

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Charakterisierung der Virulenzproteine YscM1 und  
YscM2 in ihrer Funktion als Modulatoren des  
Stoffwechsels in *Yersinia enterocolitica*

Wibke Neumayer

aus

Stuttgart

2005


## **Erklärung**

Die Dissertation wurde in Sinne von § 13 Abs. 3 bzw 4 der Promotionsordnung von 29. Januar 1998 von Professor Dr. Dr. J. Heesemann betreut und von Professor Dr. A. Pfeifer vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfsmittel erarbeitet.

München, 10. Januar 2005

  
(Wibke Neumayer) ✓

Dissertation eingereicht am 10. Januar 2005

1. Gutachter: Professor Dr. Dr. J. Heesemann
2. Gutachter: Professor Dr. A. Pfeifer

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Februar 2005

# INHALTSVERZEICHNIS

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>A.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>A.1</b>	<b>Die Gattung <i>Yersinia</i>.....</b>	<b>1</b>
A.1.1	Der Erreger der Pest – <i>Yersinia pestis</i> .....	2
A.1.2	Die enteropathogenen Yersinien – <i>Y. pseudotuberculosis</i> und <i>Y. enterocolitica</i> .....	2
A.1.3	Die Differenzierung der <i>Yersinia</i> -Arten nach Biovarietäten und Serotypen.....	3
A.1.4	Die Evolution der pathogenen Yersinien.....	4
A.1.5	Pathogenese enteraler Yersiniosen .....	5
A.1.5.1	Das Enterotoxin Yst .....	5
A.1.5.2	Adhäsine und Invasine .....	5
A.1.5.3	Eisenaufnahme .....	6
A.1.5.4	Das Typ III-Sekretionssystem.....	7
<b>A.2</b>	<b>Das Typ III-Sekretionssystem bei <i>Yersinia</i>.....</b>	<b>7</b>
A.2.1	Der Typ III-Sekretionsapparat .....	8
A.2.2	Yop-Sekretion und -Translokation .....	9
A.2.3	Chaperone.....	10
A.2.4	Erkennungssignale für den Proteintransport.....	12
A.2.5	Effektorproteine.....	12
A.2.6	Regulation des Typ III-Sekretionssystems .....	14
A.2.6.1	„Low calcium response“ .....	14
A.2.6.2	Temperatur .....	15
A.2.6.3	Die negativen Regulatoren LcrQ/YscM1 und YscM2 .....	15
<b>A.3</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>17</b>
<b>B.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
<b>B.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>18</b>
B.1.1	Geräte.....	18
B.1.2	Chemikalien.....	18
B.1.3	Andere Materialien.....	18
<b>B.2</b>	<b>Bakterien, Plasmide, Primer.....</b>	<b>19</b>
B.2.1	Bakterienstämme .....	19
B.2.2	Plasmide.....	20
B.2.3	Primer .....	21
<b>B.3</b>	<b>Nährmedien, Kultivierung und Stammhaltung.....</b>	<b>22</b>
B.3.1	Nährmedien .....	22
B.3.2	Kultivierung.....	23
B.3.3	Stammhaltung.....	23
<b>B.4</b>	<b>Molekulargenetische Methoden.....</b>	<b>24</b>
B.4.1	Isolierung, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA .....	24
B.4.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA mit alkalischer Lyse (Birboim & Doly, 1979).....	24
B.4.1.2	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mit QIAprep Spin Miniprep Kit.....	25
B.4.1.3	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mit Nucleobond AX 100.....	25

B.4.1.4	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	25
B.4.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki <i>et al.</i> , 1988) .....	25
B.4.3	Enzymatische Modifikationen von DNA .....	26
B.4.3.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	26
B.4.3.2	Dephosphorylierung von DNA .....	26
B.4.3.3	Ligation linearer DNA-Moleküle .....	27
B.4.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	27
B.4.4.1	Analytische Agarose-Gelelektrophorese .....	28
B.4.4.2	Präparative Agarose-Gelelektrophorese .....	28
B.4.5	Sequenzierung von DNA .....	29
B.4.6	Transformation von DNA .....	29
B.4.6.1	Elektrokompetente Zellen .....	29
B.4.6.2	Elektroporation .....	29
<b>B.5</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>30</b>
B.5.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	30
B.5.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) .....	30
B.5.1.2	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	31
B.5.2	Detektion von Proteinen .....	32
B.5.2.1	Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue (abgew. nach Sambrook <i>et al.</i> , 1989) .....	32
B.5.2.2	Silberfärbung (Blum <i>et al.</i> , 1987) .....	32
B.5.2.3	Immunoblot (Western Blot) (Towbin <i>et al.</i> , 1979) .....	33
<b>B.6</b>	<b>Proteinreinigung .....</b>	<b>34</b>
B.6.1	Gewinnung von rekombinantem YscM1 und YscM2 .....	34
B.6.1.1	Klonierung und Expression .....	34
B.6.1.2	Affinitätsreinigung .....	34
B.6.1.3	Gelfiltration .....	35
B.6.2	Gewinnung von rekombinanter Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) .....	35
B.6.2.1	Klonierung und Expression .....	35
B.6.2.2	Affinitätsreinigung .....	35
B.6.2.3	Gelfiltration .....	36
B.6.3	Reinigung und Kristallisation von Sych .....	36
B.6.3.1	Expression .....	36
B.6.3.2	Ammoniumsulfat-Fällung .....	36
B.6.3.3	Ionenaustauschchromatographie .....	37
B.6.3.4	Gelfiltration .....	37
B.6.3.5	Kristallisation .....	37
B.6.4	Gewinnung und Reinigung eines polyklonalen PEPC-Antiserums .....	38
B.6.4.1	Immunisierung .....	38
B.6.4.2	Aufreinigung von polyklonalen PEPC-Antikörpern .....	38
B.6.5	Quantitative Proteinbestimmung (abgewandelt nach Bradford, 1976) .....	38
B.6.6	Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung) .....	39
B.6.7	Konzentration von Proteinen .....	39
<b>B.7</b>	<b>GST-Affinitätsbindungsversuch .....</b>	<b>39</b>
<b>B.8</b>	<b>Massenspektrometrie .....</b>	<b>40</b>
<b>B.9</b>	<b>Co-Immunopräzipitation .....</b>	<b>40</b>
<b>B.10</b>	<b>PEPC-Aktivitätsassay (Smith, 1968) .....</b>	<b>41</b>
<b>B.11</b>	<b>Wachstumsversuche .....</b>	<b>42</b>
B.11.1	Wachstumsversuche in BHI .....	42
B.11.2	Wachstumsversuche in M9-Medium .....	42

B.11.3	Wachstumsversuche in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) .....	43
B.11.3.1	Wachstumsversuche in Zellkulturflaschen (Lee <i>et al.</i> , 2001) .....	44
B.11.3.2	Wachstum in Erlenmeyer-Kolben .....	44
<b>B.12</b>	<b>Infektion von HeLa-Zellen mit <i>Yersinia enterocolitica</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>B.13</b>	<b>Mausversuche .....</b>	<b>46</b>
B.13.1	Mauspassage .....	46
B.13.2	Zellzahlbestimmung .....	46
B.13.3	Infektion .....	46
<b>C.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
<b>C.1</b>	<b>Reinigung von GST-YscM1 und GST-YscM2 .....</b>	<b>47</b>
C.1.1	Klonierung von <i>yscM1</i> und <i>yscM2</i> in den Expressionsvektor pGEX-4T-3 .....	47
C.1.2	Expression und Reinigung von GST-YscM1 und GST-YscM2 .....	48
<b>C.2</b>	<b>Interaktionspartner von YscM1 und YscM2 in <i>Yersinia enterocolitica</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>C.3</b>	<b>Identifizierung des potentiellen Interaktionspartners .....</b>	<b>50</b>
C.3.1	Massenspektrometrie .....	50
C.3.2	Die Phosphoenolpyruvatcarboxylase: ein anaplerotisches Stoffwechsellenzym .....	52
<b>C.4</b>	<b>Proteinreinigungen .....</b>	<b>53</b>
C.4.1	Reinigung von PEPC .....	53
C.4.1.1	Klonierung von <i>ppc</i> in den Expressionsvektor pGEX-4T-3 .....	53
C.4.1.2	Expression von <i>ppc</i> .....	54
C.4.1.3	Reinigung von PEPC .....	54
C.4.2	Reinigung von YscM1 und YscM2 durch Expression in pGEX-6P-3 .....	55
C.4.2.1	Klonierung von <i>yscM1</i> und <i>yscM2</i> in pGEX-6P-3 .....	55
C.4.2.2	Expression und Reinigung von YscM1 und YscM2 aus pGEX-6P-3 .....	56
C.4.3	YscM1 und YscM2 werden von Thrombin geschnitten .....	58
C.4.4	YscM1 und YscM2 bilden Homodimere .....	59
C.4.5	Reinigung von SycH .....	60
C.4.5.1	Reinigung von SycH als GST-Fusionsprotein .....	60
C.4.5.1.1	Klonierung von <i>sycH</i> in pGEX-4T3 .....	60
C.4.5.1.2	Expression und Reinigung von SycH aus pGEX-4T-3 .....	61
C.4.5.2	Expression und Reinigung von SycH ohne Affinitätsmarker .....	61
C.4.5.2.1	Klonierung von <i>sycH</i> in pET-21b .....	61
C.4.5.2.2	Expression und Reinigung von SycH .....	62
C.4.5.3	Oligomerisierung von SycH .....	64
C.4.5.4	Kristallisation von SycH .....	65
C.4.5.5	Gemeinsame Expression von YscM1 und SycH und Reinigung von YscM1/SycH-Komplexen .....	66
<b>C.5</b>	<b>Nativgele bestätigen die Wechselwirkung von YscM1 und YscM2 mit PEPC .....</b>	<b>68</b>
C.5.1	Wechselwirkung von GST-YscM1 und GST-YscM2 mit PEPC .....	68
C.5.2	Wechselwirkung von YscM1 und YscM2 mit PEPC unter dem Einfluss von SycH .....	70
<b>C.6</b>	<b>Ko-Immunopräzipitation .....</b>	<b>71</b>
<b>C.7</b>	<b>YscM1 und YscM2 modulieren die Enzymaktivität von PEPC .....</b>	<b>73</b>

C.7.1	Einfluss von YscM1 und YscM2 auf die Enzymaktivität von PEPC.....	73
C.7.2	Der N-Terminus von YscM1 und YscM2 moduliert die Enzymaktivität von PEPC.....	75
<b>C.8</b>	<b>Modulation der Aktivität von PEPC durch YscM1 und YscM2 <i>in vivo</i> .....</b>	<b>79</b>
C.8.1	Überexpression von YscM1 und YscM2 in <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	80
C.8.2	Überexpression von YscM1 <sub>Δ81-115</sub> und YscM2 <sub>Δ84-116</sub> .....	81
C.8.3	Überexpression von YscM1 <sub>Δ2-10</sub> und YscM2 <sub>Δ2-10</sub> in <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	83
C.8.4	Deletion von <i>yscM1</i> und <i>yscM2</i> in <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	84
<b>C.9</b>	<b>Wachstumsversuche in BHI .....</b>	<b>85</b>
C.9.1	Einfluss von YscM1 und YscM2 auf PEPC in <i>Y. enterocolitica</i> .....	85
C.9.2	Die durch Ca <sup>2+</sup> -Mangel bedingte Wachstumsinhibition bei <i>Y. pseudotuberculosis</i> wird durch YscM2 aufgehoben .....	86
<b>C.10</b>	<b>Einfluss der Modulation von PEPC auf das Typ III-Sekretionssystem .....</b>	<b>88</b>
C.10.1	Einfluss der Modulation von PEPC auf die Yop-Sekretion .....	88
C.10.2	Einfluss der Modulation von PEPC bei der Infektion von HeLa-Zellen .....	88
<b>C.11</b>	<b>Einfluss von PEPC auf die Pathogenität von <i>Y. enterocolitica</i>.....</b>	<b>89</b>
<b>D.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>91</b>
<b>D.1</b>	<b>Proteinreinigung von YscM1 und YscM2.....</b>	<b>92</b>
<b>D.2</b>	<b>Die Wechselwirkung von YscM1 und YscM2 mit PEPC .....</b>	<b>93</b>
D.2.1	Modulation des Stoffwechsels bei <i>Yersinia</i> durch einen Virulenzfaktor .....	96
D.2.2	Modell für den Mechanismus der „low calcium response“.....	99
D.2.3	Die biologische Bedeutung der Modulation der Enzymaktivität von PEPC.....	100
<b>D.3</b>	<b>Das Chaperon Sych .....</b>	<b>101</b>
<b>D.4</b>	<b>PEPC als Zielstruktur für eine Antibiotikatherapie.....</b>	<b>103</b>
<b>E.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>105</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>107</b>
	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>122</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>123</b>
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>124</b>

## ABKÜRZUNGEN

---

### ABKÜRZUNGEN

μ	Mikro
Ω	Ohm
A	Adenin, Ampere
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-6-chlor-3-indolylphosphat
BHI	Brain-Heart-Infusion
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Cb	Carbenicillin
cfu	Kolonie-bildende Einheit („colony forming unit“)
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F	Farad
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm, Fallbeschleunigung
G	Guanin
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	destilliertes Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin

l	Liter
LB	Luria Bertani
Lcr	„low calcium response“
m	Milli, Meter
M	Molar
MDH	Malatdehydrogenase
min	Minute
mRNA	Boten-RNA („ <u>m</u> essenger RNA“)
n	Nano
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
Nal	Nalidixinsäure
NBT	Nitroblautetrazolium
OD	Optische Dichte
p	Pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvatcarboxylase
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
pH	negative dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Wasserstoff-Ionen in einer wässrigen Lösung
pI	isoelektrischer Punkt
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTPase	Protein-Tyrosinphosphatase
psi	6,895 kPa
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat / Natriumlaurylsulfat?
Syc	„ <u>s</u> pecific <u>Y</u> op <u>c</u> haperon“
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	2- Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TTSS	Typ III-Sekretionssystem („ <u>t</u> ype <u>t</u> hree <u>s</u> ecretion <u>s</u> ystem“)
ÜN	über Nacht
U	Enzymeinheit („ <u>u</u> nit“)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Yop	„ <u>Y</u> ersinia <u>o</u> uter <u>p</u> rotein“
Ysc	„ <u>Y</u> op <u>s</u> ecretion“



## A. EINLEITUNG

Nach dem 11. September 2001 und der seitdem ständig wachsenden Bedrohung durch den internationalen Terrorismus ist auch der Pesterreger, *Yersinia pestis*, als potentieller biologischer Kampfstoff in den Fokus der Diskussionen gerückt. *Y. pestis* war in der neueren Geschichte der Menschheit verantwortlich für drei Pandemien, für die Justinianische Pest im 6. Jahrhundert, den Schwarzen Tod im 14. Jahrhundert und die dritte Pandemie mit Beginn im Jahr 1894. Der Schwarze Tod allein soll bis zu einem Drittel der europäischen Bevölkerung das Leben gekostet haben und hat damit die Entwicklung der modernen Zivilisation entscheidend mit beeinflusst (Gottfried, 1983; Ziegler, 1991). Auch heute ist der Pesterreger in verschiedenen Nagetierreservoirs in Amerika, Asien und Afrika verbreitet (Perry & Fetherston, 1997). Laut WHO wurden 1999 in 14 Ländern 2 603 Pestfälle mit 212 Todesfällen registriert. Im letzten Jahrzehnt wurden 76,2 % der Infektionen und 81,8 % der Todesfälle aus Afrika gemeldet. Besonders betroffen sind Uganda, Madagaskar, Mosambik, Namibia und Tansania. Außerdem wurde über Pestfälle aus den USA, China, Kasachstan, der Mongolei, Vietnam und lateinamerikanischen Staaten wie Ecuador, Brasilien und Peru berichtet (WHO, 2002). Die Identifizierung multiresistenter *Y. pestis*-Stämme (Galimand *et al.*, 1997) macht die Bedeutung der Bedrohung durch die Pest vor dem Hintergrund des Bioterrorismus deutlich und unterstreicht die Wichtigkeit der Erforschung molekularer Wirkmechanismen und der Entwicklung von Impfstoffen.

### A.1 DIE GATTUNG *YERSINIA*

Die Gattung *Yersinia* erhielt ihren Namen 1964 zu Ehren des Schweizerers Alexandre Yersin, des Entdeckers des Pesterregers. Zur Gattung *Yersinia* gehören insgesamt elf Arten, von denen drei in der Humanmedizin von Bedeutung sind. Dies sind neben dem Erreger der Pest, *Y. pestis*, die Arten *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*. Sowohl *Y. pseudotuberculosis* als auch *Y. enterocolitica* unterscheiden sich im Krankheitsbild deutlich von *Y. pestis* und sind beide enteropathogen (Knapp, 1988). Allen humanpathogenen *Yersinia*-Spezies ist ein Typ III-Sekretionssystem gemein, das von einem 70 kb großen Virulenzplasmid kodiert wird. Yersinien sind gramnegative psychrotolerante Stäbchen, die der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet werden (Frederiksen, 1964). Das Wachstumsoptimum der Yersinien liegt bei 27 °C, aufgrund ihrer Psychrotoleranz können sie sich jedoch auch bei 4 °C vermehren. Während *Y. pestis* grundsätzlich unbeweglich ist, sind *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* bei 27 °C beweglich, nicht jedoch bei 37 °C.

### A.1.1 Der Erreger der Pest – *Yersinia pestis*

Die Pest ist eine typische Zoonose, die hauptsächlich Nagetiere in ihren natürlichen Reservoirs befällt. Der Mensch spielt wahrscheinlich keine Rolle im Langzeit-Überlebenszyklus dieses Bakteriums (Perry & Fetherston, 1997). *Yersinia pestis* wird jedoch von Ratten und anderen Nagetieren über einen Flohbiss auf den Menschen übertragen. Das Bakterium sichert die Übertragung durch den Floh durch die Aggregation der Blutmahlzeit im Vormagen des Flohs. Bei einem erneuten Biss injiziert der Floh den Blutklumpen zusammen mit den Bakterien in die Bisswunde des Wirts (Bacot & Martin, 1914; Cavanaugh, 1971). Von der Bisswunde aus dringen die Bakterien in das Gewebe ein und vermehren sich in den Lymphknoten. Diese schwellen an, was die typische Symptomatik der Beulenpest ausmacht. Im Folgenden entwickelt der Patient eine Septikämie, die zu einer Infektion der inneren Organe wie Leber und Milz führt (Jawetz & Meyer, 1944; Wayson *et al.*, 1946). Ist auch die Lunge infiziert, entwickelt sich eine Lungenpest, so dass eine direkte Übertragung der Pest durch Aerosole von Mensch zu Mensch möglich wird. Die Lungenpest ist höchst infektiös und endet meist tödlich (Wren, 2003).

### A.1.2 Die enteropathogenen Yersinien – *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*

*Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* sind in der Natur in aquatischen und tierischen Reservoirs weit verbreitet, wobei das Schwein als Hauptreservoir für humanpathogene *Y. enterocolitica*-Stämme gilt (Bottone, 1997; Tauxe *et al.*, 1987). Hier sind besonders die Rachenmandeln des Schweins infiziert (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2001). *Y. pseudotuberculosis* ist primär ein tierpathogener Keim und wird selten beim Menschen nachgewiesen, während *Y. enterocolitica* ein häufiger Krankheitserreger des Menschen ist. Eine Übertragung erfolgt meist oral über kontaminierte Lebensmittel (Wasser, Schweinefleisch, Milch) (Black *et al.*, 1978). In seltenen Fällen ist eine Infektion über Bluttransfusionen mit *Y. enterocolitica* beschrieben, die vorwiegend letal verläuft (Tipple *et al.*, 1990). Bei einer enteralen Yersiniose treten nach einer Inkubationszeit von 3 – 7 Tagen typische Symptome wie eine akute Gastroenteritis (Bauchschmerzen, Fieber, Durchfall und Erbrechen), eine mesenteriale Lymphadenitis (Pseudoappendizitis) oder eine Enterokolitis auf (Cover & Aber, 1989; Bottone, 1997). Wässrige, selten blutige Stühle sind typisch für *Y. enterocolitica*-Infektionen und werden nur ausnahmsweise bei *Y. pseudotuberculosis* beobachtet (Bockemühl & Roggentin, 2004). Die Yersiniose kann sich auch in einer Septikämie mit Abszessbildung in Leber und Milz manifestieren. Hiervon besonders betroffen sind Patienten mit Immundefizienz, mit Eisenüberladung nach Desferrioxamin-

Behandlung oder hämolytischen Anämien. Die septische Verlaufsform einer Yersiniose endet meist tödlich (Rabson *et al.*, 1975). Als Folgeerscheinungen einer intestinalen Yersiniose sind eine reaktive Arthritis und das Erythema nodosum assoziiert mit dem Histokompatibilitätsantigen HLA-B27 beschrieben (Dequeker *et al.*, 1980; Winblad, 1969). In den letzten Jahren wurden im Durchschnitt 7 000 Fälle von Infektionen mit *Y. enterocolitica* pro Jahr in Deutschland registriert. Yersiniosen treten hauptsächlich bei Kleinkindern zwischen 1 und 2 Jahren auf. Die Häufigkeit der Erkrankung geht mit zunehmendem Alter zurück und bleibt im Erwachsenenalter auf niedrigem Niveau (Robert-Koch-Institut, 2004).

Die Gefahr einer Yersiniose wird besonders durch eine bakteriologische Untersuchung von insgesamt 8 Metzgereien in der Gegend von München deutlich (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2004). In verschiedenen Betrieben wurden Oberflächenproben von Tierkadavern, Innereien und rohen Schweinefleischprodukten genommen, die auf *Y. enterocolitica* getestet wurden. In allen Metzgereien konnten Yersinien nachgewiesen werden, wobei in 6 von 8 Metzgereien humanpathogene *Y. enterocolitica*-Stämme identifiziert wurden. Die Ergebnisse lassen auf eine hohe Keimzahl in den Metzgereien schließen, die auf deren oft überfüllten Kühlräume zurückzuführen sind. Die Tatsache, dass Yersinien psychrotolerant sind und sich auch bei 4 °C vermehren, verstärkt dieses Problem.

Auch in privaten Haushalten stellen psychrotolerante Bakterien in gekühlten Lebensmitteln ein Problem dar. Es gibt Studien, die das Auftreten von Morbus Crohn mit der durch die Einführung des Kühlschranks verbundenen unbemerkten Vermehrung von psychrotoleranten Bakterien (z. B. *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *C. botulinum*, *B. cereus*) in gekühlten Lebensmitteln korrelieren (Hugot *et al.*, 2003). Morbus Crohn ist als Zivilisationskrankheit mit guten hygienischen Bedingungen assoziiert (Gent *et al.*, 1994; McCormick *et al.*, 2001). Dass eine Mutation in einem Gen, das an der angeborenen Immunantwort beteiligt ist, Patienten für Morbus Crohn prädisponiert (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001), deutet tatsächlich auf eine bakterielle Infektion als Auslöser dieser Krankheit hin. Dazu kommt, dass sich das Auftreten von Morbus Crohn im 20. Jahrhundert zeitlich und räumlich mit der Einführung von Kühlschränken in privaten Haushalten korrelieren lässt (Hugot *et al.*, 2003).

### A.1.3 Die Differenzierung der *Yersinia*-Arten nach Biovarietäten und Serotypen

*Y. pestis* wird in drei so genannte Biovare unterteilt: Antiqua, Mediaevalis und Orientalis. Sie werden durch die Fähigkeit unterschieden, Glycerolvergärung, Nitratreduktion und Ammoniakoxidation durchführen zu können, wobei diese Eigenschaften auf die Virulenz keinen Einfluss

haben (Brubaker, 1972). Die Biovare werden jeweils mit einer der drei Pandemien assoziiert. Biovar Antiqua kommt hauptsächlich in Afrika vor und gilt als Auslöser der Justinianischen Pest, Mediaevalis ist in Zentralasien zu finden und gilt als Erreger des Schwarzen Todes im 14. Jahrhundert, die moderne Pest wird dem Biovar Orientalis zugeschrieben, der weit verbreitet ist (Devignat, 1951). Erst kürzlich wurde ein vierter Biovar, der Biovar Microtus, eingeführt, der sich aufgrund von biochemischen und molekularen Merkmalen sowie der fehlenden Pathogenität für den Menschen klar von den drei humanpathogenen Biovaren abgrenzen lässt. (Zhou *et al.*, 2004). Da *Y. pestis* kein O-Antigen-haltiges LPS produziert, gibt es auch keine Serotypisierung.

*Y. enterocolitica* wird aufgrund von biochemischen Eigenschaften in sechs Biogruppen unterteilt (Wauters *et al.*, 1987). Diese werden in pathogene (Biogruppen 1B-5) und nicht-pathogene Biogruppen (Biogruppe 1A) unterschieden. Daneben werden bei *Y. enterocolitica* verschiedene Serotypen unterschieden. In den USA treten hauptsächlich die Serotypen O:4, O:8, O:13, O:18, O:20 und O:21 („amerikanische“ Serotypen) auf, die zur Biogruppe 1B gehören. Die pathogenen „europäischen“ Serotypen O:3, O:5,27 und O:9 werden den Biogruppen 2-5 zugeordnet.

*Y. pseudotuberculosis* wird serologisch in 21 Untergruppen eingeteilt, die wie bei *Y. enterocolitica* auf der Kettenlänge der O-Antigene der Lipopolysaccharide basieren.

#### **A.1.4 Die Evolution der pathogenen Yersinien**

Obwohl *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* völlig verschiedene Krankheitsbilder verursachen, sind beide Erreger eng miteinander verwandt (Bercovier *et al.*, 1980; Trebesius *et al.*, 1998; Achtman *et al.*, 1999). Die Genome der beiden Spezies sind nahezu identisch. *Y. pestis* stammt von *Y. pseudotuberculosis* Serotyp O:1b ab (Skurnik *et al.*, 2000) und ist wahrscheinlich erst während der letzten 1 500 – 20 000 Jahre aus *Y. pseudotuberculosis* hervorgegangen (Achtman *et al.*, 1999; Radnedge *et al.*, 2002). *Y. pestis* besitzt lediglich 32 chromosomale Gene und 2 zusätzliche Plasmide, über die *Y. pseudotuberculosis* nicht verfügt. Dagegen wurden in *Y. pestis* 149 Pseudogene gefunden, die in *Y. pseudotuberculosis* noch aktiv sind. 317 Gene von *Y. pseudotuberculosis* sind in *Y. pestis* nicht mehr vorhanden (Chain *et al.*, 2004). Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen *Y. enterocolitica* einerseits und *Y. pestis* sowie *Y. pseudotuberculosis* andererseits sind dagegen eher mit denen zwischen *E. coli* und *Salmonella*-Spezies vergleichbar (Sharp, 1991; Achtman *et al.*, 1999). Die Entwicklung zwischen *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* ging vor 41 – 186 Millionen Jahren auseinander (Achtman *et al.*, 1999).

### A.1.5 Pathogenese enteraler Yersiniosen

Eine enterale Infektion mit Yersinien lässt sich in verschiedene Stadien einteilen. Nach oraler Aufnahme der Yersinien mit kontaminierten Lebensmitteln (Bottone, 1997) erfolgt im ersten Schritt eine Kolonisierung des Darms, gefolgt vom Eintritt der Bakterien über die M-Zellen in die Peyer'schen Plaques (Hanski *et al.*, 1989). Von dort aus erfolgt die Disseminierung in die mesenterialen Lymphknoten und über das Lymphsystem in Organe wie Leber und Milz. Die Yersinien nutzen dabei eine Vielzahl an Virulenzfaktoren.

#### A.1.5.1 Das Enterotoxin Yst

Der für eine Infektion mit *Y. enterocolitica* typische wässrige Durchfall wird durch das hitzestabile Enterotoxin Yst ausgelöst, das zu einer Aktivierung der Guanylat-Cyclase im Darm führt. *Y. pseudotuberculosis* verfügt nicht über dieses Enterotoxin, weshalb bei Infektionen mit diesem Keim kein wässriger Durchfall beobachtet wird (Delor *et al.*, 1990; Delor & Cornelis, 1992).

#### A.1.5.2 Adhäsine und Invasine

Bei der Kolonisierung des Darms und der Invasion in die Peyer'schen Plaques spielen besonders Adhäsine bzw. Invasine eine große Rolle. Bisher sind drei Virulenzfaktoren bekannt, die für die Adhäsion an die Wirtszellen verantwortlich sind: Inv (Invasin), Ail (Attachment invasion locus) und YadA (Yersinia Adhäsin). Das äußere Membranprotein Inv interagiert spezifisch mit  $\beta$ 1-Integrinen (Isberg & Leong, 1990; Miller & Falkow, 1988) auf der Oberfläche von M-Zellen (spezialisierte Zellen des follikelassozierten Epithels der Peyer'schen Plaques) und vermittelt so die Transzytose der Yersinien in die darunter liegenden Peyer'schen Plaques (Marra & Isberg, 1997; Pepe & Miller, 1993; Schulte *et al.*, 2000). Die höchste Expressionsrate von Inv wird *in vitro* bei einer Temperatur von 23 – 27 °C erreicht (Isberg *et al.*, 1988) oder Inv wird bei hoher Osmolarität im Darm bei 37 °C exprimiert (Pepe *et al.*, 1994). In *Y. pestis* ist das *inv*-Gen durch eine Insertionssequenz inaktiviert (Simonet *et al.*, 1996). Das wie Inv chromosomal kodierte Membran-assoziierte Protein Ail ist ebenfalls an der Adhäsion an die M-Zellen und der anschließenden Invasion beteiligt (Miller & Falkow, 1988; Miller *et al.*, 1989). Ail wird maximal bei 37 °C exprimiert (Pierson & Falkow, 1993). Sowohl Inv als auch Ail sind nicht essentiell für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* (Pepe *et al.*, 1995). Wahrscheinlich spielt Inv bei der Initiierung der Infektion eine Rolle, während Ail später an der extrazellulären Disseminierung

beteiligt ist (Isberg, 1990). Das dritte Adhäsion, YadA, wird von dem 70 kb großen Virulenzplasmid pYV (*Yersinia* *virulence*) kodiert (Balligand *et al.*, 1985; Bolin & Wolf-Watz, 1984). Das äußere Membranprotein YadA verfügt über eine Vielzahl von Zielstrukturen. Es bindet an Zelloberflächen und an extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen, Laminin und Fibronectin (Flügel *et al.*, 1994; Heesemann & Grüter, 1987; Schulze-Koops *et al.*, 1992; Schulze-Koops *et al.*, 1993, Skurnik *et al.*, 1994). Außerdem wurde eine indirekte Bindung an  $\beta$ 1-Integrine beschrieben (Eitel & Dersch, 2002). Die Wechselwirkung mit  $\beta$ 1-Integrinen ist für die Internalisierung von *Y. enterocolitica* von großer Bedeutung. Im Gegensatz zu Inv und Ail ist YadA essentiell für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* (Pepe *et al.*, 1995; Roggenkamp *et al.*, 1995). So zeigen *Y. enterocolitica* *yadA*-Mutanten einen attenuierten Phänotyp im Mausinfektionsversuch (Roggenkamp *et al.*, 1996).

YadA und Ail vermitteln beide außerdem die Serumresistenz von *Y. enterocolitica*, die darin besteht, dass die Bakterien nicht von dem Membranangriffskomplex (MAC) bei Komplementaktivierung lysiert werden (Bliska & Falkow, 1992; Pilz *et al.*, 1992).

### **A.1.5.3 Eisenaufnahme**

Einen weiteren wichtigen Virulenzfaktor stellt das Eisenaufnahmesystem der Yersinien dar. Eisen ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für Bakterien, da es für zahlreiche Redoxprozesse in der Zelle benötigt wird. Deshalb ist eine effektive Eisenaufnahme für die Pathogenität von großer Bedeutung (Bullen, 1981). Im menschlichen Organismus ist die Konzentration an freiem Eisen sehr gering. Eisen ist hauptsächlich extrazellulär an die Transportproteine Transferrin (Serum) und Laktoferrin (Schleimhäute) oder intrazellulär an das Speicherprotein Ferritin gebunden (Ratledge & Dover, 2000). In infiziertem Gewebe sezernieren eingewanderte Leukozyten zusätzlich Laktoferrin und halten die Eisenkonzentration so gering (Leffell & Spitznagel, 1975; Mietzner & Morse, 1994). Unter Eisenmangelbedingungen produzieren und sezernieren pathogene *Yersinia*-Spezies hochaffine Eisenchelatoren, so genannte Siderophore. Diese binden Eisen und transportieren es über Oberflächenrezeptoren in das Zellinnere des Bakteriums (Carniel *et al.*, 1987; Heesemann, 1987; Heesemann *et al.*, 1993). Yersinien können auch von anderen bakteriellen Organismen produzierte Siderophore aufnehmen (Bäumler *et al.*, 1993).

#### A.1.5.4 Das Typ III-Sekretionssystem

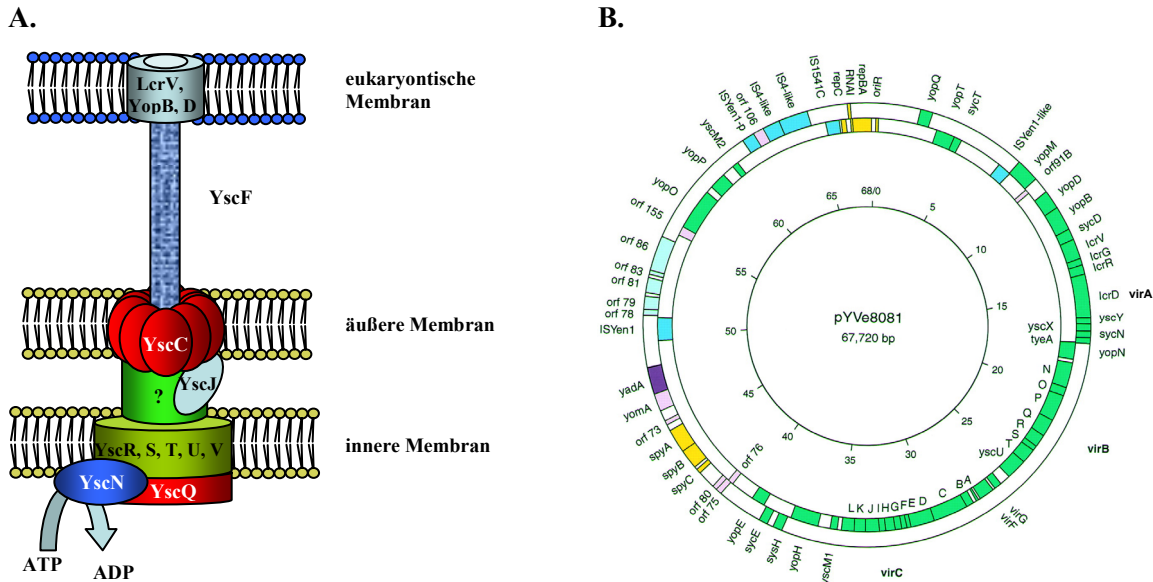
Ein essentieller Virulenzfaktor der Yersinien ist das plasmidkodierte Typ III-Sekretionssystem (type three secretion system: TTSS) (Cornelis *et al.*, 1989; Straley *et al.*, 1993). Pathogene *Yersinia*-Spezies synthetisieren verschiedene Effektorproteine, so genannte Yops (*Yersinia* outer proteins), die sie bei Kontakt mit der Wirtszelle in die eukaryontische Zelle translozieren (Rosqvist *et al.*, 1994). Sie entgehen so der angeborenen Immunantwort des Wirts und verhindern die Phagozytose durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) und durch Makrophagen (Rosqvist *et al.*, 1988; Rosqvist *et al.*, 1990; Forsberg *et al.*, 1994; China *et al.*, 1994; Fallmann *et al.*, 1995; Ruckdeschel *et al.*, 1996; Cornelis, 1998; Hueck, 1998).

## A.2 DAS TYP III-SEKRETIONSSYSTEM BEI *YERSINIA*

Das Typ III-Sekretionssystem ist ein äußerst komplexes Proteintransportsystem, das von vielen gramnegativen Bakterien genutzt wird, um Effektorproteine ins Zytosol der Wirtszelle zu transportieren und so der angeborenen Immunantwort des Wirts zu entgehen. Zu den human- bzw. tierpathogenen Keimen, die ein TTSS nutzen, gehören neben den Yersinien die Gattungen *Salmonella*, *Shigella* und *Bordetella* außerdem enteropathogene und enterohämorrhagische *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Chlamydia psittaci*. Typ III-Sekretionssysteme sind auch in pflanzenpathogenen Bakterien wie *Xanthomonas campestris*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* und *Ralstonia solanacearum* zu finden. Viele Komponenten des Typ III-Sekretionsapparats sind in den verschiedenen Gattungen konserviert, während große Unterschiede zwischen den Effektorproteinen bestehen, da diese auf die verschiedenen Wirte abgestimmt sind (Hueck, 1998; Tampakaki *et al.*, 2004). TTSS-Proteine weisen eine große Ähnlichkeit mit Proteinen des Flagellenapparates auf (Aizawa, 2001). Bei bakteriellen Flagellen handelt es sich um komplex aufgebaute Gebilde, die für die Motilität der Bakterien verantwortlich sind. Da viele Komponenten des TTSS zu denen des Exportsystems, das für die Ausbildung der Flagellen zuständig ist, paralog sind, wurde oft postuliert, dass die TTSS-Gene aus Genen der Flagellen hervorgegangen sind (Macnab, 1999; Nguyen *et al.*, 2000). Dies wurde von Gophna *et al.* (2003) widerlegt, die von einer parallelen Entwicklung von TTSS und Flagellen aus einem gemeinsamen Vorgänger ausgehen.

Das TTSS der Yersinien ist auf dem 70 kb großen Virulenzplasmid (Abb. A.2.1.B) kodiert und besteht aus ungefähr 45 Genen. Der Transportapparat ist aus ca. 25 Proteinen einschließlich der Regulatorproteine aufgebaut. Des Weiteren existieren 6 Chaperone und ungefähr 15 Proteine,

die von dem Sekretionsapparat transportiert werden, davon sind 6 als Effektorproteine charakterisiert. In Abbildung A.2.1.A ist der Aufbau des Typ III-Sekretionssystems schematisch dargestellt.



**Abb. A.2.1** A. Schematische Darstellung des Typ III-Sekretionsapparats (abgewandelt nach Tampakaki *et al.*, 2004). Der basale Teil des Sekretionsapparats ist im Bereich der inneren Bakterienmembran aus den Proteinen YscR, S, T, U, V aufgebaut, in der äußeren Bakterienmembran bildet YscC eine Pore. Durch Polymerisierung von YscF entsteht die 600 – 800 Å lange Nadel, durch die die Proteine von der Bakterienzelle in die eukaryontische Wirtszelle transportiert werden. YopB, D und LcrV bilden eine Pore in der eukaryontischen Membran. B. Plasmidkarte des pYV-Plasmids aus *Y. enterocolitica* 8081 (Snellings *et al.*, 2001). Die Transkription der Gene im inneren Kreis erfolgt im Uhrzeigersinn, die der Gene im äußeren Ring gegen den Uhrzeigersinn. In grün sind die Gene des yop-Regulons dargestellt, yadA in lila und Gene, die an der Replikation beteiligt sind, in gelb.

### A.2.1 Der Typ III-Sekretionsapparat

Der Typ III-Sekretionsapparat wird oft als „molekulare Spritze“ bezeichnet und ist äußerst komplex aufgebaut. Der Sekretionsapparat wird in *Y. enterocolitica* von den vier aneinander grenzenden Operons *virA*, *virB*, *virG* und *virC* auf dem Virulenzplasmid pYV kodiert (Abb. A.2.1.B). Eine Kultivierung der Yersinien bei 37 °C führt zur Expression der TTSS-Gene und an der Oberfläche der Bakterien bilden sich ca. 400 – 800 Mikroinjektionsnadeln aus (Michiels *et al.*, 1991; Hoiczky & Blobel, 2001). Der Sekretionsapparat (Abb. A.2.1.A) besteht aus einem basalen Teil, der die Peptidoglykanwand sowie die äußere und innere Membran durchdringt, und einer Nadel-ähnlichen Struktur, die an der Bakterienoberfläche hervortritt (Hoiczky & Blobel, 2001). Der basale Teil des Sekretionsapparats ähnelt einem Zylinder und bildet einen Kanal durch die innere und äußere Bakterienmembran aus. Der Bereich des Zylinders, der die innere



Bakterienmembran durchdringt, wird wahrscheinlich von den Proteinen YscD (Plano & Straley, 1995), YscR (Fields *et al.*, 1994), YscS, YscT, YscU (Allaoui *et al.*, 1994) und YscV (Plano & Straley, 1993) gebildet (Ysc: Yop secretion). Als möglicher Energielieferant für die Yop-Sekretion fungiert YscN, eine ATPase (Woestyn *et al.*, 1994). Der obere Bereich des basalen Teils, der die äußere Bakterienmembran durchdringt, wird durch Oligomerisierung des Proteins YscC gebildet, das zur Familie der Sekretine gehört (Koster *et al.*, 1997; Plano & Straley, 1995). YscC liegt als sehr stabiler Komplex von ungefähr 1 MDa vor, der aus 13 Untereinheiten besteht und eine Ringstruktur ausbildet, deren äußerer Durchmesser ungefähr 200 Å beträgt und eine Pore mit einem Innendurchmesser von 50 Å besitzt (Koster *et al.*, 1997; Burghout *et al.*, 2004b). Die Oligomerisierung von YscC wird durch das äußere Membranlipoprotein YscW unterstützt, das für die Lokalisation von YscC in der äußeren Membran und dessen Stabilität verantwortlich ist (Burghout *et al.*, 2004a). Die Nadel, die den Abschluss des Ysc-Sekretionsapparats bildet und durch Polymerisierung aus dem 6 kDa großen Monomer YscF entsteht, ist ungefähr 600 – 800 Å lang und 60 – 70 Å breit. Der innere Durchmesser der Nadel beträgt ca. 20 Å (Hoiczky & Blobel, 2001). Die Länge der Nadel wird durch die Größe des Proteins YscP bestimmt, das als molekulares Maßband fungiert (Journet *et al.*, 2003). Mutanten, die kein YscF synthetisieren können, sezernieren keine Yops (Allaoui *et al.*, 1995). Möglicherweise hält die Nadel die YscC-Pore offen. Der Sekretionsapparat allein ist zwar für den Transport der Yops in den Kulturüberstand (Sekretion) ausreichend, nicht aber für die Translokation der Yops in die eukaryontische Zelle.

### A.2.2 Yop-Sekretion und -Translokation

Yop-Sekretion erfolgt bei 37 °C in einem Ca<sup>2+</sup>-freien Nährmedium, das als Minimalvoraussetzung eine Kohlenstoffquelle, Albumin und die Aminosäure Glutamat enthält (Lee *et al.*, 2001). Man geht davon aus, dass der Yop-Sekretionsapparat bei Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> durch YopN, LcrG und TyeA geschlossen gehalten wird (Forsberg *et al.*, 1991; Sarker *et al.*, 1998; Skrzypek & Straley, 1993; Iriarte *et al.*, 1998). Durch Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung wird YopN freigesetzt, dadurch wird der Sekretionskanal geöffnet und die Sekretion der Effektorproteine ermöglicht.

Bei 37 °C und Kontakt mit eukaryontischen Zellen translozieren Yersinien Yops (*Yersinia* outer proteins) in die Wirtszellen. Der Kontakt mit den Wirtszellen ist essentiell für die Translokation (Rosqvist *et al.*, 1994; Petterson *et al.*, 1996). Außerdem sind YopB, YopD und LcrV notwendig für die Translokation der Yops in die Wirtszelle (Håkansson *et al.*, 1996; Petterson *et al.*, 1999; Fields *et al.*, 1999; Tardy *et al.*, 1999; Holmström *et al.*, 2001). Bei Überexpression in

*E. coli* bilden YopB, YopD und LcrV einen Komplex aus (Sarker *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass diese Proteine eine Pore bilden, durch die die Effektoren in die eukaryontische Zelle wandern. YopB und YopD verfügen beide über hydrophobe Domänen, die wahrscheinlich mit der Zellmembran der Wirtszelle interagieren (Håkansson *et al.*, 1993). Vermutlich ist LcrV dabei die Komponente, die für Größe der Poren verantwortlich ist (Holmström *et al.*, 2001). Die Stöchiometrie und die Anordnung der Proteine sind allerdings unbekannt. YopB, YopD und LcrV werden sowohl in eukaryontische Zellen transloziert als auch in das extrazelluläre Medium sezerniert (Lee & Schneewind, 1999; Lee *et al.*, 2000).

Über seine Beteiligung an der Porenbildung hinaus besitzt LcrV eine immunsuppressive Wirkung. Es unterdrückt den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), was durch Induktion der Interleukin(IL)-10-Produktion ausgelöst wird (Nakajima *et al.*, 1995; Sing *et al.*, 2002a/b).

### A.2.3 Chaperone

Für die verschiedenen Proteintransportsysteme (Typ II, Typ III, GSP) sind spezifische Chaperone bekannt. Dazu gehört das Chaperon SecB, das am Proteintransport (GSP) über die Sec-Translokase beteiligt ist (Driessen, 2001), Mitglieder der PapD-Familie, die an dem Pilusaufbau (Typ II) mitwirken (Hung & Hultgren, 1998) und die Chaperone verschiedener Typ III-Sekretionssysteme (Page & Parsot, 2002).

Im Allgemeinen sind Chaperone der TTSS saure Proteine mit geringer Molekularmasse (~ 15 kDa). Üblicherweise binden sie am N-Terminus des zugehörigen Effektorproteins. Eine Ausnahme hiervon bilden die Chaperone der Proteine des Flagellenapparats, die am C-Terminus binden (Evdokimov *et al.*, 2003) und das Chaperon SycD, das an mehreren Positionen der Translokator-Proteine YopD und YopB bindet (Neyt & Cornelis, 1999). Chaperone besitzen untereinander geringe Homologien was die Aminosäuresequenz betrifft und die Chaperon-Bindungsstellen der Substrate zeigen überhaupt keine Homologie. Bisher sind die Strukturen von 6 Chaperonen bekannt: SycE von *Y. pseudotuberculosis* (Birtalan & Ghosh, 2001; Evdokimov *et al.*, 2002), CesT von *E. coli* (Luo *et al.*, 2001), SicP (Stebbins & Galan, 2001) und SicE (Luo *et al.*, 2001) von *Salmonella enterica*, Spa15 von *Shigella flexneri* (Van Eerde *et al.*, 2004) und SycH von *Y. pestis* (Phan *et al.*, 2004). Obwohl die Aminosäuresequenzen nicht konserviert sind, liegen die Proteine alle in einer ähnlichen Sekundärstruktur vor. Alle sind Homodimere, wobei die Monomere aus 3  $\alpha$ -Helices und 5 antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblattstrukturen bestehen. Dies gilt mit Ausnahme der Flagellen-Chaperone, die nicht als Dimere vorliegen und über eine andere Faltung verfügen (Evdokimov *et al.*, 2003). Die Chaperone des Typ III-Sek-

retionssystemen werden in drei Klassen eingeteilt. Chaperone der Klasse I sind mit einem (Klasse IA) oder mehreren (Klasse IB) Effektorproteinen assoziiert, Klasse II-Chaperone binden an die so genannten Translokator-Yops YopB und YopD, während die Klasse III von den Chaperonen des Flagellensystems gebildet wird (Parsot *et al.*, 2003).

Für einige Effektorproteine des TTSS von *Yersinia* konnte bisher kein Chaperon nachgewiesen werden. Die Proteine YopE, YopH, LcrQ/YscM1, YscM2, YopT, YopN, YopD und YopB verfügen über ein spezifisches Chaperon (Syc: Specific yop chaperone), welches verschiedenste Funktionen erfüllt.

In einigen Fällen stabilisieren Chaperone die Effektorproteine. Wird beispielsweise YopE ohne sein Chaperon SycE exprimiert, sind die Proteinmengen an YopE im Zytosol deutlich verringert, was auf den Abbau von YopE zurückzuführen ist und nur Spuren von YopE werden sezerniert (Frithz-Lindsten *et al.*, 1995; Cheng & Schneewind, 1999, Woestyn *et al.*, 1996).

Chaperone fungieren zudem als Anti-Aggregationsfaktoren. So wird möglicherweise die Anlagerung von LcrV an den YopB/D-Komplex durch Bindung des Chaperons SycD verhindert (Holmström *et al.*, 2001).

Chaperone haben auch einen Einfluss auf die Sekretion der TTSS-Proteine. Ohne ihr Chaperon wird die Sekretion der meisten Effektoren stark reduziert, aber nicht völlig unterbunden (Wattiau *et al.*, 1994). Möglicherweise ist das Chaperon als ein „Lotse“ wichtig, der den Effektor zum Yop-Sekretionsapparat steuert (Wattiau & Cornelis, 1993; Feldman & Cornelis, 2003). Birtalan *et al.* (2002) postulieren ein dreidimensionales Sekretionssignal, das gleichzeitig eine bestimmte Reihenfolge in der Sekretion festlegt. Die Tatsache, dass alle antiphagozytotisch wirkenden Yops, die schnell in die Wirtszelle transportiert werden müssen, mit einem Chaperon assoziiert sind, unterstützt diese These.

Zudem scheinen Chaperone an der Regulation der Transkription beteiligt zu sein. Ein Beispiel hierfür ist das Chaperon LcrH (SycD in *Y. enterocolitica*). Eine *lcrH*-Deletionsmutante exprimiert konstitutiv Yops. Das bedeutet, dass LcrH an einem negativen Feedback-Mechanismus zur Regulation der Yop-Synthese beteiligt ist (Francis *et al.*, 2001). SycH scheint ebenfalls an der Regulation des TTSS mitzuwirken. Eine *sycH*-Mutante synthetisiert und sezerniert deutlich weniger Yops als der Kontrollstamm, während eine Überexpression von *sycH* in *Y. enterocolitica* einen allgemeinen Anstieg der produzierten und sezernierten Yop-Menge bewirkt (Cambronne *et al.*, 2000).

#### A.2.4 Erkennungssignale für den Proteintransport

Um vom Typ III-Sekretionsapparat transportiert zu werden, muss das Substrat des TTSS spezifisch von dem Transportsystem erkannt werden. Der Mechanismus für die Erkennung der Typ III-Substrate durch das TTSS konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Im Vergleich zu anderen Protein-Transportsystemen ist innerhalb der Aminosäuresequenz der TTSS-Substrate bisher keine Konsensus-Sequenz oder ein strukturelles Motiv bekannt, das als Erkennungssequenz dienen könnte. Bei Proteinen, die über Sec-abhängige Sekretionssysteme (Typ II, GSP) transportiert werden, befindet sich beispielsweise am N-Terminus dieser Proteine eine hydrophobe Signalsequenz mit einigen basischen Aminosäuren, die vor dem Transport von einer Signalpeptidase, die in der Membran verankert ist, abgespalten wird. Für den Typ III-Transport ist die Existenz eines solchen Signals bisher nicht geklärt. Es gibt widersprüchliche Ergebnisse dazu, ob das Transportsignal auf Aminosäure- oder mRNA-Ebene lokalisiert ist. Eine Verschiebung des Leserasters (-1 und +2) eines YopE<sub>1-15</sub>-Fusionsproteins, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz führt, verhindert die Sekretion von YopE nicht. Dies deutet auf ein mRNA-Signal zur Erkennung des Sekretionsapparates hin. Ähnliche Ergebnisse existieren auch für YopQ, YopN und AvrPto, ein Protein, das von dem pflanzenpathogenen Stamm *P. syringae* sezerniert wird (Anderson & Schneewind, 1997,1999; Anderson *et al.*, 1999, Ramamurthi & Schneewind, 2002a; Goss *et al.*, 2004). Andere Ergebnisse deuten allerdings auf ein Signal auf Aminosäureebene hin. Es konnte gezeigt werden, dass eine Verschiebung des Leserasters (-1) bei einer YopE<sub>1-12</sub>-Fusion die Sekretion verhindern kann. Außerdem verhindert ein Austausch von Nukleotiden, der zu einer Veränderung der mRNA-Sequenz führt, die Aminosäuresequenz aber beibehält, die Sekretion des Proteins nicht (Lloyd *et al.*, 2001). Offensichtlich ist das Typ III-Erkennungssignal für den Transport der Proteine wesentlich komplexer als bisher bekannte Transportsignale.

#### A.2.5 Effektorproteine

Bisher wurden sechs Effektorproteine identifiziert, die die starke Resistenz der Yersinien gegenüber der Phagozytose durch Makrophagen und PMNs vermitteln (Grosdent *et al.*, 2002; Visser *et al.*, 1995).

Bei YopH handelt es sich um eine Protein-Tyrosinphosphatase (PTPase) (Guan & Dixon, 1990). YopH ist die bei weitem aktivste bekannte PTPase (Zhang *et al.*, 1992). Der C-Terminus des Proteins (AS 206 – 408) ähnelt eukaryontischen Tyrosinphosphatasen und beinhaltet einen

Phosphat-bindenden Loop. Das Sekretionssignal und die Bindungsstelle für das Chaperon SycH sind am N-Terminus lokalisiert (Wattiau *et al.*, 1994). YopH dephosphoryliert Proteine des fokalen Adhäsionskomplexes (z.B. FAK, p130<sup>Cas</sup>) und beeinträchtigt so einen adhäsionsregulierten Signaltransduktionsweg (Persson *et al.*, 1997; Black *et al.*, 1998). YopH verhindert auch den „oxidative burst“ in Makrophagen (Bliska & Black, 1995). Der Effekt von YopH ist nach Translokation in die Wirtszelle innerhalb weniger Sekunden nachweisbar (Anderson *et al.*, 1999).

Die drei anderen Yops, die Phagozytose verhindern – YopE, YopT und YopO – interagieren mit kleinen GTPasen der Rho-Familie. Die Proteine der Rho-Familie sind an der Innenseite der Plasmamembran der Zelle mit einem Prenylrest am C-Terminus verankert. Zu den Mitgliedern der Rho-Familie, die an der Dynamik des Zytoskeletts beteiligt sind, gehören Rho, Rac und Cdc42. YopE wirkt als GTPase aktivierendes Protein (GAP), das GTP-bindendes Rho, Rac und Cdc42 durch Hydrolyse in ihre GDP-bindende inaktive Form konvertiert (Black & Bliska, 2000; Andor *et al.*, 2001; Von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000).

YopT zeigt einen starken depolymerisierenden Effekt auf das Zytoskelett (Iriarte & Cornelis, 1998). Es modifiziert die Proteine der Rho-Familie und löst sie so von der Plasmamembran ab (Zumbihl *et al.*, 1999; Sorg *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei YopT um eine Cysteinprotease handelt, die von Rho, Rac und Cdc42 den C-terminalen Geranyl-Geranyl-Cysteinrest abspaltet und so die GTPasen von der Membran löst (Shao *et al.*, 2002). Aepfelbacher *et al.* (2003) konnten zeigen, dass *in vivo* nur RhoA von der Membran abgelöst wird, Rac und Cdc42 aber mit GDI assoziiert bleiben.

YopO (YpkA in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) moduliert ebenfalls die Dynamik des Zytoskeletts. YopO ist eine autophosphorylierende Serin/Threonin-Kinase und wird durch Interaktion mit Aktin aktiviert (Galyov *et al.*, 1993; Juris *et al.*, 2000). YopO bindet an die GTPasen Rho und Rac1 und interferiert vermutlich mit der für die Phagozytose nötigen Signaltransduktionsmaschinerie (Barz *et al.*, 2000; Dukuzumuremyi *et al.*, 2000).

Das Effektorprotein YopP löst Apoptose in Makrophagen aus (Mills *et al.*, 1997; Monack *et al.*, 1997) und blockiert die pro-inflammatorische Reaktion der infizierten Zellen. Es inhibiert die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und damit die Freisetzung von TNF $\alpha$  aus Makrophagen und von IL-8 aus epithelialen und endothelialen Zellen (Ruckdeschel *et al.*, 1998; Boland & Cornelis, 1998; Schesser *et al.*, 1998).

YopM ist ein stark saures Protein, das 13 – 20 Leucin-reiche Wiederholungssequenzen enthält. Vier YopM-Monomere bilden einen Zylinder mit einem inneren Durchmesser von 35 Å (Evdokimov *et al.*, 2001). YopM wird in die Wirtszellen transloziert und wandert in den Nukleus (Skrzypek *et al.*, 1995). Das Effektorprotein ist in der Lage, die Thrombozytenaggregation zu hemmen und ist für die Mausvirulenz von Yersinien essentiell (Leung *et al.*, 1990). Die genaue

Funktion ist allerdings noch nicht geklärt. McDonald *et al.* (2003) konnten eine Wechselwirkung von YopM mit zwei zellulären Kinasen zeigen, deren Aktivität durch YopM gesteigert wird. YopM beeinflusst außerdem die angeborene Immunantwort und führt zu einer Depletion von NK-Zellen (Kerschen *et al.*, 2004).

## A.2.6 Regulation des Typ III-Sekretionssystems

### A.2.6.1 „Low calcium response“

Sehr frühe Arbeiten zur Physiologie der Yersinien beschreiben erstmals den Phänotyp der „Low calcium response“ (Lcr). Wird die Wachstumstemperatur von virulenten *Yersinia*-Stämmen von 27 °C auf 37 °C erhöht, verlangsamen die Bakterien ihr Wachstum oder hören ganz auf zu wachsen. Dieses Phänomen ist bei *Y. pestis* am stärksten ausgeprägt und nimmt über *Y. pseudotuberculosis* nach *Y. enterocolitica* ab (Carter *et al.*, 1980). Nach einigen Stunden Wachstum bei 37 °C werden die virulenten Stämme von avirulenten überwachsen (Higuchi *et al.*, 1959). Mit der Wachstumsinhibition einher geht die Synthese und Sekretion von Yops (Straley *et al.*, 1993). Die Wachstumsinhibition und der Virulenzverlust wie auch die Sekretion der Yops können durch Supplementierung der Kultur mit Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$  (Higuchi *et al.*, 1959; Kupferberg & Higuchi, 1958) oder mit Glutamat, Aspartat und Natriumhydrogencarbonat (Delwiche *et al.*, 1959; Surgalla *et al.*, 1964) verhindert werden. Bei pH 7,8 kann auch die Zugabe von Nukleotiden wie ATP oder AMP die Wachstumsinhibition verhindern (Zahorchak & Brubaker, 1982). Durch Zugabe von  $\text{Mg}^{2+}$  werden die Wachstumsinhibition und die Sekretion der Yops verstärkt (Higuchi *et al.*, 1959). Wahrscheinlich geht die Wachstumsinhibition auf die massive Produktion von Effektorproteinen zurück (Zahorchak *et al.*, 1979; Ramamurthi & Schneewind, 2002b). Der Lcr-Phänotyp ist spezifisch für virulente Stämme und mit der Anwesenheit eines intakten Virulenzplasmids assoziiert (Ferber & Brubaker, 1981; Gemski *et al.*, 1980; Portnoy *et al.*, 1984). Auch Stämme, die durch Mutationen in plasmid-kodierten Virulenzgenen avirulent wurden, zeigen den Phänotyp der Lcr nicht mehr (Goguen *et al.*, 1984). Der Mechanismus, der die Yop-Sekretion mit der Wachstumskontrolle in pathogenen *Yersinia*-Spezies verbindet, konnte bisher nicht identifiziert werden. Wie erwähnt kann die Wachstumsinhibition durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat aufgehoben werden, weshalb eine Beteiligung der  $\text{CO}_2$ -Fixierung im Bakterium am Lcr-Phänotyp in Erwägung gezogen wurde. Yersinien katalysieren die  $\text{CO}_2$ -Fixierung in Oxalacetat über die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) oder Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC). Ein Vergleich der  $\text{CO}_2$ -Fixierung in

virulenten und avirulenten Stämmen durch Untersuchung der beiden genannten Enzyme zeigte allerdings keine Unterschiede (Baugh *et al.*, 1964). Fowler und Brubaker (1994) betonen jedoch die Wichtigkeit dieser Enzymreaktionen vor dem Hintergrund, dass *Y. pestis* nicht über das Enzym Aspartase verfügt (Dreyfus & Brubaker, 1978). Aspartase ist für die Desaminierung von Aspartat zu Fumarat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, verantwortlich. Da der Citratzyklus über diese Reaktion bei *Y. pestis* nicht aufgefüllt werden kann, spielen die Auffüllreaktionen über die CO<sub>2</sub>-Fixierung und Bildung von Oxalacetat eine große Rolle, um die Energiegewinnung sicherzustellen.

#### A.2.6.2 Temperatur

Die Expression der Gene auf dem Virulenzplasmid pYV wird temperaturabhängig reguliert. Durch eine Erhöhung der Wachstumstemperatur von 27 °C auf 37 °C erfolgt eine Aktivierung des TTSS. Die Transkription des *yop*-Regulons wird dabei durch den Transkriptionsfaktor VirF gesteuert. VirF gehört zur Familie der AraC-Transkriptionsregulatoren, die in vielen gramnegativen Bakterien zu finden sind (Gallegos *et al.*, 1993). Das *virF*-Gen in *Y. enterocolitica* wird spezifisch bei 37 °C exprimiert (Michiels *et al.*, 1991) und aktiviert die Expression der Gene des Sekretionsapparats und der Effektorproteine. Die Aktivität von VirF wird durch das Histonähnliche Protein YmoA (*Yersinia* *modulator*) beeinflusst (Cornelis *et al.*, 1991; Rohde *et al.*, 1994). Allein die Aktivität von VirF ist für eine Transkription der *yop*-Gene allerdings nicht ausreichend. Gleichzeitig muss bei 37 °C eine Konformationsänderung der DNA im Bereich der *yop*-Promotoren erfolgen, damit die Transkription möglich ist (Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992; Rohde *et al.*, 1999). Eine Beteiligung von YmoA an diesem Vorgang wird angenommen.

#### A.2.6.3 Die negativen Regulatoren LcrQ/YscM1 und YscM2

Die Yop-Sekretion wird wie erwähnt bei Wachstum in Ca<sup>2+</sup>-haltigem Medium bei 37 °C verhindert. Des Weiteren findet bei dieser Temperatur nur in geringem Maß *yop*-Expression statt, während die Expression der Komponenten des Sekretionsapparats nicht beeinflusst wird. Lange schon wurde ein negativer Rückkopplungsmechanismus postuliert, der die *yop*-Expression bei geschlossenem oder nicht funktionsfähigem Sekretionsapparat kontrolliert (Cornelis *et al.*, 1987). Mit der Charakterisierung von LcrQ in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* (Pettersen *et*

*al.*, 1996) und den homologen Proteinen YscM1 und YscM2 in *Y. enterocolitica* (Stainier *et al.*, 1997) konnte eine Erklärung für diesen Mechanismus gefunden werden. LcrQ bzw. YscM1 sind Proteine mit einer Größe von ungefähr 12 kDa. Beide Proteine sind zu 99 % identisch und unterscheiden sich bei einer Länge von 115 Aminosäuren nur in einer Aminosäure an Position 48. In anderen bekannten Typ III-Sekretionssystemen existieren keine homologen Proteine zu LcrQ/YscM1 und YscM2. Eine Deletion von *lcrQ* führt zu einer Überproduktion von Yops bei 37 °C in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> (Rimpiläinen *et al.*, 1992). Im Gegensatz dazu zeigt eine Insertionsmutante von *yscM1* keine Deregulation der Yop-Synthese. Diese Unstimmigkeit führte durch weitere Experimente zu der Identifizierung von YscM2 in *Y. enterocolitica*. Das Protein besitzt eine Identität von 57 % zu LcrQ/YscM1. Die Molekülmasse entspricht mit 12 kDa in etwa der von YscM1 und LcrQ, der isoelektrische Punkt (pI) von YscM2 mit 9,79 unterscheidet sich jedoch deutlich von dem von YscM1 mit 6,05. Deletiert man *yscM2* zusätzlich zu *yscM1*, kann man denselben deregulierten Phänotyp wie in der *lcrQ*-Mutante beobachten (Stainier *et al.*, 1997). Des Weiteren führt eine Überproduktion von LcrQ, YscM1 oder YscM2 zu einer Repression der Transkription der *yop*-Gene (Rimpiläinen *et al.*, 1992; Stainier *et al.*, 1997). Man geht davon aus, dass YscM1 und YscM2 funktionell gleichwertig sind (Stainier *et al.*, 1997). LcrQ, YscM1 und YscM2 wirken konzentrationsabhängig. Alle drei Proteine werden über das TTSS sezerniert und auch in die Wirtszelle transloziert (Rimpiläinen *et al.*, 1992; Stainier *et al.*, 1997; Cambronne *et al.*, 2000; Cambronne *et al.*, 2004). Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass sobald der Sekretionsapparat funktionsfähig ist, LcrQ bzw. YscM1 und YscM2 durch Sekretion aus dem Zytoplasma der Yersinie entfernt werden und somit die Inhibition der *yop*-Expression entfällt, was eine vollständige Aktivierung der Yop-Synthese erlaubt. Die aktive Domäne für die negativ-regulatorische Funktion von LcrQ/YscM1 und YscM2 ist am C-Terminus der Proteine lokalisiert. Essentiell für die Regulation der Yop-Synthese sind die letzten 35 bzw. 36 Aminosäuren (Cambronne *et al.*, 2004). LcrQ/YscM1 und YscM2 zeigen eine hohe Homologie zu den ersten 128 Aminosäuren von YopH (Rimpiläinen *et al.*, 1992; Stainier *et al.*, 1997). Diese homologe Region beinhaltet das Sekretionssignal von YopH und die Bindungsstelle für das Chaperon SycH (Cambronne *et al.*, 2000; Cambronne *et al.*, 2004). Das Chaperon SycH bindet vermutlich deshalb auch an LcrQ, YscM1 und YscM2. Diese werden so wie YopH durch einen Chaperon-abhängigen Mechanismus in die Wirtszelle transloziert. Dabei verhindert die Bindung von LcrQ/YscM1 und YscM2 an das Chaperon SycH die Repression der Yop-Synthese. Eine Überexpression von SycH zeigt denselben Phänotyp wie eine *lcrQ*- bzw. *yscM1/yscM2*-Mutante (Cambronne & Schneewind, 2002). Stainier *et al.* (1997) haben außerdem festgestellt, dass LcrQ/YscM1 und YscM2 eine weitere auf dem Virulenzplasmid kodierte Komponente benötigen, um diesen negativen Rückkopplungsmechanismus auszuüben. Als essentielle Wechselwirkungspartner für die Regulation des TTSS durch LcrQ/YscM1 und YscM2



wurden YopD und sein Chaperon LcrH (SycD in *Y. enterocolitica*) identifiziert (Williams & Straley, 1998; Wulff-Strobel *et al.*, 2002; Cambronne & Schneewind, 2002). Der genaue Regulationsmechanismus ist bisher allerdings nicht bekannt. Ursprünglich wurde eine Regulation auf Transkriptionsebene angenommen (Rimpiläinen *et al.*, 1992; Allaoui *et al.*, 1995; Petterson *et al.*, 1996). Eine direkte Bindung von LcrQ/YscM1 und YscM2 an Nukleinsäuren konnte allerdings nicht gezeigt werden. Cambronne und Schneewind (2002) postulieren als Modell für die negative Regulation die Bildung eines Komplexes aus YopD, SycD, YscM1 und YscM2 und dessen Bindung an *yop*-mRNA. Dieser Komplex könnte die Translation der mRNA verhindern oder sogar zu deren Degradation führen (Anderson *et al.*, 2002). Dagegen stellen Wulff-Strobel *et al.* (2002) die These auf, dass LcrQ zusammen mit seinem Chaperon SycH das Eintreten der Yops in den Sekretionskanal durch Bindung an das innere Sekretionskanalprotein LcrG kontrolliert. Dies würde die Theorie von Boyd *et al.* (2000) bestätigen, die eine geordnete Sekretion der Yops postulieren, die von den Syc-Chaperonen bestimmt wird. Möglicherweise stellt der Chaperon-Substrat-Komplex ein dreidimensionales Sekretionssignal dar, das vom Typ III-Sekretionsapparat erkannt wird und so die Sekretionsreihenfolge beeinflusst (Birtalan *et al.*, 2002). Dass der Mechanismus möglicherweise komplizierter ist, zeigt ein kürzlich publizierter Artikel (Swietnicki *et al.*, 2004). Diese Arbeit legt Protein/Protein-Wechselwirkungen nicht nur zwischen YscM1/YscM2 und SycH, sondern auch zwischen YscM1/YscM2 und dem YopE-Chaperon SycE nahe. Die Sekretionsreihenfolge könnte teilweise auch durch die unterschiedliche Stabilität der Chaperon-Effektor-Komplexe zustande kommen. Obwohl inzwischen viel über die Funktionen von LcrQ/YscM1 und YscM2 bekannt ist, bleibt der genaue Mechanismus der Regulation des TTSS jedoch weiterhin unbekannt.

### A.3 ZIELSETZUNG

Diese Arbeit sollte an bisher Bekanntes zu YscM1 und YscM2 in *Y. enterocolitica* anknüpfen und die wenig verstandene Funktionsweise der beiden Proteine näher charakterisieren. Hierfür wurden Proteinreinigungen von YscM1 und YscM2 sowie von deren Chaperon SycH angestrebt, auch um eine Kristallisation der Proteine zu ermöglichen. Mithilfe von Wechselwirkungsstudien sollten potentielle Interaktionspartner der beiden Typ III-Proteine in *Y. enterocolitica* identifiziert werden. Zwar gelten YscM1 und YscM2 mit einer Identität von 57 % als funktionell gleichwertig (Stainier *et al.*, 1997), allerdings weisen die isoelektrischen Punkte (YscM1: pI von 6,05 / YscM2: pI von 9,79) der beiden Proteine darauf hin, dass sich die orthologen Proteine in ihrer Funktion unterschiedlich weiterentwickelt haben.

## B. MATERIAL UND METHODEN

### B.1 MATERIAL

#### B.1.1 Geräte

Geräte	Modell	Firma
Analysenwaage	R160P, Pt 1200	Sartorius, Göttingen
Blot-Apparatur	Trans-Blot SD, Mini-Transblot	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer für PAGE	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät	GenePulser II Pulse Controller II	Bio-Rad, München Bio-Rad, München
Agarose-Gelelektrophorese- kammern		Keutz
French Press	French Pressure Cell 40K	SLM Aminco
Filmentwickler	FPM-100A	Fujifilm
Gel-Dokumentation	E.A.S.Y. ( Enhanced Analysis System )	Herolab, Wiesloch
PCR-Cycler	GeneAmp, PCR System 2400	Perkin Elmer
pH-Meter	pH 211	Hanna Instruments, Kehl
Photometer	Ultraspec 3000	Amersham Biosciences
Ultraschallbad	Sonorex RK 100H	Bandelin, Berlin
Proteinreinigungssystem	SMART™ System ÄKTA Explorer	Amersham Pharmacia Biotech
Transilluminator	UVT-20M/W	Herolab, Wiesloch
Waage	Kern KB	Kern & Sohn, Balingen
Zentrifugen	3K30, 1K15, 112 Sorvall RC5C	Sigma, Osterode am Harz Kendro, Langenselbold

Tab. B.1.1 Verwendete Geräte

#### B.1.2 Chemikalien

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

#### B.1.3 Andere Materialien

Enzyme wurden bei Invitrogen und bei MBI Fermentas gekauft. Verwendete Nährmedien stammen von der Firma Difco und Standard-Antikörper von den Firmen Amersham, Becton Dickinson und Sigma. Nitrocellulose-Membran wurde von Schleicher & Schüll bezogen und Plastikverbrauchsmaterial bei den Firmen Eppendorf, Brand, Falcon / Becton Dickinson und Nunc.

## B.2 BAKTERIEN, PLASMIDE, PRIMER

### B.2.1 Bakterienstämme

Stämme	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 ) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan (1983)
BL21	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i>	Studier & Moffatt (1986)
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)	Stratagene
BL21 (DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS Cm <sup>r</sup>	Stratagene
<i>Y. enterocolitica</i>		
WA-314	Serotyp 0:8, Biogruppe 1B mit pYV-Plasmid, Nal <sup>r</sup>	Heesemann <i>et al.</i> (1984)
WA-314Cm	Cm-resistentes Derivat von WA-314	Trülsch <i>et al.</i> (2004)
WA-C	plasmidloses Derivat von WA-314, Nal <sup>r</sup>	Heesemann <i>et al.</i> (1984)
WA-314 $\Delta$ <i>yscM1</i>	<i>yscM1</i> -Mutante von WA-314, Nal <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Konrad Trülsch
WA-314 $\Delta$ <i>yscM2</i>	<i>yscM2</i> -Mutante von WA-314, Nal <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Konrad Trülsch
WA-314 $\Delta$ <i>ppc</i>	<i>ppc</i> -Mutante von WA-314, Nal <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Konrad Trülsch
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		
IP32955	klinisches Isolat, Serotyp 0:1	E. Carniel

**Tab. B.2.1** Verwendete Bakterienstämme.

## B.2.2 Plasmide

Plasmide	Eigenschaften	Referenz
<b>pGEX-4T-3</b>	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , <i>gst</i>	Amersham
pGEX- <i>yscM1</i>	pGEX-4T-3 mit <i>yscM1</i> BamHI-NotI PCR-Fragment, Amp <sup>r</sup>	Wilharm <i>et al.</i> (2003)
pGEX- <i>yscM2</i>	pGEX-4T-3 mit <i>yscM2</i> BamHI-NotI PCR-Fragment, Amp <sup>r</sup>	Wilharm <i>et al.</i> (2003)
pGEX- <i>ppc</i>	pGEX-4T-3 mit <i>ppc</i> EcoRI-NotI PCR-Fragment, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGEX- <i>sycH</i>	pGEX-4T-3 mit <i>sycH</i> BamHI-NotI PCR-Fragment, Amp <sup>r</sup>	Neumayer <i>et al.</i> (2004)
<b>pGEX-6P-3</b>	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , <i>gst</i>	Amersham
pGEX-6- <i>yscM1</i>	pGEX-6P-3 mit <i>yscM1</i> EcoRI-NotI PCR-Fragment, Amp <sup>r</sup>	Wilharm <i>et al.</i> (2003)
pGEX-6- <i>yscM2</i>	pGEX-6P-3 mit <i>yscM2</i> EcoRI-NotI PCR-Fragment, Amp <sup>r</sup>	Wilharm <i>et al.</i> (2003)
<b>pGEM-T</b>	Klonierungsvektor, Amp <sup>r</sup>	Promega
<b>pET-21b</b>	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup>	Novagen
pET- <i>sycH</i>	pET-21b mit <i>sycH</i> NdeI-BamHI PCR-Fragment, Amp <sup>r</sup>	Neumayer <i>et al.</i> (2004)
<b>pET-3c</b>	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup>	Stratagene
pETU	<i>bla</i> aus pET-3c wurde über die <i>Pst</i> I-Schnittstelle durch eine Kanamycinkassette ausgetauscht, Km <sup>r</sup>	Neumayer <i>et al.</i> (2004)
pETU- <i>sycH</i>	pETU mit <i>sycH</i> BamHI-NdeI PCR-Fragment, Km <sup>r</sup>	Neumayer <i>et al.</i> (2004)
<b>pACYC184</b>	Klonierungsvektor, Cm <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	Chang & Cohen (1978)
pACYC- <i>ppc</i>	pACYC184 mit <i>ppc</i> XbaI-SalI PCR-Fragment, Cm <sup>r</sup>	diese Arbeit
pACYC- <i>yscM2</i>	pACYC184 mit <i>yscM2</i> Clai-BamHI PCR-Fragment, Cm <sup>r</sup>	diese Arbeit
<b>pWS151</b>	Derivat von pMS470Δ8; über die Schnittstellen <i>Nde</i> I und <i>Hind</i> III wurde ein Linker eingefügt, der durch Hybridisierung der Oligonukleotide pWS-Linker-5'-P und pWS-Linkerkompl-5'-P entstanden ist, Amp <sup>r</sup>	Balzer <i>et al.</i> (1992)
pWS- <i>yscM1</i>	pWS151 mit <i>yscM1</i> NdeI-SalI PCR-Fragment, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pWS- <i>yscM2</i>	pWS151 mit <i>yscM2</i> NdeI-SalI PCR-Fragment, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pWS- <i>yscM1</i> <sub>Δ81-115</sub>	pWS151 mit <i>yscM1</i> <sub>Δ81-115</sub> NdeI-SalI PCR-Fragment, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pWS- <i>yscM2</i> <sub>Δ84-116</sub>	pWS151 mit <i>yscM2</i> <sub>Δ84-116</sub> NdeI-SalI PCR-Fragment, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pWS- <i>yscM1</i> <sub>Δ2-10</sub>	pWS151 mit <i>yscM1</i> <sub>Δ2-10</sub> NdeI-SalI PCR-Fragment, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pWS- <i>yscM2</i> <sub>Δ2-10</sub>	pWS151 mit <i>yscM2</i> <sub>Δ2-10</sub> NdeI-SalI PCR-Fragment, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit

Tab. B.2.2 Verwendete Plasmide

### B.2.3 Primer

Verwendet wurden Primer der Firmen Metabion (entsalzt und lyophilisiert), Thermohybrid (entsalzt, lyophilisiert und HPLC-gereinigt) und biomers.net (PAGE-gereinigt). Diese wurden in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gelöst. Die Konzentration der Primer-Stammlösung betrug 100 pmol/ $\mu\text{l}$ .

Primer	Sequenz (5' → 3')
ppcKm for	CTAACAACCTGCGGCGTCAAGGGCGAAGGGGATATGGGTCAAGGGTCATT CACTGACACCCTCATCAGTG
ppcKm rev	ACGGGCGCCTGGCCCGTTTGTCTTTTATTACGATAATTCTACTGGCAACG TCAAGTCAGCGTAATGCTC
yscM1Km for	AATAAATAACTTAGAATATCGTAGAGATAATTATAGCGACAGGAGACTCGT CACTGACACCCTCATCAGTG
yscM1Km rev	ATCAACCTGGGGGTATTATCGCCTCAATATACAGTAATATATTATCGCGTCA AGTCAGCGTAATGCTC
yscM2Km for	TGGTGGTTTAGTTTGTGTTTATTTTAAAATATACATGACATATCGACGTTTCA CTGACACTGACACCCTCATCAGTG
yscM2Km rev	TGAAAAATTGAATTTTAGTTTAAAGGTAACCTATCATTAAAGTTGTGATACG TCAAGTTGTGATACGTCAGTCAGCGTAATGCTC
YscM1-His-Km	GTCAAGTTATTGCTGGAAGCCATGCGCCAGGATACGGCGGCTGACGGCAGA GGATCGCATCACCATCACTGATCACTGACACCCTCATCAGTG
YscM2-Flag-Km	GAGGATGCAAAATTATTGCTAGATGCAGTGACACGGAAAATGCAAAAGCTT GACTATAAGGATGACGATGACAAATCACTGACACCCTCATCAGTG
ppc 5'-EcoRI	GAATTCAATGAACGAACAATATTCGCAATGC
ppc 3'-NotI	GCGGCCGCTTAGCCGGTATTACGCATACCTG
yscM1 5'-BamHI	GGATCCATGAAAATCAATACTCTTCAATCG
yscM1 3'-NotI	GCGGCCGCTCAGCCGTCAGCCGCCGTATCC
yscM2 5'-BamHI	GGATCCATGGGGAGCATTATGAAAATAAACG
yscM2 3'-NotI	GCGGCCGCTTAAAGCTTTTGCATTTCCGTGTC
sycH 5'-BamHI	GGATCCATGCGCACTTACAGTTCATTAC
sycH 3'-NotI	GCGGCCGCTTAAACCAGTAAATGAGATGATG
yscM2 5'-ClaI	CCATCGATTCTCTGGATCGGGAACGTCAGCTGG
yscM2 3'-BamHI	CGGGATCCAACGCCACCCTAAACCCTAAGAAC
ppc 3'-SalI	GTCGACCTAACCGGTATTACGCATCCCTG
ppc 5'-XbaI	TCTAGAGTCAATTAGTCGATCATTTCTGCC
yscM1 5'-NdeI	CATATGAAAATCAATACTCTTCAATCG
yscM1 3'-SalI	GTCGACTCAGCCGTCAGCCG
yscM2 5'-NdeI	CATATGGGGAGCATTATGAAAATAAACG
yscM2 3'-SalI	GTCGACTTAAAGCTTTTGCATTTCCGTGTC
sycH 5'-NdeI	CATATGCGCACTTACAGTTCATTAC
sycH 3'-BamHI	GGATCCCTTAAACCAGTAAATGAGATG
yscM1 $\Delta$ 81-115 3'-SalI	GTCGACTCACTTGCCCTGCTTTAGTTCCAAATTAG
yscM2 $\Delta$ 84.116 3'-SalI	GTCGACTTATTTTCTTGACTTAACTCAAATTAG
yscM1 $\Delta$ 2-10 5'-NdeI	CATATGAATCAACAAATTACCCAAGTGGGAC
yscM2 $\Delta$ 2-10 5'-NdeI	CATATGAGCATGCAAATTGCAGAGTTTGGG
pWS-Linker-5'-P	TATGAAGCTTAGATCTGTCGACGGATC
pWS-Linkercompl-5'-P	AGCTGATCCGTCGACAGATCTAAGCTTCA

Tab. B.2.3 Verwendete Primer

### B.3 NÄHRMEDIEN, KULTIVIERUNG UND STAMMHALTUNG

#### B.3.1 Nährmedien

Die Sterilität der Nährmedien wurde durch Autoklavieren bei 121 °C, 1 bar, 20 min erreicht. Zur Herstellung von festen Nährmedien wurden dem Medium 15 g Agar pro Liter zugesetzt. Der Agar wurde durch Erhitzen aufgeschmolzen und in Petrischalen gegossen.

<b>CIN-Agar (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin)</b>	Selektivagar für <i>Yersinia enterocolitica</i> (Becton Dickinson)
<b>Luria-Bertani-(LB)-Medium</b>	10 g Trypton 5 g Hefe 5 g NaCl ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> mit NaOH den pH auf 7,4 – 7,6 einstellen
<b>Brain-Heart-Infusion (BHI)</b>	37 g BHI ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
<b>M9-Medium</b>	100 ml M9 Salze (autoklaviert) 1 ml MgSO <sub>4</sub> (1 M) 1 ml CaCl <sub>2</sub> (0,1 M) 50 ml Glukose (20 %) ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> Glukose, MgSO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> wurden steril filtriert
<b>M9-Salze (10x)</b>	75 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 30 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 g NH <sub>4</sub> Cl 5 g NaCl ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
<b>SOC-Medium</b>	10 g Trypton 5 g Hefe 0,3 g NaCl 0,09 g KCl 1,02 g MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 1,23 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O ad 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> nach dem Autoklavieren wird dem Medium 20 mM Glukose (steril filtriert) zugesetzt

### B.3.2 Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* und *Yersinia* erfolgte aerob bei 37 °C bzw. 27 °C auf Agarplatten oder im Flüssigmedium in einem Schüttelinkubator (100-200 rpm), um eine ausreichende Belüftung der Kultur sicherzustellen.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über Antibiotika und andere Zusätze, die bei der Kultivierung verwendet wurden und deren eingesetzte Konzentrationen. Alle Zusätze wurden vor der Zugabe zur Bakterienkultur steril filtriert.

Zusätze	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
<b>Antibiotika</b>			
Ampicillin (Amp)	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	10 mg / ml	100 µg / ml
Carbenicillin (Cb)	50 % Ethanol	50 mg / ml	250 µg / ml
Chloramphenicol (Cm)	70 % Ethanol	2 mg / ml	20 µg / ml
Kanamycin (Km)	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	5 mg / ml	50 µg / ml
Nalidixinsäure (Nal)	0,5 N NaOH	6 mg / ml	60 µg / ml
Spectinomycin (Sp)	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	5 mg / ml	50 µg / ml
Streptomycin (Sm)	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	100 mg / ml	100 µg / ml
Tetracyclin (Tet)	70 % Ethanol	2 mg / ml	20 µg / ml
Casamino Acids	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1 %	0,005 %
EGTA	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	500 mM	5 mM
Glukose	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	20 %	0,2 %
IPTG	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1 M	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1 M	10 mM
Thiamin	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1 mg / ml	10 µg / ml

Tab. B.3.1 Verwendete Antibiotika und andere Zusätze

### B.3.3 Stammhaltung

Bakterienstämme können in der Regel auf Agarplatten bis zu sechs Wochen bei 4 °C unter entsprechendem Selektionsdruck gelagert werden. Die Langzeitlagerung der Stämme erfolgte in 15 % Glycerol bei –80 °C.





#### B.4.1.2 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mit QIAprep Spin Miniprep Kit

Bis zu 20 µg qualitativ hochwertiger Plasmid-DNA können mit diesem Kit der Firma Qiagen gereinigt werden. Das Prinzip dieses Kits basiert auf der alkalischen Lyse und anschließender Anionenaustauschchromatographie. Die Isolierung erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

#### B.4.1.3 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mit Nucleobond AX 100

Größere Mengen Plasmid-DNA (bis zu 100 µg) wurden über AX 100-Säulen der Firma Macherey & Nagel gereinigt. Das Prinzip dieses Kits basiert ebenfalls auf der alkalischen Lyse und anschließender Anionenaustauschchromatographie. Die Isolierung erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

#### B.4.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei 260 nm. Hierfür wurde die DNA 1:100 in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> verdünnt und die Absorption in einer Quarzküvette (d=1 cm) gegen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> bestimmt. Dabei entspricht 1 OD<sub>260 nm</sub> etwa 50 µg/ml.

Die Verunreinigung der DNA mit Proteinen wurde durch eine parallele Messung bei 280 nm abgeschätzt. Ein Quotient OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> über 1,8 gilt als Kriterium für eine ausreichende Qualität der DNA für anschließende Manipulationen wie Sequenzierung, Ligation oder Restriktionsverdau.

#### B.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine *in vitro*-Methode zur spezifischen Vervielfältigung und Anreicherung definierter DNA-Abschnitte. Die Amplifizierung wird durch eine Reihe von Temperatur-Zeit-Zyklen ermöglicht. Dabei wird zuerst die DNA denaturiert, dann erfolgt die Hybridisierung der Primer, die den Bereich der Amplifizierung festlegen, und im letzten Schritt verlängert eine thermostabile DNA-Polymerase die Primer entlang der DNA-Matrize.

Als DNA-Polymerasen wurden eine *Taq*-Polymerase und die Herculase (Stratagene; Mischung aus *Pfu*- und *Taq*-DNA-Polymerase), die über eine Korrekturleseaktivität verfügt, verwendet.

Die Dauer der Elongation war jeweils abhängig von der Länge des zu vervielfältigenden Bereichs. Bei der Festlegung der Temperatur zur Hybridisierung der Primer wurde deren Schmelztemperatur berücksichtigt.

Als Template wurde entweder ein aufgekochtes Gesamtzell-Lysat von Bakterien oder isolierte DNA verwendet:

Gesamtzell-Lysat: eine Bakterienkolonie von Platte wurde mit 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> für 10 min aufgekocht und dann bei 20 000 g für 5 min abzentrifugiert  
isolierte DNA: 1:20 bis 1:50 verdünnen, Endkonzentration: 5 – 10 ng/µl

Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte mit dem Qiagen PCR Purification Kit.

### **B.4.3 Enzymatische Modifikationen von DNA**

#### **B.4.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen. Dadurch entstehen spezifische Fragmente mit definierten Enden.

In einem Restriktionsansatz wurden ca. 2 – 5 Units der entsprechenden Enzyme pro µg DNA eingesetzt. Die Pufferung des Reaktionsansatzes erfolgte mit einem 10 x Puffer nach Empfehlung des Herstellers. Da die Restriktionsenzyme in 50 % Glycerol aufbewahrt werden, muss beachtet werden, dass die Glycerol-Konzentration im Restriktionsansatz 5 % nicht übersteigt, da es sonst zu einer Hemmung der Enzymaktivität kommen kann.

#### **B.4.3.2 Dephosphorylierung von DNA**

Um eine Religation von linearisierter Vektor-DNA zu verhindern, wurde das 5'-Phosphat mithilfe von Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP, Roche Diagnostics, Mannheim) nach Anweisung des Herstellers dephosphoryliert. Nach Abschluss der Reaktion wurde die SAP durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 65 °C für 15 min inaktiviert.

### B.4.3.3 Ligation linearer DNA-Moleküle

Mithilfe einer T4-DNA-Ligase lassen sich Nukleinsäure-Moleküle mit kompatiblen überhängenden oder glatten Enden miteinander verbinden (z.B. Vektor und Fragment). Das Enzym knüpft dabei eine Phosphodiester-Bindung zwischen 5'-phosphorylierten Enden und 3'-OH-Enden unter gleichzeitiger Spaltung von ATP. Bei der Ligation ist zu beachten, dass die Reaktion in einem möglichst kleinen Volumen stattfindet. Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt und mit 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-Ligase bei 16 °C für 12 bis 16 h inkubiert.

Eine Besonderheit stellt die Ligation von PCR-Fragmenten mit dem Klonierungsvektor pGEM-T dar. Die *Taq*-DNA-Polymerasen haben die Eigenschaft, unabhängig vom Template an die 3'-Enden je ein Desoxyadenosin anzuhängen. Der von Promega gelieferte Vektor pGEM-T ist mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* im Bereich der „multiple cloning site“ (MCS) geschnitten und an die beiden entstandenen 3'-Enden wurde je ein Thymidin-Rest angehängt. So ist einerseits die Gefahr der Religation des Vektors gering und zum anderen stellt er kompatible Überhänge für die PCR-Produkte zur Verfügung. PCR-Produkte können also ohne vorherigen Schnitt mit einer Restriktionsendonuklease in die MCS kloniert werden.

### B.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Molekülen entsprechend ihrer Größe und zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld. Wegen der negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA wandern die DNA-Fragmente in der Agarosematrix zur Anode. Lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente bewegen sich im Agarose-Gel umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts. Die bei der Agarose-Gelelektrophorese eingesetzte Agarosekonzentration ist abhängig von dem DNA-Molekulargewichtsbereich, in dem eine effektive Auftrennung der Fragmente erfolgen soll. In dieser Arbeit wurden Konzentrationen von 0,5 – 1,5 % Agarose verwendet. Als Größenstandard zur Größenbestimmung eines linearen DNA-Moleküls wurde der 1 kb plus DNA Ladder von Invitrogen verwendet.

<b>Elektrophoresepuffer (1 x TAE):</b>	40 mM Tris-HCl pH 8,2 20 mM Essigsäure 2 mM EDTA
<b>10 x DNA-Auftragspuffer.</b>	0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerol in 1 x TAE
<b>Ethidiumbromid-Färbelösung:</b>	1 µg Ethidiumbromid pro ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

#### B.4.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

- Agarose in TAE-Puffer aufschmelzen, in vorbereitete Gelschlitten gießen und Kamm mit entsprechend vielen Taschen einsetzen
- das verfestigte Gel in eine Elektrophoresekammer einsetzen, mit TAE-Puffer überschichten und Kamm ziehen
- die DNA-Proben 1:10 mit Auftragspuffer mischen und in die Geltaschen pipettieren
- die Elektrophorese wurde bei 80 – 100 V durchgeführt
- anschließend Gel 10 – 30 min in Ethidiumbromid-Lösung färben, mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> überschüssiges Ethidiumbromid entfernen
- das Ethidiumbromid wird in die DNA eingelagert und kann durch Fluoreszenz bei UV-Bestrahlung ( $\lambda = 302$  nm) detektiert werden; Bandenmuster mit einer Videophotoanlage dokumentieren

#### B.4.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die präparative Agarose-Gelelektrophorese erfolgte im Prinzip wie zuvor beschrieben. Allerdings wurde zusätzlich 1 mM Guanosin in das Gel eingegossen und dem Laufpuffer zugefügt, um die DNA vor Quervernetzung und Strangbrüchen durch UV-Licht zu schützen (Gründemann & Schömig, 1996). Das Gel wurde dann nur kurz gefärbt und unter UV-Licht wurden die gewünschten Banden ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus Agarose erfolgte mit dem Qiagen Gel Purification Kit nach Anweisung des Herstellers.

#### **B.4.5 Sequenzierung von DNA**

Plasmid-DNA wurde wie beschrieben gereinigt (siehe B.4.1.3). Die Sequenzierung wurde bei der Firma GATC Biotech AG durchgeführt. 30 µl Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 50 ng/µl wurden an die Firma geschickt.

#### **B.4.6 Transformation von DNA**

##### **B.4.6.1 Elektrokompente Zellen**

Aus einer Übernachtskultur wurden 200 ml LB-Medium 1:50 beimpft. Unter Schütteln wurde die Kultur inkubiert, bis sie eine optische Dichte  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,5 – 0,7 erreicht hatte. Die Bakterienkultur wurde dann sofort auf Eis gestellt. Alle folgenden Schritte müssen bei 4 °C durchgeführt werden, weshalb benötigte Lösungen oder Geräte vorgekühlt wurden. Die Zellen wurden abzentrifugiert (alle Zentrifugationsschritte bei 4 000 g für 10 min) und zweimal mit 50 ml  $H_2O_{\text{dest.}}$  gewaschen. Der letzte Waschschritt erfolgte in 5 ml 10 % Glycerol. Das Zellpellet wurde in ca. 900 µl 10 % Glycerol resuspendiert und in Aliquots von 100 µl bei – 80 °C eingefroren.

##### **B.4.6.2 Elektroporation**

Zur Transformation von DNA in elektrokompente Zellen wurde die entsprechende DNA mit den Zellen gemischt und in eine Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit einem Bio-Rad Gene Pulser entsprechend der Betriebsanleitung des Herstellers bei einer Spannung von 2 500 V, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF. Danach wurden sofort 900 µl SOC-Medium zugegeben. Die Bakterien wurden dann 30 Minuten bei optimaler Temperatur (37 °C für *E. coli*, 27 °C für *Yersinia*) inkubiert und auf Agarplatten unter Selektionsdruck ausplattiert.

## B.5 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

### B.5.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

#### B.5.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der elektrophoretischen Trennung von Proteingemischen. Das anionische Detergenz SDS lagert sich an die Proteine an. So entsteht ein negativ geladener Komplex. Die Proteine werden dabei denaturiert. Durch Zugabe von DTT werden außerdem Disulfidbrücken in den Proteinen gespalten. Die große Menge an gebundenem SDS überwiegt die Eigenladung des Proteins deutlich, so dass die Ladung des Proteins näherungsweise proportional zu seiner Masse ist. Die elektrophoretische Auftrennung der nun stark negativ geladenen Proteine erfolgt so aufgrund der Molekularmasse. Als Größenstandard wurde der Benchmark Prestained Protein Ladder (Invitrogen) verwendet.

Zur Herstellung der Gele wurden die Glasplatten mit 70 % Ethanol gereinigt und in den Gießstand eingesetzt. Zuerst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen (ca. 2 cm unter die Oberkante der kleinen Glasplatte) und mit 2-Butanol überschichtet. Nach der Polymerisierung der Gelmatrix wurde der Alkohol entfernt, das Sammelgel aufgegossen und der saubere Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach etwa 30 Minuten war die Polymerisierung abgeschlossen und die Gele konnten verwendet werden.

Trenngel	Sammelgel
11 – 16 % Acrylamid (Protogel 30 %*)	6 % Acrylamid (Protogel 30 %*)
370 mM Tris pH 8,8	100 mM Tris pH 6,8
0,2 % SDS	0,2 % SDS
0,2 % TEMED	0,4 % TEMED
0,04 % APS	0,08 % APS

\* Protogel 30 %: Acrylamid / Bisacrylamid (30 / 0,8)

**Tab. B.5.1** Verwendetes SDS-System

<b>Laufpuffer:</b>	3,02 g Tris 14,24 g Glycin 0,1 % SDS ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
<b>Auftragspuffer:</b> (nach Trček <i>et al.</i> , 2002)	100 mM Tris pH 8,8 10 % Glycerol 10 % SDS 100 mM MgCl <sub>2</sub> 5 % β-Mercaptoethanol 0,005 % Bromphenolblau
<b>Elektrophoresebedingungen:</b>	150 – 200 V

### B.5.1.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist es möglich, Proteine und deren Komplexe unter nicht denaturierenden Bedingungen aufzutrennen. Die Vorgehensweise zum Gießen solcher Nativgele entspricht der unter B.5.1.1. beschriebenen, wobei kein Sammelgel gegossen wird.

<b>Nativgel:</b>	6 % Acrylamid (Protogel 30 %*) 25 mM HEPES 5 mM NaCl 0,2 % TEMED 0,04 % APS * Protogel 30 %: Acrylamid / Bisacrylamid (30/0,8)
<b>Laufpuffer:</b>	25 mM HEPES 5 mM NaCl
<b>Auftragspuffer:</b>	25 mM HEPES 5 mM NaCl 10 % Glycerol 0,005 % Bromphenolblau
<b>Elektrophoresebedingungen:</b>	Gel bei 100 V 30 min vorlaufen lassen, die eigentliche Gelelektrophorese erfolgt bei 80 V für 2,5 h

## B.5.2 Detektion von Proteinen

### B.5.2.1 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue (abgew. nach Sambrook *et al.*, 1989)

Das Polyacrylamid-Gel wurde nach der Elektrophorese ca. 30 Minuten auf einem Blotinkubator in einer Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung inkubiert. Die anschließende Entfärbung des unspezifischen Hintergrunds erfolgte mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  oder mit Entfärbelösung bei RT. Eine Beschleunigung sowohl des Färbeprozesses als auch der Entfärbung kann durch Erwärmung der Lösungen erzielt werden. Anschließend kann das Gel zwischen Cellophan-Folien getrocknet werden.

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

**Entfärbelösung:** 10 % Ethanol  
7 % Essigsäure

### B.5.2.2 Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987)

Die Silberfärbung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine ist mit einer Nachweisgrenze von 5 bis 30 ng Protein wesentlich empfindlicher als die Coomassie-Färbung mit 50 bis 100 ng. Das Prinzip der Silberfärbung ist die Reduktion von Silberionen durch die Seitenketten der Aminosäuren Glutamat, Aspartat und Cystein. Das entstandene metallische Silber dient in einer nachgeschalteten Entwicklerreaktion als Kristallisationskeim für die Reduktion weiterer Silberionen, so dass an der Stelle, an der sich Proteine im Gel befinden, braune bis schwarze Banden sichtbar werden.

**Fixierer:** 50 % Methanol  
12 % Essigsäure  
500  $\mu\text{l}$  Formaldehyd 37 %

**Thiosulfatlösung:** 0,2 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

**Silbernitratlösung:** 2 g  $\text{AgNO}_3$   
750  $\mu\text{l}$  Formaldehyd 37 %

**Entwickler:** 60 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
4 mg  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$   
500  $\mu\text{l}$  Formaldehyd 37 %

Alle Mengenangaben beziehen sich auf einen Liter Lösung



**Durchführung:**

- Gel nach der Elektrophorese mindestens 1 h unter Schütteln in Fixierer inkubieren
- 3 x je 20 min mit 50 % Ethanol waschen
- 1 min in Thiosulfatlösung inkubieren
- 3 x je 20 s mit H<sub>2</sub>O waschen
- 20 min in Silbernitratlösung inkubieren
- 3 x je 20 s mit H<sub>2</sub>O waschen
- Entwicklung mit Entwicklerlösung bis die Banden sichtbar sind
- Abstoppen der Reaktion mit H<sub>2</sub>O-Waschschritt
- Gel 10 min in 50 % Methanol und 12 % Essigsäure inkubieren
- Gel anschließend mindestens 20 min in 50 % Methanol inkubieren
- gefärbtes Gel in H<sub>2</sub>O quellen lassen, das Gel kann dann getrocknet werden

**B.5.2.3 Immunoblot (Western Blot) (Towbin *et al.*, 1979)**

Die Detektion der Proteine beruht hier auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Methode des Immunoblots ist in Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern sehr sensitiv. Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mithilfe einer Semi-Dry- oder Tank-Blotting-Apparatur auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden mit einer Blockierlösung abgesättigt. Dann erfolgte eine Inkubation der Membran mit einem Antikörper (Ak) gegen das entsprechende Antigen. Nach einem Waschschritt wurde ein Sekundärantikörper zugegeben, der gegen den ersten Ak gerichtet und mit Alkalischer Phosphatase oder Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Alle Inkubationsschritte erfolgten in Blockierlösung. Die Detektion erfolgte dann je nach Sekundärantikörper mit BCIP/NPT-Blue (kolorimetrisch, Sigma) bzw. mit DAB Metal (kolorimetrisch, Pierce) oder ECL (Chemilumineszenz, Amersham) jeweils nach Anweisung der Hersteller. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde der FujiMedical X-RayFilm SuperRX verwendet.

**Blockierlösung:** 0,5 % Tween 20  
1 % Milchpulver  
1 % BSA  
in PBS

**Waschpuffer:** 0,5 % Tween 20 in PBS

## B.6 PROTEINREINIGUNG

### B.6.1 Gewinnung von rekombinantem YscM1 und YscM2

#### B.6.1.1 Klonierung und Expression

*yscM1* und *yscM2* aus *Y. enterocolitica* WA-314 wurden in pGEX-6P-3 kloniert. Beide wurden per PCR mit den Primern *yscM1/2* 5'-BamHI und *yscM1/2* 3'-NotI amplifiziert, wobei BamHI- und NotI-Schnittstellen eingeführt wurden. Als Template für die PCR diente Gesamtzell-Lysat von WA-314. Die resultierenden Plasmide pGEX-6-*yscM1* und pGEX-6-*yscM2* wurden durch Sequenzierung bestätigt und zu Expressionszwecken in *E. coli* BL21 transformiert. In beiden Fällen wurden Übernachtskulturen 1:20 in LB-Medium verdünnt, mit Ampicillin supplementiert und bei 37 °C für ungefähr 3-4 h kultiviert ( $OD_{600\text{ nm}} \sim 0,8$ ). Die Expression wurde mit 1 mM IPTG induziert und die Bakterien über Nacht weiter kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 6 000 g geerntet und sofort eingefroren.

#### B.6.1.2 Affinitätsreinigung

Die aufgetauten Pellets wurden in PBS mit 1 mM PMSF, 1 mM DTT und 100 µg/ml Lysozym resuspendiert und durch 3 French Press-Zyklen (1000 psi) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation für 30 min bei 17 000 g wurde der Überstand geklärt und 1-2 h lang mit Glutathion(GSH)-Sephrose 4 FF (Amersham) bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die GSH-Matrix 3 mal mit PBS gewaschen und das gebundene GST-Fusionsprotein mit GSH-Elutionspuffer (10 mM GSH, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl) eluiert. Der GST-Affinitätsmarker wurde anschließend durch PreScission Protease nach Anweisung des Herstellers entfernt. Das Eluat wurde zuvor auf ungefähr 100 µl konzentriert, um die Effizienz der Proteasebehandlung zu erhöhen und da nur ein begrenztes Volumen auf die in der anschließenden Gelfiltration verwendeten Säulen aufgetragen werden konnte. Entsprechend der Molekularmasse der Proteine und der vermuteten Dimerbildung zwischen den GST-Affinitätsmarkern wurde ein Centricon-30-Konzentrator (Amicon) mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa verwendet. Bei der Konzentratormembran handelt es sich um regenerierte Zellulose.

### B.6.1.3 Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde mit dem SMART System (Amersham) durchgeführt. In Abhängigkeit von den Proteinmengen wurden die Säulen Superdex 75 PC 3.2/30 und HR 10/30 verwendet, die mit PBS equilibriert worden waren. Das Eluat wurde fraktioniert und mit SDS-PAGE analysiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden gepoolt und bei -20 °C eingefroren.

## B.6.2 Gewinnung von rekombinanter Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC)

### B.6.2.1 Klonierung und Expression

PEPC wurde als GST-Fusion in pGEX-4T-3 (Amersham Biosciences) exprimiert. Dafür wurde das PEPC-Gen *ppc* aus *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Primern *ppc* 5'-EcoRI und *ppc* 3'-NotI amplifiziert und in pGEM-T subkloniert. Mithilfe der Primer wurden die Restriktionschnittstellen *EcoRI* und *NotI* eingeführt. Als Template diente Gesamtzell-Lysat von WA-314. Nach Restriktionsverdau mit den genannten Enzymen und nachfolgender Reinigung aus dem Agarose-Gel wurde das resultierende Fragment mit pGEX-4T-3 ligiert. Die Expression von *ppc* erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS bei 27 °C. LB-Medium wurde mit einer Übernachtskultur 1:20 beimpft. Nach dem Erreichen einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von ~ 0,8 erfolgte Induktion der Expression mit 0,2 mM IPTG und Wachstum der Kultur über Nacht. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 6 000 g geerntet und sofort eingefroren.

### B.6.2.2 Affinitätsreinigung

Das Pellet wurde in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, supplementiert mit 100 mM NaCl und 5 mM DTT, resuspendiert und die Bakterien wurden durch 3 French Press-Zyklen (1000 psi) aufgeschlossen. Der geklärte Überstand (Zentrifugation für 30 min bei 17 000 g) wurde 1 h bei 4 °C mit Glutathion-Sepharose 4 FF inkubiert. Die GSH-Matrix wurde dann mit dem oben erwähnten Puffer gewaschen, in PBS aufgenommen und der GST-Rest wurde durch Thrombin über Nacht abgespalten. PEPC wurde durch Waschen von der Matrix entfernt und die Proteinlösung in Vorbereitung auf die anschließende Gelfiltration aufkonzentriert. Verwendet wurden Konzentratoren der Firma Amicon mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa.

### B.6.2.3 Gelfiltration

Die Gelfiltration wurden mit einem SMART System oder mit einem ÄKTA Explorer (beide Amersham) durchgeführt. Verwendet wurden die Säulen Superdex 200 PC 3.2/30 und Superdex 200 (26/60). Die Säulen wurden mit PBS oder 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl und 1 mM DTT equilibriert. Das Eluat wurde fraktioniert und mit SDS-PAGE analysiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden gepoolt und bei -20 °C eingefroren.

## B.6.3 Reinigung und Kristallisation von SycH

### B.6.3.1 Expression

*sycH* aus *Yersinia enterocolitica* wurde mit den Primern *sycH* 5'-NdeI und *sycH* 3'-BamHI amplifiziert, wobei die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Nde*I eingefügt wurden. Als Template diente Gesamtzell-Lysat von WA-314. Das resultierende Fragment wurde in pET-21b kloniert. Das mit dem Fragment eingeführte Stoppcodon verhinderte die Expression des durch pET-21b codierten His-Affinitätsmarkers. SycH wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS exprimiert. Eine Übernachtskultur wurde 1:20 in LB-Medium verdünnt. Die Induktion der Expression erfolgte mit 1 mM IPTG bei einer OD<sub>600 nm</sub> von ~ 0,8 und die Zellen wurden bei 27 °C über Nacht kultiviert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 6 000 g geerntet und sofort bei -20 °C eingefroren.

### B.6.3.2 Ammoniumsulfat-Fällung

Das Pellet wurde in 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM PMSF und 10 mM DTT resuspendiert und die Bakterien wurden durch 3 French Press-Zyklen (1000 psi) aufgeschlossen. Das Lysat wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 17 000 g geklärt und mit einer gesättigten (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung auf 30 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingestellt. Die Präzipitation der Proteine erfolgte bei 4 °C für eine Stunde unter ständiger Rotation. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 17 000 g gewonnen, 3 mal mit 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 30 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 10 mM DTT gewaschen, in 50 mM Tris-HCl pH 8,0 und 10 mM DTT resuspendiert und über Nacht gegen 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl und 1 mM DTT dialysiert.

### B.6.3.3 Ionenaustauschchromatographie

Nach Dialyse wurde das klare Lysat auf eine MonoQ-Säule gegeben, die vorher mit 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl und 1 mM DTT equilibriert worden war. Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumen Equilibrierungspuffer gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem 0-100 % Gradienten des Elutionspuffers (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M NaCl, 1 mM DTT). SycH eluierte bei ungefähr 300 mM NaCl. Die SycH-Fractionen wurden gepoolt und für die anschließende Gelfiltration aufkonzentriert. Aufgrund der Oligomerisierung von SycH konnten Konzentratoren mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa verwendet werden.

### B.6.3.4 Gelfiltration

Das Konzentrat wurde auf eine Superdex 75 PC 3.2/30 oder auf eine Superdex 75 (26/60) geladen, die vorher mit 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl und 1 mM DTT equilibriert worden war. Das Eluat wurde fraktioniert und die entsprechenden SycH-Fractionen gepoolt und analysiert.

### B.6.3.5 Kristallisation

Die Kristallisation von SycH wurde am Adolf-Butenandt-Institut, München, von Michael Groll durchgeführt. SycH-Kristalle wurden in einem hängenden Tropfen unter Dampfdiffusionsbedingungen bei 298 K gezüchtet. Es wurden SycH-Konzentrationen von 40 mg/ml verwendet. Dabei wurde 1,5 µl Protein mit 1 µl Reservoirlösung (0,1 M HEPES pH 7,2, 10 % PEG200) gemischt und Kristalle wuchsen innerhalb von 5 Tagen in einem hängenden Tropfen, der gegen 300 µl Reservoirlösung equilibriert wurde. Die Kristalle wurden mit Kryopuffer (25 % PEG200, 0,1 M HEPES pH 7,2) getränkt und für 30 s in einem Strom von flüssigem Stickstoff bei 100 K gefroren und am DESY-Center in Hamburg vermessen. Die Daten wurden mit verschiedenen Programmen ausgewertet. (Otwinowski & Minor, 1997; Otwinowski & Minor, 1998; French & Wilson, 1978)

## **B.6.4 Gewinnung und Reinigung eines polyklonalen PEPC-Antiserums**

### **B.6.4.1 Immunisierung**

Rekombinant gereinigtes Protein wurde in 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 4 M Harnstoff denaturierend gelöst und zur Immunisierung eines Kaninchens an die Firma Dr. Pineda in Berlin geschickt. Die Immunisierung des Kaninchens erfolgte initial mit 150 µg Protein, im Abstand von ca. 3 Wochen wurden jeweils weitere 100 µg Protein subkutan gespritzt. 10 Tage nach jeder Immunisierung wurden Serumproben auf ihren Antikörpertiter untersucht. Das Antikörper-Serum wird bei -20 °C gelagert.

### **B.6.4.2 Aufreinigung von polyklonalen PEPC-Antikörpern**

Da die Spezifität der PEPC-Antikörper nicht ausreichend war, erfolgte die Aufreinigung von polyklonalem PEPC-Antiserum mit CNBr-aktivierter Sepharose (Amersham). Die CN-Br-aktivierte Sepharose wurde nach Anweisung des Herstellers gewaschen und mit PEPC beladen. Freie Bindungsstellen der Sepharose wurden mit 100 mM Tris pH 8,0 abgesättigt. Anschließend wurde das PEPC-Antiserum mit der PEPC-beladenen Sepharose bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Sepharose mit Waschpuffer (siehe B.5.2.3) gewaschen. Die gebundenen PEPC-Antikörper wurde mit 100 mM Glycin pH 2,5 eluiert und sofort mit 3 M Tris-HCl pH 8,8 neutralisiert.

## **B.6.5 Quantitative Proteinbestimmung (abgewandelt nach Bradford, 1976)**

Die Quantifizierung von Proteinen in Lösung erfolgte mit dem Bio-Rad Protein Assay nach Anweisung des Herstellers. Der Assay basiert darauf, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250-Lösung von 465 nm zu 595 nm verschiebt, wenn eine Bindung an Proteine stattfindet. Als Standard wurde BSA verwendet.

### B.6.6 Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung)

Um eine Analyse von Proteinen aus dem Überstand von Bakterienkulturen mit SDS-PAGE durchzuführen, wurde die TCA-Fällung verwendet, um diese Proteine aus dem Kulturüberstand zu fällen. Dies erfolgte, indem 9 Teile Kulturüberstand mit 1 Teil Trichloressigsäure (TCA) gemischt wurden. Die vollständige Fällung der Proteine erfolgte bei 4 °C für mindestens eine Stunde. Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation bei 21 000 g verworfen und das Proteinpellet wurde 2 mal mit 4 °C kaltem Aceton gewaschen. Ein dritter Waschschrift erfolgte mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>. Das resultierende Pellet wurde dann in SDS-Auftragspuffer aufgenommen und mit SDS-PAGE analysiert.

### B.6.7 Konzentration von Proteinen

Proteinlösungen wurden mit Konzentratoren für die Zentrifuge der Firmen Vivascience und Amicon aufkonzentriert. Die beiden Konzentratoren unterscheiden sich in der verwendeten Membran. Die Membran der Amicon-Konzentratoren besteht aus regenerierter Zellulose, die der Vivascience-Konzentratoren aus Polyethoxysulfon. Je nach Größe des zu konzentrierenden Proteins wurden Konzentratoren mit einer Ausschlussgrenze von 3, 10 oder 30 kDa verwendet.

## B.7 GST-AFFINITÄTSBINDUNGSVERSUCH

Dieses Experiment diente der Identifizierung potentieller Protein-Protein-Wechselwirkungen. GST, GST-YscM1 und GST-YscM2 wurden exprimiert (siehe B.6.1) und ungefähr 200 µg der Proteine wurden jeweils an Glutathion-Sepharose gebunden. 50 ml BHI-Medium wurden 1:20 aus einer Übernachtskultur von WA-314 oder WA-C beimpft und entweder bei 27 °C oder bei 37 °C für einige Stunden kultiviert. Die Kulturen bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C wurden mit 5 mM EGTA und 10 mM MgCl<sub>2</sub> supplementiert, um das Typ III-Sekretionssystem und damit die Yop-Sekretion zu stimulieren. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert und in PBS mit verschiedenen Protease-Inhibitoren resuspendiert. Lyse erfolgte durch 3 French Press-Zyklen bei 1000 psi. An die GSH-Matrix gebundenes GST, GST-YscM1 und GST-YscM2 wurden mit diesen Zell-Lysaten 30 min bei 4 °C inkubiert und mit PBS gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden anschließend mit SDS-PAGE (siehe B.5.1.1) analysiert.

### B.8 MASSENSPEKTROMETRIE

Die Massenspektrometrie wurde von Guido Sauer<sup>1</sup> durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben erfolgte durch Trypsinverdau direkt im Gel. Die resultierende Mischung aus Peptiden wurde mit MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionisation kombiniert mit time of flight-Detektor) auf einem Bruker Daltonics (Bremen) ReflexIII, ausgestattet mit einer Scout348™-Quelle, bei einer Ionisierungsspannung von 20 V analysiert. (Tsarbopoulos *et al.*, 1994). Peptidmassen wurden mit Mascot (<http://www.mascotscience.com/>) analysiert.

### B.9 CO-IMMUNOPRÄZIPITATION

Ziel dieser Methode ist der Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkung aus zytosolischen Lysaten. Das Verfahren beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion.

#### Durchführung:

- die beiden potentiellen Interaktionspartner wurden in *Yersinia enterocolitica* WA-314 bei 37 °C in BHI, supplementiert mit 1 mM CaCl<sub>2</sub>, exprimiert
- bei der Verwendung von Expressionsvektoren erfolgte die Kultivierung bei 27 °C in BHI + 1 mM CaCl<sub>2</sub>, induzierbare Systeme wurden mit 1 mM IPTG induziert
- Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 10 000 g für 30 min bei 4 °C gewonnen
- die Pellets wurden in PBS, 1 mM PMSF, 10 mM DTT, 100 µg/ml Lysozym resuspendiert (200 ml Kultur in 5 ml Puffer)
- Zur Lyse der Bakterien wurden diese mehrmals eingefroren und aufgetaut bis die Bakterien-suspension eine schleimige Konsistenz aufwies; die Gewinnung des Überstands erfolgte durch Zentrifugation bei 20 000 g für 30 min bei 4 °C
- Anschließend wurde eine Gesamtproteinbestimmung des Überstands durchgeführt und die unterschiedlichen Proben wurden auf eine einheitliche Proteinmenge geeicht
- zum Lysat wurde ein polyklonaler Antikörper gegeben, der gegen einen der beiden Wechselwirkungspartner gerichtet war; es wurden 20 – 50 µl Antikörper eingesetzt
- die Inkubation erfolgte bei 4 °C für 1 h unter Rotation

---

<sup>1</sup> GSF, Marchioninistraße 25, 81377 München, derzeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried



- im nächsten Schritt wurden 20  $\mu\text{l}$  Protein A/G-Agarose (Santa Cruz) zugegeben, um den Antigen-Antikörper-Komplex zu binden und zu immobilisieren
- es folgten 4 Waschschrte (Waschpuffer: PBS, 1 mM PMSF, 10 mM DTT), Zentrifugation für 5 min bei 1000 g
- abschließend wurde die Agarose-Matrix in 25  $\mu\text{l}$  SDS-Auftragspuffer (siehe B.5.1.1) suspendiert und mit SDS-PAGE und Immunoblot analysiert

#### B.10 PEPC-AKTIVITÄTSASSAY (Smith, 1968)

Die Enzymaktivität von PEPC wurde photospektrometrisch bestimmt. Im ersten Schritt wurde Phosphoenolpyruvat (PEP) durch PEPC zu Oxalacetat carboxyliert. In einer nachgeschalteten Reaktion wurde das entstandene Oxalacetat durch Malatdehydrogenase (MDH) zu L-Malat umgesetzt, wobei NADH zu NAD<sup>+</sup> oxidiert wurde. So war eine Messung der Enzymaktivität von PEPC über die Bestimmung der Abnahme von NADH im Reaktionsansatz bei 340 nm möglich. Die Messungen erfolgten bei 37 °C. Es wurden jeweils 3 unabhängige Messungen durchgeführt und die Werte der Steigungen gemittelt.

**Reaktionsansatz:**

- 100 mM Tris-HCl pH 8,0
- 10 mM NaHCO<sub>3</sub>
- 10 mM MgSO<sub>4</sub>
- 0,2 mM NADH
- 1 U MDH

Dem Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 100  $\mu\text{l}$  wurden PEPC und mögliche Effektoren zugesetzt. Das Gemisch wurde 5 min bei 37 °C vorinkubiert. Zu dem Ansatz wurde dann das Substrat PEP in einer Konzentration von 5 mM gegeben, um die enzymatische Reaktion zu starten. Gereinigte PEPC wurde dabei so eingesetzt, dass die Abnahme der Absorption bei 340 nm ungefähr 0,1/min entsprach. Gereinigtes YscM1 bzw. YscM2 wurden als Effektoren in Konzentrationen von 100 nM eingesetzt, die von ihnen abgeleiteten Peptide mit einer Endkonzentration von ca. 100  $\mu\text{M}$ .

## B.11 WACHSTUMSVERSUCHE

Um den Einfluss von PEPC auf das Wachstum der Yersinien unter verschiedenen Bedingungen zu testen, wurden die Bakterien in unterschiedlichen Nährmedien kultiviert.

### B.11.1 Wachstumsversuche in BHI

Yersinien wurden über Nacht in BHI bei 27 °C angezogen. Die Kulturen wurden so verdünnt, dass die Start-OD<sub>600 nm</sub> ungefähr 0,1 betrug. Das Medium wurde mit 1 mM Ca<sup>2+</sup> bzw. mit 5 mM EGTA/10 mM MgCl<sub>2</sub> supplementiert. Bei der Überexpression von YscM1 oder YscM2 mit pWS-yscM1 und pWS-yscM2 wurde dem Medium außerdem 1 mM IPTG hinzugefügt. Wachstum der Kulturen erfolgte bei 27 °C oder 37 °C. Die OD<sub>600 nm</sub> wurde in regelmäßigen Abständen bestimmt. Für jede Messung wurden 3 Ansätze aus unabhängigen Übernachtskulturen angeimpft.

### B.11.2 Wachstumsversuche in M9-Medium

Das M9-Medium (Sigma) wurde aus 10 x M9-Salzen hergestellt und mit MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> und Glukose supplementiert (siehe B.3.1).

#### Durchführung:

- Bakterien über Nacht in BHI mit Antibiotika bei 27 °C kultivieren
- 2 ml ÜN-Kultur mit 2 ml M9-Medium waschen und in 2 ml M9-Medium aufnehmen
- OD<sub>600 nm</sub> bestimmen, die Zellen dafür 1:10 verdünnen
- 20 ml M9-Medium supplementiert mit Casamino Acids, Thiamin und IPTG mit den gewaschenen Zellen beimpfen, so dass die resultierende OD<sub>600 nm</sub> ~ 0,1 beträgt
- die Start-OD<sub>600 nm</sub> messen, Kultivierung der Zellen bei 27 °C
- jede Stunde 1 ml Kultur entnehmen und OD<sub>600 nm</sub> bestimmen

**B.11.3 Wachstumsversuche in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)**

Das hier verwendete Dulbecco's Modified Eagle Medium wurde über die Firma Gibco bezogen (Art.-Nr. 21068-028). Das Zellkulturmedium ist aus verschiedenen Aminosäuren, Vitaminen und anorganischen Salzen zusammengesetzt, die in Tabelle B.11.1 aufgeführt sind.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration (mg/l)</b>
Glycin	30
L-Arginin	84
L-Cystein	63
L-Histidin	42
L-Isoleucin	105
L-Leucin	105
L-Lysin	146
L-Methionin	30
L-Phenylalanin	66
L-Serin	42
L-Threonin	95
L-Tryptophan	16
L-Tyrosin	104
L-Valin	94
Cholinchlorid	4
D-Calciumpantothenat	4
Folsäure	4
Inositol	7,2
Niacinamid	4
Pyridoxal	4
Riboflavin	0,4
Thiamin	4
Eisennitrat	0,1
Magnesiumsulfat	97,67
Kaliumchlorid	400
Natriumhydrogencarbonat	3700
Natriumchlorid	6400
Natriumdihydrogenphosphat	125
D-Glukose	4500
Phenolrot	15

**Tab. B.11.1 Zusammensetzung des verwendeten DMEM**

Für die folgenden Experimente wurde das Medium standardmäßig mit 0,2 % FCS supplementiert (Lee *et al.*, 2001).

**B.11.3.1 Wachstumsversuche in Zellkulturflaschen (Lee *et al.*, 2001)****Durchführung:**

- Yersinien ÜN in LB mit Antibiotika anziehen
- 30 ml LB-Medium 1:20 aus der ÜN-Kultur beimpfen und mit Antibiotika supplementieren; Kultivierung der Bakterien bei 27 °C für 2 h
- OD<sub>600 nm</sub> bestimmen; Zellen 2 mal mit 0,9 % NaCl waschen und in DMEM aufnehmen
- 10 ml DMEM in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) supplementiert mit 0,2 % FCS und mit bzw. ohne 1,8 mM CaCl<sub>2</sub> mit 2,5 x 10<sup>8</sup> Keimen (entspricht OD<sub>600 nm</sub> ~ 1,0) beimpfen
- Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> für 3 h
- OD<sub>600 nm</sub> erneut bestimmen, den Kulturüberstand durch Zentrifugation für 30 min bei 10 000 g gewinnen
- 4,5 ml Überstand mit 0,5 ml TCA fällen
- YopE-Sekretion mit SDS-PAGE und Immunoblot analysieren

**B.11.3.2 Wachstum in Erlenmeyer-Kolben****Durchführung:**

- Yersinien ÜN in LB mit den entsprechenden Antibiotika anziehen
- 2 ml ÜN-Kultur 2 mal mit 0,9 % NaCl waschen und in 2 ml DMEM aufnehmen
- Wachstum in DMEM erfolgte in 20 ml supplementiert mit 0,2 % FCS und mit bzw. ohne 1,8 mM CaCl<sub>2</sub> bei 37 °C im Schüttelinkubator; den Proben ohne CaCl<sub>2</sub> wurden zusätzlich 5 mM EGTA zugesetzt
- Kulturen wurden so beimpfen, dass die Start-OD<sub>600 nm</sub> ungefähr 0,1 betrug
- OD<sub>600 nm</sub> zu Beginn des Experiments und jede weitere Stunde bestimmen
- zu Ende des Experiments nach ca. 6 – 8 h Überstände durch Zentrifugation für 30 min bei 10 000 g gewinnen
- 4,5 ml Überstand mit 0,5 ml TCA fällen
- YopE-Sekretion mit SDS-PAGE und Immunoblot analysieren

**B.12 INFEKTION VON HELa-ZELLEN MIT *YERSINIA ENTEROCOLITICA***

Konfluente HeLa-Zellen wurden mit *Y. enterocolitica* WA-314, WA-314 $\Delta$ *ppc*, WA-314 $\Delta$ *yscM1* und WA-314 $\Delta$ *yscM2* infiziert.

**Durchführung:**

- Bakterien ÜN bei 27 °C in BHI unter entsprechendem Selektionsdruck anziehen
- aus der ÜN-Kultur 10 ml BHI (supplementiert mit den entsprechenden Antibiotika) 1:10 beimpfen und für 2 h bei 37 °C inkubieren
- Bakterienkultur bei 6 000 g für 10 min abzentrifugieren und in 200  $\mu$ l PBS resuspendieren
- OD<sub>600 nm</sub>-Bestimmung, dazu Zellen 1:10 verdünnen
- OD<sub>600 nm</sub> zum Infizieren auf 0,36 einstellen, Zugabe von x  $\mu$ l, um eine OD<sub>600 nm</sub> von 0,36 zu erreichen:  $(OD_{600\text{ nm}}/0,36) \times 100 - 100 = x \mu\text{l}$
- HeLa-Zellen mit PBS waschen, in DMEM aufnehmen und Bakteriensuspension zugeben
- HeLa-Zellen 1 h bei 37 °C mit den Bakterien inkubieren
- Bakterien dann mit 50 mg/ml Gentamycin abtöten: 30 min bei 37 °C
- 1 x mit PBS Bakterien abwaschen
- 15 ml DMEM zur HeLa-Zellkultur geben, dazu Proteinase K 1:1000 (30 mg/ml) bei 37 °C für 15 min, um die Zellen von der Zellkulturflasche (175 cm<sup>2</sup>) abzulösen
- HeLa-Zellen bei 4 °C und 2 000 g 5 min lang abzentrifugieren
- Pellet in 1 ml PBS supplementiert mit 1 mM PMSF resuspendieren
- Lyse der Zellen mit 75  $\mu$ l NP-40-Lysispuffer
- 10 min auf Eis, Probe bei 20 000 g und 4 °C abzentrifugieren
- Gesamtproteinbestimmung des Überstands mit dem Bio-Rad Proteinassay (siehe B.6.5)
- Pellets und Überstand bei -20 °C einfrieren
- Proben mit SDS-PAGE und Immunoblot analysieren

### **B.13 MAUSVERSUCHE**

Die Mausversuche wurden wie beschrieben durchgeführt (Roggenkamp *et al.*, 1995).

#### **B.13.1 Mauspassage**

Erfahrungsgemäß ergeben Mausinfektionsversuche reproduzierbarer Ergebnisse, wenn der betreffende Stamm vorher Maus-passagiert wurde. Deshalb wurden  $10^7$  der zu untersuchenden Bakterien intraperitoneal in eine C57BL/6-Maus gespritzt. Die Maus wurde nach 24 h getötet und der Bauchraum mit PBS ausgespült. Die Lavage wurde auf antibiotikahaltigem LB-Agar ausplattiert. Die gewachsenen Yersinien wurden 1:20 aus einer ÜN-Kultur in LB-Medium angeimpft, Wachstum erfolgte bei 27 °C bis zur späten exponentiellen Phase. Die Kultur wurde dann abzentrifugiert (4 000 g, 5 min, 4 °C) und in der gleichen Menge LB-Medium mit 10 % Glycerol resuspendiert. Aliquots von 1 ml wurden bei -80 °C eingefroren.

#### **B.13.2 Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlen wurden vor und nach dem Einfrieren der Zellen bestimmt. Dazu wurde 1 ml Kultur 2 mal mit PBS gewaschen, verschiedene Verdünnungen der Zellsuspension ausplattiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

#### **B.13.3 Infektion**

Die Infektion erfolgte oral. Je fünf 6-8 Wochen alte C57BL/6-Mäuse wurden mit  $10^8$  Bakterien des jeweiligen Stammes infiziert. Bei kompetitiven Infektionsversuchen wurden je  $10^8$  Bakterien der konkurrierenden Stämme gemischt. Die Bakteriensuspension wurde mit einer Pipette an die Mäuse verfüttert. Vier Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet. Leber, Milz und Peyer'sche Plaques wurden aseptisch entnommen. Das Darmlumen wurde mit 5 ml PBS gespült. Die Organe wurden in PBS (Milz, Peyer'sche Plaques: 1 ml / Leber: 5 ml) homogenisiert, verdünnt und auf CIN-Agar ausplattiert. Die Darmlavage wurde ebenfalls verdünnt und ausplattiert. Bei kompetitiver Infektion wurde ein Cm-resistenter WA-314-Stamm als Vergleichsstamm verwendet (Trülzsch *et al.*, 2004). Den Agar-Platten wurde deshalb zusätzlich entweder Chloramphenicol für den Vergleichsstamm oder Kanamycin für die Mutante zugesetzt. Nach Inkubation bei 27 °C wurden die Kolonien ausgezählt und daraus die Gesamtkeimzahl in den Organen errechnet.

## C. ERGEBNISSE

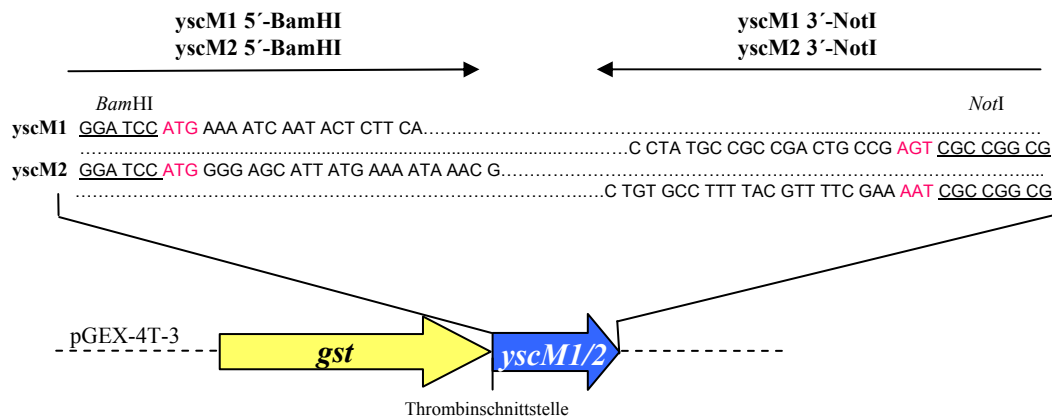
Das Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der Funktionen von YscM1 und YscM2 in *Yersinia enterocolitica*. Bisher ging man davon aus, dass beide Proteine funktionell gleichwertige negative Regulatoren des Typ III-Sekretionssystems (TTSS) sind. Es fiel jedoch auf, dass sich die isoelektrischen Punkte (pI) der beiden Proteine deutlich von einander unterscheiden (YscM1: pI von 6,05 / YscM2: pI von 9,79). Aufgrund dessen kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich YscM1 und YscM2 trotz ihrer Identität von ungefähr 57 % funktionell unterschiedlich entwickelt haben. Um YscM1 und YscM2 näher zu charakterisieren, sollten Interaktionspartner der beiden Proteine identifiziert werden.

### C.1 REINIGUNG VON GST-YSCM1 UND GST-YSCM2

Wechselwirkungsstudien sollten eine Identifizierung potentieller Wechselwirkungspartner in *Yersinia enterocolitica* möglich machen. Hierzu wurde die Immobilisierung von YscM1 und YscM2 als GST-Fusionsproteine an eine Glutathion-Matrix angestrebt. Die immobilisierten Fusionsproteine sollten dann mit verschiedenen Yersinien-Lysaten inkubiert werden. Um dieses Experiment durchzuführen, war im ersten Schritt die Klonierung, Expression und Reinigung von GST-YscM1 und GST-YscM2 notwendig.

#### C.1.1 Klonierung von *yscM1* und *yscM2* in den Expressionsvektor pGEX-4T-3

Über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Not*I wurden *yscM1* und *yscM2* nach Amplifizierung aus *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Primern *yscM1/2* 5'-*Bam*HI und *yscM1/2* 3'-*Not*I und Subklonierung in pGEM-T in den Expressionsvektor pGEX-4T-3 ligiert. Der Vektor enthält das Gen für die Glutathion-S-Transferase (*gst*) unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors. Der Vektor kodiert außerdem für den *lac*-Repressor (*lacI<sup>q</sup>*) und eine Ampicillinresistenz (*bla*). Zur Abspaltung des GST-Affinitätsmarkers kodiert er für eine Thrombinschnittstelle. Die korrekte Sequenz der beiden resultierenden Plasmide pGEX-*yscM1* und pGEX-*yscM2* wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Konstruktion der beiden Plasmide ist in Abbildung C.1.1 schematisch dargestellt.



**Abb. C.1.1 Konstruktion von pGEX-yscM1 und pGEX-yscM2.** Die schwarzen Pfeile geben die Lage der Primer an. Mit den dargestellten Primern wurden *yscM1* und *yscM2* aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert, in pGEM-T subkloniert und über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Not*I stromabwärts von *gst* in pGEX-4T-3 kloniert. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Start- und Stoppcodon sind farblich hervorgehoben.

### C.1.2 Expression und Reinigung von GST-YscM1 und GST-YscM2

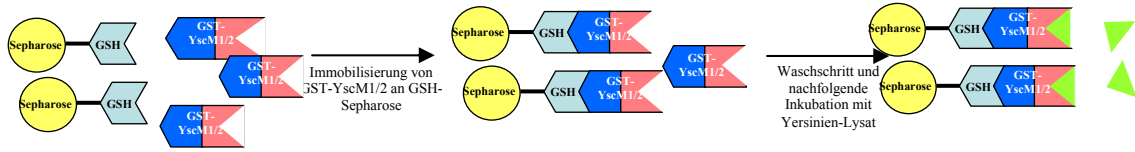
Die Fusionsproteine von YscM1 und YscM2 wurden in *E. coli* BL21 bei 37 °C exprimiert. Die Bakterienzellen wurden mit der French Press aufgeschlossen und das Lysat mit Glutathion-Sepharose inkubiert. Nach der spezifischen Bindung der GST-Fusionsproteine von YscM1 und YscM2 an die GSH-Matrix wurden Verunreinigungen durch Waschen entfernt. Mit den immobilisierten Proteinen wurde dann eine Affinitätsreinigung zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner durchgeführt.

## C.2 INTERAKTIONSPARTNER VON YSCM1 UND YSCM2 IN *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Die immobilisierten GST-Fusionsproteine von YscM1 und YscM2 und gebundenes GST als Negativkontrolle wurden mit verschiedenen *Y. enterocolitica*-Lysaten des pathogenen Stammes *Y. enterocolitica* WA-314 und seines Derivats WA-C, der kein Virulenzplasmid besitzt, inkubiert. Die Kultivierung der Yersinien erfolgte parallel unter Bedingungen, die die Aktivierung des pYV-kodierten TTSS bewirkten oder diese verhinderten. Eine Expression der Gene des TTSS erfolgt durch Kultivierung bei 37 °C und Zugabe von Ca<sup>2+</sup>-chelatierendem EGTA sowie MgCl<sub>2</sub>. Dagegen wird diese durch Kultivierung bei 27 °C unterdrückt. Die Yersinien-Lysate wurden durch Aufschluss der Bakterien mit der French Press gewonnen. Nach Inkubation der GSH-Sepharose mit den unterschiedlichen Lysaten wurden die immobilisierten Proteine gewa-

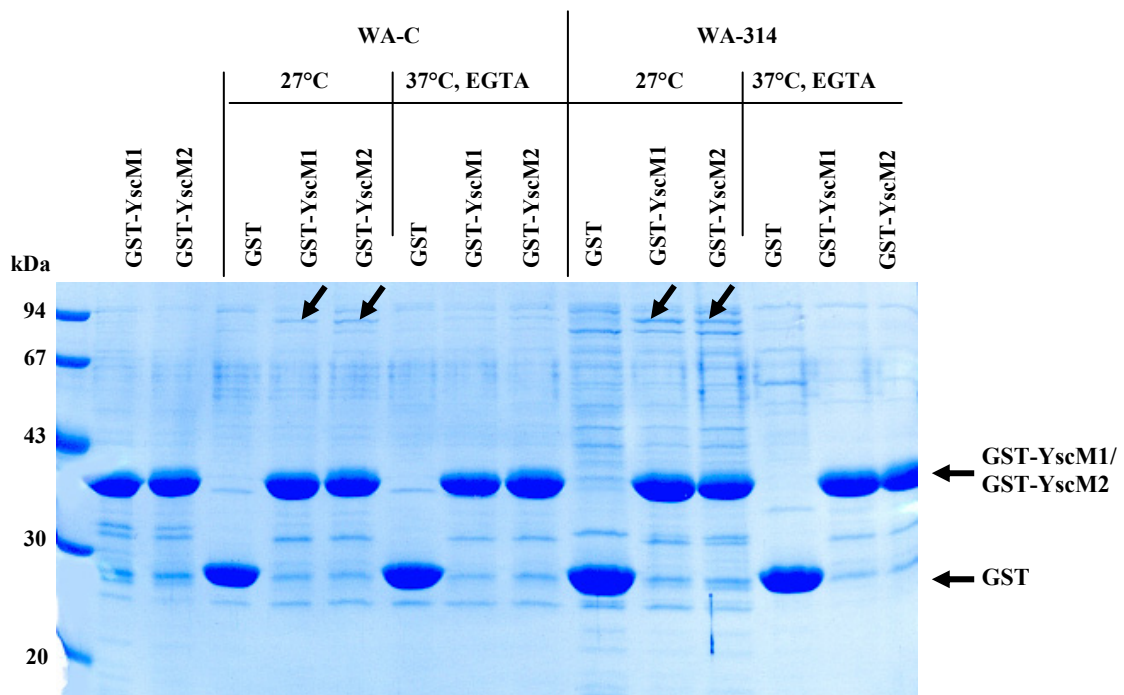


schen und mit SDS-PAGE auf mögliche Interaktionspartner von YscM1 und YscM2 untersucht. Das Prinzip der Affinitätsreinigung ist schematisch in Abbildung C.2.1 dargestellt.



**Abb. C.2.1 Wechselwirkungspartner von YscM1/2 in *Y. enterocolitica*.** GST-Fusionsproteine von YscM1 und YscM2 wurden an GSH-Sepharose immobilisiert, gewaschen und dann mit Yersinien-Lysat inkubiert, das durch Aufschluss der Zellen mit der French Press gewonnen wurde. Mögliche Interaktionspartner von YscM1 und YscM2 binden an die immobilisierten Fusionsproteine und können mittels SDS-PAGE analysiert werden.

In Abbildung C.2.2 ist das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel gezeigt, das einen ersten Hinweis auf das Vorhandensein eines potentiellen Wechselwirkungspartners liefert. Eine Bande im Gel bei ungefähr 90 kDa ist nur sichtbar, wenn YscM1 und YscM2 mit den Yersinien-Lysaten inkubiert wurden. Die GST-Kontrolle und nicht mit Lysat inkubiertes YscM1 und YscM2 weisen diese Wechselwirkung nicht auf. Aus der Abbildung wird außerdem ersichtlich, dass die fragliche Bande bei 27 °C deutlich prominenter auftritt. Des Weiteren zeigt die Tatsache, dass die Interaktion auch nach Inkubation mit dem WA-C-Lysat nachweisbar ist, dass es sich bei dem Wechselwirkungspartner um ein chromosomal kodiertes Protein handelt.



**Abb. C.2.2 Affinitätsreinigung.** GST-YscM1, GST-YscM2 und GST als Kontrolle wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit Lysaten von *Y. enterocolitica* WA-314 und WA-C inkubiert. Die GST-Fusionsproteine in den ersten beiden Spuren wurden nicht mit Yersinien-Lysaten inkubiert. Die immobilisierten Proteine wurden nach Waschen mittels SDS-PAGE auf potentielle Wechselwirkungspartner untersucht. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Die Pfeile markieren die fragliche Bande bei ca. 90 kDa.

### C.3 IDENTIFIZIERUNG DES POTENTIELLEN INTERAKTIONSPARTNERS

#### C.3.1 Massenspektrometrie

Eine Identifizierung des möglichen Interaktionspartners erfolgte durch Massenspektrometrie. Die fragliche Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, das Protein im Gel mit Trypsin verdaut und das resultierende Peptidgemisch mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert<sup>2</sup>. Die massenspektrometrisch identifizierten Peptidfragmente wurden in die Mascot-Suchmaschine (<http://www.matrixscience.com/>) eingespeist und dort mit bekannten Proteinsequenzen verglichen. Die Suchergebnisse sind in Abbildung C.3.1 dargestellt. Die Ergebnisse der Auswertung wurden mit  $-10 \cdot \log(P)$  berechnet. P ist die Wahrscheinlichkeit, dass der beobachtete Treffer zufällig ist. Auswertungsergebnisse größer als 72 sind signifikant ( $p < 0,05$ ). Abbildung C.3.1 zeigt, dass es sich bei dem potentiellen Wechselwirkungspartner um Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) handelt.

In Abbildung C.3.2 ist die Proteinsequenz von PEPC aus *Y. pestis* CO92 dargestellt. Zum Zeitpunkt der Analyse war die Sequenz von PEPC aus *Y. enterocolitica* noch nicht verfügbar. Die massenspektrometrisch identifizierten Peptidfragmente, die mit der Sequenz von PEPC übereinstimmen, sind in rot dargestellt. Sie decken dabei ungefähr 26 % der gesamten Aminosäuresequenz des Proteins ab.

---

<sup>2</sup> Die Massenspektrometrie wurde von Guido Sauer, Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Zellbiologie, Am Klopferspitz 18a, 82152 Martinsried durchgeführt.

Zugangsnummer	Masse	Score	Beschreibung
1. <a href="#">AE0478</a>	98889	146	phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31) [imported] - <i>Yersinia pestis</i> (strain C092)
2. <a href="#">QYEC</a>	99456	101	phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31) - <i>Escherichia coli</i> (strain K-12)
3. <a href="#">1FIYA</a>	98330	93	phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31), chain A - <i>Escherichia coli</i> (fragments)
4. <a href="#">E91239</a>	99500	92	phosphoenolpyruvate carboxylase [imported] - <i>Escherichia coli</i> (strain O157:H7, substrain RIMD 05099)
5. <a href="#">B86087</a>	99498	92	phosphoenolpyruvate carboxylase [imported] - <i>Escherichia coli</i> (strain O157:H7, substrain EDL933)
6. <a href="#">AD0936</a>	99391	91	phosphoenolpyruvate carboxylase [imported] - <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi (str
7. <a href="#">Q961M1</a>	103957	81	GH16431p.- <i>Drosophila melanogaster</i> (Fruit fly).
8. <a href="#">Q9VB71</a>	104413	81	CG6059 protein.- <i>Drosophila melanogaster</i> (Fruit fly).
9. <a href="#">Q8ZKM0</a>	99396	74	Phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31).- <i>Salmonella typhimurium</i> .
10. <a href="#">Q978T9</a>	41705	71	ATP-dependent RNA helicase.- <i>Thermoplasma volcanium</i> .

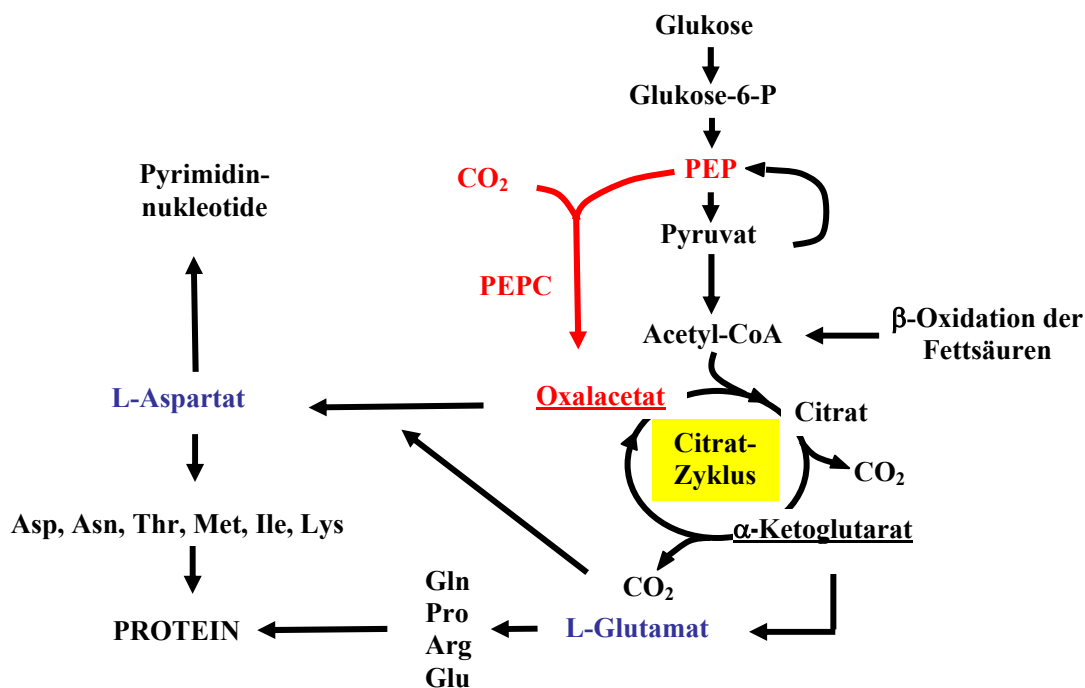
**Abb. C.3.1 Ergebnisse der Mascot-Suchmaschine.** Massenspektrometrisch identifizierte Peptidfragmente wurden in die Mascot-Suchmaschine eingespeist und dort mit Sequenzen bekannter Proteine verglichen. Die Ergebnisse der Auswertung wurden mit  $-10 \cdot \log(P)$  berechnet, wobei P die Wahrscheinlichkeit dafür angibt, dass der Treffer zufällig ist. Auswertungsergebnisse größer als 72 sind signifikant ( $p < 0,05$ ). Die ersten 10 Treffer sind mit ihrer Zugangsnummer und Masse aufgeführt.

1	MNEQYSAMRS	NVSMGLGTLG	DTIKEALGEH	ILDRVETIRK	LSKSSRAGNE
51	ASRQELLTTL	QNLSNDELLP	VARAFSQFLN	LTNTAEQYHS	ISPHGEAASN
101	PEALAQLFTR	LKDKKLSDDQ	MRSVDDLSI	ELVLTAPTE	ITRRTLHKL
151	VEVNTCLSQ	DHNDLADYER	NKIMRRLRQL	VAQSWHTDEI	RKLRSPVDE
201	AKWGFVAVEN	SLWEGVPAFL	REFNEQLENS	LDYRLPVEAV	<b>PIRFTSWMGG</b>
251	DRDGNPNVTA	EITRHVLLLS	RWKATDLFLR	DIQVLVSELS	MSECTPELRE
301	LAGGEEVLEP	YRQLMKNVRT	<b>QLTNTQAYLE</b>	ARLKGervLP	PHDLLVSNQD
351	LWEPLYACYQ	SLKACGMEII	ANGQLLDTLR	RVRCFGVPLV	RIDVRQESTR
401	<b>HTDAIAELTR</b>	YLGLGDYESW	SESDKQAFV	RELNSKRPLV	<b>PLKWEPSAET</b>
451	QEVLETCTRVI	AEAPQGSIAA	YVISMakVPS	<b>DVLAVHLLK</b>	EAGCPFTLPV
501	APLFETLDDL	NNADDVMTQL	LGIDWYRGLI	<b>QGGKQVMIGY</b>	<b>SDSAKDAGVM</b>
551	<b>AASWAQYRAQ</b>	DALIKTCEKA	GITLTLFHGR	GGSIGRGGAP	AHAALLSQPP
601	GSLKGLRVT	<b>EQGEMIRFKF</b>	GLPEVTISL	ALYAGAILEA	NLLPPEPKK
651	EWIEVMDLLS	DASCDMYRSY	VRENPEFVRY	<b>FRAATPELEL</b>	<b>GKLPLGSRPA</b>
701	<b>KRRPDGGVES</b>	<b>LRAIPWIFAW</b>	<b>TQNRLMLPAW</b>	LGAGAGLQRA	IDAGKQDVLA
751	TMCRDWPFFS	<b>TRIGMLEMVF</b>	<b>AKADLWLAEY</b>	<b>YDQRLVDKSL</b>	<b>WPLGQQLRDQ</b>
801	LAADIKVVLA	IANDDHLMD	LPWIAESIAL	RNVYTDPLNV	LQAEALLHRSR
851	QQEHDPACVE	QALMVTIAGV	AAGMRNTG		

**Abb. C.3.2** Die Proteinsequenz von PEPC aus *Yersinia pestis* C092 ist hier dargestellt. Massenspektrometrisch identifizierte Peptide, die mit dieser Sequenz von PEPC übereinstimmen, sind fett markiert.

### C.3.2 Die Phosphoenolpyruvatcarboxylase: ein anaplerotisches Stoffwechsellzym

Bei der Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) handelt es sich um ein Stoffwechsellzym. Es katalysiert die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Oxalacetat (Abb. C.3.3, in rot dargestellt) und erfüllt eine so genannte anaplerotische Funktion. Die PEPC-Reaktion dient in vielen Bakterien der Auffüllung des Citrat-Zyklus mit Oxalacetat, da dem Citrat-Zyklus ständig Oxalacetat oder andere Vorstufen (in Abb. C.3.3 unterstrichen) für Biosynthesezwecke entzogen werden. Wird der Citrat-Zyklus nicht wieder mit Oxalacetat aufgefüllt, fehlt der Akzeptor für Acetyl-CoA und es besteht die Gefahr, dass der Citrat-Zyklus zum Erliegen kommt. Dies wird durch die PEPC-Reaktion verhindert, die somit die Energiegewinnung über den Citrat-Zyklus aufrechterhält. PEPC ist in tierischen und menschlichen Geweben nicht vorhanden. Stattdessen erfolgt die Auffüllung des Citrat-Zyklus in diesen Fällen durch Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat durch das Enzym Pyruvatcarboxylase. Bei Bakterien ist die PEPC-Reaktion besonders bei Wachstum auf Glukose, Pyruvat (oder anderen C<sub>3</sub>-Verbindungen) und Fettsäuren als Kohlenstoffquelle von großer Bedeutung (Morikawa *et al.*, 1980).



**Abb. C.3.3 Schematische Darstellung der Funktion von PEPC im Stoffwechselgefüge.** Im rechten Teil der Abbildung ist stark vereinfacht die Glykolyse dargestellt. Glukose wird über verschiedene Zwischenschritte zu Acetyl-CoA abgebaut. Dieses wird durch Kondensation mit Oxalacetat in den Citrat-Zyklus eingeschleust. Im Zyklus erfolgt die komplette Oxidation des Acetyl-Rests unter Regenerierung von Oxalacetat, das so wieder als Akzeptor für Acetyl-CoA zur Verfügung steht. Wird Oxalacetat oder auch  $\alpha$ -Ketoglutarat (beide unterstrichen) für die Biosynthese von Aminosäuren aus dem Citrat-Zyklus entfernt, besteht die Gefahr, dass die Zelle an Oxalacetat verarmt. Hier spielt die anaplerotische Funktion von PEPC eine große Rolle, um Oxalacetat wieder als Akzeptor für Acetyl-CoA bereit zustellen. Phosphoenolpyruvat (PEP) wird durch PEPC zu Oxalacetat carboxyliert.

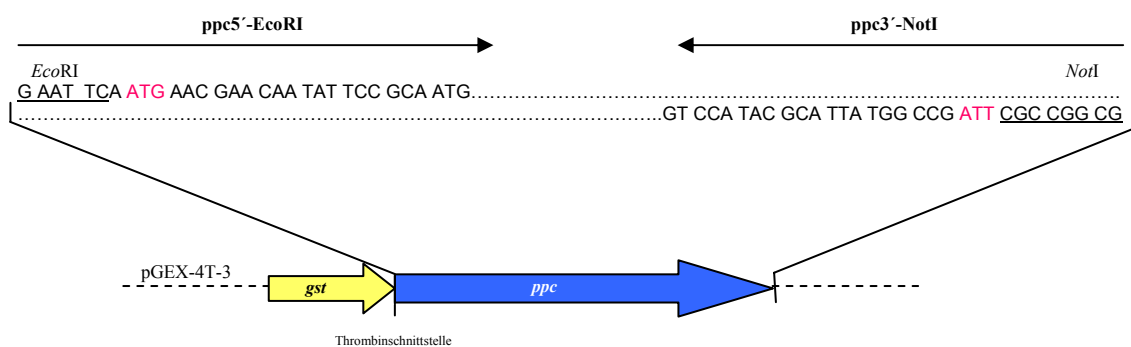
## C.4 PROTEINREINIGUNGEN

Um die Wechselwirkung zwischen YscM1 und YscM2 und PEPC näher zu charakterisieren, wurde die Expression und Reinigung dieser Proteine angestrebt. Das Chaperon der beiden Typ III-Proteine, SycH, wurde ebenfalls gereinigt, um einen möglichen Einfluss von SycH auf die Interaktion zu untersuchen.

### C.4.1 Reinigung von PEPC

#### C.4.1.1 Klonierung von *ppc* in den Expressionsvektor pGEX-4T-3

Das 2,6 kb große PEPC-Gen *ppc* von *Y. enterocolitica* wurde mit einer DNA-Polymerase mit Korrekturlese-Aktivität aus *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Primern *ppc* 5'-EcoRI und *ppc* 3'-NotI amplifiziert, in pGEM-T subkloniert und anschließend stromabwärts von *gst* über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *NotI* in den Expressionsvektor pGEX-4T-3 ligiert. Die korrekte Sequenz des resultierenden Plasmids pGEX-*ppc* wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Konstruktion von pGEX-*ppc* ist in Abbildung C.4.1 schematisch dargestellt.



**Abb. C.4.1 Konstruktion des Expressionsvektors pGEX-*ppc*.** Die schwarzen Pfeile geben die Lage der Primer an. Mit den dargestellten Primern wurde *ppc* aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert, in pGEM-T subkloniert und über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *NotI* stromabwärts von *gst* in pGEX-4T-3 kloniert. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Start- und Stoppcodon sind farblich hervorgehoben.

#### C.4.1.2 Expression von *ppc*

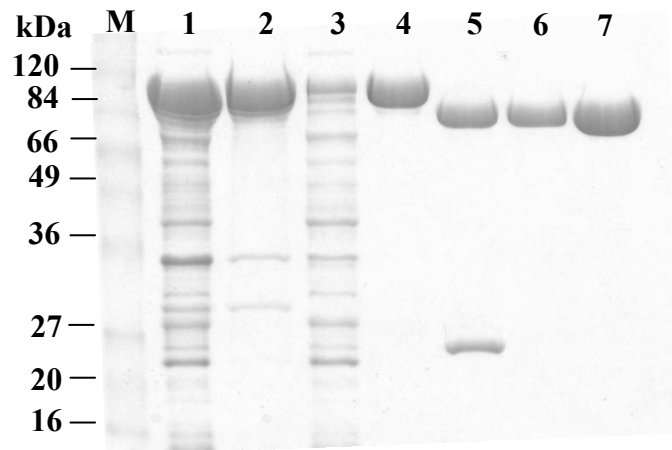
Die Expression wurde anfangs in *E. coli* BL21 bei 37 °C durchgeführt. Durch die Optimierung einiger Schritte konnte die Ausbeute von PEPC erhöht werden. Dies erfolgte zum einen durch die Wahl von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS als Expressionsstamm anstelle von *E. coli* BL21. Des Weiteren konnte die Ausbeute durch die Expression bei niedrigerer Temperatur (27 statt 37 °C) und durch Reduktion der Menge an IPTG von 1 mM auf 0,2 mM erhöht werden, weil dadurch eine bessere intrazelluläre Löslichkeit des Proteins erreicht wurde. Eine zusätzliche Steigerung der Ausbeute konnte durch Kultivierung der Bakterien in einem 5 l-Fermenter bei konstantem pH und gleichmäßiger Sauerstoffzufuhr über Nacht erreicht werden. Die Ausbeute an gereinigtem Protein betrug schließlich in etwa 60 mg Protein pro Liter Bakterienkultur. Versuche zur Kristallisation des Proteins werden derzeit in einer Kooperation<sup>3</sup> unternommen.

#### C.4.1.3 Reinigung von PEPC

Die Reinigung des GST-PEPC-Fusionsproteins (Abb. C.4.2) erfolgte durch spezifische Bindung an Glutathion(GSH)-Sephrose. Verunreinigungen wurden durch Waschen entfernt und GST durch Thrombin von PEPC abgespalten. Das abgespaltene PEPC wurde von der GSH-Matrix eluiert, während GST daran gebunden blieb. Das Eluat lag nach diesem Schritt bereits zu mehr als 95 % homogen vor. Es wurde konzentriert und im letzten Schritt durch eine Gelfiltration weiter aufgereinigt. Abbildung C.4.2 veranschaulicht die verschiedenen aufeinander folgenden Reinigungsschritte.

---

<sup>3</sup> Kristallisierung von PEPC in Kooperation mit Hartmut Niemann, Abteilung Strukturbiologie, GBF, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig



**Abb. C.4.2 Zusammenfassung der Reinigung von PEPC.** PEPC wurde in pGEX-4T-3 als GST-Fusion exprimiert und die Zellen mit der French Press aufgeschlossen. Spur 1 zeigt das Gesamtzell-Lysat nach French Press. Durch Zentrifugation wurde der lösliche Überstand von der unlöslichen Fraktion abgetrennt. Spur 2 zeigt die lösliche Fraktion, Spur 3 die unlösliche Fraktion nach Zentrifugation. Der lösliche Überstand wurde mit GSH-Sepharose inkubiert, GST-PEPC daran gebunden und Verunreinigungen durch Waschen entfernt (Spur 4). Mit Thrombin wurde PEPC von dem an die GSH-Sepharose gebundenen GST abgespalten (Spur 5). Abgespaltenes PEPC wurde von der GSH-Sepharose eluiert (Spur 6). Spur 7 zeigt PEPC nach der anschließenden Gelfiltration. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

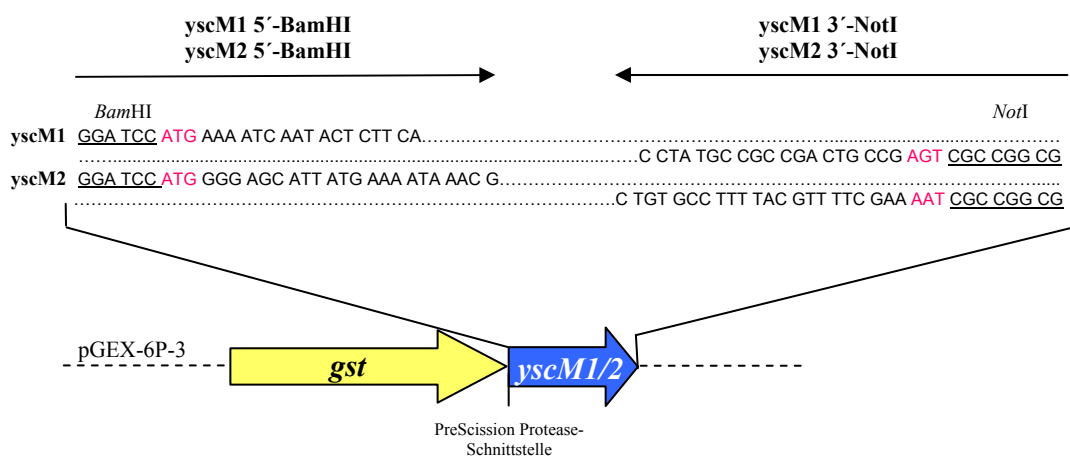
#### C.4.2 Reinigung von YscM1 und YscM2 durch Expression in pGEX-6P-3

Im Folgenden wurde die Reinigung von YscM1 und YscM2 ohne Affinitätsmarker angestrebt. Beide Proteine verfügen über eine interne Thrombinschnittstelle (siehe C.4.3). Deshalb war eine Reinigung der Proteine nach Expression in dem Vektor pGEX-4T-3 nicht möglich, da dieser Vektor wie beschrieben für eine Thrombinschnittstelle zur Abspaltung des GST-Rests kodiert. Somit war eine Umklonierung von *yscM1* und *yscM2* in den Expressionsvektor pGEX-6P-3 notwendig, der für eine PreScission Protease-Schnittstelle kodiert und deshalb eine Abspaltung von GST aus den Fusionsproteinen von YscM1 und YscM2 erlaubte.

##### C.4.2.1 Klonierung von *yscM1* und *yscM2* in pGEX-6P-3

Über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Not*I wurden *yscM1* und *yscM2* nach Amplifizierung aus *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Primern *yscM1/2* 5'-*Bam*HI und *yscM1/2* 3'-*Not*I und Subklonierung in pGEM-T in den Expressionsvektor pGEX-6P-3 ligiert. Der Vektor kodiert wie pGEX-4T-3 für das Gen der Glutathion-S-Transferase (*gst*), das unter der Kontrolle

des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors steht, außerdem für den *lac*-Repressor (*lacI<sup>q</sup>*) und eine Ampicillinresistenz (*bla*), aber anstatt für eine Thrombinschnittstelle kodiert der Expressionsvektor pGEX-6P-3 für eine PreScission Protease-Schnittstelle, um eine Abspaltung des GST-Affinitätsmarkers von YscM1 und YscM2 zu ermöglichen. Die Abbildung C.4.3 zeigt die Position der beiden Gene stromabwärts von *gst* im Vektor. Die korrekte Sequenz der resultierenden Plasmide pGEX-6-*yscM1* und pGEX-6-*yscM2* wurde durch Sequenzierung bestätigt.



**Abb. C.4.3 Konstruktion von pGEX-6-*yscM1* und pGEX-6-*yscM2*.** Die schwarzen Pfeile markieren die Lage der Primer. Mit den dargestellten Primern wurden *yscM1* und *yscM2* aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert, in pGEM-T subkloniert und über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Not*I stromabwärts von *gst* in pGEX-6P-3 kloniert. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Start- und Stoppcodon sind farblich hervorgehoben.

#### C.4.2.2 Expression und Reinigung von YscM1 und YscM2 aus pGEX-6P-3

Die Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21 exprimiert. Die Löslichkeit von YscM1 und YscM2 war zuerst gering, konnte aber durch Expression über Nacht erhöht werden. Die Zugabe von Triton X-100 (0,1– 0,5 %) zum Aufschlusspuffer zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Löslichkeit. Sowohl bei YscM1 als auch bei YscM2 waren nach Aufschluss der Zellen und anschließender Zentrifugation ungefähr 50 % des zu reinigenden Proteins im löslichen Überstand. Nach Affinitätsreinigung über GSH-Sepharose wurde der GST-Rest mit PreScission Protease abgespalten und eine weitere Aufreinigung mittels Gelfiltration angeschlossen. Verwendet wurde eine Superdex 75-Säule. Tabelle C.4.1 gibt einen Überblick über die gereinigten Proteinmengen und die Ausbeute von YscM1 und YscM2 bezogen auf 1,8 l Bakterienkultur. Berechnet wurden diese Daten mithilfe der Gel-Densitometrie. Die mit Coomassie gefärbten Gele wurden

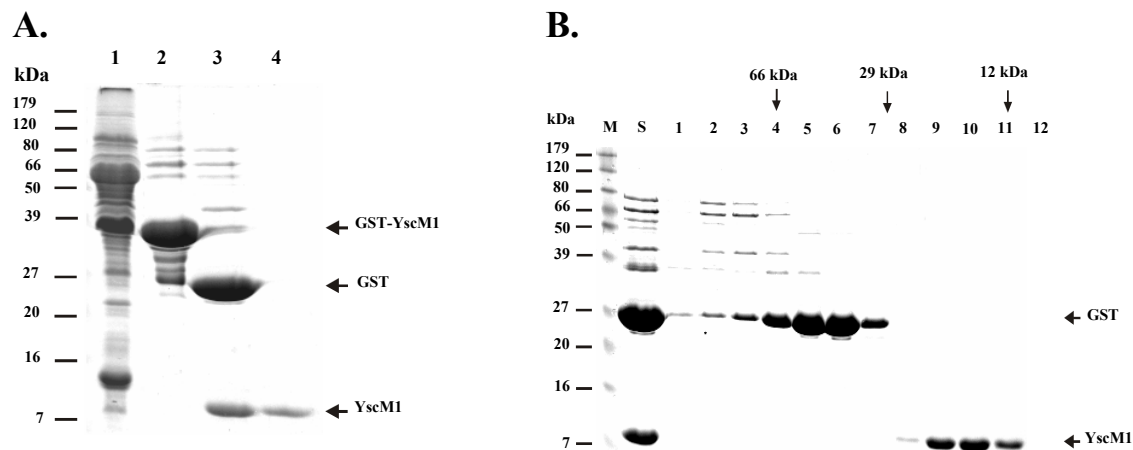


mit einer Kodak Image Station 440 aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit dem Programm Kodak ID Image Analysis.

Reinigungs- schritt	YscM1			YscM2		
	Gesamtprotein (mg)	YscM1 (mg)	Ausbeute %	Gesamtprotein (mg)	YscM2 (mg)	Ausbeute %
Gesamtzell-Lysat	657	11,52	100	600	5,94	100
lösliche Fraktion	590	5,76	50	535	3	50,5
GSH-Matrix	9	2,45	21,3	4,8	1,35	22,7
Gelfiltration	1,34	1,3	11,3	0,63	0,6	10,1

**Tab. C.4.1 Zusammenfassung der Reinigung von YscM1 und YscM2.** Die angegebenen Proteinmengen und Ausbeuten beziehen sich auf 1,8 l Bakterienkultur. Die Werte wurden mithilfe der Gel-Densitometrie gewonnen. Gele wurden mit Coomassie gefärbt und die Banden mit einer Kodak Image Station 440 aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Kodak ID Image Analysis. Definierte Mengen an GST-YscM1/2 (bestimmt mit dem Bio-Rad Proteinassay) wurden auf ein Gel aufgetragen und zur Quantifizierung von GST-YscM1/2 im Gesamtzell-Lysat verwendet. Der Hintergrund wurde hier durch nicht-induzierte Kulturen bestimmt.

Eine deutliche Verbesserung der Ausbeuten konnte durch Expression in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS in einem 5 l-Fermenter unter konstanten pH-Bedingungen und kontrollierter Sauerstoffzufuhr erreicht werden. Maximal konnten für YscM1 34 mg und für YscM2 26 mg bezogen auf 2,5 l Kultur gewonnen werden. Mit diesen Ausbeuten stehen auch YscM1 und YscM2 für eine Kristallisation in ausreichender Menge zur Verfügung. Die Abbildung C.4.4 soll die Reinigung von YscM1 veranschaulichen. Der erste Teil der Abbildung fasst die aufeinander folgenden Reinigungsschritte vom Aufschluss der Zellen bis zur Gelfiltration zusammen. Im zweiten Teil der Abbildung wird die Gelfiltration von YscM1 gezeigt. Die Elution von YscM1 erfolgte in den Fraktionen 8 – 11. GST und verschiedene andere Verunreinigungen konnten abgetrennt werden. Die Reinigung von YscM2 verlief analog (Daten nicht gezeigt).

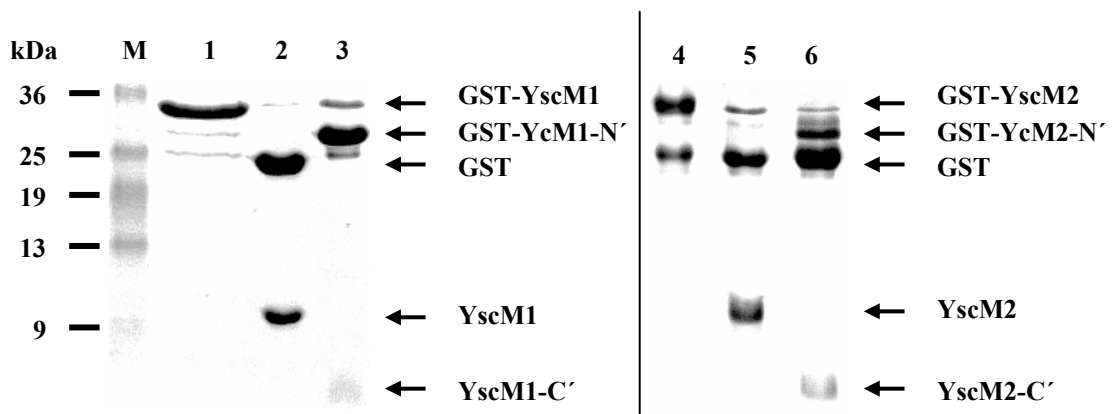


**Abb. C.4.4 Reinigung von YscM1.** A. GST-YscM1 wurde in *E. coli* BL21 exprimiert und die Zellen mit der French Press aufgeschlossen (1). Das Lysat wurde mit GSH-Sepharose inkubiert, Verunreinigungen durch Waschen entfernt und das Fusionsprotein mit GSH-Elutionspuffer von der GSH-Matrix eluiert (2). Mit PreScission Protease wurde der GST-Rest abgespalten (3) und YscM1 durch eine Gelfiltration weiter aufgereinigt (4). B. Gelfiltration von YscM1. Die angegebenen Molekularmassen wurden bei der Kalibrierung der Säule mit Standard-Eichproteinen ermittelt. In Spur S wurde eine Probe des auf die Säule applizierten Proteingemischs aufgetragen. Das Eluat wurde fraktioniert und die aufeinander folgenden Fraktionen mit SDS-PAGE analysiert. Beide Gele wurden mit Coomassie gefärbt.

### C.4.3 YscM1 und YscM2 werden von Thrombin geschnitten

Nach Expression in pGEX-4T-3 sollte der GST-Affinitätsmarker mit Thrombin abgespalten werden. Es zeigte sich allerdings, dass Thrombin neben der Abspaltung des GST-Rests auch YscM1 und YscM2 effizient schneidet. Abbildung C.4.5 verdeutlicht dies. Hier wurden GST-YscM1 und GST-YscM2 wie unter C.4.2 beschrieben in pGEX-6P-3 exprimiert. pGEX-6P-3 kodiert für eine PreScission Protease-Schnittstelle anstatt einer Thrombinschnittstelle. Gereinigtes GST-YscM1 und GST-YscM2 wurden mit PreScission Protease (Spuren 2 und 5) oder mit Thrombin (Spuren 3 und 6) geschnitten. Zum Vergleich sind GST-YscM1 und GST-YscM2 ohne Proteasebehandlung aufgetragen (Spuren 1 und 4). Die PreScission Protease spaltet den GST-Rest von YscM1 und YscM2 ab (Spuren 2 und 5) während Thrombin offensichtlich YscM1 und YscM2 näherungsweise im Zentrum der Proteine schneidet (Spuren 3 und 6). Daraufhin wurden die Sequenzen von YscM1/LcrQ und YscM2 auf potentielle Thrombinschnittstellen untersucht. Laut Chang (1985) besitzt die optimale Thrombinschnittstelle folgende Struktur: a)  $X_1 - X_2 - \text{Pro} - \text{Arg}^\gamma - X_3 - X_4$ , während  $X_1$  und  $X_2$  hydrophobe Aminosäuren und  $X_3$  und  $X_4$  keine sauren Aminosäuren sind oder b)  $X_5 - \text{Arg}^\gamma - X_6$ , wobei  $X_5$  oder  $X_6$  für die Aminosäure Glycin stehen. In YscM1 (Snellings *et al.*, 2001)/LcrQ (Rimpilainen *et al.*, 1992; Perry *et al.*, 1998) und in YscM2 (Snellings *et al.*, 2001) konnten mögliche Throm-

binschnittstellen identifiziert werden. Bei YscM1 und LcrQ ist die potentielle Schnittstelle nach Aminosäure 70 ( $^{67}\text{LLPR}^{\sim}\text{VS}^{72}$ ) und in YscM2 nach Aminosäure 73 ( $^{70}\text{LLPR}^{\sim}\text{AS}^{75}$ ) lokalisiert. Dieses Ergebnis stimmt mit den ungefähr 5 kDa großen C-terminalen Fragmenten überein, die bei der Thrombinbehandlung von YscM1 und YscM2 entstehen (Abb. C.4.5, Spuren 3 und 6).

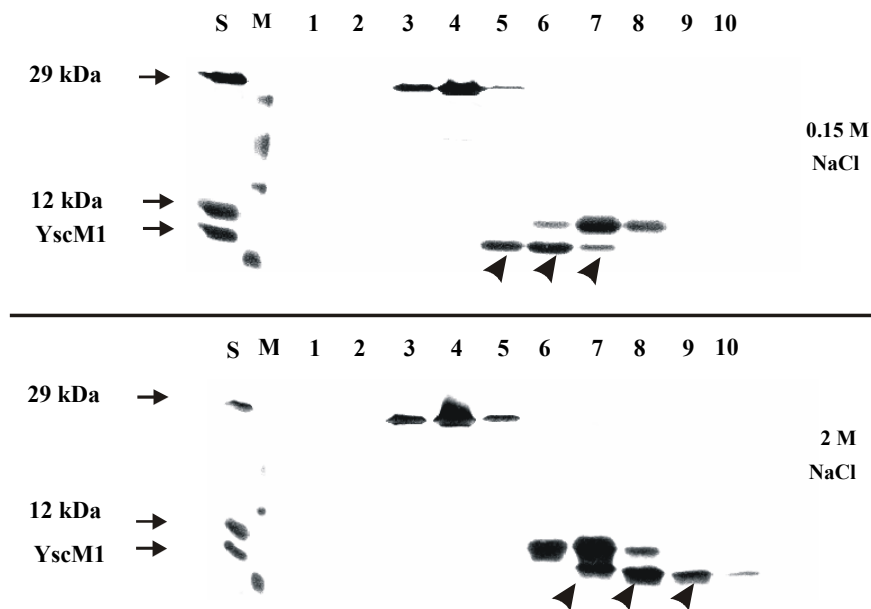


**Abb. C.4.5 YscM1 und YscM2 werden von Thrombin geschnitten.** GST-YscM1 und GST-YscM2 wurden in *E. coli* BL21 mit pGEX-6P-3 exprimiert. Der Vektor kodiert für eine PreScission Protease-Schnittstelle. GST-YscM1 und GST-YscM2 wurden gereinigt und je 5 µg wurden mit 1 U PreScission Protease (Spuren 2 und 5) oder mit 1 U Thrombin (Spuren 3 und 6) bei 20 °C für 2 h inkubiert. Die Proben in den Spuren 1 und 4 sind unbehandelt. Das 16 %ige SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

#### C.4.4 YscM1 und YscM2 bilden Homodimere

Wie aus Abbildung C.4.4.B hervorgeht, wurde YscM1 (gleiches gilt auch für YscM2) bei der Reinigung mittels Gelfiltration unmittelbar in den Fraktionen nach GST eluiert (GST: Fraktionen 4 – 7, YscM1/2 Fraktionen 8 – 11), obwohl GST als Homodimer mit einer Größe von ungefähr 52 kDa vorliegt (McTigue *et al.*, 1995). Man würde erwarten, dass YscM1 und YscM2 sich mit einer Molekularmasse von ungefähr 12 kDa ohne Probleme von GST abtrennen lassen müssten. Deshalb wurde eine analytische Gelfiltration zur Bestimmung der apparenten Molekularmassen von YscM1 und YscM2 durchgeführt. Hierfür wurden beide Proteine mit monomeren Markerproteinen (29 und 12 kDa) gemischt und auf einer Superdex 75-Säule aufgetrennt. Verschiedene Gelfiltrationen wurden mit PBS unter physiologischen sowie Hochsalzbedingungen (150 mM bzw. 2 M NaCl) durchgeführt. Abbildung C.4.6 zeigt, dass die Elution von YscM1 bei höherer Ionenstärke in einer späteren Fraktion erfolgte als bei niedriger Salzkonzentration, während sich das Elutionsverhalten der Markerproteine wie erwartet nicht änderte. Die Elution unter Niedrigsalzbedingungen zwischen dem 12 kDa- und dem 29 kDa-Markerprotein lässt auf eine

Dimerisierung von YscM1 schließen. Die dargestellten Daten stehen stellvertretend auch für YscM2, das sich analog verhält (Daten nicht gezeigt).



**Abb. C.4.6 Dimerisierung von YscM1.** Um die apparente Molekularmasse von YscM1 zu bestimmen, wurde das Protein zusammen mit 2 verschiedenen Markerproteinen (Carboanhydrase: 29 kDa, Cytochrom C: 12 kDa) auf eine Superdex 75 PC 3.2/30 appliziert. Die Säule wurde mit PBS und 150 mM NaCl oder 2 M NaCl equilibriert. Aufeinander folgende Fraktionen wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Im oberen Teil der Abbildung ist die Gelfiltration unter Niedrigsalzbedingungen, im unteren Teil die unter Hochsalzbedingungen dargestellt. Die Hauptfraktionen von YscM1 sind mit Pfeilen markiert. In Spur S wurde eine Probe des applizierten Proteinmixes aufgetragen, in M ein Marker.

## C.4.5 Reinigung von SycH

### C.4.5.1 Reinigung von SycH als GST-Fusionsprotein

#### C.4.5.1.1 Klonierung von *sycH* in pGEX-4T3

Über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Not*I wurde *sycH* nach Amplifizierung aus *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Primern *sycH* 5'-*Bam*HI und *sycH* 3'-*Not*I und Subklonierung in pGEM-T in den bereits beschriebenen Expressionsvektor pGEX-4T-3 ligiert. Die korrekte Sequenz des resultierenden Plasmids pGEX-*sycH* wurde durch Sequenzierung bestätigt.

#### C.4.5.1.2 Expression und Reinigung von SycH aus pGEX-4T-3

SycH wurde als GST-Fusion in *E. coli* BL21 bei 27 °C synthetisiert. Die Rohausbeute des Fusionsproteins betrug ungefähr 50 mg/l Bakterienkultur. GST-SycH war gut löslich. Trotzdem konnten nur wenige Mikrogramm des funktionellen Proteins aufgereinigt werden. Die Bindung an Glutathion-Sepharose verlief effizient und auch die anschließende Abspaltung des GST-Rests mit Thrombin erfolgte quantitativ. SycH konnte jedoch nur zu einem geringen Teil von der GSH-Matrix eluiert werden. Auch die Elution des Fusionsproteins mit 50 mM Glutathion, 500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,0 und anschließendem Thrombinschnitt war nicht erfolgreich. Elution von der Matrix und Abspaltung von GST verliefen zwar effizient. Es war jedoch weder durch Gelfiltration noch durch Ionenaustausch- oder Hydrophobizitätschromatographie möglich, SycH von GST zu trennen.

#### C.4.5.2 Expression und Reinigung von SycH ohne Affinitätsmarker

##### C.4.5.2.1 Klonierung von *sycH* in pET-21b

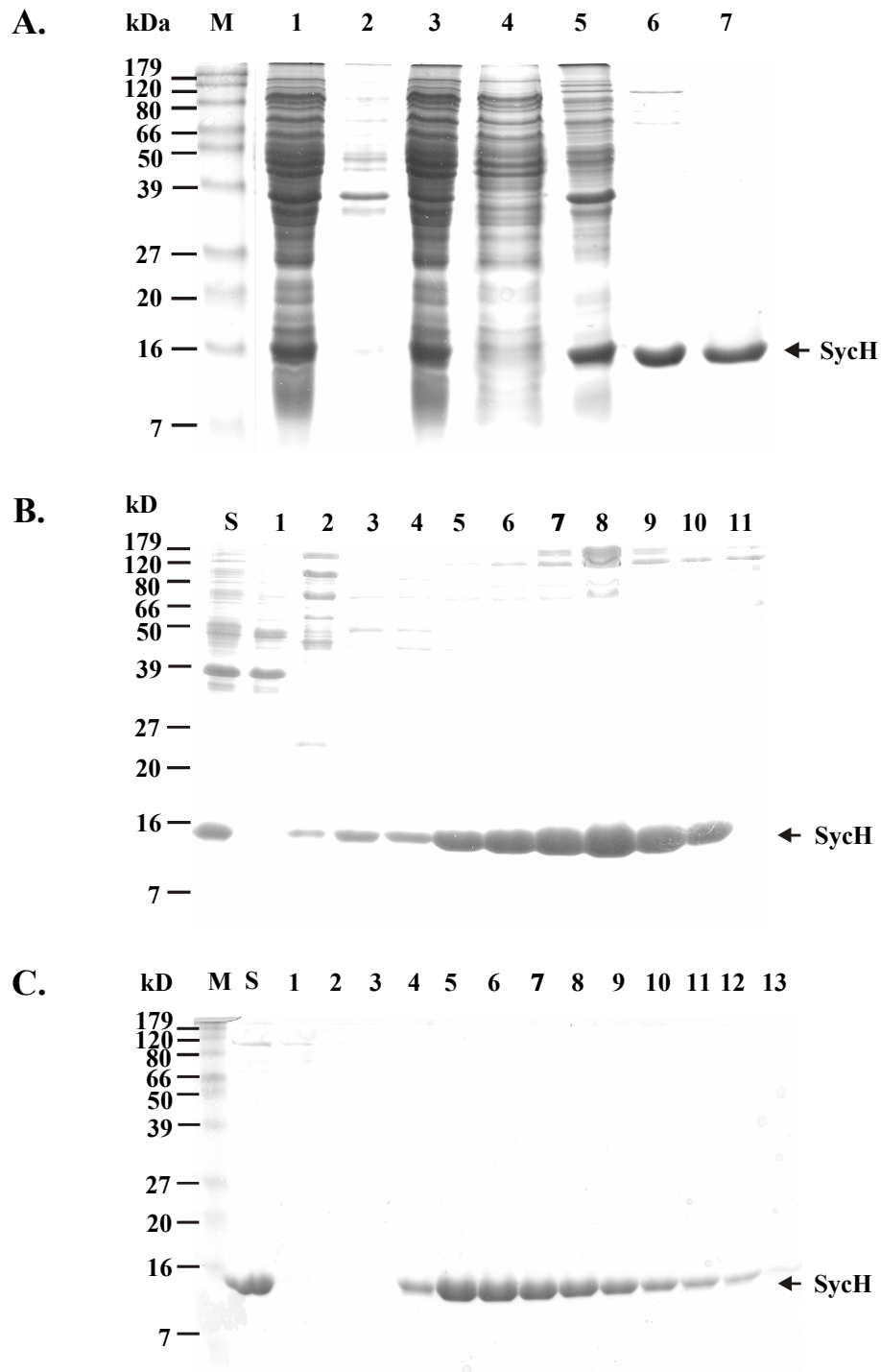
Um SycH ohne Affinitätsmarker zu reinigen, wurde *sycH* nach Amplifizierung aus *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Primern *sycH* 5' NdeI und *sycH* 3' BamHI über die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Bam*HI in den Expressionsvektor pET-21b kloniert. Die Transkription von *sycH* stand unter der Kontrolle des T7 RNA-Polymerase-Promotors, weshalb die Expression in einem Stamm durchgeführt werden muss, der die T7 RNA-Polymerase synthetisieren kann. In diesem Fall erfolgte die Expression in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. pET-21b kodiert des Weiteren für das *lacI<sup>q</sup>*-Repressorgen. Der Lac-Repressor unterbindet die Expression des T7 RNA-Polymerase-Gens sowie die Expression von *sycH* unter Kontrolle des T7 Promotors im nicht induzierten Zustand. Die Expression des T7 RNA-Polymerase-Gens und die Derepression des T7 Promotors werden durch IPTG induziert. Um die basale Aktivität der T7 RNA-Polymerase im nicht induzierten Zustand weiter zu verringern, enthält der Expressionsstamm BL21 (DE3) das Plasmid pLysS, das für das T7 Lysozym-Gen kodiert. T7 Lysozym bindet an die T7 RNA-Polymerase und verhindert so die Transkription von *sycH*. Außerdem erleichtert es die Zell-Lyse, da es Peptidoglykan-Ketten in der äußeren Membran spaltet. Solange das Bakterium intakt ist, kann das Lysozym die innere Membran nicht durchdringen.

#### C.4.5.2.2 Expression und Reinigung von SycH

SycH wurde über Nacht bei 27 °C in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS synthetisiert. Die Rohausbeute betrug ungefähr 60 mg/l (Tabelle C.4.2). Nach French Press-Aufschluss war SycH praktisch komplett löslich (Abb. 4.7.A. Spur 2 und 3). Da die Reinigung von SycH ohne Affinitätsmarker erfolgte, wurde im ersten Schritt eine Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von SycH konnte durch Fällung mit 30 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ein Großteil anderer Proteine abgetrennt werden (Tab. C.4.2 und Abb. C.4.7.A. Spur 4 und 5). Nach Waschen und Solubilisierung des Präzipitats erfolgte die Dialyse der Proteinlösung. Vor allem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , aber auch andere Salze wurden so in Vorbereitung auf die Ionenaustauschchromatographie entfernt. Der niedrige pI von 5,12 von SycH bewirkte eine stabile Bindung an den Anionenaustauscher MonoQ bei pH 8,0. Durch die Erhöhung der Ionenstärke über einen Gradienten von 100 mM bis 1 M NaCl wurden schwächer gebundene Proteine vor SycH eluiert, so dass das Protein nach der Ionenaustauschchromatographie (MonoQ-Säule) bereits zu 90 % rein vorlag (Tab. C.4.2 und Abb. 4.7.A. Spur 6). Nach einer anschließenden Gelfiltration konnte SycH mit einer Reinheit von > 95 % und einer Ausbeute von etwa 20 mg pro Liter Bakterienkultur gewonnen werden.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	SycH (mg)	Reinheit %	Ausbeute %
Gesamtzell-Lysat	2978	150	5	100
Lösliche Fraktion	2549	145	6	97
Solubiliertes und dialysiertes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitat	449	112	25	75
Ionenaustauschchromatographie	78	70	90	47
Gelfiltration	53	51	96	34

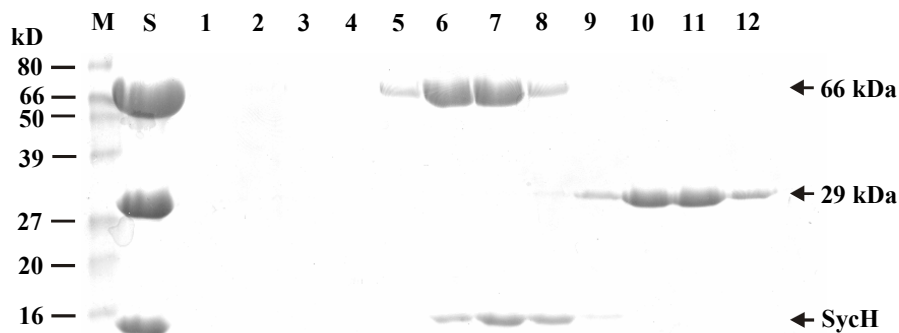
**Tab. C.4.2 Reinigung von SycH.** Die angegebenen Proteinmengen und Ausbeuten beziehen sich auf 2,5 l Bakterienkultur. Die Werte wurden mithilfe der Gel-Densitometrie gewonnen. Die SDS-Gele wurden mit Coomassie gefärbt und die Banden mit einer Kodak Image Station 440 aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Kodak ID Image Analysis. Definierte Mengen an SycH wurden auf ein Gel aufgetragen und zur Quantifizierung von SycH im Gesamtzell-Lysat verwendet. Der Hintergrund wurde hier durch nicht-induzierte Kulturen bestimmt.



**Abb. C.4.7 Reinigung von SycH.** A. Das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel gibt eine Übersicht über die Reinigung von SycH. Spur 1: Gesamtzell-Lysat; 2: unlösliche Fraktion nach French Press und Zentrifugation; 3: lösliche Fraktion nach French Press und Zentrifugation; 4: Überstand nach  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung; 5:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitat nach Solubilisierung und Dialyse; 6: Eluat nach MonoQ-Anionenaustauschchromatographie; 7: SycH nach Gelfiltration. B. MonoQ-Anionenaustauschchromatographie. In Spur S wurde eine Probe des auf die Säule applizierten Proteingemisches aufgetragen. 1-11 markieren die aufeinander folgende eluierten Fraktionen. C. Gelfiltration von SycH. Die SDS-Gele wurden mit Coomassie gefärbt.

### C.4.5.3 Oligomerisierung von SycH

SycH wird den Klasse I-Chaperonen der Typ III-Sekretionssysteme zugeordnet (Parsot *et al.*, 2003). Bisher bekannte Chaperone dieser Klasse liegen als Homodimere vor. Bei der Reinigung von SycH konnte jedoch beobachtet werden, dass das Protein wesentlich früher von der Gel-filtrationssäule eluiert wurde, als bei einer Molekularmasse von 15,8 kDa zu erwarten wäre. Deshalb wurde eine analytische Gelfiltration durchgeführt, um die apparente Molekularmasse von SycH zu bestimmen. SycH wurde mit monomeren Markerproteinen (66 kDa und 29 kDa) gemischt und auf eine Superdex-Säule 75 PC 3.2/30 aufgetragen. Läge SycH als Dimer vor, so würde man eine Ko-Elution mit dem 29 kDa großen Markerprotein erwarten. Abbildung C.4.8 zeigt jedoch, dass SycH kurz nach dem 66 kDa großen Markerprotein eluiert wird. Eine Tri- oder Tetramerisierung von SycH ist also wahrscheinlicher als eine Dimerisierung, wie sie für Klasse I-Chaperone typisch ist.



**Abb. C.4.8 Analytische Gelfiltration von SycH.** Um die apparente Molekularmasse von SycH zu bestimmen, wurde das Protein mit Markerproteinen (BSA: 66 kDa, Carboanhydrase: 29 kDa) gemischt und auf eine Superdex 75 PC 3.2/30-Säule appliziert. Aufeinanderfolgende Fraktionen wurden mit SDS-PAGE analysiert. In Spur S wurde das auf die Säule applizierte Proteingemisch aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt.



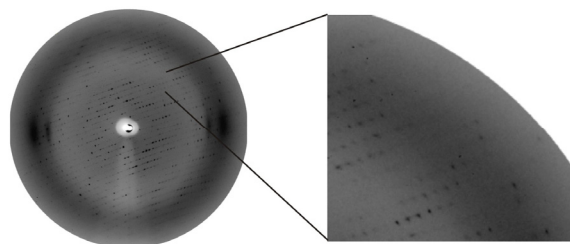
#### C.4.5.4 Kristallisation von SycH

Eine Kristallisation von SycH war interessant, weil SycH offenbar in seinen Oligomerisierungseigenschaften von den typischen bisher bekannten Klasse I-Chaperonen des TTSS abweicht. Dies ließ auch auf eine Abweichung von den typischen Proteinstrukturen der TTSS-Chaperone schließen. SycH wurde in Kooperation mit Michael Groll<sup>4</sup> unter Dampfdiffusionsbedingungen in einem hängenden Tropfen kristallisiert. Für die Kristallisation wurde SycH in einer Konzentration von 40 mg/ml eingesetzt. 1,5 µl Proteinlösung wurden mit 1 µl Reservoirpuffer (0,1 M HEPES pH 7,2, 10 % PEG200) gemischt. Innerhalb von fünf Tagen wuchsen Kristalle bis zu einer endgültigen Größe von 0,08 x 0,08 x 2mm (Abb. C.4.9.A.). Die Kristalle zeigten eine Beugung bei einer Auflösung von bis zu 2,94 Å.

A.



B.

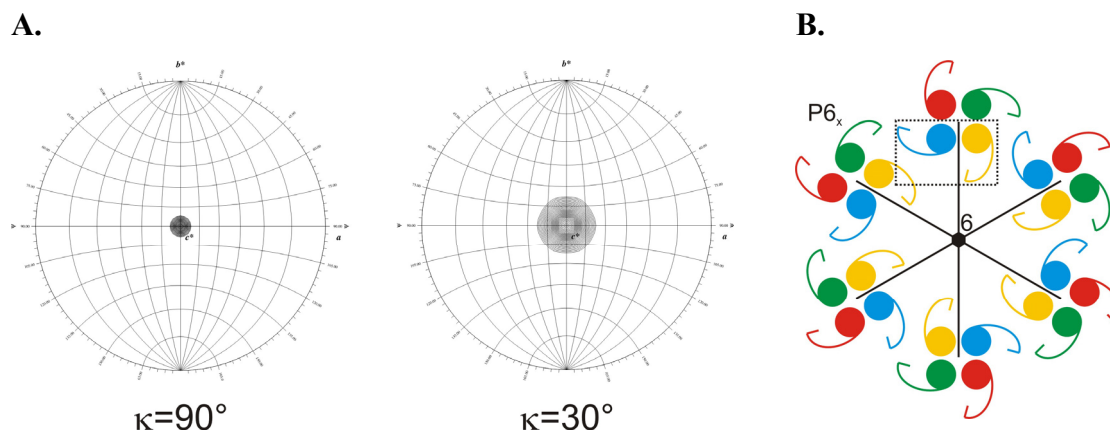


**Abb. C.4.9 Kristallisation und Beugung von SycH.** A. Kristalle von SycH; B. Beugungsmuster der SycH-Kristalle. Die Daten wurden am DESY-Zentrum in Hamburg aufgenommen. Der Detektorrand entspricht einer Auflösung von 2,8 Å.

Die Berechnung der  $\kappa=180^\circ$  und  $\kappa=60^\circ$  Bereiche zeigt 2-fache und 6-fache Symmetrieachsen, während der  $\kappa=30^\circ$  Bereich eine 12-fach Symmetrie zeigt, die durch die Kombination von lokaler und kristallographischer Symmetrien zustande kommt. SycH-Kristalle zeigen eine hexagonale Kristallstruktur, während sich je 2 Moleküle in der asymmetrischen Einheitszelle befinden. Das Homotetramer im Kristallgitter entsteht durch die Kombination von lokaler und kristallographischer Zweifachsymmetrie. Es war jedoch nicht möglich, die Schraubenachse entlang der 6-fach Symmetrieachse aufzuklären. Aufgrund der lokalen 4-fach Symmetrie können die

<sup>4</sup> Kooperation mit Michael Groll, Adolf-Butenandt-Institut, Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstraße 5, 81377 München

Raumgruppen  $P6_122$ ,  $P6_322$  und  $P6_522$  außer Acht gelassen werden. Einiges deutet darauf hin, dass es sich um die Raumgruppen  $P6_222$  oder  $P6_422$  handelt. Obwohl die Struktur bislang nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, zeigen die Daten doch, dass es sich bei SycH um eine Homotetramer handelt, was die Daten aus der Gelfiltration unterstützt.

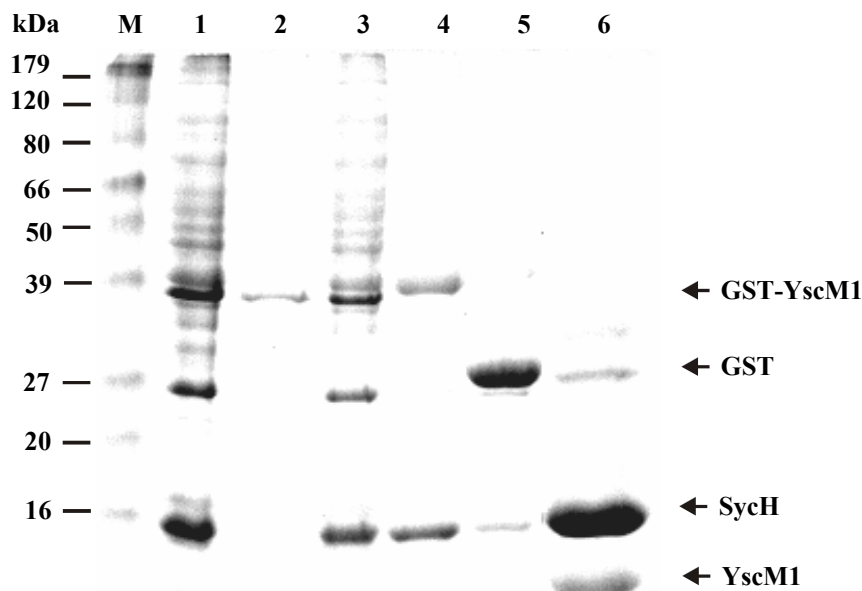


**Abb. C.4.10** A. Stereografische Projektion B. Schematische Darstellung der Anordnung von SycH im Kristallgitter  $P6_x$ . Die Untereinheiten des SycH-Tetramers sind in unterschiedlichen Farben gezeichnet. Die asymmetrische Einheitszelle ist durch den schwarzen Rahmen markiert.

#### C.4.5.5 Gemeinsame Expression von YscM1 und SycH und Reinigung von YscM1/SycH-Komplexen

Zusätzlich wurde die Reinigung von YscM1/SycH-Komplexen für Kristallisationszwecke angestrebt. Da die bisher für die Synthese von GST-YscM1 und SycH verwendeten Plasmide aufgrund der Antibiotikaresistenz nicht kompatibel waren, wurde das Plasmid pETU-sycH konstruiert. Bei pETU handelt es sich um ein Derivat des Expressionsvektors pET-3c, bei dem das Ampicillin-Resistenzgen *bla* über die Restriktionsschnittstelle *PstI* gegen die Kanamycinresistenzkassette aus pUC4K ausgetauscht wurde (Neumayer *et al.*, 2004). Mit den Primern sycH 5'-NdeI und sycH 3'-BamHI wurde *sycH* aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* in pETU eingefügt. Die korrekte Sequenz des resultierenden Plasmids pETU-sycH wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Expression von *sycH* erfolgte unter der Kontrolle des T7 RNA-Polymerase-Promotors ohne Affinitätsmarker. Die Plasmide pGEX-6-yscM1 und pETU-sycH wurden in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ko-transformiert und GST-YscM1 und SycH bei 27 °C gleichzeitig exprimiert (Abb. C.4.11, Spur 1). Die GST-YscM1/SycH-Komplexe wurden durch Bindung an Glutathion-Sepharose

gereinigt. Mit PreScission Protease wurde der GST-Rest abgespalten und der Komplex von der GSH-Matrix eluiert, während GST gebunden blieb (Abb.4.11 Spur 5). In einer anschließenden Gelfiltration auf einer Superdex 200-Säule wurde der YscM1/SycH-Komplex weiter aufgereinigt. GST-Verunreinigungen und unkomplexiertes YscM1 wurden vom YscM1/SycH-Komplex abgetrennt (Spur 6). Die Abbildung C.4.11 liefert zudem einen Hinweis auf das stöchiometrische Verhältnis zwischen YscM1 und SycH. Eine 1:4 Stöchiometrie für YscM1 und SycH wäre denkbar. Die Endausbeute an gereinigtem SycH/YscM1-Komplex bei Kultivierung in einem 5 l-Fermenter bei 27 °C über Nacht betrug ungefähr 20 mg pro Liter Bakterienkultur. Eine gute Voraussetzung für die Kristallisation ist die hohe Löslichkeit des Komplexes von etwa 60 mg/ml.



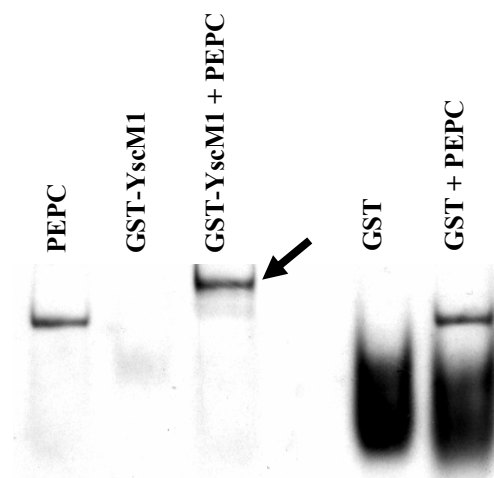
**Abb. 4.11 Ko-Expression und Reinigung von YscM1 und SycH.** GST-YscM1 und SycH wurden in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ko-exprimiert und die Zellen wurden mit French Press aufgeschlossen. Spur 1: Gesamtzell-Lysat; 2: unlösliche Fraktion nach Zentrifugation; 3: lösliche Fraktion nach Zentrifugation; 4: an GSH-Sepharose gebundenen Proteine; 5: GSH-Matrix nach PreScission Protease-Behandlung und Waschen; 6: Eluat nach PreScission Protease-Behandlung. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

## C.5 NATIVGELE BESTÄTIGEN DIE WECHSELWIRKUNG VON YSCM1 UND YSCM2 MIT PEPC

Die Reinigung rekombinanter Proteine machte es möglich, die im Affinitätsbindungsexperiment (siehe C.1) beobachtete Wechselwirkung von PEPC mit YscM1 und YscM2 näher zu untersuchen. Die nicht-denaturierende (native) Gelelektrophorese ermöglicht die Darstellung von Protein/Protein-Wechselwirkungen. Durch eine Interaktion von Proteinen ändern sich in der Regel die elektrophoretischen Mobilitätseigenschaften der Komplexe gegenüber denen der einzelnen Wechselwirkungspartner im Nativgel.

### C.5.1 Wechselwirkung von GST-YscM1 und GST-YscM2 mit PEPC

Erste Nativgel-Experimente wurden mit GST-Fusionen von YscM1 und YscM2 durchgeführt. Wie bereits erwähnt, wurden zuerst GST-Fusionen aus pGEX-4T-3, später aus pGEX-6P-3 gereinigt. Die Vektoren unterscheiden sich nur in wenigen Basenpaaren stromabwärts von *gst*, bedingt durch eine Thrombin- bzw. eine PreScission Protease-Schnittstelle, für die die Vektoren kodieren. Das Dimer GST-YscM1, das in pGEX-4T-3 exprimiert wurde, wurde in 2-fachem Überschuss mit dem Tetramer PEPC gemischt und auf ein Nativgel aufgetragen. Die Abbildung C.5.1 zeigt eine deutliche Mobilitätsänderung des GST-YscM1/PEPC-Komplexes im Vergleich zu den einzelnen Proteinen. Als Kontrolle wurde GST im Überschuss mit PEPC gemischt. Hier konnte keine Veränderung der Mobilitätseigenschaften der Proteine beobachtet werden (Abb. C.5.1).

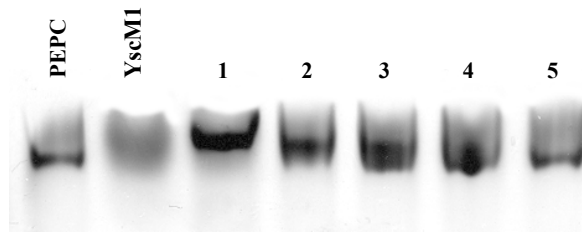


**Abb. C.5.1 Bindung von GST-YscM1 an PEPC.** GST-YscM1 und PEPC wurden jeweils einzeln und als Gemisch auf ein 6 %iges Nativgel aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde GST allein und im Überschuss mit PEPC aufgetragen. Der Pfeil markiert den GST-YscM1/PEPC-Komplex. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

Interessanterweise zeigte ein Nativgel mit den GST-Fusionen aus pGEX-6P-3 nicht das Ergebnis, das man nach dem ersten Experiment erwarten würde. Diese GST-Fusionsproteine wiesen keine Bindungsaktivität an PEPC auf, obwohl wie erwähnt nur der N-Terminus von YscM1 und YscM2 durch die unterschiedliche Protease-Schnittstelle leicht verändert war. Dies deutet darauf hin, dass der N-Terminus der beiden Proteine eine wichtige Rolle bei der Bindung an PEPC zu spielen scheint.

Im Folgenden sollten die Nativgel-Experimente mit YscM1 und YscM2 auch ohne den GST-Affinitätsmarker durchgeführt werden. Da eine Abspaltung des GST-Affinitätsmarkers mit Thrombin bedingt durch die interne Thrombinschnittstelle von YscM1 und YscM2 (siehe C.4.3) auch zu einer Spaltung dieser Proteine führt, wurden YscM1 und YscM2 deshalb wie erwähnt in pGEX-6P-3 exprimiert, einem Vektor, der statt für eine Thrombinschnittstelle eine PreScission Protease-Schnittstelle kodiert und der GST-Rest mit PreScission Protease entfernt. Die Proteine unterscheiden sich deshalb am C-Terminus des GST-Affinitätsmarkers bedingt durch die unterschiedlichen Schnittstellen in wenigen Aminosäuren.

Die Abbildung C.5.2 zeigt PEPC im Nativgel inkubiert mit absteigenden Konzentrationen an YscM1. In Spur 1 wurden die beiden Proteine in einem Massenverhältnis von 1:1 gemischt (dies entspricht einem molaren Verhältnis von ca. 1:7,5). Gut erkennbar ist, dass sich die elektrophoretische Mobilität von PEPC im Vergleich zur PEPC-Kontrollspur verändert hat. PEPC ist offensichtlich komplett mit YscM1 abgesättigt. Auch in Spur 2, wo PEPC und YscM1 im Massenverhältnis von 1:5 gemischt wurden, zeigt PEPC eine Veränderung der elektrophoretischen Mobilität und scheint mit YscM1 abgesättigt zu sein. In Spur 3 bei einem PEPC:YscM1-Masseverhältnis von 1:10 scheint PEPC nicht mehr komplett an YscM1 gebunden zu sein, da PEPC teilweise ihre Mobilität nicht verändert hat. Die in den Spuren 4 und 5 aufgetragenen Masseverhältnisse von 1:20 und 1:50 machen deutlich, dass die vorhandene Menge an YscM1 nicht mehr ausreicht, um die Mobilität von PEPC zu verändern. Aufgrund dieser groben Abschätzung kann man davon ausgehen, dass die tetramere PEPC von 2 Molekülen YscM1 gebunden wird.

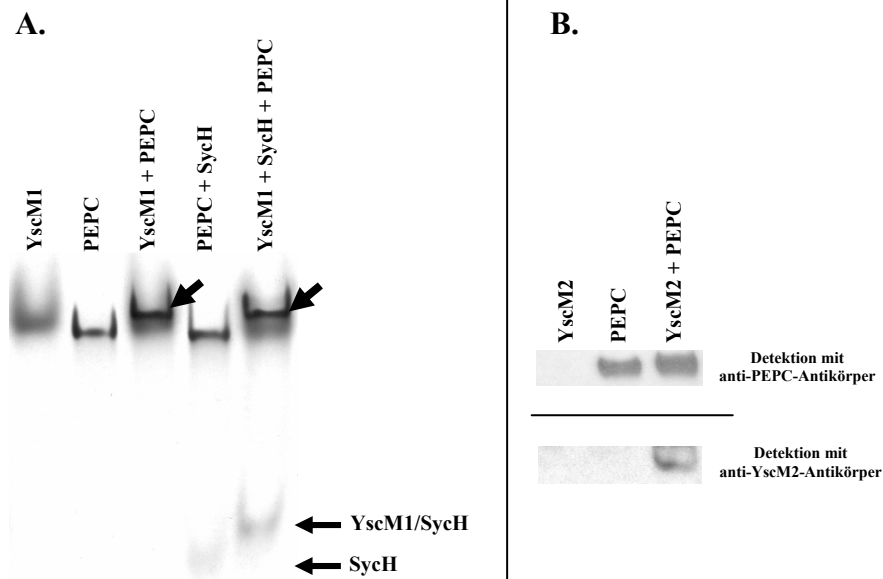


**Abb. C.5.2 PEPC im Nativgel mit unterschiedlichen Konzentrationen an YscM1.** In den ersten beiden Spuren wurden PEPC und YscM1 zur Kontrolle allein aufgetragen. Es wurden je 4  $\mu\text{g}$  Protein eingesetzt. In den Spuren 1-5 wurde PEPC mit absteigenden Konzentrationen an YscM1 inkubiert und auf das Nativgel aufgetragen. In Spur 1 beträgt das Massenverhältnis zwischen PEPC und YscM1 1:1, in Spur 2 1:5, in Spur 3 1:10, in Spur 4 1:20 und in Spur 5 1:50. Das Nativgel wurde mit Coomassie gefärbt.

### C.5.2 Wechselwirkung von YscM1 und YscM2 mit PEPC unter dem Einfluss von SycH

SycH wurde ebenfalls in die Studie einbezogen, um den Einfluss des Chaperons auf die Bindung an PEPC zu untersuchen. Ein Komplex aus SycH und YscM1 wurde in 3-fachem Überschuss zu dem tetrameren PEPC eingesetzt. Abbildung C.5.3.A. zeigt eine deutliche Änderung der Mobilitätseigenschaft von PEPC in Anwesenheit von YscM1. Das Chaperon, das an YscM1 bindet, hat dabei offensichtlich keinen Einfluss auf die PEPC/YscM1-Bindung. Die Wechselwirkung von YscM1 und PEPC konnte in diesem Versuch ohne GST-Rest und unter Anwesenheit des Chaperons SycH gezeigt werden.

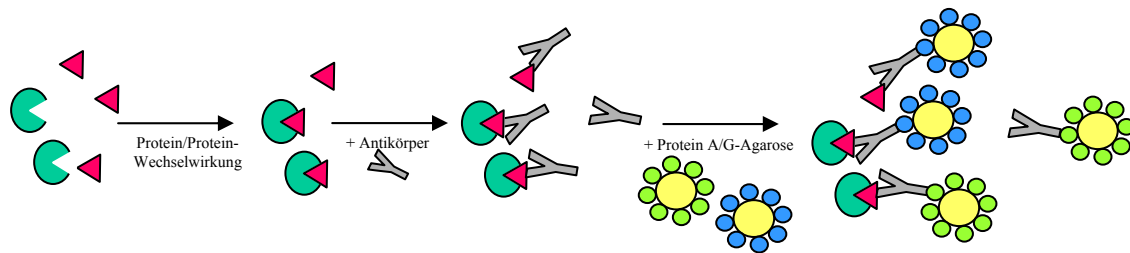
Die Bindung von YscM2 an PEPC wurde ebenfalls im Nativgel untersucht. YscM2 wurde wie für YscM1 beschrieben im 3-fachen Überschuss zu PEPC auf das Nativgel geladen und mithilfe eines Western Blots analysiert. Der Blot wurde dabei nacheinander mit Antikörpern gegen PEPC und gegen YscM2 entwickelt. Abbildung C.5.3.B. zeigt zwar nur eine geringe Änderung der Mobilität von PEPC bei Zugabe von YscM2, aber die Ko-Migration von YscM2 und PEPC ist offensichtlich. Die Detektion von YscM2 im Gel kann nur durch die Bindung an PEPC zustande kommen, da YscM2 allein mit seinem isoelektrischen Punkt von 9,79 unter den gewählten Nativgel-Bedingungen (pH 7,4) nicht ins Gel einwandert. Abb. 5.3.B. bestätigt also auch die Bindung von YscM2 an PEPC.



**Abb. C.5.3 Bindung von YscM1 und YscM2 an PEPC im Nativgel.** A. YscM1, SycH und der Komplex aus beiden Proteinen wurden in einem dreifachen Überschuss zu PEPC eingesetzt, wobei bei YscM1 und SycH von einer 1:4 Stöchiometrie ausgegangen wurde. PEPC wurde entweder allein oder im Gemisch mit YscM1, SycH oder dem Komplex aus beiden auf das Nativgel aufgetragen. Die YscM1/PEPC-Komplexe sind mit Pfeilen markiert. Das Nativgel wurde mit Coomassie gefärbt. B. YscM2 wurde ebenfalls im dreifachen Überschuss zu PEPC auf ein Nativgel aufgetragen und dann im Western Blot analysiert. Die Abbildung zeigt denselben Blot, der zuerst mit Antikörpern gegen PEPC und nach dem Entfernen dieser mit Antikörpern gegen YscM2 entwickelt wurde.

## C.6 KO-IMMUNOPRÄZIPITATION

Die Nativgel-Experimente konnten die Wechselwirkung zwischen rekombinantem YscM1 bzw. YscM2 und PEPC bestätigen. Mittels Ko-Immunopräzipitation sollte die Wechselwirkung direkt aus dem Yersinien-Lysat nachgewiesen werden. Um Protein/Protein-Interaktionen aus Lysaten nachzuweisen, stellt die Ko-Immunopräzipitation eine gute Methode dar. Das Verfahren beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Abbildung C.6.1 soll das Prinzip der Ko-Immunopräzipitation veranschaulichen.



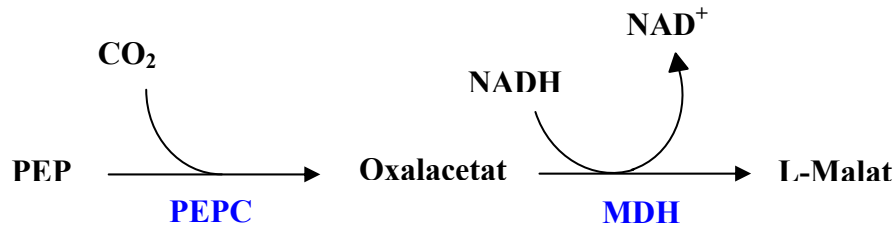
**Abb. C.6.1 Prinzip der Ko-Immunopräzipitation.** Um die Protein/Protein-Wechselwirkung zu detektieren, wird dem Lysat ein Antikörper (Ak) zugesetzt, der gegen Protein 1 gerichtet ist. Der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex wird durch Bindung an Protein A/G-Agarose immobilisiert und so aus dem Lysat entfernt. Der an die Agarose gebundene Komplex wird mit SDS-PAGE analysiert. Interagieren Protein 1 und 2 miteinander, lässt sich Protein 2 durch einen spezifischen Ak im Immunoblot nachweisen.

*Y. enterocolitica* WA-314 wurde in BHI bei 37 °C kultiviert, wobei der Kultur 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  zugesetzt wurde. Der Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$  ermöglichte zwar die Synthese von Typ III-Proteinen und somit auch die von YscM1 und YscM2, verhinderte aber ihre Sekretion. Auch PEPC wurde unter diesen Bedingungen synthetisiert und war im Zytosol nachweisbar. Des Weiteren wurden YscM1, YscM2 und PEPC in WA-314 mit Expressionsvektoren überexprimiert. Mit den Primern yscM1/2 5'-NdeI und yscM1/2 3'-SalI wurden *yscM1* und *yscM2* aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert und in den Expressionsvektor pWS kloniert. Bei diesem Vektor handelt es sich um ein Derivat des Vektors pMS470Δ8 (Balzer *et al.*, 1992), der mit NdeI und HindIII geschnitten und mit einem Verbindungsstück ligiert wurde, dass durch Hybridisierung der Oligonukleotide pWS-Linker-5'-P und pWS-Linkercompl-5'-P entstanden ist. Die Expression stand unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors. Das PEPC-Gen *ppc* wurde mit seinem nativen Promotor mit den Primern ppc 5'-XbaI und ppc 3'-SalI aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert und in pACYC184 kloniert, um die Expression von *ppc* etwas zu erhöhen. Die Überexpression von YscM1 und YscM2 erfolgte bei 27 °C mit 1 mM IPTG. Mit einem Antikörper gegen PEPC sollte PEPC mit dem daran gebundenen YscM1 oder YscM2 aus dem Lysat von WA-314 präzipitiert und an Protein A/G-Agarose immobilisiert werden, so dass YscM1 bzw. YscM2 im anschließenden Western Blot detektiert werden können. Es war jedoch nicht möglich, mit dieser Methode die Wechselwirkung zwischen PEPC und YscM1 und YscM2 nachzuweisen. YscM1 und YscM2 allein zeigten schon Affinität zu Protein A/G-Agarose und konnten somit in der Kontrolle ohne Zugabe des Antikörpers gegen PEPC detektiert werden. Eine Reduktion der unspezifischen Wechselwirkung zwischen YscM1/2 und Protein A/G konnte auch nicht durch Zugabe von Detergenzien wie Triton X-100 oder SDS erzielt werden. Die Methode der Ko-Immunopräzipitation erwies sich also als ungeeignet, die Wechselwirkung von PEPC und YscM1/YscM2 darzustellen.



### C.7 YSCM1 UND YSCM2 MODULIEREN DIE ENZYMAKTIVITÄT VON PEPC

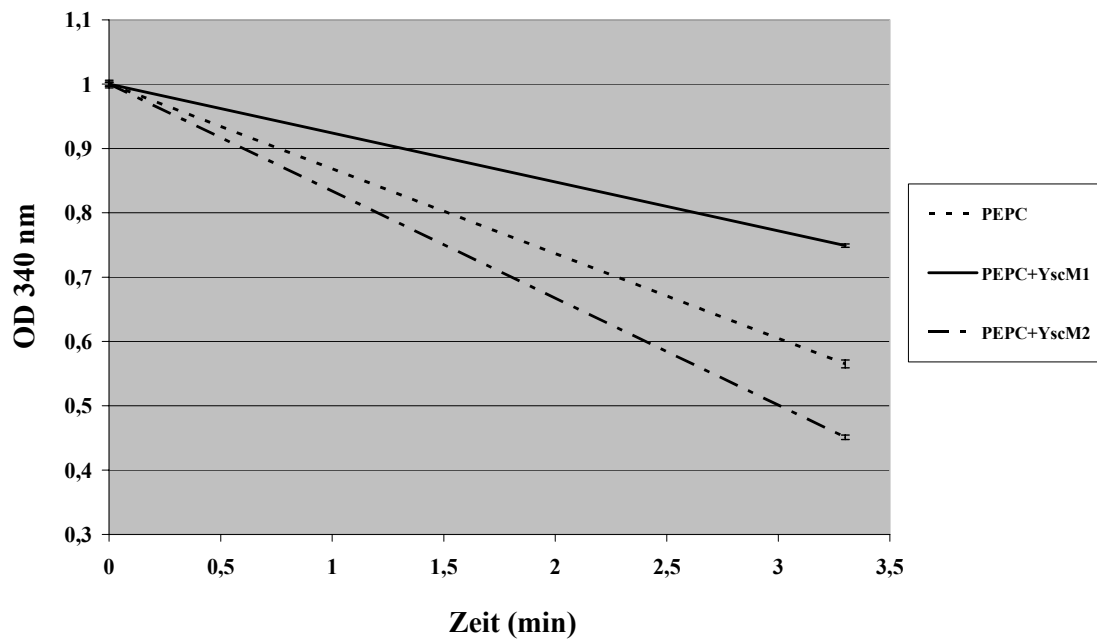
Nach Untersuchung der Bindung von YscM1 und YscM2 an PEPC stellte sich die Frage, ob beide Proteine auch die Enzymaktivität von PEPC beeinflussen. Durch experimentelle Bestimmung der Enzymaktivität von PEPC in Gegenwart von YscM1 oder YscM2 sollte ihr Einfluss auf die PEPC-Aktivität festgestellt werden. In Anlehnung an eine Methode von Smith (1968) wurde die Enzymaktivität von PEPC bestimmt, in dem die PEPC-Reaktion mit einer zweiten enzymatischen Reaktion gekoppelt wurde. Oxalacetat als Produkt der PEPC-Reaktion wurde dabei durch Malatdehydrogenase (MDH) zu L-Malat umgesetzt (Abb. C.7.1). Gemessen wurde die gleichzeitige Oxidation von NADH im Reaktionsansatz bei 340 nm.



**Abb. C.7.1 Bestimmung der Enzymaktivität von PEPC.** Phosphoenolpyruvat (PEP) wird im ersten Schritt durch Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) zu Oxalacetat carboxyliert. Oxalacetat wird dann unter Oxidation von NADH durch Malatdehydrogenase (MDH) zu L-Malat umgesetzt. Die Enzymaktivität wird durch Messung der Oxidation von NADH bei 340 nm bestimmt.

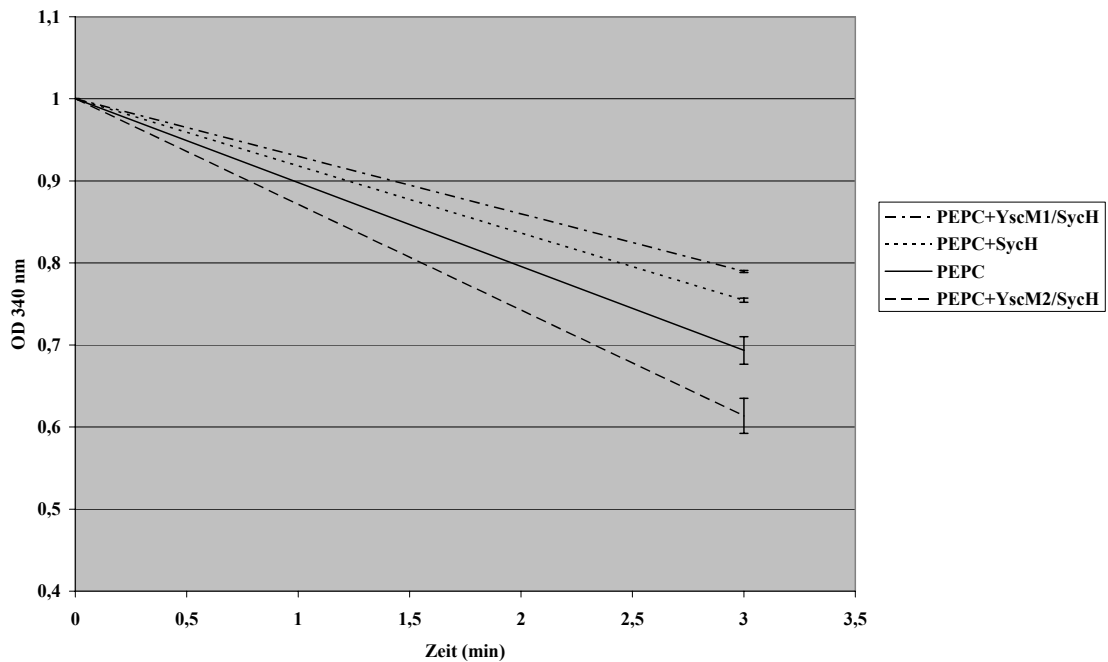
#### C.7.1 Einfluss von YscM1 und YscM2 auf die Enzymaktivität von PEPC

Zur Messung der Enzymaktivität von PEPC wurden YscM1 und YscM2 in einer Konzentration von ungefähr 100 nM eingesetzt. Die beiden Proteine wurden dem Reaktionsansatz hinzugefügt und bei 37 °C für 5 min vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe des Substrats Phosphoenolpyruvat (PEP) gestartet wurde. Die Messung der Oxidation von NADH erfolgte für 200 s bei 340 nm. Abbildung C.7.2 zeigt, dass beide TTSS-Komponenten einen deutlichen Einfluss auf die Enzymaktivität von PEPC besitzen. YscM1 und YscM2 zeigten dabei gegensätzliche Effekte. YscM1 reduzierte die Enzymaktivität auf etwa 58 % der Ausgangsaktivität, während YscM2 die Enzymaktivität um ungefähr 25 % erhöhte. Ein Einfluss von YscM1 und YscM2 auf die Aktivität der MDH konnte ausgeschlossen werden. Durch Zugabe von YscM1 und YscM2 zur Malatdehydrogenase-Reaktion veränderte sich die Umsetzungsgeschwindigkeit von Oxalacetat bzw. die Enzymaktivität der MDH nicht.



**Abb. C.7.2 Einfluss von YscM1 und YscM2 auf die Enzymaktivität von PEPC.** YscM1 und YscM2 wurden in Konzentrationen von 100 nM eingesetzt, PEPC in einer Konzentration von ca. 50 nM. Die beiden Proteine wurden dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37 °C wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von PEP gestartet. Die Oxidation von NADH wurde bei 340 nm über einen Zeitraum von 200 s gemessen. Hier wurde die Abnahme von NADH über die Zeit aufgetragen. Jeweils 3 unabhängige Messungen wurden durchgeführt und die resultierenden Steigungen gemittelt. Fehlerbalken:  $\pm$  Standardabweichung.

Die Abbildung C.7.3 zeigt, dass interessanterweise auch SycH als Chaperon von YscM1 und YscM2 einen Einfluss auf die Enzymaktivität von PEPC aufweist. SycH zeigte ebenfalls einen inhibitorischen Effekt, der etwas schwächer ausgeprägt war als der Effekt von YscM1 (Abb. C.7.3). SycH/YscM1- oder SycH/YscM2-Komplexe zeigten jeweils dieselben Effekte wie YscM1 und YscM2 allein. Das bedeutet, dass eine Bindung an das Chaperon SycH die Wechselwirkung von YscM1 und YscM2 mit PEPC nicht verhinderte.



**Abb. C.7.3 Einfluss von SycH auf die Enzymaktivität von PEPC.** SycH, YscM1 und YscM2 wurden in Konzentrationen von 100 nM eingesetzt, PEPC in einer Konzentration von ca. 50 nM. Die Proteine wurden dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37 °C wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von PEP gestartet. Die Oxidation von NADH wurde bei 340 nm über einen Zeitraum von 180 s gemessen. Hier wurde die Abnahme von NADH über die Zeit aufgetragen. Jeweils 3 unabhängige Messungen wurden durchgeführt und die resultierenden Steigungen gemittelt. Fehlerbalken:  $\pm$  Standardabweichung.

### C.7.2 Der N-Terminus von YscM1 und YscM2 moduliert die Enzymaktivität von PEPC

Wie erwähnt, gab es bereits erste Hinweise auf den für die Bindung an PEPC verantwortlichen Bereich von YscM1 bzw. YscM2 (siehe C.5.1). Es wurde vermutet, dass der Molekülbereich, der die Bindung an PEPC vermittelt, am N-Terminus der beiden Proteine lokalisiert ist. Um diesen Molekülbereich von YscM1 und YscM2 näher zu bestimmen und einzugrenzen, wurden Peptide synthetisiert, die den N-Terminus repräsentieren. Abbildung C.7.5 gibt einen Überblick über die synthetisierten Peptide. Bei der Wahl der Peptide wurden die Vorhersagen zu Sekundärstrukturelementen und Homologien der beiden Proteine zueinander bzw. zu YopH berücksichtigt (Abb. C.7.4).

```

YscM1  ----MKINTLQSLINQQITQVGH-----GGQAGRLTETNPLTENSHQISTAEKA
YscM2  MGSIMKINDLKSLISMQIAEFGG-----GEKIGRLKSTLQQVS-TQAITSDERR
YopH   --MNLSDLHRQVSRVLVQQESGDCTGKLRGNVAANKETTFQGLTIASGARESEKV

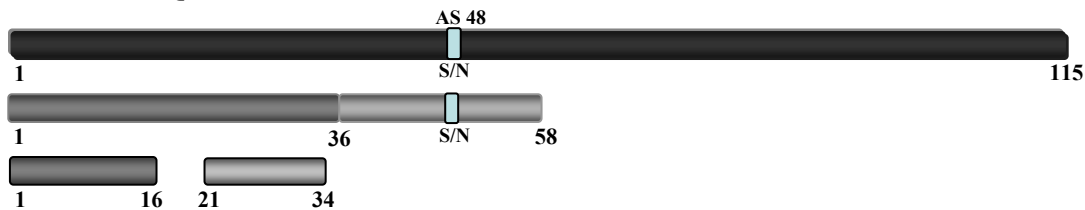
YscM1  FASEVLEHVKNTALSRHDIACLLP-----RVSNLELKQGGKAGEVIVTGLRTEQLSL
YscM2  FAYAVLEHAKNTILNRQDVAKLLP-----RASNFELSQGGKGEVILKGLRVEQLSL
YopH   FAQTVLSHVANIVLTQEDTAKLLQSTVKHNLNNYELRSVGNGNSVLVSLRSDQMTL

YscM1  SDAKLLLEAAMRQDTAADG115
YscM2  EDAKLLLDAVTRKMQKL116
YopH   QDAKVLLEAALRQESGARG127.....

```

Abb. C.7.4 Sequenzvergleich von YscM1, YscM2 und YopH. Die Proteinsequenzen von YscM1, YscM2 und dem N-Terminus von YopH aus *Y. enterocolitica* O:8 wurden miteinander verglichen. Aminosäuren, die in allen drei Proteinen konserviert sind, sind fett markiert, Aminosäuren die nur in YscM1 und YscM2 konserviert sind, sind in grau hervorgehoben. In YscM1 ist die Aminosäure 48 unterstrichen. Diese ist in LcrQ gegen Asparagin ausgetauscht.

#### YscM1/LcrQ



#### YscM2



Abb. C.7.5 Peptide abgeleitet von YscM1/LcrQ und YscM2. Ausgehend von den Proteinen wurden unter Berücksichtigung von Sekundärstrukturvorhersagen und der Homologien der Proteine zueinander und zu YopH Peptide abgeleitet, die den N-Terminus repräsentieren. Die erste Generation an Peptiden umfasste für YscM1/LcrQ die ersten 36 Aminosäuren bzw. die Aminosäuren 36-58, für YscM2 die ersten 40 Aminosäuren. Eine zweite Generation an Peptiden umfasste die Aminosäuren 1-16 und 21-34 für YscM1/LcrQ und die Aminosäuren 5-20 und 25-38 für YscM2. In LcrQ ist gegenüber YscM1 an Position 48 die Aminosäure Serin (S) gegen die Aminosäure Asparagin (N) ausgetauscht.

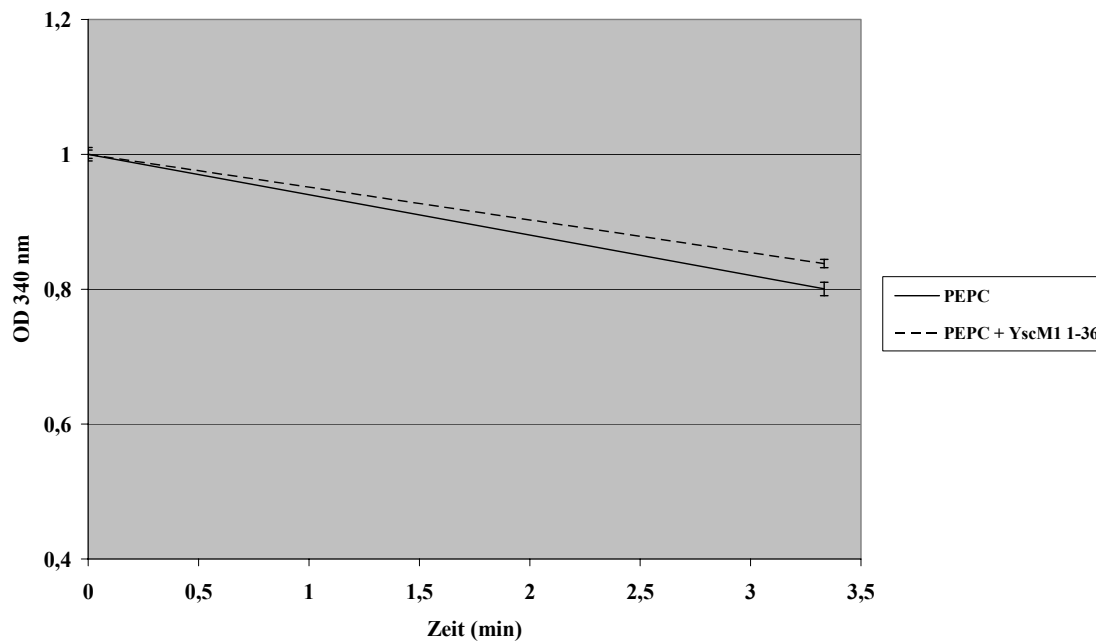
Eine erste Generation an Peptiden umfasste die ersten 36 (YscM1) bzw. 40 (YscM2) Aminosäuren der Proteine<sup>5</sup>. Die Peptide wurden so gewählt, da nach Aminosäure 40 der Bereich höchster Homologie zu YopH beginnt und deshalb hier der Beginn der Bindungsdomäne des Chaperons SycH vermutet wurde. Da der Molekülbereich nach Aminosäure 40 durch das Chaperon abgedeckt sein dürfte, ist eine Wechselwirkung in diesem Bereich eher unwahrscheinlich. Um die Frage zu klären, ob LcrQ sich im Vergleich zu seinem Homologen YscM1 in Bezug auf die Bindung an PEPC unterscheidet, wurde trotzdem zusätzlich der Bereich der Aminosäuren 36-58 für YscM1 und LcrQ in die Studie miteinbezogen. Die beiden Proteine, die ansonsten identisch sind, unterscheiden sich in diesem Bereich in einer Aminosäure. An Position 48 ist in LcrQ die Aminosäure Serin gegen Asparagin ausgetauscht (Abb. C.7.5).

Im Enzymassay zeigten die beiden Peptide YscM1 1-36 und YscM2 1-40 dieselbe Tendenz wie die beiden rekombinanten Proteine YscM1 und YscM2 (Abb. C.7.6 und Tab. C.7.1). YscM1 1-36 erniedrigte die Enzymaktivität von PEPC während YscM2 1-40 diese erhöhte. Der relativ geringe Einfluss von YscM1 1-36 auf die Enzymaktivität von PEPC lässt sich zumindest teilweise mit der geringen Löslichkeit des Peptids erklären. Die Peptide YscM1 36-58 und LcrQ 36-58 beeinflussten die Enzymaktivität von PEPC nicht (Tab.C.7.1). Die in Abbildung C.7.6 dargestellten Daten bestätigen die Vermutung, dass der Bindungsbereich für die Modulation der Enzymaktivität von PEPC bei YscM1/LcrQ und YscM2 innerhalb der ersten 40 Aminosäuren lokalisiert ist.

---

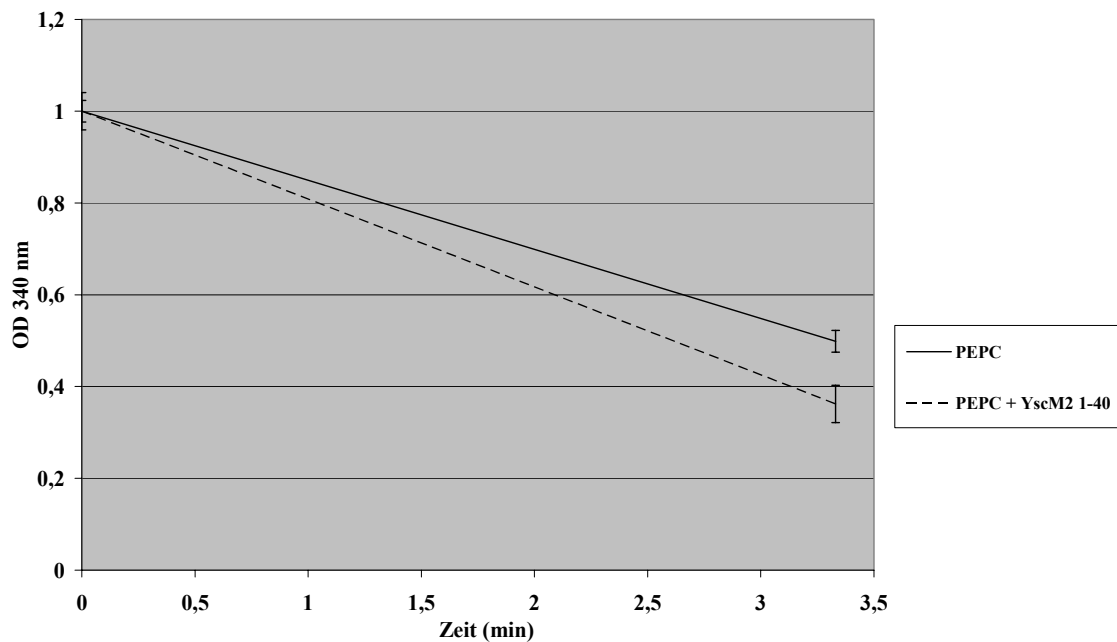
<sup>5</sup> Die DNA-Sequenz von *yscM2* kodiert für zwei mögliche Start-Codons. Hier wurde von einem Translationsstart am ersten Start-Codon ausgegangen, weshalb der N-Terminus von YscM2 gegenüber YscM1 um 4 Aminosäuren länger ist.

A.



**C.7.6.A. Einfluss der Peptide auf die Enzymaktivität von PEPC.** Einfluss von YscM1 1-36 auf die Enzymaktivität von PEPC. YscM1 1-36 wurde in 50 mM Tris pH 7,5 und 150 mM NaCl unter Zusatz von 2 M Harnstoff gelöst und in Konzentrationen von 100  $\mu$ M im Reaktionsansatz eingesetzt. Der Kontrolle wurde dieselbe Menge an Harnstoff zugesetzt. Jeweils 3 unabhängige Messungen wurden durchgeführt und der Mittelwert der Steigungen aufgetragen. Fehlerbalken:  $\pm$  Standardabweichung.

B.



**Abb. C.7.6.B Einfluss der Peptide auf die Enzymaktivität von PEPC.** Einfluss von YscM2 1-40 auf die Enzymaktivität von PEPC. YscM2 1-40 wurde in 50 mM Tris pH 7,5 und 150 mM NaCl gelöst und in einer Konzentration von 100  $\mu$ M im Reaktionsgemisch eingesetzt. Jeweils 3 unabhängige Messungen wurden durchgeführt und der Mittelwert der Steigungen aufgetragen. Fehlerbalken:  $\pm$  Standardabweichung.

Eine zweite Generation von Peptiden sollte die Bindungsdomäne von YscM1 und YscM2 an PEPC weiter eingrenzen. Für YscM1 wurden Peptide mit den Aminosäuren 1-16 und 21-34 synthetisiert, für YscM2 Peptide, die die Aminosäuren 5-20 und 25-38 (Abb. C.7.5) umfassten. Bei der Wahl der Peptide wurden die Sekundärstrukturelemente berücksichtigt. Tabelle C.7.1 gibt einen Überblick über den Einfluss der Peptide auf die Enzymaktivität von PEPC. Hieraus wird ersichtlich, wie im Fall von YscM1 1-36 bereits erwähnt, dass die schlechte Löslichkeit mancher Peptide deren Einsatz in dem gewählten Enzymassay einschränkte. Die Verwendung von 2 M Harnstoff als Lösungsmittel sollte die Löslichkeit der schlecht löslichen Peptide erhöhen. Im Fall von YscM1 1-36 war dies möglich, und das Peptid konnte im Enzymassay eingesetzt werden. Dagegen konnte das Peptid YscM1 1-16 auch bei höheren Harnstoffkonzentrationen nicht in Lösung gebracht werden.

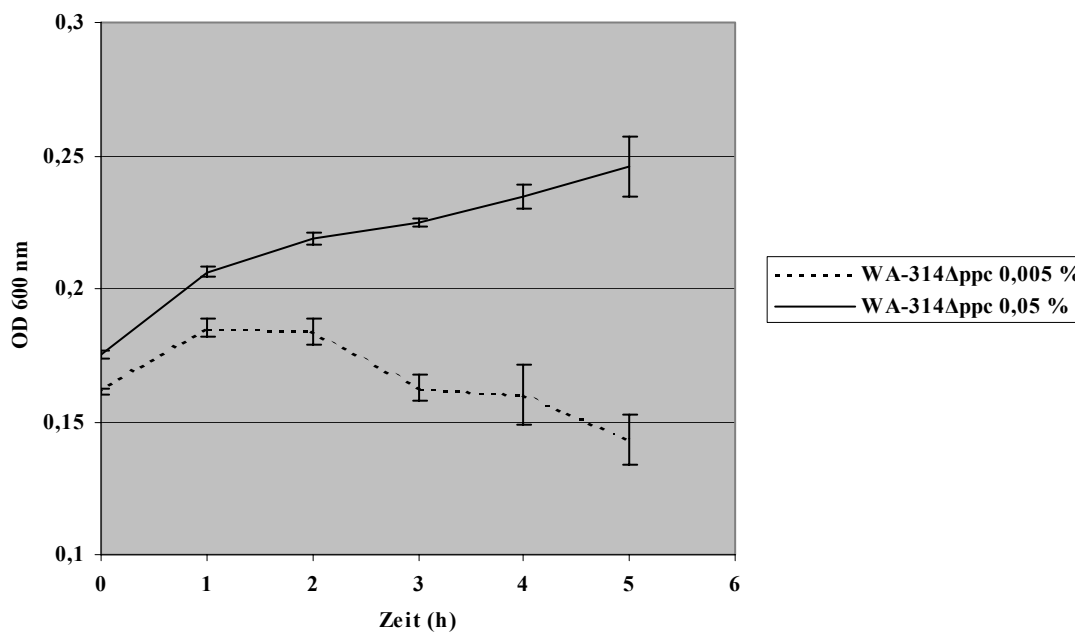
Peptid	Löslichkeit	Effekt
YscM1 1-36	in 2 M Harnstoff	↓
YscM1 36-58	gut	—
YscM1 1-16	nicht löslich	nicht nachweisbar
YscM1 21-34	gut	—
YscM2 1-40	gut	↑↑
YscM2 5-20	mäßig	↑↑
YscM2 25-38	gut	↑

**Tab. C.7.1 Peptide und ihr Effekt auf die Enzymaktivität von PEPC.** Die Peptide wurden von den Firmen Thermohybrid und Metabion synthetisiert und standardmäßig in 50 mM Tris pH 7,5 mit 150 mM NaCl gelöst. YscM1 1-36 wurde im Standardpuffer unter Zusatz von 2 M Harnstoff gelöst. YscM1 1-16 ließ sich auch mit höheren Harnstoffkonzentrationen nicht in Lösung bringen. Die Peptide wurden zur Bestimmung ihres Einflusses auf die Enzymaktivität von PEPC in Konzentrationen von 100  $\mu$ M eingesetzt. ↓: Erniedrigung der Enzymaktivität; ↑: Erhöhung der Enzymaktivität; —: es konnte kein Einfluss auf die Enzymaktivität von PEPC nachgewiesen werden.

## C.8 MODULATION DER AKTIVITÄT VON PEPC DURCH YSCM1 UND YSCM2 *IN VIVO*

Nach Bestätigung der Bindung von YscM1 und YscM2 an PEPC im Nativgel und dem Nachweis der Modulation der Enzymaktivität von PEPC durch die beiden TTSS-Komponenten sollte in Wachstumsversuchen der Einfluss von YscM1 und YscM2 auf die Enzymaktivität von PEPC untersucht werden. Als Kulturmedium wurde für diese Wachstumsversuche M9-Minimalmedium mit 1 % Glukose als Kohlenstoffquelle gewählt. Das Medium wurde zusätzlich mit 1 mM Thiamin und 0,005 % Casaminosäuren supplementiert. Die PEPC war für das Wachstum der Bakterien unter den gewählten Bedingungen essentiell. In Abb. C.8.1 ist das Wachstum der PEPC-Deletionsmutante WA-314 $\Delta$ *ppc* in dem beschriebenen M9-Medium dargestellt, zum

Vergleich sind Konzentrationen von 0,05 % und 0,005 % Casaminosäuren dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass WA-314 $\Delta$ *ppc* bei der in den folgenden Versuchen verwendeten Konzentration von 0,005 % an Casaminosäuren kein Wachstum aufweist. Damit sollte das Medium ideal sein, um den Einfluss von YscM1 und YscM2 auf die Enzymaktivität von PEPC zu untersuchen.



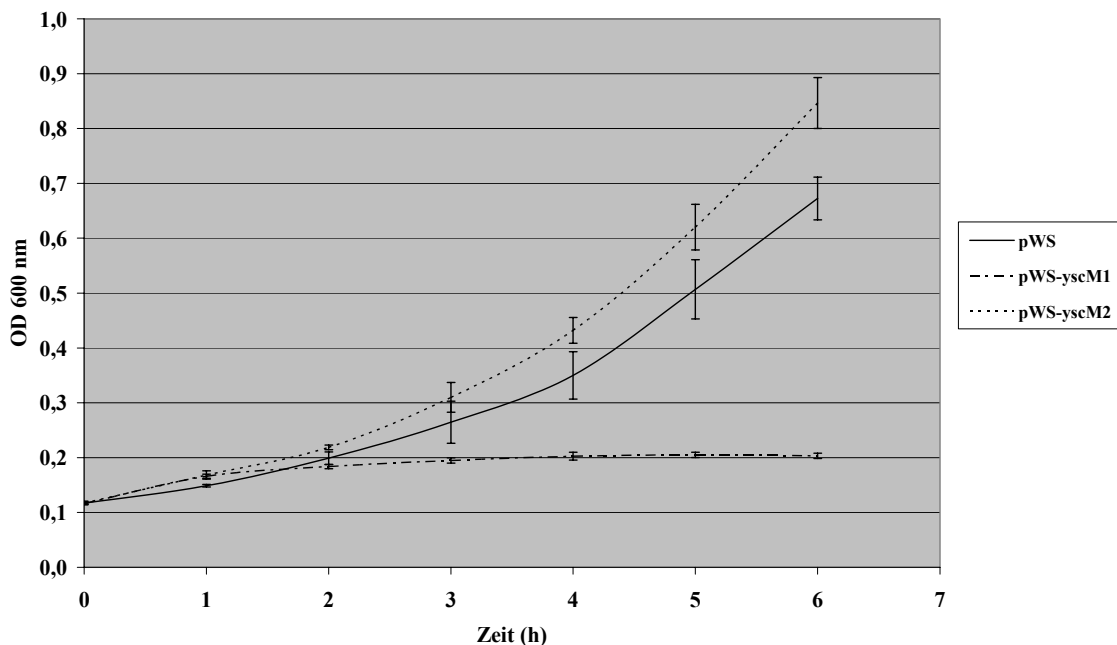
**Abb. C.8.1 Die PEPC-Deletionsmutante WA-314 $\Delta$ *ppc* in M9-Medium.** Wachstum von WA-314 $\Delta$ *ppc* erfolgte in M9-Minimalmedium mit 1 % Glukose supplementiert mit 1 mM Thiamin und entweder 0,05 oder 0,005 % Casaminosäuren bei 27 °C. Die OD<sub>600 nm</sub> wurde in regelmäßigen Abständen bestimmt. Drei Datenreihen von unabhängigen Kulturen wurden gemittelt aufgetragen. Fehlerbalken:  $\pm$  Standardabweichung.

### C.8.1 Überexpression von YscM1 und YscM2 in *Yersinia enterocolitica*

YscM1 und YscM2 wurden in *Yersinia enterocolitica* WA-314 überexprimiert. Hierfür wurden die Expressionskonstrukte pWS-*yscM1* und pWS-*yscM2* verwendet (siehe C.6). *yscM1* und *yscM2* standen beide unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors. *Yersinia enterocolitica* WA-314[pWS-*yscM1*], WA-314[pWS-*yscM2*] und WA-314[pWS] wurden über Nacht in LB-Medium bei 27 °C unter Zusatz von 0,2 % Glukose angezogen. Die Bakterien wurden dann mit M9-Medium gewaschen und auf eine Start-OD<sub>600 nm</sub> von ungefähr 0,1 eingestellt. Dem M9-Medium wurde 1 % Glukose, 1 mM Thiamin und 0,005 % Casaminosäuren zugesetzt. Das Wachstum erfolgte bei 27 °C für 6 – 8 Stunden. Die Expression von *yscM1* und



*yscM2* wurde mit 1 mM IPTG induziert. Die Abbildung C.8.2. zeigt, dass die Überproduktion von YscM1 in WA-314 zu einer Wachstumsinhibition führte, während die Überproduktion von YscM2 ein schnelleres Wachstum der Bakterien im Vergleich zum Kontrollstamm bewirkte. Dieser Wachstumsversuch bestätigt somit das Modell, nach dem YscM1 als Inhibitor von PEPC fungiert, während YscM2 die Enzymaktivität von PEPC erhöht. Damit unterstützt dieser Versuch die bisherigen Ergebnisse, die eine Modulation der Enzymaktivität von PEPC durch YscM1 und YscM2 gezeigt haben (siehe C.7.1). Eine Überproduktion von YscM1 und YscM2 in *E. coli* zeigte dieselben Ergebnisse, weshalb ein potentieller Einfluss des pYV-Plasmids auf die Vermehrung der Yersinien ausgeschlossen werden kann.

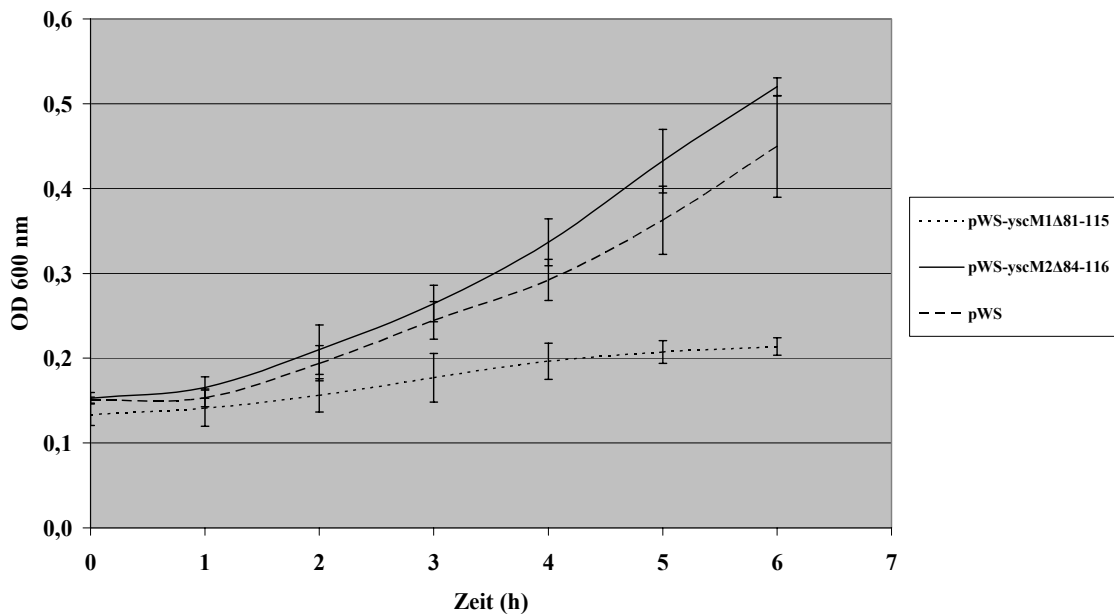


**Abb. C.8.2 Überproduktion von YscM1 und YscM2 in *Y. enterocolitica* WA-314.** Wachstum von WA-314[pWS-yscM1], WA-314[pWS-yscM2] und WA-314[pWS] erfolgte in M9-Minimalmedium supplementiert mit 1 % Glukose, 1 mM Thiamin und 0,005 % Casaminsäuren bei 27 °C. Die Synthese von YscM1 und YscM2 wurde mit 1 mM IPTG induziert. Die OD<sub>600 nm</sub> wurde in regelmäßigen Abständen bestimmt. Drei Datenreihen von unabhängigen Kulturen wurden gemittelt aufgetragen. Fehlerbalken: ± Standardabweichung.

### C.8.2 Überexpression von YscM1<sub>Δ81-115</sub> und YscM2<sub>Δ84-116</sub>

Vor kurzem wurde eine wichtige Domäne für die negativ regulatorische Funktion von YscM1 und YscM2 auf das TTSS im C-Terminus der beiden Proteine lokalisiert. Dazu wurden in YscM1 und YscM2 die Aminosäuren ab Position 81 bzw. Position 84 deletiert, wodurch die

Proteine ihre regulatorische Wirkung auf das TTSS verloren (Cambronne *et al.*, 2004). Um den Einfluss des C-Terminus von YscM1 und YscM2 auf die Modulation der Enzymaktivität von PEPC zu untersuchen, wurden YscM1 und YscM2 ebenfalls C-terminal verkürzt. Bei den im folgenden Versuch verwendeten verkürzten Proteinen YscM1<sub>Δ81-115</sub> und YscM2<sub>Δ84-116</sub> wurden C-terminal dieselben Aminosäuren deletiert wie in der Arbeit von Cambronne *et al.* (2004). Der N-Terminus von YscM2<sub>Δ84-116</sub> unterscheidet sich jedoch aufgrund eines möglichen zweiten Startcodons in der Sequenz von *yscM2*. Bei YscM2<sub>Δ84-116</sub> wurde eine Transkription ausgehend vom ersten Start-Codon vorausgesetzt. *yscM1*<sub>Δ81-116</sub> und *yscM2*<sub>Δ84-115</sub> wurden mit den Primern *yscM1/2* 5'-NdeI und *yscM1* Δ81-115 bzw. *yscM2* Δ84-116 3'-SalI amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *SalI* in den Expressionsvektor pWS kloniert. Die resultierenden Plasmide pWS-*yscM1*<sub>Δ81-115</sub> und pWS-*yscM2*<sub>Δ84-116</sub> wurden durch Sequenzierung bestätigt und in *Yersinia enterocolitica* WA-314 überexprimiert. Die intrazelluläre Löslichkeit der beiden verkürzten Proteine war jedoch sehr schlecht, weshalb eine Expression zusammen mit dem Chaperon SycH erfolgte, was die Löslichkeit von YscM1<sub>Δ81-115</sub> und YscM2<sub>Δ84-116</sub> deutlich erhöhte. Für die Ko-Expression von *sycH* wurde der Vektor pETU-*sycH* (siehe C.4.3.5) verwendet. Die Überproduktion von YscM1<sub>Δ81-115</sub> und YscM2<sub>Δ84-116</sub> konnte bei gleichzeitiger Synthese von SycH nicht in *Y. enterocolitica* WA-314 erfolgen, da die Expression von *sycH* von der Anwesenheit der T7 RNA-Polymerase abhängig ist. Aus diesem Grund wurde das Wachstumsexperiment in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS durchgeführt. Das Wachstum erfolgte wie zuvor beschrieben in M9-Medium mit 1% Glukose unter Zugabe von 1 mM Thiamin und 0,005 % Casaminsäuren bei 27 °C. In regelmäßigen Abständen wurde die OD<sub>600 nm</sub> bestimmt. Die Expression von *yscM1*<sub>Δ81-115</sub>, *yscM2*<sub>Δ84-116</sub> und *sycH* wurde durch 1 mM IPTG induziert. Die Abbildung C.8.3 zeigt, dass die verbleibenden 80 bzw. 83 Aminosäuren ausreichend sind, um sowohl die Wachstumsinhibition als auch die Wachstumssteigerung zu bewirken. Man kann also davon ausgehen, dass der C-Terminus von YscM1 und YscM2 für eine Modulation der Enzymaktivität von PEPC keine Rolle spielt. Auch die Bindung des Chaperons SycH an die beiden Proteine beeinflusst die Wechselwirkung mit PEPC offenbar nicht. Zudem scheinen die Bindungsstellen für YscM1/2 in der PEPC von *E. coli* konserviert zu sein. Da der Einfluss auf die Enzymaktivität von PEPC von den C-terminalen Deletionen unberührt blieb, handelt es sich bei Modulation der Enzymaktivität von PEPC offensichtlich um eine völlig neue Funktion von YscM1 und YscM2, die unabhängig von der beschriebenen negativ regulatorischen Funktion auf das TTSS ist.

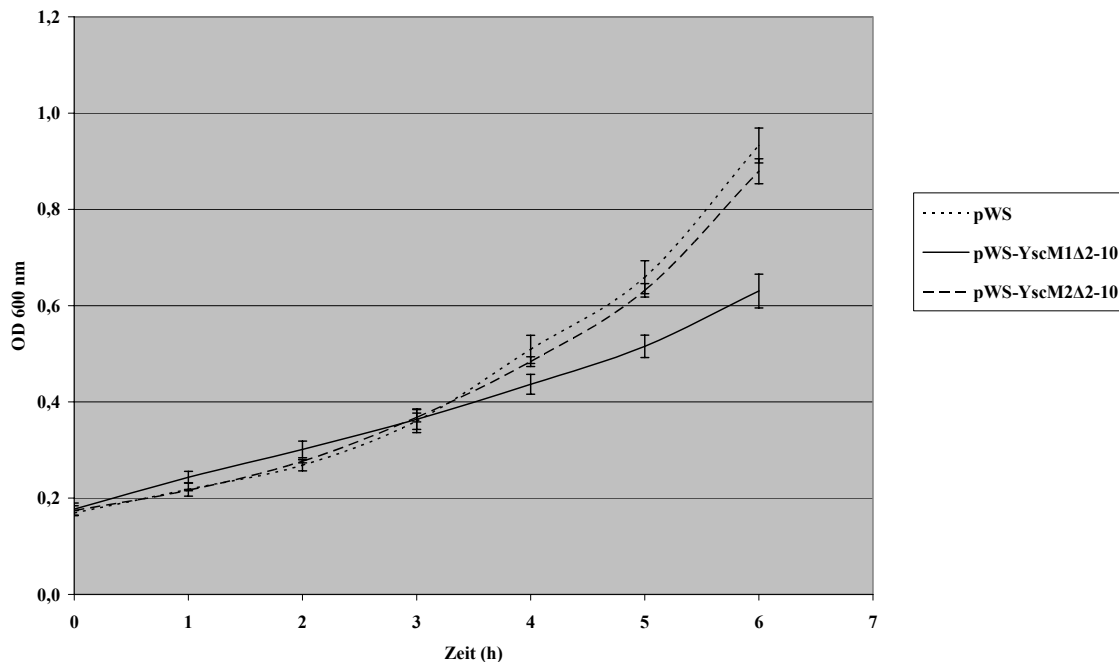


**Abb. C.8.3 Überexpression von YscM1 $\Delta$ 81-115 und YscM2 $\Delta$ 84-116.** YscM1 $\Delta$ 81-115 und YscM2 $\Delta$ 84-116 wurden zusammen mit ihrem Chaperon SycH in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS überexprimiert. Als Kontrolle diente der Leervektor pWS. Das Wachstum erfolgte in M9-Minimalmedium supplementiert mit 1 % Glukose, 1 mM Thiamin und 0,005 % Casaminosäuren bei 27 °C. Die Expression von YscM1 $\Delta$ 81-115 und YscM2 $\Delta$ 84-116 wurde mit 1 mM IPTG induziert. In regelmäßigen Abständen wurde die OD bei 600 nm bestimmt. Drei Datenreihen von unabhängigen Kulturen wurden gemittelt aufgetragen. Fehlerbalken:  $\pm$  Standardabweichung.

### C.8.3 Überexpression von YscM1 $\Delta$ 2-10 und YscM2 $\Delta$ 2-10 in *Yersinia enterocolitica*

Die Experimente in C.5.1 und C.7.2 lieferten bereits erste Hinweise darauf, dass der N-Terminus von YscM1 und YscM2 eine wichtige Rolle bei der Bindung an PEPC spielt. Die Bedeutung des N-Terminus von YscM1 und YscM2 für die Modulation der Enzymaktivität von PEPC wurde deshalb auch bei Wachstum im Minimalmedium untersucht. Die Aminosäuren 2-10 in YscM1 und YscM2 wurden deletiert. *yscM1* $\Delta$ 2-10 und *yscM2* $\Delta$ 2-10 wurden mit den Primern *yscM1/2*  $\Delta$ 2-10 5'-NdeI und *yscM1/2* 3'-SalI amplifiziert und über die Schnittstellen *NdeI* und *SalI* in den Expressionsvektor pWS kloniert. Die resultierenden Plasmide pWS-*yscM1* $\Delta$ 2-10 und pWS-*yscM2* $\Delta$ 2-10 wurden durch Sequenzierung bestätigt und in *Y. enterocolitica* WA-314 überexprimiert. Das Wachstum erfolgte in M9-Medium mit 1 % Glukose supplementiert mit 1 mM Thiamin und 0,005 % Casaminosäuren bei 27 °C. Die Induktion der Expression von *yscM1* $\Delta$ 2-10 und *yscM2* $\Delta$ 2-10 erfolgte mit 1 mM IPTG. Die OD<sub>600 nm</sub> wurde in regelmäßigen Abständen bestimmt. Die Abbildung C.8.4 zeigt, dass der hemmende Effekt von YscM1 durch die Deletion der Aminosäuren 2-10 reduziert wird, während der aktivierende Effekt von YscM2 komplett aufgehoben wird. Wie erwartet spielt also der N-Terminus von YscM1 und YscM2 für die In-

teraktion mit PEPC eine große Rolle. Zumindest im Fall von YscM1 kann man davon ausgehen, dass der Molekülbereich für die Bindung an PEPC über die ersten 10 Aminosäuren hinausreicht, da der Einfluss auf PEPC durch die Deletion der Aminosäuren 2-10 nicht komplett unterbunden werden konnte. Möglicherweise wird die Bindung von YscM2 an PEPC aufgrund der fehlenden Aminosäuren nur abgeschwächt.



**Abb. C.8.4 Überproduktion von YscM1<sub>Δ2-10</sub> und YscM2<sub>Δ2-10</sub>.** *yscM1*<sub>Δ2-10</sub> und *yscM2*<sub>Δ2-10</sub> wurden in *Y. enterocolitica* WA-314 überexprimiert. Als Kontrolle diente der Leervektor pWS. Das Wachstum erfolgte in M9-Medium mit 1 % Glukose supplementiert mit 1 mM Thiamin und 0,005 % Casaminosäuren bei 27 °C. Die Expression wurde mit 1 mM IPTG induziert. In regelmäßigen Abständen wurde die OD<sub>600 nm</sub> bestimmt. Drei Datenreihen von unabhängigen Kulturen wurden gemittelt aufgetragen. Fehlerbalken: ± Standardabweichung.

#### C.8.4 Deletion von *yscM1* und *yscM2* in *Yersinia enterocolitica*

Bisher wurde der Einfluss von YscM1 und YscM2 auf die Enzymaktivität von PEPC durch Überproduktion der Proteine in *Y. enterocolitica* WA-314 untersucht. Im Folgenden sollte dies indirekt durch Deletion von *yscM1* oder *yscM2* erfolgen. Es wurden die Deletionsmutanten *Y. enterocolitica* WA-314Δ*yscM1* und WA-314Δ*yscM2*, verwendet, um den Effekt von YscM1 und YscM2 auf PEPC unabhängig voneinander darzustellen und so eine Addition der Effekte von YscM1 und YscM2 auszuschließen. Dazu erfolgte das Wachstum der Yersinien in M9-

Minimalmedium supplementiert mit 1 % Glukose, 0,005 % Casamino-säuren und 1mM Thiamin wie zuvor beschrieben. Eine Induktion der Expression von *yscM1* oder *yscM2* wurde durch Aktivierung des TTSS bei 37 °C angestrebt. Weder der Kontrollstamm WA-314 noch die Mutanten zeigten jedoch bei 37 °C Wachstum, das über eine  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,2 hinausging. Auch der Stamm WA-C, der nicht über das Virulenzplasmid verfügt, konnte nicht bei 37 °C kultiviert werden, was einen Effekt des TTSS ausschließt. Warum kein Wachstum bei 37 °C beobachtet werden konnte, ist nicht geklärt. Da das TTSS nicht erst bei exakt 37 °C aktiviert wird, sondern die Aktivierung beim Übergang von 27 °C auf 37 °C fließend verläuft, wurde der Versuch bei einer Temperatur von 33 °C durchgeführt. Die Yersinien wuchsen bei dieser Temperatur deutlich besser, die Aktivierung des TTSS war allerdings nur schwach. Es konnten allerdings keine eindeutigen und reproduzierbaren Wachstumsunterschiede zwischen den Mutanten und dem Kontrollstamm beobachtet werden, was möglicherweise durch die zu schwache Aktivierung des TTSS bedingt war.

## C.9 WACHSTUMSVERSUCHE IN BHI

### C.9.1 Einfluss von YscM1 und YscM2 auf PEPC in *Y. enterocolitica*

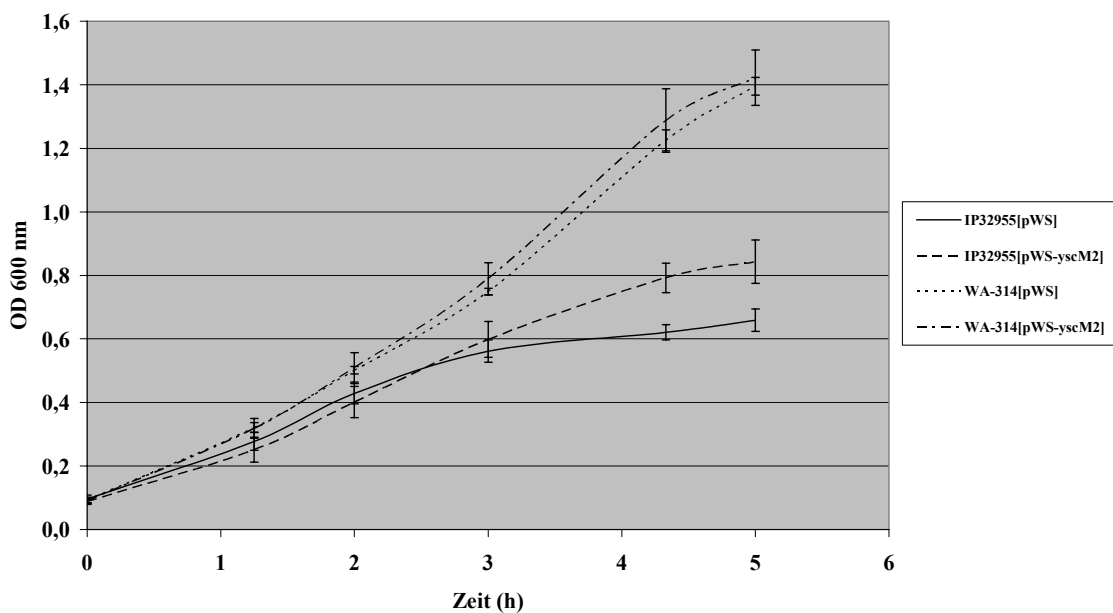
Da sich das M9-Medium für die Kultivierung der verwendeten *Y. enterocolitica*-Stämme bei 37 °C als ungeeignet erwiesen hatte, wurde BHI als Kulturmedium gewählt. In diesem Medium ist sowohl Wachstum von Yersinien bei 37 °C und Induktion des TTSS als auch Yop-Sekretion beschrieben. Im Gegensatz zum M9-Minimalmedium handelt es sich bei BHI um ein sehr reichhaltiges Medium. Die in C.8.4 beschriebenen Deletionsmutanten *Y. enterocolitica* WA-314 $\Delta$ *yscM1* und WA-314 $\Delta$ *yscM2* wurden im Vergleich zu den Kontrollstämmen WA-314 und WA-314 $\Delta$ *ppc* bei 37 °C in BHI kultiviert, um das TTSS zu aktivieren. Im Kontrollstamm WA-314 $\Delta$ *ppc* wurde das PEPC-Gen *ppc* durch Austausch gegen eine Kanamycinkassette deletiert. Dem Kulturmedium BHI wurde entweder 1 mM  $Ca^{2+}$  hinzugefügt, um die Yop-Sekretion zu unterbinden, oder die Yop-Sekretion wurde durch Chelatierung von  $Ca^{2+}$  mit 5 mM EGTA und Zugabe von 10 mM  $MgCl_2$  induziert. Die Deletionsmutanten *Y. enterocolitica* WA-314 $\Delta$ *yscM1* und WA-314 $\Delta$ *yscM2* zeigten im Vergleich zu den Kontrollstämmen WA-314, WA-314 $\Delta$ *ppc* bei 37 °C mit und ohne  $Ca^{2+}$  keine unterschiedlichen Wachstumseigenschaften. Auch eine Überexpression von YscM1 oder YscM2 in BHI wie in C.8.1 beschrieben, zeigte keinen Einfluss auf das Wachstum. Die Tatsache, dass auch der Stamm WA-314 $\Delta$ *ppc* nicht im Wachstum gegen-

über WA-314 zurück blieb, macht deutlich, dass die Funktion der PEPC in BHI eine untergeordnete Rolle spielt. Offenbar kann *Yersinia enterocolitica* wichtige Nährstoffe aus dem Medium aufnehmen und muss sie nicht selbst synthetisieren, oder das Bakterium kann aufgrund der Vielzahl an Nährstoffen in BHI auf andere Stoffwechselwege ausweichen. Das erklärt auch, warum weder die Deletion noch die Überexpression von *yscM1* und *yscM2* einen Einfluss auf das Wachstum von *Y. enterocolitica* in BHI besitzen.

### **C.9.2 Die durch $\text{Ca}^{2+}$ -Mangel bedingte Wachstumsinhibition bei *Y. pseudotuberculosis* wird durch YscM2 aufgehoben**

Der Versuch in C.9.1 hat gezeigt, dass die Funktion von PEPC bei Wachstum in BHI für *Y. enterocolitica* keine Rolle spielt. Von den anderen beiden humanpathogenen *Yersinia*-Spezies *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* aber ist bekannt, dass sie im Vergleich zu *Y. enterocolitica* ein deutlich langsames Wachstum in BHI (auch im  $\text{Ca}^{2+}$ -supplementierten Medium) zeigen. Der Grund hierfür wird in dem fortschreitenden Verlust an Stoffwechselfunktionen vermutet, den man von *Y. enterocolitica* über *Y. pseudotuberculosis* nach *Y. pestis* beobachten kann. Für *Y. pestis* sind diese Stoffwechseldefekte als besonders ausgeprägt beschrieben (Mortlock & Brubaker, 1962; Dreyfus & Brubaker, 1978). Es war also nicht auszuschließen, dass *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* im Gegensatz zu *Y. enterocolitica* auf die Funktion der PEPC in BHI angewiesen sind, da den Bakterien möglicherweise alternative Stoffwechselwege fehlen. *Y. pseudotuberculosis* IP32955 wurde deshalb im Vergleich zu *Y. enterocolitica* WA-314 in BHI bei 37 °C mit 5 mM EGTA und 10 mM  $\text{MgCl}_2$  kultiviert. *yscM1* und *yscM2* wurden mit den Expressionskonstrukten pWS-*yscM1* und pWS-*yscM2* parallel in IP32955 und in WA-314 überexprimiert. Als Kontrolle diente der Leervektor pWS. Die Abbildung C.9.1 zeigt, dass das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis* IP32955[pWS] gegenüber *Y. enterocolitica* WA-314[pWS] deutlich zurück blieb. Nach knapp 3 Stunden stoppt im Fall von IP32955[pWS] das Wachstum, während WA-314[pWS] bestenfalls eine schwache Verlangsamung des Wachstums aufweist. Diese Beobachtung korreliert mit veröffentlichten Daten (Carter *et al.*, 1980). Bei einer Überproduktion von YscM2 in *Y. pseudotuberculosis* IP32955 wird die charakteristische Wachstumsinhibition, die normalerweise bei 37 °C in  $\text{Ca}^{2+}$ -armen Medium auftritt, abgeschwächt (Abb. C.9.1). In *Y. enterocolitica* WA-314 zeigte eine Überproduktion von YscM2 keinen Effekt (Abb.C.9.1). Auch im Falle der Überproduktion von YscM1 konnte weder in IP32955 noch in WA-314 ein Einfluss auf das Wachstum der Bakterien nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dass YscM2, das in vorhergehenden Versuchen als Aktivator der En-

zymaktivität von PEPC identifiziert wurde, die Wachstumsinhibition bei *Y. pseudotuberculosis* aufheben kann, deutet auf eine Beteiligung von PEPC an der Wachstumsinhibition hin. Möglicherweise ist der Phänotyp der „low calcium response“ auf die Hemmung von PEPC durch YscM1 bzw. LcrQ zurückzuführen. Dass *Y. enterocolitica* in BHI keine Wachstumsinhibition zeigt, korreliert mit den Daten aus C.9.1, wo gezeigt werden konnte, dass das Fehlen von PEPC aufgrund der Vielzahl an alternativen Stoffwechselwegen kompensiert werden kann und sich nicht auf das Wachstum von *Y. enterocolitica* in BHI auswirkt. *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* allerdings scheinen auf die Funktion von PEPC aufgrund verschiedener Stoffwechseldefekte angewiesen zu sein. Da ihnen außerdem im Gegensatz zu *Y. enterocolitica* der PEPC-Aktivator YscM2 fehlt, bleiben sie im Wachstum zurück. Es wäre also möglich, dass YscM2 in Abbildung C.9.1 als Gegenspieler von LcrQ die PEPC-Reaktion für das Bakterium wieder verfügbar machen kann und so das Wachstum fördert. Dass die Überexpression von YscM1 in *Y. pseudotuberculosis* keinen Effekt zeigte, könnte dafür sprechen, dass die Bindungsstellen an PEPC bereits von endogenem LcrQ abgesättigt waren und so schon eine maximale Hemmung der PEPC bewirkt wurde.



**Abb. C.9.1 YscM2 schwächt die Wachstumsinhibition in *Y. pseudotuberculosis* ab.** YscM2 wurde in *Y. pseudotuberculosis* IP32955 und *Y. enterocolitica* WA-314 überproduziert. Das Wachstum erfolgte in BHI supplementiert mit 5 mM EGTA/10 mM MgCl<sub>2</sub>. Zur Kontrolle wurden die beiden *Yersinia*-Spezies mit dem Leervektor pWS transformiert. In regelmäßigen Abständen wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt. Drei Datenreihen von unabhängigen Kulturen wurden gemittelt aufgetragen. Fehlerbalken: ± Standardabweichung.

### C.10 EINFLUSS DER MODULATION VON PEPC AUF DAS TYP III-SEKRETIONSSYSTEM

Die Tatsache, dass YscM1 und YscM2 als Regulatoren des TTSS und damit der Yop-Synthese und Sekretion mit einem Stoffwechsellzym des Bakteriums interagieren und dessen Aktivität modulieren, gibt Anlass zu der Annahme, dass PEPC durch diese Modulation indirekt einen Einfluss auf die Pathogenität des Bakteriums oder gar auf die Yop-Synthese und Sekretion hat. Möglicherweise werden so optimale Stoffwechselbedingungen für das TTSS geschaffen und eine Art Feinabstimmung bewirkt. Deshalb wurde ein möglicher Einfluss von PEPC auf die Yop-Synthese und Sekretion bzw. auf die Pathogenität untersucht.

#### C.10.1 Einfluss der Modulation von PEPC auf die Yop-Sekretion

In der Literatur wurde ein Zellkulturmedium beschrieben, in dem Yop-Sekretion ohne Wirtszellkontakt möglich ist (Lee *et al.*, 2001). Da die PEPC-Deletionsmutante WA-314 $\Delta$ *ppc* in diesem Medium wie in M9-Medium kein Wachstum zeigte, scheint die PEPC für das Wachstum der Yersinien in diesem Medium essentiell zu sein. Damit bietet dieses Medium gute Voraussetzungen, um den Einfluss von YscM1 und YscM2 auf PEPC in einen Zusammenhang mit der Yop-Sekretion zu bringen. Die Deletionsmutanten von *yscM1*, *yscM2* und *ppc*, WA-314 $\Delta$ *yscM1*, WA-314 $\Delta$ *yscM2* und WA-314 $\Delta$ *ppc*, wurden nach Lee *et al.* (2001) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM supplementiert mit 0,2 % FCS kultiviert und Yop-Sekretion wurde durch Zugabe von 5 mM EGTA induziert. Entgegen der von Lee *et al.* (2001) publizierten Daten, stellte sich heraus, dass die Yop-Sekretion in diesem Medium minimal war. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Yop-Sekretionsmuster der Mutanten im Vergleich zu WA-314 festgestellt werden. Eine Interpretation der Ergebnisse ist durch die Tatsache erschwert, dass auch die nicht induzierten Kontrollen Yop-Sekretion und andere unspezifische Banden zeigten, was auf eine teilweise Lyse der Zellen während des Experiments hindeutet. Eine Aussage über einen möglichen Einfluss von PEPC auf die Yop-Sekretion konnte nicht getroffen werden.

#### C.10.2 Einfluss der Modulation von PEPC bei der Infektion von HeLa-Zellen

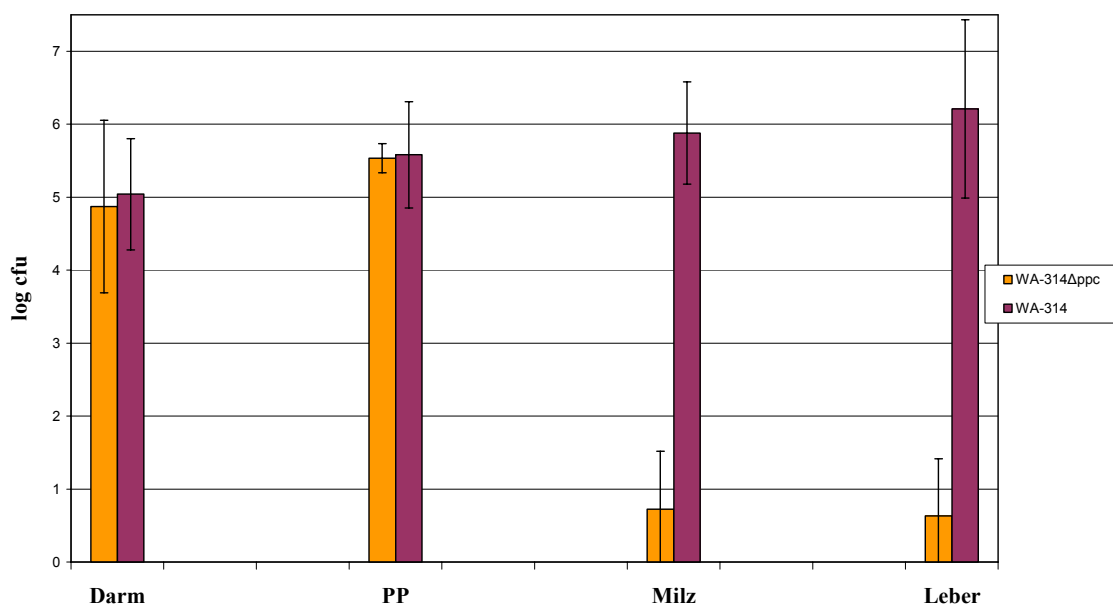
Um den Einfluss von PEPC auf die Pathogenität von *Y. enterocolitica* WA-314 zu ermitteln, wurden konfluente HeLa-Zellen jeweils mit WA-314, WA-314 $\Delta$ *ppc*, WA-314 $\Delta$ *yscM1* und WA-314 $\Delta$ *yscM2* im Vergleich zu dem Stamm WA-C ohne Virulenzplasmid infiziert. Translozierte Yops wurden im Zell-Zytosol spezifisch im Western Blot detektiert. Auch hier zeigten sich



keine signifikanten Unterschiede im Yop-Sekretionsmuster bei WA-314 und den Mutanten. Ein Einfluss von PEPC auf die Yop-Translokation konnte nicht nachgewiesen werden.

### C.11 EINFLUSS VON PEPC AUF DIE PATHOGENITÄT VON *Y. ENTEROCOLITICA*

Um die Bedeutung der PEPC für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* abzuschätzen, wurden *ppc*-, *yscM1*- und *yscM2*-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp WA-314 im Mausinfektionsmodell getestet. Dazu wurden je fünf 6 – 8 Wochen alte C57BL/6-Mäuse mit  $10^8$  Bakterien der Mutanten oder von WA-314 infiziert. Vier Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet. Leber, Milz und Peyer'sche Plaques wurden entnommen, sowie eine Darmspülung durchgeführt. Nach Homogenisierung wurden verschiedene Verdünnungen auf CIN-Agar ausplattiert und die Keimzahlen in den Organen bestimmt. Bei CIN-Agar handelt es sich um ein Selektivmedium für *Yersinia enterocolitica*. Abbildung C.11.1 zeigt das Ergebnis der Infektion mit WA-314 $\Delta$ *ppc* im Vergleich zu WA-314. WA-314 $\Delta$ *ppc* ist dabei ebenso wie der Vergleichsstamm WA-314 in der Lage Darm und Peyer'sche Plaques zu besiedeln. Bei der Disseminierung in die Maus, also der Besiedlung von Leber und Milz, scheint das Fehlen von PEPC ein Nachteil zu sein, da die Keimzahlen in Leber und Milz im Vergleich zu WA-314 wesentlich geringer sind (Abb. C.11.1). WA-314 $\Delta$ *ppc* ist also gegenüber WA-314 attenuiert.



**Abb. C.11.1 Einfluss von PEPC auf die Pathogenität von *Y. enterocolitica*.** Jeweils fünf C57BL/6-Mäuse wurden mit  $10^8$  Bakterien von WA-314 $\Delta$ *ppc* und WA-314 infiziert. Nach 4 Tagen wurden die Mäuse getötet, Peyer'sche Plaques, Milz und Leber wurden entnommen und eine Darmspülung durchgeführt. Die Organe wurden homogenisiert und auf CIN-Agar ausplattiert. Durch Auszählen der Platten wurden die Keimzahlen in den Organen berechnet. PP=Peyer'sche Plaques; cfu=Kolonie-bildende Einheiten.

Im Folgenden wurden kompetitive Infektionsversuche (Mischinfektionen) durchgeführt. Eine Maus wurde gleichzeitig mit der Mutante und dem Kontrollstamm infiziert. Als Kontrollstamm wurde ein Cm-resistentes Derivat von WA-314 verwendet. Der Cm-resistente Stamm ist in der Virulenz mit dem WA-314 vergleichbar (Trülsch *et al.*, 2004). Bei kompetitiven Infektionsversuchen wurden jeweils  $10^8$  Bakterien des Kontrollstamms ( $Cm^r$ ) und der Mutante ( $Km^r$ ) gemischt und mit einer Pipette an je fünf Mäuse verfüttert. Vier Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet. Die Organe wurden wie unter C.11.1 beschrieben entnommen und homogenisiert. Verschiedene Verdünnungen der Organe wurden auf CIN-Agar ausplattiert, dem zuvor ein entsprechendes Antibiotikum (Cm oder Km) zugesetzt wurde, und die Keimzahlen in den Organen wurden bestimmt.

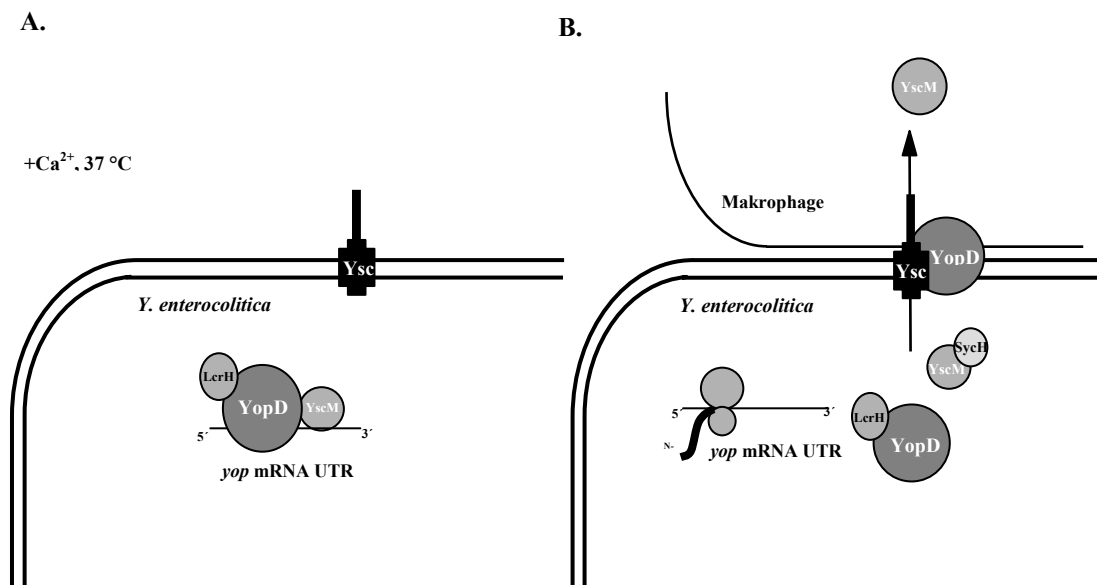
Die Ergebnisse der kompetitiven Mausinfektionsversuche sind in Tabelle C.11.1 als gepaarte mittlere Differenzen der log-Werte der Kolonie-bildenden Einheiten in den Organen angegeben. Im Fall von WA-314 $\Delta ppc$  kann man erkennen, dass die Mutante im Vergleich zum Kontrollstamms wie unter C.11.1 beschrieben in Milz und Leber attenuiert ist. WA-314 $\Delta yscM1$  scheint in der Milz aufgrund der Mutation gegenüber dem Kontrollstamm benachteiligt zu sein, während WA-314 $\Delta yscM2$  in seiner Virulenz nicht von Kontrollstamm zu unterscheiden ist. Die fettgedruckten Werte in Tabelle C.11.1 sind signifikant mit  $p < 0,05$ . Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass YscM1 und YscM2 nicht wie in der Literatur beschrieben (Stainier *et al.*, 1997) funktionell gleichwertig sind.

	$\Delta ppc$	$\Delta yscM1$	$\Delta yscM2$
<b>Darm</b>	1,03 ± 0,65	0,37 ± 0,34	0,33 ± 0,37
<b>Peyer'sche Plaques</b>	0,77 ± 0,88	0,25 ± 1,16	0,35 ± 0,57
<b>Leber</b>	<b>2,15 ± 0,64</b>	0,09 ± 0,10	0,25 ± 1,22
<b>Milz</b>	1,75 ± 0,83	<b>3,15 ± 2,62</b>	0,23 ± 0,35

**Tab. C.11.1 Mausinfektionsversuche.** Die mittlere logarithmische Differenz (= log Kolonie-bildende Einheiten Wildtyp pro Organ – log Kolonie-bildende Einheiten Mutante pro Organ) ± Standardabweichung ist hier dargestellt. Die fettgedruckten Werte sind signifikant mit  $p < 0,05$ . P-Werte wurden mit einem gepaarten einseitigen t-Test bestimmt.

## D. DISKUSSION

Das Typ III-Sekretionssystem (TTSS) bei *Yersinia* ist ein essentieller Faktor für die Virulenz und ist äußerst komplex aufgebaut und reguliert. Als negative Regulatoren des TTSS wurden LcrQ in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* bzw. YscM1 und YscM2 in *Y. enterocolitica* beschrieben (Rimpiläinen *et al.*, 1992; Stainier *et al.*, 1997). Der Mechanismus der Regulation des TTSS durch YscM1 und YscM2 ist aber bisher nicht verstanden. An der Regulation durch YscM1 und YscM2 sind verschiedene andere Komponenten beteiligt, wie z. B. das Chaperon SycH, YopD und sein Chaperon LcrH (Williams & Straley, 1998; Cambronne *et al.*, 2000; Wulff-Strobel *et al.*, 2002; Cambronne & Schneewind, 2002; Cambronne *et al.*, 2004). Die Abbildung D.1.1 zeigt ein Modell für das Zusammenspiel der verschiedenen Proteine während der Regulation der TTSS. Aufbauend auf diesen Kenntnissen sollten die Funktionen der Proteine YscM1 und YscM2 weiter charakterisiert werden und mögliche Interaktionspartner in *Y. enterocolitica* identifiziert werden.



**Abb. D.1.1 Modell der regulatorischen Wirkung von YscM1 und YscM2.** A. Bei  $37^{\circ}C$  im  $Ca^{2+}$ -haltigen Medium verhindern YopD, LcrH, YscM1 und YscM2 die Translation der *yop* mRNA durch Bindung an die 5' UTR. B. Durch Kontakt mit eukaryontischen Zellen und erniedrigter  $Ca^{2+}$ -Konzentration wird die Sekretion bzw. die Translokation YscM1/YscM2 initiiert und YopD lagert sich in die eukaryontische Membran ein. Dadurch wird die Inhibition der *yop* mRNA-Translation aufgehoben. YopB und LcrV, die ebenfalls an der Porenbildung in der Membran beteiligt sind, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit in dieser Zeichnung nicht berücksichtigt. (abgewandelt nach Cambronne & Schneewind, 2002)

### D.1 PROTEINREINIGUNG VON YSCM1 UND YSCM2

Um YscM1 und YscM2 näher zu charakterisieren und mithilfe von Wechselwirkungsstudien Interaktionspartner in *Y. enterocolitica* zu identifizieren, wurden für die beiden Proteine Reinigungsprotokolle erarbeitet, die eine Reinigung im Milligramm-Maßstab ermöglichen.

Während der Proteinreinigungen zeigte sich, dass YscM1 und YscM2 als Dimere vorliegen. Beide Proteine weisen eine hohe Homologie zum N-Terminus des Typ III-Effektors YopH auf. YopH wird spezifisch von seinem Chaperon SycH gebunden. Die spezifische Bindung des Chaperon SycH an YscM1 und YscM2 (Cambronne *et al.*, 2000; Cambronne *et al.*, 2004; Swietnicki *et al.*, 2004) ist wahrscheinlich durch die hohe Homologie zu YopH im Bereich der Chaperonbindungsstelle (Rimpiläinen *et al.*, 1992; Stainier *et al.*, 1997) bedingt. Für YopH wurde ebenfalls ein Dimer bei neutralem pH nachgewiesen (Smith *et al.*, 2001), weshalb die Dimerbildung von YscM1 und YscM2 auf die hohe Homologie zu YopH zurückzuführen sein könnte. Die Dimerisierung von Proteinen ist ein Phänomen, das in biologischen Systemen sehr häufig beobachtet werden kann (Alm & Arkin, 2003). Sie bringt dabei für das Protein verschiedene Vorteile mit sich. Beispielsweise kann die Stabilität der Proteine erhöht werden. Durch die Zusammenlagerung zweier Proteine können auch neue Bindungsdomänen entstehen bzw. bestehende Domänen ausgeweitet werden, was zu einer Erhöhung der Substratspezifität führt (Marianayagam *et al.*, 2004). Dies spielt bei vielen DNA-bindenden Proteinen eine Rolle. Im Fall der Typ II-Restriktionsenzyme erhöht die Dimerbildung die Bindungsaffinität an die DNA über eine Ausweitung der Bindungsdomäne (Pingoud & Jeltsch, 2001). Eine Dimerisierung kann auch die Aktivierung bzw. Inaktivierung eines Proteins steuern, indem Bindungsstellen in einem Dimer exponiert oder verdeckt werden (Jiang *et al.*, 2000; Giraldo *et al.*, 2003; Marianayagam *et al.*, 2004). Im Fall von YscM1 und YscM2 bleibt zu klären, ob die beobachtete Dimerisierung der Proteine für den regulatorischen Effekt auf die Yop-Sekretion und die Modulation der Enzymaktivität von PEPC von Bedeutung ist. Bekannt ist, dass eine Bindung an das Chaperon SycH den negativ-regulatorischen Effekt auf die Yop-Sekretion aufhebt (Cambronne *et al.*, 2000; Cambronne & Schneewind, 2002). Möglicherweise führt die Bindung an SycH zu einer Aufspaltung des Dimers in das inaktive Monomer. Da die Bindung von SycH an YscM1 und YscM2 den Einfluss auf die Enzymaktivität von PEPC nicht beeinflusst, könnte die Dimerisierung der Proteine hier eine untergeordnete Rolle spielen.

Während der Proteinreinigung von YscM1 und YscM2 zeigte sich außerdem, dass beide Proteine effektiv von Thrombin geschnitten werden (Wilharm *et al.*, 2003). In der Aminosäuresequenz von YscM1 und YscM2 konnten jeweils potentielle Thrombinschnittstellen identifiziert werden. Die biologische Relevanz der Thrombinschnittstelle bleibt dabei allerdings vorerst un-

bekannt. Da YscM1 und YscM2 beide sowohl in die eukaryontische Zelle transloziert als auch in den Kulturüberstand sezerniert werden, wäre eine Spaltung durch Thrombin von YscM1 und YscM2 in der Wirtszelle oder im extrazellulären Medium und eine damit verbundene Aktivierung der Proteine vorstellbar. Eine Bindung von Prothrombin an YscM1 und YscM2 konnte allerdings bereits ausgeschlossen werden.

Aufgrund der Basizität von YscM2 mit einem pI von 9,79 ist auch eine DNA-Bindungsaktivität des Proteins nicht auszuschließen, obwohl kein typisches Helix-Turn-Helix-Motiv vorhanden ist. Eine solche Aktivität konnte aber experimentell nicht gezeigt werden. Die in dieser Arbeit etablierten Reinigungsprotokolle für YscM1 und YscM2 erlauben jetzt aber weitere detaillierte biochemische Charakterisierungen der beiden Proteine. Eine Kristallisation von YscM1 und YscM2 wird in einer Kooperation<sup>6</sup> derzeit versucht.

## D.2 DIE WECHSELWIRKUNG VON YSCM1 UND YSCM2 MIT PEPC

Mittels immobilisiertem GST-YscM1 und GST-YscM2 konnte spezifisch ein Protein aus dem Lysat von *Y. enterocolitica* gereinigt werden, welches durch anschließende Massenspektrometrie als Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) identifiziert wurde. Die Interaktion wurde durch Nativgelexperimente bestätigt und mithilfe von Enzymaktivitätsmessungen und Wachstumsversuchen charakterisiert. YscM1 erwies sich als Inhibitor von PEPC, während YscM2 die Enzymaktivität von PEPC steigern konnte. Die Modulation der Enzymaktivität von PEPC stellt dabei eine völlig neue Funktion von YscM1 und YscM2 zusätzlich zu der negativ-regulatorischen Wirkung auf das TTSS dar. Wie und wo YscM1 und YscM2 genau an PEPC binden und die Enzymaktivität modulieren, ist bisher nicht bekannt. Um dies zu untersuchen, könnte man einen Verdau des PEPC-YscM1/2-Komplexes mit einer Protease durchführen. Eine Analyse der entstandenen Proteinfragmente mit Massenspektrometrie könnte Aufschluss über die Bindungsstelle an PEPC geben.

Interessant ist die Tatsache, dass YscM2 mit einer Identität von 57 % zu YscM1 einen entgegengesetzten Effekt auf die Enzymaktivität von PEPC ausübt. Mit diesen Ergebnissen wurde die bisher bestehende Meinung revidiert, YscM1 und YscM2 wären funktionell gleichwertige Proteine (Stainier *et al.*, 1997). Aufgrund der hohen Homologie der beiden Proteine binden YscM1 und YscM2 wahrscheinlich in ähnlicher Weise an PEPC. Vorstellbar ist, dass nur wenige Ami-

---

<sup>6</sup> Hartmut Niemann, Abteilung Strukturbiologie, GBF, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig

nosäuren über eine inhibitorische oder stimulatorische Wirkung der Proteine entscheiden. Da bekannt ist, dass die Bindungsdomäne für die Wechselwirkung mit PEPC am N-Terminus der beiden Proteine lokalisiert ist, wäre ein systematischer Austausch der fraglichen Aminosäuren gegen Alanin in diesem Bereich denkbar, um die Aminosäuren zu identifizieren, die für die Modulation der Enzymaktivität von PEPC verantwortlich sind.

Da YscM1 und YscM2 nicht nur für die bisher bekannte negative Regulation des TTSS verantwortlich sind, sondern durch die Modulation der Enzymaktivität von PEPC in den Stoffwechsel des Bakteriums eingreifen, sind diese Proteine gute Beispiele für so genannte „moonlighting proteins“. Die Vorstellung, dass ein Gen für ein Protein mit nur einer bestimmten Funktion kodiert, ist überholt. Proteine haben häufig unterschiedliche Funktionen. Die Funktion des Proteins kann sich z. B. je nach Lokalisation in der Zelle oder dem Zelltyp, von dem das Protein produziert wird, unterscheiden. Auch die Oligomerisierung eines Proteins und Konzentrationen an Liganden, Substraten, Produkten oder Kofaktoren können eine andere Funktion des Proteins induzieren (Jeffery, 1999). Im Fall von YscM1 und YscM2 werden die unterschiedlichen Funktionen durch verschiedene Bindungsstellen im Protein vermittelt. So wird der regulatorische Effekt auf das TTSS durch den C-Terminus der Proteine vermittelt (Cambronne *et al.*, 2004), während der Einfluss auf die Enzymaktivität von PEPC durch Bindung des N-Terminus von YscM1 und YscM2 an PEPC bedingt ist. Die Tatsache, dass YscM1 und YscM2 außerdem beide in die eukaryontische Zelle transloziert werden (Cambronne *et al.*, 2000; Cambronne *et al.*, 2004), legt die Vermutung nahe, dass beide Proteine zudem als Effektoren in der Wirtszelle fungieren. Durch Mikroinjektion könnten YscM1 oder YscM2 in die eukaryontische Zelle eingebracht werden und ein möglicher Effekt auf das Zytoskelett studiert werden. Auch Affinitätsbindungsexperimente, um Interaktionspartner und Zielstrukturen in der Wirtszelle zu identifizieren, könnten erfolgreich sein.

In der Basensequenz von *yscM2* fällt ein zweites Startcodon wenige Codons nach dem ersten auf. Bisher konnte nicht geklärt werden, an welchem der beiden Startcodons der Translationsstart erfolgt. Die resultierenden Proteine sind je nach Translationsstart 112 bzw. 116 Aminosäuren lang. In dieser Arbeit wurde von einem Translationsstart am ersten Startcodon ausgegangen. Interessant wäre sicher, herauszufinden, welches Startcodon tatsächlich den Translationsstart von *yscM2* darstellt, ob möglicherweise beide Startcodons genutzt werden und eine Verkürzung des Proteins vielleicht biologisch relevant ist. Da der modulatorische Effekt auf die Enzymaktivität von PEPC am N-Terminus von YscM2 lokalisiert ist, wäre durchaus denkbar, dass sich eine Verkürzung des Proteins um vier Aminosäuren durch einen Translationsstart am zweiten Startcodon auf die stimulatorische Wirkung von YscM2 auswirkt. Überprüft werden

könnte dies durch die Synthese eines N-terminal um vier Aminosäuren verkürzten Peptids und die Bestimmung des Einflusses auf die Enzymaktivität von PEPC im Enzymassay. Die Überexpression des verkürzten YscM2-Proteins in *Y. enterocolitica* während Wachstums im Minimalmedium wie unter C.8 könnte ebenfalls zeigen, ob derselbe stimulatorische Effekt auf die Enzymaktivität von PEPC vorhanden ist wie in dem 116 Aminosäuren großen Protein. Interessant wäre außerdem, zu überprüfen, wie YscM2 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen in den Yersinien vorliegt. Eine Expression von *yscM2* unter Kontrolle des nativen Promotors und eine gleichzeitige Markierung mit einem His-Affinitätsmarker könnte eine Reinigung von YscM2 aus der Zelle möglich machen und eine N-terminale Sequenzierung oder ein Trypsinverdau mit anschließender massenspektrometrischer Analyse könnten Auskunft darüber geben, ob tatsächlich auch das verkürzte YscM2-Protein synthetisiert wird. Möglicherweise nutzt das Bakterium die Besonderheit des zweiten Startcodons, um je nach Bedarf die stimulatorische Wirkung auf die Enzymaktivität von PEPC abzuschalten, ohne die regulatorische Funktion zu beeinflussen, die durch den C-Terminus vermittelt wird (Cambronne *et al.*, 2004). Seit kurzem sind so genannte „riboswitches“ bekannt. Das sind mRNA-Moleküle, die kleine Metabolite (z. B. Flavinmononukleotid, Vitamin B12, Lysin) binden, und damit die Transkription oder die Translation des entsprechenden Gens beeinflussen (Brantl, 2004). Denkbar wäre, dass beispielsweise PEP oder Oxalacetat als Metabolite an die mRNA von *yscM2* binden und so die Translation am ersten oder zweiten Startcodon steuern.

Interessant ist außerdem, dass nur *Y. enterocolitica* über YscM2 verfügt (Stainier *et al.*, 1997). Die beiden anderen humanpathogenen *Yersinia*-Spezies *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* aber weisen kein Homologes zu YscM2 auf. Beide verfügen mit LcrQ lediglich über ein Homologes zu YscM1. Warum *Y. enterocolitica* mit YscM2 eine Kopie von YscM1 erworben hat, bleibt Spekulation. Vielleicht war eine bessere Adaption an den Lebensraum durch eine Feinregulierung des Stoffwechsels durch die stimulierende Wirkung von YscM2 auf PEPC der Selektionsdruck. Ob YscM1 und YscM2 zeitgleich wirken, ist bisher nicht bekannt. Die Gene für YscM1 und YscM2 werden von unterschiedlichen Promotoren kontrolliert, beide liegen jedoch gleichzeitig im Zytosol der Yersinien vor (Cambronne *et al.*, 2004). Möglicherweise wird eine Wirkung zu verschiedenen Zeitpunkten durch eine unterschiedliche Affinität von YscM1 und YscM2 zu Interaktionspartnern in *Yersinia*, wie z. B. zu dem Chaperon SycH oder dem Komplex aus YopD/SycD, gesteuert, und die Proteine so aktiviert oder deaktiviert. Für die Bindung an SycH wurden bereits unterschiedliche Bindungsaffinitäten gezeigt (Cambronne *et al.*, 2004; Swietnicki *et al.*, 2004).

### D.2.1 Modulation des Stoffwechsels bei *Yersinia* durch einen Virulenzfaktor

In dieser Arbeit konnte mit der Entdeckung der Modulation der Enzymaktivität von PEPC durch LcrQ/YscM1 und YscM2 das erste Mal überhaupt auf molekularer Ebene die Einflussnahme eines Virulenzfaktors auf den Stoffwechsel eines Bakteriums aufgezeigt werden. Bislang ist nur der umgekehrte Fall bekannt, indem der Stoffwechsel auf die Pathogenität eines Bakteriums einwirkt. Ein pathogener Organismus muss sich rasch auf die Bedingungen in seinem Wirt einstellen und seinen Metabolismus an die neuen Bedürfnisse anpassen. Diese Anpassung erfolgt zum Beispiel über den Kontrollmechanismus der „stringent response“ (Wagner, 2000). Die „stringent response“ wird ausgelöst durch eine Limitierung der Nährstoffe und wird über das Signalmolekül ppGpp vermittelt (Godfrey *et al.*, 2002). Sie sichert beispielsweise die Persistenz von *M. tuberculosis* im Wirt (Primm *et al.*, 2000). In *P. aeruginosa* konnten Dacheux *et al.* (2002) zeigen, dass eine intakte Pyruvatdehydrogenase für die Sekretion der Effektoren des Typ III-Sekretionssystems notwendig ist. Des Weiteren konnte für *P. aeruginosa* und *Y. enterocolitica* die Notwendigkeit des Signalmoleküls cAMP für die normale Expression des TTSS und damit für die Virulenz gezeigt werden (Wolfgang *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; Petersen & Young, 2002). All diese Beispiele zeigen eine Beeinflussung der Virulenz durch den Stoffwechsel und verdeutlichen die Bedeutung der wechselseitigen Einflussnahme von Stoffwechsel und Virulenz. Während der Infektion des Wirts muss in der Yersinie vor allem die Synthese von Effektorproteinen sichergestellt werden, die die Phagozytose durch die angeborene Immunantwort des Wirts verhindern sollen. Dafür könnte ein Rückkopplungsmechanismus wie die Modulation der Enzymaktivität von PEPC durch YscM1 und YscM2 für die Yersinien von großer Bedeutung sein. Diese Schnittstelle zwischen Virulenz und Stoffwechsel könnte eine Anpassung des Stoffwechsels an die veränderten Bedingungen während einer Infektion gewährleisten und somit das Überleben im Wirt sichern. Die Abbildung D.2.1 gibt einen Überblick über die PEPC-Reaktion im Stoffwechselgefüge des Bakteriums und zeigt gleichzeitig wie komplex die Regulation der Enzymaktivität der PEPC ist.



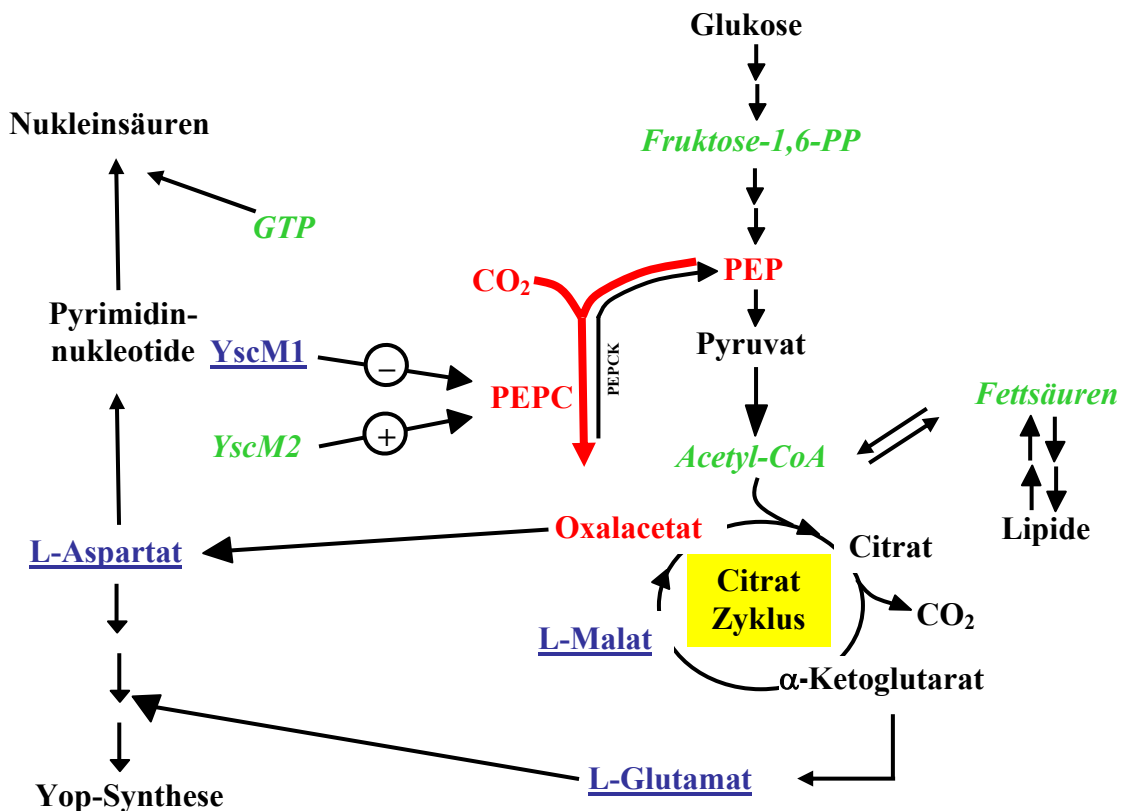


Abb. D.2.1 Übersicht über die Regulation der PEPC-Aktivität. Die Enzymaktivität von PEPC wird je nach Stoffwechsellage von allosterischen Effektoren reguliert. Inhibitoren von PEPC sind unterstrichen, Aktivatoren kursiv gekennzeichnet.

Bereits vor fast 50 Jahren wurde das erste Mal die Virulenz von *Y. pestis* mit einem Einfluss auf den Stoffwechsel der Yersinien verknüpft (Higuchi & Carlin, 1958). Beschrieben wurde damals das Phänomen der „low calcium response“ (Lcr) (Kupferberg & Higuchi, 1958; Higuchi *et al.*, 1959). Der Eingriff in den Stoffwechsel des Bakteriums wurde dadurch deutlich, dass virulente *Yersinia pestis*-Stämme, die bei 37 °C kultiviert wurden, eine Inhibition des Wachstums erfuhren und die virulenten Stämme nach einigen Stunden von avirulenten überwachsen wurden (Higuchi *et al.*, 1959). Der Virulenzfaktor, der die Modulation des Stoffwechsels bewirkte, war damals noch nicht bekannt, konnte aber später als das plasmidkodierte Typ III-Sekretionssystem identifiziert werden, da die Lcr assoziiert mit der Anwesenheit des Virulenzplasmids ist, das für das Typ III-Sekretionssystem kodiert (Gemski *et al.*, 1980; Portnoy *et al.*, 1984). Der molekulare Mechanismus der Lcr und damit die TTSS-Komponenten, die für die Modulation des Stoffwechsels verantwortlich sind, konnten jedoch nicht identifiziert werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsinhibition durch Zugabe von Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Higuchi *et al.*, 1959), Glutamat, Aspartat oder Hydrogencarbonat (Delwiche *et al.*, 1959) aufgehoben werden

konnte und so der Verlust des Virulenzplasmids unterbunden werden konnte, der die beobachtete Avirulenz der Bakterien (Selektion von plasmidfreien Mutanten bei 37 °C und Ca<sup>2+</sup>-Mangel aufgrund schnellerer Vermehrung) bedingte.

Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Modulation der Enzymaktivität von PEPC durch YscM1 und YscM2 um eine Erklärung für die mit der „low calcium response“ verbundenen Wachstumsinhibition in *Y. pestis* handelt. Schon Baugh *et al.* (1964) hatten aufgrund der Aufhebung der Wachstumsinhibition durch Hydrogencarbonat eine Verbindung zwischen der Lcr und der CO<sub>2</sub>-Fixierung in den Yersinien vermutet. Sie hatten die Enzymaktivitäten der an der CO<sub>2</sub>-Fixierung im Bakterium beteiligten Enzyme Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) und der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) in virulenten und avirulenten *Y. pestis*-Stämmen verglichen. Allerdings konnte damals kein Unterschied zwischen den Enzymaktivitäten in virulenten und avirulenten Stämmen gezeigt werden, was möglicherweise dadurch zu erklären ist, dass PEPC und PEPCK für die Durchführung der Experimente aus Zellextrakten von *Y. pestis* gereinigt werden mussten. Unter den gewählten Reinigungsbedingungen dissoziierten LcrQ und PEPC wahrscheinlich, so dass keine Unterschiede in den Enzymaktivitäten zwischen virulenten und avirulenten Stämmen beobachtet werden konnten und die Wechselwirkung von PEPC mit LcrQ bzw. die Beteiligung der PEPC an der Lcr nicht identifiziert werden konnte. Außerdem war die Virulenz damals schlecht definiert, weil das Virulenzplasmid noch unbekannt war. Dass die Hemmung von PEPC durch LcrQ allerdings für die Wachstumsinhibition in *Yersinia pestis* verantwortlich sein könnte, unterstreicht auch die Aussage von Fowler und Brubaker (1994), die die Bedeutung der CO<sub>2</sub>-Fixierung in Oxalacetat durch PEPC vor dem Hintergrund der fehlenden Aspartase-Aktivität in *Yersinia pestis* (Dreyfus & Brubaker, 1978) hervorheben.

Interessanterweise ist die Wachstumsinhibition in den humanpathogenen *Yersinia*-Spezies unterschiedlich ausgeprägt. Während die Vermehrung von *Y. pestis* in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> bei 37 °C wie beschrieben sehr stark inhibiert ist, erfolgt die Inhibition des Wachstums in *Y. pseudotuberculosis* mit Verzögerung nach einer weiteren Verdoppelung der Bakterien. Im Fall von *Y. enterocolitica* verlangsamt sich die Bakterienvermehrung lediglich (Carter *et al.*, 1980). Auch diese Differenzen unterstützen die These, dass der Einfluss auf die Vermehrung der Yersinien auf eine Hemmung der Enzymaktivität von PEPC durch LcrQ/YscM1 zurückzuführen ist. Die unterschiedlich ausgeprägte Wachstumsinhibition kann durch die unterschiedliche Stoffwechsellenzymausstattung der *Yersinia*-Spezies und die damit variierende Bedeutung der PEPC-Reaktion für den Stoffwechsel erklärt werden. Dass *Y. pestis* einige wichtige Stoffwechsellenzyme wie z. B die Aspartase oder die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase fehlen, war schon

länger bekannt (Dreyfus & Brubaker, 1978; Mortlock & Brubaker, 1962). Ein erst kürzlich veröffentlichter Vergleich der Genome von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* liefert neue Begründungen für die physiologischen Unterschiede zwischen den beiden Spezies (Chain *et al.*, 2004). So sind neben den oben genannten Stoffwechsellzymen in *Y. pestis* im Gegensatz zu *Y. pseudotuberculosis* außerdem eine Cystein-Synthase und Enzyme, die für den Methionin-Stoffwechsel wichtig sind, inaktiviert oder verloren gegangen, was für *Y. pestis* die Bedeutung der PEPC unterstreicht. Auch im Vergleich von *Y. pseudotuberculosis* zu *Y. enterocolitica* werden physiologische Unterschiede bei Wachstum in BHI-Medium deutlich. *Y. pseudotuberculosis* bleibt im Wachstum gegenüber *Y. enterocolitica* zurück. Die Erklärung für die unterschiedlich ausgeprägte Wachstumsinhibition von *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* liegt wahrscheinlich tatsächlich in der physiologischen Bedeutung von PEPC für die jeweilige Spezies. Im Fall von *Y. enterocolitica* kommt noch die stimulierende Wirkung von YscM2 auf die Enzymaktivität von PEPC dazu, die dem inhibitorischen Effekt von YscM1 entgegen gewirkt und so die Wachstumsinhibition einschränkt bzw. aufhebt, solange man von einer zeitgleichen Wirkung von YscM1 und YscM2 ausgeht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in *Y. pseudotuberculosis* wie in *Y. enterocolitica* die Überexpression von YscM2 die Wachstumsinhibition in Folge von  $\text{Ca}^{2+}$ -Mangel abmildert.

### D.2.2 Modell für den Mechanismus der „low calcium response“

Bei einer Infektion mit Yersinien kommt es durch die Körpertemperatur des Wirts von 37 °C zu einer Expression der Typ III-Gene und zu einer Synthese von LcrQ und YscM1. *In vitro* kann diese Situation durch eine Erhöhung der Wachstumstemperatur von 27 °C auf 37 °C simuliert werden. LcrQ und YscM1 binden dann an PEPC und hemmen die Enzymaktivität, was zu der beschriebenen Wachstumsinhibition führt. Im Widerspruch zu dieser Theorie steht allerdings die Tatsache, dass LcrQ und YscM1 diesen Effekt erst verursachen, wenn man dem Kulturmedium  $\text{Ca}^{2+}$  entzieht, obwohl die Proteine schon in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  synthetisiert werden. Dies könnte allerdings damit erklärt werden, dass LcrQ/YscM1 intrazellulär mit SycH und YopD assoziiert sind bevor sie sezerniert werden (Williams & Straley, 1998; Wulff-Strobel *et al.*, 2002). Durch eine Bindung des LcrQ/YscM1-SycH-Komplexes an YopD verlieren die Proteine wahrscheinlich ihre Bindungsaktivität an PEPC und eine Hemmung der Enzymaktivität ist deshalb nicht möglich. Wie hier gezeigt wurde, ist eine Bindung an SycH allein nicht ausreichend, um die Modulation der Enzymaktivität durch LcrQ/YscM1 und YscM2 zu verhindern. Paradox ist weiterhin, dass die Wachstumsinhibition, also die Hemmung der Enzymaktivität von PEPC

erst auftritt, wenn es zu einer Sekretion an Typ III-Proteinen und damit auch zu einer Sekretion bzw. Translokation von LcrQ/YscM1 kommt. Durch Sekretion bzw. Translokation sinkt die intrazelluläre Konzentration an LcrQ/YscM1 und YscM2 in der Yersinie eigentlich ab (Pettersson *et al.*, 1996; Cambronne *et al.*, 2000; Cambronne *et al.*, 2004). Gelfiltrationen, die von Cambronne *et al.* (2004) durchgeführt wurden, zeigen allerdings, dass auch unter Sekretionsbedingungen YscM1 und YscM2 noch in der Bakterienzelle vorhanden sind. Die Wachstumsinhibition könnte also mit der noch in der Bakterienzelle vorhandenen Menge an LcrQ/YscM1 erklärt werden, zumal es auch zu einer Sekretion bzw. Translokation von YopD kommt. So entfällt die Bindung von YopD an LcrQ/YscM1, die damit nicht mehr im Komplex mit YopD vorliegen und deshalb ihre inhibitorische Wirkung auf die Enzymaktivität von PEPC entfalten können.

### D.2.3 Die biologische Bedeutung der Modulation der Enzymaktivität von PEPC

Die biologische Bedeutung der Modulation der Enzymaktivität von PEPC durch YscM1 und YscM2 sollte durch Yop-Sekretionsversuche in einem Medium, in dem PEPC für das Wachstum der Bakterien essentiell war, und durch Infektion von HeLa-Zellen mit *Y. enterocolitica* *yscM1*- und *yscM2*-Mutanten untersucht werden. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob PEPC bei der Synthese der Yops eine Rolle spielt und so die unterschiedliche Enzymaktivität von PEPC in den Mutanten sich möglicherweise auf das Sekretionsmuster der Yops auswirkt. Leider konnte die Frage der biologischen Bedeutung der Wechselwirkung von YscM1 und YscM2 mit PEPC in dieser Arbeit nicht geklärt werden, da es bisher nicht gelungen ist, Typ III-Sekretion in *Y. enterocolitica* unter PEPC-restriktiven Wachstumsbedingungen zu analysieren und damit möglicherweise einen Zusammenhang zwischen den sezernierten Yops und der PEPC herzustellen. Die Konstruktion einer *lcrQ*-Mutante in *Y. pseudotuberculosis* könnte eine Lösung für dieses Problem darstellen, da bei *Y. pseudotuberculosis* im Gegensatz zu *Y. enterocolitica* die PEPC-Reaktion auch im komplexen BHI-Medium wichtig für das Bakterium ist, da wahrscheinlich Stoffwechsellzyme, die in *Y. enterocolitica* genutzt werden, in *Y. pseudotuberculosis* nicht vorhanden sind, und so der Einfluss der Mutation von *lcrQ* auf PEPC und möglicherweise auf die Yop-Sekretion in einem bekannten Medium untersucht werden kann. Trotzdem bleibt die Frage nach der biologischen Relevanz besonders in *Y. enterocolitica* vor dem Hintergrund der durch YscM2 wesentlich komplexeren Regulierung der Enzymaktivität von PEPC interessant. Falls ein Medium gefunden wird, in dem PEPC essentiell ist und Yop-Sekretion möglich ist, könnte eine Analyse des metabolischen Fluxes von CO<sub>2</sub>, das durch PEPC

in Oxalacetat eingebaut wird, während der Sekretion mithilfe von  $^{13}\text{CO}_3\text{H}^-$  hier möglicherweise weitere Klärung bringen. Zudem ist bisher wenig über die Ernährungssituation der Yersinien im Wirt bekannt. Möglicherweise ist diese für die verschiedenen *Yersinia*-Spezies unterschiedlich. Für *Yersinia pestis* wurde beispielsweise gezeigt, dass sie konstitutiv Fettsäuren aufnehmen und diese durch  $\beta$ -Oxidation verwerten können (Moncla *et al.*, 1983). Interessanterweise funktioniert dies nur in Anwesenheit des Virulenzplasmids pCD, das für das Typ III-Sekretionssystem kodiert. Dies zeigt, dass auch hier eine Verknüpfung zwischen Stoffwechsel und Virulenzfaktor besteht. Bemerkenswert ist, dass zwischen Fettsäureabbau und PEPC ebenfalls ein Zusammenhang besteht. Die Abbildung D.2.1 verdeutlicht dies und unterstreicht gleichzeitig die Komplexität der Regulation der Enzymaktivität von PEPC. Je nach Ernährungssituation des Bakteriums wird über Rückkopplungsmechanismen die Aktivität von PEPC reguliert. Fettsäuren fungieren dabei als allosterische Aktivatoren der PEPC (Morikawa *et al.*, 1980). All dies liefert Hinweise auf eine ausgeprägte regulative Vernetzung zwischen den *Yersinia*-Virulenzfaktoren und dem Stoffwechsel. Eine Feinregulierung des Stoffwechsels der Yersinien und damit eine Anpassung an die metabolischen Bedürfnisse des Bakteriums während der Infektion ist wahrscheinlich. Alternativ ist auch eine Ausnutzung von speziellen Metaboliten der Wirtszellen durch das Bakterium während der Infektion denkbar. Um dieses Phänomen genauer zu analysieren müssen in der Zukunft sowohl die Physiologie der Yersinien als auch die Molekularbiologie verknüpft werden.

### D.3 DAS CHAPERON SYCH

SycH dient als Chaperon für die Protein-Tyrosinphosphatase YopH und die Regulatorproteine LcrQ/YscM1 und YscM2 (Cambronne *et al.*, 2000; Cambronne *et al.*, 2004; Swietnicki *et al.*, 2004), die im Chaperonbindungsbereich eine hohe Homologie zu YopH aufweisen (Rimpiläinen *et al.*, 1992; Stainier *et al.*, 1997). SycH wird ebenso wie YscM1 und YscM2 eine Beteiligung an der Regulation des TTSS zugeschrieben (Cambronne *et al.*, 2000). Um die regulatorische Wirkung des Chaperons SycH im Zusammenhang mit YscM1 und YscM2 näher zu untersuchen, wurde ein Proteinreinigungsprotokoll für SycH etabliert. SycH konnte in großen Mengen (20 mg Protein pro Liter Bakterienkultur) und in hoher Reinheit (> 95 %) gewonnen werden, was eine Kristallisation des Proteins möglich machte. Die Expression von SycH erfolgte ohne Affinitätsmarker, was Störungen bei der Kristallisation verhindern sollte. SycH-Kristalle die unter Dampfdiffusionsbedingungen im hängenden Tropfen gewachsen waren, zeigten eine Beugung im Röntgenstrahl bis zu einer Auflösung von 2,94 Å. Aufgrund der gewonnenen Da-

ten ist ein Homotetramer von SycH im Kristallgitter wahrscheinlich. Die Kristallstruktur von SycH konnte allerdings nicht vollständig gelöst werden, da es mit den gewonnenen Daten nicht möglich war, die Schraubenachse entlang der 6-fach Symmetrieachse aufzuklären. Erst kürzlich wurde die komplette Kristallstruktur von SycH aus *Y. pestis* von Phan *et al.* (2004) veröffentlicht. SycH wurde zusammen mit YscM2(AS 33 – 81)-His<sub>6</sub> kristallisiert. Bei der Auswahl des Bereichs der AS 33 – 81 von YscM2 wurde die Homologie von YscM2 zu YopH und eine ähnliche Bindung beider Proteine an das Chaperon SycH zugrunde gelegt. SycH liegt im Kristall nach Phan *et al.* als Dimer vor und besitzt eine für bisher kristallisierte Chaperone typische Struktur. Die Autoren gehen davon aus, dass YscM2 mit SycH ähnlich wie YopE mit seinem Chaperon SycE interagiert. Wahrscheinlich ist YscM2 um das Chaperon gewickelt und wird so gebunden. Die publizierten Daten können dies jedoch nicht auflösen, da die AS 51 – 81 von YscM2 ungeordnet im Kristall vorliegen. Die kristallographischen Daten, die in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurden, deuten auf eine andere Struktur von SycH hin, die von der typischen Struktur für Chaperone abweicht. Neben den kristallographischen Daten weisen auch die der Reinigung des Komplexes von SycH und YscM1 und die Gelfiltration von SycH eher auf eine Tetramerbildung hin. Ein Dimer ist aufgrund der Datenlage nicht wahrscheinlich. Im Gegensatz dazu verhält sich das kristallisierte Chaperon SycT (bisher unpublizierte Daten), das sich bei der Kristallisation als Dimer erwies, auch in der Gelfiltration wie ein Dimer. Auch in anderen Experimenten konnten Oligomerisierungstendenzen von SycH beobachtet werden. Deshalb könnte eine vollständige Aufklärung der hier ermittelten SycH-Struktur ohne Substrat durchaus interessant sein. Durch eine Einlagerung von Schwermetallatomen in die Kristalle konnte die Struktur allerdings nicht berechnet werden. Eine Aufklärung der Proteinstruktur von SycH unter Einbeziehung der Daten von Phan *et al.* (2004) wäre aber denkbar. SycH wurde den Klasse I-Chaperonen zugeordnet. Liegt SycH im Gegensatz zu den bisher bekannten Chaperonen der Klasse I, die als Homodimere vorkommen, tatsächlich als Tetramer vor, stellt es möglicherweise einen Vertreter einer neuen Klasse an Chaperonen dar. Die Kristallstruktur von SycH ist möglicherweise auch für die Aufklärung des regulatorischen Effekts von SycH auf das TTSS und den Einfluss auf PEPC im Enzymassay hilfreich. SycH allein zeigte ähnliche Effekte wie YscM1 auf die Enzymaktivität von PEPC, während es im Komplex mit YscM1 oder YscM2 keinen additiven oder synergistischen Effekt aufwies. Ob die Wirkung auf die Enzymaktivität von PEPC von biologischer Relevanz ist, ist unbekannt. In Yersinien liegt SycH hauptsächlich gebunden an seine Substrate vor und ist wahrscheinlich kaum frei verfügbar. Möglicherweise erfüllt SycH mit seiner Affinität zu PEPC für YscM1 und YscM2 eine Art Lotsenfunktion und steuert die Proteine an deren Wirkungsort.

#### D.4 PEPC ALS ZIELSTRUKTUR FÜR EINE ANTIBIOTIKATHERAPIE

Durch eine Affinitätsreinigung konnte PEPC als Wechselwirkungspartner von YscM1 und YscM2 identifiziert werden. YscM1 und YscM2 zeigten beide Einfluss auf die Enzymaktivität von PEPC, dabei erwies sich YscM1 als Inhibitor während YscM2 eine stimulierende Wirkung entfaltete. Dies konnte sowohl in einem Enzymassay als auch in Wachstumsversuchen im Minimalmedium gezeigt werden. Für PEPC wurde ein Proteinreinigungsprotokoll etabliert, das es möglich machte, PEPC in großen Mengen und in hoher Reinheit zu gewinnen (60 mg gereinigtes Protein pro Liter Bakterienkultur). Mausinfektionsversuche zeigten, dass PEPC an der Virulenz von *Y. enterocolitica* beteiligt ist, da eine *ppc*-Deletionsmutante im Mausversuch gegenüber dem Kontrollstamm attenuiert war. Dies macht die PEPC zu einer interessanten Zielstruktur für antimikrobielle Therapeutika. Bisher greifen gängige Antibiotika entweder in die Zellwandsynthese ein, verändern die Permeabilität der Zellmembran, hemmen die Proteinbiosynthese des Bakteriums oder interferieren mit dessen Nukleinsäuresynthese. Antibiotika wurden lange als Allzweckwaffe betrachtet, obwohl kurz nach ihrer Einführung erste Resistenzentwicklungen beobachtet wurden. Diese wurden bisher durch die ständige Neu- und Weiterentwicklung der Antibiotika kompensiert. Seit den achtziger Jahren jedoch wurden praktisch keine neuen antibiotischen Substanzklassen auf den Markt gebracht. Schon heute stellen multiresistente Keime in Krankenhäusern ein Problem dar, weshalb die Entwicklung neuer Antibiotika bzw. der Erforschung neuer Zielstrukturen für Antibiotika eine große Bedeutung hat. Dass PEPC im menschlichen Organismus nicht vorhanden ist, macht sie grundsätzlich zu einem idealen Angriffspunkt für Antibiotika. Dies trifft zumindest im Fall von *Y. pestis* zu, da *Y. pestis* auf die Funktion der PEPC aufgrund verschiedener Stoffwechseldefekte angewiesen ist (Fowler & Brubaker, 1994). Viele weitere für den Menschen pathogene Keime nutzen PEPC, um ihren Citrat-Zyklus mit Oxalacetat aufzufüllen. Auch hier wäre eine antibiotische Therapie durch Inhibition von PEPC möglich, sofern PEPC eine Rolle in der Virulenz des Bakteriums spielt. Zu den pathogenen Keimen, die die PEPC zur Auffüllung des Citrat-Zyklus nutzen, gehören beispielsweise *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* und *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* und *Helicobacter pylori*. Die PEPC der genannten Bakterien weist eine Identität von ungefähr 80 – 25 % zur PEPC von *Y. pestis* CO92 auf. Für die PEPC aus *E. coli* mit einer Identität von ungefähr 80 % konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass ihre Enzymaktivität von YscM1 und YscM2 ebenso beeinflusst wird wie die der PEPC in *Y. enterocolitica*, was eine breitere Anwendung eines PEPC-Inhibitors prinzipiell unterstützen würde. Sicherlich steht die Entwicklung eines therapeutisch einsetzbaren PEPC-Inhibitors mit dieser Arbeit erst am Anfang, aber die

hier geleisteten Vorarbeiten bieten eine gute Ausgangsposition. Eine Kristallisation von PEPC ist durch das etablierte Reinigungsprotokoll prinzipiell möglich und wird zurzeit in einer Kooperation angestrebt. Eine Kristallisation zusammen mit YscM1 oder Peptiden, die vom N-Terminus von YscM1 abgeleitet sind, könnte den Bereich von PEPC, in dem die Wechselwirkung mit YscM1 stattfindet, näher charakterisieren. Die Kristallstruktur könnte außerdem zum besseren Verständnis des Mechanismus der Inhibition beitragen. Des Weiteren ermöglicht die Verfügbarkeit des rekombinanten PEPC-Proteins die Durchführung von Peptid-Scans, um den für die Bindung an PEPC wichtigen Bereich von YscM1 und YscM2, der in dieser Arbeit bereits am N-Terminus lokalisiert werden konnte, weiter einzugrenzen. Auch ein Hochdurchsatz-Screening mit rekombinant hergestelltem PEPC in einem Enzymassay, um synthetisch hergestellte Inhibitoren zu testen, wäre denkbar.



## E. ZUSAMMENFASSUNG

Humanpathogene Yersinien nutzen ein Typ III-Sekretionssystem (TTSS), um Virulenzproteine in die Wirtszelle zu injizieren und so der angeborenen Immunantwort des Wirts zu entkommen. Die homologen Proteine YscM1 und YscM2 in *Yersinia enterocolitica* gelten als funktionell austauschbare negative Regulatoren des TTSS. Ziel dieser Arbeit war die nähere Charakterisierung der Funktion von YscM1 und YscM2. Mithilfe von Wechselwirkungsstudien wurde in *Y. enterocolitica* ein Interaktionspartner der beiden Proteine gefunden, der durch Massenspektrometrie als Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) identifiziert wurde. Bei der PEPC handelt es sich um ein Stoffwechsellzym, das die Synthese von Oxalacetat aus Phosphoenolpyruvat und CO<sub>2</sub> katalysiert und somit der Aufrechterhaltung des Citratzyklus dient, da dieser neben der Energiegewinnung auch Bausteine für Aminosäuresynthesen liefert.

YscM1 und YscM2 sowie deren Chaperon SycH und PEPC wurden rekombinant hergestellt und gereinigt. Mit den gereinigten Proteinen konnte die Bindung von PEPC an YscM1 und YscM2 bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine antagonistisch wirken. YscM1 drosselt die Enzymaktivität von PEPC, während YscM2 die Aktivität erhöht. Um einen Effekt von YscM1 und YscM2 auf die Enzymaktivität von PEPC *in vivo* zu untersuchen, wurden beide Proteine in *Y. enterocolitica* überexprimiert. Die Wachstumsbedingungen wurden dabei so gewählt, dass die Yersinien auf die PEPC-Reaktion angewiesen waren. Bei Überproduktion von YscM1 kam das Wachstum der Yersinien dabei völlig zum Erliegen, während YscM2 das Wachstum stimulierte. Die hier beschriebene Funktion von YscM1 und YscM2 ließ sich als völlig neue Funktion gegenüber der bekannten regulatorischen Funktion abgrenzen. Mausinfektionsversuche zeigten für eine *ppc*- und eine *yscM1*-Mutante einen attenuierten Phänotyp, während die *yscM2*-Mutante keine Unterschiede in der Pathogenität im Vergleich zum Wildtyp aufwies.

Für pathogene Bakterien ist vielfach beschrieben, dass sich deren Stoffwechsel auf die Expression von Virulenzfaktoren auswirkt. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein Virulenzfaktor den Stoffwechsel eines bakteriellen Erregers moduliert. Vermutlich ist durch die Modulation der Enzymaktivität eine optimale Anpassung an die Ernährungssituation im Wirt möglich, da eine Balance zwischen Energiestoffwechsel und der Synthese von Virulenzfaktoren sichergestellt wird.

Da die PEPC im Menschen nicht vorkommt, aber für viele pathogene Bakterien von großer Bedeutung sein dürfte, könnte die PEPC ein interessantes Angriffsziel für Antibiotika und die Wechselwirkung zwischen YscM1 und PEPC die Grundlage für deren Entwicklung darstellen.



## LITERATURVERZEICHNIS

- Achtman, M., K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, and E. Carniel. 1999.** *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96:14043-14048.
- Aepfelbacher, M., C. Trasak, G. Wilharm, A. Wiedemann, K. Trülsch, K. Krauss, P. Gierschik, and J. Heesemann. 2003.** Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. J. Biol. Chem. 278:33217-33223.
- Aizawa, S. I. 2001.** Bacterial flagella and type III secretion systems. FEMS Microbiol. Lett. 202:157-164.
- Allaoui, A., S. Woestyn, C. Sluiter, and G. R. Cornelis. 1994.** YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. J. Bacteriol. 176:4534-4542.
- Allaoui, A., R. Schulte, and G. R. Cornelis. 1995.** Mutational analysis of the *Yersinia enterocolitica* *virC* operon: characterization of *yscE, F, G, I, J, K* required for Yop secretion and *yscH* encoding YopR. Mol. Microbiol. 18:343-355.
- Alm, E. and A. P. Arkin. 2003.** Biological networks. Curr. Opin. Struct. Biol. 13:193-202.
- Anderson, D. M. and O. Schneewind. 1997.** A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. Science 278:1140-1143.
- Anderson, D. M. and O. Schneewind. 1999.** *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. Mol. Microbiol. 31:1139-1148.
- Anderson, D. M., D. E. Fouts, A. Collmer, and O. Schneewind. 1999.** Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96:12839-12843.
- Anderson, D. M., K. S. Ramamurthi, C. Tam, and O. Schneewind. 2002.** YopD and LcrH regulate expression of *Yersinia enterocolitica* YopQ by a posttranscriptional mechanism and bind to *yopQ* RNA. J. Bacteriol. 184:1287-1295.
- Andor, A., K. Trülsch, M. Essler, A. Roggenkamp, A. Wiedemann, J. Heesemann, and M. Aepfelbacher. 2001.** YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. Cell Microbiol. 3:301-310.
- Bacot, A. W. and C. J. Martin. 1914.** LXVII. Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas. J. Hyg. 13 (Plague Suppl. 3):423-439.
- Balligand, G., Y. Laroche, and G. Cornelis. 1985.** Genetic analysis of virulence plasmid from a sero-group 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. Infect. Immun. 48:782-786.
- Balzer, D., G. Ziegelin, W. Pansegrau, V. Kruft, and E. Lanka. 1992.** KorB protein of promiscuous plasmid RP4 recognizes inverted sequence repetitions in regions essential for conjugative plasmid transfer. Nucleic Acids Res. 20:1851-1858.
- Barz, C., T. N. Abahji, K. Trülsch, and J. Heesemann. 2000.** The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. FEBS Lett. 482:139-143.
- Baugh, C. L., J. W. Lanham, and M. J. Surgalla. 1964.** Effect of bicarbonate on growth of *Pasteurella pestis*: II. Carbon dioxide fixation into oxaloacetate by cell-free extracts. J. Bacteriol. 88:553-558.

- Bäumler, A., R. Koebnik, I. Stojiljkovic, J. Heesemann, V. Braun, and K. Hantke. 1993.** Survey on newly characterized iron uptake systems of *Yersinia enterocolitica*. Zentralbl. Bakteriologie. 278:416-424.
- Bercovier, H., H. H. Mollaret, J. M. Alonso, J. Brault, G. R. Fanning, A. G. Steigerwalt, and D. J. Brenner. 1980.** Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. Curr. Microbiol. 4:225-229.
- Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7:1513-1523.
- Birtalan, S. and P. Ghosh. 2001.** Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE. Nat. Struct. Biol. 8:974-978.
- Birtalan, S. C., R. M. Phillips, and P. Ghosh. 2002.** Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. Mol. Cell 9:971-980.
- Black, D. S., L. G. Montagna, S. Zitsmann, and J. B. Bliska. 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. 29:1263-1274.
- Black, D. S. and J. B. Bliska. 2000.** The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. Mol. Microbiol. 37:515-527.
- Black, R. E., R. J. Jackson, T. Tsai, M. Medvesky, M. Shayegani, J. C. Feeley, K. I. MacLeod, and A. M. Wakelee. 1978.** Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. N. Engl. J. Med. 298:76-79.
- Bliska, J. B. and S. Falkow. 1992.** Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 89:3561-3565.
- Bliska, J. B. and D. S. Black. 1995.** Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. Infect. Immun. 63:681-685.
- Blum, H., H. Beier, and H. J. Gross. 1987.** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8:93-99.
- Bockemühl, J. and P. Roggentin. 2004.** Enterale Yersiniosen. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 47:685-691.
- Boland, A. and G. R. Cornelis. 1998.** Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. Infect. Immun. 66:1878-1884.
- Bolin, I. and H. Wolf-Watz. 1984.** Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of *Yersinia pseudotuberculosis*. Infect. Immun. 43:72-78.
- Bottone, E. J. 1997.** *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. Clin. Microbiol. Rev. 10:257-276.
- Boyle, J. S. and A. M. Lew. 1995.** An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. Trends in Genetics 11:8.
- Boyd, A. P., I. Lambermont and G. R. Cornelis. 2000.** Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. J. Bacteriol. 182:4811-21.
- Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 72:248-254.

- Brantl, S. 2004.** Bacterial gene regulation: from transcription attenuation to riboswitches and ribozymes. *Trends Microbiol.* 12:473-475.
- Brenner, D. J. 1979.** Speciation in *Yersinia*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 5:33-43.
- Brubaker, R. R. 1972.** The genus *Yersinia*: biochemistry and genetics of virulence. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 57:111-158.
- Bullen, J. J. 1981.** The significance of iron in infection. *Rev. Infect. Dis.* 3:1127-1138.
- Burghout, P., F. Beckers, W. E. de, B. R. van, G. R. Cornelis, J. Tommassen, and M. Koster. 2004a.** Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 186:5366-5375.
- Burghout, P., B. R. van, G. P. Van, P. Ringler, S. A. Muller, J. Tommassen, and M. Koster. 2004b.** Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 186:4645-4654.
- Cambronne, E. D., L. W. Cheng, and O. Schneewind. 2000.** LcrQ/YscM1, regulators of the *Yersinia yop* virulon, are injected into host cells by a chaperone-dependent mechanism. *Mol. Microbiol.* 37:263-273.
- Cambronne, E. D. and O. Schneewind. 2002.** *Yersinia enterocolitica* type III secretion: *yscM1* and *yscM2* regulate *yop* gene expression by a posttranscriptional mechanism that targets the 5' untranslated region of *yop* mRNA. *J. Bacteriol.* 184:5880-5893.
- Cambronne, E. D., J. A. Sorg, and O. Schneewind. 2004.** Binding of SycH Chaperone to YscM1 and YscM2 Activates Effector *yop* Expression in *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 186:829-841.
- Carniel, E., D. Mazigh, and H. H. Mollaret. 1987.** Expression of iron-regulated proteins in *Yersinia* species and their relation to virulence. *Infect. Immun.* 55:277-280.
- Carter, P. D., R. J. Zahorchak, and R. R. Brubaker. 1980.** Plague virulence antigens from *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 28:638-640.
- Cavanaugh, D. C. 1971.** Specific effect of temperature upon transmission of the plague bacillus by the oriental rat flea, *Xenopsylla cheopis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20:264-273.
- Chain, P. S., E. Carniel, F. W. Larimer, J. Lamerdin, P. O. Stoutland, W. M. Regala, A. M. Georgescu, L. M. Vergez, M. L. Land, V. L. Motin, R. R. Brubaker, J. Fowler, J. Hinnebusch, M. Marceau, C. Medigue, M. Simonet, V. Chenal-Francisque, B. Souza, D. Dacheux, J. M. Elliott, A. Derbise, L. J. Hauser, and E. Garcia. 2004.** Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:13826-13831.
- Chang, A. C. and S. N. Cohen. 1978.** Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134:1141-1156.
- Chang, J. Y. 1985.** Thrombin specificity. Requirement for apolar amino acids adjacent to the thrombin cleavage site of polypeptide substrate. *Eur. J. Biochem.* 151:217-224.
- Cheng, L. W. and O. Schneewind. 1999.** *Yersinia enterocolitica* type III secretion. On the role of SycE in targeting YopE into HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 274:22102-22108.
- China, B., B. T. N'Guyen, B. M. de, and G. R. Cornelis. 1994.** Role of YadA in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 62:1275-1281.
- Cornelis, G., Y. Laroche, G. Balligand, M. P. Sory, and G. Wauters. 1987.** *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. *Rev. Infect. Dis.* 9:64-87.

- Cornelis, G. R., T. Biot, d. R. Lambert, T. Michiels, B. Mulder, C. Sluifers, M. P. Sory, M. Van Bouchaute, and J. C. Vanooteghem. 1989.** The *Yersinia yop* regulon. *Mol. Microbiol.* 3:1455-1459.
- Cornelis G. R., C. Sluifers, I. Delor, D. Geib, K. Kaniga, C. Lambert de Rouvroit, M. P. Sory, J. C. Vanooteghem and T. Michiels. 1991.** *ymoA*, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Mol Microbiol.* 5:1023-34.
- Cornelis, G. R. 1998.** The *Yersinia* deadly kiss. *J. Bacteriol.* 180:5495-5504.
- Cover, T. L. and R. C. Aber. 1989.** *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.* 321:16-24.
- Dacheux, D., O. Epaulard, G. A. de, B. Guery, R. Leberre, I. Attree, B. Polack, and B. Toussaint. 2002.** Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system requires an intact pyruvate dehydrogenase *aceAB* operon. *Infect. Immun.* 70:3973-3977.
- Delor, I., A. Kaeckenbeeck, G. Wauters, and G. R. Cornelis. 1990.** Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae. *Infect. Immun.* 58:2983-2988.
- Delor, I. and G. R. Cornelis. 1992.** Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect. Immun.* 60:4269-4277.
- Delwiche, E. A., G. M. Fukui, A. W. Andrews, and M. J. Surgalla. 1959.** Environmental conditions affecting the population dynamics and the retention of virulence of *Pasteurella pestis*: the role of carbon dioxide. *J. Bacteriol.* 77:355-360.
- Dequeker, J., R. Jamar, and M. Walravens. 1980.** HLA-B27, arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Rheumatol.* 7:706-710.
- Devignat, R. 1951.** Bulletin WHO 4, 247-263.
- Dreyfus, L. A. and R. R. Brubaker. 1978.** Consequences of aspartase deficiency in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 136:757-764.
- Driessen, A. J. 2001.** SecB, a molecular chaperone with two faces. *Trends Microbiol.* 9:193-196.
- Dukuzumuremyi, J. M., R. Rosqvist, B. Hallberg, B. Akerstrom, H. Wolf-Watz, and K. Schesser. 2000.** The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J. Biol. Chem.* 275:35281-35290.
- Eitel, J. and P. Dersch. 2002.** The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. *Infect. Immun.* 70:4880-4891.
- Evdokimov, A. G., D. E. Anderson, K. M. Routzahn, and D. S. Waugh. 2001.** Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. *J. Mol. Biol.* 312:807-821.
- Evdokimov, A. G., J. E. Tropea, K. M. Routzahn, and D. S. Waugh. 2002.** Three-dimensional structure of the type III secretion chaperone SycE from *Yersinia pestis*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58:398-406.
- Evdokimov, A. G., J. Phan, J. E. Tropea, K. M. Routzahn, H. K. Peters, M. Pokross, and D. S. Waugh. 2003.** Similar modes of polypeptide recognition by export chaperones in flagellar biosynthesis and type III secretion. *Nat. Struct. Biol.* 10:789-793.

- Fallman, M., K. Andersson, S. Hakansson, K. E. Magnusson, O. Stendahl, and H. Wolf-Watz. 1995.** *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. *Infect. Immun.* 63:3117-3124.
- Feldman, M. F. and G. R. Cornelis. 2003.** The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol. Lett.* 219:151-158.
- Ferber, D. M. and R. R. Brubaker. 1981.** Plasmids in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 31:839-841.
- Fields, K. A., G. V. Plano, and S. C. Straley. 1994.** A low-Ca<sup>2+</sup> response (LCR) secretion (ysec) locus lies within the *lcrB* region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 176:569-579.
- Fields, K. A., M. L. Nilles, C. Cowan, and S. C. Straley. 1999.** Virulence role of V antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface. *Infect. Immun.* 67:5395-5408.
- Flügel, A., H. Schulze-Koops, J. Heesemann, K. Kuhn, L. Sorokin, H. Burkhardt, M. K. von der, and F. Emmrich. 1994.** Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *J. Biol. Chem.* 269:29732-29738.
- Forsberg, A., A. M. Viitanen, M. Skurnik, and H. Wolf-Watz. 1991.** The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 5:977-986.
- Forsberg, A., R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz. 1994.** Regulation and polarized transfer of the *Yersinia* outer proteins (Yops) involved in antiphagocytosis. *Trends Microbiol.* 2:14-19.
- Fowler, J. M. and R. R. Brubaker. 1994.** Physiological basis of the low calcium response in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 62:5234-5241.
- Francis, M. S., S. A. Lloyd, and H. Wolf-Watz. 2001.** The type III secretion chaperone LcrH cooperates with YopD to establish a negative, regulatory loop for control of Yop synthesis in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 42:1075-1093.
- Frederiksen, W. 1964.** A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (*Bacterium enterocoliticum*) and *Pasteurella X*. *Proc. 14th Scand. Congr. Path. Microbiol.* 108.
- Fredriksson-Ahomaa, M., M. Bucher, C. Hank, A. Stolle, and H. Korkeala. 2001.** High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on pig offal in southern Germany: a slaughtering technique problem. *Syst. Appl. Microbiol.* 24:457-463.
- Fredriksson-Ahomaa, M., U. Koch, C. Klemm, M. Bucher, and A. Stolle. 2004.** Different genotypes of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains widely distributed in butcher shops in the Munich area. *Int. J. Food Microbiol.* 95:89-94.
- French, S. and K. Wilson. 1978.** On the treatment of negative intensity observations. *Acta Crystallogr. A* 34:517-524.
- Frithz-Lindsten, E., R. Rosqvist, L. Johansson, and A. Forsberg. 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.* 16:635-647.
- Galimand, M., A. Guiyoule, G. Gerbaud, B. Rasoamanana, S. Chanteau, E. Carniel, and P. Courvalin. 1997.** Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *N. Engl. J. Med.* 337:677-680.
- Gallegos M. T., C. Michan and J. L. Ramos. 1993.** The XylS/AraC family of regulators. *Nucleic Acids Res.* 21:807-10.

- Galyov, E. E., S. Håkansson, A. Forsberg, and H. Wolf-Watz. 1993.** A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* 361:730-732.
- Gemski, P., J. R. Lazere, and T. Casey. 1980.** Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 27:682-685.
- Gent, A. E., M. D. Hellier, R. H. Grace, E. T. Swarbrick, and D. Coggon. 1994.** Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 343:766-767.
- Giraldo, R., C. Fernandez-Tornero, P. R. Evans, R. az-Orejas, and A. Romero. 2003.** A conformational switch between transcriptional repression and replication initiation in the RepA dimerization domain. *Nat. Struct. Biol.* 10:565-571.
- Godfrey, H. P., J. V. Bugrysheva, and F. C. Cabello. 2002.** The role of the stringent response in the pathogenesis of bacterial infections. *Trends Microbiol.* 10:349-351.
- Goguen J. D., J. Yother and S. C. Straley. 1984.** Genetic analysis of the low calcium response in *Yersinia pestis* mu d1(Ap lac) insertion mutants. *J. Bacteriol.* 160:842-8.
- Gophna, U., E. Z. Ron, and D. Graur. 2003.** Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* 312:151-163.
- Goss, J. W., J. A. Sorg, K. S. Ramamurthi, H. Ton-That, and O. Schneewind. 2004.** The secretion signal of YopN, a regulatory protein of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion pathway. *J. Bacteriol.* 186:6320-6324.
- Gottfried, R. S. 1983.** The black death. Natural and human disaster in medieval europe. The Free Press, New York, N.Y.
- Grosdent, N., I. Maridonneau-Parini, M. P. Sory, and G. R. Cornelis. 2002.** Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect. Immun.* 70:4165-4176.
- Gründemann, D. and E. Schömig. 1996.** Protection of DNA during preparative agarose gel electrophoresis against damage induced by ultraviolet light. *Biotechniques* 21:898-903.
- Guan, K. L. and J. E. Dixon. 1990.** Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 249:553-556.
- Håkansson, S., T. Bergman, J. C. Vanooteghem, G. Cornelis, and H. Wolf-Watz. 1993.** YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins. *Infect. Immun.* 61:71-80.
- Håkansson, S., K. Schesser, C. Persson, E. E. Galyov, R. Rosqvist, F. Homble, and H. Wolf-Watz. 1996.** The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J.* 15:5812-5823.
- Hanahan, D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Hanski, C., U. Kutschka, H. P. Schmoranzler, M. Naumann, A. Stallmach, H. Hahn, H. Menge, and E. O. Riecken. 1989.** Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect. Immun.* 57:673-678.
- Heesemann, J., B. Algermissen, and R. Laufs. 1984.** Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 46:105-110.



- Heesemann, J. and L. Grüter. 1987.** Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 48:229-233.
- Heesemann, J. 1987.** Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 48:229-233.
- Heesemann, J., K. Hantke, T. Vocke, E. Saken, A. Rakin, I. Stojiljkovic, and R. Berner. 1993.** Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity. *Mol. Microbiol.* 8:397-408.
- Heesemann, J., U. Gross, N. Schmidt, and R. Laufs. 1996.** Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect. Immun.* 54:561-567.
- Higuchi, K. and C. E. Carlin. 1958.** Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. II. A defined medium for the growth of *Pasteurella pestis*. *J. Bacteriol.* 75:409-413.
- Higuchi, K., L. L. Kupferberg, and J. L. Smith. 1959.** Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. III. Effects of calcium ions on the growth of virulent and avirulent strains of *Pasteurella pestis*. *J. Bacteriol.* 77:317-321.
- Hoiczky, E. and G. Blobel. 2001.** Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:4669-4674.
- Holmström, A., J. Olsson, P. Cherepanov, E. Maier, R. Nordfelth, J. Pettersson, R. Benz, H. Wolf-Watz, and A. Forsberg. 2001.** LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol. Microbiol.* 39:620-632.
- Hueck, C. J. 1998.** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:379-433.
- Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J. F. Colombel, M. Sahbatou, and G. Thomas. 2001.** Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:599-603.
- Hugot, J. P., C. Alberti, D. Berrebi, E. Bingen, and J. P. Cezard. 2003.** Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* 362:2012-2015.
- Hung, D. L. and S. J. Hultgren. 1998.** Pilus biogenesis via the chaperone/usher pathway: an integration of structure and function. *J. Struct. Biol.* 124:201-220.
- Iriarte, M. and G. R. Cornelis. 1998.** YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol. Microbiol.* 29:915-929.
- Iriarte, M., M. P. Sory, A. Boland, A. P. Boyd, S. D. Mills, I. Lambermont, and G. R. Cornelis. 1998.** TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J.* 17:1907-1918.
- Isberg, R. R., A. Swain, and S. Falkow. 1988.** Analysis of expression and thermoregulation of the *Yersinia pseudotuberculosis inv* gene with hybrid proteins. *Infect. Immun.* 56:2133-2138.
- Isberg, R. R. and J. M. Leong. 1990.** Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60:861-871.

- Isberg, R. R. 1990.** Pathways for the penetration of enteroinvasive *Yersinia* into mammalian cells. *Mol. Biol. Med.* 7:73-82.
- Jawetz, E. and K. F. Meyer. 1944.** The behaviour of virulent and avirulent *P. pestis* in normal and immune experimental animals. *J. Infect. Dis.* 74:1-13.
- Jeffery, C. J. 1999.** Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci.* 24:8-11.
- Jiang, G., H. J. den, and T. Hunter. 2000.** Receptor-like protein tyrosine phosphatase alpha homodimerizes on the cell surface. *Mol. Cell Biol.* 20:5917-5929.
- Journet, L., C. Agrain, P. Broz, and G. R. Cornelis. 2003.** The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* 302:1757-1760.
- Juris, S. J., A. E. Rudolph, D. Huddler, K. Orth, and J. E. Dixon. 2000.** A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:9431-9436.
- Kerschen, E. J., D. A. Cohen, A. M. Kaplan, and S. C. Straley. 2004.** The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect. Immun.* 72:4589-4602.
- Knapp, W. 1988.** Die Gattung *Yersinia* - Yersiniosen, *In H. Brandis and G. Pulverer* [eds.], *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*.
- Koster, M., W. Bitter, C. H. de, A. Allaoui, G. R. Cornelis, and J. Tommassen. 1997.** The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol. Microbiol.* 26:789-797.
- Kupferberg, L. L. and K. Higuchi. 1958.** Role of calcium ions in the stimulation of growth of virulent strains of *Pasteurella pestis*. *J. Bacteriol.* 76:120-121.
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lambert de Rouvroit C., C. Sluiter, and G. R. Cornelis. 1992.** Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* 6:395-409.
- Lee, V. T. and O. Schneewind. 1999.** Type III machines of pathogenic yersiniae secrete virulence factors into the extracellular milieu. *Mol Microbiol.* 31:1619-29.
- Lee, V. T., C. Tam, and O. Schneewind. 2000.** LcrV, a substrate for *Yersinia enterocolitica* type III secretion, is required for toxin targeting into the cytosol of HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 275:36869-36875.
- Lee, V. T., S. K. Mazmanian, and O. Schneewind. 2001.** A program of *Yersinia enterocolitica* type III secretion reactions is activated by specific signals. *J. Bacteriol.* 183:4970-4978.
- Leffell, M. S. and J. K. Spitznagel. 1975.** Fate of human lactoferrin and myeloperoxidase in phagocytizing human neutrophils: effects of immunoglobulin G subclasses and immune complexes coated on latex beads. *Infect. Immun.* 12:813-820.
- Leung, K. Y., B. S. Reisner, and S. C. Straley. 1990.** YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect. Immun.* 58:3262-3271.
- Lloyd, S. A., M. Norman, R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz. 2001.** *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol. Microbiol.* 39:520-531.

- Luo, Y., M. G. Bertero, E. A. Frey, R. A. Pfuetzner, M. R. Wenk, L. Creagh, S. L. Marcus, D. Lim, F. Sicheri, C. Kay, C. Haynes, B. B. Finlay, and N. C. Strynadka. 2001.** Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE. *Nat. Struct. Biol.* 8:1031-1036.
- Macnab, R. M. 1999.** The bacterial flagellum: reversible rotary propeller and type III export apparatus. *J. Bacteriol.* 181:7149-7153.
- Marianayagam, N. J., M. Sunde, and J. M. Matthews. 2004.** The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem Sci.* 29:618-625.
- Marra, A. and R. R. Isberg. 1997.** Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infect. Immun.* 65:3412-3421.
- McCormick, P. and D. Manning. 2001.** Chronic inflammatory bowel disease and the 'over-clean' environment: rarity in the Irish 'traveller' community. *Ir. Med. J.* 94:203-204.
- McDonald, C., P. O. Vacratis, J. B. Bliska, and J. E. Dixon. 2003.** The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J. Biol. Chem.* 278:18514-18523.
- McTigue, M. A., S. L. Bernstein, D. R. Williams, and J. A. Tainer. 1995.** Purification and crystallization of a schistosomal glutathione S-transferase. *Proteins* 22:55-57.
- Michiels, T., J. C. Vanooteghem, R. C. Lambert de, B. China, A. Gustin, P. Boudry, and G. R. Cornelis. 1991.** Analysis of *virC*, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 173:4994-5009.
- Mietzner, T. A. and S. A. Morse. 1994.** The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Nutr.* 14:471-493.
- Miller, V. L. and S. Falkow. 1988.** Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* 56:1242-1248.
- Miller, V. L., J. J. Farmer, III, W. E. Hill, and S. Falkow. 1989.** The ail locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect. Immun.* 57:121-131.
- Mills, S. D., A. Boland, M. P. Sory, S. P. van der, C. Kerbouch, B. B. Finlay, and G. R. Cornelis. 1997.** *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:12638-12643.
- Monack, D. M., J. Mecsas, N. Ghori, and S. Falkow. 1997.** *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:10385-10390.
- Moncla, B. J., S. L. Hillier, and W. T. Charnetzky. 1983.** Constitutive uptake and degradation of fatty acids by *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 153:340-344.
- Morikawa, M., K. Izui, M. Taguchi, and H. Katsuki. 1980.** Regulation of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase by multiple effectors in vivo. Estimation of the activities in the cells grown on various compounds. *J. Biochem. (Tokyo)* 87:441-449.
- Mortlock R. P. and R. R. Brubaker. 1962.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities of *Pasteurella pestis* and *Pasteurella pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol.* 84:1122-1123
- Nakajima, R., V. L. Motin, and R. R. Brubaker. 1995.** Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. *Infect. Immun.* 63:3021-3029.

- Neumayer, W., M. Groll, V. Lehmann, U. Antonenka, S. Kähler, J. Heesemann, and G. Wilharm. 2004.** *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycH. Recombinant expression, purification, characterisation, and crystallisation. *Protein Expr. Purif.* 35:237-247.
- Neyt, C. and G. R. Cornelis. 1999.** Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol. Microbiol.* 31:143-156.
- Nguyen, L., I. T. Paulsen, J. Tchieu, C. J. Hueck, and M. H. Saier, Jr. 2000.** Phylogenetic analyses of the constituents of Type III protein secretion systems. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2:125-144.
- Ogura, Y., D. K. Bonen, N. Inohara, D. L. Nicolae, F. F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R. H. Duerr, J. P. Achkar, S. R. Brant, T. M. Bayless, B. S. Kirschner, S. B. Hanauer, G. Nunez, and J. H. Cho. 2001.** A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:603-606.
- Otwinowski, Z. and W. Minor. 1997.** Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276:307-326.
- Otwinowski, Z. and W. Minor. 1998.** HKL, Manual, fifth ed. Available from <[http://krzys.med.virginia.edu/CrystUVa/HKL\\_page.html](http://krzys.med.virginia.edu/CrystUVa/HKL_page.html)>.
- Page, A. L. and C. Parsot. 2002.** Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol. Microbiol.* 46:1-11.
- Parsot, C., C. Hamiaux, and A. L. Page. 2003.** The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:7-14.
- Pepe, J. C. and V. L. Miller. 1993.** *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:6473-6477.
- Pepe, J. C., J. L. Badger, and V. L. Miller. 1994.** Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene. *Mol. Microbiol.* 11:123-135.
- Pepe, J. C., M. R. Wachtel, E. Wagar, and V. L. Miller. 1995.** Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect. Immun.* 63:4837-4848.
- Perry, R. D. and J. D. Fetherston. 1997.** *Yersinia pestis* - etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:35-66.
- Perry, R. D., S. C. Straley, J. D. Fetherston, D. J. Rose, J. Gregor, and F. R. Blattner. 1998.** DNA sequencing and analysis of the low-Ca<sup>2+</sup>-response plasmid pCD1 of *Yersinia pestis* KIM5. *Infect. Immun.* 66:4611-4623.
- Persson, C., N. Carballeira, H. Wolf-Watz, and M. Fallman. 1997.** The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J.* 16:2307-2318.
- Petersen, S. and G. M. Young. 2002.** Essential role for cyclic AMP and its receptor protein in *Yersinia enterocolitica* virulence. *Infect. Immun.* 70:3665-3672.
- Pettersson, J., R. Nordfelth, E. Dubinina, T. Bergman, M. Gustafsson, K. E. Magnusson, and H. Wolf-Watz. 1996.** Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science* 273:1231-1233.
- Pettersson, J., A. Holmstrom, J. Hill, S. Leary, E. Frithz-Lindsten, A. von Euler-Matell, E. Carlsson, R. Titball, A. Forsberg, and H. Wolf-Watz. 1999.** The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol. Microbiol.* 32:961-976.

- Phan, J., J. E. Tropea, and D. S. Waugh. 2004.** Structure of the *Yersinia pestis* type III secretion chaperone SycH in complex with a stable fragment of YscM2. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60:1591-1599.
- Pierson, D. E. and S. Falkow. 1993.** The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infect. Immun.* 61:1846-1852.
- Pilz, D., T. Vocke, J. Heesemann, and V. Brade. 1992.** Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect. Immun.* 60:189-195.
- Pingoud, A. and A. Jeltsch. 2001.** Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* 29:3705-3727.
- Plano, G. V. and S. C. Straley. 1993.** Multiple effects of *lcrD* mutations in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 175:3536-3545.
- Plano, G. V. and S. C. Straley. 1995.** Mutations in *yscC*, *yscD*, and *yscG* prevent high-level expression and secretion of V antigen and Yops in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 177:3843-3854.
- Portnoy, D. A., H. Wolf-Watz, I. Bolin, A. B. Beeder, and S. Falkow. 1984.** Characterization of common virulence plasmids in *Yersinia* species and their role in the expression of outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 43:108-114.
- Primm, T. P., S. J. Andersen, V. Mizrahi, D. Avarbock, H. Rubin, and C. E. Barry, III. 2000.** The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J. Bacteriol.* 182:4889-4898.
- Rabson, A. R., A. F. Hallett, and H. J. Koornhof. 1975.** Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Infect. Dis.* 131:447-451.
- Radnedge, L., P. G. Agron, P. L. Worsham, and G. L. Andersen. 2002.** Genome plasticity in *Yersinia pestis*. *Microbiology* 148:1687-1698.
- Ramamurthi, K. S. and O. Schneewind. 2002a.** *Yersinia enterocolitica* type III secretion: mutational analysis of the *yopQ* secretion signal. *J. Bacteriol.* 184:3321-3328.
- Ramamurthi, K. S. and O. Schneewind. 2002b.** Type III protein secretion in *yersinia* species. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:133.
- Ratledge, C. and L. G. Dover. 2000.** Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:881-941.
- Rimpilainen, M., A. Forsberg, and H. Wolf-Watz. 1992.** A novel protein, LcrQ, involved in the low-calcium response of *Yersinia pseudotuberculosis* shows extensive homology to YopH. *J. Bacteriol.* 174:3355-3363.
- Robert-Koch-Institut. 2004.** Bakterielle Gastroenteritiden: Situationsbericht 2003. *Epidemiologisches Bulletin* 31:251-260.
- Roggenkamp, A., H. R. Neuberger, A. Flügel, T. Schmoll, and J. Heesemann. 1995.** Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol. Microbiol.* 16:1207-1219.
- Roggenkamp, A., K. Ruckdeschel, L. Leitritz, R. Schmitt, and J. Heesemann. 1996.** Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect. Immun.* 64:2506-2514.

- Rohde J. R., J. M. Fox and S. A. Minnich. 1994.** Thermoregulation in *Yersinia enterocolitica* is coincident with changes in DNA supercoiling. *Mol Microbiol.* 12:187-99.
- Rohde, J. R., X. S. Luan, H. Rohde, J. M. Fox, and S. A. Minnich. 1999.** The *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37 degrees C. *J. Bacteriol.* 181:4198-4204.
- Rosqvist, R., I. Bolin, and H. Wolf-Watz. 1988.** Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. *Infect. Immun.* 56:2139-2143.
- Rosqvist, R., A. Forsberg, M. Rimpilainen, T. Bergman, and H. Wolf-Watz. 1990.** The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol. Microbiol.* 4:657-667.
- Rosqvist, R., K. E. Magnusson, and H. Wolf-Watz. 1994.** Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* 13:964-972.
- Ruckdeschel, K., A. Roggenkamp, S. Schubert, and J. Heesemann. 1996.** Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect. Immun.* 64:724-733.
- Ruckdeschel, K., S. Harb, A. Roggenkamp, M. Hornef, R. Zumbihl, S. Kohler, J. Heesemann, and B. Rouot. 1998.** *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J. Exp. Med.* 187:1069-1079.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989.** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sarker, M. R., M. P. Sory, A. P. Boyd, M. Iriarte, and G. R. Cornelis. 1998.** LcrG is required for efficient translocation of *Yersinia* Yop effector proteins into eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 66:2976-2979.
- Schesser, K., A. K. Spiik, J. M. Dukuzumuremyi, M. F. Neurath, S. Pettersson, and H. Wolf-Watz. 1998.** The *yopJ* locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol. Microbiol.* 28:1067-1079.
- Schulte, R., G. A. Grassl, S. Preger, S. Fessele, C. A. Jacobi, M. Schaller, P. J. Nelson, and I. B. Autenrieth. 2000.** *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J.* 14:1471-1484.
- Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, M. K. von der, and F. Emmrich. 1992.** Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen. *Infect. Immun.* 60:2153-2159.
- Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, T. Kirsch, B. Swoboda, C. Bull, S. Goodman, and F. Emmrich. 1993.** Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect. Immun.* 61:2513-2519.
- Shao, F., P. M. Merritt, Z. Bao, R. W. Innes, and J. E. Dixon. 2002.** A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109:575-588.

- Sharp, P. M. 1991.** Determinants of DNA sequence divergence between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: codon usage, map position, and concerted evolution. *J. Mol. Evol.* 33:23-33.
- Simonet, M., B. Riot, N. Fortineau, and P. Berche. 1996.** Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *Infect. Immun.* 64:375-379.
- Sing, A., A. Roggenkamp, A. M. Geiger, and J. Heesemann. 2002a.** *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J. Immunol.* 168:1315-1321.
- Sing, A., D. Rost, N. Tvardovskaia, A. Roggenkamp, A. Wiedemann, C. J. Kirschning, M. Aepfelbacher, and J. Heesemann. 2002b.** *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J. Exp. Med.* 196:1009-1012.
- Skrzypek, E. and S. C. Straley. 1993.** LcrG, a secreted protein involved in negative regulation of the low-calcium response in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 175:3520-3528.
- Skrzypek, E. and S. C. Straley. 1995.** Differential effects of deletions in *lcrV* on secretion of V antigen, regulation of the low-Ca<sup>2+</sup> response, and virulence of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 177:2530-2542.
- Skurnik, M., Y. el Tahir, M. Saarinen, S. Jalkanen, and P. Toivanen. 1994.** YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. *Infect. Immun.* 62:1252-1261.
- Skurnik, M., A. Peippo, and E. Ervela. 2000.** Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol. Microbiol.* 37:316-330.
- Smith, C. L., P. Khandelwal, K. Keliikuli, E. R. Zuiderweg, and M. A. Saper. 2001.** Structure of the type III secretion and substrate-binding domain of *Yersinia* YopH phosphatase. *Mol. Microbiol.* 42:967-979.
- Smith, R. S., M. C. Wolfgang, and S. Lory. 2004.** An adenylate cyclase-controlled signaling network regulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect. Immun.* 72:1677-1684.
- Smith, T. E. 1968.** *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase: characterization and sedimentation behavior. *Arch Biochem Biophys* 128:611-622.
- Snellings, N. J., M. Poppek, and L. E. Lindler. 2001.** Complete DNA sequence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 low-calcium-response plasmid reveals a new virulence plasmid-associated replicon. *Infect. Immun.* 69:4627-4638.
- Sorg, I., U. M. Goehring, K. Aktories, and G. Schmidt. 2001.** Recombinant *Yersinia* YopT leads to uncoupling of RhoA-effector interaction. *Infect. Immun.* 69:7535-7543.
- Stainier, I., M. Iriarte, and G. R. Cornelis. 1997.** YscM1 and YscM2, two *Yersinia enterocolitica* proteins causing downregulation of *yop* transcription. *Mol. Microbiol.* 26:833-843.
- Stebbins, C. E. and J. E. Galan. 2001.** Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* 414:77-81.
- Straley, S. C., E. Skrzypek, G. V. Plano, and J. B. Bliska. 1993.** Yops of *Yersinia* spp. pathogenic for humans. *Infect. Immun.* 61:3105-3110.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt. 1986.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189:113-130.

- Surgalla, M. J., A. W. Andrews, and C. L. Baugh. 1964.** Effects of bicarbonate on growth of *Pasteurella pestis*. I. Differential response of virulent and avirulent cells. *J. Bacteriol.* 88:269-272.
- Swietnicki, W., S. O'Brien, K. Holman, S. Cherry, E. Brueggemann, J. E. Tropea, H. B. Hines, D. S. Waugh, and R. G. Ulrich. 2004.** Novel protein-protein interactions of the *Yersinia pestis* type III secretion system elucidated with a matrix analysis by surface plasmon resonance and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 10:38693-38700.
- Tampakaki, A. P., V. E. Fadoulglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos, and M. Kokkinidis. 2004.** Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol.* 6:805-816.
- Tardy, F., F. Homble, C. Neyt, R. Wattiez, G. R. Cornelis, J. M. Ruyschaert, and V. Cibiaux. 1999.** *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *EMBO J.* 18:6793-6799.
- Tauxe, R. V., J. Vandepitte, G. Wauters, S. M. Martin, V. Goossens, M. P. De, N. R. Van, and G. Thiers. 1987.** *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet* 1:1129-1132.
- Tipple, M. A., L. A. Bland, J. J. Murphy, M. J. Arduino, A. L. Panlilio, J. J. Farmer, III, M. A. Tourault, C. R. Macpherson, J. E. Menitove, A. J. Grindon, and . 1990.** Sepsis associated with transfusion of red cells contaminated with *Yersinia enterocolitica*. *Transfusion* 30:207-213.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76:4350-4354.
- Trcek, J., G. Wilharm, C. A. Jacobi, and J. Heesemann. 2002.** *Yersinia enterocolitica* YopQ: strain-dependent cytosolic accumulation and post-translational secretion. *Microbiology* 148:1457-1465.
- Trebesius, K., D. Harmsen, A. Rakin, J. Schmelz, and J. Heesemann. 1998.** Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J. Clin. Microbiol.* 36:2557-2564.
- Trülzsch, K., T. Sporleder, E. I. Igwe, H. Rüssmann, and J. Heesemann. 2004.** Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect. Immun.* 72:5227-5234.
- Tsarbopoulos, A., M. Karas, K. Strupat, B. N. Pramanik, T. L. Nagabhushan, and F. Hillenkamp. 1994.** Comparative mapping of recombinant proteins and glycoproteins by plasma desorption and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 66:2062-2070.
- Van, Eerde, A., C. Hamiaux, J. Perez, C. Parsot, and B. W. Dijkstra. 2004.** Structure of Spa15, a type III secretion chaperone from *Shigella flexneri* with broad specificity. *EMBO Rep.* 5:477-483.
- Visser, L. G., A. Annema, and R. van Furth. 1995.** Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes. *Infect. Immun.* 63:2570-2575.
- Von Pawel-Rammingen, U., M. V. Telepnev, G. Schmidt, K. Aktories, H. Wolf-Watz, and R. Rosqvist. 2000.** GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol. Microbiol.* 36:737-748.
- Wagner, R. 2000.** Regulatory networks. *Transcription Regulation in Prokaryotes.* pp. 264-335. Oxford University Press
- Wattiau, P. and G. R. Cornelis. 1993.** SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE. *Mol. Microbiol.* 8:123-131.



- Wattiau, P., B. Bernier, P. Deslee, T. Michiels, and G. R. Cornelis. 1994.** Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 91:10493-10497.
- Wauters, G., K. Kandolo, and M. Janssens. 1987.** Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. Contrib. Microbiol. Immunol. 9:14-21.
- Wayson, N. E., C. McMahon, and F. M. Prince. 1946.** An evaluation of three plague vaccines against infection in guinea pigs induced by natural and artificial methods. Public Health Rep. 61:1511-1518.
- WHO. 2002.** Plague. Fact Sheet No. 267. <http://www.who.int/inf-fs/en/fact267.html>
- Wilharm, G., W. Neumayer, and J. Heesemann. 2003.** Recombinant *Yersinia enterocolitica* YscM1 and YscM2: homodimer formation and susceptibility to thrombin cleavage. Protein Expr. Purif. 31:167-172.
- Williams, A. W. and S. C. Straley. 1998.** YopD of *Yersinia pestis* plays a role in negative regulation of the low-calcium response in addition to its role in translocation of Yops. J. Bacteriol. 180:350-358.
- Winblad, S. 1969.** Erythema nodosum associated with infection with *Yersinia enterocolitica*. Scand. J. Infect. Dis. 1:11-16.
- Woestyn, S., A. Allaoui, P. Wattiau, and G. R. Cornelis. 1994.** YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. J. Bacteriol. 176:1561-1569.
- Woestyn, S., M. P. Sory, A. Boland, O. Lequenne, and G. R. Cornelis. 1996.** The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes. Mol. Microbiol. 20:1261-1271.
- Wolfgang, M. C., V. T. Lee, M. E. Gilmore, and S. Lory. 2003.** Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. Dev. Cell 4:253-263.
- Wren, B. W. 2003.** The Yersinia - a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. Nature Reviews Microbiology 1:55-64.
- Wulff-Strobel, C. R., A. W. Williams, and S. C. Straley. 2002.** LcrQ and SycH function together at the Ysc type III secretion system in *Yersinia pestis* to impose a hierarchy of secretion. Mol. Microbiol. 43:411-423.
- Zahorchak, R. J., W. T. Charnetzky, R. V. Little, and R. R. Brubaker. 1979.** Consequences of Ca<sup>2+</sup> deficiency on macromolecular synthesis and adenylate energy charge in *Yersinia pestis*. J. Bacteriol. 139:792-799.
- Zahorchak, R. J. and R. R. Brubaker. 1982.** Effect of exogenous nucleotides on Ca<sup>2+</sup> dependence and V antigen synthesis in *Yersinia pestis*. Infect. Immun. 38:953-959.
- Zhang, Z. Y., J. C. Clemens, H. L. Schubert, J. A. Stuckey, M. W. Fischer, D. M. Hume, M. A. Saper, and J. E. Dixon. 1992.** Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant *Yersinia* protein tyrosine phosphatase. J. Biol. Chem. 267:23759-23766.
- Zhou, D., Z. Tong, Y. Song, Y. Han, D. Pei, X. Pang, J. Zhai, M. Li, B. Cui, Z. Qi, L. Jin, R. Dai, Z. Du, J. Wang, Z. Guo, J. Wang, P. Huang, and R. Yang. 2004.** Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus. J. Bacteriol. 186:5147-5152.
- Ziegler, P. 1991.** The black death. Alan Sutton Publishing Inc., Wolfboro Falls, N.H.
- Zumbihl, R., M. Aepfelbacher, A. Andor, C. A. Jacobi, K. Ruckdeschel, B. Rouot, and J. Heesemann. 1999.** The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. J. Biol. Chem. 274:29289-29293.

## PUBLIKATIONEN

**Wilharm, G., W. Neumayer, and J. Heesemann. 2003.** Recombinant *Yersinia enterocolitica* YscM1 and YscM2: homodimer formation and susceptibility to thrombin cleavage. Protein Expr. Purif. 31:167-172.

**Neumayer, W., M. Groll, V. Lehmann, U. Antonenka, S. Kähler, J. Heesemann, and G. Wilharm. 2004.** *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycH. Recombinant expression, purification, characterisation, and crystallisation. Protein Expr. Purif. 35:237-247.

**Wilharm, G., V. Lehmann, W. Neumayer, J. Trcek, and J. Heesemann. 2004.** *Yersinia enterocolitica* type III secretion: evidence for the ability to transport proteins that are folded prior to secretion. BMC. Microbiol. 4:27.

**Europäische Patentanmeldung EP 04015734.9. 2004.** Use of a bacterial phosphoenolpyruvate carboxylase, Ludwig-Maximilians-Universität München.  
Erfindungsmelder: Neumayer, W., K. Trülsch, J. Heesemann & G. Wilharm

Diese Arbeit wurde am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München von Oktober 2001 bis Dezember 2004 angefertigt.

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Gottfried Wilharm für seine hervorragende Betreuung, motivierende Diskussionen, für ein stets offenes Ohr und die besonders gute Arbeitsatmosphäre.

Herrn Professor Heesemann danke ich herzlich für die Möglichkeit meine Arbeit an diesem Institut durchführen zu können, für die finanzielle Unterstützung, sein Interesse an meiner Arbeit und seine rege Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Professor Pfeifer bedanke ich mich für die gute Betreuung von Seiten der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München und seine tatkräftige Unterstützung bei der Abwicklung der Formalitäten.

Für die Konstruktion der WA-314-Deletionsmutanten von *yscM1*, *yscM2* und *ppc* gilt mein Dank Konrad Trülzsch, ebenso für die Infektion der Mäuse und die Entnahme der Organe.

Bei Guido Sauer vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bedanke ich mich für die Durchführung der Massenspektrometrie zur Identifizierung von PEPC.

Michael Groll vom Adolf-Butenandt-Institut am Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Durchführung der Kristallisierung von SycH und die Aufzeichnung und Auswertung der Daten.

Bei allen ehemaligen und derzeitigen Kollegen der Arbeitsgruppen Rakin und Wilharm bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die netten Stunden im Labor, die konstruktiven Diskussionen und für alle gelungenen Festivitäten. Mein besonderer Dank gilt dabei Susanna Richter für die große Hilfe bei der Durchführung der Wachstumsversuche und Christina Nölting für das gewissenhafte Korrekturlesen meiner Arbeit.

Den Mitgliedern des HK Neuhausen danke ich für die seelisch-moralische Unterstützung, die vielen Gebete und das geduldige Zuhören. Besonders danke ich allen Freunden, die die letzten Jahre mit mir durch Höhen und Tiefen gegangen sind.

Meinen Eltern und Großeltern danke ich für die großzügige finanzielle Unterstützung, die mir diese Ausbildung ermöglicht hat.

# LEBENS LAUF

Wibke Neumayer  
geboren am 13.02.1976  
in Stuttgart  
deutsch

## SCHULBILDUNG

1982 – 1986

Sommerrain-Grundschule Schornbach

1986 – 1995

Burg-Gymnasium Schorndorf  
Abschluss mit Abitur

## STUDIUM

1995 – 2000

Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin  
Abschluss mit dem 2. Staatsexamen

07/2000 – 01/2001

Praktikum bei der Schering AG, Berlin

01/2001 – 07/2001

Praktikum in der Prenzl-Apotheke, Berlin

08/2001

3. Staatsexamen

09/2001

Approbation als Apothekerin

## PROMOTION

10/2001 – 12/2004

Dissertation am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene  
und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-  
Maximilians-Universität München