

**Wirkung der *Yersinia*-translozierten Effektorproteine
YopT und YopO
auf GTPasen der Rho-Familie**

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Beatrix Lehnert
aus
München

März 2005

Dissertation eingereicht am: 22.03.2005

Erstgutachter: Prof. Dr. Charles N. David

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung

Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2005

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	<i>Yersinia enterocolitica</i>	3
2.2	pYV-Plasmid	4
2.2.1	Typ III Sekretions- und Translokationsapparat (TTSS)	5
2.2.2	Effektorproteine	7
2.2.2.1	YopH	7
2.2.2.2	YopE	8
2.2.2.3	YopM	9
2.2.2.4	YopP	10
2.2.2.5	YopO	10
2.2.2.6	YopT	12
2.2.3	Chaperone	13
2.3	RhoGTPasen	14
2.3.1	RhoGTPasen und ihre Wirkungsweise	14
2.3.2	RhoGTPasen und die Organisation des Zytoskeletts	16
2.3.3	RhoGTPasen und Immunantwort	17
2.3.4	RhoGTPasen als Angriffspunkt für bakterielle Pathogenitätsfaktoren	18
2.4	Ziel der Arbeit	18
3	Ergebnisse	19
3.1	YopT	19
3.1.1	Reinigung von YopT	19
3.1.1.1	Klonierung des codierenden Genabschnitts von YopT	19
3.1.1.2	Reinigung von YopT	20
3.1.2	Nachweis der biologischen Aktivität des rekombinanten YopT	22
3.1.2.1	Einfluss von YopT auf das Aktinzytoskelett nach Mikroinjektion	22

3.1.2.2 Analyse der elektrophoretischen Eigenschaften von RhoA nach Einfluss von YopT <i>in vitro</i>	23
3.1.2.3 Einfluss von YopT auf das Membranbindungsverhalten von RhoA <i>in vitro</i>	25
3.1.3 YopT-Interaktionsstudie mit RhoGTPasen	26
3.1.4 YopT trennt den Komplex zwischen RhoA und RhoGDI	27
3.1.5 Einfluss von YopT auf den Komplex zwischen RhoGDI und Rac1 bzw. Cdc42	30
3.1.6 Co-Immünpräzipitation des RhoGTPase/RhoGDI-Komplexes aus zytosolischen Fraktionen nach Infektion mit <i>Yersinia</i> -Stämmen	32
3.1.7 Abspaltung der RhoGTPasen von GST-GDI durch YopT	33
3.1.8 Analyse von Rac1 mittels 2D-Gelelektrophorese nach Interaktion mit YopT	34
3.1.9 Einfluss von YopT auf RhoGDI	35
3.1.10 Analyse des Bindungsverhaltens der RhoGTPasen an ihre Effektoren nach Interaktion mit YopT	37
3.2 YopO	39
3.2.1 Bindung von RhoA und Rac1 an GST-YopO	39
3.2.2 Analyse des Bindungsverhaltens der RhoGTPasen an ihre Effektoren nach Infektion mit WA-C(pTTSS + pACYC-yopO)	41
3.3 YopT und YopO	42
3.3.1 Membranbindungsverhalten von RhoA und Rac1 nach Infektionen	42
3.3.2 Inkubation von nativen Membranfraktionen mit gereinigten YopT- bzw. YopO-Proteinen	44
3.4 Kristallisationsversuche	46
3.4.1 Reinigung von YopT/SycT	46
3.4.2 Kristallisation von SycT	47
4 Diskussion	50
4.1 Reinigung von GST-YopT und Nachweis der biologischen Aktivität	50
4.2 Interaktion von YopT mit RhoA und deren Auswirkung	53
4.3 Interaktion von YopT mit den RhoGTPasen Rac1 und Cdc42 und deren Auswirkung	55
4.4 Einfluss von YopT auf RhoGDI	58
4.5 Interaktion von YopO mit RhoA und Rac1	60

4.6	Aktivitätsstatus der RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 nach Einfluss von YopT und YopO	61
4.7	Membranbindungsverhalten von RhoA und Rac1 nach Einfluss von YopT und YopO	64
4.8	Zusammenfassende Übersicht über die Wirkungsweisen von YopT und YopO	66
4.9	Kristallisation von SycT	69
5	Material und Methoden	71
5.1	Material	71
5.1.1	Bakterienstämme	71
5.1.1.1	<i>E. coli</i>	71
5.1.1.2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	71
5.1.2	Eukaryotische Zelllinien und Kulturmedien	72
5.1.3	Oligonukleotide und Plasmide	72
5.1.3.1	Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide	72
5.1.3.2	Expressionsvektoren und klonierte Gene	73
5.1.4	Enzyme	74
5.1.4.1	Restriktionsenzyme	74
5.1.4.2	Enzyme für die PCR, Ligation und Proteinreinigung bzw. –spaltung	74
5.1.5	Antikörper	75
5.1.5.1	Primäre Antikörper für indirekte Immundetektion nach SDS-PAGE und Western Transfer sowie für Immunpräzipitationen	75
5.1.5.2	Sekundäre Antikörper für Western Transfer-Analysen	75
5.1.6	Chemikalien	76
5.1.7	Kits	77
5.1.8	Weitere Materialien	77
5.1.9	Geräte	77
5.2	Methoden	79
5.2.1	Molekularbiologische Methoden	79
5.2.1.1	Präparation von DNA	79
5.2.1.2	Analyse von DNA	79

5.2.1.3 Enzymatische Behandlung von DNA	80
5.2.2 Biochemische Methoden	83
5.2.2.1 GST-System	83
5.2.2.2 Reinigung von SycT für Kristallisationsversuche	86
5.2.2.3 Proteinquantifizierung	88
5.2.2.4 Protein-Analysen	89
5.2.2.5 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen („Pulldown-Versuche“)	91
5.2.2.6 Immunpräzipitationsanalysen	92
5.2.2.7 GTP/GDP-Beladung der RhoGTPasen	92
5.2.3 Mikrobiologische Methoden	93
5.2.3.1 <i>E.coli</i>	93
5.2.3.2 <i>Y. enterocolitica</i>	94
5.2.4 Zellbiologische Methoden	95
5.2.4.1 Kultivierung von HeLa-Zellen	95
5.2.4.2 Lysieren von HeLa-Zellen	96
5.2.4.3 Infektion von HeLa-Zellen mit <i>Yersinia</i>	97
5.2.4.4 Mikroinjektion von HeLa-Zellen	98
5.2.4.5 Färbung des Aktinzytoskeletts mit Rhodamin-Phalloidin	99
6 Anhang	100
Abkürzungen	100
Sequenz von yopT/sycT	102
Sequenz von YopO	104
7 Literaturverzeichnis	105
Danksagung	119
Lebenslauf	121
Ehrenwörtliche Versicherung	122

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte mittels eines *in vitro*-Systems die Wirkung des *Yersinia*-Effektorproteins YopT, einer Cysteinprotease, auf zelluläre Signalwege untersucht werden. Hierzu wurde rekombinant exprimiertes YopT, welches dieselbe biologische Aktivität aufwies wie *Yersinia*-transloziertes YopT, über die Coexpression mit seinem spezifischen Chaperon SycT in löslicher Form gereinigt.

Mittels Interaktionsstudien wurde die Wirkung von YopT auf die RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass RhoGTPasen, die im Komplex mit ihren zytosolischen Inhibitor RhoGDI vorliegen, als Target für YopT dienen. Dabei wird RhoA von YopT gebunden, proteolytisch modifiziert und anschließend entlassen. Als Folge der Modifikation wird der Komplex zwischen RhoA und RhoGDI getrennt.

Rac1 und Cdc42 interagieren ebenfalls mit YopT. Es konnte jedoch keine Modifikation beider GTPasen durch YopT dargestellt werden. Stattdessen binden Cdc42 und Rac1 nach der Wechselwirkung mit YopT in erhöhtem Maße an RhoGDI. Zusätzlich werden die biochemischen Eigenschaften von RhoGDI durch die Wirkung von YopT verändert.

RhoA wird durch den Einfluss der Cysteinprotease YopT inaktiviert und kann nicht mehr mit nachgeschalteten Effektoren interagieren. Rac1 und Cdc42 dagegen binden nach Interaktion mit YopT weiterhin in ihrem aktivierten Zustand an ihre Effektoren.

Neben YopT ist ein weiteres *Yersinia*-Effektorprotein bekannt, das mit den RhoGTPasen RhoA und Rac1 interagiert: die Serin/Threonin-Kinase YopO. Hier konnte die Bindung beider GTPasen an YopO unabhängig von der Anwesenheit des Prenylrestes am C-Terminus der GTPasen dargestellt werden. Auch als Komplex mit RhoGDI interagierten Rac1 und RhoA mit der Kinase YopO.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch die Translokation von YopO im Gegensatz zur Translokation von YopT_{C139S} die drei GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 zumindest vorübergehend aktiviert werden.

In dieser Arbeit konnte außerdem die Kristallstruktur des Chaperons SycT aufgelöst werden. SycT bildet ein Dimer und weist im allgemeinen Ähnlichkeiten zur Struktur anderer Chaperone des Typ III Sekretions- und Translokationsapparates (TTSS) auf. Jedoch unterscheidet sich der Dimerisierungsbereich von SycT strukturell von dem der

anderen TTSS-Chaperone. Außerdem konnte gezeigt werden, dass weniger SycT an das biologisch inaktive YopT_{C139S} bindet, was auf eine Interaktion des Chaperons mit dem katalytischen Zentrum der Cysteinprotease YopT hinweist.

2 Einleitung

2.1 *Yersinia enterocolitica*

Yersinien sind gram-negative Stäbchen und werden der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet. Sie sind fakultative Anaerobier und in der Lage, sich in einem Temperaturbereich von 4°C bis 43°C zu vermehren, wobei die optimale Wachstumstemperatur zwischen 28°C und 30°C liegt.

Yersinia enterocolitica gehört neben *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* zu den humanpathogenen Arten dieser Gattung. Während *Y. pestis* als Erreger der Pest bekannt ist, sind *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* für Darmerkrankungen verantwortlich. In Deutschland stellen diese enteropathogenen Yersinien die dritthäufigsten Durchfallerreger nach Salmonellen und *Campylobacter jejuni* dar. Die Pathogenität dieser drei Arten wird durch ein 70 kb großes Virulenzplasmid (pYV) vermittelt.

Die Aufnahme von *Y. enterocolitica* erfolgt durch kontaminierte Nahrungsmittel. Die Folge sind akute intestinale Infektionen mit in der Regel benignem Ausgang (sog. Yersiniose). Bei einer Infektion dringen Yersinien zunächst in das darmassoziierte lymphatische Gewebe ein, vermehren sich extrazellulär überwiegend in den Peyer-Plaques des terminalen Ileums und verursachen dort Abszesse. Diese Abszesse entleeren sich einerseits in das Darmlumen, andererseits wandern Yersinien in Lymphknoten, Milz, Leber und Blutbahn ab. Im Falle von *Y. enterocolitica* ist diese Erkrankung beim Menschen in der Regel auf eine Enteritis oder Enterocolitis mit selbstlimitierender Diarrhöe beschränkt. Die Manifestation ist oft schwer von einer akuten Appendizitis zu unterscheiden.

Y. enterocolitica wird nach O- und H-Antigenen in Serovarietäten unterteilt. In Europa sind die Serovare O:3, O:9 und O:5,27 von Bedeutung, in Nordamerika dagegen O:8. Letzteres ist virulenter als Serovar O:3. (Heesemann, 2001)

2.2 pYV-Plasmid

Pathogene Yersinien können die angeborenen Immunmechanismen (Komplementlyse, professionelle Phagozytose u.a.) unterlaufen und sich im Gewebe extrazellulär vermehren. Zur Abwehr von Immunzellen wie Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten (PMN) verfügt *Yersinia* über eine Vielzahl verschiedener Proteine, die für die Invasion ins Gewebe, die Adhäsion an Wirtszellen sowie die Sezernierung und Translokation von Effektorproteinen in Wirtszellen verantwortlich sind. Die dazu notwendigen Gene liegen extrachromosomal auf dem 70 kb großen Virulenzplasmid pYV (s. Abb. 2.1). Pathogene Yersinien unterscheiden sich von apathogenen durch den Besitz dieses Plasmids, das unter den humanpathogenen Yersinien konserviert ist.

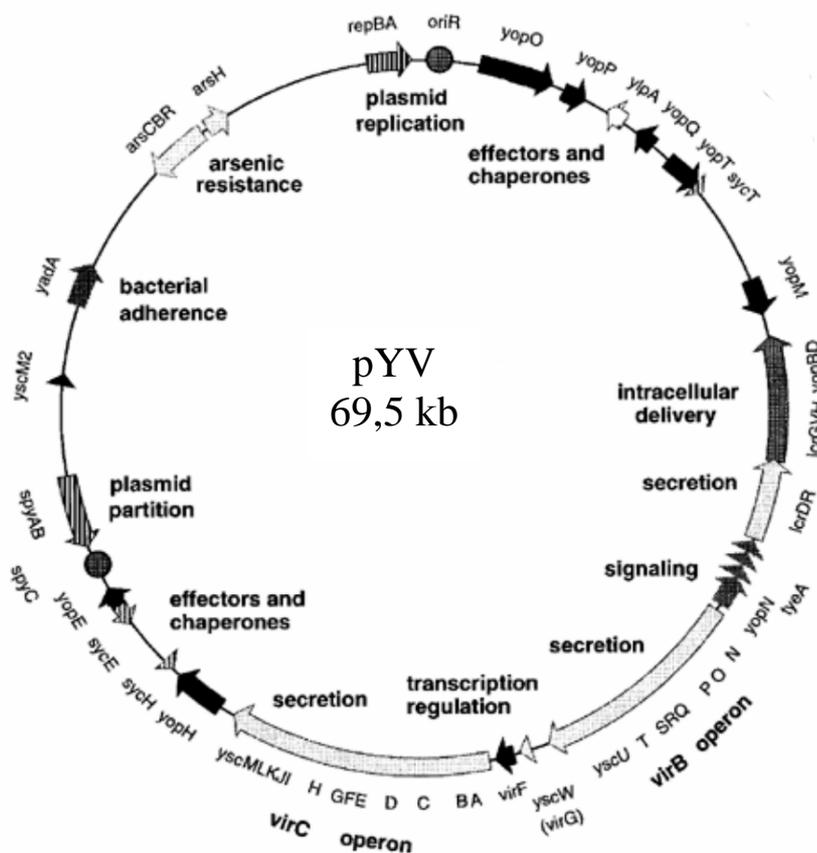


Abb. 2.1: Genetische Karte des pYV-Plasmids von *Y. enterocolitica* (O:9) (entnommen aus Iriarte und Cornelis, 1998).

Im Wesentlichen werden durch die Gene auf pYV zwei wichtige Proteinklassen exprimiert:

- Zum einen handelt es sich um Proteine, die an der Sekretion und Translokation der Effektorproteine beteiligt sind. Diese Proteine bauen den Typ III Sekretions- und Translokationsapparat (TTSS) auf und regulieren und kontrollieren diesen Aufbau sowie den Transport der Effektorproteine.
- Eine zweite Gruppe bilden die Effektorproteine (*Yersinia outer proteins*), die in eukaryotische Wirtszellen transloziert werden und dort zelluläre Signalkaskaden modulieren.

2.2.1 Typ III Sekretions- und Translokationsapparat (TTSS)

Typ III Sekretions- und Translokationsapparate sind inzwischen in einer Vielzahl von Tier- und Pflanzenerregern identifiziert worden (Cornelis und Van Gijsegem, 2000; Espinosa und Alfano, 2004). Das Ysc (*Yop secretion*)-System der Yersinien stellt jedoch den Archetypus des TTSS dar. Es handelt sich um ein Organell an der Oberfläche der Bakterien, das sich über beide Bakterienmembranen und die Peptidoglycanschicht dazwischen erstreckt. Eine nadelähnliche Struktur ragt aus *Yersinia* heraus. Mit Hilfe des TTSS können Proteine aus dem Zytoplasma über die Membranen transportiert und gezielt in die Wirtszelle eingeschleust werden, um die Phagozytose und die Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen zu verhindern (Cornelis *et al.*, 1998).

Das gesamte Organell wird aus 27 verschiedenen Proteinen aufgebaut (Cornelis, 2002b). Der Basalkörper, der die Proteine vom Zytoplasma der Bakterien durch die Bakterienmembranen transportiert, lässt sich in einen internen und einen distalen Teil unterscheiden. Der interne Teil weist Ähnlichkeiten mit dem Basalkörper eines Flagellums auf, was auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hinweist (Cornelis, 2002b). Ein wichtiger Bestandteil der Proteinpumpe ist YscN (Woestyn *et al.*, 1994). Dieses Protein wird als ATPase bezeichnet, die Homologien zur β -katalytischen Untereinheit der F₀F₁-Protonen-Translokase zeigt. Die genaue Lokalisierung im TTSS und die Funktionsweise sind jedoch noch nicht näher bekannt (Cornelis, 2002a). Der distale Teil des Ysc-Basalkörpers ist eine homomultimere ringförmige Struktur in der äußeren

Bakterienmembran, die durch das Protein YscC gebildet wird. Dieser Ring besitzt eine zentrale Pore mit dem Durchmesser von 50 Å (Koster *et al.*, 1997). Den Abschluss des Ysc-Injektisoms bildet eine Nadel, die aus Monomeren des YscF-Proteins aufgebaut wird (Hoiczky und Blobel, 2001). Die Nadel ist 60-80 nm lang und hat einen inneren Durchmesser von ca. 2 nm. Mit Hilfe dieser Nadel kann die eukaryotische Zelle perforiert werden, um die *Yersinia*-Effektorproteine ins Zytosol zu schleusen.

Für die Translokation der Effektorproteine sind jedoch weitere Proteine notwendig. Eine wichtige Rolle dabei spielen die sogenannten Translokatoren YopB, YopD und LcrV. Diese Proteine werden ebenfalls sezerniert, sind aber anschließend für die Porenbildung in der Plasmamembran der Zielzelle verantwortlich (Neyt und Cornelis, 1999a; Tardy *et al.*, 1999; Marenne *et al.*, 2003). Eine weitere Aufgabe von YopB, YopD und LcrV ist die Translokation der Effektorproteine in die Zielzelle (Rosqvist *et al.* 1994; Sory und Cornelis, 1994; Persson *et al.*, 1995; Hakansson *et al.*, 1996b; Neyt und Cornelis, 1999a; Holmström *et al.*, 2001). Von Bedeutung bei der Translokation der Effektorproteine ist außerdem YopN. Dieses Protein verzögert die Translokation der Effektor- und Regulatorproteine, bis das Bakterium mit der Wirtszelle Kontakt aufnimmt, und wirkt damit als eine Art Verschluss (Forsberg *et al.*, 1991; Iriarte *et al.*, 1998).

Der Aufbau des Ysc-Injektisoms erfolgt erst bei der Temperatur des Wirtsorganismus. Die Sekretion und Translokation der Effektorproteine jedoch wird erst durch den Kontakt mit einer Wirtszelle aktiviert (Rosqvist *et al.*, 1994). Beinahe jeder Typ einer tierischen Zelle kann das Ziel von *Yersinia* sein, vorausgesetzt, *Yersinia* ist in der Lage, an diese Zelle zu adhären (Boyd *et al.*, 2000). Für die Adhäsion spielen Adhäsine auf der Außenseite der Membran und im Falle von Makrophagen und PMNs phagozytotische Rezeptoren eine wichtige Rolle. Zusätzlich ist bei den Yersinien das pYV-Plasmid-codierte *Yersinia* Adhäsine A (YadA) und die chromosomal codierten Proteine Invasin (Inv) bzw. *attachment invasion locus* (Ail) für die Anlagerung von Bedeutung (Wiedemann *et al.*, 2001; Grosdent *et al.*, 2002). Erst wenn die Bakterien über diese Proteine an die eukaryotische Zielzelle andocken, erfolgt die Sezernierung und Translokation der Effektorproteine.

2.2.2 Effektorproteine

Y. enterocolitica verfügt über bislang sechs bekannte Effektorproteine, die über das TTSS in die eukaryotische Zielzelle injiziert werden: Yop (*Yersinia outer protein*) E/H/M/O/P/T. Die Proteine YopO und YopP aus *Y. enterocolitica* sind homolog zu YpkA und YopJ aus *Y. pseudotuberculosis*. Yops inhibieren in der Wirtszelle mehrere wichtige Verteidigungsmechanismen wie Phagozytose und Zytokin-Synthese. Auf diese Weise können Yersinien im Lymphgewebe persistieren und sich extrazellulär vermehren (Galan und Bliska, 1996; Cornelis *et al.*, 1998). Allgemein ist bekannt, dass ein Yop mehrere Wirkmechanismen und Zielmoleküle innerhalb der eukaryotischen Zelle besitzt. YopE, YopH, YopO und YopT beeinflussen die Dynamik des Aktinzytoskeletts und tragen damit zur Verhinderung der Phagozytose bei (Cornelis, 2002b). YopP reguliert die inflammatorische Antwort herunter und führt in Makrophagen Apoptose herbei. YopM schließlich wandert in den Zellkern und interagiert mit zellulären Kinasen (McDonald *et al.*, 2003).

Versuche im Mausinfektionsmodell mit verschiedenen Mutanten zeigten, dass jedes Yop spezifische, koordinierte Funktionen erfüllt und das synergistische Zusammenspiel aller Yops eine erhöhte Resistenz gegen Phagozytose bewirkt (Grosdent *et al.*, 2002).

2.2.2.1 YopH

YopH (51 kDa) zeichnet sich durch eine hohe Sequenzhomologie zu eukaryotischen Proteinphosphatasen aus und besitzt *in vitro* eine starke Tyrosinphosphatase-Aktivität (Guan und Dixon, 1990). Neben p130^{Cas} (Crk-assoziiertes Substrat) dephosphoryliert es FAK (Fokaladhäsionskinase), Paxillin und Fyb (Fyn-bindendes Protein) (Black und Bliska, 1997; Persson *et al.*, 1997; Black *et al.*, 1998; Hamid *et al.*, 1999). Diese eukaryotischen Proteine sind Bestandteile des fokalen Adhäsionskomplexes und sind an der Signaltransduktion des β 1-Integrin-Rezeptors beteiligt. Dieser bindet an Invasin von *Yersinia* und vermittelt in der Regel die Internalisierung der Bakterien bei Abwesenheit von YopH (Deleuil *et al.*, 2003). Eine Dephosphorylierung dieser Proteine führt zur Auflösung des fokalen Adhäsionskomplexes und bewirkt folglich die Inhibierung der Integrin-vermittelten Phagozytose (Hamid *et al.*, 1999).

Außerdem unterdrückt YopH die Aktivierung von B- und T-Zellen, vermutlich hervorgerufen durch eine Dephosphorylierung von Proteinen der T-Tell- und B-Zell-Rezeptorkomplexe (Yao *et al.*, 1999). Zusätzlich hemmt YopH die Synthese des Chemotaktischen Proteins-1 (Sauvonnet *et al.*, 2002). Als weiteres Substrat von YopH wurde Lck Kinase entdeckt, ein Protein, das an der Signaltransduktion des T-Zell-Antigenrezeptors beteiligt ist (Alonso *et al.*, 2004).

2.2.2.2 YopE

YopE (23 kDa) wirkt in eukaryotischen Zellen zytotoxisch und führt zu deren Abrunden und Ablösen von der extrazellulären Matrix (Rosqvist *et al.*, 1990). Mikroinjektionsstudien zeigten, dass YopE in der Lage ist, die Bildung der Stressfasern zu inhibieren (Rosqvist *et al.*, 1991). Zusätzlich besitzt es eine starke anti-phagozytische Wirkung (Rosqvist *et al.*, 1990; Ruckdeschel *et al.*, 1996). YopE wird außerdem benötigt, um die Porenbildung in der Wirtszellmembran, welche am YopB/YopD-Translokationskanal auftritt, zu verhindern (Viboud und Bliska, 2001). Auf diese Weise wird die Lyse der Wirtszelle vermieden.

Es konnte gezeigt werden, dass YopE als GAP (*GTPase activating protein*) auf GTPasen der Rho-Familie (RhoA, Rac1 und Cdc42) wirkt (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000; Black und Bliska, 2000). Die GAP-Aktivität konnte für alle drei RhoGTPasen jedoch lediglich *in vitro* nachgewiesen werden (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000; Black und Bliska, 2000). Dagegen konnte in Zellkultur-Infektionsmodellen bislang nur die Inhibierung von Rac1 und RhoA beobachtet werden (Black und Bliska, 2000; Andor *et al.*, 2001). Da die Aktivierung von RhoGTPasen ein wichtiges Signal zwischen Rezeptoraktivierung und Reorganisation des Zytoskeletts während der Phagozytose darstellt (Chimini und Chavrier, 2000; May und Machesky, 2001), bewirkt die Inhibierung durch GAPs dementsprechend den gegenteiligen Effekt, d.h. die Phagozytose wird unterbunden.

Durch seinen inhibitorischen Effekt auf Rac1 kann YopE außerdem die autoproteolytische Aktivierung von Caspase-1 verhindern (Schotte *et al.*, 2004). Die Cysteinprotease Caspase-1 kontrolliert die Reifung von IL-1 β , einem Zytokin, das in die Regulierung der Immunantwort eingebunden ist.

Jedoch beruht der zytotoxische Effekt von YopE nicht ausschließlich auf der GAP-Aktivität, wie Versuche mit mutiertem YopE ohne GAP-Aktivität zeigten (Aili *et al.*, 2003). Es besteht daher die Möglichkeit, dass noch weitere, bisher unidentifizierte Targets von YopE existieren (Aili *et al.*, 2003).

2.2.2.3 YopM

Das Molekulargewicht von YopM ist variabel und liegt zwischen 41,6 und 56,9 kDa, da das *yopM*-Gen repetitive Einheiten aufweist, welche in unterschiedlicher Anzahl auftreten (Boland *et al.*, 1998).

Über YopM ist bekannt, dass es als einziges Yop nach der Translokation in die Wirtszelle in den Nukleus der Zelle transportiert wird (Skrzypek *et al.*, 1998). Die Lokalisierung wird über den Vesikeltransport gesteuert (Skrzypek *et al.*, 2003). YopM ist ein saures Protein, das sich durch den Besitz von LRRs (*leucine-rich repeats*) auszeichnet (Leung und Straley, 1989; Mulder *et al.*, 1989). Die ersten drei LRRs sowie die 32 C-terminalen Aminosäuren von YopM dienen als Erkennungssequenz für die Kernlokalisierung in Hefe, in Säugerzellen jedoch ist dafür vermutlich lediglich der C-Terminus von Bedeutung (Benabdillah *et al.*, 2004).

Als Interaktionspartner von YopM wurden bislang zwei zelluläre Kinasen, PRK2 (*Protein kinase C-like 2*) und RSK1 (*p90 ribosomal S6 protein kinase 1*), identifiziert (McDonald *et al.*, 2003). Diese sind unter anderem an der Regulation der Translation, Zellproliferation und an der Glykogensynthese beteiligt. Durch Bildung der YopM-Kinase-Komplexe werden beide Kinasen aktiviert, allerdings ist die Folge dieses Prozesses noch unklar (McDonald *et al.*, 2003).

Außerdem zeigt YopM Sequenzhomologie zur α -Kette des Glykoproteins Ib (GPIb α), das auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert wird (Leung und Straley, 1989). Wie GPIb ist auch YopM in der Lage, Thrombin zu binden und die Thrombin-induzierte Plättchenaggregation zu hemmen (Leung *et al.*, 1990). Die Bedeutung dieser Homologie ist jedoch noch unklar, da YopM als Effektorprotein in die Zellen des Wirtsorganismus transloziert wird (Hines *et al.*, 2001).

2.2.2.4 YopP

YopP (32,5 kDa) aus *Y. enterocolitica* stellt das Homolog zu YopJ aus *Y. pseudotuberculosis* dar. Es ist verantwortlich für die Induktion der Apoptose in Makrophagen (Mills *et al.*, 1997; Monack *et al.*, 1997; Ruckdeschel *et al.*, 1997b) und unterdrückt die Produktion der Zytokine TNF- α und IL-8 (Boland und Cornelis, 1998; Palmer *et al.*, 1998; Schesser *et al.*, 1998). Von Bedeutung für diese Prozesse ist die Fähigkeit von YopP/J, an Mitglieder der MAPK-Kinase-Familie (*mitogen-activated protein kinase*), inklusive MAPK-Kinasen und I κ B-Kinase-Komplex, zu binden und dadurch deren Aktivierung zu inhibieren (Orth *et al.*, 1999).

In der Regel werden die MAPK- und NF- κ B-Signaltransduktionskaskaden durch die Lipopolysaccharide der Bakterien induziert. Eine Infektion mit *Yersinia* jedoch führt zu einer Inhibierung mehrerer MAPK-Signalwege (Erk, JNK, p38) in Makrophagen (Ruckdeschel *et al.*, 1997a). Palmer *et al.* (1999) haben gezeigt, dass die Ursache dafür YopP/J ist.

Zusätzlich verhindert YopP/J die Phosphorylierung und damit die Degradierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B, welche für die Aktivierung von NF- κ B notwendig ist, und somit die Translokation dieses Transkriptionsfaktors in den Zellkern (Ruckdeschel *et al.*, 1998, 2001; Schesser *et al.*, 1998).

Die Signale der MAPKs und von NF- κ B sind wichtig für das zelluläre Überleben und für die Produktion von Zytokinen. Eine Unterbrechung der Aktivierung von MAPK und NF- κ B kann somit zur Apoptose der Zelle und zur Einstellung der Zytokinproduktion führen.

Es wird auch diskutiert, dass YopP/J die Apoptose über das proapoptotische Molekül Bid vermittelt (Denecker *et al.*, 2001).

Sekundärstruktur-Vergleiche führten bislang zu dem Schluss, dass es sich bei YopP/J um eine Cysteinprotease, möglicherweise um eine SUMO-Protease handelt (Orth *et al.*, 2000).

2.2.2.5 YopO

YopO (81 kDa) aus *Y. enterocolitica* ist homolog zu YpkA (*Yersinia protein kinase A*) aus *Y. pseudotuberculosis*. Sequenzanalysen lassen darauf schließen, dass es sich bei

YopO/YpkA um eine Serin/Threonin-Kinase handelt. Experimentell wurde bestätigt, dass YopO/YpkA in der Lage ist, seine Serin-Reste zu autophosphorylieren (Galyov *et al.*, 1993). Für die Autophosphorylierung und damit Aktivierung ist YopO/YpkA auf einen eukaryotischen Faktor angewiesen. Als dieser Aktivator wurde Aktin identifiziert (Juris *et al.*, 2000). Der C-Terminus ist essentiell für die Kinase-Aktivität sowie die Interaktion zwischen YopO/YpkA und Aktin (Juris *et al.*, 2000). Die C-terminalen 20 Aminosäuren zeigen Homologien zu Coronin, einem aktinbündelnden Protein (Juris *et al.*, 2000). Bei Verlust des C-Terminus ist YopO/YpkA nicht mehr in der Lage, Aktin zu binden und damit zu autophosphorylieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *Yersinia* ohne den C-Terminus von YopO/YpkA avirulent ist (Galyov *et al.*, 1993).

Obwohl Aktin *in vitro* durch YopO/YpkA phosphoryliert werden kann (Juris *et al.*, 2000), sind keine *in vivo*-Substrate dieser Kinase bekannt. Am wahrscheinlichsten sind Proteine, die bei der Regulation des Aktinzytoskeletts in der Wirtszelle eine wichtige Rolle spielen, möglicherweise Proteine des Rho-Signaltransduktionsweges (Juris *et al.*, 2002).

Infektionsversuche mit *Yersinia*-Mutantenstämmen haben gezeigt, dass YopO/YpkA eine große Bedeutung für die Virulenz der Yersinien hat (Galyov *et al.*, 1993).

Zellen, in die YopO/YpkA injiziert wurde, runden sich ab, lösen sich jedoch nicht von der extrazellulären Matrix. An ihrer Peripherie lassen sich verzweigte „Retraktionsfasern“ beobachten (Hakansson *et al.*, 1996a). Außerdem lokalisiert YopO/YpkA nach der Translokation an der Plasmamembran der Zielzelle, was darauf schließen lässt, dass die Substrate für diese Kinase ebenfalls an diesem Ort zu finden sind (Hakansson *et al.*, 1996a). Als Folge der Wirkung von YopO/YpkA in der Wirtszelle konnte eine Auflösung des Aktinzytoskeletts gezeigt werden (Juris *et al.*, 2000; Nejedlik *et al.*, 2004).

Es wird diskutiert, dass die Zerstörung des Aktinzytoskeletts auf die Fähigkeit von YopO/YpkA, die kleinen GTPasen RhoA und Rac1 zu binden, zurückzuführen sein könnte (Barz *et al.*, 2000; Dukuzumuremyi *et al.*, 2000). Diese Interaktion ist unabhängig vom Phosphorylierungsstatus von YopO/YpkA, ebenso vom Aktivitätszustand der RhoGTPasen, der durch die Beladung der GTPasen mit GTP (=aktiv) bzw. GDP (=inaktiv) charakterisiert ist (Barz *et al.*, 2000; Dukuzumuremyi *et al.*, 2000). Jedoch scheint YopO/YpkA GDP-beladenes RhoA zu präferieren (Dukuzumuremyi *et al.*, 2000). Beide GTPasen sind an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt.

2.2.2.6 YopT

YopT (36 kDa) ist das einzige *Yersinia*-Effektorprotein, das nicht bei allen drei humanpathogenen *Yersinia*-Arten vorkommt. Während es von allen pathogenen *Y. enterocolitica*- und *Y. pestis*-Stämmen exprimiert und transloziert wird, findet man nur bei einigen *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen ein intaktes *yopT*-Gen

YopT wird aufgrund von Sequenzhomologien zusammen mit einem *Pseudomonas*-Avirulenzprotein einer neuen Familie von Cysteinproteasen zugeordnet, die eine Funktion in der bakteriellen Pathogenese haben (Shao *et al.*, 2002). Cysteinproteasen gehören zu einer Gruppe von Enzymen, welche die SH-Gruppe eines Cysteinrestes für ihre katalytische Aktivität benötigen. Zusammen mit einem Histidin- und einem Aspartat-Rest bildet das Cystein im aktiven Zentrum die katalytische Triade. Im Falle von YopT hängt die Toxizität von dem Cystein an Position 139, dem Histidin an Position 258 und der Asparaginsäure an Position 274 ab (Shao *et al.*, 2002).

Die zytotoxische Wirkung von YopT wurde erstmals von Iriarte und Cornelis (1998) beschrieben. Ähnlich wie bei YopE kann man ein Abrunden der Wirtszellen beobachten.

Als Substrat von YopT wurde die kleine GTPase RhoA identifiziert (Zumbihl *et al.*, 1999). Später wurden zusätzlich die RhoGTPasen Rac1 und Cdc42 als Targetmoleküle beschrieben (Shao *et al.*, 2002). YopT spaltet bei diesen Proteinen das C-terminale Cystein, das posttranslational modifiziert wird, ab (Shao *et al.*, 2003). Im Falle von RhoA konnte nach Infektionsversuchen, ausgelöst durch YopT, eine erhöhte elektrophoretische Mobilität, eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes ins Saure sowie das Herauslösen von RhoA aus der Plasmamembran der Wirtszelle beobachtet werden (Zumbihl *et al.*, 1999). Die Modifikation von RhoA durch YopT bewirkt eine Inhibierung der Stressfaserbildung in der Zelle (Iriarte und Cornelis, 1998; Zumbihl *et al.*, 1999). Die YopT-induzierten morphologischen Effekte können durch CNF1 (*cytotoxic necrotizing factor*), das RhoA konstitutiv aktiviert, nicht aufgehoben werden (Sorg *et al.*, 2001). Durch YopT ist RhoA nicht mehr in der Lage, mit seinen *downstream*-Effektoren zu interagieren (Sorg *et al.*, 2001). Erste Untersuchungen deuteten darauf hin, dass YopT die Bindung zwischen RhoA und seinem zytosolischen Inhibitor RhoGDI beeinflusst (Sorg *et al.*, 2001; Aepfelbacher *et al.*, 2003).

Für die Aktivität von YopT ist neben den bereits genannten Aminosäuren der C-Terminus essentiell, für die Substratbindung dagegen der N-Terminus (Sorg *et al.*, 2003). Außerdem

wurde gezeigt, dass YopT bei einer Infektion an der Plasmamembran lokalisiert (Aepfelbacher *et al.*, 2003).

2.2.3 Chaperone

Sycs (*specific Yop chaperone*) sind saure Proteine mit einem niedrigen Molekulargewicht (ca. 15 kDa), die spezifisch mit nur einem oder zwei Effektor- bzw. Translokatorproteinen interagieren. In der Regel führt das Fehlen eines *Yersinia*-Chaperons dazu, dass die Sezernierung des betroffenen Yops ausbleibt, ohne die Sezernierung aller weiteren Yops zu beeinflussen. Sycs besitzen keine Ähnlichkeit mit ATP-abhängigen Chaperonen wie den Hsp-verwandten Proteinen (*heat shock proteins*). Im Allgemeinen bilden Sycs Dimere, wenn sie an die N-terminale Region des Partnerproteins binden. Die Chaperone weisen untereinander kaum Homologien in der Aminosäuresequenz auf, die Chaperon-bindenden Domänen der Substrate sogar keinerlei Homologien. Die Gene der Chaperone liegen jeweils in direkter Nachbarschaft zu den Genen ihrer Partnerproteine (Cornelis und Van Gijsegem, 2000; Feldman und Cornelis, 2003).

Bekannt sind bis jetzt SycE (für YopE), SycH (für YopH), SycN (für YopN), SycD (für YopB und YopD) und SycT (für YopT) (Wattiau und Cornelis, 1993; Wattiau *et al.*, 1994; Day und Plano, 1998; Neyt und Cornelis, 1999b; Iriarte und Cornelis, 1999; Iriarte und Cornelis, 1998).

Die Rolle der Chaperone ist noch nicht vollständig geklärt. Für einzelne Chaperone gibt es jedoch bereits Hinweise auf ihre Funktion.

So ist bekannt, dass YopE durch SycE stabilisiert wird und ohne Chaperon schnell degradiert (Frithz-Lindsten *et al.*, 1995). Außerdem dient SycE wohl als Translokationssignal für YopE (Cheng *et al.*, 1997; Birtalan *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Funktion wird auch angenommen, dass die drei Chaperone, die an Effektorproteine (YopE, YopH und YopT) binden, eine temporale Hierarchie bei der Translokation definieren (Birtalan *et al.*, 2002). Diese drei Effektorproteine, die als einzige Yops ein spezifisches Chaperon besitzen, wirken anti-phagozytotisch auf die Wirtszelle. Dementsprechend wäre eine schnelle Translokation dieser Yops und damit die schnelle Unterdrückung der Phagozytose

für *Yersinia* von Vorteil. Allerdings existieren noch keine experimentellen Daten, die diese Theorie unterstützen.

Es ist möglich, dass jedes Chaperon mehrere Aufgaben erfüllt, jedoch immer in einer spezialisierten Art und Weise (Feldman und Cornelis, 2003).

2.3 RhoGTPasen

2.3.1 RhoGTPasen und ihre Wirkungsweise

Rho (*Ras homology*)-GTPasen bilden eine Untergruppe innerhalb der Ras-Superfamilie kleiner GTP-bindender Proteine (20-30 kDa), die von Hefe bis Mensch ubiquitär verbreitet sind. Zu den Rho-Proteinen von Säugetieren gehören u.a. RhoA, Rac1 und Cdc42, die in dieser Arbeit unter besonderer Beachtung stehen. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von Rho-Proteinen verschiedener Arten zeigt, dass sie eine Homologie von 50-55 % untereinander aufweisen.

RhoGTPasen regulieren eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Aktinorganisation, Zelladhäsion, Zellmotilität, Vesikeltransport, Genexpression und Zellzyklus. Dabei fungieren sie als molekulare Schalter, die zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen Form und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand wechseln können. Der Austausch von GDP zu GTP wird durch GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) gesteuert. Diese fördern die GDP-Dissoziation und erleichtern die Bindung von GTP an die Rho-Proteine. Den gegenteiligen Effekt erzielen GAPs (*GTPase-activating proteins*), welche die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-Proteine stimulieren, wodurch GTP zu GDP gespalten wird. In ihrer GDP-gebundenen Form liegen RhoGTPasen zumeist im Zytosol vor, in der Regel im Komplex mit ihrem spezifischen Inhibitor RhoGDI (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*). RhoGDI blockiert den Austausch von GDP zu GTP, indem es die Interaktion zwischen RhoGTPasen und GEFs verhindert (Fukumoto *et al.*, 1990; Robbe *et al.*, 2003). Haben die kleinen GTPasen dagegen GTP gebunden, sind sie meistens an die Plasmamembran bzw. an die Membranen von Zellorganellen verlagert. In dieser Form

interagieren sie mit einer Vielzahl an Effektorproteinen, darunter zahlreiche Kinasen und Gerüstproteine, die die weiteren Signaltransduktionskaskaden in Gang setzen.

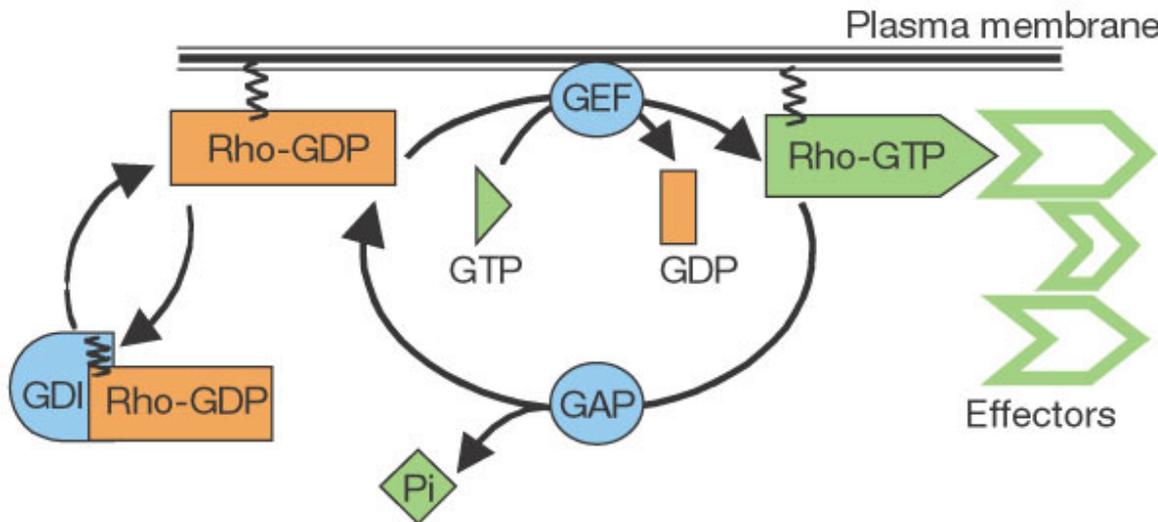


Abb. 2.2: Der Zyklus der RhoGTPasen (entnommen aus Etienne-Manneville und Hall, 2002).

RhoGTPasen wechseln zwischen einer aktiven (GTP-gebundenen) und einer inaktiven (GDP-gebundenen) Konformation. Im aktiven Zustand interagieren sie mit einem von über 60 Zielproteinen (Effektoren). Der Zyklus wird reguliert durch drei Klassen von Proteinen: in Säugerzellen katalysieren ungefähr 60 *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) den Nukleotid-Austausch und vermitteln so die Aktivierung; mehr als 70 *GTPase-activating proteins* (GAPs) stimulieren die GTP-Hydrolyse, was zur Inaktivierung führt; vier *guanine nucleotide dissociation inhibitors* (GDIs) extrahieren die inaktive GTPase von der Membran. Alle RhoGTPasen sind an ihrem C-Terminus prenyliert, was für ihre Funktion benötigt wird.

Für die Lokalisation an Zellmembranen benötigen RhoGTPasen posttranslationale Modifikationen der C-terminalen CAAX-Box (C: Cystein, A: aliphatische Aminosäure, X: in der Regel Leucin bei RhoGTPasen). Das Cystein der CAAX-Box wird zunächst prenyliert, Rho-Proteine erhalten in der Regel einen Geranylgeranylrest. Anschließend wird der AAX-Rest proteolytisch abgespalten, und das Cystein wird methyliert. Als weitere Modifikationen können bei GTPasen noch Palmitoylierungen auftreten. Diese Modifikationen sowie eine polybasische Region am C-Terminus ergeben eine hypervariable Region, welche die genaue Lokalisation der GTPase innerhalb der Zelle definiert (Michaelson *et al.*, 2001).

Der Prenylrest dient den RhoGTPasen als Anker in der Membran (Adamson *et al.*, 1992b). Außerdem findet über den Prenylrest auch die Interaktion mit RhoGDI statt (Gosser *et al.*, 1997).

Entscheidend für die Translokation der RhoGTPasen zwischen Plasmamembran und Zytosol ist neben den posttranslationalen Modifikationen und der GDP/GTP-Beladung ihre Interaktion mit RhoGDI. Der Inhibitor zeigt eine höhere Affinität zu der GDP-gebundenen Form der RhoGTPasen als zu der GTP-gebundenen Form (Sasaki *et al.*, 1993). GDP-gebundene GTPasen extrahiert RhoGDI von Membranen, indem es den Prenylrest maskiert. Neben zytoplasmatischem Rho-GDP kann RhoGDI mit niedrigerer Affinität auch an die GTP-gebundene Form der kleinen GTPase binden und es im aktiven Zustand von der Membran ins Zytoplasma rekrutieren. RhoGDI ist in der Lage, die intrinsische und GAP-stimulierte GTPase-Aktivität der Rho-Proteine zu inhibieren, so dass das Protein im aktiven Zustand blockiert wird (Hart *et al.*, 1992; Chuang *et al.*, 1993b).

Die Aktivierung von RhoGTPasen kann unabhängig erfolgen, entweder über die Stimulierung G-Protein-gekoppelter Membran-Rezeptoren (GPCR), Rezeptortyrosinkinasen oder über verwandte GTPasen quervernetzender Signaltransduktionswege (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997; Bhattacharya *et al.*, 2004). RhoGTPasen werden jedoch im Unterschied zu heterotrimeren G-Proteinen nicht direkt bei der Bindung des Liganden an den GPCR aktiviert. Die Aktivierung erfolgt erst stromabwärts in der Signaltransduktionskaskade durch ihre spezifischen GEFs (Sah *et al.*, 2000).

Die RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 sind außerdem über eine Aktivierungskaskade vernetzt: Aktiviertes Cdc42 aktiviert Rac1, das wiederum in der Lage ist, RhoA zu aktivieren (Nobes und Hall, 1995).

2.3.2 RhoGTPasen und die Organisation des Zytoskeletts

RhoGTPasen stellen Schlüsselmoleküle dar, welche eine Verbindung zwischen Oberflächenrezeptoren und der Organisation des Aktinzytoskeletts aufbauen. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Effektorproteine, an welche RhoGTPasen in ihrem aktiven Zustand binden. Bei den Effektorproteinen handelt es sich häufig um Kinasen (z.B. p160 *Rho-coiled coil kinase* ROCK, p21-assoziierte Kinase PAK1, *myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase* MRCK α und β) oder Proteine, die an der Regulation von

Aktin beteiligt sind (z.B. Wiskott-Aldrich Syndrom Protein WASP, *mammalian homologue of diaphanous* mDia) (Bishop und Hall, 2000).

Die drei RhoGTPasen, RhoA, Rac1 und Cdc42 bewirken in der Zelle spezifische Aktinformationen. RhoA induziert Stressfasern, Rac1 reguliert die Bildung von Lamellipodien und Cdc42 unterstützt die Bildung von Filopodien (Ridley und Hall, 1992; Ridley *et al.*, 1992; Nobes und Hall, 1995; Kozma *et al.*, 1995; Puls *et al.*, 1999). Außerdem spielen diese drei Proteine eine Rolle in der Zellmigration (Hall und Nobes, 2000): Rac1 stellt die „treibende Kraft“ dar, da es die Aktinpolymerisierung an der Zellmembranfront induziert; durch Cdc42 wird die Polarität der Zelle definiert; RhoA ist essentiell für die Adhäsion.

2.3.3 RhoGTPasen und Immunantwort

Phagozytose wird durch die Interaktion von Partikel-gebundenen Liganden mit spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen oder Neutrophilen initiiert. Die Bindung an diese Rezeptoren löst eine Signalkette aus, die zur Aktivierung von kleinen GTPasen und schließlich zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts führt (Caron und Hall, 1998; Aderem und Underhill, 1999; Chimini und Chavrier, 2000).

Zusätzlich beeinflussen RhoGTPasen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Sulciner *et al.*, 1996; Perona *et al.*, 1997). Damit spielen sie auch eine Rolle in pro-inflammatorischen und anti-apoptotischen Signalkaskaden.

Rac1 reguliert zudem die reduzierte Form des NADPH-Oxidase-Enzymkomplexes in phagozytischen Zellen (Abo *et al.*, 1992; Diekmann *et al.*, 1994; Bokoch, 1995). Die NADPH-Oxidase generiert Superoxid-Anionen („oxidative burst“), welche auf phagozytierte Erreger bakterizid wirken.

2.3.4 RhoGTPasen als Angriffspunkt für bakterielle Pathogenitätsfaktoren

Aufgrund ihrer Schlüsselstellung in vielen Signalwegen von Immunantwort, Gentranskription, Vesikeltransport, Zellzyklus etc. bilden RhoGTPasen einen wichtigen Angriffspunkt für Erreger (Aktories *et al.*, 2000; Galan, 2001).

Invasive Bakterien wie *Salmonella Typhimurium* aktivieren Mitglieder der Rho-Familie, um ihre Internalisierung in Wirtszellen zu induzieren. So injiziert *S. Typhimurium* das als GEF wirkende SopE, in die Wirtszelle, um Cdc42 und Rac1 zu aktivieren. Dadurch erfolgt die Internalisierung des Erregers. In der Zelle wird sodann SptP freigesetzt, das als GAP die beiden Proteine Cdc42 und Rac1 wieder herunterreguliert.

Extrazellulär persistierende Erreger wie *Yersinia* spp. dagegen induzieren die Deaktivierung von RhoGTPasen, um die Phagozytose zu unterdrücken. Dazu translozieren sie Effektorproteine, die als GAP (z.B. YopE) wirken oder GTPasen modifizieren und dadurch deaktivieren (z.B. YopT, C3-Toxin von *Clostridium botulinum*). Signalkaskaden für die Reorganisation des Aktinzytoskeletts werden somit unterbrochen und die Phagozytose verhindert.

2.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro*-System zu etablieren, welches es ermöglicht, die Wirkungsweise von YopT zu studieren. Dazu war es zunächst notwendig, ein gereinigtes Protein in löslicher Form zu erhalten und dessen biologische Aktivität durch verschiedene biochemische Methoden zu verifizieren. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welche Targets neben RhoA durch YopT ebenfalls beeinträchtigt werden.

Da bekannt ist, dass neben YopT das Effektorprotein YopO mit der kleinen GTPase RhoA interagiert, sollte überprüft werden, ob es Hinweise darauf gibt, dass YopO und YopT hinsichtlich der Modifikation kleiner GTPasen zusammenwirken.

Zusätzlich wurde die Kristallisation von YopT im Komplex mit seinem spezifischen Chaperon SycT angestrebt.

3 Ergebnisse

3.1 YopT

3.1.1 Reinigung von YopT

3.1.1.1 Klonierung des codierenden Genabschnitts von YopT

Um die zelluläre Wirkungsweise von YopT *in vitro* studieren zu können, war es zunächst notwendig, ein lösliches biologisch aktives YopT-Protein in gereinigter Form zu erhalten. Die Anreicherung von YopT sollte über einen affinitätschromatographischen Versuchsansatz erfolgen. Zu diesem Zweck wurde die standardisierte Reinigungsmethode von GST-Fusionsproteinen verwendet (Amersham Biosciences, Freiburg, s. Kapitel 5.2.2.1).

Da die codierenden Regionen von YopT und seinem spezifischen Chaperon SycT in einem überlappenden Leserahmen angeordnet sind (s. Abb. 3.1), Syc-Chaperone vermutlich Proteine stabilisieren (Frithz-Lindsten *et al.*, 1995) und damit die Löslichkeit von Proteinen unterstützen, wurde neben dem *yopT*-Gen (Serovar O:8) zusätzlich der gesamte codierende Bereich *yopT/sycT* (Serovar O:8) mittels PCR amplifiziert.

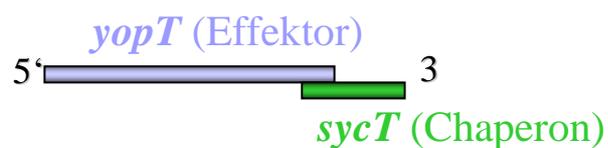


Abb. 3.1: Schema des Genabschnitts *yop/sycT*.

Die Gene *yopT* und *sycT* bilden ein Operon, bei dem *sycT* in einem überlappenden Leserahmen am 3'-Ende von *yopT* lokalisiert ist (Iriarte und Cornelis, 1998).

Die hierzu verwendeten Oligonukleotide YopT_{for BamHI} und YopT_{rev SmaI} bzw. SycT_{rev SmaI} waren an ihrem 5'-Ende mit unterschiedlichen Restriktionsschnittstellen modifiziert, um letztlich eine definierte Integration der YopT- und YopT/SycT-codierenden Bereiche in den Expressionsvektor pGEX-6P-3 zu erhalten. Der 5'-codierende Genabschnitt von YopT

wurde bei der Ligation in den Vektor mit der GST-kodierenden Einheit des Expressionsvektors fusioniert. Nach Transformation in den *E. coli*-Stamm BL-21 konnte das GST-fusionierte Effektorprotein YopT exprimiert werden, im Falle der Klonierung von *yopT/sycT* gemeinsam mit dem YopT-spezifischen Chaperon SycT.

Zusätzlich zu YopT_{WT} wurde mit Hilfe einer sogenannten *overlap* PCR (s. Kapitel 5.2.1.3) eine Punktmutation im *yopT*-Gen nach Shao *et al.* (2002) generiert, bei der das Cystein an Position 139 gegen ein Serin ausgetauscht wurde (*yopT*_{C139S}). Dieses mutierte Gen wurde ebenfalls in einer Einheit mit dem *sycT*-Gen auf die gleiche Weise wie das Wildtyp-Gen in den pGEX-6P-3-Vektor integriert.

3.1.1.2 Reinigung von YopT

Nachdem der im folgenden verwendete GST-YopT/SycT-Genbereich hinsichtlich seiner DNA-Sequenz verifiziert wurde (s. Anhang), stellten sich folgende Fragen: liegt YopT nach der Affinitätschromatografischen Reinigung in löslicher Form vor und wird SycT coexprimiert bzw. bindet es an sein Effektorprotein? Hierzu wurde wie in Kapitel 5.2.2.1 beschrieben eine Affinitätschromatografische Reinigung des GST-YopT-Proteins durchgeführt. In Abb. 3.2 ist zu sehen, dass GST-fusioniertes YopT als rekombinantes lösliches Protein vorliegt.

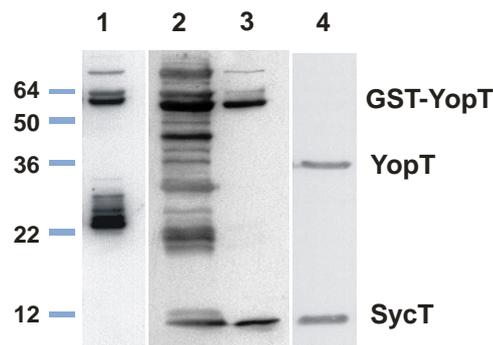


Abb. 3.2: Das *Yersinia*-Effektorprotein YopT bildet einen stabilen Komplex mit seinem Chaperon SycT *in vitro*.

Rekombinant exprimiertes YopT wurde mit oder ohne Chaperon SycT aus Bakterienlysat durch Glutathiongekoppelte Sepharose-Kügelchen isoliert. Die Proteinfractionen wurden über eine 15 %-SDS-PAGE mit Western Transfer und anschließender Immundetektion analysiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe affinitätsgereinigter Antikörper gegen YopT und SycT.

Spur 1: GST-YopT ohne SycT

Spur 2: lysierte *E. coli*-Zellen nach Induktion mit IPTG, Expression von YopT und SycT

Spur 3: GST-YopT, das nach der Reinigung im Komplex mit seinem Chaperon SycT vorliegt

Spur 4: gereinigtes YopT/SycT nach der Abspaltung der GST-Einheit mittels PreScission Protease

Wurde YopT_{WT} ohne sein spezifisches Chaperon exprimiert und gereinigt, sind Degradationsprodukte in Form von Unterbanden zu erkennen (s. Abb. 3.2, Spur 1), im Gegensatz zur Reinigung des zusammen mit SycT exprimierten YopT_{WT} (s. Abb. 3.2, Spur 3). Desweiteren zeigt sich, dass SycT im Eluat der Affinitätsreinigung nachweisbar ist, was auf eine Komplexierung von rekombinanten YopT und SycT schließen lässt (s. Abb. 3.2, Spur 3 und 4). Um die Annahme zu bestätigen, dass das Effektorprotein YopT nach der GST-Reinigung mit seinem exprimierten spezifischen Chaperon SycT im Komplex vorliegt, wurden affinitätsspezifisch-gereinigte Antikörper von YopT und SycT für den spezifischen Nachweis verwendet (Abb. 3.2).

Abb. 3.2 zeigt, dass GST-YopT im Komplex mit SycT gereinigt worden ist.

3.1.2 Nachweis der biologischen Aktivität des rekombinanten YopT

Die zelluläre Wirkungsweise von *Yersinia*-transloziertem YopT wurde mithilfe verschiedener biochemischer Assays erstmals von Zumbihl *et al.* (1999) gezeigt. Neben der Auflösung von Stressfasern wurde eine erhöhte elektrophoretische Mobilität von RhoA und eine Verlagerung des isoelektrischen Punktes (pI) der GTPase nachgewiesen. Außerdem wurde festgestellt, dass RhoA durch transloziertes YopT aus der Plasmamembran gelöst wird und sich modifiziert im Zytosol anreichert.

Zur Analyse des Einflusses von YopT auf die zelluläre Signalkaskade musste die biologische Aktivität des rekombinant-gereinigten YopT *in vitro* verifiziert werden. Untersucht wurden die YopT-induzierte Auflösung der Stressfasern, die erhöhte elektrophoretische Mobilität sowie die Veränderung des pI-Wertes von RhoA und das Herauslösen von RhoA aus der zellulären Membran.

Ebenso sollte geklärt werden, ob SycT, das nach der Reinigung in Komplex mit YopT vorliegt, das Effektorprotein in seiner Funktion behindert.

3.1.2.1 Einfluss von YopT auf das Aktinzytoskelett nach Mikroinjektion

Um die durch YopT induzierte Auflösung der Aktinstressfasern in der Zelle zu untersuchen, wurden verschiedene affinitätsgereinigte GST-Proteine in HeLa-Zellen mikroinjiziert (s. Kapitel 5.2.4.4). Die Proteine wurden zuvor mit FITC-Dextran inkubiert, um die mikroinjizierten Zellen durch die grüne Färbung von den nicht-injizierten Zellen unterscheiden zu können. Nach einer ca. einstündigen Inkubationszeit der Zellen bei 37°C wurde das Aktinzytoskelett der Zellen mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt (s. Kapitel 5.2.4.5). Im Anschluss daran wurden die Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

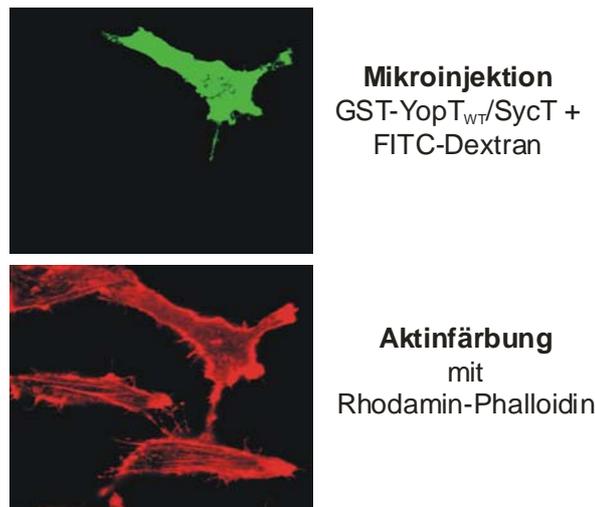


Abb. 3.3: Mikroinjiziertes GST-Yop_{T_{WT}}/SycT inhibiert in HeLa-Zellen die Stressfaserbildung.

Adhärente HeLa-Zellen wurden mit GST-Yop_{T_{WT}}/SycT in FITC-Dextran mikroinjiziert. Anschließend wurde das Aktinzytoskelett mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt.

oben: Mikroinjizierte Zellen können durch das FITC-Dextran (grün) detektiert werden.

unten: Mikroinjizierte Zellen weisen im Gegensatz zu den benachbarten, nicht-mikroinjizierten Zellen nach der Aktinfärbung mit Rhodamin-Phalloidin (rot) keine Stressfasern mehr auf.

Wie in Abb. 3.3 zu sehen ist, können nach der Mikroinjektion von GST-Yop_{T_{WT}}/SycT keine Stressfasern mehr detektiert werden. Mikroinjiziertes GST bzw. GST-SycT haben keinen Einfluss auf die Architektur des Aktinzytoskeletts. Nach der Mikroinjektion von GST-Yop_{T_{C139S}}/SycT war ebenfalls keine Auflösung der Aktinstruktur zu beobachten (nicht gezeigt).

3.1.2.2 Analyse der elektrophoretischen Eigenschaften von RhoA nach Einfluss von YopT *in vitro*

Um das Mobilitätsverhalten von RhoA nach Wirkung von YopT *in vitro* zu untersuchen, wurde HeLa-Zell-Lysat mit folgenden rekombinanten Proteinen inkubiert: Yop_{T_{WT}}/SycT, Yop_{T_{C139S}}/SycT, Yop_{T_{WT}}, GST und SycT. Die Inkubation wurde bei zwei verschiedenen Temperaturen, 37°C und 4°C, durchgeführt. Die entsprechend behandelten Zell-Lysate wurden mithilfe der SDS-PAGE und anschließendem Western Transfer (s. Kapitel 5.2.2.4) analysiert.

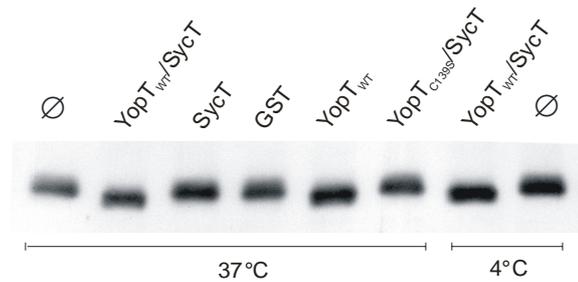


Abb. 3.4: YopT_{WT} führt zu einer erhöhten elektrophoretischen Mobilität von RhoA *in vitro*.

Lysat von HeLa-Zellen wurde mit jeweils gleichen Mengen der angegebenen gereinigten Proteine 2 h bei 37°C und 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden über eine 15 %-SDS-PAGE mit Western Transfer und anschließender Immunodetektion analysiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines spezifischen RhoA-Antikörpers (Santa Cruz). Die unbehandelte Kontrolle wird mit Ø bezeichnet.

Es zeigt sich eine erhöhte Mobilität von RhoA nach Zugabe von YopT_{WT} mit bzw. ohne SycT, unabhängig von der verwendeten Inkubationstemperatur (s. Abb. 3.4). Dies lässt vermuten, dass die Komplexierung von YopT mit SycT die Wirkungsweise des Effektors unter diesen Versuchsbedingungen nicht beeinträchtigt. Bei der Inkubation von Zell-Lysat mit den Proteinen YopT_{C139S}/SycT, GST und SycT dagegen konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Diese Proteine führen zu keiner RhoA-Modifikation. SycT ist somit nicht an der Modifikation von RhoA beteiligt, behindert aber auch nicht die Aktivität von YopT.

Zur Analyse des isoelektrischen Punktes von RhoA nach Wirkung von YopT wurde Lysat von HeLa-Zellen mit YopT_{WT}/SycT inkubiert. Anschließend wurde eine 2D-Gelelektrophorese mit Western Transfer (s. Kapitel 5.2.2.4) durchgeführt.

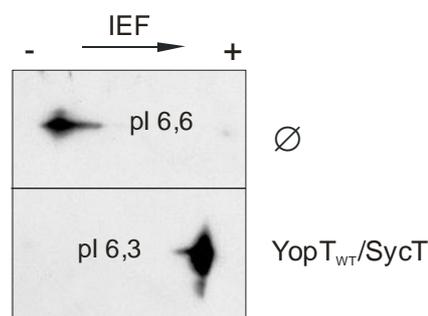


Abb. 3.5: YopT_{WT}/SycT verursacht *in vitro* eine Verschiebung des pI von RhoA ins Saure.

Lysat von HeLa-Zellen wurde 2 h bei 37°C mit GST-YopT_{WT}/SycT inkubiert und anschließend einer 2D-Gelelektrophorese mit Western Transfer unterzogen. Die Immundetektion erfolgte mit einem spezifischen RhoA-Antikörper (Santa Cruz). Ø bezeichnet die unbehandelte Kontrolle.

Wie in Abb. 3.5 zu sehen ist, weist das mit YopT behandelte RhoA eine Modifikation auf: Der isoelektrische Punkt von RhoA ist vollständig ins Saure (pI 6,3) verschoben, was mit den Ergebnissen der Infektionsversuche von Zumbihl *et al.* (1999) übereinstimmt.

3.1.2.3 Einfluss von YopT auf das Membranbindungsverhalten von RhoA *in vitro*

Wie Zumbihl *et al.* (1999) durch Infektionsversuche gezeigt haben, ist YopT in der Lage, RhoA aus der Plasmamembran zu lösen und im Zytosol anzureichern. In einem entsprechenden *in vitro*-Ansatz wurden native Membranfraktionen von HeLa-Zellen mit YopT_{WT}/SycT bzw. mit der Mutante YopT_{C139S}/SycT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze durch Ultrazentrifugation in feste Membranbestandteile und löslichen Überstand getrennt. Mittels SDS-PAGE und Western Transfer wurden die Proben analysiert.

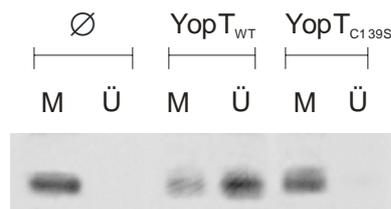


Abb. 3.6: Gereinigtes YopT_{WT}/SycT löst RhoA aus nativen Membranfraktionen.

Native Membranfraktionen wurden mit HEPES-Lysispuffer (Ø), GST-YopT_{WT}/SycT bzw. GST-YopT_{C139S}/SycT 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Ultrazentrifugation wurden die Membranbestandteile (M) und der lösliche Überstand (Ü) einer 15 %-SDS-PAGE unterzogen. Nach dem Western Transfer folgte die Immundetektion mit einem RhoA-spezifischen Antikörper (Santa Cruz).

RhoA liegt im Falle des Wildtyp-Proteins zu einem großen Teil im Überstand vor, während es bei der Mutante YopT_{C139S} vollständig in der Membran gebunden bleibt. Zusätzlich weist das herausgelöste RhoA (Ü von YopT_{WT}) einen Laufunterschied im Vergleich zu den benachbarten Banden auf, was darauf schließen lässt, dass dieses RhoA durch YopT modifiziert wurde.

Diese Versuche zeigen, dass rekombinantes YopT die gleiche Wirkungsweise zeigt wie YopT, das von Yersinien in menschliche Zellen transloziert wird. Es wurde daher im Folgenden ein *in vitro* System verwendet, welches ermöglichen sollte, die Interaktion von YopT mit den RhoGTPasen näher zu untersuchen.

3.1.3 YopT-Interaktionsstudie mit RhoGTPasen

Shao *et al.* (2002) zeigten, dass YopT nicht nur mit RhoA interagiert, sondern auch mit zwei weiteren RhoGTPasen, Rac1 und Cdc42, in Wechselwirkung tritt. Diese Fähigkeit von YopT, mit GTPasen der Rho-Familie zu interagieren, wurde mit Hilfe von Pulldown-Versuchen (s. Kapitel 5.2.2.5) untersucht. Es wurden Pulldown-Versuche mit den folgenden GST-fusionierten Proteinen durchgeführt: GST-YopT_{WT}/SycT, GST-YopT_{C139S}/SycT und GST-YopT_{WT}. Zusätzlich dienten die ebenfalls rekombinant exprimierten, gereinigten Proteine GST und GST-SycT als Kontrolle. Als Substrat wurde Zytosol von HeLa-Zellen eingesetzt. Interaktionspartner wurden mittels immunologischer Methoden in der gebundenen und nicht-gebundenen Fraktion nachgewiesen.

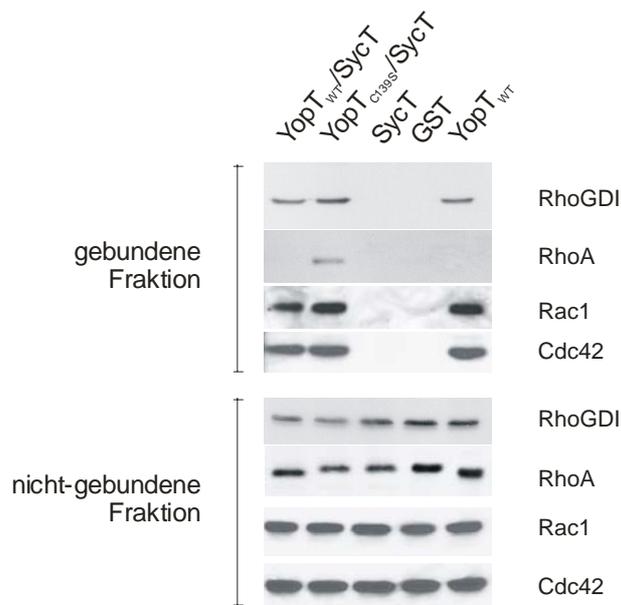


Abb. 3.7: YopT greift den zytosolischen Komplex RhoGTPase/RhoGDI an.

Jeweils gleiche Mengen der angegebenen GST-fusionierten Proteine wurden an Glutathion-gekoppelten Sepharose-Kügelchen immobilisiert und 1 h mit Zytosol von HeLa-Zellen bei 4°C inkubiert. Gebundene und ungebundene Fraktionen wurden mittels 15 %-SDS-PAGE und Western Transfer analysiert. Die Immundetektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen die GTPasen und RhoGDI.

In Abb. 3.7 ist zu sehen, dass RhoA nicht an biologisch aktives YopT bindet. Dagegen ist RhoA in der gebundenen Fraktion der inaktiven YopT-Mutante detektierbar. Eine Interaktion von RhoA und YopT findet folglich statt, ist jedoch abhängig von der biologischen Aktivität des rekombinanten Effektorproteins.

Im Gegensatz dazu wurden die GTPasen Rac1 und Cdc42 sowohl in der gebundenen Fraktion des biologisch aktiven YopT als auch der inaktiven YopT-Mutante nachgewiesen.

Da im Vorfeld bereits nachgewiesen wurde, dass biologisch aktives YopT die biochemischen Eigenschaften bzw. die elektrophoretische Mobilität von RhoA nach Inkubation *in vitro* verändert (s. Kapitel 3.1.2.2), wurde zusätzlich das Laufverhalten von RhoA in der nicht-gebundenen Fraktion aller Ansätze untersucht.

Es zeigte sich, dass RhoA nach Inkubation mit biologisch aktivem YopT eine veränderte Mobilität im Vergleich zum endogenen Zustand aufweist (s. Abb. 3.7). Ein verändertes Laufverhalten von RhoA in der SDS-PAGE konnte in keinem der Fälle nach Inkubation mit SycT, GST oder inaktivem YopT_{C139S} nachgewiesen werden.

Ein vergleichbarer Laufunterschied wie bei RhoA ist bei Rac1 und Cdc42 in allen Ansätzen dagegen in keinem Fall zu erkennen.

Wie bereits oben erwähnt, wurde Zytosol von HeLa-Zellen für diesen Bindungsversuch eingesetzt. Da die GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 im Zytosol komplexiert mit ihrem Inhibitor RhoGDI vorliegen, wurden die gebundenen und nicht-gebundenen Fraktionen aller analysierten GST-Proteine außerdem hinsichtlich RhoGDI untersucht. In Abb. 3.7 zeigt sich, dass der GTPase-Inhibitor in allen gebundenen Fraktionen der Pulldown-Versuche, die mit verschiedenen YopT-Fusionsproteinen durchgeführt wurden, nachzuweisen war. Dagegen wurde RhoGDI nicht in den gebundenen Fraktionen der Kontrollen GST bzw. GST-SycT detektiert.

Angriffspunkt von YopT in der Zelle kann demnach nicht nur die freie Form der GTPasen, sondern auch der Komplex RhoGTPase/RhoGDI sein.

3.1.4 YopT trennt den Komplex zwischen RhoA und RhoGDI

Nachdem gezeigt werden konnte, dass biologisch aktives YopT_{WT} eine Modifikation der GTPase RhoA und deren Freisetzung in die nicht-gebundene Fraktion verursacht, hingegen die GTPasen Rac1 und Cdc42, sowie der GTPase-Inhibitor RhoGDI in der gebundenen Fraktion nachweisbar waren, sollte die Interaktion zwischen RhoA und RhoGDI während

der Wirkung von YopT näher untersucht werden. Zur systematischen Analyse aller beteiligten Proteine wurde als experimenteller Ansatz die Immunpräzipitation (s. Kapitel 5.2.2.6) gewählt. Diese Methodik wurde im Speziellen für RhoA ausgewählt, da sie vergleichende Aussagen hinsichtlich der Interaktion beider Proteine erlaubt (Fujihara *et al.*, 1997).

Alle Immunpräzipitationen wurden unter denselben Versuchsbedingungen durchgeführt. Ein Teil des Zytosols von HeLa-Zellen wurde zunächst mit rekombinantem YopT_{WT}/SycT für 2h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe der entsprechenden Antikörper (evtl. zusätzlich 0,5 % SDS, s. Abb. 3.8) und weiterer Inkubation wurden die experimentellen Ansätze hinsichtlich der gebundenen und der nicht-gebundenen Fraktion getrennt und mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert. Beide Fraktionen wurden auf die Bindung des spezifisch zu präzipitierenden Proteins sowie auf die Bindung möglicher Interaktionspartner immunologisch analysiert (s. Abb. 3.8).

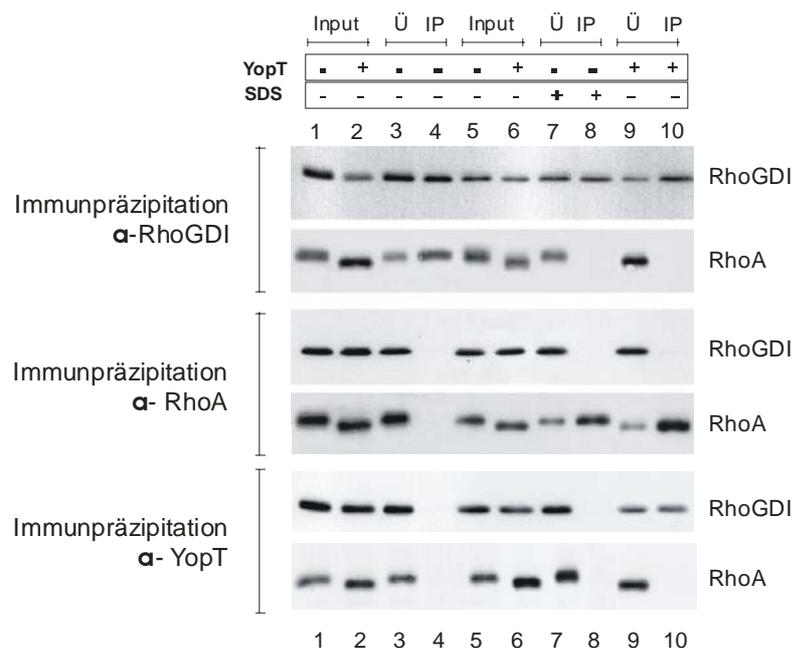


Abb. 3.8: YopT trennt den Komplex zwischen RhoA und RhoGDI.

HeLa-Zytosol wurde entweder 2 h bei 37°C mit GST-YopT_{WT}/SycT oder 30 min bei 37°C mit 0,5 % SDS inkubiert. Für die Immunpräzipitationen wurden ein monoklonaler RhoA-Antikörper, ein polyklonaler Antikörper gegen RhoGDI (beide Santa Cruz) oder affinitätsgereinigte Antikörper gegen YopT verwendet. Die Präzipitate wurden anschließend mit Protein A-Agarose gebunden. Nicht-gebundene (Ü) und gebundene (IP) Fraktionen wurden einer 15 %-SDS-PAGE mit Western Transfer unterzogen. Zusätzlich wurden zur Kontrolle Lysatproben, die mit oder ohne GST-YopT_{WT}/SycT inkubiert worden waren, auf das Gel aufgetragen (Input). Für die Immundetektion wurden die genannten Antikörper gegen RhoA und RhoGDI verwendet.

Zytosolisches RhoA, das im Komplex mit RhoGDI vorliegt, kann nicht durch den verwendeten monoklonalen Antikörper präzipitiert werden (s. Abb. 3.8, Spur 4). Das Epitop für diesen Antikörper wird durch RhoGDI verdeckt, der Antikörper kann RhoA somit nicht binden (Fujihara *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 1997). Durch Zugabe von 0,5% SDS allerdings wird der Komplex von RhoA und RhoGDI getrennt, und RhoA kann präzipitiert werden (s. Abb. 3.8, Spur 8). Immunologische Untersuchungen derselben Fraktionen zeigten, dass RhoGDI nach dieser Behandlung im Überstand verbleibt (s. Abb. 3.8, Spur 7).

Wird HeLa-Zytosol mit rekombinantem YopT_{WT} inkubiert, wird RhoA ebenfalls durch den Antikörper gebunden (s. Abb. 3.8, Spur 10). Zusätzlich ist zu erkennen, dass es in seiner modifizierten Form vorliegt. RhoGDI ist wiederum nur in der nicht-gebundenen Fraktion detektierbar (s. Abb. 3.8, Spur 9). Daher kann der Schluss gezogen werden, dass der Komplex zwischen RhoA und RhoGDI durch YopT getrennt wird.

Um diese Beobachtungen zu bestätigen, wurden Immunpräzipitationen gegen RhoGDI durchgeführt. Der immunologische Nachweis umfasste sowohl RhoGDI als auch RhoA. Durch den eingesetzten polyklonalen Antikörper gegen RhoGDI lies sich die Bindung von RhoGDI und RhoA nachweisen (s. Abb. 3.8, Spur 4). Durch Zugabe von 0,5 % SDS wird wiederum der Komplex getrennt, RhoGDI wird ohne RhoA in der gebundenen Fraktion detektiert (s. Abb. 3.8, Spur 8). Dieselben Beobachtungen werden nach Inkubation des Zytosols mit YopT_{WT} gewonnen. Auch hier wird RhoA nicht durch den RhoGDI-Antikörper copräzipitiert. RhoA kann lediglich in der nicht-gebundenen Fraktion, jedoch in modifizierter Form nachgewiesen werden (s. Abb. 3.8, Spur 9 und 10).

Darüber hinaus wurde das Bindungsvermögen von RhoA und RhoGDI an YopT mittels Immunpräzipitation analysiert. Auch hierbei wurden dieselben Versuchsbedingungen wie oben erwähnt verwendet. Nach Zusatz von YopT ist hier ausschließlich RhoGDI durch den YopT-Antikörper präzipitierbar (s. Abb. 3.8, Spur 10). RhoA dagegen findet man in allen Versuchsansätzen lediglich in der nicht-gebundenen Fraktion.

Diese Immunpräzipitationen weisen eindeutig darauf hin, dass YopT durch die Modifikation von RhoA den Komplex RhoA/RhoGDI trennt.

3.1.5 Einfluss von YopT auf den Komplex zwischen RhoGDI und Rac1 bzw. Cdc42

Untersucht man die Immunpräzitationen im Hinblick auf die GTPasen Rac1 und Cdc42, zeichnet sich ein anderes Bild ab als in Abb. 3.8.

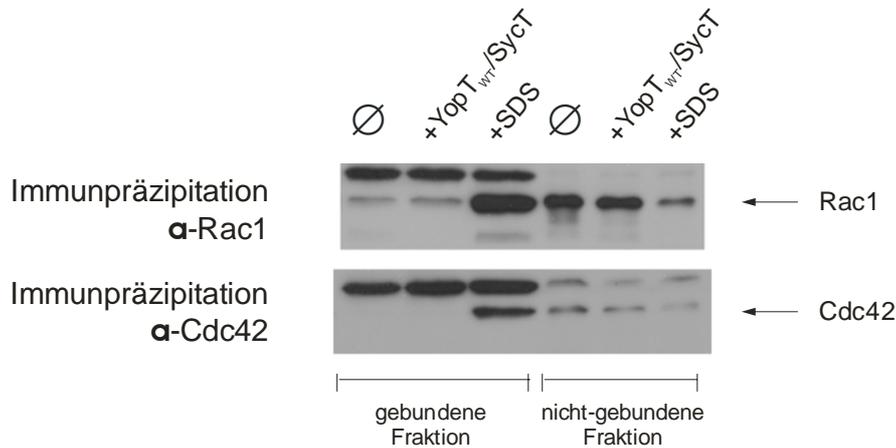


Abb. 3.9: YopT beeinflusst nicht das Immunpräzitationsverhalten von Rac1 und Cdc42.

Zytosol von HeLa-Zellen wurde entweder 30 min bei 37°C mit 0,5 % SDS oder 2 h bei 37°C mit GST-YopT_{WT}/SycT inkubiert. Darauf folgte die Immunpräzitation mit spezifischen Antikörpern gegen Rac1 bzw. Cdc42 (beide BD Biosciences) bei 4°C. Die Präzipitate wurden anschließend mit Protein A-Agarose gebunden. Die gebundenen und nicht-gebundenen Fraktionen wurden mittels einer 15 %-SDS-PAGE und Western Transfer analysiert. Die Immundetektion wurde mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Ø stellt die unbehandelte Kontrolle dar. Die Banden oberhalb der GTPasen werden durch die leichte Kette des Antikörpers hervorgerufen.

Rac1 kann im Gegensatz zu RhoA in jedem Fall durch seinen monoklonalen Antikörper präzipitiert werden (s. Abb. 3.9). Die Bindung des Antikörpers an das Epitop wird folglich nicht durch die Komplexierung mit RhoGDI gestört. Rac1 ist in der gebundenen Fraktion detektierbar, unabhängig davon, ob die Probe vorher mit YopT_{WT} inkubiert wurde oder nicht (Ø). In beiden Fällen liegt die GTPase in vergleichbarer Menge in der gebundenen Fraktion vor. Eine Zugabe von 0,5 % SDS zu diesem Versuchsansatz und die damit verbundene Trennung von RhoGDI erhöhen dagegen die Effizienz der Präzipitation von Rac1.

Bei einer Immunpräzitation gegen Cdc42 mit einem monoklonalen Antikörper wird vermutlich, ähnlich wie bei RhoA, das Epitop durch RhoGDI verdeckt. Aus einer unbehandelten Probe kann Cdc42 nicht präzipitiert werden (s. Abb. 3.9, Ø). Erst durch Zugabe von 0,5 % SDS bindet Cdc42 an den Antikörper und kann später in der

gebundenen Fraktion detektiert werden. Nach Inkubation des HeLa-Zytosols mit YopT_{WT} wird Cdc42 jedoch wie bei der unbehandelten Probe nicht präzipitiert.

Die Ergebnisse der Immunpräzipitationen gegen Rac1 und Cdc42 deuten bereits darauf hin, dass der Komplex zwischen diesen beiden GTPasen und RhoGDI durch YopT unter diesen Versuchsbedingungen *in vitro* nicht getrennt wird, sondern stabil bleibt.

Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurden Immunpräzipitationen gegen RhoGDI und gegen YopT mit Zytosol, das mit YopT_{WT} inkubiert wurde, durchgeführt. Die gebundenen Fraktionen wurden hinsichtlich des Bindungsverhaltens der beiden GTPasen Rac1 und Cdc42 analysiert.

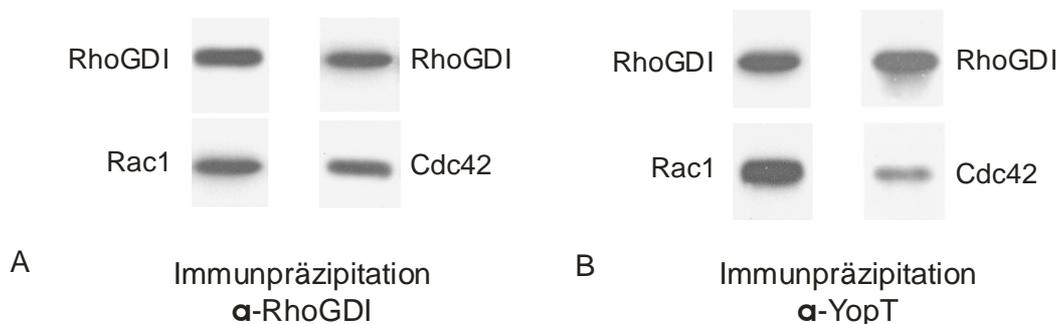


Abb. 3.10: Die Interaktion mit YopT führt nicht zur Trennung des Komplexes zwischen RhoGDI und Rac1 bzw. Cdc42.

HeLa-Zytosol wurde mit GST-YopT_{WT}/SycT 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit spezifischen Antikörpern gegen RhoGDI (Santa Cruz) bzw. mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen YopT immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden anschließend mit Protein A-Agarose gebunden. Gebundene und nicht-gebundene Fraktion wurden einer 15 %-SDS-PAGE mit Western Transfer unterzogen. Die immunologische Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Rac1, Cdc42 (beide BD Biosciences) und RhoGDI (Santa Cruz).

A: Immunpräzipitation gegen RhoGDI

B: Immunpräzipitation gegen YopT

Beide GTPasen werden durch den RhoGDI-Antikörper zusammen mit RhoGDI copräzipitiert (s. Abb. 3.10A). Bei der Immunpräzipitation gegen YopT sind Rac1 und Cdc42 ebenfalls in der gebundenen Fraktion detektierbar (s. Abb. 3.10B). Auch RhoGDI kann in der gebundenen Fraktion nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu RhoA bleiben Rac1 und Cdc42 demzufolge nach der Interaktion mit YopT im Komplex mit RhoGDI gebunden.

3.1.6 Co-Immunpräzipitation des RhoGTPase/RhoGDI-Komplexes aus zytosolischen Fraktionen nach Infektion mit *Yersinia*-Stämmen

Bislang wurde in dieser Arbeit ausschließlich durch *in vitro*-Versuche gezeigt, dass der zytosolische Komplex zwischen RhoA und seinem Inhibitor RhoGDI durch YopT getrennt wird, jedoch der Komplex zwischen RhoGDI und Rac1 bzw. Cdc42 erhalten bleibt. Es sollte daher näher untersucht werden, ob die GTPasen nach Infektionen von HeLa-Zellen mit verschiedenen *Yersinia*-Stämmen ein entsprechendes Verhalten aufweisen.

Zu diesem Zweck wurden subkonfluente HeLa-Zellen mit den *Y. enterocolitica*-Stämmen WAP, W Δ YopT, WpYopT_{WT} und WpYopT_{C139S} (s. Kapitel 5.1.1.2) infiziert (s. Kapitel 5.2.4.3). Aus den anschließend gewonnenen zytosolischen Fraktionen wurde mit einem RhoGDI-Antikörper immunpräzipitiert, und die gebundene Fraktion mittels SDS-PAGE und anschließender Immundetektion hinsichtlich der Interaktionspartner analysiert.

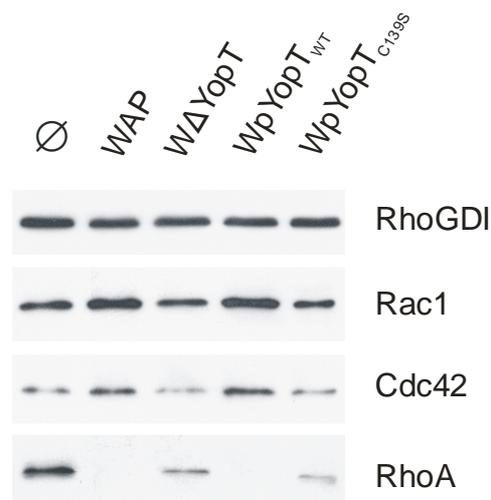


Abb. 3.11: Proteolytisch aktives YopT bewirkt eine erhöhte Bindungskapazität der GTPasen Rac1 und Cdc42 an RhoGDI.

HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen *Yersinia*-Stämmen infiziert. Zytosol von nicht-infizierten (\emptyset) und der infizierten Zellen wurden einer Immunpräzipitation gegen RhoGDI unterzogen. Die gebundenen Fraktionen wurden nach einer 15 %-SDS-PAGE und Western Transfer immunologisch hinsichtlich der Bindung von RhoGDI, RhoA (beide Santa Cruz), Rac1 und Cdc42 (beide BD Biosciences) analysiert.

Bei der Translokation von aktivem YopT (WAP und WpYopT_{WT}) konnte RhoA nicht in der gebundenen Fraktion detektiert werden. Dagegen war eine Copräzipitation von RhoA

mit RhoGDI nach Infektionen mit den *Yersinia*-Stämmen WΔYopT bzw. WpYopT_{C139S} nachweisbar.

Sowohl Rac1 als auch Cdc42 können in jedem untersuchten Fall mit RhoGDI assoziiert nachgewiesen werden, unabhängig von der Anwesenheit oder der Aktivität von YopT.

Auffallend ist jedoch die Tendenz zu einer erhöhten Affinität von Rac1 und Cdc42 zu RhoGDI, wenn die Zellen mit biologisch aktivem YopT infiziert wurden. Dies zeigt sich in Abb. 3.11 deutlich im Vergleich zu Infektionen mit *Yersinia*-Stämmen ohne YopT bzw. mit inaktivem YopT_{C139S}. Ein Mengenartefakt kann ausgeschlossen werden, da die Menge an präzipitiertem RhoGDI in allen Proben vergleichbar groß ist.

3.1.7 Abspaltung der RhoGTPasen von GST-GDI durch YopT

Bisherige Ergebnisse zeigten, dass YopT den Komplex zwischen RhoGDI und RhoA, jedoch nicht den Komplex zwischen RhoGDI und Rac1 bzw. Cdc42 trennt. Shao *et al.* (2002) zeigten jedoch ebenfalls in *in vitro*-Versuchen, dass auch Rac1 und Cdc42 durch YopT modifiziert werden können, indem es das C-terminale Cystein mit dem Prenylrest, der für die Interaktion mit RhoGDI verantwortlich ist, abspaltet. Ob eine Trennung der GTPasen von RhoGDI nach Zusatz von YopT auch unter den in dieser Arbeit angewandten Versuchsbedingungen nachzuweisen ist, wurde deshalb in einem *in vitro*-Ansatz untersucht.

Hierzu wurden in Pulldown-Versuchen die drei RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 aus HeLa-Zelllysate zunächst an rekombinant exprimiertes und gereinigtes GST-RhoGDI gebunden. Die so isolierten Komplexe wurden nach einem Waschschrift für eine bestimmte Zeit mit rekombinantem YopT_{WT}/SycT und YopT_{C139S}/SycT inkubiert, um die GTPasen von RhoGDI abzuspalten. Sowohl der Überstand mit den abgespaltenen GTPasen als auch die gebundenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Transfer immunologisch analysiert.

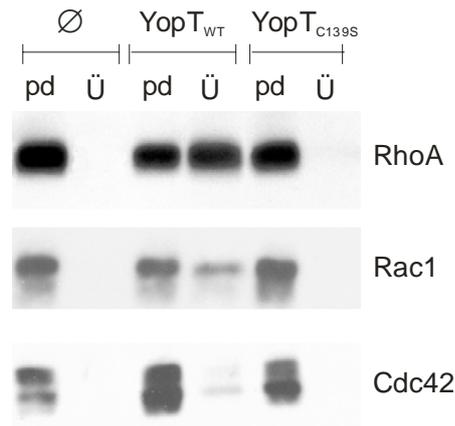


Abb. 3.12: YopT_{WT} ist in der Lage, *in vitro* RhoGTPasen von GST-RhoGDI abzuspalten.

HeLa-Zelllysate wurden mit an Glutathion-gekoppelten Sepharose-Kügelchen immobilisiertem GST-RhoGDI inkubiert, um die GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 daran zu binden. Nach einem Waschschrift wurden die Ansätze entweder mit Puffer (Ø), YopT_{WT}/SycT oder YopT_{C139S}/SycT inkubiert. Der Überstand (Ü) und die gebundenen Fraktionen (pd) wurden nach 12 %-SDS-PAGE und Western Transfer immunologisch hinsichtlich RhoA, Rac1 und Cdc42 analysiert.

Bei der Behandlung mit biologisch inaktivem YopT_{C139S} bleibt der Komplex zwischen den GTPasen und ihrem Inhibitor erhalten, RhoA, Rac1 und Cdc42 können im Überstand nicht detektiert werden. Dagegen wird RhoA im Fall des YopT_{WT} zu ca. 50 % abgespalten. Rac1 liegt ebenfalls nach Inkubation mit YopT_{WT} im Überstand vor, allerdings in wesentlich geringeren Mengen als RhoA. Cdc42 kann nach Inkubation mit YopT_{WT} lediglich in Spuren im Überstand nachgewiesen werden.

YopT ist also in der Lage, eine Trennung der drei analysierten RhoGTPase/RhoGDI-Komplexe zu verursachen, jedoch mit unterschiedlicher Effizienz.

3.1.8 Analyse von Rac1 mittels 2D-Gelelektrophorese nach Interaktion mit YopT

Wie durch vorangegangene Experimente bereits gezeigt wurde, modifiziert YopT die kleine GTPase RhoA *in vitro*, was sowohl durch die erhöhte elektrophoretische Mobilität in der SDS-PAGE als auch durch die Verlagerung des pI in der 2D-Gelelektrophorese nachgewiesen wurde (s. Abb. 3.4 und 3.5). Eine erhöhte Mobilität im Falle von Rac1 mittels SDS-PAGE konnte unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht beobachtet werden (s. Abb. 3.7). Daher sollte das Verhalten von Rac1 in der 2D-Gelelektrophorese untersucht werden. Es wurde sowohl unbehandeltes Lysat von HeLa-

Zellen als auch Lysat, das mit YopT_{WT}/SycT inkubiert wurde, über die 2D-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Transfer immunologisch analysiert.

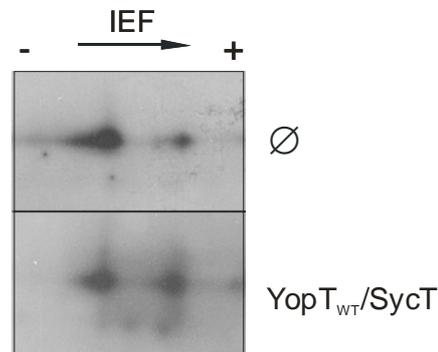


Abb. 3.13: YopT führt nicht zu einer Verschiebung des pI von Rac1 ins Saure.

Unbehandeltes (Ø) und mit GST-YopT_{WT}/SycT inkubiertes HeLa-Zelllysate wurde einer 2D-Gelelektrophorese unterzogen. Nach dem Western Transfer erfolgte die Immundetektion mit einem Rac1-spezifischen Antikörper.

Wie in Abb. 3.13 zu sehen ist, kann Rac1 im endogenen Zustand (Ø) in zwei Formen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten detektiert werden. Nach Behandlung mit YopT_{WT} erkennt man lediglich eine leichte Zunahme des saureren Spots. Allerdings erfolgt keine vollständige Verschiebung zum sauren pH wie bei RhoA (s. Abb. 3.5).

3.1.9 Einfluss von YopT auf RhoGDI

Nachdem gezeigt werden konnte, dass YopT den Komplex RhoGTPase/RhoGDI angreift und RhoA modifiziert, stellte sich die Frage, ob RhoGDI ebenfalls in Folge der Wirkung von YopT modifiziert wird. Da Bourmeyster und Vignais (1996) mittels 2D-Gelelektrophorese gezeigt haben, dass zwischen zwei Formen von RhoGDI unterschieden werden kann, wurde diese Methode gewählt, um biochemische Veränderungen von RhoGDI zu untersuchen.

Die an RhoGTPasen gebundene Form soll sich demnach durch einen länglichen Spot im Bereich von pH 4,6-5,2 zeigen, während die freie Form, ohne Bindung an eine GTPase, durch einen Spot zwischen pH 5,0-5,2 charakterisiert wird (Bourmeyster und Vignais, 1996).

Um Erkenntnisse über RhoGDI nach Wirkung von YopT zu gewinnen, wurde Zytosol, das *in vitro* mit YopT-Proteinen inkubiert bzw. nach Infektionen mit verschiedenen *Y. enterocolitica*-Stämmen präpariert worden war, mittels der 2D-Gelelektrophorese untersucht. Zur Infektion wurden folgende Stämme gewählt: WAP, WΔYopT, WpYopT_{WT} und WpYopT_{C139S} (s. Kapitel 5.1.1.2). Außerdem wurde Zytosol von HeLa-Zellen mit rekombinantem YopT_{WT}/SycT bzw. YopT_{C139S}/SycT inkubiert. Nach der 2D-Gelelektrophorese und Western Transfer wurden die Proben mittels Immundetektion untersucht.

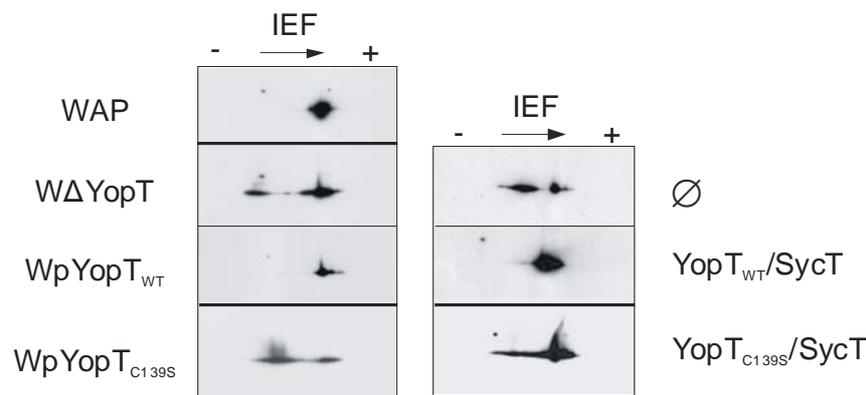


Abb. 3.14: YopT verursacht *in vivo* und *in vitro* eine Akkumulation von RhoGDI in seinem sauren pI.

HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen *Yersinia*-Stämmen infiziert. Zusätzlich wurde HeLa-Zytosol mit GST-YopT_{WT}/SycT bzw. GST-YopT_{C139S}/SycT 2 h bei 37°C inkubiert. Alle Zytosolfractionen wurden zusammen mit einer unbehandelten Kontrolle (Ø) über eine 2D-Gelelektrophorese analysiert. Nach dem Western Transfer wurde RhoGDI mittels eines spezifischen Antikörpers (Santa Cruz) detektiert.

Im endogenen Zustand (Ø) zeigt sich RhoGDI in zwei Spots (s. Abb. 3.14). Es konnten ein runder Spot im Bereich von pH 5,0, sowie ein länglicher Spot im basischeren Bereich (pH 5,3) nachgewiesen werden.

Eine Veränderung ist jedoch zu beobachten, nachdem HeLa-Zellen mit verschiedenen *Y. enterocolitica*-Stämmen infiziert wurden. Es konnte lediglich der saure Spot von RhoGDI nach der 2D-Gelelektrophorese detektiert werden, wenn aktives YopT (WAP und WpYopT_{WT}) in die Zellen transloziert worden war. Wurden die HeLa-Zellen hingegen mit WΔYopT oder WpYopT_{C139S} infiziert, war keine Abweichung vom endogenen Zustand erkennbar, d.h. sowohl der basische als auch der saure Spot von RhoGDI waren nachweisbar.

Wie außerdem in Abb. 3.14 zu sehen ist, konnte dieses Ergebnis ebenfalls erzielt werden, wenn HeLa-Zytosol mit rekombinanten YopT-Proteinen inkubiert wurde. Auch hier war bei YopT_{WT} lediglich der saure Spot nachweisbar, während die Probe, die mit YopT_{C139S} behandelt wurde, beide Spots aufwies.

3.1.10 Analyse des Bindungsverhaltens der RhoGTPasen an ihre Effektoren nach Interaktion mit YopT

Aktivierte, d.h. mit GTP beladene, RhoGTPasen treten mit Effektorproteinen in Wechselwirkung und geben dadurch Signale weiter. Für die einzelnen RhoGTPasen sind verschiedene Effektorproteine bekannt. Die Fragestellung, in welchem Aktivitätszustand die RhoGTPasen nach einer Interaktion mit YopT vorliegen bzw. ob sie noch in der Lage sind, an ihre Effektoren zu binden, wurde mit Hilfe von Pulldown-Versuchen untersucht. Gewählt wurden dafür GST-Rhotekin (RBD, *Rho binding domain*) als Effektorprotein für RhoA und GST-PAK (CRIB, *Cdc42/Rac-interactive binding*), das sowohl mit aktiviertem Rac1 als auch mit aktiviertem Cdc42 interagiert. Als Substrat diente HeLa-Zelllysat, das aus Zellen gewonnen wurde, die mit verschiedenen *Y. enterocolitica*-Stämmen (WAP, WΔYopT, WpYopT_{WT} und WpYopT_{C139S}, s. Kapitel 5.1.1.2) infiziert worden waren. Zusätzlich wurde Lysat mit nicht-hydrolysierbarem GTPγS beladen und mit rekombinantem YopT_{WT}/SycT inkubiert. Die gebundenen Fraktionen wurden nach SDS-PAGE und Western Transfer immunologisch analysiert.

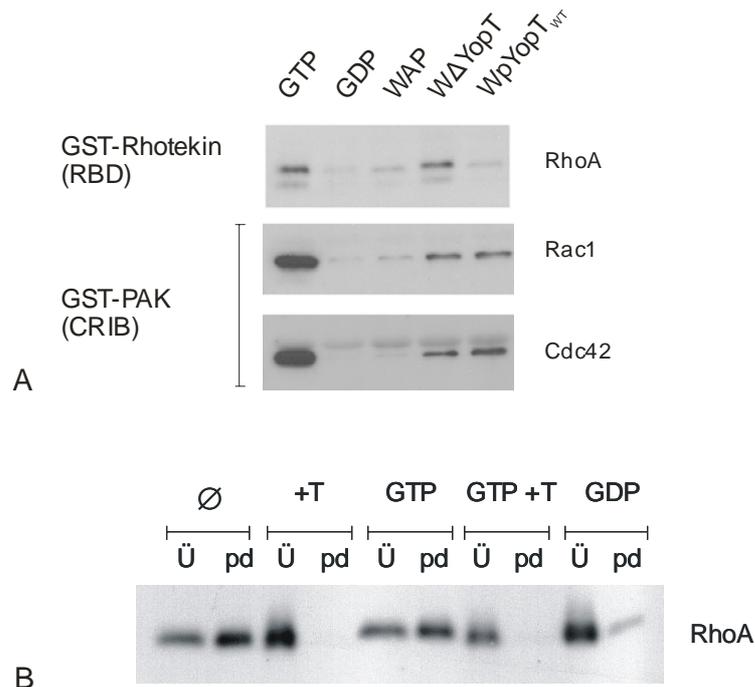


Abb. 3.15: YopT beeinflusst die Interaktion von RhoGTPasen mit ihren spezifischen Effektoren.

GST-Rhotekin (RBD) bzw. GST-PAK (CRIB) wurde an Glutathion-gekoppelte Sepharose-Kügelchen gebunden und mit HeLa-Zelllysate inkubiert. Als Kontrolle wurde Lysat entweder mit GTP γ S (GTP) oder GDP β S (GDP) inkubiert, um die GTPasen mit diesen Nukleotiden zu beladen.

A: HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen *Yersinia*-Stämmen infiziert. Die Pulldown-Versuche mit GST-Rhotekin und GST-PAK wurden mit Lysat dieser Zellen durchgeführt. Analysiert wurden die gebundenen Fraktionen über eine 15 %-SDS-PAGE mit Western Transfer und anschließender Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern gegen RhoA (Santa Cruz), Rac1 und Cdc42 (beide BD Biosciences).

B: HeLa-Zelllysate wurde mit GST-YopT_{WT}/SycT inkubiert (+T). Zusätzlich wurde Lysat zuerst mit GTP γ S und anschließend mit GST-YopT_{WT}/SycT inkubiert (GTP+T). Mit allen Ansätzen und einer unbehandelten Kontrolle (Ø) wurde ein Pulldown-Versuch mit GST-Rhotekin durchgeführt. Gebundene (pd) und nicht-gebundene (Ü) Fraktionen wurden mittels 15 %-SDS-PAGE und Western Transfer immunologisch hinsichtlich RhoA untersucht.

Es zeigte sich, dass RhoA nicht mehr an Rhotekin bindet, nachdem YopT mit dieser GTPase in Wechselwirkung trat. Dieser Effekt trat sowohl bei Infektionen mit biologisch aktivem YopT (WAP, WpYopT_{WT}, s. Abb. 3.15A) als auch nach Inkubation von Lysat mit rekombinantem YopT_{WT}/SycT auf (s. Abb. 3.15B). Darüber hinaus führte auch eine Beladung von RhoA mit GTP γ S mit anschließender Inkubation mit YopT_{WT}/SycT nicht zu einer Bindung an das Effektorprotein (s. Abb. 3.15B).

Die GTPasen Rac1 und Cdc42 dagegen zeigten ein anderes Bindungsverhalten. Nach einer Infektion, bei der ausschließlich YopT_{WT} transloziert wurde, waren beide GTPasen in der Lage, mit der Bindungsdomäne von PAK zu interagieren. Ebenso wurden Rac1 und Cdc42 an PAK gebunden, wenn alle Yops mit Ausnahme von YopT transloziert wurden. Wurden

hingegen alle Yop-Proteine inklusive YopT in die Zelle eingeschleust, fand keine Interaktion mehr mit dem Effektorprotein statt.

Dieses Resultat deutet darauf hin, dass für die vollständige Inaktivierung von Rac1 und Cdc42 auch andere Yops als YopT benötigt werden.

3.2 YopO

3.2.1 Bindung von RhoA und Rac1 an GST-YopO

Von der bakteriellen Serin/Threonin-Kinase YopO ist bekannt, dass sie unter anderem mit den beiden RhoGTPasen RhoA und Rac1 interagiert (Dukuzumuremyi *et al.*, 2000; Barz *et al.*, 2000). Jedoch ist noch nicht untersucht worden, ob nur freie oder auch mit RhoGDI komplexierte GTPasen an YopO binden können. Aus diesem Grund wurden verschiedene Pulldown-Versuche mit rekombinant-exprimiertem GST-YopO durchgeführt. Als Substrat diente sowohl unbehandeltes als auch mit YopT_{WT}/SycT inkubiertes Lysat von HeLa-Zellen, sowie in *E. coli* rekombinant exprimiertes, gereinigtes RhoA bzw. Rac1 (nach Abspaltung der GST-Einheit). Gebundene und nicht-gebundene Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Immundetektion untersucht.

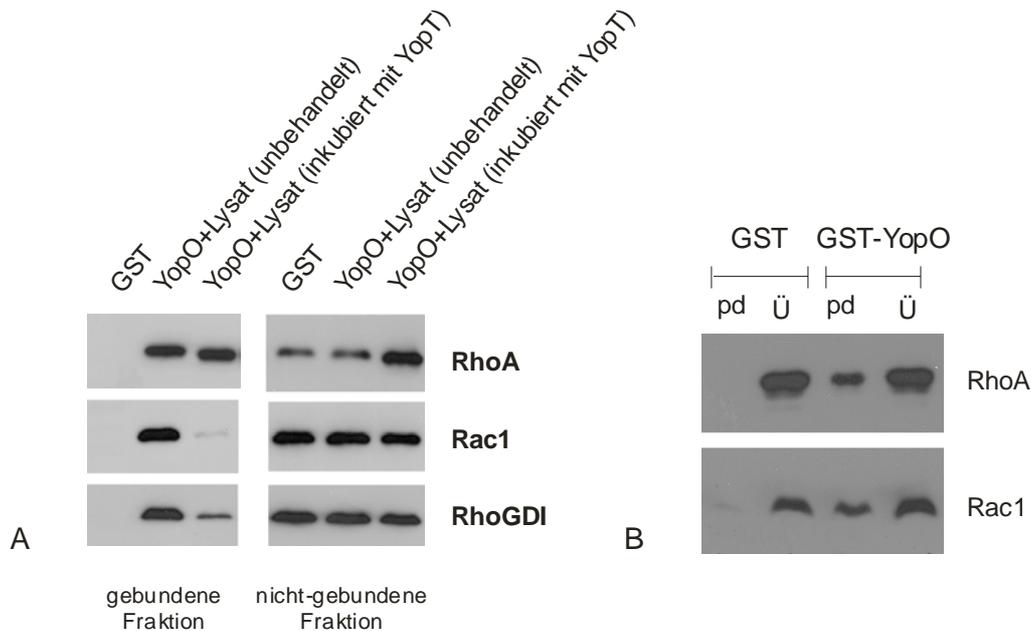


Abb. 3.16: Die RhoGTPasen RhoA und Rac1 interagieren mit YopO.

A: An Glutathion-gekoppelte Sepharose-Kügelchen gebundenes GST-YopO wurde mit unbehandeltem HeLa-Zelllysate sowie mit Lysate, das zuvor mit Yop_{T^{WT}}/SycT inkubiert worden war, inkubiert. Als Kontrolle diente ein Pull-down-Versuch mit GST.

B: Der Pull-down-Versuch mit GST-YopO wurde außerdem mit RhoA und Rac1, die in *E. coli* rekombinant exprimiert und gereinigt worden waren, durchgeführt.

Gebundene (pd) und nicht-gebundene (Ü) Fraktionen wurden bei A+B einer 15 %-SDS-PAGE unterzogen. Auf den Western Transfer folgte die Immundetektion von RhoA und Rac1.

Sowohl RhoA als auch Rac1 aus unbehandeltem HeLa-Zelllysate interagierten mit der Kinase (s. Abb. 3.16A). Zusätzlich konnte der Inhibitor der RhoGTPasen RhoGDI in der gebundenen Fraktion detektiert werden. YopO ist also *in vitro* in der Lage, den Komplex GTPase/RhoGDI zu binden.

Wie Abb. 3.16A weiterhin zeigt, wurde auch modifiziertes RhoA aus mit Yop_{T^{WT}} behandeltem Lysate mit YopO assoziiert vorgefunden. Ebenso interagierten in einem *in vitro*-Ansatz gereinigte RhoA- und Rac1-Proteine, die in *E. coli* exprimiert wurden und damit keine posttranslationalen Modifikationen durchlaufen haben, mit der Kinase (s. Abb. 3.16B).

3.2.2 Analyse des Bindungsverhaltens der RhoGTPasen an ihre Effektoren nach Infektion mit WA-C(pTTSS + pACYC-yopO)

Dukuzumuremyi *et al.* (2000) haben bereits nachgewiesen, dass RhoA nach einer Infektion mit *Yersinia*-Stämmen, die lediglich YpkA (YopO-Homolog in *Y. enterocolitica*) translozieren, verstärkt an sein Effektorprotein Rhotekin bindet. Wie bereits oben erwähnt wurde, findet diese Interaktion nur im aktiven, d.h. GTP-beladenen Zustand der GTPase statt. Es wurde jedoch noch nicht untersucht, ob derselbe Effekt auch im Falle von Rac1 auftritt. Um diese Frage zu klären, wurden HeLa-Zellen mit WpYopO (s. Kapitel 5.1.1.2), einem *Y. enterocolitica*-Stamm, der ausschließlich YopO in die Zellen injiziert, infiziert. Das Lysat dieser Zellen wurde im Folgenden für Pulldown-Versuche mit GST-Rhotekin (RBD) als Effektorprotein für RhoA und GST-PAK (CRIB), das mit aktiviertem Rac1 interagiert, verwendet. Die gebundenen Fraktionen wurden nach SDS-PAGE und Western Transfer immunologisch hinsichtlich der Bindung der GTPasen an ihren spezifischen Effektor untersucht.

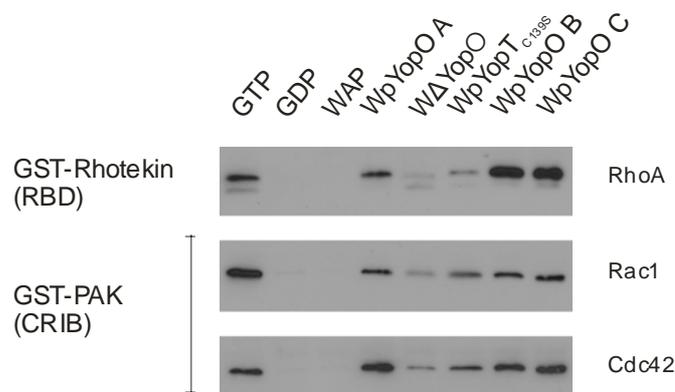


Abb. 3.17: YopO führt zu einer Aktivierung der GTPasen.

HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen *Yersinia*-Stämmen infiziert. Mit dem Lysat dieser Zellen wurden Pulldown-Versuche mit GST-Rhotekin (RBD) und GST-PAK (CRIB) durchgeführt. Im Fall von pYopO wurde Lysat aus drei unabhängigen Infektionen eingesetzt (WpYopO A-C). Als Kontrolle wurde Lysat mit GTPγS bzw. GDPβS inkubiert. Die gebundenen Fraktionen wurden einer 15 %-SDS-PAGE und Western Transfer unterzogen. Die Immundetektion erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen RhoA (Santa Cruz), Rac1 und Cdc42 (beide BD Biosciences).

Sowohl RhoA als auch Rac1 wurden nach Infektion mit WpYopO in signifikanter Menge in der gebundenen Fraktion vorgefunden. Zur Kontrolle, dass dieser Effekt nicht allein auf einer Aktivierung der GTPasen durch eine Infektion allgemein beruht, wurde der Versuch

mit HeLa-Zelllysats durchgeführt, das aus Zellen nach einer Infektion mit WpYopT_{C139S} gewonnen wurde. In diesem Fall findet keine Modifikation der GTPasen durch YopT_{C139S} statt (s. Abb. 3.4). Wie ebenfalls in Abb. 3.17 zu erkennen ist, binden beide GTPasen nach der Interaktion mit dem mutierten YopT an den entsprechenden Effektor. Jedoch ist zu beobachten, dass im Falle der Infektion mit YopO eine deutlich größere Menge mit dem Effektorprotein assoziiert ist als nach der Infektion mit dem inaktiven YopT_{C139S}.

Da PAK neben Rac1 auch als Effektor von Cdc42 fungiert, wurden die Proben zusätzlich auf die Bindung von Cdc42 analysiert, um die Frage zu klären, ob der Effekt von YopO auf den Aktivitätsstatus der beiden GTPasen RhoA und Rac1 spezifisch für diese ist oder allgemein GTPasen betreffen kann. Die Ergebnisse dieses Experiments sind ebenfalls in Abb. 3.17 zu sehen.

Obwohl in bisherigen Arbeiten keine direkte Interaktion von YopO mit Cdc42 nachgewiesen werden konnte, konnte ebenfalls eine verstärkte Bindung von Cdc42 an PAK beobachtet werden.

3.3 YopT und YopO

3.3.1 Membranbindungsverhalten von RhoA und Rac1 nach Infektionen

Wie schon Zumbihl *et al.* (1999) zeigten, wird RhoA aus der Membran gelöst, wenn biologisch aktives YopT in die Zelle injiziert wird. Um den Einfluss von YopT und YopO auf das Membranbindungsverhalten der GTPase vergleichen zu können, wurden native Membranfraktionen von HeLa-Zellen nach Infektionen mit *Y. enterocolitica*-Stämmen hinsichtlich des RhoA-Anteils mit Hilfe der SDS-PAGE und Immundetektion untersucht.



Abb. 3.18: Membranbindungsverhalten von RhoA nach Infektionen mit verschiedenen *Yersinia*-Stämmen.

HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen *Yersinia*-Stämmen infiziert. Native Membranfraktionen dieser Zellen wurden einer 15 %-SDS-PAGE unterzogen. Nach dem Western Transfer erfolgte die Immundetektion von RhoA. Ø bezeichnet die Membranfraktion nicht-infizierter Zellen.

Auch hier war RhoA nicht in der Membran detektierbar, wenn biologisch aktives YopT in die Zelle injiziert worden war (WAP, WpYopT_{WT}, WΔYopO). Wurde kein YopT in die Zelle transloziert (WΔYopT), konnte RhoA in der Membran nachgewiesen werden. Ein Anstieg der RhoA-Menge in der Membran zeigte sich jedoch, wenn lediglich YopT_{C139S} bzw. YopO injiziert wurden. Vermutlich wird die GTPase durch beide Proteine, die in *in vitro*-Versuchen stabil an RhoA gebunden haben, an die Membran rekrutiert. Dieses Ergebnis ist auch ein Hinweis darauf, dass YopT während einer Infektion in der Zellmembran verankert vorliegt.

Darüber hinaus wurden die nativen Membranfraktionen auch hinsichtlich ihres Gehalts an Rac1 untersucht.



Abb. 3.19: Membranbindungsverhalten von Rac1 nach Infektionen mit verschiedenen *Yersinia*-Stämmen.

HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen *Yersinia*-Stämmen infiziert. Native Membranfraktionen dieser Zellen wurden einer 15 %-SDS-PAGE unterzogen. Nach dem Western Transfer erfolgte die Immundetektion von Rac1. Ø bezeichnet die Membranfraktion nicht-infizierter Zellen.

Bei einer Infektion mit WAP, der in Lage ist, alle Yop-Effektorproteine zu translozieren, verblieb Rac1 in der Membran, allerdings in geringerer Menge im Vergleich zu uninfizierten Zellen. In vergleichbarer Menge wie bei uninfizierten Zellen konnte Rac1 nach der ausschließlichen Translokation von YopT_{WT} in der Membran detektiert werden. Ein Anstieg der Rac1-Menge war zu verzeichnen, wenn alle Yops außer YopT (WΔYopT), ausschließlich das biologisch inaktive YopT_{C139S} bzw. ausschließlich YopO in die Zellen injiziert wurden. Rac1 war jedoch kaum mehr in der Membran nachweisbar, wenn alle *Yersinia*-Effektoren mit Ausnahme von YopO transloziert wurden (WΔYopO). Es ist eindeutig zu erkennen, dass YopT weniger Einfluss auf das Membranverhalten von Rac1 hat als YopO.

3.3.2 Inkubation von nativen Membranfraktionen mit gereinigten YopT- bzw. YopO-Proteinen

Um den Einfluss von YopT bzw. YopO auf die Membranbindung von RhoA auch *in vitro* zu untersuchen, wurden native Membranfraktionen von HeLa-Zellen zusammen mit HeLa-Zytosol sowie mit rekombinant exprimiertem, gereinigtem YopT_{WT}/SycT bzw. YopO inkubiert. Außerdem wurden Ansätze mit beiden Yop-Proteinen gleichzeitig behandelt (YopO+YopT). Weitere Proben wurden zuerst mit YopO, das an die HeLa-Zellmembran bindet (Hakansson *et al.*, 1996a), und anschließend mit YopT_{WT}/SycT inkubiert (1. YopO, 2. YopT). Es wurden mehrere Versuchsansatzreihen mit jeweils YopT_{WT}/SycT, YopO, YopO+YopT, 1. YopO, 2. YopT über entsprechende Zeitintervalle inkubiert. Die Membranbestandteile wurden mittels Ultrazentrifugation vom Zytosol getrennt und in Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen. Der RhoA-Anteil in der Membran wurde immunologisch detektiert.

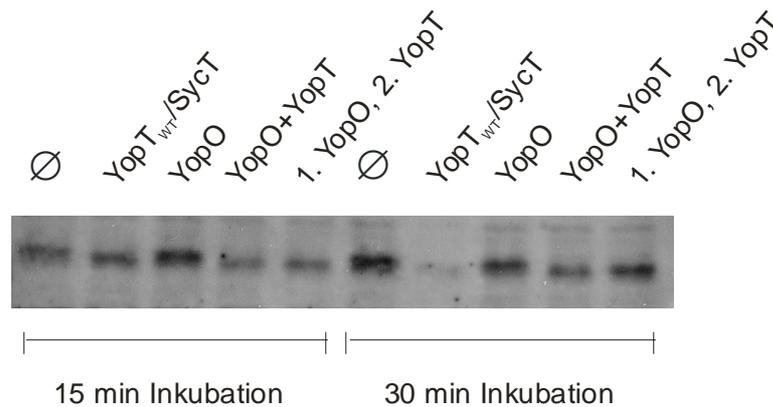


Abb. 3.20: Einfluss von YopT und YopO auf das Membranbindungsverhalten von RhoA *in vitro*.

Native Membranfraktionen von HeLa-Zellen wurden mit Zytosol sowie mit GST-YopT_{WT}/SycT und GST-YopO bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden zum einen jeweils getrennt eingesetzt. In einem weiteren Ansatz wurden die Membranfraktionen mit beiden Proteinen gleichzeitig inkubiert (YopO+YopT). Zusätzlich wurde ein Ansatz zuerst 1 h mit YopO behandelt, darauf folgte die Inkubation mit YopT für die angegebene Zeit (1. YopO, 2. YopT). Die Versuchsreihen wurden für 15 min bzw. für 30 min durchgeführt. Nach Ultrazentrifugation wurden die festen Membranbestandteile mittels einer 15 %-SDS-PAGE und Western Transfer analysiert. RhoA wurde mit einem spezifischen Antikörper (Santa Cruz) nachgewiesen. Ø bezeichnet die unbehandelten Kontrollen, die jeweils über dieselben Zeiträume bei 37°C inkubiert wurden.

Nach 15-minütiger Inkubationszeit war RhoA noch in jedem Ansatz in der Membran nachweisbar. Es zeigte sich allerdings in der Probe, die mit YopO behandelt wurde, ein Anstieg der RhoA-Menge. Bereits nach 30 min Inkubationsdauer war RhoA durch YopT vollständig aus der Membran herausgelöst worden. In der Probe mit YopO blieb RhoA dagegen in der Membranfraktion detektierbar. Ferner zeigte sich, dass YopO vermutlich in der Lage ist, den herauslösenden Effekt von YopT zu überdecken, da RhoA sowohl in der Probe, die mit beiden Proteinen gleichzeitig inkubiert wurde, als auch in dem Ansatz, dem zuerst YopO, dann YopT_{WT} hinzugefügt wurde, in der Membran nachzuweisen war.

3.4 Kristallisationsversuche

3.4.1 Reinigung von YopT/SycT

Im Zuge der Reinigung von GST-YopT/SycT wurde auch die Kristallisation des Komplexes angestrebt, um Erkenntnisse über die Struktur und den Einfluss des Chaperons auf die Faltung des Effektorproteins zu gewinnen. Bislang sind noch keine Daten über die Struktur des Komplexes zwischen einem vollständigen Effektor und seinem Chaperon bekannt. Für die Kristallisationsversuche wurde sowohl GST-YopT_{WT}/SycT als auch GST-YopT_{C139S}/SycT gereinigt. Beide Proteinkomplexe konnten in großer Menge (15 mg/L Bakterienkultur) isoliert werden. Jedoch war es noch nicht möglich, aus diesem Material Kristalle zu erhalten.

Nach der Reinigung der Proteinkomplexe zeigte sich ein Unterschied zwischen den Komplexen mit YopT_{WT} und YopT_{C139S}: An das mutierte YopT bindet weniger SycT als an den Wildtyp. Der Effekt konnte durch Inkubation der Komplexe über Nacht in Pufferlösung noch verstärkt werden. Hierzu wurden jeweils gleiche Mengen GST-YopT_{WT}/SycT und GST-YopT_{C139S}/SycT an Glutathion-gekoppelte Sepharose-Kügelchen gebunden und in 1 mL (s. Abb. 3.21A) bzw. 50 mL (s. Abb. 3.21B) PBS über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde entfernt, und die gebundenen Proteine einer SDS-PAGE mit Western Transfer unterzogen.

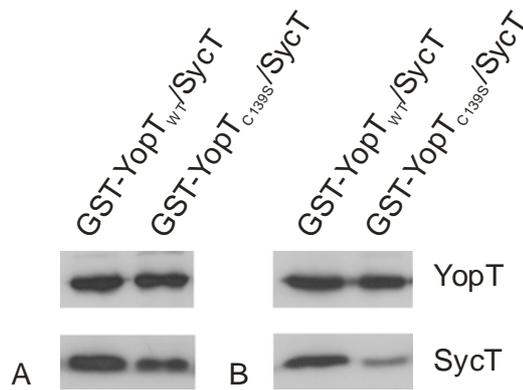


Abb. 3.21: Die Mutation im katalytischen Zentrum von YopT führt zu einer schwächeren Bindung von SycT an YopT_{C139S}.

Gleiche Mengen GST-YopT_{WT}/SycT und GST-YopT_{C139S}/SycT wurden an Glutathion-gekoppelte Sepharose-Kügelchen gebunden. Die Kügelchen wurden anschließend über Nacht unter Rotation in 1 mL (A) bzw. 50 mL (B) PBS inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die gebundenen Proteine mittels einer 15 %-SDS-PAGE und Western Transfer analysiert. Die Immundetektion erfolgte mit affinitäts-gereinigten Antikörpern gegen YopT und SycT.

Wie in Abb. 3.21 ersichtlich ist, wird die Dissoziation des SycT von YopT_{C139S} durch die Verdünnung verstärkt. Aus dem unterschiedlichen Komplexverhalten von SycT kann geschlossen werden, dass das Cystein im katalytischen Zentrum von YopT mit SycT interagiert. Da derartige Bindungsverhältnisse noch nicht für TTSS-Chaperone beschrieben worden waren, wurde eine Kristallisation von SycT angestrebt, um weitere Einblicke in die Eigenschaften dieses Chaperons zu erhalten.

3.4.2 Kristallisation von SycT

Die Reinigung von SycT erfolgte wie in Kapitel 5.2.2.2 beschrieben. Die Kristallisationsversuche wurden in Kooperation mit Dr. Michael Groll, Adolf-Butenandt-Institut der LMU München, durchgeführt. Die Auflösung der SycT-Kristalle betrug 2,5 Å. Das Kristallmodell schließt die Aminosäuren 3-112 ein. Die Struktur der 18 Aminosäuren am C-Terminus von SycT konnte nicht definiert werden.

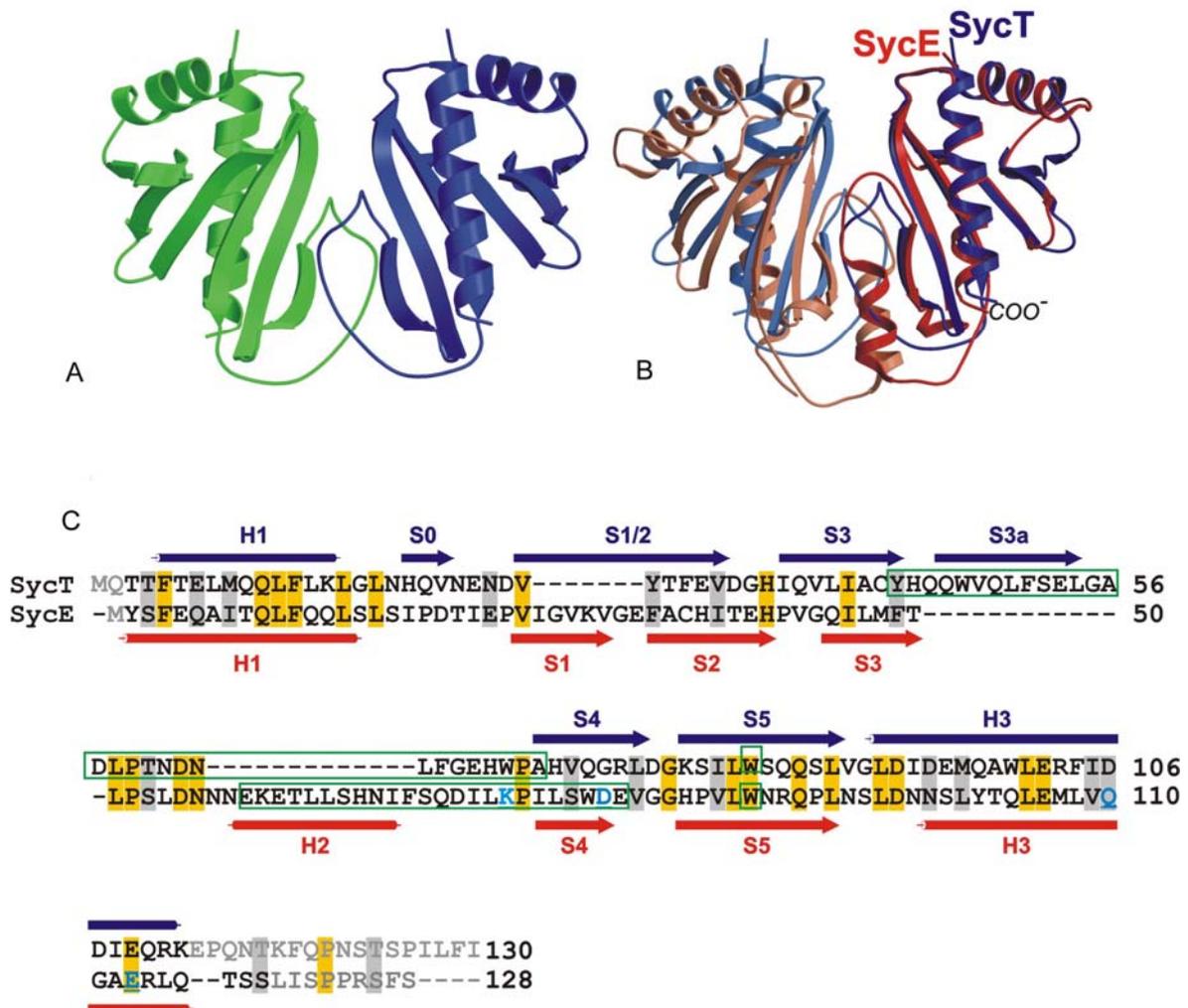


Abb. 3.22: Struktur von SycT.

A: Bandmodell des SycT-Dimers. Ein Monomer ist in grün dargestellt, das zweite Monomer in blau.

B: Überlagerung der Dimere von SycT (blau) und SycE (rot).

C: Struktur-basierte Sequenzalignierung von SycT und SycE. Die Sekundärstruktur-Elemente von SycT sind über der Alignierung in blau angegeben, die Sekundärstruktur-Elemente von SycE in rot unterhalb der Sequenz. Identische Aminosäurereste beider Chaperone sind auf gelbem Hintergrund dargestellt, homologe Reste auf grauem Hintergrund. Grau geschriebene Sequenzbereiche konnten in den jeweiligen Strukturmodellen nicht aufgelöst werden. Die Dimerisierungsbereiche sind durch grüne Boxen markiert. Aminosäuren von SycE, die zur Bindung an YopE beitragen, sind blau gekennzeichnet.

SycT tritt als Dimer auf (s. Abb. 3.22A). Grundsätzlich ähnelt die Struktur von SycT der Faltung anderer TTSS-Chaperone, die bislang kristallisiert wurden. Eine Überlagerung von SycT (blau) mit SycE (rot), welches zu 20 % identisch mit SycT ist, zeigt charakteristische Übereinstimmungen zwischen beiden Proteinen (s. Abb. 3.22B). Die Orientierung der N-

und C-terminalen α -Helices H1 und H3 beider Chaperone ist innerhalb der Monomere nahezu identisch. Ebenso findet sich in beiden Chaperonen ein ähnliches β -Faltblatt, das aus fünf β -Strängen (S1-5) gebildet wird. Bei SycT ist zusätzlich zwischen der α -Helix H1 und dem β -Strang S1 ein weiterer β -Strang S0 zwischengeschaltet (s. Abb. 3.22C). Einen deutlichen Unterschied in der Faltung beider Proteine weist jedoch der Dimerisierungsbereich auf. Während SycE in diesem Bereich die α -Helix H2 besitzt, ist der Dimerisierungsbereich von SycT durch eine Schleife charakterisiert. Diese Abweichung führt dazu, dass die relative Lage der Dimer-Untereinheiten zueinander sich bei SycE und SycT unterscheidet. Die Verkipfung der Untereinheiten gegeneinander ist bei beiden Chaperonen verschieden. Aus diesem Grund kann auch nur ein Monomer von SycT mit SycE überlagert werden (s. Abb. 3.22B).

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Wirkung der *Yersinia*-Effektorproteine YopT und YopO auf die kleinen GTPasen der Rho-Familie (RhoA, Rac1 und Cdc42) untersucht werden. Hierzu wurde ein *in vitro*-Ansatz mit rekombinant exprimierten YopT- und YopO-Proteinen und HeLa-Zelllysate sowie ein *in vivo*-Ansatz mit *Yersinia*-infizierten HeLa-Zellen gewählt.

4.1 Reinigung von GST-YopT und Nachweis der biologischen Aktivität

Als Aufgabe stand zu Beginn dieser Arbeit, ein *in vitro*-System zu etablieren, mit dessen Hilfe die Wirkung von YopT auf Proteine der Wirtszelle untersucht werden kann. Um *in vitro*-Untersuchungen durchführen zu können, wurde jedoch rekombinant exprimiertes, gereinigtes YopT in löslicher Form benötigt. Für Expression und Reinigung wurde das GST-System (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Es ermöglicht, N-terminal mit GST fusionierte Proteine zu exprimieren und diese anschließend affinitätschromatographisch zu isolieren. Auf diese Weise wurde GST-YopT_{WT} gereinigt. Jedoch zeigte sich nach der Reinigung, dass es in dieser Form instabil war und degradiert vorlag.

Es war bereits bekannt, dass in *Yersinia* für YopT ein spezifisches Chaperon, SycT, existiert. Allgemein sind molekulare Chaperone Proteine, die an Proteine binden und damit eine sonst instabile Konformation dieses Proteins stabilisieren. Durch kontrolliertes Binden und Entlassen des Substratproteins trägt das Chaperon dazu bei, dass dieses Protein den korrekten weiteren Prozessen unterzogen wird, sei es Faltung, Transport zu einem bestimmten subzellulären Kompartiment o.ä. (Ellis und van der Vies, 1991).

Über die Rolle einzelner Sycs gab es bislang nur wenige Erkenntnisse. Unter anderem wurde jedoch gezeigt, dass in Abwesenheit des für YopE spezifischen Chaperons SycE dieses Effektorprotein in der *Yersinia*-Zelle schnell degradiert (Frithz-Lindsten *et al.*, 1995).

Die *syc*-Gene liegen auf pYV in direkter Nachbarschaft zu den Genen ihrer Effektorproteine. So ist am 3'-Ende von *yopT* in einem überlappenden Leserahmen *sycT* lokalisiert. Beide Gene bilden ein Operon (Iriarte und Cornelis, 1998) (s. Abb. 3.1). Diese Tatsache wurde für die Expression von YopT als GST-Fusionsprotein ausgenutzt. Der

gesamte codierende Bereich *yopT/sycT* wurde mit Hilfe der PCR amplifiziert und in den pGEX-Vektor integriert, sodass beide Gene transkribiert werden konnten. Beide Proteine wurden exprimiert und lagen nach der Reinigung im Eluat vor. Wie sich zeigte, bindet SycT stabil an YopT und konnte dadurch zusammen mit dem Effektorprotein als Komplex gereinigt werden. Darüber hinaus wurde deutlich, dass keine Degradationsprodukte von YopT mehr auftraten, wenn es zusammen mit seinem Chaperon in *E. coli* exprimiert wurde (s. Abb. 3.2). SycT erhöht damit die Löslichkeit und Stabilität von YopT.

Vor Untersuchungen zur Wirkungsweise von YopT musste jedoch zunächst geklärt werden, ob das rekombinant exprimierte, gereinigte GST-Fusionsprotein im Komplex mit SycT über eine biologische Aktivität verfügt. Bereits durch Infektionsversuche haben Zumbühl *et al.* (1999) gezeigt, dass die Translokation von YopT zu einer Modifikation von RhoA führt. Diese Modifikation konnte durch eine erhöhte elektrophoretische Mobilität sowie durch eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes (pI) von RhoA nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich, dass keine Stressfasern mehr gebildet werden konnten. Außerdem war YopT in der Lage, membrangebundenes RhoA wieder ins Zytosol zu überführen.

Mit Hilfe von *in vitro*-Ansätzen wurde untersucht, ob diese Effekte auch durch das gereinigte GST-YopT_{WT}/SycT hervorgerufen werden können. Durch Mikroinjektion von GST-YopT_{WT}/SycT in HeLa-Zellen wurde die Stressfaserbildung inhibiert (s. Abb. 3.3). Inkubation von HeLa-Zytosol mit GST-YopT_{WT}/SycT führte zur Modifikation von RhoA, was durch die erhöhte elektrophoretische Mobilität und die Verlagerung des pI von RhoA sichtbar gemacht werden konnte (s. Abb. 3.4 und 3.5). Zusätzlich konnte RhoA durch GST-YopT_{WT}/SycT aus nativen Membranfraktionen von HeLa-Zellen herausgelöst werden (s. Abb. 3.6). Rekombinant exprimiertes und gereinigtes GST-YopT_{WT}/SycT ist somit biologisch aktiv und verursacht ebenso wie YopT, das von *Yersinia* in die Wirtszellen transloziert wird, eine Modifikation von RhoA.

Während der Durchführung dieser Doktorarbeit wurde von Shao *et al.* (2002, 2003) die Funktionsweise von YopT aufgeklärt: YopT wirkt als Cysteinprotease und spaltet das C-terminale Cystein der RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 mit dem Prenylrest ab (Shao *et al.*, 2003) (s. Abb. 4.1).

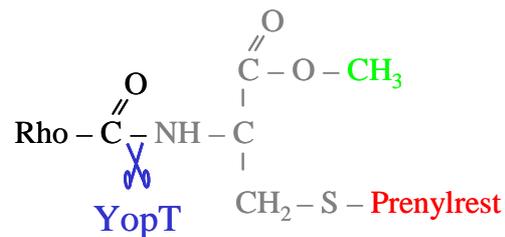


Abb. 4.1: YopT spaltet das posttranslational prozessierte C-terminale Cystein der RhoGTPasen ab.

RhoGTPasen werden posttranslational modifiziert. Das Cystein (grau) der C-terminalen CAAX-Box wird zunächst prenyliert (rot). Nach Abspaltung der AAX-Gruppe wird das Cystein methyliert (grün). Die Cysteinprotease YopT (blau) schneidet RhoA N-terminal des prozessierten Cysteins. Das Produkt ist ein Geranylgeranylcyteinmethylester.

Diese Abspaltung ist verbunden mit einer Verringerung des Molekulargewichts und erklärt das veränderte Laufverhalten in der SDS-PAGE, das bei RhoA beobachtet werden kann. Ebenso werden die biochemischen Eigenschaften von RhoA verändert, was die Verlagerung des pI von RhoA zum sauren pH begründet. Zudem erfolgt die Verankerung von RhoA in der Plasmamembran über den Prenylrest (Adamson *et al.*, 1992a, 1992b; Cox und Der, 1992). Das Herauslösen von RhoA aus der Membran liegt deshalb ebenfalls in der Abspaltung des Restes begründet.

Negativkontrollen wie GST und GST-SycT führten zu keiner Modifikation von RhoA. Ebenso wiesen HeLa-Zellen, in welche diese Proteine mikroinjiziert worden waren, weiterhin Stressfasern auf. Somit kann bei dem RhoA-Modifikationsprozess eine Beteiligung der GST-Einheit des Fusionsproteins und des Chaperons, das bei den *in vitro*-Ansätzen im Komplex mit YopT vorlag, ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse zeigen auch, dass SycT die Funktion von YopT unter diesen Versuchsbedingungen nicht blockiert, wenn bei den Versuchen jeweils der YopT/SycT-Komplex eingesetzt worden war. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich SycT von YopT löst, wenn es sein Substrat bindet. Wichtig ist jedoch, dass SycT als stabilisierender Faktor für die Reinigung von YopT genutzt werden kann, ohne bei anschließenden *in vitro*-Versuchsansätzen die Wirkungsweise von YopT zu behindern.

Mit der Reinigung des rekombinant exprimierten YopT/SycT-Komplexes im mg-Maßstab und löslicher Form war es nun möglich, *in vitro*-Experimente durchzuführen, um die Wirkungsweise von YopT auf zelluläre Signalketten zu untersuchen.

Als weitere Kontrolle wurde nach Shao *et al.* (2002) ein YopT-Protein mit der Punktmutation C139S generiert, das ebenfalls als GST-Fusionsprotein im Komplex mit SycT exprimiert und gereinigt wurde. Durch diese Mutation wurde das Cystein im aktiven Zentrum der Protease gegen ein Serin ausgetauscht. Mikroinjektionsversuche und Inkubation von HeLa-Zytosol mit GST-YopT_{C139S}/SycT haben gezeigt, dass dieses YopT keinen erkennbaren Einfluss auf die Stressfaserbildung ausübt und keine Modifikation von RhoA verursacht (s. Abb. 3.4). Aufgrund der Mutation wird YopT somit biologisch inaktiv. Das gereinigte GST-YopT_{C139S}/SycT konnte in weiteren *in vitro*-Versuchen einerseits als Kontrolle, aber auch als Instrument für Interaktionsstudien verwendet werden.

4.2 Interaktion von YopT mit RhoA und deren Auswirkung

Zumbihl *et al.* (1999) haben nachgewiesen, dass YopT die Zerstörung der Stressfasern in Epithel- und Endothelzellen verursacht, RhoA modifiziert und die Bindung von RhoA an die Plasmamembran verhindert. Um die Interaktion zwischen RhoA und YopT näher zu untersuchen, wurden verschiedene Versuchsansätze wie Pulldown-Versuche und Immunpräzipitationen mit Zytosol von HeLa-Zellen durchgeführt.

Bei den durchgeführten Pulldown-Versuchen konnte keine Bindung von RhoA an GST-YopT_{WT}/SycT nachgewiesen werden (s. Abb. 3.7). Dagegen interagierte das biologisch inaktive YopT_{C139S} mit RhoA, was darauf hindeutet, dass eine direkte Interaktion zwischen RhoA und YopT stattfindet.

Bei einer Analyse der nicht-gebundenen Fraktionen zeigte sich, dass RhoA bei dem Versuchsansatz mit YopT_{WT} eine erhöhte elektrophoretische Mobilität aufwies, was der proteolytischen Abspaltung des C-Terminus entspricht. Somit lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass YopT an RhoA bindet, es modifiziert und nach diesem Prozess die GTPase wieder entlässt. Die Bindung zwischen YopT und RhoA ist nicht stabil. Laut Shao *et al.* (2002) erfolgt die Interaktion zwischen den beiden Proteinen möglicherweise über den Prenylrest, was das Aufheben der Bindung nach der Abspaltung erklären würde.

Neben RhoA wurde auch sein Inhibitor RhoGDI in der gebundenen Fraktion von YopT_{C139S} nachgewiesen (s. Abb. 3.7). Da die GTPase im Zytosol mit RhoGDI als Komplex vorliegt, kann man den Schluss ziehen, dass der Nachweis von RhoGDI nicht auf eine direkte Interaktion zurückzuführen ist, sondern dass der Komplex RhoA/RhoGDI als Substrat für YopT dienen kann. YopT unterscheidet somit nicht zwischen der im Komplex gebundenen und der freien Form von RhoA, die zum Beispiel an der Plasmamembran vorzufinden ist. Auch der Beladungszustand der GTPase spielt folglich keine Rolle bei der Modifikation, da RhoA mit GDP beladen ist (=inaktiv), wenn es mit RhoGDI komplexiert ist. Dagegen liegt RhoA überwiegend mit GTP beladen vor (=aktiv), wenn es in der Plasmamembran gebunden ist. Bereits Shao *et al.* (2003) haben gezeigt, dass YopT sowohl die GTP- als auch die GDP-gebundene Form von RhoA erkennt.

Co-Immunpräzipitationsanalysen haben gezeigt, dass RhoA bzw. RhoGDI nach Einfluss von YopT_{WT} ohne ihren jeweiligen Partner durch spezifische Antikörper präzipitiert werden konnten (s. Abb. 3.8 und 3.11). Die YopT-Wirkung führt folglich zur Dissoziation des Komplexes RhoA/RhoGDI. Auch hier liegt die Ursache wahrscheinlich in der Abspaltung des C-terminalen Cysteins mit dem Prenylrest von RhoA durch YopT. Über den Prenylrest erfolgt die Bindung an RhoGDI (Gosser *et al.*, 1997). Fehlt diese posttranslationale Modifikation, kann die Interaktion zwischen RhoA und seinem zytosolischen Inhibitor nicht mehr stattfinden.

Die gleiche Schlussfolgerung lässt sich aus der Dissoziation von RhoA von GST-RhoGDI nach Inkubation mit YopT_{WT} ziehen (s. Abb. 3.12). Auch hier wird die GTPase durch den Verlust des Prenylrestes von RhoGDI getrennt, wenn auch nicht vollständig. Nach Inkubation mit YopT_{C139S} dagegen ist kein Einfluss auf den Komplex zu erkennen. Die Trennung des Komplexes ist somit auf die proteolytische Wirkung von YopT_{WT} zurückzuführen.

Dass die RhoA/RhoGDI-Komplexe nicht vollständig dissoziiert wurden, könnte zum einen auf die eingesetzten Proteinmengen zurückzuführen sein. Durch eine zu geringe Menge an rekombinantem YopT könnte die Aktivität der Cysteinprotease aufgrund der Bindung an Rac1 und Cdc42 „blockiert“ worden sein. Ein weitere Erklärung dafür, dass ein Teil des RhoA an RhoGDI gebunden blieb, könnte durch die Möglichkeit gegeben werden, dass YopT für seine Aktivität einen Co-Faktor benötigt (Sorg *et al.*, 2003; Aepfelbacher *et al.*,

2003). Es wurde bereits das Lipid PIP₂ als Co-Faktor diskutiert, da es zur Öffnung des Komplexes zwischen RhoA und RhoGDI beitragen soll (Chuang *et al.*, 1993a; Faurè *et al.*, 1999; Aepfelbacher *et al.*, 2003). Nach der Bindung der GTPasen an GST-RhoGDI wurde vor der Inkubation mit den gereinigten Yop-Proteinen ein Waschschriff eingeschaltet, um ungebundenes RhoA und weitere Bestandteile des eingesetzten HeLa-Zellysats zu entfernen. Dadurch wurden auch eventuelle Co-Faktoren ausgewaschen. Möglicherweise wurde hierdurch die Effizienz von YopT beeinträchtigt, sodass RhoA während der begrenzten Inkubationszeit nicht vollständig von RhoGDI abgespalten werden konnte.

4.3 Interaktion von YopT mit den RhoGTPasen Rac1 und Cdc42 und deren Auswirkung

Shao *et al.* (2002, 2003) haben gezeigt, dass nicht nur RhoA ein Target von YopT darstellt, sondern auch die beiden RhoGTPasen Rac1 und Cdc42. Im Gegensatz zu RhoA konnte für beide GTPasen sowohl eine Bindung an GST-YopT_{WT}/SycT als auch an GST-YopT_{C139S}/SycT nachgewiesen werden (s. Abb. 3.7). Beide GTPasen binden stabil an biologisch aktives YopT_{WT} und werden nicht, anders als RhoA, nach einer möglichen Modifikation entlassen.

Während RhoA nach Interaktion mit YopT ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE aufweist, bedingt durch den Verlust des Prenylrests, konnte bei Rac1 und Cdc42 keine erhöhte elektrophoretische Mobilität beobachtet werden. Aufgrund des ähnlichen Molekulargewichts der drei RhoGTPasen und der gleichen Art der Prenylierung des C-terminalen Cysteins würde man für Rac1 und Cdc42 ein entsprechendes Laufverhalten erwarten, falls sie ebenfalls durch YopT proteolytisch modifiziert werden. Dies ist jedoch nicht der Fall. Zusätzlich veränderte sich der pI von Rac1 nicht nach Inkubation mit YopT_{WT} (s. Abb. 3.13). Eine entsprechende Analyse von Cdc42 mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese wurde ebenfalls durchgeführt (nicht gezeigt). Eine zufriedenstellende Darstellung von Cdc42 war jedoch aufgrund des geringen Anteils dieser GTPase im Zytosol und der Qualität des Antikörpers für die immunologische Detektion nicht möglich.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Rac1 und Cdc42 zwar von YopT erkannt und gebunden, jedoch nicht modifiziert werden.

Einen weiteren Hinweis darauf, dass Rac1 und Cdc42 nicht durch YopT modifiziert werden, gibt der Nachweis von RhoGDI in Assoziation mit den beiden GTPasen. Sowohl beim Bindungsversuch mit GST-YopT_{WT}/SycT als auch bei Immunpräzipitationen nach Inkubation mit YopT_{WT} lag der Inhibitor assoziiert mit Rac1 und Cdc42 vor (s. Abb. 3.10). Nach Infektionen, bei denen biologisch aktives YopT in die Zellen transloziert worden war, konnte sogar festgestellt werden, dass Cdc42 und Rac1 im Vergleich zu Infektionen, bei denen die Aktivität von YopT ausgeschaltet worden war, in größerer Menge an RhoGDI gebunden vorlagen (s. Abb. 3.11). Diese Bindung an RhoGDI könnte nicht erfolgen, wäre der C-Terminus von Rac1 und Cdc42 abgespalten worden, da auch für diese GTPasen der Prenylrest essentiell für die Interaktion mit RhoGDI ist. Nachdem bei diesen Versuchen eine Trennung des Komplexes RhoGDI/Rac1 bzw. Cdc42 durch YopT nicht nachgewiesen werden konnte, lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass Rac1 und Cdc42 im Gegensatz zu RhoA nicht durch YopT proteolytisch gespalten und damit nicht modifiziert werden.

Die mögliche Abspaltung der RhoGTPasen von ihrem Inhibitor wurde mit Hilfe eines weiteren *in vitro*-Ansatzes analysiert, indem GST-RhoGDI/RhoGTPase-Komplexe mit YopT_{WT} inkubiert wurden. Im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen konnte unter diesen Versuchsbedingungen eine Trennung aller drei GTPasen von RhoGDI erzielt werden (s. Abb. 3.12). Allerdings unterschieden sich die Mengen der abgespaltenen GTPasen sehr deutlich voneinander. RhoA wurde in sehr großer Menge abgespalten, jedoch nicht vollständig. Die Abspaltung von Rac1 erfolgte in wesentlich geringerem Maße, am wenigsten betroffen von der Wirkung von YopT war Cdc42. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf eine Hierarchie in der GTPasen-Spezifität von YopT.

Es stellt sich die Frage, wie sich die Unterschiede hinsichtlich der Interaktion mit YopT und der Modifikation der drei RhoGTPasen erklären lassen. Laut Shao *et al.* (2003) ist für die Erkennung der GTPasen durch YopT die C-terminale polybasische Region, an welche sich die CAAX-Box anschließt, essentiell.

RhoA	¹⁸¹ ARRG KKK SG <u>CL</u> VL ₁₉₃
Rac1	¹⁷⁷ LCPPP VKKRKRK <u>CLLL</u> ₁₉₂
Cdc42	¹⁷⁸ EPPETQP KRK <u>CC</u> IF ₁₉₁

Abb. 4.2: Die C-terminale Sequenzen der RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 (nach Shao *et al.*, 2003).

Fett markiert sind die basischen Aminosäuren. Das Cystein, welches durch Prenylierung und Methylierung posttranslational modifiziert wird, ist unterstrichen. Die letzten drei Aminosäuren werden im Zuge der posttranslationalen Modifikation abgespalten.

Durch Austausch der basischen Aminoäuren am C-Terminus von RhoA wurde eine Bindung des mutierten RhoA an YopT_{C139S} verhindert (Shao *et al.*, 2003). Das Vorhandensein der polybasischen Region bei allen drei RhoGTPasen kann die Bindung dieser Proteine an YopT erklären. Es lässt sich jedoch in diesem Bereich ein Unterschied zwischen RhoA und den beiden anderen GTPasen feststellen: während bei Rac1 und Cdc42 die polybasische Region direkt an das C-terminale Cystein mit den posttranslationalen Modifikationen anschließt, sind bei RhoA ein Serin- und ein Glycinrest eingeschoben (s. Abb. 4.2). Diese beiden Aminosäuren könnten der Grund dafür sein, dass YopT das C-terminale Cystein von RhoA, nicht jedoch von Rac1 und Cdc42 abspalten kann. Mutationen, bei denen die C-Termini der RhoGTPasen untereinander ausgetauscht werden, könnten über diese These weiteren Aufschluss geben.

Wie bereits oben erwähnt wurde, binden die beiden RhoGTPasen Rac1 und Cdc42 in erhöhter Menge an RhoGDI nach Zellinfektionen mit *Yersinia*, bei denen biologisch aktives YopT in die Zellen transloziert worden war, im Vergleich zu Infektionen mit biologisch inaktivem YopT. Hervorgerufen wird dieser Effekt wahrscheinlich durch das „freie“ RhoGDI, das nach der proteolytischen Spaltung von RhoA und der damit verbundenen Trennung des Komplexes RhoA/RhoGDI im Zytosol vorliegt.

Es besteht die Möglichkeit, dass durch die Komplexierung mit RhoGDI die GTPasen Rac1 und Cdc42 in einem inaktiven Zustand gehalten werden. Wie eine Studie vor kurzem zeigte, stimuliert der Virulenzfaktor ExoS von *Pseudomonas aeruginosa* die Reorganisation des Aktinzytoskeletts durch RhoGDI (Sun und Barbieri, 2004). ExoS ist ein bifunktionales Zytotoxin, das sowohl eine RhoGAP- als auch eine ADP-

Ribosyltransferase-Domäne besitzt. Mit Hilfe seiner RhoGAP-Domäne inaktiviert ExoS die GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoA *in vivo* und *in vitro*. Durch die Ausschaltung von RhoGDI wurde nachgewiesen, dass ExoS und RhoGDI nacheinander die GTPasen inaktivieren und somit das Aktinzytoskelett reorganisieren. Zuerst induziert ExoS als GAP die Umwandlung von Rho-GTP zu Rho-GDP. Die GDP-gebundene GTPase wird daraufhin durch RhoGDI von der Zellmembran ins Zytosol rekrutiert, wo beide Proteine einen stabilen Komplex bilden. Dieser Vorgang inhibiert die Reaktivierung der GTPasen durch GEFs an der Zellmembran. Im Zytosol verhindert RhoGDI außerdem die Interaktion zwischen den RhoGTPasen und GEFs und blockiert damit den Austausch von GDP zu GTP (Fukumoto *et al.*, 1990; Robbe *et al.*, 2003).

Möglicherweise fördert YopT auf ähnliche Weise indirekt durch die Trennung des Komplexes RhoGDI/RhoA und der dadurch resultierenden Verfügbarkeit von RhoGDI die Inaktivierung von Cdc42 und Rac1 mit Hilfe von RhoGDI.

4.4 Einfluss von YopT auf RhoGDI

Durch die 2D-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass sich die biochemischen Eigenschaften von RhoGDI ebenfalls durch die Wirkung von YopT verändern (s. Abb. 3.14). YopT_{WT} führte zur Akkumulation von RhoGDI im sauren pI-Bereich (pH 5,0). Da sich RhoGDI in unbehandelten Proben über einen pI-Bereich von 5,0 bis 5,3 erstreckt, lässt sich vermuten, dass YopT lediglich eine Verschiebung der endogenen Aktivität von RhoGDI verursacht. Ein Mechanismus von Zellen, sich durch schnelle Regulation von Signalwegen an spezifische Reize zu adaptieren, ist die Phosphorylierung von Proteinen. Diese bewirkt eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes von Proteinen ins saure Milieu (Immler *et al.*, 1998). Die PMA-Stimulierung von T-Zellen resultierte in der Phosphorylierung von Ly-GDI (einer hämatopoetisch exprimierten RhoGDI-Form) an Serin/Threonin-Resten und einer Anreicherung im sauren pI-Bereich (Gorvel *et al.*, 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieses Protein in Neutrophilen konstitutiv an Tyrosinresten phosphoryliert ist (Kasper *et al.*, 2000).

Analysen der Proben mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern, radioaktiv markiertem Phosphat sowie massenspektrometrischen Untersuchungen von isoliertem

RhoGDI gaben jedoch keine Hinweise auf eine Phosphorylierung von RhoGDI, hervorgerufen durch YopT (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zudem ist beschrieben, dass eine Phosphorylierung von RhoGDI durch unterschiedliche Kinasen mit einer Trennung von RhoA (durch PKC α) bzw. Rac1 (durch PAK1) einhergeht (Mehta *et al.*, 2001; DerMardirossian *et al.*, 2004). Dies widerspricht jedoch den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen, die durch Immunpräzipitationen nach Infektionen sowie durch verschiedene *in vitro*-Ansätze erzielt worden waren (s. Kapitel 3.1.5 und 3.1.6). Hier hatte die Wirkung von YopT eine verstärkte Bindung von Cdc42 und Rac1 an RhoGDI zur Folge. Demzufolge kann eine Phosphorylierung als Ursache für die Verschiebung des pI von RhoGDI als unwahrscheinlich angesehen werden.

Zusätzlich zur Art des biochemischen Unterschieds zwischen beiden Spots von RhoGDI sollte in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden, welcher endogenen Aktivität der basische Spot entspricht. Verschiedene Bindungszustände mit GTPasen oder anderen Proteinen könnten als Ursache für das Auftreten der beiden Spots dienen. Die Charakterisierung dieser beiden Aspekte würde weiteren Einblick in die Wirkungsweise von YopT geben.

Sollte durch YopT eine Beeinträchtigung von RhoGDI auftreten, könnte dies Folgen auf Aktin-abhängige Prozesse in der Zelle haben. So wurde gezeigt, dass RhoGDI mit Proteinen der ERM-Familie interagiert, wodurch die Aktivierung von RhoGTPasen durch GEFs gefördert wird (Takahashi *et al.*, 1997; Sasaki und Takai, 1998). ERM-Proteine (Ezrin, Radixin, Moesin) sind in der Lage, F-Aktin zu binden und die Assoziation der Aktin-Filamente an die Plasmamembran über CD44 zu ermöglichen. Zusätzlich wurde bei RhoGDI-defizienten Mutanten von *Dictyostelium* eine Reduzierung der Aktin-polymerisation nach Stimulation durch cAMP beobachtet, wobei jedoch die Motilität der Zellen nicht betroffen war (Rivero *et al.*, 2002). Eine Ausschaltung von RhoGDI-Funktionen durch YopT könnte somit in einer Beeinträchtigung des Aktinzytoskeletts resultieren.

4.5 Interaktion von YopO mit RhoA und Rac1

Mit Hilfe von Pulldown-Versuchen konnte die Interaktion der beiden RhoGTPasen RhoA und Rac1 aus HeLa-Zellen mit rekombinantem YopO bestätigt werden (s. Abb. 3.16A), wie auch bereits in früheren Studien nachgewiesen (Barz *et al.*, 2000; Dukuzumuremyi *et al.*, 2000). Als neues Ergebnis konnte zusätzlich gezeigt werden, dass auch RhoGDI mit YopO assoziiert ist, wahrscheinlich aufgrund der Komplexbildung mit beiden GTPasen. Es konnte außerdem dargestellt werden, dass durch YopT modifiziertes RhoA sowie aus *E. coli* gereinigtes RhoA und Rac1, die somit keine posttranslationalen Modifikationen aufweisen, ebenfalls an die Kinase YopO binden können (s. 3.16A und B).

Nachdem bei den Bindungsversuchen der Prenylrest der beiden GTPasen entweder durch RhoGDI maskiert wurde oder nicht vorhanden war, ist dieser somit nicht essentiell für die Interaktion mit YopO. In der Regel erfolgt die Interaktion von RhoGTPasen mit GEFs oder Effektorproteinen der zellulären Signalkette über die Switch I- und Switch II-Regionen der GTPasen (Schmidt und Hall, 2002). Jedoch verdeckt der N-Terminus von RhoGDI die Switch II-Region und den C-terminalen Bereich der Switch I-Region der GTPasen (Longenecker *et al.*, 1999; Scheffzek *et al.*, 2000). Eine Beteiligung der beiden Regionen an der Interaktion mit YopO kann somit aufgrund der Komplexbildung mit RhoGDI für unwahrscheinlich gehalten werden.

Wie sich in den Pulldown-Versuchen zeigte, bindet Rac1/RhoGDI nach Interaktion mit rekombinantem YopT_{WT} nur schwach an YopO (s. Abb. 3.16). Die bisherigen Ergebnisse von Pulldown-Versuchen und Immunpräzipitationen weisen darauf hin, dass Rac1/RhoGDI einen Komplex mit YopT bilden kann. Der Bereich für diese Bindung liegt vermutlich im C-Terminus der GTPasen (Shao *et al.*, 2003). Es lässt sich deshalb der Schluss ziehen, dass die Interaktion zwischen den GTPasen und YopO ebenfalls über diese Region stattfindet und im Fall von Rac1 durch YopT verdeckt wurde. RhoA dagegen wird nach seiner Modifikation durch YopT freigesetzt und ist somit in der Lage, an YopO zu binden.

4.6 Aktivitätsstatus der RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 nach Einfluss von YopT und YopO

Der Einfluss von YopT und YopO auf den Aktivitätsstatus der RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 wurde mit Hilfe von Bindungsversuchen an spezifische Effektorproteine untersucht. Pulldown-Versuche mit der Rho-bindenden Domäne von Rhotekin sollten Aufschluss geben über die Wirkung der beiden Yops auf RhoA-Effektor-Bindungen. Diese Domäne interagiert ausschließlich mit aktiviertem, GTP-gebundenem RhoA (Reid *et al.*, 1996). Aus diesem Grund kann sie genutzt werden, um den Aktivitätsstatus von RhoA und das Bindungsverhalten von RhoA an nachgeschalteten Effektoren zu analysieren.

Der Aktivitätsstatus von Rac1 und Cdc42 dagegen wurde über Pulldown-Versuche mit der Cdc42- und Rac-bindenden Region des spezifischen nachgeschalteten Effektorproteins PAK1 untersucht. PAK1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, deren Aktivität durch die Bindung von aktiviertem Cdc42 und Rac1 reguliert wird (Manser *et al.*, 1994).

Nach Infektionsversuchen, bei denen biologisch aktives YopT_{WT} transloziert wurde (WAP, WpYopT_{WT}, WΔYopO), war RhoA nicht mehr in der Lage, an Rhotekin zu binden (s. Abb. 3.15A und 3.17). Dieser Effekt wurde ausschließlich durch YopT induziert, da RhoA mit Rhotekin interagiert, wenn alle Yop-Proteine außer YopT in die Zellen injiziert worden waren (WΔYopT). Das Fehlen des Prenylrestes kann in diesem Fall jedoch nicht als Erklärung für das Unterbleiben der Bindung dienen. Die Interaktion zwischen RhoGTPasen und ihren nachgeschalteten Effektoren erfolgt in der Regel über die Switch-Regionen der GTPasen (Bishop and Hall, 2000; Hakoshima *et al.*, 2003). Diese Regionen sind im N-Terminus lokalisiert und funktionell für die Interaktion mit GEFs, GAPs und Effektorproteinen verantwortlich (Thapar *et al.*, 2002). Ein Austausch von GDP gegen aktivierendes GTP wird von Konformationsänderungen in der Switch I- und Switch II-Region begleitet. Die genauen Interaktionsstellen zwischen RhoA und Rhotekin konnten bislang allerdings noch nicht dargestellt werden.

Es stellt sich nun die Frage, ob durch YopT die Aktivierung von RhoA durch GEFs oder andere Signale unterbunden wird und deshalb RhoA nicht mehr an Rhotekin bindet. Um diese Frage zu klären, wurde RhoA mit nicht-hydrolyzierbarem GTP beladen, somit

aktiviert, und mit YopT inkubiert. Auch in diesem Fall fand keine Interaktion von RhoA mit Rhotekin statt (s. Abb. 3.15B).

Somit kann die Vermutung aufgestellt werden, dass entweder mit der proteolytischen Abspaltung des C-Terminus durch YopT eine Konformationsänderung einhergeht, welche die Interaktionsstellen von RhoA verdeckt, oder dass weitere biochemische Modifikationen durch YopT verursacht werden, welche die Bindung zwischen RhoA und seinem Effektor Rhotekin unterbinden.

Es zeigte sich weiterhin, dass YopT scheinbar keinen inaktivierenden Einfluss auf Rac1 und Cdc42 ausübt (s. Abb. 3.15A). Beide GTPasen interagierten mit PAK nach einer Infektion, bei der ausschließlich YopT_{WT} in die Zellen transloziert worden war. Wurden dagegen alle Yops in die Zellen injiziert, fand keine Interaktion mit dem Effektorprotein mehr statt. Wie jedoch die Bindung von Rac1 und Cdc42 nach einer Infektion mit Translokation aller Yops außer YopT zeigte (WΔYopT), spielt YopT dennoch eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung der beiden GTPasen, auch wenn es allein keinen sichtbaren Effekt verursacht. Demnach bewirkt erst das synergistische Zusammenspiel aller Yops die vollständige Inaktivierung von Rac1 und Cdc42.

So ist neben YopT ein weiteres *Yersinia*-Effektorprotein bekannt, das eine inhibierende Wirkung auf RhoGTPasen ausübt: YopE. Es besitzt GAP-Aktivität für RhoA und Rac1 (Black und Bliska, 2000; von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000) und verhindert die Rac-Aktivierung durch Cdc42 (Andor *et al.*, 2001). Unter Umständen erfolgt die vollständige Inaktivierung von Cdc42 und Rac1 durch Kombination der GAP-Aktivität von YopE mit der verstärkten Bindung der beiden RhoGTPasen an RhoGDI, die durch YopT hervorgerufen wird. Ein ähnliches Zusammenspiel wurde bereits bei *P. aeruginosa* beschrieben (Sun und Barbieri, 2004). Möglicherweise resultiert die Inaktivierung von Rac1 und Cdc42 aber auch aus der Ausschaltung von GEFs oder einer bislang unbekanntem direkten Interaktion mit Yop-Effektorproteinen.

Nach Infektion von HeLa-Zellen mit einem *Yersinia*-Stamm, der ausschließlich YopO transloziert, zeigte sich ein aktivierender Effekt auf die beiden RhoGTPasen RhoA und Rac1. Im Vergleich zu Infektionen mit dem YopO-defizienten Stamm WΔYopO und dem

Stamm WpYopT_{C139S}, der ausschließlich das biologisch inaktive YopT_{C139S} injiziert, banden RhoA und Rac1 verstärkt an ihre Effektoren Rhotekin bzw. PAK (s. Abb. 3.17).

Obwohl bereits mehrfach nachgewiesen worden war, dass Cdc42 nicht mit YopO interagiert (Barz *et al.*, 2000; Dukuzumuremyi *et al.*, 2000), konnte nach Translokation von YopO ebenfalls eine Aktivierung von Cdc42 festgestellt werden (s. Abb. 3.17). Der Effekt ist demnach nicht spezifisch für die YopO-bindenden GTPasen, sondern besitzt wohl eher einen allgemeinen Ursprung. Um auszuschließen, dass die Aktivierung der GTPasen nicht als Folge einer Infektion per se auftritt, z.B. über Signale der β_1 -Integrine, wurde der Stamm WpYopT_{C139S} als Kontrolle gewählt, da kein modifizierender Einfluss des biologisch inaktiven YopT_{C139S} auf die GTPasen bekannt ist. Nach dieser Infektion konnte jedoch im Vergleich zur Infektion mit WpYopO keine erhöhte Aktivierung der GTPasen beobachtet werden.

In einer früheren Studie wurde bereits gezeigt, dass nach Infektionen mit einem YpkA (YopO-Homolog aus *Y. pseudotuberculosis*)-exprimierenden Stamm die Bindung von RhoA an Rhotekin leicht erhöht ist, unabhängig von der Kinase-Aktivität von YopO (Dukuzumuremyi *et al.*, 2000). Die Bindungsfähigkeit stieg noch deutlicher an, wenn der C-Terminus mit den postulierten RhoA-Bindungsstellen deletiert war. Anscheinend übt YopO über einen bislang unbekanntes Weg einen aktivierenden Einfluss auf die drei GTPasen aus, während sie gleichzeitig die Bindung von Rho-Effektoren durch die Bindung an RhoA wieder vermindert. Möglicherweise lenkt YopO dadurch das Signal der GTPase um. Schließlich strebt *Yersinia* in der Regel eine Inaktivierung von RhoGTPasen an, um die Umorganisation des Aktinzytoskeletts im Zuge der Phagozytose zu inhibieren.

Bislang sind *in vivo* keine Substrate für eine Phosphorylierung durch YopO bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass es sich dabei um Proteine handelt, welche an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind, möglicherweise um Proteine des Rho-Signaltransduktionsweges (Juris *et al.*, 2002). Die aktivierende Wirkung von YopO auf die drei RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 deutet darauf hin, dass Proteine in der Transduktionskette oberhalb der GTPasen als Target von YopO dienen könnten.

YopO ist innerhalb der Wirtszelle an der Plasmamembran lokalisiert, unabhängig von der Interaktion mit RhoA (Hakansson *et al.*, 1996a; Dukuzumuremyi *et al.*, 2000). An der Plasmamembran sind außerdem viele Proteine lokalisiert, die an Signaltransduktionsketten

von GTPasen beteiligt sind, wie z.B. GEFs. Jedoch zeigt sich der erhöhte Aktivitätsstatus bei allen drei RhoGTPasen, sodass es sich nicht um einen spezifischen Weg handeln muss.

Zudem ist die aktivierende Wirkung von YopO nicht dauerhaft, wie die Infektion mit dem WAP-Stamm, der in der Lage ist, alle Yops zu translozieren, zeigte (s. Abb. 3.17). In diesem Fall liegen alle drei RhoGTPasen inaktiviert vor. Dies legt den Schluss nahe, dass durch YopO eine Signalkette „eingeschaltet“ wird, die nach Erreichen des Ziels durch das Zusammenspiel der Yops wieder ausgeschaltet wird.

4.7 Membranbindungsverhalten von RhoA und Rac1 nach Einfluss von YopT und YopO

GTP-beladene RhoGTPasen sind in der Regel über ihren Prenylrest an der Plasmamembran gebunden und wirken von diesem Ort aus durch Interaktion mit ihren Effektoren auf Zytoskelettlagerungen.

Nach Infektionen mit verschiedenen *Yersinia*-Stämmen wiesen RhoA und Rac1 hinsichtlich ihres Membranbindungsverhaltens einige Unterschiede auf.

Bei Translokation von YopT_{WT} wurde RhoA aus der Membran gelöst und ins Zytoplasma freigegeben (s. Abb. 3.18). Da YopT den Verlust des Prenylrestes, der für die Verankerung in der Membran verantwortlich ist, verursacht, kann damit das Herauslösen von RhoA erklärt werden. Bei einer Infektion mit dem YopT-defizienten Stamm dagegen blieb RhoA in der Membran gebunden, wenn auch in einer geringeren Menge verglichen mit den Membranen nicht-infizierter Zellen. Erklärt werden kann dieser Mengenunterschied vermutlich mit der Wirkung anderer Yops. So inaktiviert YopE die GTPase RhoA, indem es als GAP die Spaltung von gebundenem GTP zu GDP induziert (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000; Black und Bliska, 2000). Das GDP-gebundene RhoA wird anschließend durch RhoGDI von der Membran ins Zytosol rekrutiert.

Ein deutlicher Anstieg des RhoA-Gehalts in der Membran zeigte sich nach Infektionen, bei denen ausschließlich YopT_{C139S} oder YopO transloziert worden waren (s. Abb. 3.18). Von beiden Yop-Proteinen ist bekannt, dass sie an der Membran der Wirtszellen lokalisieren (Hakansson *et al.*, 1996a; Aepfelbacher *et al.*, 2003). Beide Yops binden RhoA und

bewirken somit eine erhöhte RhoA-Menge an der Membran. Dieses Ergebnis zeigt außerdem, dass im Fall von YopO die Bindung an RhoA ohne die zusätzliche Wirkung anderer Yops stabil ist. Durch die Funktionen der anderen Yops wird anscheinend die Interaktion zwischen RhoA und YopO aufgehoben.

Rac1 dagegen wurde nur vollständig aus der Membran herausgelöst, wenn alle Yops mit Ausnahme von YopO transloziert worden waren ($W\Delta YopO$). Bei allen weiteren Infektionen (WAP , $W\Delta YopT$, $WpYopT_{WT}$, $WpYopT_{C139S}$, $WpYopO$) blieb es weiterhin an der Membran gebunden, allerdings in unterschiedlichen Mengen (s. Abb. 3.19).

So wies die Membran nach Infektionen mit WAP und $WpYopT_{WT}$ einen geringeren Rac1-Gehalt auf als die Membran nicht-infizierter Zellen. $YopT_{WT}$ besitzt somit eine herauslösende Wirkung, auch wenn in dieser Arbeit keine Modifikationen von Rac1 durch YopT dargestellt werden konnten. Eventuell wird durch YopT die Bindung von Rac1 an RhoGDI stabilisiert, wodurch die GTPase ins Zytosol rekrutiert wird und nicht mehr durch GEFs aktiviert werden kann. Bei WAP bewirkte neben YopT wohl auch YopE als GAP den geringeren Rac1-Gehalt. Dass nach einer Infektion mit WAP jedoch immer noch Rac1 in der Membran nachgewiesen werden konnte, ist unter Umständen auf die Rac1-bindende Wirkung von YopO zurückzuführen. Ohne YopO bewirken alle anderen Yops das vollständige Herauslösen von Rac1, mit YopO ist Rac1 dagegen wieder in der Membran nachweisbar. Erstaunlicherweise war die Menge von Rac1 in der Membran nach einer Infektion mit $WpYopO$ relativ niedrig, gerade auch im Vergleich zu RhoA.

Durch die Mutante $WpYopT_{C139S}$ war wie bei RhoA eine erhöhte Menge an Rac1 nachweisbar (s. Abb. 3.19). Auch hier liegt die Begründung nahe, dass das biologisch inaktive $YopT_{C139S}$ durch direkte Interaktion die GTPase an die Membran rekrutiert. Ein Vergleich zwischen den beiden Infektionen mit $WpYopT_{WT}$ und $WpYopT_{C139S}$ zeigt nochmals, dass $YopT_{WT}$ einen Einfluss auf Rac1 hinsichtlich der Membranlokalisation hat, obwohl dies in den bisher gezeigten Untersuchungen mit anderen Versuchsansätzen nicht nachgewiesen werden konnte. Wie durch *in vitro*-Experimente beobachtet werden konnte, können sowohl $YopT_{WT}$ als auch $YopT_{C139S}$ einen Komplex mit der GTPase bilden (s. Abb. 3.7 und 3.10B). Dennoch war der Rac1-Gehalt in der Membran nach der Wirkung beider translozierter YopT-Proteine unterschiedlich. Während das biologisch inaktive $YopT_{C139S}$ einen Anstieg des Rac1-Gehalts verursachte, führte $YopT_{WT}$ zu einer

Reduzierung. Dieses Ergebnis kann als Hinweis auf den inaktivierenden Einfluss von YopT_{WT} auf Rac1 betrachtet werden.

Ein höherer Rac1-Gehalt war ebenso nach einer Infektion mit dem YopT-defizienten Stamm WΔYopT zu verzeichnen. Hier fällt der herauslösende Effekt von YopT weg, kombiniert mit der Rac1-bindenden Wirkung von YopO.

Die Inkubation von nativen Membranfraktionen mit YopT_{WT} und HeLa-Zytosol führte innerhalb von 30 Minuten ebenfalls zu einem Herauslösen von RhoA (s. Abb. 3.20). YopO dagegen bewirkte eine Rekrutierung von RhoA an die Membran. In diesem *in vitro*-Ansatz konnte YopO außerdem die herauslösende Wirkung von YopT überdecken: Wurden die nativen Membranfraktionen mit beiden Yop-Proteinen entweder gleichzeitig oder in der Reihenfolge 1. YopO, 2. YopT mit einem zeitlichen Abstand von 60 min inkubiert, konnte RhoA in beiden Fällen in der Membran nachgewiesen werden. Es wurde bereits gezeigt, dass YopO in der Lage ist, durch YopT modifiziertes RhoA zu binden (s. Abb. 3.16A). Dieses Ergebnis konnte mit diesem Experiment bestätigt werden. Ob diese Fähigkeit eine Bedeutung im Lauf einer Infektion hat, muss noch geklärt werden.

4.8 Zusammenfassende Übersicht über die Wirkungsweisen von YopT und YopO

YopT bindet RhoA und modifiziert die GTPase aufgrund seiner Funktion als Cysteinprotease. Durch die Modifikation ist RhoA nicht mehr in der Lage, mit zellulären Interaktionspartnern wie RhoGDI und Effektorproteinen in Wechselwirkung zu treten. Die GTPase wird durch YopT inaktiviert (s. Abb. 4.3A). Sichtbar wird dieser Vorgang durch die Inhibierung der Stressfaserbildung nach Wirkung von YopT.

Die beiden anderen RhoGTPasen Rac1 und Cdc42, die Gegenstand dieser Arbeit waren, interagieren ebenfalls mit YopT, jedoch ist die Folge dieser Wechselwirkung noch nicht vollständig geklärt. Die Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese sowie die stabile Komplexbildung mit RhoGDI sprechen dafür, dass beide GTPasen nicht modifiziert werden. Dennoch beeinflusst YopT den „Ruhezustand“ von Rac1 und Cdc42. Nach Wirkung von YopT liegen beide GTPasen in erhöhtem Maße mit ihrem zytosolischen

Inhibitor RhoGDI assoziiert vor (= inaktiver Zustand), was die GTPasen zumindest erschwert aktivieren lässt (s. Abb. 4.3B). Ob zusätzliche Faktoren an der Inaktivierung beteiligt sind, sollte noch weiter untersucht werden.

Ferner verändert YopT die biochemischen Eigenschaften von RhoGDI. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist noch nicht geklärt. Zu vermuten ist, dass die Aktivität von RhoGDI moduliert wird, was den Ablauf zellulärer Signalwege betreffen würde.

Die Rolle von YopO erscheint komplexer. Es wurde zunächst vermutet, dass die Aufgabe von YopO als Kinase, die mit zwei RhoGTPasen, RhoA und Rac1, direkt interagiert, innerhalb der Signaltransduktionswege liegt. Beide GTPasen scheiden jedoch als Substrate der Kinase aus (Barz *et al.*, 2000; Dukuzumuremyi *et al.*, 2000). Aufgrund der Aktivierung der beiden RhoGTPasen sowie von Cdc42 durch die Wirkung von YopO ist das Substrat wohl in der Signalkette oberhalb der GTPasen zu suchen (s. Abb. 4.3). Ob und welche Signalwege durch die Aktivierung der GTPasen eingeschaltet werden, ist noch weiter zu analysieren. Da YopO im Gegensatz zu dem RhoA-Effektorprotein Rhotekin in der Lage ist, durch YopT modifiziertes RhoA zu binden, besteht außerdem die Möglichkeit, dass es sozusagen als einziges „Effektorprotein“ Signale dieser GTPase auffängt und eventuell in eine andere Richtung weiterleitet (s. Abb. 4.3).

Inwiefern die Bindung an die beiden GTPasen RhoA und Rac1 mit der direkten Interaktion mit Aktin, welches die Kinase YopO aktiviert (Juris *et al.*, 2000), kombiniert werden kann, ist ebenfalls noch zu klären.

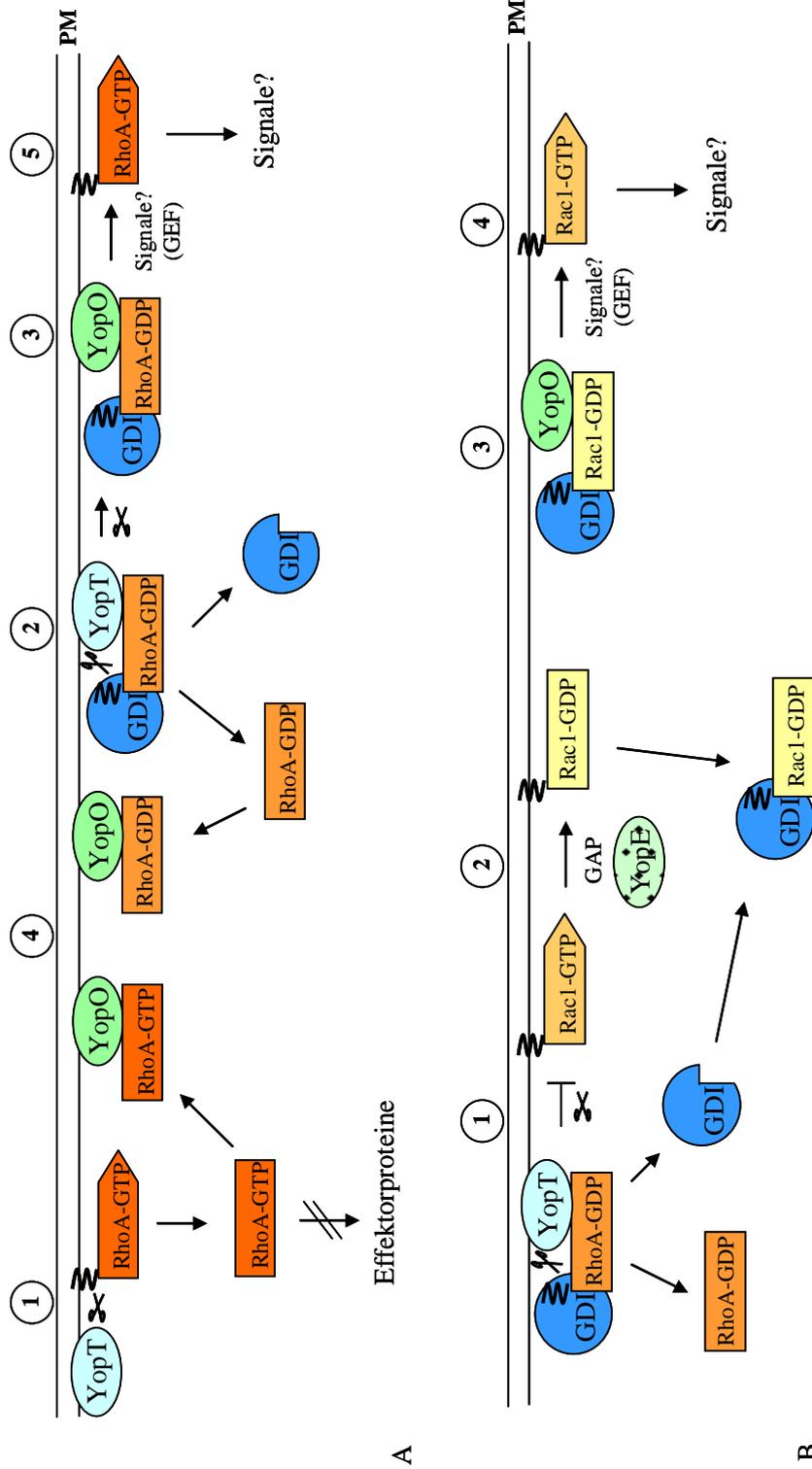


Abb. 4.3: Übersicht über die Wirkungsweisen der beiden *Yersinia*-Effektorproteine YopT und YopO auf die RhoGTPasen RhoA und Rac1.

A: Wirkung auf RhoA. YopT ist in der Lage, sowohl membrangebundenes (1) als auch mit RhoGDI komplexiertes (2) RhoA zu modifizieren. Zudem besteht die Möglichkeit, dass YopT auch den YopO-gebundenen RhoA/RhoGDI-Komplex (3) angreift. Aufgrund der Modifikation kann RhoA nicht mehr mit nachgeschalteten zellulären Effektoren interagieren (1). Außerdem dissoziiert der Komplex RhoA/RhoGDI (2). Das modifizierte RhoA kann jedoch weiterhin mit YopO interagieren (4). Durch die Wirkung von YopO wird RhoA über bislang unbekannte Signalwege in seine aktivierte, also GTP-gebundene Form, überführt (5). (PM: Plasmamembran)

B: Wirkung auf Rac1. YopT ist nicht in der Lage, Rac1 zu modifizieren (1). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass Rac1 durch das Zusammenspiel von YopT und YopE inaktiviert wird. So könnte YopE als GAP Rac1 in seine GDP-gebundene Form überführen (2). In dieser Form bildet Rac1 anschließend einen Komplex mit dem Inhibitor RhoGDI, der durch die YopT-induzierte Modifikation von RhoA frei wird. Ferner kann YopO mit Rac1, das im Komplex mit RhoGDI vorliegt, interagieren (3). Durch die Wirkung von YopO wird Rac1 wie RhoA über bislang unbekannt Signalwege in seine aktivierte, also GTP-gebundene Form, überführt (4). (PM: Plasmamembran)

4.9 Kristallisation von SycT

TTSS-Chaperone, die ein Effektorprotein binden, weisen in ihrer Struktur große Ähnlichkeiten auf, obwohl sie sich hinsichtlich ihrer Sequenz unterscheiden (Page und Parsot, 2002). Die Auflösung der Kristallstruktur von SycT ergab ebenfalls Übereinstimmungen in der Faltung von SycT mit der Struktur anderer Chaperone. Jedoch weicht der Dimerisierungsbereich von SycT im Vergleich zum entsprechenden Bereich anderer Chaperone ab (s. Abb. 3.22B). Die α -Helix, welche bei den bislang untersuchten TTSS-Chaperonen im Dimerisierungsbereich auftritt, wird bei SycT durch eine Schleife ersetzt. Daraus resultiert eine im Vergleich zu SycE verschiedene relative Lage der Dimer-Untereinheiten zueinander. Diese Befunde können eine Bedeutung für die Interaktion zwischen YopT und SycT haben.

Ein Vergleich mit der Struktur des YopE₂₃₋₇₈/SycE-Modells (Birtalan *et al.*, 2002) könnte Aufschluss über die Interaktion zwischen YopT und SycT geben. Es wurde in der genannten Studie gezeigt, dass die N-terminale Domäne von YopE um das SycE-Dimer geschlungen ist, wobei die Sekundärstruktur-Elemente beibehalten werden. Grundsätzlich kann das YopE₂₃₋₇₈-Peptid nicht der Struktur von SycT angepasst werden (Ergebnisse nicht gezeigt). In Abb. 3.22C sind vier Aminosäuren von SycE markiert, die wichtig sind für die Bindung an YopE. Zwei dieser Aminosäuren sind in SycT nicht konserviert, eine weist Homologie auf und lediglich eine der Aminosäuren liegt identisch in SycT vor. Außerdem besitzt SycT einen zusätzlichen β -Strang (S0) (s. Abb. 3.22C), welcher in dem Bereich liegt, der im YopE₂₃₋₇₈/SycE-Modell von YopE besetzt wird. Möglicherweise stellt dieser β -Strang S0 eine Interaktionsdomäne zwischen YopT und SycT dar. Zusätzlich trägt die unterschiedliche Orientierung der Untereinheiten in den SycT- und SycE-Dimern dazu bei, dass YopE₂₃₋₇₈ nicht in die SycT-Struktur eingefügt werden kann. Somit kann der Schluss gezogen werden, dass die genannten Unterschiede zwischen SycE und SycT zur Substratspezifität der Chaperone beisteuern.

Die Arbeiten verschiedener Gruppen lassen darauf schließen, dass der Einfluss der TTSS-Chaperone auf die Konformation ihrer Substrate auf die Bindungsdomänen am N-Terminus der Effektoren begrenzt ist (Birtalan *et al.*, 2002; Neumayer *et al.*, 2004; Wilharm *et al.*, 2004). Die instabile Bindung zwischen dem biologisch inaktiven

YopT_{C139S} und SycT deutet jedoch darauf hin, dass eine Interaktion zwischen dem katalytischen Zentrum der Cysteinprotease YopT und seinem spezifischen Chaperon besteht (s. Abb. 3.21). Es ist davon auszugehen, dass die konservierte Substitution des Cysteins gegen ein Serin nicht zu bedeutenden Änderungen in der Konformation führt. Somit wird wohl durch die Mutation eine direkte Interaktion verhindert, was zu der geringeren Bindungsfähigkeit von SycT an YopT_{C139S} führt.

Es stellt sich die Frage, welcher Bereich von SycT mit dem katalytischen Zentrum interagiert. Wenn davon ausgegangen wird, dass YopT vergleichbar mit dem Modell YopE/SycE an SycT bindet, stellt am wahrscheinlichsten der C-Terminus von SycT die Interaktionsdomäne dar. Die Struktur des C-Terminus konnte nicht aufgelöst werden (s. Abb. 3.22C). Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass der C-Terminus von SycT flexibel ist. Die Syc-Proteine von *Yersinia* besitzen im Anschluss an die α -Helix H3 in der Regel 12-18 Aminosäuren an ihrem C-Terminus, deren Struktur und Funktion nicht definiert werden können (s. Abb. 3.22C). Deletionsmutationen dieser Proteine können Aufschluss geben über die Funktion dieser Bereiche.

Möglicherweise dient die Interaktion von SycT mit dem katalytischen Zentrum von YopT der Inaktivierung der Protease YopT in der *Yersinia*-Zelle. Damit wäre neben der Aufgabe als Translokationssignal und als stabilisierender Faktor eine neue Funktion für ein Syc-Protein bekannt.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Bakterienstämme

5.1.1.1 *E. coli*

Name	Beschreibung
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>supE44 thi-1 λ⁻¹ recA1 gyrA96 recA1 gyrA96 relA1 Φ80d lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF⁹) U169</i>
BL-21	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i>

5.1.1.2 *Yersinia enterocolitica*

Name	Beschreibung	Abkürzung	Referenz
WA-314	Serovar O:8; klinisches Isolat, welches das Virulenzplasmid pYVO:8 besitzt	WAP	Heesemann und Laufs, 1983
WA-C(pTTSS)	WA-314 ohne pYV, der TTSS und YadA exprimiert		Trülsch <i>et al.</i> , 2003
WA-C(pTTSS + pACYC- <i>yopT_{WT}/sycT</i>)	Mutanten-Stamm WA-C(pTTSS) mit pACYC- <i>yopT_{WT}/sycT</i> (O:8); Sekretion und Translokation von YopT _{WT}	WpYopT _{WT}	diese Arbeit
WA-C(pTTSS + pACYC- <i>yopT_{C139S}/sycT</i>)	Mutanten-Stamm WA-C(pTTSS) mit pACYC- <i>yopT_{C139S}/sycT</i> ; Sekretion und Translokation von YopT _{C139S}	WpYopT _{C139S}	diese Arbeit
WA-C(pTTSS + pACYC- <i>yopO</i>)	Mutanten-Stamm WA-C(pTTSS) mit pACYC- <i>yopO</i> ; Sekretion und Translokation von YopO	WpYopO	Trülsch <i>et al.</i> , 2003
WA-C(pYVO8 Δ T)	Mutanten-Stamm, der kein YopT produziert, Inaktivierung des <i>yopT</i> -Gens durch Insertion	W Δ YopT	Zumbihl <i>et al.</i> , 1999
WA-C(pYVO8 Δ O)	Mutanten-Stamm, der kein YopO produziert, Inaktivierung des <i>yopO</i> -Gens durch Insertion	W Δ YopO	Trülsch <i>et al.</i> , 2004

5.1.2 Eukaryotische Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinie	Beschreibung	Bezugsquelle	Kulturmedium
HeLa	humane Epithelzellen; Zervix-Karzinom-Zelllinie (adhärent)	ATCC	DMEM, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 % Vitamine, 1x essentielle Aminosäuren

5.1.3 Oligonukleotide und Plasmide

5.1.3.1 Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotide für die Integration in Expressionvektoren

Name	Sequenz	Vektor
Promotor YopT _{for BamHI}	<u>GGATCC</u> GACGCTCCGACGCTATCAACATAACA	pACYC184
YopT _{for BamHI}	<u>GGATCC</u> GACAGTATTCACGGACACTACCATAT	pGEX-6P-3
SycT _{for NdeI}	<u>CATATG</u> CAGACAACCTTCACAGAACTTATGCA	pWS151
YopT _{rev SmaI}	<u>CCCGGG</u> TAAACCTCCTTGGAGTCAAATGTTA	pGEX-6P-3
SycT _{rev SalI}	<u>GTCGACT</u> CAGATGAATAATATAGGTGATGTCG	pACYC184, pWS151
SycT _{rev SmaI}	<u>CCCGGG</u> TCAGATGAATAATATAGGTGATGTCG	pGEX-6P-3

Unterstrichen markiert sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme.

Oligonukleotide für die Definition einer Punktmutation

Name	Sequenz
YopT _{C139S for}	CTAGGGGGGCCAGCGAGGCTTTATGTGCAC
YopT _{C139S rev}	GTGCACATAAAGCCTCGCTGGCCCCCCTAG

5.1.3.2 Expressionsvektoren und klonierte Gene

Name	Eigenschaften	Referenz
pGEX-2T	Expressionsvektor, Amp ^R	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
pGEX-2T- <i>rhoA</i>	humanes RhoA als GST-Fusionsprotein	Ridley <i>et al.</i> , 1992
pGEX-2T- <i>rac1</i>	humanes Rac1 als GST-Fusionsprotein	Ridley <i>et al.</i> , 1992
pGEX-2TK	Expressionsvektor, Amp ^R	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
pGEX-2TK- <i>pak (CRIB)</i>	Cdc42/Rac-bindende Domäne der humanen PAK1 als GST-Fusionsprotein	Sander <i>et al.</i> , 1998
pGEX-4T-3	Expressionsvektor, Amp ^R	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
pGEX-4T-3- <i>rhoGDI</i>	humanes RhoGDI als GST-Fusionsprotein	Kristina Krauß, Max von Pettenkofer-Institut, München, Deutschland
pGEX-4T-3- <i>rhotekin (RBD)</i>	Rho-bindende Domäne des humanen Rhotekin als GST-Fusionsprotein	Agnes Wiedemann, Max von Pettenkofer-Institut, München, Deutschland
pGEX-4T-3- <i>sycT</i>	Chaperon SycT von <i>Y. enterocolitica</i> als GST-Fusionsprotein	Gottfried Wilharm, Max von Pettenkofer-Institut, München, Deutschland
pGEX-6P-2	Expressionsvektor, Amp ^R	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
pGEX-6P-2- <i>yopO_{WT}</i>	Wildtyp von YopO von <i>Y. enterocolitica</i> als GST-Fusionsprotein	Juris <i>et al.</i> , 2000
pGEX-6P-3	Expressionsvektor, Amp ^R	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
pGEX-6P-3- <i>yopT_{WT}</i>	Wildtyp von YopT (Serovar O:8) von <i>Y. enterocolitica</i> als GST-Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX-6P-3- <i>yopT_{WT}/sycT</i>	Wildtyp von YopT (Serovar O:8) und SycT von <i>Y. enterocolitica</i> als GST-Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX-6P-3- <i>yopT_{C139S}/sycT</i>	Punktmutation C139S und SycT von <i>Y. enterocolitica</i> als GST-Fusionsprotein	diese Arbeit

pACYC184	Klonierungsvektor, Cm ^R , Tc ^R	New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland
pACYC-promotor <i>yopT_{WT}/sycT</i>	Promotorregion, YopT (Wildtyp) und SycT von <i>Y. enterocolitica</i> zur Expression in <i>Yersinia</i>	diese Arbeit
pACYC-promotor <i>yopT_{C139S}/sycT</i>	Promotorregion, YopT (Punktmutation) und SycT von <i>Y. enterocolitica</i> zur Expression in <i>Yersinia</i>	diese Arbeit
pWS151	Derivat von pMS470D8; über die Schnittstellen <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> wurde ein Linker eingefügt; Amp ^R	Balzer <i>et al.</i> , 1992
pWS- <i>sycT</i>	Chaperon SycT von <i>Y. enterocolitica</i>	diese Arbeit

5.1.4 Enzyme

5.1.4.1 Restriktionsenzyme

Name	Hersteller	Temperatur
<i>BamH</i> I (10 U/μl)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	37°C
<i>Sal</i> I (10 U/μl)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	37°C
<i>Xma</i> I (10 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt/Main	37°C

5.1.4.2 Enzyme für die PCR, Ligation und Proteinreinigung bzw. -spaltung

Name	Hersteller
Deep Vent _R ® DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PreScission TM Protease	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Proteinase K (fungal)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Thrombin Protease	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

5.1.5 Antikörper

5.1.5.1 Primäre Antikörper für indirekte Immundetektion nach SDS-PAGE und Western Transfer sowie für Immunpräzipitationen

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp und Herkunft	Hersteller/ Bezug über	Referenz
anti-YopT	gegen YopT gerichtet	polyklonales Serum aus Kaninchen	Kristina Krauß, Max von Pettenkofer-Institut, München, Deutschland	diese Arbeit
anti-SycT	gegen SycT gerichtet	polyklonales Serum aus Kaninchen	Gottfried Wilharm, Max von Pettenkofer-Institut, München, Deutschland	
anti-RhoA	gegen humanes RhoA gerichtet	Maus, monoklonal 26C4	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	siehe Produktinformation
anti-RhoGDI	gegen humanes RhoGDI gerichtet	Kaninchen, monoklonal A-20	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	siehe Produktinformation
anti-Rac1	gegen humanes Rac1 gerichtet	Maus, monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	siehe Produktinformation
anti-Cdc42	gegen humanes Cdc42 gerichtet	Maus, monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	siehe Produktinformation

5.1.5.2 Sekundäre Antikörper für Western Transfer-Analysen

Bezeichnung	Spezifität
alle von Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland	
HRP anti-Maus IgG (aus Schaf)	IgG mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert gegen IgG aus Maus gerichtet
HRP anti-Kaninchen IgG (aus Esel)	IgG mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert gegen IgG aus Kaninchen gerichtet

5.1.6 Chemikalien

Name	Hersteller/Lieferant
Acrylamid-Mix/ Protogel	National Diagnostics, Atlanta, USA
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ampuwa [®] (für Spülzwecke)	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H, Deutschland
BHI (Brain Heart Infusion)-Medium	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMEM (Dulbecco's modified eagle media)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Längenstandard (Ready Load™ 1 kb)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FCS (fötale Kälberserum)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FITC-Dextran	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
GDPβS [Guanosin-5'-O- (2-Thiodiphosphat) Trilithiumsalz]	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glutathion	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glutathion Sepharose [®] 4B	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
GTPγS [Guanosin-5'-O- (3-Thiotriphosphat) Tetralithiumsalz]	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
HEPES (<i>N</i> -2[Hydroxyethyl]piperazine- <i>N'</i> -[2-ethanesulfonic acid])	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	peqlab, Erlangen, Deutschland
LB (Luria Bertani)-Agar	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
LB (Luria Bertani)-Medium	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MEM essentielle Aminosäuren (100x)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MEM Vitamin-Lösung	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mineralöl	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Moviol 4-88	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NuPAGE [®] MOPS SDS Laufpuffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE [®] Transferpuffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PCR Nukleotid Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
p-Diaminobenzamidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (complete)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
<i>Protein Assay</i> (Farbstoff-Konzentrat)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Protein-A-Agarose	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Proteingrößenstandard (SeeBlue [®] Plus2, prestained)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Rhodamin-Phalloidin	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Servalyt pH 4-7, pH 3-10 (iso-dalt)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Spectinomycin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau (Benzaminblau)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Trypsin-EDTA (1x)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

5.1.7 Kits

Bezeichnung	Hersteller
ECL Western blotting detection reagents	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
S.N.A.P. MiniPrep Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

5.1.8 Weitere Materialien

Name	Hersteller
Centricon (10 kDa, 30 kDa, 50 kDa)	Millipore, Eschborn, Deutschland
Criterion Precast Gele (Tris-HCl)	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Femtotip	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Fuji Medical X-Ray Film	Fuji Photo Film, Düsseldorf, Deutschland
Immunobilon™-P Transfermembran (PVDF)	Millipore, Eschborn, Deutschland
Membran Filter (0,025 µm)	Millipore, Eschborn, Deutschland
Microcon (10 kDa, 30 kDa, 50 kDa)	Millipore, Eschborn, Deutschland
Microfuge® Tube (für Ultrazentrifugation)	Beckman Instruments, Inc, CA, U.S.A.
NuPAGE® Gele (Bis-Tris)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ready Strip™ IPG Strips (pH 4-7, pH 3-10; 7 und 11 cm)	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Steriflip (0,22 µm, 50 ml)	Millipore, Eschborn, Deutschland
Vivaspin 500 (10 kDa, 30 kDa)	Vivascience, Hannover, Deutschland

5.1.9 Geräte

Gerät	Typ und Hersteller
Brutschränke	BBD 6220, Heraeus, Hanau, Deutschland
Chromatographie	Äkta Explorer System, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Elektrophoresekammer DNA	Agagel Standard G45/1, Biometra®, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer Protein	Mini-Protean 3, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland Hofer SE 400, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland Criterion™, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland NuPAGE® X Cell II Mini, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Leitz DM RBE, Leica, Mannheim, Deutschland
French Press	SLM-AMINCO, Spectronic Instruments, French Press® Pressure Cells (Typ 40K Manual-Fill-Cell, FA-030) und Cell Press, New York, USA

Geldokumentationssystem/ UV-Transilluminator	Herolab, E.A.S.Y.RH., Molekulare Trenntechnik, Wiesloch, Deutschland
Isoelektrische Fokussierung	Protean IEF Cell; Bio-Rad, München, Deutschland
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroinjektion	Transjector 5246 und Micromanipulator 5171, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	pH211 Microprocessor pH-Meter, Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
Präzisionswaagen	Sartorius Basic Plus (BP 615), Sartorius, Göttingen, Deutschland Sartorius BL 1500S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Spektralphotometer	Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Rotator	Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, Deutschland
Schüttelinkubatoren	Certomat [®] R, B. Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland Certomat BS-1, B. Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland
Spannungsgeräte	Power Pac 1000, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Sterilwerkbänke	Heraeus, HS12, Hanau, Deutschland
Thermocycler	Gene Amp [®] PCR System 2400, Perkin Elmer, Foster City, CA, USA
Thermoschüttler	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transferapparatur	Multiblot, C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland Sigma, 3K30, B. Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland Sigma, 1K15, B. Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland Optima [™] TL Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Beckman Instruments, Inc., CA, USA

5.2 Methoden

5.2.1 Molekularbiologische Methoden

5.2.1.1 Präparation von DNA

Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden verschiedene Kit-Systeme verwendet. Die Minipräparation, also die Reinigung von Plasmid-DNA im Maßstab von bis zu 10 µg aus 5 mL Bakterienkultur, erfolgte mit Hilfe des S.N.A.P. MiniPrep Kits (Invitrogen, Karlsruhe). Für die Isolierung großer Plasmidmengen, d.h. im Maßstab von 300-500 µg aus 100 mL Bakterienkultur, wurde das EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Es wurde nach den jeweiligen Anweisungen des Herstellers verfahren. Beide Systeme beruhen auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und das unterschiedliche Verhalten von chromosomaler und Plasmid-DNA im alkalischen Milieu.

Präparation von DNA-Fragmenten nach elektrophoretischer Auftrennung

Elektrophoretisch getrennte DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht als Blöckchen aus dem Agarosegel ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

5.2.1.2 Analyse von DNA

Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm (Absorptionsmaximum).

Gemessen wurde in Quarzküvetten bei einer Verdünnung von 1:50. Als Nullwert diente bidest. Wasser bzw. der Elutionspuffer des zur DNA-Gewinnung verwendeten Kits. Die Berechnung der DNA-Konzentration aus der ermittelten Absorption erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

Verunreinigungen der Probe durch Proteine konnten durch zusätzliche Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda=280$ nm identifiziert werden. Der Quotient

$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ verringert sich mit zunehmender Verunreinigung der Probe mit Proteinen und beträgt bei sehr reiner DNA annähernd 1,8.

DNA-Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmentgemische können durch Elektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt werden. Dieser Vorgang ermöglicht die Analyse der Fragmentgröße mit Hilfe eines aufgetragenen Längenstandards, sowie eine quantitative Bestimmung.

Für die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Flachbettgele mit einer Agarosekonzentration von 0,7 bis 1,4 % eingesetzt. Als Gel- und Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Vor der Gelelektrophorese wurden die Proben mit Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 80-120 V.

6x Auftragspuffer: 50 % (v/v) Glycerin; 0,1 mM EDTA; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; pH 7,0

10x TAE: 40 mM Tris/HCl, pH 8,0; 5 mM Essigsäure; 1 mM EDTA

Visualisierung von DNA

Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten DNA-Banden im Agarosegel in einem Ethidiumbromid-Bad (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 10 min angefärbt und durch Fluoreszenzanregung mit UV-Licht ($\lambda=260\text{ nm}$) sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit einem Video-System (Herolab, E.A.S.Y.RH., Molekulare Trenntechnik, Wiesloch).

Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech in Konstanz durchgeführt.

5.2.1.3 Enzymatische Behandlung von DNA

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungs-, Mutagenese- oder Analysezwecke diente die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). DNA-Fragmente können *in vitro* durch thermostabile DNA-Polymerasen vervielfältigt werden.

Die Amplifikation erfolgt über zwei gegensätzlich orientierte Oligonukleotide. Diese hybridisieren mit den denaturierten Einzelsträngen der zu amplifizierenden DNA und dienen der DNA-Polymerase als Ansatzstelle zur Synthese.

Für die Reaktion wurden standardmäßig jeweils 2 μ M Oligonukleotid, 100 μ M jedes dNTP (Roche Diagnostics, Mannheim) und 0,6 U Deep Vent_R® DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt/Main) eingesetzt. Als Matritze wurde entweder gereinigte Plasmid-DNA oder lysierte Bakterien herangezogen. Als Puffer diente der ThermoPol Reaction Puffer (New England Biolabs, Frankfurt/Main), dem zusätzlich 2 mM MgSO₄ zugefügt wurde.

Die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde in automatisierten PCR-Prozessoren (Perkin Elmer, Foster City, CA) durchgeführt. Ein Zyklus umfasste 30-60 sec Denaturierung bei 94°C, 30-60 sec Anlagerung der Oligonukleotide bei 55-58°C und abschließend 60-90 sec Extension bei 75°C. Insgesamt wurde dieser Zyklus 24-29x wiederholt. Zu Beginn der Amplifikation wurden 5 min Anfangsdenaturierung bei 94°C vorgeschaltet. Auf den letzten Zyklus folgten 10 min Extension bei 75°C, um die Polymerisierung zu vervollständigen.

Der Erfolg der PCR wurde über Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

Generierung einer Punktmutation im *yopT*-Gen

Nach Shao *et al.* (2002) wurde eine Punktmutation im *yopT*-Gen erzeugt, bei der das Cystein an Position 139 gegen Serin ausgetauscht wurde. Der Austausch erfolgte mit Hilfe der *overlap*-PCR (Ho *et al.*, 1989). Im ersten Schritt wurden mittels PCR zwei Fragmente des Gens mit überlappenden Enden erzeugt (1. Fragment: YopT_{for BamHI} bzw. Promotor YopT_{for BamHI} und YopT_{C139S rev}; 2. Fragment: YopT_{C139S for} und SycT_{rev Sall} bzw. SycT_{rev SmaI}). Dabei wurde bei beiden Fragmenten über die Oligonukleotide YopT_{C139S for} und YopT_{C139S rev} die Punktmutation definiert. Als zweiter Schritt folgte die „Fusions-PCR“, bei der sich die überlappenden Enden der beiden Fragmente aneinanderlagern und somit das gesamte Gen per PCR amplifiziert wurde.

Der auf diese Weise mutierte codierende Abschnitt *yopT/sycT* (mit und ohne Promotorregion) wurde zunächst in den pCR®2.1-TOPO®-Vektor zwischenkloniert und sequenziert. Nach Behandlung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurde die Sequenz in den pGEX-6p-3-Vektor für die Reinigung eines GST-Fusionsproteins sowie

(mit Promotorregion) in den pACYC184-Vektor zur Erzeugung einer *Yersinia*-Mutante integriert.

Zwischenklonierung

DNA-Sequenzen, die in Expressionsvektoren ligiert werden sollten, wurden nach der Amplifikation mittels PCR zuerst mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen, Karlsruhe) in den pCR®2.1-TOPO®-Vektor zwischenkloniert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Nach der Transformation des Ligationsansatzes in TOP10-*E. coli* und der folgenden Inkubation wurden Bakterien-Kolonien über die PCR-Methode auf den klonierten DNA-Bereich hin kontrolliert. Positive Klone wurden einer Plasmidpräparation unterzogen (s. Kapitel 5.2.1.1). Aus den gereinigten Plasmiden wurde die zu klonierende DNA-Sequenz mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten.

Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem. Pro µg Plasmid-DNA wurden 2,5 U Enzym eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 2 h bei 37°C. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes wurde so gewählt, dass die eingesetzte Enzymmenge 10 % des Gesamtvolumens nicht überschritt.

Mehrfachspaltungen wurden, soweit möglich, in einem Puffer durchgeführt. Waren die Puffersysteme zweier Restriktionsenzyme nicht kompatibel, erfolgte der Verdau zuerst in dem Puffersystem mit dem geringeren Salzgehalt. Anschließend wurde der Restriktionsansatz mittels Membran-Filter (Millipore, Eschborn) ca. 1,5 min gegen bidest. Wasser dialysiert. Mit dem entsalzten Restriktionsansatz wurde der Verdau mit dem Enzym, das einen höheren Salzgehalt benötigt, und dem entsprechenden Puffer durchgeführt.

Im Anschluss an die Restriktion wurde der vollständige Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen. Das herausgeschnittene DNA-Fragment wurde nach der Gelelektrophorese als Blöckchen aus dem Gel geschnitten und extrahiert.

Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren (pGEX und pACYC) wurde mit T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) 2 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Reaktionsvolumen wurde relativ klein (10 µL) gewählt. Um die Ausbildung von Vektor-Konkatameren zu minimieren bzw. zu vermeiden, wurde das Fragment im Überschuss zum Ligationsansatz gegeben (Insert: Vektor=5:1), wobei 10 bis 50 ng Vektor-DNA eingesetzt wurden. Die DNA wurde mit 1 U T4-DNA-Ligase und 1x Ligationspuffer versetzt. Der Ansatz wurde mit bidest. Wasser auf ein Endvolumen von 10 µL aufgefüllt.

Die DNA-Fragmente wurden über die Schnittstellen zweier verschiedener Restriktionsenzyme, die keine Komplementarität aufwiesen, in die Vektoren ligiert. Dadurch konnte sowohl die Orientierung der Sequenz definiert als auch eine Selbstzirkularisierung des Vektors vermieden werden. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz, der lediglich den geschnittenen Vektor enthielt.

Im Anschluss an die Ligrationsreaktion wurde der gesamte Ansatz in *E. coli*-Zellen transformiert.

Transformationskontrolle in *E. coli* mit PCR

Der Erfolg einer Transformation wurde mittels der PCR überprüft. Dazu wurden die Bakterien in 5 mL Flüssigmedium über Nacht angezogen. 200 µL der Kultur wurden 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden in 20 µL bidest. Wasser resuspendiert und zur Lyse 5 min bei 100°C inkubiert. Das Lysat wurde kurz auf Eis abgekühlt und 5 sec zentrifugiert. 3 µL des Überstands wurden als DNA-Matrize in der PCR-Reaktion eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 25 µL, die Parameter entsprachen den oben beschriebenen.

5.2.2 Biochemische Methoden

5.2.2.1 GST-System

Der *multiple cloning site* (MCS) der pGEX-Vektoren des GST-Systems (Amersham Biosciences, Freiburg) ist das Gen der Glutathion S-Transferase (GST) vorgeschaltet. Dadurch können GST-Fusionsproteine generiert, in *E. coli* exprimiert und nach Lyse der

Bakterien affinitätschromatographisch gereinigt werden. Das Enzym GST aus *Schistosoma japonicum* hat ein Molekulargewicht von 26 kDa.

Zur Expression des GST-Fusionsproteins wird das entsprechende Gen in die MCS eines pGEX-Vektors kloniert. Alle pGEX-Vektoren tragen eine Ampicillinresistenz-Kassette. Die Induktion erfolgt mit dem Laktose-Analog IPTG.

Die Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus dem Lysat von *E. coli*-Zellen erfolgt affinitätschromatographisch über die Bindung von GST an Glutathion-gekoppelte Sepharose-Kügelchen. Gebundene Fusionsproteine konnten anschließend mit Glutathionhaltigem Elutionspuffer wieder von den Sepharose-Kügelchen getrennt werden. Das reduzierte Glutathion im Elutionspuffer konkurriert mit dem an die Sepharose-Kügelchen gekoppelten Glutathion um die Bindung an GST und löst so die Bindung zwischen den Kügelchen und den GST-Fusionsproteinen, die im Eluat angereichert werden können.

Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit, die GST-Einheit des gereinigten Fusionsproteins abzuspalten. Stromaufwärts der MCS tragen die in dieser Arbeit verwendeten pGEX-Vektoren (s. Kapitel 5.1.3.2) eine Erkennungssequenz für die spezifische Spaltung durch Thrombin (pGEX-2T, pGEX-4T) bzw. PreScission Protease (pGEX-6P).

Nach dieser Methode wurden in dieser Arbeit folgende GST-Fusionsproteine gereinigt:

Tab. 5.1: Liste der gereinigten GST-Fusionsproteine

Protein	Beschreibung	Molekulargewicht
GST	Glutathion S-Transferase	26 kDa
GST-SycT	YopT spezifisches Chaperon SycT	40 kDa
GST-YopT _{WT}	Wildtyp von YopT	62 kDa
GST-YopT _{WT} /SycT	Wildtyp von YopT mit Chaperon SycT	62 kDa und 15 kDa
GST-YopT _{C139S} /SycT	YopT mit Punktmutation C139S und SycT	62 kDa und 15 kDa
GST-YopO	Wildtyp von YopO	107 kDa
GST-RhoA	humanes RhoA	48 kDa
GST-Rac1	humanes Rac1	48 kDa
GST-RhoGDI	humanes RhoGDI	52 kDa
GST-Rhotekin (RBD)	Rho-bindende Domäne des humanen Rhotekin	40 kDa
GST-PAK (CRIB)	Cdc42- und Rac1-bindende Domäne der humanen PAK1	40 kDa

Expression der GST-Fusionsproteine

500 mL einer *E. coli*-Kultur in LB-Medium mit Ampicillin wurden bei 37°C und unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 (GST-YopO) bzw. 1,0 bis 1,3 (alle anderen GST-Fusionsproteine) angezogen und mit 0,5-1 mM IPTG induziert. Die Expression der Proteine erfolgte 3 h bei 22°C (GST-YopO) bzw. 37°C (alle anderen GST-Fusionsproteine) unter Schütteln.

Um den Erfolg der Expression zu überprüfen, wurden jeweils vor der Induktion und nach der Expression 1 mL der Kultur abgenommen und in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden über die SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie Blaufärbung hinsichtlich der Expression der Fusionsproteine analysiert.

Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Bakterien wurden sedimentiert (5 min bei 6000 rpm und 4°C), mit 50 mL eiskaltem PBS gewaschen, in 30 mL *E. coli* Lysispuffer resuspendiert und 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal bei einem Arbeitsdruck von 1000 Psi in einer French Press (SLM-AMINCO, Spectronic Instruments, New York) aufgebrochen. Durch Zentrifugation (10 min bei 10.000 rpm und 4°C) wurden unlösliche Zellbestandteile von löslichem Zelllysate (Überstand) abgetrennt. Der Überstand wurde durch einen Sterilfilter von 0,22 µm Porengröße filtriert, um restliche Zellbestandteile abzutrennen.

Die Vorbereitung der Glutathion-Sepharose-Kügelchen erfolgte nach der als Batch-Verfahren im Benutzer-Handbuch von Amersham Biosciences, Freiburg, beschriebenen Methode.

Für die Bindung der Fusionsproteine an die Matrix wurde das Zelllysate zusammen mit den Glutathion-Sepharose-Kügelchen 1 h auf Eis unter leichtem Schwenken inkubiert.

Nach Abnahme des Überstandes wurden die Sepharose-Kügelchen mehrmals mit Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Das gebundene GST-Fusionsprotein konnte anschließend mit Glutathion-haltigem Elutionspuffer eluiert werden. Dazu wurden die Sepharose-Kügelchen mit 1 mL Elutionspuffer versetzt. Der Elutionsansatz wurde 10 min bei RT leicht geschwenkt. Danach wurde der Überstand mit den eluierten Fusionsproteinen abgenommen und gesammelt. Dieser Vorgang wiederholte sich zweimal.

Abschließend wurde das Eluat in Konzentratoren (Millipore, Eschborn; Vivascience, Hannover) bis zu einer Proteinkonzentration von etwa 5-10 µg/µL konzentriert.

Das Ergebnis der Proteinreinigung wurde mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese und anschließender Coomassie Blau-Färbung dokumentiert.

<i>E. coli</i> -Lysispuffer:	1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; 200 µg/mL Lysozym in 1x PBS
<i>E. coli</i> -Lysispuffer für GST-YopO:	30 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 10 % Glycerin; 0,5 % Triton X-100; 0,1 mM PMSF; 1 mM DTT; 1,5 % CHAPS; 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail auf 50 mL
Elutionspuffer:	20 mM Glutathion; 50 mM NaCl; 100 mM Tris/HCl pH 7,4
Waschpuffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,4; 10 % Glycerin; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl ₂ ; 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail auf 50 mL

Spaltung der GST-Fusionsproteine mit Proteasen

Die Spaltung von GST-Fusionsproteinen mit PreScission Protease (Amersham Biosciences, Freiburg) erfolgte über Nacht bei 4°C, während die Fusionsproteine an die Sepharose-Kügelchen gebunden waren. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

Für die Spaltung der Fusionsproteine mit Thrombin wurden 100 µg eluiertes Fusionsprotein mit 10 U Thrombin-Protease (Amersham Biosciences, Freiburg) versetzt und zusammen 2 h bei 20°C inkubiert. Abgespaltenes GST wurde anschließend durch Inkubation des Ansatzes mit Glutathion-Sepharose-Kügelchen weggefangen. Mit Hilfe von p-Diaminobenzamidin-gekoppelter Agarose-Matrix (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde im Anschluss die Thrombin-Protease aus der Proteinlösung entfernt (1 h, 20°C).

Über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie Blau-Färbung konnten die Spaltungsreaktionen analysiert werden.

5.2.2.2 Reinigung von SycT für Kristallisationsversuche

Expression und Fällung

E. coli mit dem Plasmid pWS-*sycT* wurden in 3x 500 mL LB unter entsprechendem Selektionsdruck über Nacht bei 37°C und unter Schütteln kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 1,0 wurde die Expression von SycT durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Daraufhin wurden die Bakterien weitere 4 h bei 37°C und unter Schütteln inkubiert.

Um den Erfolg der Expression zu überprüfen, wurden jeweils vor der Induktion und nach der Expression 1 mL der Kultur abgenommen und in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden über die SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie Blau-Färbung hinsichtlich der Expression der Fusionsproteine analysiert.

Die Bakterien der drei Kulturen wurden getrennt sedimentiert (5 min bei 6000 rpm und 4°C) und jeweils mit 50 mL eiskaltem PBS gewaschen. Jedes der drei Sedimente wurde in 30 mL SycT-Lysispuffer resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal bei einem Arbeitsdruck von 1000 Psi in einer French Press (SLM-AMINCO, Spectronic Instruments, New York) aufgebrochen. Durch Zentrifugation (15 min bei 15.000 rpm und 4°C) wurden unlösliche Zellbestandteile von löslichem Zellysat (Überstand) abgetrennt. Der Überstand wurde durch einen Sterilfilter von 0,22 µm Porengröße filtriert, um restliche Zellbestandteile abzutrennen.

Durch Zugabe von Ammoniumsulfatlösung (32,5 % finale Konzentration) und Inkubation für 2,5 h bei 4°C unter Drehen wurde SycT aus dem Bakterienlysat gefällt. Auf das Aussalzen folgte ein Zentrifugationsschritt (15 min bei 15.000 rpm und 4°C).

Das Präzipitat wurde zweimal mit SycT-Waschpuffer gewaschen. Für die anschließende Dialyse wurde das Präzipitat in Dialysepuffer resuspendiert. Die Dialyse erfolgte über Nacht gegen NaCl-Dialysepuffer.

SycT-Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF, 200 µg/mL Lysozym

SycT-Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; 25 % (NH₄)₂SO₄

Dialysepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 2 mM DTT

NaCl-Dialysepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 25 mM NaCl; 3 mM DTT

Ionenaustauschchromatographie

Die Lösung wurde nach der Dialyse wiederum 15 min bei 15.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine MonoQ-Säule (HiTrap Q FF, 5 mL) gegeben, die vorher mit dem MonoQ-Puffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 10 mL MonoQ-Puffer gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem 0-100 %-Gradienten des MonoQ-Elutionspuffers. SycT eluierte bei ungefähr 250 mM NaCl. Die SycT-Fractionen wurden gesammelt und mit Hilfe von Konzentratoren (Vivascience, Hannover) konzentriert.

MonoQ-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM DTT

MonoQ-Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 1 M NaCl; 1 mM DTT

Gelfiltration

Das konzentrierte Eluat der Ionenaustauschchromatographie wurde anschließend einer Gelfiltration mit Hilfe der Superdex 75 26/60 unterzogen. Die Säule war mit dem Superdex-Puffer äquilibriert worden.

Die Fraktionen, die SycT enthielten, wurden gesammelt und mit Hilfe von Konzentratoren (Vivascience, Hannover) konzentriert. Aus 1 L Kultur konnten insgesamt 3,3 mg Protein gewonnen werden.

Superdex-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM DTT

Kristallisation

Die Kristallisation von SycT wurde am Adolf-Butenandt-Institut der LMU München von Dr. Michael Groll durchgeführt. SycT-Kristalle wurden innerhalb von vier Tagen in einem hängenden Tropfen unter Dampfdiffusionsbedingungen bei 20°C gezüchtet. Die Tropfen enthielten gleiche Volumina der Protein (40 mg/mL)- und der Reservoirlösung. Vor der Röntgenanalyse wurden die Kristalle mit Kryopuffer getränkt und für 30 sec in einem Strom von flüssigem Stickstoff bei 100 K gefroren. Die Messung erfolgte am DESY-Center, Hamburg.

Reservoirlösung: 1,2 M DL-Apfelsäure pH 7,0; 100 mM Bis-Tris Propan pH 7,0

Kryopuffer: 1,2 M DL-Apfelsäure pH 7,0; 100 mM Bis-Tris Propan pH 7,0; 25 % Glycerin

5.2.2.3 Proteinquantifizierung

Zur Abschätzung von Proteinmengen wurden zwei Methoden angewandt:

a) Proteinquantifizierung nach Bradford (1976) mit einem Farbstoff-Konzentrat (Bio-Rad Laboratories, München). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Mit Hilfe einer Eichkurve, die mit einer Stammlösung aus BSA angefertigt wurde, kann die Proteinkonzentration bestimmt werden.

b) Proteinquantifizierung durch Coomassie Blau-Färbung nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Durch den Einsatz von

Standardproteinen in definierten Mengen (SeeBlue®Plus2, *prestained*, Invitrogen, Karlsruhe) kann die Proteinquantität abgeschätzt werden.

5.2.2.4 Protein-Analysen

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach dem Protokoll von Laemmli (1970). Die Laufrichtung war vertikal. Die Laufstrecke betrug ca. 6 cm (kleine Gele; Mini Protean 3, Bio-Rad Laboratories, München) bzw. 15 cm (große Gele; Hoefer SE 400, Amersham Biosciences, Freiburg). Die Geldicke maß 0,75 mm (kleine Gele) bzw. 1,5 mm (große Gele). Trenn- und Sammelgele wurden nach den Protokollen in dem Laborhandbuch *Molecular Cloning* (Sambrook *et al.*, 1989) angefertigt.

Die aufzutragenden Proteine wurden in SDS-Probenpuffer 5 min bei 100°C inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei kleinen Gelen zunächst bei 80 V und wurde, nachdem die Farbstoffbande das Trenngel erreicht hatte, bei 120 V weitergeführt. Bei großen Gelen wurde konstant eine Stromstärke von 35 mA angelegt. Nach dem Gellauf wurden die Proteine entweder für einen anschließenden Immunoblot auf eine Membran transferiert oder das Gel wurde mit Coomassie Blau angefärbt.

Coomassie Blau-Färbelösung: 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250 in 40 % Methanol und 7 % Essigsäure

Entfärbelösung: 50 % (v/v) Methanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1 % SDS

2x SDS-Probenpuffer : 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 4 % SDS; 20 % (v/v) Glycerin; 0,3 mM Bromphenolblau; 2 % (w/v) β -Mercaptoethanol

Zweidimensionale Gelelektrophorese

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteinextrakte nach Zusatz von Ampholyten zuerst mittels der isoelektrischen Fokussierung (IEF) in einem Gelstreifen mit einem immobilisierten pH-Gradienten nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt (erste Dimension). Anschließend erfolgt die Trennung nach dem Molekulargewicht (zweite Dimension). Dazu wird der Streifen mit den fokussierten Proteinen in die Tasche eines Gels für die SDS-PAGE transferiert.

In der ersten Dimension wurden 200 μ g zytosolische Proteine aus HeLa-Zellen in einem IPG-Streifen mit einem linearen pH-Gradienten von 4-7 oder 3-10 (Bio-Rad Laboratories,

München) nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Die Proben wurden im IEF-Probenpuffer vorbereitet. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in der Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories, München) nach den Vorgaben des Herstellers. Nach der IEF wurden die Streifen bei -80°C tiefgefroren.

Für die zweite Dimension, der SDS-PAGE, wurden die Streifen zunächst 20 min im Äquilibriumspuffer unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die IPG-Streifen in die Geltasche (NuPAGE®, Invitrogen, Karlsruhe; Criterion, Bio-Rad Laboratories, München) transferiert und einer SDS-PAGE bei einer konstanten Stromspannung von 200 V unterzogen. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und immunologisch detektiert.

IEF-Probenpuffer: 8 M Harnstoff; 2 % CHAPS; 1 % TBP; 1 % Servalyt pH 4-7 bzw. pH 3-10

Äquilibriumspuffer: 6 M Harnstoff; 30 % Glycerin; 2 % SDS; 50 mM Tris/HCl pH 8,8; 1 % DTT

Proteintransfer auf Membranen

Beim Western Transfer werden die Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen, wobei das Trennungsmuster der Proteine erhalten bleibt.

Im Fall der kleinen Gele wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine in einer Nassblot-Apparatur (Mini Protean 3, Bio-Rad Laboratories, München) auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte 1 h bei 0,2 mA/Gel. Bei großen Gelen wurden die Proteine mit Hilfe einer „semidry-Blot“-Apparatur (Multiblot, Roth, Karlsruhe) auf eine PVDF-Membran übertragen. Für den Transfer wurde eine Stromstärke von 200 mA für 1 h gewählt.

Transfer-Puffer (Nassblot): 50 mM Tris; 184 mM Glycin

Anode I (semidry): 300 mM Tris; 10 % Methanol

Anode II (semidry): 25 mM Tris; 10 % Methanol

Kathode (semidry): 25 mM Tris; 40 mM 6-Aminohexansäure; 10 % Methanol

Indirekte Immundetektion

Die auf die PVDF-Membran transferierten Proteine wurden mit Hilfe spezifischer Primärantikörper nachgewiesen. An die Primärantikörper banden Sekundärantikörper, die mit dem Enzym Meerettich-Peroxidase konjugiert sind. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL™-Kits (Amersham Biosciences, Freiburg).

Vor der Immundetektion wurden die Membranen entweder 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht in TBS-T-Puffer mit 10 % Magermilchpulver und 1 % BSA inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Die Bindung der Primär- und Sekundärantikörper erfolgte jeweils bei RT für 1 h. Der Primärantikörper wurde 1:1000 (kommerziell erwerbbarer Antikörper) bzw. 1:5000 (polyklonale Seren) in TBS-T-Puffer verdünnt. Der Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper gegen Maus bzw. Kaninchen (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde 1:10000 in TBS-T-Puffer verdünnt eingesetzt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten mit der Blockierlösung bzw. den Antikörpern wurden die Membranen jeweils 3x5 min unter Schwenken mit TBS-T-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte nach abermaligem Waschen mit Hilfe des ECL™-Kits (Amersham Biosciences, Freiburg) und Röntgenfilmen (Fuji Photo Film, Düsseldorf).

TBS-T: 40 mM Tris/HCl pH 7,4; 200 mM NaCl; 0,1 % Tween-20

Ponceau-Färbung von immobilisierten Proteinen

Die Ponceau-Färbung ermöglicht die reversible Anfärbung von Proteinen einer Trägermembran. Sie wurde zur Kontrolle des Proteintransfers durchgeführt.

Die Membran wurde 20 min mit Ponceau-Färbelösung gefärbt und danach mit bidest. Wasser entfärbt.

Ponceau-Färbelösung: 2 % Ponceau in 3 % Trichloressigsäure

5.2.2.5 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen („Pull-down-Versuche“)

Bei Pull-down-Versuchen können Interaktionspartner einzelner Proteine definiert und analysiert werden. Dazu wurden GST-Fusionsproteine an Glutathion-gekoppelte Sepharose-Kügelchen gebunden und anschließend mit dem zu untersuchenden Substrat inkubiert. Als Substrat dienten je nach Fragestellung entweder Lysat bzw. Zytosol von HeLa-Zellen oder rekombinant-gereinigte Proteine nach Abspaltung ihrer GST-Einheit.

30-50 µL Glutathion-gekoppelte Sepharose-Kügelchen wurden nach Angaben des Herstellers (Amersham Biosciences, Freiburg) mit PBS äquilibriert. Die Bindungskapazität der Sepharose-Kügelchen beträgt dabei nach Angaben des Herstellers 5 mg GST-Fusionsprotein pro 1 mL Glutathion-Sepharose. An die Kügelchen wurden 30-100 µg GST-Fusionsprotein innerhalb von 60 min bei 4°C unter Rotieren gebunden. Nach

einmaligem Waschen wurden die immobilisierten GST-Fusionsproteine entweder mit Lysat bzw. Zytosol von HeLa-Zellen (Gesamtproteinmenge 500 µg) oder mit einem rekombinante gereinigten Protein (10-30 µg) weitere 60 min bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Auf die Abnahme des Überstandes folgten drei Waschschrte mit Waschpuffer mit dem dreifachen Volumen an eingesetzten Sepharose-Kügelchen, wobei die Kügelchen vorsichtig aufgewirbelt wurden.

Gebundene und nicht-gebundene Fraktionen wurden mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und mittel der Gelelektrophorese und anschließendem Western Transfer analysiert.

Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 10 % Glycerin; 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail auf 50 mL

5.2.2.6 Immunpräzitationsanalysen

Bei der Immunpräzitation kann ein Protein über die spezifische Bindung an seinen immobilisierten Antikörper präzipitiert und analysiert werden. Als Trägermatrix für den Antikörper wurde Protein A-Agarose (Santa Cruz, Heidelberg) verwendet. Über das gebundene Protein können Interaktionspartner copräzipitiert und bestimmt werden.

Zytosol von HeLa-Zellen (500 µg Gesamtproteinmenge) wurde mit 30 µL Protein A-Agarose 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 10-15 µL Antikörper gegen das zu untersuchende Protein hinzugefügt. Die Ansätze wurden 3 h bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min bei 500 g und 4°C) wurde der Überstand abgenommen, und die Protein A-Agarose mit den gebundenen Proteinen dreimal mit Waschpuffer mit dem dreifachen Volumen an eingesetzten Agarose-Kügelchen gewaschen.

Gebundene und nicht-gebundene Fraktionen wurden mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und mittel der Gelelektrophorese und anschließendem Western Transfer analysiert.

Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 10 % Glycerin; 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail auf 50 mL

5.2.2.7 GTP/GDP-Beladung der RhoGTPasen

Der Aktivitätsstatus von RhoGTPasen wird durch deren Bindung an Guanosintriphosphate bzw. -diphosphate, GTP bzw. GDP, bestimmt. Für Versuche, bei denen der

Aktivitätszustand der GTPasen von Bedeutung war, wurde HeLa-Zelllysate mit nicht-hydrolyzierbarem GPT γ S bzw. GDP β S (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) inkubiert, um die GTPasen mit den Nucleotiden zu beladen.

HeLa-Zelllysate (500 μ g Gesamtproteinmenge) wurde hierfür mit Austauschpuffer und 200 μ M Nucleotid 30 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM MgCl₂ beendet.

Austauschpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 50 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 10 mM EDTA; 2 mM DTT; 200 μ M GPT γ S bzw. GDP β S; 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail auf 50 mL

5.2.3 Mikrobiologische Methoden

5.2.3.1 *E.coli*

Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden bei 37°C in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika unter Schütteln kultiviert. Plattenkulturen wurden ebenfalls bei 37°C inkubiert. Die *E. coli*-Stämme wurden als Glycerinkulturen (15 % Glycerin) bei -80°C gelagert.

Herstellung Calcium-kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden *E. coli*-Zellen verwendet, deren Plasmidaufnahme induziert wurde. Eine Übernachtskultur wurde 1:20 verdünnt, so dass ein Endvolumen von 25 mL vorlag. Die Bakterien wurden bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 angezogen. Nach Erreichen dieses OD-Werts wurden die Bakterien 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 12 mL eiskalter 100 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert und wiederum 10 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Sediment in 12 mL eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Die nun kompetenten Bakterien wurden wiederum 10 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert und in 2,5 mL 100 mM CaCl₂- und 14 %iger Glycerin-Lösung aufgenommen. Abschließend wurden die Bakterien in 100 μ L-Ansätze aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren.

Transformation Calcium-kompetenter *E. coli*-Zellen

100 μ L kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit ca. 10 ng Plasmid-DNA gemischt oder auf den vollständigen Ligationsansatz gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 s bei 42°C hitzegeschockt, mit 500 μ L LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C unter Schütteln regeneriert. Die Bakteriensuspension wurde 5 sec zentrifugiert. Nach Abnahme von 400 μ L Überstand wurden die Bakterien im verbleibenden Medium resuspendiert und auf entsprechenden Selektionsagarplatten plattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Als Negativ- bzw. Positivkontrollen wurden Transformationsansätze ohne bzw. mit ungeschnittenem Plasmid mitgeführt.

5.2.3.2 *Y. enterocolitica*

Kultivierung und Stammhaltung von *Y. enterocolitica*

Yersinia-Kulturen wurden bei 27°C in BHI-Medium unter selektivem Druck und Schütteln kultiviert. Plattenkulturen wurden ebenfalls bei 27°C inkubiert. Die *Yersinia*-Stämme wurden als Glycerinkulturen (15 % Glycerin) bei -80°C gelagert.

Herstellung elektrokompetenter *Yersinien*

100 mL Kultur von *Y. enterocolitica* in BHI-Medium wurden bei 27°C bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,3-0,5 kultiviert. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 5000 rpm, 4°C) wurden die Zellen in 30 mL eiskaltem, bidest. Wasser gewaschen. Dieser Vorgang wiederholte sich zweimal. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 1 mL 10 % Glycerin resuspendiert. 100 μ L Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrem Gebrauch bei -80°C gelagert.

Transformation elektrokompetenter *Yersinien*

100 μ L elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in eine gekühlte Transformationsküvette transferiert. Nach Zugabe von 0,5 bis 2,0 μ g qualitativ hochreiner Plasmid-DNA erfolgte die Elektroporation (Gene Pulser II, Bio-Rad Laboratories, München) bei einer Spannung von U=2,5 kV, einem Widerstand von R=200 Ohm und einer Kapazität von C=25 μ F. Die Zeit des konstanten Strompulses betrug über 4 msec.

Die elektroporierten Bakterien wurden in 800 μL SOC-Medium resuspendiert und 1 h bei 27°C regeneriert. Anschließend wurden 150 μL der Zellsuspension auf entsprechende LB-Selektionsplatten plattiert und 24-48 h bei 27°C inkubiert.

SOC-Medium: 2 % Select Pepton 140; 0,5 % Select Yeast Extract; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1 mM NaOH; 10 mM MgCl_2 ; 20 mM Glukose; pH 7,0

Vorbereitung von Yersinia-Stämmen für Infektionsexperimente

Eine Übernachtkultur Yersinien wurde 1:20 in einem Endvolumen von 10-20 mL BHI-Medium verdünnt und 2 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert, um die *yop*-Expression zu induzieren. Anschließend wurden die Bakterien 10 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert und in 200 μL eiskaltem PBS resuspendiert.

Zur Infektion wurde die OD_{600} auf 0,36 eingestellt, um die Infektion mit einer definierten Bakterienkonzentration durchzuführen. Eine optische Dichte OD_{600} von 0,36 entspricht einer Bakterienkonzentration von 1×10^6 Zellen/ μL . Die Einstellung der Konzentration erfolgte mit eiskaltem PBS.

5.2.4 Zellbiologische Methoden

5.2.4.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

Die bei -80°C oder flüssigem Stickstoff gelagerte Zellsuspension wurde 1-2 min in einem 37°C Wasserbad aufgetaut, in auf 37°C vorgewärmten Medium gewaschen (5 min bei 1100 rpm und RT) und in 10 mL Medium in TC-80-Kulturflaschen (80 cm^2 , Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Die ausgesäten Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO_2 gesättigter Atmosphäre in supplementiertem DMEM kultiviert.

Sollten konfluente Zellen passagiert werden, wurden sie mit Trypsin/EDTA abgelöst und in entsprechender Verdünnung in Gewebekulturflaschen (80 cm^2 , 175 cm^2 , Nunc, Wiesbaden) ausgesät.

Medium: DMEM mit 10 % FCS, 100 U/mL Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 % Vitamine, 1x essentielle Aminosäuren

Ablösen adhärenter HeLa-Zellen mit Trypsin/EDTA

Um die adhärent wachsenden HeLa-Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, wurden sie mit 1x Trypsin-EDTA-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt. Zunächst wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden gleichmäßig mit 2,5 bzw. 5 mL 1x EDTA-Trypsin-Lösung (für 80 bzw. 175 cm²) beschichtet und 3 min bei 37°C inkubiert. Dabei wird die Bindung der Zellen an den Untergrund über ihre Zelladhäsionsmoleküle gestört. Die Ablösung der Zellen vom Untergrund wurde unter dem Lichtmikroskop verfolgt und durch Klopfen gegen die Kulturflasche unterstützt. Durch Zugabe des dreifachen Volumens an Kulturmedium wurde die Trypsinaktivität gestoppt und das zytotoxische EDTA gebunden.

Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zahl lebender Zellen wurde mit Hilfe der Neubauerzählkammer und Trypanblau bestimmt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der nur in tote Zellen diffundiert und diese anfärbt. 30 µl Zellsuspension wurden mit 30 µL Trypanblau (0,5 % in PBS) versetzt (1:2 Verdünnung). Mit Hilfe der Neubauerzählkammer wurde die Zahl der lebenden Zellen berechnet.

Kryokonservierung von HeLa-Zellen

1×10^7 Zellen wurden 10 min bei 1100 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1,5 mL vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und in vorgekühlten Kryoröhrchen bei -80°C tiefgefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Einfriermedium: 10 % DMSO in FCS

5.2.4.2 Lysieren von HeLa-Zellen

Präparation von HeLa-Zelllysate

Adhärente HeLa-Zellen wurden vom Boden der Zellkulturflasche abgeschabt und mit dem Medium gesammelt. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 1500 rpm, 4°C) wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Für die Lyse der Zellen wurden pro 1×10^7 Zellen 100-150 µL HeLa-Lysispuffer (4°C) eingesetzt, und der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation, 5 min bei 15.000 rpm und 4°C, wurde das

lösliche Lysat von der nicht-löslichen Fraktion abgetrennt. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde mittels der Bradford-Methode bestimmt.

HeLa-Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl pH7,4; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 10 % Glycerin; 0,1 % NP40; 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail auf 50 mL

Präparation von HeLa-Zytosol und nativen Membranfraktionen

Adhärenente HeLa-Zellen wurden vom Boden der Zellkulturflasche abgeschabt und mit dem Medium gesammelt. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 1500 rpm, 4°C) wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. 30x10⁶ Zellen wurden mit 500 µL HEPES-Lysispuffer in einem Homogenisator auf Eis aufgeschlossen. Die Suspension wurde anschließend 10 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert, um ganze Zellen, Nuclei und grobe Zellbestandteile abzutrennen. Der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes wurde einer Ultrazentrifugation (45.000 rpm, 45 min, 4°C) unterzogen, um das Zytosol von der nativen Membranfraktion zu trennen.

HEPES-Lysispuffer: 10 mM HEPES; 50 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 10 mM EDTA; 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail auf 50 mL

5.2.4.3 Infektion von HeLa-Zellen mit *Yersinia*

HeLa-Zellen wurden in Gewebekulturflaschen (80 bzw. 175 cm²) mit supplementiertem DMEM kultiviert. Für eine Infektion lagen die Zellen subkonfluent vor. Vor der Infektion wurden die Zellen zweimal mit auf 37°C vorgewärmten PBS gewaschen, um Antibiotika-Überstände zu entfernen, und mit 10-15 mL DMEM ohne Zusätze bedeckt. Die *Y. enterocolitica*-Stämme, mit denen die Infektion erfolgte, wurden wie unter Kapitel 5.2.3.2 beschrieben vorbereitet. Das Volumen der Bakterien, die zu den HeLa-Zellen pipettiert wurden, wurde so gewählt, dass eine MOI (*multiplicity of infection*, Verhältnis Bakterienzahl:Zahl der Zielzellen) von 30 vorlag. Der Infektionsansatz wurde 2-2,5 h bei 37°C und 5 % CO₂ gesättigter Atmosphäre inkubiert. Zur Beendigung der Infektion wurde dem Ansatz für 15 min bei 37°C Proteinase K (20 µg/mL; Invitrogen, Karlsruhe) hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und lysiert (s. Kapitel 5.2.4.2). Statt reinem PBS wurde dabei für den Waschschrift 2 mM PMSF in PBS eingesetzt, um die Aktivität der Proteinase K zu blockieren.

5.2.4.4 Mikroinjektion von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Deckgläschen in supplementiertem DMEM auf Deckgläschen ausgesät und über Nacht bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert. Die Mikroinjektion von GST, GST-SycT, GST-YopT_{C139S}/SycT und GST-YopT_{WT}/SycT erfolgte mit Hilfe des Transjectors 5246 und des Micromanipulators 5171 (Eppendorf, Hamburg) in DMEM ohne Zusätze bei 37°C. Die Proteinlösung wurde mit FITC-Dextran als Markersubstanz vorinkubiert, welche die Detektion der mikroinjizierten Zellen ermöglichte.

Zur Vorbereitung wurde FITC-Dextran in Mikroinjektionspuffer verdünnt, so dass eine Endkonzentration von 1 µg/µL vorlag. Mit dieser Lösung wurden die GST-Fusionsproteine versetzt. Die Endkonzentration der Proteine lag bei 500 ng/µL (GST, GST-SycT und GST-YopT_{C139S}/SycT) bzw. 200 ng/µL (GST-YopT_{WT}/SycT). Anschließend wurde die Mikroinjektionslösung 15 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert, um Aggregate zu entfernen, die die Injektionskanüle verstopfen könnten.

Zur Injektion wurden 3 µL der Injektionslösung in eine Kanüle (Femtotip, Eppendorf, Hamburg) pipettiert. Die Injektion wurde Computer-unterstützt gesteuert und konnte über ein Mikroskop an einem Monitor verfolgt werden. Für die Mikroinjektion wurde ein Deckgläschen in einer Kulturschale mit 5 mL DMEM ohne Zusätze in den Strahlengang positioniert. Pro Deckgläschen wurden 30-50 Zellen mit der Proteinlösung mikroinjiziert. An die Behandlung schloss sich sofort eine einstündige Inkubation bei 37°C an, um Schockeffekte durch die Injektion zu umgehen und damit sich die Effekte der injizierten Proteine manifestieren konnten. Zur Stimulation der Zellen wurden diese anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen in 3,7 % Formalin in PBS fixiert. Im Anschluss daran folgte die Färbung des Aktinzytoskeletts mit Rhodamin-Phalloidin, um die Auswirkungen der injizierten Proteine zu untersuchen. Die Färbung der mikroinjizierten Zellen durch FITC-Dextran sowie des Aktinzytoskeletts wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie (Leitz DM RBE, Leica, Mannheim) analysiert.

Mikroinjektionspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂

5.2.4.5 Färbung des Aktinzytoskeletts mit Rhodamin-Phalloidin

Phalloidin, ein Peptid aus dem Knollenblätterpilz, lagert sich spezifisch in fibrilläres (F-) Aktin ein. Die Kopplung an den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin ermöglicht seinen direkten Nachweis im Fluoreszenzmikroskop.

Vor der Färbung wurden die Zellen mit 3,7 % Formalin in PBS 30 min bei RT fixiert. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte für 5 min in eiskaltem Aceton bei -20°C . Anschließend wurden die Zellen luftgetrocknet. Die Aktinfärbung wurde mit Rhodamin-Phalloidin (Molecular Probes, Leiden), das 1:80 in PBS + 1 % BSA verdünnt wurde, durchgeführt. Dazu wurden 25 μL Rhodamin-Phalloidin-Lösung auf Parafilm in einer feuchten Kammer getropft. Die Deckgläschen wurden mit Hilfe einer spitzen Pinzette mit der Zellseite nach unten auf die Tropfen gelegt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschrte von je 5 min in PBS + 1 % BSA. Pro Deckgläschen wurden 6 μL Moviol auf mit Ethanol gereinigte Objektträger gegeben. Die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten auf die Moviol-Tropfen gelegt und luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Proben versiegelt.

Die Färbung des Aktinzytoskeletts wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie (Leitz DM RBE, Leica, Mannheim) analysiert.

6 Anhang

Abkürzungen

μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
2D-Gelelektrophorese	Zweidimensionale Gelelektrophorese
Abb.	Abbildung
bidest.	bidestilliert
BSA	bovines Serum-Albumin
CRIB	<i>Cdc42/Rac-interactive binding</i>
FITC	Fluorescein
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factors</i>
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter

mM	millimolar
msec	Millisekunde
nm	Nanometer
pd	Pulldown
pI	Isoelektrischer Punkt
RBD	<i>Rho binding domain</i>
Rho	<i>Ras homology</i>
RhoGDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
Syc	<i>specific Yop chaperone</i>
Tab.	Tabelle
TTSS	Typ III Sekretions- und Translokationsapparat
U	Unit
Ü	Überstand
V	Volt
Yop	<i>Yersinia outer protein</i>
Ysc	<i>Yersinia secretion system</i>

Sequenz des gesamten codierenden Bereichs *yopT* (O:8)/*sycT* (nach Sequenzierung)

```

1      ATGGACAGTATTCACGCACACTACCATATTCAACTATCGAATTATTCTGCCGGTGAAAAC
1      M D S I H A H Y H I Q L S N Y S A G E N

61     CTTCAATCAGCTACACTCACCGAAGGGGTGATTGGCGCACACCGAGTGAAAGTGAAACA
21     L Q S A T L T E G V I G A H R V K V E T

121    GCACTGTCACACTCAAACCGGCAGAAAAAGTTATCAGCCACCATAAAACATAACCAGTCA
41     A L S H S N R Q K K L S A T I K H N Q S

181    AGCCGTTCTATGCTGGATAGAAAAGTTGACCAGCGACGGCAAAGTTAACCAACGCAGCAGC
61     S R S M L D R K L T S D G K V N Q R S S

241    TTTACCTTCAGTATGATTATGTATCGCATGATACATTTTGTACTCAGTACTCGTGTGCC
81     F T F S M I M Y R M I H F V L S T R V P

301    GCGGTGAGAGAGTCTGTTGCAAATTACGGAGGTAACATCAATTTCAAGTTTGCTCAGACC
101    A V R E S V A N Y G G N I N F K F A Q T

361    AAAGGGGCTTTTCTTCATCAAATAATAAAACATTTCAGACACCGCTAGGGGGGCCTGTGAG
121    K G A F L H Q I I K H S D T A R G A C E

421    GCTTTATGTGCACATTTGGATCAGGAGCCATGCACAGGGCCAAAGCTTATTTGACCAGCTC
141    A L C A H W I R S H A Q G Q S L F D Q L

481    TATGTTGGCGGGCGTAAGGGGAAATTCCAGATCGATACACTTTACTCAATTAACAGTTG
161    Y V G G R K G K F Q I D T L Y S I K Q L

541    CAAATAGATGGTTGTAAAGCAGACGTTGATCAAGATGAGGTAACACTAGATTGGCTCAAG
181    Q I D G C K A D V D Q D E V T L D W L K

601    AAAAAATGGCATATCAGAACGTATGATTGAACGGCATTGCTTACTGCCTACAGTTGATGTT
201    K N G I S E R M I E R H C L L P T V D V

661    ACTGGTACGACGGGATCGGAAGGGCCGGATCAATTATTAACGCTATCCTTGATACTCAT
221    T G T T G S E G P D Q L L N A I L D T H

721    GGGATAGGTTACGGTTATAAAAAAATATATCTCTCTGGCCAAATGTCAGGCCACACCATA
241    G I G Y G Y K K I Y L S G Q M S G E T I

781    GCGGCGTATGTCAACGAAAATAGTGGTGTACTTTCTTCGATCCCAATTTCCGTGAATTC
261    A A Y V N E N S G V T F F D P N F G E F

841    CACTTTTCTGATAAGGAACAGTTCAGCAAATGGTTTACTAACTCATTCTGGGAAAATTCT
281    H F S D K E Q F S K W F T N S F W E N S

901    ATGTATCATTATCCTTTGGGGGTGGGGCAGAGTTTTAGCGTTTTTACATTTGATTCCAAG
301    M Y H Y P L G V G Q S F S V F T F D S K

```

```

961      GCGGTTTAAATGCAGACAACCTTCACAGAACTTATGCAACAGCTTTTCCTGAAGCTTGGCT
321      A  V  *
1          M  Q  T  T  F  T  E  L  M  Q  Q  L  F  L  K  L  G

1021     TGAACCATCAAGTTAATGAAAATGACGTTTATACATTTGAAGTGGATGGGCACATCCAAG
21      L  N  H  Q  V  N  E  N  D  V  Y  T  F  E  V  D  G  H  I  Q

1081     TACTGATTGCTTGTATCATCAACAATGGGTACAGTTGTTTCAGTGAGCTAGGTGCTGATT
41      V  L  I  A  C  Y  H  Q  Q  W  V  Q  L  F  S  E  L  G  A  D

1141     TGCCAACCAACGATAATTTGTTTGGCGAACATTGGCCTGCCCATGTTCAAGGAAGGCTGG
61      L  P  T  N  D  N  L  F  G  E  H  W  P  A  H  V  Q  G  R  L

1201     ATGGTAAATCTATTCTCTGGTCTCAACAATCACTGGTAGGGTTGGATATCGATGAAATGC
81      D  G  K  S  I  L  W  S  Q  Q  S  L  V  G  L  D  I  D  E  M

1261     AGGCTTGGTTAGAACGTTTCATTGATGATATTGAGCAGAGAAAAGAACCGCAAATACTA
101     Q  A  W  L  E  R  F  I  D  D  I  E  Q  R  K  E  P  Q  N  T

1321     AGTTTCAGCCCAACTCGACATCACCTATATTATTTCATCTGA
121     K  F  Q  P  N  S  T  S  P  I  L  F  I  *

```

Dargestellt ist die DNA-Sequenz (obere Zeile) und die Aminosäuresequenz (untere Zeile) des gesamten codierenden Bereichs für YopT und SycT. Die Sequenzen von SycT sind in blau geschrieben. Rot unterlegt ist die katalytische Triade von YopT: Cystein an der Position 139, Histidin an der Position 258 und Aspartat an der Position 274.

Sequenz des Proteins YopO (O:8) (AC-Nr. AAK69255)

```

1  MKIMGTMSPS ISLAKAHERI SKHWQNPVGE LNIEGKRYRI IDNQVLRRLNP HSGFSLFREG
61  VGKIFSGKMF SFSIARNLTD TLHAAQKTTS QELRSDIPNA LSNLFGAKPQ TELPLGWK GK
121 PLSGAPDLEG MRVAETDKFA EGESHSISIE TKDKQRLVAK IERSIAEGHL FAELEAYKHI
181 YKTAGKHPNL ANVHGMAVVP YGNRKEEALL MDEV D GWRCS DTLRSLADSW KQ GKINSEAY
241 WGTIKFIAHR LLDVTNHLAK AGIVHNDIKP GNVVFD RASG EPVVIDLGLH SRSGEQPKGF
301 TEFKAPELG VGNLGASEKS DVFLV VSTLL HGIEGF EKDP EIKPNQGLRF ITSEPAHVMD
361 ENGYPIHRPG IAGVETAYTR FITDILGVSA DSRPDSNEAR LHEFLSDGTI DEESAKQILK
421 DTLTGEMSPL PTDVR RITPK KLRELSDLLR THLSSAATKQ LDMGVVLS DL DTMLVALDKA
481 EREGGVDKDQ LKSFNSLILK TYSVIGAYIK GREGDTKSSS TEVSPYHR SN FMLSIVEPSL
541 QRIQKHL DQT HSFSDIGSLM RAHKHLETL L EVLVTL SQQG QPVSSETYSF LNRLAEAKVT
601 LSQQLN TLQQ QQESAKAQLS ILINRSGSWA DVARQSLQRF DSTRPVVKFG TEQYTAIHRQ
661 MMAAHAAITL QEVSEFTDDM RNFTADSIPL LIQLGRSSLM DEHLVEQREK LRELTTIAER
721 LNRLEREW M

```

Blau markiert ist die Kinasedomäne von YopO. Rot dargestellt sind die vier postulierten Rho-Bindungsdomänen (Dukuzumuremyi et al., 2000). Durch Mutation des grau unterlegten Lysins an Position 269 kann die Kinaseaktivität von YopO ausgeschaltet werden.

7 Literaturverzeichnis

- Abo A, Boyhan A, West I, Thrasher AJ, Segal AW** (1992) Reconstitution of neutrophil NADPH oxidase activity in the cell-free system by four components: p67-phox, p47-phox, p21rac1, and cytochrome b-245. *J Biol Chem* 267: 16767-70.
- Adamson P, Marshall CJ, Hall A, Tilbrook PA** (1992a) Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem* 267: 20033-8.
- Adamson P, Paterson HF, Hall A** (1992b) Intracellular localization of the p21rho proteins. *J Cell Biol* 119: 617-27.
- Aderem A, Underhill DM** (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17: 593-623.
- Aepfelbacher M, Trasak C, Wilharm G, Wiedemann A, Trulzsch K, Krauss K, Gierschik P, Heesemann J** (2003) Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J Biol Chem* 278: 33217-23.
- Aili M, Telepnev M, Hallberg B, Wolf-Watz H, Rosqvist R** (2003) In vitro GAP activity towards RhoA, Rac1 and Cdc42 is not a prerequisite for YopE induced HeLa cell cytotoxicity. *Microb Pathog* 34: 297-308.
- Aktories K, Schmidt G, Just I** (2000) Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem* 381: 421-6.
- Alonso A, Bottini N, Bruckner S, Rahmouni S, Williams S, Schoenberger SP, Mustelin T** (2004) Lck dephosphorylation at Tyr-394 and inhibition of T cell antigen receptor signaling by *Yersinia* phosphatase YopH. *J Biol Chem* 279: 4922-8.
- Andor A, Trulzsch K, Essler M, Roggenkamp A, Wiedemann A, Heesemann J, Aepfelbacher M** (2001) YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol* 3: 301-10.
- Balzer D, Ziegelin G, Pansegrau W, Kruft V, Lanka E** (1992) KorB protein of promiscuous plasmid RP4 recognizes inverted sequence repetitions in regions essential for conjugative plasmid transfer. *Nucleic Acids Res* 20: 1851-8.
- Barz C, Abahji TN, Trulzsch K, Heesemann J** (2000) The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett* 482: 139-43.

- Benabdillah R, Mota LJ, Lutzelschwab S, Demoinet E, Cornelis GR** (2004) Identification of a nuclear targeting signal in YopM from *Yersinia* spp. *Microb Pathog* 36: 247-61.
- Bhattacharya M, Babwah AV, Ferguson SS** (2004) Small GTP-binding protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans* 32: 1040-4.
- Birtalan SC, Phillips RM, Ghosh P** (2002) Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol Cell* 9: 971-80.
- Bishop AL, Hall A** (2000) RhoGTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348: 241-55.
- Black DS, Bliska, JB** (1997) Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J* 16: 2730-44.
- Black DS, Bliska JB** (2000) The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol* 37: 515-27.
- Black DS, Montagna LG, Zitsman S, Bliska JB** (1998) Identification of an amino-terminal substrate-binding domain in the *Yersinia* tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. *Mol Microbiol* 29: 1263-74.
- Bokoch GM** (1995) Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol* 5: 109-13.
- Boland A, Cornelis GR** (1998) Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect Immun* 66: 1878-84.
- Boland A, Havaux S, Cornelis GR** (1998) Heterogeneity of the *Yersinia* YopM protein. *Microb Pathog* 25: 343-8.
- Bourmeyster N, Vignais PV** (1996) Phosphorylation of Rho GDI stabilizes the Rho A-Rho GDI complex in neutrophil cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 54-60.
- Boyd AP, Grosdent N, Totemeyer S, Geuijen C, Bleves S, Iriarte M, Lambermont I, Octave JN, Cornelis GR** (2000) *Yersinia enterocolitica* can deliver Yop proteins into a wide range of cell types: development of a delivery system for heterologous proteins. *Eur J Cell Biol* 79: 659-71.

- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method to the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Caron E, Hall A** (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282: 1717-21.
- Cheng LW, Anderson DM, Schneewind O** (1997) Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 24: 757-65.
- Chimini G, Chavrier P** (2000) Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol* 2: E191-6.
- Chuang TH, Bohl BP, Bokoch GM** (1993a) Biologically active lipids are regulators of Rac.GDI complexation. *J Biol Chem* 268: 26206-11.
- Chuang TH, Xu X, Knaus UG, Hart MJ, Bokoch GM** (1993b) GDP dissociation inhibitor prevents intrinsic and GTPase activating protein-stimulated GTP hydrolysis by the Rac GTP-binding protein. *J Biol Chem* 268: 775-8.
- Cornelis GR** (2002a) The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 742-52.
- Cornelis GR** (2002b) *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol* 158: 401-8.
- Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP, Stainier I** (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1315-52.
- Cornelis GR, Van Gijsegem F** (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* 54: 735-74.
- Cox AD, Der CJ** (1992) Protein prenylation: more than just glue? *Curr Opin Cell Biol* 4: 1008-16.
- Day JB, Plano GV** (1998) A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol* 30: 777-88.
- Deleuil F, Mogemark L, Francis MS, Wolf-Watz H, Fallman M** (2003) Interaction between the *Yersinia* protein tyrosine phosphatase YopH and eukaryotic Cas/Fyb is an important virulence mechanism. *Cell Microbiol* 5: 53-64.
- Denecker G, Declercq W, Geuijen CA, Boland A, Benabdillah R, van Gurp M, Sory MP, Vandenabeele P, Cornelis GR** (2001) *Yersinia enterocolitica* YopP-induces

- apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. *J Biol Chem* 276: 19706-14.
- DerMardirossian C, Schnelzer A, Bokoch GM** (2004) Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase. *Mol Cell* 15: 117-27.
- Diekmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW, Hall A** (1994) Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* 265: 531-3.
- Dukuzumuremyi JM, Rosqvist R, Hallberg B, Akerstrom B, Wolf-Watz H, Schesser K** (2000) The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J Biol Chem* 275: 35281-90.
- Ellis RJ, van der Vies SM** (1991) Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 60: 321-47.
- Espinosa A, Alfano JR** (2004) Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cell Microbiol* 6: 1027-40.
- Etienne-Manneville S, Hall A** (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629-35.
- Fauré J, Vignais PV, Dagher MC** (1999) Phosphoinositide-dependent activation of Rho A involves partial opening of the RhoA/Rho-GDI complex. *Eur J Biochem* 262: 879-89.
- Feldman MF, Cornelis GR** (2003) The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett* 219: 151-8.
- Forsberg A, Viitanen AM, Skurnik M, Wolf-Watz H** (1991) The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* 5: 977-86.
- Frithz-Lindsten E, Rosqvist R, Johansson L, Forsberg A** (1995) The chaperone-like protein YerA of *Yersinia pseudotuberculosis* stabilizes YopE in the cytoplasm but is dispensable for targeting to the secretion loci. *Mol Microbiol* 16: 635-47.
- Fujihara H, Walker LA, Gong MC, Lemichez E, Boquet P, Somlyo AV, Somlyo AP** (1997) Inhibition of RhoA translocation and calcium sensitization by in vivo ADP-ribosylation with the chimeric toxin DC3B. *Mol Biol Cell* 8: 2437-47.
- Fukumoto Y, Kaibuchi K, Hori Y, Fujioka H, Araki S, Ueda T, Kikuchi A, Takai Y** (1990) Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* 5: 1321-8.

- Galan JE** (2001) Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 53-86.
- Galan JE, Bliska JB** (1996) Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 221-55.
- Galyov EE, Hakansson S, Forsberg A, Wolf-Watz H** (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* 361: 730-2.
- Gorvel JP, Chang TC, Boretto J, Azuma T, Chavrier P** (1998) Differential properties of D4/LyGDI versus RhoGDI: phosphorylation and rho GTPase selectivity. *FEBS Lett* 422: 269-73.
- Gosser YQ, Nomanbhoy TK, Aghazadeh B, Manor D, Combs C, Cerione RA, Rosen MK** (1997) C-terminal binding domain of Rho GDP-dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases. *Nature* 387: 814-9.
- Grosdent N, Maridonneau-Parini I, Sory MP, Cornelis GR** (2002) Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* 70: 4165-76.
- Guan KL, Dixon JE** (1990) Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 249: 553-6.
- Hakansson S, Galyov EE, Rosqvist R, Wolf-Watz H** (1996a) The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol Microbiol* 20: 593-603.
- Hakansson S, Schesser K, Persson C, Galyov EE, Rosqvist R, Homble F, Wolf-Watz H** (1996b) The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J* 15: 5812-23.
- Hakoshima T, Shimizu T, Maesaki R** (2003) Structural basis of the Rho GTPase signaling. *J Biochem* 134: 327-31.
- Hall A, Nobes CD** (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 965-70.

- Hamid N, Gustavsson A, Andersson K, McGee K, Persson C, Rudd CE, Fallman M** (1999) YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb Pathog* 27: 231-42.
- Hart MJ, Maru Y, Leonard D, Witte ON, Evans T, Cerione RA** (1992) A GDP dissociation inhibitor that serves as a GTPase inhibitor for the Ras-like protein CDC42Hs. *Science* 258: 812-5.
- Heesemann J** (2001) Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G (Hrsg.) Medizinische Mikrobiologie. *Urban & Fischer Verlag*, München, Jena, 8. Aufl.: 315-29.
- Heesemann J, Laufs R** (1983) Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J Bacteriol* 155: 761-7.
- Hines J, Skrzypek E, Kajava AV, Straley SC** (2001) Structure-function analysis of *Yersinia pestis* YopM's interaction with alpha-thrombin to rule on its significance in systemic plague and to model YopM's mechanism of binding host proteins. *Microb Pathog* 30: 193-209.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR** (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51-9.
- Hoiczyc E, Blobel G** (2001) Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4669-74.
- Holmström A, Olsson J, Cherepanov P, Maier E, Nordfelth R, Pettersson J, Benz R, Wolf-Watz H, Forsberg A** (2001) LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol* 39: 620-32.
- Immler D, Gremm D, Kirsch D, Spengler B, Presek P, Meyer HE** (1998) Identification of phosphorylated proteins from thrombin-activated human platelets isolated by two-dimensional gel electrophoresis by electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Electrophoresis* 19: 1015-23.
- Iriarte M, Cornelis GR** (1998) YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* 29: 915-29.
- Iriarte M, Cornelis GR** (1999) Identification of SycN, YscX, and YscY, three new elements of the *Yersinia* yop virulon. *J Bacteriol* 181: 675-80.

- Iriarte M, Sory MP, Boland A, Boyd AP, Mills SD, Lambermont I, Cornelis GR** (1998) TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J* 17: 1907-18.
- Juris SJ, Rudolph AE, Huddler D, Orth K, Dixon JE** (2000) A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9431-6.
- Juris SJ, Shao F, Dixon JE** (2002) *Yersinia* effectors target mammalian signalling pathways. *Cell Microbiol* 4: 201-11.
- Kasper B, Tidow N, Grothues D, Welte K** (2000) Differential expression and regulation of GTPases (RhoA and Rac2) and GDIs (LyGDI and RhoGDI) in neutrophils from patients with severe congenital neutropenia. *Blood* 95: 2947-53.
- Koster M, Bitter W, de Cock H, Allaoui A, Cornelis GR, Tommassen J** (1997) The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* 26: 789-97.
- Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L** (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 15: 1942-52.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Leung KY, Straley SC** (1989) The yopM gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. *J Bacteriol* 171: 4623-32.
- Leung KY, Reisner BS, Straley SC** (1990) YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun* 58: 3262-71.
- Longenecker K, Read P, Derewenda U, Dauter Z, Liu X, Garrard S, Walker L, Somlyo AV, Nakamoto RK, Somlyo AP, Derewenda ZS** (1999) How RhoGDI binds Rho. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55: 1503-15.
- Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao ZS, Lim L** (1994) A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 367: 40-6.
- Marenne MN, Journet L, Mota LJ, Cornelis GR** (2003) Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN. *Microb Pathog* 35: 243-58.

- May RC, Machesky LM** (2001) Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 114: 1061-77.
- McDonald C, Vacratsis PO, Bliska JB, Dixon JE** (2003) The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem* 278: 18514-23.
- Mehta D, Rahman A, Malik AB** (2001) Protein kinase C- α signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *J Biol Chem* 276: 22614-20.
- Michaelson D, Silletti J, Murphy G, D'Eustachio P, Rush M, Philips MR** (2001) Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol* 152: 111-26.
- Mills SD, Boland A, Sory MP, van der Smissen P, Kerbouch C, Finlay BB, Cornelis GR** (1997) *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12638-43.
- Monack DM, Mecsas J, Ghori N, Falkow S** (1997) *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10385-90.
- Mulder B, Michiels T, Simonet M, Sory MP, Cornelis G** (1989) Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect Immun* 57: 2534-41.
- Nejedlik L, Pierfelice T, Geiser JR** (2004) Actin distribution is disrupted upon expression of *Yersinia* YopO/YpkA in yeast. *Yeast* 21: 759-68.
- Neumayer W, Groll M, Lehmann V, Antoneka U, Kahler S, Heesemann J, Wilharm G** (2004) *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycH. Recombinant expression, purification, characterisation, and crystallisation. *Protein Expr Purif* 35: 237-47.
- Neyt C, Cornelis GR** (1999a) Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol Microbiol* 33: 971-81.
- Neyt C, Cornelis GR** (1999b) Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol Microbiol* 31: 143-56.

- Nobes CD, Hall A.** (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81: 53-62.
- Orth K, Palmer LE, Bao ZQ, Stewart S, Rudolph AE, Bliska JB, Dixon JE** (1999) Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. *Science* 285: 1920-3.
- Orth K, Xu Z, Mudgett MB, Bao ZQ, Palmer LE, Bliska JB, Mangel WF, Staskawicz B, Dixon JE** (2000) Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* 290: 1594-7.
- Palmer LE, Hobbie S, Galan JE, Bliska JB** (1998) YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol* 27: 953-65.
- Palmer LE, Pancetti AR, Greenberg S, Bliska JB** (1999) YopJ of *Yersinia* spp. is sufficient to cause downregulation of multiple mitogen-activated protein kinases in eukaryotic cells. *Infect Immun* 67: 708-16.
- Page AL, Parsot C** (2002) Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol Microbiol* 46: 1-11.
- Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC** (1997) Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* 11: 463-75.
- Persson C, Nordfelth R, Holmstrom A, Hakansson S, Rosqvist R, Wolf-Watz H** (1995) Cell-surface-bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell. *Mol Microbiol* 18: 135-50.
- Persson C, Carballeira N, Wolf-Watz H, Fallman M** (1997) The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J* 16: 2307-18.
- Puls A, Eliopoulos AG, Nobes CD, Bridges T, Young LS, Hall A** (1999) Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(alpha) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J Cell Sci* 112: 2983-92.
- Reid T, Furuyashiki T, Ishizaki T, Watanabe G, Watanabe N, Fujisawa K, Morii N, Madaule P, Narumiya S** (1996) Rhotekin, a new putative target for Rho bearing

- homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhotaxilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem* 271: 13556-60.
- Ridley AJ, Hall A** (1992) The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-99.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A** (1992) The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70: 401-10.
- Rivero F, Illenberger D, Somesh BP, Dislich H, Adam N, Meyer AK** (2002) Defects in cytokinesis, actin reorganization and the contractile vacuole in cells deficient in RhoGDI. *EMBO J* 21: 4539-49.
- Robbe K, Otto-Bruc A, Chardin P, Antony B** (2003) Dissociation of GDP dissociation inhibitor and membrane translocation are required for efficient activation of Rac by the Dbl homology-pleckstrin homology region of Tiam. *J Biol Chem* 278: 4756-62.
- Rosqvist R, Forsberg A, Rimpilainen M, Bergman T, Wolf-Watz H** (1990) The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol Microbiol* 4: 657-67.
- Rosqvist R, Forsberg A, Wolf-Watz H** (1991) Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun* 59: 4562-9.
- Rosqvist R, Magnusson KE, Wolf-Watz H** (1994) Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* 13: 964-72.
- Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S, Heesemann J** (1996) Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun* 64: 724-33.
- Ruckdeschel K, Machold J, Roggenkamp A, Schubert S, Pierre J, Zumbühl R, Liautard JP, Heesemann J, Rouot B** (1997a) *Yersinia enterocolitica* promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-alpha production. *J Biol Chem* 272:15920-7.

- Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Lafont V, Mangeat P, Heesemann J, Rouot B** (1997b) Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. *Infect Immun* 65: 4813-21.
- Ruckdeschel K, Harb S, Roggenkamp A, Hornef M, Zumbihl R, Kohler S, Heesemann J, Rouot B** (1998) *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 187: 1069-79.
- Ruckdeschel K, Mannel O, Richter K, Jacobi CA, Trulzsch K, Rouot B, Heesemann J** (2001) *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J Immunol* 166: 1823-31.
- Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, Brown JH** (2000) The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 459-89.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Book 3. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, 2. Aufl: 18.52.
- Sander EE, van Delft S, ten Klooster JP, Reid T, van der Kammen RA, Michiels F, Collard JG** (1998) Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol* 143: 1385-98.
- Sasaki T, Kato M, Takai Y** (1993) Consequences of weak interaction of rho GDI with the GTP-bound forms of rho p21 and rac p21. *J Biol Chem* 268: 23959-63.
- Sasaki T, Takai Y** (1998) The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 641-5.
- Sauvonnet N, Lambermont I, van der Bruggen P, Cornelis GR** (2002) YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Microbiol* 45: 805-15.
- Scheffzek K, Stephan I, Jensen ON, Illenberger D, Gierschik P** (2000) The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat Struct Biol* 7: 122-6.

- Schesser K, Spiik AK, Dukuzumuremyi JM, Neurath MF, Pettersson S, Wolf-Watz H** (1998) The yopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol Microbiol* 28: 1067-79.
- Schmidt A, Hall A** (2002) Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16: 1587-1609.
- Schotte P, Denecker G, Van Den Broeke A, Vandenaabeele P, Cornelis GR, Beyaert R** (2004) Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. *J Biol Chem* 279: 25134-42.
- Shao F, Merritt PM, Bao Z, Innes RW, Dixon JE** (2002) A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109: 575-88.
- Shao F, Vacratsis PO, Bao Z, Bowers KE, Fierke CA, Dixon JE** (2003) Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 904-9.
- Skrzypek E, Cowan C, Straley SC** (1998) Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol Microbiol* 30: 1051-65.
- Skrzypek E, Myers-Morales T, Whiteheart SW, Straley SC** (2003) Application of a *Saccharomyces cerevisiae* model to study requirements for trafficking of *Yersinia pestis* YopM in eucaryotic cells. *Infect Immun* 71: 937-47.
- Sorg I, Goehring UM, Aktories K, Schmidt G** (2001) Recombinant *Yersinia* YopT leads to uncoupling of RhoA-effector interaction. *Infect Immun* 69: 7535-43.
- Sorg I, Hoffmann C, Dumbach J, Aktories K, Schmidt G** (2003) The C terminus of YopT is crucial for activity and the N terminus is crucial for substrate binding. *Infect Immun* 71: 4623-32.
- Sory MP, Cornelis GR** (1994) Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol* 14: 583-94.
- Sulciner DJ, Irani K, Yu ZX, Ferrans VJ, Goldschmidt-Clermont P, Finkel T** (1996) Rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 16: 7115-21.

- Sun J, Barbieri JT** (2004) ExoS Rho GTPase-activating protein activity stimulates reorganization of the actin cytoskeleton through Rho GTPase guanine nucleotide disassociation inhibitor. *J Biol Chem* 279: 42936-44.
- Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Takaishi K, Kameyama T, Tsukita S, Takai Y** (1997) Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem* 272: 23371-5.
- Tardy F, Homble F, Neyt C, Wattiez R, Cornelis GR, Ruyschaert JM, Cabiaux V** (1999) *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *EMBO J* 18: 6793-9.
- Thapar R, Karnoub AE, Campbell SL** (2002), Structural and biophysical insights into the role of the insert region in Rac1 function. *Biochemistry* 41: 3875-83.
- Trülsch K, Roggenkamp A, Aepfelbacher M, Wilharm G, Ruckdeschel K, Heesemann J** (2003) Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Int J Med Microbiol* 293: 167-77.
- Trülsch K, Sporleder T, Igwe EI, Rüssmann H, Heesemann J** (2004) Contribution of the major secreted Yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun* 72: 5227-34.
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C** (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11: 2295-322.
- Viboud GI, Bliska JB** (2001) A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes. *EMBO J* 20: 5373-82.
- Von Pawel-Rammingen U, Telepnev MV, Schmidt G, Aktories K, Wolf-Watz H, Rosqvist R** (2000) GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol* 36: 737-48.
- Wattiau P, Cornelis GR** (1993) SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in Ohe secretion of YopE. *Mol Microbiol* 8: 123-31.
- Wattiau P, Bernier B, Deslee P, Michiels T, Cornelis GR** (1994) Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10493-7.

- Wei Y, Zhang Y, Derewenda U, Liu X, Minor W, Nakamoto RK, Somlyo AV, Somlyo AP, Derewenda ZS** (1997) Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat Struct Biol* 4: 699-703.
- Wiedemann A, Linder S, Grassl G, Albert M, Autenrieth I, Aepfelbacher M** (2001) *Yersinia enterocolitica* invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. *Cell Microbiol* 3: 693-702.
- Wilharm G, Lehmann V, Neumayer W, Trcek J, Heesemann J** (2004) *Yersinia enterocolitica* type III secretion: evidence for the ability to transport proteins that are folded prior to secretion. *BMC Microbiol* 4: 27.
- Woestyn S, Allaoui A, Wattiau P, Cornelis GR** (1994) YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J Bacteriol* 176: 1561-9.
- Yao T, Meccas J, Healy JJ, Falkow S, Chien Y** (1999) Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, YopH. *J Exp Med* 190: 1343-50.
- Zumbihl R, Aepfelbacher M, Andor A, Jacobi CA, Ruckdeschel K, Rouot B, Heesemann J** (1999) The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J Biol Chem* 274: 29289-93.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Bereitstellung des Themas, seine Anregungen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. Charles N. David für die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät für Biologie, obwohl er im Grunde „völlig ausgebucht“ war, sein Interesse an meiner Arbeit und sein offenes Ohr für alle meine Anliegen/Fragen/Probleme.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Kristina Krauß. Zum einen natürlich für das Fachliche: wie sie mich gelernte Anthropologin geduldig in die molekularbiologischen Arbeitsweisen eingeführt hat; für effizientes und kreatives Arbeiten; dass ich mich jederzeit mit allem an sie wenden konnte. Wichtig waren für mich aber auch die menschlichen Dinge, die das Zusammenarbeiten so angenehm machten: Humor durfte nicht zu kurz kommen; gemeinsam an die French Press; Filser-Englisch („morning hour ...“, Robbie's deep grip in the romantic box); Laborweisheiten („Die zwei Minuten merkt's schon nicht.“, „Entweder du hast 'ne Bindung oder du hast keine.“); die große Freude über das blaue Bradford; die Versorgung mit Krimis.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Gottfried Wilharm. Gerade im letzten Jahr war er ein wichtiger Ansprechpartner für mich, an den ich mich mit jedem Problem und jeder Frage wenden konnte. Dabei war er immer gut gelaunt und baute mich auf, wenn ich mal wieder allzu schwarz sah. Für die Kristallisationsversuche war er ein wichtiger Kooperationspartner. Der Konzentratoren-Test (Amicon vs. Vivascience) wird mir immer in Erinnerung bleiben. An dieser Stelle möchte ich mich noch mal dafür entschuldigen, dass ich immer genau seine Mittagspause erwischte, wenn ich eine Frage hatte.

Ich danke Dr. Sandra Lechner, die erst im letzten halben Jahr meine Projektleiterin wurde. In der kurzen Zeit hat sie mich immer unterstützt, mir viele wichtige Tipps für die Arbeit gegeben und war immer diskussionsbereit. Außerdem danke ich ihr dafür, dass sie meine Arbeit korrektur gelesen hat. Und vielen Dank für die Süßigkeiten.

Bei Dr. Agnès Wiedemann möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der Mikroinjektion und für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Dr. Michael Groll danke ich für das Interesse an der Kristallisation „meiner“ Proteine und die Kooperation.

Außerdem bedanke ich mich bei Gülnihal Yüksekdağ („Du!!“), für die Hilfe und Unterstützung in Laborangelegenheiten und für die Diskussionen sowohl über fachliche Themen als auch über die verschiedensten Aspekte des Lebens. Ich weiß jetzt, wo vorne ist.

Ein Dankeschön an alle Leute, die während der drei Jahre im Labor 407b(!)/408 gearbeitet haben oder immer noch dort arbeiten: Katy Niedung, Bernadette Pöllinger, Suse Bierschenk, Dagmar Reithmeier-Rost, Hanna Scheller, Katharina Werber und Nina Weber. Die Atmosphäre war sehr angenehm und man konnte immer mit Unterstützung rechnen. Dazu kamen noch die Gespräche beim Eisabhacken am -20°C und beim Arbeiten am Flow, unser Bücherclub, eine Tasse Tee mit oder ohne Kuchen zwischendurch. Katy danke ich noch ganz speziell für die Welt von Placebo.

Danke auch an meine „Leidensgenossinnen“ beim Zusammenschreiben Wibke Neumayer, Moni Schwienbacher und Kathrin van Erp für die aufbauenden Gespräche ... überhaupt für die Gespräche. In diesem Sinne auch danke an alle Leute im 4. Stock.

Danke allen Freunden, die immer Geduld hatten und mich nicht abgeschrieben haben, auch wenn ich sie manchmal vernachlässigt habe. LÖG!!!!

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, für alles, was sie für mich getan haben!

Curriculum vitae

Beatrix Lehnert

Geburtstag und –ort: 11.02.1975, München

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

1981 – 1985 Besuch der Grundschule, Unterhaching und München

1985 – 1994 Besuch des Pestalozzi-Gymnasiums, München

1994 – 2000 Biologiestudium (Diplom) an der LMU, München

Hauptfach: Anthropologie und Humangenetik

Nebenfächer: Zoologie, Ökologie, Paläontologie

10/1999 – 6/2000 Diplomarbeit bei Frau Prof. Dr. G. Grupe, Institut für Anthropologie und Humangenetik, LMU München:

„Molekulare Geschlechtsbestimmung und Verwandtschaftsanalyse an einem geschlossenen frühmittelalterlichen Skelettkollektiv“

06.07.2000 Biologie-Diplom mit der Note „1,0“ (mit Auszeichnung)

10/2000 – 8/2001 wiss. Hilfskraft an der Staatssammlung für Anthropologie und Paläoanatomie

11/2000 – 10/2001 wiss. Hilfskraft am Zoologischen Institut (Dekanat)

11/2001 – 03/2001 Doktorarbeit bei Prof. Dr. Dr. J. Heesemann, Max von Pettenkofer-Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der LMU München, Bereich Bakteriologie:

„Wirkung der *Yersinia*-translozierten Effektorproteine YopT und YopO auf GTPasen der Rho-Familie“

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde. Die Dissertation habe ich keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt. Außerdem habe ich noch nicht versucht, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Die Arbeit wurde von Prof. Dr. Charles N. David, Department Biologie II, LMU München, betreut.

München, den 21.03.2005

Beatrix Lehnert