ad 10 ml H ₂ O _{dest.}

B.6.3 Detektion von Proteinen

B.6.3.1 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue (mod. nach Sambrook *et al.* (1989))

Nach der Elektrophorese (B.5.3) wurde das Polyacrylamid-Gel 30-60 min bei RT mit Coomassie Brilliant Blue, einem Triphenylmethanfarbstoff, unter mechanischem Schwenken gefärbt. Der Farbstoff bindet unspezifisch an kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten von Proteinen. Die anschließende Entfärbung erfolgte ebenfalls schwenkend mit H₂O_{dest.} bei RT. Bei diesem Vorgang wird die Farbe wieder aus der Gelmatrix herausgewaschen, so dass nur die Proteine ihre blaue Farbe behalten. Um möglichst wenig Hintergrund zu erhalten, erfolgte das Entfärben über Nacht und mit einem Papiertaschentuch, das die aus dem Gel herausgelöste Farbe aus dem H₂O_{dest.} aufnimmt. Eine Beschleunigung sowohl des Färbeprozesses als auch der Entfärbung kann durch Erwärmung der Lösungen erzielt werden. Anschließend wurde das Gel zwischen Cellophan-Folien getrocknet.

Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung	25 % Isopropanol 10 % Essigsäure 0,05 % Coomassie Brilliant Blue R250
---	---

B.6.3.2 Proteinfärbung mit PonceauS Rot

Ein Problem des Proteintransfers auf Nitrozellulose-Membranen besteht darin (B.6.3.3.1), dass man die Proteinbanden nicht sieht. Die PonceauS Rot-Färbung eignet sich gut, um Proteine sichtbar zu machen, da sie reversibel und schnell ist. So lässt sich zum einen sofort die Übertragung der Proteine auf die Membran überprüfen und zum anderen werden nicht vorgefärbte Proteinstandards sichtbar.

Die Membran wurde nach dem Transfer sowohl denaturierter als auch nativer Proteine für 30-60 sek mit PonceauS Rot-Lösung gefärbt und durch Spülen unter Wasser wieder entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Der Proteinstandard oder spezielle Banden in den Proben wurden bei Bedarf mit Bleistift markiert. Danach kann sofort mit dem Absättigen unspezifischer Bindekapazitäten für die

Immundetektion (B.6.3.3.2) begonnen werden. Es ist nicht erforderlich die vollständige Entfärbung der Proteinbanden abzuwarten.

PonceauS Rot-Lösung 0,2 % PonceauS Rot
 0,2 % Essigsäure

B.6.3.3 Transfer und Detektion von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran

B.6.3.3.1 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran („Western Blot“)

Die Detektion von Proteinen in einem Immunoblot beruht auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion. Diese Methode ist in Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern sehr sensitiv. Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (B.5.3.1) wurden mit Hilfe einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert („Western Blot“). Dafür wurden zwei Lagen Whatman-Papier (Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad, München; GB 40 Blotting Papier, Schleicher & Schuell, Dassel) und eine Nitrozellulose-Membran auf Gelgröße zurechtgeschnitten und zusammen mit dem SDS-Gel in Transferpuffer gelegt. Anschließend wurden sie in folgender Reihenfolge luftblasenfrei auf die Anodenplatte gelegt: ein Whatman-Papier, die Nitrozellulose-Membran, das SDS-Gel und erneut ein Whatman-Papier. Mit einer Glaspipette wurde mehrmals über den Stapel gerollt, um Luftblasen zu entfernen und überschüssigen Transferpuffer mit saugfähigem Papier aufnehmen zu können. Nach Auflegen der Kathodenplatte wurden die Proteine aus den Gelen der Minigel-Kammer (Bio-Rad, München) bei konstanten 15 V für 45 min auf die Membran übertragen. Für die größeren und wesentlich dickeren Gele aus der SE400-Kammer wurde die Übertragungszeit auf 90 min verlängert.

B.6.3.3.2 Immunodetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz (Immunoblot) (Towbin *et al.* 1979)

Die Immunodetektion ist eine sensitive Methode der Detektion von auf Nitrozellulose-Membranen transferierten Proteinen mittels Antikörpern. Nach dem Transfervorgang (B.6.3.3.1) wurden freie Bindungsstellen auf der Membran mit einer Blockierlösung für mindestens 60 min abgesättigt. Dann folgte eine Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper gegen das entsprechende Antigen (das Zielprotein) 1:5.000 bis 1:200 in Blockierlösung für weitere 60 min. Nach einem Waschschrift wurde der Sekundärantikörper 1:10.000 in Blockierlösung verdünnt für 30-60 min zugegeben. Dieser Antikörper ist gegen den Fc-Teil des primären IgG-Antikörpers gerichtet und mit Alkalischer Phosphatase (AP) oder Meerrettichperoxidase gekoppelt. Die Detektion erfolgte nach einem erneuten Waschschrift. Je nach Sekundärantikörper wurde mit BCIP/NBT-Blue (AP, kolorimetrisch, Sigma) oder ECL (Meerrettichperoxidase, Chemilumineszenz, Amersham Biosciences, Freiburg; Millipore, Billerica) nach

Anweisung der Hersteller detektiert. Bei der kolorimetrischen Detektion mittels AP wird das farblose BCIP und NBT durch das Enzym in ein blaues Produkt umgesetzt, das sich auf der Membran ablagert und so die detektierten Banden sichtbar macht. Die Chemilumineszenz bei der ECL-Färbung entsteht durch Zugabe von Peroxidasesubstrat und Luminol zum Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Luminol wird durch freigesetztes Peroxid oxidiert und das Reaktionsprodukt emittiert Licht, welches auf Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurden FujiMedical X-Ray-Filme Typ SuperRX verwendet. Entwickelt wurden die Filme im Fujifilm FPM-100A Filmentwickler. Nach einem Waschschrift konnte die Membran bei -20°C eingefroren und später für weitere Detektionen aufgetaut werden.

PBS (10 x) (Sambrook <i>et al.</i> 1989)	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na_2HPO_4 2,4 g KH_2PO_4 ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
Blockierlösung	0,5 % Tween 20 1 % Milchpulver 1 % BSA in 1 x PBS
Waschpuffer	0,5 % Tween 20 in 1 x PBS

B.6.3.3.3 Entfernen von Antikörpern von Nitrozellulose-Membranen („Strippen“)

Sollte dieselbe Membran mit verschiedenen Primärantikörpern detektiert werden, war es erforderlich, die Antikörper der ersten Detektion zu entfernen.

Die Membran wurde zu diesem Zweck in Waschpuffer gewaschen, um Reste der verwendeten Detektionslösung (B.6.3.3.2) zu entfernen. Anschließend wurde sie 1-2 x für 30 min mit Western-„Strip“-Lösung inkubiert, wobei SDS und DTT zur Denaturierung der Antikörper führen, und zweimal 15 min bei RT in Waschpuffer (B.6.3.3.2) gewaschen, um Reste der Western-„Strip“-Lösung auf der Membran zu neutralisieren. Die Membran wurde 1 h in Blockierungslösung geschwenkt und es konnte wie unter B.6.3.3.2 beschrieben weiter verfahren werden.

Western-„Strip“-Lösung	100 mM Tris pH 6,8 2 % SDS 50 mM DTT (Zugabe immer frisch bei Verwendung der „Strip“-Lösung)
-------------------------------	--

B.6.3.4 Detektion von Proteinen mittels ELISA („Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay“)

Der „Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay“ (ELISA) ist eine sensitive Methode, die es erlaubt, Proteine - anders als beim Immunoblot - in ihrer nativen Form an eine Oberfläche zu koppeln und so im gefalteten Protein vorkommende Epitope zu detektieren.

Für den ELISA wurden Maxisorp-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verwendet. 100 µl des Antigens (Protein, ca. 1 µg/µl) wurden pro Vertiefung mit 200 µl Beschichtungs-Puffer verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert, um die Anlagerung des Proteins an die Oberfläche der Mikrotiterplatte zu gewährleisten. Anschließend wurde die Platte mit Blockerlösung 1 h bei 37°C abgesättigt. Als primärer Antikörper wurden die aus der Fusion (B.8.2.2) gewonnenen Kulturüberstände in einer Doppelbestimmung eingesetzt. Pro Vertiefung wurden 100 µl Kulturüberstand 1 h bei 37°C inkubiert und dann dreimal mit Waschpuffer (B.6.3.3.2) gewaschen. Als Negativkontrolle diente PBS. Als Sekundärantikörper wurde ein Alkalische Phosphatase-gekoppelter Antikörper verwendet. Dieser wurde 1:1.000 in Blockierlösung verdünnt und 1 h bei 37°C in den Vertiefungen inkubiert. Danach wurden die Vertiefungen dreimal mit Waschlösung gespült und einmal mit Entwicklungspuffer (ohne Tablette) gewaschen. Zu 5 ml Entwicklungslösung wurde nun frisch eine Tablette Sigma 104 (Phosphatase Substrate Tablets, Sigma, Taufkirchen) gegeben und in jede Vertiefung 100 µl pipettiert. Nach einer Entwicklungszeit von 5-30 min erfolgte die Quantifizierung durch Messung der OD_{405nm} auf einem Tecan Sunrise Reader (Tecan).

Beschichtungspuffer	0,1 M NaHCO ₃ , pH 9,8
Blockerlösung	1 % BSA 0,5 % Tween 20
Entwicklungspuffer	9,7 ml Diethanolamin 100 µl 1 M MgCl ₂ ad 1 l H ₂ O _{dest.} + Sigma 104 Substrat Tablette

B.6.4 Quervernetzung von Proteinen in Lösung

Eine einfache Möglichkeit Interaktionen von rekombinanten Proteinen in Lösung zu untersuchen, ist die Verwendung von Crosslinkern. Diese enthalten reaktive Gruppen, die mit bestimmten funktionellen Gruppen von Proteinen (z.B. primäre Amine) reagieren, wenn sie nahe genug beieinander liegen, und durch eine kovalente Bindung verknüpfen. Dies ermöglicht die Analyse der entstandenen Komplexe mittels SDS-PAGE (B.6.2.1.1).

Da die verwendeten Crosslinker DSP, EGS und Sulfo-EGS (Tabelle 12) mit primären Aminen reagieren, durften die zu vernetzenden Proteine nicht in Tris-Puffer gelöst sein. Daher wurde für alle Quer-

vernetzungsversuche Phosphat-Puffer gewählt. Von jedem Protein wurden 50-200 μM zusammen mit 1,5 mM des gewünschten Crosslinkers für die Vernetzungsreaktion eingesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT inkubiert und dann die Quervernetzungs-Reaktion mit 40 M Tris-HCl pH 7,5 für 15 min bei RT abgestoppt. Anschließend konnten die Proben mit SDS-PAGE (B.6.2.1) auf Komplexbildung überprüft werden. Dabei war im Fall von DSP darauf zu achten, dass der Auftragspuffer nur 0,5 % β -Mercaptoethanol enthielt, da höhere Konzentrationen zur Spaltung des Crosslinkers führen. Auch die Quervernetzungs-Produkte von EGS und Sulfo-EGS erwiesen sich in Auftragspuffer mit 0,5 % β -Mercaptoethanol als stabiler.

Tabelle 12: Verwendete Crosslinker

Crosslinker	Reaktive Gruppe	Funktionelle Gruppe	Lösungsmittel	Stamm-lösung	Endkonzentration
DSP (Dithiobis[succinimidylpropionate])	NHS-Ester	primäre Amine	DMSO	20 mM	1,5 mM
EGS (Ethylene glycolbis[succinimidylsuccinate])	NHS-Ester	primäre Amine	DMSO	20 mM	1,5 mM
Sulfo-EGS (Ethylene glycolbis[sulfosuccinimidylsuccinate])	NHS-Ester	primäre Amine	H ₂ O _{dest.}	10 mM	1,5 mM

B.7 Proteinproduktion und Proteinreinigung

B.7.1 Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen

B.7.1.1 Überproduktion von Glutathion-S-Transferase(GST)-Fusionsproteinen

pGEX-Vektoren (Tabelle 6) ermöglichen die Expression des Zielproteins als Fusion mit einem N-terminalen Glutathion-S-Transferase(GST)-,Tag“. Zusätzlich wird in Abhängigkeit vom gewählten Vektor zwischen GST und dem Zielprotein eine Proteaseschnittstelle eingefügt, die nach Reinigung die Spaltung des GST vom Zielprotein erlaubt. Das gewünschte Protein wurde im Leserahmen an das 3'-Ende des *gst*-Gens kloniert, welches unter der Kontrolle eines P_{tac} -Promotors steht. In Abwesenheit des Induktors IPTG ist der Promotor durch den LacI-Repressor blockiert. Zugabe von IPTG induziert die Expression des Fusionsproteins durch Inaktivierung des Repressors. Als Wirtsorganismus für die heterologe Überexpression diente *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, dessen endogene RNA-Polymerase an den P_{taq} -Promotor bindet und die Transkription durchführt.

Ein 5 l-Fermenter befüllt mit LB_{Amp/Cm}-Medium wurde mit einer rekombinanten *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Übernachtskultur 1:50 beimpft. Unter kontinuierlichem Rühren (200 rpm), pH (7,2) und Belüftung (10 l/min) wurde die Kultur bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von ~ 0,8 angezogen. Dann erfolgte die Induktion durch Zugabe von 0,2 mM IPTG. Die Expression des Zielproteins erfolgte bei 27°C

über Nacht. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 4.000 rpm geerntet und sofort eingefroren. Als Kontrolle wurde eine nicht-induzierte Kultur verwendet. Mittels SDS-PAGE (B.6.2.1.1) wurde die Überexpression des Fusionsproteins überprüft.

B.7.1.2 Reinigung von GST-Fusionsproteinen durch Affinitätschromatographie

Der GST-„Tag“ hat v.a. die Funktion, die Reinigung des Zielproteins zu erleichtern. In seltenen Fällen kann GST auch löslichkeitsvermittelnd auf den Fusionspartner wirken. Die Reinigung von GST-Fusionsproteinen basiert auf einer hohen Bindungsaffinität des GST zu Gluthation (GSH).

Die Pellets wurden in 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 7,5 supplementiert mit 4 mM PMSF und 250 U Benzonase resuspendiert und durch drei French Press-Zyklen (1000 psi) aufgeschlossen. Der klare Überstand (Zentrifugation 30 min, 15.000 rpm) wurde 1 h bei 4°C mit Glutathion-Sepharose 4 FF inkubiert. Die GSH-Matrix wurde dann mit 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 7,5 gewaschen, in Phosphat-Puffer aufgenommen und der GST-Rest je nach gewähltem Vektor mit der entsprechenden Protease (Thrombin, PreScissionTMProtease) über Nacht gespalten (B.7.5). Das Zielprotein wurde durch Waschen mit dem gewünschten Endpuffer (Tris- oder Phosphat-Puffer) von der Matrix entfernt und konnte nun für weitere Reinigungsschritte (z.B. Gelfiltration, B.7.6) eingesetzt werden. Die Reinigung wurde mittels SDS-PAGE (B.6.2.1.1) oder Immunoblot (B.6.3.3) mit Anti-GST-Antikörpern (1:5.000) kontrolliert. Die Gesamtproteinmenge wurde nach Bradford (1976) bestimmt (B.6.1).

Phosphat-Puffer 20-40 mM NaH₂PO₄
 20-100 mM NaCl
 pH 7,8

Tris-Puffer 10 mM Tris
 20-100 mM NaCl
 pH 7,5

B.7.2 Produktion und Reinigung von Proteinen mit His₆-„Tag“

B.7.2.1 Überproduktion von Proteinen mit His₆-„Tag“

Für die Expression von Proteinen mit His-„Tag“ wurde das T7-RNA-Polymerase/Promotorsystem (Studier & Moffatt 1986) verwendet. Über die verwendeten pET-Vektoren (Tabelle 6) konnten C-terminal an das Protein sechs Histidine angefügt werden. Wahlweise konnte der His₆-„Tag“ über einen Primer N- oder C-terminal und bei Bedarf mit einer Proteaseschnittstelle zwischen „Tag“ und Zielgen

eingefügt werden. In diesem Fall musste der Vektor-kodierte His₆-„Tag“ am C-Terminus durch ein Stoppcodon am 3'-Ende des zu klonierenden Fragments für die Expression entfernt werden.

Bei pET-Vektoren wird das Zielgen nicht direkt hinter dem P_{taq}-Promotor sondern hinter dem T7-Φ10-Promotor eingesetzt. Die für das Ablesen des T7-Φ10-Promotors notwendige T7-RNA-Polymerase ist in *E. coli* BL21 (DE3) und *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Tabelle 4) chromosomal kodiert. Da die chromosomal lokalisierte T7-RNA-Polymerase durch den P_{taq}-Promotor reguliert wird, erfolgt die Expression der T7-RNA-Polymerase IPTG-abhängig. Dieses System zeichnet sich durch eine wesentlich stringenteren Kontrolle der Expression aus als Systeme, bei denen das Zielgen direkt hinter dem P_{taq} liegt. Die Expressionsbedingungen entsprechen den unter B.7.1.1 für GST-Fusionsproteine beschriebenen. Die Überexpression des Proteins wurde mittels SDS-PAGE (B.6.2.1.1) überprüft.

B.7.2.2 Reinigung von Proteinen mit His₆-„Tag“ durch „Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography“ (IMAC)

Bei der Reinigung mittels „Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography“ (IMAC) macht man sich zunutze, dass 6 bis 10 Histidine, die einen heterozyklischen Imidazolring besitzen, aufgrund eines freien Elektronenpaars am Stickstoff dieses Rings Metalle komplexieren können. Die stationäre Phase bildet eine Agarosematrix, die über einen Chelator (z.B. NTA) an zweiwertigen Metallionen (z.B. Ni²⁺) gekoppelt ist. Wird ein Protein mit Histidin-Peptid über die beladene Matrix geleitet, bindet es an das zweiwertige Metallion. Die Elution erfolgt durch Imidazol, das dem Heterozyklus der Histidine entspricht und so das His-„Tag“-Protein von der Matrix verdrängt.

Die Pellets wurden in Puffer A supplementiert mit 4 mM PMSF und 250 U Benzonase resuspendiert und durch drei French Press-Zyklen (1000 psi) aufgeschlossen. Der klare Überstand (Zentrifugation 30 min, 15.000 rpm) wurde auf eine HisTrap HP-Säule aufgetragen, die am Chelator zweiwertige Nickelionen gebunden hat. Die Ni²⁺-Matrix wurde mit dem oben erwähnten Puffer gewaschen und das Zielprotein entweder durch einen Imidazolgradient eluiert oder nach Spaltung mit der TEV-Protease (B.7.5) von der Säule gespült. Der Imidazolgradient von 0-500 mM Imidazol zur Elution des Proteins mit „Tag“ wurde mit Hilfe des Puffers B angelegt. Der Gradient wurde nach 10 ml bei 10 % Puffer B gestoppt bis die Basislinie stabil war, da unter diesen Bedingungen unspezifisch gebundene Proteine eluieren. Danach wurde ein 90 ml Gradient angelegt, der mit 100 % Puffer B endet. Das Zielprotein eluiert meist bei 25-30 % Imidazol. Um das Imidazol aus der Probe zu entfernen, ist ein anschließender Pufferwechsel durch Dialyse (D-TubesTM mit einer Ausschlussgröße von 3,5 kDa) oder durch einen weiteren Reinigungsschritt (z.B. Gelfiltration, B.7.6) sinnvoll. Bei der Abspaltung des His₆-„Tag“ durch die TEV-Protease konnte das native Protein durch Waschen der Matrix mit dem gewünschten Endpuffer (Tris- oder Phosphat-Puffer, B.7.1.2) eluiert werden. Der His₆-„Tag“ blieb an der Ni²⁺-Matrix zurück. Anschließend konnte mit weiteren Reinigungsschritten fortgefahren werden.

Die Reinigung wurde mittels SDS-PAGE (B.6.2.1.1) oder Immnuoblot (B.6.3.3) kontrolliert. Die Gesamtproteinmenge wurde nach Bradford (1976) bestimmt (B.6.1).

Puffer A 40 mM NaPO₄
 300 mM NaCl
 10 mM Imidazol
 pH 7,5

Puffer B 40 mM NaPO₄
 300 mM NaCl
 500 mM Imidazol
 pH 7,5

B.7.3 Produktion und Reinigung nativer Proteine

Für die Expression nativer Proteine wurde entweder das T7-RNA-Polymerase/Promotorsystem (Studier & Moffatt 1986) der pET-Vektoren oder der pWS151-Vektor verwendet (Tabelle 6), bei dem das Zielgen direkt unter der Kontrolle eines P_{taq} -Promotors steht. Wurde ein pET-Vektor verwendet, so musste der Vektor-kodierte His₆-„Tag“ durch ein Stoppcodon am 3'-Ende des zu klonierenden Fragments für die Expression entfernt werden. Der pWS151-Vektor bringt keinen „Tag“ mit. Die Expressionsbedingungen entsprechen den unter B.7.1.1 für GST-Fusionsproteine beschrieben. Die Überexpression des Zielproteins wurde mittels SDS-PAGE (B.6.2.1.1) überprüft.

B.7.3.1 Reinigung von nativen Proteinen

B.7.3.1.1 Ammoniumsulfat-Fällung

Da bei der Reinigung eines Proteins ohne „Tag“ meist kein bekannter Ligand zur Verfügung steht, muss man sich für die Reinigung die Eigenschaften des Proteins zunutze machen. Da Ammoniumsulfat zur nicht-denaturierenden Fällung von Proteinen führt, wird diese Methode häufig zum „Aussalzen“ von Proteinen verwendet, ein Vorgang, bei dem Proteinen die Hydrathülle entzogen wird. Stellt man nach der Präzipitation die ursprünglichen Bedingungen wieder her, lösen sich die gefällten Proteine erneut. Bei niedriger Salzkonzentration werden Proteine gefällt, die eine geringe Affinität zum Wasser haben. Um die optimale Ammoniumsulfat-Konzentrationen für die Fällung des Zielproteins zu ermitteln, wurden in Vorversuchen zunächst Ammoniumsulfat-Konzentrationen von 20-50 % getestet. Die Pellets wurden im 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 7,5 supplementiert mit 4 mM PMSF und 250 U Benzonase resuspendiert und durch drei French Press-Zyklen (1.000 psi) aufgeschlossen. Das

Lysat wurde durch Zentrifugation (30 min, 15.000 rpm) geklärt und mit einer gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung auf die gewünschte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Endkonzentration eingestellt. Die Präzipitation der Proteine erfolgte unter ständiger Rotation bei 4°C für 1 h. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (30 min, 15.000 rpm) gewonnen, dreimal mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5, x % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [v/v], 10 mM DTT gewaschen, in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM DTT resuspendiert und über Nacht gegen den gewünschten Endpuffer (Tris- oder Phosphat-Puffer, B.7.1.2) dialysiert, um das Salz aus der Ammoniumsulfat-Fällung zu entfernen. Anschließend konnten die Proteine durch Ionenaustauschchromatographie (B.7.3.1.2) weiter gereinigt werden.

B.7.3.1.2 Ionenaustauschchromatographie

Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie beruht darauf, dass Proteine in Abhängigkeit vom pH-Wert eine positive oder negative Nettoladung haben und dadurch an eine entsprechende Matrix, die ihrerseits positiv oder negativ geladen ist, binden können. Die Zugabe von Salz (z.B. NaCl) führt zur Elution der Proteine, da die positiv geladenen Na-Ionen mit den positiv geladenen Gruppen bzw. die Chlorid-Ionen mit den negativ geladenen Gruppen des Proteins um die Bindung am Ionenaustauscher konkurrieren. Proteine mit geringer Nettoladung werden dabei schneller verdrängt als Proteine mit einer hohen Nettoladung.

Nach Dialyse wurde das klare Lysat auf eine MonoQ-Säule gegeben, die vorher mit 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 40 mM NaCl, 1 mM DTT equilibriert worden war. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumen Equilibrierungspuffer gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem 0-100 % Gradienten des Elutionspuffers (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M NaCl, 1 mM DTT). Die positiven Fraktionen wurden für die anschließende Gelfiltration (B.7.6) vereinigt.

B.7.3.1.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Hydrophobizität beruht darauf, dass unpolare Moleküle von einer polaren Umgebung (z.B. Wasser) abgestoßen werden. Daher wird um ein hydrophobes Molekül im Wasser eine Höhle gebildet. Gibt man ein polares Lösungsmittel dazu, erzwingt dieses die Aggregation der hydrophoben Moleküle. Proteine, die auf der Oberfläche genügend hydrophobe Reste haben, lassen sich über eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) isolieren. Je hydrophober ein Protein ist, umso leichter adsorbiert es an die hydrophobe Säulenmatrix (z.B. Phenyl, Oktyl), ein Vorgang der durch Salz im Chromatographie-Puffer noch verstärkt werden kann, da es die Löslichkeit des Proteins weiter verringert. Die Bedingungen werden aber so gewählt, dass das Protein seine native Konformation behält.

Die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde mit einer HiTrap Phenyl-Sepharose-Säule durchgeführt. Dazu wurde die Proteinlösung mit 200 mM Ammoniumsulfat versehen, auf die Säule appliziert und mit einem absteigenden Salzgradient eluiert. Je stärker das Protein die Säulenmatrix bindet, um so später eluiert es. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0-100% des gewünschten Endpuffers (Tris- oder Phosphat-Puffer, B.7.1.2) ohne Salz.

B.7.4 Reinigung von Proteinen aus Einschlusskörpern („inclusion bodies“)

Wird ein Protein in Einschlusskörperchen (IB) als unlösliches Proteinaggregat abgelagert, so können die IBs aufgrund ihrer Masse und Hydrophobizität leicht durch Zentrifugation vom Bakterienlysat abgetrennt werden.

Für die Reinigung wurde das Bakterienpellet mit BugBuster nach Anweisung des Herstellers abgeschlossen. Zu dem Lysat wurde 1/3 Vol Waschpuffer I gegeben und die Suspension für 1 h bei RT rotierend inkubiert. Danach wurden die Einschlusskörperchen für 20 min bei 4°C und 15.000 rpm pelletiert. Das IB-Pellet wurde in 30 ml Waschpuffer I resuspendiert, für eine weitere Stunde bei RT rotierend inkubiert und erneut für 20 min bei 4°C und 15.000 rpm pelletiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal mit Waschpuffer I und dann dreimal mit Waschpuffer II wiederholt. Die Reinheit der IB-Präparation wurde mittels SDS-PAGE (B.6.2.1.1) überprüft. Da Proteine in IBs meist mit hoher Reinheit abgelagert werden, ist auch eine Reinigung von Proteinen ohne „Tag“ möglich. Proteine mit einem His₆-„Tag“ standen für weitere Reinigungsschritte über IMAC zur Verfügung (B.7.2.2), da der His₆-„Tag“ auch unter denaturierenden Bedingungen an die Matrix binden kann.

Waschpuffer I	50 mM Tris
	60 mM EDTA
	1,5 M NaCl
	6 % Triton-X-100
	pH 7,2

Waschpuffer II	50 mM Tris
	60 mM EDTA
	pH 7,2

B.7.5 Spaltung von Fusionsproteinen

Das Entfernen von „Tags“ diente dazu, Proteine nach der Reinigung in ihrer nativen Form zu gewinnen. Die Spaltung erfolgte über spezifische Erkennungssequenzen für Proteasen, die zuvor schon bei der Klonierung der Zielgene berücksichtigt worden sind. Die Erkennungssequenzen der verwendeten Proteasen sind im Folgenden aufgeführt:

Faktor Xa	Ile-Glu-Gly-Arg↓
PreScission™ Protease	Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln↓Gly-Pro
TEV-Protease	Glu-X-X-Tyr-X-Gln↓(Gly/Ser)
Thrombin	Leu-Val-Pro-Arg↓Gly-Ser

Für die TEV-Protease wurde die Erkennungssequenz Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Met verwendet. Die Spaltungsreaktion wurde jeweils wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt und mit SDS-PAGE (B.6.2.1.1) überprüft.

B.7.6 Gelfiltration (Größenausschluss-Chromatographie)

Die Gelfiltration beruht auf der Trennung von Proteinen nach ihrer Größe. Die Säulenmatrix ist durch quervernetzte Polymere, die eine Netzstruktur bilden, so angelegt, dass Proteine mit zunehmender Größe schneller über die Säule laufen und damit früher eluieren. Kleine Moleküle können in die Hohlräume der Polymere eindringen und wandern somit langsamer. Die Gelfiltration wird typischerweise als zweiter Schritt bei einer Proteinreinigung über einen „Tag“ oder nach einer Fällung eingesetzt, um die Reinheit der Proteinlösung weiter zu erhöhen.

Gelfiltrationen wurden mit einer Superdex 75 PC 3.2/30 oder Superdex 200 PC 3.2/30 durchgeführt. Die Säulen wurden mit dem gewünschten Puffer equilibriert (Tris- oder Phosphat-Puffer, B.7.1.2) und anschließend die Proteinprobe aufgetragen. Die Eluate wurden fraktioniert und mit SDS-PAGE analysiert (B.6.2.1.1). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, bei Bedarf eingeeengt (B.7.7) und die Gesamtproteinmenge nach Bradford (1976) bestimmt (B.6.1).

B.7.7 Einengen von Proteinen

Proteinlösungen wurden mit Konzentratoren für die Zentrifuge der Firma Vivascience (Hannover) eingeeengt. Es wurden Konzentratoren mit zwei verschiedenen Membranen eingesetzt: zum einen eine Polyethersulfon-Membran und zum anderen eine Hydrosart®-Membran. Je nach Größe des zu konzentrierenden Proteins wurden Konzentratoren mit einer Ausschlussgrenze von 3 kDa, 10 kDa oder 30 kDa verwendet.

B.7.8 Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung)

Die TCA-Fällung erlaubt die Analyse von Proteinen aus dem Kulturüberstand mit SDS-PAGE (B.6.2.1.1). Das Fällung der Proteine erfolgte, indem zum Kulturüberstand 1/10 Vol 100%ige Trichloressigsäure (TCA) gegeben und die Proben bei 4°C für mindestens 1 h inkubiert wurden. Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation (30 min, 15.000 rpm) verworfen und das Proteinpellet zweimal mit 4°C kaltem Aceton gewaschen (30 min, 15.000 rpm). Ein dritter Waschschrift erfolgte mit H₂O_{dest.} (10 min, 15.000 rpm). Das resultierende Pellet wurde mit SDS-PAGE analysiert (B.6.2.1.1).

B.8 Herstellung von Antisera

B.8.1 Herstellung polyklonaler Antisera

Zur Herstellung polyklonaler Antisera wurden Kaninchen mit gereinigtem Zielprotein immunisiert. Der Immunisierungsauftrag wurde an den Pineda Antikörper-Service (Berlin) erteilt. Die eingesandte Proteinlösung hatte eine Konzentration von 1 µg/µl. Die Immunisierung des Kaninchens erfolgte initial mit 150 µg Protein, im Abstand von ca. drei Wochen wurden jeweils weitere 100 µg Protein subkutan gespritzt. 10 Tage nach jeder Immunisierung wurden Serumproben auf ihren Antikörpertiter untersucht. Die Immunisierung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- | | |
|---------|--|
| 0. Tag | Präimmuns Serum (2 ml)
Primärimmunisierung mit komplettem Freund'schem Adjuvans |
| 20. Tag | 1. Injektion (150 µg Protein mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans) |
| 30. Tag | 2. Injektion (100 µg Protein mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans) |
| 40. Tag | 3. Injektion (100 µg Protein mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans) |
| 60. Tag | 4. Injektion (100 µg Protein mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans)
Endblutung (> 50 ml) |

Die Gewinnung des Antikörper-haltigen Serums aus dem Vollblut erfolgte, indem das frische Blut für 1 h bei RT inkubiert und dann bei 2.000 rpm für 30 min zentrifugiert wurde. Durch die Zentrifugation trennt sich das Blut in zwei Schichten: das bernsteinfarbene Plasma oben und die dunkelroten Erythrozyten unten. Die Seren wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

B.8.2 Herstellung monoklonaler Antiseren

B.8.2.1 Immunisierung der Mäuse

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurden BALB/c Mäuse initial mit 50 µg Protein immunisiert. Im Abstand von zwei Wochen folgten zwei weitere Injektionen. Die Immunisierung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- | | |
|---------|---|
| 1. Tag | 1. Injektion (50 µg Protein mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans) |
| 14. Tag | 2. Injektion (50 µg Protein mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans) |
| 28. Tag | 3. Injektion (50 µg Protein) |
| 32. Tag | Entnahme der Milz und Herstellung einer Einzelzellsuspension |

B.8.2.2 Fusion der Lymphozyten

Die aus der Milz immunisierter Mäuse gewonnenen Antikörper-bildenden Plasmazellen wurden mit einer Maus-Myelomzelllinie fusioniert. Um die aus der Fusion resultierenden Hybridomazellen nach der Fusion von restlichen Myelomzellen trennen zu können, wird ein Selektionssystem verwendet, das auf einem Enzymdefekt der Myelomzellen beruht. Für Zellen gibt es zwei Möglichkeiten Purinbasen zu synthetisieren, die wiederum für die Synthese von DNA wichtig sind. Bei den verwendeten Myelomzellen wurde der Weg über die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase ausgeschaltet und der andere Weg kann durch Zugabe von Azaserin blockiert werden. Normale Zellen können in Anwesenheit von Azaserin bei Zugabe von Hypoxanthin daher das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase für die Purin-Synthese verwenden. Es können also unter entsprechendem Selektionsdruck nur Zellen überleben, die aus der Fusion einer Myelomzelle (Immortalisierung) und eines Lymphozyten (Kompensation des Stoffwechseldefekts) hervorgegangen sind.

Für die Fusion wurde aus der Milz durch mehrfaches Spülen durch eine Spritze eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Maus-Myelomzelllinie P3-X63-Ag8 war auf ca. 4×10^8 Zellen herangezogen worden und wurde nun bei 950 rpm (5 min) sedimentiert. Das Pellet wurde einmal in HEPES-Medium gewaschen. Die Myelomzellen wurden mit den Lymphozyten gemischt und zusammen zentrifugiert (950 rpm, 5 min). Das Zellpellet wurden bei 37°C im Wasserbad inkubiert und unter leichtem Schütteln tropfenweise innerhalb einer Minute 1 ml Polyethylenglycol 4000-Lösung (PEG 4000) zugegeben. Nach 1-minütiger Inkubation wurde die PEG 4000-Lösung durch Zugabe von HEPES-Medium verdünnt (1 ml in 30 sek, 3 ml in 30 sek, 16 ml in 1 min). Anschließend wurden die Zellen bei 37°C für 5 min inkubiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in HA(Hypoxanthin/Azaserin)-Selektionsmedium resuspendiert und die Suspension auf 24-, „well“-Platten verteilt.

HEPES-Medium	25 mM HEPES-Puffer in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Polyethylenglycol 4000-Lösung	5 g PEG 4000 5 ml HEPES-Medium pH 7,4
HA-Selektionsmedium	5 % FCS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 1 % HCF („hybridoma cloning factor“) 10 mg Hypoxanthin 0,75 m Azaserin ad 500 ml Opti-MEM-Medium

B.8.2.3 Durchmusterung der Hybridomaüberstände

Die Durchmusterung der Hybridomaüberstände erfolgte nach 10-12 Tagen Inkubationszeit. Wenn sich in den einzelnen Vertiefungen der Platte deutlich sichtbare Zellhaufen gebildet hatten, wurde ein Teil des Überstands für die Durchmusterung abgenommen. Dabei kamen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz. Zum einen wurde das rekombinante Protein, das als Antigen gedient hatte, für ELISA-Tests eingesetzt, zum anderen wurden Immunoblots angefertigt. Das Vorgehen für beide Testverfahren ist unter B.6.3.4 bzw. B.6.3.3 beschrieben.

B.9 PEPC-Aktivitätsassay

Die Enzymaktivität der PEPC wurde photospektrometrisch mittels eines gekoppelten Assays bestimmt. Im ersten Reaktionsschritt wird Phosphoenolpyruvat (PEP) durch das Enzym PEPC zu Oxalacetat carboxyliert, das dann durch die Malatdehydrogenase (MDH) zu L-Malat umgesetzt wird. Die Reaktion der MDH wird durch die Oxidation von NADH zu NAD⁺ angetrieben. Dadurch ist eine Messung der Enzymaktivität der PEPC über die Bestimmung der Abnahme von NADH im Reaktionsansatz bei 340nm möglich. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt vorbereitet und bis zur Verwendung auf Eis inkubiert:

100 mM Tris-HCl pH 8,0
10 mM NaHCO₃
10 mM MgSO₄
0,2 mM NADH
1 U MDH

Dem Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 100 μl wurden 100 nM PEPC und mögliche Effektoren zugesetzt. Das Gemisch wurde 5 min bei 37°C auf einem Heizblock inkubiert. Dann wurden 5 mM PEP als Substrat zugegeben, um die Reaktion zu starten, und die Abnahme der Absorption sofort im Photometer bei 37°C gemessen. Gereinigte PEPC wurde dabei so eingesetzt, dass die Abnahme der Absorption bei 340nm ungefähr 0,1/min bis 0,2/min entsprach. Gereinigte potentielle Effektoren wurden in Konzentrationen von 100 nM-40 μM eingesetzt. Abgeleitete Peptide wurden in Konzentrationen von 10-50 μM eingesetzt. Es wurden jeweils vier unabhängige Messungen durchgeführt und die Werte der Steigungen gemittelt.

B.10 Wachstumsversuche in M9-Medium

Um den Einfluss der PEPC auf das Wachstum von *Y. enterocolitica* WA-314 zu testen, wurden die Bakterien in M9-Medium supplementiert mit MgSO_4 , CaCl_2 und Glukose kultiviert (B.3.1).

Yersinien wurden über Nacht in BHI mit Antibiotika bei 27°C angezogen. 4 ml der $\bar{u}\text{N}$ -Kultur wurden zweimal mit PBS gewaschen und die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ bestimmt. 20 ml M9-Medium wurden mit 0,01 % Casamino-säuren und 1 mM Thiamin supplementiert und mit den gewaschenen Zellen so beimpft, dass die resultierende $\text{OD}_{600\text{nm}} \sim 0,2$ betrug. Sollte während des Versuchs ein Protein überexprimiert werden, wurde dem Medium zusätzlich 1 mM IPTG hinzugefügt. Die Start-OD wurde bei 600nm überprüft und dann für 7 h stündlich das Wachstum bei 27°C überprüft. Es wurden jeweils drei Ansätze aus unabhängigen Übernachtskulturen beimpft. Nach 7 h wurden von allen Kulturen Proben gewonnen, um die Expression der IPTG-induzierten Proteine mittels SDS-PAGE (B.6.2.1.1) zu überprüfen.

B.11 Analyse der Yop-Sekretion von *Yersinia enterocolitica*

B.11.1 Analyse der Yop-Sekretion von *Yersinia enterocolitica* in BHI

Yersinien wurden über Nacht bei 27°C in BHI angezogen. Die Kulturen wurden 1:10 verdünnt, mit 0,2 mM CaCl_2 supplementiert und bei 37°C für 2 h inkubiert, um die Synthese der Yop-Proteine zu induzieren. Dann wurde das Medium zusätzlich mit 5 mM EGTA und 10 mM MgCl_2 supplementiert, um die Sekretion der Yop-Proteine zu induzieren und die Kulturen für weitere 2-3 h bei 37°C inkubiert. Sollte in einem Kontrollansatz die Yop-Sekretion unterbunden werden, wurde das Medium zu Beginn des Versuchs mit 1 mM CaCl_2 supplementiert. Die Inkubation erfolgte dann für 4-5 h ohne weitere Supplementierung. Die Fällung der Überstandsproteine erfolgte durch TCA (B.7.8).

B.11.2 Analyse der Yop-Sekretion von *Yersinia enterocolitica* nach ^{13}C -Markierung in F12-Medium

Das F12-Zellkulturmedium zeichnet sich dadurch aus, dass die *Y. enterocolitica* Mutanten WA-314 Δ *ppc* und WA-314 Δ *yscMI* sich in Yop-Sekretion und -Expression vom wildtypischen Stamm unterscheiden. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung des F12-Mediums.

Yersinien wurden über Nacht bei 27°C in BHI kultiviert. 4 ml der Kulturen wurden pelletiert, zweimal mit F12 gewaschen und 5 ml F12-Medium mit einer Start-OD_{600nm} von ~ 0,15 beimpft. Die Kulturen wurden entweder mit 2 % [U- $^{13}\text{C}_6$]glukose oder mit 2 % nicht-markierter Glukose supplementiert. Zusätzlich wurde das Medium mit 0,2 mM CaCl₂ supplementiert, um die Sekretion der Yop-Proteine zu inhibieren. Die Kulturen wurden bei 37°C für 2 h inkubiert, um die Synthese des T3S-Apparates zu erlauben. Dann wurde durch Zugabe von 5 mM EGTA und 10 mM MgCl₂ die Yop-Sekretion induziert, und die Kulturen für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen, die sekretierten Proteine durch TCA gefällt (B.7.8) und durch SDS-PAGE (B.6.2.1.1) aufgetrennt. Die Coomassie-gefärbten Banden von YopM, YopE und YopH wurden aus dem Gel ausgeschnitten, im Gel trypsinverdaut und durch MALDI-TOF wie unter B.14 beschrieben analysiert.

Tabelle 13: Zusammensetzung des F12-Zellkulturmediums

Komponente	Konzentration (mg/l)
Aminosäuren	
Glycin	7,50
L-Alanin	8,91
L-Arginin	210,70
L-Asparagin	15,00
L-Asparaginsäure	13,31
L-Cystein	35,12
L-Glutaminsäure	14,70
L-Histidin	20,96
L-Isoleucin	3,94
L-Leucin	13,10
L-Lysin	36,54
L-Methionin	4,48
L-Phenylalanin	4,96
L-Prolin	34,53
L-Serin	10,50
L-Threonin	11,90
L-Tryptophan	2,04
L-Tyrosin	5,44
L-Valin	11,70
Vitamine	
Cholinchlorid	13,96
D(+)-Biotin	0,007
D-Calciumpantothenat	0,48
Folsäure	1,32
Myo-Inositol	18,02

Niacinamid	0,037
Pyridoxal	0,062
Riboflavin	0,038
Thiamin	0,34
Vitamin B12	1,36
Anorganische Salze	
Eisensulfat	0,834
Kaliumchlorid	223,60
Kupfersulfat	0,003
Magnesiumchlorid	122,00
Natriumchlorid	7599,00
Natriumhydrogencarbonat	1176,00
di-Natriumhydrogenphosphat	142,04
Zinksulfat	0,863
Andere Komponenten	
DL- α -Liponsäure	0,21
Deoxythimidin	0,73
D-Glukose	1802,00
Hypoxanthin	4,08
Linolsäure	0,084
Natriumpyruvat	110,10
Phenolrot	1,20
Putrescin	0,161

B.12 Zellbiologische Methoden

B.12.1 Infektion von eukaryotischen Zelllinien mit *Yersinia enterocolitica*

Auf Deckgläschen wachsende konfluente HeLa-Zellen oder J774-Makrophagen wurde mit verschiedenen *Y. enterocolitica*-Stämmen infiziert. Die Bakterienstämme wurden mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 27°C in BHI angezogen. Aus der üN-Kultur wurden entweder 10 ml BHI direkt mit einer Start-OD_{600nm} von ~ 0,1 beimpft oder 4 ml abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und 10 ml F12-Medium mit einer Start-OD_{600nm} von ~ 0,2 beimpft. Die Medien wurden mit 0,2 mM CaCl₂ supplementiert, um die Yop-Synthese zu erlauben, aber die Yop-Sekretion zu unterbinden. Die Stämme wurden für 2 h bei 37°C kultiviert. Danach wurden 2-4 ml der Kulturen pelletiert (11.000 rpm, 2 min) und für die Infektion in frischem Medium (BHI bzw. F12) auf eine OD_{600nm} von 0,1 eingestellt. Dabei entspricht 1 µl der Suspension 0,5 x 10⁵ Bakterien, so dass für die Infektion das benötigte Volumen an Zellsuspension für die gewünschte MOI („multiplicity of infection“) berechnet werden kann. Die verwendete Zelllinie war am Tag zuvor mit der gewünschten Zelldichte in Zellkulturflaschen oder -platten ausgesät worden und wurde nun dreimal mit PBS gewaschen, mit frischem Medium versehen und die gewünschte Menge Bakteriensuspension zugegeben. Je nach Versuchsansatz wurden dem frischen Medium weitere Zusätze hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂. Je nach angestrebtem Versuch wurde im Anschluss unterschiedlich weiter verfahren.

B.12.2 Apoptose-Assay mit *Yersinia enterocolitica*

Der programmierte Zelltod geht mit charakteristischen Veränderungen der Zelloberfläche einher. Eine der frühen Veränderungen während der Apoptose ist die Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite der Plasmamembran an die Zelloberfläche. Annexin V ist ein Phosphatidyl-bindendes Protein mit hoher Affinität für PS. Durch die Kopplung des Annexin V an ein Fluorochrom kann die veränderte Zelloberfläche mittels FACS („fluorescence activated cell sorting“) oder Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Da nekrotische Zellen durch den Verlust der Membran-Integrität ebenfalls Annexin V binden können, wird zusätzlich mit Propidiumiodid gefärbt. Dieser DNA-Farbstoff kann nur die permeabilisierte Membran nekrotischer Zellen durchdringen und die Zellkerne rot färben. Die Anzucht von *Y. enterocolitica* WA-314, WA-314 Δ *ppc*, WA-314 Δ *yscM1* und WA-314 Δ *yscM2* erfolgte wie unter B.12.1 beschrieben in F12. 5×10^5 J774-Makrophagen waren am Tag zuvor in 6-„well“-Platten mit Deckgläschen ausgesät worden, um ihnen eine Teilung bis zur Infektion zu ermöglichen. Die Makrophagen wurden mit einer MOI 50 in F12-Medium infiziert. Die Bakterien wurden auf die Zelllinie zentrifugiert (800 rpm, 5 min) und für 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Bakterien mit Gentamicin abgetötet und die Platten für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurde die erste Apoptose-Färbung mit dem Annexin-V-FLUOS Staining Kit nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Im Abstand von 1 h wurden über einen Zeitraum von insgesamt 5,5 h weitere Färbungen durchgeführt. Alle Präparate wurden mit Nagellack fixiert und sofort mikroskopiert, da die Färbung nur für einen kurzen Zeitraum stabil bleibt. Pro Präparat wurde bei 63-facher Vergrößerung für mindestens 300 Zellen die Apoptose-Rate bestimmt.

B.12.3 Invasions-Assay mit *Yersinia enterocolitica*

Der Invasions-Assay ermöglicht die Bestimmung der Anzahl intrazellulärer Bakterien, indem nach einer definierten Inkubationszeit extrazelluläre Bakterien durch Gentamicin abgetötet werden. Nach Aufschluss der infizierten Zellen werden die freigesetzten Bakterien ausplattiert und die „colony forming unit“ (cfu) bestimmt.

Der Versuch wurde in 24-„well“-Platten durchgeführt. Die Infektion erfolgte mit *Y. enterocolitica* WA-314, WA-314 Δ *ppc*, WA-314 Δ *yscM1*, WA-314 Δ *yscM2*, WA-C und WA-C Δ *inv*. Für jeden Stamm wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Zusätzlich erfolgte mit jedem Stamm die Infektion der Zellkulturen bei 27°C und 37°C. Die Bakterienstämme wurden wie unter B.12.1 beschrieben in F12-Medium vorbereitet. Die Infektion wurde in F12-Medium mit einer MOI 50 an HeLa-Zellen durchgeführt. Dafür wurde das F12-Medium zusätzlich mit 20 mM HEPES und 0,4 BSA supplementiert. Die Bakterien wurden auf die Zell-Monoschicht zentrifugiert (800 rpm, 5 min) und die Platten für 90 min bei 27°C (adhärente Bakterien) bzw. 37°C (intrazelluläre Bakterien) inkubiert. Nach dieser Zeit wurde den Zellkulturen bei 37°C Gentamicin zugesetzt und die Kulturen für weitere 60 min in

Mowiol	6 mg Glycerol
	2,4 mg Mowiol
	12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5
	6 ml H ₂ O _{dest}

B.13 Circular dichroismus(CD)-Spektrometrie

Die CD-Spektroskopie erlaubt eine schnelle Analyse der Konformation eines Proteins. Da α -helikale Elemente im kurzwelligen UV-Bereich stärkere Signale als β -Falblätter ergeben und charakteristische Minima bilden, kann der Anteil von Sekundärstrukturelementen in einem Protein bestimmt werden. Im längerwelligen Bereich lassen sich Rückschlüsse auf die korrekte Faltung des Proteins schließen. Weit-UV (ultraviolett) CD-Spektren von SycD (0,1 mg/ml) wurden in 20 mM NaHPO₄, 50 mM KF pH 7,5 bei 20°C mit einem Jasco J-715 Spektropolarimeter (Jasco, Großumstadt), ausgestattet mit einer PTC343 Peltiereinheit, in einer 1 mm Quarzküvette aufgenommen. 12 Messungen wurden gemittelt und mit dem Puffersignal korrigiert. Die molare Eliptizität wurde für den mittleren Aminosäurerest (MRW) kalkuliert. Die Experimente wurden an der Technischen Universität München in einer Kooperation mit Stefan Walter¹ durchgeführt.

B.14 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie zur Bestimmung von Peptidmassen wurde von Axel Imhof² durchgeführt. Die Proben wurden zweimal mit Wasser und zweimal mit 40 mM NH₄HCO₃, pH 8 gewaschen. Nach zweifacher Behandlung mit 50 % Acetonitril erfolgte über Nacht bei 37°C der Trypsinverdau direkt im Gel in 40 mM NH₄HCO₃, pH 8. Die resultierende Mischung aus Peptiden wurde mit MALDI-TOF („matrix-assisted laser desorption ionisation“ kombiniert mit einem Voyager-DE STR „time of flight“-Detektor; Applied Biosystems, Foster City) auf einem Bruker Daltonics (Bremen) ReflexIII, ausgestattet mit einer Scout348TM-Quelle, bei einer Ionisierungsspannung von 20 V, analysiert (Tsarbooulos *et al.* 1994). Peptidmassen wurden mit Mascot (<http://www.mascotscience.com/>) ausgewertet. Die resultierenden Spektren aus der ¹³C-Markierung (B.11.2) wurden mit der „Data Explorer Software“ (Applied Biosystems, Foster City) ausgewertet.

¹Technische Universität München, Lichtenbergstraße 4, 58748 Garching, derzeit University of Michigan, Ann Arbor, USA

²Ludwig-Maximilians-Universität München, Zentrallabor für Proteinanalytik, Schillerstraße 44, 80336 München

B.15 Kleinwinkelstreuung

Kleinwinkelstreu- oder „Small angle X-ray scattering“(SAXS)-Messungen erlauben die Analyse der Oberflächenform von Molekülen in Lösung. Die Synchrotron Röntgenstreudaten wurden nach Standardvorgehen auf dem Kleinwinkelstreustrahlengang X33 (Rössle *et al.* 2007) des EMBL Hamburg am Speicherring DORIS III des Deutsches Elektronen Synchrotron (DESY) in einer Kooperation mit Manfred Rössle³ aufgenommen. Die Streudaten wurden mit Hilfe einer Imageplatte mit Onlineauslesung aufgenommen (MAR345, MarResearch, Norderstedt). Das Streumuster der PEPC und PEPC/YscM-Komplexe wurde mit einem Proben-Detektor-Abstand von 2,4 m gemessen, womit ein Impulstransfer im Bereich von $0,1 < s < 4,5 \text{ nm}^{-1}$ ($s = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$, wobei θ der Streuwinkel und $\lambda = 0,15 \text{ nm}$ die Wellenlänge des Röntgenstrahls ist) abgedeckt wurde.

Die Streuung der PEPC wurde bei 2,4 mg/ml aufgenommen. Die PEPC/YscM1- und PEPC/YscM2-Komplexe wurden bei einer PEPC-Konzentration von 0,6 mg/ml und 1,6 mg/ml des entsprechenden YscM-Proteins gemessen. Alle Proteinlösungen wurden mit D-TubesTM mit einer Ausschlussgröße von 3,5 kDa (Novagen) auf PBS equilibriert. Wiederholte Messungen derselben Proteinlösung wurden für 120 sek durchgeführt, um Strahlenschäden auszuschließen. Während der ersten Exposition für 120 sek konnte keine Aggregation festgestellt werden, so dass die erste Messung für die weiteren Analysen verwendet wurde. Die Daten wurden auf die Intensität des einfallenden Strahls normalisiert, die Streuung des PBS-Puffers wurde abgezogen und die Differenzierungskurven an die Konzentration angepasst. Alle datenprozessierenden Schritte wurden mit dem Programmpaket PRIMUS (Konarev *et al.* 2003) durchgeführt. Die Vorwärtsstreuung $I(0)$ und der Gyrationradius R_g wurden mit Hilfe der Guinier-Approximation abgeschätzt (Guinier & Fournet 1955) unter der Annahme, dass bei sehr kleinen Winkeln ($s < 1,3/R_g$) die Intensität durch $I(s) = I(0) \exp(-(sR_g)^2/3)$ repräsentiert wird. Diese Parameter wurden auch aus dem gesamten Streumuster mit Hilfe des Pakets GNOM zur indirekten Umwandlung (Semenyuk & Svergun 1991) berechnet, das auch die Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$ des Partikels erstellt. Für die PEPC betrug der Gyrationradius 5,55nm, für die PEPC/YscM1- und PEPC/YscM2-Komplexe 5,75nm bzw. 5,52nm. Der Gyrationradius für SycD betrug 27,6 Å und D_{max} 95 Å. Das Molekulargewicht der Proteine wurde aus dem Vergleich mit der Vorwärtsstreuung einer Referenzlösung mit Rinderserumalbumin (BSA) kalkuliert.

Niedrigauflösende Modelle von SycD, PEPC, PEPC/YscM1 und PEPC/YscM2 wurden unter Anwendung von *ab initio* Modellierungstechniken erstellt. Das Programm DAMMIN (Svergun 1997) repräsentiert den Proteinumriss als eine Zusammenstellung von $M \gg 1$ dicht gepackter Kügelchen innerhalb eines durchsuchten Volumens (eine Sphäre des Durchmessers D_{max}). Jedes Kügelchen gehört entweder zum Protein (Index=1) oder zur umgebenden Lösung (Index=0) und die Form wird auf diese Weise durch eine binäre Folge der Länge M beschrieben. Beginnend von einer zufälligen Folge wird eine Angleichung vorgenommen, um eine kompakte Konfiguration der Kügelchen zu identifizieren,

³EMBL Hamburg, Notkestraße 85, 22603 Hamburg

die die Diskrepanz χ zwischen den experimentellen Daten $I_{\text{exp}}(s)$ und den kalkulierten $I_{\text{calc}}(s)$ Kurven minimiert:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_j \left[\frac{I_{\text{exp}}(s_j) - cI_{\text{calc}}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2$$

wobei N die Anzahl der experimentellen Punkte, c ein Maßstabsfaktor und $\sigma(s_j)$ der experimentelle Fehler beim Impulstransfer s_j ist.

In einem ersten Schritt wurde die Modellierung der Umrise von PEPC, PEPC/YscM1 und PEPC/YscM2 ohne jegliche Symmetrievorgaben durchgeführt. Sowohl diese ersten Modelle als auch biochemische Daten legen eine p22 Symmetrie nahe. Für detailliertere Analysen wurden zehn unabhängige DAMMIN Rekonstruktionen mit einer p22 Symmetrie durchgeführt und die Modelle mit dem Paket DAMAVER (Kozin & Svergun 2001) analysiert. Dieses Paket gleicht alle möglichen Modellpaare unter Verwendung des Programms SUBCOMB (Volkov & Svergun 2003) ab und identifiziert das wahrscheinlichste Modell, das im Mittel die geringste Diskrepanz mit den restlichen Modellen aufweist. Darüber hinaus wird das gemittelte Modell berechnet, indem alle anderen Modelle mit dem wahrscheinlichsten Modell abgeglichen werden unter Berechnung der Dichte der Kügelchen und Bestimmung des Grenzbereichs, der zum Ausschlussvolumen des Partikels gehört. Die χ -Werte für die Modelle der Rekonstruktion der Umrise reichen von 1,62 für die PEPC, 1,45 für PEPC/YscM1 bis 1,59 für PEPC/YscM2.

C ERGEBNISSE

C.1 Reinigung von SycD

Bei SycD (LcrH in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*) handelt es sich um ein Klasse II-Chaperon der Typ III Sekretionssysteme. Während viele Klasse I-Chaperone verschiedener Typ III Sekretionssysteme gut charakterisiert sind und auch bereits erfolgreich eine hochauflösende Struktur ermittelt werden konnte, ist über Klasse II-Chaperone nur wenig bekannt. Klasse I-Chaperone binden die Effektoren, die in das Wirtszellzytoplasma transloziert werden, Klasse II-Chaperone dagegen binden die Translokatoren (Abbildung 5) (Wattiau & Cornelis 1993; Wattiau *et al.* 1994; Frithz-Lindsten *et al.* 1995; Iriarte & Cornelis 1998; Neyt & Cornelis 1999b; Letzelter *et al.* 2006). Die Translokatoren des *Yersinia* Systems sind YopB und YopD, die vermutlich eine Pore in der Wirtszellmembran bilden (Neyt & Cornelis 1999a). Wie eine Vielzahl von Transmembranproteinen bilden auch YopB und YopD charakteristische α -helikale Bereiche, sogenannte Transmembrandomänen, die vermutlich maskiert werden müssen, um eine Aggregation zu verhindern. Es ist also vorstellbar, dass Klasse II-Chaperone eine völlig andere Struktur haben als Klasse I-Chaperone, die für die Effektoren möglicherweise eine andere Bedeutung haben wie beispielsweise die Maskierung zytotoxischer Domänen im bakteriellen Zytoplasma. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass alle Klasse I-Chaperone aus α -Helices und β -Faltblättern bestehen, während in der Aminosäuresequenz von SycD drei direkt hintereinander liegende Tetratricopeptid(TPR)-Motive identifiziert wurden, die den Großteil der Sequenz des Proteins umfassen (Pallen *et al.* 2003). Jedes dieser 34 Aminosäuren langen Motive bildet zwei charakteristische α -Helices (Hirano *et al.* 1990; Sikorski *et al.* 1990), so dass die Vermutung nahe liegt, dass SycD eine andere Struktur annimmt als die bekannten Klasse I-Chaperone. Darüber hinaus wurde von verschiedenen Klasse I-Chaperonen gezeigt, dass sie mit den Regulatorproteinen YscM1 und YscM2 wechselwirken (Swietnicki *et al.* 2004; Cambronne *et al.* 2004). Zusätzlich konnte von Swietnicki *et al.* (2004) auch eine Interaktion des Klasse II-Chaperons LcrH, dem SycD-homologen Protein aus *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*, mit YscM2 nachgewiesen werden (Abbildung 5A). Diese Wechselwirkungen sind im Hinblick auf die Regulation der Typ III Sekretion besonders interessant, da YscM1 und YscM2 eine zentrale Rolle als Regulatoren der Typ III Sekretion spielen. Eine Doppelmutante in *yscM1* und *yscM2* zeigt bezüglich der Yop-Sekretion einen deregulierten Phänotyp (Stainier *et al.* 1997; Cambronne & Schneewind 2002). Daher sollte SycD zum einen für eine nähere Charakterisierung, speziell der Interaktion mit YscM2, aber auch für die Überprüfung einer Wechselwirkung mit YscM1 (Abbildung 5B) und für Kristallisationsversuche rekombinant gereinigt werden. Zum anderen sollte SycD aufgrund der Wechselwirkung mit YscM2 (Swietnicki *et al.* 2004) auf einen Einfluss auf das Stoffwechsellenzym Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) untersucht werden, da dieses in der Doktorarbeit von Neumayer (2005) als Wechselwirkungspartner von YscM1 und YscM2

identifiziert worden war. Dies war von besonderem Interesse, da SycD selbst Bestandteil des komplexen Regulationssystems der Typ III Sekretion ist, da es gemeinsam mit YopD an der Regulation der Yop-Synthese beteiligt ist (Bergman *et al.* 1991; Francis *et al.* 2001). Das Chaperon sollte in zwei Varianten gereinigt werden: mit C-terminalem Hexahistidin-„Tag“ direkt am 3'-Ende der kodierenden Sequenz und mit abspaltbarem N-terminalem Hexahistidin-„Tag“, um das native Protein zu gewinnen.

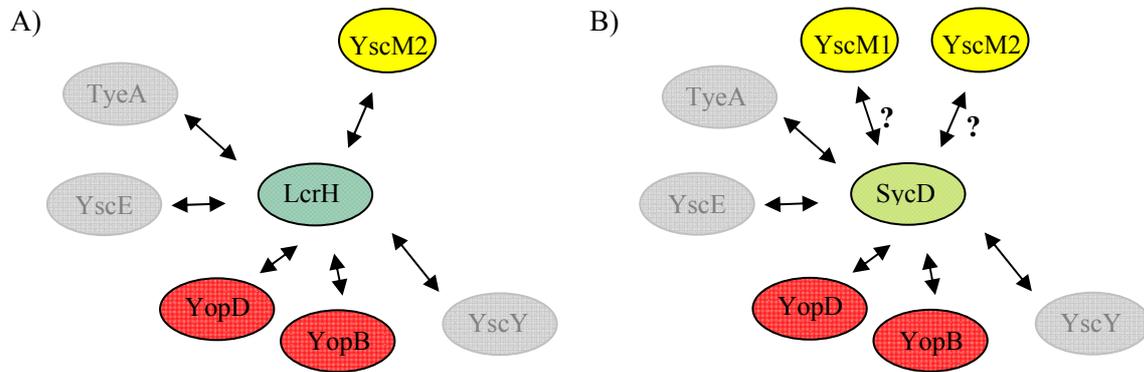


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Wechselwirkungspartner von LcrH aus *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis* und des homologen SycD aus *Y. enterocolitica*.

(A) Wechselwirkungspartner des Chaperons LcrH aus *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis*. (B) Wechselwirkungspartner des LcrH-homologen SycD aus *Y. enterocolitica*. LcrH und das homologe SycD dienen als Chaperon für die Translokatoren des *Yersinia* Typ III Sekretionssystems YopB und YopD, die rot dargestellt sind. Von LcrH wurde gezeigt, dass es mit dem T3SS-Regulator YscM2 interagiert, der gelb dargestellt ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass SycD ebenfalls mit YscM2 wechselwirkt. Da YscM2 durch eine Genduplikation aus YscM1 hervorgegangen ist, wäre zusätzlich eine Interaktion von SycD mit YscM1 denkbar. Alle weiteren bekannten Wechselwirkungspartner von LcrH bzw. SycD sind grau dargestellt.

C.1.1 Klonierung von SycD in den Expressionsvektor pET-24b

Für die Klonierung mit C-terminalem His₆-„Tag“ wurde das 507 bp große *sycD* aus der isolierten Gesamt-DNA von *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Primern SycD_NdeI_for und SycDHis_NotI_rev amplifiziert (Tabelle 8). Dabei wurde der C-terminale His₆-„Tag“ durch einen Überhang des reversen Primers SycDHis_NotI_rev an das Gen angefügt. Zusätzlich fügt der Primer ein RGS-Motiv zwischen *sycD* und dem His₆-„Tag“ ein. Das erlaubt später eine spezifischere Detektion des Proteins mit einem Antiserum gegen das RGS-His₄-Motiv als das mit einem gegen den His₆-„Tag“ gerichteten Antikörper der Fall wäre. Nach Subklonierung in pMOSBlue wurde das *sycD*-Fragment über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in den Expressionsvektor pET-24b ligiert (Tabelle 6, Abbildung 6).

Für die Klonierung mit N-terminalem His₆-„Tag“ und TEV-Proteaseschnittstelle wurde *sycD* aus der isolierten Gesamt-DNA von *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Primern SycDHis_TEV_NdeI_for und SycD_NotI_rev amplifiziert (Tabelle 8). Der N-terminale His₆-„Tag“ und die Proteaseschnittstelle wurden durch einen Überhang des Primers SycDHis_TEV_NdeI_for an das 5'-Ende des Gens angefügt. Nach Subklonierung in pMBL-T/A wurde das *sycD*-Fragment über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in den Expressionsvektor pET-24b ligiert (Tabelle 6, Abbildung 6).

Die korrekte Sequenz der resultierenden Plasmide pET24b-sycD-His und pET24b-His-TEV-sycD wurde durch Sequenzierung bestätigt (Tabelle 7).

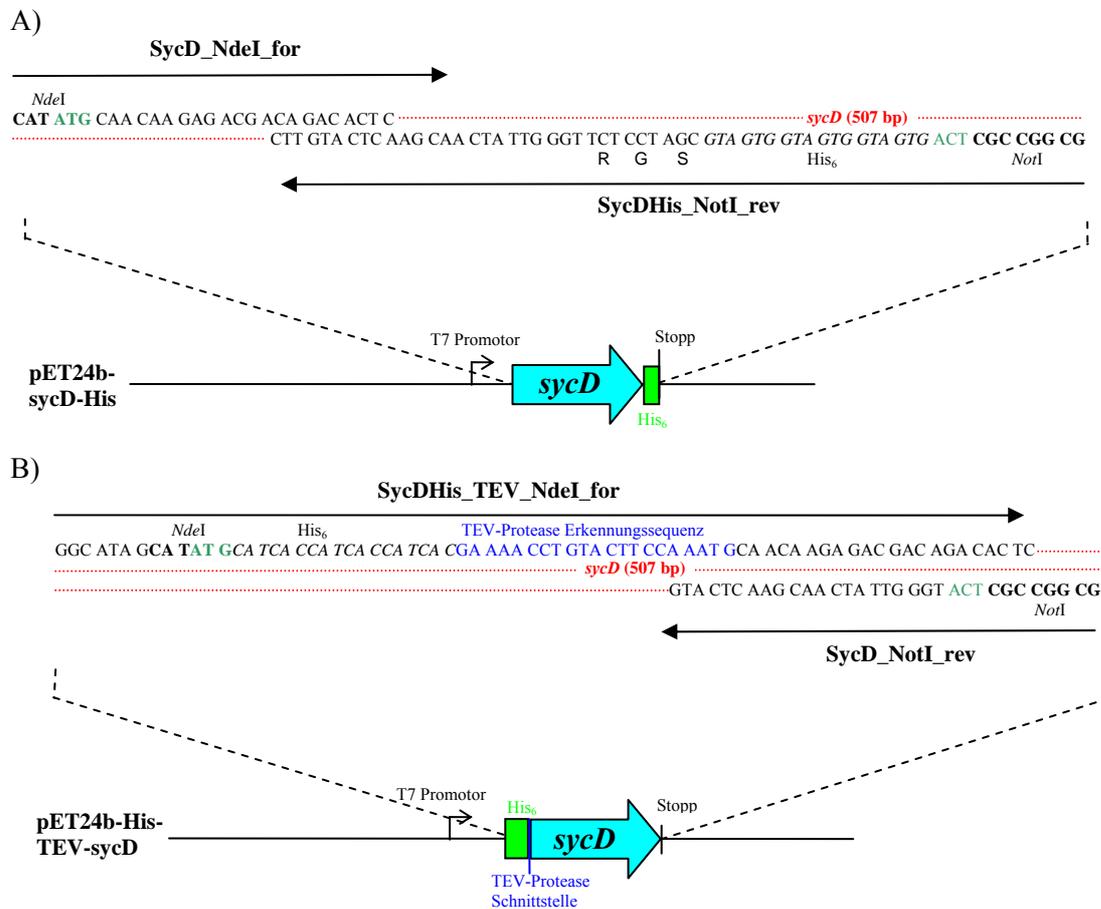


Abbildung 6: Konstruktion von pET24b-sycD-His und pET24b-His-TEV-sycD.

(A) pET24b-sycD-His. (B) pET24b-His-TEV-sycD. Mit den dargestellten Primern wurde *sycD* aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in den Expressionsvektor pET-24b kloniert. Proteaseschnittstelle, Start- und Stoppcodon sind farblich hervorgehoben.

C.1.2 Expression und Reinigung von SycD

Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Tabelle 4) für 18 h bei 27°C im Fermenter. Bei Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die Löslichkeit des Proteins stark von der Expressionstemperatur abhängt. So war bei 37°C mehr als die Hälfte des Proteins unlöslich. Unter optimalen Expressionsbedingungen betrug die Rohausbeute an SycD-His₆ ungefähr 210 mg/l Kultur (Tabelle 14). Der erste Reinigungsschritt erfolgte durch eine Ni-Sepharose-Chromatographie, nach der die Reinheit der Probe ungefähr 80 % betrug (Tabelle 14, Abbildung 7). In einer anschließenden Gelfiltration wurden restliche Verunreinigungen entfernt (Abbildung 7), so dass aus einem Liter Bakterienkultur 120 mg SycD mit einer Reinheit > 95 % gewonnen werden konnten (Tabelle 14, Abbildung 7). Für die Expression des His₆-TEV-SycD wurde wie für SycD-His₆ beschrieben vorgegangen.

Für die Reinigung wurde das His₆-TEV-SycD allerdings nach der Ni-Sephrose-Chromatographie mit TEV-Protease inkubiert, um den N-terminalen His₆-„Tag“ zu entfernen. Anschließend folgte eine erneute Ni-Sephrose-Chromatographie, bei der das native Protein im Durchlauf zu finden ist, während der His₆-Rest und nicht gespaltenes Protein auf der Säule zurückbleiben. Zuletzt wurden über einen Gelfiltrationsschritt letzte Verunreinigungen entfernt. Ausbeute und Reinheit waren mit den Angaben in Tabelle 14 für SycD-His₆ vergleichbar. SycD konnte sowohl nativ als auch mit Hexahistidin-„Tag“ mittels Konzentratoren mit einer Polyethersulfon-Membran auf 30 µg/µl eingengt werden. Für die Generierung eines polyklonalen Antiserums wurde SycD-His₆ verwendet. Kristallisationsversuche⁴ wurden mit beiden Varianten unternommen. Darüber hinaus wurden mit den rekombinanten Proteinen verschiedene Interaktionsstudien mit den Regulatoren YscM1, YscM2 und der PEPC angestrebt.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Reinigung von SycD-His₆.

Die angegebenen Proteinmengen und Ausbeuten beziehen sich auf 1,1 l Bakterienkultur. Die Werte wurden mit Hilfe der Gel-Densitometrie gewonnen. Gele wurden mit Coomassie gefärbt und die Banden mit einer Bio-Rad GelDoc EQ Dokumentationsanlage aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Quantity One. Definierte Mengen an SycD-His₆ wurden auf ein Gel aufgetragen und zur Quantifizierung von SycD-His₆ im Gesamtzell-Lysat verwendet. Der Hintergrund wurde durch nicht-induzierte Kulturen bestimmt.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	SycD (mg)	Reinheit %	Anreicherung	Ausbeute %
Gesamtzell-Lysat	2293	233	10.2	1	100
Lösliche Fraktion	1949	221	11.3	1.1	94.8
HisTrap HP	190	159	83.7	8.1	68.2
Superdex 75	135	131	97.1	9.5	56.2

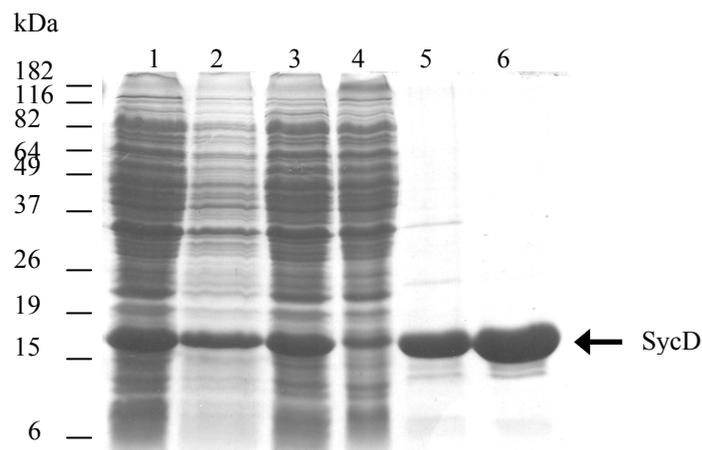


Abbildung 7: Übersicht über die Reinigung von SycD-His₆.

Spur 1: Gesamtzell-Lysat; Spur 2: unlösliche Fraktion nach French Press und Zentrifugation; Spur 3: lösliche Fraktion nach French Press und Zentrifugation; Spur 4: Durchlauf nach Ni-Sephrose-Chromatographie; Spur 5: SycD nach Ni-Sephrose-Chromatographie; Spur 6: SycD nach Gelfiltration. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

⁴Kooperation mit Michael Groll, Adolf-Butenandt-Institut, Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstraße 5, 81377 München, derzeit am Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching

C.1.3 Analyse der Struktur von SycD

C.1.3.1 Analyse der Struktur von SycD durch Circular dichroismus(CD)-Spektrometrie

Um sicher zu stellen, dass das rekombinante Protein richtig gefaltet ist und um Anhaltspunkte für die Sekundärstruktur zu erhalten, wurde in Kooperation mit Stefan Walter⁵ eine CD-Spektrometrie durchgeführt. Das aus Mehrfachmessungen erhaltene Spektrum zeigt, dass SycD gefaltet vorliegt (Abbildung 8). Darüber hinaus weisen die beiden charakteristischen Minima bei 208nm und 220nm auf eine hauptsächlich α -helikale Sekundärstruktur hin, was im Einklang steht mit den postulierten TPR-Motiven in der SycD-Struktur (Pallen *et al.* 2003).

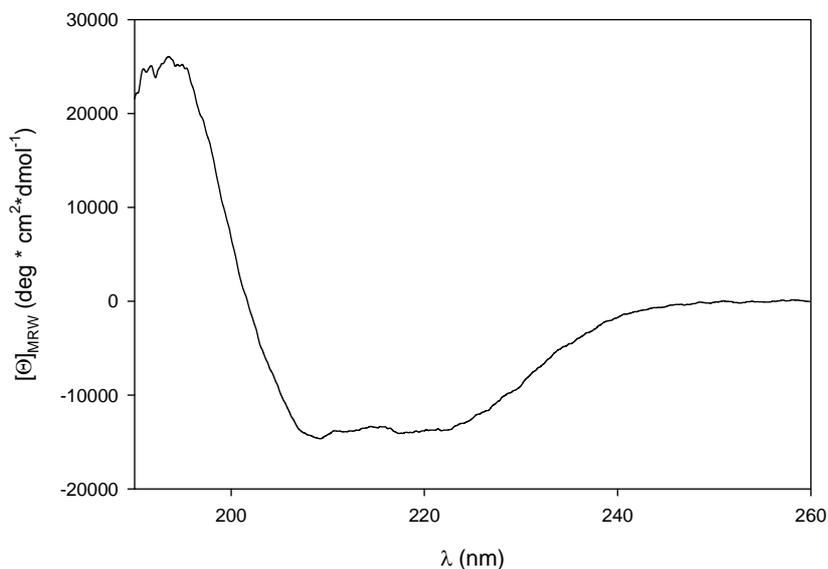


Abbildung 8: Strukturelle Charakterisierung von SycD durch CD-Spektrometrie.

Das CD-Spektrum von SycD (0,1 mg/ml) wurde bei 20°C mit einer Weglänge von 1 mm aufgenommen. Die charakteristischen Minima bei 208nm und 220nm weisen auf eine hauptsächlich α -helikale Struktur hin.

C.1.3.2 Sekundärstrukturvorhersagen und Homologie-basierte Strukturberechnung von SycD

Um neben der CD-Spektrometrie weitere Anhaltspunkte für die Struktur des Klasse II-Chaperons SycD zu bekommen, wurde die Aminosäuresequenz von SycD in das Programm JUFO (<http://www.meilerlab.org/view.php>) eingespeist, das ausschließlich aus der Primärsequenz eine Sekundärstrukturvorhersage generiert. Für jede Aminosäure der Sequenz wird dabei die Wahrscheinlichkeit berechnet, in einer Schleife (U), einer Helix (H) oder einem Faltblatt (S) zu liegen. Die Genauigkeit dieser Vorhersage liegt bei 75 %. Diese Analyse zeigt, dass SycD zu ca. 80 % aus α -Helices besteht und keine β -Faltblätter enthalten sind (Abbildung 9). Die sechs identifizierten Helices sind

⁵Technische Universität München, Lichtenbergstrasse 4, 58748 Garching, derzeit University of Michigan, Ann Arbor, USA

dabei durch kurze Schleifen miteinander verbunden, was mit der Annahme, dass SycD drei TPR-Motive enthält, übereinstimmt. Dies wird auch im Homologie-basierten 3D-Modell von SycD deutlich, das jedoch auf ca. acht α -Helices hindeutet (Abbildung 10). Analog zur Sekundärstrukturvorhersage enthält auch dieses Modell, das durch das Programm ESyPred3D (Lambert *et al.* 2002) (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>) auf der Grundlage von Homologien der Aminosäuresequenz von SycD zur Aminosäuresequenz bekannter Proteinstrukturen generiert wurde, keine β -Faltblätter. Dies untermauert zusätzlich die Ergebnisse der CD-Spektrometrie von SycD (C.1.3.1).

	Helix 1		Helix 2		Helix 3
	UUUUUUUHHH	HHHHHHHHHH	UUUUHHHHUU	UUHHHHHHHH	HHHHHHHHHH
1	MQQETTDQTQE	YQLAMESFLK	GGGTIAMLNE	ISSDTLEQLY	SLAFNQYQSG
	Helix 3		Helix 4		
	HHHHHHHHHH	HHHHUUUUHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHU
51	KYEDAHKVFQ	ALCVLDHYDS	RFFLGACR	QAMGQDLAI	HSYSYGAIMD
		Helix 5		Helix 6	
	UUUHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHUUUUH	HHHHHHHHHH
101	IKEPRFPFHA	AECLLQKGEL	AEAESGLFLA	QELIADKPEF	KELSTRVSSM
	Helix 6				
	HHHHHHHHHU	UUUUUUUU			
151	LEAIKCLKKEM	EHEFVDNP*			

Abbildung 9: Sekundärstrukturvorhersage von SycD.

Die Sekundärstrukturanalyse wurde ausschließlich auf Grundlage der Primärstruktur von SycD mit dem Programm JUFO durchgeführt. U: Schleife; H: Helix.

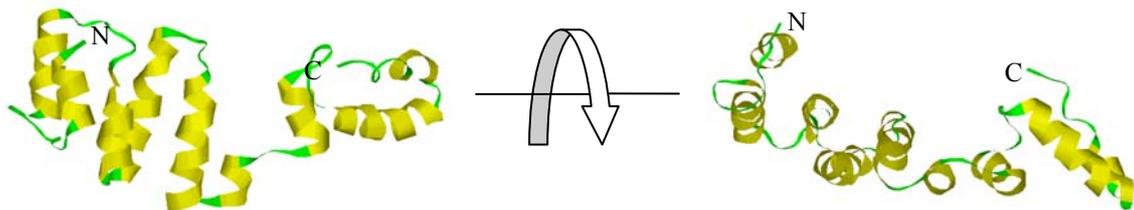


Abbildung 10: Homologie-basiertes Modell der 3D-Struktur von SycD.

Die Berechnung der Strukturvorhersage wurde durch das Programm ESyPred3D (Lambert *et al.* 2002) basierend auf der Struktur der TPR-Domäne der O-verknüpften GlcNAc-Transferase (Jinek *et al.* 2004) erstellt.

C.1.4 Oligomerisierung von SycD

SycD wird den Klasse II-Chaperonen der Typ III Sekretionssysteme zugeordnet (Parsot *et al.* 2003), über die lange Zeit strukturell nur wenig bekannt war. Besonders gut untersucht waren bisher nur die Strukturen und Eigenschaften vieler Klasse I-Chaperone verschiedener Typ III Sekretionssysteme. Alle bisher näher charakterisierten Klasse I-Chaperone liegen als Homodimere vor. Da über den Oligomerisierungszustand von Klasse II-Chaperonen dagegen wenig bekannt war, sollte in verschiedenen Ansätzen vor allem das Oligomerisierungsverhalten von SycD näher charakterisiert werden.

C.1.4.1 Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von SycD

Um das apparente Molekulargewicht von SycD zu bestimmen, sollte zunächst eine analytische Gelfiltration und eine chemische Quervernetzung durchgeführt werden. Für die analytische Gelfiltration wurde SycD mit Markerproteinen bekannter Größe (66, 29, 12 kDa) gemischt und auf einer Superdex 75-Säule aufgetrennt. Da SycD eine berechnete Molekularmasse von 19 kDa hat, würde ein SycD Dimer (~ 38 kDa) vor dem 29 kDa großen Markerprotein eluieren. Abbildung 11A zeigt die aufeinanderfolgenden Fraktionen der Gelfiltration. Anhand des Elutionsverhaltens von SycD zwischen den Eichproteinen von 66 kDa und 29 kDa kann abgeschätzt werden, dass das apparente Molekulargewicht von SycD bei ca. 35-40 kDa liegt. Das bedeutet, dass SycD ebenso wie Klasse I-Chaperone in Lösung Homodimere bildet. Dieses Ergebnis konnte mit dem Crosslinker EGS bestätigt werden (Abbildung 11 B). Nach einer 30-minütigen Inkubation von SycD mit EGS lag der Großteil der Probe als Dimer vor, wobei auch Subpopulationen von Trimeren und Tetrameren detektiert werden konnten. Die Bildung von Homodimeren konnte inzwischen von Büttner *et al.* (2008) in einer hochauflösenden Struktur von SycD bestätigt werden.

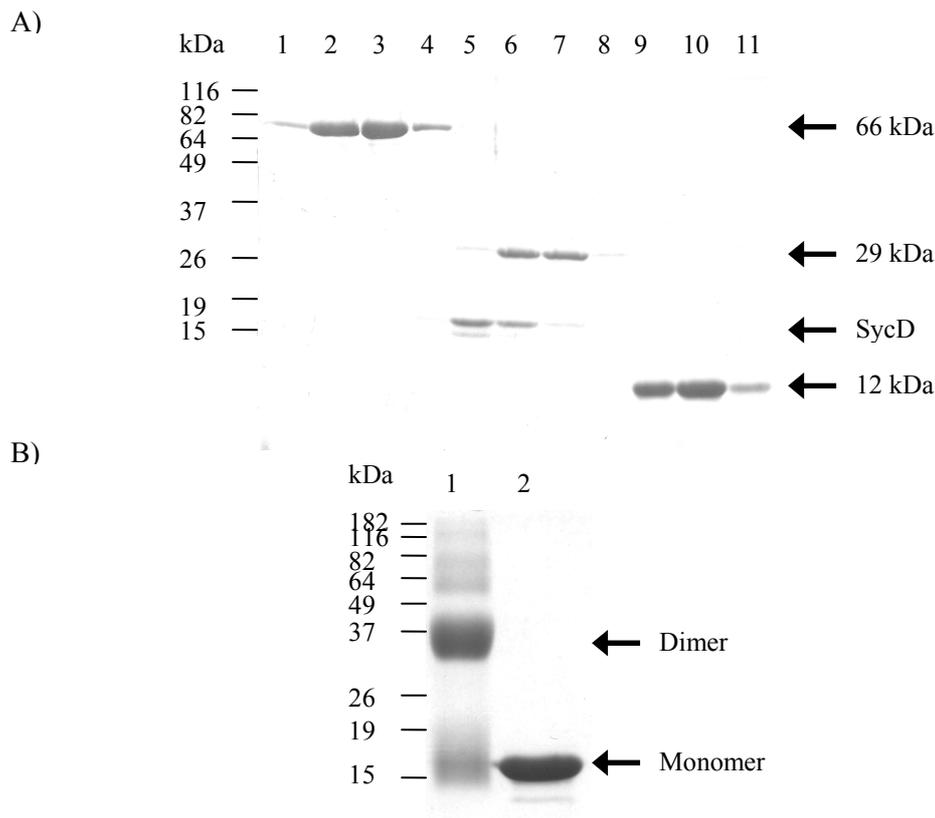


Abbildung 11: Dimerisierung von SycD.

(A) Analytische Gelfiltration. Um das apparente Molekulargewicht von SycD zu bestimmen, wurde das rekombinante Protein mit Markerproteinen (BSA: 66 kDa, Carboanhydrase: 29 kDa, Cytochrom c: 12 kDa) gemischt und auf eine Superdex 75-Säule appliziert. Aufeinanderfolgende Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Spuren 1-11). (B) Chemische Quervernetzung. Rekombinantes SycD wurde mit dem Crosslinker EGS inkubiert (Spur 1). In Spur 2 wurde eine Probe ohne Crosslinker aufgetragen. Alle SDS-Gele wurden mit Coomassie gefärbt.

C.1.4.2 Analyse der Oberflächenform von SycD mittels Kleinwinkelstreuung (SAXS)

Die Kleinwinkelstreuung (SAXS)-Analysen von SycD wurden am EMBL in Hamburg⁶ durchgeführt. Im Vergleich zu Röntgenkristallographie und NMR handelt es sich um eine niederauflösende Strukturanalysemethode, die aber Aussagen über die Oberflächenform und Partikelgröße von Molekülen in Lösung erlaubt. Da zum Zeitpunkt der Messungen keine hochauflösende Struktur von SycD bekannt war, sollten die SAXS-Analysen neben anderen Studien zum Oligomerisierungsverhalten von SycD (C.1.4.1) zusätzliche Informationen zum Verhalten des Proteins in Lösung geben. Außerdem sollte das unter C.1.3.2 vorgestellte Homologie-basierte Modell in das berechnete Modell eingepasst werden. Die SAXS-Messungen bestätigen, dass SycD in Lösung Homodimere bildet, da das Volumen des berechneten Oberflächenmodells und die Partikelgröße für ein Monomer zu groß sind, hingegen mit einem Dimer gut übereinstimmen. Da Anfang 2008 (Büttner *et al.*) die Kristallstruktur von SycD von einer anderen Gruppe publiziert wurde, konnten die dort beschriebenen Dimere mit dem Modell aus

⁶Kooperation mit Manfred Rössle, EMBL Hamburg, Notkestraße 85, 22603 Hamburg

den SAXS-Messungen abgeglichen werden (Abbildung 12). Keines der beschriebenen Dimere lässt sich in das Modell der SAXS-Analyse einpassen, da speziell die zwei als physiologisch bedeutsam beschriebenen SycD Dimere eine deutlich stärker gestreckte Form annehmen. Diese langgestreckte Form entsteht dadurch, dass die beiden SycD Monomere lediglich über die Helices des ersten TPR-Motivs miteinander wechselwirken. Die Diskrepanz zu den SAXS-Daten könnte teilweise durch die unterschiedlichen Bedingungen im Kristall für die Röntgenstrukturanalyse und in Lösung für die SAXS-Messungen zu erklären sein. Darüber hinaus könnte sich in Lösung ein Gleichgewicht aus Monomeren, Dimeren, Trimeren und Tetrameren einstellen (vgl. C.1.4.1), das bei der Berechnung des SAXS-Modells zu einer etwas veränderten Oberflächenstruktur führen würde. Ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht wurde auch von Büttner *et al.* (2008) beobachtet. Dennoch bestätigt das SAXS-Modell zum einen die Dimerisierung von SycD zum anderen aber auch, dass die SycD Monomere nicht über die gesamte Fläche der TPR-Motive Kontakte miteinander aufnehmen, sondern zueinander verschoben sind.

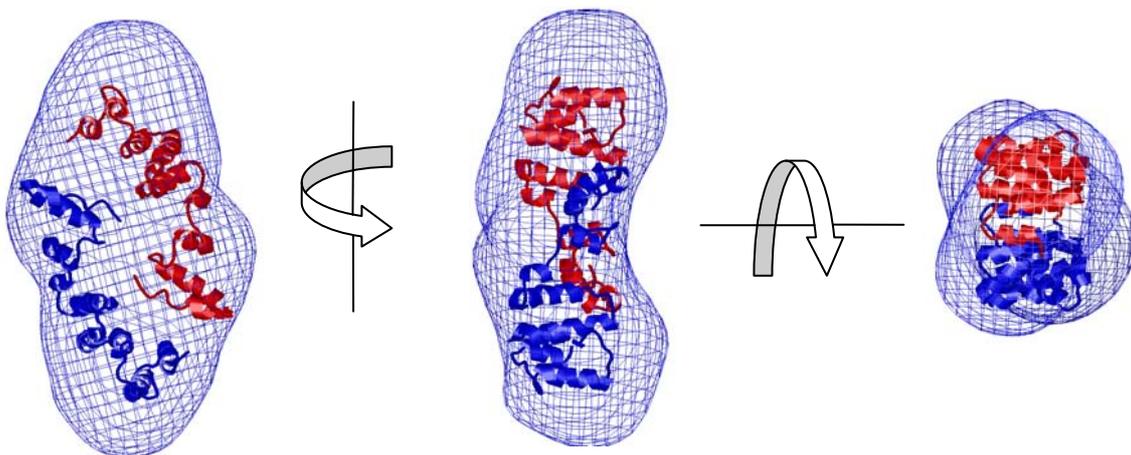


Abbildung 12: Kristallstruktur von SycD eingepasst in das Raummodell von SycD.

Als Grundlage für die Modellierung des SycD Dimers in das SAXS-Raummodell, wurde die von Büttner *et al.* (2008) gelöste Kristallstruktur von SycD verwendet. Es wurde eine p2-Symmetrie zugrunde gelegt. Es sind jeweils drei Ansichten um 90° rotiert dargestellt.

C.1.5 Interaktion von SycD mit YscM1 und YscM2

Bei YscM1 und YscM2 handelt es sich um ca. 13 kDa große Regulatorproteine der Typ III Sekretion aus *Y. enterocolitica*, die untereinander 57 % Identität aufweisen. In *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* existiert mit LcrQ nur ein YscM1-homologes Protein. Die Chaperone SycH und SycE interagieren mit YscM1 und YscM2 (Swietnicki *et al.* 2004; Phan *et al.* 2004). Von dem SycD-homologen LcrH aus *Y. pestis* Biovar Orientalis wurde gezeigt, dass es mit YscM2 wechselwirkt, obwohl dieser Virulenzfaktor nur in *Y. enterocolitica* vorkommt (Swietnicki *et al.* 2004). Um auch SycD aus *Y. enterocolitica* in das Interktom der T3SS-Regulatoren zu integrieren, sollte SycD auf eine Interaktion mit YscM1 und YscM2 hin untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die chemische Quervernetzung

von Proteinen eingesetzt. Sowohl SycD als auch die YscM Proteine bilden in Lösung Homodimere (Wilharm *et al.* 2003; Schmid *et al.* 2006). Diese Homodimere finden sich auch bei der Quervernetzung mit DSP wieder (Abbildung 13A, Spuren 2,4 u. 7). Außerdem konnte bestätigt werden, dass SycD aus *Y. enterocolitica* ebenso wie das homologe LcrH aus *Y. pestis* mit YscM2 interagiert (Abbildung 13A, C und D). Zusätzlich konnte mit dem Nachweis der Wechselwirkung von SycD mit YscM1 der Regulator YscM1 als neuer Bindungspartner von SycD identifiziert werden (Abbildung 13A, B und C). Zudem konnte gezeigt werden, dass SycD mit dem jeweiligen YscM Protein ein Heterodimer von ca. 30 kDa bildet. Größere Komplexe wie Heterotrimere oder Heterotetramere wären denkbar, lassen sich aber im SDS-Gel aufgrund der vielen unterschiedlichen Oligomere, die sich bei der Quervernetzung bilden, nicht auflösen (Abbildung 13). Diese Interaktion bestätigt, dass auch SycD wie LcrH aus *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* in das komplexe regulatorische Netzwerk der Typ III Sekretion eingebunden ist.

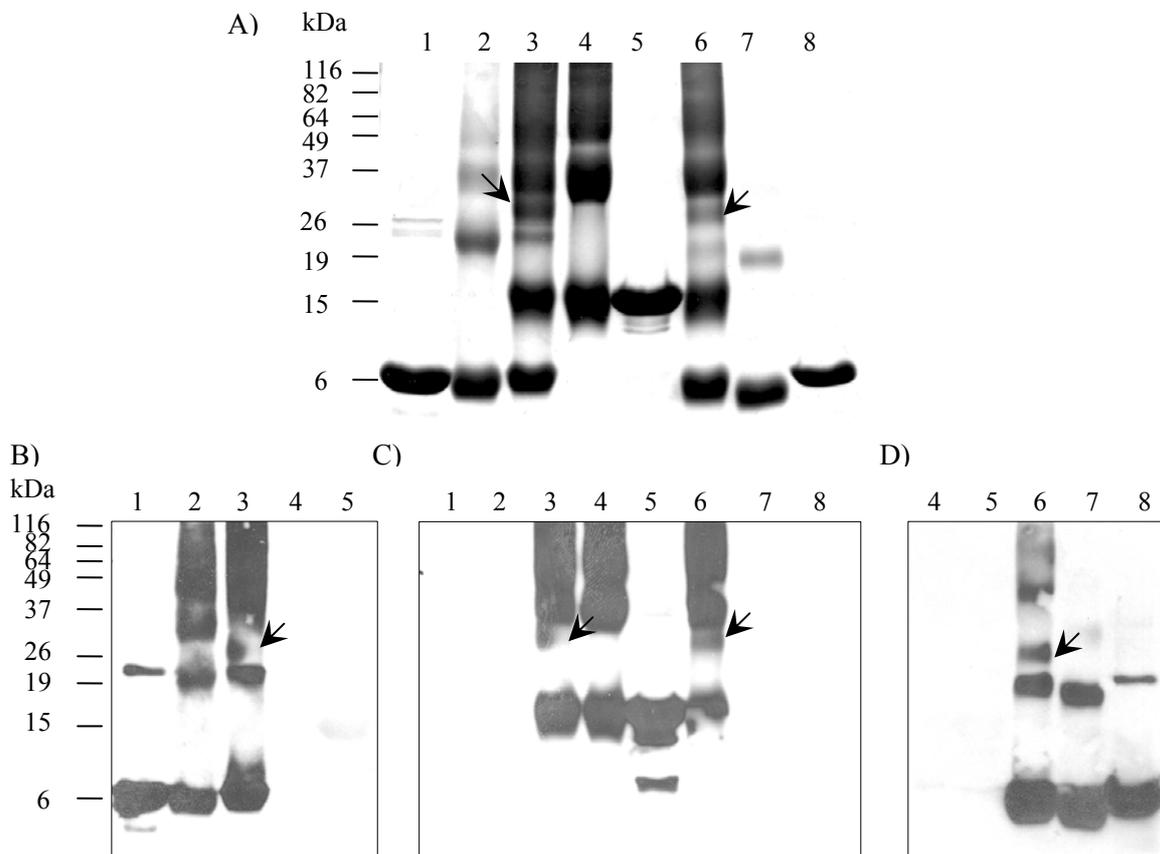


Abbildung 13: Chemische Quervernetzung von SycD mit YscM1 und YscM2.

(A) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. Immunoblots mit Antiserum gegen YscM1 (B), SycD (C) und YscM2 (D). Rekombinantes SycD wurde mit rekombinantem YscM1 oder YscM2 und dem Crosslinker DSP inkubiert. Die entstandenen Komplexe zwischen YscM1 und SycD bzw. YscM2 und SycD sind mit Pfeilen markiert. Spur 1: YscM1; Spur 2: YscM1 mit DSP; Spur 3: YscM1, SycD mit DSP; Spur 4: SycD mit DSP; Spur 5: SycD; Spur 6: YscM2, SycD mit DSP; Spur 7: YscM2 mit DSP; Spur 8: YscM2.

C.2 Reinigung verkürzter SycD Proteine

C.2.1 Reinigung eines N- und C-terminal verkürzten SycD Proteins

Da alle bisherigen Kristallisationsversuche mit SycD gescheitert waren, sollte eine stabile, verkürzte Variante von SycD identifiziert werden. Dieses verkürzte Fragment sollte darüber hinaus für Wechselwirkungsstudien mit YscM1 und YscM2 eingesetzt werden, um den Bindungsbereich zwischen diesen Proteinen eingrenzen zu können. Typischerweise lassen sich stabile verkürzte Fragmente durch Verdau des Zielproteins mit verschiedenen Proteasen identifizieren. Dabei wird das Protein je nach eingesetzter Protease vom N- oder C-Terminus abgebaut oder an bestimmten Erkennungsstellen gespalten. Wenn ein stabiles Produkt entstanden ist, kann dieses mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Meist ist eine neue Klonierung der verkürzten Variante sinnvoller als das Entfernen der verwendeten Protease. Einige Proteasen werden vom Hersteller mit „Tag“ angeboten, dennoch ist eine vollständige Entfernung aus der Proteinlösung schwierig und daher für Kristallisationsansätze ungeeignet.

C.2.1.1 Bestimmung des zu klonierenden Bereichs von SycD

Um eine stabile verkürzte Variante von SycD zu identifizieren, wurde das Protein mit verschiedenen Proteasen verdaut (Abbildung 14). Bei Inkubation mit der Aminopeptidase M ergab sich neben dem Volllängen-SycD (19 kDa), ein stabiles Fragment von ca. 15 kDa. Die Bildung dieses Fragments konnte durch Inkubation des Proteaseverdau bei 20°C für 6 h optimiert werden. Beide Fragmente (15 und 19 kDa) wurden aus dem Gel ausgeschnitten, trypsinverdaut und mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert⁷.

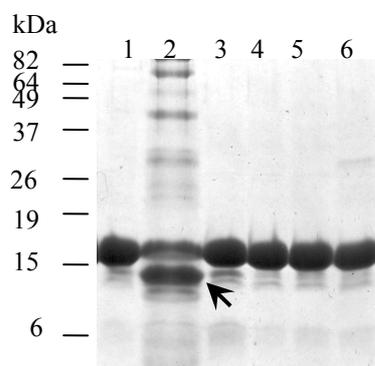


Abbildung 14: Identifizierung eines stabilen SycD-Fragments.

Alle Proben wurden für 4 h bei 30°C mit der entsprechenden Protease inkubiert. Das stabile SycD-Fragment von ca. 15 kDa nach Inkubation mit der Aminopeptidase M ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Spur 1: Newlase; Spur 2: Aminopeptidase M; Spur 3: Protease Subtilisin; Spur 4: Protease Typ XII; Spur 5: Protease X; Spur 6: Carboxypeptidase D.

⁷Ludwig-Maximilians-Universität München, Zentrallabor für Proteinanalytik, Schillerstraße 44, 80336 München

Die massenspektrometrisch identifizierten Peptidfragmente wurden in die Mascot-Suchmaschine (<http://www.matrixscience.com/>) eingespeist und dort mit bekannten Proteinsequenzen verglichen. Wie erwartet wurden die Peptidfragmente dem Chaperon SycD zugeordnet. In Abbildung 15 sind in der Proteinsequenz von SycD alle massenspektrometrisch identifizierten Peptidfragmente aus der Analyse des Volllängen-SycD rot dargestellt. Die identifizierten Peptide decken ungefähr 70 % der gesamten Aminosäuresequenz des Proteins ab. Das 19 kDa Volllängen-SycD unterscheidet sich in zwei Peptiden, die sich beide am N-Terminus des Proteins befinden, von dem verkürzten SycD-Fragment. Der N-terminale Bereich bis Position 20 taucht in der Analyse des verkürzten SycD nicht auf. Für den Bereich von Position 21-51 und den C-Terminus ab Position 156 liefern die Daten aus der Massenspektrometrie darüber hinaus keine eindeutige Aussage, da diese Bereiche in der Analyse nicht erfasst sind. Mit Sicherheit kann daher nur gesagt werden, dass das stabile verkürzte Fragment von SycD mindestens den Bereich von Position 52 bis Position 155 umfasst. Um bei der Klonierung eines verkürzten SycD keine der α -Helices des Proteins zu destabilisieren, wurden die Daten der Sekundärstrukturvorhersage und des Homologie-basierten 3D-Modells (C.1.3.2) mit den Ergebnissen der Massenspektrometrie abgeglichen. Auf Grundlage dieser Daten wurde entschieden, N-terminal nach dem Startcodon sieben und am C-Terminus fünf Aminosäuren zu entfernen. Das erhaltene Protein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 17,4 kDa und sollte ohne Affinitätsmarker gereinigt werden, um Störungen bei der Kristallisation zu vermeiden.

```

1  MQQETTTDTQE YQLAMESFLK GGGTIAMLNE ISSDTLEQLY SLAFNQYQSG
51  KYEDAHKVFQ  ALCVLDHYDS RFFLGLGACR QAMGQYDLAI HSYSYGAIMD
101  IKEPRFPFHA  AECLLQKGEL  AEAESGLFLA QELIADKPEF  KELSTRVSSM
151  LEAIKLLKKEM EHEFVDNP*

```

Abbildung 15: Proteinsequenz von SycD aus *Y. enterocolitica*.

Alle massenspektrometrisch identifizierten Peptide der Analyse des 19 kDa SycD sind in der Sequenz von SycD rot markiert.

C.2.1.2 Klonierung des verkürzten SycD ohne Affinitätsmarker

Für die Klonierung wurde das 465 bp große *sycD*₉₋₁₆₃-Fragment aus der isolierten Gesamt-DNA von *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Primern SycDdelta_NdeI_for und SycDdelta_SalI_rev amplifiziert (Tabelle 8). Dabei wurden die Restriktionsschnittstellen und Start- und Stoppcodon durch Überhänge der Primer angefügt. Am 5'-Ende wurde die kodierende Sequenz von *sycD* um 24 Basenpaare und am 3'-Ende um 18 Basenpaare verkürzt, so dass sich ein Fragment von Position 25-489 ergab. Nach Direktverdau wurde das *sycD*₉₋₁₆₃-Fragment über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *SalI* in den Expressionsvektor pWS ligiert (Tabelle 6, Abbildung 16). Die korrekte Sequenz des resultierenden Plasmids pWS-*sycD*₉₋₁₆₃ wurde durch Sequenzierung bestätigt (Tabelle 7).

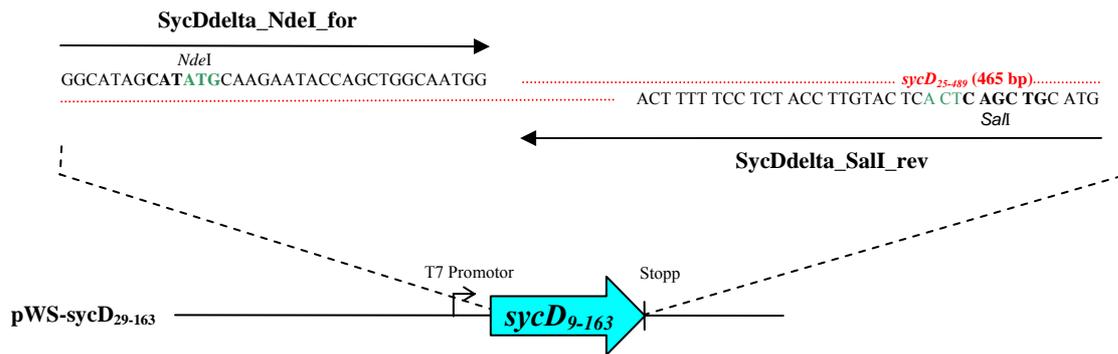


Abbildung 16: Konstruktion von pWS-sycD₉₋₁₆₃.

Mit den dargestellten Primern wurde *sycD* am 5'-Ende um 24 Basenpaare und am 3'-Ende um 18 Basenpaare verkürzt aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *SalI* in den Expressionsvektor pWS kloniert. Proteaseschnittstelle, Start- und Stoppcodon sind farblich hervorgehoben.

C.2.1.3 Reinigung des verkürzten SycD₉₋₁₆₃

Die Expression des Proteins wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Tabelle 4) für 18 h bei 27°C im Fermenter durchgeführt. Da die Reinigung ohne Affinitätsmarker erfolgen sollte, wurde der Überstand nach Zellaufschluss mit Ammoniumsulfat gefällt, um eine erste Anreicherung zu erzielen. Die Anreicherung von SycD₉₋₁₆₃ konnte mit einer 35 %igen Ammoniumsulfat-Lösung optimiert werden. Das Pellet wurde gewaschen, die Proteine resuspendiert und ein erster Reinigungsschritt auf einer MonoQ-Säule über Ionenaustauschchromatographie vorgenommen. Die positiven Fraktionen wurden anschließend mittels Gelfiltration und, um die Reinheit weiter zu erhöhen, mittels hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) weiter gereinigt. Das Elutionsverhalten in der Gelfiltration und Quervernetzungsversuche zeigten, dass das Protein trotz der N- und C-terminalen Deletion dimerisiert (nicht gezeigt). Das verkürzte SycD₉₋₁₆₃ konnte mit Konzentratoren mit einer Polyethersulfon-Membran auf 15 µg/µl eingengt und somit für Kristallisationsansätze⁸ verwendet werden. Um zu überprüfen, ob das verkürzte SycD₉₋₁₆₃ trotz der Deletionen ebenso wie das native SycD mit YscM1 und YscM2 interagiert, wurde eine chemische Quervernetzung der Proteine vorgenommen. Dabei konnte keine Wechselwirkung zwischen den YscM Proteinen und SycD₉₋₁₆₃ nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Da die Banden durch die Quervernetzung sehr diffus werden, wäre es möglich, dass ein geringer Prozentsatz der Proteine in der Probe dennoch miteinander interagiert, dieser aber im SDS-Gel nicht aufgelöst werden kann. Mit Sicherheit kann jedoch festgestellt werden, dass die Wechselwirkung wesentlich weniger effizient ist und damit wohl durch die N- und C-terminalen Deletionen des SycD destabilisiert wurde.

⁸Kooperation mit Michael Groll, Adolf-Butenandt-Institut, Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstraße 5, 81377 München, derzeit am Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching

C.2.2 Reinigung von N- bzw. C-terminal verkürzten SycD Proteinen

Da eine Quervernetzung von YscM1 bzw. YscM2 mit dem verkürzten SycD₉₋₁₆₃ nicht möglich war, sollten der N-Terminus und der C-Terminus einzeln deletiert werden, um zu überprüfen, welcher Bereich von SycD für die Interaktion mit den YscM Proteinen von Bedeutung ist.

C.2.2.1 Klonierung der N- bzw. C-terminal verkürzten SycD Proteine mit His₆-„Tag“

Für die Klonierung wurde das 483 bp große N-terminal verkürzte *sycD*_{Δ2-8}-Fragment und das 489 bp große C-terminal verkürzte *sycD*_{Δ163-168}-Fragment aus der isolierten Gesamt-DNA von *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Primern SycDdelta_His_TEV_NdeI_for und SycD_NotI_rev bzw. SycDHis_TEV_NdeI_for und SycDdelta_Sall_rev amplifiziert (Tabelle 8). Dabei wurde ein N-terminaler His₆-„Tag“ und eine TEV-Proteaseschnittstelle durch einen Überhang der Vorwärtsprimer SycDdelta_His_TEV_NdeI_for bzw. SycDHis_TEV_NdeI_for an das Gen angefügt. Der Vorwärtsprimer SycDdelta_His_TEV_NdeI_for für das *sycD*_{Δ2-8}-Fragment kodierte zusätzlich für ein neues Startkodon. Nach Subklonierung in pMBL-T/A (Tabelle 6) wurden die *sycD*_{Δ2-8}- und *sycD*_{Δ163-168}-Fragmente über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* bzw. *NdeI* und *Sall* in den Expressionsvektor pET-21b ligiert (Tabelle 6). Die korrekte Sequenz der resultierenden Plasmide pET21b-sycD_{Δ2-8} und pET21b-sycD_{Δ163-168} wurde durch Sequenzierung bestätigt (Tabelle 7).

C.2.2.2 Reinigung der verkürzten Proteine SycD_{Δ2-8} und SycD_{Δ164-168}

Die Expression der Proteine erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Tabelle 4) bei 27°C für 18 h im Fermenter unter ständigem Belüften und Rühren. Als erster Reinigungsschritt wurde eine Ni-Sepharose-Chromatographie durchgeführt, mit anschließender Gelfiltration zur Entfernung restlicher Verunreinigungen. Nach der Gelfiltration wurden die Proteine His₆-TEV-SycD_{Δ164-168} und His₆-TEV-SycD_{Δ2-8} mit TEV-Protease inkubiert, um den N-terminalen His₆-„Tag“ zu entfernen. Anschließend folgte eine erneute Ni-Sepharose-Chromatographie, bei der das Protein im Durchlauf zu finden ist, während der His₆-Rest und nicht gespaltenes Protein auf der Säule zurückbleiben. SycD_{Δ164-168} und SycD_{Δ2-8} wurden mit Konzentratoren mit einer Polyethersulfon-Membran eingengt.

C.2.2.3 Interaktion von SycD_{Δ2-8} und SycD_{Δ164-168} mit YscM1 und YscM2

Da eine Quervernetzung von YscM1 bzw. YscM2 mit dem N- und C-terminal verkürzten SycD₉₋₁₆₃ im Gegensatz zum nativen SycD nicht möglich war, sollten SycD_{Δ2-8} und SycD_{Δ164-168} auf eine Interaktion mit den YscM Proteinen überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde wie für das native SycD die

chemische Quervernetzung von Proteinen eingesetzt. Durch Quervernetzung mit DSP konnte gezeigt werden, dass SycD Δ_{2-8} und SycD $\Delta_{164-168}$ ebenso wie das native SycD mit YscM1 und YscM2 interagieren (Abbildung 17). Im Gegensatz zum beidseitig verkürzten SycD $_{9-163}$ bilden die nur N- bzw. C-terminal verkürzten Proteine SycD Δ_{2-8} und SycD $\Delta_{164-168}$ mit dem jeweiligen YscM Protein ein Heterodimer. Dies spricht dafür, dass die YscM Proteine sowohl mit dem N- als auch dem C-Terminus von SycD wechselwirken und diese Interaktion möglicherweise durch die beidseitige Deletion von SycD so stark destabilisiert wird, dass keine stabile Bindung der YscM Proteine mehr möglich ist.

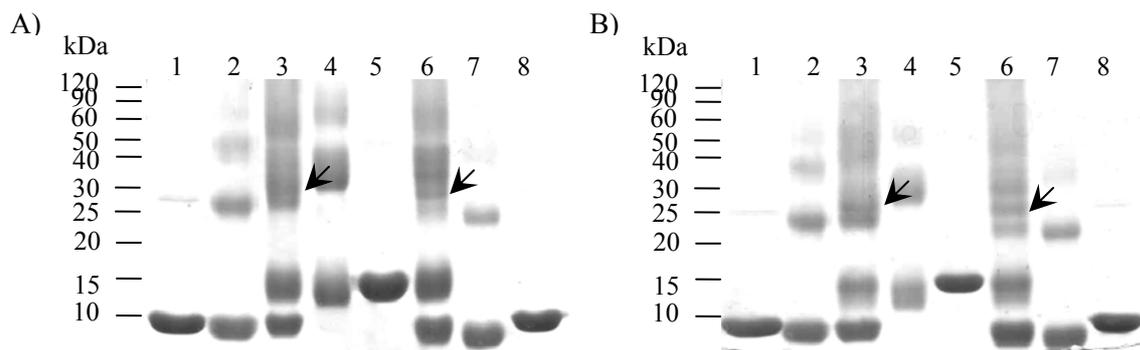


Abbildung 17: Chemische Quervernetzung von SycD Δ_{2-8} und SycD $\Delta_{164-168}$ mit YscM1 und YscM2.

Rekombinantes SycD Δ_{2-8} bzw. SycD $\Delta_{164-168}$ wurde mit rekombinantem YscM1 oder YscM2 und dem Crosslinker DSP inkubiert. Die entstandenen Komplexe zwischen YscM1 und SycD Δ_{2-8} /SycD $\Delta_{164-168}$ bzw. YscM2 und SycD Δ_{2-8} /SycD $\Delta_{164-168}$ sind mit Pfeilen markiert. (A) Spur 1: YscM1; Spur 2: YscM1 mit DSP; Spur 3: YscM1, SycD Δ_{2-8} mit DSP; Spur 4: SycD Δ_{2-8} mit DSP; Spur 5: SycD Δ_{2-8} ; Spur 6: YscM2, SycD Δ_{2-8} mit DSP; Spur 7: YscM2 mit DSP; Spur 8: YscM2. (B) Spur 1: YscM1; Spur 2: YscM1 mit DSP; Spur 3: YscM1, SycD $\Delta_{164-168}$ mit DSP; Spur 4: SycD $\Delta_{164-168}$ mit DSP; Spur 5: SycD $\Delta_{164-168}$; Spur 6: YscM2, SycD $\Delta_{164-168}$ mit DSP; Spur 7: YscM2 mit DSP; Spur 8: YscM2. SDS-Gele wurden mit Coomassie gefärbt.

C.3 Das Chaperon SycO

SycO wurde erst kürzlich als Chaperon des Effektors YopO identifiziert (Letzelter *et al.* 2006). Bei SycO handelt es sich um ein Klasse I-Chaperon, das zudem in die Regulation der Typ III Sekretion eingebunden ist (Dittmann *et al.* 2007). Da fast alle Chaperone der Typ III Sekretionssysteme Homodimere bilden, sollte die Oligomerisierung von SycO überprüft werden. Außerdem sollte SycO auf eine Interaktion mit YscM1 und YscM2 getestet werden. Da die YscM Proteine als wichtige Regulatoren der Typ III Sekretion gelten (Cambronnie & Schneewind 2002) und bisher auch für andere T3SS-Chaperone wie SycH, SycD und SycE gezeigt werden konnte, dass sie mit YscM1 und YscM2 interagieren (Swietnicki *et al.* 2004; Phan *et al.* 2004; Schmid *et al.* 2006), sollte überprüft werden, ob auch das Klasse I-Chaperon SycO in dieses komplexe Regulationsnetzwerk integriert werden kann.

C.3.1 Oligomerisierung von SycO

Da alle bisher bekannten Klasse I-Chaperone in Lösung Homodimere bilden, sollte überprüft werden, ob das auch auf SycO zutrifft. Zu diesem Zweck sollten chemische Quervernetzer verwendet werden. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit von SycO mit DSP lag ein Großteil der Probe als Homodimer vor, wobei auch Subpopulationen von Trimeren und Tetrameren detektiert werden konnten (Abbildung 18). Mittels analytischer Gelfiltration konnte dieses Ergebnis untermauert werden (Dittmann *et al.* 2007). Damit konnte bestätigt werden, dass sich SycO in Lösung ebenso wie andere Klasse I-Chaperone verhält.

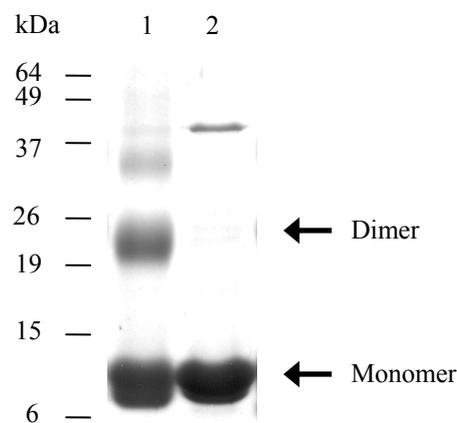


Abbildung 18: Nachweis der Dimerisierung von SycO durch chemische Quervernetzung.

Rekombinantes SycO wurde zusammen mit dem Crosslinker DSP inkubiert (Spur 2). In Spur 1 wurde eine Probe ohne Crosslinker aufgetragen. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

C.3.2 Interaktion von SycO mit YscM1 und YscM2

Da einige T3SS-Chaperone (SycE, SycH, SycD) von *Y. enterocolitica* mit den Regulatorproteinen YscM1 und YscM2 interagieren (Swietnicki *et al.* 2004; Cambronne *et al.* 2004), sollte auch das Chaperon SycO auf eine derartige Wechselwirkung hin untersucht werden. Alle drei Proteine haben mit etwa 13 bis 16 kDa sehr ähnliche Größen und bilden darüber hinaus jeweils Homodimere. Deshalb eignete sich ein Versuch mit Crosslinkern oder eine analytische Gelfiltration weniger. Daher wurde das Tris-basierte Nativgel-System zur Überprüfung einer Interaktion ausgewählt. In Abbildung 19A ist zu sehen, dass eine gemeinsame Inkubation von YscM1 und SycO zur Bildung einer neuen Bande führt (Spur 2). Diese Bande fehlt, wenn man YscM1 oder SycO alleine aufträgt. Immunoblots mit Antisera gegen YscM1 (Abbildung 19B) und SycO (Abbildung 19C) konnten bestätigen, dass es sich bei der neuen Bande um einen Komplex aus YscM1 und SycO handelt. Im Gegensatz dazu konnte zwischen YscM2 und SycO keine Interaktion gezeigt werden (Abbildung 19A, Spur 4). Im Fall von YscM2 ist zu beachten, dass es aufgrund seines hohen pI von 9,79 nicht in das Nativgel einläuft (Abbildung 19A, Spur 5). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ähnlich wie die Chaperone SycE,

SycH und SycD auch SycO in das Interktom der T3SS-Regulatoren eingeordnet werden kann. Dies ist besonders interessant, da von SycH, SycD und SycO auch bereits eine Beteiligung an der Regulation der Typ III Sekretion nachgewiesen wurde (Bergman *et al.* 1991; Francis *et al.* 2001; Cambronne *et al.* 2004; Dittmann *et al.* 2007). Außerdem sollte SycO in weiteren Versuchen auf einen direkten oder indirekten Einfluss vermittelt über YscM1 auf die Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) überprüft werden. Da YscM1 in einer vorherigen Promotion (Neumayer 2005) als Inhibitor der PEPC identifiziert worden war, lag die Vermutung nahe, dass die Interaktion von SycO mit YscM1 die Wechselwirkung von YscM1 mit der PEPC beeinflusst.

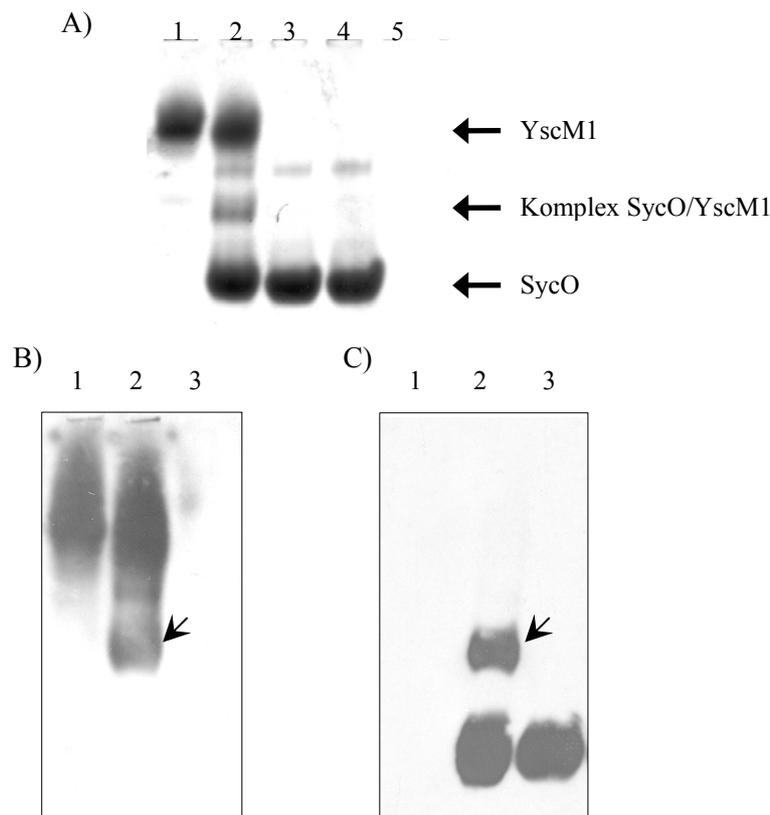


Abbildung 19: Überprüfung der Interaktion von SycO mit YscM1 und YscM2.

(A) Coomassie-gefärbtes Tris-gepuffertes Nativgel. YscM2 läuft aufgrund seines hohen pI (9,79) nicht in das Nativgel (pH 8) ein. Immunoblots mit Antiserum gegen YscM1 (B) und SycO (C). Spur 1: YscM1; Spur 2: YscM1/SycO; Spur 3: SycO; Spur 4: YscM2/SycO; Spur 5: YscM2. Der Komplex aus YscM1 und SycO ist in (B) und (C) mit einem Pfeil markiert.

C.4 Reinigung von YscY

Bei YscY handelt es sich um ein weiteres Regulatorprotein der Typ III Sekretion. Bisher wurde das Protein nur wenig charakterisiert, mit Hilfe einer Deletionsmutante konnte aber bereits gezeigt werden, dass das Fehlen von YscY die Yop-Sekretion unter permissiven Bedingungen unterdrückt (Iriarte & Cornelis 1999). Außerdem wurde postuliert, dass es sich bei YscY um ein Chaperon des *Yersinia* Typ III Sekretionssystems handelt (Day & Plano 2000). Um den Platz von YscY im Interktom der

T3SS-Regulatoren einordnen zu können, sollte YscY rekombinant gereinigt und für *in vitro* Interaktionsstudien eingesetzt werden. Ein zweiter Ansatzpunkt war die bekannte Interaktion von YscY mit SycD (Bröms *et al.* 2005). Es sollte ein SycD/YscY-Komplex gereinigt werden, der zum einen bezüglich seines Oligomerisierungszustandes charakterisiert und zum anderen für Kristallisationsversuche eingesetzt werden sollte. YscY ist besonders deshalb interessant, da es die Schnittstelle für zwei unterschiedliche Regulatoren der Typ III Sekretion darzustellen scheint: zum einen SycD und zum anderen YscX. Beide Proteine sind in die Regulation des Systems eingebunden und interagieren mit YscY (Bergman *et al.* 1991; Day & Plano 2000; Francis *et al.* 2001; Bröms *et al.* 2005).

C.4.1 Klonierung von YscY in den Expressionsvektor pWS

Für die Klonierung wurde das 345 bp große *yscY* aus der isolierten Gesamt-DNA von *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Primern YscY_NdeI_for und YscY_XhoI_SalI_rev amplifiziert (Tabelle 8). Dabei wurden die Restriktionsschnittstellen durch Überhänge der Primer stromaufwärts und stromabwärts der kodierenden Sequenz angefügt. Nach Subklonierung in pMBL-T/A wurde das *yscY*-Fragment über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *SalI* in den Expressionsvektor pWS ligiert (Tabelle 6, Abbildung 20).

Zusätzlich wurde ein Konstrukt mit C-terminalem RGS-His₄-„Tag“ generiert. Dafür wurde der reverse Primer YscY_His_SalI_rev verwendet (Tabelle 8), der durch einen Überhang das entsprechende Motiv an das 3'-Ende der kodierenden Sequenz anfügt. Der Vorwärtsprimer entsprach dem für das Konstrukt ohne Hexahistidin-„Tag“. Nach Subklonierung in pMBL-T/A wurde das *yscY*-Fragment über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *SalI* in den Expressionsvektor pWS ligiert (Tabelle 6).

Die korrekte Sequenz der resultierenden Plasmide pWS-*yscY* und pWS-*yscY*-His wurde durch Sequenzierung bestätigt (Tabelle 7).

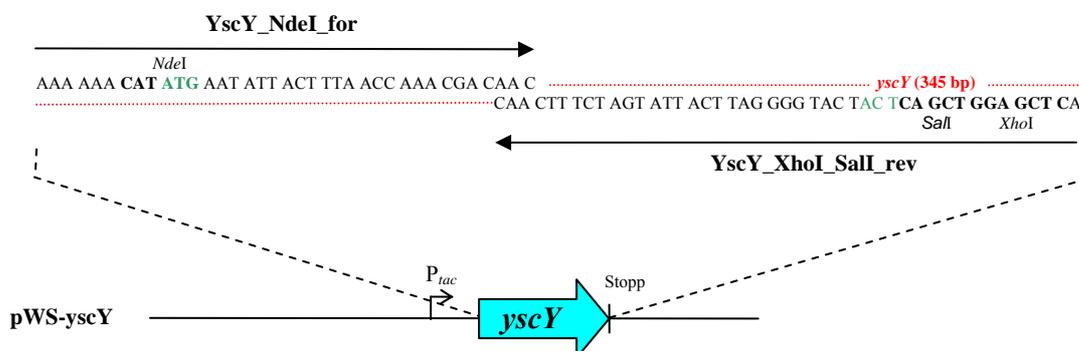


Abbildung 20: Konstruktion von pWS-*yscY*.

Mit den dargestellten Primern wurde *yscY* aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *SalI* in den Expressionsvektor pWS kloniert. Start- und Stoppcodon sind farblich hervorgehoben.

C.4.2 Expression und Reinigung von YscY

Die Expression von YscY wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Tabelle 4) bei 37°C und 27°C überprüft. Beide YscY-Konstrukte waren jedoch komplett unlöslich. Da aber große Mengen YscY in Einschlusskörperchen abgelagert wurden, konnte YscY-His₆ unter denaturierenden Bedingungen in 7 M Harnstoff, 100 mM Tris pH 7,6 über Ni-Sepharose-Chromatographie aus den Einschlusskörperchen mit einer Reinheit > 95 % gereinigt, dann über eine HiPrep Desalting-Säule auf 6 M Harnstoff, 100 mM Tris pH 7,6 umgestellt und für die Generierung eines polyklonalen Antiserums eingesetzt werden.

C.4.3 Expression und Reinigung von YscY im Komplex mit SycD

Da bekannt war, dass YscY mit dem SycD-homologen Chaperon LcrH aus *Y. pseudotuberculosis* wechselwirkt (Bröms *et al.* 2005) und SycD bei der Reinigung als äußerst stabil aufgefallen war, wurde eine Koexpression von YscY und SycD angestrebt. Dafür wurden die Plasmide pET24b-sycD-His und pWS-yscY (Tabelle 7) in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Tabelle 4) kotransformiert und für 18 h bei 27°C im Fermenter die Expression induziert. Die Expression beider Proteine erfolgt IPTG-abhängig. Bereits bei der Ni-Sepharose-Chromatographie zeigte sich, dass ein stabiler Komplex zwischen SycD und YscY gebildet wird, da über den His₆-„Tag“ des SycD eine gemeinsame Reinigung beider Proteine möglich war (Abbildung 21). Darüber hinaus wirkt die Komplexbildung mit SycD löslichkeitsvermittelnd auf YscY, da nahezu die gesamte Menge an exprimiertem Protein löslich vorlag. Auch in der anschließenden Gelfiltration blieb der Komplex zwischen SycD und YscY stabil (Abbildung 21). Der SycD/YscY-Komplex konnte mit Konzentratoren mit einer Polyethersulfon-Membran eingengt werden. Der Komplex wurde unter anderem für Kristallisationsversuche⁹ und zur Generierung eines monoklonalen Antiserums gegen YscY verwendet. Zum anderen sollte der Komplex für Wechselwirkungsstudien mit YscX eingesetzt werden.

⁹Kooperation mit Michael Groll, Adolf-Butenandt-Institut, Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstraße 5, 81377 München, derzeit am Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching

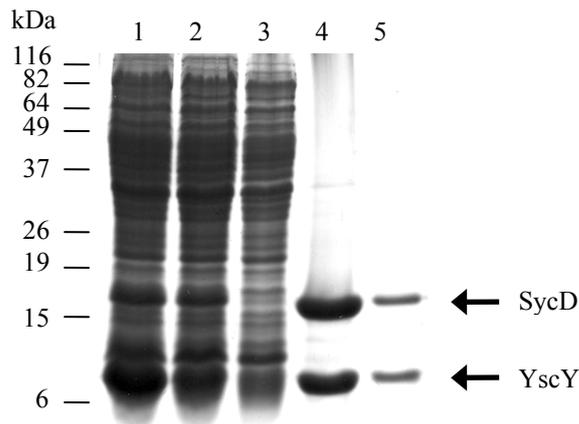


Abbildung 21: Reinigung von YscY im Komplex mit SycD.

Übersicht über die Reinigung des SycD/YscY-Komplexes. Spur 1: Gesamtzell-Lysat; Spur 2: lösliche Fraktion nach French Press und Zentrifugation; Spur 3: Durchlauf nach Ni-Sepharose-Chromatographie; Spur 4: SycD/YscY nach Ni-Sepharose-Chromatographie; Spur 5: SycD/YscY nach Gelfiltration. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

C.4.4 Oligomerisierung von YscY

Zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des SycD/YscY-Komplexes wurde eine analytische Gelfiltration durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde der Komplex mit Markerproteinen bekannter Größe (66, 29, 12 kDa) gemischt, auf eine Superdex 75-Säule aufgetragen und die gesammelten Fraktionen anschließend im SDS-Gel überprüft (nicht gezeigt). Dabei fiel auf, dass in den frühen Fraktionen vor allem YscY eluiert, während in den späteren Fraktionen SycD im Überschuss vorhanden ist. Um dieses Verhalten von YscY näher zu charakterisieren, wurde der Komplex auf eine Superdex 200-Säule aufgetragen, die die Analyse wesentlich größerer Komplexe erlaubt. In Abbildung 22 ist zu sehen, dass sich YscY aus dem Komplex mit SycD löst und in Polymeren von bis zu 600 kDa eluiert. Dieses Verhalten konnte vor allem in Phosphat-Puffer beobachtet werden, während Tris-Puffer und Salzkonzentrationen von 300-500 mM einen heterodimeren Komplex von SycD/YscY begünstigten. Die starke Tendenz von YscY zu oligomerisieren konnte durch Quervernetzung bestätigt werden, da die Proben nicht mehr in das SDS-Gel einwandern konnten, sondern als hochpolymere Strukturen in der Tasche hängen blieben (nicht gezeigt). Zurzeit werden in einer Kooperation mit Ulrich Welsch¹⁰ Immunogold-Färbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen YscY durchgeführt. Ziel ist es zu überprüfen, ob YscY während der Infektion von Wirtszellen die in der Gelfiltration beobachteten hochpolymeren Strukturen im Bakterium ausbildet. Parallel wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von Yersinien mit dem monoklonalen Antikörper gegen YscY angefertigt. Es konnte aber keine Fluoreszenz detektiert werden, weil entweder der Antikörper für die Fluoreszenz-Färbung nicht geeignet oder die intrabakterielle YscY Menge zu gering war.

¹⁰Ludwig-Maximilians-Universität München, Anatomische Anstalt, Pettenkoferstraße 11, 80336 München

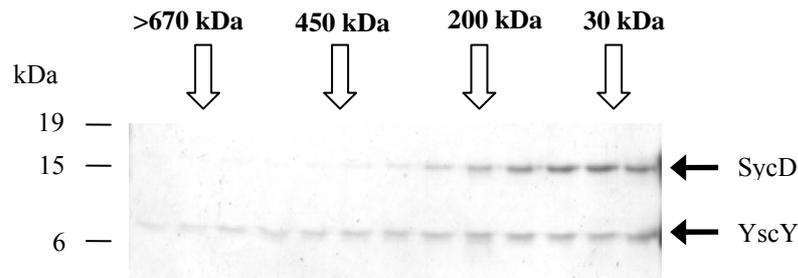


Abbildung 22: Analytische Gelfiltration des SycD/YscY-Komplexes.

Um die starke Tendenz von YscY zur Oligomerisierung näher zu untersuchen, wurde der SycD/YscY-Komplex in Phosphat-Puffer auf eine Superdex 200-Säule appliziert. Aufeinanderfolgende Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. In einem parallelen Ansatz waren Markerproteine (Thyroglobulin: 667 kDa, Apoferritin: 450 kDa, β -Amylase: 200 kDa, BSA: 66 kDa) bekannter Größe auf die Säule appliziert worden, so dass nun den unterschiedlichen Fraktionen bei der Elution von SycD und YscY die entsprechenden Größen zugeordnet werden konnten. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

C.4.5 Sekundärstrukturvorhersagen und Homologie-basierte Strukturberechnung von YscY

Um eine Vorstellung der Interaktion von YscY mit dem Klasse II-Chaperon SycD zu bekommen, wurde die Aminosäuresequenz von YscY in das Programm JUFO (<http://www.meilerlab.org/view.php>) eingespeist. Dieses Programm generiert ausschließlich auf Grundlage der Primärsequenz eine Sekundärstrukturvorhersage. Für jede Aminosäure der Sequenz wird dabei mit einer Genauigkeit von 75 % die Wahrscheinlichkeit berechnet, in einer Schleife (U), einer Helix (H) oder einem Faltblatt (S) zu liegen. Die Analyse zeigt, dass YscY zu ca. 65 % aus α -Helices besteht (Abbildung 23). Zusätzlich ergab die Berechnung eine sehr kurze β -Faltblattstruktur (Abbildung 23). Die fünf identifizierten Helices sind ähnlich wie bei SycD durch kurze Schleifen miteinander verbunden. Dies wird auch im Homologie-basierten 3D-Modell von YscY deutlich, das durch das Programm ESyPred3D (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>) (Lambert *et al.* 2002) generiert wurde. Dieses Modell deutet jedoch auf sechs α -Helices hin und enthält keine β -Faltblätter (Abbildung 24). Bei den insgesamt sechs α -Helices, die durch die Strukturvorhersage-Programme identifiziert wurden, handelt es sich wohl um drei TPR-Motive, wie sie auch in SycD vorliegen (Pallen *et al.* 2003). Dies könnte die stabile Interaktion und damit die löslichkeitsvermittelnde Wirkung von SycD auf YscY erklären.

```

          Helix 1                Helix 2                Helix 3
UUUUUUUUHH HHHHHHHHHH HHUUUHHHHH HHHHHHHUUU UUUHHHHHHH
1  MNITLTKRQQ EFLLLNGWLQ LQCGHAERAC ILLDALLTLN PEHLAGRRCR

Helix 3                Helix 4                Helix 5
HHHHHHUUUU UHHHHHHHHH HUUUUUUUUU SSSHHHHHHH HHHHHHHHHH
51  LVALLNQQG ERAEKEAQL I SHDPLQAGN WLCLSRAQQL NGDLDKARHA

Helix 5
HHHHHHUUUU UUUU
101 YQHYLELKDH NESP*

```

Abbildung 23: Sekundärstrukturvorhersage von YscY.

Die Sekundärstrukturanalyse wurde ausschließlich auf Grundlage der Primärstruktur von YscY mit dem Programm JUFO durchgeführt. U: Schleife; H: Helix; S: Faltblatt.

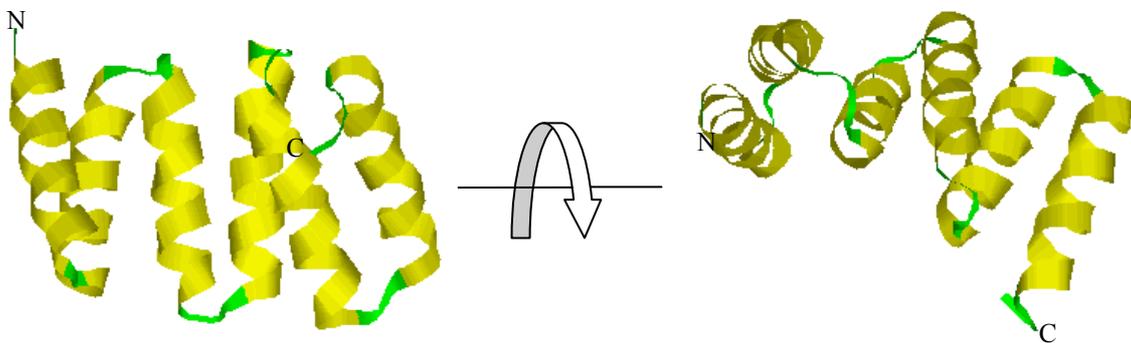


Abbildung 24: Homologie-basiertes Modell der 3D-Struktur von YscY.

Die Berechnung der Strukturvorhersage wurde durch das Programm ESyPred3D (Lambert *et al.* 2002) basierend auf der Struktur eines idealen TPR-Motivs (Main *et al.* 2003) erstellt.

C.5 Reinigung von YscX

Gemeinsam mit YscY wurde YscX als Regulator der Typ III Sekretion identifiziert (Iriarte & Cornelis 1999). Eine Deletionsmutante in *yscX* erlaubt ebenso wie eine Deletionsmutante in *yscY* unter permissiven Bedingungen keine Yop-Sekretion. Denkbar wäre im Fall von YscX auch eine Funktion als T3SS-Effektor, da YscX in den Kulturüberstand sezerniert wird (Day & Plano 2000). Da bekannt war, dass YscY sowohl mit SycD als auch mit YscX wechselwirkt (Day & Plano 2000; Bröms *et al.* 2005), sollte YscX rekombinant hergestellt werden, um mehr über die Interaktion der drei Proteine zu erfahren. Dabei sollte vor allem überprüft werden, ob auch YscX und SycD miteinander interagieren und ob möglicherweise ein trimerer Komplex zwischen allen drei Proteinen existiert, um eine bessere Vorstellung des regulatorischen Netzwerks der Typ III Sekretion zu erhalten. Darüber hinaus sollte YscX alleine und im Komplex mit YscY und/oder SycD für kristallographische Ansätze zugänglich gemacht werden.

C.5.1 Klonierung von YscX in den Expressionsvektor pET-21b

Für die Klonierung wurde das 369 bp große *yscX* aus der isolierten Gesamt-DNA von *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Primern YscX_NdeI_for und YscXHis_XhoI_rev amplifiziert (Tabelle 8). Der C-terminale His₆-„Tag“ wurde durch einen Überhang des reversen Primers YscXHis_XhoI_rev an das Gen angefügt. Zusätzlich fügt der Primer ein RGS-Motiv zwischen dem Zielgen und dem His₆-„Tag“ ein. Nach Direktverdau wurde das *yscX*-Fragment über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den Expressionsvektor pET-21b ligiert (Tabelle 6, Abbildung 25). Die korrekte Sequenz des resultierenden Plasmids pET21b-*yscX*-His wurde durch Sequenzierung bestätigt (Tabelle 7).

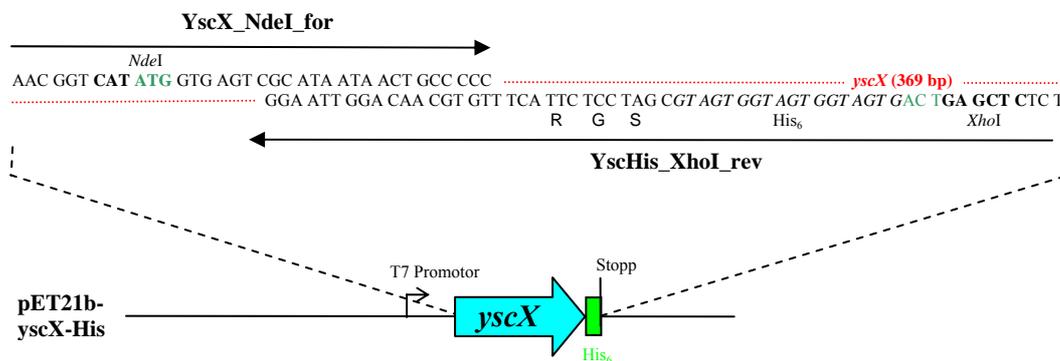


Abbildung 25: Konstruktion von pET21b-*yscX*-His.

Mit den dargestellten Primern wurde *yscX* aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den Expressionsvektor pET-21b kloniert. Start- und Stoppcodon sind farblich hervorgehoben.

C.5.2 Expression und Reinigung von YscX

Die Expression des Proteins wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Tabelle 4) bei 27°C und 37°C überprüft. Unter beiden Bedingungen wurde YscX in Einschlusskörperchen abgelagert. Da ausreichend große Mengen an unlöslichem YscX in *E. coli* gebildet wurden, wurde YscX-His₆ unter denaturierenden Bedingungen in 7 M Harnstoff, 100 mM Tris pH 7,6 über Ni-Sepharose-Chromatographie aus den Einschlusskörperchen gereinigt, dann über eine HiPrep Desalting-Säule auf 6 M Harnstoff, 100 mM Tris pH 7,6 umgestellt und für die Generierung eines polyklonalen Antiserums eingesetzt.

C.5.3 Expression und Reinigung von YscX im Komplex mit YscY

Da bekannt war, dass YscY und YscX miteinander wechselwirken, wurde eine Koexpression von YscX und YscY angestrebt. Dafür musste *yscX* umkloniert werden. Die Klonierungsstrategie war analog zur in Abbildung 25 dargestellten Klonierung in pET-21b. Nach Subklonierung in pMBL-T/A

wurde das *yscX*-Fragment über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pCDFDuet-1 ligiert (Tabelle 6). Die korrekte Sequenz des resultierenden Plasmids pCDF-*yscX*-His wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Plasmide pCDF-*yscX*-His und pWS-*yscY* wurden in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Tabelle 4) kotransformiert und für 18 h bei 27°C im Fermenter die Expression induziert. Die Expression beider Proteine erfolgt IPTG-abhängig. Obwohl die Proteine einzeln in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Tabelle 4) komplett unlöslich sind, konnte nach gemeinsamer Expression durch Ni-Sepharose-Chromatographie ein stabiler Komplex von YscX und YscY gereinigt werden (Abbildung 26). Trägt man die positiven Fraktionen aus der Ni-Sepharose-Chromatographie auf eine Superdex 75-Säule auf, eluieren beide Proteine gemeinsam (Abbildung 26). Dies zeigt, dass YscX und YscY einen stabilen Komplex bilden. Vermutlich werden durch die Komplexbildung stark hydrophobe Bereiche in beiden Proteinen maskiert, so dass der Komplex im Gegensatz zu den einzelnen Proteinen in Lösung eine gewisse Stabilität aufweist. Die Ausbeute aus 1,1 l Bakterienkultur betrug jedoch maximal 1 µg. Der YscY/YscX-Komplex konnte mit Konzentratoren mit einer Polyethersulfon-Membran bis 2,5 µg/µl eingeeengt werden. Die Probe musste schnell für weitere Versuche eingesetzt werden, da sie sowohl bei längerer Lagerung bei 4°C als auch beim Einfriervorgang aggregierte. Diese Tatsache erschwerte die Kritallisationsversuche des Komplexes erheblich¹¹. YscX und SycD konnten zwar gemeinsam in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Tabelle 4) exprimiert werden, aber eine gemeinsame Reinigung war nicht möglich (nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass SycD und YscX vermutlich nicht direkt miteinander wechselwirken. Möglich wäre aber auch eine sehr schwache und damit für die Reinigung zu instabile Interaktion.

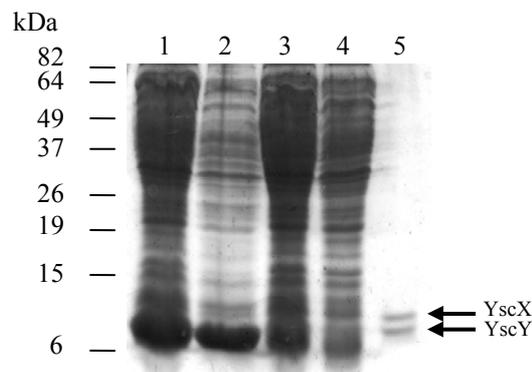


Abbildung 26: Übersicht über die Reinigung von YscX im Komplex mit YscY

Spur 1: Gesamtzell-Lysat; Spur 2: unlösliche Fraktion nach French Press und Zentrifugation; Spur 3: lösliche Fraktion nach French Press und Zentrifugation; Spur 4: Durchlauf nach Ni-Sepharose-Chromatographie; Spur 5: YscY/YscX nach Ni-Sepharose-Chromatographie. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

¹¹Kooperation mit Michael Groll, Adolf-Butenandt-Institut, Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstraße 5, 81377 München, derzeit am Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching

C.5.4 Sekundärstrukturvorhersagen und Homologie-basierte Strukturberechnung von YscX

Im Fall von YscX brachten weder Sekundärstrukturvorhersagen noch Homologie-basierte Strukturberechnungen ein Ergebnis. Ein Grund hierfür ist sicherlich die Tatsache, dass bisher kein mögliches homologes Protein zu YscX strukturell untersucht wurde, auf dessen Grundlage Berechnungen möglich wären. Bei der Sekundärstrukturberechnung durch das Programm JUFO (<http://www.meilerlab.org/view.php>) werden ungefähr 70 % des Proteins als unstrukturiert identifiziert. Es lässt sich nur sagen, dass YscX im Gegensatz zu SycD und YscY möglicherweise nicht aus TPR-Motiven besteht, da in der Sekundärstrukturvorhersage kaum α -Helices identifiziert wurden. Allerdings ist die Vorhersage von TPR-Motiven schwierig, da das Motiv bezüglich der Aminosäuresequenz nur wenig konserviert ist.

C.5.5 Stöchiometrie des YscY/YscX-Komplexes

Da über die Stöchiometrie des YscY/YscX-Komplexes nichts bekannt war und die Gelfiltration zur Reinigung des Komplexes erste Anhaltspunkte auf die Bildung eines Heterodimers gegeben hatte, sollte diese Vermutung überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde eine analytische Gelfiltration und chemische Quervernetzung durchgeführt. Für die analytische Gelfiltration wurde der Komplex mit Markerproteinen bekannter Größe (66, 29, 12 kDa) gemischt und auf eine Superdex 75-Säule aufgetragen. Da YscY und YscX eine berechnete Molekularmasse von 13 kDa bzw. 13,7 kDa haben, würde ein Heterodimer nach dem 29 kDa großen Markerprotein eluieren. Abbildung 27A zeigt anhand des Elutionsverhaltens des YscY/YscX-Komplexes bei ca. 25-30 kDa, dass die Proteine in Lösung Heterodimere bilden. Unter Gelfiltrationsbedingungen konnte bei der Applikation eines Gemischs aus rekombinantem SycD und YscY/YscX-Komplex keine Wechselwirkung von SycD mit dem Komplex nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Das bedeutet, dass SycD vermutlich nicht mit dem YscY/YscX-Komplex interagiert oder in der Lage ist den Komplex aufzulösen. Die Bildung eines Heterodimers von YscY und YscX hingegen konnte mit verschiedenen Crosslinkern bestätigt werden. Nach einer 30-minütigen Inkubation des Komplexes mit Crosslinkern lag der Großteil der Probe als Dimer von ca. 26 kDa vor (Abbildung 27B). Der Komplex konnte sowohl mit Antiserum gegen YscY als auch mit Antiserum gegen YscX detektiert werden (nicht gezeigt). Obwohl beide Proteine eine sehr ähnliche Größe haben und damit sowohl in der analytischen Gelfiltration als auch bei der chemischen Quervernetzung ein Heterodimer schlecht von YscY- bzw. YscX-Homodimeren zu unterscheiden wäre, deuten die Ergebnisse auf die Bildung eines Heterodimers hin. Zum einen sind YscY und YscX in der analytischen Gelfiltration ebenso wie in der Gelfiltration zur Reinigung der Proteine in allen Fraktionen gemeinsam eluiert und das Verhältnis zueinander lag bei 1:1. Zum anderen ergab sich auch

bei der Quervernetzung nur eine einzige Bande bei 26 kDa, obwohl sich beide Proteine als Monomer im Gel deutlich voneinander abgrenzen lassen, dies also auch für Homodimere zu erwarten wäre. Außerdem spricht die Unlöslichkeit beider Proteine bei getrennter Expression, dann aber die Möglichkeit der Reinigung der Proteine in einem 1:1 Verhältnis bei gemeinsamer Expression, stark für die Bildung eines Heterodimers.

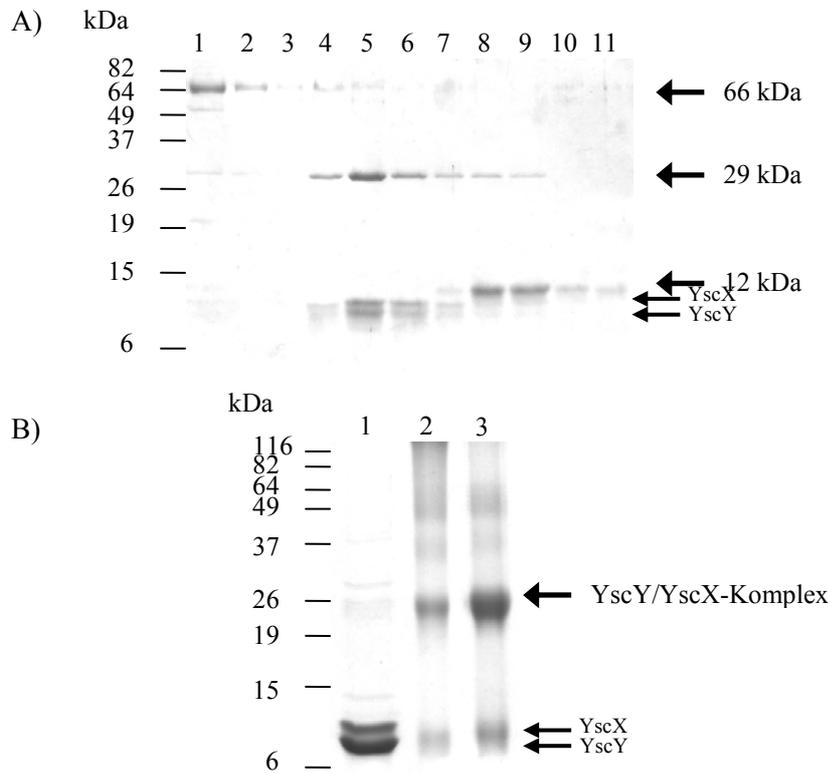


Abbildung 27: Stöchiometrie des YscY/YscX-Komplexes.

(A) Analytische Gelfiltration. Um das apparente Molekulargewicht des YscY/YscX-Komplexes zu bestimmen, wurden die rekombinanten Proteine mit Markerproteinen (BSA: 66 kDa, Carboanhydrase: 29 kDa, Cytochrom c: 12 kDa) gemischt und auf eine Superdex 75-Säule appliziert. Aufeinanderfolgende Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Spuren 1-11). (B) Chemische Quervernetzung. Der gereinigte Komplex wurde für 30 min bei RT mit verschiedenen Crosslinkern inkubiert. Spur 1: YscY/YscX ohne Crosslinker; Spur 2: YscY/YscX mit DSP; Spur 3: YscY/YscX mit EGS. SDS-Gele wurden mit Coomassie gefärbt.

C.6 Reinigung von SycE

Ziel der Reinigung von rekombinantem SycE war vor allem die Verfügbarkeit des Proteins für Interaktionsstudien mit anderen Proteinen. Besonderes Augenmerk sollte auf mögliche Eingriffe von SycE in den Stoffwechsel von *Y. enterocolitica* gelegt werden, da SycE mit den Regulatorproteinen YscM1 und YscM2 interagiert (Swietnicki *et al.* 2004) und damit auch die PEPC beeinflussen könnte. SycE sollte sowohl auf eine direkte Interaktion mit der PEPC als auch auf einen indirekten Einfluss vermittelt über YscM1 überprüft werden. Bei SycE handelt es sich um ein Klasse I-Chaperon, das im bakteriellen Zytoplasma den Effektor YopE bindet (Forsberg & Wolf-Watz 1990; Wattiau & Cornelis

1993). Es bildet in Lösung Homodimere und es existiert bereits eine Kristallstruktur, die die typischen Charakteristika von Klasse I-Chaperonen aufweist: Eine gemischte Struktur aus α -Helices und β -Faltblättern, wobei sich die sechs β -Stränge zu einem antiparallelen β -Faltblatt zusammenlagern (Birtalan & Ghosh 2001; Evdokimov *et al.* 2002; Trame & McKay 2003).

C.6.1 Klonierung von SycE in den Expressionsvektor pET-21b

Für die Klonierung mit C-terminalem His₆-„Tag“ wurde das 393 bp große *sycE* aus der isolierten Gesamt-DNA von *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Primern SycE_NdeI_for und SycEHis_NotI_rev amplifiziert (Tabelle 8). Dabei wurde der C-terminale His₆-„Tag“ durch einen Überhang des reversen Primers SycEHis_NotI_rev an das Gen angefügt. Zusätzlich fügt der Primer ein RGS-Motiv zwischen *sycE* und dem His₆-„Tag“ ein. Nach Subklonierung in pMOSBlue wurde das *sycE*-Fragment über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in den Expressionsvektor pET-21b ligiert (Tabelle 6, Abbildung 28). Die korrekte Sequenz des resultierenden Plasmids pET21b-sycE-His wurde durch Sequenzierung bestätigt.

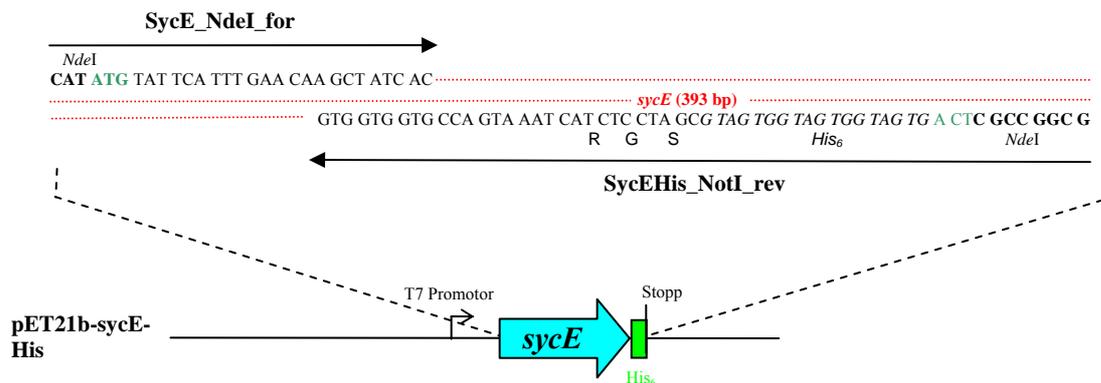


Abbildung 28: Konstruktion von pET21b-sycE-His.

Mit den dargestellten Primern wurde *sycE* aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in den Expressionsvektor pET-21b kloniert. Start- und Stoppcodon sind farblich hervorgehoben.

C.6.2 Expression und Reinigung von SycE

Die Expression des Proteins erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Tabelle 4) bei 27°C für 18 h im Fermenter unter ständigem Belüften und Rühren. Als erster Reinigungsschritt wurde eine Ni-Sepharose-Chromatographie durchgeführt, mit anschließender Gelfiltration zur Entfernung restlicher Verunreinigungen (Abbildung 29). SycE-His₆ konnte mit Konzentratoren mit einer Polyethersulfon-Membran auf 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingengt werden. Damit konnte SycE für verschiedene Studien eingesetzt werden, um ein besseres Verständnis des Interaktions der T3SS-Regulatoren zu erhalten. Besonders von Interesse war dabei, ob über YscM1 eine Wechselwirkung mit der PEPC vermittelt wird.

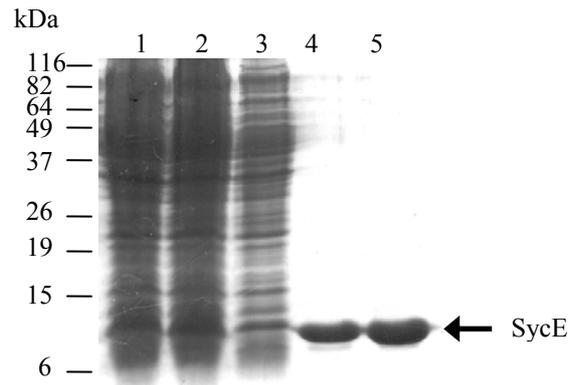


Abbildung 29: Übersicht über die Reinigung von SycE-His₆.

Spur 1: Gesamtzell-Lysat; Spur 2: lösliche Fraktion nach French Press und Zentrifugation; Spur 3: Durchlauf nach Ni-Sepharose-Chromatographie; Spur 4: SycE nach Ni-Sepharose-Chromatographie; Spur 5: SycE nach Gelfiltration. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

C.6.3 Überprüfung der Funktionalität von SycE

Um zu überprüfen, ob das gereinigte SycE-His₆ korrekt gefaltet und damit funktionsfähig ist, wurde die bekannte Dimerisierung (Cheng & Schneewind 1999) getestet (Swietnicki *et al.* 2004). Der Nachweis erfolgte durch Quervernetzung mit dem Crosslinker DSP. Die Dimerisierung konnte so bestätigt werden (Abbildung 30). SycE konnte somit gefaltet und funktionsfähig gereinigt werden. Somit konnte SycE auf einen direkten oder über YscM1 vermittelten indirekten Einfluss auf die PEPC Aktivität überprüft werden (siehe C.7.4).

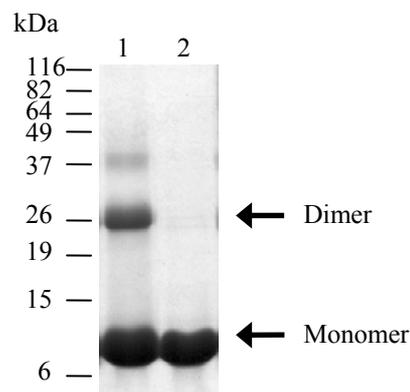


Abbildung 30: Nachweis der Dimerisierung von SycE durch chemische Quervernetzung.

Rekombinantes SycE wurde zusammen mit dem Crosslinker DSP inkubiert (Spur 2). In Spur 1 wurde eine Probe ohne Crosslinker aufgetragen. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

C.7 Der Virulenzfaktor YscM1 moduliert die Enzymaktivität der PEPC

In einer vorangegangenen Doktorarbeit waren die T3SS-Regulatorproteine YscM1 und YscM2 als Interaktionspartner des Stoffwechsellenzym Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) identifiziert worden (Neumayer 2005). Die Wechselwirkung der Proteine wurde im Nativgel mit rekombinanten Proteinen bestätigt und der Einfluss auf die PEPC Aktivität in einem Enzymassay charakterisiert (Neumayer 2005). Daran sollte in dieser Arbeit angeknüpft werden und im Enzymassay die Wechselwirkung mit der PEPC detaillierter untersucht werden. Darüber hinaus sollten die bekannten Interaktionen zwischen YscM1 und den T3SS-Chaperonen (Swietnicki *et al.* 2004; Phan *et al.* 2004; Cambronne *et al.* 2004; Schmid *et al.* 2006; Dittmann *et al.* 2007) auf eine Bedeutung für die Modulation des Stoffwechsels durch YscM1 untersucht werden. Die Bestimmung der PEPC Aktivität erfolgte in Anlehnung an einen Assay von Smith (1968), der die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der PEPC durch die Kopplung an eine zweite Reaktion ermöglicht. Dabei wird Oxalacetat (OA), das Produkt der Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) durch das Enzym PEPC, von der Malatdehydrogenase (MDH) zu L-Malat umgesetzt (Abbildung 31). Diese Reaktion wird durch die Oxidation von NADH angetrieben. Die NADH Abnahme im Reaktionsansatz kann spektrophotometrisch bei 340nm bestimmt werden.

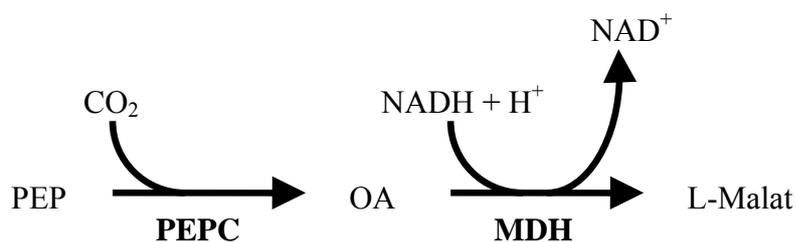


Abbildung 31: Bestimmung der Enzymaktivität der PEPC.

Phosphoenolpyruvat (PEP) wird durch die Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) zu Oxalacetat (OA) carboxyliert. Dieses wird dann unter Oxidation von NADH durch die Malatdehydrogenase (MDH) zu L-Malat umgesetzt.

C.7.1 Einfluss von YscM1 und YscM2 auf die Enzymaktivität der PEPC

Um einen Einfluss von YscM1 und YscM2 auf die Enzymaktivität der PEPC zeigen zu können, wurde die Aktivität der PEPC in Anwesenheit der YscM Proteine bei 340nm protokolliert. Zu diesem Zweck wurde die PEPC mit unterschiedlichen Mengen YscM1 bzw. YscM2 inkubiert. Die Proben wurden für 5 min bei 37°C vorinkubiert, um die Bedingungen zu simulieren, unter denen YscM1 und YscM2 im Bakterium exprimiert werden, und die Reaktion dann gestartet. YscM1 verlangsamt den NADH Verbrauch deutlich, was einer Hemmung der Reaktion entspricht (Abbildung 32). Diese Inhibition war bereits von Neumayer (2005) beobachtet worden. Anders als in der vorangegangenen Promotion (Neumayer 2005), in der YscM2 als Aktivator der PEPC beschrieben wurde, konnte YscM2 allerdings

kein Einfluss auf die PEPC Aktivität zugeordnet werden (nicht gezeigt). Der YscM1 Effekt auf die PEPC Reaktion erwies sich als titrierbar (Abbildung 32). Während ein 1:1 Verhältnis von YscM1 zur PEPC keine signifikante Senkung der Enzymaktivität zur Folge hatte, wurde bei einem 10- bis 20-fachen (1-2 μM) Überschuss von YscM1 ein signifikanter Effekt deutlich. Bei einem 400-fachen (40 μM) Überschuss von YscM1 gegenüber der PEPC konnte die PEPC Aktivität auf ungefähr 30 % des Ausgangswerts gesenkt werden. Kontrollproteine wie GST und MBP oder Typ III-assoziierte Proteine wie LcrG und LcrV hatten unter denselben Bedingungen und in vergleichbaren Konzentrationen keinen Einfluss auf die PEPC Aktivität (nicht gezeigt). Die für die Versuche eingesetzten 100 nM PEPC entsprechen normalen zytoplasmatischen Konzentrationen. Da es sich im Fall des *yscM1*-Gens um ein Gen mit schwacher bis mittlerer Expressionsstärke handelt, sind im Bakterium Konzentrationen im mikromolaren Bereich, wie sie im Assay eingesetzt wurden, nicht zu erwarten. Da aber intrazellulär das Phänomen des „molecular crowding“ eine wichtige Rolle für die Umsatzrate kinetischer Reaktionen spielt (Chebotarev *et al.* 2004), sind im bakteriellen Zytoplasma möglicherweise Konzentrationen von YscM1 im nanomolaren Bereich bereits für einen inhibitorischen Einfluss auf die PEPC ausreichend. Um sicherzustellen, dass der Effekt von YscM1 nicht durch einen Einfluss auf den zweiten Reaktionsschritt bedingt ist, der durch die Malatdehydrogenase (MDH) katalysiert wird, wurde der Assay leicht abgewandelt. Der erste Reaktionsschritt wurde entfernt und die Reaktion durch Zugabe von 5 mM Oxalacetat gestartet. Es konnte kein Einfluss von YscM1 auf die Aktivität der MDH nachgewiesen werden (Abbildung 33). Abbildung 33 ermöglicht bei einer PEPC Aktivität von 50% die Abschätzung der Inhibitorkonstante K_i . Der K_i -Wert bei pH 8 beträgt für YscM1 11,7 μM .

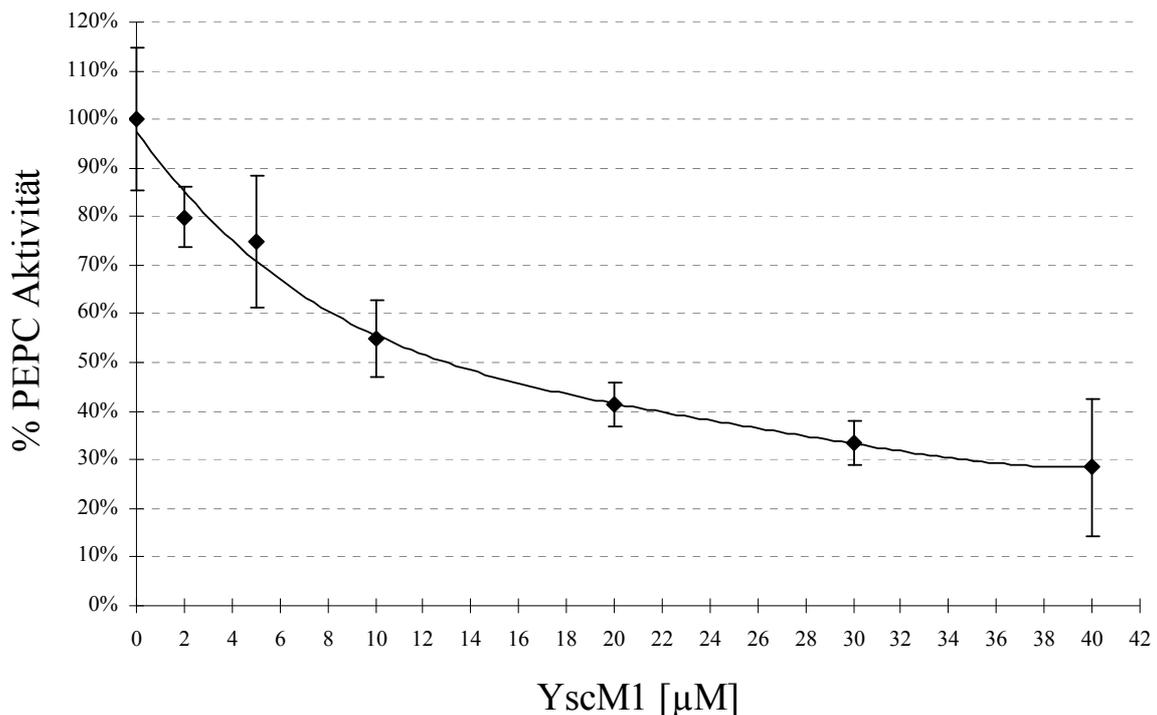


Abbildung 32: Der inhibitorische Effekt von YscM1 auf die PEPC ist titrierbar.

Steigende Mengen (0-40 µM) YscM1 wurden zu 100 nM PEPC (bezogen auf das Monomer) gegeben und nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C die Oxidation von NADH gemessen. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 60 sek in 2-Sekundenschritten. Jeweils vier unabhängige Messungen wurden durchgeführt und die daraus resultierenden Steigungen als Maß für die PEPC Aktivität gemittelt. Die Aktivität von 1 µg PEPC im Assay (100 nM PEPC) wurde als 100 % PEPC Aktivität definiert. Die Umsatzrate von NADH in Anwesenheit von YscM1 in verschiedenen Konzentrationen wurde in Bezug zu diesem Wert gesetzt. Die Signifikanz p ist für alle Werte < 0,05. Fehlerbalken: ± Standardabweichung.

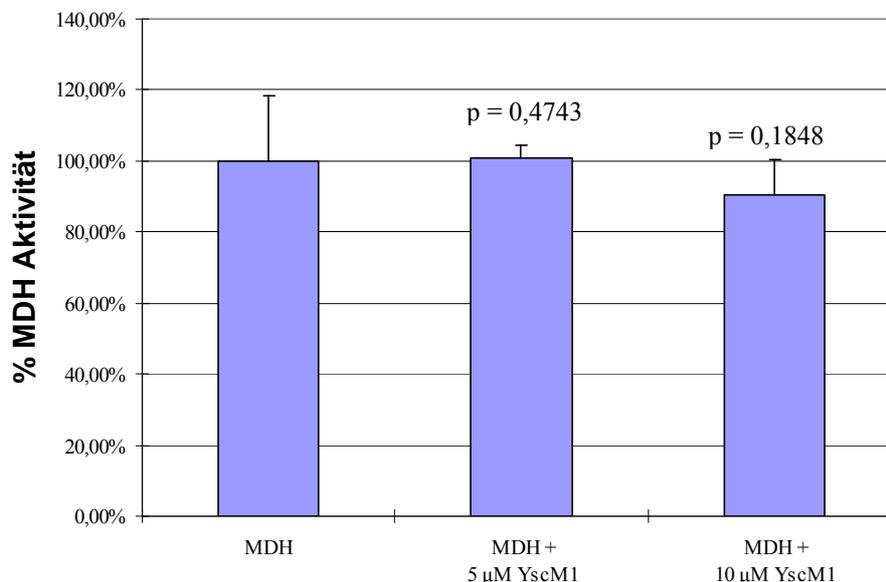


Abbildung 33: Einfluss von YscM1 auf die Enzymaktivität der Malatdehydrogenase.

5 µM bzw. 10 µM YscM1 wurden zu 100 nM Malatdehydrogenase (MDH) gegeben und nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C die Oxidation von NADH gemessen. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 60 sek in 2-Sekundenschritten. Jeweils vier unabhängige Messungen wurden durchgeführt und die daraus resultierenden Steigungen als Maß für die MDH Aktivität gemittelt. Die Aktivität von 1 U MDH im Assay wurde als 100 % MDH Aktivität definiert. Die Umsatzrate von NADH in Anwesenheit von YscM1 in verschiedenen Konzentrationen wurde in Bezug zu diesem Wert gesetzt. Die Signifikanz p ist für alle Messungen angegeben. Fehlerbalken: ± Standardabweichung.

Zusätzlich wurde überprüft, ob YscM1 im Komplex mit SycH ebenfalls die PEPC Aktivität beeinflussen kann. Zu diesem Zweck wurde YscM1 aus einer Koexpression in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS im Komplex mit SycH gereinigt (Neumayer 2005). Auch der YscM1/SycH-Komplex führt zu einer signifikanten Inhibition der PEPC, allerdings in abgeschwächter Form (Abbildung 34). Da nicht sicher ist, ob es sich bei dem YscM1/SycH-Komplex um einen 1:2 oder 1:4 Komplex handelt, wurde für beide Varianten die benötigte Proteinmenge errechnet, um eine Endkonzentration von 10 μM im Reaktionsansatz zu erhalten und die daraus resultierende Abnahme der $\text{OD}_{340\text{nm}}$ bestimmt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Inhibition auf nicht-komplexiertes YscM1 zurückzuführen ist. Allerdings ist die Inhibition durch den YscM1/SycH-Komplex so deutlich, dass es unwahrscheinlich ist, dass die zu erwartende geringe Menge an freiem YscM1 für den beobachteten Einfluss verantwortlich ist. SycH hat im Enzymassay keinen signifikanten Einfluss auf die PEPC Aktivität (Abbildung 38).

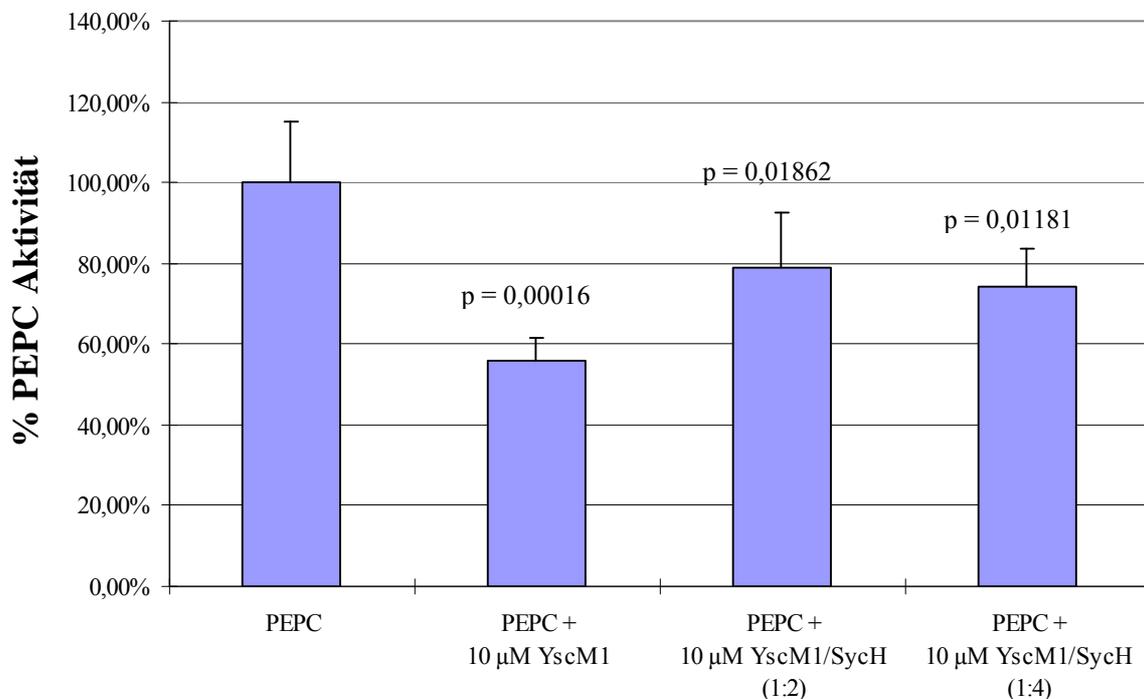


Abbildung 34: Einfluss des YscM1/SycH-Komplexes auf die Enzymaktivität der Malatdehydrogenase.

10 μM YscM1/SycH bzw. 10 μM YscM1 wurden zu 100 nM PEPC (bezogen auf das Monomer) gegeben und nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C die Oxidation von NADH gemessen. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 60 sek in 2-Sekundenschritten. Jeweils vier unabhängige Messungen wurden durchgeführt und die daraus resultierenden Steigungen als Maß für die PEPC Aktivität gemittelt. Die Aktivität von 1 μg PEPC im Assay (100 nM PEPC) wurde als 100 % PEPC Aktivität definiert. Die Umsatzrate von NADH in Anwesenheit des YscM1/SycH-Komplexes wurde in Bezug zu diesem Wert gesetzt. Die Signifikanz p ist für alle Messungen angegeben. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

Um die biologische Relevanz der Inhibition der PEPC durch YscM1 einschätzen zu können, wurden Vergleiche mit Aspartat, einem allosterischen Inhibitor der PEPC, unternommen. Daher wurde der Effekt von millimolaren Mengen Aspartat mit dem Effekt von mikromolaren Mengen YscM1 auf die PEPC verglichen (Abbildung 35). Dabei zeigte sich, dass das inhibitorische Potential von YscM1 bei pH 8 deutlich stärker ist als das von Aspartat. Vergleicht man 10 μM YscM1 mit 10 mM Aspartat, liegt das inhibitorische Potential von YscM1 unter den gewählten Bedingungen mehr als drei Zehnerpotenzen über dem von Aspartat. Dass Aspartat erst im millimolaren Bereich einen Einfluss auf die Aktivität der PEPC zeigt, ist im Einklang mit der Literatur zum Einfluss von Aspartat auf die PEPC anderer Organismen (Wohl & Markus 1972; Nakamura *et al.* 1996; Frank *et al.* 2001). Dennoch fällt der inhibitorische Effekt von Aspartat auf die *Yersinia* PEPC sehr gering aus. So wird die *E. coli* PEPC durch 10 mM Aspartat auf weniger als 10 % der Anfangsaktivität gesenkt (Terada & Izui 1991) und auch die PEPC aus *Synechococcus vulcans* wird durch Aspartat deutlich stärker inhibiert als die *Yersinia* PEPC (Chen *et al.* 2002). Allerdings machen sowohl die Studien von Chen *et al.* (2002) als auch Studien zur Inhibition der PEPC verschiedener Pflanzen (Willert 1975; Moraes & Plaxton 2000) deutlich, dass die Hemmung der Enzymaktivität durch Metabolite wie Malat und Aspartat stark vom pH-Wert abhängt. Somit wäre denkbar, dass das pH-Optimum für Aspartat nicht bei pH 8 liegt und eine Veränderung des pH-Wertes zu einer deutlicheren Inhibition der PEPC führen würde.

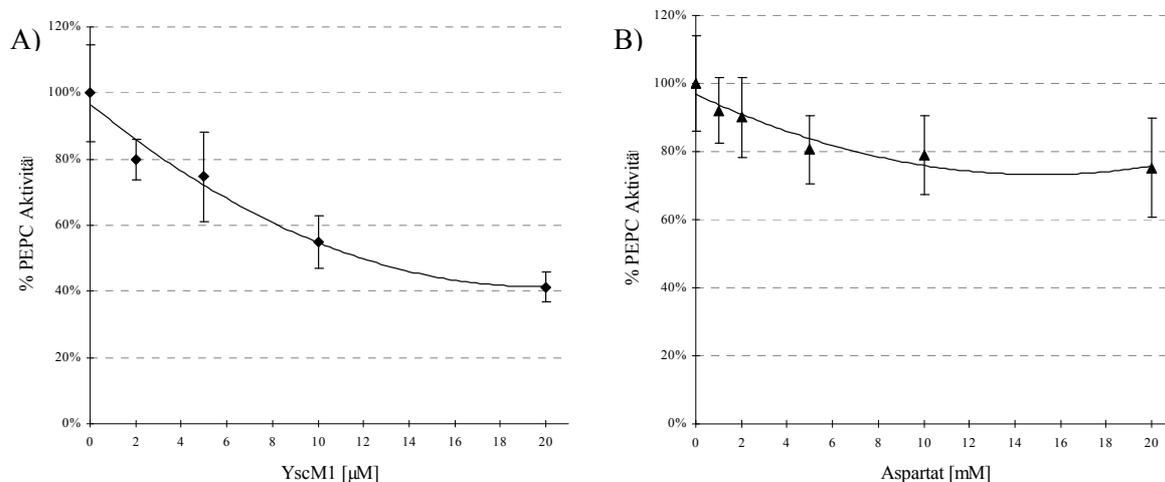


Abbildung 35: Vergleich des allosterischen PEPC Inhibitors Aspartat mit YscM1.

Die PEPC Reaktion nach Zugabe von 0-40 μM YscM1 (A) zu 100 nM PEPC (bezogen auf das Monomer) im Vergleich zur Reaktion nach Zugabe von 0-20 mM Aspartat (B). Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Oxidation von NADH gemessen. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 60 sek in 2-Sekundenschritten. Jeweils drei (Aspartat) bzw. vier (YscM1) unabhängige Messungen wurden durchgeführt und die daraus resultierenden Steigungen als Maß für die PEPC Aktivität gemittelt. Die Aktivität von 1 μg PEPC im Assay (100 nM PEPC) wurde als 100 % PEPC Aktivität definiert. Die Umsatzrate von NADH in Anwesenheit von YscM1 bzw. Aspartat in verschiedenen Konzentrationen wurde in Bezug zu diesem Wert gesetzt. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

C.7.2 Der N-Terminus von YscM1 moduliert die Enzymaktivität der PEPC

Der Einfluss des N-Terminus auf die PEPC Aktivität war bereits in der Promotion von Neumayer (2005) untersucht worden, sollte nun aber erneut überprüft werden. Die gewünschten N-terminalen Peptide wurden bei der Firma ThermoHybaid mit einer Reinheit > 70 % synthetisiert und in den von Neumayer (2005) als geeignet identifizierten Puffern gelöst (Tabelle 15).

Tabelle 15: N-terminale Peptide von YscM1 und ihre Löslichkeit.

Die Peptide wurden von der Firma ThermoHybaid synthetisiert und standardmäßig in 50 mM Tris pH 7,5 mit 150 mM NaCl gelöst. YscM1 1-36 wurde im Standardpuffer unter Zusatz von 2 M Harnstoff gelöst. Die Peptide wurden zur Bestimmung ihres Einflusses auf die Enzymaktivität von PEPC in Konzentrationen von 50 μ M eingesetzt.

Peptide	Löslichkeit
YscM1 1-36	in 2 M Harnstoff
YscM1 36-58	gut
YscM1 21-34	gut
LcrQ 36-58	gut

Das Peptid YscM1 1-36 zeigt im Enzymassay auch nach Korrektur um den Einfluss des Harnstoff-Puffers dieselbe Tendenz wie rekombinantes YscM1 (Abbildung 36). Allerdings ist von dem Peptid eine entsprechend größere Menge notwendig, um einen inhibitorischen Effekt zu erzielen, als von dem rekombinanten Protein. Dies könnte mehrere Ursachen haben: Zum einen ist bei einer Reinheit des Peptids von >70 % von ca. 30 % Ausschuss auszugehen, zum anderen erwies sich das Peptid als schlecht löslich, so dass nicht beurteilt werden kann, wie groß der Anteil an korrekt gefaltetem Peptid in Lösung letztendlich ist. Es konnte aber dennoch wie von Neumayer (2005) gezeigt, bestätigt werden, dass der N-Terminus von YscM1 die Enzymaktivität der PEPC signifikant beeinflusst, während die Peptide YscM1 21-34 und YscM1 36-58 die PEPC Aktivität nicht signifikant verändern. YscM1 aus *Y. enterocolitica* unterscheidet sich lediglich an einer Position von dem homologen LcrQ aus *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*. Während YscM1 an Position 48 ein Serin trägt, liegt dort bei LcrQ ein Asparagin. Dieser Bereich wird von dem Peptid YscM1 36-58 abgedeckt. Ein entsprechendes Peptid LcrQ 36-58 zeigt im Enzymassay ebenso wie das korrespondierende Peptid aus YscM1 keinen Einfluss auf die Aktivität der PEPC (nicht gezeigt).

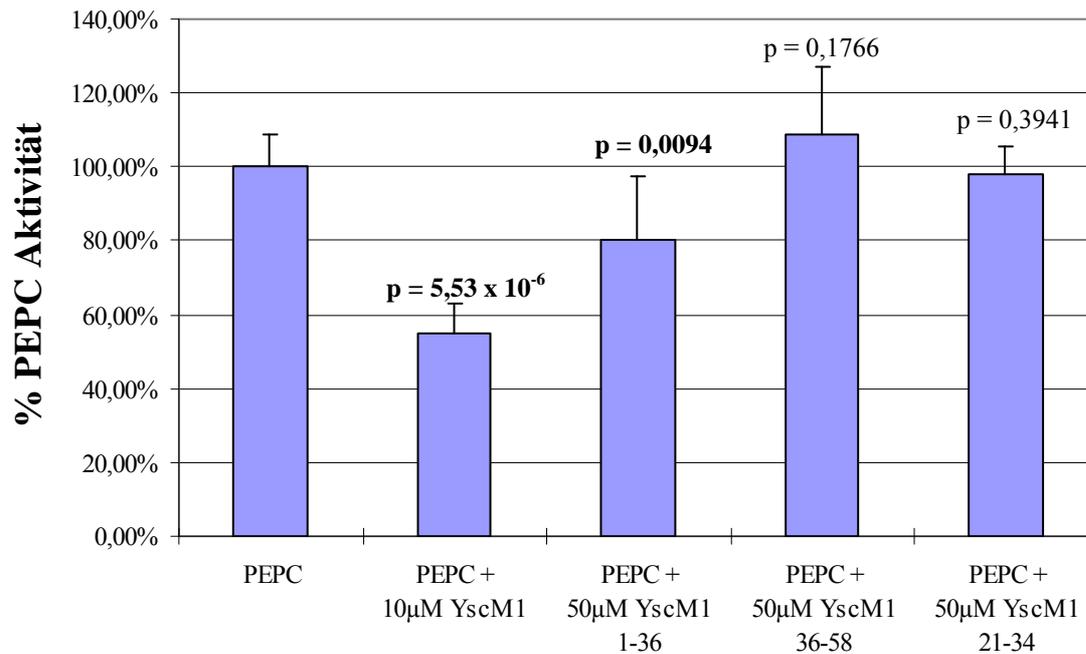


Abbildung 36: Einfluss der N-terminalen Peptide auf die Enzymaktivität der PEPC.

Es wurden jeweils 50 µM des entsprechenden Peptids bzw. als Kontrolle 10 µM YscM1 zu 100 nM PEPC (bezogen auf das Monomer) gegeben und nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C die Oxidation von NADH gemessen. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 60 sek in 2-Sekundenschritten. Jeweils vier unabhängige Messungen wurden durchgeführt und die daraus resultierenden Steigungen als Maß für die PEPC Aktivität gemittelt. Die Aktivität von 1 µg PEPC im Assay (100 nM PEPC) wurde als 100 % PEPC Aktivität definiert. Die Umsatzrate von NADH in Anwesenheit der YscM1 Peptide wurde in Bezug zu diesem Wert gesetzt. Die Signifikanz p ist für alle Messungen angegeben. Fehlerbalken: ± Standardabweichung.

C.7.3 YscM1 wirkt als Antagonist des allosterischen Aktivators Acetyl-CoA

Nun sollte überprüft werden, ob YscM1 als Antagonist des starken allosterischen Aktivators Acetyl-CoA wirken kann, das einen wichtigen Knotenpunkt des bakteriellen Stoffwechsels darstellt. Dieses Koenzym war von besonderem Interesse, da es aufgrund einer hohen Biosyntheseleistung der Zelle zu einem Mangel an Oxalacetat im Citratzyklus und damit zu einem Überschuss an Acetyl-CoA kommt. Dies führt wiederum zur Aktivierung der PEPC Reaktion, um Oxalacetat zu regenerieren. 50 µM Acetyl-CoA auf 100 nM PEPC führen zu einer Verdopplung der PEPC Aktivität (Abbildung 37). Die Zugabe steigender Mengen YscM1 zu konstanten 100 nM PEPC und 50 µM Acetyl-CoA führt zu einer kontinuierlichen Abnahme der stimulierenden Wirkung von Acetyl-CoA (Abbildung 37). Bei Zugabe von 10 µM YscM1 wird die stimulierende Wirkung von Acetyl-CoA bereits völlig kompensiert obwohl Acetyl-CoA im Überschuss vorliegt. Die Aktivität der PEPC liegt trotz der Anwesenheit des Aktivators bei etwa 100 %, was der Aktivität ohne Zugabe von Acetyl-CoA entspricht. Bei Zugabe von 20 µM YscM1 wird die PEPC Aktivität auf 60 % der Anfangsaktivität reduziert (Abbildung 37). Denkbar wäre, dass YscM1 Acetyl-CoA hydrolysiert oder die PEPC acetyliert und dadurch dem aktivierenden Effekt entgegenwirkt. Es konnte jedoch weder ein irreversibler Einfluss von YscM1 auf

Acetyl-CoA durch Hydrolyse noch eine Acetylierung der PEPC nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Daher ist davon auszugehen, dass YscM1 als Antagonist von Acetyl-CoA wirkt. Ein möglicher Einfluss von YscM2 als Antagonist von Acetyl-CoA wurde ebenfalls überprüft, es konnte aber keine Veränderung der PEPC Aktivität nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

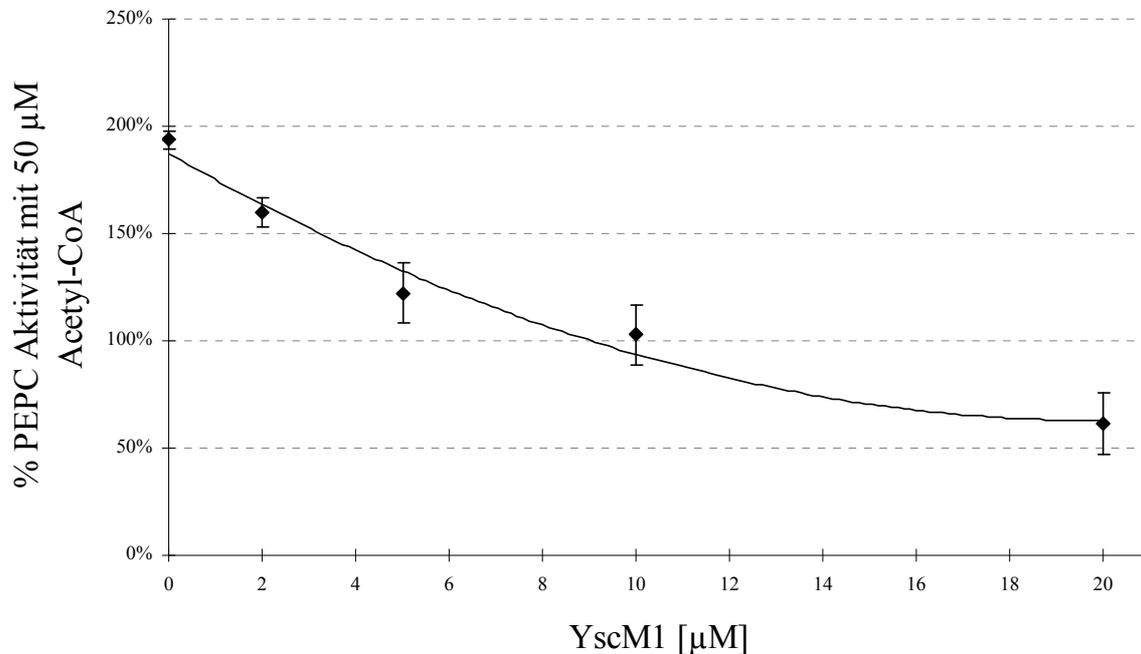


Abbildung 37: YscM1 wirkt als Antagonist zum allosterischen Aktivator Acetyl-CoA.

Steigende Mengen YscM1 (0-20 µM) wurden zu 100 nM PEPC (bezogen auf das Monomer) und 50 µM Acetyl-CoA gegeben und nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C die Oxidation von NADH gemessen. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 60 sek in 2-Sekundenschritten. Jeweils vier unabhängige Messungen wurden durchgeführt und die daraus resultierenden Steigungen als Maß für die PEPC Aktivität gemittelt. Die Aktivität von 1 µg PEPC im Assay (100 nM PEPC) wurde als 100 % PEPC Aktivität definiert. Die Umsatzrate von NADH in Anwesenheit von Acetyl-CoA und steigenden Konzentrationen YscM1 wurde in Bezug zu diesem Wert gesetzt. Fehlerbalken: ± Standardabweichung.

C.7.4 Einfluss der Chaperone der Typ III Sekretion auf die Enzymaktivität der PEPC

Inzwischen kann fast allen Chaperonen der Typ III Sekretion eine Bedeutung bei der Regulation der Typ III Sekretion zugeordnet werden. Außerdem konnte von vielen der Chaperone gezeigt werden, dass sie mit den Regulatoren YscM1 und YscM2 *in vitro* interagieren (Swietnicki *et al.* 2004; Schmid *et al.* 2006; Dittmann *et al.* 2007). Das veranlasste uns zunächst die Chaperone SycE, SycD, SycH, SycO und SycT auf einen direkten Einfluss auf die PEPC Aktivität zu überprüfen (Abbildung 38). Allerdings wurde unter den gewählten Reaktionsbedingungen für keines der Chaperone ein signifikanter Einfluss auf die Aktivität der PEPC festgestellt (Abbildung 38). Auffällig ist aber, dass SycO im Gegensatz zu den anderen vier getesteten Chaperonen tendenziell eine Stimulation der PEPC Aktivität zur Folge hat. Hier wären möglicherweise weitere Untersuchungen interessant, zumal sich bei der Überprüfung der Signifikanz dieser Abweichung immer vergleichsweise geringe p-Werte um 0,06 ergaben. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Vorinkubation von YscM1 mit SycE, SycD, SycO, SycT

bzw. SycH einen Einfluss auf die Inhibition der PEPC durch YscM1 hat (Abbildung 39), da von allen Syc Proteinen mit Ausnahme von SycT eine Interaktion mit YscM1 beschrieben wurde (Swietnicki *et al.* 2004; Schmid *et al.* 2006; Dittmann *et al.* 2007). Zu diesem Zweck wurden die Syc Proteine jeweils 1:1 mit YscM1 gemischt und 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wurde analog zu den zuvor beschriebenen Enzymassays verfahren. Weder die Vorinkubation von YscM1 mit SycE noch mit SycD oder SycT hatte einen signifikanten Einfluss auf die Inhibition der PEPC durch YscM1 (Abbildung 39). Lediglich in Anwesenheit von SycO wurde die PEPC Inhibition durch YscM1 aufgehoben (Abbildung 39). Dieser neutralisierende Effekt von SycO auf YscM1 wird nicht beobachtet, wenn SycO, YscM1 und die PEPC gleichzeitig zusammengegeben werden (nicht gezeigt). Offensichtlich führt erst die SycO-SycM1-Komplexbildung zur Neutralisierung von YscM1. Konsistent mit diesem Ergebnis sind die Komplexbildungsnachweise im Nativgel: Stabile Komplexe konnten nur mit YscM1 und SycO (C.3.2) nicht aber mit YscM1 und SycE, SycD bzw. SycT (nicht gezeigt) nachgewiesen werden.

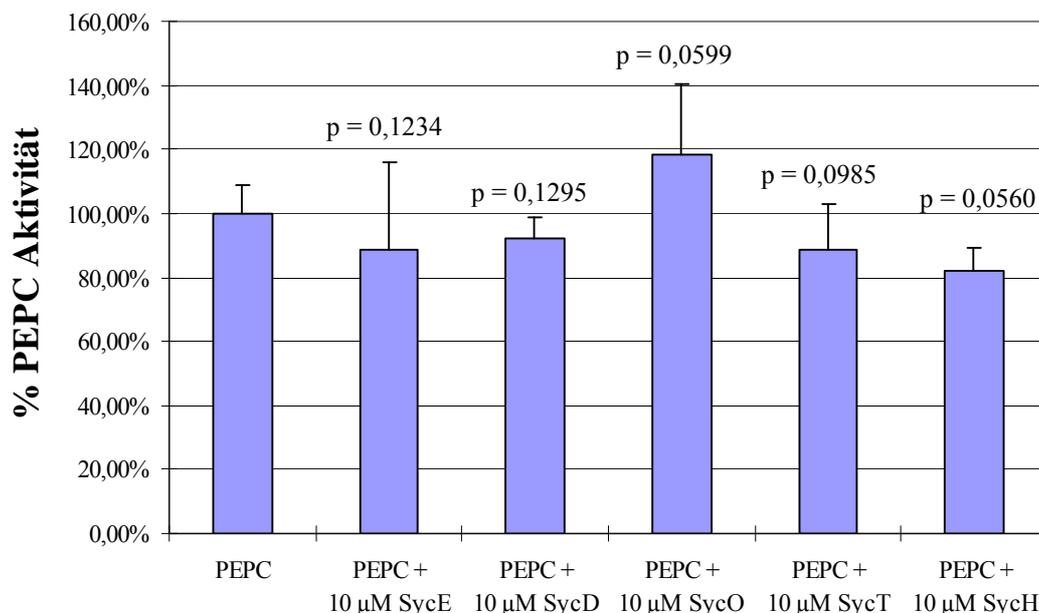


Abbildung 38: Einfluss der Syc Chaperone auf die Enzymaktivität der PEPC.

10 µM SycE, SycD, SycO, SycT und SycH wurden zu 100 nM PEPC (bezogen auf das Monomer) gegeben und nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C die Oxidation von NADH gemessen. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 60 sek in 2-Sekundenschritten. Jeweils vier unabhängige Messungen wurden durchgeführt und die daraus resultierenden Steigungen als Maß für die PEPC Aktivität gemittelt. Die Aktivität von 1 µg PEPC im Assay (100 nM PEPC) wurde als 100 % PEPC Aktivität definiert. Die Umsatzrate von NADH in Anwesenheit der Syc Chaperone wurde in Bezug zu diesem Wert gesetzt. Die Signifikanz p ist für alle Messungen angegeben. Fehlerbalken. ± Standardabweichung.

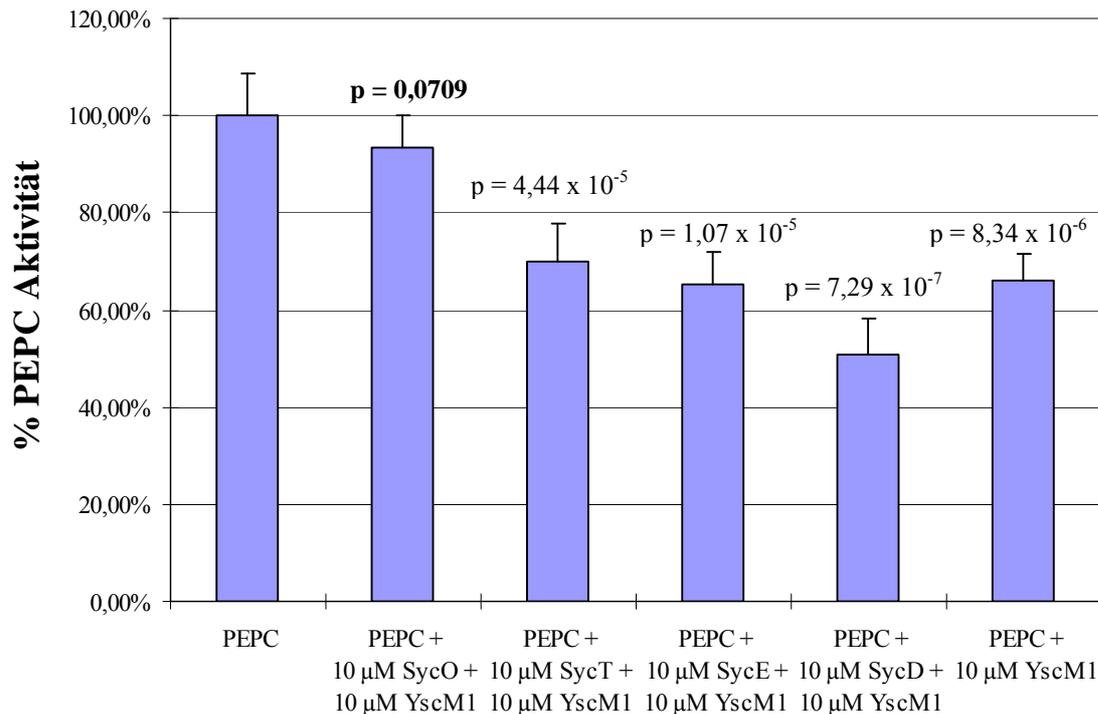


Abbildung 39: Einfluss der Syc Chaperone in Anwesenheit von YscM1 auf die Enzymaktivität der PEPC.

10 µM SycE, SycD, SycO, SycT, SycH wurden jeweils 5 min bei 22°C mit 10 µM YscM1 inkubiert, das Gemisch dann zu 100 nM PEPC (bezogen auf das Monomer) gegeben und nach einer weiteren 5-minütigen Inkubation bei 37°C die Oxidation von NADH gemessen. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 60 sek in 2-Sekundenschritten. Jeweils vier unabhängige Messungen wurden durchgeführt und die daraus resultierenden Steigungen als Maß für die PEPC Aktivität gemittelt. Die Aktivität von 1 µg PEPC im Assay (100 nM PEPC) wurde als 100 % PEPC Aktivität definiert. Die Umsatzrate von NADH in Anwesenheit von 10 µM YscM1 und 10 µM des jeweiligen Syc Chaperons wurde in Bezug zu diesem Wert gesetzt. Die Signifikanz p ist für alle Messungen angegeben. Fehlerbalken. ± Standardabweichung.

C.7.5 PEPC-abhängiges Wachstum von *Yersinia enterocolitica*

Um neben *in vitro* Versuchen den Einfluss von YscM1 auf die PEPC *in vivo* zu untersuchen, wurde eine WA-314Δ*ppc* Mutante generiert (Tabelle 3). Diese Mutante wurde für Wachstumsversuche in M9-Medium eingesetzt, um Bedingungen für ein PEPC-abhängiges Wachstum herauszufinden. Zu diesem Zweck wurde M9-Medium mit unterschiedlichen Mengen an Casamino säuren supplementiert und das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp WA-314 protokolliert. Die Startkonzentration der Kulturen wurde auf $0,75 \times 10^8$ cfu/ml eingestellt. Bei einer Supplementierung mit 0,02 % Casamino säuren erfolgt ein zum Wildtyp WA-314 vergleichbares Wachstum (nicht gezeigt), während 0,01 % Casamino säuren zum Erliegen des Wachstums der *ppc* Mutante führen (Abbildung 40). Um sicherzustellen, dass die Wachstumsinhibition auf das Fehlen der PEPC zurückzuführen ist, wurde die Mutante WA-314Δ*ppc* mit dem Plasmid pACYC-*ppc* komplementiert, das das PEPC-kodierende Gen *ppc* unter der Kontrolle seines natürlichen Promotors trägt. Wie in Abbildung 40 zu sehen ist, komplementiert das Plasmid den Wachstumseffekt völlig. Damit wurde M9-Medium mit 1 % Glukose, 0,01 % Casamino säuren und 1 mM Thiamin supplementiert als eine Kulturbedingung definiert, unter der PEPC-

abhängiges Wachstum erfolgt. Das entsprechende Medium wird im Folgenden als Δ PEPC-Medium bezeichnet. Die Expression der PEPC im Stamm WA-314 Δ *ppc*[pACYC-*ppc*] wurde nach 7 h mittels Immunoblot überprüft (Abbildung 41). Die Expression der PEPC ist in den komplementierten Stämmen erwartungsgemäß etwas höher als im Wildtyp WA-314, da das pACYC184 Plasmid in etwa zwanzig Kopien pro Zelle vorliegt (Chang & Cohen 1978).

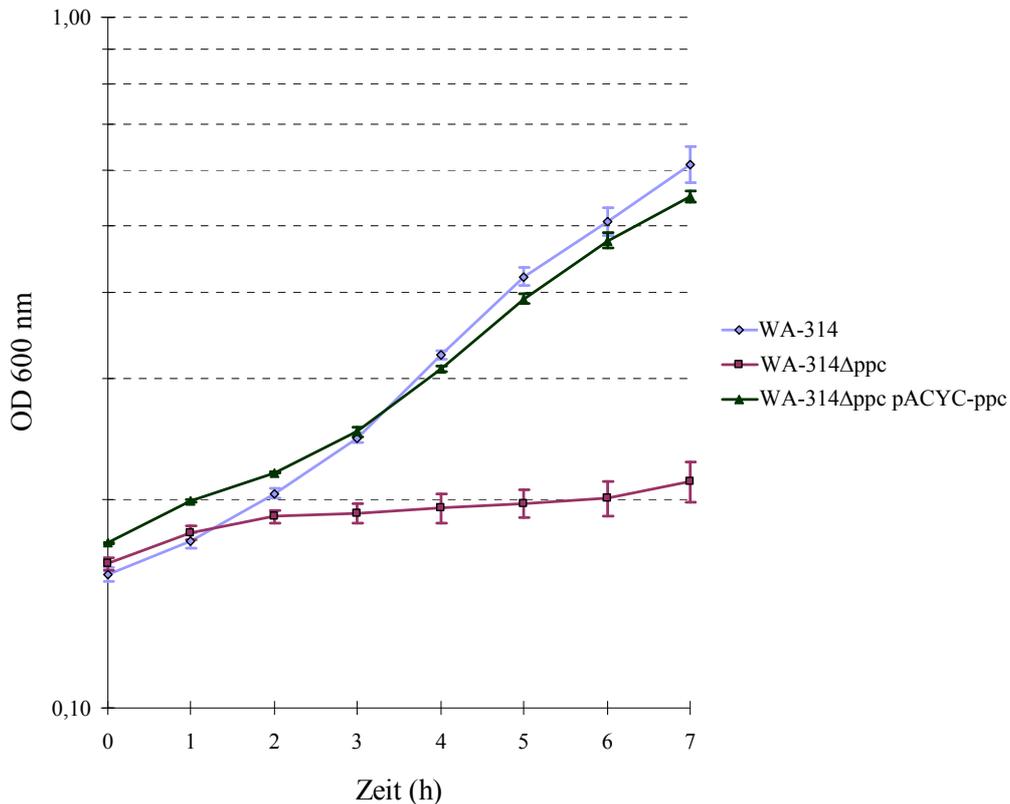


Abbildung 40: Komplementation der Mutante WA-314 Δ *ppc*.

Das Wachstum von WA-314, WA-314 Δ *ppc* und WA-314 Δ *ppc*[pACYC-*ppc*] erfolgte in M9-Medium mit 1 % Glukose, 1 mM Thiamin und 0,01 % Casaminosäuren supplementiert bei 27°C. Die Expression des PEPC-kodierenden Gens *ppc* im Plasmid pACAY-*ppc* erfolgt unter der Kontrolle des natürlichen Promotors. Die OD wurde in Abständen von einer Stunde bei 600nm bestimmt. Drei Datenreihen von unabhängigen Kulturen wurden gemittelt aufgetragen. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

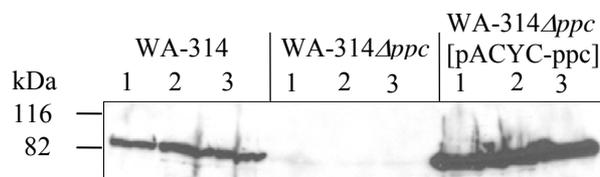


Abbildung 41: Überprüfung der Expression der PEPC in WA-314 Δ *ppc* [pACYC-*ppc*].

Immunoblot mit Antiserum gegen PEPC. Nach 7 h wurde von den drei unabhängigen Parallelkulturen aus dem Wachstumsversuch jeweils eine Probe entnommen und im SDS-Gel mit anschließendem Immunoblot analysiert. PEPC wurde in WA-314 Δ *ppc*[pACYC-*ppc*] in allen drei Klonen exprimiert.

C.7.6 Modulation der Aktivität der PEPC durch YscM1 *in vivo*

Um die Bedeutung von YscM1 und YscM2 *in vivo* zu charakterisieren, wurde *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Plasmiden pWS-yscM1 und pWS-yscM2 (Tabelle 7) transformiert und jeweils drei Klone für einen Wachstumsversuch in Δ PEPC-Medium isoliert. Als Kontrolle diente der Leervektor. Die Startkonzentration der Kulturen wurde auf 1×10^8 cfu/ml eingestellt. Dem Δ PEPC-Medium wurde 1 mM IPTG zur Induktion der Expression von YscM1 und YscM2 zugesetzt. Der Wachstumsversuch wurde bei 27°C durchgeführt, da bei 37°C die Synthese der Virulenzproteine einsetzen würde, also auch die Synthese des endogenen YscM1 und YscM2. Das Wachstum wurde über 7 h jede Stunde protokolliert. In Abbildung 42 ist zu sehen, dass die Überproduktion von YscM1 unter PEPC-abhängigen Bedingungen das Wachstum nahezu komplett inhibiert, während die Überproduktion von YscM2 keinen Einfluss auf das Wachstum hat. Dies bestätigt die Ergebnisse aus dem PEPC Aktivitätsassay, dass YscM1 die Enzymaktivität der PEPC moduliert. Außerdem stellt die Überexpression von YscM2 eine interne Kontrolle dar, dass die Wachstumsinhibition im Stamm WA-314[pWS-yscM1] nicht durch die Überproduktionsbedingungen unter nährstoffarmen Bedingungen zurückzuführen ist. Die Überproduktion von YscM1 und YscM2 in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS liefert dieselben Ergebnisse (Neumayer 2005), so dass ein potentieller Einfluss des pYV Plasmids auf das Verhalten der Yersinien im Wachstumsversuch ausgeschlossen werden kann. Abbildung 43 zeigt, dass sowohl YscM1 als auch YscM2 in den Stämmen, die für den Wachstumsversuch eingesetzt wurden, exprimiert wurde. Die Expression von YscM1 fällt jedoch geringer aus als die von YscM2. Dies zeigt auch, dass bereits geringe Mengen an intrazellulärem YscM1 ausreichen, um den beschriebenen Wachstumseffekt hervorzurufen.

Ähnliche Wachstumsversuche waren von Neumayer (2005) mit N- und C-terminal verkürzten Varianten von YscM1 durchgeführt worden. Während die Überexpression einer N-terminal von Position 2-10 deletierten Variante von YscM1 in Δ PEPC-Medium eine weniger ausgeprägte Wachstumsinhibition zur Folge hatte, führte eine C-terminal ab Position 81 deletierte Variante von YscM1 weiterhin zu einer Inhibition der Vermehrung von *Y. enterocolitica* (Neumayer 2005). Damit konnten die Ergebnisse aus dem Enzymassay mit den YscM1 Peptiden bestätigt werden (C.7.2), dass vor allem der N-Terminus von YscM1 für die inhibitorische Aktivität des Proteins von Bedeutung ist.

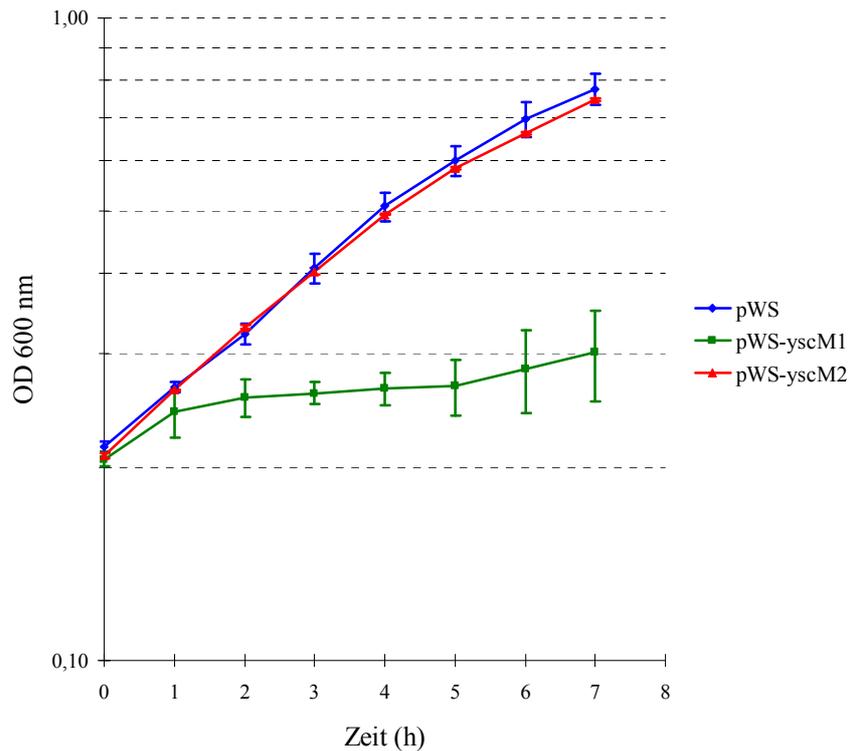


Abbildung 42: Überexpression von YscM1 und YscM2 in *Y. enterocolitica* WA-314.

Das Wachstum von WA-314, WA-314[pWS], WA-314[pWS-yscM1] und WA-314[pWS-yscM2] erfolgte in M9-Medium mit 1 % Glukose, 1 mM Thiamin und 0,01 % Casaminosäuren supplementiert bei 27°C. Die Synthese von YscM1 und YscM2 wurde mit 1 mM IPTG zum Zeitpunkt Null induziert. Die OD wurde in Abständen von einer Stunde bei 600nm bestimmt. Drei Datenreihen von unabhängigen Kulturen wurden gemittelt aufgetragen. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

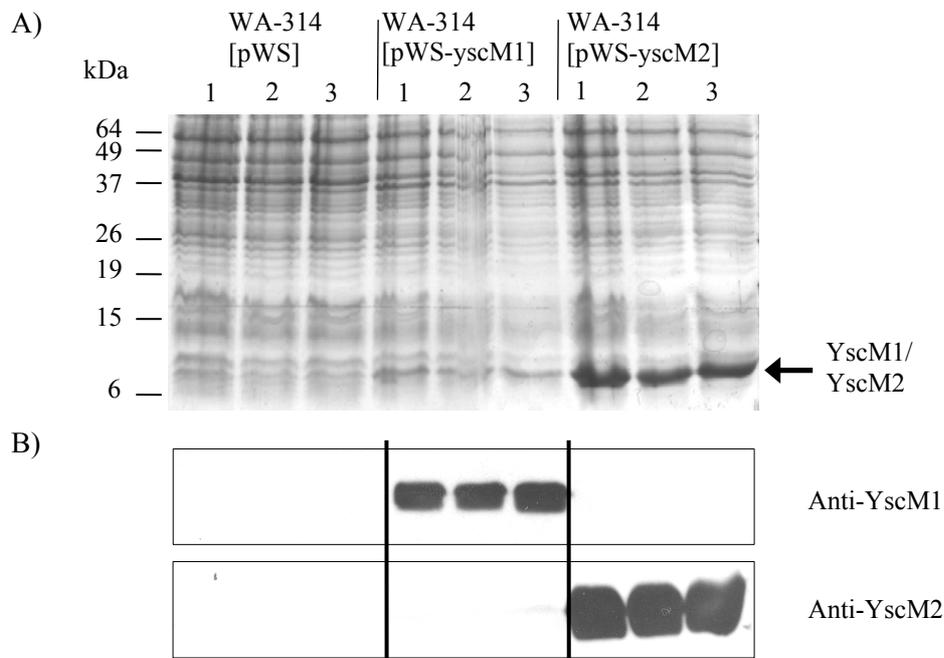


Abbildung 43: Überprüfung der Expression von YscM1 und YscM2.

(A) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. (B) Immunoblots mit Antiserum gegen YscM1 bzw. YscM2. Nach 7 h wurde von den drei unabhängigen Parallelkulturen aus dem Wachstumsversuch jeweils eine Probe entnommen und im SDS-Gel und Immunoblot analysiert. YscM1 und YscM2 wurden nach Induktion exprimiert.

C.7.7 YscM1 und YscM2 führen zu Konformationsänderungen der PEPC

Da vermutet wurde, dass der Einfluss von YscM1 auf die PEPC eine Konformationsänderung des allosterischen Enzyms nach sich zieht, wurden am EMBL in Hamburg in Kooperation mit Manfred Rössle¹² Kleinwinkelstreu(SAXS)-Analysen durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine im Vergleich zu Röntgenkristallographie und NMR niederauflösende Strukturmethode, die aber Aussagen über die Oberflächenform und Partikelgröße von Molekülen in Lösung erlaubt. Da im Nativgel neben der Bindung von YscM1 auch eine Bindung von YscM2 an die PEPC gezeigt werden konnte (Neumayer 2005), sollten mit YscM2 ebenfalls Messungen durchgeführt werden. In Abbildung 44A sind drei verschiedene Ansichten der PEPC, die aus dem Streumuster unter Annahme einer p22-Symmetrie berechnet wurden, dargestellt. Das Ergebnis ist konsistent mit den Kristallstrukturen der PEPC aus *E. coli* und Mais (Kai *et al.* 1999; Matsumura *et al.* 2002). Die PEPC von *E. coli* weist 80 % Aminosäureidentität mit der *Yersinia* PEPC auf. Das PEPC Tetramer wird aus zwei eng miteinander verbundenen Dimeren gebildet, die ihrerseits nur locker miteinander verknüpft sind und eine leichte Drehung relativ zueinander aufweisen. Diese Verdrehung zueinander ist in dem SAXS-basierten Modell der PEPC aus *Y. enterocolitica* ebenfalls zu erkennen (Abbildung 44A, rechte Spalte). Abbildung 44B und Abbildung 44C zeigen die Modelle der PEPC aus *Y. enterocolitica* in Anwesenheit von YscM1 bzw. YscM2. Beide Proteine führen zu deutlichen Konformationsänderungen, die darüber hinaus eindeutig voneinander unterschieden werden können. Sowohl YscM1 als auch YscM2 führen zu einer weniger ausgeprägten Verdrehung der zwei Dimere der PEPC zueinander, so dass das Tetramer insgesamt stärker in einer Ebene liegt (Abbildung 44B und C, rechte Spalte). Die unterschiedlichen Konformationen könnten den leicht zugänglichen, relaxierten „R“- und den schlecht zugänglichen „T“-Zustand repräsentieren, die für allosterisch regulierte Enzyme typisch sind. Da die PEPC als Homotetramer fast 400 kDa ausmacht und die Regulatoren YscM1 und YscM2 als Homodimere jeweils lediglich ca. 26 kDa groß sind, ist aufgrund der Tatsache, dass die Größe des Partikels bei der Berechnung der Streuintensität mit eingeht und kleine Partikel einen wesentlich geringeren Beitrag zur Streuung leisten, eine Aussage über mögliche Bindestellen der Regulatoren an das Enzym nicht möglich. Da auch für YscM2 deutliche Konformationsänderungen gezeigt werden konnten, obwohl im PEPC Enzymassay und im Wachstumsversuch kein Einfluss auf die Aktivität der PEPC nachweisbar war, könnte dies bedeuten, dass bei diesen Versuchen nicht die geeigneten Bedingungen abgedeckt waren, um einen Einfluss darzustellen. Möglicherweise ist die Präsenz eines Kofaktors nötig, um eine Veränderung der Enzymaktivität in Anwesenheit von YscM2 messen zu können. Dies wäre durchaus denkbar, da auch die von Neumayer (2005) angefertigten Nativgele untermauern, dass zwischen YscM2 und der PEPC eine Wechselwirkung erfolgt.

¹²EMBL Hamburg, Notkestraße 85, 22603 Hamburg

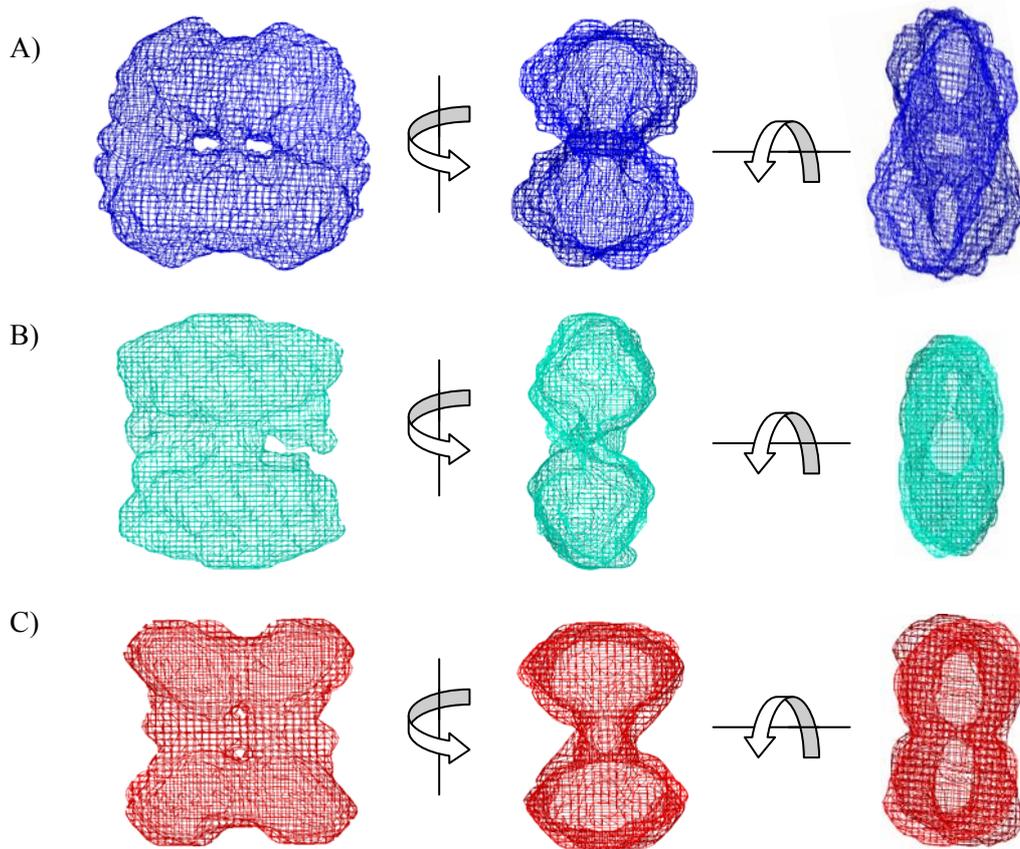


Abbildung 44: YscM1 und YscM2 bewirken Konformationsänderungen der PEPC.

(A) Modell des PEPC Tetramers. Es wurde eine p22-Symmetrie zugrunde gelegt, wie sie von den Kristallstrukturen der PEPC von *E. coli* und Mais bekannt ist. (B) Aus den Streudaten einer PEPC/YscM1-Mischung errechnetes Modell. (C) Aus den Streudaten einer PEPC/YscM2-Mischung errechnetes Modell. Die Berechnung aller Modelle beruht auf Streudaten aus Kleinwinkelstreu-Experimenten. Es sind jeweils drei Ansichten um 90°C rotiert dargestellt.

C.8 Einfluss der PEPC Reaktion auf die Yop-Biosynthese

Um einen Einfluss der anaplerotischen PEPC Reaktion auf die Yop-Biosynthese zu zeigen, sollte zunächst ein geeignetes Medium gefunden werden, in dem zum einen Induktion der Yop-Sekretion möglich ist, aber zum anderen dennoch ein PEPC-abhängiges Wachstum erfolgt. In diesem Medium sollten *Y. enterocolitica* Mutanten in *ppc*, *yscM1* und *yscM2* zunächst auf Unterschiede in der Yop-Sekretion überprüft werden. Um die Bedeutung der PEPC Reaktion *in vivo* unter Bedingungen der Yop-Synthese und -Sekretion zu untersuchen, wurden in einem weiteren Schritt außerdem ^{13}C -Markierungsversuche in diesem Medium mit den *Y. enterocolitica* Stämmen WA-314 und den Mutanten in *ppc*, *yscM1* und *yscM2* angestrebt. Erwartet wurde eine PEPC-abhängige ^{13}C -Markierung über den Glukoseabbau (Abbildung 45). Damit sollte auch die Biosynthese von ^{13}C -markierten Yops PEPC-abhängig sein. Mittels Massenspektrometrie sollten diese ^{13}C -Markierungsunterschiede analysierbar sein. Speziell die *ppc* Mutante ist auf nicht-markierte Aminosäuren der Aspartat- und Glutamat-Familie aus dem Medium angewiesen und sollte daher als Vergleichsstamm für Mutanten in *yscM1* und *yscM2* dienen, um den vermuteten Stoffwechseleffekt in diesen Stämmen besser einordnen zu

können. Falls YscM1 und möglicherweise auch YscM2 die Aminosäuresynthese über die PEPC Reaktion beeinflussen, sollte sich der Ursprung der Aminosäuren, die in den *yscM1* und *yscM2* Mutanten in die Yops eingebaut werden, vom Ursprung der Aminosäuren, die beim Wildtyp WA-314 eingebaut werden, unterscheiden. Besonders sollte dies für die Aminosäuren der Aspartat- und Glutamat-Familie gelten, da diese direkt aus Zwischenprodukten des Citratzyklus synthetisiert werden: Als Vorstufe für die Aspartat-Familie dient Oxalacetat, als Vorstufe für die Glutamat-Familie α -Ketoglutarat (Abbildung 45). Durch eine ^{13}C -Markierung sollten daher die sekretierten Yops der *ppc*, *yscM1* und *yscM2* Mutanten in der Massenspektrometrie vom Wildtyp WA-314 unterschieden werden können.

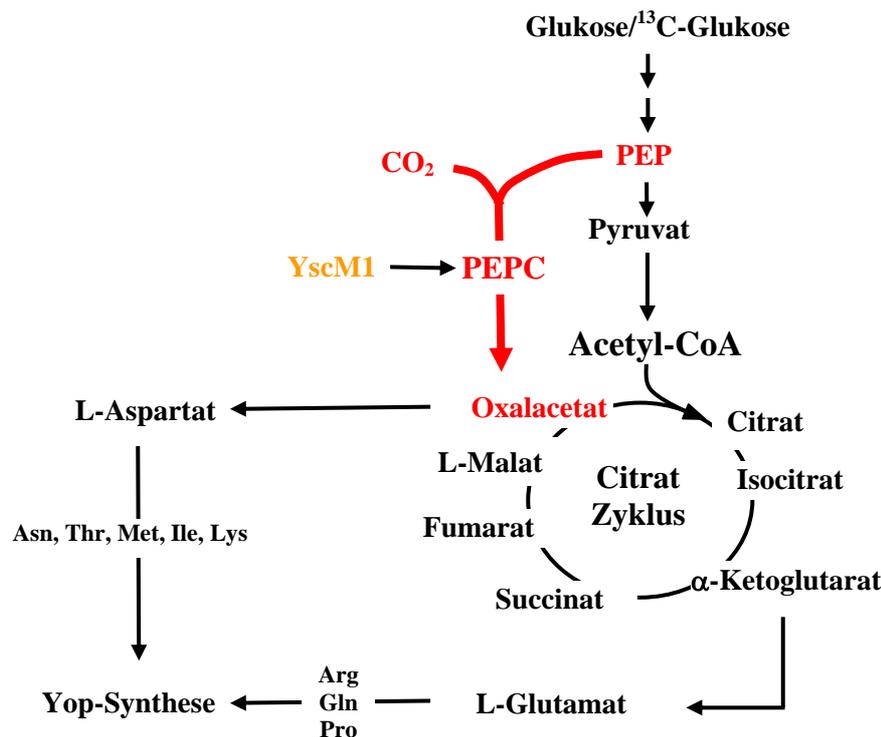


Abbildung 45: Die anaplerotische PEPC Reaktion im Kontext des bakteriellen Stoffwechsels.

Die PEPC katalysiert eine anaplerotische Reaktion, die dafür sorgt, dass genügend Oxalacetat als Akzeptor für Acetyl-CoA zur Verfügung steht. Bei Zugabe von ^{13}C -markierter Glukose lassen sich die ^{13}C -Einheiten in den Aminosäuren und damit in den daraus synthetisierten Proteinen wie den Yop-Effektoren mittels Massenspektrometrie oder NMR nachweisen. Die PEPC Reaktion ist rot dargestellt.

C.8.1 Analyse der Yop-Sekretion von *Yersinia enterocolitica* Mutanten in *ppc*, *yscM1* und *yscM2* in verschiedenen Medien

Obwohl in ΔPEPC -Medium Wachstumsunterschiede zwischen dem Wildtyp WA-314 und den *ppc*, *yscM1* und *yscM2* Mutanten nachweisbar sind, lassen sich keine Unterschiede in der Yop-Sekretion darstellen, da stringente Nährstoffbedingungen bei 37°C zum Erliegen des Wachstums der *ppc* Mutante führen und damit keine nachweisbare Yop-Sekretion zur Folge haben. Daher sollte ein Medium identifiziert werden, das das Wachstum aller Stämme erlaubt, aber dennoch Unterschiede in der Yop-Sekretion hervorruft. Zu diesem Zweck wurden unterschiedlich supplementierte nährstoffarme Medien

und auch Zellkulturmedien getestet, da zusätzlich Infektionsversuche geplant waren. In den getesteten Medien wurden die Stämme für zwei Stunden bei 37°C mit 0,2 mM CaCl₂ kultiviert und dann für weitere zwei Stunden bei 37°C die Yop-Sekretion durch Chelatierung des Calciums induziert. Anschließend wurden die Yops aus dem Kulturüberstand mittels TCA gefällt und mittels SDS-PAGE analysiert. Wie in Abbildung 46 gezeigt, erwies sich das F12-Zellkulturmedium als geeignet. Die Yop-Sekretion ist nach zwei Stunden von allen Stämmen in F12 schwächer als in BHI (Abbildung 46, vgl. A u. B) und darüber hinaus zeigen sich deutliche Unterschiede in der Menge sekretierter Yops zwischen den *Y. enterocolitica* Stämmen. Während sich die *yscM1* Mutante wie der Wildtyp verhält, ist die Yop-Sekretion in der *ppc* und *yscM2* Mutante stark abgeschwächt (Abbildung 46B, vgl. Spur 1 u.3 mit Spur 2 u.4). Dies bestätigt sich auch im Immunoblot mit Antiseren gegen YopE und YopP, wobei YopP in der *ppc* Mutante sogar im Immunoblot nicht detektiert werden konnte. Des Weiteren zeigten sich in F12 ebenfalls leichte Wachstumsunterschiede, da das Wachstum der *ppc* Mutante im Vergleich zu den anderen Stämmen geringfügig schwächer war (nicht gezeigt). Dies lässt eine PEPC-Abhängigkeit des Wachstums vermuten.

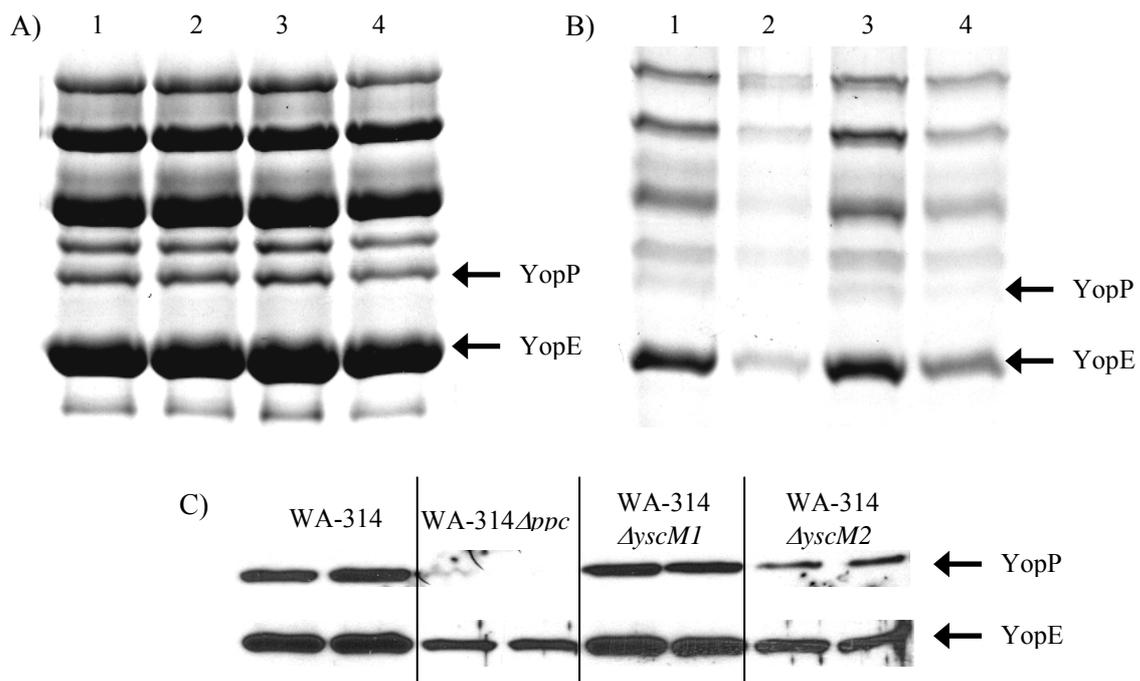


Abbildung 46: Abhängigkeit der Yop-Sekretion durch die Mutanten vom Kulturmedium.

(A) Yop-Sekretion in BHI. B) Yop-Sekretion in F12-Medium. (C) Immunoblots der Yop-Sekretion in F12-Medium mit Antiserum gegen YopE und YopP. Spur 1: Wildtyp WA-314; Spur 2: WA-314 Δ *ppc*; Spur 3: WA-314 Δ *yscM1*; Spur 4: WA-314 Δ *yscM2*. Von allen Proben wurde die gleiche Menge bezogen auf die OD_{600nm} der Kultur 2 h nach Induktion der Yop-Sekretion eingesetzt. SDS-Gele wurden mit Coomassie gefärbt.

C.8.2 ^{13}C -Markierungsversuche deuten auf einen Einfluss der anaplerotischen PEPC Reaktion auf die Yop-Biosynthese hin

Um die Bedeutung der anaplerotischen PEPC Reaktion *in vivo* unter Bedingungen der Yop-Synthese und -Sekretion zu untersuchen, wurden ^{13}C -Markierungsversuche mit den *Y. enterocolitica* Stämmen WA-314, WA-314 Δppc , WA-314 $\Delta yscM1$ und WA-314 $\Delta yscM2$ durchgeführt. Falls YscM1 und YscM2 die Aminosäuresynthese über die PEPC Reaktion beeinflussen, würde sich der Ursprung der Aminosäuren der Aspartat- und Glutamat-Familie, die in den *yscM1* und *yscM2* Mutanten in die Yops eingebaut werden, vom Ursprung der Aminosäuren, die beim Wildtyp WA-314 eingebaut werden, unterscheiden. Speziell die *ppc* Mutante ist aufgrund des indirekten Einflusses der Mutation in dem Gen für das Stoffwechsellzym PEPC auf die Aminosäurebiosynthese der Aspartat- und Glutamat-Familie auf nicht-markierte Aminosäuren aus dem Medium angewiesen. Zunächst sollte in NMR-Experimenten¹³ die ^{13}C -Verteilung im Aminosäurepool der Zelle analysiert werden, um die vermuteten Unterschiede zwischen den *Y. enterocolitica* Stämmen WA-314, WA-314 Δppc , WA-314 $\Delta yscM1$ und WA-314 $\Delta yscM2$ zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurden alle Stämme in 5.000 ml F12-Medium supplementiert mit ^{13}C -markierter Glukose und 0,2 mM CaCl_2 mit einer Start- $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,3 beimpft und bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,5 bei 37°C kultiviert. Dann wurde die Yop-Sekretion für zwei Stunden bei 37°C induziert. Anschließend wurden die Kulturen zentrifugiert, die Bakterien sedimentiert, lyophilisiert und die intrazellulären Aminosäuren mittels NMR untersucht. Mit dieser Analyse konnte bestätigt werden, dass die *ppc* Mutante die meisten Aminosäuren der Aspartat- und Glutamat-Familie nicht mehr selbst synthetisieren kann. In Abbildung 47 ist zu sehen, dass beispielsweise Aspartat von der *ppc* Mutante aus dem Medium aufgenommen und nicht selbst synthetisiert wird, da keine ^{13}C -Markierung nachgewiesen werden kann. Dies gilt auch für Lysin und etwas weniger deutlich ausgeprägt für Isoleucin. Die *yscM1* und *yscM2* Mutanten zeigen keine derart ausgeprägten Veränderungen, sondern einen intermediären Phänotyp zwischen dem Wildtyp und der *ppc* Mutante. Außerdem ergeben sich auch zwischen den beiden Mutanten Unterschiede wie beispielsweise bei Prolin. Die Ursache dafür könnte ein unterschiedlicher Einfluss von YscM1 und YscM2 auf den Stoffwechsel sein. Insgesamt sind aber weitere vertiefte Analysen aller Mutanten notwendig, um zu klären, aus welchen Biosynthesewegen die einzelnen Kohlenstoffgruppen der Aminosäuren stammen und damit detailliertere Aussagen über Eingriffe in den Metabolismus treffen zu können.

¹³Kooperation mit Wolfgang Eisenreich, Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching

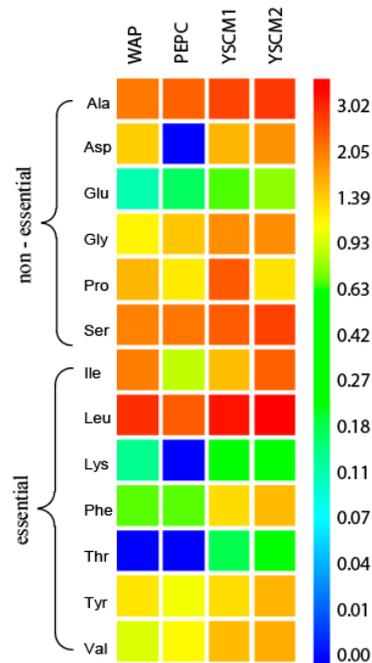


Abbildung 47: Anreicherung von ^{13}C in aus *Y. enterocolitica* gewonnenen Aminosäuren.

Yersinia WA-314 (WAP), WA-314 Δppc (PEPC), WA-314 $\Delta yscM1$ (YSCM1) und WA-314 $\Delta yscM2$ (YSCM2) Kulturen wurden über Nacht in BHI angezogen. Am darauffolgenden Tag wurden die Kulturen in F12-Medium supplementiert mit 2 % ^{13}C -markierter Glukose und 0,2 mM CaCl_2 bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,5 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Yop-Sekretion induziert und nach weiteren 2 h die Kulturen pelletiert und lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden einer vollständigen Hydrolyse zur Gewinnung der Aminosäuren unterzogen und die Präparationen der NMR-Analyse und Massenspektrometrie zugeführt, um die Verteilung an markierten Aminosäuren in den verschiedenen Stämmen zu vergleichen.

Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass durch eine ^{13}C -Markierung auch eine Unterscheidung der sekretierten Yops zwischen den Mutanten in der Massenspektrometrie möglich sein sollte. Speziell in der *ppc* Mutante, die auf nicht-markierte Aminosäuren der Aspartat- und Glutamat-Familie aus dem Medium angewiesen ist, sollten die in der Massenspektrometrie analysierten Yop-Peptide eine geringere Masse aufweisen als die des Wildtyps. Zu diesem Zweck wurden die *Y. enterocolitica* Stämme WA-314, WA-314 Δppc , WA-314 $\Delta yscM1$ und WA-314 $\Delta yscM2$ in F12 supplementiert mit 2 % ^{13}C -markierter Glukose bei 37°C kultiviert, nach zwei Stunden die Yop-Sekretion induziert, die sekretierten Yops im SDS-Gel aufgetrennt und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie¹⁴ analysiert. Die Supplementierung des F12-Mediums mit ^{13}C -markierter Glukose führt zunächst zu einer Verbreiterung der Massenspektren der einzelnen Fragmente (Abbildung 48 u. Abbildung 49, vgl. jeweils A u. B). Dies liegt unter anderem daran, dass sowohl Aminosäuren aus dem Medium aufgenommen werden, die dann aus ^{12}C -Isotopen aufgebaut sind, oder Aminosäuren alternativ aus ^{13}C -markierter Glukose neu synthetisiert werden. Außerdem spielt neben Vorläufern aus anderen Stoffwechselwegen auch die Fähigkeit der PEPC, Kohlenstoffdioxid zu fixieren, eine Rolle. Die Proteine werden also aus nicht-markierten und voll-markierten Aminosäuren synthetisiert, wodurch sich die Spektren verbreitern und zu höheren Masse/Ladungsverhältnissen verschieben. Für die massenspektrometrische Ana-

¹⁴Ludwig-Maximilians-Universität München, Zentrallabor für Proteinanalytik, Schillerstraße 44, 80336 München

lyse wurden YopM (Abbildung 48), YopE (Abbildung 49) und YopH (nicht gezeigt) ausgewählt, da sie in ausreichender Menge sekretiert werden, so dass sie aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF analysiert werden konnten. Wie erwartet war es möglich die *ppc* Mutante auf Grundlage der erhaltenen Yop-Fragmente vom Wildtyp WA-314 zu unterscheiden. Die Masse/Ladungsverhältnisse der Yop-Peptide waren wesentlich niedriger als die des Wildtyps (Abbildung 48 u. Abbildung 49, vgl. jeweils B u. C). Dies bestätigt, dass die Aufnahme von nicht-markierten Aminosäuren aus dem F12-Medium den Biosynthesedefekt der PEPC in der *ppc* Mutante kompensiert, während der Wildtyp die Aminosäuren aus ^{13}C -markierter Glukose synthetisieren kann. Entsprechende Ergebnisse liefert die Analyse von YopH-Fragmenten (nicht gezeigt). Diese Daten zeigen außerdem, dass die PEPC Aktivität über die Aminosäurebiosynthese die Yop-Synthese beeinflusst.

Für die Analyse der *yscM1* und *yscM2* Mutanten wurde der Stamm WA-C mit pYV Plasmiden, die eine entsprechende Deletionen in *yscM1* oder *yscM2* tragen, frisch transformiert. Das ^{13}C -Markierungsexperiment wurde wie oben beschrieben durchgeführt und Peptidfragmente von YopM (Abbildung 48D u. E), YopE (Abbildung 49D u. E) und YopH (nicht gezeigt) massenspektrometrisch analysiert. Die Spektren der *yscM1* und *yscM2* Mutanten lassen sich eindeutig sowohl von denen des Wildtyps als auch denen der *ppc* Mutante unterscheiden (Abbildung 48 u. Abbildung 49, vgl. jeweils B u. C mit D u. E). Alle Spektren wurden ebenfalls zu niedrigeren Masse/Ladungsverhältnissen verschoben, jedoch weniger ausgeprägt als in der *ppc* Mutante. Allerdings sehen sich die Spektren der beiden Mutanten wider Erwarten sehr ähnlich. Obwohl im Enzymassay kein Einfluss von YscM2 auf die PEPC Aktivität messbar war, lassen diese *in vivo* Ergebnisse vermuten, dass sowohl YscM1 als auch YscM2 einen Einfluss auf die PEPC Aktivität hat.

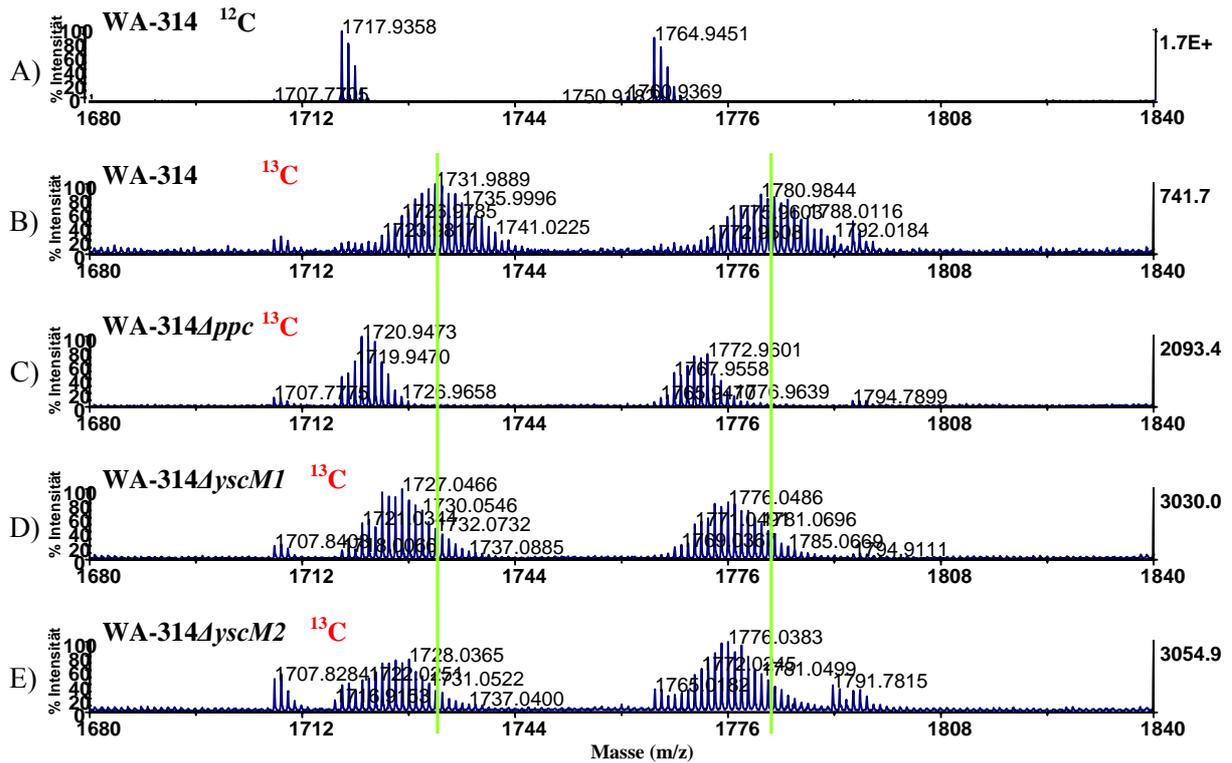


Abbildung 48: MALDI-TOF Analyse von Peptiden von sekretiertem YopM.

Yersinia WA-314, WA-314 Δ ppc, WA-314 Δ yscM1 und WA-314 Δ yscM2 wurden über Nacht in BHI angezogen. Am darauffolgenden Tag wurden die Kulturen in F12 supplementiert mit 2 % nicht-markierter oder ^{13}C -markierter Glukose und 0,2 mM CaCl_2 für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Yop-Sekretion induziert und nach weiteren 2 h die sekretierten Yops aus dem Kulturüberstand gefällt. Die Yops wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die mit YopM korrespondierende Bande ausgeschnitten und durch MALDI-TOF analysiert. (A) Spektrum des Wildtyps WA-314 mit nicht-markierter Glukose; (B) Spektrum des Wildtyps WA-314 mit ^{13}C -markierter Glukose; (C)-(E) Spektren der angegebenen Mutanten mit ^{13}C -markierter Glukose. Um die Verschiebung der Peptidspektren in den Mutanten zu verdeutlichen, markieren die grünen Striche die Mitte des Spektrums der Peptidfragmente im Wildtyp WA-314 ^{13}C .

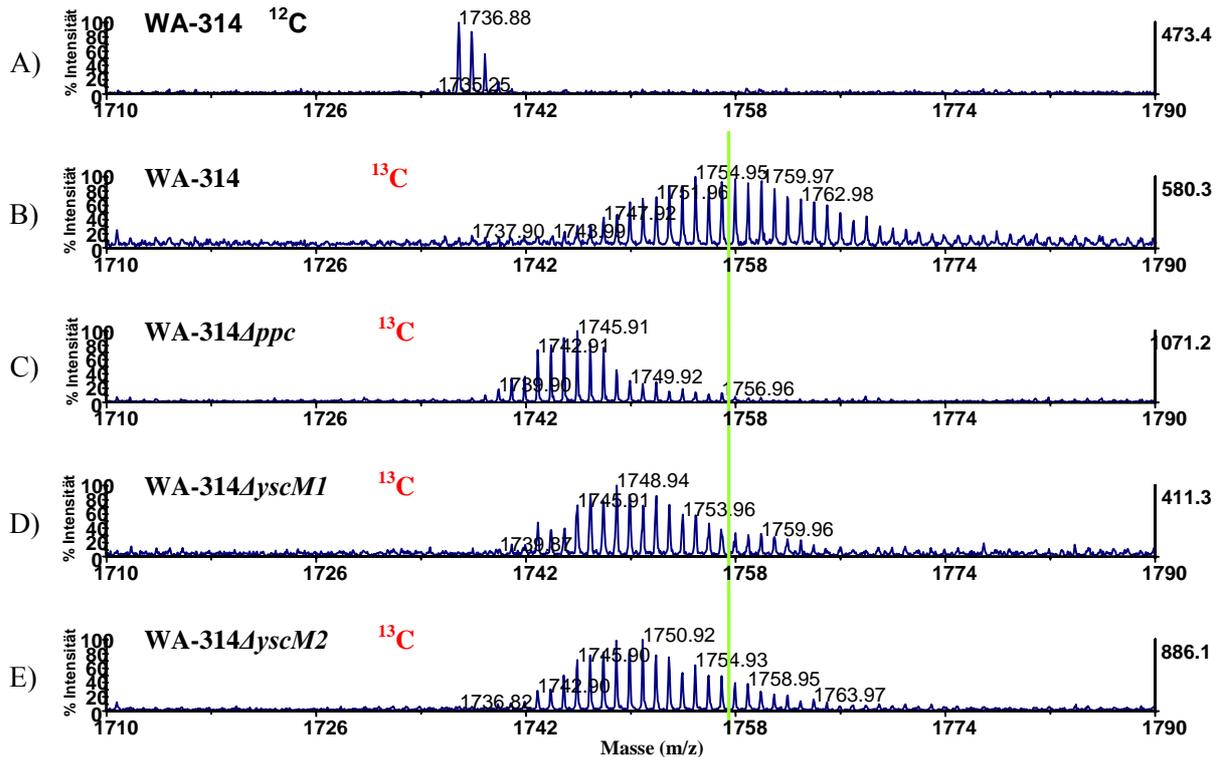


Abbildung 49: MALDI-TOF Analyse eines Peptids von sekretiertem YopE.

Das Vorgehen entsprach dem unter Abbildung 48 für YopM, mit dem einzigen Unterschied, dass nach Auftrennung der Yops mittels SDS-PAGE, die mit YopE korrespondierende Bande ausgeschnitten und durch MALDI-TOF analysiert wurde. (A) Spektrum des Wildtyps WA-314 mit nicht-markierter Glukose; (B) Spektrum des Wildtyps WA-314 mit ¹³C-markierter Glukose; (C)-(E) Spektren der angegebenen Mutanten mit ¹³C-markierter Glukose. Um die Verschiebung der Peptidspektren in den Mutanten zu verdeutlichen, markiert der grüne Strich die Mitte des Spektrums des Peptidfragments im Wildtyp WA-314 ¹³C.

C.9 Einfluss der Modulation der PEPC durch YscM1 während der Infektion

Da YscM1 und YscM2 als Regulatoren der Yop-Synthese und -Sekretion bekannt sind, legt die Interaktion der Proteine mit einem Stoffwechsellenzym die Vermutung nahe, dass Yersinien auf diese Art den Stoffwechsel an die veränderten Bedingungen während der Yop-Synthese und -Sekretion anpassen. Diese Modulation könnte für die Wachstumsinhibition mit verantwortlich sein, der Yersinien bei 37°C unter Yop-Expressionsbedingungen und -Sekretionsbedingungen unterliegen (Higuchi *et al.* 1959). Daher sollte ein möglicher Einfluss der PEPC auf die Pathogenität überprüft werden.

C.9.1 Einfluss der Modulation der PEPC Aktivität bei der Infektion von J774-Makrophagen

Da zwischen dem Wildtyp und den *ppc*, *yscM1* und *yscM2* Mutanten in F12-Medium Unterschiede in der Yop-Sekretion zu beobachten sind, sollte dieses Medium für einen Infektionsversuch mit J774-Makrophagen eingesetzt werden. Da YopP von der *ppc* Mutante in F12 in kaum nachweisbaren Mengen sekretiert wird (Abbildung 46), sollte der Einfluss speziell dieses Yops auf Zellen protokolliert werden. YopP ist eine Acetyltransferase (Mukherjee *et al.* 2006), die in Makrophagen den natürlichen Zelltod induziert (Monack *et al.* 1997; Mills *et al.* 1997). Daher sollte die Apoptoserate von Makrophagen nach Infektion mit den Mutanten bestimmt werden, um Unterschiede in der Pathogenität der Stämme nachzuweisen und damit die Bedeutung der PEPC während der Infektion zu bestimmen.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen in parallelen Ansätzen mit den *Y. enterocolitica* Stämmen WA-314, WA-314 Δ *ppc*, WA-314 Δ *yscM1* und WA-314 Δ *yscM2* in F12 infiziert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit erfolgt die Translokation der Effektorproteine ins Zytoplasma der Wirtszellen. Anschließend wurden die Bakterien mit Gentamicin abgetötet und die J774-Makrophagen weiterhin bei 37°C inkubiert, damit YopP seine Funktion in der Wirtszelle über den Inkubationszeitraum weiter ausüben kann. 1,5 Stunden nach Infektion wurde vom Wildtyp und jeder Mutante das erste Präparat mikroskopiert, um den Anteil apoptotischer Zellen zu bestimmen. Dieses Vorgehen wurde im Abstand von einer Stunde für insgesamt 5,5 Stunden fortgesetzt. Obwohl die Stämme sich leicht unterschieden, konnte nicht gezeigt werden, dass die Deletion der PEPC einen erheblichen Nachteil für die Infektion darstellt. In keinem Ansatz zur Überprüfung der Mutanten war zu einem der getesteten Zeitpunkte ein signifikanter Anstieg an apoptotischen J774-Makrophagen nachweisbar (nicht gezeigt). Möglicherweise führt der natürliche Sekretionsstimulus, der im Zellkulturversuch durch den Kontakt der Yersinie mit der Wirtszelle erfolgt, generell zu einer gesteigerten Sekretion, so dass sich die Unterschiede, die in F12 unter dem künstlichen Stimulus der Calciumdepletion nachweisbar waren, aufheben. Eine andere Erklärung könnte sein, dass auch die sehr geringe Menge an sekretiertem YopP in der *ppc* und *yscM2* Mutante bereits ausreicht, um den programmierten Zelltod einzuleiten. Möglicherweise müsste daher die Translokation der Yops viel früher durch ein Abtöten der Yersinien mit Gentamicin unterbunden werden. Bisher gibt es keine Studien über die kritische Menge für jedes einzelne Yop, bei der die zellulären Veränderungen in der Wirtszelle gestartet werden.

C.9.2 Einfluss der Modulation der PEPC auf die Phagozytose von Yersinien durch HeLa-Zellen

In einem zweiten Ansatz sollten Unterschiede der *ppc*, *yscM1* und *yscM2* Mutanten und des Wildtyps bezüglich der Phagozytose untersucht werden, die von YopH, YopT, YopE und YopO abhängt. Da die Yops synergetisch wirken (Grosdent *et al.* 2002), wäre es möglich, dass eine verringerte Sekretion dieser vier Yops in F12-Medium dazu führt, dass die anti-phagozytische Wirkung weniger stark ausgeprägt ist. In diesem Fall sollten sich Unterschiede in der Fähigkeit von HeLa-Zellen ergeben, die *Y. enterocolitica* Stämme WA-314, WA-314 Δ *ppc*, WA-314 Δ *yscM1*, WA-314 Δ *yscM2*, WA-C und WA-C Δ *inv* zu internalisieren. Der Kontrollstamm WA-C besitzt kein Virulenzplasmid und wird zu 90 % innerhalb einer Stunde phagozytiert. Als weitere Kontrolle wurde WA-C Δ *inv* eingesetzt, der aufgrund des fehlenden Invasins nicht an die Wirtszellen binden kann und somit nicht phagozytiert wird. HeLa-Zellen wurden mit den *Yersinia*-Stämmen in F12 für 1,5 Stunden bei 37°C bzw. bei 27°C infiziert. Bei 37°C wird der Typ III Sekretionsapparat gebildet und Yops werden in die Wirtszelle transloziert. Bei diesen Zellkulturen sollte ein Unterschied zwischen den *Yersinia*-Stämmen bezüglich ihrer Fähigkeit der Phagozytose entgegenzuwirken erkennbar sein. Bei 27°C dagegen adhären die Yersinien über das Invasin an die HeLa-Zellen und können den Verteidigungsmechanismen der Wirtszelle aber nichts entgegensetzen, da kein T3SS gebildet wird. Diese Zellkulturen dienen daher als Kontrolle für die Anzahl adhärierter Bakterien. Nach 1,5 Stunden wurden die Zellkulturen von 27°C gewaschen, die HeLa-Zellen lysiert und die Suspension auf Selektionsmedium plattiert, um die Anzahl adhärierter Bakterien zu bestimmen. In den Zellkulturen bei 37°C wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamicin abgetötet und die Kulturen für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde mit den Kulturen ebenso wie mit den Kulturen von 27°C verfahren. Da die extrazellulären Bakterien abgetötet wurden, wird mit diesem Ansatz die Zahl der phagozytierten Bakterien bestimmt. Allerdings ergaben sich wie bei der Bestimmung der Apoptoserate (C.9.1) keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mutanten. Lediglich die Kontrollen WA-C und WA-C Δ *inv* unterschieden sich wie erwartet deutlich von den anderen Stämmen.

C.10 Der Effektor YopH moduliert die Enzymaktivität der PEPC

Der Effektor YopH ähnelt in der N-terminalen Aminosäuresequenz, die die Chaperonbindedomäne (CBD) enthält, den Regulatoren YscM1 und YscM2 (Evdokimov *et al.* 2001b). Eine weitere Gemeinsamkeit von YopH mit YscM1 und YscM2 ist die Bindung an das Chaperon SycH (Wattiau *et al.* 1994; Sory *et al.* 1995; Phan *et al.* 2004). In Abbildung 50 ist ein Vergleich der Aminosäuresequenz des N-terminalen Bereichs von YopH mit YscM1 und YscM2 dargestellt. Über die ersten 128 Aminosäuren beträgt die Identität von YopH mit YscM1 31 % und mit YscM2 28 %. Dies legt die Vermutung nahe, dass YopH Einfluss auf die Aktivität der PEPC nimmt.

YscM1 MKINTLQSLINQITQVG . . . HGGQAGRLTETNPLT	33
YopH	MNLSLSDLHRQVSRLVQQESGDCTGKLRRGNVAANKETT	38
YscM2	MGSIMKINDLKSLSMQIAEFG . . . GGEKIGRLKSTLQQV	37
YscM1	ENSHQIST . . . AEKAFASEVLEHVKNALSRHDIACLLP	69
YopH	FQGLTIASGARESEKVFQTVLSHVANIVLTQEDTAKLLQ	78
YscM2	ST.QAITS . . . DERRFAYAVLEHAKNTILNRQDVAKLLP	72
YscM1 RVSNLELKQKGAGEVIVTGLRTEQLSLSDAKLLE	104
YopH	STVKHNLNNYELRSVGNNGSVLVSLRSDQMTLQDAKVLE	118
YscM2 RASNFEELSQQKKEVILKGLRVEQLSLEDAKLLLD	107
YscM1	AAMRQDTAADG ¹¹⁵	468
YopH	AALRQESGARG ¹²⁷ -----	
YscM2	AVTRKMQKL ¹¹⁶	

Abbildung 50: Sequenzvergleich von YscM1 und YscM2 mit YopH.

Die Aminosäuresequenzen von YscM1, YscM2 und dem N-Terminus von YopH von *Y. enterocolitica* pYVa127/90 (Foultier & Cornelis 2003) wurden miteinander verglichen. Aminosäuren, die in allen drei Proteinen konserviert sind, sind rot dargestellt. Aminosäuren, die nur in zwei der drei Proteine konserviert sind, sind blau dargestellt.

C.10.1 Einfluss von YopH auf die Enzymaktivität der PEPC

Um einen Einfluss von YopH auf die Enzymaktivität der PEPC zu überprüfen, wurde die Aktivität der PEPC in Anwesenheit von YopH bei 340nm protokolliert. Zu diesem Zweck wurden 100 nM PEPC mit steigenden Mengen YopH inkubiert (Abbildung 51). Die Proben wurden für 5 min bei 37°C vorinkubiert, um Bedingungen zu simulieren, unter denen YopH in der Yersinie vorliegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM PEP gestartet. Ebenso wie YscM1 (C.7.1) verlangsamt YopH den NADH Verbrauch. Das entspricht einer Hemmung der Reaktion und dieser Effekt auf die PEPC ist titrierbar (Abbildung 51). Bei einem 200-fachen Überschuss (20 µM) von YopH gegenüber der PEPC wurde die PEPC Aktivität auf ungefähr 42 % der Ausgangsaktivität gesenkt. Das entspricht dem Ergebnis, das mit 41 % Inhibition für 20 µM YscM1 ermittelt wurde. In Abbildung 51 ist zu sehen, dass YscM1 und YopH sich über den gesamten getesteten Bereich bezüglich ihrer inhibitorischen Stärke nahezu gleich verhalten. Dies bestätigt sich auch bei der Ermittlung der Inhibitorkonstante K_i , die für YscM1 bei 11,7 µM liegt. Der K_i -Wert von YopH kann aus Abbildung 51 bei einer PEPC Aktivität von 50% abgeschätzt werden. Der K_i -Wert bei pH 8 beträgt für YopH 13,2 µM. Eine Analyse der Interaktion von YopH und der PEPC im Nativgel war aufgrund der Eigenschaften der Proteine nicht möglich.

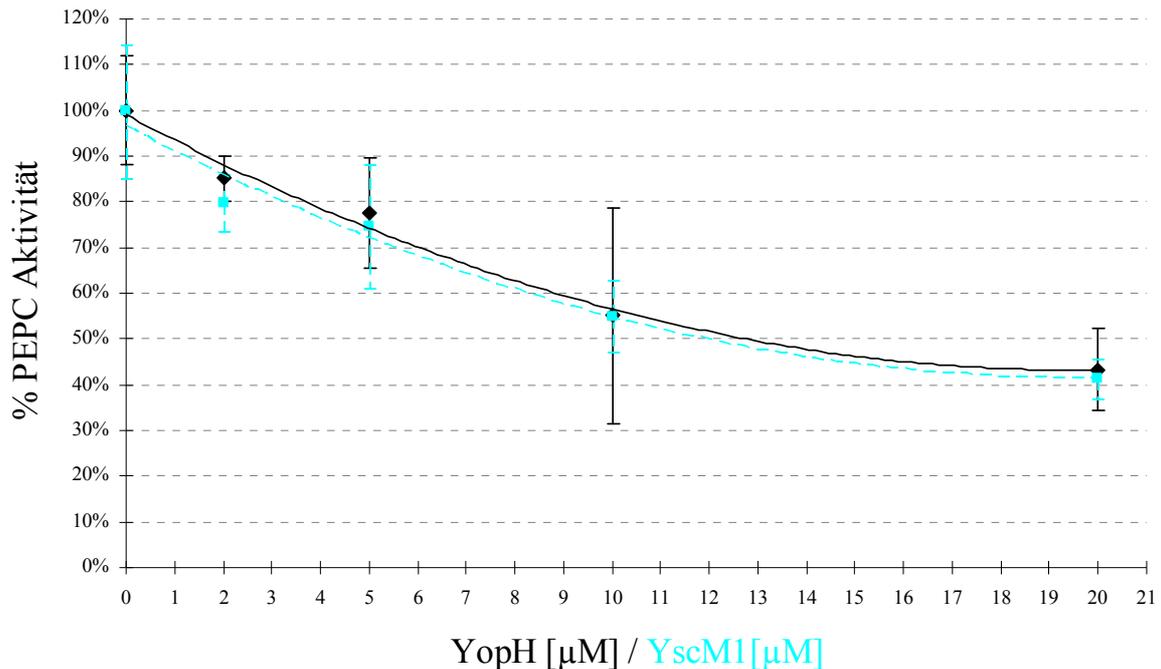


Abbildung 51: Der inhibitorische Effekt von YopH auf die PEPC ist titrierbar.

Steigende Mengen YopH (0-20 μM) wurden zu 100 nM PEPC (bezogen auf das Monomer) gegeben und nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C die Oxidation von NADH gemessen. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 60 sek in 2-Sekundenschritten. Jeweils vier unabhängige Messungen wurden durchgeführt und die daraus resultierenden Steigungen als Maß für die PEPC Aktivität gemittelt. Die Aktivität von 1 μg PEPC im Assay (100 nM PEPC) wurde als 100 % PEPC Aktivität definiert. Die Umsatzrate von NADH in Anwesenheit von steigenden Mengen YopH wurde in Bezug zu diesem Wert gesetzt. Die Signifikanz p ist für alle Werte $< 0,05$. Zusätzlich wurde das entsprechende Experiment mit YscM1 in blau aufgetragen. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

C.10.2 YopH wirkt als Antagonist des allosterischen Aktivators Acetyl-CoA

Es sollte überprüft werden, ob YopH ebenso wie YscM1 ein Antagonist des allosterischen Aktivators Acetyl-CoA ist (C.7.3). 50 μM Acetyl-CoA auf 100 nM PEPC führen zur Verdopplung der PEPC Aktivität. Die Zugabe von steigenden Mengen YopH zu konstanten 100 nM PEPC und 50 μM Acetyl-CoA führt zu einer kontinuierlichen Abnahme der stimulierenden Wirkung von Acetyl-CoA (Abbildung 52), obwohl Acetyl-CoA in allen Ansätzen im Überschuss vorlag. Dabei wird vor allem deutlich, dass der Effekt von YopH bei Konzentrationen im Bereich von 2-10 μM etwas stärker ausgeprägt ist als der von YscM1. Während bei Zugabe von 10 μM YscM1 die stimulierende Wirkung von Acetyl-CoA lediglich kompensiert wird, führen 10 μM YopH bereits zu einer Hemmung der PEPC (Abbildung 52). Bei Zugabe von 20 μM YopH wird die Aktivität der PEPC auf ungefähr 60 % des Ausgangswerts herabgesenkt (Abbildung 52). In diesem Bereich gleichen sich YscM1 und YopH in der Stärke der Inhibition wieder aneinander an. 20 μM YscM1 führen in Anwesenheit von Acetyl-CoA ebenfalls zu einer Absenkung der Anfangsaktivität auf etwa 60 %.

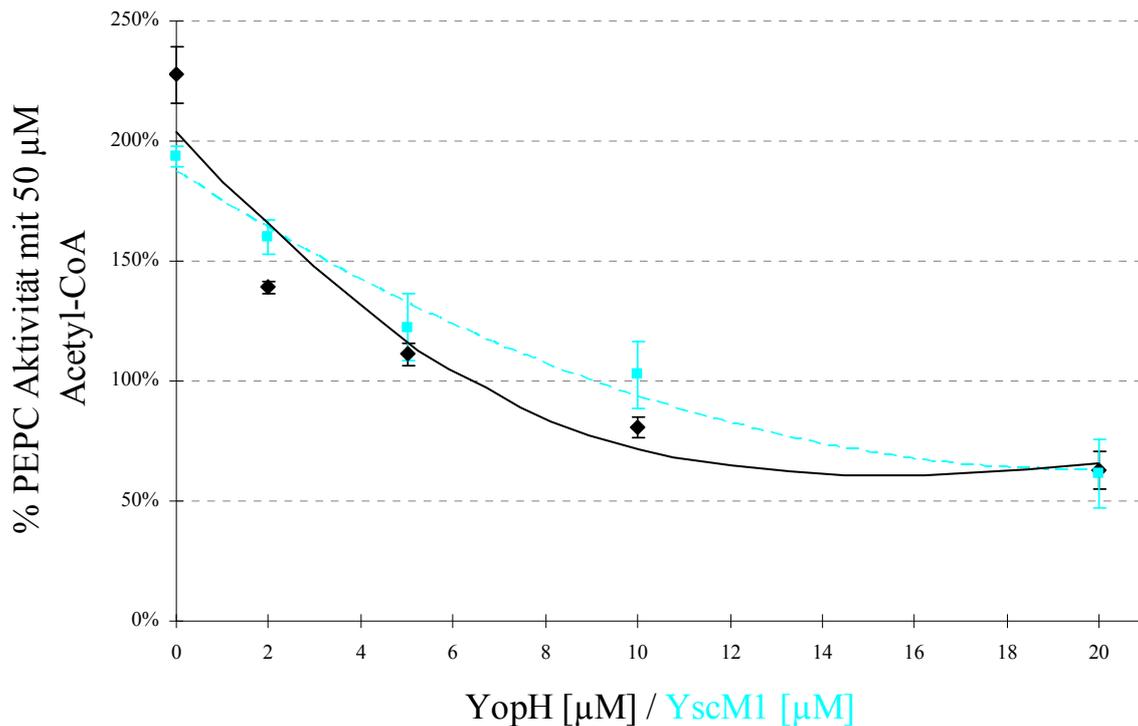


Abbildung 52: YopH wirkt als Antagonist zum allosterischen Aktivator Acetyl-CoA.

Steigende Mengen YopH (0-20 μM) wurden zu 100 nM PEPC (bezogen auf das Monomer) und 50 μM Acetyl-CoA gegeben und nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C die Oxidation von NADH gemessen. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 60 sek in 2-Sekundenschritten. Jeweils vier unabhängige Messungen wurden durchgeführt und die daraus resultierenden Steigungen als Maß für die PEPC Aktivität gemittelt. Die Aktivität von 1 μg PEPC im Assay (100 nM PEPC) wurde als 100 % PEPC Aktivität definiert. Die Umsatzrate von NADH in Anwesenheit von Acetyl-CoA und steigenden Mengen YopH wurde in Bezug zu diesem Wert gesetzt. Zusätzlich wurde das entsprechende Experiment mit YscM1 in blau aufgetragen. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

C.10.3 Modulation der Aktivität der PEPC durch YopH *in vivo*

Die Bedeutung von YopH sollte *in vivo* unter PEPC-abhängigen Wachstumsbedingungen charakterisiert werden. Dazu wurde das Plasmid pWS-yopH konstruiert (Tabelle 7). Für die Klonierung wurde das 1407 bp große *yopH* aus der chromosomalen DNA von *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Primern YopH_NdeI_for und YopH_SalI_rev amplifiziert (Tabelle 8). Nach Subklonierung in pMBL-T/A wurde das *yopH*-Fragment über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *SalI* in den Expressionsvektor pWS ligiert (Tabelle 6). Die korrekte Sequenz des resultierenden Plasmids pWS-yopH wurde durch Sequenzierung bestätigt und in *Y. enterocolitica* WA-314 transformiert. Es wurden jeweils drei Klone für den Wachstumsversuch isoliert. Als Kontrolle diente der Leervektor. Außerdem wurde für den direkten Vergleich mit YscM1 das Plasmid pWS-yscM1 eingesetzt (Tabelle 7). Alle Kulturen wurden über Nacht bei 27°C in BHI angezogen, am nächsten Tag in PBS gewaschen und die Startkonzentration auf 1×10^8 cfu/ml eingestellt. Dem Δ PEPC-Medium wurden 1 mM IPTG zur Induktion der Expression von YopH und YscM1 zugesetzt. Der Wachstumsversuch wurde bei 27°C durchgeführt, da die Expression der endogenen T3SS-Gene unterbunden werden sollte, und das Wachstum über 7 h jede Stunde protokolliert. In Abbildung 53 ist zu sehen, dass die Überproduktion von YscM1 das

Wachstum wie bereits gezeigt inhibiert, während die Überproduktion von YopH nur zu einer leichten Wachstumsinhibition führt. Obwohl YopH im PEPC Enzymassay einen ähnlichen Effekt auf die PEPC hat wie YscM1, verhält sich YopH im Wachstumsversuch anders als YscM1. Sowohl YopH als auch YscM1 wurden in den für den Wachstumsversuch eingesetzten Stämmen exprimiert (Abbildung 54). Abbildung 54 macht auch deutlich, dass YopH trotz der deutlich stärkeren Expression keine zu YscM1 vergleichbare Inhibition von *Y. enterocolitica* WA-314 zur Folge hat. Eine mögliche Ursache könnten Probleme mit der Stabilität von YopH sein. Eine andere Möglichkeit wäre, dass ein bisher unbekannter Kofaktor, der von *Y. enterocolitica* bei 27°C synthetisiert wird, für die unterschiedliche Ausprägung der Wachstumsinhibition verantwortlich ist.

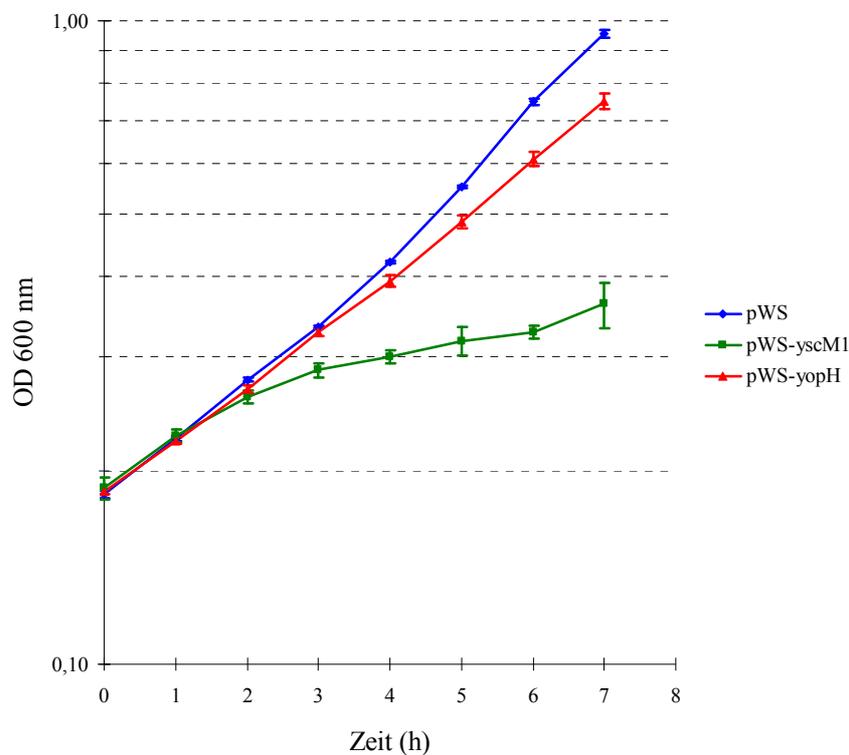


Abbildung 53: Überexpression von YopH und YscM1 in *Y. enterocolitica* WA-314.

Das Wachstum von WA-314[pWS], WA-314[pWS-yscM1] und WA-314[pWS-yopH] erfolgte in M9-Medium mit 1 % Glukose, 1 mM Thiamin und 0,01 % Casaminosäuren supplementiert bei 27°C. Die Synthese von YscM1 und YopH wurde mit 1 mM IPTG zum Zeitpunkt Null induziert. Die OD wurde in Abständen von einer Stunde bei 600nm bestimmt. Drei Datenreihen von unabhängigen Kulturen wurden gemittelt aufgetragen. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

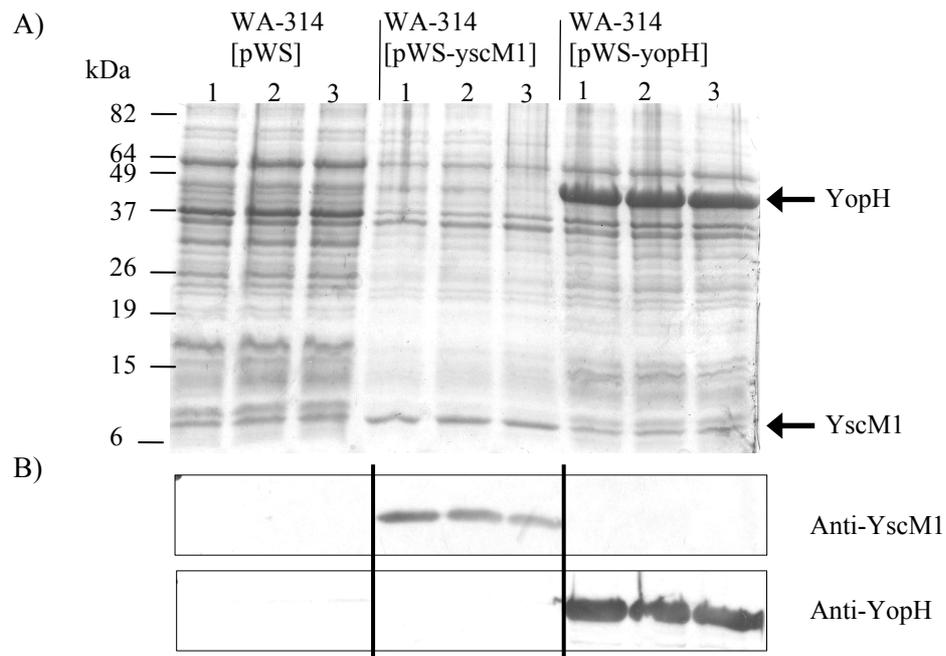


Abbildung 54: Überprüfung der Expression von YopH und YscM1.

(A) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel; (B) Immunoblots mit Antiserum gegen YopH bzw. YscM1. Nach 7 h wurde von den drei unabhängigen Parallelkulturen aus dem Wachstumsversuch jeweils eine Probe entnommen und im SDS-Gel und Immunoblot analysiert. YscM1 und YopH wurden nach Induktion exprimiert.

D DISKUSSION

Als essentieller Virulenzfaktor pathogener Yersinien wurde ein plasmidkodiertes Typ III Sekretions-system (T3SS) identifiziert (Cornelis *et al.* 1989b; Straley *et al.* 1993). Dabei handelt es sich um einen komplex aufgebauten und regulierten Sekretionsapparat, der es den Pathogenen ermöglicht, der angeborenen Immunantwort des Wirts zu entgehen und sich im Wirt zu replizieren (Rosqvist *et al.* 1990; Forsberg *et al.* 1994; Fallman *et al.* 1995; Ruckdeschel *et al.* 1996; Cornelis 1998). Bereits vor der Beschreibung des Virulenzplasmids wurde beobachtet, dass für virulente Yersinien eine Wachstumsinhibition bei 37°C charakteristisch ist (Higuchi *et al.* 1959), die mit der massiven Synthese und Sekretion von Yop-Effektoren einhergeht (Brubaker 1983; Straley *et al.* 1993). Da sowohl die Wachstumsinhibition als auch die massive Yop-Expression und -Sekretion u.a. durch hohe Ca^{2+} -Konzentrationen bei der Kultivierung verhindert werden können (Higuchi *et al.* 1959; Delwiche *et al.* 1959; Brubaker & Surgalla 1964), wurde dieser Phänotyp als „Low calcium response“ (Lcr) bezeichnet. Weil die Zugabe von Natriumhydrogencarbonat ebenfalls die Wachstumsinhibition und massive Yop-Sekretion unterbindet, wurde auch ein Zusammenhang der Lcr mit der CO_2 -Fixierung vermutet (Baugh *et al.* 1964), aber auf molekularer Ebene konnte bisher keine Verknüpfung zwischen Wachstumsinhibition und Virulenz hergestellt werden. In einer vorherigen Doktorarbeit wurden jedoch YscM1 und YscM2 als Wechselwirkungspartner des Stoffwechsellzyms Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) identifiziert (Neumayer 2005). Bisher galten LcrQ aus *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* bzw. YscM1 und YscM2 aus *Y. enterocolitica* lediglich als negative Regulatoren des T3SS (Rimpiläinen *et al.* 1992; Stainier *et al.* 1997). Die Daten von Neumayer (2005) zeigen damit nicht nur erstmals, dass auf molekularer Ebene eine Verknüpfung zwischen T3SS-Faktoren und dem Stoffwechsel vorhanden ist, sondern legen auch die Vermutung nahe, dass die zwei YscM Proteine diejenigen Proteine sind, die eine Anpassung des Metabolismus an die Bedingungen während der Typ III Sekretion erlauben. Dieses System scheint jedoch noch wesentlich komplexer zu sein, da LcrQ/YscM1 und YscM2 mit verschiedenen T3SS-Chaperonen interagieren, die ihrerseits ebenfalls an der Regulation der Typ III Sekretion beteiligt sind (Francis *et al.* 2001; Wulff-Strobel *et al.* 2002; Swietnicki *et al.* 2004; Cambronne *et al.* 2004). In der vorliegenden Arbeit sollten daher ausgehend von den beiden YscM Proteinen, die einen zentralen Knotenpunkt in der Regulation der Virulenz bei *Y. enterocolitica* darzustellen scheinen, solche Proteine charakterisiert werden, die über das Typ III-Interaktom an der Stoffwechselregulation beteiligt sein könnten. Dabei sollte die Rolle der Chaperone in der Typ III Sekretion unter regulatorischen, aber auch unter strukturellen Gesichtspunkten untersucht werden. Außerdem sollte die Bedeutung der Wechselwirkung von YscM1 und YscM2 mit der PEPC genauer analysiert werden.

D.1 Die Chaperone der Typ III Sekretion

Die Chaperone der Typ III Sekretion werden in Abhängigkeit ihres Substrats und ihrer Struktur in verschiedene Klassen (Klasse I-V) eingeteilt (Parsot *et al.* 2003; Wilharm *et al.* 2007). Ihre Funktion wird kontrovers diskutiert und bis heute ist nicht vollständig geklärt, welche der ihnen zugeschriebenen Funktionen sie tatsächlich ausüben. Von den sechs bekannten Yop-Effektoren besitzen YopO, YopH, YopE und YopT ein spezifisches Chaperon (SycO, SycH, SycE, SycT) (Wattiau & Cornelis 1993; Wattiau *et al.* 1994; Iriarte & Cornelis 1998; Letzelter *et al.* 2006). Außerdem existiert mit SycD auch ein Chaperon für die Translokatoren YopB und YopD (Wattiau *et al.* 1994). Warum die Effektoren YopM und YopP kein Chaperon benötigen, ist bisher unklar. Möglich wäre auch, dass die zugehörigen Chaperone existieren und lediglich noch nicht identifiziert wurden. Außerdem wird vermutet, dass YscY als Chaperon für YscX fungiert. Beide Proteine sind an der Regulation der Typ III Sekretion beteiligt. Die Beteiligung der sechs genannten Chaperone an der Regulation der Typ III Sekretion wird anhand deregulierter Phänotypen nach Deletion oder Überexpression der jeweiligen Chaperone deutlich. Der Mechanismus konnte bisher aber auf molekularer Ebene nicht geklärt werden (Cambronne *et al.* 2000; Francis *et al.* 2001; Dittmann *et al.* 2007).

D.1.1 Die Klasse I-Chaperone

Als Klasse I-Chaperone werden T3SS-Chaperone bezeichnet, die an Effektoren binden (Parsot *et al.* 2003). Bei *Yersinia* sind das SycO, SycH, SycE und SycT (Wattiau & Cornelis 1993; Wattiau *et al.* 1994; Iriarte & Cornelis 1998; Letzelter *et al.* 2006). Von SycH wurde erstmals für ein Klasse I-Chaperon gezeigt, dass es für die Regulation der Typ III Sekretion von Bedeutung ist (Cambronne *et al.* 2000). Zum einen induziert die Überexpression von SycH in Anwesenheit von Ca^{2+} das *yop*-Virulon und führt zur Sekretion der Exportsubstrate des T3SS (Cambronne *et al.* 2000). Zum anderen führte die Deletion von *sycH* zu einer verminderten Expression vieler Sekretionssubstrate (Cambronne *et al.* 2000). Außerdem vermittelt SycH die Translokation der Regulatoren YscM1 und YscM2 in die Wirtszelle (Cambronne *et al.* 2000). Es wurde vermutet, dass YscM1 und YscM2 Bestandteil eines negativen Rückkopplungsmechanismus sind, der die Transkription des *yop*-Virulons unterbindet, wenn keine Yop-Sekretion erfolgen soll (Stainier *et al.* 1997). Cambronne *et al.* (2000) haben postuliert, dass die Bindung von SycH an die YscM Proteine deren negativen Einfluss auf die Transkription der T3SS-Gene aufheben kann. Swietnicki *et al.* (2004) konnten mit rekombinanten Proteinen darüber hinaus nachweisen, dass auch SycE mit den T3SS-Regulatoren YscM1 und YscM2 interagiert. *In vivo* konnte dieser Wechselwirkung bisher aber keine Bedeutung zugeordnet werden. SycO dagegen konnte bereits kurz nach Identifikation als Chaperon von YopO (Letzelter *et al.* 2006) eine regulatorische Bedeutung in der Typ III Sekretion zugeschrieben werden (Dittmann *et al.* 2007). Um SycO *in vitro* zu charakterisieren, wurde das Chaperon im Rahmen einer anderen Promotion zunächst rekombinant

gereinigt (Dittmann *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob SycO sich ebenfalls durch eine Wechselwirkung mit den YscM Proteinen in das T3SS-Interaktom einbinden lässt. So konnte YscM1 als neuer Interaktionspartner von SycO identifiziert werden (Dittmann *et al.* 2007). Die regulatorische Bedeutung von SycO in der Typ III Sekretion äußert sich dadurch, dass die Überproduktion von SycO ein vermindertes intrazelluläres Level an Yop-Effektoren und damit eine verminderte Yop-Sekretion zur Folge hat (Dittmann *et al.* 2007). *In vivo* konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dem beobachteten Phänotyp und YscM1 bzw. YscM2 hergestellt werden, da die Überexpression von SycO in einer *yscM1* bzw. *yscM2* Mutante nach wie vor zur Repression der Yop-Expression und -Sekretion führt (Dittmann *et al.* 2007). Möglicherweise dient die Wechselwirkung von YscM1 mit Chaperonen wie SycO dazu, die Menge an freien Chaperonen, die nicht mit einem Sekretionssubstrat beladen sind, im bakteriellen Zytoplasma zu bestimmen und diese Information in die Repression oder Derepression der Yop-Translation zu übersetzen. In Übereinstimmung mit diesem Modell konnte für fast alle T3SS-Chaperone eine Wechselwirkung mit den YscM Proteinen nachgewiesen werden (Francis *et al.* 2001; Wulff-Strobel *et al.* 2002; Swietnicki *et al.* 2004; Cambronne *et al.* 2004; Schmid *et al.* 2006; Dittmann *et al.* 2007), so dass sich diese Interaktion gut als Maß für die Menge an translozierten Effektorproteinen eignen würde. Dass Chaperone nach der Sekretion bzw. Translokation ihres ersten Wechselwirkungspartners häufig über neue Interaktionen in die Regulation der Typ III Sekretion eingreifen, ist inzwischen aus einer Vielzahl von Mikroorganismen mit T3SS bekannt (Brutinel & Yahr 2008).

D.1.2 Das Klasse II-Chaperon SycD

SycD aus *Y. enterocolitica* ist das Chaperon der Translokatoren YopB und YopD (Neyt & Cornelis 1999b), welche vermutlich eine Pore in der Wirtszellmembran bilden, über die die Effektorproteine ins Wirtszytoplasma gelangen (Hakansson *et al.* 1996b; Tardy *et al.* 1999; Neyt & Cornelis 1999a). Francis *et al.* (2001) haben gezeigt, dass SycD neben seiner Funktion als Chaperon auch an der Regulation der Typ III Sekretion beteiligt ist. Dies wird durch Daten von Swietnicki *et al.* (2004) untermauert, dass das SycD-homologe LcrH aus *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* mit YscM2, einem Regulator der Typ III Sekretion, interagiert. Um das Chaperon SycD aus *Y. enterocolitica* biochemisch und strukturell näher zu untersuchen, wurde ein Proteinreinigungsprotokoll für SycD etabliert. Da SycD in großen Mengen (120 mg Protein pro Liter Bakterienkultur) und mit hoher Reinheit (> 95 %) gewonnen werden konnte, wurde die Kristallisation des Proteins angestrebt¹⁵. Obwohl mit verschiedenen Konstrukten (SycD-His₆, natives SycD, verkürztes SycD₉₋₁₅₅, SycD/YscY-Komplex) Versuche unternommen wurden, Kristalle zu ziehen, gelang dies nicht. Während im Rahmen dieser Arbeit

¹⁵Kooperation mit Michael Groll, Adolf-Butenandt-Institut, Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstraße 5, 81377 München, derzeit am Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching

Vorbereitungen zur Kokristallisation von SycD mit dem SycD-bindenden Fragment von YopD unternommen wurden (Tengel *et al.* 2002), hat eine andere Gruppe die Kristallstruktur von SycD veröffentlicht (Büttner *et al.* 2008). Ähnlich wie das in der vorliegenden Arbeit verwendete N- und C-terminal verkürzte SycD Konstrukt wurde auch von Büttner *et al.* (2008) ein stabiles verkürztes Konstrukt eingesetzt. Die Deletion am C-Terminus entsprach der in dieser Arbeit gewählten Verkürzung, aber der N-Terminus wurde nicht nur bis Position 8, sondern bis Position 20 deletiert (Büttner *et al.* 2008). Dies und die reduktive Methylierung von Lysinen hat vermutlich dazu geführt, dass Büttner *et al.* (2008) erfolgreich eine Kristallstruktur für SycD ermitteln konnten. Mit dieser Struktur konnte bestätigt werden, dass Klasse II-Chaperone eine völlig andere Faltung annehmen als die bisher kristallisierten Klasse I-Chaperone. Die hochauflösende Struktur von SycD ermöglicht nun einen direkten Vergleich mit den Klasse I-Chaperonen. Während Klasse I-Chaperone eine gemischte Struktur aus α -Helices und β -Strängen annehmen, sind bei SycD besonders die drei Tetratricopeptid(TPR)-Motive (TPR1, TPR2, TPR3) auffällig, die die sechs zentralen α -Helices bilden. Diese werden von zwei weiteren α -Helices flankiert, so dass SycD aus insgesamt acht α -Helices besteht (Büttner *et al.* 2008). Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene 3D-Modell von SycD stimmt damit gut mit dem Röntgenstrukturmodell von SycD überein. Die C-terminale zusätzliche α -Helix in der SycD Struktur wird als stabilisierende Helix bezeichnet und existiert in fast allen bisher bekannten Strukturen von Proteinen, die TPR-Motive besitzen (Büttner *et al.* 2008). Ein TPR-Motiv besteht typischerweise aus etwa 34 Aminosäuren, die eine „helix-turn-helix“-Struktur bilden (Goebel & Yanagida 1991), wobei die Aminosäurefolge nicht strikt festgelegt ist, sondern vielmehr an bestimmten Positionen kleine und große hydrophobe Aminosäuren auftreten (D'Andrea & Regan 2003). Daraus entsteht eine charakteristische dreidimensionale Struktur, die zur Bildung einer konkaven Spalte/Proteininnenseite und einer konvexen Proteinaußenseite führt, deren Eigenschaften die Wechselwirkungen zwischen den Bindungspartnern vermitteln. Meist finden Wechselwirkungen mit der konkaven Spalte statt, aber generell können alle Seiten der TPR-Motive für die Bindung an Liganden verwendet werden (D'Andrea & Regan 2003). Diese stark konservierten Motive sind dafür bekannt, Protein-Protein-Interaktionen in einem breiten Spektrum zellulärer Funktionen in allen drei Domänen der Lebewesen zu vermitteln (Blatch & Lässle 1999; D'Andrea & Regan 2003). Inzwischen wurde eine Vielzahl an Proteinen, die am Proteintransport beteiligt sind oder als Chaperone dienen, mit TPR-Motiven identifiziert (Blatch & Lässle 1999). Im Fall von SycD, das eine Vielzahl an Interaktionspartnern im bakteriellen Zytoplasma hat, eignen sich wohl TPR-Motive besonders gut, um in Abhängigkeit von den zellulären Bedingungen mit verschiedensten Wechselwirkungspartnern Bindungen einzugehen. Zu den bisher bekannten Interaktionspartnern von SycD zählen YscY, TyeA, YscE, YscM1, YscM2, YopB und YopD (Neyt & Cornelis 1999b; Swietnicki *et al.* 2004; Bröms *et al.* 2005; Schmid *et al.* 2006, diese Arbeit). Darüber hinaus muss SycD der Anforderung gerecht werden, die Translokatoren YopB und YopD gleichzeitig binden zu können (Neyt & Cornelis 1999b). Da TPR-Motive zwei Interaktionsflächen für mögliche Wechselwirkungspartner zur Verfügung stellen, eignen sie sich dafür besonders

(D'Andrea & Regan 2003). Edqvist *et al.* (2006) konnten zeigen, dass die Bindungsstellen von YopB und YopD an das SycD-homologe LcrH tatsächlich auf verschiedenen Seiten des Proteins lokalisiert sind und diese Wechselwirkungen über α -Helices der TPR-Motive von LcrH vermittelt werden. Die Interaktion mit YopB konnte auf das TPR1 und TPR2 eingegrenzt werden, während YopD mit allen drei TPR-Motiven von LcrH wechselwirkt. Auch die Interaktion von SycD mit YscY, das seinerseits TPR-Motive enthält (Pallen *et al.* 2003), wird über diese Motive vermittelt. In SycD konnte der Bindbereich mit YscY im ersten TPR-Motiv lokalisiert werden (Bröms *et al.* 2005). Interessant ist auch die Dimerisierung von SycD, da Büttner *et al.* (2008) zwei unterschiedliche SycD Dimere im Kristall beobachtet haben. In beiden Dimeren erfolgt die Interaktion über die N-terminalen TPR1-Motive der SycD Monomere (Büttner *et al.* 2008). SycD wird daher von Büttner *et al.* (2008) als erstes Homodimer beschrieben, das zwei alternative Konformationen annimmt, obwohl die Wechselwirkung in beiden Dimeren über dieselben Bereiche vermittelt wird (Büttner *et al.* 2008).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Interaktion von sowohl Klasse I-Chaperonen als auch des Klasse II-Chaperons SycD mit den Regulatoren YscM1 und YscM2. Wie ist es möglich, dass diese so unterschiedlich gefalteten Chaperone alle mit den YscM Regulatoren wechselwirken können? Das Chaperon SycH wurde mit der Chaperonbindedomäne (CBD) von YscM2, die um das Chaperon „gewickelt“ ist, kristallisiert (Phan *et al.* 2004). Die Bindung von YscM2 an das Chaperon SycH wurde von Phan *et al.* (2004) mit der Bindung des Effektors YopE an sein Chaperon SycE verglichen (Birtalan *et al.* 2002). Für die Bindung der YscM Proteine an SycD ist eher eine Interaktion zwischen α -Helices beider Proteine wahrscheinlich. Laut dem Programm JUFO (<http://www.meilerlab.org/view.php>) zur Vorhersage von Sekundärstrukturen enthält sowohl YscM1 als auch YscM2 vor allem α -Helices, was diese Vermutung untermauert. Im Gegensatz zur Wechselwirkung der YscM Proteine mit einem SycH Dimer, deuten die Daten aus Quervernetzungsversuchen in dieser Arbeit auf einen 1:1 Komplex von YscM1 bzw. YscM2 mit dem Klasse II-Chaperon SycD hin. Ob das SycD Monomer aber ähnlich wie das SycH Dimer von YscM1 und YscM2 umwickelt wird und ob derselbe Bereich der YscM Proteine Interaktionen mit Klasse I-Chaperonen und SycD vermittelt, könnte durch Interaktionsstudien mit deletierten YscM1- und YscM2-Konstrukten untersucht werden. Die biologische Relevanz der vielfältigen Wechselwirkungen der YscM Proteine mit den Chaperonen des T3SS ist bisher unklar. Möglicherweise dienen die YscM Proteine als Schnittstelle, um zu messen, ob die T3SS-Chaperone mit Effektoren beladen sind, und um dieses Signal entsprechend in die Repression oder Derepression der Yop-Translation zu übertragen (Abbildung 55). In Übereinstimmung mit diesem Modell wurde für fast alle T3SS-Chaperone eine Wechselwirkungspartner mit den YscM Proteinen identifiziert (Francis *et al.* 2001; Wulff-Strobel *et al.* 2002; Swietnicki *et al.* 2004; Cambronne *et al.* 2004; Schmid *et al.* 2006; Dittmann *et al.* 2007, diese Arbeit). Alternativ wäre denkbar, dass die YscM Proteine stabil an Effektor/Chaperon-Komplexe binden und an der Sekretion der Yops beteiligt sind.

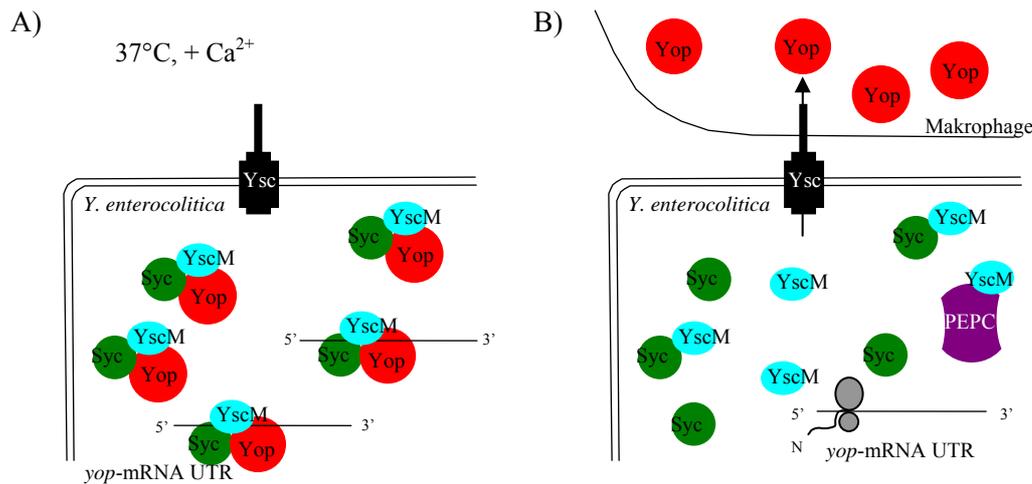


Abbildung 55: Modell für die Bedeutung der Interaktion der YscM Proteine mit den Typ III-spezifischen Chaperonen.

(A) Vor dem Kontakt mit einer Wirtszelle binden die YscM Proteine im Komplex mit Chaperon/Substrat-Komplexen an den 5' nicht-translatierten Bereich (UTR) von *yop*-mRNA und beeinflussen so die Translation. (B) Beim Kontakt mit der Wirtszelle werden die Yop-Effektoren transloziert und die meisten YscM Proteine werden aus den Komplexen freigesetzt. Dies hat zur Folge, dass zum einen die Inhibition der *yop*-mRNA aufgehoben wird. Zum anderen können die YscM Proteine mit der PEPC wechselwirken und die Vermehrung der Yersinien begrenzen.

D.1.3 YscY - Chaperon und Regulator?

YscY interagiert mit YscX, das über den Typ III Sekretionsapparat sekretiert wird (Day & Plano 2000). Da YscY typische Eigenschaften von T3SS-Chaperonen besitzt, wurde postuliert, dass es als Chaperon von YscX fungiert (Day & Plano 2000). Deletionsmutanten sowohl in *yscY* als auch in *yscX* sind nicht in der Lage Yops zu sekretieren (Iriarte & Cornelis 1999), was auf eine Beteiligung an der Regulation hindeutet. Da YscY neben YscX mit SycD wechselwirkt (Bröms *et al.* 2005), sollten alle drei Proteine für eine biochemische Charakterisierung rekombinant hergestellt werden. Auch die Strukturaufklärung mittels Kristallisation wurde angestrebt¹⁶. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Proteinreinigungsprotokolle etabliert. Die Reinigung von YscY war nur unter denaturierenden Bedingungen möglich. Bei der Koexpression mit SycD dagegen konnte ein SycD/YscY-Komplex in großer Menge und mit hoher Reinheit und Stabilität gewonnen werden. Die Kristallisation des Komplexes gelang nicht. Daher sind lediglich Spekulationen über die Art der Wechselwirkung der Proteine möglich. Wahrscheinlich ist eine Interaktion über die TPR-Motive, die in beiden Proteinen vorkommen (Pallen *et al.* 2003) und unter D.1.2 bereits beschrieben wurden. YscY enthält ebenso wie SycD drei dieser Motive (Pallen *et al.* 2003), die laut Strukturvorhersagen fast das gesamte Protein umfassen. Damit besitzt YscY keine zusätzliche C-terminale α -Helix (stabilisierende Helix), wie sie in fast allen bisher bekannten Strukturen von Proteinen vorkommt, die TPR-Motive besitzen (Büttner *et al.* 2008).

¹⁶Kooperation mit Michael Groll, Adolf-Butenandt-Institut, Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstraße 5, 81377 München, derzeit am Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels analytischer Gelfiltration gezeigt werden, dass YscY und SycD einen 1:1 Komplex bilden. Dieses Heterodimer könnte ähnlich wie das kristallisierte SycD Homodimer aussehen (Büttner *et al.* 2008), da sowohl die Dimerisierung von SycD über das TPR1 von SycD vermittelt wird, als auch die Wechselwirkung mit YscY über das TPR1 von SycD erfolgt (Bröms *et al.* 2005). Anders als Day *et al.* (2000), die in „Yeast two-hybrid“-Versuchen keine Interaktion zwischen YscY-Molekülen beobachten konnten, konnte in dieser Arbeit unter bestimmten Pufferbedingungen eine Tendenz zur Bildung von YscY Polymeren (~ 600 kDa) gezeigt werden. Ob diese Polymere biologisch relevant sind ist unklar. Da die Sekretionssubstrate während des Translokationsvorgangs relativ schnell an die basalen Teile des Nadelapparates gelangen müssen, wäre es möglich, dass dieser Vorgang nicht zufällig durch die Diffusion der Substrat/Chaperon-Komplexe zum Sekretionsapparat geregelt ist, sondern ein gerichteter Prozess ist, bei dem die YscY Polymere eine zentrale Rolle spielen. Um zu prüfen, ob die YscY Polymere während der Infektion möglicherweise ein Leitsystem für Yops und deren Chaperone zu den Typ III Apparaten darstellen, werden momentan elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt¹⁷. Darüber hinaus deutet die Interaktion von YscY und SycD auf eine Beteiligung von YscY am Regulationsnetzwerk der Typ III Sekretion hin. Da SycD an der Regulation der Typ III Sekretion beteiligt ist (Francis *et al.* 2001) und von YscY gezeigt wurde, dass es für die Sekretion der Yop-Effektoren unter permissiven Bedingungen wichtig ist (Iriarte & Cornelis 1999), wäre es denkbar, dass die Interaktion zwischen SycD und YscY nur während bestimmter Phasen der Infektion möglich ist, und dadurch regulatorische Vorgänge an- und abgeschaltet werden. Dies stimmt damit überein, dass SycD zunächst für die Translokatoren YopB und YopD als Chaperon dient (Neyt & Cornelis 1999b) und dann erst für eine Wechselwirkung mit YscY zur Verfügung steht. Ähnliches gilt für YscY, das erst YscX bindet und vermutlich an dessen Sekretion beteiligt ist, bevor es für eine Wechselwirkung mit SycD frei ist. Dies ist wiederum konsistent mit Daten aus dieser Arbeit, dass SycD *in vitro* nicht in der Lage ist aktiv den Komplex zwischen YscY und YscX zu lösen, um seinerseits einen Komplex mit YscY zu bilden. Da Day *et al.* (2000) postulieren, dass YscX eines der frühen translozierten Substrate des Typ III Apparates ist, wäre die zeitliche Abfolge, in der SycD und YscY am Translokationsapparat „andocken“, relativ dicht. Möglicherweise treffen YscY und SycD während der Translokation ihrer Wechselwirkungspartner am basalen Bereich des Sekretionsapparates aufeinander und können ihrerseits miteinander interagieren, nachdem die ATPase YscN die jeweiligen Chaperon/Substrat-Komplexe getrennt hat.

YscX konnte ebenso wie YscY nur unter denaturierenden Bedingungen gewonnen werden. Die Koexpression von YscY mit YscX ermöglichte die Reinigung von geringen Mengen YscY/YscX-Komplex. Die Interaktion der Proteine hat somit eine löslichkeitsvermittelnde Wirkung, vermutlich durch die Maskierung stark hydrophober Bereiche in beiden Proteinen. Bisher wurden nur in *P. aeruginosa* mit Pcr3 und Pcr4 ähnliche Proteine zu YscX und YscY nachgewiesen (Yahr *et al.* 1996; Day & Plano

¹⁷Ulrich Welsch, Ludwig-Maximilians-Universität München, Anatomische Anstalt, Pettenkoferstraße 11, 80336 München

2000). Sowohl Mutationen in *pcr3* und *pcr4* als auch Mutationen in *yscX* und *yscY* führen zur Repression der Typ III Sekretion (Iriarte & Cornelis 1999; Yang *et al.* 2007). *YscX* und *yscY* sind Teil des *virA*-Lokus (Abbildung 56), der aus insgesamt sieben offenen Leserahmen besteht: *yscN*, *yopN*, *tyeA*, *sycN*, *yscX*, *yscY*, *lcrD* (Viitanen *et al.* 1990; Forsberg *et al.* 1991; Iriarte *et al.* 1998; Iriarte & Cornelis 1999). Während für *YscX* und *YscY* keine Interaktion mit *YopN*, das bei *Yersinia* vermutlich den Sekretionskanal blockiert, nachgewiesen werden konnte (Day & Plano 2000), interagieren *Pcr3* und *Pcr4* von *P. aeruginosa* mit dem *YopN*-homologen *PopN* (Yang *et al.* 2007). Außerdem interagiert *Pcr4* mit *Pcr1* (Yang *et al.* 2007), das möglicherweise das homologe Protein zu *TyeA* von *Yersinia* darstellt. In *Yersinia* blockieren *YopN* und *TyeA* vermutlich gemeinsam mit *LcrG* unter nicht-permissiven Bedingungen den Sekretionskanal (Forsberg *et al.* 1991; Sarker *et al.* 1998; Iriarte *et al.* 1998). Da für *PopN* und *Pcr1* aus *P. aeruginosa*, die mit *Pcr4* (*YscY*-homolog) interagieren, eine ähnliche Funktion vermutet wird (Yang *et al.* 2007), wäre denkbar, dass *YscY* wie von Iriarte und Cornelis postuliert einen Teil der Sekretionsmaschinerie darstellt (Iriarte & Cornelis 1999). Allerdings wurde in *P. aeruginosa* nachgewiesen, dass *Pcr4* (*YscY*-homolog) in den Kulturüberstand sezerniert wird, während *Pcr3* (*YscX*-homolog) nicht sezerniert wird (Yang *et al.* 2007). Dies ist konträr zu den Daten aus *Y. pestis*, wo *YscY* im Bakterienzytoplasma verbleibt, während *YscX* sezerniert wird (Day & Plano 2000). Dieser Unterschied könnte der Grund dafür sein, dass *Pcr4* eine *Yersinia yscY* Mutante nicht komplementieren kann, obwohl *Pcr4* in *Yersinia* an *YscX* bindet (Bröms *et al.* 2005). Diese Ergebnisse deuten trotz der Ähnlichkeiten der Proteine auf Unterschiede in der Regulation des T3SS in *Yersinia* und *Pseudomonas* hin.

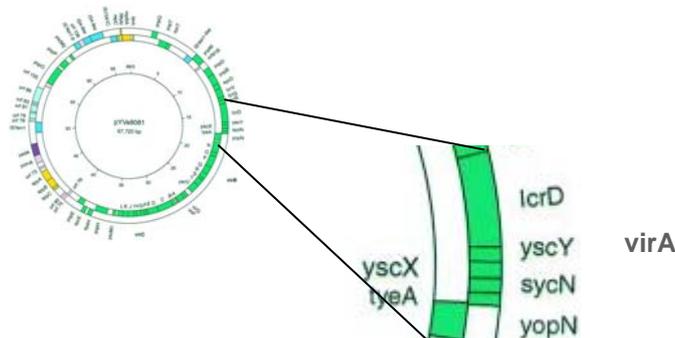


Abbildung 56: Ausschnitt aus der Plasmidkarte des pYV Plasmids aus *Y. enterocolitica* 8081 (mod. nach Snellings *et al.* (2001)).

Die Transkription der Gene im äußeren Ring erfolgt gegen den Uhrzeigersinn, die im inneren Ring im Uhrzeigersinn. Vergrößert dargestellt ist das *virA*-Operon.

Die Dimerisierung von Proteinen spielt darüber hinaus auch häufig eine wichtige Rolle, da sie nicht immer nur die Funktion der Stabilisierung der Proteine hat, sondern sie kann auch die Entstehung bzw. Maskierung von Interaktionsdomänen begünstigen (Marianayagam *et al.* 2004). Speziell bei der Bildung von Dimeren mit verschiedenen Partnern kann die Entstehung unterschiedlicher Interaktionsdomänen mit dementsprechend unterschiedlicher Substratspezifität gefördert werden (Marianayagam

et al. 2004). So verleihen die Proteine SycD, YscY und YscX durch die Bildung von Homodimeren (SycD), Heterodimeren (SycD/YscY, YscY/YscX) und Polymeren (YscY) der Zelle eine hohe Flexibilität. SycD interagiert außerdem mit TyeA und YscE (Swietnicki *et al.* 2004) und besitzt durch die Bildung von zwei alternativen Dimeren vermutlich zusätzliche Variabilität bezüglich der Substratspezifität (Büttner *et al.* 2008).

D.2 Die Wechselwirkung von Virulenzfaktoren mit der Phosphoenolpyruvatcarboxylase

Bereits vor 50 Jahren wurde in *Yersinia* ein Einfluss der Virulenz auf den Stoffwechsel beschrieben, als der Phänotyp der „Low calcium response“ (Lcr) beobachtet wurde (Kupferberg & Higuchi 1958; Higuchi *et al.* 1959). Das bedeutet, dass virulente *Yersinia* Spezies bei 37°C eine reduzierte Vermehrungsrate haben (Higuchi *et al.* 1959), die mit der massiven Expression und Sekretion von Yops einhergeht (Brubaker 1983; Straley *et al.* 1993) und die u.a. durch hohe Ca^{2+} -Konzentrationen (Higuchi *et al.* 1959; Brubaker & Surgalla 1964) aufgehoben werden kann. Da Natriumhydrogencarbonat eine ähnliche Wirkung wie Ca^{2+} -Ionen hat (Delwiche *et al.* 1959), wurde ein Zusammenhang mit der CO_2 -Fixierung vermutet (Baugh *et al.* 1964). Die Identifizierung eines Faktors, der auf molekularer Ebene für die Verknüpfung von Virulenzfunktion und Metabolismus verantwortlich ist, gelang aber nicht. In Vorarbeiten wurden jedoch YscM1 und YscM2 als Wechselwirkungspartner des Stoffwechsellzyms Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) identifiziert (Neumayer 2005). Damit wurde erstmals auf molekularer Ebene eine Verknüpfung zwischen T3SS-Faktoren und dem Stoffwechsel gezeigt. Studien aus anderen pathogenen Mikroorganismen weisen ebenfalls auf eine Verknüpfung zwischen Metabolismus und Virulenz hin (Rietsch *et al.* 2004; Munoz-Elias & McKinney 2006; Rietsch & Mekalanos 2006), allerdings konnte in keiner dieser Untersuchungen ein Virulenzfaktor als regulatorisches Element identifiziert werden.

D.2.1 Die Wechselwirkung von YscM1 und YscM2 mit der PEPC

Nachdem von Neumayer (2005) YscM1 und YscM2 mittels einer Affinitätsreinigung als neue Wechselwirkungspartner der PEPC identifiziert worden waren, wurde diese Interaktion zunächst im Nativgel mit rekombinanten Proteinen überprüft und bestätigt. Außerdem wurde mit der Charakterisierung der Wechselwirkung mittels eines Enzymassays begonnen (Neumayer 2005). Diese Arbeit wurde in der vorliegenden Promotion fortgesetzt. Von YscM1 konnte gezeigt werden, dass es die PEPC konzentrationsabhängig inhibiert. Möglicherweise ist also anders als von Zahorchak *et al.* (1979) zunächst vorgeschlagen die Ursache für die Wachstumsinhibition virulenter *Yersinien* bei 37°C nicht die massive Produktion von Effektorproteinen, sondern die Wechselwirkung von YscM1 mit der PEPC. Die Überprüfung von YscM2 hingegen ergab, dass YscM2 *in vitro* keinen signifikanten

Einfluss auf die Aktivität der PEPC hat. Dies ist nicht konsistent mit den Ergebnissen von Neumayer (2005), dass YscM2 als Aktivator der PEPC fungiert. Da in der vorliegenden Arbeit die 100-fache Menge YscM2 gegenüber den Messreihen von Neumayer (2005) eingesetzt wurde und dennoch kein Aktivierung der PEPC gezeigt werden konnte, handelt es sich bei YscM2 vermutlich nicht um einen Aktivator der PEPC. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Überproduktion der YscM Proteine in *Y. enterocolitica* unter PEPC-abhängigen Bedingungen im YscM1-exprimierenden Stamm zu einer Wachstumsinhibition führt, während die Überexpression von YscM2 keinen Einfluss auf das Wachstum von *Y. enterocolitica* hat. Dies bestätigt die negativ-regulatorische Funktion auf die PEPC Aktivität, die YscM1 auch im Enzymassay zugewiesen werden konnte. Die Strukturanalyse der PEPC in Anwesenheit von YscM1 bzw. YscM2 mittels Röntgenkleinwinkelstreuung ergab, dass beide YscM Proteine Konformationsänderungen des Enzyms induzieren. Die durch YscM1 und YscM2 hervorgerufenen Veränderungen waren zudem deutlich voneinander zu unterscheiden. Dies legt die Vermutung nahe, dass YscM1 und YscM2 einen unterschiedlichen Einfluss auf die PEPC haben. Mit ¹³C-Markierungsexperimenten unter PEPC-abhängigen Wachstumsbedingungen zeigten Mutanten in *ppc*, *yscM1* und *yscM2* im Vergleich zum Wildtyp ein verändertes Markierungsmuster. Die deutlichste Abweichung wurde bei der *ppc* Mutante beobachtet, während die *yscM1* und *yscM2* Mutanten einen intermediären Phänotyp zwischen Wildtyp und *ppc* Mutante hatten. An dieser Stelle wäre die Untersuchung einer *yscM1/yscM2* Doppelmutante interessant, um zu überprüfen, ob diese wiederum mit der *ppc* Mutante vergleichbar ist. Die Analyse einer solchen Mutante ist allerdings nicht trivial, da sie bezüglich der Yop-Sekretion dereguliert ist (Stainier *et al.* 1997) und es somit zu einer Überlagerung von Stoffwechseleffekten und T3SS-Effekten kommt.

Neben dem oben beschriebenen Einfluss auf die PEPC Aktivität kann YscM1 die aktivierende Wirkung des allosterischen Regulators Acetyl-CoA auf die PEPC aufheben. Acetyl-CoA stellt einen zentralen Knotenpunkt des bakteriellen Stoffwechsels dar, da es als Maß für die Syntheseleistung der Zelle dient. Wenn der Citratzyklus nicht mehr genügend Oxalacetat als Akzeptor für die Acetyl-Gruppe zur Verfügung stellen kann, sammelt sich Acetyl-CoA an. Dies tritt ein, wenn dem Zyklus für Biosyntheszwecke zu viele Zwischenprodukte entzogen werden. Die Menge an Acetyl-CoA kann also in einen direkten Zusammenhang zur Syntheseleistung der Zelle gesetzt werden. Acetyl-CoA aktiviert die PEPC, die dann durch die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat Oxalacetat generiert und damit den Citratzyklus auffüllt. YscM1 könnte als Antagonist von Acetyl-CoA während der Infektion den Stoffwechsel kurzzeitig in eine andere Richtung modulieren als es der metabolische Status der Zelle unter normalen Bedingungen tun würde. Interessant ist, dass in *Pseudomonas* ebenfalls vermutet wird, dass Acetyl-CoA oder dessen Derivate eine zentrale Rolle bei der Regulation des Metabolismus zugunsten der Virulenz darstellen könnten (Rietsch & Mekalanos 2006).

Bei der Bestimmung von Inhibitorkonzentrationen *in vitro* in Enzymassays muss darüber hinaus immer bedacht werden, dass die Umgebung für solche Reaktionen *in vivo* völlig anders ist. Bei solchen intrazellulären Prozessen muss vor allem das Phänomen des „molecular crowding“ beachtet

werden. Das bedeutet, dass ein signifikantes Volumen jeder Zelle durch die verschiedensten Makromoleküle und kleinere gelöste Substanzen belegt ist (Fulton 1982; Zimmerman & Trach 1991). Dabei handelt es sich nicht nur um frei diffundierende Moleküle, sondern viele Proteine bilden große funktionelle Komplexe (z.B. Ribosomen) oder Polymere (z.B Aktin) (Ellis & Minton 2003). Darüber hinaus führt die Hydrathülle, die sich in wässrigem Millieu um Ionen bildet und dadurch deren effektive Größe erhöht, zu einer weiteren Zunahme der Dichte im Zytoplasma. Unter solchen Bedingungen interagieren die meisten Moleküle durch eine unspezifische sterische Abstoßung miteinander. Die hohe Molekülkonzentration kann aber auch die kinetischen oder biophysikalischen Eigenschaften eines Proteins drastisch beeinflussen, da jede Art von Reaktion, die das zugängliche Volumen erhöht, durch das „crowding“ begünstigt wird (Chebotarev *et al.* 2004). Dies trifft auch auf die allosterische Transition von Proteinen durch die Bindung allosterischer Liganden zu, da dieser Vorgang mit unterschiedlich kompakten Zuständen des Proteins einhergeht (Chebotarev *et al.* 2004). „Crowding“ hat einen komplexen Effekt auf die Rate biochemischer Reaktionen, da einerseits die thermodynamischen Raten der Reaktionspartner ansteigen, aber gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens zweier Reaktionspartner sinkt (Chebotarev *et al.* 2004). Im Fall von YscM1 und YscM2 würde dies bedeuten, dass die Wechselwirkung mit der PEPC begünstigt wird, da sie, wie in den SAXS-Analysen gezeigt, zu einer kompakteren Struktur der PEPC führt. Damit geht einher, dass vermutlich niedrigere Konzentrationen von YscM1 notwendig sind, um den im Enzymassay gezeigten Effekt in der Zelle zu erzielen.

Darüber hinaus ist bemerkenswert, dass lediglich *Y. enterocolitica* über YscM2 verfügt (Stainier *et al.* 1997), während *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* kein Homologes zu YscM2 aufweisen. Beide verfügen mit LcrQ lediglich über ein Homologes zu YscM1. YscM2 ist vermutlich durch eine Genduplikation aus LcrQ entstanden (Stainier *et al.* 1997). Bisher wurden YscM1 und YscM2 aus *Y. enterocolitica* als funktionell äquivalente negative Regulatoren der Typ III Sekretion beschrieben (Stainier *et al.* 1997). Bezüglich der beschriebenen regulatorischen Funktion für die Typ III Sekretion scheinen die beiden Kopien funktionell austauschbar zu sein, aber aus evolutionärer Sicht erklärt dies nicht die stabile Etablierung beider Proteine, da dem Bakterium zwei Kopien eines Gens mit gleicher Funktion vermutlich keinen Vorteil verschaffen. Möglicherweise erlaubte daher die zweite Kopie des Gens zunächst eine bessere Feinabstimmung auf die Lebensbedingungen des Erregers während der Infektion. Die Anhäufung von Mutationen in YscM2 hat dann dazu geführt, dass sich die Gene auseinanderentwickelt haben, was sich auch in den unterschiedlichen isoelektrischen Punkten von YscM1 (pI 6,05) und YscM2 (pI 9,79) widerspiegelt. Der unterschiedliche pI spricht daher neben dem evolutionären Gesichtspunkt für die Ausbildung einer neuen Funktion für YscM1 und/oder YscM2, in der sich die beiden Proteine darüber hinaus voneinander unterscheiden. Diese zusätzliche Funktion, die die stabile Koexistenz zweier Kopien des Gens rechtfertigen würde, könnte die Modulation der Enzymaktivität der PEPC sein. Außerdem werden die korrespondierenden Gene von unterschiedlichen Promotoren reguliert, obwohl YscM1 und YscM2 zeitgleich im Zytoplasma vorliegen (Cambronne *et*

al. 2004). Nur *yscM1* steht unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors VirF, der die Expression einer Vielzahl von Virulenzgenen temperaturabhängig reguliert (Cornelis *et al.* 1989a). Auch dieser Unterschied deutet darauf hin, dass die YscM Proteine für die Zelle eine unterschiedliche Bedeutung haben, und es möglicherweise Situationen gibt, in denen sie nicht zeitgleich oder in unterschiedlichen Konzentrationen in der Zelle vorkommen.

Da YscM1 und YscM2 nicht nur für die negative Regulation der Typ III Sekretion verantwortlich sind, sondern durch die Wechselwirkung mit der PEPC auch in den bakteriellen Stoffwechsel eingreifen, sind sie typische Beispiele für „moonlighting“ Proteine. Unter „moonlighting“ versteht man, dass ein Gen nicht nur für ein Protein mit einer einzigen Funktion kodiert, sondern Proteine in der Zelle ganz unterschiedliche Aufgaben erfüllen können (Jeffery 1999). Diese Funktionen können durch die Lokalisation, Oligomerisierung oder Bindung an Substrate, Produkte und Kofaktoren induziert werden (Jeffery 1999). Während Cambronne *et al.* (2004) nachweisen konnten, dass die negativ-regulatorische Funktion von YscM1 und YscM2 auf die Typ III Sekretion durch den C-Terminus der Proteine vermittelt wird, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der N-Terminus von YscM1 für die Modulation der PEPC Aktivität verantwortlich ist. Möglicherweise kann den beiden Proteinen außerdem eine dritte Funktion zugeordnet werden, da sie auch in eukaryotische Wirtszellen transloziert werden (Cambronne *et al.* 2000; Cambronne *et al.* 2004). Bisher konnte ihnen dort kein Effekt zugeordnet werden, aber eine Translokation zytoplasmatischer Proteine über ein komplexes System wie das T3SS, um sie lediglich aus der Bakterienzelle zu entfernen, erscheint unwahrscheinlich. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass beide YscM Proteine durch Thrombin gespalten werden, was möglicherweise zur Aktivierung der Proteine führen könnte (Wilharm *et al.* 2003). Ein möglicher Ansatz, um Zielstrukturen in der eukaryotischen Zelle zu identifizieren, wären Affinitätsbindungsexperimente.

Sowohl YscM1 als auch YscM2 bilden in Lösung Dimere (Wilharm *et al.* 2003) und sind auf posttranskriptionaler Ebene an der Regulation der Yop-Expression beteiligt (Cambronne & Schneewind 2002). Darüber hinaus ist interessant, dass bisher in keinem anderen Mikroorganismus ein Homologes zu den YscM Proteinen identifiziert wurde. Yersinien haben möglicherweise mit diesen beiden Proteinen einen einzigartigen Weg zur Regulation der Typ III Sekretion entwickelt. Außerdem weisen die YscM Proteine hohe Homologie zum N-Terminus des Typ III-Effektors YopH auf, der die Chaperonbindedomäne (CBD) für das Chaperon SycH enthält (Rimpiläinen *et al.* 1992; Stainier *et al.* 1997). Vermutlich bedingt durch diese Homologie binden YscM1 und YscM2 an SycH (Cambronne *et al.* 2000; Cambronne *et al.* 2004). Die Bindungsaffinität der YscM Proteine für das Chaperon SycH ist jedoch unterschiedlich (Swietnicki *et al.* 2004; Cambronne *et al.* 2004). Dies könnte auf eine Wirkung der Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten hindeuten, da die Bindung an SycH bestimmte Funktionen von YscM1 und YscM2 aktivieren oder deaktivieren könnte. Allerdings wird durch die Bindung an SycH die negativ-regulatorische Funktion von YscM1 und YscM2 auf das T3SS gleichermaßen aufgehoben (Cambronne *et al.* 2000; Cambronne & Schneewind 2002). Dagegen schwächt die Bindung von SycH an YscM1 den negativen Einfluss auf die Aktivität der PEPC im Enzymassay lediglich ab,

unterbindet ihn aber nicht völlig. Da es schwierig ist zu bestimmen, ob der YscM1/SycH-Komplex im Reaktionsansatz für den Assay dissoziiert, wäre auch denkbar, dass die abgeschwächte Inhibition der PEPC Aktivität nicht durch den Komplex, sondern durch freigesetztes YscM1 verursacht wird. Dies ist aber unwahrscheinlich, da der Komplex mittels Gelfiltration gereinigt werden kann und auch unter relativ harschen Bedingungen im elektrischen Feld kaum dissoziiert. YscM1 liegt im Komplex mit SycH anders als in Lösung als Monomer vor, das von einem SycH-Dimer oder -Tetramer gebunden wird (Cambronne *et al.* 2004; Neumayer 2005). Dadurch könnte die Interaktion mit der PEPC unterbunden oder verändert werden. Da aufgrund des Größenunterschieds der PEPC (Tetramer: 400 kDa) zu YscM1 bzw. YscM2 (Dimere: 26 kDa) die niedrigauflösende Struktur aus der SAXS-Analyse keine Aussagen über die Bindestelle und -art erlaubt, ist nicht bekannt, ob die YscM Proteine als Monomer oder Dimer an die PEPC binden. Um den Bindebereich von YscM1 und YscM2 an die PEPC einzugrenzen, wäre ein Verdau der PEPC-YscM-Komplexe mit einer Protease und die anschließende Analyse der entstandenen Peptide mittels Massenspektrometrie möglich.

In der Basensequenz von *yscM2* existiert ein zweites Startcodon kurz nach dem ersten Startcodon. Bisher konnte nicht geklärt werden, an welchem der beiden Startcodons der Translationsstart erfolgt. In Abhängigkeit vom verwendeten Translationsstart haben die resultierenden Proteine eine Länge von 112 bzw. 116 Aminosäuren. In dieser Arbeit wurde von einem Translationsstart am ersten Startcodon ausgegangen. Die zwei Startcodons könnten für die Zelle eine zusätzliche Option darstellen die Funktion von YscM2 zu modulieren. Da in dieser Arbeit dem YscM2₁₁₆ im Enzymassay kein Einfluss auf die PEPC zugeordnet werden konnte, wäre es interessant zusätzlich YscM2₁₁₂ zu überprüfen. Die Existenz einer kürzeren Variante von YscM2 könnte die Diskrepanz zwischen den Daten aus ¹³C-Markierungsexperimenten mit einer *Y. enterocolitica yscM2* Mutante und den Daten aus dem Enzymassay und den Überproduktionsexperimenten mit dem YscM2₁₁₆ erklären. Möglicherweise hat das YscM2₁₁₆ die Bindeaktivität an die PEPC beibehalten, was im Nativgel (Neumayer 2005) und durch die SAXS-Analyse bestätigt werden konnte, aber lediglich das YscM2₁₁₂ wäre in der Lage einen Einfluss auf die Enzymaktivität der PEPC auszuüben. Denkbar ist auch, dass YscM2 einen bisher nicht identifizierten Kofaktor benötigt. Darüber hinaus könnten die seit einiger Zeit bekannten „riboswitches“ eine Rolle spielen. Das sind strukturelle Domänen im nicht-kodierenden Bereich von mRNA Molekülen, die kleine Metabolite binden, und so die Transkription oder Translation des entsprechenden Gens positiv oder negativ beeinflussen (Brantl 2004). „Riboswitches“ wurden bereits in der Leadersequenz zahlreicher metabolischer Gene gefunden, um die Expression dieser Gene auf die Anwesenheit bestimmter Metabolite abzustimmen (Nudler & Mironov 2004). Im Fall von YscM2 wäre denkbar, dass Acetyl-CoA, Phosphoenolpyruvat oder Oxalacetat an die mRNA von *yscM2* binden und so die Translation vom ersten oder zweiten Startcodon steuern.

Des Weiteren ist die Wechselwirkung der YscM Proteine mit den T3SS-Chaperonen ein interessanter Aspekt. In Abbildung 57 sind die Proteine dargestellt, die direkt oder möglicherweise indirekt mit YscM1 und YscM2 interagieren. Die Abbildung macht deutlich, dass die T3SS-Regulatoren YscM1

und YscM2 neben der PEPC mit dem Großteil der T3SS-Chaperone wechselwirken. Lediglich für SycT und das Heterodimer SycN/YscB wurde bisher keine Interaktion mit den YscM Proteinen gezeigt. Von vielen T3SS-Chaperonen wurde bereits nachgewiesen, dass sie neben der Funktion als Chaperon auch an der Regulation der Typ III Sekretion beteiligt sind, was die Wechselwirkung der Syc Chaperone mit den YscM Regulatoren besonders interessant macht. So wurde beispielsweise von dem SycD-homologen IpgC aus *S. flexneri* gezeigt, dass es nach der Translokation seiner Substrate mit MxiE interagiert und an der Transkription von T3SS-Genen beteiligt ist (Pilonieta & Munson 2008). Von SycD wurde postuliert, dass es im Komplex mit YopD und den YscM Proteinen an nicht-translatierte 5'-Bereiche der *yop*-mRNA bindet und die Transkription unterbindet (Abbildung 59) (Cambronne & Schneewind 2002). Darüber hinaus wäre daher denkbar, dass die Chaperone auch in die Verknüpfung von Virulenz und Stoffwechsel eingebunden sind. Ein Eingriff der Chaperone in den Metabolismus könnte bereits im Komplex mit ihrem Substrat erfolgen oder alternativ könnten die Chaperone erst nach der Translokation ihrer Effektoren für neue Funktionen zur Verfügung stehen. Daher wurde überprüft, ob die Chaperone einen direkten Einfluss auf die Aktivität der PEPC ausüben oder die Bildung von Chaperon/YscM1-Komplexen die Hemmung der PEPC durch YscM1 beeinflusst. Es konnte jedoch lediglich dem Chaperon SycO eine Bedeutung für die Wechselwirkung von YscM1 mit der PEPC zugeordnet werden. Der Komplex von YscM1 mit dem Chaperon SycO scheint so stabil zu sein, dass die Inhibition der PEPC durch YscM1 unterbunden wird. Um die physiologische Relevanz dieses Ergebnisses verstehen zu können, wären in einem nächsten Schritt Analysen zum intrazellulären Mengenverhältnis von YscM1 zu SycO aber auch zur PEPC und die Bestimmung von Bindungskonstanten erforderlich. Da die meisten T3SS-Chaperone weder direkt noch indirekt über YscM1 vermittelt Einfluss auf die PEPC nehmen, wäre eine andere Bedeutung der Chaperone und ihrer Interaktion mit den YscM Proteinen für die Typ III Sekretion denkbar. Die Interaktion der YscM Proteine mit den T3SS-Chaperonen könnte dazu dienen, die Information der Beladung der Chaperone mit Yops mit der Regulation der Aminosäuresynthese über die PEPC abzustimmen. Über die Wechselwirkung der YscM Proteine mit den T3SS-Chaperonen könnte die Menge an nichtbeladenen Chaperonen bestimmt und diese Information in die Repression oder Derepression der Yop-Translation übersetzt werden. Dies könnte, wie in Abbildung 55 gezeigt, direkt über eine Wechselwirkung der Substrat/Chaperon/YscM-Komplexe mit der *yop*-mRNA erfolgen. Nach Translokation der Effektoren könnte durch YscM1 die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Inhibition der PEPC vermittelt werden. So ermöglicht YscM1 die Modulation des Metabolismus entweder in Richtung Biosynthese oder zur Bereitstellung von Energie.

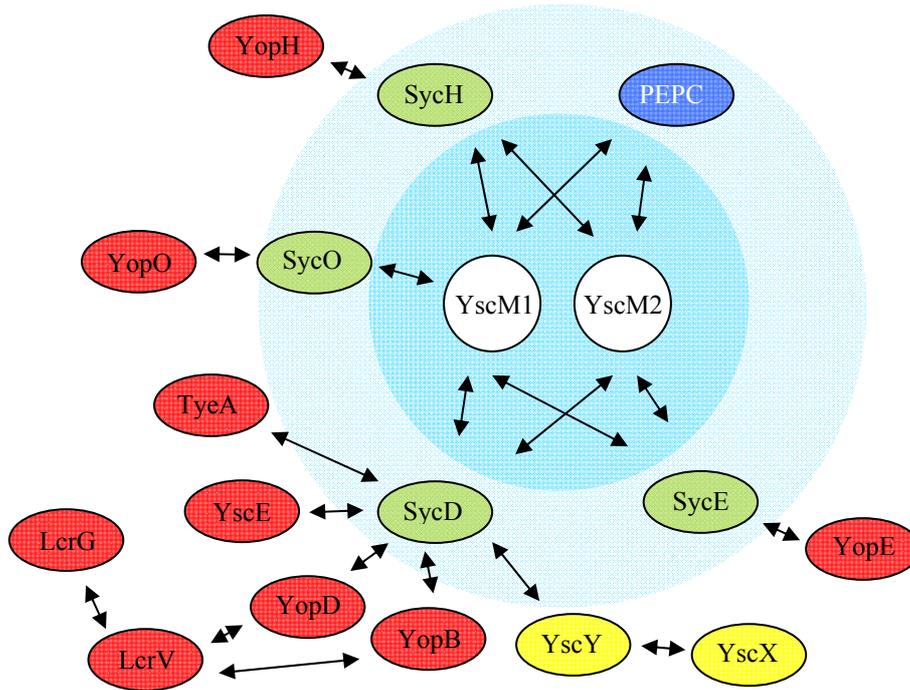


Abbildung 57: Übersicht über die T3SS-Proteine, die mit YscM1 und YscM2 interagieren, und deren Wechselwirkungspartner.

Im hellblauen Ring sind die direkten Wechselwirkungspartner der YscM Proteine dargestellt. Die Chaperone sind grün dargestellt, die PEPC blau. Außerhalb des hellblauen Kreises sind Proteine dargestellt, die mit den Interaktionspartnern der YscM Proteine wechselwirken. YscY und YscX sind gelb dargestellt, alle anderen in dieser Arbeit nicht näher charakterisierten Proteine sind rot dargestellt.

D.2.2 Die Wechselwirkung von YopH mit der PEPC

Der Effektor YopH wurde von Guan & Dixon (1990) als Protein-Tyrosinphosphatase (PTPase) identifiziert. Der N-Terminus des Proteins beinhaltet das Sekretionssignal und die Bindungsstelle für das Chaperon SycH (Wattiau *et al.* 1994; Sory & Cornelis 1994). Dieser Bereich weist eine hohe Homologie zu den T3SS-Regulatoren YscM1 und YscM2 auf (Rimpiläinen *et al.* 1992; Stainier *et al.* 1997). Ähnlich wie YscM1 und YscM2 (Wilharm *et al.* 2003) bildet YopH bei neutralem pH Dimere (Smith *et al.* 2001). Die Fähigkeit von YopH ebenso wie YscM1 die Aktivität der PEPC zu hemmen, beruht daher wohl auf Gemeinsamkeiten im N-Terminus. Erste Versuche deuten darauf hin, dass die Inhibition der PEPC in abgeschwächter Form auch durch den YopH/SycH-Komplex erfolgt. Da YopH und SycH außerdem jeweils eine eigene Transkriptionseinheit darstellen (Wattiau *et al.* 1994), wäre es möglich, dass nicht immer alle YopH Moleküle an SycH gebunden vorliegen, was einen zusätzlichen Regulationsmechanismus für die Zelle darstellt. Des Weiteren wirkt YopH ebenso wie YscM1 als Antagonist von Acetyl-CoA, dem vermutlich wichtigsten allosterischen Aktivator der PEPC. Bisher konnte von keinem Pathogen mit T3SS gezeigt werden, dass ein Effektor neben der Funktion in der Wirtszelle bereits im Bakterium eine wichtige Funktion hat. Daher ist es mit der momentanen Datenlage schwierig, die Bedeutung der beobachteten Inhibition einzuordnen. Sicherlich sind weitere Studien, wie sie in der vorliegenden Arbeit auch für YscM1 durchgeführt wurden, notwendig. Zum

einen wären SAXS-Analysen im Fall von YopH besonders gut geeignet, da YopH wesentlich größer ist als YscM1 und damit unter Umständen sogar eine Lokalisierung des Interaktionsbereichs mit der PEPC möglich wäre. Zum anderen müssten mit einer *yopH* Mutante ¹³C-Markierungsexperimente durchgeführt werden, um die Relevanz der Wechselwirkung mit der PEPC nachzuweisen und die erhaltenen Daten mit den Ergebnissen für die *yscM1* und *yscM2* Mutanten zu vergleichen. In einem weiteren Schritt könnte dann eine *yscM1/yopH* Mutante charakterisiert werden.

D.2.3 Die Bedeutung der PEPC Reaktion und ihrer Regulation für *Yersinia*

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals auf molekularer Ebene gezeigt werden, dass Virulenzfaktoren mit dem Stoffwechsel des Bakteriums interagieren. Der Effektor YopH und der Regulator YscM1 haben einen inhibitorischen Einfluss auf die PEPC. Dem Regulator YscM2 konnte bisher *in vitro* und in Überexpressionsexperimenten kein Einfluss auf die Aktivität der PEPC zugeordnet werden, obwohl zweifelsfrei eine Interaktion mit der PEPC nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren führen ¹³C-Markierungsexperimenten mit Mutanten in *yscM1* und *yscM2* ähnlich wie mit einer *ppc* Mutante zu einem veränderten Spektrum der analysierten Peptidfragmente. Das Peptidspektrum der *ppc* Mutante zeigt eine Verschiebung hin zu einem geringeren Masse/Ladungsverhältnis, da die Mutante auf die Aufnahme gewisser Aminosäuren aus dem Medium angewiesen ist. Die *yscM1* und *yscM2* Mutante zeigen eine weniger ausgeprägte Verschiebung hin zu einem geringeren Masse/Ladungsverhältnis, was aber dennoch darauf hindeutet, dass sowohl YscM1 als auch YscM2 einen Einfluss auf die PEPC haben. Die PEPC spielt im Stoffwechsel des Bakteriums eine zentrale Rolle (Sauer & Eikmanns 2005). Für die Synthese von Aminosäuren werden dem Citratzyklus permanent Zwischenprodukte entzogen. Als Endprodukt des Zyklus dient Oxalacetat als Akzeptor für die Acetyl-Gruppe des Acetyl-CoA. Werden dem Citratzyklus viele Zwischenprodukte wie α -Ketoglutarat und Oxalacetat für Biosynthesezwecke entzogen, kommt er zum Erliegen. Um das zu verhindern führt die PEPC eine anaplerotische Reaktion aus. Dabei wird Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat carboxyliert und somit der Citratzyklus aufgefüllt. Da *Yersinia* keine Pyruvatcarboxylase besitzen, die Oxalacetat aus Pyruvat regeneriert, sind sie besonders stark auf die anaplerotische PEPC Reaktion angewiesen. Abbildung 58 gibt einen Überblick über die PEPC Reaktion im Kontext des bakteriellen Stoffwechsels und zeigt gleichzeitig die Komplexität der Regulation der PEPC Aktivität.

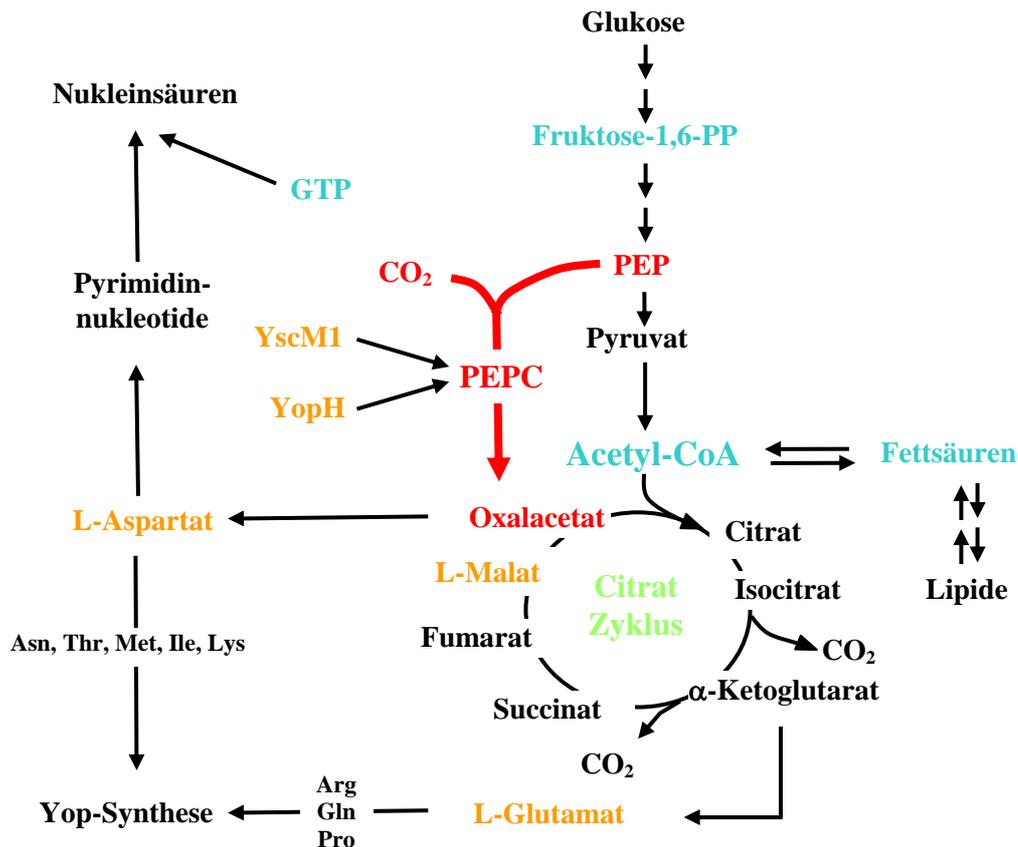


Abbildung 58: Die PEPC Reaktion im Kontext des bakteriellen Stoffwechsels.

Die PEPC katalysiert eine anaplerotische Reaktion, indem sie dafür sorgt, dass genügend Oxalacetat als Akzeptor für Acetyl-CoA zur Verfügung steht. Aufgrund ihrer zentralen Rolle für den bakteriellen Stoffwechsel, wird die PEPC vielfältig von allosterischen Effektoren reguliert. Die PEPC Reaktion ist rot abgebildet, Aktivatoren der PEPC sind blau und Inhibitoren orange dargestellt.

Stoffwechsel und Virulenz können wechselseitig aufeinander Einfluss nehmen, um optimale Bedingungen für die Infektionssituation zu schaffen. Der Einfluss des Stoffwechsels auf die Virulenz könnte damit erklärt werden, dass sich eine Virulenz erst ausprägen kann, wenn bestimmte grundsätzliche metabolische Voraussetzungen erfüllt sind, wie beispielsweise eine ausgeglichene Energiebilanz oder die Bereitstellung von Bausteinen für Biosynthesen. Während die Einflussnahme der Virulenz auf den Stoffwechsel bisher kaum Beachtung gefunden hat, wird die Einflussnahme des Stoffwechsels auf die Virulenz intensiv untersucht. So ist in *Y. enterocolitica* und *P. aeruginosa* bekannt, dass das Signalmolekül cAMP für eine normale Virulenz wichtig ist (Petersen & Young 2002; Wolfgang *et al.* 2003; Smith *et al.* 2004). Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die „stringent response“, die durch die Limitierung der Nährstoffe ausgelöst und über das Signalmolekül ppGpp vermittelt wird (Godfrey *et al.* 2002). Sie ist an der Kontrolle des T3SS von *Salmonella* beteiligt (Pizarro-Cerda & Tedin 2004). In *P. aeruginosa* ist eine intakte Pyruvatdehydrogenase für die Sekretion der Effektoren des T3SS notwendig (Dacheux *et al.* 2002). Während von den Autoren eine direkte Rolle der Pyruvatdehydrogenase als Transkriptionsfaktor postuliert wurde, vermuten Rietsch *et al.* (2004) einen indirekten Mechanismus, bei dem die Deletion des Pyruvatdehydrogenase-Gens den metabolischen Status der Zelle derart verändert, dass im Gegenzug die Expression der T3SS-Gene beeinflusst wird. Diese Hypothese

ist konsistent mit der Beobachtung, dass bei einer weiteren Mutation in einem Zweikomponenten-System zur Messung des metabolischen Zustands der Zelle die Repression der Effektorexpression teilweise aufgehoben wird (Rietsch *et al.* 2004). Rietsch *et al.* (2004) betonen, dass die Erreger am Infektionsort mit neuen Wachstumsbedingungen konfrontiert werden, was zu einer spezifischen Koordination von Metabolismus und Virulenz führen muss. Darüber hinaus wurde in *P. aeruginosa* Acetyl-CoA selbst oder ein Derivat von Acetyl-CoA als wichtiger Faktor für die Regulation der Typ III Sekretion identifiziert (Rietsch & Mekalanos 2006). Dies deutet darauf hin, dass der Zustand des Metabolismus tatsächlich auf das Typ III-Regulon einwirkt und, dass die Zelle beim Wachstum im Wirt physiologische Veränderungen erlebt, die direkt die Fähigkeit der Bakterien beeinflussen, wichtige Virulenzfaktoren zu bilden (Rietsch & Mekalanos 2006). Es wäre jedoch auch denkbar, dass in Pseudomonaden ein ähnlicher Mechanismus wie in *Yersinia* existiert, indem ein virulenzassoziiertes Faktor den Stoffwechsel beeinflussen kann. Dieser Faktor könnte jedoch nicht über Homologien zu YscM1 identifiziert werden, da bisher bei anderen bakteriellen Erregern mit T3SS keine homologen Proteine zu den YscM Proteinen identifiziert wurden.

Pathogene Mikroorganismen, die ein T3SS verwenden, müssen aber nicht nur in der Lage sein zu bestimmen, ob die Bedingungen für die Expression von Virulenzfaktoren geeignet sind, sondern sie müssen auch den Stoffwechsel auf die massive Synthese von Effektorproteinen anpassen können. Das bedeutet, dass nicht nur der Großteil der Syntheseleistung auf die Effektorproduktion gelenkt werden muss, sondern parallel eine Inhibition nicht-essentieller Syntheseaktivitäten erfolgen muss. Die erste mögliche Verknüpfung zwischen Virulenz und Stoffwechsel bei *Yersinia* wurde als der Phänotyp der „Low calcium response“ (Lcr) beschrieben (Kupferberg & Higuchi 1958; Higuchi *et al.* 1959). Der Eingriff in den Stoffwechsel wurde durch die Inhibition des Wachstums virulenter *Yersinia* Stämme bei 37°C deutlich (Higuchi *et al.* 1959). Als essentieller Faktor für die Modulation des Stoffwechsels wurde das pYV Plasmid isoliert, das für das T3SS kodiert (Gemski *et al.* 1980; Portnoy *et al.* 1984; Portnoy & Martinez 1985). Damit konnte zwar eine eindeutige Verknüpfung zwischen Virulenz und dem beobachteten Wachstumseffekt hergestellt werden, aber der dafür verantwortliche molekulare Mechanismus blieb unklar. Allerdings wurden verschiedene Medienzusätze identifiziert, die die Wachstumsinhibition bei 37°C aufheben konnten: Ca²⁺-, Sr²⁺-, Zn²⁺-Ionen (Kupferberg & Higuchi 1958; Higuchi *et al.* 1959; Brubaker & Surgalla 1964), Aspartat, Glutamat, Hydrogencarbonat (Delwiche *et al.* 1959). Mit der in dieser Arbeit gezeigten Modulation des Stoffwechsels durch die Virulenzfaktoren YscM1, YscM2 und YopH könnte es sich um die fehlende Verbindung zwischen dem Lcr-Phänotyp und der Wachstumsinhibition handeln. Damit wurde erstmals auf molekularer Ebene eine Verknüpfung zwischen Stoffwechsel und Virulenz gezeigt, die darüber hinaus durch Virulenzfaktoren vermittelt wird. Bereits kurz nach der Beschreibung der Lcr war von Baugh *et al.* (1964) vermutet worden, dass eine Verbindung zwischen der Lcr und der CO₂-Fixierung besteht, da in *Y. pestis* die Wachstumsinhibition durch Hydrogencarbonat aufgehoben werden kann. Es konnte jedoch keine Verbindung mit der PEPC oder der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK)

hergestellt werden. Da zu diesem Zeitpunkt das Virulenzplasmid noch nicht bekannt war, waren die Versuchsbedingungen möglicherweise nicht geeignet, um die vermutete Verknüpfung zwischen Lcr und Stoffwechsel nachzuweisen. Lee *et al.* (2001) konnten später zeigen, dass in *Yersinia* Glutamat, Glutamin, Aspartat und Asparagin die Typ III Sekretion induzieren können. Diese Daten lassen nicht nur eine Koordination von Metabolom und Virulon vermuten, sondern deuten darüber hinaus auch auf eine Rolle der PEPC-vermittelten anaplerotischen Reaktion für das T3SS hin.

Die unterschiedlich starke Ausprägung der Wachstumsinhibition zwischen *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* ist vermutlich auf die unterschiedliche Ausstattung der drei Spezies mit Stoffwechselenzymen zurückzuführen. Während die Zellteilung von *Y. pestis* bei 37°C in Abwesenheit von Ca²⁺-Ionen schnell inhibiert wird, erfolgt die Inhibition bei *Y. pseudotuberculosis* mit einer zeitlichen Verzögerung und bei *Y. enterocolitica* lässt sich lediglich eine Verlangsamung der Vermehrung beobachten (Carter *et al.* 1980). So ist *Y. pestis* aufgrund des Fehlens der Aspartase (Dreyfus & Brubaker 1978), die durch Abspaltung von Ammoniak die Bildung von Fumarat aus Aspartat katalysiert, besonders stark auf die CO₂-Fixierung in Oxalacetat durch die PEPC angewiesen. Eingriffe an dieser Stelle wären also speziell in *Y. pestis* besonders effizient und würden zu massiven Effekten auf die Vermehrung der Bakterien führen. Genomvergleiche zeigen, dass in *Y. pestis* viele Enzyme für Biosynthesewege inaktiviert wurden, was vermutlich die physiologischen Unterschiede bedingt, die zwischen den pathogenen *Yersinia*-Spezies beobachtet werden können (Chain *et al.* 2004). Unter anderem sind bei *Y. pestis* Enzyme des Methionin-Stoffwechsels und Enzyme für die Purin- und Aspartat-Synthese verloren gegangen (Mortlock 1962; Brubaker 1970; Dreyfus & Brubaker 1978), was zusätzlich die Bedeutung der PEPC unterstreicht. Aber auch zwischen *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* gibt es deutliche Unterschiede in der Ausstattung mit Stoffwechselenzymen (Thomson *et al.* 2006). Dies lässt vermuten, dass *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* im Wirt verschiedene Nischen belegen könnten (Thomson *et al.* 2006). Die Erklärung für die unterschiedlich ausgeprägte Wachstumsinhibition von *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* und die zusätzliche Existenz von YscM2 in *Y. enterocolitica* liegt daher wahrscheinlich in der physiologischen Bedeutung der PEPC für die jeweilige Spezies.

D.3 Modell für den Mechanismus der „Low calcium response“

Bei einer Yersinieninfektion wird durch die Körpertemperatur von 37°C im warmblütigen Wirt die Expression der Typ III-Gene und damit die Synthese von LcrQ/YscM1 und YscM2 induziert. Dadurch können LcrQ/YscM1 an die PEPC binden und die Enzymaktivität hemmen. Unter *in vitro* Kulturbedingungen wird die Wachstumsinhibition bei 37°C allerdings erst verursacht, wenn dem Kulturmedium zusätzlich Ca²⁺ entzogen wird, obwohl LcrQ/YscM1 bei 37°C auch in Anwesenheit von Ca²⁺ exprimiert werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass LcrQ/YscM1 intrazellulär mit SycH und YopD assoziiert ist bevor YopD sezerniert wird (Williams & Straley 1998; Wulff-Strobel *et al.*

2002). Durch die Bindung von LcrQ/YscM1 an YopD und SycD entsteht ein Komplex, der nach den Ergebnissen von Cambronne und Schneewind (2002) das *yop*-Virulon negativ regulieren könnte. Des Weiteren führt der Komplex möglicherweise zum Verlust der Bindungsaktivität von LcrQ/YscM1 an die PEPC, so dass die Hemmung der Enzymaktivität in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen unterbunden wird. Während zunächst lediglich eine indirekte Bindung der YscM Proteine über YopD an SycD vermutet wurde (Cambronne & Schneewind 2002), deuten die Ergebnisse von Swietnicki *et al.* (2004) darauf hin, dass die YscM Proteine im Komplex mit YopD und SycD mit beiden Proteinen Bindungen eingehen. Von Cambronne *et al.* (2004) wurde postuliert, dass dieser Komplex zerfällt, wenn die Translokation von YopD eingeleitet wird und die YscM Proteine an das Chaperon SycH binden, so dass die negativ regulatorischen Funktion auf die Yop-Translation unterbunden wird. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine Bindung an SycH alleine nicht ausreicht, um den Einfluss von LcrQ/YscM1 auf die PEPC Aktivität zu unterbinden. Daher könnte die Wechselwirkung mit SycD und YopD vor Beginn der Sekretion eine wichtige Rolle spielen. Bei Beginn der Translokation bzw. Sekretion wird zunächst YopD mit Hilfe seines Chaperons SycD aus der Zelle entfernt, so dass LcrQ/YscM1 freigesetzt wird. Es wäre möglich, dass YscM1 mit anderen T3SS-Chaperonen wie beispielsweise SycE und SycO und ihren Substraten vor Beginn der Translokation ebenfalls Komplexe bildet. Man könnte sich vorstellen, dass diese Komplexe in Anwesenheit der Yops besonders stabil sind und daher vor Beginn der Sekretion kaum freies YscM1 in der Zelle vorliegt. Mit Beginn der Sekretion zerfallen die Komplexe, so dass YscM1 mit der PEPC interagieren und ihre Enzymaktivität regulieren kann. YscM1 und möglicherweise auch YscM2 stellen also eine wichtige Schnittstelle dar, die eine koordinierte Abstimmung der Proteinbiosynthese (Effektorproduktion) und Bereitstellung von Energie auf die Repression oder Derepression der Yop-Translation erlauben könnten. Während der Einfluss auf Biosynthese und Energiegewinnung durch die Wechselwirkung mit der PEPC erfolgen könnte, wird der Einfluss auf die Yop-Translation möglicherweise durch die Interaktion mit den T3SS-Chaperonen vermittelt, deren Beladungszustand mit Yops die YscM Proteine messen und in die Repression oder Derepression der Yop-Translation übersetzen. Im Verlauf der Proteinsekretion werden auch LcrQ/YscM1 und YscM2 in einem Chaperon-abhängigen Prozess aus der Zelle transportiert (Pettersson *et al.* 1996; Cambronne *et al.* 2000; Cambronne *et al.* 2004). Aber Cambronne *et al.* (2004) konnten nachweisen, dass auch unter Sekretionsbedingungen YscM1 und YscM2 in der Bakterienzelle nachweisbar sind. Daher ist anzunehmen, dass die Wachstumsinhibition mit der in der Bakterienzelle verbliebenen Menge an LcrQ/YscM1 erklärt werden kann. Damit wäre nicht die massive Yop-Produktion für die Wachstumsinhibition der Yersinien verantwortlich (Zahorchak *et al.* 1979), sondern die direkte Einflussnahme von YscM1 auf die PEPC Aktivität unter Sekretionsbedingungen. In Abbildung 59 ist ein Modell dargestellt, wie Yop- und Syc-Proteine Einfluss auf den Metabolismus nehmen könnten.

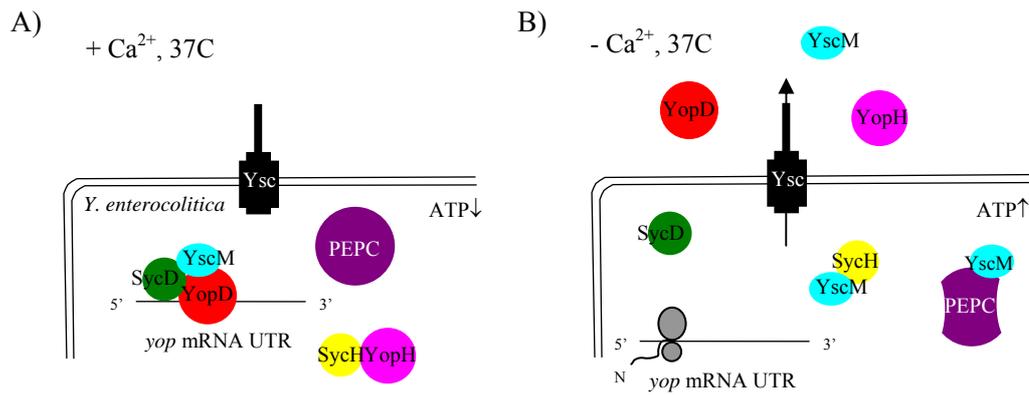


Abbildung 59: Modell für die regulatorische Wirkung von YscM1 *in vitro* (mod. nach Cambronne und Schneewind (2002)).

(A) Bei 37°C in Ca²⁺-haltigen Medium verhindern YopD, SycD, YscM1 und YscM2 die Translation der *yop*-mRNA durch Bindung an die 5'-UTR. Dennoch werden aber auch bei 37°C in Anwesenheit von Ca²⁺ geringe Mengen an Effektorproteinen in der Zelle gebildet. (B) Durch die Ca²⁺-Depletion wird die Sekretion von YopD und YscM1/YscM2 initiiert und die Inhibition der *yop*-mRNA-Translation aufgehoben. Dadurch könnte nun in der Zelle verbleibendes YscM1 und eventuell auch YscM2 für die Interaktion mit der PEPC frei werden und so den inhibitorischen Einfluss auf die PEPC ausüben, der die Vermehrung der Yersinien begrenzt. Ähnlich könnte der Mechanismus beim Kontakt mit einer Immunzelle aussehen.

Die Assemblierung und die Wirkungsweise des T3SS sind metabolisch anspruchsvoll. Besonders eindrucksvoll machen das Studien von Schlumberger *et al.* (2005) deutlich, die zeigen konnten, dass in *S. enterica* Serotyp *Typhimurium* ein präsynthetisierter Pool von $6 \pm 3 \times 10^3$ Molekülen des Effektors SipA innerhalb von 100-600 Sekunden in die Wirtszelle transloziert wird. Ähnliche Daten konnten die Autoren für den Effektor SopE gewinnen. Dies macht deutlich, dass sowohl die Effektorsynthese als auch die ATP-abhängige Translokation der Effektoren hohe Anforderungen an die Zelle stellt. Daher könnte die Modulation der PEPC in *Yersinia* erforderlich sein, um eine Anpassung an die verschiedenen metabolischen Erfordernisse während der Infektion zu ermöglichen. Im Verlauf der Infektion sind bezüglich der Modulation der PEPC zwei Phasen plausibel. Eine Phase ist durch die massive Synthese von Yops und anderen Komponenten des T3SS als Vorbereitung auf die Konfrontation mit Phagozyten charakterisiert („loading“). Unter diesen Bedingungen wäre die Bereitstellung von Vorstufen für die Aminosäuresynthese und damit eine aktive PEPC zur Aufrechterhaltung des Citratzyklus wichtig. Nach dem oben postulierten Modell (Abbildung 59) wäre in dieser Situation YscM1 in Chaperon/Substrat-Komplexen gefangen und könnte keinen Einfluss auf die PEPC ausüben. Die zweite Phase wird durch den Kontakt mit der Wirtszelle initiiert, der die rasche Injektion der präsynthetisierten Yops zur Folge hat („shooting“). Dabei könnte es für die Yersinien in erster Linie von Bedeutung sein, den Energiestatus der Zelle aufrecht zu erhalten und die Proteinsynthese in den Hintergrund zu rücken. Dies könnte durch die Inhibition der anaplerotischen Reaktion der PEPC erfolgen, nachdem YscM1 durch die Sekretion der Yops aus den Chaperon/Substrat-Komplexen freigesetzt wurde. Eine besonders wichtige Fähigkeit von YscM1 wäre dabei die antagonistische Wirkung auf Acetyl-CoA. Bei einer hohen Proteinsyntheseleistung („loading“) sammelt sich Acetyl-CoA in der Zelle an, weil viel Oxalacetat aus dem Citratzyklus entnommen wird, und führt zur Aktivierung der

PEPC. Soll während der zweiten Phase („shooting“) die PEPC herunterreguliert werden, muss YscM1 in der Lage sein, dem aktivierenden Effekt von Acetyl-CoA, das sich während der ersten Phase („loading“) der massiven Yop-Synthese angesammelt hat, entgegenzuwirken.

An welcher Stelle in dem in Abbildung 59 beschriebenen Modell YopH von Bedeutung sein könnte, ist bisher unklar. YopH gehört zu den Effektoren und wird *in vivo* in die Wirtszelle transloziert. Daher ist YopH möglicherweise nicht am Wechsel zwischen „loading“ und „shooting“ beteiligt. Es wäre jedoch denkbar, dass YopH, wenn es vor Induktion der Sekretion bzw. Translokation eine bestimmte intrabakterielle Konzentration überschreitet, zu einer leichten Inhibition der PEPC führt. Diese Inhibition könnte auch konzertiert mit YscM1 erfolgen. Durch die Bindung beider Proteine an andere Wechselwirkungspartner, speziell an SycH, wird die Inhibition der Enzymaktivität lediglich abgeschwächt. Das könnte zu einem intermediären Phänotyp führen, der bei 37°C in Anwesenheit von Ca²⁺ bzw. ohne Wirtszellkontakt eine normale Vermehrung der Yersinien erlaubt, aber als intrazelluläres Signal für das Yop-Sollniveau dient, was dann zur Verringerung der Yop-Synthese führen könnte. Dieses Modell wäre konsistent mit der Annahme, dass die Translokation von YopH in der ersten Phase nach dem Kontakt mit einer Wirtszelle post-translational erfolgt. Da der YopH Effekt auf Neutrophile bereits 10-20 Sekunden nach der Adhäsion der Yersinien nachgewiesen werden kann (Andersson *et al.* 1999), ist vermutlich für die Anfangsphase der Typ III Sekretion ein Pool von präsynthetisiertem YopH verantwortlich. Denkbar wäre auch ein völlig anderer Mechanismus für die Wechselwirkung von YopH mit der PEPC, da die Sekretionssituation *in vitro* (Ca²⁺-Depletion als Stimulus) nicht mit der Translokationssituation *in vivo* (Zellkontakt als Stimulus) vergleichbar ist. Da bisher nicht bekannt ist, wie die Ca²⁺-Depletion in ein Sekretionssignal übertragen wird und wie die genauen Wachstumsanforderungen *in vivo* aussehen, wäre auch plausibel, dass die Inhibition der PEPC durch YopH aber auch durch YscM1 zu anderen Zeitpunkten als bisher vermutet eine Bedeutung hat. Zudem erfolgt die Yop-Sekretion durch den künstlichen Stimulus *in vitro* über einen längeren Zeitraum, während inzwischen postuliert wird, dass der Kontakt mit der Wirtszelle während der Infektion *in vivo* häufig nur transient ist (Heesemann *et al.* 2006). Dieser sogenannte „kiss and run“-Mechanismus führt dazu, dass bei einem sehr kurzen Kontakt lediglich eine geringe Menge Effektoren in die Wirtszelle transloziert wird, um die Phagozytose der Erreger zu unterbinden, die Zellen aber nicht zu töten. Dieses Modell ist darüber hinaus konsistent mit Ergebnissen von Aili *et al.* (2008), dass YopE nach der Translokation in die Wirtszelle über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Menge an translozierten Yops misst und ein Signal an die zellassoziierten Bakterien sendet, das zur Repression der Yop-Translokation führt. Bei diesem Modell würden große Mengen an YopH und YscM1 in der Zelle verbleiben, so dass auch in diesem Stadium der Infektion eine Regulation der PEPC möglich wäre. Für ein besseres Verständnis speziell der Bedeutung von YopH in diesem Zusammenhang wären vertiefte Analysen einer *yopH* Mutante und weitere Interaktionsstudien von YopH mit der PEPC notwendig.

D.4 Die biologische Bedeutung der Modulation der Enzymaktivität der PEPC

Neben den in dieser Arbeit *in vitro* gezeigten Wechselwirkungen zwischen der PEPC und YscM1 bzw. YscM2 und den beobachteten Wachstumsphänomenen unter Überproduktionsbedingungen sollte die biologische Relevanz dieser Interaktionen besser verstanden werden. Zu diesem Zweck sollte ein geeignetes Medium identifiziert werden, um *Y. enterocolitica* Mutanten in *yscM1*, *yscM2* und *ppc* in Infektionsversuchen zu charakterisieren. Das Δ PEPC-Medium erwies sich als ungeeignet, da das Wachstum der *ppc* Mutante bei 37°C fast völlig inhibiert wird und darüber hinaus in allen Stämmen die Yop-Sekretion kaum nachweisbar ist. Dagegen führte F12-Medium bei Vorversuchen in Flüssigkultur in der *ppc* Mutante lediglich zu einer leichten Wachstumsinhibition, schwächte aber die Yop-Sekretion in dieser Mutante und der *yscM2* Mutante gegenüber dem *Y. enterocolitica* Wildtyp und der *yscM1* Mutante stark ab. Leider konnte die Frage nach der biologischen Relevanz dennoch nicht endgültig geklärt werden, da alle in F12-Medium durchgeführten Infektionsversuche starken Schwankungen unterlagen. Ein möglicher Grund dafür ist, dass der natürliche Sekretionsstimulus des Zellkontakts einen stärkeren Stimulus darstellt als der künstliche Stimulus der Ca^{2+} -Depletion, der in den Vorversuchen verwendet wurde. In diesem Fall wäre bei der Infektion von Zellen mit den verschiedenen *Y. enterocolitica* keine Unterscheidung der Mutanten möglich. Um dies zu klären, könnte die Menge an Yops, die durch die verschiedenen Mutanten während der Infektion von HeLa-Zellen in F12 transloziert werden, quantifiziert werden. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung des F12-Mediums unabhängig von Zellkulturversuchen. Das Medium könnte für die Analyse des metabolischen Flusses der CO_2 -Einheiten, die durch die PEPC zur Bildung von Oxalacetat verwendet werden, eingesetzt werden und so detailliertere Einblicke in den Stoffwechsel ermöglichen. Im Rahmen dieser Promotion sind bereits erste NMR-Analysen mit ^{13}C -markierter Glukose unternommen worden, die Unterschiede zwischen den Mutanten im Kohlenstofffluss zeigen. In einem weiteren Schritt könnten Einzelkluster innerhalb der Aminosäuren genauer mittels NMR analysiert werden, um auf den verwendeten Biosyntheseweg schließen zu können (Eisenreich *et al.* 2006). Ähnliche Experimente mit $^{13}\text{CO}_3\text{H}^-$ würden möglicherweise weitere Klärung bringen.

Eine andere Möglichkeit die biologische Bedeutung der PEPC zu untersuchen, ist die Konstruktion von *lcrQ* und *ppc* Mutanten in *Y. pseudotuberculosis* bzw. einer *yscM1/yscM2* Doppelmutante in *Y. enterocolitica*. Da für *Y. pseudotuberculosis* im Gegensatz zu *Y. enterocolitica* die PEPC Reaktion auch in vollwertigem BHI wichtig ist, wäre möglicherweise der Einfluss der Deletion von *lcrQ* auf die PEPC und die Yop-Sekretion einfacher zu untersuchen, da das eingesetzte Medium nicht den limitierenden Faktor darstellen würde. Andererseits zeigt ein *lcrQ* Mutante in *Y. pseudotuberculosis* oder eine *yscM1/yscM2* Doppelmutante in *Y. enterocolitica* einen Ca^{2+} -unabhängigen Phänotyp (Rimpiläinen *et al.* 1992; Stainier *et al.* 1997). Dieses Problem kann bei *yscM1* bzw. *yscM2* Einzelmutanten in *Y. enterocolitica* umgangen werden, da die beiden *yscM* Kopien bezüglich ihrer regulatorischen Funktion für die Typ III Sekretion redundant sind (Stainier *et al.* 1997). Die Generierung einer *ppc* Deletionsmutante in *Y. pseudotuberculosis* ist im Rahmen dieser Promotion bereits angestrebt worden, aber

die Mutagenese ist nicht gelungen. Dies könnte daran liegen, dass die PEPC bei *Y. pseudotuberculosis* ein so zentrales Enzym des Stoffwechsels darstellt, dass eine Deletion des *ppc* Gens letal ist. Daher könnten weitere Studien zum Metabolismus der Yersinien im Wirt einen wichtigen Beitrag leisten, geeignete Bedingungen zu identifizieren, die es erlauben, die Regulation des Stoffwechsels während der Infektion zu untersuchen. *Y. pestis* nimmt beispielsweise konstitutiv Fettsäuren auf und verwertet sie durch β -Oxidation, ein Vorgang, der nur in Anwesenheit des Virulenzplasmids pCD stattfindet, das für das T3SS kodiert (Moncla *et al.* 1983). Auch hier besteht also eine Verknüpfung zwischen Stoffwechsel und Virulenz, die wiederum mit der PEPC Reaktion in Zusammenhang steht, da β -Oxidation von Fettsäuren zur Anreicherung von Acetyl-CoA und damit zur allosterischen Aktivierung der PEPC führt (Morikawa *et al.* 1980).

Die Aufklärung der Bedeutung der PEPC während der Etablierung einer Infektion ist auch unter dem Gesichtspunkt neuer Therapiemöglichkeiten interessant. Gängige Antibiotika greifen in die Zellwandsynthese oder Proteinbiosynthese des Bakteriums ein, verändern die Permeabilität der Zelle oder interferieren mit der Nukleinsäuresynthese. Da multiresistente Keime vor allem in Krankenhäusern inzwischen ein großes Problem darstellen, ist die Entwicklung neuer Antibiotika bzw. die Identifizierung neuer Zielstrukturen für Antibiotika von großer Bedeutung. Die PEPC könnte besonders gut als Zielstruktur einer neuen antimikrobiellen Therapie genutzt werden, da im Menschen für die Regenerierung von Oxalacetat ein alternativer Weg über die Pyruvatcarboxylase verwendet wird und die PEPC somit nicht vorkommt. Als Grundlage für die Entwicklung eines solchen Therapeutikums könnte YscM1 dienen, da es die Enzymreaktion der PEPC hemmt.

E ZUSAMMENFASSUNG

Humanpathogene Yersinien nutzen ein Typ III Sekretionssystem (T3SS) zur Translokation von Effektorproteinen in Wirtszellen, um die Zellen zu paralysieren und der angeborenen Immunantwort zu entgehen. In Vorarbeiten wurden die homologen Proteine YscM1 und YscM2, die bisher als funktionell äquivalent galten, als Interaktionspartner der Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) identifiziert (Neumayer 2005). Die PEPC trägt durch die Bildung von Oxalacetat zur Auffüllung des Citratzyklus bei. In dieser Arbeit sollte die Interaktion der PEPC mit den YscM Proteinen *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. Darüber hinaus sollten verschiedene weitere T3SS-Proteine aus *Y. enterocolitica* wie die Chaperone SycO, SycE und SycD und YscY/YscX charakterisiert und auf eine mögliche Verknüpfung zu den YscM Regulatoren überprüft werden.

Zu diesem Zweck wurden die Chaperone SycE und SycD rekombinant hergestellt. SycD wurde zusätzlich im Komplex mit YscY gereinigt, da SycD sowohl Homodimere als auch einen heterodimeren Komplex mit YscY bildet. Bioinformatikbasierte Strukturanalysen ergaben für SycD und YscY eine α -helikale Sekundärstruktur. Des Weiteren konnte mittels Quervernetzungsexperimenten die Bildung von Heterodimeren zwischen YscM1 bzw. YscM2 und SycD nachgewiesen werden. YscY, das als weiteres Chaperon der Typ III Sekretion gilt, wurde im Komplex mit YscX gereinigt. Beide Proteine waren bei alleiniger Expression unlöslich. Der Komplex konnte als Heterodimer charakterisiert werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass SycO Homodimere bildet und ebenfalls mit dem Regulator YscM1 interagiert. Neben der Wechselwirkung der YscM Proteine mit zahlreichen T3SS-Chaperonen inhibiert YscM1 die PEPC konzentrationsabhängig. YscM2 hingegen hat keinen regulatorischen Effekt auf die PEPC. Außerdem ist die Inhibition der PEPC durch YscM1 deutlich stärker als die des bekannten allosterischen PEPC Inhibitors Aspartat. Des Weiteren wirkt YscM1 als Antagonist des allosterischen Aktivators der PEPC Acetyl-CoA. Mit Hilfe einer *ppc* Mutante wurden PEPC-abhängige Wachstumsbedingungen bestimmt. Bei Überproduktion von YscM1 in *Y. enterocolitica* unter PEPC-abhängigen Bedingungen kam die Vermehrung der Bakterien völlig zum Erliegen. Die Analyse der Konformation der PEPC in Anwesenheit von YscM1 bzw. YscM2 mittels Röntgenkleinwinkelstreuung ergab, dass beide Proteine zu strukturellen Veränderungen des PEPC Tetramers führen. ^{13}C -Markierungsexperimente mit ^{13}C -Glukose zeigten mit Hilfe von NMR und Massenspektrometrie, dass YscM1 und YscM2 auch *in vivo* in *Y. enterocolitica* einen Einfluss auf die Metabolisierung der Glucose bzw. den ^{13}C -Einbau von Aminosäuren in Yop-Proteine haben. Der T3SS-Effektor YopH, der im N-Terminus homolog zu YscM1 und YscM2 ist, inhibiert ebenso wie YscM1 die Aktivität der PEPC und wirkt als Antagonist von Acetyl-CoA. Die Überproduktion von YopH in *Y. enterocolitica* unter PEPC-abhängigen Bedingungen führte allerdings zu keinem deutlichen Wachstumseffekt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein komplexes Netzwerk an Proteinen an der Regulation des Typ III Sekretionssystems beteiligt ist. Im Zentrum dieses Netzwerks stehen YscM1 und YscM2, deren Wechselwirkung mit der PEPC die Abstimmung des T3SS mit dem Erregerstoffwechsel ermöglicht.

LITERATURVERZEICHNIS

- Achtman,M., Zurth,K., Morelli,G., Torrea,G., Guiyoule,A. & Carniel,E. 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **96**, 14043-14048.
- Aepfelbacher,M., Trasad,C. & Ruckdeschel,K. 2007. Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. *Thromb.Haemost.*, **98**, 521-529.
- Aepfelbacher,M., Trasad,C., Wilharm,G., Wiedemann,A., Trülzsch,K., Krauss,K., Gierschik,P. & Heesemann,J. 2003. Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J.Biol.Chem.*, **278**, 33217-33223.
- Aili,M., Isaksson,E.L., Carlsson,S.E., Wolf-Watz,H., Rosqvist,R. & Francis,M.S. 2008. Regulation of *Yersinia* Yop-effector delivery by translocated YopE. *Int.J.Med.Microbiol.*, **298**, 183-192.
- Aizawa,S.I. 2001. Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol.Lett.*, **202**, 157-164.
- Akeda,Y. & Galan,J.E. 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*, **437**, 911-915.
- Alder,N.N. & Theg,S.M. 2003. Energy use by biological protein transport pathways. *Trends Biochem.Sci.*, **28**, 442-451.
- Aleksic,S. & Bockemühl,J. 1990. [Microbiology and epidemiology of *Yersinia* infections]. *Immun.Infekt.*, **18**, 178-185.
- Allaoui,A., Woestyn,S., Sluiters,C. & Cornelis,G.R. 1994. YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J.Bacteriol.*, **176**, 4534-4542.
- Anderson,D.M., Fouts,D.E., Collmer,A. & Schneewind,O. 1999. Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **96**, 12839-12843.
- Anderson,D.M. & Schneewind,O. 1997. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science*, **278**, 1140-1143.
- Andersson,K., Carballeira,N., Magnusson,K.E., Persson,C., Stendahl,O., Wolf-Watz,H. & Fallman,M. 1996. YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. *Mol.Microbiol.*, **20**, 1057-1069.
- Andersson,K., Magnusson,K.E., Majeed,M., Stendahl,O. & Fallman,M. 1999. *Yersinia pseudotuberculosis*-induced calcium signaling in neutrophils is blocked by the virulence effector YopH. *Infect.Immun.*, **67**, 2567-2574.
- Andor,A., Trülzsch,K., Essler,M., Roggenkamp,A., Wiedemann,A., Heesemann,J. & Aepfelbacher,M. 2001. YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol.*, **3**, 301-310.
- Bachmann,B.J. 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol.Rev.*, **54**, 130-197.
- Balligand,G., Laroche,Y. & Cornelis,G. 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**, 782-786.
- Bartlett,D.H., Frantz,B.B. & Matsumura,P. 1988. Flagellar transcriptional activators FlbB and FlaI: gene sequences and 5' consensus sequences of operons under FlbB and FlaI control. *J.Bacteriol.*, **170**, 1575-1581.

- Barz,C., Abahji,T.N., Trülzsch,K. & Heesemann,J. 2000. The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett.*, **482**, 139-143.
- Baugh,C.L., Lanham,J.W. & Surgalla,M.J. 1964. Effects of bicarbonate on growth of *Pasteurella pestis*. II. Carbon dioxide fixation into oxalacetate by cell-free extracts. *J.Bacteriol.*, **88**, 553-558.
- Ben Gurion,R.& Shafferman,A. 1981. Essential virulence determinants of different *Yersinia* species are carried on a common plasmid. *Plasmid*, **5**, 183-187.
- Benabdillah,R., Mota,L.J., Lutzelschwab,S., Demoinet,E. & Cornelis,G.R. 2004. Identification of a nuclear targeting signal in YopM from *Yersinia* spp. *Microb.Pathog.*, **36**, 247-261.
- Bercovier,H., Mollaret,H.H., Alonso,J.M., Brault,J., Fanning,G.R., Steigerwalt,A.G. & Brenner,D.J. 1980. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Curr.Microbiol.*, **4**, 225-229.
- Bergman,T., Hakansson,S., Forsberg,A., Norlander,L., Macellaro,A., Backman,A., Bolin,I. & Wolf-Watz,H. 1991. Analysis of the V antigen *lcrGVH-yopBD* operon of *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for a regulatory role of LcrH and LcrV. *J.Bacteriol.*, **173**, 1607-1616.
- Birtalan,S.& Ghosh,P. 2001. Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE. *Nat.Struct.Biol.*, **8**, 974-978.
- Birtalan,S.C., Phillips,R.M. & Ghosh,P. 2002. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol.Cell*, **9**, 971-980.
- Black,D.S.& Bliska,J.B. 2000. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol.Microbiol.*, **37**, 515-527.
- Black,R.E., Jackson,R.J., Tsai,T., Medvesky,M., Shayegani,M., Feeley,J.C., MacLeod,K.I. & Wakelee,A.M. 1978. Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N.Engl.J.Med.*, **298**, 76-79.
- Blatch,G.L.& Lässle,M. 1999. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays*, **21**, 932-939.
- Blaylock,B., Riordan,K.E., Missiakas,D.M. & Schneewind,O. 2006. Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J.Bacteriol.*, **188**, 3525-3534.
- Bleves,S., Marenne,M.N., Detry,G. & Cornelis,G.R. 2002. Up-regulation of the *Yersinia enterocolitica* yop regulon by deletion of the flagellum master operon flhDC. *J.Bacteriol.*, **184**, 3214-3223.
- Bliska,J.B.& Black,D.S. 1995. Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infect.Immun.*, **63**, 681-685.
- Bliska,J.B.& Falkow,S. 1992. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **89**, 3561-3565.
- Blocker,A., Jouihri,N., Larquet,E., Gounon,P., Ebel,F., Parsot,C., Sansonetti,P. & Allaoui,A. 2001. Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. *Mol.Microbiol.*, **39**, 652-663.
- Boland,A.& Cornelis,G.R. 1998. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect.Immun.*, **66**, 1878-1884.
- Boland,A., Sory,M.P., Iriarte,M., Kerbouch,C., Wattiau,P. & Cornelis,G.R. 1996. Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J.*, **15**, 5191-5201.

- Bolin,I., Norlander,L. & Wolf-Watz,H. 1982. Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect.Immun.*, **37**, 506-512.
- Bolin,I.& Wolf-Watz,H. 1984. Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect.Immun.*, **43**, 72-78.
- Bottone,E.J. 1977. *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism. *CRC Crit Rev.Microbiol.*, **5**, 211-241.
- Bottone,E.J. 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin.Microbiol.Rev.*, **10**, 257-276.
- Boyd,A.P., Lambermont,I. & Cornelis,G.R. 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**, 4811-4821.
- Bradford,M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brantl,S. 2004. Bacterial gene regulation: from transcription attenuation to riboswitches and ribozymes. *Trends Microbiol.*, **12**, 473-475.
- Bröms,J.E., Edqvist,P.J., Carlsson,K.E., Forsberg,A. & Francis,M.S. 2005. Mapping of a YscY binding domain within the LcrH chaperone that is required for regulation of *Yersinia* type III secretion. *J.Bacteriol.*, **187**, 7738-7752.
- Brubaker,R.R. 1970. Interconversion of purine mononucleotides in *Pasteurella pestis*. *Infect.Immun.*, **1**, 446-454.
- Brubaker,R.R. 1972. The genus *Yersinia*: biochemistry and genetics of virulence. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, **57**, 111-158.
- Brubaker,R.R. 1983. The Vwa⁺ virulence factor of *Yersinia*: the molecular basis of the attendant nutritional requirement for Ca⁺⁺. *Rev.Infect.Dis.*, **5 Suppl 4**, S748-S758.
- Brubaker,R.R.& Surgalla,M.J. 1964. The effect of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ on lysis, growth, and production of virulence antigens by *Pasteurella pestis*. *J.Infect.Dis.*, **114**, 13-25.
- Brutinel,E.D.& Yahr,T.L. 2008. Control of gene expression by type III secretory activity. *Curr.Opin.Microbiol.*
- Burghout,P., Beckers,F., de Wit,E., van Boxtel,R., Cornelis,G.R., Tommassen,J. & Koster,M. 2004a. Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol.*, **186**, 5366-5375.
- Burghout,P., van Boxtel,R., Van Gelder,P., Ringler,P., Muller,S.A., Tommassen,J. & Koster,M. 2004b. Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol.*, **186**, 4645-4654.
- Büttner,C.R., Cornelis,G.R., Heinz,D.W. & Niemann,H.H. 2005. Crystal structure of *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. *Protein Sci.*, **14**, 1993-2002.
- Büttner,C.R., Sorg,I., Cornelis,G.R., Heinz,D.W. & Niemann,H.H. 2008. Structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion translocator chaperone SycD. *J.Mol.Biol.*, **375**, 997-1012.
- Calos,M.P.& Miller,J.H. 1980. Transposable elements. *Cell*, **20**, 579-595.
- Cambronne,E.D., Cheng,L.W. & Schneewind,O. 2000. LcrQ/YscM1, regulators of the *Yersinia yop* virulon, are injected into host cells by a chaperone-dependent mechanism. *Mol.Microbiol.*, **37**, 263-273.
- Cambronne,E.D.& Schneewind,O. 2002. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: *yscM1* and *yscM2* regulate *yop* gene expression by a posttranscriptional mechanism that targets the 5' untranslated region of *yop* mRNA. *J.Bacteriol.*, **184**, 5880-5893.

- Cambronne, E.D., Sorg, J.A. & Schneewind, O. 2004. Binding of SycH chaperone to YscM1 and YscM2 activates effector yop expression in *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol.*, **186**, 829-841.
- Carter, P.B., Zahorchak, R.J. & Brubaker, R.R. 1980. Plague virulence antigens from *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.*, **28**, 638-640.
- Cavanaugh, D.C. 1971. Specific effect of temperature upon transmission of the plague bacillus by the oriental rat flea, *Xenopsylla cheopis*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, **20**, 264-273.
- Chain, P.S., Carniel, E., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Stoutland, P.O., Regala, W.M., Georgescu, A.M., Vergez, L.M., Land, M.L., Motin, V.L., Brubaker, R.R., Fowler, J., Hinnebusch, J., Marceau, M., Medigue, C., Simonet, M., Chenal-Francisque, V., Souza, B., Dacheux, D., Elliott, J.M., Derbise, A., Hauser, L.J. & Garcia, E. 2004. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **101**, 13826-13831.
- Chang, A.C. & Cohen, S.N. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J.Bacteriol.*, **134**, 1141-1156.
- Chebotarev, N.A., Kurganov, B.I. & Livanova, N.B. 2004. Biochemical effects of molecular crowding. *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 1522-1536.
- Chen, L.M., Omiya, T., Hata, S. & Izui, K. 2002. Molecular characterization of a phosphoenolpyruvate carboxylase from a thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus vulcanus* with unusual allosteric properties. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 159-169.
- Cheng, L.W. & Schneewind, O. 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion. On the role of SycE in targeting YopE into HeLa cells. *J.Biol.Chem.*, **274**, 22102-22108.
- Chester, N. & Marshak, D.R. 1993. Dimethyl sulfoxide-mediated primer Tm reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal.Biochem.*, **209**, 284-290.
- China, B., N'Guyen, B.T., de Bruyere, M. & Cornelis, G.R. 1994. Role of YadA in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect.Immun.*, **62**, 1275-1281.
- Cornelis, G., Laroche, Y., Balligand, G., Sory, M.P. & Wauters, G. 1987a. *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. *Rev.Infect.Dis.*, **9**, 64-87.
- Cornelis, G., Sluiter, C., de Rouvroit, C.L. & Michiels, T. 1989a. Homology between VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. *J.Bacteriol.*, **171**, 254-262.
- Cornelis, G., Sory, M.P., Laroche, Y. & Derclaye, I. 1986. Genetic analysis of the plasmid region controlling virulence in *Yersinia enterocolitica* 0:9 by Mini-Mu insertions and lac gene fusions. *Microb.Pathog.*, **1**, 349-359.
- Cornelis, G., Vanootegem, J.C. & Sluiter, C. 1987b. Transcription of the yop regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microb.Pathog.*, **2**, 367-379.
- Cornelis, G.R. 1998. The *Yersinia* Yop virulon, a bacterial system to subvert cells of the primary host defense. *Folia Microbiol.(Praha)*, **43**, 253-261.
- Cornelis, G.R. 2002. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **3**, 742-752.
- Cornelis, G.R. 2006. The type III secretion injectisome. *Nat.Rev.Microbiol.*, **4**, 811-825.
- Cornelis, G.R., Biot, T., Lambert, d.R., Michiels, T., Mulder, B., Sluiter, C., Sory, M.P., Van Bouchaute, M. & Vanootegem, J.C. 1989b. The *Yersinia* yop regulon. *Mol.Microbiol.*, **3**, 1455-1459.
- Cornelis, G.R., Sluiter, C., Delor, I., Geib, D., Kaniga, K., Lambert, d.R., Sory, M.P., Vanootegem, J.C. & Michiels, T. 1991. ymoA, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Mol.Microbiol.*, **5**, 1023-1034.

- Cornelis,G.R.& Wolf-Watz,H. 1997. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol.Microbiol.*, **23**, 861-867.
- Cover,T.L.& Aber,R.C. 1989. *Yersinia enterocolitica*. *N.Engl.J.Med.*, **321**, 16-24.
- Crepin,V.F., Prasannan,S., Shaw,R.K., Wilson,R.K., Creasey,E., Abe,C.M., Knutton,S., Frankel,G. & Matthews,S. 2005. Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ. *Mol.Microbiol.*, **55**, 1658-1670.
- Crumpton,M.J.& Davies,D.A. 1957. A protein antigen associated with smooth colony forms of some species of *Pasteurella*. *Nature*, **180**, 863-864.
- D'Andrea,L.D.& Regan,L. 2003. TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem.Sci.*, **28**, 655-662.
- Dacheux,D., Epaulard,O., de Groot,A., Guery,B., Leberre,R., Attree,I., Polack,B. & Toussaint,B. 2002. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system requires an intact pyruvate dehydrogenase *aceAB* operon. *Infect.Immun.*, **70**, 3973-3977.
- Day,J.B., Guller,I. & Plano,G.V. 2000. *Yersinia pestis* YscG protein is a Syc-like chaperone that directly binds *yscE*. *Infect.Immun.*, **68**, 6466-6471.
- Day,J.B.& Plano,G.V. 1998. A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in *Yersinia pestis*. *Mol.Microbiol.*, **30**, 777-788.
- Day,J.B.& Plano,G.V. 2000. The *Yersinia pestis* YscY protein directly binds YscX, a secreted component of the type III secretion machinery. *J.Bacteriol.*, **182**, 1834-1843.
- Delor,I.& Cornelis,G.R. 1992. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect.Immun.*, **60**, 4269-4277.
- Delwiche,E.A., Fukui,G.M., Andrews,A.W. & Surgalla,M.J. 1959. Environmental conditions affecting the population dynamics and the retention of virulence of *Pasteurella pestis*: the role of carbon dioxide. *J.Bacteriol.*, **77**, 355-360.
- Denecker,G., Totemeyer,S., Mota,L.J., Troisfontaines,P., Lambermont,I., Youta,C., Stainier,I., Ackermann,M. & Cornelis,G.R. 2002. Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. *Infect.Immun.*, **70**, 3510-3520.
- Diaz,R., Urra,E., Toyos,J. & Moriyon,I. 1985. Characterization of a *Yersinia enterocolitica* antigen common to enterocolitis-associated serotypes. *J.Clin.Microbiol.*, **22**, 1035-1039.
- Dittmann,S., Schmid,A., Richter,S., Trülzsch,K., Heesemann,J. & Wilharm,G. 2007. The *Yersinia enterocolitica* type three secretion chaperone SycO is integrated into the Yop regulatory network and binds to the Yop secretion protein YscM1. *BMC.Microbiol.*, **7**, 67.
- Dreyfus,L.A.& Brubaker,R.R. 1978. Consequences of aspartase deficiency in *Yersinia pestis*. *J.Bacteriol.*, **136**, 757-764.
- Driessen,A.J. 2001. SecB, a molecular chaperone with two faces. *Trends Microbiol.*, **9**, 193-196.
- Dukuzumuremyi,J.M., Rosqvist,R., Hallberg,B., Akerstrom,B., Wolf-Watz,H. & Schesser,K. 2000. The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J.Biol.Chem.*, **275**, 35281-35290.
- Edqvist,P.J., Aili,M., Liu,J. & Francis,M.S. 2007. Minimal YopB and YopD translocator secretion by *Yersinia* is sufficient for Yop-effector delivery into target cells. *Microbes.Infect.*, **9**, 224-233.
- Edqvist,P.J., Bröms,J.E., Betts,H.J., Forsberg,A., Pallen,M.J. & Francis,M.S. 2006. Tetratricopeptide repeats in the type III secretion chaperone, LcrH: their role in substrate binding and secretion. *Mol.Microbiol.*, **59**, 31-44.

- Edqvist,P.J., Olsson,J., Lavander,M., Sundberg,L., Forsberg,A., Wolf-Watz,H. & Lloyd,S.A. 2003. YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *J.Bacteriol.*, **185**, 2259-2266.
- Eisenreich,W., Slaghuis,J., Laupitz,R., Bussemmer,J., Stritzker,J., Schwarz,C., Schwarz,R., Dandekar,T., Goebel,W. & Bacher,A. 2006. ¹³C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **103**, 2040-2045.
- Eitel,J.& Dersch,P. 2002. The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasins is repressed. *Infect.Immun.*, **70**, 4880-4891.
- Ellis,R.J.& Minton,A.P. 2003. Cell biology: join the crowd. *Nature*, **425**, 27-28.
- Emödy,L., Heesemann,J., Wolf-Watz,H., Skurnik,M., Kapperud,G., O'Toole,P. & Wadström,T. 1989. Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J.Bacteriol.*, **171**, 6674-6679.
- Eppinger,M., Rosovitz,M.J., Fricke,W.F., Rasko,D.A., Kokorina,G., Fayolle,C., Lindler,L.E., Carniel,E. & Ravel,J. 2007. The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. *PLoS.Genet.*, **3**, e142.
- Erfurth,S.E., Grobner,S., Kramer,U., Gunst,D.S., Soldanova,I., Schaller,M., Autenrieth,I.B. & Borgmann,S. 2004. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect.Immun.*, **72**, 7045-7054.
- Evdokimov,A.G., Anderson,D.E., Routzahn,K.M. & Waugh,D.S. 2001a. Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. *J.Mol.Biol.*, **312**, 807-821.
- Evdokimov,A.G., Phan,J., Tropea,J.E., Routzahn,K.M., Peters,H.K., Pokross,M. & Waugh,D.S. 2003. Similar modes of polypeptide recognition by export chaperones in flagellar biosynthesis and type III secretion. *Nat.Struct.Biol.*, **10**, 789-793.
- Evdokimov,A.G., Tropea,J.E., Routzahn,K.M., Copeland,T.D. & Waugh,D.S. 2001b. Structure of the N-terminal domain of *Yersinia pestis* YopH at 2.0 Å resolution. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.*, **57**, 793-799.
- Evdokimov,A.G., Tropea,J.E., Routzahn,K.M. & Waugh,D.S. 2002. Three-dimensional structure of the type III secretion chaperone SycE from *Yersinia pestis*. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.*, **58**, 398-406.
- Fallman,M., Andersson,K., Hakansson,S., Magnusson,K.E., Stendahl,O. & Wolf-Watz,H. 1995. *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. *Infect.Immun.*, **63**, 3117-3124.
- Feldman,M.F.& Cornelis,G.R. 2003. The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol.Lett.*, **219**, 151-158.
- Ferber,D.M.& Brubaker,R.R. 1981. Plasmids in *Yersinia pestis*. *Infect.Immun.*, **31**, 839-841.
- Fields,K.A., Plano,G.V. & Straley,S.C. 1994. A low-Ca²⁺ response (LCR) secretion (ysc) locus lies within the *lcrB* region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*. *J.Bacteriol.*, **176**, 569-579.
- Flugel,A., Schulze-Koops,H., Heesemann,J., Kuhn,K., Sorokin,L., Burkhardt,H., von der,M.K. & Emmrich,F. 1994. Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *J.Biol.Chem.*, **269**, 29732-29738.
- Forsberg,A., Rosqvist,R. & Wolf-Watz,H. 1994. Regulation and polarized transfer of the *Yersinia* outer proteins (Yops) involved in antiphagocytosis. *Trends Microbiol.*, **2**, 14-19.
- Forsberg,A., Viitanen,A.M., Skurnik,M. & Wolf-Watz,H. 1991. The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol.Microbiol.*, **5**, 977-986.

- Forsberg,A.& Wolf-Watz,H. 1988. The virulence protein Yop5 of *Yersinia pseudotuberculosis* is regulated at transcriptional level by plasmid-p1B1-encoded trans-acting elements controlled by temperature and calcium. *Mol.Microbiol.*, **2**, 121-133.
- Forsberg,A.& Wolf-Watz,H. 1990. Genetic analysis of the *yopE* region of *Yersinia* spp.: identification of a novel conserved locus, *yerA*, regulating *yopE* expression. *J.Bacteriol.*, **172**, 1547-1555.
- Foultier,B.& Cornelis,G.R. 2003. DNA sequence and analysis of the pYVa127/90 virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* strain A127/90. *Res.Microbiol.*, **154**, 553-557.
- Fowler,J.M.& Brubaker,R.R. 1994. Physiological basis of the low calcium response in *Yersinia pestis*. *Infect.Immun.*, **62**, 5234-5241.
- Francis,M.S., Lloyd,S.A. & Wolf-Watz,H. 2001. The type III secretion chaperone LcrH co-operates with YopD to establish a negative, regulatory loop for control of Yop synthesis in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol.Microbiol.*, **42**, 1075-1093.
- Frank,J., Clarke,R.J., Vater,J. & Holzwarth,J.F. 2001. Influence of allosteric effectors on the kinetics and equilibrium binding of phosphoenolpyruvate (PEP) to phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) from *Zea mays*. *Biophys.Chem.*, **92**, 53-64.
- Frederiksen,W. 1964. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (*Bacterium enterocoliticum*) and *Pasteurella*. *X.Proc.14 th Sand.Congr.Path.Microbiol.*, **108**.
- Fredriksson-Ahomaa,M., Koch,U., Klemm,C., Bucher,M. & Stolle,A. 2004. Different genotypes of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains widely distributed in butcher shops in the Munich area. *Int.J.Food Microbiol.*, **95**, 89-94.
- Fredriksson-Ahomaa,M., Niskanen,T., Neubauer,H., Laukkanen,R. & Korkeala,H. 2002. Characterisation of sucrose-negative *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 isolates recovered from pig tonsils. *Int.J.Food Microbiol.*, **75**, 19-25.
- Frithz-Lindsten,E., Rosqvist,R., Johansson,L. & Forsberg,A. 1995. The chaperone-like protein YerA of *Yersinia pseudotuberculosis* stabilizes YopE in the cytoplasm but is dispensible for targeting to the secretion loci. *Mol.Microbiol.*, **16**, 635-647.
- Fulton,A.B. 1982. How crowded is the cytoplasm? *Cell*, **30**, 345-347.
- Galan,J.E. 2008. Energizing type III secretion machines: what is the fuel? *Nat.Struct.Mol.Biol.*, **15**, 127-128.
- Gallegos,M.T., Michan,C. & Ramos,J.L. 1993. The XylS/AraC family of regulators. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 807-810.
- Galyov,E.E., Hakansson,S., Forsberg,A. & Wolf-Watz,H. 1993. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature*, **361**, 730-732.
- Gemski,P., Lazere,J.R. & Casey,T. 1980. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.*, **27**, 682-685.
- Godfrey,H.P., Bugrysheva,J.V. & Cabello,F.C. 2002. The role of the stringent response in the pathogenesis of bacterial infections. *Trends Microbiol.*, **10**, 349-351.
- Goebel,M.& Yanagida,M. 1991. The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends Biochem.Sci.*, **16**, 173-177.
- Gophna,U., Ron,E.Z. & Graur,D. 2003. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene*, **312**, 151-163.
- Goss,J.W., Sorg,J.A., Ramamurthi,K.S., Ton-That,H. & Schneewind,O. 2004. The secretion signal of YopN, a regulatory protein of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion pathway. *J.Bacteriol.*, **186**, 6320-6324.

- Goure,J., Broz,P., Attree,O., Cornelis,G.R. & Attree,I. 2005. Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J.Infect.Dis.*, **192**, 218-225.
- Grosdent,N., Maridonneau-Parini,I., Sory,M.P. & Cornelis,G.R. 2002. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect.Immun.*, **70**, 4165-4176.
- Guan,K.L.& Dixon,J.E. 1990. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science*, **249**, 553-556.
- Guan,K.L.& Dixon,J.E. 1991. Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J.Biol.Chem.*, **266**, 17026-17030.
- Guinier,A.& Fournet,G. 1955. *Small Angle Scattering of X-Rays*. Wiley, New York.
- Hakansson,S., Bergman,T., Vanootehem,J.C., Cornelis,G. & Wolf-Watz,H. 1993. YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins. *Infect.Immun.*, **61**, 71-80.
- Hakansson,S., Galyov,E.E., Rosqvist,R. & Wolf-Watz,H. 1996a. The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol.Microbiol.*, **20**, 593-603.
- Hakansson,S., Schesser,K., Persson,C., Galyov,E.E., Rosqvist,R., Homble,F. & Wolf-Watz,H. 1996b. The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J.*, **15**, 5812-5823.
- Hamid,N., Gustavsson,A., Andersson,K., McGee,K., Persson,C., Rudd,C.E. & Fallman,M. 1999. YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb.Pathog.*, **27**, 231-242.
- Hanahan,D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.*, **166**, 557-580.
- Hanski,C., Kutschka,U., Schmoranzler,H.P., Naumann,M., Stallmach,A., Hahn,H., Menge,H. & Riecken,E.O. 1989. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect.Immun.*, **57**, 673-678.
- Heesemann,J., Algermissen,B. & Laufs,R. 1984. Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.*, **46**, 105-110.
- Heesemann,J., Gross,U., Schmidt,N. & Laufs,R. 1986. Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect.Immun.*, **54**, 561-567.
- Heesemann,J.& Grüter,L. 1987. Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol.Lett.*, **48**, 229-233.
- Heesemann,J., Keller,C., Morawa,R., Schmidt,N., Siemens,H.J. & Laufs,R. 1983. Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J.Infect.Dis.*, **147**, 107-115.
- Heesemann,J.& Laufs,R. 1985. Double immunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture. *J.Clin.Microbiol.*, **22**, 168-175.
- Heesemann,J., Sing,A. & Trülsch,K. 2006. *Yersinia's* stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr.Opin.Microbiol.*, **9**, 55-61.
- Heroven,A.K., Bohme,K., Tran-Winkler,H. & Dersch,P. 2007. Regulatory elements implicated in the environmental control of invasin expression in enteropathogenic *Yersinia*. *Adv.Exp.Med.Biol.*, **603**, 156-166.
- Heroven,A.K.& Dersch,P. 2006. RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene *rovA*, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol.Microbiol.*, **62**, 1469-1483.

- Heussipp,G., Spekker,K., Brast,S., Falker,S. & Schmidt,M.A. 2006. YopM of *Yersinia enterocolitica* specifically interacts with alpha1-antitrypsin without affecting the anti-protease activity. *Microbiology*, **152**, 1327-1335.
- Higuchi,K., Kupferberg,L.L. & Smith,J.L. 1959. Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. III. Effects of calcium ions on the growth of virulent and avirulent strains of *Pasteurella pestis*. *J.Bacteriol.*, **77**, 317-321.
- Hirano,T., Kinoshita,N., Morikawa,K. & Yanagida,M. 1990. Snap helix with knob and hole: essential repeats in *S. pombe* nuclear protein nuc2+. *Cell*, **60**, 319-328.
- Hoiczky,E.& Blobel,G. 2001. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **98**, 4669-4674.
- Hoiczky,E., Roggenkamp,A., Reichenbecher,M., Lupas,A. & Heesemann,J. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.*, **19**, 5989-5999.
- Holmström,A., Olsson,J., Cherepanov,P., Maier,E., Nordfelth,R., Pettersson,J., Benz,R., Wolf-Watz,H. & Forsberg,A. 2001. LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol.Microbiol.*, **39**, 620-632.
- Horne,S.M.& Prüß,B.M. 2006. Global gene regulation in *Yersinia enterocolitica*: effect of FliA on the expression levels of flagellar and plasmid-encoded virulence genes. *Arch.Microbiol.*, **185**, 115-126.
- Hueck,C.J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, **62**, 379-433.
- Iriarte,M.& Cornelis,G.R. 1995. MyfF, an element of the network regulating the synthesis of fibrillae in *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol.*, **177**, 738-744.
- Iriarte,M.& Cornelis,G.R. 1998. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol.Microbiol.*, **29**, 915-929.
- Iriarte,M.& Cornelis,G.R. 1999. Identification of SycN, YscX, and YscY, three new elements of the *Yersinia* yop virulon. *J.Bacteriol.*, **181**, 675-680.
- Iriarte,M., Sory,M.P., Boland,A., Boyd,A.P., Mills,S.D., Lambermont,I. & Cornelis,G.R. 1998. TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J.*, **17**, 1907-1918.
- Iriarte,M., Stainier,I., Mikulskis,A.V. & Cornelis,G.R. 1995. The *fliA* gene encoding sigma 28 in *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol.*, **177**, 2299-2304.
- Iriarte,M., Vanooteghem,J.C., Delor,I., Diaz,R., Knutton,S. & Cornelis,G.R. 1993. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol.Microbiol.*, **9**, 507-520.
- Isberg,R.R. 1990. Pathways for the penetration of enteroinvasive *Yersinia* into mammalian cells. *Mol.Biol.Med.*, **7**, 73-82.
- Isberg,R.R.& Leong,J.M. 1990. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell*, **60**, 861-871.
- Isberg,R.R., Swain,A. & Falkow,S. 1988. Analysis of expression and thermoregulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* inv gene with hybrid proteins. *Infect.Immun.*, **56**, 2133-2138.
- Isberg,R.R., Voorhis,D.L. & Falkow,S. 1987. Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell*, **50**, 769-778.
- Jackson,M.W.& Plano,G.V. 2000. Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol.Lett.*, **186**, 85-90.
- Jawetz,E.& Meyer,K.F. 1944. The behaviour of virulent and avirulent *P. pestis* in normal and immune experimental animals. *J.Infect.Dis.*, **74**, 1-13.

- Jeffery,C.J. 1999. Moonlighting proteins. *Trends Biochem.Sci.*, **24**, 8-11.
- Jinek,M., Rehwinkel,J., Lazarus,B.D., Izaurralde,E., Hanover,J.A. & Conti,E. 2004. The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, **11**, 1001-1007.
- Journet,L., Agrain,C., Broz,P. & Cornelis,G.R. 2003. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science*, **302**, 1757-1760.
- Kai,Y., Matsumura,H., Inoue,T., Terada,K., Nagara,Y., Yoshinaga,T., Kihara,A., Tsumura,K. & Izui,K. 1999. Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: a proposed mechanism for allosteric inhibition. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 823-828.
- Kapatral,V.& Minnich,S.A. 1995. Co-ordinate, temperature-sensitive regulation of the three *Yersinia enterocolitica* flagellin genes. *Mol.Microbiol.*, **17**, 49-56.
- Kapatral,V., Olson,J.W., Pepe,J.C., Miller,V.L. & Minnich,S.A. 1996. Temperature-dependent regulation of *Yersinia enterocolitica* Class III flagellar genes. *Mol.Microbiol.*, **19**, 1061-1071.
- Kapperud,G.& Namork,E. 1987. Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*. Correlation with outer membrane protein YOP1, autoagglutination, and hemagglutination. *Contrib.Microbiol.Immunol.*, **9**, 165-172.
- Kerschen,E.J., Cohen,D.A., Kaplan,A.M. & Straley,S.C. 2004. The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect.Immun.*, **72**, 4589-4602.
- Kim,W.& Surette,M.G. 2004. Metabolic differentiation in actively swarming *Salmonella*. *Mol.Microbiol.*, **54**, 702-714.
- Knapp,W. 1988. *Die Gattung Yersinia - Yersiniosen*.
- Konarev,P.V., Volkov,V.V., Sokolova,A.V., Koch,M.H.J. & Svergun,D.I. 2003. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, **36**, 1277-1282.
- Koretke,K.K., Szczesny,P., Gruber,M. & Lupas,A.N. 2006. Model structure of the prototypical non-fimbrial adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica*. *J.Struct.Biol.*, **155**, 154-161.
- Koster,M., Bitter,W., de Cock,H., Allaoui,A., Cornelis,G.R. & Tommassen,J. 1997. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol.Microbiol.*, **26**, 789-797.
- Kozin,M.B.& Svergun,D.I. 2001. Automated matching of high- and low-resolution structural models. *Journal of Applied Crystallography*, **34**, 33-41.
- Kubori,T., Matsushima,Y., Nakamura,D., Uralil,J., Lara-Tejero,M., Sukhan,A., Galan,J.E. & Aizawa,S.I. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, **280**, 602-605.
- Kupferberg,L.L.& Higuchi,K. 1958. Role of calcium ions in the stimulation of growth of virulent strains of *Pasteurella pestis*. *J.Bacteriol.*, **76**, 120-121.
- Kuwajima,G., Kawagishi,I., Homma,M., Asaka,J., Kondo,E. & Macnab,R.M. 1989. Export of an N-terminal fragment of *Escherichia coli* flagellin by a flagellum-specific pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **86**, 4953-4957.
- Lachica,R.V., Zink,D.L. & Ferris,W.R. 1984. Association of fibril structure formation with cell surface properties of *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.*, **46**, 272-275.
- Laemmli,U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- Lambert,C., Leonard,N., De,B., X & Depiereux,E. 2002. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics.*, **18**, 1250-1256.
- Lambert,d.R., Sluiter,C. & Cornelis,G.R. 1992. Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol.Microbiol.*, **6**, 395-409.
- Lee,S.H.& Galan,J.E. 2004. *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol.Microbiol.*, **51**, 483-495.
- Lee,V.T., Anderson,D.M. & Schneewind,O. 1998. Targeting of *Yersinia* Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. *Mol.Microbiol.*, **28**, 593-601.
- Lee,V.T., Mazmanian,S.K. & Schneewind,O. 2001. A program of *Yersinia enterocolitica* type III secretion reactions is activated by specific signals. *J.Bacteriol.*, **183**, 4970-4978.
- Lee,V.T.& Schneewind,O. 1999. Type III machines of pathogenic *Yersiniae* secrete virulence factors into the extracellular milieu. *Mol.Microbiol.*, **31**, 1619-1629.
- Lee,V.T., Tam,C. & Schneewind,O. 2000. LcrV, a substrate for *Yersinia enterocolitica* type III secretion, is required for toxin targeting into the cytosol of HeLa cells. *J.Biol.Chem.*, **275**, 36869-36875.
- Letzelter,M., Sorg,I., Mota,L.J., Meyer,S., Stalder,J., Feldman,M., Kuhn,M., Callebaut,I. & Cornelis,G.R. 2006. The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *EMBO J.*, **25**, 3223-3233.
- Leung,K.Y., Reisner,B.S. & Straley,S.C. 1990. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect.Immun.*, **58**, 3262-3271.
- Lindler,L.E., Klempner,M.S. & Straley,S.C. 1990. *Yersinia pestis* pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague. *Infect.Immun.*, **58**, 2569-2577.
- Liu,P., Wood,D. & Nester,E.W. 2005. Phosphoenolpyruvate carboxykinase is an acid-induced, chromosomally encoded virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens*. *J.Bacteriol.*, **187**, 6039-6045.
- Lloyd,S.A., Forsberg,A., Wolf-Watz,H. & Francis,M.S. 2001a. Targeting exported substrates to the *Yersinia* TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol.*, **9**, 367-371.
- Lloyd,S.A., Norman,M., Rosqvist,R. & Wolf-Watz,H. 2001b. *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol.Microbiol.*, **39**, 520-531.
- Lloyd,S.A., Sjostrom,M., Andersson,S. & Wolf-Watz,H. 2002. Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. *Mol.Microbiol.*, **43**, 51-59.
- Locher,M., Lehnert,B., Krauss,K., Heesemann,J., Groll,M. & Wilharm,G. 2005. Crystal structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. *J.Biol.Chem.*, **280**, 31149-31155.
- Luo,Y., Bertero,M.G., Frey,E.A., Pfuetzner,R.A., Wenk,M.R., Creagh,L., Marcus,S.L., Lim,D., Sicheri,F., Kay,C., Haynes,C., Finlay,B.B. & Strynadka,N.C. 2001. Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE. *Nat.Struct.Biol.*, **8**, 1031-1036.
- Macnab,R.M. 1999. The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *J.Bacteriol.*, **181**, 7149-7153.
- Main,E.R., Xiong,Y., Cocco,M.J., D'Andrea,L. & Regan,L. 2003. Design of stable alpha-helical arrays from an idealized TPR motif. *Structure.*, **11**, 497-508.
- Majander,K., Anton,L., Antikainen,J., Lang,H., Brummer,M., Korhonen,T.K. & Westerlund-Wikstrom,B. 2005. Extracellular secretion of polypeptides using a modified *Escherichia coli* flagellar secretion apparatus. *Nat.Biotechnol.*, **23**, 475-481.

- Marianayagam,N.J., Sunde,M. & Matthews,J.M. 2004. The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem.Sci.*, **29**, 618-625.
- Marlovits,T.C., Kubori,T., Sukhan,A., Thomas,D.R., Galan,J.E. & Unger,V.M. 2004. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science*, **306**, 1040-1042.
- Martinez,R.J. 1989. Thermoregulation-dependent expression of *Yersinia enterocolitica* protein 1 imparts serum resistance to *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriol.*, **171**, 3732-3739.
- Matsumura,H., Xie,Y., Shirakata,S., Inoue,T., Yoshinaga,T., Ueno,Y., Izui,K. & Kai,Y. 2002. Crystal structures of C4 form maize and quaternary complex of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxylases. *Structure.*, **10**, 1721-1730.
- McDonald,C., Vacratsis,P.O., Bliska,J.B. & Dixon,J.E. 2003. The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J.Biol.Chem.*, **278**, 18514-18523.
- Meijer,L.K., Schesser,K., Wolf-Watz,H., Sassone-Corsi,P. & Pettersson,S. 2000. The bacterial protein YopJ abrogates multiple signal transduction pathways that converge on the transcription factor CREB. *Cell Microbiol.*, **2**, 231-238.
- Michiels,T., Wattiau,P., Bresseur,R., Ruyschaert,J.M. & Cornelis,G. 1990. Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*. *Infect.Immun.*, **58**, 2840-2849.
- Miller,V.L.& Falkow,S. 1988. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect.Immun.*, **56**, 1242-1248.
- Mills,S.D., Boland,A., Sory,M.P., van der,S.P., Kerbouch,C., Finlay,B.B. & Cornelis,G.R. 1997. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 12638-12643.
- Minamino,T., Gonzalez-Pedrajo,B., Yamaguchi,K., Aizawa,S.I. & Macnab,R.M. 1999. FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in *Salmonella*, is exported during hook assembly. *Mol.Microbiol.*, **34**, 295-304.
- Minamino,T.& Macnab,R.M. 2000. Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol.Microbiol.*, **35**, 1052-1064.
- Minamino,T.& Namba,K. 2008. Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature*, **451**, 485-488.
- Mofenson,H.C., Caraccio,T.R. & Sharieff,N. 1987. Iron sepsis: *Yersinia enterocolitica* septicemia possibly caused by an overdose of iron. *N.Engl.J.Med.*, **316**, 1092-1093.
- Monack,D.M., Mecsas,J., Ghori,N. & Falkow,S. 1997. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 10385-10390.
- Moncla,B.J., Hillier,S.L. & Charnetzky,W.T. 1983. Constitutive uptake and degradation of fatty acids by *Yersinia pestis*. *J.Bacteriol.*, **153**, 340-344.
- Moraes,T.F.& Plaxton,W.C. 2000. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brassica napus* (rapeseed) suspension cell cultures: implications for phosphoenolpyruvate carboxylase regulation during phosphate starvation, and the integration of glycolysis with nitrogen assimilation. *Eur.J.Biochem.*, **267**, 4465-4476.
- Morikawa,M., Izui,K., Taguchi,M. & Katsuki,H. 1980. Regulation of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase by multiple effectors in vivo. Estimation of the activities in the cells grown on various compounds. *J.Biochem.*, **87**, 441-449.
- Morita-Ishihara,T., Ogawa,M., Sagara,H., Yoshida,M., Katayama,E. & Sasakawa,C. 2006. *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J.Biol.Chem.*, **281**, 599-607.

- Mortlock,R.P. 1962. Gluconate metabolism of *Pasteurella pestis*. *J.Bacteriol.*, **84**, 53-59.
- Mudgett,M.B., Chesnokova,O., Dahlbeck,D., Clark,E.T., Rossier,O., Bonas,U. & Staskawicz,B.J. 2000. Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **97**, 13324-13329.
- Mueller,C.A., Broz,P., Muller,S.A., Ringler,P., Erne-Brand,F., Sorg,I., Kuhn,M., Engel,A. & Cornelis,G.R. 2005. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science*, **310**, 674-676.
- Mukherjee,S., Keitany,G., Li,Y., Wang,Y., Ball,H.L., Goldsmith,E.J. & Orth,K. 2006. *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science*, **312**, 1211-1214.
- Mulder,B., Michiels,T., Simonet,M., Sory,M.P. & Cornelis,G. 1989. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect.Immun.*, **57**, 2534-2541.
- Munoz-Elias,E.J.& McKinney,J.D. 2006. Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cell Microbiol.*, **8**, 10-22.
- Nakamura,T., Minoguchi,S. & Izui,K. 1996. Purification and characterization of recombinant phosphoenolpyruvate carboxylase of *Thermus* sp. *J.Biochem.*, **120**, 518-524.
- Navarro,L., Koller,A., Nordfelth,R., Wolf-Watz,H., Taylor,S. & Dixon,J.E. 2007. Identification of a molecular target for the *Yersinia* protein kinase A. *Mol.Cell*, **26**, 465-477.
- Neubauer,H., Sprague,L.D., Scholz,H. & Hensel,A. 2001. [Diagnosis o *Yersinia enterocolitica* infections: a review on classical identification techniques and new molecular biological methods]. *Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr.*, **114**, 1-7.
- Neumayer,W. 2005. *Charakterisierung der Virulenzproteine YscM1 und YscM2 in ihrer Funktion als Modulatoren des Stoffwechsels in Yersinia enterocolitica*. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Neyt,C.& Cornelis,G.R. 1999a. 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**, 971-981.
- Neyt,C.& Cornelis,G.R. 1999b. Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol.Microbiol.*, **31**, 143-156.
- Nguyen,L., Paulsen,I.T., Tchieu,J., Hueck,C.J. & Saier,M.H., Jr. 2000. Phylogenetic analyses of the constituents of type III protein secretion systems. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.*, **2**, 125-144.
- Nilles,M.L., Williams,A.W., Skrzypek,E. & Straley,S.C. 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**, 1307-1316.
- Nudler,E.& Mironov,A.S. 2004. The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem.Sci.*, **29**, 11-17.
- Nummelin,H., Merckel,M.C., Leo,J.C., Lankinen,H., Skurnik,M. & Goldman,A. 2004. The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *EMBO J.*, **23**, 701-711.
- Ohnishi,K., Kutsukake,K., Suzuki,H. & Iino,T. 1990. Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol.Gen.Genet.*, **221**, 139-147.
- Pai,C.H.& Mors,V. 1978. Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.*, **19**, 908-911.
- Pallen,M.J., Francis,M.S. & Futterer,K. 2003. Tetratricopeptide-like repeats in type-III-secretion chaperones and regulators. *FEMS Microbiol.Lett.*, **223**, 53-60.
- Palmer,L.E., Hobbie,S., Galan,J.E. & Bliska,J.B. 1998. YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol.Microbiol.*, **27**, 953-965.

- Parsot,C., Hamiaux,C. & Page,A.L. 2003. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr.Opin.Microbiol.*, **6**, 7-14.
- Paul,K., Erhardt,M., Hirano,T., Blair,D.F. & Hughes,K.T. 2008. Energy source of flagellar type III secretion. *Nature*, **451**, 489-492.
- Pawel-Rammigen,U., Telepnev,M.V., Schmidt,G., Aktories,K., Wolf-Watz,H. & Rosqvist,R. 2000. GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol.Microbiol.*, **36**, 737-748.
- Pepe,J.C.& Miller,V.L. 1993. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **90**, 6473-6477.
- Pepe,J.C., Wachtel,M.R., Wagar,E. & Miller,V.L. 1995. Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect.Immun.*, **63**, 4837-4848.
- Perry,R.D.& Fetherston,J.D. 1997. *Yersinia pestis*-etiologic agent of plague. *Clin.Microbiol.Rev.*, **10**, 35-66.
- Persson,C., Nordfelth,R., Holmström,A., Hakansson,S., Rosqvist,R. & Wolf-Watz,H. 1995. Cell-surface-bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell. *Mol.Microbiol.*, **18**, 135-150.
- Petersen,S.& Young,G.M. 2002. Essential role for cyclic AMP and its receptor protein in *Yersinia enterocolitica* virulence. *Infect.Immun.*, **70**, 3665-3672.
- Pettersson,J., Holmström,A., Hill,J., Leary,S., Frithz-Lindsten,E., Euler-Matell,A., Carlsson,E., Titball,R., Forsberg,A. & Wolf-Watz,H. 1999. The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol.Microbiol.*, **32**, 961-976.
- Pettersson,J., Nordfelth,R., Dubinina,E., Bergman,T., Gustafsson,M., Magnusson,K.E. & Wolf-Watz,H. 1996. Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science*, **273**, 1231-1233.
- Phan,J., Austin,B.P. & Waugh,D.S. 2005. Crystal structure of the *Yersinia* type III secretion protein YscE. *Protein Sci.*, **14**, 2759-2763.
- Phan,J., Tropea,J.E. & Waugh,D.S. 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**, 1591-1599.
- Pierson,D.E.& Falkow,S. 1993. The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infect.Immun.*, **61**, 1846-1852.
- Pilonieta,M.C.& Munson,G.P. 2008. The chaperone IpgC copurifies with the virulence regulator MxiE. *J.Bacteriol.*, **190**, 2249-2251.
- Pilz,D., Vocke,T., Heesemann,J. & Brade,V. 1992. Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. *Infect.Immun.*, **60**, 189-195.
- Pizarro-Cerda,J.& Tedin,K. 2004. The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. *Mol.Microbiol.*, **52**, 1827-1844.
- Plano,G.V.& Straley,S.C. 1993. Multiple effects of lcrD mutations in *Yersinia pestis*. *J.Bacteriol.*, **175**, 3536-3545.
- Plano,G.V.& Straley,S.C. 1995. Mutations in *yscC*, *yscD*, and *yscG* prevent high-level expression and secretion of V antigen and Yops in *Yersinia pestis*. *J.Bacteriol.*, **177**, 3843-3854.
- Portnoy,D.A., Blank,H.F., Kingsbury,D.T. & Falkow,S. 1983. Genetic analysis of essential plasmid determinants of pathogenicity in *Yersinia pestis*. *J.Infect.Dis.*, **148**, 297-304.
- Portnoy,D.A.& Martinez,R.J. 1985. Role of a plasmid in the pathogenicity of *Yersinia* species. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, **118**, 29-51.

- Portnoy,D.A., Wolf-Watz,H., Bolin,I., Beeder,A.B. & Falkow,S. 1984. Characterization of common virulence plasmids in *Yersinia* species and their role in the expression of outer membrane proteins. *Infect.Immun.*, **43**, 108-114.
- Price,S.B., Cowan,C., Perry,R.D. & Straley,S.C. 1991. The *Yersinia pestis* V antigen is a regulatory protein necessary for Ca²(+)-dependent growth and maximal expression of low-Ca²⁺ response virulence genes. *J.Bacteriol.*, **173**, 2649-2657.
- Quinaud,M., Chabert,J., Faudry,E., Neumann,E., Lemaire,D., Pastor,A., Elsen,S., Dessen,A. & Attree,I. 2005. The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Biol.Chem.*, **280**, 36293-36300.
- Quinaud,M., Ple,S., Job,V., Contreras-Martel,C., Simorre,J.P., Attree,I. & Dessen,A. 2007. Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **104**, 7803-7808.
- Rabson,A.R., Hallett,A.F. & Koornhof,H.J. 1975. Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J.Infect.Dis.*, **131**, 447-451.
- Radnedge,L., Agron,P.G., Worsham,P.L. & Andersen,G.L. 2002. Genome plasticity in *Yersinia pestis*. *Microbiology*, **148**, 1687-1698.
- Ramamurthi,K.S.& Schneewind,O. 2002. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: mutational analysis of the *yopQ* secretion signal. *J.Bacteriol.*, **184**, 3321-3328.
- Ramamurthi,K.S.& Schneewind,O. 2003. *Yersinia yopQ* mRNA encodes a bipartite type III secretion signal in the first 15 codons. *Mol.Microbiol.*, **50**, 1189-1198.
- Rietsch,A.& Mekalanos,J.J. 2006. Metabolic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol.Microbiol.*, **59**, 807-820.
- Rietsch,A., Wolfgang,M.C. & Mekalanos,J.J. 2004. Effect of metabolic imbalance on expression of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect.Immun.*, **72**, 1383-1390.
- Rimpiläinen,M., Forsberg,A. & Wolf-Watz,H. 1992. A novel protein, LcrQ, involved in the low-calcium response of *Yersinia pseudotuberculosis* shows extensive homology to YopH. *J.Bacteriol.*, **174**, 3355-3363.
- Robert Koch-Institut 2007. *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2006*. Berlin.
- Roggenkamp,A., Ackermann,N., Jacobi,C.A., Trülzsch,K., Hoffmann,H. & Heesemann,J. 2003. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J.Bacteriol.*, **185**, 3735-3744.
- Roggenkamp,A., Neuberger,H.R., Flugel,A., Schmoll,T. & Heesemann,J. 1995. Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol.Microbiol.*, **16**, 1207-1219.
- Rohde,J.R., Fox,J.M. & Minnich,S.A. 1994. Thermoregulation in *Yersinia enterocolitica* is coincident with changes in DNA supercoiling. *Mol.Microbiol.*, **12**, 187-199.
- Rohde,J.R., Luan,X.S., Rohde,H., Fox,J.M. & Minnich,S.A. 1999. The *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37 degrees C. *J.Bacteriol.*, **181**, 4198-4204.
- Rosqvist,R., Bolin,I. & Wolf-Watz,H. 1988. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. *Infect.Immun.*, **56**, 2139-2143.
- Rosqvist,R., Forsberg,A., Rimpiläinen,M., Bergman,T. & Wolf-Watz,H. 1990. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol.Microbiol.*, **4**, 657-667.
- Rosqvist,R., Magnusson,K.E. & Wolf-Watz,H. 1994. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.*, **13**, 964-972.

- Rössle, M.W., Klaering, R., Ristau, U., Robrahn, B., Jahn, D., Gehrman, T., Konarev, P., Round, A., Fiedler, S., Hermes, C. & Svergun, D. 2007. Upgrade of the small-angle X-ray scattering beamline X33 at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg. *J. Appl. Crystallogr.*, **4**, 190-194.
- Ruckdeschel, K., Harb, S., Roggenkamp, A., Hornef, M., Zumbihl, R., Kohler, S., Heesemann, J. & Rouot, B. 1998. *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J. Exp. Med.*, **187**, 1069-1079.
- Ruckdeschel, K., Machold, J., Roggenkamp, A., Schubert, S., Pierre, J., Zumbihl, R., Liautard, J.P., Heesemann, J. & Rouot, B. 1997. *Yersinia enterocolitica* promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-alpha production. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15920-15927.
- Ruckdeschel, K., Mannel, O., Richter, K., Jacobi, C.A., Trulzsch, K., Rouot, B. & Heesemann, J. 2001. *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J. Immunol.*, **166**, 1823-1831.
- Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Schubert, S. & Heesemann, J. 1996. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect. Immun.*, **64**, 724-733.
- Rüssmann, H., Kubori, T., Sauer, J. & Galan, J.E. 2002. Molecular and functional analysis of the type III secretion signal of the *Salmonella enterica* InvJ protein. *Mol. Microbiol.*, **46**, 769-779.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sarker, M.R., Neyt, C., Stainier, I. & Cornelis, G.R. 1998. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J. Bacteriol.*, **180**, 1207-1214.
- Sauer, U. & Eikmanns, B.J. 2005. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**, 765-794.
- Sauvonnet, N., Pradet-Balade, B., Garcia-Sanz, J.A. & Cornelis, G.R. 2002. Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. *J. Biol. Chem.*, **277**, 25133-25142.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T. & Gey, G.O. 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.*, **97**, 695-710.
- Schesser, K., Frithz-Lindsten, E. & Wolf-Watz, H. 1996. Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. *J. Bacteriol.*, **178**, 7227-7233.
- Schesser, K., Spiik, A.K., Dukuzumuremyi, J.M., Neurath, M.F., Pettersson, S. & Wolf-Watz, H. 1998. The yopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol. Microbiol.*, **28**, 1067-1079.
- Schlumberger, M.C., Müller, A.J., Ehrbar, K., Winnen, B., Duss, I., Stecher, B. & Hardt, W.D. 2005. Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* SipA injection into host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 12548-12553.
- Schmid, A., Dittmann, S., Grimminger, V., Walter, S., Heesemann, J. & Wilharm, G. 2006. *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycD: recombinant expression, purification and characterization of a homodimer. *Protein Expr. Purif.*, **49**, 176-182.
- Schmid, A., Neumayer, W., Trülzsch, K., Israel, I., Imhof, A., Rössle, M., Sauer, G., Richter, S., Heesemann, J. & Wilharm, G. 2008. Cross-talk between type three secretion system and metabolism in *Yersinia*. *J. Biol. Chem.*, in revision

- Schmiel,D.H., Young,G.M. & Miller,V.L. 2000. The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene *yplA* is part of the flagellar regulon. *J.Bacteriol.*, **182**, 2314-2320.
- Schubot,F.D., Jackson,M.W., Penrose,K.J., Cherry,S., Tropea,J.E., Plano,G.V. & Waugh,D.S. 2005. Three-dimensional structure of a macromolecular assembly that regulates type III secretion in *Yersinia pestis*. *J.Mol.Biol.*, **346**, 1147-1161.
- Schulze-Koops,H., Burkhardt,H., Heesemann,J., Kirsch,T., Swoboda,B., Bull,C., Goodman,S. & Emmrich,F. 1993. Outer membrane protein YadA of enteropathogenic *Yersiniae* mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect.Immun.*, **61**, 2513-2519.
- Schulze-Koops,H., Burkhardt,H., Heesemann,J., von der,M.K. & Emmrich,F. 1992. Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersiniae* to various types of collagen. *Infect.Immun.*, **60**, 2153-2159.
- Semenyuk,A.V.& Svergun,D.I. 1991. GNOM - a program package for small-angle scattering data processing. *Journal of Applied Crystallography*, **24**, 537-540.
- Shao,F., Merritt,P.M., Bao,Z., Innes,R.W. & Dixon,J.E. 2002. A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell*, **109**, 575-588.
- Sikorski,R.S., Boguski,M.S., Goebel,M. & Hieter,P. 1990. A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell*, **60**, 307-317.
- Simonet,M., Riot,B., Fortineau,N. & Berche,P. 1996. Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *Infect.Immun.*, **64**, 375-379.
- Singer,A.U., Desveaux,D., Betts,L., Chang,J.H., Nimchuk,Z., Grant,S.R., Dangl,J.L. & Sondek,J. 2004. Crystal structures of the type III effector protein AvrPphF and its chaperone reveal residues required for plant pathogenesis. *Structure.*, **12**, 1669-1681.
- Skryzpek,E.& Straley,S.C. 1993. LcrG, a secreted protein involved in negative regulation of the low-calcium response in *Yersinia pestis*. *J.Bacteriol.*, **175**, 3520-3528.
- Skryzpek,E., Cowan,C. & Straley,S.C. 1998. Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol.Microbiol.*, **30**, 1051-1065.
- Skryzpek,E.& Straley,S.C. 1995. Differential effects of deletions in *lcrV* on secretion of V antigen, regulation of the low-Ca²⁺ response, and virulence of *Yersinia pestis*. *J.Bacteriol.*, **177**, 2530-2542.
- Skurnik,M., el Tahir,Y., Saarinen,M., Jalkanen,S. & Toivanen,P. 1994. YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. *Infect.Immun.*, **62**, 1252-1261.
- Skurnik,M., Peippo,A. & Ervela,E. 2000. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol.Microbiol.*, **37**, 316-330.
- Smith,C.L., Khandelwal,P., Keliikuli,K., Zuiderweg,E.R. & Saper,M.A. 2001. Structure of the type III secretion and substrate-binding domain of *Yersinia* YopH phosphatase. *Mol.Microbiol.*, **42**, 967-979.
- Smith,R.S., Wolfgang,M.C. & Lory,S. 2004. An adenylate cyclase-controlled signaling network regulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect.Immun.*, **72**, 1677-1684.
- Smith,T.E. 1968. *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase: characterization and sedimentation behavior. *Arch.Biochem.Biophys.*, **128**, 611-622.

- Snellings,N.J., Popek,M. & Lindler,L.E. 2001. Complete DNA sequence of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:8 low-calcium-response plasmid reveals a new virulence plasmid-associated replicon. *Infect.Immun.*, **69**, 4627-4638.
- Song,Y., Tong,Z., Wang,J., Wang,L., Guo,Z., Han,Y., Zhang,J., Pei,D., Zhou,D., Qin,H., Pang,X., Han,Y., Zhai,J., Li,M., Cui,B., Qi,Z., Jin,L., Dai,R., Chen,F., Li,S., Ye,C., Du,Z., Lin,W., Wang,J., Yu,J., Yang,H., Wang,J., Huang,P. & Yang,R. 2004. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. *DNA Res.*, **11**, 179-197.
- Sorg,I., Goehring,U.M., Aktories,K. & Schmidt,G. 2001. Recombinant *Yersinia* YopT leads to uncoupling of RhoA-effector interaction. *Infect.Immun.*, **69**, 7535-7543.
- Sorg,J.A., Miller,N.C. & Schneewind,O. 2005. Substrate recognition of type III secretion machines-testing the RNA signal hypothesis. *Cell Microbiol.*, **7**, 1217-1225.
- Sory,M.P., Boland,A., Lambermont,I. & Cornelis,G.R. 1995. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **92**, 11998-12002.
- Sory,M.P.& Cornelis,G.R. 1994. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol.Microbiol.*, **14**, 583-594.
- Soto,G.E.& Hultgren,S.J. 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J.Bacteriol.*, **181**, 1059-1071.
- Stainier,I., Iriarte,M. & Cornelis,G.R. 1997. YscM1 and YscM2, two *Yersinia enterocolitica* proteins causing downregulation of yop transcription. *Mol.Microbiol.*, **26**, 833-843.
- Stebbins,C.E.& Galan,J.E. 2001. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature*, **414**, 77-81.
- Straley,S.C., Skrzypek,E., Plano,G.V. & Bliska,J.B. 1993. Yops of *Yersinia* spp. pathogenic for humans. *Infect.Immun.*, **61**, 3105-3110.
- Studier,F.W.& Moffatt,B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Mol.Biol.*, **189**, 113-130.
- Sun,P., Tropea,J.E., Austin,B.P., Cherry,S. & Waugh,D.S. 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.*
- Surgalla,M.J., Andrews,A.W. & Baugh,C.L. 1964. Effects of bicarbonate on growth of *Pasteurella pestis*. I. Differential response of virulent and avirulent cells. *J.Bacteriol.*, **88**, 269-272.
- Svergun,D.I. 1997. Restoring three-dimensional structure of biopolymers from solution scattering. *Journal of Applied Crystallography*, **30**, 792-797.
- Swietnicki,W., O'Brien,S., Holman,K., Cherry,S., Brueggemann,E., Tropea,J.E., Hines,H.B., Waugh,D.S. & Ulrich,R.G. 2004. Novel protein-protein interactions of the *Yersinia pestis* type III secretion system elucidated with a matrix analysis by surface plasmon resonance and mass spectrometry. *J.Biol.Chem.*, **279**, 38693-38700.
- Takao,T., Tominaga,N., Shimonishi,Y., Hara,S., Inoue,T. & Miyama,A. 1984. Primary structure of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **125**, 845-851.
- Tampakaki,A.P., Fadouloglou,V.E., Gazi,A.D., Panopoulos,N.J. & Kokkinidis,M. 2004. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol.*, **6**, 805-816.
- Tardy,F., Hombler,F., Neyt,C., Wattiez,R., Cornelis,G.R., Ruysschaert,J.M. & Cabaux,V. 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *EMBO J.*, **18**, 6793-6799.

- Tauxe,R.V., Vandepitte,J., Wauters,G., Martin,S.M., Goossens,V., De Mol,P., Van Noyen,R. & Thiers,G. 1987. *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet*, **1**, 1129-1132.
- Tengel,T., Sethson,I. & Francis,M.S. 2002. Conformational analysis by CD and NMR spectroscopy of a peptide encompassing the amphipathic domain of YopD from *Yersinia*. *Eur.J.Biochem.*, **269**, 3659-3668.
- Terada,K.& Izui,K. 1991. Site-directed mutagenesis of the conserved histidine residue of phosphoenolpyruvate carboxylase. His138 is essential for the second partial reaction. *Eur.J.Biochem.*, **202**, 797-803.
- Thomson,N.R., Howard,S., Wren,B.W., Holden,M.T., Crossman,L., Challis,G.L., Churcher,C., Mungall,K., Brooks,K., Chillingworth,T., Feltwell,T., Abdellah,Z., Hauser,H., Jagels,K., Maddison,M., Moule,S., Sanders,M., Whitehead,S., Quail,M.A., Dougan,G., Parkhill,J. & Prentice,M.B. 2006. The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLoS.Genet.*, **2**, e206.
- Towbin,H., Staehelin,T. & Gordon,J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **76**, 4350-4354.
- Trame,C.B.& McKay,D.B. 2003. Structure of the *Yersinia enterocolitica* molecular-chaperone protein SycE. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.*, **59**, 389-392.
- Treck,J., Wilharm,G., Jacobi,C.A. & Heesemann,J. 2002. *Yersinia enterocolitica* YopQ: strain-dependent cytosolic accumulation and post-translational secretion. *Microbiology*, **148**, 1457-1465.
- Troisfontaines,P.& Cornelis,G.R. 2005. Type III secretion: more systems than you think. *Physiology.(Bethesda.)*, **20**, 326-339.
- Trosky,J.E., Liverman,A.D. & Orth,K. 2008. *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol.*, **10**, 557-565.
- Tsarbopoulos,A., Karas,M., Strupat,K., Pramanik,B.N., Nagabhushan,T.L. & Hillenkamp,F. 1994. Comparative mapping of recombinant proteins and glycoproteins by plasma desorption and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal.Chem.*, **66**, 2062-2070.
- van Eerde,A., Hamiaux,C., Perez,J., Parsot,C. & Dijkstra,B.W. 2004. Structure of Spa15, a type III secretion chaperone from *Shigella flexneri* with broad specificity. *EMBO Rep.*, **5**, 477-483.
- Viitanen,A.M., Toivanen,P. & Skurnik,M. 1990. The *lcrE* gene is part of an operon in the *lcr* region of *Yersinia enterocolitica* O:3. *J.Bacteriol.*, **172**, 3152-3162.
- Volkov,V.V.& Svergun,D.I. 2003. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography*, **36**, 860-864.
- Wang,Q., Frye,J.G., McClelland,M. & Harshey,R.M. 2004. Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Mol.Microbiol.*, **52**, 169-187.
- Wattiau,P., Bernier,B., Deslee,P., Michiels,T. & Cornelis,G.R. 1994. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **91**, 10493-10497.
- Wattiau,P.& Cornelis,G.R. 1993. SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in Ohe secretion of YopE. *Mol.Microbiol.*, **8**, 123-131.
- Wattiau,P.& Cornelis,G.R. 1994. Identification of DNA sequences recognized by VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia yop* regulon. *J.Bacteriol.*, **176**, 3878-3884.
- Wauters,G. 1979. Carriage of *Yersinia enterocolitica* serotype 3 by pigs as a source of human infection. *Contrib.Microbiol.Immunol.*, **5**, 249-252.
- Wauters,G., Kandolo,K. & Janssens,M. 1987. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib.Microbiol.Immunol.*, **9**, 14-21.

- Wayson,N.E., McMahon,C. & Prince,F.M. 1946. An evaluation of three plague vaccines against infection in guinea pigs induced by natural and artificial methods. *Public Health Rep.*, **61**, 1518.
- Weber-Sparenberg,C., Poplau,P., Brookman,H., Rochon,M., Mockel,C., Nietschke,M. & Jung,H. 2006. Characterization of the type III export signal of the flagellar hook scaffolding protein FlgD of *Escherichia coli*. *Arch.Microbiol.*, **186**, 307-316.
- Wilharm,G., Dittmann,S., Schmid,A. & Heesemann,J. 2007. On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion. *Int.J.Med.Microbiol.*, **297**, 27-36.
- Wilharm,G., Lehmann,V., Krauss,K., Lehnert,B., Richter,S., Ruckdeschel,K., Heesemann,J. & Trülsch,K. 2004. *Yersinia enterocolitica* type III secretion depends on the proton motive force but not on the flagellar motor components MotA and MotB. *Infect.Immun.*, **72**, 4004-4009.
- Wilharm,G., Neumayer,W. & Heesemann,J. 2003. Recombinant *Yersinia enterocolitica* YscM1 and YscM2: homodimer formation and susceptibility to thrombin cleavage. *Protein Expr.Purif.*, **31**, 167-172.
- Willert,D.J.v. 1975. Die Bedeutung des anorganischen Phosphats für die Regulation der Phosphoenolpyruvat Carboxylase von *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta (Berl.)*, **122**, 273-280.
- Williams,A.W.& Straley,S.C. 1998. YopD of *Yersinia pestis* plays a role in negative regulation of the low-calcium response in addition to its role in translocation of Yops. *J.Bacteriol.*, **180**, 350-358.
- Woestyn,S., Allaoui,A., Wattiau,P. & Cornelis,G.R. 1994. YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J.Bacteriol.*, **176**, 1561-1569.
- Woestyn,S., Sory,M.P., Boland,A., Lequenne,O. & Cornelis,G.R. 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**, 1261-1271.
- Wohl,R.C.& Markus,G. 1972. Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Purification and some properties. *J.Biol.Chem.*, **247**, 5785-5792.
- Wolfgang,M.C., Lee,V.T., Gilmore,M.E. & Lory,S. 2003. Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev.Cell*, **4**, 253-263.
- Wren,B.W. 2003. The *yersiniae*-a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat.Rev.Microbiol.*, **1**, 55-64.
- Wulff-Strobel,C.R., Williams,A.W. & Straley,S.C. 2002. LcrQ and SycH function together at the Ysc type III secretion system in *Yersinia pestis* to impose a hierarchy of secretion. *Mol.Microbiol.*, **43**, 411-423.
- Yahr,T.L., Goranson,J. & Frank,D.W. 1996. Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol.Microbiol.*, **22**, 991-1003.
- Yang,H., Shan,Z., Kim,J., Wu,W., Lian,W., Zeng,L., Xing,L. & Jin,S. 2007. Regulatory role of PopN and its interacting partners in type III secretion of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.*, **189**, 2599-2609.
- Yang,Y., Merriam,J.J., Mueller,J.P. & Isberg,R.R. 1996. The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. *Infect.Immun.*, **64**, 2483-2489.
- Yip,C.K., Finlay,B.B. & Strynadka,N.C. 2005a. Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, **12**, 75-81.
- Yip,C.K., Kimbrough,T.G., Felise,H.B., Vuckovic,M., Thomas,N.A., Pfuetzner,R.A., Frey,E.A., Finlay,B.B., Miller,S.I. & Strynadka,N.C. 2005b. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature*, **435**, 702-707.
- Yother,J., Chamness,T.W. & Goguen,J.D. 1986. Temperature-controlled plasmid regulon associated with low calcium response in *Yersinia pestis*. *J.Bacteriol.*, **165**, 443-447.

- Young,G.M., Badger,J.L. & Miller,V.L. 2000. Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.*, **68**, 4323-4326.
- Zahorchak,R.J., Charnetzky,W.T., Little,R.V. & Brubaker,R.R. 1979. Consequences of Ca²⁺ deficiency on macromolecular synthesis and adenylate energy charge in *Yersinia pestis*. *J.Bacteriol.*, **139**, 792-799.
- Zhang,Y., Ting,A.T., Marcu,K.B. & Bliska,J.B. 2005. Inhibition of MAPK and NF-kappa B pathways is necessary for rapid apoptosis in macrophages infected with *Yersinia*. *J.Immunol.*, **174**, 7939-7949.
- Zhang,Z.Y., Clemens,J.C., Schubert,H.L., Stuckey,J.A., Fischer,M.W., Hume,D.M., Saper,M.A. & Dixon,J.E. 1992. Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant *Yersinia* protein tyrosine phosphatase. *J.Biol.Chem.*, **267**, 23759-23766.
- Zhou,D., Tong,Z., Song,Y., Han,Y., Pei,D., Pang,X., Zhai,J., Li,M., Cui,B., Qi,Z., Jin,L., Dai,R., Du,Z., Wang,J., Guo,Z., Wang,J., Huang,P. & Yang,R. 2004. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus. *J.Bacteriol.*, **186**, 5147-5152.
- Zimmerman,S.B.& Trach,S.O. 1991. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.*, **222**, 599-620.
- Zumbihl,R., Aepfelbacher,M., Andor,A., Jacobi,C.A., Ruckdeschel,K., Rouot,B. & Heesemann,J. 1999. The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J.Biol.Chem.*, **274**, 29289-29293.

PUBLIKATIONSLISTE

- Schmid,A., Dittmann,S., Grimminger,V., Walter,S., Heesemann,J. & Wilharm,G. 2006. *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycD: recombinant expression, purification and characterization of a homodimer. *Protein Expr.Purif.*, **49**, 176-182.
- Wilharm,G., Dittmann,S., Schmid,A. & Heesemann,J. 2007. On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion. *Int.J.Med.Microbiol.*, **297**, 27-36.
- Reithmeier-Rost,D., Hill,J., Elvin,S.-J., Williamson,D., Dittmann,S., Schmid,A., Wilharm,G. & Sing,A. 2007. The weak interaction of LcrV and TLR2 does not contribute to the virulence of *Yersinia pestis*. *Microbes Infect.*, **9**, 997-1002.
- Dittmann,S., Schmid,A., Richter,S., Trülzsch,K., Hesseemann,J. & Wilharm,G. 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.
- Schmid,A., Neumayer,W., Trülzsch,K., Israel,L., Imhof,A., Rössle,M., Sauer,G., Richter,S., Heesemann,J. & Wilharm,G. 2008. Cross-talk between type III secretion system and metabolism in *Yersinia*. *J.Biol.Chem.* in revision

TAGUNGSBEITRÄGE

Schmid,A., Dittmann,S., Grimminger,V., Walter,S., Heesemann,J. & Wilharm,G.

Jahreskongress der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) vom 19.-22. März in Jena

Poster: *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycD: recombinant expression, purification and characterization of a homodimer.

Neumayer,W., Trülzsch,K., Schmid,A., Sauer,G., Richter,S., Heesemann,J. & Wilharm,G.

Jahreskongress der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) vom 19.-22. März in Jena

Vortrag: Cross-talk between type three secretion system and metabolism in *Yersinia*: modulation of the phosphoenolpyruvate carboxylase.

Schmid,A., Dittmann,S., Grimminger,V., Walter,S., Heesemann,J. & Wilharm,G.

ASM-FEMS Conference on Protein Traffic in Prokaryotes vom 06.-10. Mai 2006 auf Kreta

Poster: *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycD: recombinant expression, purification and characterization of a homodimer.

Wilharm,G., Neumayer,W., Trülzsch,K., Schmid,A., Sauer,G., Richter,S. & Heesemann,J.

ASM-FEMS Conference on Protein Traffic in Prokaryotes vom 06.-10. Mai 2006 auf Kreta

Poster: Cross-talk between type three secretion system and metabolism in *Yersinia*.

Schmid,A., Dittmann,S., Grimminger,V., Walter,S., Heesemann,J. & Wilharm,G.

Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) vom 01.-04. Oktober 2006 in Würzburg

Vortrag: *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycD: recombinant expression, purification and characterization of a homodimer.

Schmid,A., Neumayer,W., Wilharm,G. & Heesemann,J.

Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) vom 30. September-04. Oktober in Göttingen

Poster: Cross-talk between the type three secretion system and metabolism in *Yersinia enterocolitica*.

Dittmann,S., Schmid,A., Wilharm,G. & Heesemann,J.

Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) vom 30. September-04. Oktober in Göttingen

Poster: Characterization of the type III secretion system chaperone SycO of *Yersinia enterocolitica*.

Reithmeier-Rost,D., Hill,J., Elwin,S.J., Williamson,D., Dittmann,S., Schmid,A., Wilharm,G. & Sing,A.

Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) vom 30. September-04. Oktober in Göttingen

Poster: The weak interaction of LcrV and TLR2 does not contribute to the virulence of *Yersinia pestis*.

Schmid,A., Neumayer,W., Heesemann,J. & Wilharm,G.

Interact PhD Symposium am 07. Dezember 2007 in Martinsried

Poster: *Yersinia enterocolitica* modulates metabolism via the virulence factor YscM1.

Schmid,A., Neumayer,W., Trülzsch,K., Israel,L., Imhof,A., Rössle,M., Sauer,G., Richter,S., Heesemann,J. & Wilharm,G.

1st national conference on *Yersinia* vom 25.-26. Juli in Braunschweig

Vortrag: Cross-talk between the type three secretion and metabolism in *Yersinia enterocolitica*.

LEBENS LAUF**Angaben zur Person**

Name : Annika Schmid

Geburtsdatum: 30.10.1979

Geburtsort: München

Studium

- seit Februar 2005 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Bakteriologie im Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie (Prof. Dr. Dr. J. Heesemann) der Ludwig-Maximilians-Universität München
Titel: Analyse von Regulatorproteinen des *Yersinia* Typ III Sekretionssystems: Bedeutung Typ III-spezifischer Chaperone und Kontrolle der Aktivität der Phosphoenolpyruvatcarboxylase
- November 2004 Erhalt des Hochschulgrades „Diplom-Biologin“
- 1999 – 2004 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Schwerpunkt Genetik
Nebenfächer: Biochemie, Mikrobiologie, Immunologie
Diplomarbeit bei Frau Prof. Dr. B. Averhoff:
Analyse der Struktur, Funktion und Regulation von Komponenten des Kompetenzapparates von *Thermus thermophilus* HB27
- Schul Ausbildung**
- 1990 – 1999 Besuch des Gymnasiums München-Fürstenried
Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife
- 1986 – 1990 Besuch der Canisiusgrundschule in München

DANKSAGUNG

Ich danke ganz herzlich Frau Prof. Dr. Kirsten Jung für die Übernahme des Erstgutachtens und für die Bereitschaft, meine Arbeit vor der biologischen Fakultät der LMU zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit am Max von Pettenkofer-Institut durchzuführen und für die interessanten Anregungen zum Thema.

Besonder möchte ich PD Dr. Gottfried Wilharm für die Bereitstellung des spannenden Themas, die Betreuung (auch aus der Ferne), die Diskussionsbereitschaft und die vielen Möglichkeiten und Anregungen, die er mir im Bereich der Forschung gegeben hat, danken.

Dr. Manfred Rössel (EMBL, Hamburg) möchte ich für die Unterstützung bei der Auswertung der SAXS-Daten danken.

Bei Prof. Dr. Axel Imhof und Dr. Lars Israel (ZfP, München) möchte ich mich für die Analyse der Massenspektrometrie und ein immer offenes Ohr für neue Formatierungswünsche bedanken.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Kollegen, die ich während meiner Arbeit am Max von Pettenkofer-Institut kennen und schätzen gelernt habe. Julia möchte ich speziell für Ihre Hilfsbereitschaft in Laborbelangen während meiner „heißen“ Schreibphase danken. Ganz besonders danke ich Svea, Katy, Robert, Isabel und Eva für die schöne gemeinsame Zeit auch außerhalb des Labors. Ich hoffe sehr, dass das auch zukünftig so bleiben wird!

Bei Svea möchte ich mich besonders für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen bedanken, das hat mir sehr oft weiter geholfen!

Ich danke allen, die durch das Korrekturlesen der Arbeit dazu beigetragen haben, Fehler auszumerken.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, die mich stets bei der Verwirklichung meiner Ziele unterstützt hat.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Benny: Deine steten Aufmunterungen und „Ablenkungsmanöver“ haben mir immer Kraft und Zuversicht gegeben.