

**Substratspezifität der nicht-dbl-homologen G-Nukleotid-  
Austauschfaktoren SopE und SopE2 aus *Salmonella*  
*typhimurium***

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

vorgelegt von  
Andrea Friebel  
aus München

---

Februar 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck

2. Gutachter: Prof. Dr. E. Weiß

Sondergutachter: Prof. Dr. W.-D. Hardt

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 2002

Aus dieser Arbeit gingen folgende Veröffentlichungen hervor:

**Friebel, A.,** Hardt, W. D. (2000) Purification and biochemical activity of *Salmonella* exchange factor SopE. *Methods Enzymol* 325, 82-91.

**Stender, S.,** Friebel, A., Linder, S., Rohde, M., Miold, S., und Hardt, W. D. (2000) Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol* 36, 1206-1221.

**Friebel, A.,** Ilchmann, H., Aepfelbacher, M., Ehrbar, K., Machleidt, W., und Hardt, W. D. (2001) SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem* 276, 34035-34040.

**Ehrbar, K.,** Miold, S., Friebel, A., Stender, S., und Hardt, W. D. (2001) Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Int J Med Microbiol* 291, 479-485.

**Buchwald, G.,** Friebel, A., Galán, J. E., Hardt, W. D., Wittinghofer, A., und Scheffzek, K. (2002) Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE. *EMBO* 21 (13).



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>A.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.	Klassifizierung von <i>Salmonella</i> spp.	1
2.	Virulenzmechanismen von <i>Salmonella</i> spp.	3
2.1.	Invasion in Wirtszellen	3
2.2.	Der SPI1-kodierte Typ III-Translokationsapparat	4
2.3.	Effektoren des Typ III-Translokationsapparates	5
3.	Signaltransduktionsprozesse in der Zelle	7
3.1.	Regulatorische G-bindende Proteine	8
3.2.	Der GTPase-Zyklus	8
3.3.	Die Ras-homologen Proteine	10
3.4.	Rho, Rac und Cdc42	11
4.	Bakterielle Modifikation von RhoGTPasen	13
<b>B.</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>15</b>
<b>C.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
1.	Stämme, Zelllinien, Plasmide und Oligonukleotide	16
2.	Nährmedien	19
3.	Enzyme, Chemikalien und Puffer	21
4.	Anzucht	22
4.1.	Anzucht von Bakterien	22
4.2.	Anzucht von Gewebekulturzellen	23
5.	Molekulargenetische Methoden	23
5.1.	Schnellisolierung von Plasmid-DNA	24
5.2.	PCR-Methoden	24
5.2.1.	Mutagenese-PCR	24
5.2.2.	Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels PCR zur Klonierung	24
5.3.	Sequenzierungen	25
5.4.	Transformation	25
6.	Proteinreinigung und -modifikation	25
6.1.	Herstellung von GST-Fusionsproteinen	25
6.2.	Spaltung von GST-Fusionsproteinen	26
6.3.	Herstellung von verkürztem SopE	27
6.4.	Herstellung von Protein-Nukleotidkomplexen	27
6.4.1.	Herstellung von mantGDP·Cdc42	27
6.4.2.	Herstellung von mantGDP·Rac1	28

<b>7.</b>	<b>Proteinbiochemische Standardmethoden</b>	<b>28</b>
<b>7.1.</b>	<b>Quantitative Proteinbestimmung</b>	<b>28</b>
<b>7.2.</b>	<b>Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>	<b>28</b>
<b>8.</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	<b>29</b>
<b>9.</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	<b>30</b>
<b>9.1.</b>	<b>Nitrozellulose-Filterbindungstest</b>	<b>30</b>
<b>9.2.</b>	<b>Fluoreszenzspektrometrie</b>	<b>30</b>
<b>9.3.</b>	<b>Oberflächenplasmonresonanz-Spektrometrie</b>	<b>32</b>
<b>9.4.</b>	<b>CD-Spektroskopie</b>	<b>32</b>
<b>10.</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>33</b>
<b>10.1.</b>	<b>Immunfluoreszenzfärbung</b>	<b>33</b>
10.1.1.	Translokationsstudien	33
10.1.2.	Nachweis von Aktinumlagerungen	33
<b>10.2.</b>	<b>Gentamycin-Protektionsversuch</b>	<b>34</b>
<b>10.3.</b>	<b>Affinitätspräzipitation</b>	<b>35</b>
<b>10.4.</b>	<b>Aktivierung von Proteinkinasen</b>	<b>36</b>
<b>11.</b>	<b>Bioinformatische Methoden</b>	<b>36</b>
<b>D.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
<b>1.</b>	<b>Biochemische und zellbiologische Charakterisierung der Effektorproteine SopE und SopE2 von <i>S. typhimurium</i></b>	<b>37</b>
<b>1.1.</b>	<b>Substratspezifität von SopE und SopE2</b>	<b>38</b>
<b>1.2.</b>	<b>Aufreinigung von SopE</b>	<b>38</b>
<b>1.3.</b>	<b>Filterbindungsversuche</b>	<b>40</b>
<b>1.4.</b>	<b>Die Michaelis-Menten-Kinetik des SopE bzw. SopE2-vermittelten Nukleotidaustauschs</b>	<b>43</b>
<b>1.5.</b>	<b>Die Gleichgewichtskonstanten der GEF·RhoGTPase-Komplexe</b>	<b>48</b>
<b>1.6.</b>	<b>Morphologie der SopE- und SopE2-induzierten Membranausstülpungen</b>	<b>51</b>
<b>1.7.</b>	<b>SopE- oder SopE2-vermittelte Invasivität</b>	<b>55</b>
<b>1.8.</b>	<b>Translokation von SopE und SopE2 in die Wirtszelle</b>	<b>56</b>
1.8.1.1.	Domänenaustausch zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von SopE und SopE2	57
<b>1.9.</b>	<b><i>in vivo</i>-Quantifizierung durch Affinitätspräzipitationsversuche</b>	<b>58</b>
<b>1.10.</b>	<b>Aktivierung von Proteinkinasen durch SopE und SopE2</b>	<b>61</b>
<b>1.11.</b>	<b>Einfluss der Magnesiumkonzentration auf die Substratspezifität</b>	<b>63</b>
<b>2.</b>	<b>Die Kristallstruktur des SopE·Cdc42-Komplexes</b>	<b>64</b>
<b>2.1.</b>	<b>Aufreinigung von N-terminal verkürztem SopE</b>	<b>65</b>
<b>2.2.</b>	<b>Kristallisation des Komplexes und seine Struktur</b>	<b>65</b>
<b>2.3.</b>	<b>Gerichtete Mutagenese im SopE·Cdc42-Komplex</b>	<b>67</b>
<b>2.4.</b>	<b>Zellbiologische Charakterisierung der Proteinvarianten</b>	<b>70</b>
2.4.1.	Invasivität	70
2.4.2.	Morphologie der Membranalagerungen	73
<b>2.5.</b>	<b>Biochemische Charakterisierung der Proteinvarianten</b>	<b>73</b>
2.5.1.	Aufreinigung der Proteinvarianten	74

2.5.2.	Bindungsvermögen für Cdc42	74
2.5.3.	Konformationelle Eigenschaften und Stabilität	78
2.5.3.1.	Stabilität	78
2.5.3.2.	CD-Spektroskopie	79
2.5.4.	Die Michaelis-Menten –Kinetik	81
2.5.4.1.	Substratüberschuss-Experimente	81
2.5.4.2.	Enzymüberschuss-Experimente	82
<b>3.</b>	<b>Biochemische Untersuchung der GEF-Aktivität eines SopE-Homologs aus <i>Burkholderia mallei</i></b>	<b>86</b>
<b>E.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>88</b>
<b>1.</b>	<b>Evolution</b>	<b>88</b>
<b>2.</b>	<b>Der katalytische Mechanismus von SopE</b>	<b>89</b>
<b>3.</b>	<b>Vergleich mit dem Tiam 1·Rac1-Komplex</b>	<b>93</b>
<b>4.</b>	<b>Interaktion von SopE und SopE2 mit RhoGTPasen des Wirts</b>	<b>94</b>
<b>5.</b>	<b>Bedeutung der Spezifität</b>	<b>95</b>
<b>F.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>98</b>
<b>G.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>99</b>
<b>H.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>100</b>
<b>I.</b>	<b>ANHANG</b>	
<b>J.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	
<b>K.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	





## A. EINLEITUNG

*Salmonella* spp. gelten weltweit als Hauptverursacher von Durchfällen und fieberhaften Infektionskrankheiten des Verdauungssystems (Miller und Pegues, 2000). Während in den Entwicklungsländern auch systemische Erkrankungen wie Typhus und Paratyphus noch eine wichtige Rolle spielen, treten in den Industrieländern vor allem gastrointestinale Salmonelleninfektionen auf. Man schätzt, dass es jährlich vor allem in Asien und Afrika 16,6 Millionen Typhusfälle gibt, von denen 600 000 tödlich verlaufen. An akuter Gastroenteritis erkranken jährlich weltweit 1,3 Milliarden Menschen, drei Millionen sterben daran (Pang *et al.*, 1995; Pang *et al.*, 1998).

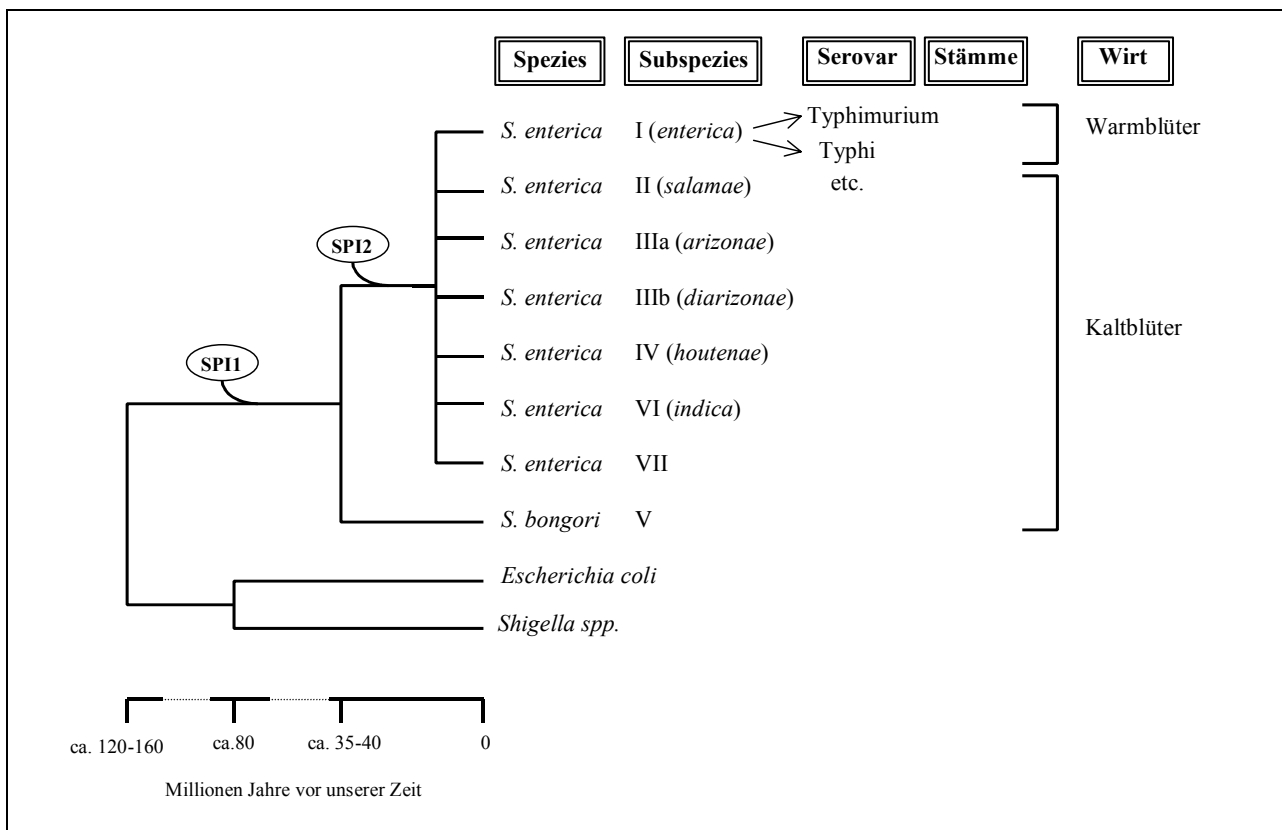
*Salmonella* spp. werden hauptsächlich durch kontaminierte Nahrungsmittel oder Wasser verbreitet und aufgenommen. Untersuchungen zeigen, dass *Salmonella* spp. (v. a. *Salmonella* (*S.*) *typhimurium* und *S. enteritidis*) neben *Listeria monocytogenes* und *Toxoplasma gondii* in den USA zu den drei wichtigsten Verursachern nahrungsmittelbedingter Infektionskrankheiten gehören (Mead *et al.*, 1999). *Salmonella* spp. stellen somit auch heute noch ein weltweites Gesundheitsproblem von großer sozioökonomischer Bedeutung dar.

### 1. Klassifizierung von *Salmonella* spp.

*Salmonella* spp. sind gramnegative, stäbchenförmige, fakultativ intrazelluläre und mit Ausnahme von *S. gallinarum* und *S. pullorum* bewegliche Bakterien, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. *Salmonella* spp. wurden erstmals 1880 von Eberth beschrieben und 1884 von Gaffky kultiviert (Burrows, 1959).

Bisher sind insgesamt über 2400 *Salmonella*-Serovare bekannt (Brenner *et al.*, 2000), die früher nach dem „ein Serotyp - eine Spezies-Konzept“ von Kauffmann auf der Basis der serologischen Identifizierung von O (Lipopolysaccharid)- und H (Flagellen)-Antigenen klassifiziert wurden. Damals wurde für jeden neuen Serovar eine eigene Speziesbezeichnung mit lateinischem Doppelnamen (z.B. *Salmonella typhimurium*) vergeben (Kauffmann-White-Schema; Popoff *et al.*, 1992; Popoff und Le Minor, 1997).

Nach dem heutigen Kenntnisstand werden *Salmonella* spp. in zwei Spezies, *S. bongori* und *S. enterica*, eingeteilt (Crosa *et al.*, 1973; Ewing, 1986; Le Minor *et al.*, 1986; Reeves *et al.*, 1989; Boyd *et al.*, 1996). *S. bongori* trennte sich von *S. enterica* vor 35 bis 40 Mio Jahren ab (Cotter und DiRita, 2000). *S. enterica* wird wiederum in sieben Subspezies aufgeteilt, die mit I, II, IIIa, IIIb, IV, VI und VII bezeichnet werden (Abbildung 1). Jede dieser Subspezies wird, basierend auf den klassischen Antigeneigenschaften, in Serovare und weiter in Stämme unterteilt (Popoff und Le Minor, 1997).



**Abbildung 1: Dendrogramm der Phylogenie der Gattung *Salmonella*.** Dargestellt ist die heutige Einordnung in Spezies, Subspezies, Serovare und Stämme sowie die Wirtsspezifität der einzelnen Subspezies. Zu verschiedenen Stadien der Diversifizierung wurden Pathogenitätsfaktoren wie SPI1 und SPI2 erworben (nach Cotter und DiRita, 2000).

In der Praxis werden bis heute die lateinischen Doppelnamen für die einzelnen Serovare verwendet. Daher wird dieses System auch dieser Arbeit zu Grunde gelegt. *Salmonella enterica* Subspezies I Serovar Typhimurium wird demzufolge als *S. typhimurium* bezeichnet.

Nach Bäumler (Bäumler *et al.*, 1997; Bäumler *et al.*, 1998) fand die phylogenetische Entwicklung der *Salmonella* spp. in drei differenzierten Phasen statt. Die erste Phase, die

Abspaltung von der Gattung *Escherichia*, korreliert dabei mit der Aufnahme von Genen, die den *Salmonella* spp. die Besiedelung des Darms ermöglichen. Diese Gene liegen vor allem auf der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 (SPI1) und wurden durch horizontalen Gentransfer erworben. In der zweiten Phase, der Aufspaltung in *S. enterica* und *S. bongori*, erwarb die *S. enterica*-Linie weitere spezifische Gene, die zur Etablierung einer systemischen Infektion in Warmblütern benötigt werden. Viele dieser Gene sind auf der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2 (SPI2) lokalisiert. Der dritte Evolutionsschritt ist charakterisiert durch die Ausdehnung des Wirtsspektrums von *S. enterica* Subspezies I auf Warmblüter, während *S. bongori* und *S. enterica* Subspezies II-VII mit Kaltblütern wie Fischen, Amphibien und Reptilien assoziiert bleiben.

## 2. Virulenzmechanismen von *Salmonella* spp.

Während der langandauernden Koevolution mit ihrem Wirt haben *Salmonella* spp. Virulenzmechanismen entwickelt, die es ihnen erlauben, den Wirt zu beeinflussen ohne ihn dauerhaft zu schädigen. Hierbei gelingt es dem Bakterium, über bakterienvermittelte Endozytose in nichtphagozytierende Zellen der Darmschleimhaut zu gelangen (Takeuchi *et al.*, 1967; Francis *et al.*, 1993; Garcia-del Portillo und Finlay, 1994), interne Verteidigungsstrategien zu umgehen und eine Vermehrung im Wirt zu sichern.

Im Verlauf der Infektion reagieren die *Salmonella* spp. auf die wechselnden Bedingungen im Wirt mit der Expression verschiedener Virulenzfaktoren. Man schätzt, dass ca. 4 % des *Salmonella*-Chromosoms für Virulenzfaktoren kodieren (Bowe *et al.*, 1998), die in Pathogenitätsinseln, kleineren Genklustern und einzeln liegenden Genen organisiert sind (Groisman und Ochman, 1997; Hacker *et al.*, 1997; Salama und Falkow, 1999; McClelland *et al.* 2001). Einige Stämme verfügen zusätzlich über ein Virulenzplasmid, das jedoch nach heutigem Kenntnisstand hauptsächlich bei der systemischen Infektion von Bedeutung ist und bei der Kolonisierung und der Darminfektion nur eine untergeordnete Rolle spielt (Rotger und Casadeus, 1999; Libby *et al.*, 2000).

### 2.1. Invasion in Wirtszellen

Bevor *Salmonella* spp. in die Wirtszellen invadieren können, müssen sie sich an das Darmepithel des Wirts anheften. Untersuchungen haben gezeigt, dass der erste spezifische Kontakt je nach Wirtsspezies an Enterozyten oder M-Zellen innerhalb der Peyer-Plaques stattfindet (Jones *et al.*,

1994; Frost *et al.*, 1997). Die initiale Bindung an Wirtszellen wird dabei wahrscheinlich über fimbrielle Adhäsine vermittelt (Bäumler *et al.*, 1996; Bäumler *et al.*, 1997).

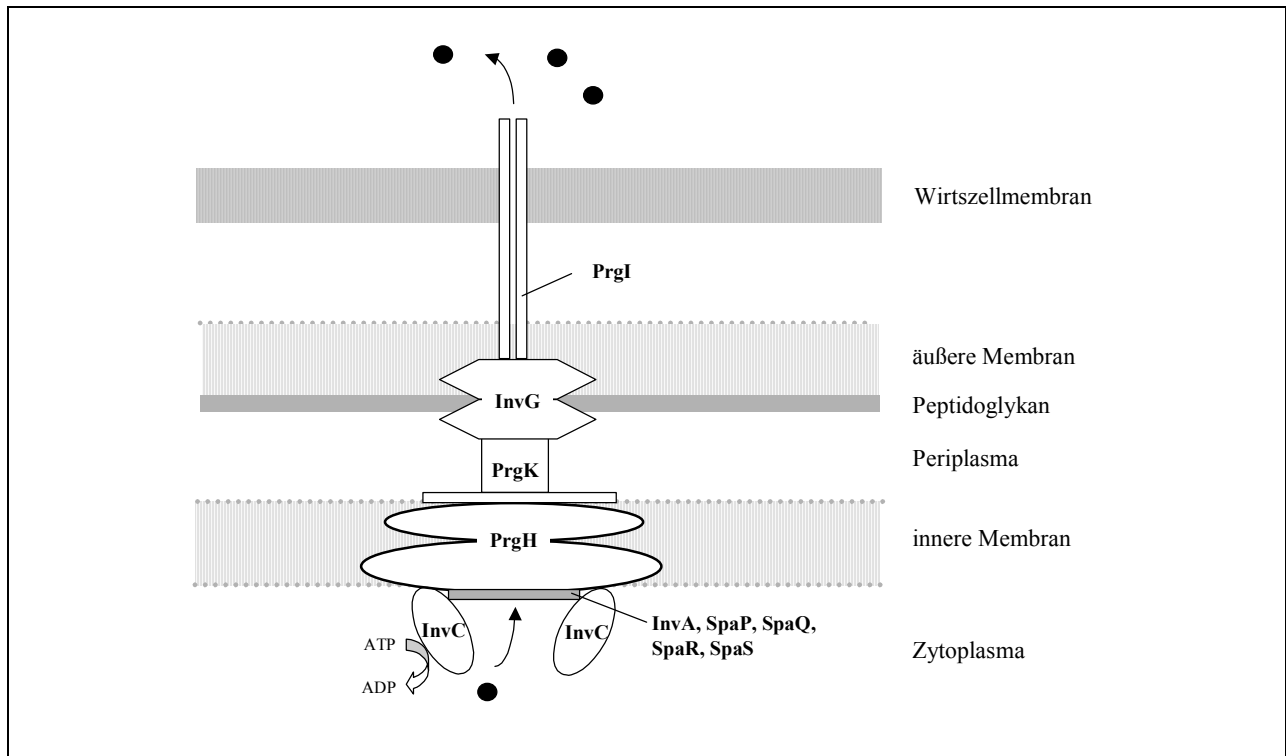
Durch den Wirtszellkontakt wird in den Bakterien ein hochkonservierter SPI1-Typ III-Translokationsapparat aktiviert, der es den *Salmonella* spp. ermöglicht, Effektorproteine direkt in das Zytosol der Wirtszelle zu translozieren (Rosqvist *et al.*, 1994; Zierler und Galán, 1995). Durch die Sekretion dieser Proteine werden wirtseigene Signaltransduktionswege moduliert, wodurch eine Vielzahl zellulärer Antworten ausgelöst wird. Dem Typ III-Translokationsapparat kommt somit eine zentrale Funktion bei der Manipulation des Wechselspiels mit dem Wirt zu (Galán, 1999; Galán und Collmer, 1999; Galán und Zhou, 2000).

## **2.2. Der SPI1-kodierte Typ III-Translokationsapparat**

Der Transport der Effektorproteine durch den SPI1-kodierten Typ III-Translokationsapparat erfolgt über drei Barrieren hinweg, nämlich die innere und äußere Membran des Bakteriums und die Membran der Wirtszelle (Abbildung 2).

Typ III-Translokationsapparate sind strukturell mit dem Flagellenapparat gramnegativer und grampositiver Bakterien verwandt (Mecasas und Strauss, 1996; Kubori *et al.*, 1998; Kubori *et al.*, 2000) und in pflanzen- und tierpathogenen Bakterien weitverbreitet (Galán und Collmer, 1999). Sie gehören zu den komplexesten bekannten Proteinsekretionssystemen. Ihre Funktion umfasst die zeitlich und räumlich koordinierte direkte Translokation der Effektoren ins Wirtszellzytosol.

Bei *Salmonella* spp. spielt eines dieser Systeme (kodiert auf SPI1) bei der Enteritis und bei der Invasion von Wirtszellen eine Rolle, das zweite (kodiert auf SPI2) sichert bei systemischen Infektionen das Überleben in Phagozyten und die intrazelluläre Replikation (Hueck, 1998; Hansen-Wester und Hensel, 2001).



**Abbildung 2: Der SPI1-kodierte Typ III-Translokationsapparat.** Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus des SPI1-kodierten Typ III-Translokationsapparats von *Salmonella* spp. und die Lokalisation der einzelnen Komponenten in der Zellhülle. Das Modell wurde aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen und biochemischer Analysen erstellt.

### 2.3. Effektoren des Typ III-Translokationsapparates

SPI1 kodiert nicht nur für Proteine, die am Aufbau des Typ III-Translokationsapparats beteiligt sind. Unter den mehr als 30 auf SPI1 lokalisierten Genen befinden sich auch die Gene für Regulatoren, Effektoren und Translokation vermittelnde Proteine (Wallis und Galyov, 2000).

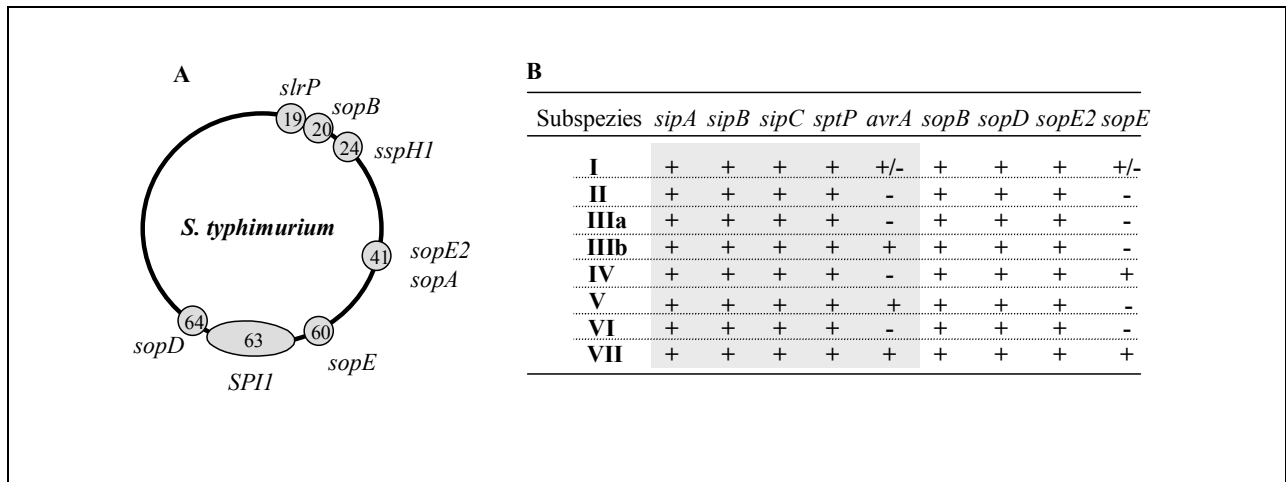
Während der eigentliche Typ III-Translokationsapparat und einige der von ihm translozierten Effektoren (*sipA*, *sipB*, *sipC*, *sipD*, *sptP* und *avrA*) innerhalb von SPI1 kodiert sind, liegen die Gene anderer, SPI1-abhängig translozierter Proteine (*slrP*, *sopB*, *sspHI*, *sopA*, *sopD* sowie *sopE* und *sopE2*) außerhalb von SPI1 in anderen Bereichen des *Salmonella*-Chromosoms (Abbildung 3A). Eine besondere Stellung nimmt hierbei *sopE* ein, das im Genom von SopE $\Phi$ , einem temperenten P2-ähnlichen Prophagen, lokalisiert ist (Hardt *et al.*, 1998a; Miroid *et al.*, 1999; Miroid *et al.*, 2001).

Die einzelnen Effektorproteine haben bei der Invasion und Modulation von Wirtszellen unterschiedliche Aufgaben (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Die Effektorproteine des SPI1-Typ III-Translokationsapparats.** Alle bisher identifizierten Effektorproteine sind zusammen mit ihrer möglichen Funktion oder bekannten Homologien sowie den jeweiligen Literaturangaben aufgelistet.

Effektorprotein	Funktion/Homologien	Referenz
<b>Effektoren, die innerhalb von SPI1 kodiert sind</b>		
AvrA	Homolog zu YopJ (aus <i>Yersinia</i> spp.), Funktion unbekannt	Hardt und Galán, 1997; Schesser <i>et al.</i> , 2000
SipA	Entzündungsreaktion durch Stimulation der Neutrophileneinwanderung, Inhibition der Aktinfilamentdepolymerisierung	Zhou <i>et al.</i> , 1999a; Zhou <i>et al.</i> , 1999b; Lee <i>et al.</i> , 2000
SipB	Induktion der Makrophagenapoptose durch Bindung an Caspase-1, Translokation von Effektorproteinen	Collazo und Galán, 1997; Hersh <i>et al.</i> , 1999; Hayward <i>et al.</i> , 2000
SipC	Translokation von Effektorproteinen, Modulation des Aktinzytoskeletts	Hayward und Koronakis, 1999
SipD	Translokation von Effektorproteinen, Effektorfunktion?	Collazo und Galán, 1997
SptP	Modulation des Aktinzytoskeletts, wirkt antagonistisch zu SopE und SopE2	Fu und Galán, 1999; Kaniga <i>et al.</i> , 1996; Stebbins und Galán, 2000
<b>Effektoren, die außerhalb von SPI1 kodiert sind</b>		
SopA	Darmentzündung, Stimulation der Neutrophileneinwanderung	Wood <i>et al.</i> , 2000
SopB	Darmentzündung, Flüssigkeitsausstrom ins Darmlumen	Norris <i>et al.</i> , 1998; Zhou <i>et al.</i> , 2001
SopD	Darmentzündung, Flüssigkeitsausstrom ins Darmlumen, Elektrolytverlust	Jones <i>et al.</i> , 1998
SopE	Induktion der Bakterienaufnahme durch „membraneruffling“, Transkriptionsaktivierung	Wood <i>et al.</i> , 1996; Hardt <i>et al.</i> , 1998a; Hardt <i>et al.</i> , 1998b
SopE2	Induktion der Bakterienaufnahme durch „membraneruffling“, Transkriptionsaktivierung	Bakshi <i>et al.</i> , 2000; Stender <i>et al.</i> , 2000
SlrP	Bedeutung bei der Maus-Virulenz	Tsolis <i>et al.</i> , 1999
SspH1	Bedeutung bei der Rinder-Virulenz	Miao <i>et al.</i> , 1999; Figueroa-Bossi <i>et al.</i> , 2001

Phylogenetische Analysen haben gezeigt, dass die Gene für den SPI1-Typ III-Translokationsapparat in allen untersuchten Stämmen einen hohen Grad an Konservierung aufweisen. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Gene für translozierte Effektorproteine, die innerhalb von SPI1 lokalisiert sind, in allen Vertretern der SARC-Kollektion nachgewiesen werden können (Abbildung 3B).



**Abbildung 3:** **A.** Chromosomale Karte von *S. typhimurium*. Eingezeichnet sind die Gene der bekannten Effektorproteine innerhalb und außerhalb von SPI1. SPI1 kodiert für einen Typ III-Translokationsapparat und die translozierten Effektorproteine SipA, SipB, SipC, SipD, SptP und AvrA. Die Zahlen geben die Zentisombereiche des *S. typhimurium*-Chromosoms an. **B.** Verteilung ausgewählter Gene SPI1-abhängig translozierter Effektorproteine in verschiedenen *Salmonella* spp.. Die graue Schattierung markiert Gene, die innerhalb von SPI1 lokalisiert sind (nach Mirold *et al.*, 2001).

Die einzige Ausnahme ist hier *avrA* (Hardt *et al.*, 1997; Prager *et al.* 2000; Mirold *et al.*, 2001). Auch *sopB*, *sopD* und *sopE2*, die außerhalb von SPI1 lokalisiert sind, sind in allen getesteten *Salmonella*-Isolaten vorhanden. Hier bildet das phagenkodierte *sopE* die Ausnahme, das nur in wenigen Isolaten gefunden werden konnte. Aufgrund des hohen Grads an Konservierung wird vermutet, dass Genen, die in allen *Salmonella*-Stämmen gefunden wurden, eine zentrale Virulenzfunktion zukommt. Im Gegensatz dazu deutet die heterogene Verteilung von *avrA* und *sopE* innerhalb der *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare darauf hin, dass diese variablen Effektorproteine erst kürzlich horizontal erworben wurden und als sogenannte Adaptationsproteine die Anpassung der entsprechenden *S. enterica*-Stämme an bestimmte Wirte verbessert haben (Prager *et al.*, 2000; Mirold *et al.*, 2001).

### 3. Signaltransduktionsprozesse in der Zelle

Eukaryonten verfügen zur Regulation von Zellprozessen über einzelne Kompartimente, in denen Reaktionen räumlich voneinander getrennt ablaufen können. Zur Kommunikation mit der Umgebung dienen den Zellen eines Organismus Signale, die von Rezeptoren durch die Membran weitergeleitet werden und nach entsprechender Modulation in eine Reaktion umgesetzt werden. Dabei wird durch eine Serie aktivierter Proteine das Signal innerhalb der Zelle weitergeleitet und in seiner Wirkung verstärkt. Die Koordinierung dieser Signalkaskaden übernehmen häufig

regulatorische GTPasen, Kinasen und Phosphatasen sowie Adaptor-Proteine, die die Prozesse stromaufwärts und stromabwärts dieser Schalter kontrollieren (Boguski und McCormick, 1993; Pelech, 1996; Fauman und Saper, 1996; Geyer und Wittinghofer, 1997).

### 3.1. Regulatorische G-bindende Proteine

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur verschiedener regulatorischer G-bindender Proteine (GTPasen) durch Röntgenkristallographie hat gezeigt, dass die Nukleotid bindende Domäne in allen GTPasen konserviert ist (Vetter und Wittinghofer, 2001). Aufgrund ihrer Sequenz und Funktion lassen sich die G-bindenden Proteine generell in fünf Gruppen einteilen (Bourne *et al.*, 1990; Bourne *et al.*, 1991):

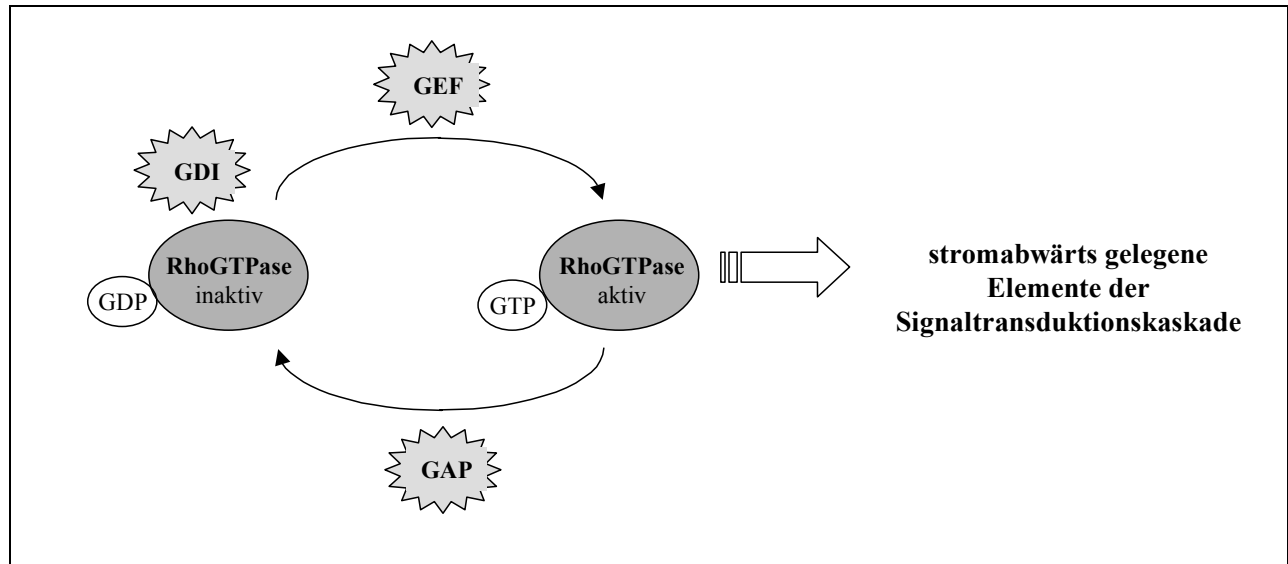
- die  $\alpha$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine ( $G_\alpha$  in  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_t$ ,  $G_0$ ,  $G_Q$ )
- die Translationsfaktoren der Proteinbiosynthese (IF-2, EF-Tu, EF-G, RF-3)
- das Signalerkennungspartikel und dessen Rezeptor (SRP, SR)
- die großen GTP-bindenden Proteine (GBP, Dynamamin)
- die Ras-homologen GTPasen

### 3.2. Der GTPase-Zyklus

GTPasen liegen in der Zelle entweder in der GDP-gebundenen, inaktiven Form oder in der GTP-gebundenen, aktiven Form vor (Bourne *et al.*, 1990; Takai *et al.*, 1992). Die basale Funktion dieser molekularen Schalter ist die Übermittlung von Signalen an stromabwärts gelegene Elemente der Signaltransduktionskaskade. Die Interaktion geschieht dabei grundsätzlich nur in der GTP-gebundenen Konformation und wird durch den anschließenden Konformationswechsel infolge der GTP-Hydrolyse zeitlich begrenzt. Da die Hydrolyse von GTP zu GDP ein irreversibler Prozess ist, wird die Reversibilität der Konformationsänderung durch den Austausch von GDP gegen GTP gewährleistet. In der Zelle liegt GTP in einer zehnfach höheren Konzentration vor als GDP (Lenzen *et al.*, 1998). Dank dieser beiden gegensätzlichen Prozesse können Interaktionen zwischen GTPasen und stromabwärts gelegenen Signalproteinen sequenziell in mehreren Zyklen erfolgen. GTPasen dienen für viele Abläufe als biologische Schaltuhren, die spezifische Zellfunktionen initiieren und beenden können und somit die Dauer einer zellulären Reaktion festlegen.



Die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte in diesem GTPase-Zyklus sind die Dissoziation des GDP von der jeweiligen GTPase bzw. die Hydrolyse von GTP zu GDP. Das Verhältnis der GDP- zur GTP-gebundenen Form wird durch die Aktivität verschiedener Faktoren reguliert (Boguski und McCormick, 1993) (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Funktion und Regulation von RhoGTPasen.** Die GTPase liegt in der Zelle entweder in der GTP-gebundenen, aktiven Form oder in der GDP-gebundenen, inaktiven Form vor. Nur in der aktivierten Form kommt es zu einer Wechselwirkung der GTPase mit stromabwärts gelegenen Elementen der Signaltransduktionskaskade. Bei der Aktivierung wird der Austausch von GDP gegen GTP von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) katalysiert. Die intrinsische GTPase-Aktivität wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) beschleunigt. Die Stabilisierung im inaktiven Zustand erfolgt durch Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs).

Guaninnukleotid-Austauschfaktoren („guanine nucleotide exchange factors“, GEFs) katalysieren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der GDP-Dissoziation. GEFs interagieren hierzu zuerst mit der GDP-Form der GTPase, so dass GDP dissoziieren kann. Das führt zur Bildung des binären Komplexes von GTPase und GEF. Anschließend bindet erneut ein G-Nukleotid (aufgrund der Konzentrationsverhältnisse zu 90 % GTP), was zur Dissoziation des GEFs und zur Bildung des aktiven GTP-GTPase-Komplexes führt (Van Aelst und D’Souza-Schorey, 1997; Kjoller und Hall, 1999). Für viele GTPasen ist der Zyklus von GTP-Bindung und Hydrolyse auch mit einem ständigen Wechsel der intrazellulären Lokalisation zwischen Zytoplasma und Zellmembran gekoppelt (Takai *et al.*, 1993; Sasaki und Takai, 1998).

GTPase aktivierende Proteine (GAPs) begünstigen die inaktive Form der GTPasen, indem sie die intrinsische Rate der Nukleotidhydrolyse beschleunigen. Sie sind meist spezifisch für eine bestimmte GTPase (Lamarche und Hall, 1994).

Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) scheinen bevorzugt an die GDP-Form der GTPasen zu binden. Damit verhindern sie sowohl die spontane als auch die GEF-katalysierte Nukleotidfreisetzung und stabilisieren die GTPase in der GDP-gebundenen, inaktiven Form.

### 3.3. Die Ras-homologen Proteine

Man vermutet, dass eukaryontische Zellen mehrere hundert GTPasen verwenden, um verschiedenste Prozesse von der Proteinbiosynthese bis zum Zellwachstum zu regulieren. Die Familie der Ras-homologen Proteine sind monomere Proteine mit einem Molekulargewicht von 20-30 kDa, die sich als zentrale Schalter der gesamten Zellphysiologie erwiesen haben (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997; Mackay und Hall, 1998; Matozaki *et al.*, 2000). Sie existieren in allen Eukaryonten und stellen eine Gruppe von mehr als 100 Proteinen dar (Bourne *et al.*, 1990; Takai *et al.*, 1992). Diese Familie ist, basierend auf strukturellen und funktionellen Kriterien, in mehrere Unterfamilien unterteilt (Tabelle 2) (Matozaki *et al.*, 2000).

**Tabelle 2: Unterfamilien der Ras-homologen Proteine und ihre Aufgaben.**

Unterfamilien der Ras-homologen Proteine	regulierte Prozesse
Ras/Raf-Unterfamilie	Genexpression
Rab/YPT1-Unterfamilie	Vesikeltransport
Ran-Unterfamilie	nukleozytoplasmatischer Transport während der Mitose
Arf/Sar-Unterfamilie	Vesikeltransport
Rho/Rac/Cdc-Unterfamilie	Zytoskelett und Genexpression

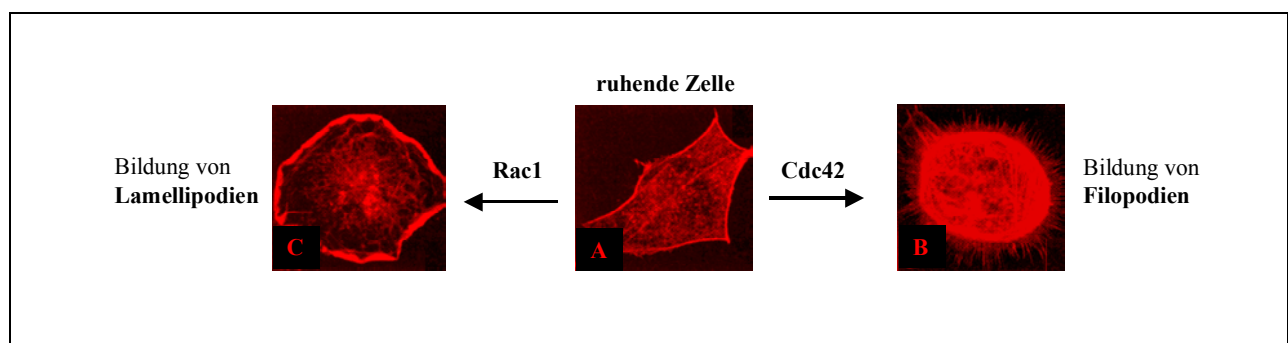
Während diesen einzelnen Unterfamilien früher definierte Aufgabenbereiche zugeschrieben wurden, weiß man heute, dass eine strikte Trennung aufgrund der vernetzten Signaltransduktionswege und der wechselseitigen Kreuzaktivierung von GTPasen (Matozaki *et al.*, 2000) nicht sinnvoll ist.

Die Rho/Rac/Cdc42-Unterfamilie der GTPasen (RhoGTPasen) umfasst sechs verschiedene Mitglieder: Rho (Isoformen RhoA, B, C), Rac (Isoformen Rac1, 2, 3, RhoG), Cdc42 (Isoformen Cdc42Hs, G25K, TC10), Rnd (RhoE/Rnd3, Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7), RhoD und TTF

(Aspenstrom 1999). Diese Familie von Signalmolekülen wird über Rezeptoren durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen aktiviert. Sie steuert biologische Prozesse wie beispielsweise Phago- und Pinozytose, Zellmigration, Transkriptionsaktivierung, Proteinkinase-Signalkaskaden, Zellzyklusprogression und Sekretion (Bishop und Hall, 2000).

### 3.4. Rho, Rac und Cdc42

Die bestuntersuchten Vertreter der RhoGTPasen sind Rho, Cdc42 und Rac, denen eine wichtige Funktion bei der Regulation des Aktinzytoskeletts zukommt (Hall, 1998). Während die Aktinpolymerisation normalerweise durch verschiedene extrazelluläre Signale vermittelt wird (Zhang *et al.*, 1992), genügt die Injektion von konstitutiv aktivem Rho, Cdc42 und Rac1, um in Zellen tiefgreifende morphologische Änderungen zu bewirken. Polymerisiertes Aktin ist in der Zelle in drei Hauptformen zu finden. Jede der drei GTPasen scheint die Ausbildung eines bestimmten Typs von Aktinzytoskelettstruktur zu begünstigen. Rho kontrolliert die Bildung von fokalen Adhäsionen und Stressfasern (Paterson *et al.*, 1990; Ridley und Hall, 1992), während nach der Aktivierung von Rac1 Aktin an der Plasmamembran polymerisiert. Dies führt zu lamellenförmigen Ausstülpungen (Lamellipodien) (Xu *et al.*, 1994; Nobes und Hall, 1995). Aktiviertes Cdc42 induziert fingerförmige Ausstülpungen (Filopodien) und „microspikes“ (Kozma *et al.*, 1995; Nobes und Hall, 1995) (Abbildung 5).

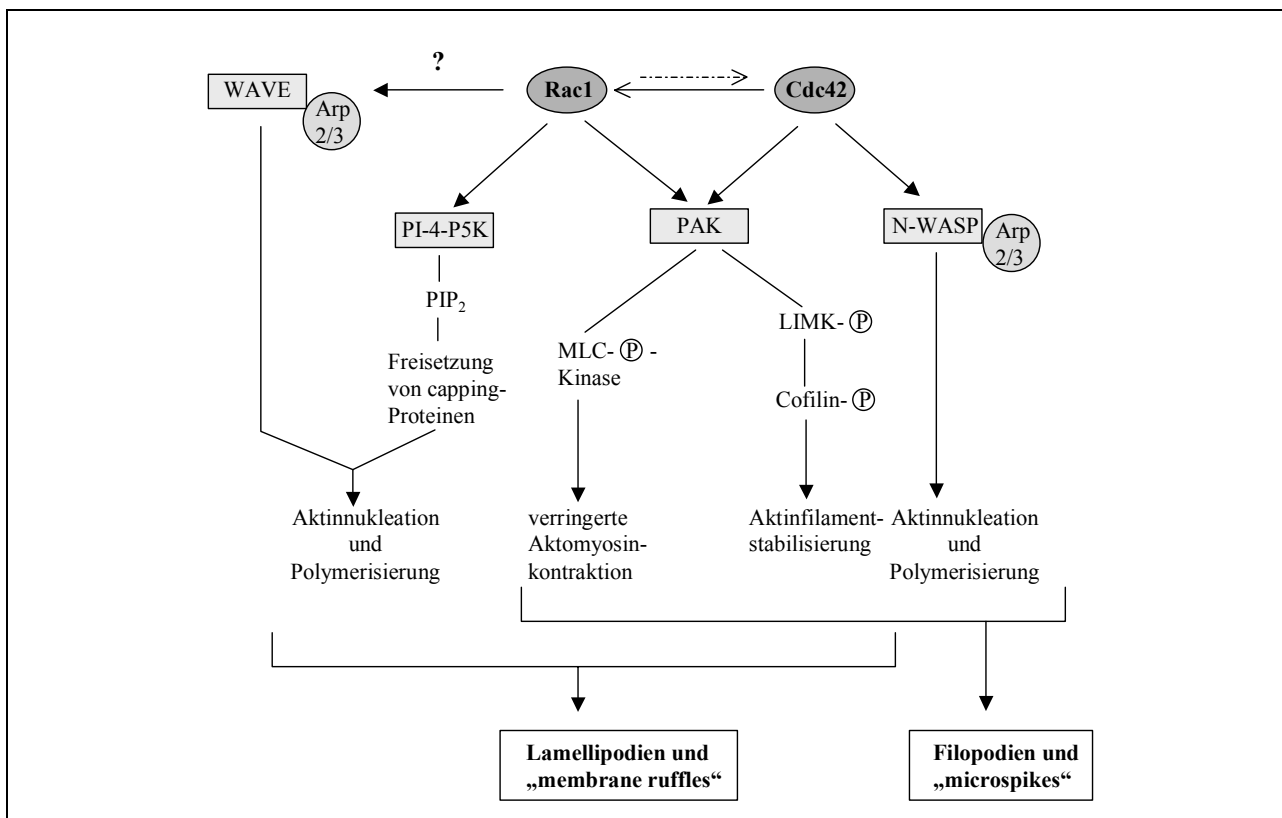


**Abbildung 5: Unterschiedliche Morphologie Cdc42- und Rac1-induzierter Zytoskelettlagerungen.** Während die Aktivierung von Cdc42 zur Ausbildung von Filopodien und „microspikes“ führt, resultiert eine Aktivierung von Rac1 in der Bildung von Lamellipodien.

Im Rahmen dieser Arbeit soll näher auf Cdc42 und Rac1 eingegangen werden. Es konnte gezeigt werden, dass aktiviertes Cdc42 oder Rac1 über ihre sogenannten Effektordomänen (= „switch“ I“; Aminosäuren 26-45) an etwa 30 stromabwärts gelegene Effektoren binden kann (Bishop und

Hall, 2000). Man unterscheidet dabei zwischen Effektoren, die entweder für Rac1 oder Cdc42 spezifisch sind oder von beiden RhoGTPasen aktiviert werden können. In der Folge werden sowohl Aktin umlagernde als auch transkriptionsregulierende Prozesse initiiert.

In Abbildung 6 ist eine Übersicht über Aktin umlagernde Prozesse gegeben, die durch Cdc42 und Rac1 vermittelt werden. Die bestcharakterisierten Effektoren von Cdc42 sind auf dem Gebiet der Aktinreorganisation die Proteine der WASP-Familie. Diese binden wiederum an den Arp2/3-Komplex, der für die *de novo*-Aktinpolymerisation verantwortlich ist (Machesky und Insall, 1998; Machesky und Insall, 1999; Machesky und Gould, 1999; Rohatgi *et al.*, 1999). Die Bedeutung weiterer, hier nicht aufgeführter Effektoren von Cdc42, für die Aktinumlagerung wird gegenwärtig noch genauer untersucht.



**Abbildung 6: Darstellung der vorherrschenden Cdc42- und Rac1-abhängigen Signaltransduktionswege zur Beeinflussung des Aktinzytoskeletts.** Während die Signaltransduktion von Cdc42 aus hauptsächlich über N-WASP und PAK läuft, interagiert Rac1 zu Beginn mit WAVE, PI-4-P4K und PAK (nach Bishop und Hall, 2000).

Die transkriptionelle Aktivierung durch Cdc42 und Rac1 erfolgt - vermutlich über einen anderen Teil der Effektor-domäne - über die JNK/„stress activated protein kinase“ (SAPK)- und die p38-MAP-Kinase-Kaskade. Als natürliche Stimuli gelten zellulärer Stress wie UV-Licht, osmotischer

Schock oder inflammatorische Signale (Treisman, 1996). Die genauen Prozesse sind jedoch bisher nicht geklärt. Cdc42 und Rac1 können auch die SRF-abhängige und NF $\kappa$ B-abhängige Transkription aktivieren (Hill *et al.*, 1995; Sulciner *et al.*, 1996).

Eine eindeutige Zurückführung der einzelnen zellulären Reaktionen auf Cdc42 und Rac1 ist jedoch oft nicht möglich, da allein auf der Ebene der RhoGTPasen neben der Konvergenz und Divergenz der Signalwege auch eine Kreuzaktivierung der GTPasen untereinander möglich ist. Cdc42 wirkt beispielsweise als Aktivator von Rac1 (Nobes und Hall, 1995).

#### **4. Bakterielle Modifikation von RhoGTPasen**

GTPasen sind aufgrund ihres hohen Grads an Konservierung und der zentralen Schalterfunktion häufig Ziele bakterieller Toxine, die innerhalb der Wirtszelle wirken. In vielen Fällen führen die bakteriellen Toxine zur Lähmung von Signaltransduktionswegen und Wirtszellantworten. Für Bakterien wie *Shigella* spp. und *Salmonella* spp. ist das Aktinzytoskelett der Wirtszelle von besonderer Bedeutung, da Bakterien durch Manipulation des Aktinzytoskeletts auch in nichtphagozytierende Zellen invadieren können.

Während die Mehrheit der bisher untersuchten bakteriellen Toxine ihren zellulären Partner irreversibel kovalent modifiziert, interagieren einige wenige Proteine transient mit dem Wirtspotein. Bei beiden Gruppen von Toxinen unterscheidet man weiter zwischen aktivierenden und inaktivierenden Toxinen (Aktories, 1997; Lerm *et al.*, 2000). Eine Übersicht über die bisher bekannten Toxine ist in Tabelle 3 gegeben.

SopE und SopE2 von *S. typhimurium* sind bisher die einzigen bekannten bakteriellen Toxine, die RhoGTPasen auf nichtkovalente Weise aktivieren können (Hardt *et al.*, 1998b; Rudolph *et al.*, 1999a; Stender *et al.*, 2000). Für SopE wurde gezeigt, dass es nach der Translokation in die Wirtszelle als hocheffizienter GEF für Cdc42 wirkt und sowohl die Architektur des Aktinzytoskeletts als auch die Transkription beeinflusst. SopE2, das einen 69 %-igen Grad an Homologie zu SopE aufweist (Abbildung 30A, Anhang), wirkt ebenfalls als GEF für Cdc42. Beide Proteine gelten als redundant wirkende, invasionsvermittelnde Effektoren (Hardt *et al.*, 1998a; Hardt *et al.*, 1998b; Bakshi *et al.*, 2000; Stender *et al.*, 2000; Miold *et al.* 2001) und spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenität. Es war allerdings unklar, welcher Nutzen im

Besitz von zwei SopE-Homologen liegen könnte oder ob SopE und SopE2 möglicherweise funktionelle Unterschiede aufweisen könnten.

**Tabelle 3: Bakterielle Toxine, die an RhoGTPasen angreifen.** Man unterscheidet generell zwischen aktivierenden oder inaktivierenden Toxinen. Zur weiteren Klassifizierung findet eine Unterscheidung in kovalent modifizierende und transient bindende Toxine statt. Die einzelnen Klassen sind jeweils mit einem Beispiel und bakteriellen Vertretern aufgeführt.

<b>Rho-inaktivierende Toxine</b>	
<u>Kovalent</u>	
C3-ähnliche ADP-Ribosyltransferasen	<i>Clostridium</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i>
Große Zytotoxine von <i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i> spp.
<u>Transient</u>	
ExoS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
YopE	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
SptP	<i>S. typhimurium</i>
<b>Rho-aktivierende Toxine</b>	
<u>Kovalent</u>	
Deamidierende Toxine	<i>E. coli</i> , <i>Bordetella</i> spp.
Transglutaminierende Toxine	<i>Bordetella</i> spp.
<u>Transient</u>	
SopE/SopE2	<i>S. typhimurium</i>

Durch das Zusammenspiel von SopE und SopE2 mit dem inaktivierenden SptP wird eine in dieser Art bisher nur in *Salmonella* spp. beobachtete, fein abgestimmte Regulation gewährleistet, die die sequenzielle Aktivierung und Inaktivierung von RhoGTPasen ermöglicht (Galán und Zhou, 2000) und die Schäden für die Wirtszelle minimiert.

## B. ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es, den Wirkmechanismus von SopE näher zu klären und herauszufinden, warum *S. typhimurium* mit SopE und SopE2 als einziges bisher bekanntes enteroinvasives Bakterium über zwei homologe, funktionell redundante, translozierte Proteine verfügt.

SopE und SopE2 sind bakterielle G-Nukleotid austauschfaktoren für eukaryontische RhoGTPasen. Unterschiedliche Phänotypen der SopE- und SopE2-vermittelten Wirtsantwort, wie sie auch schon im Vorfeld dieser Arbeit beobachtet worden waren, sollten genauer charakterisiert und auf molekulare Ursachen zurückgeführt werden. Um Näheres über die Interaktion von SopE und SopE2 mit den zellulären Zielproteinen zu erfahren, sollte im ersten Teil der Arbeit die direkte Wechselwirkung von SopE und SopE2 mit RhoGTPasen studiert werden. Von besonderem Interesse waren hier Fragen nach der Spezifität, der katalytischen Effizienz und der Affinität der beiden Effektorproteine für RhoGTPasen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte der enzymatische Mechanismus von SopE untersucht werden. Da SopE keine Sequenzähnlichkeit zu eukaryontischen GEFs für RhoGTPasen aufweist, sollte die Röntgenstruktur in enger Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund aufgeklärt werden. Ferner sollte in einer Mutagenesestudie das aktive Zentrum von SopE ermittelt werden und eine zellbiologische und biochemische Charakterisierung der Varianten erfolgen. Auf diese Weise sollte geklärt werden, inwieweit trotz aller Sequenzunterschiede der katalytische Mechanismus von SopE dem katalytischen Mechanismus eukaryontischer GEFs ähnelt.

## C. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Stämme, Zelllinien, Plasmide und Oligonukleotide

Die Tabellen 4-7 geben eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Zellkulturlinien, Plasmide und Oligonukleotide.

**Tabelle 4: Bakterienstämme.** Bei den *E. coli*-Stämmen ist BL21 (DE3) ein *E. coli* B-Stamm, die anderen sind Derivate von *E. coli* K12.

Stamm	Relevanter Genotyp/Phänotyp	Referenz
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
χ6060	<i>araD139 Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA20 galK galE recA1 rpsE</i>	Manoil und Beckwith, 1985
XL-1 blue	<i>supE44 hsdR17 endA1 recA1 gyrA46 thi-1 relA1 lac<sup>c</sup> F<sup>+</sup>[<i>proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacF<sup>l</sup> lacZΔM15 Tn10</i>]</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
DH5α	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1ΔlacU169 (φ80lacZΔM15)</i>	Hanahan, 1983
BL21(DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS (r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal λDE3</i>	Studier und Moffatt, 1986
<b><i>Salmonella typhimurium</i></b>		
SL1344	<i>rpsL hisG</i>	Hoiseh und Stocker, 1981
SB300	mauspassagierter SL1344	erhalten von J. E. Galán (Yale University, New Haven)
SB161	SB300, <i>ΔinvG</i>	Kaniga <i>et al.</i> , 1994
M516	SB300; <i>ΔsopB sopE::amp sopE2::tet</i>	Mirolid <i>et al.</i> , 2001

**Tabelle 5: Zellkulturlinien**

Bezeichnung	Gewebetyp	Referenz/Herkunft
COS7	Affennieren-Epithelzellen	Gluzman, 1981
Caco-2	humanes colorektales Karzinom	Fogh <i>et al.</i> , 1977
NIH3T3	murine Fibroblasten	Jainchill <i>et al.</i> , 1969
Henle407	humane intestinale Zellen	Henle und Deinhardt, 1957
HeLa	humane Gebärmutterhals-Epithelzellen	Puck und Marcus, 1955
HUVEC	humane Nabelschnurzellen	klinisches Material



**Tabelle 6: Plasmide.** Alle *sopE*- und *sopE2*-Sequenzen stammen aus *S. typhimurium*.

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pGEX-KG	Expressionsvektor für N-terminale GST-Fusionen	Guan und Dixon, 1991
pGEX-2T	pGEX-KG-Derivat	Guan und Dixon, 1991
pGEX-2TK	pGEX-KG-Derivat	Guan und Dixon, 1991
pGEX-4T-3	pGEX-KG-Derivat	Guan und Dixon, 1991
pGEX-5X-1	pGEX-KG-Derivat	Guan und Dixon, 1991
pACYC184	Klonierungsvektor	Chang und Cohen, 1987
pM136	SopE <sub>1-240-M45</sub> unter nativem Promotor in pBAD24-Derivat	Stender <i>et al.</i> , 2000
pM148	SopE <sub>269-240</sub> in pGEX-KG	Stender <i>et al.</i> , 2000
pM164	SopE <sub>78-240</sub> in pGEX-KG	Hardt, unveröffentlicht
pM226	SopE <sub>21-240-M45</sub> unter nativem Promotor in pBAD24-Derivat	Stender <i>et al.</i> , 2000
pM416	Chimärenprotein SopE <sub>1-95</sub> -SopE <sub>296-240-M45</sub> in pBAD24-Derivat	diese Arbeit
pM417	Chimärenprotein SopE <sub>21-95</sub> -SopE <sub>296-240-M45</sub> in pBAD24-Derivat	diese Arbeit
pM421	pM136 (SopE <sub>1-240-M45</sub> ), Proteinvariante Q109N	diese Arbeit
pM422	pM136 (SopE <sub>1-240-M45</sub> ), Proteinvariante Q109A	diese Arbeit
pM423	pM136 (SopE <sub>1-240-M45</sub> ), Proteinvariante K198A	diese Arbeit
pM424	pM136 (SopE <sub>1-240-M45</sub> ), Proteinvariante DG168	diese Arbeit
pM425	pM136 (SopE <sub>1-240-M45</sub> ), Proteinvariante D103E	diese Arbeit
pM426	pM136 (SopE <sub>1-240-M45</sub> ), Proteinvariante D103A	diese Arbeit
pM427	pM136 (SopE <sub>1-240-M45</sub> ), Proteinvariante D124E	diese Arbeit
pM428	pM136 (SopE <sub>1-240-M45</sub> ), Proteinvariante D124A	diese Arbeit
pM429	pM136 (SopE <sub>1-240-M45</sub> ), Proteinvariante G168A	diese Arbeit
pM430	pM136 (SopE <sub>1-240-M45</sub> ), Proteinvariante G168V	diese Arbeit
pM431	pM136 (SopE <sub>1-240-M45</sub> ), Proteinvariante K198R	diese Arbeit
pM432	pM136 (SopE <sub>1-240-M45</sub> ), Proteinvariante K198E	diese Arbeit
pM437	pM136 (SopE <sub>1-240-M45</sub> ), Proteinvariante ΔG168, ΔA169	diese Arbeit
pM438	SopE <sub>1-240-M45</sub> in pACYC184	diese Arbeit
pM441	pM164 (SopE <sub>78-240</sub> ), Proteinvariante Q109N	diese Arbeit
pM442	pM164 (SopE <sub>78-240</sub> ), Proteinvariante Q109A	diese Arbeit
pM443	pM164 (SopE <sub>78-240</sub> ), Proteinvariante K198A	diese Arbeit
pM444	pM164 (SopE <sub>78-240</sub> ), Proteinvariante DG168	diese Arbeit
pM445	pM164 (SopE <sub>78-240</sub> ), Proteinvariante D103E	diese Arbeit
pM446	pM164 (SopE <sub>78-240</sub> ), Proteinvariante D103A	diese Arbeit
pM447	pM164 (SopE <sub>78-240</sub> ), Proteinvariante D124E	diese Arbeit
pM448	pM164 (SopE <sub>78-240</sub> ), Proteinvariante D124A	diese Arbeit
pM449	pM164 (SopE <sub>78-240</sub> ), Proteinvariante G168A	diese Arbeit
pM450	pM164 (SopE <sub>78-240</sub> ), Proteinvariante G168V	diese Arbeit
pM451	pM164 (SopE <sub>78-240</sub> ), Proteinvariante K198R	diese Arbeit
pM452	pM164 (SopE <sub>78-240</sub> ), Proteinvariante K198E	diese Arbeit
pM453	pM164 (SopE <sub>78-240</sub> ), Proteinvariante ΔG168, ΔA169	diese Arbeit
pM461	mutiertes <i>sopE</i> -Fragment aus pM421 in pACYC184	diese Arbeit
pM462	mutiertes <i>sopE</i> -Fragment aus pM422 in pACYC184	diese Arbeit
pM463	mutiertes <i>sopE</i> -Fragment aus pM423 in pACYC184	diese Arbeit
pM464	mutiertes <i>sopE</i> -Fragment aus pM424 in pACYC184	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pM465	mutiertes <i>sopE</i> -Fragment aus pM425 in pACYC184	diese Arbeit
pM466	mutiertes <i>sopE</i> -Fragment aus pM426 in pACYC184	diese Arbeit
pM467	mutiertes <i>sopE</i> -Fragment aus pM427 in pACYC184	diese Arbeit
pM468	mutiertes <i>sopE</i> -Fragment aus pM428 in pACYC184	diese Arbeit
pM469	mutiertes <i>sopE</i> -Fragment aus pM429 in pACYC184	diese Arbeit
pM470	mutiertes <i>sopE</i> -Fragment aus pM430 in pACYC184	diese Arbeit
pM471	mutiertes <i>sopE</i> -Fragment aus pM431 in pACYC184	diese Arbeit
pM472	mutiertes <i>sopE</i> -Fragment aus pM432 in pACYC184	diese Arbeit
pM473	mutiertes <i>sopE</i> -Fragment aus pM437 in pACYC184	diese Arbeit
pSB1188	SopE <sub>78-240</sub> in pGEX-Derivat	Hardt <i>et al.</i> , 1998b
Cdc42 in pGEX-2TK	humanes Cdc42 in pGEX-2TK	Crespo <i>et al.</i> , 1997
pHa-Ras	humanes Ha-Ras in pGEX-4T-3	Crespo <i>et al.</i> , 1997
pM101	humanes wt-GST-Rac1 in pGEX-5X-1	Hardt, unveröffentlicht
pRac verkürzt	humanes wt-GST-Rac1 (P1-K184) in pGEX-2T	erhalten von Gretel Buchwald (MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund)
pRhoA	humanes RhoA in pGEX-2TK	Crespo <i>et al.</i> , 1997
pTC10	humanes TC10 in pGEX-Derivat	erhalten von I. Macara (Center for Cell Signaling, University of Virginia)
pXRB157	humanes RhoB in pGEX-5X-1	Crespo <i>et al.</i> , 1997
pXRB158	humanes RhoC in pGEX-5X-1	Crespo <i>et al.</i> , 1997

**Tabelle 7: Oligonukleotide**

Übersicht über verwendete Oligonukleotide (Metabion, Martinsried), mutierte Aminosäurekodons sind unterstrichen, Punkte stehen für Nukleotiddeletionen.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
518 seq III	GAGCTGACTGGGTTGAAGG	Sequenzierung
542 fwd	GCTATAAAAAATAAAAGCATTCCCTG	Sequenzierung
A24	CGGGCGATATCAGAGGTAGTGCGAGTAAAGACCC	Klonierung
A25	ATGTCGATATCTATATCATTGAGCGTTTGAAGC	Klonierung
A26	TCGATACTAGTATGCCCGTTTTCTTACCGTCG	Klonierung
A98	GGTAGTGCGAGTAAAG <u>AA</u> ACCCGCATACGCCAGC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante D103E
A99	GCTGGCGTATGCGGGT <u>TT</u> CTTTACTCGCACTAC C	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante D103E
A100	GGTAGTGCGAGTAAAG <u>CCCC</u> CGCATACGCCAGC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante D103A
A101	GCTGGCGTATGCGGG <u>GG</u> CTTTACTCGCACTAC C	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante D103A
A102	GACCCCGCATACGCCAGCA <u>AC</u> ACCCGTGAAGCTATACTATCG	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante Q109N
A103	CGATAGTATAGCTTCACGGGT <u>GTT</u> GCTGGGGTATGCGGGGTC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante Q109N

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Verwendung
A104	GACCCCGCATACGCCAGCGCGACCCGTGAAG CTATACTATCG	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante Q109A
A105	CGATAGTATAGCTTCACGGGT <u>CGCGCT</u> GGGG TATGCGGGGTC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante Q109A
A106	GCAGTTTACAGCAAGAATAAAG <u>AACAGT</u> GTT GTAATTTGCTC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante D124E
A107	GCAGTTTACAGCAAGAATAAAG <u>GCTCAGT</u> GTT GTAATTTGCTC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante D124A
A108	GAGCAAATTACAACACTG <u>GAGCTTTATTCTT</u> GC TGTAAACTGC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante D124A
A109	GTTTTTACGCCAAGCGGCGCAG <u>CGGCCA</u> ATC CTTTATAACTC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante G168A
A110	GAGTTATAAAAAGGATTGGCC <u>GCTGCGCC</u> GCT TGCGTAAAAAC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante G168A
A111	GTTTTTACGCCAAGCGGCGCAG <u>TGGCCA</u> ATCC TTTTATAACTC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante G168V
A112	GAGTTATAAAAAGGATTGGCC <u>ACTGCGCC</u> GCT TGCGTAAAAAC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante G168V
A115	CATCAGCAGGCATCCTTT <u>AGAATCTATG</u> CGGA GAAGATC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante K198R
A116	GATCTTCTCCGCATAGAT <u>TCTAAAGGAT</u> GCCT GCTGATG	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante K198R
A117	GAGCAAATTACAACACTG <u>TCTTTATTCTT</u> GC TGTAAACTGC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante D124E
A118	CAACATCAGCAGGCATCCTTT <u>GCAATCTATG</u> C GGAGAAGATCATT	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante K198A
A119	AATGATCTTCTCCGCATAGAT <u>TGCAAAGGAT</u> G CCTGCTGATGTTG	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante K198A
A120	CATCAGCAGGCATCCTTT <u>GAAATCTATG</u> CGGA GAAGATC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante K198E
A121	GATCTTCTCCGCATAGAT <u>TTCAAAGGAT</u> GCCT GCTGATG	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante K198E
A126	GACGTTTTTACGCCAAGCGGCGCA ..... AATCC TTTTATAACTCCGTTG	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante ΔG168/A169
A127	CAACGGAGTTATAAAAAGGATT ..... TGCGCCG CTTGCGTAAAAACGTC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante ΔG168/A169
A128	GTTTTTACGCCAAGCGGCGCA ... GCCAATCCT TTTATAACTCCG	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante ΔG168
A129	CGGAGTTATAAAAAGGATTGGC ... TGCGCCGCT TGCCGTA AAAAC	<i>sopE</i> -Mutagenese; Proteinvariante ΔG168
pBAD-M45-3' Xlong	GCATGGGGTCAGGTGGG	Sequenzierung
pBAD-M45-5'	GCGTCACACTTTGCTATGC	Sequenzierung
PGEX-KG-3'	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	Sequenzierung
PGEX-KG-5'	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	Sequenzierung

## 2. Nährmedien

Für die Kultivierung und Selektion von *E. coli* und *S. typhimurium* wurden die in Tabelle 8 aufgelisteten Medien mit den in Tabelle 9 angegebenen Zusätzen verwendet. Für feste Nährböden wurde den entsprechenden Flüssigmedien 1,5 % Agar zugegeben.

**Tabelle 8: bakterielle Nährmedien.**

Medium	Zusammensetzung	Referenz
LB	1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl	Miller, 1972
LB (0,3 M NaCl)	1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1,75 % NaCl	Leclerc <i>et al.</i> , 1998
2 x TY	1,6 % Trypton; 1 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl	

**Tabelle 9: Medienzusätze.**

Medienzusatz	Endkonzentration
Ampicillin	50 µg/ml
Chloramphenicol	30 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml
Tetracyclin	12 µg/ml
Gentamicin	400 µg/ml
IPTG	50 µM (SopE-Varianten), 200 µM (allgemein)

Für die dauerhafte Lagerung wurden Bakterien in 1 % Pepton versetzt mit 10 % Glycerin bei –80 °C eingefroren.

Für Zellkulturversuche wurden die in Tabelle 10 aufgelisteten Zellkulturmedien und –zusätze verwendet. Die Bestelladressen regionaler Vertreiber für verschiedene Medien und Chemikalien sind im Internet ersichtlich.

**Tabelle 10: Zellkulturmedien und –zusätze.** Zur Kultivierung der Zellen wurde dem Medium 40 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen Life Technologies) zugesetzt.

Zellkulturlinie	Medium
COS7	DMEM (4500 mg/l Glukose, ohne Natriumpyruvat, mit Glutamin), versetzt mit 5 % FCS („fetal calf serum“) (Invitrogen Life Technologies)
Caco-2	DMEM (4500 mg/l Glukose, ohne Natriumpyruvat), versetzt mit 10 % FCS, 5 ml Glutamat und 0,5 ml Transferrin (Invitrogen Life Technologies)
HUVEC	„endothelial cell growth medium MV“ (PromoCell)
NIH3T3, HeLa, Henle407	DMEM (4500 mg/l Glukose, mit Natriumpyruvat), versetzt mit 10 % FCS (Invitrogen Life Technologies)

### 3. Enzyme, Chemikalien und Puffer

Enzyme wurden von Invitrogen Life Technologies, Fermentas oder New England Biolabs geliefert.

Sofern nicht anders vermerkt, waren alle Chemikalien oder Feinchemikalien in Analysenqualität und wurden von Merck, Roth oder von Sigma bezogen. Der *complete*-Proteaseinhibitor-Cocktail wurde von Roche bezogen. Fluoreszenzmarkiertes mantGDP stammte von Molecular Probes, [<sup>3</sup>H]-GDP (250 µCi) von Amersham Pharmacia.

Trypsin/EDTA, HBSS („Hanks buffered salt solution“) und PBS („phosphate buffered saline“) für die Zellkultur wurden von Invitrogen Life Technologies bezogen.

Standardpuffer der Molekularbiologie, Biochemie und Proteinbiochemie wurden, sofern nicht anders vermerkt, nach Sambrook *et al.* (1989) und Lämmler (1970) hergestellt.

Besondere Puffer sind im Anschluss aufgeführt.

#### **Puffer A** (Proteinreinigung)

100 mM NaCl  
50 mM Tris/HCl pH7,6  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
2 mM DTT

#### **Puffer A<sup>+</sup>** (Proteinreinigung)

Puffer A versetzt mit  
1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid  
(PMSF)

#### **Puffer T** (Proteinreinigung)

150 mM NaCl  
50 mM Tris/HCl pH7,6  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
2,5 mM CaCl<sub>2</sub>  
2 mM DTT

#### **Puffer F** (Filterbindungsversuche)

50 mM NaCl  
50 mM Tris/HCl pH7,6  
5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **Puffer F<sup>+</sup>** (Filterbindungsversuche)

Puffer F versetzt mit  
5 mM DTT  
10 mM EDTA

#### **Puffer B** (Biacore)

10 mM Hepes/NaOH pH 7,4  
150 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,005 % Igepal CA-630

**Puffer X** (Proteinreinigung)

100 mM NaCl  
 50 mM Tris/HCl pH8,0  
 3 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1 mM CaCl<sub>2</sub>  
 1 mM DTT

**Puffer L** (Affinitätspräzipitation)

50 mM Tris/HCl pH8,0  
 2 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,2 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O  
 10 % Glycerin  
 20 % Saccharose  
 2 mM DTT  
*complete*-Proteaseinhibitor  
 (1 Tablette pro 50 ml)

**Puffer D** (Proteinreinigung)

100 mM NaCl  
 20 mM Tris/HCl pH7,6  
 1 mM MgCl<sub>2</sub>  
 2 mM DTT

**Puffer S** (Fluoreszenzspektroskopie)

40 mM Hepes/NaOH pH7,4  
 100 mM NaCl  
 5 mM MgCl<sub>2</sub>

**Puffer M** (Affinitätspräzipitation)

50 mM Tris/HCl pH7,4  
 100 mM NaCl  
 2 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1 % Igepal CA-630  
 10 % Glycerin  
*complete*-Proteaseinhibitor  
 (1 Tablette pro 50 ml)

## 4. Anzucht

### 4.1. Anzucht von Bakterien

Bakterienkulturen von *E. coli*-Stämmen zur Isolierung von DNA wurden in LB-Medium mit den angegebenen Konzentrationen der jeweiligen Antibiotika über Nacht bei 37 °C im Rollinkubator oder im Tischschüttler angezogen.

*Salmonella*-Stämme wurden zur Induktion der SPI1-Sekretion in LB-Medium (0,3 M NaCl) angezogen, hierbei wurde das Medium nur mit 50 % der in Tabelle 9 angegebenen Konzentration der entsprechenden Antibiotika versetzt. Nach einer zwölfstündigen Inkubation im Rollinkubator bei 37 °C wurde die Vorkultur im Verhältnis 1:20 in frisches Medium ohne

Antibiotikazusatz verdünnt, bevor die Bakterien nach weiteren 4 h bei 37 °C bei einer OD<sub>600</sub> von 0,9 zur Infektion verwendet wurden.

Für die Zellanzucht zur anschließenden Überproduktion von Proteinen aus *E. coli* wurde eine Übernachtskultur bei 37 °C des jeweiligen Bakterienstammes in 2 × TY-Medium mit Antibiotikazusatz angezogen. Nach einer 1:100-Verdünnung in frisches Medium wurde die Kultur standardmäßig im Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>600</sub> von zirka 0,6 bei 37 °C angezogen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 30 °C wurde die Überproduktion der Proteine von einem Plasmid mit lactoseinduzierbarem Promotor durch die Zugabe von 200 µM des Substratanalogons IPTG gestartet. Nach weiteren 4 h Inkubation bei 30 °C wurden die Bakterien geerntet.

Abweichend von der Standardprozedur wurden die SopE-Varianten bei einer OD<sub>600</sub> von 0,2 mit 50 µM IPTG bei 18 °C über Nacht induziert.

#### **4.2. Anzucht von Gewebekulturzellen**

COS7-, Caco-2-, HeLa-, Henle407- und NIH3T3-Zellen wurden in DMEM-Medium in Zellkulturflaschen angezüchtet. Zur Weiterführung der Kultur wurden die Zellen zweimal wöchentlich mit PBS gewaschen, durch Behandlung mit Trypsin/EDTA von der Kulturflasche abgelöst, in DMEM-Medium mit Penicillin und Streptomycin aufgenommen, bei 50 × g abzentrifugiert und in frisches Medium verdünnt. Für Versuche wurden die Zellen nach dem Abzentrifugieren in Medium ohne Penicillin und Streptomycin aufgenommen und ausgesät.

HUVEC-Zellen wurden am Institut von Claudia Trasak aus klinischen Nabelschnurpräparaten isoliert und kultiviert.

### **5. Molekulargenetische Methoden**

Soweit nicht anders angegeben wurden Standardmethoden nach Sambrook *et al.* (1989) angewendet. Darin eingeschlossen sind enzymatische *in vitro*-Reaktionen an DNA und die Auftrennung von DNA in Agarosegelen.

## 5.1. Schnellisolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (bis 20 µg) wurde mit dem „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Für die Isolierung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA (bis 200 µg) eignete sich das „HiSpeed Plasmid Midi Kit“ von Qiagen. Über Agarosegele aufgetrennte niedermolekulare DNA wurde mit dem „GeneClean III-Kit“ (Bio101) gemäß Anleitung isoliert. Isolierte DNA wurde direkt in die Ligation oder die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen eingesetzt.

## 5.2. PCR-Methoden

### 5.2.1. Mutagenese-PCR

Punktmutationen in *sopE* wurden mittels PCR mit dem „QuikChange site-directed mutagenesis-Kit“ der Firma Stratagene nach Anleitung des Herstellers eingeführt. Die Oligonukleotide, komplementär zueinander und zu den gegenläufigen Strängen des Ausgangsplasmids, enthielten dabei gezielte Basenaustausche für Punktmutationen, Aminosäureaustausche oder Aminosäuredeletionen. Anschließend an eine PCR-Amplifikation und den darauffolgenden Verdau der parentalen DNA mit der für methylierte Sequenzen spezifischen Restriktionsendonuklease *DpnI* wurden die mutierten Plasmide transformiert, reisoliert und durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

### 5.2.2. Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels PCR zur Klonierung

Die Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnitts erfolgte entweder aus bakteriellem Ganzzelllysat oder aus isolierter DNA. Für das Ganzzelllysat wurde eine Übernachtskultur 1:20 in Wasser verdünnt und 10 min auf 100 °C erhitzt. Hiervon wurden 15 µl in die Reaktion eingesetzt. Von der Plasmid-DNA wurde 1 µl einer 1:10-Verdünnung zum Reaktionsansatz gegeben. Neben der DNA enthielten die 50 µl-Reaktionsansätze 0,25 mM dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate), je 0,5 µM der beiden Primer, 5 µl 10 × Reaktionspuffer und 1 µl „Taq Plus Long“-Polymerase (TaqPlus Long PCR System, Stratagene). Die verwendeten Programme („hot start“) umfassten eine halbe Minute Denaturierung bei 95 °C gefolgt von 30 Zyklen mit Denaturierung (95 °C, 30 s), Hybridisierung (1 min, je nach Primer 48-60 °C) und Extension (72 °C, ≥ 45 s). Nach einem letzten Polymerisationsschritt (72 °C, maximal 20 min) zur Komplettierung nicht vollständig synthetisierter DNA-Stränge wurde die Reaktion durch Abkühlen auf 4 °C gestoppt. Die Extensionszeit richtete sich nach der Länge des zu



amplifizierenden Bereiches und orientierte sich an dem empirisch ermittelten Wert von 90 s pro kb. Die Spezifität der Oligonukleotidbindung an die DNA-Matrize wurde über die Hybridisierungstemperatur (48-60 °C) und die Salzkonzentration im Puffer („high“- oder „low salt“-Puffer, TaqPlus Long PCR System, Stratagene) erreicht.

### 5.3. Sequenzierungen

Für Sequenzierungen zur Überprüfung der klonierten Plasmide wurde die DNA mittels des „Qiagen Spin Miniprep Kits“ aufgereinigt. 1 µg der isolierten DNA wurden in der Vakuumentrifuge getrocknet und zur weiteren Analyse zusammen mit den entsprechenden Oligonukleotiden an MWG Biotech geschickt.

### 5.4. Transformation

*E. coli*- und *Salmonella* spp.-Stämme wurden durch Elektroporation transformiert (1800 V, 200 Ω, 25 µF, nach Fiedler und Wirth, 1988). Plasmide, die mit dem „QuikChange site directed mutagenesis-Kit“ erzeugt wurden, wurden nach Anleitung des Herstellers durch eine 45-sekündige Inkubation bei 42 °C in die mitgelieferten chemisch kompetenten Zellen transformiert.

## 6. Proteinreinigung und -modifikation

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über Affinitätschromatografie mit Materialien und Säulen von Pharmacia (GSH-Sepharose, Benzamidinsepharose 6B), Gelfiltration (HiLoad Superdex 75 (26/60)) und Ionenaustauschchromatographie (MonoQ, MonoS).

### 6.1. Herstellung von GST-Fusionsproteinen

Alle Proteine wurden als N-terminale Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) überproduziert. Die Expressionsplasmide sind Derivate von pBR322 (pGEX-Serie, Pharmacia) und kodieren für Genfusionen, die unter Kontrolle des *lac*-Promotors stehen. Die Reinigung von GST und von GST-Fusionsproteinen (GST-SopE, GST-SopE2, GST-Cdc42, GST-Rac1, GST-RhoA, GST-RhoB und GST-RhoC) wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Die Bakteriensedimente wurden auf Eis in Puffer A<sup>+</sup> aufgenommen und anschließend in einer vorgekühlten „French Press“-Zelle bei einem Druck von 6900 kPa in zwei Durchläufen aufgeschlossen. Anschließend wurden unlösliche Zellbestandteile und Membranfragmente durch

Zentrifugation abtrennt ( $2 \times 10$  min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , SS34-Rotor,  $12000 \times g$ ). Die erhaltene, proteinhaltige Lösung wurde sterilfiltriert (Porengröße des Filters:  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ ) und zu einer in Puffer A äquilibrierten GSH-Sepharose-Matrix ( $0,7$  ml Suspension/l Kultur) gegeben. Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die GSH-Sepharose erfolgte während einer 30-minütigen Inkubation bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Rollinkubator. Anschließende wiederholte Wasch- und Zentrifugationsschritte in Puffer A entfernten nichtgebundene Proteine und Verunreinigungen von der Matrix. Das jeweilige Fusionsprotein wurde daraufhin mit  $20$  mM Glutathion in Puffer A über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  von der GSH-Sepharose-Matrix eluiert. Zur Entfernung von Glutathion wurden die Proteinlösungen sterilfiltriert und mit  $3 \times 2$  l Puffer D für jeweils mindestens drei Stunden dialysiert (Dialyseschläuche mit einem „molecular weight cut off“ (MWCO) von  $8000$  kDa; Roth). Anschließend wurden die Proteinlösungen mit Ultrafiltrationseinheiten (Millipore) nach Anleitung des Herstellers aufkonzentriert. Nach der Reinigung wurden die konzentrierten Proteinlösungen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 6.2. Spaltung von GST-Fusionsproteinen

Die Vektoren der pGEX-Serie tragen eine Erkennungssequenz für Thrombin oder Faktor Xa. Somit wurde zur Präparation von Proteinen, die den GST-Anteil nicht mehr tragen, das oben beschriebene Protokoll wie folgt modifiziert. Nach der Bindung des GST-Fusionsproteins an die GSH-Sepharose wurde die Matrix wie oben beschrieben gewaschen. Die Abspaltung des Proteins vom GST-Anteil erfolgte nun je nach klonierter Spaltsequenz im Vektor (Guan und Dixon, 1991) durch Zugabe von  $20$  U/ml Thrombin in Puffer T (SopE, SopE2, C-terminal verkürztes SopE, Cdc42, RhoA) oder von  $20$  U/ml Faktor Xa in Puffer X (Rac1, RhoB, RhoC, TC10, C-terminal verkürztes Rac1). Das Volumen des Spaltansatzes betrug das doppelte Matrixvolumen, die Spaltung erfolgte über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf dem Rollinkubator. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Matrix nochmals mit Puffer T oder Puffer X gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden mit  $1/50$  Vol. voräquilibrierter p-Aminobenzamidin-Sepharose versetzt und nochmals für  $30$  min inkubiert, um die Serinproteasen zu entfernen. Anschließend wurde die Proteinlösung - wie für die GST-Fusionsproteine bereits beschrieben - dialysiert, aufkonzentriert, schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 6.3. Herstellung von verkürztem SopE

Verkürztes SopE-Protein (Expressionsvektor pM164) für die Röntgenkristallographie wurde wie im vorigen Abschnitt beschrieben als abgespaltenes Protein aufgereinigt. Anschließend wurde die proteinhaltige Lösung über eine mit Puffer D äquilibrierte HiLoad Superdex 75 (26/60) - Säule bei einer Flussrate von 1 ml/min gefiltert. Die Dokumentation der Auftrennung und der Nachweis von Protein erfolgte über eine UV-Einheit. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden durch Analyse auf einem SDS-Polyacrylamidgel auf ihre Menge und Reinheit getestet und danach vereinigt, aufkonzentriert und schockgefroren.

Zur Kristallisation wurde das aufgereinigte Protein zur Arbeitsgruppe von A. Wittinghofer an das Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund geschickt (Buchwald *et al.*, 2002).

### 6.4. Herstellung von Protein-Nukleotidkomplexen

#### 6.4.1. Herstellung von mantGDP·Cdc42

Ausgangsmaterial für die Komplexierung von Cdc42 mit dem fluoreszenzmarkierten Nukleotidanalogen mantGDP war 2,6 mg aufgereinigtes GST-Cdc42, das über den GST-Anteil erneut an 1 ml einer in Puffer A voräquilibrierten GSH-Sepharose Matrix gebunden wurde (30 min bei 4 °C auf dem Rollinkubator). Die Sepharose-Matrix wurde daraufhin mit einer sterilen Pasteurpipette in eine 5 ml-Einwegpipette gefüllt, an deren unterem Ende eine Schlauchklemme zur Regulierung der Flussrate angebracht war. Zunächst wurde GDP, das bereits an Cdc42 gebunden war, durch einen Waschschriff bei 25 °C mit 10 ml Puffer A (versetzt mit 5 mM EDTA) bei einer Flussrate von 2 ml/min entfernt. Anschließend wurde das matrixgebundene Protein in ein Reaktionsgefäß überführt und in Gegenwart eines 2,5-fachen molaren Überschusses an mantGDP für 10 min bei 22 °C inkubiert. Die Komplexierung mit mantGDP wurde durch Zugabe von 15 mM MgCl<sub>2</sub> auf Eis gestoppt. Das mantGDP-beladene Cdc42 wurde nun durch Zugabe von 20 U/ml Thrombin in Puffer T bei 4 °C über Nacht vom GST-Anteil abgespalten. Die Abtrennung des Komplexes von ungebundenem mantGDP erfolgte durch Gelfiltration mit Puffer A auf einer NAP25-Säule (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers. Fraktionen, die den mantGDP·Cdc42-Komplex enthielten, wurden anhand des Absorptionsmaximums bei 440 nm durch Fluoreszenzspektroskopie identifiziert, mit EDTA auf ihre Dissoziationsfähigkeit in Cdc42 und mantGDP geprüft, vereinigt und durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Die Lagerung erfolgte nach dem Schockgefrieren bei -80 °C.

#### **6.4.2. Herstellung von mantGDP·Rac1**

Ausgangsmaterial für die Komplexbildung von Rac1 mit mantGDP war 9 mg bereits aufgereinigtes Rac1 in Puffer D, das zunächst über die spezifische Interaktion mit SopE an einer bereits zuvor präparierten Glutathion-SopE-Säule immobilisiert wurde. Hierzu wurden 15 mg GST-SopE wie bereits beschrieben über den GST-Anteil an 1 ml einer in Puffer A voräquilibrierten GSH-Sepharose-Matrix gebunden und anschließend in eine 5 ml-Einwegpipette gefüllt. Nach Beladung mit dem aufgereinigten Rac1 wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina Puffer A gewaschen. Die Elution von Rac1 erfolgte mit 5 ml 180  $\mu$ M mantGDP in Puffer A. Die Abtrennung des Komplexes von ungebundenem mantGDP erfolgte schließlich durch Gelfiltration auf einer NAP25-Säule (Pharmacia) nach Angabe des Herstellers (Puffer S). Fraktionen, die den mantGDP·Rac1-Komplex enthielten, wurden zur Entfernung von SopE-Spuren über eine GST-Rac1-Säule aufgereinigt. Die Lagerung erfolgte nach vorheriger Aufkonzentrierung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **7. Proteinbiochemische Standardmethoden**

#### **7.1. Quantitative Proteinbestimmung**

Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Proteinlösungen erfolgte durch Coomassie-Färbung auf einem SDS-Polyacrylamidgel (Lämmli, 1970) im Vergleich mit standardisierten BSA-Lösungen. Alternativ wurde das kolorimetrische Verfahren mit dem „Protein-Microassay“ von Biorad nach Angaben des Herstellers angewandt.

#### **7.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lämmli, 1970) kam bei der Kontrolle des Proteinaufreinigungsprozesses, bei Expressions- und Sekretionsstudien sowie bei der Herstellung von Immunoblots zum Einsatz. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Trenngel-Acrylamidkonzentration von 12 %. Proteine wurden hierbei gemäß ihrer molekularen Masse aufgetrennt und anschließend im „Western Blot“ oder mittels Coomassie-Färbung nachgewiesen. Zur Zuordnung der Molekulargewichte der analysierten Proteine wurde „BenchMark Protein ladder“ (Invitrogen) verwendet.

## 8. Immunologische Methoden

Die Proteine wurden nach Auftrennung in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese durch ein Elektroblobverfahren auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der Proteintransfer erfolgte hierbei für 2 h bei 360 mA. Nach Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen durch Inkubation in 5 % Magermilchpulver in PBS/Tween (PBS versetzt mit 0,1 % Tween 20) wurde die Nitrozellulosemembran für eine Stunde mit dem ersten, proteinspezifischen Antikörper (in 5 % Magermilchpulver in PBS/Tween) inkubiert. Die Konzentration des ersten Antikörpers orientierte sich entweder an den Angaben der Hersteller oder sie wurde für nichtkommerzielle Antikörper empirisch ermittelt (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Immunoblot-Antikörper.**

Antikörper (Herkunft)	Verdünnung (in 5 % Magermilchpulver in PBS/Tween)	Referenz/Bezugsquelle
$\alpha$ -M45 (monoklonal, Maus)	1:100 (Affinitätspräzipitationsversuche) 1:30 (Sekretionsversuche)	Zur Verfügung gestellt von P. Hearing (School of Medicine, State University, New York)
$\alpha$ -SopE (polyklonal, Kaninchen)	1:10000	Mirold <i>et al.</i> 1999
$\alpha$ -SopE2 (polyklonal, Kaninchen)	1:500	Stender <i>et al.</i> 2000
$\alpha$ -Rac1 (monoklonal, Maus)	1:12000	Upstate Biotechnology
$\alpha$ -Cdc42 (monoklonal, Maus)	1:500	Transduction Laboratories
$\alpha$ -p38 MAPK (polyklonal, Kaninchen)	1:1000	Cell Signaling Technology
$\alpha$ -SAPK/JNK (polyklonal, Kaninchen)	1:1000	Cell Signaling Technology
$\alpha$ -p44/42 (polyklonal, Kaninchen)	1:1000	Cell Signaling Technology
$\alpha$ -phospho-p38 MAPK (polyklonal, Kaninchen)	1:1000	Cell Signaling Technology
$\alpha$ - phospho-SAPK/JNK (polyklonal, Kaninchen)	1:1000	Cell Signaling Technology
$\alpha$ - phospho-p44/42 (polyklonal, Kaninchen)	1:1000	Cell Signaling Technology
$\alpha$ - Maus-HRP (polyklonal, Ziege)	1:40000 (Affinitätspräzipitationsversuche) 1:5000 (Sekretionsversuche)	Sigma
$\alpha$ - Kaninchen-HRP (polyklonal, Ziege)	1:40000 (Affinitätspräzipitationsversuche) 1:5000 (Sekretionsversuche)	Dianova

Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS/Tween wurde die Membran für eine weitere Stunde mit einem zweiten, gegen den ersten Antikörper gerichteten, HRP („horseradish peroxidase“, Meerrettich-Peroxidase)-gekoppelten Antikörper in 5 % Magermilchpulver in PBS/Tween (standardmäßig 1:5000; im Falle der Affinitätspräzipitationsversuche 1:30000) inkubiert. Die Detektion der spezifischen Antikörperbindung erfolgte nach abschließenden Waschschritten mit PBS/Tween entweder mit dem ECL-System (Pharmacia) oder, bei den Affinitätspräzipitationsversuchen, mit dem ECL Plus-System (Pharmacia), nach den Angaben des Herstellers.

## 9. Biochemische Methoden

### 9.1. Nitrozellulose-Filterbindungstest

Für die Nitrozellulose-Filterbindungstests wurden pro Ansatz 2 µg RhoGTPase bei 28 °C für 12 min in einem Gesamtvolumen von 100 µl Puffer F<sup>+</sup> versetzt mit 8 µCi [<sup>3</sup>H]GDP beladen. Die Erhöhung der Magnesiumkonzentration auf 10 mM MgCl<sub>2</sub> und die Zugabe von 3 Volumina kaltem Puffer F stoppte den Nukleotidaustausch und stabilisierte das [<sup>3</sup>H]GDP in der Bindungstasche der RhoGTPasen. Die Austauschreaktionen ([<sup>3</sup>H]GDP gegen unmarkiertes GDP) wurden durch die Zugabe der [<sup>3</sup>H]GDP-beladenen RhoGTPasen zu den angegebenen Konzentrationen an GDP und GST, SopE, SopE2 oder EDTA in Puffer F gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, mit 800 µl eiskaltem Puffer F versetzt, auf Nitrozellulosemembranen aufgebracht, mit 3 × 2 ml eiskaltem Puffer F gewaschen, getrocknet und nach Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit (OptiPhase Supermix, Wallac/Perkin Elmer) in einem Wallac 1450 Micro Beta Trilux Szintillationszähler vermessen.

### 9.2. Fluoreszenzspektrometrie

Fluoreszenzmessungen zur Charakterisierung der Michaelis-Menten-Enzymkinetik von SopE und SopE2 wurden in „single“- und „multiple turnover“-Experimenten mit Mikroküvetten in einem „Aminco-Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer“ durchgeführt. Die Anregung des Fluorophors („mant“ = 2'- (oder 3')-O-(N-Methylantraniloyl-)) erfolgte jeweils bei 366 nm, die Emissionsspektren wurden bei einer Bandbreite von 4 nm und einer Schrittweite von 1 nm bei einer Wellenlänge von 440 nm aufgenommen. Für die „multiple turnover“-Messungen wurde Puffer S mit unterschiedlichen Konzentrationen an mantGDP-beladenem Cdc42 oder Rac1 (1 bis 366 µM) in der Fluoreszenzküvette bei 25 °C inkubiert, bis keine Schwankungen der Basislinie

mehr zu beobachten waren. Anschließend wurden in rascher Folge 1 mM GDP und 25 nM SopE oder SopE2 zugegeben.

Die Zerfallskonstante zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten in den „multiple turnover“-Versuchen wurde für jede Substratkonzentration mit Hilfe des SigmaPlot-Programms ermittelt.

#### Zerfallsgleichung:

$$y = c + A e^{-b \times t}, \quad \text{wobei } c \text{ den Achsenabschnitt, } A \text{ die Substratkonzentration zum Zeitpunkt } t = 0, t \text{ die Zeit und } b \text{ die Zerfallskonstante bezeichnet.}$$

#### Berechnung der Zerfallskonstanten (SigmaPlot):

$$b = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

#### Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten $k_{obs}$ :

$$k_{obs} = \frac{b [\text{Substrat}]}{[\text{Enzym}]}$$

Für die grafische Darstellung im Rahmen eines Michaelis-Menten-Diagramms wurden die ermittelten  $k_{obs}$ -Werte gegen die entsprechende Substratkonzentration an Cdc42 und Rac1 aufgetragen. Aus diesem Diagramm konnten als enzymkinetische Konstanten die halbmaximale Geschwindigkeit der Reaktion ( $v_{max}/2$ ) sowie die zugehörige Substratkonzentration ( $K_M$ ) bestimmt werden.

Außerdem wurden „single turnover“-Experimente durchgeführt. Hierbei wurden 200 nM mantGDP·Cdc42 mit höheren Konzentrationen von SopE (1 bis 80  $\mu$ M) versetzt. Für die Auswertung der „single turnover“-Experimente wurden die Kurven für die kinetisch langsamen Proteinvarianten mit denen des WT-SopE überlagert. Aus den Enzymkonzentrationen vergleichbar schneller Austauschkurven wurde anschließend das Verhältnis der Reaktionsverlangsamung ermittelt.

### 9.3. Oberflächenplasmonresonanz-Spektrometrie

Die Messungen zur Oberflächenplasmonresonanz-Spektrometrie erfolgten in einem Biacore2000-Apparat. Den Angaben des Herstellers folgend wurde zunächst an die Polysaccharidmatrix des Chips ein  $\alpha$ -GST-Antikörper kovalent gebunden. Die anschließende Bindung des jeweiligen GST-Fusionsproteins in einer 0,1 mg/ml-Lösung in Puffer B bei einer Flussrate von 5  $\mu$ l/min erlaubte die nachfolgende Bindung freier Liganden an den  $\alpha$ -GST/GST-Fusionsprotein-Komplex. Die Liganden wurden in Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen (10 nM bis 10  $\mu$ M) appliziert (Flussrate: 10  $\mu$ l/min). Injektion von 20  $\mu$ l einer 20  $\mu$ M GDP- (oder auch GTP-) Lösung bei einer Flussrate von 10  $\mu$ l/min diente der raschen Dissoziation aller Fusionsprotein-Liganden-Komplexe. Die Matrix wurde im anschließenden Regenerationsschritt durch die aufeinanderfolgende Injektion von 20 mM Glycin/HCl pH2,0 und 0,005 % SDS von allen nicht kovalent gebundenen Proteinen gereinigt. Die Vermessung der SopE-Varianten erfolgte standardmäßig bei einer konstanten Flussrate von 5  $\mu$ l/min für alle Schritte.

Die Bindungs- und Dissoziationskurven wurden mithilfe der BIAEvaluation-Software ausgewertet.

### 9.4. CD-Spektroskopie

Circulardichroitische Messungen (CD-Spektroskopie) wurden an einem Jasco-J710-Spektropolarimeter in Küvetten von 1 mm Schichtdicke bei 20 °C durchgeführt. Dabei wurde der Wellenlängenbereich von 190-250 nm aufgenommen (Geschwindigkeit: 50 nm/min, Schrittweite: 1 nm, Empfindlichkeit: 100 mGrad, Zeitkonstante: 1 s, Bandbreite: 1 nm). Die Testansätze enthielten 0,05-0,2 mg/ml Protein in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH7,4. Alle Spektren wurden zehnfach akkumuliert und um den Pufferbeitrag korrigiert. Anschließend wurden die Kurven der SopE-Varianten mit der Kurve des Wildtyp-SopE-Proteins überlagert und auf Abweichungen überprüft.



## 10. Zellbiologische Methoden

### 10.1. Immunfluoreszenzfärbung

#### 10.1.1. Translokationsstudien

Für den Nachweis der Translokation von bakteriellen Proteinen in Wirtszellen wurden COS7-Zellen in DMEM mit 5 % FCS auf Deckgläsern ausgesät und für 2 Tage bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. 30 min vor Versuchsbeginn wurde das Medium nach zweimaligem Waschen gegen 500 µl einer gepufferten Salzlösung (HBSS; Invitrogen Life Technologies) ausgetauscht. Anschließend wurden die Gewebekulturzellen mit einem zehnfachen Überschuss an Bakterien, die unter sekretionsfördernden Bedingungen angezogen worden waren, infiziert. Nach 40 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen gewaschen und für 10 min mit 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert. Eine 3-minütige Inkubation in 0,1 % Triton in PBS diente der Permeabilisierung der Zellwand. Anschließend wurden unspezifische Antikörper-Bindungsstellen durch Inkubation in 3% BSA in PBS blockiert. Translozierte Proteine, die C-terminal ein M45-Epitop tragen, wurden zunächst durch α-M45-Antikörper markiert, der in einem zweiten Schritt mit einem sekundären FITC-gekoppelten Antikörperkonjugat detektiert wurde. Anschließend wurden die Deckgläser mit „Vectashield“-Eindeckmedium (Lunaris GmbH) auf Objektträgern aufgebracht und die intrazelluläre Verteilung translozierter, epitopmarkierter Proteine unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

#### 10.1.2. Nachweis von Aktinumlagerungen

Die Anzucht der Zellen und der Bakterien erfolgte unter sekretionsfördernden Bedingungen in LB-Medium mit 0,3 M NaCl. Die Zellen wurden zwei Tage vor Versuchsbeginn so auf Deckgläsern ausgesät, dass sie am Versuchstag zu 80 % konfluent waren. Nachdem die Gewebekulturzellen mit einem zehnfachen Überschuss an Bakterien infiziert wurden, konnte nach 40 min in den durch 3,7 % Formaldehyd fixierten und durch 0,1 % Triton X-100 permeabilisierten Zellen Aktin über die direkte Färbung mit TRITC-Phalloidin nachgewiesen werden. DNA wurde durch die direkte Bindung von DAPI angefärbt. Die Detektion der Bakterien erfolgte über eine zweistufige Färbung mit einem polyklonalen α-*Salmonella*-O-1,4,5,12 (8)-Antikörper sowie einem FITC-gekoppelten Konjugat, das gegen den ersten Antikörper gerichtet war (Tabelle 12). Im Fluoreszenzmikroskop wurde daraufhin die Umlagerung des Aktinzytoskeletts in Abhängigkeit von der Lokalisation der Bakterien bewertet.

**Tabelle 12: Antikörper und Farbstoffe für die Immunfluoreszenz.**

Antikörper (Herkunft)	Verdünnung (in PBS mit 3% BSA)	Bezugsquelle
$\alpha$ -M45 (monoklonal, Maus)	1:3	Zur Verfügung gestellt von P. Hearing (School of Medicine, State University, New York)
$\alpha$ -Maus-FITC (polyklonal, Ziege)	1:400	Dianova
$\alpha$ - <i>Salmonella</i> O-1,4,5,12 (8) (polyklonal, Kaninchen)	1:250	DIFCO Laboratories
DAPI	1:2000	Sigma
TRITC-Phalloidin	1:500	Sigma

## 10.2. Gentamicin-Protektionsversuch

Für Studien zur Invasion von *S. typhimurium* in Wirtszellen wurden COS7-Zellen für 2 Tage in DMEM mit 5 % FCS ohne Deckgläser so ausgesät, dass sie am Versuchstag 70 % Konfluenz erreichten. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Zellen gewaschen und das Medium durch 500  $\mu$ l HBSS ersetzt. COS7-Zellen wurden mit unter sekretionsfördernden Bedingungen angezogenen Salmonellenstämmen mit einer MOI von 5 Bakterien/Zelle infiziert und für 50 min bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit HBSS gewaschen und das Medium durch 500  $\mu$ l DMEM, 5 % FCS und 400  $\mu$ g/ml Gentamicin ausgetauscht, um selektiv extrazelluläre Bakterien abzutöten. Nach weiteren 90 min wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in 500  $\mu$ l PBS versetzt mit 0,1 % Natrium-Desoxycholat lysiert. Anschließend wurde das Lysat unverdünnt und in einer 1:30- bzw. 1:900-Verdünnung ausplattiert. Der genaue Titer des Inokulums wurde ebenfalls durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf LB-Platten bestimmt. Die Anzahl der internalisierten Bakterien wurde auf die Größe des Inokulums normiert und zur Invasivität des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt.

### Berechnung des Invasivitätsfaktors eines Stammes:

$$\text{Invasivität} = \frac{\text{Anzahl der internalisierten Bakterien}}{\text{Größe des Inokulums}}$$

Berechnung der relativen Invasivität eines Stammes (prozentual, bezogen auf die Invasivität des Wildtypstammes):

$$\text{relative Invasivität} = \frac{\text{Invasivität des Stammes}}{\text{Invasivität des Wildtypstammes}} \times 100$$

Für eine statistische Auswertung wurden die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten gemittelt.

### 10.3. Affinitätspräzipitation

Durch Affinitätspräzipitation wurde die Aktivierung zellulärer RhoGTPasen durch *S. typhimurium*-Effektorproteine untersucht. Dazu wurde *S. typhimurium* unter sekretionsfördernden Bedingungen angezüchtet und 400 µl zur Infektion von konfluenten COS7-Zellen im Medium ohne Antibiotikum verwendet, die zwei Tage zuvor in 9 cm-Nunclon-Schalen ausgesät worden waren (MOI = 50). Die Inkubationsdauer im CO<sub>2</sub>-Inkubator betrug hierbei 40 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gespült und in 1ml Puffer M lysiert. Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min bei 4 °C abgetrennt. Für die Positivkontrolle wurde der Überstand mit 500 nM GTPγS versetzt mit 10 mM EDTA, für die Negativkontrolle mit 1 mM GDP und 10 mM EDTA bei 30 °C für 15 min auf einem Rollmischer inkubiert, bevor die Beladung durch Zugabe von 20mM MgCl<sub>2</sub> auf Eis gestoppt wurde. Kontroll- und Probenlysate wurden daraufhin zu je 80 µl Glutathion-Sepharose-Matrix mit gebundener PAK-CRIB-Domäne (äquibriert in Puffer L) zugegeben.

Die PAK-CRIB-Domäne wurde als N-terminales Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase überproduziert. Zunächst wurde das Bakteriensediment aus 50 ml Kultur sofort nach dem Abzentrifugieren in 20 ml eiskaltem Puffer L suspendiert und anschließend in einer vorgekühlten „French Press“-Zelle bei einem Druck von 6900 kPa in zwei Durchläufen aufgeschlossen. Anschließend wurden unlösliche Zellbestandteile und Membranfragmente durch Zentrifugation abgetrennt (2 × 10 min, 4 °C, SS34-Rotor, 12000 × g). Die Lösung wurde sterilfiltriert (Porengröße des Filters: 0,45 µm) und zu 100 µl einer in Puffer L äquilibrierten GSH-Sepharose-Matrix gegeben. Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die GSH-Sepharose erfolgte während einer 30-minütigen Inkubation bei 4 °C im Rollinkubator. Anschließend wurde die Matrix dreimal mit 10 ml kaltem Puffer L gewaschen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Nach einer 30-minütigen Infektion auf dem Rollmischer bei 4 °C wurde die Matrix mit 4 × 1 ml Puffer M gewaschen, in 100 µl Lämmli-Probenpuffer aufgekocht und der Überstand auf ein zwölfprozentiges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Im anschließenden „Western Blot“ wurde aktiviertes Cdc42 und Rac1 von α-Cdc42 und α-Rac1-Antikörper gebunden, der mit einem sekundären α-Maus-HRP-gekoppelten Antikörper und dem „ECL Plus detection Kit“ (Pharmacia) detektiert wurde.

#### **10.4. Aktivierung von Proteinkinasen**

Der Nachweis der Proteinkinase-Aktivierung wurde in konfluenten COS7-Zellen durchgeführt, die zwei Tage zuvor in 9 cm-Nunclon-Schalen ausgesät worden waren. Um eine selektive Aktivierung durch SopE oder SopE2 zu erreichen, wurden die Zellen für 40 min mit den Stämmen M516, M516 komplementiert mit pM136 oder komplementiert mit pM226 mit einer MOI von 50 Bakterien pro Zelle infiziert, die zuvor unter sekretionsfördernden Bedingungen angezogen worden waren. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS gespült und in 1 ml Puffer L lysiert. 80 µl des Zelllysates wurden auf ein zwölfprozentiges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran wurde die Aktivierung der Proteine in einem „Western Blot“ mit Antikörpern gegen p38 MAPK, p44/42, SAPK/JNK sowie den jeweils phosphorylierten Formen phospho-p38 MAPK, phospho-p44/42 und phospho-SAPK/JNK überprüft.

### **11. Bioinformatische Methoden**

Für genetische Fragestellungen wurden DNASTar oder DNA Strider (Version 1.2) verwendet. Daten aus den Biacore-Versuchen wurden mit BIAEvaluation Software (Version 3.0) ausgewertet. Alle anderen kinetischen Daten wurden mit SigmaPlot (Version 5.0) bzw. Origin (Version 5.0) angenähert. Die Bearbeitung der Immunfluoreszenzaufnahmen erfolgte mit Adobe Photoshop (Version 5.0).

Protein-Sequenzvergleiche wurden mit dem Clustal-Paket ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSAHLIP/npsahlp\\_alignclustalw.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSAHLIP/npsahlp_alignclustalw.html)) durchgeführt. Zur Darstellung dieser Sequenzvergleiche wurde außerdem das Boxshade-Programm ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) verwendet.

## D. ERGEBNISSE

### 1. Biochemische und zellbiologische Charakterisierung der Effektorproteine SopE und SopE2 von *S. typhimurium*

Im Rahmen einer Analyse sekretierter *Salmonella*-Proteine wurde bereits in früheren Arbeiten das Gen für das 25 kDa große SopE-Protein kloniert und seine Bedeutung *in vivo* in Zellkulturversuchen analysiert (Wood *et al.*, 1996; Hardt *et al.*, 1998a; Hardt *et al.*, 1998b). Es konnte gezeigt werden, dass *sopE*-Mutanten in Henle407-Zellen im Vergleich zum *Salmonella*-Wildtyp-Stamm weniger invasiv sind und die Ausbildung von Membranalagerungen („membrane ruffles“) schwächer ist als beim Wildtyp oder in einem plasmidkomplementierten Mutantenstamm (Hardt *et al.*, 1998b).

Später konnte in „Western Blots“ mithilfe eines kreuzreagierenden Antikörpers ein weiteres Protein gleicher Größe identifiziert werden, das aufgrund seiner 69 %-igen Sequenzhomologie als SopE2 bezeichnet wurde (Abbildung 30A, Anhang). Auch hier konnte durch eine Mutation des kodierenden Gens ein Invasionsdefekt beobachtet werden, wenn auch etwas schwächer ausgeprägt als bei einer *sopE*-Mutation. Ein gleichzeitiges Ausschalten beider Proteine führte zu einer nochmals verringerten Invasivität des betreffenden Stammes (Stender *et al.*, 2000). Beobachtungen zeigten, dass die bakterieninduzierten Zytoskelettlagerungen der Wirtszelle, die schließlich zu einer Internalisation der *Salmonella* spp. führen, sowohl im *sopE*- wie auch im *sopE2*-Mutantenstamm schwächer ausgeprägt waren als bei einer Infektion mit dem Wildtypstamm. Ein Stamm, der in beiden Genen - *sopE* und *sopE2* – mutiert ist, ruft diese Membranveränderungen nur noch in stark abgeschwächter Form hervor.

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass SopE und SopE2 als GEF für Cdc42 wirken. Durch die Aktivierung von Cdc42 und die damit verbundene Bildung von Membranausstülpungen können *Salmonella* spp. effektiv in die Wirtszelle aufgenommen werden. Es stellte sich daher die Frage, warum *S. typhimurium* zwei zu 69 % homologe Effektorproteine in die Zielzelle transloziert, deren Funktion auf den ersten Blick identisch und damit redundant zu sein scheint.

### 1.1. Substratspezifität von SopE und SopE2

Es ist bekannt, dass GEFs die Aktivierung G-bindender Proteine über eine direkte Interaktion regulieren (Boguski und McCormick, 1993). Die Aktivierung von Cdc42 führt dabei vorwiegend zu spitzen Filopodien, während die Aktivierung von Rac1 die Ausbildung von lappigen Lamellipodien („ruffles“) zur Folge hat (Abbildung 5).

In früheren Experimenten wurde bereits das G-Protein-Substratspektrum von SopE untersucht. Es zeigte sich, dass Rac1, Rac2, RhoG, Cdc42 und in geringerem Maße auch RhoA Substrate für SopE darstellen, während bei RhoB, RhoC, TC21, Ran und Ha-Ras keine Aktivierung zu beobachten ist (Hardt *et al.*, 1998b).

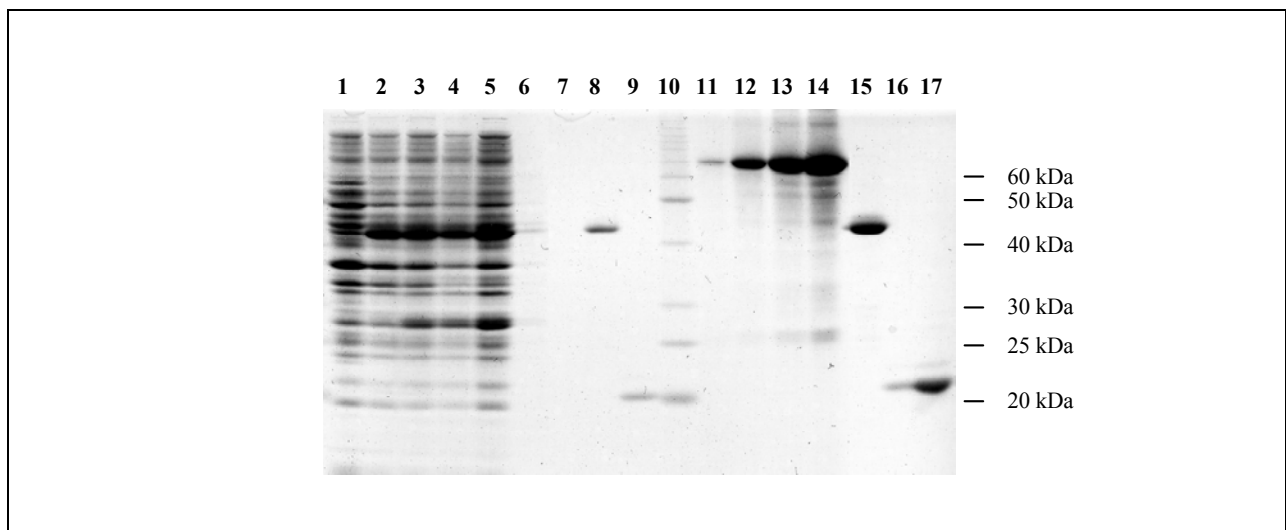
Bisherige Arbeiten hatten gezeigt, dass auch SopE2 ein effizienter G-Nukleotid-Austauschfaktor für Cdc42 ist (Stender *et al.*, 2000). Die G-Nukleotid-Austauschfaktoraktivität von SopE2 für andere GTPasen war bisher noch nicht im Detail untersucht worden.

### 1.2. Aufreinigung von SopE

Um die biochemische Funktion von SopE und SopE2 analysieren zu können, wurde ein Protokoll zur Aufreinigung der katalytischen Domänen etabliert, das mit Abwandlungen (siehe Material und Methoden) auch für alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Proteine übernommen werden konnte.

50 ml  $2 \times$  TY-Medium wurden mit einer Kolonie *E. coli* XL1-blue mit pSB1188 (SopE<sub>78-240</sub>) oder pM148 (SopE<sub>269-240</sub>) angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter starker Belüftung geschüttelt. Für die Übertagkultur wurde  $1 \frac{1}{2} \times$  TY-Medium ohne Antibiotikum mit 10 ml der Übernachtskultur angeimpft und für 3 h bei 37 °C geschüttelt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde die Kultur unter ständigem Schütteln auf 30 °C abgekühlt und mit 0,2 mM IPTG induziert. Nach weiteren drei Stunden bei 30 °C unter starker Belüftung wurden die Zellen geerntet. Das Zellsediment wurde in Puffer A<sup>+</sup> aufgenommen und in der „French Press“-Zelle bei einem Druck von 6900 kPa aufgeschlossen. Zelluläre Bestandteile wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei  $6000 \times g$  abgetrennt und anschließend über einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert. Das sterile Lysat wurde daraufhin bei 4 °C mit 0,7 ml Glutathion-Sepharose-Matrix auf einem Rollmischer inkubiert. Die Matrix wurde mit  $6 \times 10$  ml kaltem Puffer A gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen. Zur Elution von GST-SopE<sub>78-240</sub> oder GST-

SopE<sub>69-240</sub>-Fusionsprotein wurde die Matrix mit 20 mM Glutathion in Puffer A über Nacht auf dem Rollmischer geschwenkt. Der Überstand wurde bei 4 °C gegen 2 × 3 l Puffer D dialysiert und durch Ultrafiltration (MWCO 8000) eingengt. Zur Präparation von GST-freien Proteinen wurde die Matrix nach dem Waschen einem Thrombinverdau mit 25 U Thrombin über Nacht bei 4 °C unterworfen. Der Überstand wurde mit 50 µl Benzamidin-Sepharose behandelt, um die Protease zu entfernen, und anschließend dialysiert und eingengt. Die Konzentration des Proteins wurde anschließend im Coomassie-Gel und in einer Schnellfärbung nach Bradford (Biorad) abgeschätzt. Die Aufreinigung lieferte zwischen 2 und 4 mg SopE<sub>78-240</sub> oder SopE<sub>69-240</sub> pro Liter Kultur. Von den einzelnen Schritten der Aufreinigung wurden Proben genommen, in Lämmli-Probenpuffer aufgeköcht und auf ein zwölfprozentiges Coomassie-Gel aufgetragen (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Kontrolle der Aufreinigung von SopE<sub>78-240</sub> und GST-SopE<sub>78-240</sub>.** Die Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Aufreinigung genommen, mithilfe eines 12 % SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Spuren: 1: 50 µl Kultur vor IPTG-Induktion, 2: 50 µl der IPTG-induzierten Kultur vor der Zentrifugation, 3: 2 µl der resuspendierten Bakterien, 4: 2 µl der filtrierte Proteinlösung vor Zugabe der Glutathion-Sepharose-Matrix, 5: 6 µl des Lysats nach der Inkubation mit der Glutathion-Sepharose-Matrix, 6: 10 µl des ersten Waschschriffs, 7: 10 µl des sechsten Waschschriffs, 8: 10 µl des Glutathion-eluierten GST-Fusionsproteins, 9: 10 µl des thrombingespaltenen Proteins, 10: Molekulargewichtsstandard, 11-14: 1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg BSA, 15: 5 µl GST-SopE<sub>78-240</sub> nach der Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration, 16 und 17: 1 µl und 5 µl SopE<sub>78-240</sub> nach der Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration.

Bedingt durch die Konstruktion der Expressionsvektoren trägt GST-SopE<sub>78-240</sub> zwischen der Thrombinschnittstelle und L78 von SopE die Aminosäuren PGISGGGGGILEFEM; GST-SopE<sub>69-240</sub> trägt PGISGGGGGIL zwischen der Thrombinschnittstelle und G69. SopE<sub>78-240</sub> trägt

am N-Terminus die zusätzlichen Aminosäuren GSPGISGGGGGILEFEM; SopE<sub>269-240</sub> trägt GSPGISGGGGGIL am N-Terminus.

### 1.3. Filterbindungsversuche

In Filterbindungsversuchen sollte qualitativ gezeigt werden, wie effizient andere RhoGTPasen als Cdc42 mit SopE und SopE2 in Wechselwirkung treten.

Dazu wurden zunächst nach demselben Protokoll wie für SopE und SopE2 die kleinen G-Proteine Cdc42, Rac1, RhoA, RhoB, RhoC, Ha-Ras und TC10 aufgereinigt. In einem Beladungstest wurde die spezifische [<sup>3</sup>H]GDP-Beladbarkeit [cpm/μg] der einzelnen G-Protein-Präparationen bestimmt. 2 μg RhoGTPase wurden in einem Gesamtvolumen von 100 μl Puffer F<sup>+</sup> versetzt mit 8 μCi [<sup>3</sup>H]GDP für 12 min bei 28 °C beladen. Anschließend wurde die Beladungsreaktion durch Erhöhung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration auf 10 mM und Zugabe von 300 μl kaltem Puffer F gestoppt und ein Aliquot auf Nitrozellulosemembran aufgebracht. Nach dem darauffolgenden Waschschrift bleiben Proteine auf der Membran haften, damit kann die Menge an proteingebundenem [<sup>3</sup>H]GDP bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die im Szintillationszähler gemessene, spezifische Aktivität von Protein zu Protein stark variierte (Tabelle 13). Je höher der Wert ist, desto höher ist der Prozentsatz an biologisch aktivem und damit [<sup>3</sup>H]GDP-beladbarem Protein in der Probe. In enzymatischen Messungen liefern Proteinpräparationen mit hoher spezifischer Aktivität daher verlässlichere Ergebnisse, da die Messungen nicht durch große Mengen an inaktivem Protein beeinträchtigt werden können.

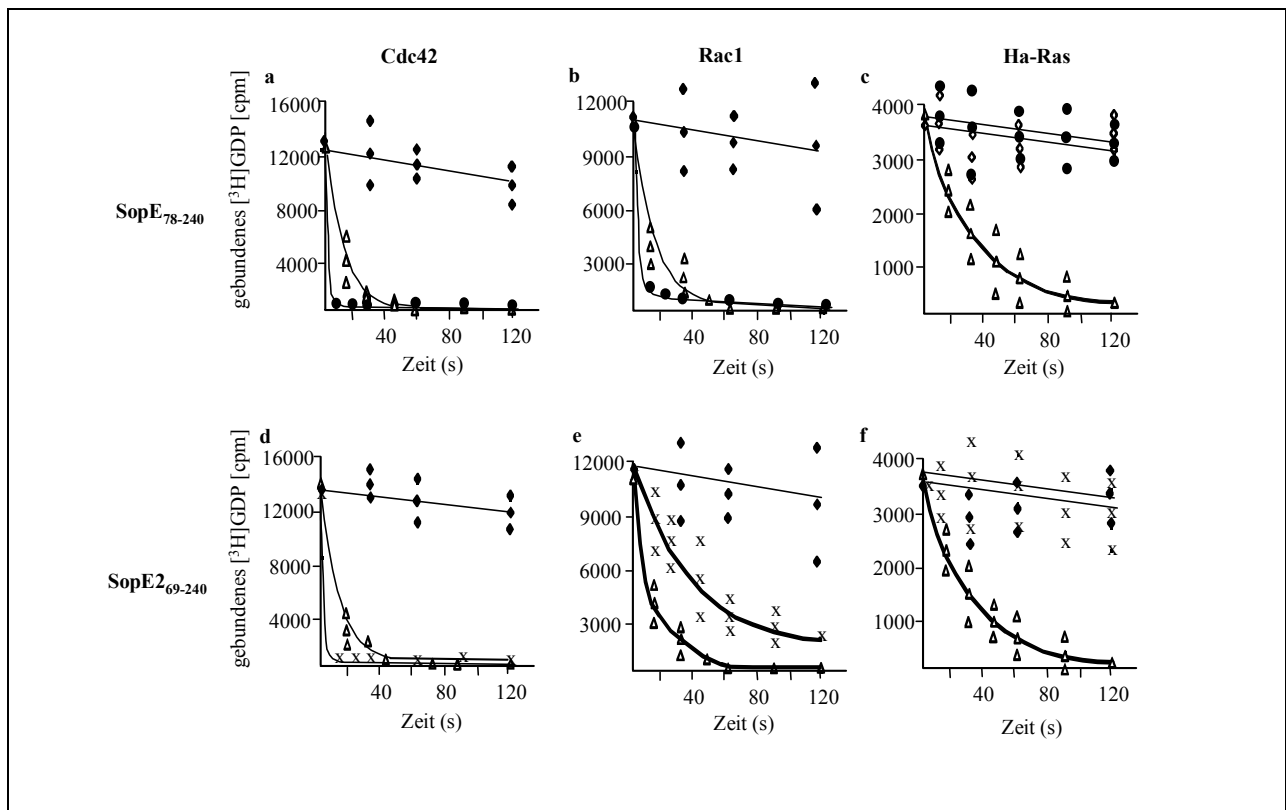
**Tabelle 13: Spezifische Beladbarkeit verschiedener RhoGTPase-Präparationen mit [<sup>3</sup>H]GDP.** Je 2 μg RhoGTPase wurden bei 28 °C für 12 min mit 8 μCi [<sup>3</sup>H]GDP beladen, auf Nitrozellulosefilter aufgebracht und im Szintillationszähler vermessen. \*: Die Proteinkonzentrationen wurden aus mit Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen abgeschätzt.

RhoGTPase	spezifische Aktivität (cpm/μg*)
Cdc42	6700
Rac1	22240
RhoA	440
RhoB	2020
RhoC	740
TC10	540



In Filterbindungsversuchen lassen sich vergleichende qualitative Aussagen über die GEF-Aktivität von SopE<sub>78-240</sub> und SopE2<sub>69-240</sub> an verschiedenen RhoGTPasen machen. Rac1, Cdc42, RhoA, GST-RhoA, RhoB, GST-RhoB, TC10 und Ha-Ras wurden wie bereits beschrieben mit [<sup>3</sup>H]GDP beladen und anschließend die Raten des Nukleotidaustauschs im Filterbindungsversuch bestimmt. Parallelversuche mit Ha-Ras aus der Familie der Ras-GTPasen dienten als Negativkontrolle, da Ha-Ras kein Substrat für SopE und SopE2 darstellt (Abbildung 8c, f).

Um die Austauschreaktion zu starten, wurden die [<sup>3</sup>H]GDP-markierten RhoGTPasen in vier bei 28 °C vorgewärmte Reaktionsgefäße gegeben, die 420 µl Puffer F, 1 mM GDP und entweder 10 mM EDTA, 10 µg SopE<sub>78-240</sub>, 10 µg SopE2<sub>69-240</sub> oder 10 µg GST enthielten. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 80 µl entnommen, zu 800 µl kaltem Puffer F gegeben, auf einen angefeuchteten Nitrozellulosefilter aufgebracht und mit 3 × 2 ml kaltem Puffer F gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die filtergebundene Radioaktivität (entspricht der Menge an [<sup>3</sup>H]GDP-RhoGTPase-Komplex) unter Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler vermessen.



**Abbildung 8: Raten des SopE- und SopE2-vermittelten Nukleotidaustauschs.** Im Filterbindungsversuch wurde die [<sup>3</sup>H]GDP-Freisetzung aus Cdc42·[<sup>3</sup>H]GDP (a und d), Rac1·[<sup>3</sup>H]GDP (b und d) und Ha-Ras·[<sup>3</sup>H]GDP (c und f) in der Gegenwart von 1 mM GDP und 1 µM SopE<sub>78-240</sub> (●), 1 µM SopE2<sub>69-240</sub> (×), 10 mM EDTA (Δ) oder 1 µM GST (◆) verfolgt. Die Daten wurden jeweils aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt.

Inkubation der beladenen RhoGTPasen unter der Zugabe von EDTA bewirkte in allen Fällen einen Austausch von [ $^3\text{H}$ ]GDP gegen GDP. EDTA komplexiert bei der Zugabe zum Reaktionsansatz  $\text{Mg}^{2+}$ , das das Nukleotid in der Bindungstasche der RhoGTPase stabilisiert (Zhang *et al.*, 2000). GST diente als Negativkontrolle, es war katalytisch inaktiv. Die langsame spontane Freisetzung des [ $^3\text{H}$ ]GDP entsprach hier der Rate der unkatalysierten Reaktion (Abbildung 8).

Dagegen katalysieren sowohl SopE<sub>78-240</sub> als auch SopE2<sub>69-240</sub> eine schnelle Freisetzung des [ $^3\text{H}$ ]GDP aus dem Cdc42·[ $^3\text{H}$ ]GDP-Komplex ( $t_{1/2} \approx 15\text{s}$ ) (Abbildung 8a, d). Dagegen war der Austausch von [ $^3\text{H}$ ]GDP gegen GDP bei Rac1 in der Anwesenheit von SopE ( $t_{1/2} \approx 15\text{s}$ ) wesentlich schneller als in der Gegenwart von SopE2 ( $t_{1/2} \approx 35\text{s}$ ) (Abbildung 8b, e). Qualitativ betrachtet ist SopE<sub>78-240</sub> somit ein hocheffizienter Austauschfaktor für Cdc42 und Rac1, während SopE2<sub>69-240</sub> im Vergleich zu SopE gleich effizient an Cdc42, aber wesentlich schlechter an Rac1 austauscht.

Filterbindungsexperimente von [ $^3\text{H}$ ]GDP-RhoA, [ $^3\text{H}$ ]GDP-GST-RhoA, [ $^3\text{H}$ ]GDP-RhoB, [ $^3\text{H}$ ]GDP-GST-RhoB und [ $^3\text{H}$ ]GDP-TC10 mit SopE<sub>78-240</sub> oder SopE2<sub>69-240</sub> konnten aufgrund starker Schwankungen bei verschiedenen Versuchen nicht eindeutig ausgewertet werden. Da aufgrund der geringen spezifischen Aktivität der anderen RhoGTPase-Präparationen keine verlässlichen Aussagen über die Reaktionskinetik treffen lassen, wurden die erhaltenen Ergebnisse nicht weiter berücksichtigt. Eine mögliche Inaktivität der SopE<sub>78-240</sub>- und SopE2<sub>69-240</sub>-Präparationen wurde mit Kontrollversuchen (Austausch an [ $^3\text{H}$ ]GDP-markiertem Cdc42) ausgeschlossen.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass SopE2 im Gegensatz zu SopE eine differenzielle Spezifität gegenüber Cdc42 und Rac1 zeigt: Während SopE ein effizienter Austauschfaktor sowohl für Cdc42 als auch für Rac1 ist, kann SopE2 an Rac1 wesentlich schlechter austauschen als an Cdc42. Es stellte sich die Frage, ob sich dieser qualitativ bestimmte Unterschied in quantitativen biochemischen Messungen bestätigen lässt.

#### 1.4. Die Michaelis-Menten-Kinetik des SopE bzw. SopE2-vermittelten Nukleotidaustauschs

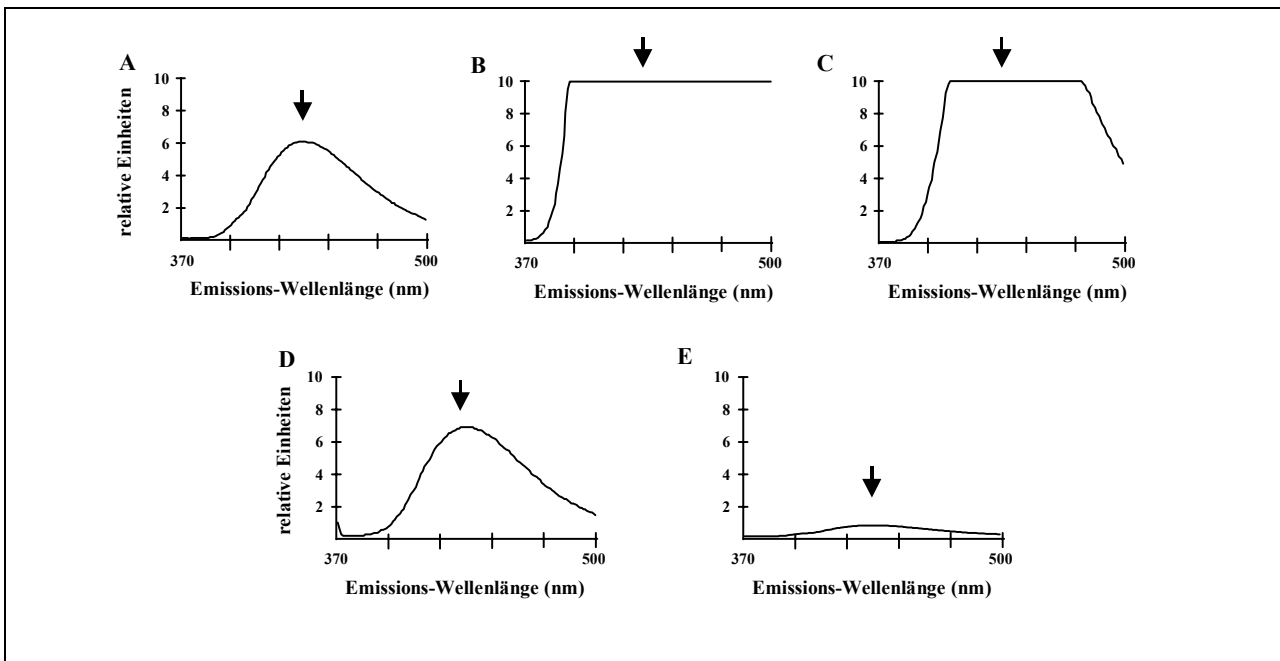
Fluoreszenzspektrometrie stellt eine wichtige Methode zur Quantifizierung von katalytischen Prozessen dar. Nach einem ähnlichen Prinzip wie in den Filterbindungsversuchen wird hier die Freisetzung des fluoreszierenden, mant-markierten GDP von der RhoGTPase verfolgt. Die Fluoreszenz des proteingebundenen mantGDP ist vierfach höher als die von mantGDP in Lösung. Diese Methode (Rudolph *et al.*, 1999a) hat gegenüber den Filterbindungsversuchen den entscheidenden Vorteil, dass die Austauschreaktion in Gegenwart eines Überschusses an GDP direkt verfolgt werden kann und somit keine Artefakte durch die Immobilisation auf dem Filter zu erwarten sind.

Cdc42 und Rac1 wurden auf verschiedene Methoden mit mantGDP beladen, da sich Rac1 bereits während der Aufreinigung als empfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen zeigte als Cdc42. Ausgangsmaterial für die Beladung der RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 war jeweils aufgereinigtes Protein.

Für die Beladung wurde zunächst 2,6 mg GST-Cdc42 in 625  $\mu$ l Puffer D zu 1 ml äquilibrierter GSH-Sepharose gegeben. In dieser Phase ist Cdc42 mit GDP beladen, das durch Zugabe von 10 mM EDTA und 50  $\mu$ l mantGDP gegen fluoreszenzmarkiertes Nukleotid ausgetauscht wurde. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 22 °C wurde die Beladung durch die Zugabe eines 10 mM Überschusses an  $MgCl_2$  auf Eis gestoppt. In der anschließenden Thrombinspaltung wurde der mantGDP-Cdc42-Komplex durch Gelfiltration über eine NAP-25-Säule von freiem Nukleotid abgetrennt. Nach der Einengung der komplexhaltigen Fraktionen mittels Ultrafiltration wurde die Aktivität des Komplexes durch EDTA-vermittelten G-Nukleotidaustausch überprüft.

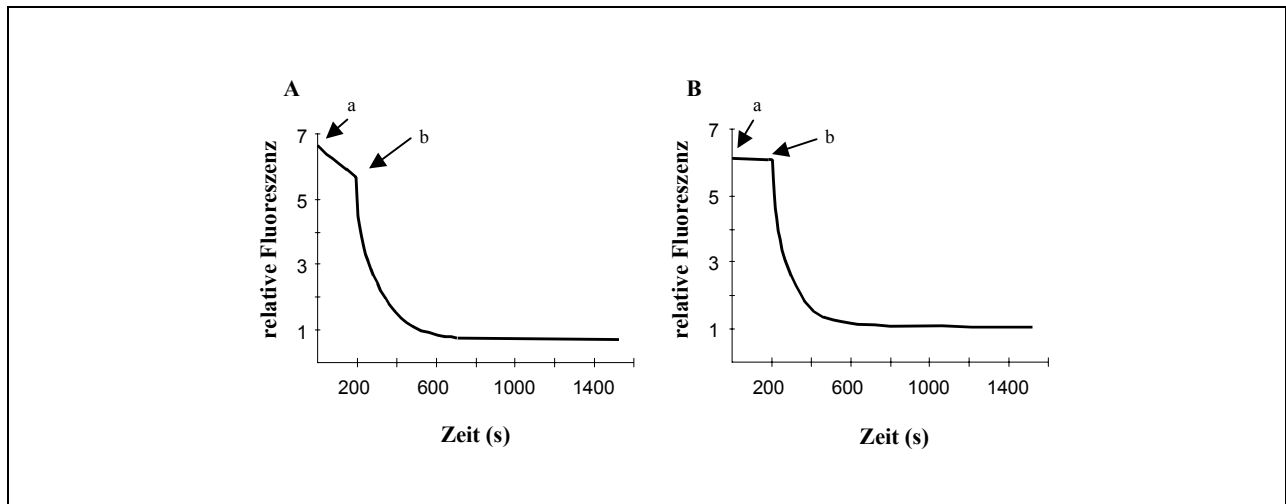
Da Rac1 mittels dieser Methode nicht erfolgreich beladen werden konnte, wurde für die Beladung von Rac1 ein anderes Protokoll gewählt. 9 mg Rac1 in 1,5 ml Puffer D wurden zunächst an eine GST-SopE-Sepharose-Säule gebunden. Diese Säule wurde gewaschen, damit nur aktives Rac1, das an SopE binden konnten, auf der Säule immobilisiert blieb. Inaktives Rac1 befand sich im Durchfluss und wurde somit von der anschließenden Beladung ausgeschlossen. Die Elution von Rac1 erfolgte in 1 ml-Schritten mit 5 ml 180  $\mu$ M mantGDP. Je 10  $\mu$ l der einzelnen Fraktionen wurde in Puffer S verdünnt. Die Menge des eluierten mantGDP-Rac1-

Komplexes wurde anhand eines „Emissionsscans“ abgeschätzt (Abbildung 9). Anschließend wurden die proteinhaltigen Fraktionen (Abbildung 9, A-D) vereinigt.



**Abbildung 9: Elutionsprofil des mantGDP-Rac1-Komplexes.** Nach der Bindung an die GST-SopE-Sepharose-Säule wurde Rac1 in 1 ml-Schritten mit einer 180  $\mu$ M mantGDP-Lösung eluiert. Von jeder Fraktion wurde ein Aliquot im Fluoreszenzspektrometer zur Überprüfung der Ausbeute vermessen („Emissionsscan“ von 370 bis 500 nm). Das Emissionsmaximum des mantGDP-Rac1-Komplexes bei 440 nm ist durch den schwarzen Pfeil markiert. Die Abbildungen A-E zeigen die Mengen an eluiertem Komplex in den einzelnen Fraktionen.

Nach der Einengung auf 2,5 ml wurde das Eluat über Gelfiltration auf einer NAP25-Säule von freiem Nukleotid abgetrennt. Proteinhaltiges Eluat wurde wiederum mit EDTA auf seine Dissoziationsfähigkeit geprüft. Als Ursache für die beobachtete spontane Dissoziation in Gegenwart von GDP wurden Spuren von SopE aus der ersten Säule vermutet (Abbildung 10). Um SopE-Reste zu entfernen wurde deshalb das Eluat aus der Gelfiltration über eine GST-Rac1-Säule gereinigt, danach ist keine spontane Dissoziation mehr zu beobachten.



**Abbildung 10: Spontane Dissoziation des mantGDP·Rac1-Komplexes.** **A.** Nach der Elution des gebundenen Rac1 mit 180  $\mu\text{M}$  mantGDP führt die Zugabe von 1 mM GDP zur spontanen Dissoziation des Komplexes, die durch eine Erhöhung der EDTA-Konzentration auf 10 mM noch beschleunigt werden kann. **B.** Nach Aufreinigung des mantGDP·Rac1-Komplexes über eine GST-Rac1-Säule ist die Basislinie nach Zugabe von 1 mM GDP stabil, die Erhöhung der EDTA-Konzentration auf 10 mM führt zur Dissoziation des Komplexes. a: Zugabe von 1 mM GDP, b: Erhöhung der EDTA-Konzentration auf 10 mM.

Im folgenden Versuch wurde die Kinetik und die Konzentrationsabhängigkeit der SopE- und SopE2-vermittelten Dissoziation von mantGDP·Cdc42 und mantGDP·Rac1 verfolgt. Dabei wurden in „multiple turnover“-Experimenten einer gleichbleibenden Enzymkonzentration von 25 nM SopE<sub>78-240</sub> bzw. SopE2<sub>69-240</sub> in Puffer S in Gegenwart von 1 mM GDP steigende Konzentrationen an mantGDP·Cdc42 oder mantGDP·Rac1 zugegeben. Aus den erhaltenen Austauschkurven wurde mithilfe der Zerfallsgleichung und den Konzentrationsangaben der beiden Reaktionspartner jeweils die konzentrationsunabhängige Geschwindigkeitskonstante  $k_{obs}$  berechnet.

#### Zerfallsgleichung:

$$y = c + A e^{-b \cdot t} \quad \text{wobei } c \text{ den Achsenabschnitt, } A \text{ die Substratkonzentration zum Zeitpunkt } t = 0, t \text{ die Zeit und } b \text{ die Zerfallskonstante bezeichnet.}$$

#### Berechnung der Zerfallskonstanten (SigmaPlot):

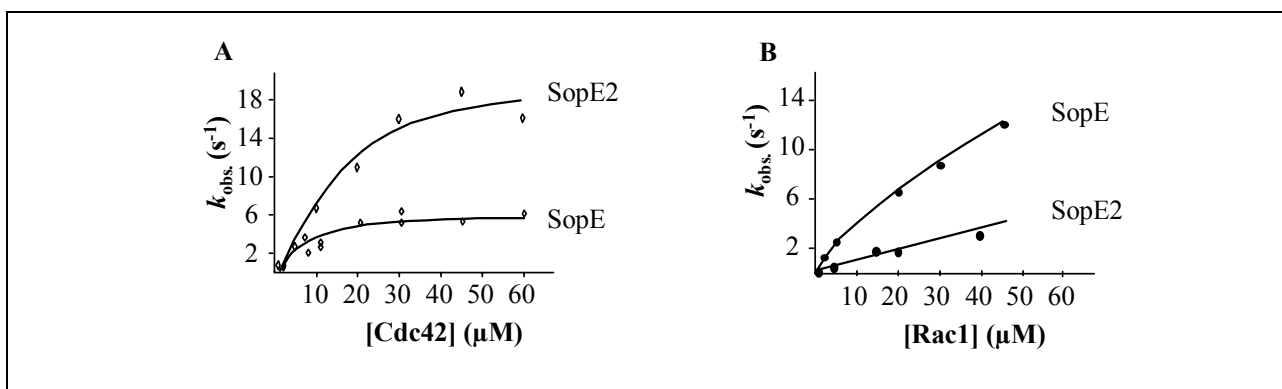
$$b = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

### Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten $k_{obs}$ :

$$k_{obs} = \frac{b \text{ [Substrat]}}{\text{[Enzym]}}$$

In der graphischen Darstellung der Kinetik wurde für alle Reaktionspaare (SopE/Cdc42, SopE2/Cdc42, SopE/Rac1, SopE2/Rac1)  $k_{obs}$  gegen die zugehörige Substratkonzentration aufgetragen. Aus dem so erhaltenen Michaelis-Menten-Diagramm können nun als kinetische Parameter direkt die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}/2$ ) und die zugehörige Substratkonzentration (Michaelis-Menten-Konstante,  $K_M$ ) ermittelt werden.  $K_M$  dient als Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Je höher der  $K_M$ -Wert bei halbmaximaler Geschwindigkeit der Reaktion ist, desto geringer ist die Affinität des Enzyms zum jeweiligen Substrat.

In Abbildung 11A ist zu sehen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der SopE<sub>78-240</sub>-vermittelten G-Nukleotid-Austauschreaktion für Cdc42 ein Plateau bei einer Konzentration von 20-40  $\mu\text{M}$  Cdc42-mantGDP erreicht. Die Michaelis-Menten-Parameter des SopE<sub>78-240</sub>-vermittelten G-Nukleotid-Austauschs an Cdc42-mantGDP ( $k_{cat} = 5 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ ;  $K_M = 6 \pm 2 \text{ }\mu\text{M}$ ) liegen damit in derselben Größenordnung wie die für den SopE<sub>78-240</sub>-vermittelten Austausch an Cdc42<sub>V12</sub> ( $k_{cat} = 0,95 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$ ;  $K_M = 4,5 \pm 0,9 \text{ }\mu\text{M}$ , Rudolph *et al.*, 1999a). Die geringen Abweichungen der ermittelten Konstanten können unter Umständen auf die V12-Mutation zurückgeführt werden.



**Abbildung 11:** „multiple turnover“-Kinetik des SopE- und SopE2-vermittelten Nukleotidaustauschs. Durch Fluoreszenzspektrometrie wurde die Freisetzung von mantGDP aus Cdc42-mantGDP (1 bis 45  $\mu\text{M}$ , A) und Rac1-mantGDP (1 bis 60  $\mu\text{M}$ , B) in Gegenwart von 1 mM GDP und 25 nM SopE<sub>78-240</sub> oder SopE<sub>269-240</sub> verfolgt (Anregungswellenlänge = 366 nm, Emissionswellenlänge = 440 nm). Die Kurven wurden in SigmaPlot an Zerfallskurven erster Ordnung angenähert, die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten wurden als Funktion der Substratkonzentration aufgetragen.

Die enzymatische Aktivität von SopE<sub>269-240</sub> gegenüber Cdc42 ist durch die Konstanten  $v_{max} = 19 \pm 3 \text{ s}^{-1}$  und  $K_M = 14 \pm 3 \text{ }\mu\text{M}$  charakterisiert. Damit ist SopE<sub>269-240</sub> für Cdc42 sogar ein effizienterer G-Nukleotid-Austauschfaktor als SopE<sub>78-240</sub>.

Für Rac1·mantGDP konnte auch bei hohen Substratkonzentrationen weder für SopE<sub>78-240</sub> noch für SopE<sub>269-240</sub> die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion erreicht werden (Abbildung 11B) (siehe auch Zhang *et al.*, 2000). Die Versuche für Rac1 wurden zur Kontrolle mit zwei unterschiedlichen Proteinvarianten durchgeführt, zum einen mit Volllängen-Rac1 (Aminosäuren 1-191, pM101), zum anderen mit verkürztem Rac1 (Aminosäuren 1-184, pRac verkürzt), jedoch konnte mit keiner der Varianten eine Sättigung der Reaktionsgeschwindigkeit für SopE<sub>78-240</sub> und SopE<sub>269-240</sub> erzielt werden. Daher wurde die katalytische Effizienz von SopE<sub>78-240</sub> und SopE<sub>269-240</sub> an Volllängen-Rac1 nur als  $k_{cat}/K_M$  anhand der Steigungen im linearen Bereich der Kurven abgeschätzt, wo die Geschwindigkeit der Reaktion direkt proportional zur Substratkonzentration ansteigt. Die Werte in diesem Bereich zeigen, dass die katalytische Effizienz von SopE<sub>78-240</sub> für Rac1 ungefähr sechsfach höher ist als die von SopE<sub>269-240</sub> (Tabelle 14).

**Tabelle 14:** „Multiple turnover“-Messungen des SopE- und SopE2-vermittelten Nukleotidaustauschs. \*: bestimmt aus den Messungen bei niedrigen RhoGTPase-Konzentrationen im linearen Bereich der Kurve (siehe Abbildung 11).

	SopE		SopE2	
	Cdc 42	Rac1	Cdc 42	Rac1
$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$6 \pm 2$	Abbildung 11	$14 \pm 3$	Abbildung 11
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$5 \pm 1$	Abbildung 11	$19 \pm 3$	Abbildung 11
$k_{obs} / [\text{GTPase}]$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )*	$29 \pm 5 \times 10^4$	$50 \pm 15 \times 10^4$	$65 \pm 8 \times 10^4$	$8 \pm 1 \times 10^4$

Nachdem sich die Beobachtungen aus den Filterbindungsversuchen in den quantitativen Fluoreszenzmessungen bestätigen ließen, stellte sich als nächstes die Frage, worauf die geringere Effizienz von SopE2 gegenüber Rac1 zurückzuführen ist. Die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion wird hierbei sowohl von der Affinität der beiden Reaktionspartner zueinander (Assoziation und Dissoziation) als auch von der Geschwindigkeit des eigentlichen katalytischen Schritts bestimmt.

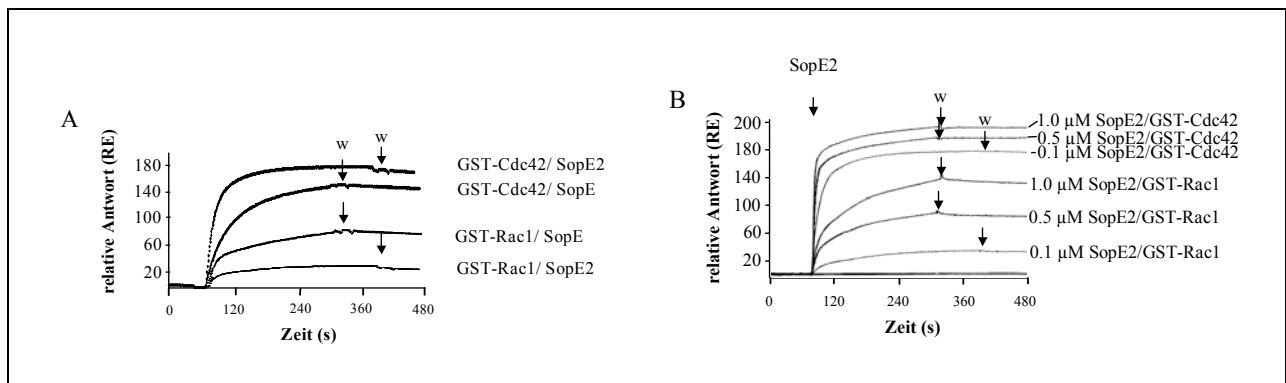
### 1.5. Die Gleichgewichtskonstanten der GEF·RhoGTPase-Komplexe

Um die Bindungsspezifität von SopE und SopE2 näher zu analysieren, wurde auf das Prinzip der Oberflächen-Plasmon-Resonanz („Surface Plasmon Resonance“) zurückgegriffen. Als Erweiterung zu den Fluoreszenzmessungen ermöglicht das BIAcore-System, die direkte Bindung von Molekülen aufgeschlüsselt in Assoziation und Dissoziation zu verfolgen. Eine Gelmatrix, die auf der Oberfläche des Chips aufgebracht ist, wurde für die Immobilisation eines  $\alpha$ -GST-Antikörpers genutzt, der den ersten Reaktionspartner (ein GST-Fusionsprotein) bindet. Daraufhin kann der zweite Bindungspartner in Lösung auf den Chip injiziert werden. Kommt es zu einer Bindung, führt das zu einer Zunahme der Proteinkonzentration auf der Sensoroberfläche, was aufgrund der sogenannten Plasmonresonanz eine Veränderung des Brechungsindex auf der gegenüberliegenden Seite des Chips bewirkt. Die Änderung wird in Resonanzeinheiten (RE) gemessen, wobei eine lineare Beziehung zwischen der Massenzunahme auf der Oberseite des Chips und den beobachteten Resonanzeinheiten besteht.

Zunächst wurde der  $\alpha$ -GST-Antikörper über eine Amin-Kopplung bis zu einer Signalstärke von 4000 Resonanzeinheiten (RE) kovalent an die Dextranmatrix gekoppelt. Die Assoziationskonstanten der Komplexbildung zwischen GST-Cdc42 oder GST-Rac1 und SopE<sub>78-240</sub> oder SopE2<sub>69-240</sub> wurden nun abhängig von der injizierten Konzentration an SopE bzw. SopE2 bestimmt. Dazu wurden zunächst GST-Cdc42 (100  $\mu$ g/ml in Puffer B), GST-Rac1 (100  $\mu$ g/ml in Puffer B) oder GST (50  $\mu$ g/ml in Puffer B) bei einer Flussrate von 5  $\mu$ l/min über die Injektionsschleife an jeweils eine der Spuren mit  $\alpha$ -GST-Antikörper gebunden. Nach einem Waschschrift wurden SopE<sub>78-240</sub> oder SopE2<sub>69-240</sub> in verschiedenen Konzentrationen (50 nM bis 10  $\mu$ M) injiziert und die Geschwindigkeit der Assoziation anhand der Zunahme des Resonanzsignals gemessen. Anschließend wurde für 5 bis 60 min bei einer Flussrate von 10  $\mu$ l/min mit Puffer B gespült, dabei konnte die spontane Dissoziation des nukleotidfreien Komplexes verfolgt werden. Durch Zugabe von 20  $\mu$ l 20  $\mu$ M GDP bei einer Flussrate von 15  $\mu$ l/min konnte eine rasche und vollständige Dissoziation der Komplexe herbeigeführt werden (ohne Abbildung). Eine vollständige Regeneration der Matrix unter Erhalt des  $\alpha$ -GST-Antikörpers erfolgte durch die aufeinanderfolgende Injektion von 20  $\mu$ l 0,05 % SDS und 20  $\mu$ l 10 mM Glycin pH 2,2 bei einer Flussrate von 15  $\mu$ l/min. Durch parallele Kontrollversuche mit GST als erstem Bindungspartner konnten die Werte um den Beitrag der unspezifischen Bindung korrigiert werden. Die Assoziations- und Dissoziationskonstanten der Komplexe wurden aus den erhaltenen Kurven mithilfe der BIAEvaluation Software ermittelt.



Die Raten der Komplexbildung zwischen GST-Cdc42<sub>1-192</sub>, GST-Rac1<sub>1-191</sub>, SopE<sub>78-240</sub> und SopE2<sub>69-240</sub> waren abhängig von der Konzentration an SopE<sub>78-240</sub> und SopE2<sub>69-240</sub> (Abbildung 12). SopE<sub>78-240</sub> bindet mit einer ähnlichen Kinetik an GST-Cdc42 und GST-Rac1. Dagegen ist die Assoziationskonstante für die Bildung des GST-Cdc42·SopE2<sub>69-240</sub>-Komplexes siebenfach höher als die des GST-Rac1·SopE2<sub>69-240</sub>-Komplexes (Tabelle 15). Die Dissoziation beider Komplexe ist in der Abwesenheit von GDP sehr langsam. Die Dissoziationsrate sollte aufgrund der daraus resultierenden Ungenauigkeit nur als grobe Schätzung angesehen werden.



**Abbildung 12: Oberflächenresonanzmessungen der SopE/E2-Interaktion mit Cdc42 und Rac1. A.** Bindungskinetik von SopE<sub>78-240</sub> und SopE2<sub>69-240</sub> (je 100 nM) an GST-Cdc42 und GST-Rac1. **B.** Konzentrationsabhängigkeit der Bindungsraten von SopE2<sub>69-240</sub> an GST-Cdc42 oder GST-Rac1. Nach einem Waschschritt (0-90 s) wurde SopE2 in den angegebenen Konzentrationen injiziert. Die Kurven wurden um den Betrag der unspezifischen Bindung korrigiert, um die spezifischen Signaländerungen zu erhalten.

Vergleicht man die Assoziations- und Dissoziationskonstanten, so sind der GST-Cdc42·SopE<sub>78-240</sub>-Komplex und der GST-Rac1·SopE<sub>78-240</sub>-Komplex ähnlich stabil. Die Dissoziation des GST-Rac1·SopE2<sub>69-240</sub>-Komplexes ist dagegen sechsmal schneller als die des GST-Cdc42·SopE2<sub>69-240</sub>-Komplexes. Ähnlich wie in früheren Versuchen zum GST-SopE<sub>78-240</sub>·Cdc42-Komplex war die Dissoziation aller Komplexe von GST-RhoGTPase und SopE<sub>78-240</sub> bzw. SopE2<sub>69-240</sub> in Gegenwart von 20 μM GDP in weniger als 5 s vollständig. Die Dissoziationskurven in der Anwesenheit von G-Nukleotiden waren zu schnell für eine genaue Analyse. Deshalb war es auch nicht möglich, Unterschiede in den Dissoziationsraten der Komplexe mit GST-Cdc42 und GST-Rac1 in Anwesenheit von G-Nukleotiden herauszuarbeiten.

Die Bestimmung der Dissoziations- und Assoziationskonstanten für alle Komplexe ermöglichte nun die Berechnung der jeweiligen Gleichgewichtskonstanten  $K_D$  (Tabelle 15), die sich als Verhältnis der Dissoziationsrate zur Assoziationsrate definiert. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass SopE<sub>78-240</sub> mit ähnlichen Gleichgewichtskonstanten an Cdc42 und Rac1 bindet. Dagegen ist die Gleichgewichtsbindung von SopE<sub>69-240</sub> an GST-Cdc42 etwa 40-fach stärker als an GST-Rac1.

**Tabelle 15: Oberflächen-Plasmonresonanzmessungen der Assoziation und Dissoziation der SopE/E2-Komplexe mit GST-Cdc42/GST-Rac1.** Angegeben sind für jeden Komplex die Assoziationskonstante  $k_{ass}$ , die Dissoziationskonstante  $k_{diss}$  sowie die daraus resultierende Gleichgewichtsbindungskonstante  $K_D$ .  $k_{ass}$  und  $k_{diss}$  wurden mithilfe der BIAEvaluation-Software ermittelt.

		SopE <sub>78-240</sub>	SopE <sub>69-240</sub>
<b>GST-Cdc42</b>	$K_D$ (M)	$2,8 \times 10^{-10}$	$5,2 \times 10^{-11}$
	$k_{ass}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$1,6 \pm 0,1 \times 10^5$	$4,0 \pm 1,0 \times 10^5$
	$k_{diss}$ ( $s^{-1}$ )	$4,5 \pm 1,5 \times 10^{-5}$	$2,1 \pm 0,5 \times 10^{-5}$
<b>GST-Rac1</b>	$K_D$ (M)	$3,1 \times 10^{-10}$	$2,3 \times 10^{-9}$
	$k_{ass}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$3,2 \pm 0,5 \times 10^5$	$5,7 \pm 1,4 \times 10^4$
	$k_{diss}$ ( $s^{-1}$ )	$1,0 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$1,3 \pm 0,4 \times 10^{-4}$

Die Fähigkeit von SopE2, Cdc42 und Rac1 differenziell zu aktivieren, beruht somit auf einer geringeren Affinität für Rac1 als für Cdc42, die aus einer Kombination von schwächerer Bindungs- und erhöhter Dissoziationsrate des GST-Rac1-SopE2-Komplex im Vergleich zum GST-Cdc42-SopE2-Komplex resultiert.

In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die spezifische Aktivierung von Cdc42 in Zellkulturversuchen die Ausbildung von Filopodien begünstigt, während die Aktivierung von Rac1 zur Bildung von Lamellipodien führt (Abbildung 5). Es stellte sich nun die Frage, ob die in den biochemischen Versuchen herausgearbeitete differenzielle Substratspezifität von SopE und SopE2 wirklich einen unterschiedlichen Phänotyp in der Organisation des Aktinzytoskeletts vermittelt.

## 1.6. Morphologie der SopE- und SopE2-induzierten Membranausstülpungen

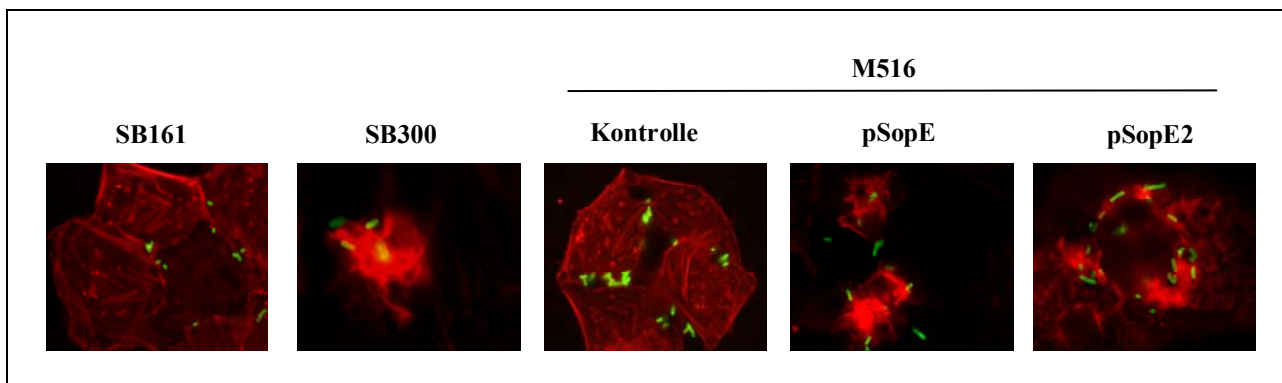
Mit der Tripelmutante M516 (Mirolid *et al.*, 2001) stand ein neuer Stamm zur Verfügung, in dem mit SopE, SopE2 und SopB die drei wichtigsten invasionsvermittelnden Effektorproteine fehlen. Dieser Stamm ist 100-fach weniger invasiv als der isogene Ausgangsstamm SB300 und induziert in Zellkulturversuchen keine Zytoskelettlagerungen mehr. Somit bot M516 einen idealen Ausgangspunkt, um die Funktion von SopE und SopE2 detailliert zu untersuchen.

Zur Untersuchung der Aktinumlagerungen wurde der Einfluss von SopE und SopE2 im Hintergrund des Stammes M516 auf das Aktinzytoskelett verschiedener Zelllinien studiert. Dazu wurde die Stärke und die morphologische Ausprägung *sopE*- und *sopE2*-induzierter Membranveränderungen in Abhängigkeit von der Infektionsdauer untersucht. Parallel mit einer Bakterienfärbung kann durch die Verwendung von fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin, das selektiv an Aktin bindet, der Membranumbau der Wirtszelle im Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden.

COS7-, NIH3T3-, HeLa-, Henle407-, Caco-2- sowie HUVEC-Zellen wurden für 12, 20, 30 oder 40 min mit einer Dosis von zehn Bakterien pro Wirtszelle infiziert. Als Inokulum dienten der Wildtyp (SB300, Positivkontrolle), eine translokationsdefekte *invG*-Mutante (SB161, Negativkontrolle), der *sopE sopE2 sopB*-Tripelmutantenstamm M516 sowie M516 komplementiert mit pM136 (SopE<sub>1-240-M45</sub>) oder pM226 (SopE2<sub>1-240-M45</sub>). Bei jeder der getesteten Zelllinien wurden Zeitreihen analysiert, um auch kinetische Unterschiede von SopE- und SopE2-induzierten Zytoskelettlagerungen herauszuarbeiten. Anschließend wurden die Zellen fixiert, gefärbt und die Reorganisation des Zytoskeletts in Abhängigkeit von der Lokalisation der Bakterien beurteilt.

Dabei induzierte der Wildtyp-Stamm (SB300) in allen getesteten Zelllinien und zu allen Zeitpunkten auffällige Zytoskelettlagerungen am Ort der Anheftung an die Wirtszelle (Abbildung 13). Zellen, infiziert mit dem Tripelmutantenstamm M516 oder der nicht invasiven *invG*-Mutante (SB161) zeigten dagegen nur geringe oder gar keine Zytoskelettveränderungen (Abbildung 13).

Eine Untersuchung der *sopE*- und *sopE2*-abhängigen Zytoskelettlagerungen zeigte, dass pM136 wie auch pM226 den „Rufflingdefekt“ der Tripelmutante komplementieren können - im Bereich der Bakterien sind starke Membranumlagerungen sichtbar. Jedoch waren bei HeLa-Zellen, die für 12, 15, 20 oder 40 min infiziert wurden, keine signifikanten Unterschiede in Stärke und Gestalt der Aktinumlagerungen zu erkennen. Ein ähnliches Ergebnis lieferten COS7-Zellen. Auch bei Henle407- und Caco-2-Zellen zeigte sich nach 12 bzw. 30 min keine Unterschiede in der Gestalt der SopE- und SopE2-induzierten Membranumlagerungen.



**Abbildung 13: Phänotyp salmonelleninduzierter Zytoskelettlagerungen.** HeLa-Zellen wurden für 12 min mit *S. typhimurium*-Stämmen infiziert (MOI = 10), fixiert und permeabilisiert. Aktin (rot) wurde mit einem Phalloidin-TRITC-Konjugat gefärbt, die Detektion der Bakterien (grün) erfolgte über eine zweistufige Färbung mit einem  $\alpha$ -*Salmonella*-Antikörper sowie einem FITC-gekoppelten Konjugat.

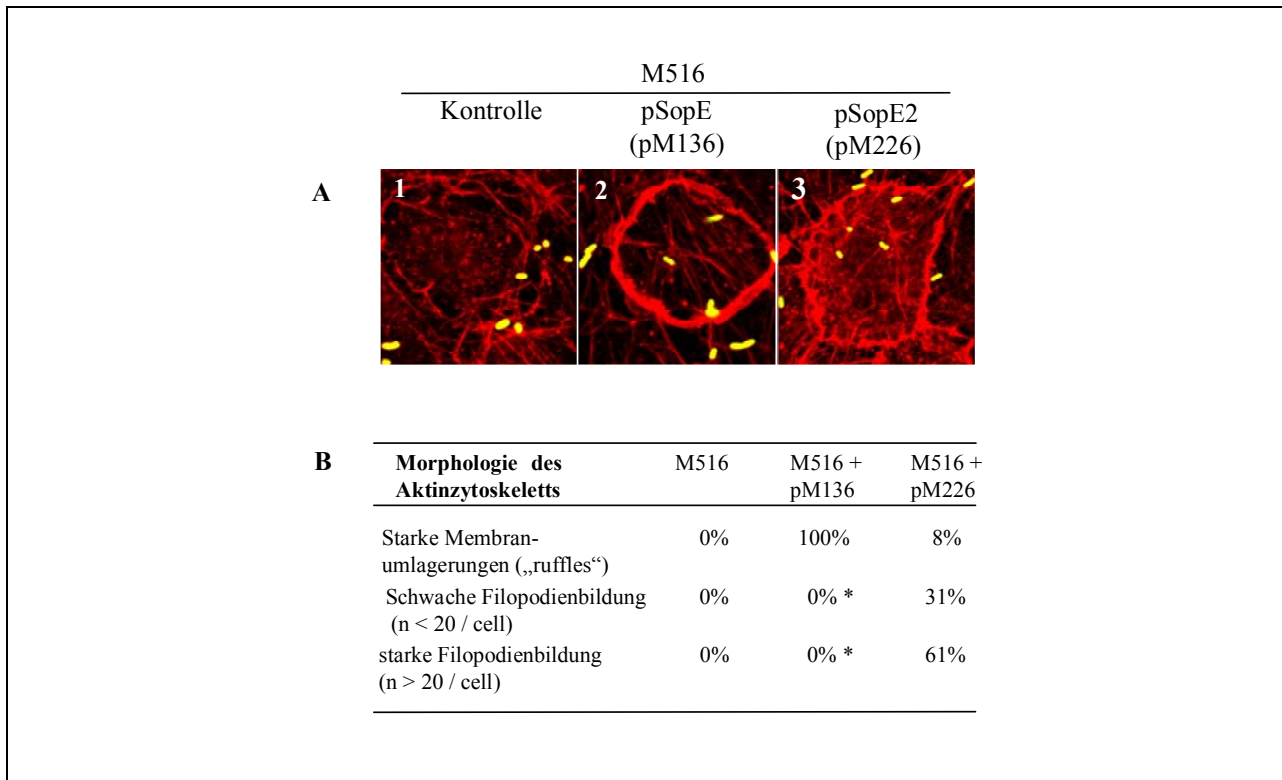
Der Vergleich mit bisherigen Ergebnissen (Stender *et al.*, 2000; Hardt *et al.*, 1998b) legt nahe, dass die Wirkung von SopE und SopE2 unter anderem auch vom Zelltyp abhängig ist. Mit NIH3T3- und HUVEC-Zellen konnten Zelllinien gefunden werden, bei denen sich der Unterschied zwischen SopE- und SopE2-induzierten Zytoskelettveränderungen deutlicher zeigt.

Bei NIH3T3-Zellen zeigte sich im Vergleich von *sopE*- und *sopE2*-infizierten Zellen ein offensichtlicher Unterschied in der Anzahl der Zellen, die Membranumlagerungen aufwiesen. Im Rahmen einer Zeitreihe (10', 15', 20' und 30') waren die Unterschiede bei 30-minütiger Infektion am stärksten ausgeprägt. Eine mikroskopische Auszählung aller infizierten Zellen mit mehr als zwei Bakterien auf der Oberfläche zeigte, dass bei einer Komplementation mit SopE mit 86 % vergleichbar viele Zellen Zytoskelettveränderungen zeigten wie beim Wildtypstamm (88 %). Bei einer Komplementation mit SopE2 dagegen kehrt sich das Verhältnis um (Tabelle 16).

**Tabelle 16: Ausmaß der durch SopE (pM136) und SopE2 (pM226) induzierten Zytoskelettveränderungen in NIH3T3-Zellen.** NIH3T3-Zellen wurden für 30 min mit den angegebenen *S. typhimurium*-Stämmen infiziert (MOI = 10). Die Zellen wurden fixiert, infizierte Zellen wurden durch eine Färbung der Bakterien mit einem polyklonalen  $\alpha$ -*Salmonella*-Antiserum und einem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper detektiert. Aktin wurde zur Quantifizierung der Aktinumlagerungen mit TRITC-markiertem Phalloidin gefärbt. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt, angegeben ist der Anteil der Zellen, die auffällige Zytoskelettveränderungen zeigten.

Stamm	Anteil der Zellen mit deutlichen Zytoskelettveränderungen	Anteil der Zellen ohne deutliche Zytoskelettveränderungen
SB300 (WT)	88 %	12 %
M516 mit pM136 ( <i>sopE</i> )	86 %	14 %
M516 mit pM226 ( <i>sopE2</i> )	15 %	85 %

Für HUVEC-Zellen schließlich konnten signifikante Unterschiede in der Form der SopE bzw. SopE2-induzierten Zytoskelettumlagerungen nachgewiesen werden. Während M516 alleine keine nennenswerten Zytoskelettumlagerungen verursachte, führte eine Infektion mit M516 (pM136) zu deutlichen Umlagerungen. Beurteilt wurden alle Zellen, bei denen mehr als 50 % des randständigen Aktins umgelagert waren. Hier konnten für eine Komplementation mit *sopE* in allen Zellen deutliche lamellipodienartige Strukturen nachgewiesen werden. Diese Veränderungen (Abbildung 14, A2) erinnerten stark an die Effekte, die bei der spezifischen Aktivierung von Rac1 beobachtet werden (Abbildung 5B). Eine Infektion mit M516 (pM226) führte dagegen bei 92 % der Zellen zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Filopodien, hier zeigten nur 8 % der Zellen Lamellipodien (Abbildung 14, A3 und B). Der Phänotyp von M516 (pM226) entspricht somit stark den Effekten, die bei der spezifischen Aktivierung von Cdc42 beobachtet werden (Abbildung 5B).



**Abbildung 14: SopE/SopE2-induzierte Umlagerung des Aktinzytoskeletts in HUVEC-Zellen.** **A.** HUVEC-Zellen wurden für 40 min mit den angegebenen *S. typhimurium*-Stämmen infiziert (MOI = 40). Die Zellen wurden fixiert, F-Aktin wurde mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt (rot), Bakterien wurden durch die Färbung mit einem  $\alpha$ -*Salmonella*-Antiserum sowie einem sekundären FITC-markierten Antikörper sichtbar gemacht (grün). **B.** Quantitative Analyse der SopE/E2 induzierten Zytoskelettumlagerungen. Zellen mit einer veränderten Morphologie des Aktinzytoskeletts (etwa 35 % aller Zellen) wurden aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften klassifiziert: unterschieden wurde zwischen „membrane ruffling“ (A, Bild 2), schwacher Filopodienbildung (<20 Filopodien pro Zelle) sowie starker Filopodienbildung (>20 Filopodien pro Zelle, A, Bild 3). Für jeden Stamm wurden mindestens 100 Zellen mit veränderter Morphologie des Aktinzytoskeletts in drei unabhängigen Experimenten ausgezählt. pSopE steht für pM136, pSopE2 für pM226. \*: Der Anteil an „microspikes“ konnte nicht bestimmt werden, da ein unbekannter Prozentsatz von „ruffles“ überdeckt ist.

Mit den folgenden Invasions- und Translokationsversuchen sollte ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in der Intensität und der Morphologie der Membranausstülpungen auf ein signifikant unterschiedliches Invasionsvermögen (d. h. eine unterschiedlich starke Wechselwirkung) des *sopE*- und *sopE2*-komplementierten Mutantenstamms in verschiedene Zelltypen oder auf deutlich unterschiedliche Mengen an transloziertem Protein zurückzuführen sind.

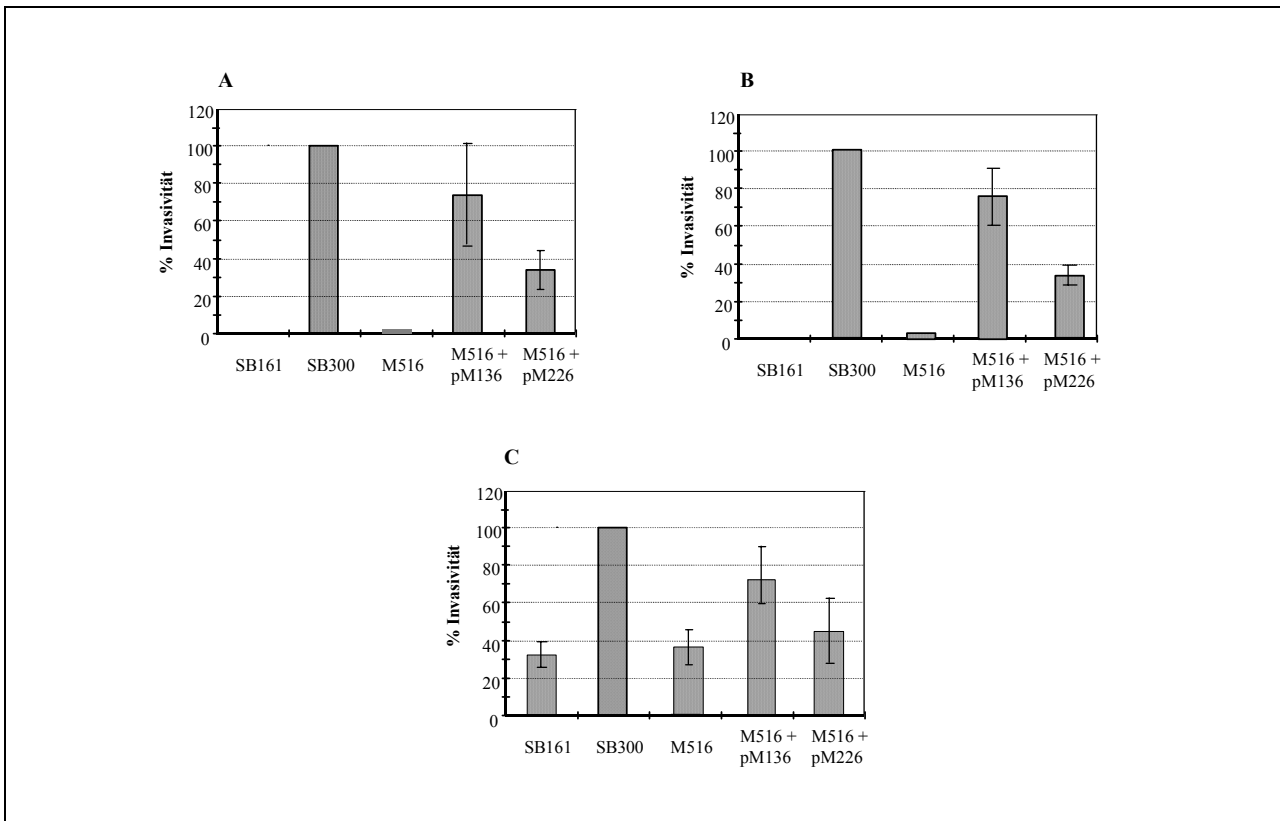
### 1.7. SopE- oder SopE2-vermittelte Invasivität

In sogenannten Gentamicin-Protektionsversuchen wurde bestimmt, welchen Beitrag *sopE* und *sopE2* zur Invasion der Tripelmutante in verschiedene Zelllinien leisten.

COS7-, NIH3T3- sowie HUVEC-Zellen wurden für 50 min mit M516 und M516 komplementiert mit pM136 (SopE<sub>1-240-M45</sub>) oder pM226 (SopE<sub>2-240-M45</sub>) mit einer MOI von 5 Bakterien pro Zelle infiziert. Eine anschließende zweistündige Inkubation mit DMEM-Medium versetzt mit 400 µg/ml Gentamicin bewirkte, dass selektiv alle extrazellulären Bakterien abgetötet wurden. Daraufhin wurden die Zellen in PBS mit Natriumdesoxycholat lysiert und die Menge der internalisierten Bakterien durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungsstufen bestimmt. Als Kontrollen dienten bei allen Versuchen die invasionsdefiziente Mutante SB161 (*invG*) sowie der Wildtypstamm SB300 (100 %).

Die Invasivität für M516 (pM136) und M516 (pM226) beträgt bei NIH3T3-Zellen 77 % und 34 % (Abbildung 15A). Dies ähnelt stark der Situation in COS7-Zellen mit 78% (pM136) und 37% (pM226) (Abbildung 15B). Da hier aber keine unterschiedliche Ausprägung des Aktinzytoskeletts zu beobachten war, scheinen die unterschiedlichen Effekte von pM136 und pM226 auf die Morphologie des Aktin-Zytoskeletts von NIH3T3-Zellen nicht auf eine unterschiedliche Intensität der Wechselwirkung zurückzuführen zu sein.

Bei HUVEC-Zellen beträgt die Invasivität von M516 (pM136) und M516 (pM226) 72 % und 45 % (Abbildung 15C). Da in HUVEC-Zellen auch bei SB161 (33 %) und M516 (37 %) eine deutliche Invasionsrate zu beobachten ist, scheint hierfür ein bisher unbekannter, sehr effizienter Typ III-unabhängiger Invasionsmechanismus verantwortlich zu sein, der die Typ III-vermittelte Invasion überlagert. Aufgrund der sehr ähnlichen Wechselwirkung von M516 (pM136) und M516 (pM226) mit HUVEC-Zellen ist es durchaus möglich, dass die unterschiedlichen Einflüsse auf das Aktinzytoskelett von HUVEC-Zellen auf die in den biochemischen Versuchen ermittelten funktionellen Unterschiede zwischen SopE und SopE2 zurückzuführen sind.



**Abbildung 15: Invasionskompetenz verschiedener *S. typhimurium*-Stämme in unterschiedliche Zelllinien.** Gewebekulturzellen wurden für 50 min mit verschiedenen *S. typhimurium*-Stämmen infiziert (MOI = 5). Die Anzahl der invadierten Bakterien wurde in einem Gentamicin-Protektionsversuch bestimmt (Material und Methoden), auf die Invasivität des Wildtypstammes normiert und als Prozentsatz der Wildtypinvasivität dargestellt. Alle Daten wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelt, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. **A.** Invasion verschiedener *S. typhimurium*-Stämme in NIH3T3-Zellen. **B.** Invasion verschiedener *S. typhimurium*-Stämme in COS7-Zellen. **C.** Invasion verschiedener *S. typhimurium*-Stämme in HUVEC-Zellen.

### 1.8. Translokation von SopE und SopE2 in die Wirtszelle

Da durch pM136 und pM226 SopE und SopE2 als C-terminale Fusionen mit dem 17 Aminosäuren langen M45-Epitop kodiert werden, kann die Menge an transloziertem SopE und SopE2 durch Detektion des Epitops mit dem monoklonalen  $\alpha$ -M45-Antikörper nachgewiesen werden. Dadurch kann überprüft werden, ob die Variationen in der Ausprägung des Aktinzytoskeletts auf unterschiedliche Mengen an transloziertem SopE und SopE2 zurückzuführen sind.

NIH3T3-, HeLa-, COS7- und HUVEC-Zellen wurden mit einem zehnfachen Überschuss an M516 (pM136) oder M516 (pM226) infiziert. Nach einer 40-minütigen Infektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Translokation von M45-Fusionsproteinen wurde durch



Immunfluoreszenz-Mikroskopie mithilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das Epitop und einem zweiten, FITC-gekoppelten Antikörper analysiert. Es zeigte sich für alle untersuchten Zelltypen, dass SopE und SopE2 in ca. 15-25 % der Zellen nachgewiesen werden konnten. Eine Analyse der intrazellulären Verteilung von M45-markierten SopE- und SopE2-Proteinen in der Immunfluoreszenz zeigte, dass beide Proteine in COS7-, NIH3T3-, HeLa- und HUVEC-Zellen in vergleichbaren Mengen in das Zytosol der Wirtszelle transloziert werden.

Zusätzlich zeigte sich, dass SopE<sub>1-240-M45</sub> in allen Zelllinien vor allem in den Bereichen der Zytoskelettlagerungen konzentriert ist. SopE2<sub>1-240-M45</sub> dagegen ist in allen getesteten Zelllinien gleichmäßig im Zytosol verteilt (ohne Abbildung).

### **1.8.1.1. Domänenaustausch zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von SopE und SopE2**

Zur Eingrenzung des intrazellulären Lokalisationssignals von SopE und SopE2 wurden wechselweise die N- und C-Termini des SopE- und SopE2-Proteins ausgetauscht.

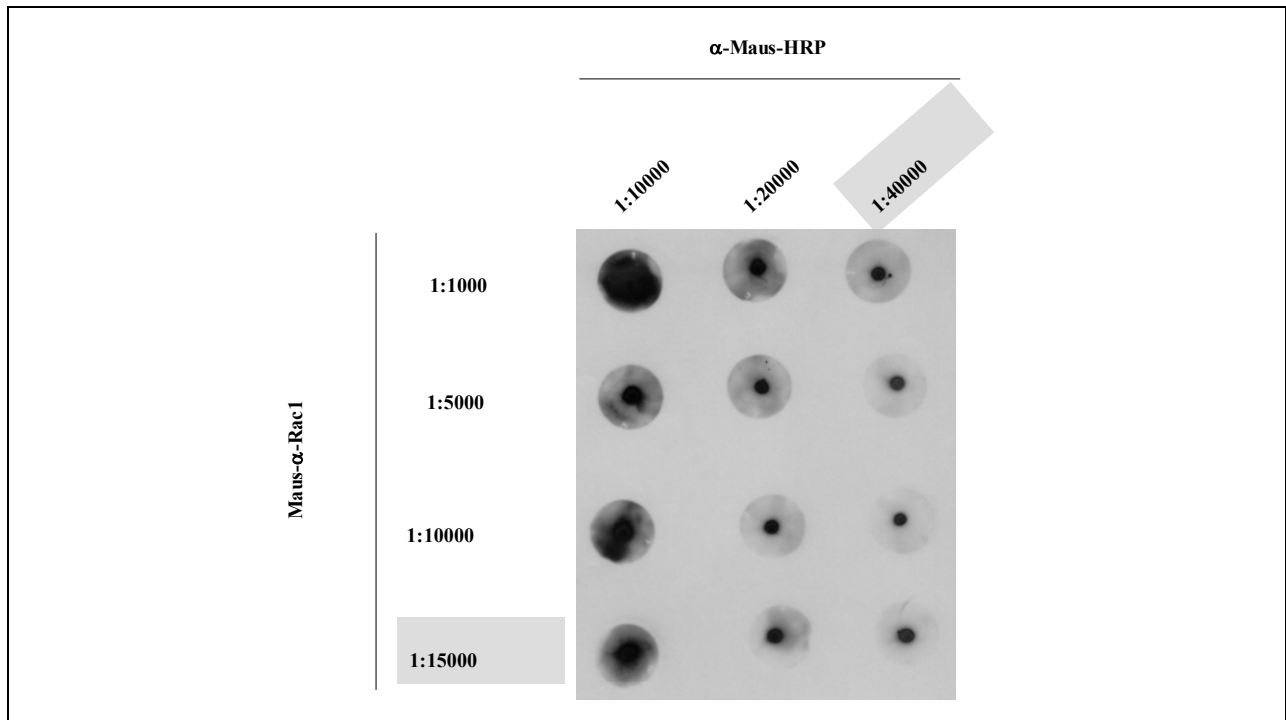
Dazu wurde über PCR in die kodierende Sequenz von pM136 (SopE<sub>1-240-M45</sub>) und pM226 (SopE2<sub>1-240-M45</sub>) zwischen Aminosäureposition 95 und 96 (Abbildung 30A, Anhang) eine stumme *EcoRV*-Schnittstelle in *sopE* bzw. *sopE2* eingeführt. Durch Schneiden der PCR-Produkte mit *SpeI/EcoRV* bzw. *EcoRV/HindIII* konnten daraufhin die vordere (5'-seitige) und hintere (3'-seitige) Hälfte der Gene wechselweise ligiert werden. Dies führte zu den Plasmiden pM416 (SopE<sub>1-95</sub>-SopE2<sub>96-240-M45</sub>) und pM417 (SopE2<sub>1-95</sub>-SopE<sub>96-240-M45</sub>). Bei der anschließenden Infektion von COS7-Zellen mit M516 komplementiert mit pM136, pM226, pM416 und pM417 zeigte sich, dass sich SopE<sub>1-95</sub>-SopE2<sub>96-240-M45</sub> wie SopE<sub>1-240-M45</sub> vorwiegend in Bereichen starker Aktinumlagerungen anreichert. SopE2<sub>1-95</sub>-SopE<sub>96-240-M45</sub> dagegen verteilt sich wie SopE2<sub>1-240-M45</sub> gleichmäßig in der Zelle. Dies weist darauf hin, dass das Lokalisationssignal, ähnlich dem Sekretions- und dem Translokationssignal (K. Ehrbar, persönliche Mitteilung), in der N-terminalen Hälfte des Proteins liegt und die katalytischen Domänen von SopE und SopE2 keinen Einfluß auf die intrazelluläre Lokalisation haben. Ob dies einen Einfluss auf die Spezifität hat, kann jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend weisen diese zellbiologischen Beobachtungen darauf hin, dass SopE und SopE2 in vergleichbarer Weise in Wirtszellen transloziert werden. Somit ist anzunehmen, dass die unterschiedlichen Effekte auf das Aktinzytoskelett von HUVEC-Zellen durch die differenzielle Substratspezifität von SopE und SopE2 gegenüber Cdc42 und Rac1 bedingt sind. SopE scheint in der Zelle eher Rac1 zu aktivieren, während SopE2 verstärkt Cdc42 zu aktivieren scheint.

### 1.9. *in vivo*-Quantifizierung durch Affinitätspräzipitationsversuche

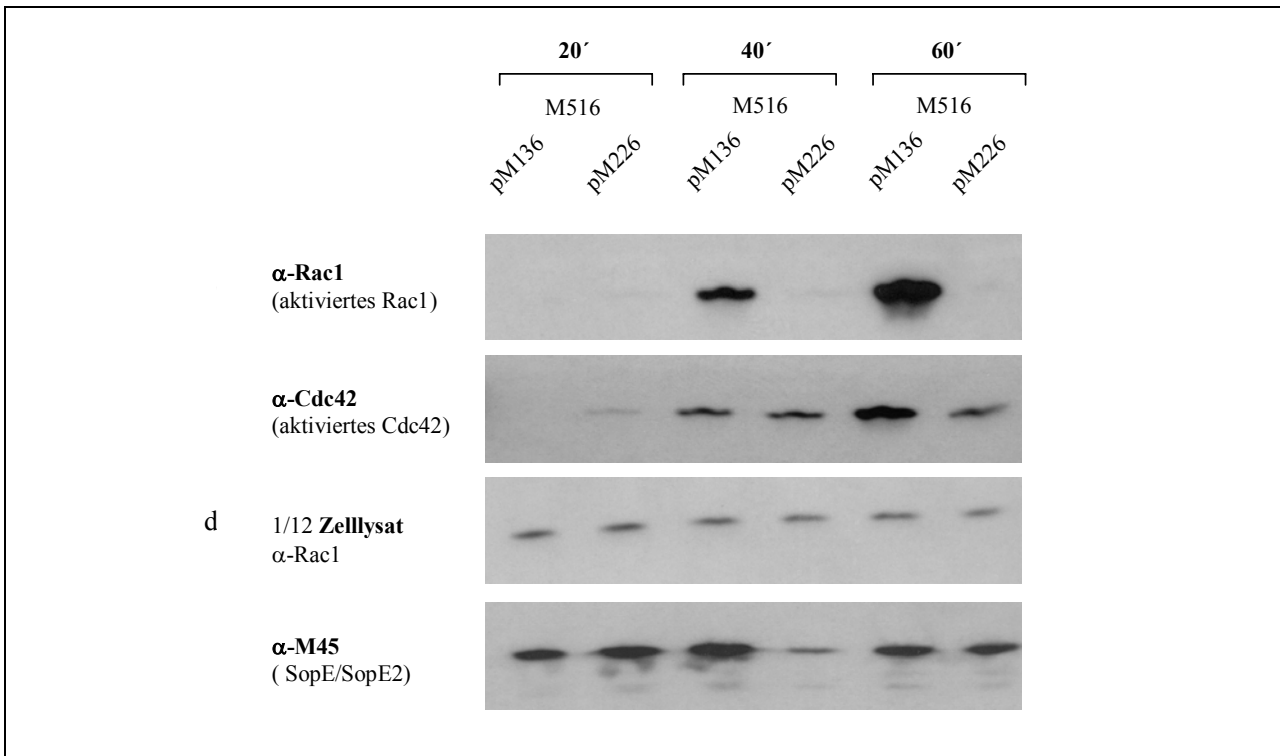
Als nächstes sollte quantitativ analysiert werden, ob SopE und SopE2 *in vivo* wirklich eine unterschiedlich starke Aktivierung von Cdc42 und Rac1 hervorrufen. In ruhenden Zellen liegt der Großteil der RhoGTPasen in der inaktiven GDP-gebundenen Form vor. Erst nach einem aktivierenden Stimulus sind die Konzentrationen der GTP-gebundenen RhoGTPasen erhöht. Somit können die Mengen an GTP-gebundenem Rac1 und Cdc42 in Gewebekulturzellen als Maß für den Aktivierungsgrad von RhoGTPasen dienen. Dies kann mithilfe der Affinitätspräzipitation geschehen. Die Affinitätspräzipitation basiert auf der Interaktion von Cdc42 bzw. Rac1 mit der Cdc42-Rac1-Bindedomäne (CRIB) von PAK-1. PAK-1 ist ein zellulärer Effektor von Cdc42 und Rac1 und bindet über die CRIB-Domäne spezifisch an aktiviertes (GTP-gebundenes), aber nicht an inaktives Rac1·GDP bzw. Cdc42·GDP (Sander *et al.* 1998). Wird die CRIB-Domäne an eine Matrix gebunden, so kann parallel aktiviertes Cdc42 und Rac1 aus dem Zelllysate isoliert werden. Der selektive Nachweis jedes einzelnen Proteins erfolgt über spezifische Antikörper.

RhoGTPasen kommen in Säugetierzellen nur in relativ geringen Konzentrationen vor. Deshalb wurde für die Entwicklung der Filme aufgrund der zu erwartenden schwachen Signale das „ECL Plus detection Kit“ von Pharmacia verwendet. Die Antikörperkonzentrationen wurden im „dot blot“-Verfahren optimiert. Hierzu wurden 0,1 µg Rac1 auf Nitrozellulosemembran aufgetragen und mit verschiedenen Konzentrationen von  $\alpha$ -Rac1-Antikörper und HRP-gekoppeltem  $\alpha$ -Maus-Antikörper inkubiert. Da bei 1:15000 verdünntem  $\alpha$ -Rac1-Antikörper und 1:40000 verdünntem HRP-gekoppeltem  $\alpha$ -Maus-Antikörper das Signal bei geringem Hintergrund am stärksten war, wurde dieses Konzentrationsverhältnis zum Nachweis der zellulären Proteine verwendet (Abbildung 16).



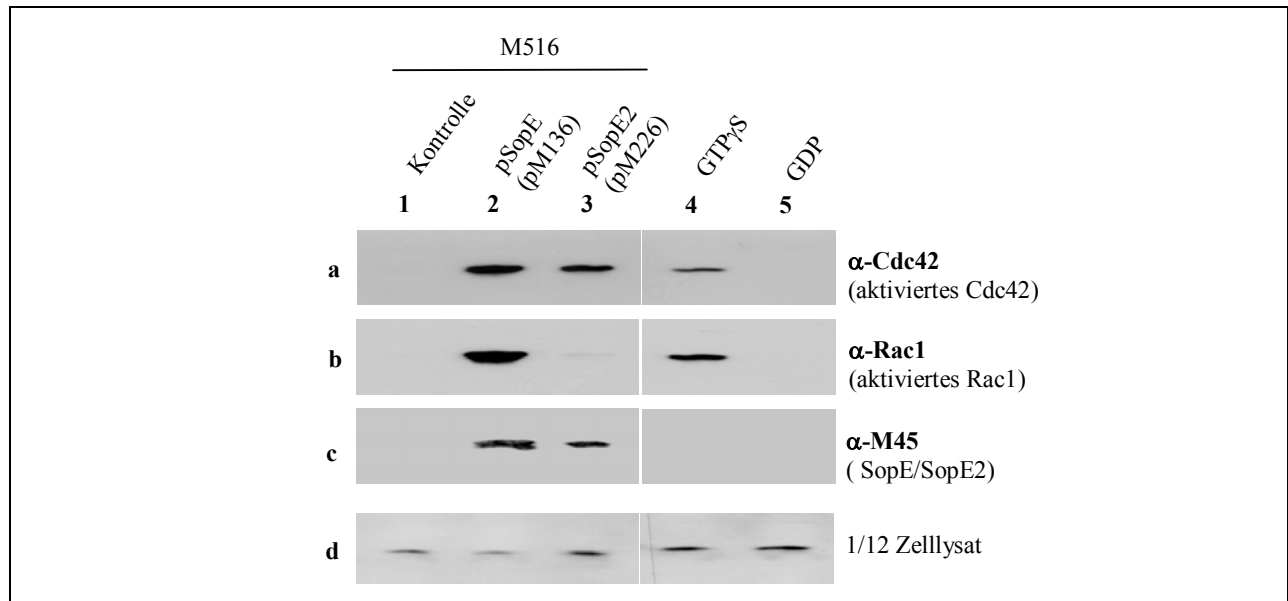
**Abbildung 16: Optimierung der Antikörperkonzentrationen für die Affinitätspräzipitation.** Im „dot blot“-Verfahren wurden je 0,1 µg aufgereinigtes Rac1 mittig auf Nitrozellulosefilter aufgebracht. Die Filter wurden mit verschiedenen Konzentrationen an erstem (Maus-α-Rac1) und zweitem Antikörper (α-Maus-HRP) in PBS mit 3 % Milchpulver und 0,1 % Tween 20 inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit dem „ECL Plus detection Kit“. Die grau unterlegten Antikörperkonzentrationen lieferten das beste Signal-Rausch-Verhältnis.

Zusätzlich wurde in einer Zeitreihe die optimale Infektionsdauer für COS7- und NIH3T3-Zellen ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl für COS7- als auch für NIH3T3-Zellen die Mengen an aktivierten Cdc42 bzw. Rac1 bei 40 min bereits deutlich sichtbar sind (Abbildung 17), obwohl das Signal bei 60 min noch stärker ist. Um die Ergebnisse aus den Affinitätspräzipitationsversuchen jedoch besser mit einem Großteil der Daten aus den zellbiologischen Experimenten vergleichen zu können, wurden hier 40 min als Infektionsdauer gewählt. Da das Signal bei COS7-Zellen wesentlich stärker war als bei NIH3T3-Zellen, wurden für die Affinitätspräzipitationsversuche COS7-Zellen verwendet.



**Abbildung 17: Zeitreihe zur Aktivierung von intrazellulärem Rac1 und Cdc42 durch SopE und SopE2.** COS7-Zellen wurden für 20, 40 oder 60 min mit M516 (pM136) oder M516 (pM226) infiziert (MOI = 50). Cdc42-GTP und Rac1-GTP wurden mit matrixgebundenem GST-PAK-CRIB affinitätspräzipitiert. Die Quantifizierung von Cdc42-GTP und Rac1-GTP erfolgte durch „Western Blot“-Analyse mit  $\alpha$ -Rac1- und  $\alpha$ -Cdc42-Antikörpern. Relative Mengen an Sop-Proteinen (oder Rac1) in den Lysaten wurden über „Western Blot“ mit spezifischen Maus- $\alpha$ -M45 oder Maus- $\alpha$ -Rac1-Antikörpern nachgewiesen. Der Versuch wurde in zwei unabhängigen Experimenten reproduziert.

Um die *in vivo*-Spezifität von SopE und SopE2 zu testen, wurden COS7-Zellen für 40 min mit dem plasmidfreien M516 oder mit M516 komplementiert mit Expressionsvektoren für das Epitop-markierte SopE<sub>1-240-M45</sub> (pM136) oder SopE2<sub>1-240-M45</sub> (pM226) infiziert. Die Zellen wurden daraufhin lysiert und aktiviertes Cdc42 und Rac1 über die matrixgekoppelte PAK-CRIB-Domäne gebunden. Wie in Abbildung 18 gezeigt, konnte M516 (pM136) effizient Cdc42 und Rac1 aktivieren, während M516 (pM226) nur Cdc42, aber nicht Rac1 aktivieren konnte. Kontrollexperimente haben gezeigt, dass die Unterschiede in der Bandenstärke nicht auf unterschiedliche Mengen Rac1 oder SopE-Protein in den Lysaten zurückzuführen waren.



**Abbildung 18: Messung der Aktivierung von zellulärem Cdc42 und Rac1 durch SopE und SopE2.** COS7-Zellen wurden für 40 min mit M516 (Spuren 1a-1d), M516 (pM136) (Spuren 2a-2d) oder M516 (pM226) (Spuren 3a-3d) infiziert (MOI = 50). Cdc42-GTP und Rac1-GTP in den COS7-Zelllysaten wurden mit matrixgebundenem GST-PAK-CRIB affinitätspräzipitiert. Die Quantifizierung von Cdc42-GTP und Rac1-GTP erfolgte durch „Western Blot“-Analyse mit spezifischen Maus- $\alpha$ -Cdc42- (Spur a) oder Maus- $\alpha$ -Rac1-Antikörpern (Spur b). Spur c: relative Mengen an Sop-Proteinen (oder Rac1, Spur d) in den Lysaten wurden über „Western Blot“ mit spezifischen Maus- $\alpha$ -M45 (Spur c) oder Maus- $\alpha$ -Rac1-Antikörpern (Spur d) nachgewiesen. Spur 4a-4d: Positivkontrolle. Cdc42 und Rac1 im Lysat wurde durch Beladung mit GTP $\gamma$ S aktiviert. Spur 5a-5d: Negativkontrolle. Cdc42 und Rac1 im Lysat wurde durch Beladung mit GDP inaktiviert. Der Versuch wurde in fünf unabhängigen Experimenten reproduziert.

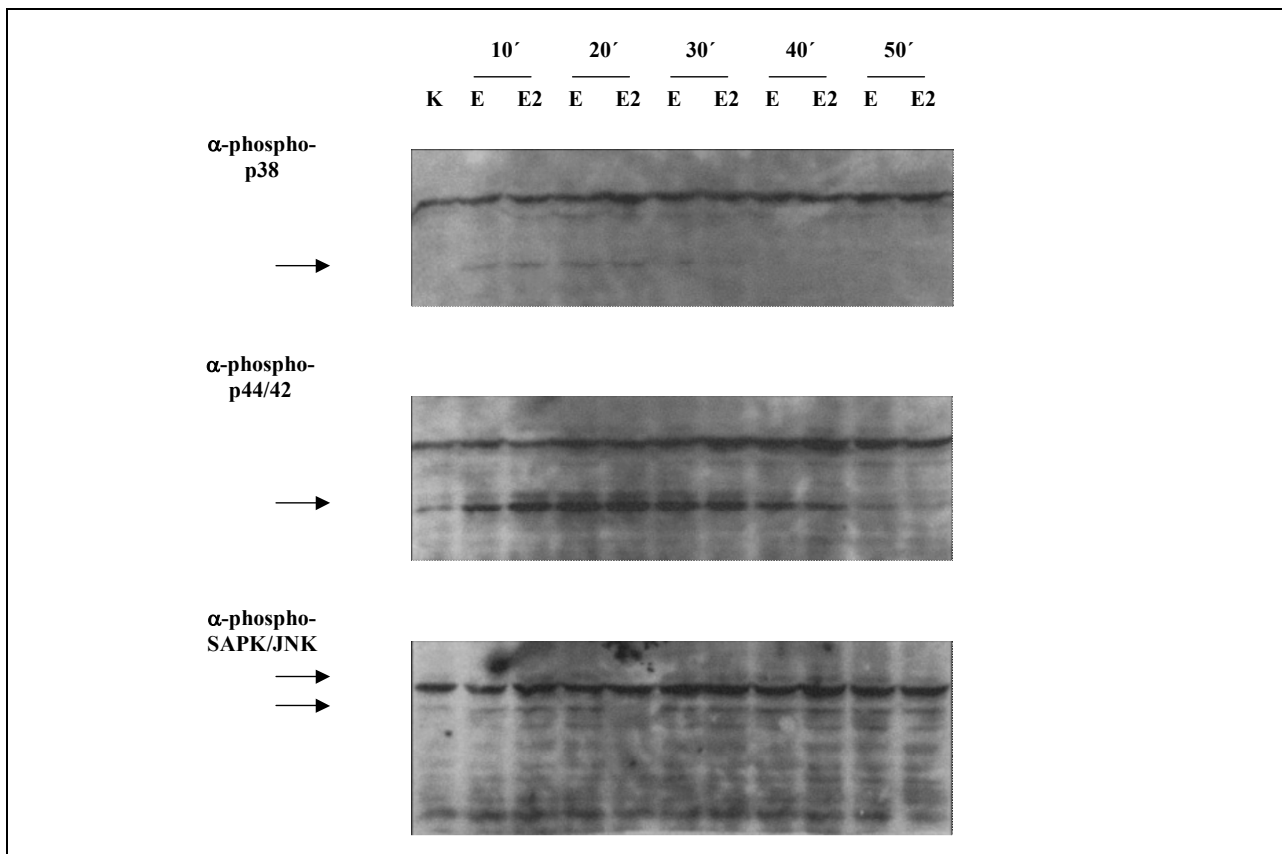
Diese Ergebnisse zeigen, übereinstimmend mit den Untersuchungen der biochemischen Versuche und den Experimenten zur Analyse der Membranausstülpungen, dass SopE2<sub>69-240</sub> *in vivo* vornehmlich Cdc42 aktiviert, während SopE<sub>78-240</sub> Cdc42 und Rac1 gleich stark aktivieren kann.

### 1.10. Aktivierung von Proteinkinasen durch SopE und SopE2

In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass *S. typhimurium* ganze Signaltransduktionskaskaden der Wirtszelle aktiviert (Hobbie *et al.*, 1997; Hardt *et al.*, 1998b). Während die Prozesse, die zur Umlagerung des Aktinzytoskeletts führen, weitgehend bekannt sind, sind viele der Signaltransduktionswege, die zur transkriptionellen Aktivierung führen, noch nicht vollständig geklärt. Im Experiment sollte untersucht werden, ob anschließend an die differenzielle Aktivierung von Cdc42 und Rac1 durch SopE und SopE2 auch eine differenzielle Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen stattfindet. Eine solche differenzielle Aktivierung

verschiedener MAP-Kinasen könnte beispielsweise die Expression verschiedener Gene proinflammatorischer Zytokine zur Folge haben.

Da die zeitliche Regulation der Signaltransduktionskaskaden nicht bekannt ist, wurden COS7-Zellen mit M516, M516 (pM136) oder M516 (pM226) für verschiedene Zeiten (10 min, 20 min, 30 min, 40 min oder 50 min) mit einer Dosis von 10 Bakterien pro Zelle infiziert. Nach Lyse der Zellen wurden jeweils 80  $\mu$ l des Zelllysats mit Lämmli-Probenpuffer versetzt, aufgeköcht, auf sechs verschiedene SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen und geblottet. Je ein „Western Blot“ wurde mit Antikörpern spezifisch für die nichtphosphorylierte Form der Kinase getestet ( $\alpha$ -p38,  $\alpha$ -p44/42-Kinase und  $\alpha$ -SAP/Jun-Kinase) (ohne Abbildung). Parallel wurde je ein Blot mit einem Antikörper spezifisch für die phosphorylierte Form der Kinase inkubiert ( $\alpha$ -phospho-p38,  $\alpha$ -phospho-p44/42-Kinase und  $\alpha$ -phospho-SAP/Jun-Kinase) (Abbildung 19).



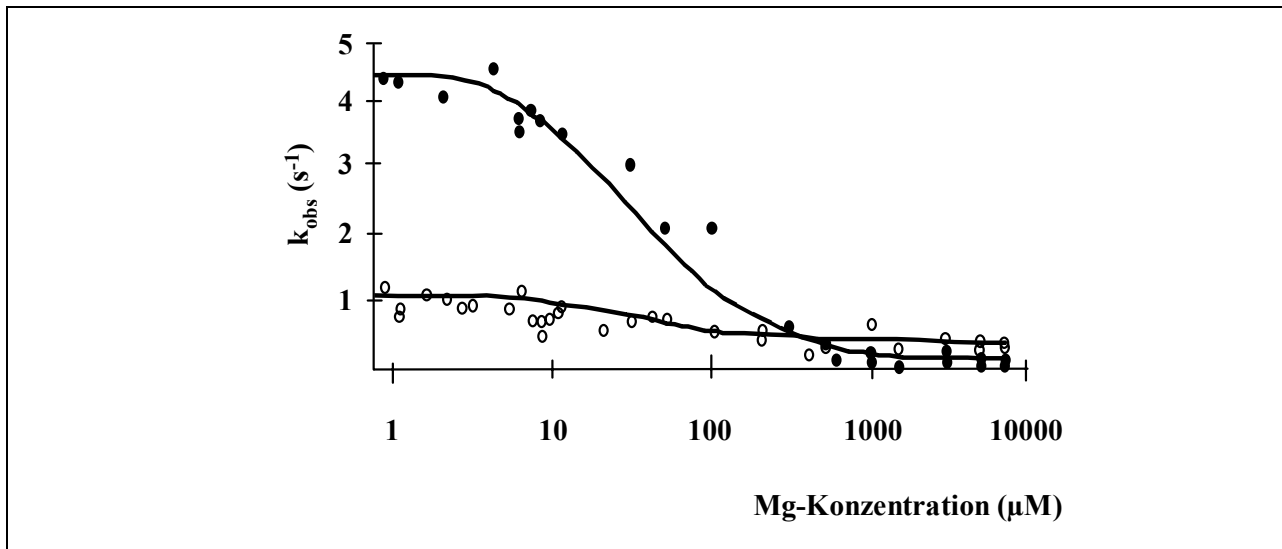
**Abbildung 19: SopE und SopE2-abhängige Aktivierung von Proteinkinasen.** COS7-Zellen wurden für 10, 20, 30, 40 oder 50 min mit M516 komplementiert mit pM136 (SopE<sub>1-240-M45</sub>) oder pM226 (SopE2<sub>1-240-M45</sub>) infiziert (MOI = 10). Die Zelllysate wurde im „Western Blot“ mit einem Antikörper gegen die phosphorylierten Formen der MAP-Kinasen getestet. K: Lysat nicht infizierter Zellen. E: Aktivierung durch M516 komplementiert mit pM136 (SopE<sub>1-240-M45</sub>), E2: M516 komplementiert mit pM226 (SopE2<sub>1-240-M45</sub>). Die Pfeile zeigen die erwartete Laufhöhe der phosphorylierten Kinasen.

Bei allen drei getesteten Kinasen war zu allen Zeitpunkten keine oder eine gleich starke Aktivierung durch M516 komplementiert mit SopE<sub>1-240-M45</sub> bzw. SopE2<sub>1-240-M45</sub> (pM136 oder pM226) zu beobachten. Eine differenzielle Spezifität von SopE und SopE2 gegenüber Cdc42 und Rac1 führt somit zumindest unter den gewählten Bedingungen nicht zu einer differenziellen Aktivierung der Signaltransduktion auf der Ebene der p38-Kinase, der p44/42-Kinase und der SAP/Jun-Kinase. Da alle drei Kinasen durch SopE und SopE2 gleich stark induziert werden, ist hier eventuell die Aktivierung von Cdc42 ausreichend, so dass eine zusätzliche Aktivierung von Rac1 (nur durch SopE) keine Rolle spielt. Es ist auch denkbar, dass diese gleichmäßige Aktivierung aller drei Kinasen auf andere, SopE- und SopE2-unabhängige Ursachen wie beispielsweise die Aktivierung durch Lipopolysaccharid zurückzuführen sind. Auch die qualitative Bestimmung verschiedenener mRNA-Level mittels RT (Reverse Transkriptase)-PCR ergab keine Hinweise auf eine differenzielle Transkriptionsaktivierung durch SopE bzw. SopE2. Es ist allerdings unklar, ob dies auf die Auswahl der in den Vorversuchen analysierten mRNAs zurückzuführen ist. Zur Klärung dieser Frage sollen künftig globale Genexpressionsanalysen auf Basis der Maus-cDNA-Chips von Affimetrix durchgeführt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen zur differenziellen Regulation der Genexpression von Wirtszellen an dieser Stelle abgebrochen.

### **1.11. Einfluss der Magnesiumkonzentration auf die Substratspezifität**

Da der Aktivierungszustand der RhoGTPasen von ihrem Beladungszustand (GDP- oder GTP-Form) abhängig ist, galt eine Überlegung der Frage, ob auch externe Faktoren an der Regulation des Beladungszustandes beteiligt sind. Da Magnesium das Nukleotid in der Bindungstasche der RhoGTPase stabilisiert und daher ein essentieller Kofaktor ist, wurde der Einfluss der Magnesiumkonzentration auf die GDP-Freisetzung durch SopE und SopE2 untersucht.

Im Rahmen von „multiple turnover“-Versuchen wurde der Nukleotidaustausch an 500  $\mu\text{M}$  mantGDP·Rac1 durch 5 nM SopE bzw. SopE2 in der Gegenwart von 1 mM GDP in Puffer S bei steigenden Magnesiumkonzentrationen von 0,5-7000  $\mu\text{M}$  verfolgt. Wie bereits vorher beschrieben wurden aus den einzelnen Kurven mit Hilfe von SigmaPlot  $k_{obs}$ -Werte ermittelt. Diese wurden anschließend gegen die Magnesiumkonzentration aufgetragen (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Magnesiumabhängigkeit des SopE/E2-vermittelten Nukleotidaustauschs an mantGDP-Rac1.**

In „multiple turnover“-Versuchen wurde der Nukleotidaustausch an 500  $\mu\text{M}$  mantGDP-Rac1 durch 5 nM SopE bzw. SopE2 in der Gegenwart von 1 mM GDP bei Magnesiumkonzentrationen von 0,5-10000  $\mu\text{M}$  verfolgt. Mithilfe von SigmaPlot wurden die zugehörigen  $k_{obs}$ -Werte ermittelt und gegen die Magnesiumkonzentration aufgetragen. o:  $k_{obs}$ -Werte für SopE; •:  $k_{obs}$ -Werte für SopE2.

Es zeigte sich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit von SopE2 wesentlich stärker von der Magnesiumkonzentration abhängig ist als von SopE. Beide Kurven zeigen einen sigmoidalen Verlauf. Anders als bei SopE ist der katalytische Schritt bei SopE2 jedoch bei niedrigen  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen wesentlich effektiver als bei hohen  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen. Beide Kurven kreuzen sich im Bereich von 500  $\mu\text{M}$  Magnesium, dies entspricht etwa den Bedingungen in der Zelle (500 bis 1000  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ ). Jenseits dieser  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration ist SopE ein effektiverer GEF für Rac1 als SopE2. Die unterschiedliche Substratspezifität von SopE und SopE2 für Rac1 ist damit keine feste Größe, ein „Spezifitätswechsel“ kann allein durch die Änderung der Magnesiumkonzentration bewirkt werden.

## 2. Die Kristallstruktur des SopE·Cdc42-Komplexes

Mit den bereits beschriebenen biochemischen Versuchen ist es möglich, die Bindungseigenschaften zwischen GEF und RhoGTPase zu charakterisieren, ohne die Struktur des Komplexes zu kennen. Da bei einer Datenbanksuche keine anderen zu SopE oder SopE2 homologen Proteine gefunden werden konnten, ist es jedoch nicht möglich, anhand bereits bekannter Strukturen Parallelen hinsichtlich der molekularen Interaktion zwischen GEF und RhoGTPase zu ziehen oder das katalytische Zentrum zu identifizieren. Durch die Ermittlung der



Röntgenstruktur des SopE-Cdc42-Komplexes könnten weiterführende Betrachtungen angestellt werden, die über die rein deskriptiven biochemischen Ansätze hinausgehen.

Die Kristallisation und die Berechnung der Struktur erfolgten in Zusammenarbeit mit Gretel Buchwald in der Arbeitsgruppe von A. Wittinghofer am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund.

### **2.1. Aufreinigung von N-terminal verkürztem SopE**

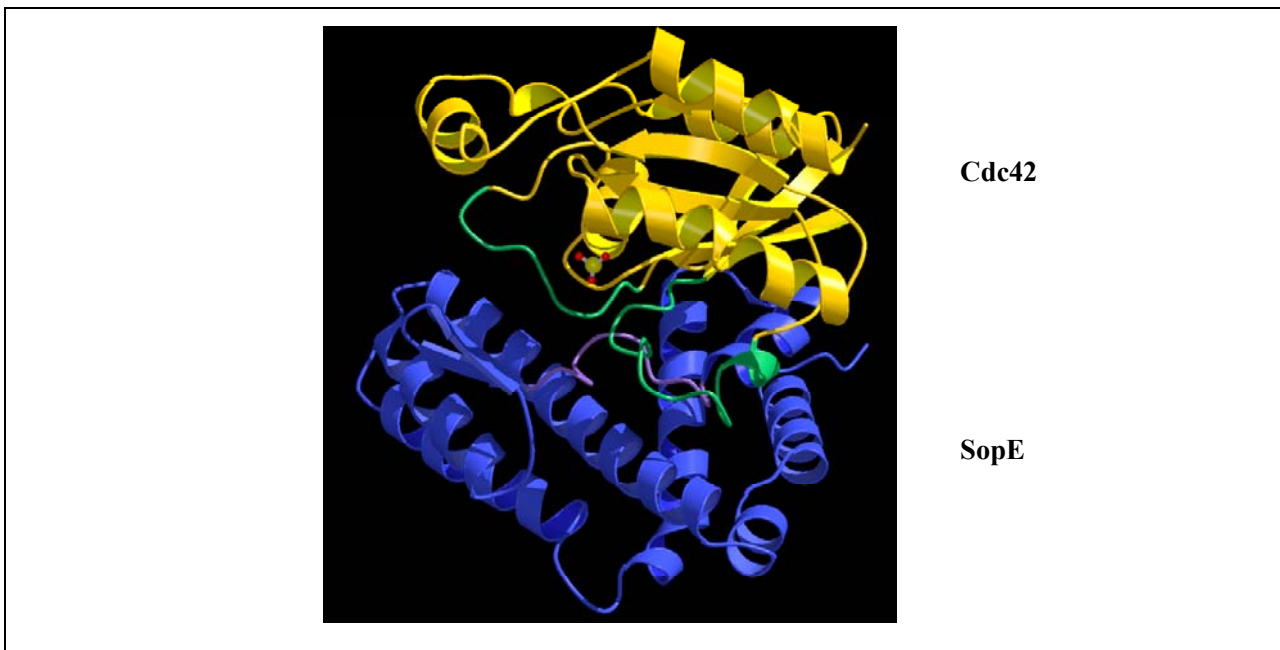
SopE<sub>78-240</sub> für die Röntgenkristallographie wurde in *E. coli* BL21(DE3) unter Verwendung des Expressionsvektors pM164 als rekombinantes GST-Fusionsprotein aufgereinigt. Das von diesem Vektor aufgereinigte SopE trägt am N-Terminus gegenüber der bisher verwendeten SopE<sub>78-240</sub> (17 Aminosäuren flexible Aminosäuresequenz) nur noch einen Glycin- sowie einen Serinrest. Dies sollte eventuell störende Einflüsse bei der anschließenden Kristallisation verringern. Die biologische Aktivität der SopE<sub>78-240</sub>-Präparation wurde in einem Nukleotidaustauschexperiment an Cdc42 überprüft. Die Aufreinigung des Komplexpartners Cdc42<sub>1-178</sub> und die Herstellung des SopE-Cdc42-Komplexes erfolgte in Dortmund.

### **2.2. Kristallisation des Komplexes und seine Struktur**

Zur Kristallisation wurde der nukleotidfreie SopE-Cdc42-Komplex bei 4 °C unter einem zweifachen Überschuss an Cdc42 gegenüber SopE gebildet und durch Größenausschlusschromatografie auf einer Superdex 75-Gelfiltrationssäule abgetrennt. Die Kristallisation erfolgte durch Gretel Buchwald mit der „hanging drop“-Methode bei Raumtemperatur in 1,9 M Ammoniumsulfat, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6 und 2 % PEG. Die dadurch erhaltenen Mikrokristalle wurden in Tropfen, die zusätzlich 0,05 M Betain enthielten, vereinzelt und dienten als Keim für größere, analysierbare Kristalle. Die Struktur des Komplexes wurde von K. Scheffzek (EMBL, Heidelberg) und Gretel Buchwald (MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund) ermittelt.

SopE stellt sich als vorwiegend  $\alpha$ -helikales Protein aus sechs Helices dar, die in zwei Bündeln zu je drei Helices angeordnet sind (Abbildung 21). Beide Bündel schließen einen Winkel ein, so dass eine V-förmige Tasche gebildet wird. Daneben beinhaltet die Struktur ein kurzes  $\beta$ -Faltblatt, auf das mit den AS 165-172 ein Peptidsegment folgt, das die beiden Seiten des „V“ miteinander verbindet. Der Vergleich der dreidimensionalen Struktur mit anderen bereits

kristallisierten GEFs lieferte wie auch schon die Aminosäuresequenz keine Ähnlichkeit mit anderen bakteriellen oder eukaryontischen Proteinen.



**Abbildung 21: Der SopE-Cdc42-Komplex.** Bänderdarstellung des Komplexes aus SopE (blau) und Cdc42 (gelb). Die „switch“-Regionen sind grün eingezeichnet, die katalytische Schleife, die sich zwischen „switch“ I und „switch“ II schiebt, ist violett hervorgehoben (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von G. Buchwald und K. Scheffzek)

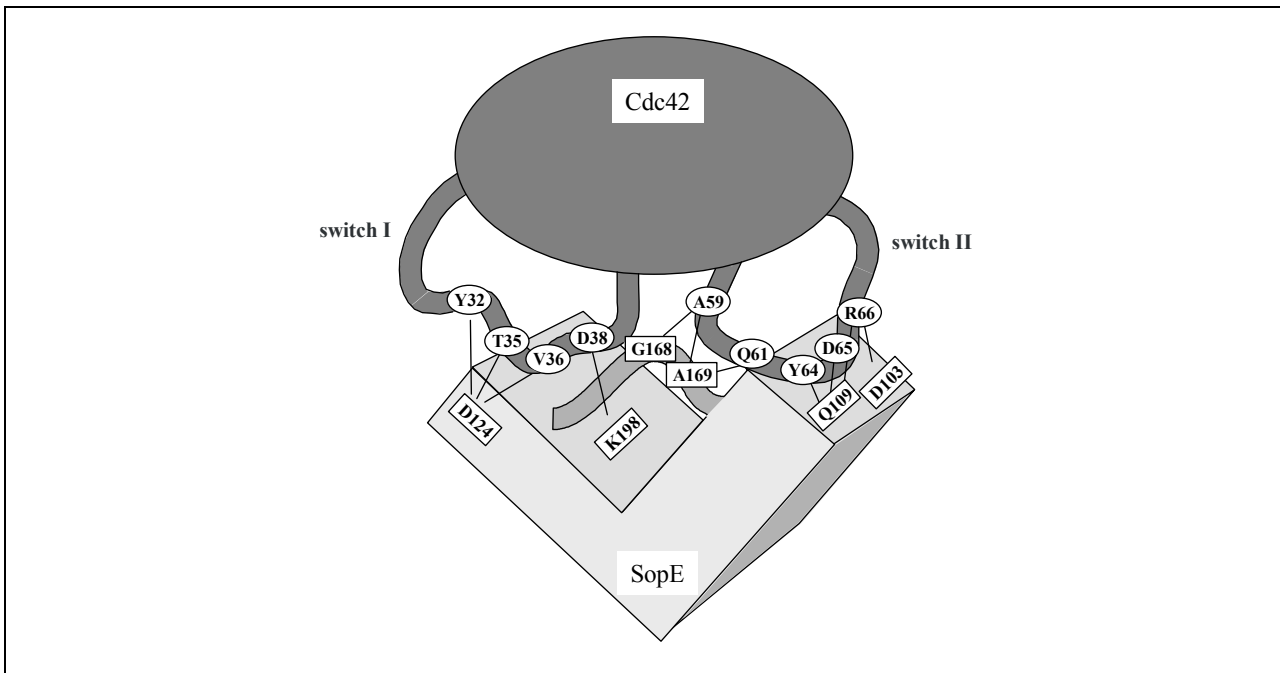
Der Kontakt zu Cdc42 findet hauptsächlich über die  $\alpha 2$ - und die  $\alpha 4$ -Helices von SopE statt, die mit der „switch“ I- (Aminosäure 26-45) und „switch“ II-Region (Aminosäure 59-74) von Cdc42 interagieren. Der enge Kontakt von SopE mit Cdc42 ist typisch für ein regulatorisches Protein. Die Situation ähnelt der in anderen bereits untersuchten Komplexen zwischen regulatorischen Proteinen und RhoGTPasen, wie beispielsweise dem Rac1-RhoGDI-, dem Rho-RhoGAP- und dem Cdc42-RhoGDI-Komplex (Rittinger *et al.*, 1997; Hoffman *et al.*, 2000; Scheffzek *et al.*, 2000). Die Nukleotidbindungstasche ist frei zugänglich und wird nicht von einem Teil des GEF blockiert. Besonders auffällig in der SopE-Struktur ist ein kleines Peptidsegment ( $^{166}\text{GAGA}^{169}$ ), das innerhalb einer Schleife am C-terminalen Ende des  $\beta$ -Faltblatts lokalisiert ist. Diese Kette schiebt sich zwischen die „switch“ I- und „switch“ II-Region in Cdc42 und könnte so für die sterische Umlagerung verantwortlich sein, die den Nukleotidbindungsstatus der RhoGTPase reguliert. Schon bei einer ersten Betrachtung der Struktur ist zu erkennen, dass SopE verglichen mit zellulären GEFs ein strukturell völlig anders gestaltetes Enzym darstellt, obwohl der

katalytische Mechanismus stark dem eukaryontischer GEFs ähnelt (Cherfils und Chardin, 1999; Worthylake *et al.*, 2000; Buchwald *et al.*, 2002).

Die Cdc42-Struktur im Komplex hingegen ähnelt der Struktur, wie sie bereits für andere Rho-Proteine in Kristallen mit eukaryontischen GEFs beschrieben wurde. Strukturell ist Cdc42 durch das klassische 20 kDa große G-Domänen-Motiv aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern charakterisiert, das in fast allen GTP-bindenden Proteinen zu finden ist (Vetter und Wittinghofer, 2001). Bei der Bindung durch SopE sind sterische Umlagerungen in Cdc42 vor allem in den „switch“ I- und „switch“ II-Regionen zu finden. Diese Bereiche sind in Ras-homologen Proteinen für die Nukleotidbindung verantwortlich, sie verändern ihre Orientierung abhängig vom Beladungszustand mit GDP oder GTP.

### **2.3. Gerichtete Mutagenese im SopE·Cdc42-Komplex**

Bei der Betrachtung des Komplexes stellt sich die Frage, welche Aminosäuren von SopE für die Interaktion und katalytische Funktionalität des Komplexes wirklich von Bedeutung sind. In Zusammenarbeit mit K. Scheffzek (EMBL, Heidelberg) wurden die entsprechenden Reste aus dem 3D-Modell des SopE·Cdc42 Komplexes für die weitere Analyse ausgewählt. Von primärem Interesse waren dabei Aminosäuren in SopE, deren Seitenketten nicht mehr als 3 Å von Seitenketten in Cdc42 entfernt waren. Diese Aminosäurereste haben einen so engen Kontakt im kristallisierten Komplex, dass sie sich auch in wässriger Lösung in unmittelbarer Nachbarschaft befinden und somit für die Interaktion von SopE und Cdc42 verantwortlich sein sollten. Da die Lage des katalytischen Zentrums sowie der Nukleotidbindungstasche von Cdc42 bekannt sind, konnte man sich auf Aminosäuren von SopE beschränken, die in direkter Nähe dieser funktionellen Einheiten liegen. Folgende Aminosäuren wurden deshalb zur gerichteten Mutagenese ausgewählt: D103, Q109, D124, <sup>166</sup>GAGA<sup>169</sup>-Schleife (G168, A169) und K198 (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Schematische Darstellung des SopE-Cdc42-Komplexes.** Gezeigt ist die Lage der für die Mutagenese ausgewählten SopE-Aminosäurereste sowie Interaktionspartner in Cdc42, die in den „switch“ I und „switch“ II-Regionen liegen (nach Buchwald *et al.*, 2002). eckig: Reste in SopE, oval: Reste in Cdc42.

Mit dem „QuikChange site directed mutagenesis Kit“ (Stratagene, Niederlande) wurden in einer Plasmid-Vollängen-PCR an den genannten fünf Positionen von SopE gezielt Mutationen eingeführt, die eventuell die Bindung von SopE an Cdc42 oder die katalytische Aktivität von SopE beeinflussen könnten.

Zur Herstellung von Komplementationsvektoren mit mutiertem *sopE* diente pM136 als Ausgangsvektor, der für eine *sopE*<sub>1-240</sub>-M45-Fusion kodiert (pBAD-Hintergrund). Für die Einführung der Mutationen wurden Oligonukleotide mit entsprechenden Nukleotid austauschen ausgewählt (siehe Tabelle 7). Die Amplifikation der mutierten Vektoren erfolgte mittels PCR nach folgendem Protokoll: Denaturierungsschritt von 30 s bei 94 °C, 12-18 Zyklen Denaturierung bei 94 °C für 30 s, Hybridisierung bei 55 °C für 1 min und Elongation bei 68 °C für 13 min. Das methylierte Ausgangsplasmid wurde gezielt in einem *DpnI*-Verdau abgebaut. Die erhaltenen mutierten Plasmide wurden als pM421-pM432 sowie pM437 bezeichnet.

Um diese *sopE*-Konstrukte auch in Infektionsversuchen analysieren zu können, wurden entsprechende Vektoren im Hintergrund des „low copy“ Vektors pACYC184 hergestellt. Diese werden für *sopE*-Komplementationsstudien (z.B. in Zellkulturinvasionsversuchen) in der

Arbeitsgruppe alternativ zum pBAD-Hintergrund verwendet. Dazu wurden die *Eco47III/SaII*-Fragmente der entsprechenden pM136-Derivate (mit dem mutierten *sopE*<sub>1-240</sub>- M45) in die *EcoRV/SaII* -Schnittstellen von pACYC184 kloniert. Dabei wurden die Plasmide pM461-pM473 erhalten.

Für die Konstruktion von Überexpressionsvektoren für SopE<sub>78-240</sub>-Varianten wurde die Mutagenese wie oben beschrieben im Expressionsvektor pM164 durchgeführt; dies lieferte die Plasmide pM441-pM453. In Tabelle 17 sind die Positionen der in *sopE* eingeführten Mutationen, interagierende Aminosäuren von Cdc42 sowie mögliche Effekte auf die SopE-Cdc42-Interaktion aufgeführt.

**Tabelle 17: Überblick über die SopE-Variationen.**

Position in SopE	interagiert mit ... aus Cdc42	Mutation zu...	Mögliche Auswirkung auf die Interaktion	Komplementationsvektoren/Expressionsvektor
<b>D103</b>	R66	A	Verlust der spezifischen Interaktion	pM426/pM466/pM446
		E	sterische Effekte	pM425/pM465/pM445
<b>Q109</b>	Y64, D65, R66	A	Verlust der spezifischen Interaktion	pM422/pM462/pM442
		N	sterische Effekte	pM421/pM461/pM441
<b>D124</b>	Y32, T35, V36	A	Verlust der spezifischen Interaktion	pM428/pM468/pM448
		E	sterische Effekte	pM427/pM467/pM447
<b>G168</b>	„switch“ I und II	A	Einschränkung der Flexibilität der <sup>166</sup> GAGA <sup>169</sup> -Schleife	pM429/pM469/pM449
		V	Einschränkung der Flexibilität der <sup>166</sup> GAGA <sup>169</sup> -Schleife	pM430/pM470/pM450
		Deletion	Einschränkung der Flexibilität der <sup>166</sup> GAGA <sup>169</sup> -Schleife	pM424/pM464/pM444
<b>A169</b>		Deletion zusammen mit G168	Einschränkung der Flexibilität der <sup>166</sup> GAGA <sup>169</sup> -Schleife	pM437/pM473/pM453
<b>K198</b>	D38	A	Verlust der spezifischen Interaktion	pM423/pM463/pM443
		R	evtl. verstärkte Interaktion	pM431/pM471/pM451
		E	Zerstörung der Bindung wegen negativer Ladung	pM432/pM472/pM452

In den folgenden Experimenten wurden zunächst die Auswirkungen dieser Mutationen in Zellkulturinvasionsexperimenten untersucht. Anschließend wurden SopE-Varianten auf biochemischer Ebene analysiert.

## **2.4. Zellbiologische Charakterisierung der Proteinvarianten**

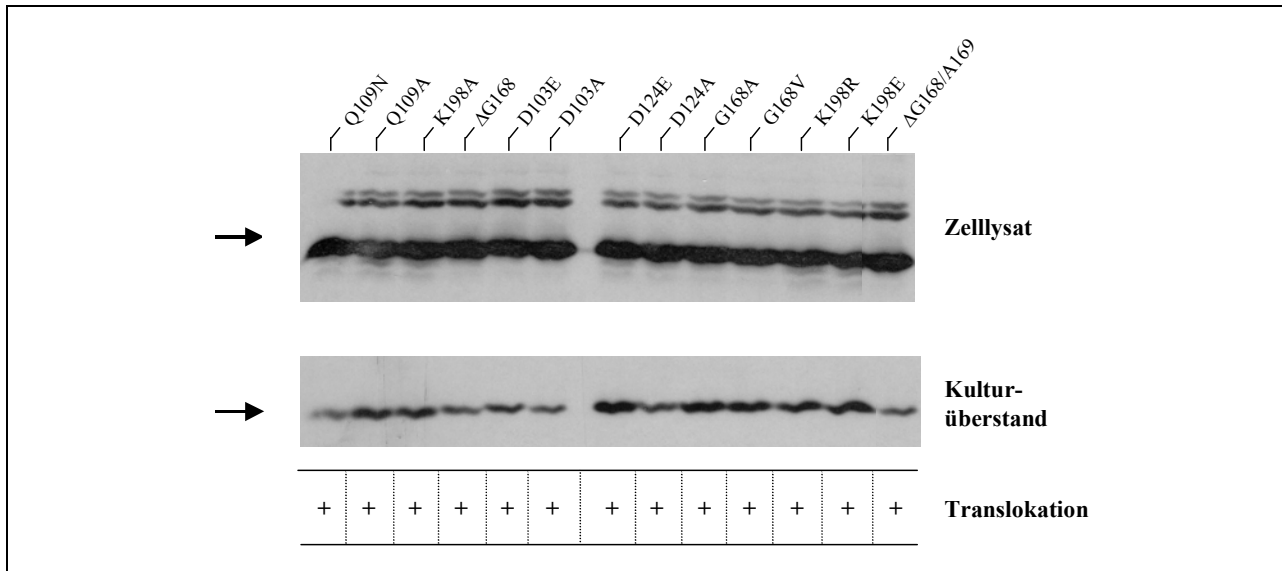
### **2.4.1. Invasivität**

Die Komplementationskompetenz der SopE-Varianten wurde in Invasionsexperimenten untersucht, die wie bereits beschrieben durchgeführt wurden. Da die bisherigen Versuche im Rahmen dieser Arbeit im Hintergrund des pBAD24-Vektors durchgeführt wurden, wurde auch hier zunächst dieser Vektorhintergrund verwendet. Mit Wildtyp-*sopE* konnte in diesem Vektorhintergrund für die *S. typhimurium*-Mutante M516 die Invasivität nur auf 16 % des Wildtyp-Niveaus erhöht werden (Daten nicht gezeigt). Auf diese Weise wäre somit das Messfenster für die Detektion negativer Effekte der Punktmutationen relativ gering. Deshalb wurden die Mutanten in pACYC184 umklontiert und die Komplementationsversuche mit diesen Vektoren wiederholt. Die Unterschiede in der Invasivität zwischen pBAD- und pACYC-komplementiertem M516 beruhen wahrscheinlich auf der unterschiedlichen Kopienzahl der Plasmide und sind auf den dadurch bedingten Gen-Dosis-Effekt zurückzuführen.

COS7-Gewebekulturzellen wurden für 40 min mit dem Stamm M516 (*sopE sopE2 sopB*) infiziert, der entweder WT-*sopE* (pM438) oder eines der mutierten *sopE*-Plasmide (pM461-pM473) zur Komplementation des Invasionsdefekts trug (Abbildung 23).



Rolle im Invasionsprozess zu spielen. Eine Ausnahme könnte hier allerdings die Mutation D124A bilden. Eventuell ist die negative Ladung des D124 wichtig für die effiziente Interaktion mit Cdc42, da durch die Mutation zu A eine vierfache Reduktion der Invasivität zu beobachten ist.



**Abbildung 24: Expression, Sekretion und Translokation der Proteinvarianten.** Über Immunoblots (Material und Methoden) von Ganzzelllysate und Kulturüberstand mit  $\alpha$ -M45-Antikörper wurde zunächst die Expression der mutierten Gene und die Sekretion der Proteinvarianten in den Kulturüberstand nachgewiesen, bevor über Immunfluoreszenzfärbung (Material und Methoden) mit  $\alpha$ -M45-Antikörper die Translokation der Proteinvarianten in COS7-Zellen gezeigt wurde. Die Pfeile markieren die Laufhöhe der in der Zelle oder im Kulturüberstand nachgewiesenen epitopmarkierten Proteinvarianten. + : transloziertes Protein in der Wirtszelle deutlich sichtbar.

Im „Western blot“ wurde abgesichert, dass die Gene aller SopE-Varianten in M516 exprimiert und die Proteine in den Kulturüberstand sekretiert werden. Dazu wurde M516 komplementiert mit pM461-pM473 unter sekretionsfördernden Bedingungen angezogen. Anschließend wurden Ganzzelllysate und Kulturüberstand mit Probenpuffer versetzt, aufgeköcht und auf ein zwölfprozentiges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die epitopmarkierten Proteinvarianten wurden im „Western Blot“ mit  $\alpha$ -M45-Antikörper nachgewiesen. Auch die gleichmäßige Translokation aller Proteinvarianten in COS7-Zellen konnte über die Anfärbung des M45-Anteils in Immunfluoreszenzexperimenten nachgewiesen werden. COS7-Zellen wurden wie in Material und Methoden beschrieben infiziert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden die epitopmarkierten Proteinvarianten wiederum über eine Färbung mit  $\alpha$ -M45-Antikörper sichtbar gemacht. Alle Proteinvarianten werden unter den gewählten Bedingungen exprimiert, sekretiert und in Wirtszellen transloziert (Abbildung 24).



### 2.4.2. Morphologie der Membranumlagerungen

Nach der bisherigen Kenntnis wird die Invasion von SopE-komplementiertem M516 in die Wirtszellen durch „membrane ruffling“ vermittelt. Deshalb wurde mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie die Gestalt der Zytoskelettlagerungen in Abhängigkeit der Variationen in SopE durch Anfärbung des eukaryontischen Aktins nach der Infektion untersucht und mit der Invasionseffizienz verglichen (siehe auch Tabelle 21).

COS7-Zellen wurden für 12 bzw. 40 min mit einer Dosis von zehn Bakterien pro Wirtszelle infiziert. Als Inokulum dienten M516 sowie M516 (pM438) und pM461-pM473 (SopE-Varianten). Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin und Antikörpern gegen *Salmonella* gefärbt (Tabelle 12; ohne Abbildung).

- Die Zytoskelettlagerungen sind bei Mutationen in **D103** und **K198** deutlich ausgeprägt und nicht vom WT-Ruffling zu unterscheiden. Mutationen dieser Aminosäurepositionen hatten auch nur geringe Auswirkungen auf die Invasionseffizienz (Abbildung 23).
- Bei einer Mutation in **D124** sind ebenfalls deutliche Zytoskelettlagerungen zu beobachten, die allerdings etwas schwächer ausfallen als beim Wildtyp. Auch hier korreliert die Ausbildung von Membranumlagerungen mit der Fähigkeit zur Invasion.
- Bei Mutationen in **Q109** und der <sup>166</sup>GAGA<sup>169</sup>-Schleife kann in den Färbungen keine Reorganisation des Aktinzytoskeletts mehr festgestellt werden. Mutationen in der <sup>166</sup>GAGA<sup>169</sup>-Schleife verhindern demnach sowohl die Ausbildung von Membranumlagerungen als auch die Invasion der Bakterien. Im Gegensatz dazu kommt es bei Mutationen in Q109 zwar zu keinen erkennbaren Aktinumlagerungen, wohl aber zu einer signifikanten Invasivität. Dieses Phänomen kann derzeit nicht erklärt werden und wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

### 2.5. Biochemische Charakterisierung der Proteinvarianten

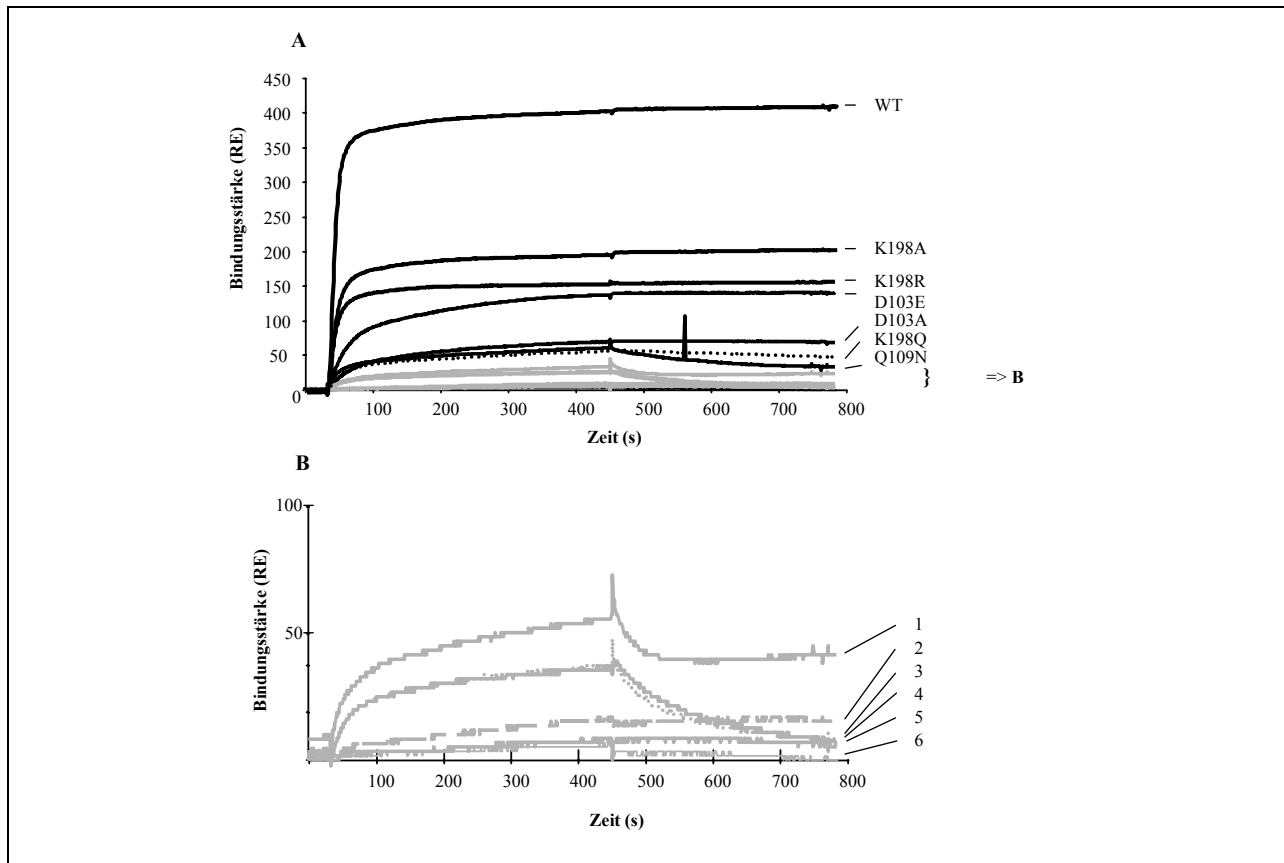
Da sich einige der SopE-Varianten in ihren zellbiologischen Eigenschaften deutlich von Wildtyp-SopE unterscheiden, sollten in biochemischen Versuchen die Auswirkungen der Mutationen auf molekularer Ebene im Zusammenspiel mit Cdc42 analysiert werden.

### 2.5.1. Aufreinigung der Proteinvarianten

Ausgehend von den Plasmiden pM461-pM473, die für variantes SopE kodieren, wurden die Proteinvarianten als GST-Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) überproduziert. Da die eingeführten Mutationen unter Umständen die Aufreinigung behindern könnten, wurden die Expressionsbedingungen gegenüber dem bisher verwendeten Protokoll verändert: induziert wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,2 mit nur 50 µM IPTG, anschließend wurden die Zellen bei 18 °C über Nacht kultiviert und dann wie bereits für WT-SopE beschrieben aufgereinigt. Bis auf die Proteinvariante ΔG168/A169, die wiederholt sowohl bei der Thrombinspaltung als auch bei der Glutathion-Elution vollständig denaturierte, konnten alle Proteine aufgereinigt werden.

### 2.5.2. Bindungsvermögen für Cdc42

Der erste Schritt der Interaktion von SopE und Cdc42 ist die Bindung von SopE an Cdc42. Daher stellte sich die Frage, ob sich die in SopE eingeführten Mutationen auf die Fähigkeit auswirken, Cdc42 zu binden. Dies wurde mithilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Spektrometrie überprüft. Dazu wurden bei einer Flussrate von 15 µl/min zunächst 100 µl 100 µg/ml GST-Cdc42 an den vorbereiteten Sensorchip gekoppelt. Anschließend wurden nacheinander die SopE-Varianten in einer Konzentration von 600 nM injiziert (Abbildung 25). Zwischen den Messungen wurde der Chip durch die aufeinanderfolgende Injektion von 20 µl 0,05 % SDS und 20 µl 10 mM Glycin pH 2,2 bei einer Flussrate von 15 µl/min regeneriert.



**Abbildung 25: Bindungsfähigkeit der SopE-Proteinvarianten für GST-Cdc42.** Die Proteinvarianten wurden in einer Konzentration von 600 nM an GST-Cdc42 gebunden. Die Kurven wurden um den Betrag der unspezifischen Bindung korrigiert und mit der Bindung von WT-SopE an GST-Cdc42 verglichen. **A.** Bindungskurven aller Proteinvarianten. Grau markiert sind die Kurven, die in B nochmals in anderem Maßstab abgebildet sind. **B.** Kurven mit niedriger Bindungshöhe. 1 = Q109A, 2 =  $\Delta$ G168, 3 = D124A, 4 = D124E, 5 = G168V, 6 = G168A.

Die Bindungsfähigkeit einer Variante wurde aus der Bindungskurve (in Resonanzeinheiten) ermittelt und zur Bindungsfähigkeit des WT-SopE an GST-Cdc42 ins Verhältnis gesetzt.

Die maximale theoretische Bindungshöhe ( $B_{\max}$ ) des zweiten Reaktionspartners ermittelt sich gemäß

$$B_{\max} = RE1 \times S \times MV \frac{BP1}{BP2}$$

wobei RE1 die Bindungshöhe des ersten Bindungspartners (GST-Cdc42) in relativen Resonanzeinheiten, S die Stöchiometrie des Komplexes, MV das Massenverhältnis, BP1 das Molekulargewicht des ersten Bindungspartners (in diesem Fall GST-Cdc42, 47200 Da) und BP2

das Molekulargewicht des zweiten Bindungspartners (in diesem Fall SopE, 18040 Da) bezeichnet. Für den Komplex aus SopE und Cdc42 ergibt sich

$$B_{\max} = RE1 \times 1 \times 0,38$$

Damit eine unspezifische Bindung ausgeschlossen werden kann, darf die beobachtete Bindungshöhe des zweiten Reaktionspartners die mithilfe dieser Formel berechnete nicht überschreiten. Die maximalen Werte für die gemessene und berechnete Bindung der SopE-Varianten an Cdc42 sowie die Bindung der Varianten relativ zu der von WT-SopE an Cdc42 ist in Tabelle 18 aufgeführt.

Bei der Auswertung zeigte sich, dass alle Varianten bis auf K198A und K198R eine deutlich verminderte Bindungsfähigkeit für Cdc42 bedingen (siehe Tabelle 18).

**Tabelle 18: Relative Bindungsfähigkeit der SopE-Varianten für Cdc42.** Bei einer Flussrate von 15  $\mu$ l/min wurden die SopE-Varianten in einer Konzentration von 600 nM an GST-Cdc42 gekoppelt. Zwischen den Messungen wurde der Chip durch die aufeinanderfolgende Injektion von 20  $\mu$ l 0,05 % SDS und 20  $\mu$ l 10 mM Glycin pH 2,2 regeneriert. Aus der Höhe der Bindung konnte die Bindungsfähigkeit der SopE-Varianten für Cdc42 ermittelt werden. \*): die Proteinvarianten mit einer Mutation in D103 und der <sup>166</sup>GAGA<sup>169</sup>-Schleife erwiesen sich in der Folge als instabil und in der CD-Spektroskopie auffällig gefaltet. Obwohl in einigen Fällen dennoch eine Bindung an Cdc42 möglich ist, sollten die Aussagen nur mit Einschränkungen gültig sein.  $B_{\max}$ : maximale theoretische Bindungshöhe des zweiten Reaktionspartners, RE1: Bindungshöhe des ersten Reaktionspartners.

Mutation	RE1	$B_{\max} = RE1 \times 1 \times 0,38$ [RE]	Bindungshöhe [RE]	relative Bindung (Bindungshöhe/ $B_{\max}$ [%])	Bindung in % der WT-Bindung (relative Bindung Variante/relative Bindung WT)
WT-SopE	1275	485	395	81	100
D103A	610	232	61	26	32*)
D103E	630	239	114	48	59*)
Q109A	719	273	6	2,2	2,7
Q109N	774	294	37	13	16
D124A	578	220	0	0	0
D124E	593	225	6	2,6	3,2
$\Delta$ G168	657	250	0	0	0*)
G168A	563	214	0	0	0*)
G168V	550	209	13	6	7*)
K198A	630	239	179	75	93
K198R	539	205	149	73	90
K198E	528	201	43	21	26

Mutationen der Aminosäuren **D103 und K198** haben dabei den geringsten Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von SopE an Cdc42 (Tabelle 18, siehe auch Tabelle 21).

- Bei einer Mutation von D103 schwankt die Bindungsfähigkeit je nach Mutation zwischen 32 und 59 % relativ zum WT. Hier kommt es erwartungsgemäß zu einer abgeschwächten Bindung von SopE an Cdc42.
- SopE mit einer Mutation in K198 bindet mit Effizienzen zwischen 26 und 93 % an Cdc42, verglichen mit dem Wildtyp. Hier haben weder eine Eliminierung der funktionellen Gruppe (K198A) noch eine Verlängerung zu Arginin einen signifikanten Einfluss auf die Bindungsfähigkeit.

Deutlich in ihrer Bindungsfähigkeit reduziert sind SopE-Proteine mit Mutationen in **Q109** (2,7-16 % der Wildtypbindung). Trotz einer deutlichen Reduktion können diese Proteinvarianten aber noch an Cdc42 binden (Tabelle 18).

Die stärksten Auswirkungen auf die Fähigkeit von SopE, an Cdc42 zu binden, zeigen Mutationen in **D124** (0-3,2 % der Wildtypbindung) und in der <sup>166</sup>GAGA<sup>169</sup>-Schleife (0-7 % der Wildtypbindung) (Tabelle 18).

- Die Fähigkeit einer D124-Variante, Cdc42 zu binden, hängt von der Art der eingeführten Mutation ab. Bei einer Mutation von D124 zu E kommt es zu einer stark reduzierten Bindung an Cdc42, die Bindung wird allerdings durch die Mutation noch nicht vollständig verhindert. Wird D124 dagegen zu A mutiert, so wird die Bindungsfähigkeit der Proteinvariante auf null herabgesetzt.
- In der <sup>166</sup>GAGA<sup>169</sup>-Schleife setzt fast jede Art von Mutation die Bindungsfähigkeit nahezu auf null herab. Nur bei einer Mutation von G168 zu V bleibt mit 7 % ein Rest der Bindungsfähigkeit erhalten. In der <sup>166</sup>GAGA<sup>169</sup>-Schleife scheinen somit selbst kleine Änderungen der Struktur einen großen Einfluss auf die Cdc42-Bindung zu haben. Bei einer Betrachtung des 3D-Modells wird nachvollziehbar, wie exakt die Schleife aus Glycin-Alanin-Glycin-Alanin für den Bereich zwischen den beiden „switch“-Regionen konzipiert ist.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die einzelnen Aminosäuren für die Bindung von Cdc42 unterschiedlich wichtig sind. In der  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Schleife setzt jede Art von Mutation die Bindungsfähigkeit auf ein Mindestmaß herab. Bei einer Mutation von K198 haben dagegen weder eine deutliche Verkürzung der Seitenkette zu Alanin noch eine Verlängerung zu Arginin einen signifikanten Einfluss auf die Bindungsfähigkeit.

Diese Werte bieten jedoch nur einen ersten Ansatzpunkt, um die Auswirkungen der einzelnen Mutationen einschätzen zu können. Eine exakte Aussage über die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Bindung von SopE an Cdc42 lässt sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht treffen.

Bevor weitere Versuche zur biochemischen Charakterisierung der einzelnen Proteinvarianten sinnvoll wären, musste zunächst geklärt werden, ob die verminderte Bindung an Cdc42 vor allem im Fall der  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Schleifen-Mutationen eine direkte Folge des Aminosäureaustauschs ist oder indirekt durch verminderte Stabilität oder eine Änderung der Konformation des Proteins verursacht wird.

### **2.5.3. Konformationelle Eigenschaften und Stabilität**

Jedes der von pM441-pM452 exprimierten SopE-Proteine, die auch für die Biacore-Versuche verwendet wurden, ist durch eine Punktmutation in der Aminosäuresequenz charakterisiert. Dies kann unter Umständen zu einer signifikanten Änderung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins führen. Proteine, die durch die Mutation konformationell stark vom WT-SopE abweichen oder instabil sind, wurden in den weiteren Untersuchungen vernachlässigt. Hier sind die Ergebnisse, wie auch schon in den Biacore-Versuchen, eventuell nicht ausschließlich auf die mutierte Aminosäure zurückzuführen und somit nicht mit dem Verhalten von WT-SopE vergleichbar. Deshalb wurden die Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gel auf ihre Stabilität und mittels CD-Spektroskopie auf ihre Konformation überprüft.

#### **2.5.3.1. Stabilität**

Um die Stabilität der Proteine zu testen, wurden die Proteinlösungen in Puffer D auf eine Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  verdünnt und bei 25 °C inkubiert. Zu Beginn und nach 45 min, 2 h, 6 h sowie 24 h wurde je 1  $\mu\text{l}$  entnommen, in Lämmli-Probenpuffer aufgekocht und auf ein zwölfprozentiges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch die anschließende Coomassie-

Färbung wurde die Stabilität der Proteine über die Zeit anhand der Stärke der Banden abgeschätzt (Tabelle 19). Aus früheren Untersuchungen im Rahmen der Aufreinigung zur Kristallisation war bekannt, dass Wildtyp-SopE<sub>78-240</sub> bei 4 °C, 25 °C sowie 37 °C mindestens für drei Tage stabil ist.

**Tabelle 19: Stabilität der Proteinvarianten.** Proteinlösungen mit einer Konzentration von 60 mM wurden bei 25 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und in einer Coomassie-Färbung die Intensität der Banden über die Zeit abgeschätzt (+: stabil, -: Abbau erkennbar).

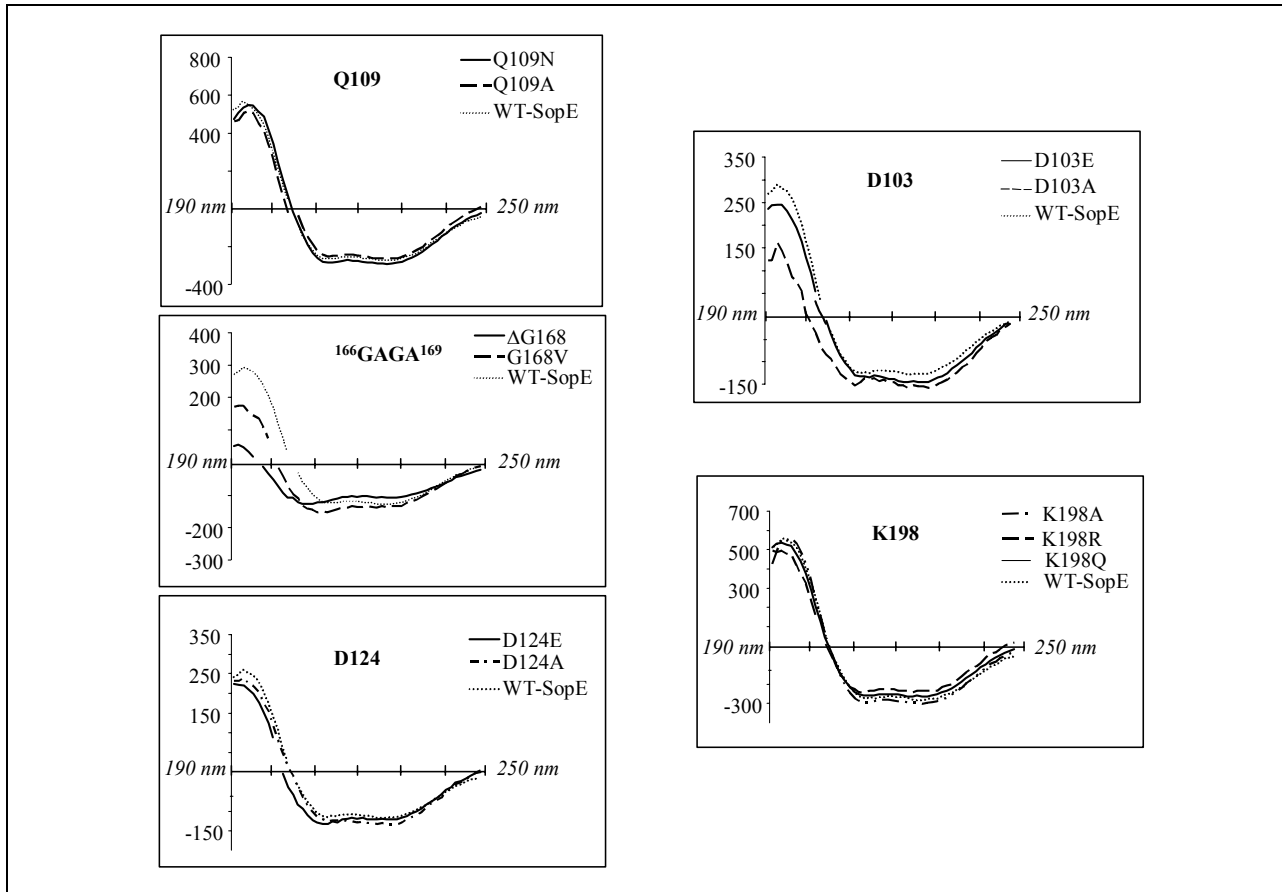
Mutation	Beginn	45 min	2 h	6 h	24 h
D103A	+	-	-	-	-
D103E	+	+	+	-	-
Q109A	+	+	+	+	+
Q109N	+	+	+	+	-
D124A	+	+	+	+	-
D124E	+	+	+	+	-
ΔG168	+	-	-	-	-
G168A	+	+	+	-	-
G168V	+	+	-	-	-
K198A	+	+	+	+	-
K198R	+	+	+	+	+
K198E	+	+	+	+	+

Eine für die folgenden Versuche ausreichende Stabilität über mindestens 6 h ist somit bei allen Mutationen in Q109, D124 und K198 gegeben. Mutationen in D103 und in der <sup>166</sup>GAGA<sup>169</sup>-Schleife führen zu einem Zerfall des Proteins in einem Zeitraum von bis zu 6 h.

### 2.5.3.2. CD-Spektroskopie

Zirkulardichroismus (CD) beruht auf der Wechselwirkung von optisch aktiven Substanzen mit linear polarisiertem Licht. In Proteinen tragen hauptsächlich Peptidbindungen und Aromaten zum Spektrum bei. Je nach der räumlichen Anordnung der Aminosäuren entstehen so proteinspezifische Muster. Zur Abschätzung der Sekundärstruktur von Proteinen wird der zirkuläre Dichroismus im fernen UV-Licht verwendet. Die CD-Spektroskopie ist besonders geeignet, um die Strukturen von Proteinvarianten mit Punktmutation mit der von Wildtyp-Proteinen zu vergleichen. Daraus kann abgeschätzt werden, ob der Aminosäureaustausch erhebliche Änderungen in der Proteinkonformation hervorruft, die zur katalytischen Inaktivität

des Proteins führen können. Da eine definitive Aussage über das Ausmaß von konformationellen Veränderungen der Proteine alleine mit dieser Methode aber nicht möglich ist, sollten die erhaltenen Ergebnisse nur als Anhaltspunkte gelten.



**Abbildung 26: Fern-UV-Spektren der Proteinvarianten.** Die Messungen wurden in einem Wellenlängenbereich von 190-250 nm bei 20 °C in einer 0,1 cm-Küvette durchgeführt, die Testansätze enthielten 0,05-0,2 mg/ml Protein in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4. Zur Abschätzung der konformationellen Eigenschaften der Varianten wurde die Kurve der vorwiegend  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur des WT-SopE-Proteins mit dem Spektrum der Proteinvarianten überlagert.

Die Messungen wurden in einem Wellenlängenbereich von 190-250 nm bei 20 °C durchgeführt. Die Testansätze enthielten 0,05-0,2 mg/ml Protein in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4. Zur Abschätzung der konformationellen Eigenschaften der Varianten wurde die Kurve der vorwiegend  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur des WT-SopE-Proteins mit dem Spektrum der Proteinvarianten überlagert. Abweichungen von der erwarteten Sekundärstruktur sind ein Indiz für die Inaktivität des Proteins aufgrund einer Fehlfaltung. Die Sekundärstruktur scheint in den SopE-Varianten mit einer Mutation in Q109, D124 bzw. K198 weitgehend erhalten geblieben zu sein, während bei den Varianten mit einer Mutation in D103 und in der  $^{166}$ GAGA $^{169}$ -Schleife



auffällige Abweichungen von der  $\alpha$ -helikalen Struktur des Wildtypproteins zu beobachten sind (Abbildung 26). Dies geht offensichtlich auch mit einer Instabilität des entsprechenden Proteins einher (siehe 2.5.3.1.).

Diejenigen SopE-Varianten mit Mutationen in D103 und in der  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Schleife, die sich als instabil oder fehlgefaltet erwiesen hatten, wurden daraufhin als GST-Fusionen aufgereinigt. In dieser Form waren sie stabil und im CD-Vergleich mit WT-SopE-GST-Fusionsprotein unauffällig gefaltet (ohne Abbildung).

Mit den bereits vorhandenen abgespaltenen und den neu aufgereinigten GST-Proteinvarianten konnte nun eine weitere biochemische Charakterisierung in kinetischen Experimenten erfolgen.

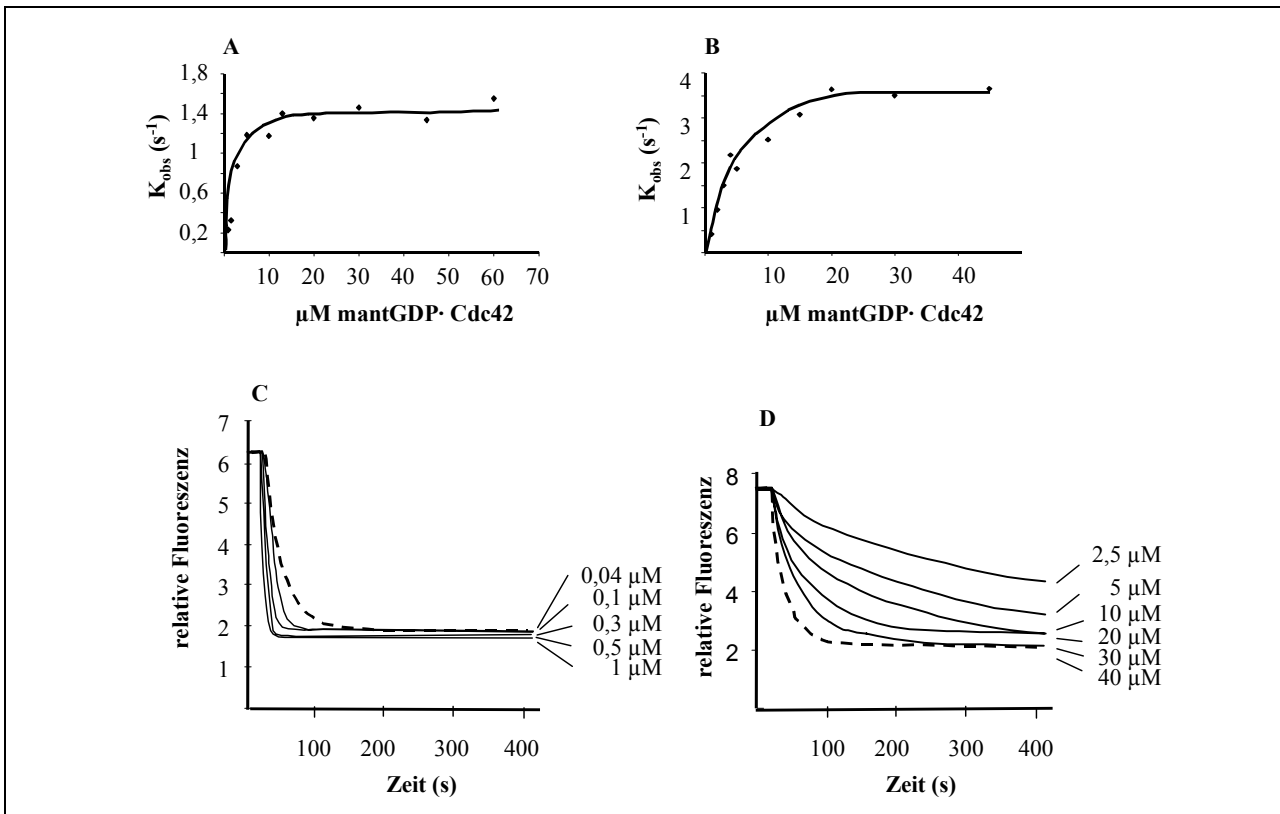
#### **2.5.4. Die Michaelis-Menten-Kinetik**

Die biochemische Charakterisierung der Proteinvarianten erfolgte in G-Nukleotid-Austauschversuchen mittels Fluoreszenzspektrometrie.

##### **2.5.4.1. Substratüberschuss-Experimente**

Zunächst wurden für alle Proteinvarianten „multiple turnover“-Experimente durchgeführt. Bei einer gleichbleibenden Enzymkonzentration von 25 nM SopE-Protein (oder GST-SopE-Protein) in Puffer S wurde in Gegenwart von 1 mM GDP die mantGDP-Dissoziation bei steigenden Konzentrationen an mantGDP-Cdc42 (1 bis maximal 60  $\mu\text{M}$ ) gemessen.

Im Fall der Proteinvarianten D103E, D103A (beide als GST-Fusionsprotein), K198A und K198R waren signifikante Umsatzraten zu messen. Die Ergebnisse wurden mithilfe von SigmaPlot ausgewertet und die berechnete konzentrationsunabhängige Geschwindigkeitskonstante  $k_{obs}$  gegen die Konzentration an mantGDP-Cdc42 aufgetragen (wie unter Ergebnisse 1.4. beschrieben). Aus dem Diagramm konnten ebenso wie beim Wildtyp-Protein mit  $v_{max}$  und  $K_M$  direkt die Michaelis-Menten-Parameter jeder Proteinvariante bestimmt werden (Abbildung 27A, B; Tabelle 20).



**Abbildung 27: Biochemische Charakterisierung der Proteinvarianten.** A und B: Für kinetisch schnelle Proteinvarianten wurde durch Fluoreszenzspektrometrie die Freisetzung von mantGDP aus Cdc2-mantGDP (Beispiele: WT-SopE bis 60  $\mu M$ , A; K198R, bis 45  $\mu M$ , B) in der Gegenwart von 1 mM GDP und 25 nM SopE-Protein verfolgt (Anregungswellenlänge = 366 nm, Emissionswellenlänge = 440 nm). Die Kurven wurden in SigmaPlot an Zerfallskurven erster Ordnung angenähert, die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten wurden als Funktion der Substratkonzentration aufgetragen. C und D: Bei den kinetisch langsamen Varianten (Beispiel: Q109A, D) wurde die im Rahmen von „single turnover“-Messungen erhaltene Kurvenschar mit den Kurven aus der „single turnover“-Messungen des Wildtyp-Proteins (C) überlagert. Aus dem Vergleich von Kurven, die eine ähnliche Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Enzymkonzentrationen aufwiesen (gestrichelte Linie), wurde die relative katalytische Effizienz für die Proteinvarianten abgeschätzt.

Bei den Varianten Q109N, Q109A, D124E, D124A und K198E war bei Substratüberschuss die Austauschrate deutlich vermindert. Bei den Proteinvarianten  $\Delta G168$ , G168A und G168V war bei Substratüberschuss fast kein Nukleotidaustausch über die Rate des spontanen Austauschs hinaus zu messen.

#### 2.5.4.2. Enzymüberschuss-Experimente

Deshalb wurden hier Enzymüberschuss-Experimente („single turnover“) durchgeführt. Bei dieser Art der Messung ist weit mehr Enzym (2,5-80  $\mu M$ ) als Substrat (konstante Konzentrationen von 200 nM mantGDP·Cdc2) im Reaktionsgemisch vorhanden. Durch

Messung der Austauschraten in Abhängigkeit der Konzentration von SopE-Proteinen kann hier die Geschwindigkeit der Reaktion bis zur Dissoziation des mantGDP bestimmt werden. Da jedes Enzym höchstens an der Umsetzung eines einzigen Substratmoleküls beteiligt ist, spielt die Dissoziation des Enzym-Produkt-Komplexes keine Rolle. Der große Vorteil dieser Messungen liegt allerdings darin, dass auch kinetisch stark verlangsamte Enzymvarianten noch exakt charakterisiert werden können. Unter diesen Bedingungen war auch für die Proteinvarianten Q109N, Q109A, D124E, D124A und K198E eine Beschleunigung des G-Nukleotidaustauschs am mantGDP·Cdc42-Komplex festzustellen, der über die spontane Dissoziationsrate hinausging. Für die Proteinvarianten ΔG168, G168A und G168V war die Rate des Nukleotidaustausches auch unter „single turnover“-Bedingungen immer noch stark verlangsamt (Tabelle 20).

Für die extrem schnellen WT-SopE-Vergleichsmessungen unter „single turnover“-Bedingungen stand kein Fluoreszenzspektrometer mit „stopped flow“-Einrichtung zur Verfügung. Deshalb ist es im Rahmen dieser Experimente nicht möglich gewesen, die exakten kinetischen Parameter zu ermitteln und mit denen der stark verlangsamten Varianten zu vergleichen. Um trotzdem einen Vergleich zu ermöglichen, wurde die erhaltene Kurvenschar für die katalytisch langsamen Varianten mit den Kurven aus der „single turnover“-Messungen des Wildtyp-Proteins überlagert (Abbildung 27C, D). Um sicherzustellen, dass die beobachtete Reaktionsverlangsamung eine katalytische Eigenschaft der jeweiligen Proteinvariante ist, musste ausgeschlossen werden, dass eine partielle Inaktivität der Präparation der Grund ist. Dazu wurde bei einer hohen Enzymkonzentration (z. B. 40 μM) die Substratkonzentration zehnfach erhöht. Ist hier keine deutliche Verlangsamung der Reaktion zu beobachten, so kann geschlossen werden, dass die beobachtete Verlangsamung auf allgemein verschlechterte katalytische Eigenschaften der Variante zurückzuführen ist und nicht auf eine teilweise Fehlfaltung des Enzyms. Dies konnte in allen Fällen bestätigt werden.

Da für die extrem schnellen WT-SopE-Vergleichsmessungen unter „single turnover“-Bedingungen kein Fluoreszenzspektrometer mit „stopped flow“-Einrichtung zur Verfügung stand, wurden für SopE nur „single turnover“-Kurven in den Konzentrationsbereichen aufgenommen, die sich auch ohne „stopped flow“-Einrichtung noch aufzeichnen ließen. Anschließend wurden aus der Schar der „single turnover“-Kurven für WT-SopE und Proteinvariante diejenigen Kurven ausgewählt, die eine ähnliche Reaktionsgeschwindigkeit aufwiesen. Aus dem Verhältnis der SopE-Konzentrationen bei dieser vergleichbaren Reaktionsgeschwindigkeit wurde die relative katalytische Effizienz für die Proteinvarianten zur

WT-SopE-vermittelten Katalyse bestimmt (Abbildung 27). So ließ sich die katalytische Effizienz der kinetisch langsamen Proteinvarianten grob abschätzen (Tabelle 20).

**Tabelle 20: Michaelis-Menten-Kinetik des Nukleotidaustauschs durch die SopE-Proteinvarianten.** In „multiple turnover“-Experimenten wurde einer gleichbleibenden Enzymkonzentration von 25 nM SopE-Protein (oder GST-SopE-Protein) in Puffer S in Gegenwart von 1 mM GDP steigende Konzentrationen an mantGDP·Cdc42 (1 bis maximal 60  $\mu$ M) zugegeben. Für katalytisch langsame Proteinvarianten wurde der Austausch unter „single turnover“-Bedingungen bei einer mantGDP·Cdc42-Konzentration von 200 nM und einer ansteigenden SopE-Konzentration (2,5 bis maximal 80  $\mu$ M) in Puffer D wiederholt. Angegeben sind für die „multiple turnover“-Kinetiken  $v_{max}$  sowie  $K_M$ , für die katalytisch langsamen Proteinvarianten wurde durch „single turnover“-Messungen die relative katalytische Effizienz gegenüber der SopE-katalysierten Reaktion bestimmt. n. b.: nicht bestimmbar, da da die spontane Austauschrate die katalysierte bei weitem übersteigt. \*: Wegen der Tendenz zur Dimerisierung lassen sich die genauen kinetischen Parameter nicht exakt ermitteln.

Proteinvariante	„multiple turnover“		„single turnover“
	$v_{max}$	$K_M$	relative katalytische Effizienz (Verlangsamung)
WT	1,4	3	
Q109N			400-1000
Q109A			1000
K198A	2,2	4	
D124E			750
D124A			> 1250
K198R	3,6	4	
K198E			8
GST-WT	39*	20*	
GST- $\Delta$ G168			> 2000
GST-D103E	1,3*	6*	
GST-D103A	1,2*	12*	
GST-G168A	n. b.	n. b.	$\approx$ 2000
GST-G168V	n. b.	n. b.	nahe an spontaner Dissoziation

Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 21 abschließend nochmals alle Ergebnisse im Vergleich aufgelistet, die für die einzelnen Proteinvarianten in den biochemischen und zellbiologischen Versuchen ermittelt werden konnten.

**Tabelle 21: Zusammenfassung der biochemischen und zellbiologischen Charakteristika der SopE-Proteinvarianten im Vergleich.** Alle bisher erhaltenen Ergebnisse im Rahmen der Charakterisierung der Proteinvarianten sind hier nochmals in einer Tabelle zusammengefasst (siehe auch Abbildung 23, Abbildung 25, Tabelle 20). n. d.: Daten nicht bestimmt.

Proteinvariante	Invasivität	„ruffling“	Bindungsfähigkeit [%]	Kinetische Parameter/ Verlangsamung
WT	100	+	100	$k_{cat} = 1,4; K_M = 3$
D103E	49	+	59	$k_{cat} = 1,3; K_M = 6$
D103A	60	+	32	$k_{cat} = 1,2; K_M = 12$
Q109N	59	-	16	400-1000
Q109A	11	-	2,7	1000
D124E	76	+/-	3,2	750
D124A	28	+/-	0	> 1250
$\Delta$ G168	1,4	-	0	> 2000
G168A	2,8	-	0	$\approx 2000$
G168V	1	-	7	spontane Diss.
$\Delta$ G168/A169	0	-	n. d.	n. d.
K198A	89	+	93	$v_{max} = 2,2; K_M = 4$
K198R	79	+	90	$v_{max} = 3,6; K_M = 4$
K198E	60	+	26	8

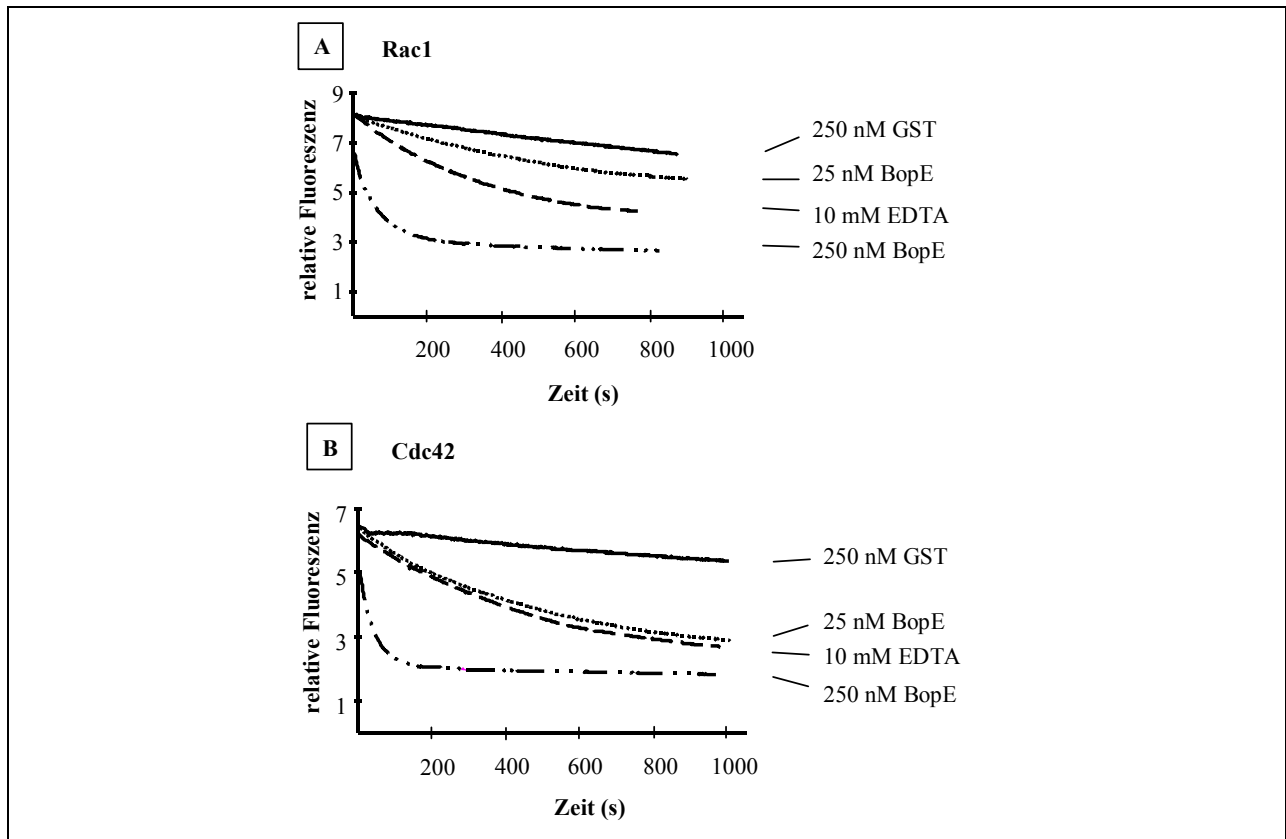
Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse wird deutlich, dass der beobachtete Phänotyp einer SopE-Proteinvariante nicht immer in direkter Relation zu den kinetischen Konstanten steht. In einigen Fällen (Mutationen in K198 und D103) drückt sich eine deutliche Ausbildung von Aktinumlagerungen und eine damit verbundene hohe Invasionsrate auch in Wildtyp-ähnlichen kinetischen Parametern aus. Im Fall einer Mutation des katalytischen Zentrums (<sup>166</sup>GAGA<sup>169</sup>-Schleife) sind sowohl die Ausbildung von Aktinumlagerungen, die Invasion und die Konstanten des Nukleotidaustauschs stark reduziert. Bei einer Mutation von Q109 und D124 zeigt sich, dass letztendlich eine vergleichsweise hohe Invasivität auch von ihren katalytischen Effizienzen stark beeinträchtigten Varianten vermittelt werden kann. Wildtyp-SopE scheint somit wenigstens für COS7-Zellen in seiner katalytischen Kompetenz 500-1000 × effizienter zu sein, als es zur Invasion notwendig wäre.

### 3. Biochemische Untersuchung der GEF-Aktivität eines SopE-Homologs aus *Burkholderia mallei*

Durch die Aufklärung der Röntgenstruktur des SopE·Cdc42-Komplexes wurde deutlich, dass SopE eine bisher unbekannte Klasse von RhoGEFs mit neuartiger struktureller Gestaltung des katalytischen Zentrums darstellt. Dennoch ist SopE ein katalytisch sehr effizientes Effektorprotein, das schon in geringen Mengen die Invasivität der Bakterien in die Wirtszelle ermöglicht. Daher ist denkbar, dass auch andere pathogene, invasive Bakterien SopE-homologe Proteine besitzen. Obwohl SopE (und SopE2) aufgrund der fehlenden Homologie zu anderen Proteinen nicht über eine gezielte Datenbanksuche identifiziert werden konnten, kann jetzt parallel zur Entschlüsselung immer neuer Genomsequenzen nach SopE-homologen GEFs aus Bakterien gesucht werden.

Die Arbeitsgruppe um E. Galyov (Institute for Animal Health, Berkshire, England) identifizierte ein potenzielles SopE-Homolog in *Burkholderia mallei*, das analog als BopE bezeichnet wurde (Abbildung 30C, Anhang). *Burkholderia mallei* ist ein gramnegatives, unbewegliches Bakterium, das vor allem in Asien, Afrika und dem Nahen Osten bei Pferden und Pferdeähnlichen die sogenannte Rotzkrankheit verursachen kann. Eine Infektion endet für die betroffenen Tiere meist tödlich. Die Übertragung auf den Menschen ist selten und wird vor allem bei Laborangestellten und Personen mit engem Kontakt zu erkrankten Tieren beobachtet.

Um zu überprüfen, ob BopE ebenfalls als GEF für RhoGTPasen wirkt, wurde BopE in unserem Labor auf seine Aktivität als GEF für Cdc42 und Rac1 getestet. Hierzu wurde aufgereinigtes BopE<sub>78-261</sub> in Fluoreszenzaustauschkinetiken mit mantGDP·Cdc42 und mantGDP·Rac1 vermessen. Die Ansätze enthielten 10 µM mantGDP·Rac1 oder 10 µM mantGDP·Cdc42 sowie 1 mM GDP und 250 nM GST, 10 mM EDTA oder 25 bzw. 250 nM BopE<sub>78-261</sub> in Puffer F. Es zeigte sich, dass auch dieses Protein als G-Nukleotid-Austauschfaktor für Cdc42 und Rac1 wirkt (Abbildung 28).



**Abbildung 28:** „multiple turnover“-Kinetik des BopE-vermittelten Nukleotidaustauschs an mantGDP-Cdc42 und mantGDP-Rac1. Die Freisetzung des mantGDP wurde durch Fluoreszenzspektrometrie in Puffer S verfolgt. Die Testansätze enthielten 10  $\mu$ M Rac1 oder 10  $\mu$ M Cdc42 sowie 1 mM GDP und 250 nM GST, 10 mM EDTA oder 25 bzw. 250 nM BopE<sub>78-261</sub> (Anregungswellenlänge 366 nm, Emissionswellenlänge 440 nm, Schrittweite 1 nm, Bandfilter 4 nm).

## E. DISKUSSION

### 1. Evolution

*Salmonella* spp. haben sich in ihrer Entwicklung zum Pathogen als äußerst erfolgreich erwiesen. Sie spielen heute eine wichtige Rolle als Erreger sowohl im Tierreich als auch im Menschen. Nachdem in der Evolution zunächst SPI1 durch horizontalen Gentransfer aufgenommen wurde, konnten *Salmonella* spp. erstmals direkt mit den Signaltransduktionswegen des Wirts interagieren. Danach war durch den Erwerb eines optimal abgestimmten Sortiments von translozierten Effektorproteinen eine Feinabstimmung der Interaktion mit dem Wirtsorganismus möglich (Miroid *et al.*, 1999; Miroid *et al.*, 2001).

In der genetischen Organisation ihrer Pathogenitätsfaktoren folgen *Salmonella* spp. nicht dem allgemein gängigen Prinzip der Pathogenitätsinseln, wo Gene, die eine funktionelle Einheit bilden, in definierten chromosomalen Bereichen oder auf einem Plasmid zusammengefasst sind (Hacker und Kaper, 2000). Bei *Salmonella* spp. sind die Gene vieler Effektoren (SopE, SopE2, SopA, SopB, SopD, SlrP, SspH1) an anderen Orten des Chromosoms zu finden. Generell unterscheidet man hier zwischen sogenannten „alten“ und „neuen“ Effektoren. Zu den alten Faktoren zählen diejenigen, die innerhalb von SPI1 kodiert sind (AvrA, SipA, SipB, SipC, SipD, SptP), sowie SopB, SopD und SopE2. Sie wurden bereits früh in der Evolution aufgenommen und vermitteln zentrale konservierte Virulenzeigenschaften. Die Gene neuer Effektoren wie SopE und AvrA sind erst in jüngerer Zeit aufgenommen und durch horizontalen Transfer in der Population verteilt worden. Sie dienen der Feinabstimmung der Virulenz (Miroid *et al.*, 2001). SopE ist dabei auf einem P2-ähnlichen Phagen kodiert, der als SopE $\Phi$  bezeichnet wird (Miroid *et al.*, 1999).

In der epidemiologischen Entwicklung hat sich immer wieder gezeigt, dass *Salmonella* spp. in verschiedenen Wirten Epidemien verursachen und Infektionen von dort aus auf den Menschen übergreifen können (Kühn und Tschäpe, 1995). Ein Grund für den großen epidemiologischen Erfolg von *Salmonella* spp. könnte darin liegen, dass die RhoGTPasen als zelluläres Ziel von SopE und SopE2 in einer Vielzahl von Wirten extrem konserviert sind.



Eine Untersuchung der SARA-Kollektion und der Salmonellenkollektion des Deutschen *Salmonella*-Referenzzentrums zeigte, dass *sopE* nur in wenigen *S. typhimurium*-Isolaten vorhanden ist, während *sopE2* in allen Isolaten gefunden werden konnte. Eine Ausnahme bildet hier *S. typhi*, wo eine Punktmutation in *sopE2* vorliegt, die in allen untersuchten *S. typhi*-Isolaten durch die Anwesenheit von *sopE* kompensiert wird (Miroid *et al.*, 1999; Stender *et al.*, 2000). SopE und SopE2 scheinen also in der Zelle vergleichbare Aufgaben übernehmen zu können, so dass generell der Besitz nur eines der beiden Proteine ausreichend ist, um die Pathogenität eines Stammes zu gewährleisten.

Zu den Stämmen, in denen *sopE* gefunden werden konnte, zählen einige Isolate der Phagentypen DT68 und DT175 sowie alle Isolate der Phagentypen DT49, DT204 und DT204c. Interessanterweise gehören zu diesen lysogenen Stämmen, die zusätzlich zu *sopE2* auch über *sopE* verfügen, diejenigen, die seit den 70er Jahren Auslöser einer lang anhaltenden Epidemie waren. Es ist zu vermuten, dass die Anwesenheit von *sopE* die Fitness eines Stammes deutlich erhöht (Kühn und Tschäpe, 1995; Miroid *et al.*, 1999).

Untersuchungen im Rindermodell haben gezeigt, dass die Pathogenität von *S. typhimurium*-Stämmen, die im Besitz von SopE und SopE2 sind, leicht gesteigert ist. Dieser Beitrag könnte allerdings ausreichen, um sich erfolgreich gegenüber anderen Stämmen durchzusetzen (Miroid und Hardt, unveröffentlicht). Es wird vermutet, dass die gesteigerte Virulenz von *sopE*- und *sopE2*-positiven *S. typhimurium*-Stämmen teilweise dadurch zu erklären ist, dass SopE im Gegensatz zu SopE2 parallel Cdc42 und Rac1 effizient aktivieren kann.

SopE und SopE2 sind also früh erworbene Virulenzfaktoren, die zentrale Virulenzeigenschaften vermitteln. Das phagenkodierte SopE kann darüber hinaus nach dem horizontalen Transfer die Virulenzeigenschaften eines Stammes und seine epidemiologische Fitness nochmals verbessern.

## 2. Der katalytische Mechanismus von SopE

Aus Sequenzvergleichen war bekannt, dass SopE keine Sequenzhomologie zu anderen pro- oder eukaryontischen Proteinen aufweist. Durch die Kristallisation des SopE<sub>78-240</sub>-Cdc42-Komplexes wurde deutlich, dass SopE auch keinerlei Strukturähnlichkeit zu zellulären RhoGEFs zeigt (Boriack-Sjodin *et al.*, 1998; Cherfils *et al.*, 1998; Mossessova *et al.*, 1998; Renault *et al.*, 1998; Buchwald *et al.*, 2002). Bisher ging man davon aus, dass GEFs für eine bestimmte Unterfamilie

der Ras-homologen Proteine jeweils eine homologe aktive Domänen besitzen. Proteine der Ras-Familie verfügen als katalytische Einheit über eine sogenannte Cdc25-Domäne, für Arf über eine Sec7-Domäne und für Rho über eine DH-Domäne (Cherfils und Chardin, 1999). Die DH-Domäne, die spezifisch für alle bisher untersuchten zellulären Rho-GEFs ist, wurde zuerst im Onkoprotein Dbl beschrieben. Der katalytisch relevante Bereich von Dbl untergliedert sich in eine 200 Aminosäuren lange Dbl-Homologie (DH)-Domäne und eine 100 Aminosäuren lange sogenannte Pleckstrin-Homologie- (PH)-Domäne (Whitehead *et al.*, 1997). Während die DH-Domäne alleine schon ausreichend ist, um den Nukleotidaustausch zu bewirken, ist die Rolle der PH-Domäne noch nicht im Detail geklärt. Eventuell ist sie für die subzelluläre Lokalisation des GEF und die intramolekulare Regulation der Austauschaktivität verantwortlich (Whitehead *et al.*, 1997).

Die Struktur von SopE unterscheidet sich jedoch grundlegend von der anderer bereits kristallisierter Rho-GEFs wie beispielsweise Trio (Liu *et al.*, 1998),  $\beta$ PIX (Aghazadeh *et al.*, 1998), Sos (Boriack-Sjodin *et al.*, 1998; Worthylake *et al.*, 2000; Hall *et al.*, 2001), Gea2 (Goldberg, 1998), Tiam 1 (Worthylake *et al.*, 2000) oder RCC1 (Renault *et al.*, 2001). In der Kristallstruktur von SopE zeigt sich ein völlig neuer struktureller Ansatz, um unabhängig von der Verwendung einer DH-Domäne den Nukleotidaustausch an RhoGTPasen bewerkstelligen zu können.

SopE verfügt, ebenso wie die GEFs für GTPasen der Ras- und Rho-Familie, über einen hohen Anteil an  $\alpha$ -helikaler Struktur (Aghazadeh *et al.*, 1998; Betz *et al.*, 1998; Boriack-Sjodin *et al.*, 1998; Cherfils *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Mossessova *et al.*, 1998; Soisson *et al.*, 1998).

Als aktives Zentrum von SopE scheint das  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Motiv zu fungieren. Dieses Motiv fällt durch eine Häufung von Aminosäuren auf, die im bloßen Sequenzvergleich nicht auf ein katalytisches Zentrum schließen lassen und in dieser Form im katalytischen Zentrum eukaryontischer GEFs nicht gefunden werden konnten. Dieser Bereich ist Teil des Peptidsegments, das in Form eines Bogens die beiden Schenkel des „V“ verbindet. Im Komplex mit Cdc42 schiebt sich die  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Schleife zwischen die „switch“ I- und „switch“ II-Region von Cdc42, die eng mit der Nukleotidbindung der RhoGTPase assoziiert sind und in Abhängigkeit vom G-Nukleotid-Beladungszustand starke konformationelle Änderungen erfahren (Buchwald *et al.*, 2002). Mutationen in diesem Sequenzmotiv zerstören die Funktionalität von SopE vollständig. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein in der  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Schleife

verändertes SopE-Protein nicht mehr signifikant an Cdc42 binden und keinen nennenswerten G-Nukleotidaustausch mehr katalysieren kann. Auch in Zellkulturinvasionsversuchen und bei der Aktinumlagerung erwiesen sich diese Varianten als inaktiv. Der Grund hierfür wird klar, wenn man sich die Vorgänge verdeutlicht, die durch eine Umlagerung von „switch“ I und „switch“ II zur Nukleotidfreisetzung führen. Da der SopE-Cdc42-Komplex in der nukleotidfreien Form kristallisiert wurde, wurde der Komplex mit der Struktur des GDP-gebundenen Cdc42 (Rudolph *et al.*, 1999b) überlagert. Während die Kernbereiche der G-Domänen hier in ihrer Struktur gut übereinstimmen, sind im Bereich der „switch“ I/II-Regionen größere konformationelle Umlagerungen zu beobachten. Durch einen Vergleich beider Strukturen können so die konformationellen Änderungen, die zur Nukleotidfreisetzung führen, rekonstruiert werden.

SopE arbeitet hier nach dem „push and pull“-Prinzip, das bereits bei zahlreichen Untersuchungen der Struktur von GDP- und GTP-beladenen GTPasen beobachtet wurde. Durch die Bindung von SopE an Cdc42 und die darauffolgende Insertion der  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Schleife zwischen die beiden „switch“-Regionen wird „switch“ I beiseite gedrängt, während „switch“ II näher an die  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Schleife heranrückt.

In „switch“ I kommt es durch die Insertion des  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Motivs zu zwei aufeinanderfolgenden Drehungen in der C-terminalen Hälfte von „switch“ I mit Rotationen von  $F37_{\text{Cdc42}}$  und  $Y40_{\text{Cdc42}}$ , die an der Bindung des GDP in der Nukleotidbindungstasche beteiligt sind. Aufgrund der Struktur wurde angenommen, dass diese Konformation unter anderem durch eine Interaktion von  $D38_{\text{Cdc42}}$  mit  $K198_{\text{SopE}}$  und  $Q194_{\text{SopE}}$  stabilisiert wird. Ein Sequenzvergleich mehrerer untersuchter SopE- und SopE2-Sequenzen zeigt, dass die Sequenzen in der katalytisch relevanten  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Schleife konserviert sind (Buchwald *et al.*, 2002).

Die seitliche Verschiebung von „switch“ I wird durch einen Kontakt zwischen  $D124_{\text{SopE}}$  und  $Y32_{\text{Cdc42}}$ ,  $T35_{\text{Cdc42}}$  (komplexiert mit dem  $\text{Mg}^{2+}$ ) und  $V36_{\text{Cdc42}}$  Infolge dieser Umlagerungen kommt es zu einer Drehung des N-terminalen Bereichs von Cdc42. Dabei werden diejenigen Reste von Cdc42, die das Nukleotid in der Bindungstasche fixieren, herausgedreht und die Nukleotidfreisetzung erleichtert. Wie in dieser Arbeit untersucht wurde, scheint der Beitrag zur Stabilisation im Falle von K198 geringer zu sein als im Fall von D124, da eine Mutation in D124 im Gegensatz zu einer Mutation in K198 die Nukleotidfreisetzung deutlich beeinträchtigt. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Nukleotidfreisetzung aus Cdc42 ist je nach Art der Mutation in D124 etwa um den Faktor 750 bzw. 1250 verlangsamt. Eine Mutation in K198 hat dagegen

keinen nennenswerten Einfluss auf katalytische Aktivität, Induktion von Membranumlagerungen und Invasivität. Dies erklärt auch, warum K198 nicht universell zwischen allen *sopE*-Genen konserviert ist. In *S. hadar*, *S. dublin* und *S. gallinarum* ist es durch ein Arginin ersetzt.

Der C-terminale Bereich von „switch“ II, der durch die Insertion der katalytischen Domäne von SopE in Richtung der  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Schleife verschoben wird, stabilisiert sich vor allem über den Kontakt der Aminosäuren Y64<sub>Cdc42</sub>, D65<sub>Cdc42</sub>, R66<sub>Cdc42</sub> und S71<sub>Cdc42</sub> mit SopE. Wie in anderen GEF-GTPase-Komplexen befinden sich R66<sub>Cdc42</sub> und D65<sub>Cdc42</sub> dabei in engem Kontakt mit der regulatorischen Komponente (Rittinger *et al.*, 1997; Nassar *et al.*, 1998; Hoffman *et al.*, 2000; Scheffzek *et al.*, 2000), in diesem Fall mit D103<sub>SopE</sub> und Q109<sub>SopE</sub>. Auch hier konnte gezeigt werden, dass D103<sub>SopE</sub> und Q109<sub>SopE</sub> unterschiedlich stark zur Stabilisation der Konformation beitragen: Q109<sub>SopE</sub> scheint eine wichtigere Rolle zu spielen als D103<sub>SopE</sub>, da eine Mutation in D103<sub>SopE</sub> im Gegensatz zu einer Mutation in Q109<sub>SopE</sub> noch einen effizienten Nukleotid austausch zulässt ( $v_{max} = 1,2$ ;  $K_M = 12$  für D103A,  $v_{max} = 1,3$ ;  $K_M = 6$  für D103E; Austausch bei beiden Mutationen in Q109 um den Faktor 400-1000 verlangsamt).

Die umfassendsten Kontakte bilden sich zwischen S165<sub>SopE</sub>, G166<sub>SopE</sub>, G168<sub>SopE</sub> und A169<sub>SopE</sub> und dem N-terminalen Teil von „switch“ II aus. Wichtige Reste sind in diesem Bereich A59<sub>Cdc42</sub>, G60<sub>Cdc42</sub> und Q61<sub>Cdc42</sub> (Buchwald *et al.*, 2002). Den größten Effekt für die Katalyse hat vermutlich die Drehung von A59<sub>Cdc42</sub>, wodurch die Methylgruppe in die  $\text{Mg}^{2+}$ -Bindetasche von Cdc42 hineinragt und eine Bindung von  $\text{Mg}^{2+}$  verhindert. Dieser Mechanismus ist auch in anderen RhoGTPase-GEF-Komplexen beobachtet worden (Shimizu *et al.*, 2000; Boriack-Sjodin *et al.*, 1998; Worthylake *et al.*, 2000). Diese Konformation wird vor allem durch die Interaktion von A169<sub>SopE</sub> mit A59<sub>Cdc42</sub> stabilisiert. Eine Mutation von G168 oder A169 innerhalb der  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Schleife hat wie oben bereits beschrieben den stärksten Effekt auf die Funktionalität von SopE.

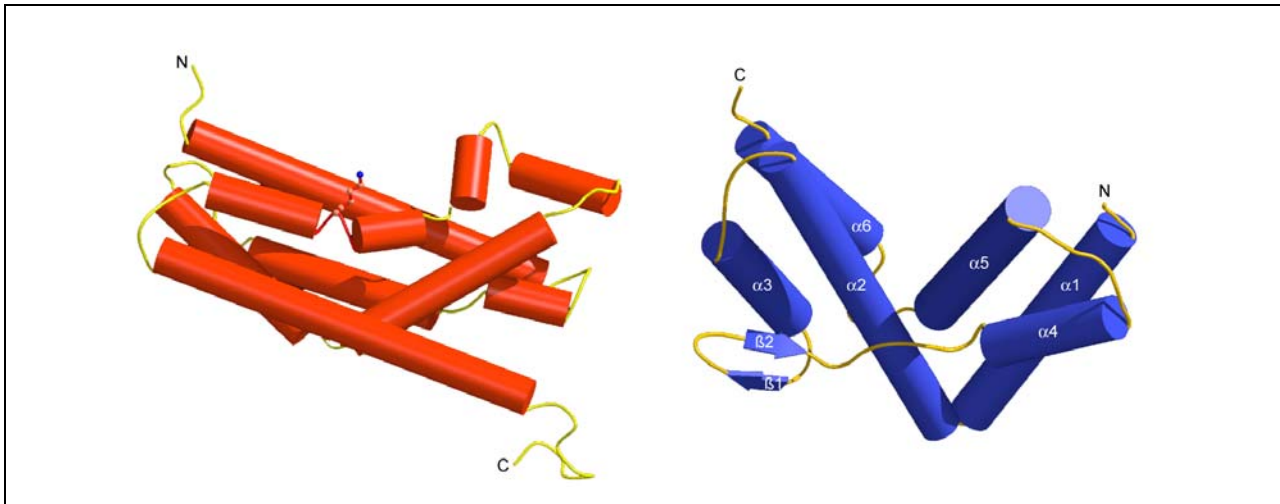
SopE spielt somit bei der Katalyse des Nukleotid austauschs eine duale Rolle. Durch die Insertion der  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Schleife kommt es zu einer Repositionierung von „switch“ I und „switch“ II. Dies resultiert sowohl in der Freisetzung des Nukleotids als auch in der Verdrängung des stabilisierenden  $\text{Mg}^{2+}$ -Ions. Da das  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Motiv sowohl an der konformationellen Umlagerung von „switch“ I mit anschließender Nukleotidfreisetzung als auch über G168 und A169 an der Freisetzung des  $\text{Mg}^{2+}$ -Ions beteiligt ist, lässt sich die Rolle des  $\text{Mg}^{2+}$  bei der Nukleotidfreisetzung nicht eindeutig bestimmen. Die Tatsache, dass es bei einer Mutation in der

$^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Schleife zu keinem Nukleotidaustausch mehr kommt, kann prinzipiell einer starken stabilisierenden Wirkung des  $\text{Mg}^{2+}$  zugeschrieben werden. Andererseits kommt es wohl durch die Insertion einer veränderten  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Schleife nicht mehr zu einer vollständigen Repositionierung von „switch“ I, was ebenfalls die Nukleotidfreisetzung behindert. Nach heutigem Wissen scheint  $\text{Mg}^{2+}$  bei den Rho-Proteinen jedoch nur teilweise für den Prozess der hochaffinen Bindung und der Freisetzung von G-Nukleotid benötigt zu werden. Vielmehr reguliert es indirekt den Beladungszustand der RhoGTPase (Zhang *et al.*, 2000; Vetter und Wittinghofer, 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass im Rahmen der physiologischen  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration von etwa 500 nM nur geringe Spezifitätsunterschiede zwischen SopE und SopE2 gegenüber Rac1 bestehen. Allerdings könnten signalinduzierte Schwankungen der intrazellulären Magnesiumkonzentration hier durchaus einen Einfluss auf die Spezifität haben (Romani und Scarpa, 2000).

Die durchgeführten Mutagenesestudien belegen, dass das  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Motiv das katalytische Zentrum von SopE repräsentiert. D103, Q109, D124 und K198 dagegen dienen der Stabilisation der umgelagerten „switch“ I und „switch“ II-Regionen, die die Freisetzung von  $\text{Mg}^{2+}$  und GDP zur Folge haben (Abbildung 22).

### 3. Vergleich mit dem Tiam1-Rac1-Komplex

Es konnte gezeigt werden, dass Tiam1 und SopE (Abbildung 29) vorwiegend  $\alpha$ -helikal sind (Worthylake *et al.*, 2000; Buchwald *et al.*, 2002). Ein Strukturvergleich beider Komplexe in den Kernbezirken der G-Domänen zeigt, dass die „switch“ I- und „switch“ II-Regionen von Rac1 und Cdc42 im Komplex mit Tiam1 und SopE eine sehr ähnliche lokale Anordnung besitzen. Während SopE zur Umlagerung der „switch“ I- und „switch“ II-Regionen vor allem das  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Motiv verwendet, schiebt Tiam1 die lange Seitenkette von K1195 zwischen „switch“ I und „switch“ II. Eine Mutation von K1195 in Tiam1 hat vergleichbare Auswirkungen wie eine Mutation des  $^{166}\text{GAGA}^{169}$ -Motivs in SopE. Die Verdrängung des  $\text{Mg}^{2+}$  aus der Bindungstasche geschieht im Fall von Tiam1 durch eine Annäherung von L1198<sub>Tiam1</sub> in Richtung von A59<sub>Rac1</sub>. Bei anderen eukaryontischen GEFs wird diese Aufgabe ebenfalls von Aminosäuren mit großen Seitenketten übernommen: Bei Trio ist K1372 verantwortlich, bei Sos L938 (Hall *et al.*, 2001). Trotz dieser ähnlichen mechanistischen Wirkungsweise stellt SopE somit eine völlig neue Klasse von G-Nukleotid-Austauschfaktoren dar.



**Abbildung 29: Der Vergleich von Tiam1 (links) mit SopE (rechts).** Trotz des ähnlichen katalytischen Mechanismus von SopE und Tiam1 verwenden beide GEFs unterschiedliche Strukturen (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von G. Buchwald und K. Scheffzek).

#### 4. Interaktion von SopE und SopE2 mit RhoGTPasen des Wirts

In der Zelle können SopE und SopE2 durch die Interaktion mit Cdc42 und Rac1 unter anderem die Signaltransduktionswege der Aktinreorganisation und Transkriptionsaktivierung aktivieren. Da die biochemischen Konstanten des SopE- und SopE2-vermittelten Nukleotidaustauschs denen der eukaryontischen GEFs sehr ähnlich sind (SopE·Cdc42-Komplex:  $k_{ass} = 1,6 \pm 0,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{diss} = 4,5 \pm 1,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ; SopE2·Cdc42-Komplex:  $k_{ass} = 4,0 \pm 1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{diss} = 2,1 \pm 0,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ; Ras/Cdc25:  $k_{ass} = 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{diss} = 1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ), müssen *Salmonella* spp. Mechanismen entwickelt haben, um durch die Injektion von SopE intrazellulär einen Vorteil gegenüber zellulären GEFs zu besitzen (Klebe *et al.*, 1995; Lenzen *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 1999a; Stender *et al.*, 2000).

Bei der Etablierung einer Infektion stellt die Invasion in die Wirtszellen einen wichtigen ersten Schritt dar. *Salmonella* spp. müssen daher durch die früh translozierten Effektoren eine Aufnahme in die Zelle gewährleisten. Durch die parallele Translokation von SopE und SopE2 und eine mögliche verstärkte Aktivierung von Cdc42 und die zusätzliche Aktivierung von Rac1 durch SopE erhöht sich die Effizienz, die Signaltransduktion schnell zu aktivieren. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass SopE in seiner Fähigkeit, Invasion in Wirtszellen zu vermitteln, überdimensioniert ist. Es wäre möglich, dass *S. typhimurium* auf diese Weise sicherstellt, dass auch bei niedrigem Inokulum eine effiziente Induktion der RhoGTPase-Signaltransduktion stattfindet.

Wie können sich *Salmonella* spp. hier gegenüber den GEFs des Wirts durchsetzen, wenn die kinetischen Konstanten für SopE und SopE2 denen zellulärer GEFs sehr ähnlich sind? Als Grund hierfür könnte die Abwesenheit einer regulatorischen Domäne in SopE genannt werden, die in Verbindung mit einer hohen SopE-Konzentration am Ort der Translokation einen Konkurrenzvorteil für das bakterielle Protein mit sich bringt.

Der Wirt selbst hat dabei kaum Möglichkeiten, sich durch Variation der SopE-Zielproteine dem Einfluss des Pathogens zu entziehen. Aufgrund der universellen Konservierung und der Bedeutung der RhoGTPasen und des komplexen Netzwerkes aus GTPasen, Effektoren und Regulatoren würden tiefgreifende Mutationen auch die Wirkung der eigenen zellulären GEFs blockieren.

## 5. Bedeutung der Spezifität

Wozu jedoch verfügt *Salmonella* über zwei homologe Effektoren, die doch im Zellkulturmodell auch alleine schon eine vergleichbar effiziente Invasion der *Salmonella* spp. in Wirtszellen vermitteln können? Bisher wurde die pathogene Effizienz von Epidemiestämmen wie DT204 nur auf den Gendosis-Effekt zurückgeführt. In dieser Arbeit konnte jetzt gezeigt werden, dass SopE und SopE2 zwar homolog, aber funktionell nicht identisch sind. Transloziertes SopE aktiviert sowohl Cdc42 als auch Rac1, während SopE2 auf direktem Wege nur Cdc42, aber nicht Rac1 aktivieren kann.

Der erste Schritt, die Invasion in Wirtszellen, kann somit durch die Anwesenheit von SopE2 und SopE doppelt abgesichert werden. In der Zelle schließlich, wo die Signaltransduktionswege durch ein hohes Maß an Vernetzung charakterisiert sind, kann durch SopE und SopE2 sowohl eine parallele stärkere Aktivierung (über Cdc42) als auch eine selektive Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege (über die differenzielle Aktivierung von Cdc42 und Rac1) stattfinden. Diese biochemischen Differenzen von SopE und SopE2 konnten in Zellkulturversuchen auch *in vivo* nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass infolge der differenziellen Aktivierung von Rac1 und Cdc42 durch SopE und SopE2 auch die SopE- und SopE2-induzierten Membranumlagerungen in Wirtszellen eine andere Morphologie aufweisen. Durch die Aktivierung von Cdc42 und/oder Rac1 können in der Wirtszelle zahlreiche stromabwärts gelegene zelluläre Effektoren aktiviert werden. Eine Übersicht ist in Tabelle 22 gegeben. Offensichtlich verfügt die Zelle über eine Vielzahl von Effektoren, die sowohl von

Cdc42 als auch Rac1 gemeinsam aktiviert werden können, während andere Effektoren spezifisch durch Rac1 oder Cdc42 aktivierbar sind. Dies ist auch von zellulären GEFs bekannt: Während Fgd1 und Tiam1 ebenso wie SopE mit Cdc42 und Rac1 interagieren können (Michiels *et al.*, 1995; Hordijk *et al.*, 1997), kann Vav den Austausch an RhoA, RhoG, Rac1 und Cdc42 vermitteln (Han *et al.*, 1997).

**Tabelle 22: Potentielle Effektorproteine von Cdc42 und Rac1.** Nach Bishop und Hall (2000) werden einige der aufgelisteten Effektorproteine durch Cdc42 und Rac1 aktiviert, einige sind spezifisch durch Cdc42 oder Rac1 aktivierbar. Abkürzungen und Referenzen sind Bishop und Hall (2000) zu entnehmen. ?: bisher unbekannt.

Effektor	Einfluss auf ...	Aktivierung durch Cdc42	Aktivierung durch Rac1
MLK	JNK	+	+
MEKK1, 4	JNK	+	+
PAK1, 2, 3	JNK, Aktin	+	+
PI3K	PIP <sub>3</sub> -Level	+	+
PLD	PA-Level	+	+
PLC-β2	DAG/IP <sub>3</sub> -Level	+	+
IQGAP1, 2	Aktin, Zell-Zell-Kontakte	+	+
p70 S6-Kinase	Translationsregulation	?	+
MRCK α, β	Aktin	+	-
PAK4	Aktin	+	-
WASP, N-WASP	Aktin	+	-
Ack1, 2	?	+	-
CIP-4	?	+	-
MSE55, BORGs	?	+	-
PI-4-P5K	PIP <sub>2</sub> -Level, Aktin	-	+
DAG-Kinase	PA-Level	-	+
WAVE/Scar	Aktin	-	+
POR-1	Aktin	-	+
p140Sra-1	Aktin	-	+
p67 <sup>phox</sup>	NADPH-Oxidase	-	+
POSH	?	-	+

Interessant sind hier im Hinblick auf die differenzielle Substratspezifität vor allem jene Effektoren, die spezifisch von einer Rac1-Aktivierung angesprochen werden und somit durch SopE, nicht aber durch SopE2 direkt aktiviert werden können. Welche dieser Effektoren aber für



den möglichen biologischen Vorteil verantwortlich sein könnten, den *sopE*-positive *S. typhimurium*-Stämme zu haben scheinen, ist derzeit noch unklar.

Unter Umständen würde auch eine unterschiedliche Gewichtung verschiedener Rac1/Cdc42-abhängiger Transduktionswege in verschiedenen Organismen sowie ein unterschiedliches zelluläres Milieu den Nutzen zweier homologer SopE-Proteine mit differenzieller Substratspezifität erklären. Dadurch wären *Salmonella* spp. deutlich besser an unterschiedliche Bedingungen angepasst, wenn sie über beide Homologe verfügen.

Bereits früher konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von SopE und SopE2 in der Zelle unterschiedlich ist (Stender *et al.*, 2000). Während SopE vornehmlich in den Gebieten starker Aktinpolymerisation lokalisiert ist, findet man SopE2 über das ganze Zytoplasma verteilt. Ob allerdings diese unterschiedliche Lokalisation in Verbindung mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur Spezifität eine tiefgreifende funktionelle Bedeutung hat, muss noch untersucht werden.

Bisher ist auch nicht bekannt, ob SopE und SopE2 zum gleichen Zeitpunkt oder zeitlich versetzt in die Wirtszelle transloziert werden. Auch hier könnte die differenzielle Substratspezifität von Bedeutung sein. Da jedoch vor allem die Signaltransduktionswege, die zur Transkriptionsaktivierung führen, noch nicht geklärt sind, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht absehbar, welche Rolle die festgestellte differenzielle Spezifität von SopE und SopE2 im Wechselspiel mit dem Wirt wirklich spielt.

## F. ZUSAMMENFASSUNG

Während der Abspaltung von der *E. coli*-Linie wurde durch die Aufnahme der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 der Grundstein für die Entwicklung vom Kommensalen zum Pathogen gelegt. Die hier kodierten Effektoren vermitteln ebenso wie einige außerhalb von SPI1 gelegene Effektoren (z. B. SopE2) zentrale Virulenzeigenschaften. Zusätzlich zu diesen konservierten Genen gibt es einige variable Effektoren wie SopE, die erst in jüngerer Zeit erworben wurden und auch heute noch durch horizontalen Transfer zwischen verschiedenen *Salmonella*-Stämmen weitergegeben werden. Sie dienen wahrscheinlich der Optimierung der Wechselwirkung mit dem Wirt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die G-Nukleotidaustauschfaktoren SopE und das zu 69 % homologe SopE2 eine differenzielle Substratspezifität gegenüber den RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 besitzen. Während SopE und SopE2 vergleichbar gut an Cdc42 binden, wird Rac1 von SopE deutlich stärker gebunden als von SopE2. Die schwächere Bindung von Rac1 an SopE2 führt in der Folge zu einer deutlich schwächeren Aktivierung von Rac1. Zellkulturversuche haben gezeigt, dass diese biochemischen Unterschiede zumindest in einigen Zelltypen zu unterschiedlichen Antworten (z. B. Morphologie des Aktinzytoskeletts) führen. Es ist zu vermuten, dass die Unterschiede der molekularen Eigenschaften von SopE und SopE2 einen Selektionsvorteil für *S. typhimurium*-Stämme darstellen, die beide SopE-Homologe besitzen.

Bei der Analyse der Kristallstruktur des SopE-Cdc42-Komplexes zeigte sich, dass SopE eine von der Struktur zellulärer GEFs unabhängige Lösung gefunden hat, den Nukleotidaustausch an RhoGTPasen zu katalysieren. In einer Mutagenesestudie konnten diejenigen Aminosäuren identifiziert werden, die das katalytische Zentrum von SopE bilden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass das katalytische Zentrum von SopE durch das <sup>166</sup>GAGA<sup>169</sup>-Motiv repräsentiert ist. Dieses Motiv weist keine Ähnlichkeiten zur katalytischen DH-Domäne eukaryontischer Rho-GEFs auf. Das deutet darauf hin, dass SopE durch konvergente Evolution entstanden sein muss.

In ähnlicher Weise wie in dieser Arbeit könnten auch in Eukaryonten durch funktionelle Analysen noch weitere, bisher unbekannte GEF-Familien identifiziert werden, deren Untersuchung das Verständnis der zellulären Signaltransduktionswege weiter fördern könnte.

## G. ABKÜRZUNGEN

Amp	Ampicillin	$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-Phenylindol	$k_{ass}$	Assoziationskonstante
DH	Dbl-Homologie	$k_{diss}$	Dissoziationskonstante
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“	$k_{obs}$	Enzymatische Geschwindigkeitskonstante
DTT	Dithiothreitol	LB	Luria Bertani-Medium
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	mant	2'- (oder 3')-O-(N-Methylantraniloyl)-Guanosin-5'-diphosphat
ECL	„Enhanced chemoluminescence“	MOI	„multiplicity of infection“
FCS	„Fetal calf serum“	MWCO	„Molecular Weight Cutoff“
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat	OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
GAP	GTPase-aktivierendes Protein	PBS	„Phosphate Buffered Saline“
GDI	G-Nukleotid-Dissoziationsinhibitor	PH	Pleckstrin-Homologie
GEF	G-Nukleotidaustauschfaktor	<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
GSH	Glutathion	SPI	<i>Salmonella</i> -Pathogenitätsinsel
GST	Glutathion-S-Transferase	spp.	nur bis auf die Genus-Ebene typisierte Bakterienstämme
GTP $\gamma$ S	Guanosin-5'-O-(3-Thiotriphosphat)	tet	Tetrazyklin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid	TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
$k_{cat}$	enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit	Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat
HBSS	„Hank's Buffered Salt Solution“	TY	„tryptone-yeast extract“
Igepal CA-630	Octylphenoxypolyethoxyethanol	$v_{max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Internationale Standardabkürzungen wurden nach den Empfehlungen der IUBMB verwendet (*Eur J Biochem* (1998) 251, 5-7.)

## H. LITERATURVERZEICHNIS

### A

- Aghazadeh, B.**, Zhu, K., Kubiseski, T. J., Liu, G. A., Pawson, T., Zheng, Y., und Rosen, M. K. (1998) *Nat Struct Biol* 5, 1098-1107.
- Aktories, K.** (1997) *J Clin Invest* 99, 827-829.
- Aspenstrom, P.** (1999) *Exp Cell Res* 246, 20-25.

### B

- Bakshi, C. S.**, Singh, V. P., Wood, M. W., Jones, P. W., Wallis, T. S., und Galyov, E. E. (2000) *J Bacteriol* 182, 2341-2344.
- Bäumler, A. J.**, Gilde, A. J., Tsohis, R. M., van der Velden, A. W., Ahmer, B. M., und Heffron, F. (1997) *J Bacteriol* 179, 317-322.
- Bäumler, A. J.**, Tsohis, R. M., Ficht, T. A., und Adams, L. G. (1998) *Infect Immun* 66, 4579-4587.
- Bäumler, A. J.**, Tsohis, R. M., und Heffron, F. (1996) *Infect Immun* 64, 1862-1865.
- Bäumler, A. J.**, Tsohis, R. M., und Heffron, F. (1997) *Adv Exp Med Biol* 412, 149-158.
- Betz, S. F.**, Schnuchel, A., Wang, H., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Lipsky, B. P., Harris, E. A., Staunton, D. E., und Fesik, S. W. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7909-7914.
- Bishop, A. L.**, und Hall, A. (2000) *Biochem J* 348, 241-255.
- Boguski, M. S.**, und McCormick, F. (1993) *Nature* 366, 643-654.
- Boriack-Sjodin, P. A.**, Margarit, S. M., Bar-Sagi, D., und Kuriyan, J. (1998) *Nature* 394, 337-343.
- Bourne, H. R.**, Sanders, D. A., und McCormick, F. (1990) *Nature* 348, 125-132.
- Bourne, H. R.**, Sanders, D. A., und McCormick, F. (1991) *Nature* 349, 117-127.
- Bowe, F.**, Lipps, C. J., Tsohis, R. M., Groisman, E., Heffron, F., und Kusters, J. G. (1998) *Infect Immun* 66, 3372-3377.
- Boyd, E. F.**, Wang, F. S., Whittam, T. S., und Selander, R. K. (1996) *Appl Environ Microbiol* 62, 804-808.
- Brenner, F. W.**, Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., und Swaminathan, B. (2000) *J Clin Microbiol* 38, 2465-2467.
- Buchwald, G.**, Friebel, A., Galán, J. E., Hardt, W. D., Wittinghofer, A., und Scheffzek, K. (2002) *EMBO* 21 (13).

**Bullock, W.O.**, Fernandez, J.M., und Short, J.M. (1987) *Biotechniques* 5, 376-378.

**Burrows, W.** (1959) *Textbook of microbiology* (The W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA).

## C

**Chang, A. C Y.**, und Cohen, S. N. (1987) *J Bacteriol* 134, 1141-1156.

**Cherfils, J.**, Menetrey, J., Mathieu, M., Le Bras, G., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Antony, B., und Chardin, P. (1998) *Nature* 392, 101-105.

**Cherfils, J.**, und Chardin, P. (1999) *Trends Biochem Sci* 24, 306-311.

**Collazo, C. M.**, und Galán, J. E. (1997) *Mol Microbiol* 24, 747-756.

**Cotter, P. A.**, und DiRita, V. J. (2000) *Annu Rev Microbiol* 54, 519-565.

**Crespo, P.**, Schuebel, K. E., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S., und Bustelo, X. R. (1997) *Nature* 385, 169-172.

**Crosa, J. H.**, Brenner, D. J., Ewing, W. H. und Falkow, S. (1973) *J Bacteriol* 115, 30715.

## E

**Ewing, W. H.** (1986) *Edwards and Ewings identification of Enterobacteriaceae* (Elsevier, New York, NY).

## F

**Fauman, E. B.**, und Saper, M. A. (1996) *Trends Biochem Sci* 21, 413-417.

**Fiedler, S.**, und Wirth, R. (1988) *Anal Biochem* 170, 38-44.

**Figuroa-Bossi, N.**, Uzzau, S., Maloriol, D., und Bossi, L. (2001) *Mol Microbiol* 39, 260-271.

**Fogh J.**, Wright, W. C., und Loveless, J. D. (1977) *J Natl Cancer Inst* 58, 209-214.

**Francis, C. L.**, Ryan, T. A., Jones, B. D., Smith, S. J., und Falkow, S. (1993) *Nature* 364, 639-642.

**Frost, A. J.**, Bland, A. P., und Wallis, T. S. (1997) *Vet Pathol* 34, 369-386.

**Fu, Y.**, und Galán, J. E. (1999) *Nature* 401, 293-297.

## G

**Galán, J. E.** (1999) *Curr Opin Microbiol* 2, 46-50.

**Galán, J. E.**, und Collmer, A. (1999) *Science* 284, 1322-1328.

**Galán, J. E.**, und Zhou, D. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8754-8761.

**Garcia-del Portillo, F.**, und Finlay, B. B. (1994) *Infect Immun* 62, 4641-4645.

**Geyer, M.**, und Wittinghofer, A. (1997) *Curr Opin Struct Biol* 7, 786-792.

**Gluzman, Y.** (1981) *Cell* 23, 175-182.

**Goldberg, J.** (1998) *Cell* 95, 237-248.

**Groisman, E. A.,** und Ochman, H. (1997) *Trends Microbiol* 5, 343-349.

**Guan, K. L.,** und Dixon, J. E. (1991) *Anal Biochem* 192, 262-267.

## H

**Hacker, J.,** Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I., und Tschäpe, H. (1997) *Mol Microbiol* 23, 1089-1097.

**Hacker, J.,** und Kaper, J. B. (2000) *Annu Rev Microbiol* 54, 641-679

**Hall, A.** (1998) *Science* 279, 509-514.

**Hall, B. E.,** Yang, S. S., Boriack-Sjodin, P. A., Kuriyan, J., und Bar-Sagi, D. (2001) *J Biol Chem* 276, 27629-27637.

**Han, J.,** Das, B., Wei, W., Van Aelst, L., Mosteller, R. D., Khosravi-Far, R., Westwick, J. K., Der, C. J., und Broek, D. (1997) *Mol Cell Biol* 17, 1346-1353.

**Hanahan, D.** (1983) *J Mol Biol* 166, 557-580.

**Hansen-Wester, I.,** und Hensel, M. (2001) *Microbes Infect* 3, 549-559.

**Hardt, W. D.,** Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., und Galán, J. E. (1998b) *Cell* 93, 815-826.

**Hardt, W. D.,** und Galán, J. E. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9887-9892.

**Hardt, W. D.,** Urlaub, H., und Galán, J. E. (1998a) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2574-2579.

**Hayward, R. D.,** McGhie, E. J., und Koronakis, V. (2000) *Mol Microbiol* 37, 727-739.

**Hayward, R. D.,** und Koronakis, V. (1999) *Embo J* 18, 4926-4934.

**Henle, G.,** und Deinhardt, F. (1957) *J Virol* 4, 549-553.

**Hersh, D.,** Monack, D. M., Smith, M. R., Ghorri, N., Falkow, S., und Zychlinsky, A. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2396-2401.

**Hill, C. S.,** Wynne, J., und Treisman, R. (1995) *Cell* 81, 1159-1170.

**Hobbie, S.,** Chen, L. M., Davis, R. J., und Galán, J. E. (1997) *J Immunol* 159, 5550-5559.

**Hoffman, G. R.,** Nassar, N., und Cerione, R. A. (2000) *Cell* 100, 345-356.

**Hoiseh, S. K.,** und Stocker, B. A. (1981) *Nature* 291, 238-239.

**Hordijk, P. L.,** ten Klooster, J. P., van der Kammen, R. A., Michiels, F., Oomen, L. C., und Collard, J. G. (1997) *Science* 278, 1464-1466.

**Hueck, C. J.** (1998) *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 379-433.

**J**

**Jainchill, J. L.**, Aaronson, S. A., und Todaro, G. J. (1969) *J Virol* 4, 549-553.

**Jones, B. D.**, Ghorri, N., und Falkow, S. (1994) *J Exp Med* 180, 15-23.

**Jones, M. A.**, Wood, M. W., Mullan, P. B., Watson, P. R., Wallis, T. S., und Galyov, E. E. (1998) *Infect Immun* 66, 5799-5804.

**K**

**Kaniga, K.**, Bossio, J. C., und Galán, J. E. (1994) *Mol Microbiol* 13, 555-568.

**Kaniga, K.**, Uralil, J., Bliska, J. B., und Galán, J. E. (1996) *Mol Microbiol* 21, 633-641.

**Kjoller, L.**, und Hall, A. (1999) *Exp Cell Res* 253, 166-179.

**Klebe, C.**, Prinz, H., Wittinghofer, A., und Goody, R. S. (1995) *Biochemistry* 34, 12543-12552.

**Kozma, R.**, Ahmed, S., Best, A., und Lim, L. (1995) *Mol Cell Biol* 15, 1942-1952.

**Kubori, T.**, Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J. E., und Aizawa, S. I. (1998) *Science* 280, 602-605.

**Kubori, T.**, Sukhan, A., Aizawa, S. I., und Galán, J. E. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10225-10230.

**Kühn, H.**, und Tschäpe, H. (1995) *Salmonellose des Menschen* (RKI-Schriften; MMV Medizin Verlag, München)

**L**

**Lamarche, N.**, und Hall, A. (1994) *Trends Genet* 10, 436-440.

**Lämmli, U. K.** (1970) *Nature* 227, 680-685.

**Le Minor, L.**, Popoff, M. Y., Laurent, B. und Hermant, D. (1986) *Ann Inst Pasteur Microbiol* 137 B, 211-217.

**Leclerc, G. J.**, Tartera, C. und Metcalf, E. S. (1998) *Infect Immun* 66, 682-691.

**Lee, C. A.**, Silva, M., Siber, A. M., Kelly, A. J., Galyov, E., und McCormick, B. A. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12283-12288.

**Lenzen, C.**, Cool, R. H., Prinz, H., Kuhlmann, J., und Wittinghofer, A. (1998) *Biochemistry* 37, 7420-7430.

**Lerm, M.**, Schmidt, G., und Aktories, K. (2000) *FEMS Microbiol Lett* 188, 1-6.

**Libby, S. J.**, Lesnick, M., Hasegawa, P., Weidenhammer, E., und Guiney, D. G. (2000) *Cell Microbiol* 2, 49-58.

**Liu, X.**, Wang, H., Eberstadt, M., Schnuchel, A., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Schkeryantz, J. M., Janowick, D. A., Harlan, J. E., Harris, E. A., Staunton, D. E., und Fesik, S. W. (1998) *Cell* 95, 269-277.

## M

**Machesky, L. M.**, und Gould, K. L. (1999) *Curr Opin Cell Biol* 11, 117-121.

**Machesky, L. M.**, und Insall, R. H. (1998) *Curr Biol* 8, 1347-1356.

**Machesky, L. M.**, und Insall, R. H. (1999) *J Cell Biol* 146, 267-272.

**Mackay, D. J.**, und Hall, A. (1998) *J Biol Chem* 273, 20685-20688.

**Manoil, C.**, und Beckwith, J. (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8129-8133.

**Matozaki, T.**, Nakanishi, H., und Takai, Y. (2000) *Cell Signal* 12, 515-524.

**McClelland, M.**, Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., und Wilson, R. K. (2001) *Nature* 413, 852-856.

**Mead, P. S.**, Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., und Tauxe, R. V. (1999) *Emerg Infect Dis* 5, 607-625.

**Mecenas, J. J.**, und Strauss, E. J. (1996) *Emerg Infect Dis* 2, 270-288.

**Miao, E. A.**, Scherer, C. A., Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Adams, L. G., Bäumlner, A. J., und Miller, S. I. (1999) *Mol Microbiol* 34, 850-864.

**Michiels, F.**, Habets, G. G., Stam, J. C., van der Kammen, R. A., und Collard, J. G. (1995) *Nature* 375, 338-340.

**Miller, J. H.** (1972) *Experiments in molecular genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, NY).

**Miller, S. I.**, und Pegues, D. A. (2000) *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Churchill Livingstone, Philadelphia)

**Miold, S.**, Ehrbar, K., Weissmüller, A., Prager, R., Tschäpe, H., Rüssmann, H., und Hardt, W. D. (2001) *J Bacteriol* 183, 2348-2358.

**Miold, S.**, Rabsch, W., Rohde, M., Stender, S., Tschäpe, H., Rüssmann, H., Igwe, E., und Hardt, W. D. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9845-9850.

**Mossessova, E.**, Gulbis, J. M., und Goldberg, J. (1998) *Cell* 92, 415-423.



**N**

- Nassar, N.**, Hoffman, G. R., Manor, D., Clardy, J. C., und Cerione, R. A. (1998) *Nat Struct Biol* 5, 1047-1052.
- Nobes, C. D.**, und Hall, A. (1995) *Biochem Soc Trans* 23, 456-459.
- Norris, F. A.**, Wilson, M. P., Wallis, T. S., Galyov, E. E., und Majerus, P. W. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14057-14059.

**P**

- Pang, T.**, Bhutta, Z. A., Finlay, B. B., und Altwegg, M. (1995) *Trends Microbiol* 3, 253-255.
- Pang, T.**, Levine, M. M., Ivanoff, B., Wain, J., und Finlay, B. B. (1998) *Trends Microbiol* 6, 131-133.
- Paterson, H. F.**, Self, A. J., Garrett, M. D., Just, I., Aktories, K., und Hall, A. (1990) *J Cell Biol* 111, 1001-1007.
- Pelech, S. L.** (1996) *Curr Biol* 6, 551-554.
- Popoff, M. Y.**, Bockemühl, J., und McWhorter-Murlin, A. (1992) *Res Microbiol* 143, 807-811.
- Popoff, M. Y.**, und Le Minor, L. (1997) *Antigenic Formulas of the Salmonella Serovars* (Institut Pasteur, Paris) 7<sup>th</sup> Edition.
- Prager, R.**, Miold, S., Tietze, E., Strutz, U., Knuppel, B., Rabsch, W., Hardt, W. D., und Tschäpe, H. (2000) *Int J Med Microbiol* 290, 605-617.
- Puck, T.T.**, und Marcus, P. I. (1955) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 41, 432-437.

**R**

- Reeves, M. W.**, Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D., und Farmer, J. J., 3rd. (1989) *J Clin Microbiol* 27, 313-320.
- Renault, L.**, Kuhlmann, J., Henkel, A., und Wittinghofer, A. (2001) *Cell* 105, 245-255.
- Renault, L.**, Nassar, N., Vetter, I., Becker, J., Klebe, C., Roth, M., und Wittinghofer, A. (1998) *Nature* 392, 97-101.
- Ridley, A. J.**, und Hall, A. (1992) *Cell* 70, 389-399.
- Rittinger, K.**, Walker, P. A., Eccleston, J. F., Smerdon, S. J., und Gamblin, S. J. (1997) *Nature* 389, 758-762.
- Romani, A. M.**, und Scarpa, A. (2000) *Front Biosci* 5, D720-734.
- Rosqvist, R.**, Magnusson, K. E., und Wolf-Watz, H. (1994) *Embo J* 13, 964-972.
- Rotger, R.**, und Casadesus, J. (1999) *Int Microbiol* 2, 177-184.

**Rudolph, M. G.**, Weise, C., Miold, S., Hillenbrand, B., Bader, B., Wittinghofer, A., und Hardt, W. D. (1999a) *J Biol Chem* 274, 30501-30509.

**Rudolph, M. G.**, Wittinghofer, A., und Vetter, I. R. (1999b) *Protein Sci* 8, 778-787.

## S

**Salama, N. R.**, und Falkow, S. (1999) *Microbes Infect* 1, 615-619.

**Sambrook, J.**, Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)

**Sander, E. E.**, van Delft, S., ten Klooster, J. P., Reid, T., van der Kammen, R. A., Michiels, F., und Collard, J. G. (1998) *J Cell Biol* 143, 1385-1398.

**Sasaki, T.**, und Takai, Y. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* 245, 641-645.

**Scheffzek, K.**, Stephan, I., Jensen, O. N., Illenberger, D., und Gierschik, P. (2000) *Nat Struct Biol* 7, 122-126.

**Schesser, K.**, Dukuzumuremyi, J. M., Cilio, C., Borg, S., Wallis, T. S., Pettersson, S., und Galyov, E.E. (2000) *Microb Pathog* 28, 59-70.

**Shimizu, M.**, Wang, W., Walch, E. T., Dunne, P. W., und Epstein, H. F. (2000) *FEBS Lett* 475, 273-277.

**Soisson, S. M.**, Nimnual, A. S., Uy, M., Bar-Sagi, D., und Kuriyan, J. (1998) *Cell* 95, 259-268.

**Stebbins, C. E.**, und Galán, J. E. (2000) *Mol Cell* 6, 1449-1460.

**Stender, S.**, Friebel, A., Linder, S., Rohde, M., Miold, S., und Hardt, W. D. (2000) *Mol Microbiol* 36, 1206-1221.

**Studier, F. W.**, und Moffatt, B. A. (1986) *J Mol Biol* 189, 113-130.

**Sulciner, D. J.**, Irani, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Goldschmidt-Clermont, P., und Finkel, T. (1996) *Mol Cell Biol* 16, 7115-7121.

## T

**Takai, Y.**, Kaibuchi, K., Kikuchi, A., Sasaki, T., und Shirataki, H. (1993) *Ciba Found Symp* 176, 128-138.

**Takai, Y.**, Kaibuchi, K., Kikuchi, A., und Kawata, M. (1992) *Int Rev Cytol* 133, 187-230.

**Takeuchi, A.** (1967) *Am J Pathol* 50, 109-136.

**Treisman, R.** (1996) *Curr Opin Cell Biol* 8, 205-215.

**Tsolis, R. M.**, Townsend, S. M., Miao, E. A., Miller, S. I., Ficht, T. A., Adams, L. G., und Bäumlner, A. J. (1999) *Infect Immun* 67, 6385-6393.

**V**

**Van Aelst, L.**, und D'Souza-Schorey, C. (1997) *Genes Dev* 11, 2295-2322.

**Vetter, I. R.**, und Wittinghofer, A. (2001) *Science* 294, 1299-1304.

**W**

**Wallis, T. S.**, und Galyov, E. E. (2000) *Mol Microbiol* 36, 997-1005.

**Whitehead, I. P.**, Campbell, S., Rossman, K. L., Der, C. J. (1997) *Biochim Biophys Acta* 1332, F1-F23.

**Wood, M. W.**, Jones, M. A., Watson, P. R., Siber, A. M., McCormick, B. A., Hedges, S., Rosquist, R., Wallis, T. S., und Galyov, E. E. (2000) *Cell Microbiol* 2, 293-303.

**Wood, M. W.**, Rosqvist, R., Mullan, P. B., Edwards, M. H., und Galyov, E. E. (1996) *Mol Microbiol* 22, 327-338.

**Worthylake, D. K.**, Rossman, K. L., und Sondek, J. (2000) *Nature* 408, 682-688.

**X**

**Xu, X.**, Barry, D. C., Settleman, J., Schwartz, M. A., und Bokoch, G. M. (1994) *J Biol Chem* 269, 23569-23574.

**Z**

**Zhang, B.**, Zhang, Y., Wang, Z., und Zheng, Y. (2000) *J Biol Chem* 275, 25299-25307.

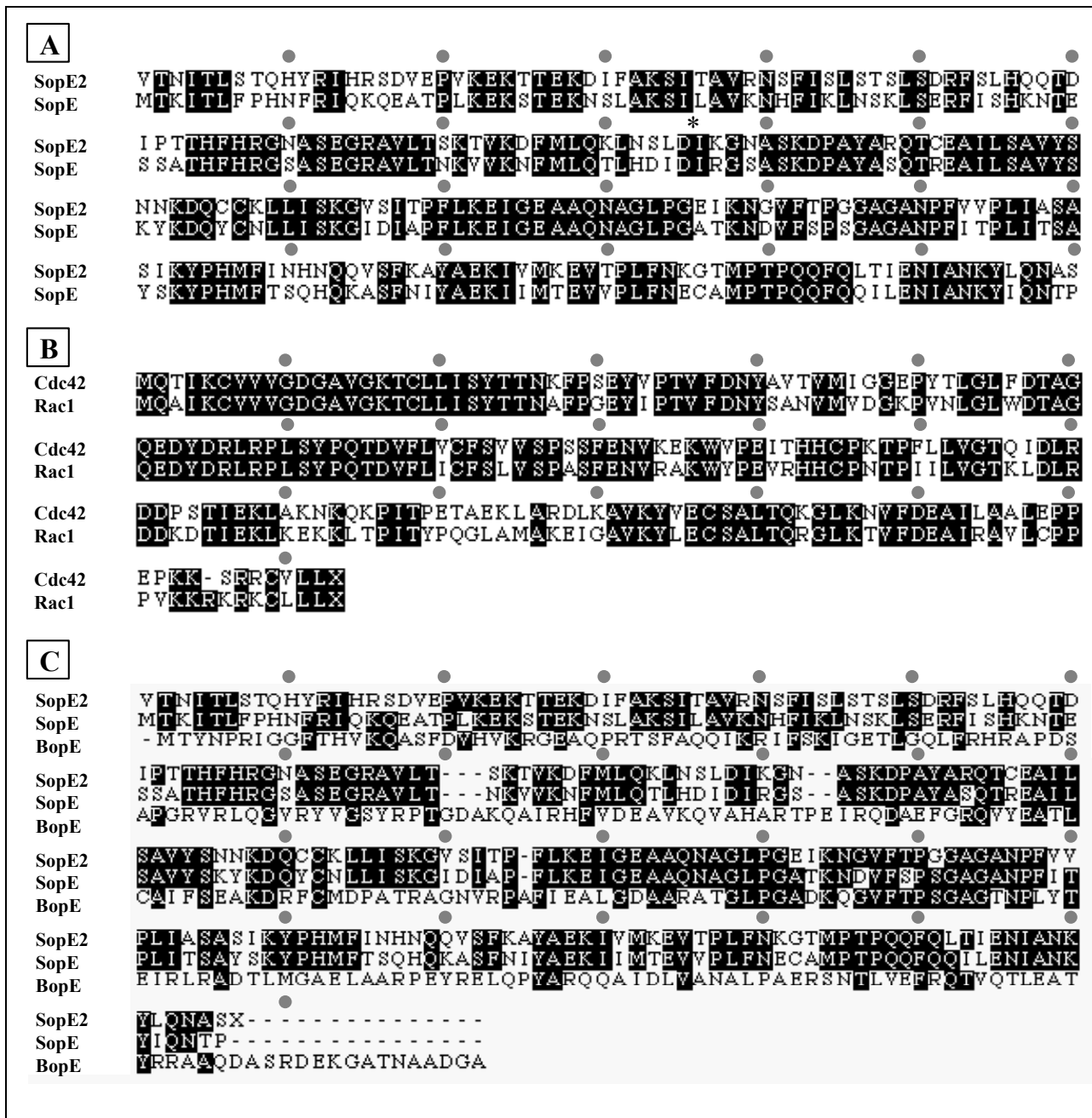
**Zhou, D.**, Chen, L. M., Hernandez, L., Shears, S. B., und Galán, J. E. (2001) *Mol Microbiol* 39, 248-259.

**Zhou, D.**, Mooseker, M. S., und Galán, J. E. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10176-10181.

**Zhou, D.**, Mooseker, M. S., und Galán, J. E. (1999) *Science* 283, 2092-2095.

**Zierler, M. K.**, und Galán, J. E. (1995) *Infect Immun* 63, 4024-4028.

## I. ANHANG



**Abbildung 30: Protein-Sequenzvergleiche.** Die Primärsequenzen der in dieser Arbeit verwendeten GEFs SopE, SopE2 (*S. typhimurium*) und BopE (*Burkholderia mallei*) wurden ebenso miteinander abgeglichen wie die Primärsequenzen der zellulären RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 (humane Sequenz). Unterschiedliche Aminosäurereste sind schwarz auf weißem Grund dargestellt, identische Reste sind schwarz unterlegt. Die grauen Punkte markieren jeden zehnten Aminosäurerest. **A.** Vergleich zwischen SopE2 und SopE. \* (zwischen Aminosäureposition 95 und 96) markiert die Stelle, an der die N-terminale und C-terminale Domäne von SopE und SopE2 zur Eingrenzung des Translokationssignals wechselweise zusammengesetzt wurden. **B.** Vergleich zwischen Cdc42 und Rac1. **C.** Vergleich zwischen SopE2, SopE und BopE.

## **J. DANKSAGUNG**

Mein Dank gilt

- meinem Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt, der viele Ideen einbrachte und nach dem „geht nicht gibt's nicht“-Prinzip stets das Fortschreiten dieser Arbeit unterstützte.
- meinem Doktorvater Prof. Dr. August Böck, der sich bereit erklärte, die Betreuung dieser externen Arbeit zu übernehmen.
- den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alfred Wittinghofer am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund, vor allem Gretel Buchwald und Alexander Wolf, für die freundliche Aufnahme und die fruchtbare Zusammenarbeit bei der Kristallisation von SopE und der anschließenden Mutagenesestudie.
- Klaus Scheffzek vom EMBL in Heidelberg für seinen „Kristallographenblick“ zur Identifizierung mutationswürdiger Aminosäuren in SopE.
- Werner Machleidt und Irmgard Assfalg-Machleidt vom Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie, die mir das Biacore-Gerät und ihre Erfahrung zur Verfügung stellten.
- allen Mitarbeitern des Max von Pettenkofer-Instituts für die Kooperation und die stete Diskussionsbereitschaft, vor allem auch Gabi Liegl für die tatkräftige Unterstützung bei so mancher Proteinaufreinigung.
  
- den „sieben Geißlein“ Susanne, Silke, Manja, Kristin, Sigi, Cosima und Bärbel dafür, dass sie stets ein offenes Ohr hatten, wenn man mal einen fachlichen Rat brauchte. Neben den Highlights des Forschungsalltages werde ich immer auch an die unterhaltsamen Stunden in unserer „hardt arbeitenden“ Laborgemeinschaft zurückdenken.
  
- meinen Eltern, meinem Freund und vielen anderen für ihr stetes Interesse an meiner Arbeit und die Unterstützung, die sie mir in diesen drei Jahren zuteil werden ließen.

## **K. LEBENSLAUF**

### **Angaben zur Person**

Name: Andrea Friebel  
Geburtsdatum: 27. Juli 1972  
Geburtsort: München  
Familienstand: ledig

Eltern: Brigitte Friebel  
Erich Friebel

### **Ausbildung**

1979-1983: Wittelsbacher-Grundschule in Germering  
1983-1992: Max-Born-Gymnasium Germering, Abitur  
1992-1993: Studium der Medizin an der Universität Ulm  
1993-1999: Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München,  
Diplom  
1999-2002: Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Max von Pettenkofer-  
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München im Labor von Prof.  
Dr. Wolf-Dietrich Hardt unter der Leitung von Prof. Dr. A. Böck