Molekulare Analyse der Yersinien-Wirtszell Interaktion

Thomas N. Abahji

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Molekulare Analyse der Yersinien-Wirtszell Interaktion

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Thomas N. Abahji

aus
München

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. J. Heesemann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. M. Schliwa Prof. Dr. R. A. W. Rupp Priv.-Doz. Dr. M. Schaller
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. C. Barz
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	25.04.2002

Meiner Mutter, Meinem Vater

Meinen Großeltern

Meiner Frau Hadia

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 Die Gattung *Yersinia* und ihre humanmedizinische Bedeutung 1

1.2 Grundlagen der Pathogenität von Yersinien 3

1.3 Die Yop Effektor-Proteine 4

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit 7

2 MATERIAL UND METHODEN 8

2.1 Material 8
2.1.1 Geräte 8
2.1.2 Chemikalien 9
2.1.3 Kitsysteme 11
2.1.4 Antikörper 11
2.1.5 Nährmedien 12
2.1.6 Plasmide 14
2.1.7 Stämme 16
2.1.8 Synthetische Oligonukleotide 17

2.2 Methoden 18
2.2.1 Mikrobiologische Methoden 18
2.2.1.1 Anzuchtbedingungen von Bakterien und Hefen 18
2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Bakterien- und Hefekulturen 19
2.2.1.3 Ausplattieren von Bakterien und Hefen 19
2.2.1.4 Lagerung von Bakterien und Hefen 19
2.2.2 Molekularbiologische Methoden 19
2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien 19
2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen 20
2.2.2.3 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung 21
2.2.2.4 Restriktionsverdau 21
2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNA 21
2.2.2.6 Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel 22
2.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten (58) 22
2.2.2.8 Herstellung elektrokompetenter Zellen und Transformation 23
2.2.2.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR) (59) 23
2.2.2.10 DNA-Sequenzierung (74) 24
2.2.3 Das Yeast Two-Hybrid System 25
2.2.3.1 Tests auf Autoaktivierung der Reporter 28
2.2.3.2 Prüfung auf die Kerngängigkeit und Bindung an LexA Operatoren 28
2.2.3.3 Hefezelltransformation 30
2.2.3.4 Transformation der Genbank 30
2.2.3.5 Filterassay auf β-Galaktosidaseaktivität 31
2.2.3.6 Test auf Aktivierung des LEU-Reportergens 31
2.2.3.7 Hefe-Paarungstest (Mating-Test) 32
2.2.4 Proteinchemische Methoden 32

2.2.4.1 Proteinisolation aus Hefezellen....32
2.2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford (14)....33
2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (53)....33
2.2.4.4 Westernblot / Immunoblot....34
2.2.4.5 Koimmunopräzipitation (65)....35
2.2.5 Zellbiologische Methoden....36
2.2.5.1 Kultivierung von humanen Zellinien....36
2.2.5.2 Infektion von Zell-Linien mit Yersinien....36

3 ERGEBNISSE....37

3.1 Untersuchung von YopM und YopO/YpkA im Yeast Two–Hybrid System....37
3.1.1 YopM....37
3.1.1.1 Klonierung....37
3.1.1.2 Sequenzierung....37
3.1.1.3 Autoaktivierungsversuche....38
3.1.2 Das YopM–Fragment (YopM–F)....40
3.1.2.1 Klonierung des YopM–Fragmentes....41
3.1.2.2 Sequenzierung des YopM–Fragmentes....41
3.1.2.3 Autoaktivierungsversuche....41
3.1.3 YopO....42
3.1.3.1 Klonierung....42
3.1.3.2 Sequenzierung....42
3.1.3.3 Autoaktivierungsversuche....43
3.1.3.4 Repressionsassay....44
3.1.3.5 Genbanktransformation....46
3.1.3.6 Selektionsverfahren....47
3.1.3.7 Hefepaarungsteste....48
3.1.3.8 Identifizierung der positiven Klone....48

3.2 Prüfung auf Interaktion von weiteren Mitgliedern der Rho–Familie mit YopO / YpkA im Yeast Two–Hybrid System....52
3.2.1 Klonierung von Rac1, RhoA, Cdc42 und Rac1V12 in den Zielvektor pJG4-5....53
3.2.2 Klonierung von YpkA und ΔYpkA in den Ködervektor pEG202....54
3.2.3 Hefepaarungstest von Mitgliedern der Rho–Familie mit YopO, YpkA und ΔYpkA....55
3.2.4 Überprüfung der Expression der Zielproteine mit einem Immunoblot....57

3.3 Koimmunopräzipitation von RhoA und Rac1 aus infizierten COS – Zellen....60

4 DISKUSSION....63

4.1 YopM....63

4.2 YopO / YpkA....64

4.3 Das Ergebnis der Yeast Two-Hybrid Filter-Untersuchung....65

4.4 Koimmunopräzipitation von Rac1 und RhoA mit Anti-YpkA Antikörpern aus infizierten COS-Zellen....69

4.5 Biologische Relevanz der Interaktion zwischen YpkA/YopO und RhoA bzw. Rac1 71

5 ZUSAMMENFASSUNG.....74

6 ABKÜRZUNGEN.....75

7 LITERATURVERZEICHNIS 77

1 Einleitung

Die infektionsbiologische Erforschung von pathogenen Bakterien hat in der vergangenen Dekade ergeben, dass Yersinien, Salmonellen und Shigellen eine Vielzahl von Strategien entwickelt haben, um die unspezifischen und teilweise auch die spezifischen Abwehrmechanismen des Wirtes zu umgehen. So penetrieren diese invasiven Bakterien das sonst schützende Schleimhautepithel des Darmes, vermehren sich intra– (Shigellen, Salmonellen) bzw. extrazellulär (Yersinien) im subepithelialen Gewebe und disseminieren über Blut– oder Lymphgefäße in nachfolgende Organe. Trotz genomspezifischer Überlebensstrategien weisen Yersinien, Salmonellen und Shigellen auch gemeinsame Pathomechanismen auf. Dem sogenannten TypIII Sekretions/Translokationsapparat kommt diesbezüglich eine entscheidende Bedeutung zu. Dieser wird nach Kontakt des Bakteriums mit der Wirtszelle (meist Abwehrzelle) induziert und stellt eine Verbindung zwischen bakteriellem und eukaryotem Zytoplasma her. Die Bakterien sind nun in der Lage über diesen Transportkanal eigene Proteine (Effektorproteine) in das Zytoplasma von Wirtszellen zu injizieren. Die in Größe, Struktur und Funktion unterschiedlichen Effektorproteine verändern Funktionen der Wirtszelle zum Vorteil des Bakteriums und sind für den spezies-spezifischen, pathogenetischen Phänotyp mitverantwortlich. Dabei ist die Aufdeckung intrazellulärer Angriffspunkte einzelner Effektorproteine sowie deren exakte pathogenetische Funktionen Gegenstand derzeitiger Forschungen.

1.1 Die Gattung *Yersinia* und ihre humanmedizinische Bedeutung

Yersinien sind gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien und gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Sie können sich in einem Temperaturbereich von 4°C bis 43°C vermehren. Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 28°C und 30°C.
Zu der Gattung *Yersinia* werden derzeit elf Spezies gerechnet, von denen drei für Mensch und Tier pathogen sind.

Pest, eine akute fieberhafte Zoonose, wird durch Infektion mit *Yersinia pestis* verursacht. Sie tritt heute nur noch sporadisch in wenigen Ländern Asiens, Afrikas und Amerikas auf, wobei die Möglichkeit einer epidemischen Ausbreitung in einigen Regionen weiterhin besteht (25). Wildlebende Nagetiere sind die natürlichen Wirte der Pestbakterien. Typischerweise werden diese über Flohbisse auf den Menschen übertragen. Nach Invasion und Vermehrung in den dränierenden Lymphknoten, was zur Bildung der typischen Bubonen führt (Beulenpest), können die Pesterreger in den Blutkreislauf gelangen und ein septisches Krankheitsbild erzeugen. Kommt es zu Absiedlung und Ausbreitung in der Lunge, kann die Infektion über Tröpfchen von Mensch zu Mensch übertragen werden (Lungenpest). Diese Manifestation hat unbehandelt eine sehr hohe Letalität (25).

Als Yersiniose werden Infektionen bezeichnet, die durch die enteropathogenen Spezies *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* verursacht werden. Zu dem Reservoir dieser Bakterien gehören im wesentlichen Nager, Schweine, Schafe, Ziegen und Rinder. Yersiniosen werden hauptsächlich durch kontaminierte Lebensmittel wie Schweinefleisch und Milchprodukte auf den Menschen übertragen (76). Klinisch manifestiert sich die Infektion meist als Enteritis oder Enterokolitis mit selbstlimitierender Diarrhöe (v.a. bei *Y. enterocolitica*) und als mesenteriale Lymphadenitis mit terminaler Ileitis (v.a. bei *Y. pseudotuberculosis*). Letztere Manifestationsform ist oft schwer von einer akuten Appendizitis zu unterscheiden (25). In 0,5 – 1,5% der Erkrankungen kann, begünstigt durch vorbestehende konsumierende, immunschwächende Grundleiden, aber auch durch hämolytische Anämien (z.B. Thalassämien), ein septischer Verlauf mit unbehandelt hoher Letalität eintreten. In solchen Fällen sind metastatische Absiedlungen in Milz, Leber und anderen Organen relativ häufig (13).

Immunologische, extraintestinale Folgeerscheinungen wie reaktive Arthritis oder Erythema nodosum können den Verlauf einer Yersiniose komplizieren. Diese nicht-eitrigen, reaktiven Entzündungen treten ein bis drei Wochen nach einer akuten Yersinieninfektion auf und weisen eine deutliche Assoziation mit HLA B27 auf (25, 78).

Der in der Regel kurze und gutartige enteritische oder pseudoappendizitische Verlauf bedarf keiner antibiotischen Therapie. Bei septikämischen Verläufen, metastatischen Absiedlungen oder Immunschwäche sollte jedoch eine antibiotische Behandlung mit Doxycyclin, Gyrasehemmern oder Cotrimoxazol erfolgen (25).

1.2 Grundlagen der Pathogenität von Yersinien

Enteropathogene Yersinien werden in der Regel über kontaminierte Lebensmittel aufgenommen. Infektionen durch direkten Kontakt mit erkrankten Tieren oder tierischen Keimträgern sind selten. Im Dünndarm überqueren die Bakterien die Epithelbarriere über M–Zellen des Follikel-assoziierten-Epithels (5, 75). Bei dieser Transzytose ist u.a. das chromosomal kodierte Inv–Protein (Inv für Invasion), welches mit β1–Integrinen auf M–Zellen interagiert, beteiligt (17). Im subepithelialem Gewebe werden die Bakterien von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten attackiert. Nur durch Expression der plasmid-kodierten Virulenzgene können pathogene Yersinien den Angriffen der Abwehrzellen widerstehen und sich sogar vermehren. Dabei kommt es histologisch zur Bildung von Mikroabszessen mit lebenden, extrazellulären Yersinien und schließlich zur Zerstörung der zytoarchitektonischen Struktur der Peyerschen Plaques (19). Im Verlauf können weitere Abszesse in den mesenterialen Lymphknoten, sowie anderen lymphatischen und extralymphatischen Geweben auftreten (38). In der Regel werden enteropathogene Yersinien jedoch nach einigen Tagen über bis heute unbekannte Mechanismen vom Wirt überwältigt, was den selbstlimitierenden Charakter der Erkrankung erklärt (1).

Obwohl einige *Yersinia* Virulenzfaktoren wie Adhäsions/Invasions–Faktoren oder das *Y. enterocolitica* Enterotoxin Yst chromosomenkodiert sind (21), ist die Virulenz der Yersinien unabdingbar mit dem Vorhandensein eines hochkonservierten 70kb Plasmids verbunden. Dieses pYV genannte Plasmid (plasmid involved in Yersinia virulence), welches allen pathogenen *Yersinia*-Arten gemein ist, enthält Gene für (i) einen TypIII Sekretion/Translokationsapparat, (ii) mindestens sechs Effektorproteine (Yersinia outer proteins, Yops) und (iii) Regulatorproteine für die Genexpression und Yop–Sekretion/Translokation. Das pYV–Plasmid kodiert darüber hinaus YadA, ein Adhäsin, welches unter anderem die Anheftung von Yersinien an Wirtszellen vermittelt (67, 43), sowie für das Lipoprotein YlpA, dessen Rolle in der Pathogenität bis heute ungeklärt ist (15).

Yersinien wirken auf Makrophagen und neutrophile Granulozyten in vielfältiger Weise. Sie induzieren Apoptose und inhibieren Phagozytose, oxidativen Burst und die Freisetzung von TNFα und INFγ (19). Es konnte gezeigt werden, dass viele dieser Wirkungen von den

Effektor–Yops abhängig sind, die über den TypIII Sekretions/Translokationsapparat in das Zytoplasma von Abwehrzellen transloziert werden (Abb.1-1).

1.3 Die Yop Effektor-Proteine

YopM ist ein 41,6 kDa großes Effektor-Protein und enthält Leuzin-reiche-Wiederholungsmotive (leucine rich repeats, LRR), die unter Proteinen weit verbreitet sind (51). Aus diesem Grund weist YopM schwache Homologien zu einer Vielzahl von Proteinen unterschiedlichster Funktionen auf, so auch zur α-Kette des Thrombozyten–Oberflächenproteins Glykoprotein Ib (GPIb-α), welches Thrombin und den von-Willebrand-Faktor bindet (57). Ursprünglich wurde die Vorstellung vertreten, dass YopM extrazellulär durch Bindung an Thrombin die Plättchenaggregation hemmt (56). Doch da die Thrombin-bindende Domäne von GPIb-α außerhalb des zu YopM homologen Bereiches liegt, und da bis heute keine Thrombin-bindende Domäne auf YopM identifiziert werden konnte, ist man von dieser These weitgehend abgerückt (20, 31). Nach gegenwärtigen Vorstellungen wird YopM vielmehr als intrazellulär wirkender Effektor angesehen. So konnte mit Hilfe von Adenylatcyclase-Fusionsproteinen gezeigt werden, dass das YopM–Cya Fusionsprotein in das Zytosol infizierter Makrophagen über den TypIII Sekretions/Translokationsapparat transloziert wird (12). Ebenfalls konnte in Zell-Fraktionierungs Versuchen intrazelluläres YopM nachgewiesen werden (54). Immunfloureszensstudien an mit *Y. pestis* infizierten HeLa–Zellen zeigten, dass YopM auch in den Zellkern lokalisiert wird (77). Von YopM ist bisher weder eine spezifische Wirkung noch ein Interaktionspartner bekannt. Da im Maus-Modell die LD_{50} von YopM–Mutanten jedoch deutlich erhöht ist, scheint dieses Protein eine wichtige Rolle in der Pathogenität von *Y. pestis* zu spielen (56).

YopO (*Y. enterocolitica*) bzw. YpkA (*Y. pseudotuberculosis, Y. pestis*) ist ein 81,7 kDa großes Protein und weist hohe Sequenzhomologieen zu eukaryoten Serin/Threonin–Proteinkinasen auf (29). Infektionsversuche von BALB/c Mäusen zeigten, dass im Vergleich zu *Y. pseudotuberculosis*-Wildtyp, die YpkA-Mutante in der Mausvirulenz abgeschwächt ist (30).

In vitro-Kinase Experimente zeigten, dass YpkA eine phosphorylierende Aktivität auf eigene Serinreste aufweist. An dieser autophosphorylierenden Aktivität sind neben der katalytische Domäne (Aminosäurereste 207 bis 388) auch davon C-terminale Bereiche notwendig (30). Die Sekretionsdomäne von YopO befindet sich innerhalb der ersten 77 N-terminalen Aminosäuren (47). YopO bzw. YpkA wird, im Gegensatz zu YopE oder YopH, vom Wildtyp nur in einem sehr geringen Maße in die Wirtszelle transloziert. Für einen direkten Nachweis von translozierten YopO werden überexprimierende YopO–Stämme benötigt (34, 47). In infizierten HeLa–Zellen ist das translozierte YopO vorzugsweise an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert (34). Die auf YopO zurückführbaren morphologischen Veränderungen unterscheiden sich von denen, die durch YopE oder YopH hervorgerufen werden. Die Zellen runden sich zwar ab, lösen sich aber nicht von der Extrazellulärmatrix. Ferner zeigen sich deutlich verzweigte Retraktionsfasern (34). Aufgrund der intrazellulären Lokalisation und der phosphorylierenden Aktivität von YopO wird eine Beteiligung in Signaltransduktionswege diskutiert, jedoch konnte bisher kein intrazellulärer Interaktionspartner identifiziert werden (34). Kürzlich wurde berichtet, dass YpkA in inaktiver Form in die Wirtszelle transloziert wird und durch das zelluläre Aktin aktiviert wird. Auch wurde gezeigt, dass transfiziertes YpkA in HeLa-Zellen zu einer Zerstörung des Actin-Zytoskeletts führt (49).

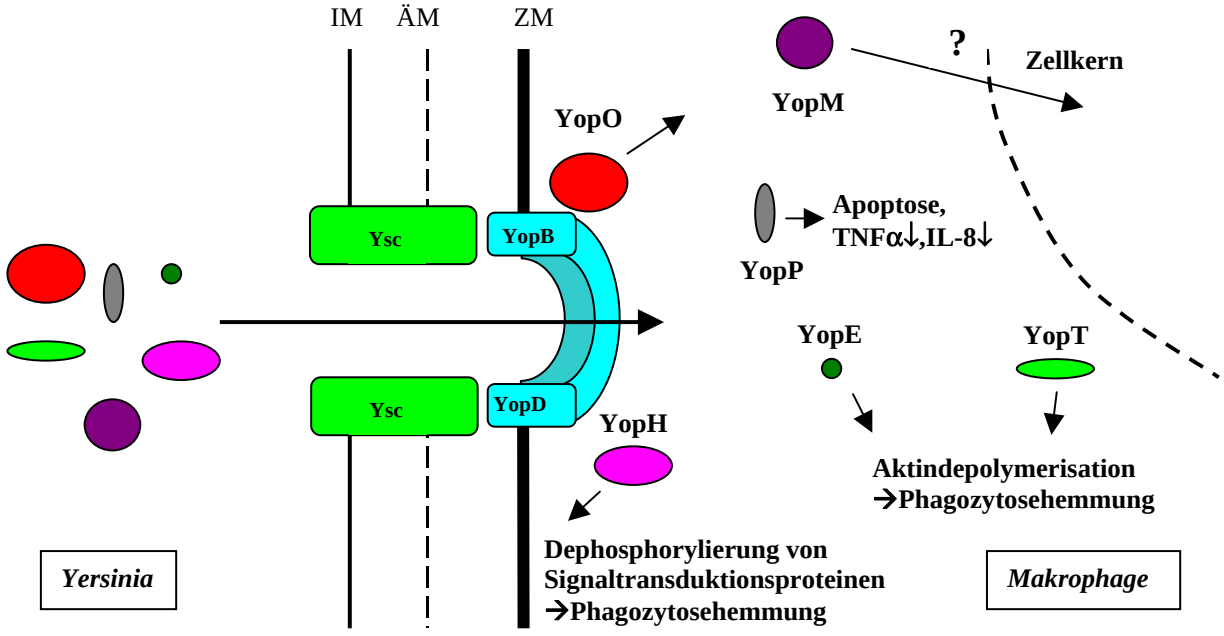

Abbildung 1-1 Translokation von Effektor-Yops in Wirtszelle und einige Effekte. **Ysc:** Yersinia secretion apparatus; **IM:** innere Membran; **ÄM:** äußere Membran; **ZM:** Zellmembran

YopE führt in Säugetierzellen zu einer Depolymerisation von Aktin-Filamenten, zur Abrundung von Zellen und zur Hemmung der Phagozytose (68). YopE weist Sequenzhomologien zu den Toxinen ExoS und SptP von *Pseudomonas aeruginosa* bzw. *Samonella typhimurium* auf, die als „GTPase activating proteins“, sog. GAPs von RhoGTPasen wirken. YopE, ExoS, SptP und andere RhoGAPs enthalten ein Arginin-Finger-Motiv, welches für die Stimulation der GTP-Hydrolyse durch die GTPase essentiell ist. Es konnte gezeigt werden, dass YopE *in vitro* über GAP-Aktivität zur Inaktivierung von RhoGTPasen führt, was die genannten Effekte erklären könnte (64, 79).

YopH besitzt starke Tyrosinphosphatase–Aktivität und weist Homologien zu eukaryoten Proteinphosphatasen auf (32). *Y. pseudotuberculosis*-Stämme, deren YopH Gen deletiert wurde, besitzen im Gegensatz zu Wildtyp-Stämmen, eine deutlich abgeschwächte Phagozytoseresistenz (24, 69). Es konnte gezeigt werden, dass YopH die Proteine $p130^{Cas}$ (*Crk associated tyrosine kinase substrate*), FAK (*focal adhesion kinase*), Paxillin und FYB (*Fyn-binding protein*) dephosphoryliert (9, 36). Diese Proteine sind in den sogenannten *focal adhesions* (FAs) organisiert, einem submembranösen Zusammenschluß von Proteinen, die an der Signaltransduktion des Integrin-Rezeptor-Signals beteiligt sind (16). Die durch YopH vermittelte Dephosphorylierung der genannten Proteine bewirkt eine Dissoziation der FAs und führt zu einer Inhibition der Integrin-vermittelten Phagozytose (36). Kürzlich wurde berichtet, dass YopH durch Hemmung der Phosphorylierung von Antigenrezeptor-Signalkomplexen, die Funktionen von B- und T-Lymphozyten unterdrückt (81).

YopP (*Y. enterocolitica*) und das homologe Effektor-Protein YopJ (*Y. pseudotuberculosis)* supprimieren die Freisetzung der Zytokine IL-8 und TNFα und induzieren in Makrophagen Apoptose (70). Es konnte gezeigt werden, dass diese Effekte auf direkte Inhibition von Mitgliedern der MAPK-Kinasen Superfamilie (mitogen-activated protein kinase kinase, MKKs) beruhen (62). Dadurch kommt es zu einer Inaktivierung pro-inflammatorischer (extracellular signal-regulated kinase-1/2, ERK-1/2; c-Jun N-terminal kinase, JNK; p38) und anti-apoptotischer (nuclear factor kappa B, NF-κB) Signaltransduktionskaskaden, sowie zu einer wahrscheinlich indirekten Aktivierung pro-apoptotischer Kaspasen (11, 39, 71). Es finden sich zu YopJ bzw. YopP homologe Proteine auch in tier- und pflanzenpathogenen Bakterien, sowie in Pflanzensymbionten. Kürzlich wurde gezeigt, dass diese YopJ-Familienmitglieder als Cystein-Proteasen wirken und die posttranslationalen

kovalenten Bindungen zwischen „Ubiquitin-like proteins“ und verschiedenen Regulatorproteinen spalten. Diese Spaltungen führen zu einer Hemmung der oben beschriebenen MKKs-Signaltransduktionswege (63).

YopT ist das zuletzt entdeckte Yop Effektor-Protein. HeLa-Zellen, die mit der *Y. enterocolitica*-Mutante (ΔYop H, O, M, E und P) infiziert wurden, wiesen eine Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts auf. Dieser Effekt konnte durch zusätzliche Mutation von YopT aufgehoben werden (48). Es wurde gezeigt, dass YopT ebenfalls an der kleinen GTPase RhoA angreift, jedoch konnte bislang, im Unterschied zu YopE, keine GAP-Aktivität nachgewiesen werden. Es gibt vielmehr Hinweise, dass YopT durch direkte oder indirekte Modifikation zur einer Inaktivierung von RhoA führt (82).

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit sollten die bislang unbekannten intrazellulären Wirtszell-Bindungspartner für die *Yersinia*- Effektorproteine YopM und YopO bzw. YpkA gefunden werden. Als Methode wurde das Yeast Two-Hybrid System gewählt. Diese erstmals 1989 beschriebene Methode (26) hat eine breite Anwendung als Suchtest für Proteininteraktionspartner gefunden.

In einem zweiten Schritt sollten die Two-Hybrid System-Ergebnisse proteinchemisch überprüft werden. Dazu sollten humane Zellinien mit *Yersinia*-Stämmen infiziert werden, und das gewonnene Zellysat mit Anti-Effektorprotein-Antikörpern immunopräzipitiert werden. Ein eventuell vorhandener Bindungspartner des Effektorproteins sollte koimmunopräzipitiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	**Firma**, *Typ*
Blotsystem	Hoefer, *Mighty Small*
Brutschränke	Heraeus, *BBD 6220*
Deckglässer	Assistent
DNA-Elektophoresekammern	Biometra, *Agagel*
Elektroporationsgerät	BioRad, *Gen Pulser II*
Elektroporationsküvetten	Invitrogen
Entwicklungsgerät	Fuji, *FPM-100A*
Exponierkassette	Rego
Floureszensmikroskop	Leitz, *DMRBE*
	Leica, *DMRD*
Geldokumentationssystem	Herolab, *E.A.S.Y.*
Glasmaterialien	Schott
Heizblock	Liebisch
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, *Axiovert 25*
Mini-Protein-Gel System	Pharmacia Biotech, *Mighty Small*
Objektträger	Langenbrink
pH–Meter	Mettler Toledo, *InLab 414*
Photometer	Pharmacia Biotech, *Ultrospec 3000*
Plastikwaren	Falcon
Röntgenfilm	Fuji, *Super RX*
Schüttelinkubator	B. Braun Biotech, *Certomat BS-1*
Spannungsquelle	BioRad, *Power Pac 200*
Sterilwerkbank	Sonnenbühl, *BDK*
Thermocycler	Perkin Elmer, *Gene Amp PCR System 2400*
Ultrazentrifuge	Beckmann, *Optima TL Ultracentrifuge*

Vakuum-Trockner	Kartell
Vortex–Gerät	Scientific Industries, *Vortex-2 Genie*
Waagen	Kern, *510*
	Sartorius, *Feinwaage*
Wasserbad	GFL
Zentrifugen	Eppendorf, *5417R*
	Sigma, *3K18*
	Heraeus, *Varifuge 3.0R*

2.1.2 Chemikalien

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien von der Firma E. Merck (Darmstadt) und Medien von der Firma Difco (Detroit, USA) bezogen.

Chemikalie	**Firma**
5-Brom-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal)	Biosolve
Aminosäuregemisch CSM –His, –Leu, –Trp, –Ura	Bio 101
Agarose	Roth
APS	Biomol
Bradford Assay	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
Carrier-DNA	Origen
Coomassie	Biomol
DE81-Zellulose	Whaterman
DMSO	Sigma
DTT	Diagmal
EDTA	Biomol
EGTA	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll 400	Sigma
Filterpapier	Whatman

Formalin	Sigma
Glasperlen	B. Braun Biotech
Leupeptin	Sigma
Magermilchpulver	Glücksklee
Moviol	Calbiochem
Nitrozellulose-Membran	Protran
N-N-Dimethyl-Formamid	Sigma
PEG-3350	Sigma
Pepstatin	Sigma
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Gibco BRL
PMSF	Serva
Polyacrylamid	Boehringer Mannheim
Ponceau S	Sigma
Protein G-Agarose-Beads	Boehringer Mannheim
SDS	Biomol
TEMED	Sigma
Tris-Acetat	ICN-Biomedicals (Ohio)
Tween 20	Sigma

Antibiotika	**Firma**	Konzentration im Medium
Ampicillin	Biomol	100 µg/ml
Chloramphenicol	Sigma	20 µg/ml
Kanamycin	Sigma	50 µg/ml
Spektinomycin	Sigma	100 µg/ml

Enzyme	**Firma**
Lysozym	Sigma
Restriktionsenzyme	Boehringer Mannheim

RNAse	QIAGEN
T4-DNA-Ligase	Gibco BRL
Taq-Polymerase	Perkin Elmer

Puffer	**Firma**
Restriktionspuffer	Boehringer Mannheim
Ligationspuffer	Gibco BRL
PCR-Puffer	Perkin Elmer
Sequenziermix	Perkin Elmer

2.1.3 Kitsysteme

Kitsystem	**Firma**
DupLEX-A Yeast Two-Hybrid System	OriGene Technologies
ECL-Detection-Kit	Amersham
PCR-Purification-Kit	QIAGEN
Plasmid–Maxi-Kit	QIAGEN
Plasmid– Mini-Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN

2.1.4 Antikörper

Antikörper	**Firma**	Referenz
Anti–HA–Antikörper	Bebco	--

Anti–Rac1–Antikörper	Transduction Laboratories	52
Anti–RhoA–Antikörper	Santa Cruz Biotechnology	6
Anti–Ypk–Antikörper	polyklonaler Kaninchen-AK, Max von Pettenkofer Institut	8
Anti-rabbit-IgG-TRITC-Conj.	Sigma	--
Anti-rabbit-IgG-FITC-Conj.	Sigma	--
Anti–Cdc42–Antikörper	Transduction Laboratories	60

2.1.5 Nährmedien

Bakterien

LB (Luria Bertani)-Medium

10 g/l Bacto Tryptophan

5 g/l Bacto Yeast Extract

10 g/l NaCl, pH 7,5

für Platten: Zugabe von 15 g/l Bacto-Agar

Minimalmedium (– Tryptophan)

10,5 g/l K_2HPO_4

4,5 g/l KH_2PO_4

1 g/l Ammoniumsulfat

0,5 g/l NaCitrat

15 g/l Bacto-Agar

0,2% Glukose

0,02% $MgSO_4$

je 0,04 mg/l Urazil, Histidin und Leuzin

0,05 mg/l Kanamycin

0,0005% Thiamin Hydrochlorid

Hefen

YPD (Vollmedium)

20 g/l Pepton

10 g/l Hefeextrakt

20 g/l Glukose

für Platten: Zugabe von 0,1 g/l NaOH und 20 g/l Bacto-Agar

YNB (–Ura, –His, –Leu, –Trp) Selektivmedium

1,7 g/l Hefestickstoff ohne Aminosäuren

5 g/l Ammoniumsulfat

0,6 g/l –Ura, –His, –Leu, –Trp Aminosäuregemisch

20 g/l Glukose für Glukosemedium bzw. 20 g/l Galaktose + 10 g/l Raffinose für Galaktosemedium

für Platten: Zugabe von 20 g/l Bacto-Agar

Je nach Bedarf wurde(n) die gewünschte(n) Aminosäure(n) zugesetzt, so dass sich eine Endkonzentration von:

0,04 mg/ml Tryptophan

0,02 mg/ml Urazil

0,06 mg/ml Leuzin

0,02 mg/ml Histidin

im Medium ergibt.

X-Gal Selektivmedium

Es wurde das gewünschte YNB-Selektivmedium nach obigen Protokoll erstellt, autoklaviert, auf 65°C abgekühlt und fogende Substanzen zugesetzt

6,4 g/l Na_2HPO_4

2,7 g/l NaH_2PO_4

80 mg/l X-Gal in N,N-Dimethylformamid

Alle Medien wurden für 20 Minuten autoklaviert. Agar-Medium wurden nach dem Autoklavieren auf 50°C abgekühlt und dann in entsprechende Platten gegossen.

2.1.6 Plasmide

Plasmide	Marker	Bemerkung
pEG202	HIS3, amp^R, ADH Prom, ADH Term	Köderplasmid (siehe Abb. 2-1)
pJG4–5	TRP1, amp^R, Gal1 Prom, ADH Term	Genbankplasmid (siehe Abb. 2-2)
pSH18–34	URA3, amp^R, 8LexAop-lacZ	Reporterplasmid (hoher Sensitivität)
pJK103	URA3, amp^R , 2LexAop-lacZ	Reporterplasmid (mittlerer Sensitivität)
pRB1840	URA3, amp^R, 1LexAop-lacZ	Reporterplasmid (geringer Sensitivität)
pJK101	URA3, amp^R, GAL1-2LexAop-lacZ	Reporterplasmid für Repressionsassay
pRFHM1	HIS3, amp^R, ADH Prom-LexA–Bicoid	Kontrollplasmid; ADH-Promotor exprimiert ein Fusionsprotein, welches die Reporter nicht induziert
pSH17 - 4	HIS3, amp^R, ADH Prom-LexA–Gal4p	Kontrollplasmid; ADH-Promotor exprimiert eine Aktivierungsdomäne, welche die Reporter induziert
PBait	HIS3, amp^R, ADH Prom-LexA–Bait	Kontrollplasmid, ADH-Promotor exprimiert LexA-Bait, welches mit Target-B42 interagiert
PMax	HIS3, amp^R ADH Prom-LexA–Max	Kontrollplasmid, kodiert das LexA-Max; Verwendet als Negativkontrolle
pTarget	TRP1, amp^R, Gal1 Prom-Target-B42, ADH Term	Kontrollplasmid, Gal1-Promotor exprimiert galaktoseabhängig Target-B42

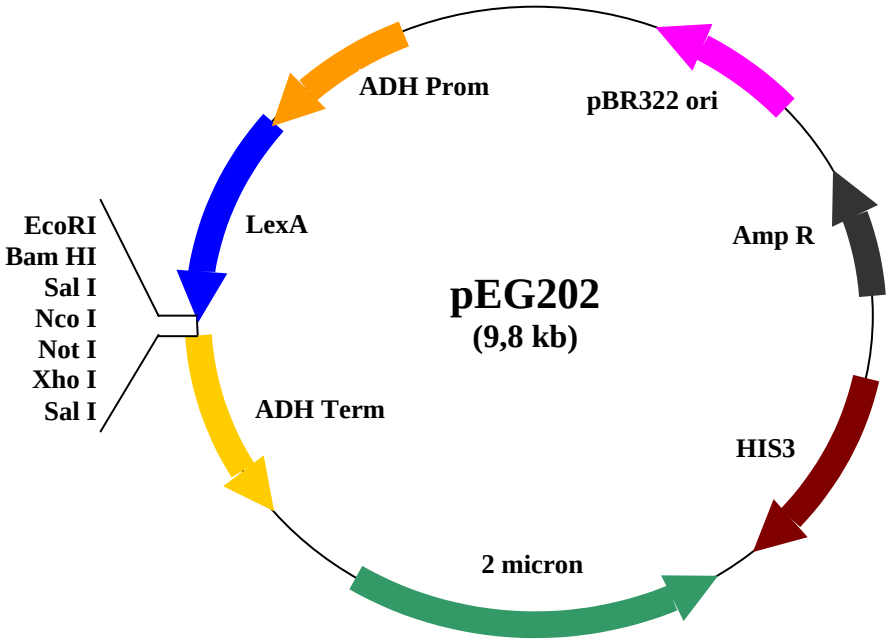

Abbildung 2-1 Plasmidkarte des Ködervektors pEG202
HIS3: Histidin-Hefeselektionsmarker; **ADH Promotor** gewährleistet konstitutive Expression des **LexA**-Köder Fusionsproteins in Hefen; **Polylinkersequenz** für die Klonierung des Ködergens im Leseraster

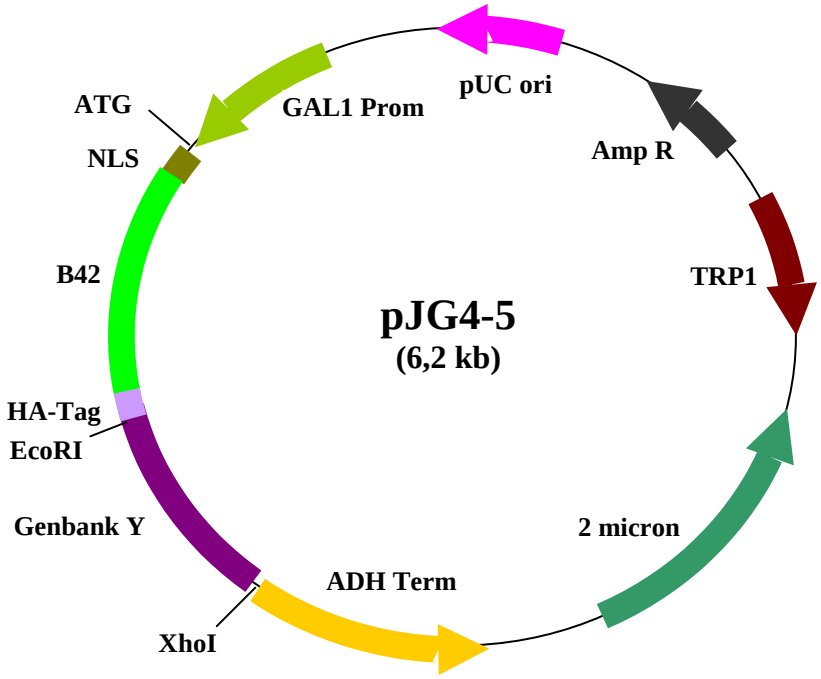

Abbildung 2-2 Plasmidkarte des Ziel-Vektors
TRP1: Tryptophan Hefe-Selektionsmarker; **NLS**: Nuclear Localisation Site gewährleistet Kerngängigkeit; **GAL1 Promotor** für galaktoseinduzierbare Expression des **B42-Y** Fusionsproteins in Hefen; **HA-Tag**: Hämagglutinin-Antigen

Amp R:	Ampicillinresistenzgen zur Ampicillinselektion in *E.coli*
ADH Term:	Alkohol-Dehydrogenase-Terminatorsequenz mit Stop-Codons in allen drei Leserastern
2 micron:	Replikations-Ursprung für hohe Kopienzahl in Hefen
pBR322:	Replikations-Ursprung für hohe Kopienzahl in *E. coli*

2.1.7 Stämme

Yersiniae

Stamm	Eigenschaft	Referenz
WA-314	*Y. enterocolitica* Wildtyp, Serogruppe O:8, klinisches Isolat, enthält Virulenzplasmid pYVO8	42
YPIII (pIB102)	Y. pseudotuberculosis, Wildtyp	30
YPIII (pIB44)	*Y. pseudotuberculosis* Kinase Mutante, in frame Deletion der Aminosäuren 207 bis 388 von YpkA	28
YPIII (pIB44, pCJYE 138-YpkA)	YPIII (pIB44) komplementiert mit pCJYE138-ypkA	8
WA-C (pTRANS)	*Y. enterocolitica*, Serotyp O:8, enthält Typ III Sekretions/Transloktionsapparat und YadA, jedoch keine Effektor-Yops	8
WA-C (pTRANS, pCJYE138-YpkA)	WA-C (pTRANS) komplementiert mit pCJYE138-YpkA, YopE138-YpkA überexprimierender Stamm	8

Escherichia coli

Stamm	Eigenschaft	Referenz
DH 5α	*end*A1 *hsd*R17 (r_K-m_K+) *sup*E44 THI-1 *rec*A1 *gyr*A (NalR) *rel*A1 Δ(*lac*ZYA-argF) U169(ϕ80*lac*ZdM15)	37
KC 8	*hsd*R, *pyr*F::Tn5, *leu*B600, *trp*C9830, *his*B463, *lac*DX74, *str*A, *gal*U,K(3)	37, 46

Saccharomyces cerevisiae

Stamm	Eigenschaften	Bemerkung
EGY48	MATα trp1, his3, ura3, leu2:6LexAop-LEU2	hohe Sensitivität[1]
EGY194	MATα trp1, his3, ura3, leu2:4LexAop-LEU2	mittlere Sensitivität[1]
EGY188	MATα trp1, his3, ura3, leu2:2LexAop-LEU2	geringe Sensitivität[1]
EGY40	MATα trp1, his3, ura3, leu2:0LexAop-LEU2	Negativkontrolle
RFY206	MATα trp1Δ::hisG his3Δ200 ura3-52 lys2 Δ201 leu2-3	Akzeptor-Stamm

[1] bzgl. Reporteraktivität

2.1.8 Synthetische Oligonukleotide

Für die PCR und zur Sequenzierung wurden folgende synthetische Oligonukleotide (Firma Roth, Karlsruhe) eingesetzt.

Name	Sequenz	Tm(C)[1]
3´tf	5´ – GCC GAC AAC CTT GAT TG – 3`	47
42EU	5´ – ATA TAG AAT TCA TGC AGA CAA TTA AGT GTG – 3`	47
42XD	5´ – ATA TAC TCG AGT CAT AGC AGC ACA CAC C – 3`	47
5´bf	5´ – CGT CAG CAG AGC TTC ACC – 3`	51
5´tf	5´ – CTG AGT GGA GAT GCC TCC – 3`	51
KEU	5´ – ATA TAG AAT TCA TGA AAA TCA TGG GAA CTA TGT C – 3`	57
KSD	5´ – ATA TAG TCG ACT CAC ATC CAT TCC CGC TCC A – 3`	57
MDS 1	5´ – ATA TAG TCG ACC TAC TCA AAT ACA TCA TCT TCA AGT– 3`	61
MDS 2	5´ – ATA TAG TCG ACA TAA ATC GCA GTC AAG AAG GGC – 3`	59
MUE 1	5´ – ATA TAG AAT TCA TGT TTA TAA ACC CAA GAA ATG TAT C – 3`	61
PKNU2	5´ – ATA TAC CAT GGA TGA AAA GCG TGA AAA TCA TGG G – 3`	55
PKXD2	5´ –ATA TAC TCG AGT CAC ATC CAT TCC CGC TCC A – 3`	57

Rac 1	5´ – CGC CCC CTA TCC TAT CCG C – 3`	59
Rac 2	5´ – CAC AGC GAG GCC TCA AGA C– 3`	57
REU	5´ – ATA TAG AAT TCA TGC AGG CCA TCA AGT GTG TG – 3`	59
RhEU	5´ – ATA TAG AAT TCA TGG CTG CCA TCC GGA AGA AAC – 3`	63
RhXD	5´ – ATA TAC TCG AGT CAC AAG ACA AGG CAA CCA G – 3`	55
RXD	5´ – ATA TAC TCG AGT TAC AAC AGC AGG CAT TTT CTC – 3`	57
SK1	5´ – CAT TAC CTC AGA ACC AGC GCA C – 3`	63
SK2	5´ – GTA TAG GCT GTC TCG ACT CCA G – 3`	63
SK3	5´ – CTG GGC TGC ATG GAG TGT GTC – 3`	63
SK4	5´ – ACC GCA ATT CAC CGA CAG ATG – 3`	59
SK5	5´ – CAA AGG CAG AGA AGG GGA TAC – 3`	59
SK6	5´ – GTA GGT TTC AGA GGA CAC GG – 3`	57
SM1	5´ – CCT GAT TTA CCT CCT TCA CTG – 3`	57
SM2	5´ – ATC GCA GTC AAG AAG GGC AAG – 3`	59
SM3	5´ – GAG AGT TTA GTG GCG TCA TG – 3`	55
SM4	5´ – CTC AAT GCA TCC AGC AAT A – 3`	49

[1]Diese Temperatur gibt eine annähernd optimale Bindungstemperatur an, errechnet nach der Formel: Tm = (Anzahl der bindenden Guanin- und Cytosin-Basen × 4 + Anzahl der bindenden Adenin- und Thymin-Basen × 2) – 5 (4, 58).

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Anzuchtbedingungen von Bakterien und Hefen

Ein Erlenmeyer-Kolben wird mit LB- oder Hefemedium so gefüllt, dass das Verhältnis Oberfläche zu Volumen möglichst groß ist, um eine optimale Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen sicherzustellen. Das Medium wird mit einer Kolonie oder Vorkultur des gewünschten Stammes angeimpft und unter Schütteln bei 37°C (*E. coli*), 27°C (*Yersinien*) oder 30°C (*Saccharomyces cerevisiae*) über Nacht inkubiert.

2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Bakterien- und Hefekulturen

Die optische Dichte einer Bakterien bzw. Hefekultur wird mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600nm bestimmt. In der exponentiellen Phase hat eine Bakterienkultur eine optische Dichte im Bereich von 0,3 bis 0,7 (entspricht etwa $1 – 2,5 \times 10^8$ Bakterien / ml). Die optische Dichte von 1 (OD_{600} = 1) einer Hefekultur entspricht einer Zellzahl von etwa 2×10^7 Hefezellen / ml.

2.2.1.3 Ausplattieren von Bakterien und Hefen

Von einer geeigneten Verdünnung einer Bakterienkultur werden 100-200 µl auf eine Agarplatte mit Nährmedium gegeben und mit einem abgeflammten Glasspatel gleichmäßig verteilt. Nach dem Antrocknen werden die Platten bei 37°C (*E. coli*), 27°C (*Yersinia*) bzw. 30°C (*Saccharomyces cerevisiae*) im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden (*E. coli/ Yersinia*) bzw. nach 2-3 Tagen (*Saccharomyces cerevisiae*) sind Einzelkolonien zu erkennen.

2.2.1.4 Lagerung von Bakterien und Hefen

Durch Parafilm abgedichtete Agarplatten mit Bakterienkolonien können bei 4°C ca. 4 Wochen gelagert werden. Bei –70°C überleben Bakterien in Nährmedium, dem 15% Glycerin zugesetzt wurde, nahezu unbegrenzt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmid-Isolierung wurde im wesentlichen nach dem Protokoll von Holmes und Quigley (44) durchgeführt. 5 ml einer Übernachtkultur des plasmidtragenden Stammes wurden kurz abzentrifugiert und in 300 µl STET-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von 0,1 mg Lysozym und 30-sekündiger Einwirkzeit bei RT, wurde die Suspension für 90 sek bei 95°C gekocht und 5 min auf Eis gekühlt. Daraufhin wurde die Lösung zentrifugiert (20000 g, 10 min, 4°C), wodurch ein Niederschlag aus sich anhaftenden Proteinen,

Zellwandbestandteilen und chromosomaler DNA entsteht. Der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, und die darin enthaltene DNA mit 200 µl 100%igen Isopropanol gefällt (20000 g, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde mit 200 µl eiskalten 70%igen Ethanol gewaschen (20000 g, 10 min, 4°C), kurz luftgetrocknet und in 30 µl ddH_2O, dem 20 µg/ml RNAse zugesetzt wurde, aufgelöst. Die DNA-Lösungen wurden bei –20°C aufbewahrt.

STET-Puffer: 8 % Sucrose, 0,5 % Triton-X 100, 50 mM Tris pH 8,0, 50 mM EDTA

Die Isolierung reiner Plasmid-DNA in 100 µg-Maßstab erfolgte mit Hilfe von Kitsystemen der Firma Qiagen entsprechend der Anleitung. Es wurden hierfür 10 ml, 250 ml oder 500 ml Bakterienkultur verwendet. Das wesentliche Prinzip dieser Methode besteht in einem Aufschluß der Bakterien durch alkalische Lyse, gefolgt von einer Ausfällung der SDS-solubilisierten Proteine und Bindung der DNA an eine Anionenaustauscher-Säule. Nach zwei Waschschritten wurde die Nukleinsäure von der Säule eluiert und durch Zugabe von Isopropanol gefällt.

2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Zwei ml Selektivmedium wurden mit einer Hefekolonie beimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. 1,5 ml wurden kurz zentrifugiert (20000 g, 5 sec, RT) und die pelletierten Zellen in 0,2 ml Lysispuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,3 g Glasperlen, wurde die Probe für 2 min stark gevortext. Der wäßrige Überstand wurde nach dem Zentrifugieren (20000 g, 5 min, RT) in ein sauberes Eppendorfröhrchen überführt und mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc, pH 5,2 und 2,5 Volumen 95 % Ethanol gefällt (20000 g, 20 min, RT). Nach einem Waschschritt mit 70 % Ethanol wurde die Plasmid-DNA Vakuum-getrocknet und in 5 µl sterilem destillierten Wasser aufgenommen.

Lysispuffer: 2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA

2.2.2.3 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration kann mittels Spektralphotometer durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm erfolgen. Es gilt das Verhältnis:

A_{260nm} : 1 = 50 µg DNA / ml

Diese Gleichung gilt für doppelsträngige DNA-Präparationen, die nicht durch Proteine oder RNA verunreinigt sind. Verunreinigungen durch Proteine können durch die zusätzliche Absorptionsmessung bei 280 nm identifiziert werden. Der Quotient A_{260nm} / A_{280nm} verringert sich mit zunehmender Verunreinigung und beträgt bei sehr reiner DNA ca. 1,8.

2.2.2.4 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen spalten können. Die hier verwendeten Enzyme spalten doppelsträngige DNA an einer sechs Basenpaare umfassenden spiegelsymmetrischen Erkennungssequenz. Die Restriktionsverdaue werden in einem für die jeweiligen Enzyme spezifischen Puffer bei 37°C durchgeführt. Ein Verdauungsansatz enthält pro 1 µg DNA ca. 3 U Enzym. Die Inkubationsphase dauert 1-3 Stunden. Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen eines 10 × Ladepuffers gestoppt und auf ein DNA-Agarosegel geladen.

Ladepuffer: 0,25 % Bromphenolblau, 25 % Ficoll 400

2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur Analyse und Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die DNA in Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurde eine 1 % Agarose-Lösung in TAE-Puffer hergestellt, aufgekocht und nach Abkühlung auf 50°C in das Bett einer horizontalen Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen geladen und bei einer Spannung von 80 V (Feldstärke: 5 V/cm) aufgetrennt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer. Nach Beendigung der Elektophorese wurden die DNA-Fragmente, durch Färbung des Gels

für 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml) und anschließender UV-Beleuchtung, sichtbar gemacht und gegebenenfalls zur Isolation ausgeschnitten.

TAE-Puffer 1×: 0,04 M Tris-Acetat, 1 mM EDTA

2.2.2.6 Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Die Elution dient dazu, einzelne DNA-Fragmente, die sich im Gel als eine solitäre Bande darstellen, zu reinigen, um diese dann gegebenenfalls in ein Plasmid zu ligieren. Die Elution erfolgte entsprechend der Gebrauchsanleitung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen.

2.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten (58)

DNA-Fragmente, die durch PCR oder Restriktionsverdau entstanden sind, lassen sich in spezielle Plasmide, sogenannte Vektoren, einbauen (=Ligation). Die ligierten Vektoren können dann in Bakterien transferiert und mit diesen vermehrt werden (=Klonierung).
Ein entscheidender Parameter bei der Ligation ist das Verhältnis von eingesetztem Vektor zu einzubauender DNA (Insert-DNA). Das Insert sollte im Überschuß vorhanden sein, um eine hohe Religationsrate des Vektors zu verhindern. Allerdings beeinträchtigt eine zu hohe Insertkonzentration ebenfalls durch Polymerenbildung die Effektivität der Ligation. In dieser Arbeit wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von etwa 1 : 5 verwendet. Für einen Ligationsansatz wurden etwa 50 – 200 ng linearisierter Vektor mit der entsprechenden Menge Insert eingesetzt. Weiterhin wurden Puffer und Ligase hinzugegeben. Die Reaktion fand bei 14°C für 12 – 24 h statt. Zur Kontrolle der Religation des Vektors wurde das Insert in einem sonst identischen Ansatz weggelassen.

Ligationsansatz: Vektor-DNA (50 – 200 ng)
Insert-DNA (etwa 5 × mehr Insert als Vektor-Moleküle)
1 µl 10 × Ligationspuffer
1 U T4-DNA-Ligase
auf 10 µl mit ddH_2O auffüllen

2.2.2.8 Herstellung elektrokompetenter Zellen und Transformation

Die Elektroporation stellt eine weitverbreitete Methode dar, geschlossene zirkuläre DNA (Plasmide) in Empfängerbakterien zu transferieren. Das Prinzip beruht darauf, dass die DNA in einer Bakteriensuspension hoher Zelldichte kurzzeitig einem starken elektrischen Feld ausgesetzt wird. Wahrscheinlich entstehen dabei Poren in der Bakterienzellwand, durch die Plasmid-DNA in das Zellinnere diffundieren kann. Das Plasmid enthält ein Gen für eine Antibiotikaresistenz, die das Bakterium vorher nicht besaß. Auf einem entsprechend antibiotikahaltigen Nährboden aufgebracht, vermehren sich nur diejenigen Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben und damit gegen das Antibiotikum resistent geworden sind. Es wurden 500ml LB-Medium mit 5ml einer Übernachtkultur des gewünschten Bakterienstammes (DH5α, KC8) angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 inkubiert. Die Bakterien wurden einmal in eiskaltem sterilem Wasser und zweimal in 10 % igem eiskalten Glycerol gewaschen (2500 g, 10 min, 4°C), bevor sie in 400 µl 10 %igem Glycerol aufgenommen und in 40 µl Aliquots bei – 70°C gelagert wurden.
Für die Transformation wurden 1 µl des Ligationsansatzes bzw. 1 µg Plasmid-DNA mit 40 µl langsam aufgetauter kompetenter Bakterien vermischt und entsprechend der Betriebsanleitung des Elektroporationsgerät bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ohm elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium für 1 h bei 37°C inkubiert und auf entsprechende Antibiotika enthaltende LB-Agarplatten ausgestrichen.

SOC-Medium: 20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe Extrakt, 0,6 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glukose

2.2.2.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR) (59)

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte erfolgte aus etwa 0,1 µg isolierter Matrizen-DNA unter Anwesenheit von Primern, Nukleotiden und Taq-Polymerase in einem 50 µl Reaktionsansatz.

PCR-Ansatz: 0,1 µg Matrizen-DNA
5 µl 10 × PCR-Puffer
je 300 – 500 pmol 5`- und 3`-Primer
je 0,2 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP
2 U Taq-Polymerase
auf 50 µl mit dd H_2O auffüllen

Die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde durch 30 Zyklen der folgenden 3 Inkubationsschritte in einem Thermocycler-Gerät durchgeführt:

- Denaturierung der DNA bei 94°C für 30 sec.
- Bindung der Primer bei den entsprechenden Schmelztemperaturen für 1 min.
- DNA-Polymerisation bei 72°C für 1-2 min (Dauer abhängig von der Länge des entstehenden DNA-Fragmentes).

Dem 1. Zyklus ging ein einmaliger Denaturierungsschritt für 4 min bei 94°C voraus. Dem letzten Zyklus folgte ein terminaler Komplimentationsschritt für 10 min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden anschließend direkt elektrophoretisch analysiert oder mit Hilfe des *QIAGEN PCR Purification Kit* aufgereinigt.

2.2.2.10 DNA-Sequenzierung (74)

Die DNA-Sequenzanalyse wurde nach der Didesoxyterminationsmethode nach Sanger durchgeführt. 1 µg DNA, 5 pmol Primer und 8 µl Sequenziermix wurden auf ein Volumen von 20 µl gebracht. Der Sequenziermix wurde von der Firma Perkin Elmer bezogen und enthält desoxy-Nukleotid-tri-phosphate, Taq-Polymerase, hitzestabile Pyrophosphatase, $MgCl_2$, Tris-HCl pH 9,0 und floureszenzmarkierte-didesoxy-Abbruchnukleotide. In einem Thermocycler-Gerät wurden durch 25 Erhitzungszyklen nach folgendem Schema Abbruchnukleotid-Stränge erzeugt:

- 10 sec Denaturierung bei 96°C
- 5 sec Primerbindung bei der optimalen Bindungstemperatur des Primers
- 4 min Elongation bei 60°C

Die erzeugte DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt. Dazu wurde 50 µl 100 %iges Ethanol und 2 µl 3 M Natrium–Acetat der Sequenzierreaktion hinzugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20000 g, 30 min, 14°C) wurde das Pellet in 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen (20000 g, 10 min, 14°C) und luftgetrocknet. Im hausinternen Servicelabor wurden die DNA-Abbruch-Stänge elektrophoretisch aufgetrennt und das Floureszenzmuster erfasst. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem Computerprogramm DNAsis (Pharmacia-LKB) ausgewertet.

2.2.3 Das Yeast Two-Hybrid System

Das Yeast Two-Hybrid System ist ein relativ neues molekularbiologisches Verfahren, einen möglichen Interaktionspartner für ein beliebiges Protein zu finden (26). Es macht sich die Tatsache zunutze, dass Transkriptionsfaktoren aus zwei Untereinheiten bestehen: Zum einen aus der DNA-Bindungsdomäne, die es dem Transkriptionsfaktor ermöglicht, stromaufwärts der Promotorregion eines bestimmten Reportergenes spezifisch an die DNA zu binden, zum anderen aus der Aktivierungsdomäne, die mit der RNA-Polymerase interagiert, einen Komplex bildet und auf diese Weise die Transkription stimuliert. Beide Untereinheiten sind für die Aktivierung der Transkription notwendig und normalerweise auf einem Protein lokalisiert. Es wurde jedoch *in vivo* nachgewiesen, dass die Aktivierung auch dann möglich ist, wenn die Domänen auf zwei unterschiedlichen Proteinen lokalisiert sind (45, 50). In der hier verwendeten Two-Hybrid-Version setzt man zum einen Expressionsvektoren ein, in denen die DNA-bindende Domäne LexA mit dem zu untersuchenden Protein X fusioniert wird (Ködervektor). LexA wirkt als Transkriptionsrepressorprotein in *E.coli* und anderen Spezies (55) und bindet an spezifische DNA–Sequenzen (sog. LexA–Bindungsstellen), die stromaufwärts der Reportergene liegen. Dabei wird die Transkription der Reportergene nicht aktiviert (siehe Abb. 2-3).

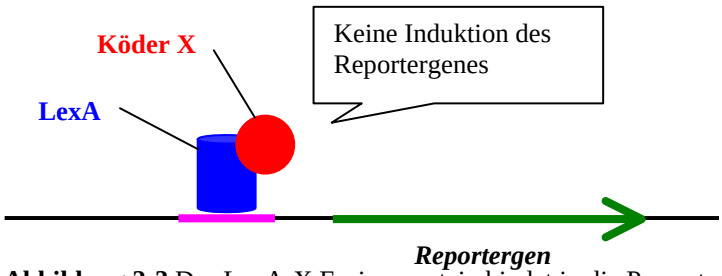

Abbildung 2-3 Das LexA-X Fusionsprotein bindet in die Promotorregion des Reporters und aktiviert die Transkription von sich aus nicht. **Rosa:** LexA-Bindungsstelle; **dunkelgrün:** Reportergen

Zum anderen wird ein Expressionsvektor verwendet, welcher die transkriptionsaktivierende Domäne B42, die ihrerseits mit einer Genbank (Y) fusioniert ist, exprimiert (Zielvektor). Das B42–Y Fusionsprotein ist von sich aus nicht in der Lage, die Transkription der Reporter zu aktivieren. Erst eine Interaktion zwischen X und Y fixiert die unspezifische Aktivierungsdomäne B42 an den Promotorbereich der Reportergene, was deren Transkription ermöglicht. Dadurch können aus der Vielzahl der transformierten Hefezellen genau jene herausselektioniert werden, bei denen das Köderprotein X mit einem Genbankprotein Y interagiert (siehe Abb. 2-4).

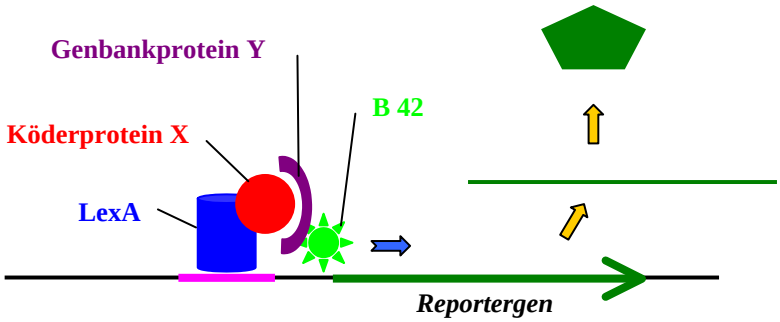

Abbildung 2-4 Erst die Interaktion zwischen dem Köder X und dem Genbankprotein Y ermöglicht die Transkription des Reporters. **Rosa:** LexA-Bindungsstelle; **dunkelgrün:** Reporter

Das hier verwendete Two-Hybrid System arbeitet mit zwei Reporterenzymen: Die β-Galaktosidase, die durch das *LacZ*–Gen kodiert wird, spaltet X-Gal (5Br 4Cl 3Indolyl β- 3 Galaktopyranose) in Gegenwart von Luftsauerstoff in einen blauen Farbstoff. Das *LacZ*–Gen befindet sich auf dem Reporterplasmid. Der zweite Reporter, die β-Isopropylmalat-Dehydrogenase wird von dem *Leu2*–Gen kodiert und ist in das Chromosom der Hefe integriert. Sie ist für die Synthese von α-Ketoisocaproat, einer unmittelbaren Leuzin-

Vorstufe, notwendig. Beide Reporter stehen unter der Kontrolle eines sogenannten minimalen GAL1-Promotors. Dadurch können die Reportergene nicht durch hefeeigene Transkriptionsfaktoren induziert werden. Die eingesetzten Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*) sind für die Aminosäuren Tryptophan, Urazil, Histidin und Leuzin auxotroph. Diese Defizite können durch Expressionsvektoren bzw. den *Leu2*–Reporter, die essentielle Gene für die Synthese dieser Aminosäuren enthalten, komplementiert werden.

So kann die Transformation der Expressionsvektoren in Hefezellen, bzw. eine Interaktion zwischen Köder- und Genbankprotein, durch das Wachstum auf Medium, welchem die entsprechende Aminosäure fehlt, überprüft werden. Die Genbankplasmide werden in Hefestämme transformiert, die Köder- und Reportervektoren enthalten (Abb. 2-5).

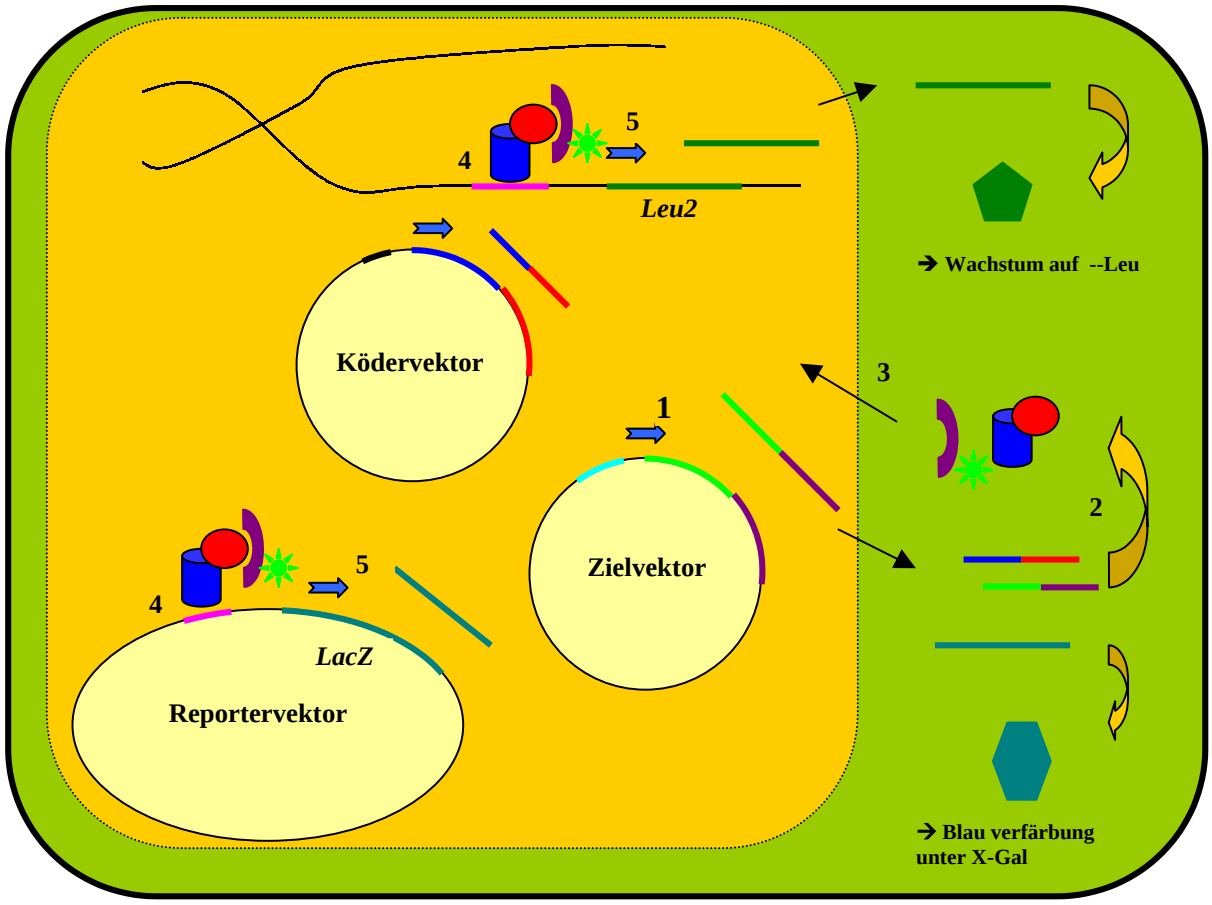

Abbildung 2-5 Stark vereinfachtes Schema einer interagierenden Hefezelle. **hellblau:** GAL1-Promotor; **rosa:** LexA-Bindungsstellen; ***LacZ*:** *LacZ*-Reportergen; ***Leu2*:** *Leu2*-Reportergen; Symbole siehe Abb. 2-4. Erklärung siehe Text.

In Galaktose-haltigem Medium wird neben dem LexA-X Fusionsprotein auch die B42-Y Genbankfusion exprimiert. Die jeweiligen mRNA-Stränge werden im Zellkern der

Hefezelle transkribiert (*1*) und im Zytoplasma translatiert (*2*). Die Fusionsproteine treten in den Zellkern ein (*3*), und die LexA-X Fusion bindet an stromaufwärts der Reportergene gelegene LexA-Bindungsstellen (*4*). Kommt es nun zu einer Interaktion zwischen Köder- und Zielprotein, so werden die Reportergene induziert (*5*) und ermöglichen diesem Hefestamm ein Wachstum auf Leuzin-freiem Medium und eine Blauverfärbung in einem X-Gal-Versuch.

2.2.3.1 Tests auf Autoaktivierung der Reporter

Vor einer Genbank–Transformation sollte man sicherstellen, dass das LexA–X Fusionsprotein allein die Transkription der beiden Reportergene nicht auszulösen vermag. So gibt es Köder, die aufgrund intrinsischer Aktivität die Transkription der Reporter aktivieren, und somit die Selektionsmarker außer Kraft setzen. Eine Genbank–Transformation wäre in diesem Fall sinnlos. Zur Prüfung der Aktivierung des *LacZ*–Reporters führt man einen Filterassay auf β-Galaktosidaseaktivität mit einem Hefeklon durch, der Reporter- und Ködervektor, aber keinen Zielvektor enthält. Kommt es zur Induktion der β-Galaktosidase, so autoaktiviert das LexA–X Fusionsprotein den Reporter. In diesem Fall kann ein weniger sensitiver Reportervektor (enthält weniger LexA-Bindungsstellen) ausgetestet werden.
Um zu prüfen, ob das LexA-X Fusionsprotein den *Leu2*–Reporter autoaktiviert, führt man einen Test auf Aktivität des *Leu2*–Reporters mit einem Hefeklon durch, der nur den Ködervektor enthält. Sollte es auch hier zu einem Wachstum auf Leuzin-defizienten Platten kommen, so induziert das LexA–X Fusionsprotein den *Leu2*–Reporter. Auch in diesem Fall besteht die Möglichkeit weniger sensitive Hefestämme zu verwenden.
Induziert das LexA-X Fusionsprotein die am wenigsten sensitiven Reportergene, ist das Köderprotein X für eine Yeast Two-Hybrid Untersuchung nicht verwendbar.

2.2.3.2 Prüfung auf die Kerngängigkeit und Bindung an LexA Operatoren

Wie Abbildung 2-3 verdeutlicht, muß das LexA–X Fusionsprotein die Zellkernmembran der Hefe durchdringen können um an die LexA-Bindungsstellen zu gelangen. Es ist aber bei weitem nicht jedes LexA-X Fusionsprotein aufgrund seiner Größe, Ladung, Konformation oder sonstiger Gegebenheiten dazu in der Lage. Autoaktivierungsversuche können bei aktivierendem Ergebnis (also Reporterinduktion) eine Kerngängigkeit belegen.

Sind die Autoaktivierungsversuche negativ (also keine Reporterinduktion), so kann dies aber auch einfach daran liegen, dass LexA–X nicht in den Zellkern der Hefe gelangt oder erst gar nicht exprimiert wird.

Mit Hilfe eines sogenannten Repressions-Assays kann geprüft werden, ob die LexA Fusion überhaupt vorhanden ist und in den Zellkern einzutreten vermag. Hierzu transformiert man den Ködervektor und den Reportervektor pJK101 in einen beliebigen Hefestamm. pJK101 hat im Gegensatz zu den anderen Reportervektoren noch *„upstream activating sequences“* (UAS_{Gal}) in 5´ Lage zu den LexA-Bindungsstellen. Diese UAS_{Gal} bewirken die Bindung des hefeeigenen Gal4 Transskriptionsaktivators, der vom ebenso endogenen Gal80 Repressor in galaktose-freiem Medium in seiner Funktion gehemmt wird.

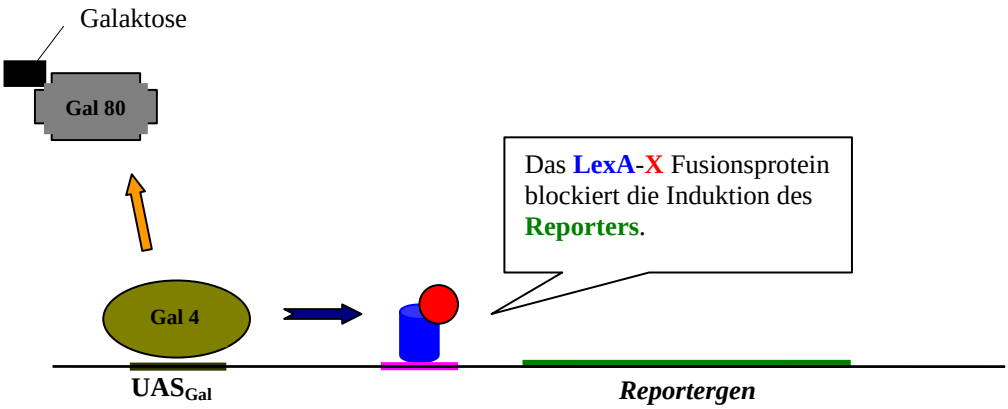

Abbildung 2-6 Das in den Kern eingetretene LexA-X Fusionsprotein verhindert die Induktion des Reportergens. **Rosa:** LexA-Bindungsstelle, **dunkelgrün:** Reportergen. Symbolerklärung siehe Abb. 2-2. Erklärung im Text.

In Anwesenheit von Galaktose (Abb. 2-4) dissoziiert der mit Galaktose beladene Gal80 Repressor vom Gal4-Regulatorprotein ab, was wiederum die Transkription des Reporters initiieren würde, wenn nicht das LexA–X Fusionsprotein in den Zellkern eintreten und die Transkription verhindern würde. Somit ergeben Klone, deren LexA–X Fusionsprotein in den Zellkern eintreten kann und die nicht autoaktivieren, in einem X-Gal Versuch weiße Kolonien.

2.2.3.3 Hefezelltransformation

60 ml YPD- oder Selektionsmedium wurden aus einer Übernachtkultur der zu transfizierenden Hefezelle zu einer OD_{600} = 0,1 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 – 0,7 inkubiert (Dauer 4 - 6 h). Die Zellen wurden pelletiert (1500 g, 5 min, RT), einmal in 20 ml sterilem Wasser gewaschen (1500 g, 5 min, RT) und in 0,3 ml Lösung 1 resuspendiert. Die Zellen wurden zu 100 µl aliquotiert und es wurde je Aliquot 100 ng Plasmid-DNA, 50 µg gekochte und abgekühlte Carrier-DNA und 0,3 ml Lösung 2 hinzugegeben. Die Lösung wurden durch Inversion gemischt und für 30 min bei 30°C inkubiert. In einer Negativkontrolle wurde lediglich auf den Zusatz von Plasmid-DNA verzichtet. Nach Zugabe von 70 µl Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) folgte ein Hitzeschock für 15 min bei 43°C. Nach kurzer Zentrifugation (10000 rpm, 10 sec, RT) wurde das Hefepellet in sterilem Wasser aufgenommen und auf entsprechende Selektionsplatten ausgestrichen. Die Hefen benötigen für ihr Wachstum bei 30°C ca. drei bis vier Tage.

10 × TE:	0,1 M Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, pH 7,5
10 × LiOAc:	1 M Lithiumacetat
Lösung 1:	1 Volumen 10 × TE, 1 Volumen 10 × LiOAc und 8 Volumen ddH_2O
Lösung 2:	1 Volumen 10 × TE, 1 Volumen 10 × LiOAc und 8 Volumen 50 % PEG-3350

2.2.3.4 Transformation der Genbank

Hierbei besteht kein prinzipieller Unterschied zu der oben beschriebenen Hefezelltransformation. Als Ausgansgsklon wurde EGY48 mit den Plasmiden pEG202-YopO und pSH18-34 verwendet, von dem eine 300 ml Suspension in YNB (Glu) –His, –Ura bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert wurden. Nach einem Waschschritt wurden die Zellen in 1,5 ml Lösung 1 resuspendiert und auf 30 Eppendorfröhrchen zu je 50 µl verteilt. Nach Zugabe von 50 µg Carrier-DNA und 1 µg Genbank-DNA pro Aliquot wurden die Proben für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von je 40 µl DMSO folgte ein Hitzeschock bei 43°C für 10 min. Anschließend wurden je Aliquot 0,6 ml ddH_2O hinzugefügt und die Zellen auf 100 YNB(Glu) –His, –Trp, –Ura –Platten (15 cm Durchmesser) ausgestrichen.

Eine Verdünnungsreihe zur Berechnung der Transformationseffizienz wurde ebenso ausplattiert.
Nach drei Tagen Inkubation wurden die Kolonien unter Zugabe von 10 ml ddH_2O pro 15 cm-Platte mit einem Zellschaber abgekratzt und pelletiert (1500 g, 5 min, RT). Nach einem Waschritt mit 75 ml ddH_2O (1500 g, 5 min, RT) wurde das Pellet in einem Volumen ddH_2O und einem Volumen 50 % Glycerol resuspendiert und in 1 ml Aliquots bei –70°C gelagert.

2.2.3.5 Filterassay auf β-Galaktosidaseaktivität

Mit diesem Test kann in kurzer Zeit geprüft werden, ob ein beliebiger Klone den β-Galaktosidase-Reporter des Yeast Two-Hybrid System induziert oder nicht.
Der zu testende Klon wurde auf YNB(Gal)-Selektionsplatten ausgestrichen und für zwei Tage inkubiert. Die gewachsenen Zellen werden auf eine Nitrozellulosemembran repliziert und zum Aufbrechen der Hefezellwand zweimal bei –70°C für 5 min eingefroren und wieder aufgetaut. Nun bringt man die Nitrozellulosemembran mit den Hefen nach oben auf ein mit Puffer Z mit 1 mg/ml X-Gal in N,N-Dimethylforamid getränktes Whatman-Filterpapier und inkubiert für 2 h bei 30°C.
Klone die eine β-Galaktosidaseaktivität aufweisen werden blau, während Klone mit fehlender β-Galaktosidaseaktivität weiß bleiben.

Puffer Z:	60 mM Na_2HPO_4, 40 mM NaH_2PO_4, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 50 mM β-Mercaptoethanol; nicht autoklavieren !
X-Gal-Lösung:	100 mg X-Gal in 1 ml N,N-Dimethylforamid gelöst

2.2.3.6 Test auf Aktivierung des LEU-Reportergens

Von einer Kolonie des zu testenden Klones wird eine Verdünnungsreihe hergestellt und vergleichend auf eine YNB(Gal)-Selektions +Leu-Platte und auf eine YNB(Gal)-Selektions –Leu-Platte ausgestrichen. In jedem Fall sollten Klone auf der YNB(Gal)-Selektions +Leu-Platte wachsen. Auf der YNB(Gal)-Selektions –Leu-Platte können nur dann Klone wachsen, falls diese in der Lage sind das *Leu2*–Reportergen zu induzieren.

2.2.3.7 Hefe-Paarungstest (Mating-Test)

Bei einem Hefe-Paarungstest kommt es, ähnlich der Konjugation bei Bakterien, zu einer Plasmidübertragung von einer Donorhefe auf eine Akzeptorhefe. Als Akzeptorhefestamm wurde RFY206, in den ein Köderplasmid und ein β-Galaktosidase-Reporterplasmid transformiert wurden, verwandt. Als Donorstamm diente EGY48 welcher ein Zielplasmid enthielt. Donor- und Akzeptorhefen wurden nun „überkreuz“ auf YPD-Platten ausgestrichen, so dass eine Paarung der Hefezellen möglich wird. Nach 1 – 2 Tagen Inkubation wurden die Zellen durch Replikation auf YNB(Gal) –His, –Ura, –Trp -Platten auf alle drei Plasmide selektioniert. Mit den wachsenden Klonen, die alle drei Plasmide enthalten, konnten nun Tests auf Aktivierung des β-Galaktosidase-Reporters durchgeführt werden.

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Proteinisolation aus Hefezellen

Zwei ml einer dicht gewachsenen Hefe-Übernachtkultur wurden kurz zentrifugiert (20000 g, 30 sec, 4°C), in Lösung 1 gewaschen und in je 0,5 ml Lösung 2a und 2b resuspendiert. Es wurden 0,4 g Glasperlen hinzugefügt und 3 mal 1 min gevortext. Die Suspension wurde dekantiert und zentrifugiert (20000 g, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in 100 µl Lösung 3 aufgenommen und für 5 min bei 100°C gekocht und anschließend für 30 min auf Eis gestellt. Die Probe wurde anschließend zentrifugiert (20000 g, 10 min, 4°C), der Überstand mit Solubilisierungs-Puffer versetzt und auf ein SDS-Proteingel geladen. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Lösung 1:	20 mM NaN_3 , 50 mM NaCl
Lösung 2a:	20 mM Tris pH 8,0, 50 mM NH_4OAc, 2 mM EDTA
Lösung 2b:	20 % TCA
Lösung 3:	3 % SDS, 100 mM Tris pH 11, 3 mM DTT
Solubilisierungs-Puffer:	2 × 50 mM Tris-HCl pH5,5, 2 % SDS, 0,04 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, 84 mM β-Mercaptoethanol

2.2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford (14)

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass das Extinktionsmaximum einer sauren Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung von 465 nm auf 595 nm steigt, sobald ein Protein an das Färbereagenz gebunden wird. Es wurden 0,8 ml PBS mit 10 µl der zu analysierenden Proteinlösung und 0,2 ml Dye-Reagent Concentrate (Färbereagenz der Firma BioRad) versetzt. Die Lösung wurde durchgemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Aus der Extinktionsmessung bei 595 nm konnte die Proteinkonzentration anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve berechnet werden.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (53)

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurden denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gele eingesetzt. Das Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (SDS) bindet an Proteine proportional zu ihrer molaren Masse (etwa ein Molekül SDS pro zwei Aminosäurereste) und bewirkt die Dissoziation, Entfaltung und Solubilisierung komplexer Proteinmoleküle oder - assoziate. Im elektrischen Feld wandern die von dem negativ geladenen SDS umgebenen Proteine in Richtung Anode. Dabei kommt es zu einer Auftrennung der Proteine entsprechend dem Molekulargewicht, da kleinere Proteinmoleküle eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit besitzen als größere. Die angewandte Methode nach *Laemmli* bedient sich eines diskontinuierlichen Polyacrylamidgels, welches aus einem unteren Polyacrylamid – Trenngel unterschiedlicher Konzentration und einem oberen Sammelgel aus 5% Polyacrylamid besteht. Das Trenngel wurde nach Zugabe von 100 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS) und 50 µl Tetraethylendiamin (TEMED) in eine Vertikalkammer (Dicke: 1,0 mm Laufstrecke: 7 cm Mini-Protein-Gel, Biotech) gefüllt. Zur Ausbildung einer geraden Oberfläche wurde es mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach Polymerisation des Polyacrylamids (30 min) und Entfernung des Wassers wurde das entgaste und mit je 10 µl 10% APS und TEMED vermischte 5% Sammelgel luftblasenfrei überschichtet und ein Taschenkamm eingesetzt. Das nach 30 min polymerisierte Gel wurde in ein Elekrtophoresegerät eingelegt und durch *Laemmli*-Puffer mit Kathode und Anode verbunden. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen in einem Volumen Protein-Stop-Mix für 5 min bei 100°C denaturiert und danach bei einer Stromstärke von 40 mA (maximal 150V) aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel entweder mit Coomassie-

Färbelösung 15 min gefärbt und der Gelhintergrund mit Entfärbe-Lösung entfärbt oder für den Transfer auf eine Nitrocellulosemembran vorbereitet.

Trenngel:	10-15 % Acrylamid, 0,2 % SDS, 375 mM Tris pH 8,8
Sammelgel:	5 % Acrylamid, 0,2 % SDS, 125 mM Tris pH 6,8
Laemmli-Puffer:	3 g Tris (25mM), 14,3 g Glycerin, 1 g SDS, H_2O ad 1000 ml, pH 8,3
Färbelösung:	0,125 % Coomassie, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure
Entfärbe-Lösung:	50 % Methanol, 10 % Essigsäure

2.2.4.4 Westernblot / Immunoblot

Beim Westernblot werden Proteinbanden von einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran elektrophoretisch übertragen. Auf dieser können – nach Inkubation mit einem entsprechenden Antikörper – Proteinbanden in einer Farbreaktion spezifisch nachgewiesen werden (Immunoblot).
Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-Gelelektrophorese wurde das Trenngel mit einer Nitrozellulosemembran kontaktiert und in einer Minigel-Blotting Kammer der Firma Hoefer entsprechend der Anleitung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Proteinmarker wurde mit Ponceau-Lösung angefärbt und die Markerbanden auf der Membran markiert. Danach wurde mit destilliertem Wasser entfärbt und die Membran zur Blockierung der freien Membranareale mit Blockierlösung für mindestens 1h inkubiert. Anschließend wurde die Filtermembran mit einem gegen das gewünschte Protein gerichteten Antikörper für mindestens 1h inkubiert. Die Antikörper wurden in Waschpuffer, in der Regel in einem Verhältnis von 1 : 5000, verdünnt. Nach einigen Waschschritten wurde die Membran mit einem zweiten, gegen den ersten gerichteten und mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörper für 1h inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran dem Peroxidasesubstrat (ECL Reagens der Firma Amersham) gemäß der Anleitung für eine Minute ausgesetzt und die kurz getrocknete Membran auf einem Film exponiert. Alle Inkubations- und Waschschritte fanden bei Raumtemperatur statt.

Blottingpuffer:	3 g/l Tris, 24,4 g/l Glycin, 1 g/l SDS, 10 % Methanol
Blockierlösung:	0,1 % Tween 20, 5 % Magermilchpulver in PBS

PBS: 3,2 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2HPO_4 pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl

Ponceau-Lösung: 0,1 % Ponceau S, 5 % Essigsäure

Waschpuffer: PBS, 0,1 % Tween 20

2.2.4.5 Koimmunopräzipitation (65)

6×10^7 COS-Zellen wurden mit *Yersinia*-Stämmen WA-C (pTRANS, pCJYE138-YpkA) bzw. YPIII(pIB102) mit einem Verhältnis von 50 Bakterien/COS-Zelle (m.o.i. = 50) für 2 h infiziert (siehe Kapitel 2.2.5.2.) Die Zellen wurden zweimal in eiskaltem PBS gewaschen, von der Zellkulturflasche abgescharbt und zentrifugiert (400 g, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 300 µl eiskaltem Lysepuffer aufgenommen und für 1 h bei 4°C unter Bewegung inkubiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (20000 g, 15 min, 4°C) und 50 µl des Überstandes wurden direkt mit Solubilisierungs-Puffer versetzt, kurz gekocht und auf ein 15 %iges SDS-Proteingel geladen. Die restlichen 250 µl Überstand wurden mit 50 µl äquilibrierten Protein G-Agarose-Beads (Boehringer Mannheim) und 6 µl polyklonalem anti-YpkA Kaninchenserum versetzt und für 12 – 24 h unter Bewegung bei 4°C präzipitiert. Die Beads wurden dreimal in Lysepuffer gewaschen, in Solubilisierungs-Puffer aufgenommen, kurz gekocht und die freigesetzten Proteine in einem 15 % SDS-Page aufgetrennt. Das Gel wurde geblottet und eine Immunodetektion auf die Proteine Rho, Rac und CDC42 durchgeführt.

Lysepuffer: 20 mM Tris pH 7,5, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 0,1 % Triton-X 100, 100 mM PMSF, 2 µl Leupeptin, 2 µl Pepstatin

Solubilisierungs-Puffer: siehe Kapitel 2.2.4.1

2.2.5 Zellbiologische Methoden

2.2.5.1 Kultivierung von humanen Zellinien

COS und HeLa Zellinien wurden in Dulbecco`s Modified Eagle Medium (Life Technologies, Cergy, Pontoise, Frankreich) kultiviert. Das Medium wurde mit 10 % hitzeinaktiviertem, fetalem Kälberserum, 5 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin komplementiert. Die Zellen wurden bei 37°C , 5 % CO_2 und 99 %iger Luftfeuchtigkeit bebrütet. Bei Erreichen einer konfluenten Zelldichte wurden sie mit Trypsin-EDTA abgelöst, in PBS gewaschen (300 g, 5 min, 37°C) und in komplettem Kulturmedium in subkonfluenter Zelldichte neu ausgesät.

Trypsin-EDTA: 0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA

2.2.5.2 Infektion von Zell-Linien mit Yersinien

Von einer *Yersinia*-Übernachtkultur (Inkubationstemperatur 27°C) wurde eine 1 : 20 Verdünnung angefertigt und davon 30 ml bei 37°C für 2 h inkubiert. Durch diesen Temperatursprung wird in Yersinien die Produktion von plasmidkodierten Virulenzfaktoren induziert. Die Bakterienkultur wurde dann zentrifugiert (1600 g, 10 min, 4°C) und das Sediment in 2,5 ml eiskaltem PBS aufgelöst. Die OD_{600} einer 1:10 Verdünnung wurde bestimmt und in die Formel

$$X = (OD_{600} \times 6666) - 2400$$

eingesetzt. X gibt die Menge PBS in µl an, die noch zu den restlichen 2,4 ml Bakteriensuspension (2,5 ml abzüglich 100 µl für OD-Bestimmung) hinzugegeben werden muß, damit ein µl Bakteriensuspension 1,67 Millionen Bakterien enthält. Somit muß eine Zellpopulation von 1 Millionen Zellen mit 30 µl der Bakteriensuspension infiziert werden, damit sich eine m.o.i. von 50 ergibt. Infiziert wurden humane Zellinien in subkonfluenter Dichte. Als Medium wurde Kulturmedium ohne Zusatz von Antibiotika verwendet. Die Infektion fand bei 37°C , 5 % CO_2 und 99 %iger Luftfeuchtigkeit für die jeweils angegebene Zeitdauer statt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung von YopM und YopO/YpkA im Yeast Two–Hybrid System

Wie in Kapitel 1.4 dargestellt, war es Ziel dieser Arbeit mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid Systems die bis dato unbekannten humanen Interaktionspartner der *Yersinia* Effektorproteine YopM und YopO zu finden. Dazu wurden zunächst die entsprechenden Gene aus dem *Yersinia* Virulenzplasmid pYV amplifiziert und in die Two-Hybrid Ködervektoren kloniert. Nach Ausschluß von durch die PCR generierten Mutationen wurden die Vektoren in entsprechende Hefen transformiert, um Tests auf (a) Autoaktivierung der Reportergene durch das LexA-YopM bzw. LexA-YopO Fusionsprotein und (b) Kerngängigkeit der LexA-Fusionsproteine, durchzuführen. Erst nach Darstellung der Kerngängigkeit und Ausschluß der Autoaktivierung kann eine Two-Hybrid Filteruntersuchung durchgeführt werden.

3.1.1 YopM

3.1.1.1 Klonierung

Das *Yersinia*-Virulenzplasmid wurde aus dem *Yersinia enterocolitica*-Stamm WA-314 isoliert und das YopM–Gen mit der PCR–Technik vervielfältigt. Als Primer wurden MUE 1 und MDS 1 verwendet. Das PCR–Produkt und der Ködervektor pEG202 wurden mit *EcoRI* und *Sal I* Restriktionsenzymen verdaut, aufgereinigt und miteinander ligiert. Einen Verdau des Konstruktes zeigt Abb. 3-1, Bande 1.

3.1.1.2 Sequenzierung

Das klonierte YopM-Gen wurde vollständig sequenziert, um eventuelle Mutationen, die durch die PCR entstanden sein könnten, auszuschließen. Als Primer dienten 5´bf, SM1, SM2, SM3 und SM4. Mutationen im YopM Gen konnten ausgeschlossen und seine Lage im richtigen Leseraster gezeigt werden.

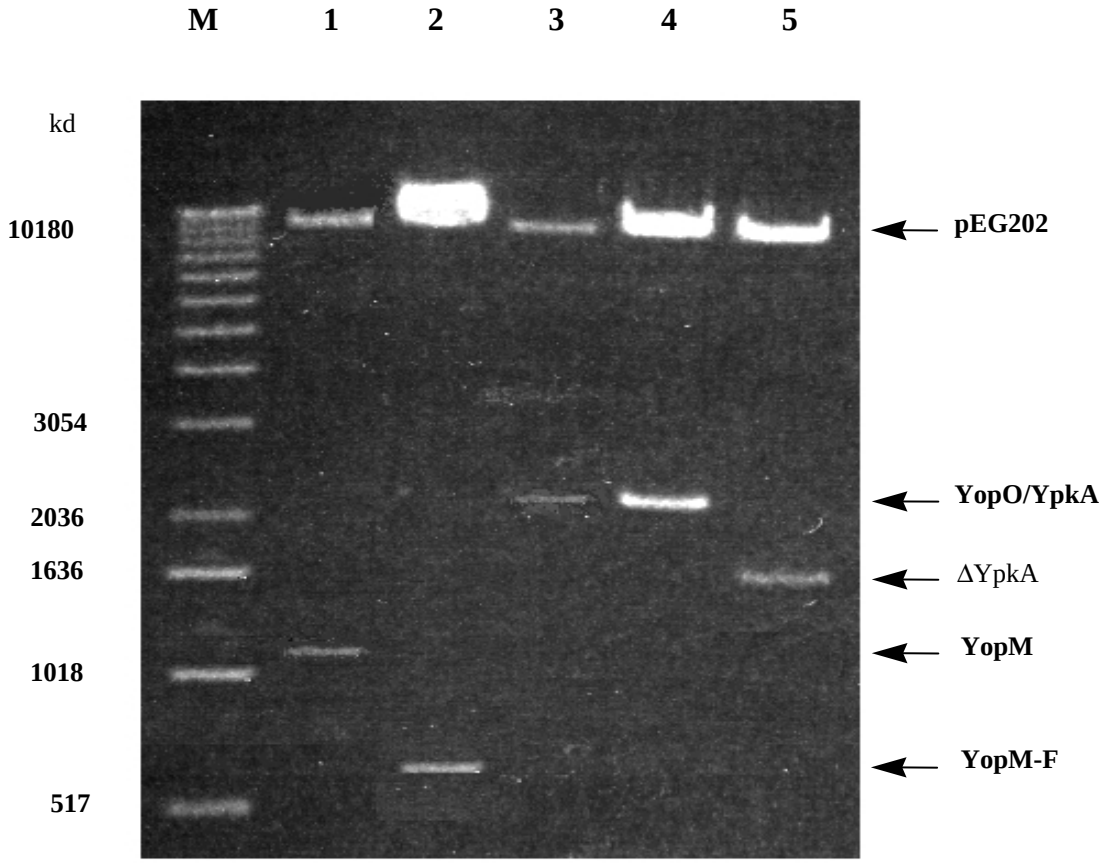

Abbildung 3-1 Die in dieser Arbeit hergestellten pEG202 – Konstrukte wurden jeweils mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und gelelektrophoretisch dargestellt.
1: pEG202-YopM (*EcoRI*, *Sal I*), **2**: pEG202-YopM-F (*EcoRI*, *Sal I*) **3**: pEG202-YopO (*EcoRI*, *Sal I*)
4: pEG202-YpkA (*Nco I*, *Xho I*) **5**: pEG202-ΔYpkA (*Nco I*, *Xho I*)

3.1.1.3 Autoaktivierungsversuche

Vor der Durchführung eines Genbanktransfers sollte sichergestellt sein, dass das LexA–YopM Fusionsprotein die Transkription der Reportergene nicht selbständig aktiviert. Für die Prüfung auf Aktivierung des *LacZ*-Reporters wurden in den Hefestamm EGY48 das *LacZ*-Reporterplasmid (pSH18-34) und das Köderplasmid (pEG202-YopM) bzw. die Kontrollplasmide (pSH17-4, pRHFM1) transformiert. Es entstanden somit die folgenden Transformanden:

- EGY48 (pEG202-YopM, pSH18-34) → Testung
- EGY48 (pSH17-4, pSH18-34) → Positivkontrolle
- EGY48 (pRHFM1, pSH18-34) → Negativkontrolle

In dem mit diesen Stämmen durchgeführten Filtertest auf β-Galaktosidaseaktivität (siehe Kap. 2.2.3.5) zeigte sich eine gleichstarke Blauverfärbung des YopM enthaltenden Stammes und der Positivkontrolle, während die Negativkontrolle weiß blieb. Das bedeutet, dass das LexA-YopM Fusionsprotein, ebenso wie die Positivkontrolle, den β-Galaktosidasereporter induziert. Daraufhin wurden die weniger sensitiven Reporterplasmide pJK103 bzw. pRB1840 statt pSH18-34 für die Hefetransformation verwendet. Diese enthalten weniger LexA-Bindungsstellen (2 bzw. 1 statt 8) vor dem β-Galaktosidasereportergen und reduzieren damit die Wahrscheinlichkeit einer Reporterinduktion durch die LexA-YopM Fusion. Doch wie Abb. 3-2 zeigt, kommt es auch unter dem am wenigsten sensitiven Reporterplasmid pRB1840 zu einer Blauverfärbung und damit zu einer Induktion des Reportergens durch LexA-YopM.

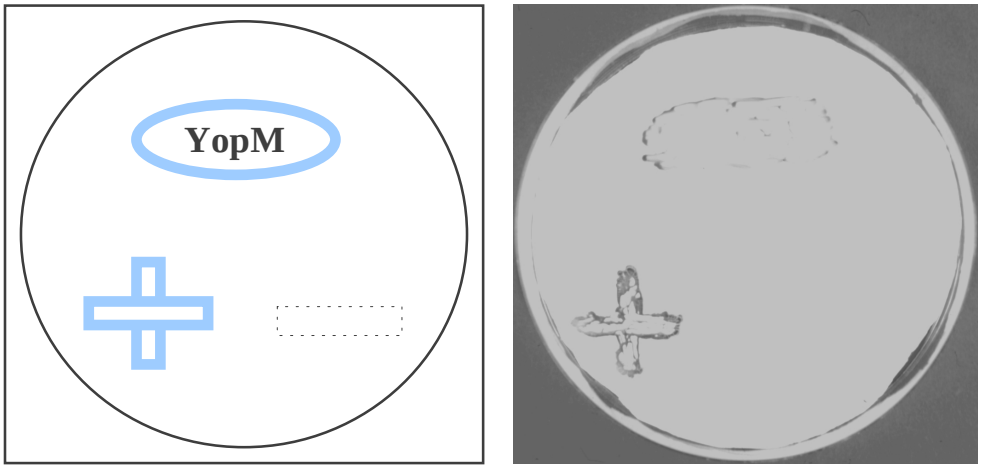

Abbildung 3-2 Autoaktivierung des am wenigsten sensitiven *LacZ*-Reporters pRB1840 durch LexA–YopM.
Plusausstrich: EGY48(pSH17-4, pRB1840) als Positivkontrolle; **Minusausstrich:** EGY48(pRHFM1, pRB1840) als Negativkontrolle; **Ovaler Ausstrich:** EGY48(pEG202-YopM, pRB1840) zeigt im Filtertest auf β-Galaktosidaseaktivität eine Blauverfärbung.

Für die Prüfung auf Aktivierung des *Leu2*-Reportergens wurden folgende Transformanden erstellt:

- EGY48 (pEG202–YopM) (hohe Sensitivität mit 6 LexA-Bindungsstellen)
- EGY194 (pEG202–YopM) (mittlere Sensitivität mit 4 LexA-Bindungsstellen)
- EGY188 (pEG202–YopM) (geringe Sensitivität mit 2 LexA-Bindungsstellen)

Die Stämme wurden auf –His und auf –His, –Leu-Platten ausgestrichen und das Wachstum verglichen. Es zeigte sich, dass jeder Stamm auf –His wie auf –His, –Leu -Platten gleich stark wuchs. Daraus folgt, dass das LexA-YopM Fusionsprotein auch den am wenigsten sensitiven *Leu2*-Reporter induziert (Abb. 3-3).

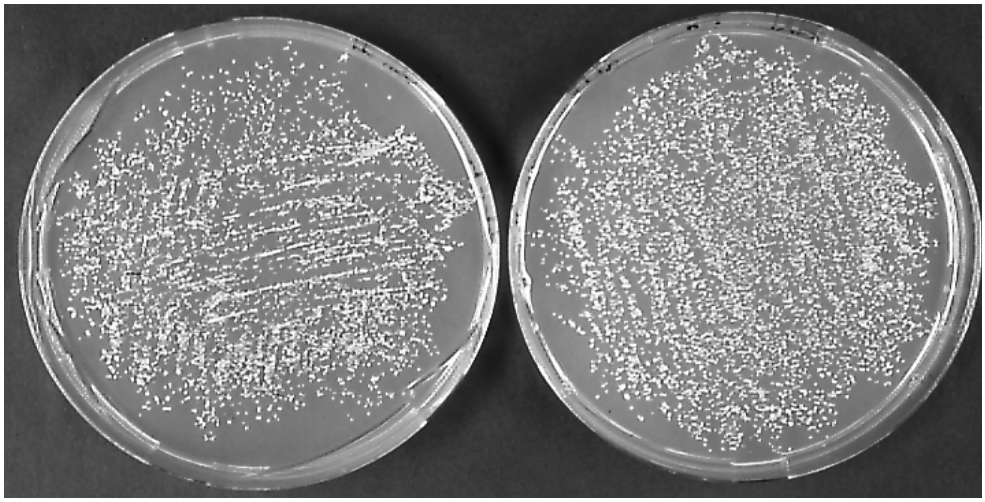

Abbildung 3-3 Autoaktivierung des am wenigsten sensitiven *Leu2*-Reporters (EGY188) durch das LexA–YopM Fusionsprotein.
Links: EGY188 (pEG202-YopM) zeigt Wachstum auf YNB(Gal) –His Platte. **Rechts**: EGY188 (pEG202-YopM) zeigt auf einer YNB(Gal) –His, –Leu Platte ebenso Wachstum.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das LexA-YopM Fusionsprotein die Transkription der beiden Reportergene *LacZ* und *Leu2* induziert und somit in dieser Form nicht für eine Two-Hybrid Filteruntersuchung verwendet werden kann. Die Darstellung der Kerngängigkeit erübrigt sich aus diesem Grund.

3.1.2 Das YopM–Fragment (YopM–F)

Durch Subklonierung eines Fragmentes des YopM-Genes kann unter Umständen ein für das Yeast Two-Hybrid System doch noch verwendbarer Köder erzeugt werden. Hierfür wird nur einen Teilbereich des Köders mit der Vorstellung an LexA fusioniert, dass der transskriptionsaktivierende Bereich nicht enthalten ist und somit die Autoaktivierung vermieden wird. Gleichzeitig erhofft man sich, die für die Bindung des Zielproteins notwendige Domäne an LexA gekoppelt und nicht zerstört oder verändert zu haben. Da die N-terminalen 300 Aminosäuren für die Funktion von YopM ausreichend sind (41) wurden diese an LexA fusioniert und mit dem entstandenen LexA-YopM-F -Köder Autoaktivierungsversuche durchgeführt.

3.1.2.1 Klonierung des YopM–Fragmentes

Die ersten 300 Aminosäuren des YopM Gens wurden mittels PCR aus dem *Yersinia*–Virulenzplasmid des Stammes WA-314 amplifiziert. Als Primer dienten MUE 1 und MDS 2. Das PCR Produkt wurde gereinigt, mit *EcoRI* und *Sal I* verdaut, abermals gereinigt und in den mit *EcoRI* und *Sal I* geschnittenen und gereinigten Vektor pEG202 ligiert. Ein Verdau des Konstruktes zeigt Abbildung 3-1, Bande 2.

3.1.2.2 Sequenzierung des YopM–Fragmentes

Die Sequenzierung des in den Vektor pEG202 klonierten YopM–Fragmentes ergab ein mutationsfreies und im Leseraster liegendes YopM–F. Als Sequenzierprimer dienten 5´bf, SM1, SM2 und MDS 2.

3.1.2.3 Autoaktivierungsversuche

Für die Testung auf Aktivierung der Reportergene wurden die am wenigsten sensitiven Reporter herangezogen. Die folgende Stämme wurden für die Prüfung auf Aktivierung des *LacZ*-Reporters verwendet:

- EGY48 (pEG202-YopM-F, pRB1840) → Testung
- EGY48 (pSH17-4, pRB1840) → Positivkontrolle
- EGY48 (pRHFM1, pBR1840) → Negativkontrolle

Im X-Gal Versuch färbte sich der YopM–F enthaltende Stamm ebenso blau wie die Positivkontrolle. Die Negativkontrolle verfärbte sich nicht.
Die *Leu2*-Reporteraktivierung wurde mit folgendem Stamm getestet:

- EGY188 (pEG202-YopM–F)

Ein vergleichender Ausstrich auf –His und auf –His, –Leu -Platten ergab jedoch wiederum gleich starkes Wachstum auf beiden Platten. Daraus ist zu folgern, dass neben dem LexA-YopM Fusionsprotein auch das LexA-YopM-Fragment Fusionsprotein die beiden Reportergene *LacZ* und *Leu2* induziert. Somit sind beide Fusionsproteine in dieser Form nicht für eine Genbanktransformation im Yeast Two-Hybrid System geeignet. Aus diesem Grund wurde auf eine weitere Untersuchung von YopM verzichtet.

3.1.3 YopO

3.1.3.1 Klonierung

Es wurde eine PCR des YopO Genes mit den Primern KEU und KSD durchgeführt. Als Matrize diente das *Yersinia* –Virulenzplasmid des Stammes WA-314. Das PCR–Produkt wurde in die *EcoRI* und *Sal I* Schnittstellen des Ködervektors pEG202 ligiert. Ein Verdau des Konstruktes zeigt Abb. 3-1, Bande 3.

3.1.3.2 Sequenzierung

Es wurde eine vollständige Sequenzierung des 2,3 kb langen YopO Gens mit den Primern KEU, KSD, 5`bf, SK1-SK6 durchgeführt. Es ergab sich ein im Leseraster zu LexA liegendes YopO, welches zu der veröffentlichten YopO Sequenz des Stammes A2635 (O:9) fünf Aminosäureaustausche und eine Insertion einer Aminosäure aufweist (siehe Tab 4-1 im Diskussionsteil).

3.1.3.3 Autoaktivierungsversuche

Für die Prüfung auf Aktivierung des *LacZ*–Reporters durch das LexA–YopO Fusionsprotein wurden die folgenden Transformanden erstellt:

- EGY48 (202-YopO, pSH18-34) → Testung
- EGY48 (pSH17-4, pSH18-34) → Positivkontrolle
- EGY48 (pRHFM1, pSH18-34) → Negativkontrolle

Wie in Abbildung 3-4 zu sehen ist, färbt sich der YopO enthaltende Stamm in einem X–Gal-Versuch nicht blau an.

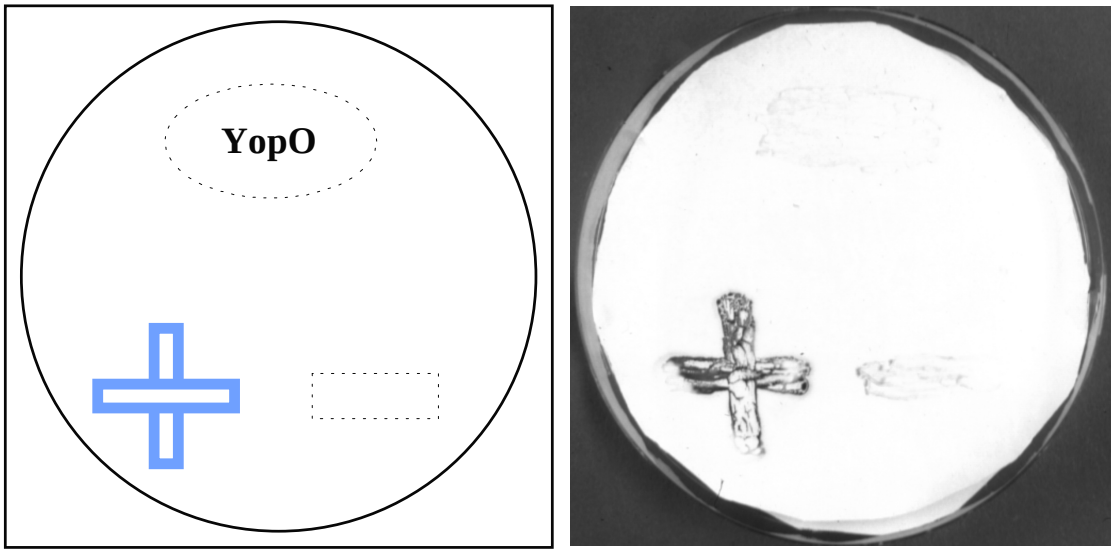

Abbildung 3-4 Der sensitivste *LacZ* Reporter pSH18-34 wird durch das LexA–YopO Fusionsprotein nicht aktiviert.
Plusausstrich: EGY48 (pSH17-4, pSH18-34) als Positivkontrolle, **Minusausstrich**: EGY48 (pRHFM1, pSH18-34) als Negativkontrolle, **Ovaler Ausstrich**: EGY48 (pEG202-YopO, pSH18-34) zeigt in einem Filtertest auf β-Galaktosidaseaktivität keine Blauverfärbung.

Für den Test auf Aktivierung des *Leu2*–Reporters wurde der Ködervektor in den sensitivsten Reporterstamm EGY48 transformiert

- EGY48 (pEG202–YopO)

Ein vergleichender Ausstrich auf –His und auf –His, –Leu-Platten ergab, dass der YopO enthaltende Köderstamm auf Leuzin enthaltenden Platten wuchs, während er auf Leuzin-defizienten Platten kein Wachstum zeigte (siehe Abb. 3-5).

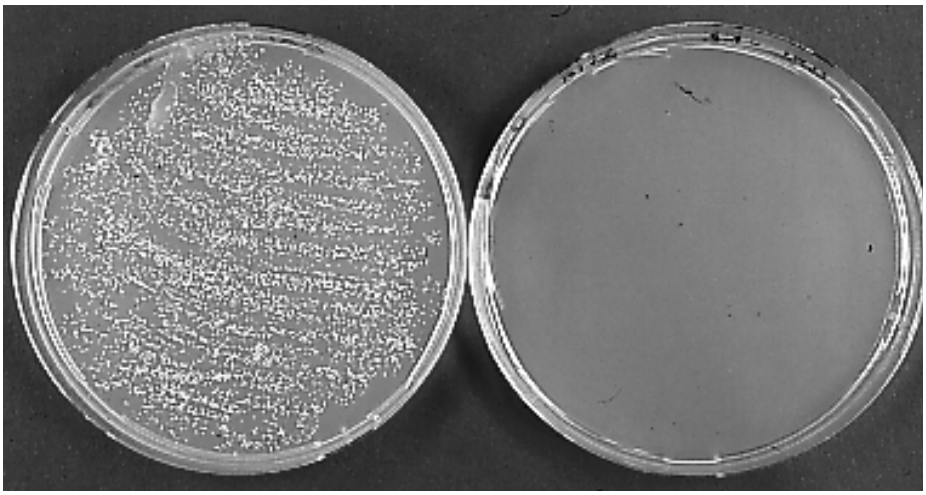

Abbildung 3-5 LexA-YopO aktiviert den *Leu2*-Reporter nicht.
Links: EGY48 (pEG202-YopO) zeigt auf YNB(Gal) –His Medium Wachstum. **Rechts**: Auf der YNB(Gal) –His, –Leu Platte zeigt EGY48 (pEG202-YopO) kein Wachstum.

Daraus folgt, dass das LexA-YopO Fusionsprotein weder das *LacZ*- noch das *Leu2*-Reportergen induziert. Es kommt also, im Gegensatz zu YopM bzw. YopM-F (siehe Kapitel 3.1.2.3), nicht zu einer Autoaktivierung der Reportergene durch den YopO-Köder.

3.1.3.4 Repressionsassay

In diesem Versuch wird geprüft, ob das LexA–YopO Fusionsprotein exprimiert wird, in den Zellkern gelangt und die Transkription des *LacZ*–Reporters vermindern kann (Erklärung siehe Kapitel 2.2.3.2). Hierzu wurden folgende Transformanden erstellt:

- EGY48 (pEG202–YopO, pJK101) → Testung
- EGY48 (pRHFM1, pJK101) → Positivkontrolle (wird schwach blau)
- EGY48 (pJK101) → Negativkontrolle (wird stark blau)

Die Positivkontrolle EGY48 (pRHFM1, pJK101) exprimiert die Homeodomäne RHFM1, die in den Hefezellkern einzutreten vermag und die Expression des β-Galaktosidase Reporters reduziert. Deshalb wird dieser Stamm in einem X-Gal Filterversuch nur schwach blau. Die Negativkontrolle enthält lediglich ein Reporterplasmid, aber keinen Faktor, der die Expression der β-Galaktosidase vermindert. Aus diesem Grund wird die Negativkontrolle in einem X-Gal Filterversuch stark blau.

Der Repressionsassay zeigte, dass der YopO enthaltende Stamm sowie die Positivkontrolle eine deutlich verminderte Blaufärbung im Gegensatz zur Negativkontrolle aufweisen (Abb. 3-6). Es kommt demzufolge zu einer Reduktion (Repression) der β–Galaktosidase-Expression durch LexA-YopO bzw. RHFM1.

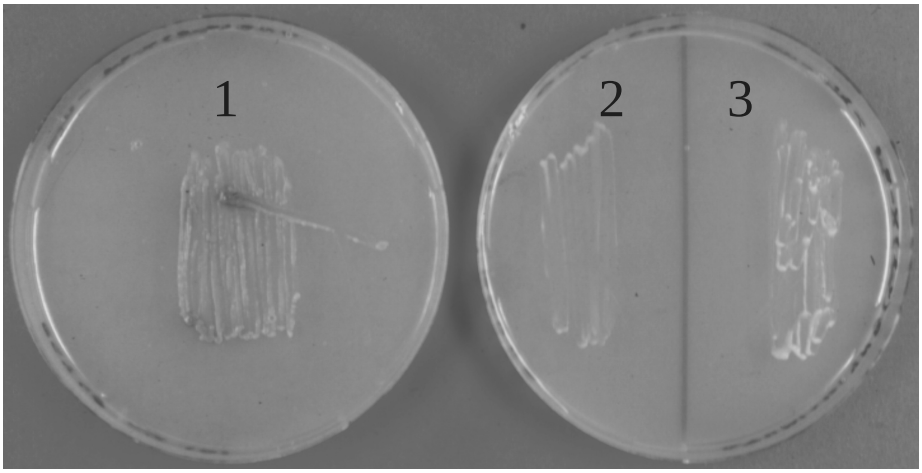

Abbildung 3-6 Repression der β-Galaktosidase-Expression durch das LexA-YopO Fusionsprotein.

1: Die Negativkontrolle EGY48 (pJK101) wurde auf eine die X-Gal haltige Agarplatte YNB (Gal) –*Ura* +X-Gal ausgestrichen und für 48 h inkubiert. Es zeigt sich eine deutliche Blaufärbung. **2**: EGY48 (pEG202-YopO, pJK101) und **3**: die Positivkontrolle EGY48 (pRHFM1, pJK101) wurden auf eine YNB (Gal) –*Ura*, –*His* +X-Gal Platte ausgestrichen und für 48 h inkubiert. Sowohl der YopO enthaltende Stamm als auch die Positivkontrolle zeigen lediglich eine schwache Blauverfärbung.

Zusammen mit den Ergebnissen der Autoaktivierungsversuche kann man folgende Schlüsse ziehen:

1. Das LexA–YopO Fusionsprotein wird exprimiert und gelangt in den Zellkern der Hefezelle.

2. Im Zellkern bindet es an LexA-Operatoren und aktiviert die Transkription der Reportergene nicht.

Der Stamm

EGY48 (pEG202–YopO, pSH18-34)

erfüllt damit alle Bedingungen für eine Yeast Two-Hybrid Genbanktransformation.

3.1.3.5 Genbanktransformation

Bei der Genbanktransformation wurden die Genbankplasmide in den schon Köder- und Reportervektor enthalten Hefestamm EGY48 (pEG202–YopO, pSH18-34) transformiert (siehe auch Kapitel 2.2.3 und 2.2.3.4). Nach der Transformation wurden die Zellen auf YNB(Glu) –His, –Trp, –Ura Platten selektioniert, sodass nur die Hefezellen wachsen konnten, die alle drei Plasmide enthielten (=Transformanden). Über diesen Weg konnte die Transformandenzahl und die Transformationseffizienz bestimmt werden. Die Selektion der Transformanden auf YNB(Glu) –His, –Trp, –Ura Medium ist unabhängig von einer eventuellen Köder – Zielprotein Interaktion, da (a) nicht auf die Reportermarker (Leucin, X-Gal) selektioniert wird und (b) in Galaktose-freiem Medium kein Zielprotein exprimiert wird (Gal1-Promotor). In einem zweiten Schritt werden die Transformanden dann durch Ausstrich auf YNB(Gal) –His, –Trp, –Ura, –Leu Platten auf eine eventuell vorhandene Köder – Zielprotein Interaktion selektioniert (siehe Kapitel 3.1.3.6).
Es wurde zunächst eine kleine Genbanktransformation durchgeführt, bei der 6 µg Genbank-DNA eingesetzt wurden. Bei dieser Transformation wurden etwa 3×10^5 Transformanden gewonnen. Eine weitere Transformation, bei der 30 µg Genbank–DNA

eigesetzt wurde, erbrachte $1{,}2 \times 10^6$ Klone, so dass aus beiden Ansätzen $1{,}5 \times 10^6$ verschiedene Transformanden zur Verfügung standen. Dies entspricht einer Effizienz von $4{,}2 \times 10^4$ Transformanden / µg Genbank-DNA. Die Zellen wurden von den YNB(Glu) –His, –Trp, –Ura Platten abgeschabt und in 50% Glycerol auf 25 Eppendorfreaktionsgefäße zu je 1 ml verteilt. Eine Bestimmung der Zellzahlkonzentration ergab 3×10^7 Zellen/ml Aliquot. Die Zellen wurden bei –70°C gelagert.

3.1.3.6 Selektionsverfahren

Um alle Transformanden auf eine Two-Hybrid Interaktion zu untersuchen, sollten etwa 5-7 mal soviel Zellen der ursprünglich erhaltenen Transformandenzahl (also $6 \times 1{,}5 \times 10^6 \approx 10^7$) selektioniert werden. Demnach wurden 0,33 ml Aliquot ($10^7 / 3 \times 10^7 = 0{,}33$ ml Aliquot) aufgetaut und für 4 Stunden in YNB(Gal) –His, –Ura, –Trp Medium inkubiert, um den *Gal1*-Promotor der Genbankplasmide zu induzieren. Danach wurden die Zellen auf YNB(Gal) –His, –Ura, –Trp, –Leu -Platten ausgestrichen und bebrütet. Die ersten Klone wuchsen nach drei Tagen und bis zum fünften Tag erschienen insgesamt etwa 60 Kolonien. Die ersten 50 Klone wurden auf neue Platten ausgestrichen und jeweils eine Übernachtkultur in 25 % Glycerol tiefgefroren konserviert.
Da das B42-Genbank Fusionsprotein aufgrund des *Gal1*-Promotors nur in Gegenwart von Galaktose exprimiert wird, sollte auch jede Reporterinduktion nur in Galaktose-haltigem Medium stattfinden. Da YNB(Glu) –Medium keine Galaktose enthält, ist jeder Klon der auf diesem Medium die Reporter induziert falsch positiv und sollte nicht weiter untersucht werden.
Die Galaktose-Abhängigkeit der Interaktion im Yeast Two-Hybrid System wurde durch Ausstrich der zuerst erschienenen 43 Klonen auf die folgenden Platten überprüft:

- YNB (Gal) –His , –Ura, –Trp, –Leu → alle 43 Klone wuchsen
- YNB (Glu) –His , –Ura, –Trp, –Leu → zwei Klone wuchsen
- YNB (Gal) –His , –Ura, –Trp + X-Gal → alle Klone wurden blau
- YNB (Glu) –His , –Ura, –Trp + X-Gal → alle Klone zeigten eine schwächere bis deutlich schwächere Blauverfärbung (bis auf einem Klon**,** der auch auf YNB(Glu) –His, –Ura, –Trp –Leu wuchs).

Somit erwiesen sich zwei Klone als falsch positiv. Von den restlichen 41 Klonen wurden die Plasmide isoliert. Da die positiven Klone drei verschiedene Plasmide enthalten (Köder-, Reporter- und Genbankplasmid), und die Genbankplasmide aus diesem Gemisch isoliert werden sollten, wurde eine Tryptophan-Selektion in KC8-Bakterien durchgeführt. KC8 Bakterien sind für ein Enzym, das für die Synthese von Tryptophan notwendig ist, defizient. Das Gen für dieses Enzym ist als Trp-Marker auf dem Genbankplasmid enthalten. Das aus den positiven Hefeklonen isolierte Plasmidgemisch wurden durch Elektroporation in KC8 Bakterien transformiert und auf Ampicillin-haltigem LB Agar, der Tryptophan enthält, selektioniert. Dadurch wuchsen nur die erfolgreich transformierten Bakterien, von denen statistisch gesehen jedes dritte das Genbankplasmid enthielt. Ein Ausstrich auf Tryptophan–defizenten Nährboden ermöglichte dann die Selektion der Genbankplasmid-enthaltenden Bakterien.

3.1.3.7 Hefepaarungsteste

Die aus den positiven Klonen isolierten pJG4-5 Genbankplasmide wurden in EGY48 retransformiert und in einem Paarungs-Versuch (siehe Kapitel 2.2.3.7) mit pEG202–YopO, pRHFM1, pLexA–Max und pBait ausgetestet. Es zeigte sich, dass 10 von den 41 Klonen mit pEG202–YopO in einem X–Gal–Versuch keine Blauverfärbung mehr zeigten. Die restlichen 31 Klone zeigten mit pEG202–YopO eine Blauverfärbung, während diese mit pRHFM1, pLexA–Max und pBait nicht, oder, bei wenigen Klonen, nur ganz schwach zu sehen war.

3.1.3.8 Identifizierung der positiven Klone

Von den ursprünglich 43 untersuchten positiven Klonen haben sich 2 Klone in den Tests auf Galaktoseabhängigkeit und 10 Klone in den Hefepaarungstests als falsch positiv herausgestellt. Die Genbankplasmide der restlichen 31 Klone wurden weiter untersucht. Um die Größe der eingefügten Genbank–DNA abzuschätzen, wurden die isolierten pJG4-5 Genbankplasmide nach Aufreinigung mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *Xho I* geschnitten und auf einem DNA-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Es ergaben sich Insertlängen zwischen 750 und 2600 bp.
Die Genbank-Fragmente wurden mit den Primern 5´tf und 3´tf sequenziert. Diese Primer binden 5´ bzw. 3´ des Genbank-Fragmentes auf dem Genbank-Vektor. Dadurch wird das

Genbank-Fragment vom 5` und 3` -Ende ausgehend sequenziert (siehe Abb. 3-7, (3)). Die erhaltenen Sequenzdaten wurden per Internet mit dem Computerprogramm BLAST Search des „National Center of Biotechnology Information, NCBI“ (61) auf Homologien mit der Gendatenbank verglichen. Das Ergebnis zeigt Tabelle 3-1.

Tabelle 3-1 *Ergebnis der 31 indentifizierten positiven Klone*

Sequenzierergebnis	Anzahl der Klone	Subgruppen nummer	Anzahl der Klone einer Subgruppe
Rac1	**17**	1	14
		2	1
		3	1
		4	1
Snk i.p.	**11**	1	5
		2	2
		3	1
		4	1
		5	1
		6	1
Mus musculus spindlin	**3**	--	--

17 Genbankplasmide enthielten die GTPase Rac1, die zu der Familie der kleinen Rho-GTPasen gehört. In elf Genbankplasmiden war das Gen für das Interaktionsprotein (i.p.) der Serin / Threonin-Kinase Snk enthalten. Snk ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. In drei Genbankplasmiden befand sich das Maus-Gen *Mus musculus spindlin*. Die Sequenzierung ergab, dass die Rac1, Snk i.p. und *Mus musculus spindlin* Gene, entsprechend der Konstruktion der Genbank, am 5´ bzw. 3´ Ende in unterschiedlich langer Weise von chromosomaler DNA flankiert sind, ehe die *EcoRI* bzw. *Xho I* Schnittstelle des Zielvektors folgt (siehe Abb. 3-7, (2)). Dies bewirkt eine unterschiedliche Länge der Rac1 bzw. Snk i.p. enthaltenden Einschübe, worauf die Einteilung in Subgruppen erfolgte. Die einzelnen Klone einer Subgruppe sind identisch.

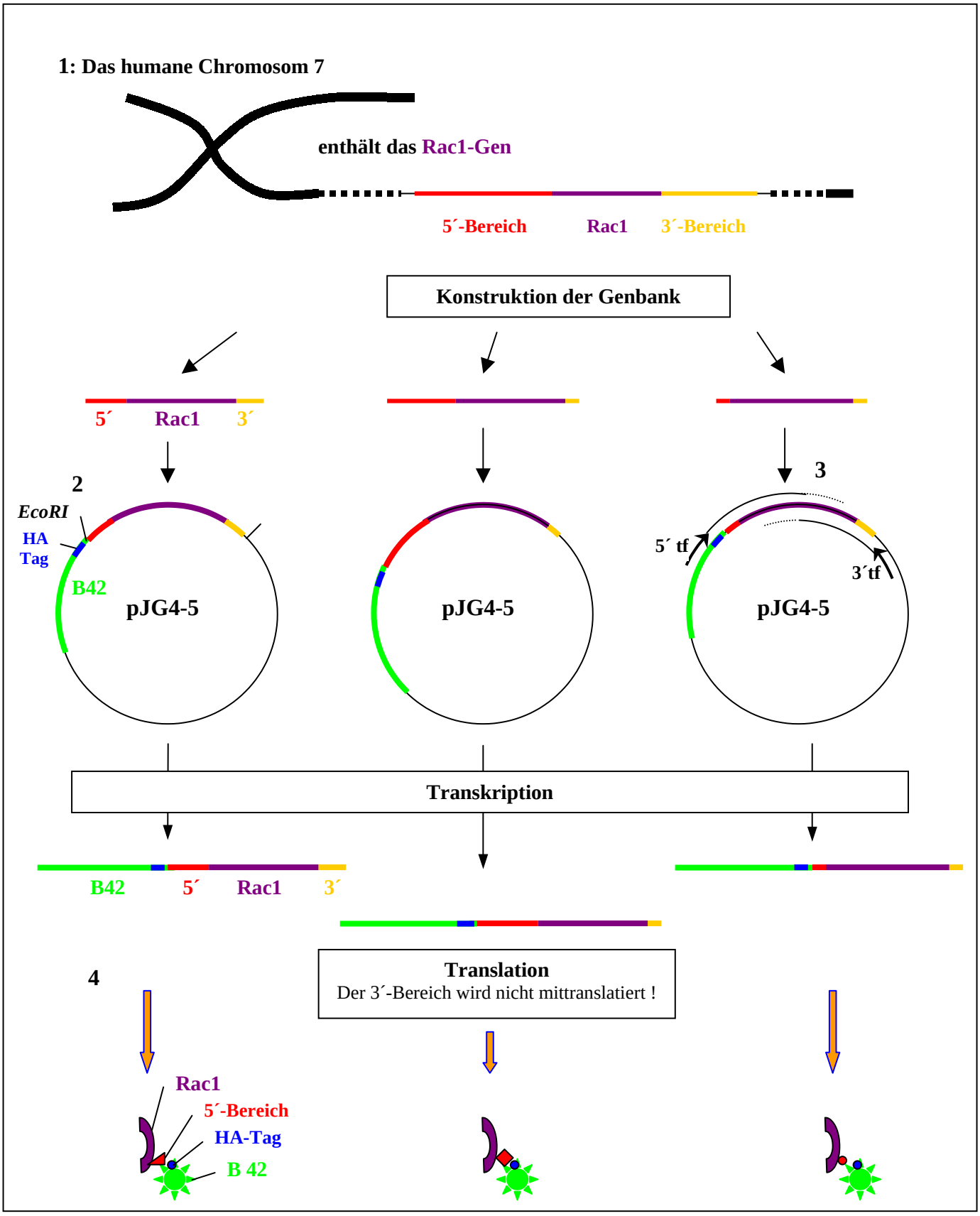

Abbildung 3-7 Der Genbank-Einschub (hier Rac1) ist im Genbankplasmid am 5´ bzw. 3´ -Ende von unterschiedlich langen Bereichen chromosomaler DNA flankiert.
1: Rac1 ist im Chromosom am 5´und am 3´-Bereich von chromosomaler DNA umgeben. **2:** Lage der Restriktionsschnittstellen und des HA-Tags im Vergleich zum B42-Gen und Genbank-Einschub. **3:** Die Genbank-Einschub Primer 5´ tf und 3´ tf binden im Vektorbereich und ermöglichen so die Sequenzierung bzw. PCR des Genbank-Einschubes. **4:** Im Gegensatz zum 5´ -Bereich wird der 3´ -Bereich aufgrund des Stop-Kodons des Rac1 Genes nicht mittranslatiert.

Da der 5´ -Bereich zwischen der dem HA-Tag und dem Start-Kodon des Genbank-Einschubes liegt, wird dieser Bereich mittranslatiert. Dieser Bereich ist bei einer Rac1-Subgruppe bis zu 60 Aminosäuren groß wurde in den Abbildungen des Kapitels 2.2.3 aus didaktischen Gründen nicht dargestellt. Im Gegensatz dazu wird der 3´ gelegene Bereich, aufgrund des Stop-Kodons des Genbank-Fragmentes, nicht mittranslatiert (siehe Abb 3-7, (4)).

Alle Rac1 enthaltenden Klone beinhalteten in ihrem Genbank-Einschub das vollständige Rac1 Gen. Demgegenüber enthaltenden nicht alle Snk i.p. -Subgruppen das Vollständige Snk i.p. -Gen (siehe Abb. 3-8). In zwei Klonen (Subgruppen Sg5 und Sg6) fehlen die ersten 17 N-terminalen Aminosäuren, während einem anderem (Sg3) sieben und einem weiterem Klon vier (Sg4) N-terminale Aminosäuren fehlen. Sieben Klone (Sg1, Sg2) enthielten das vollständige Snk i.p. (siehe Abb 3-8). Diese Daten lassen darauf schließen, dass die N-terminalen 17 Aminosäuren von Snk i.p. für die Two-Hybrid Interaktion mit YopO nicht essentiell sind.

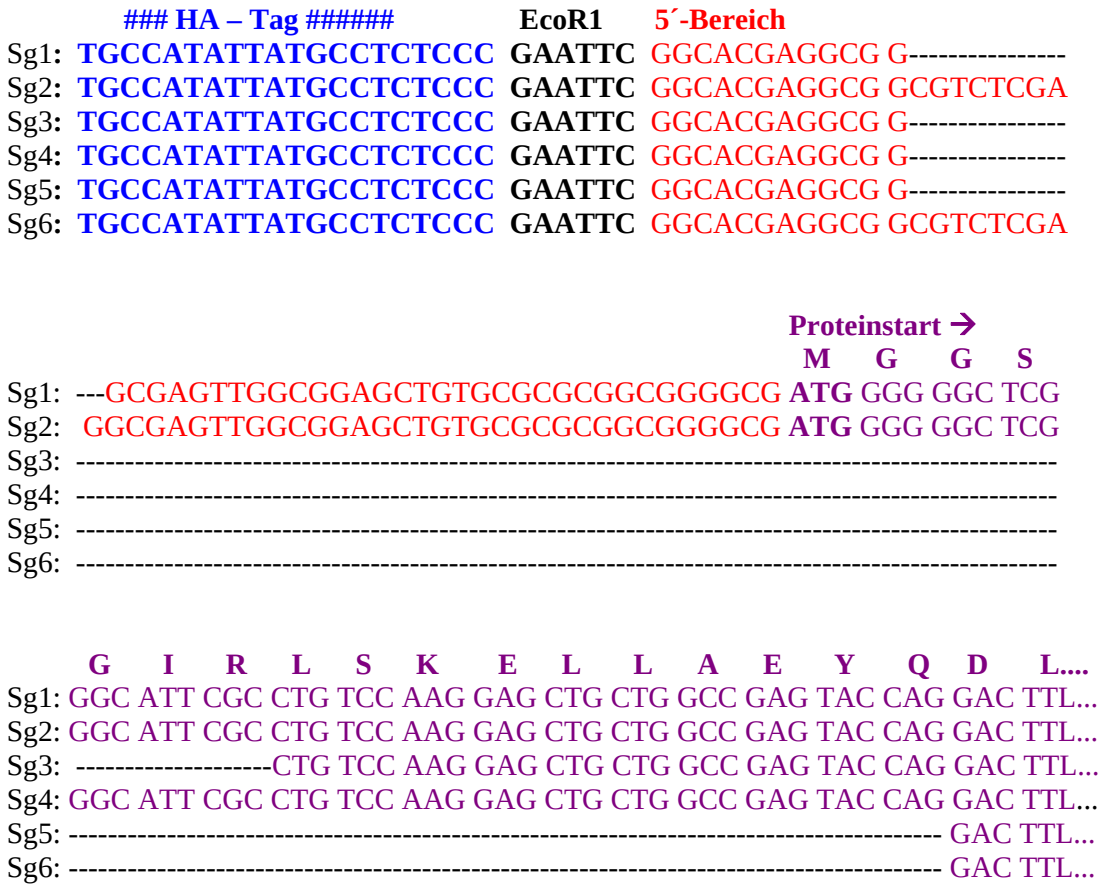

Abbildung 3–8 Darstellung des 5´ -Bereiches der Snk i.p.-Subgruppen.
Die Snk i.p. enthaltenden Genbankplasmide wurden sequenziert und miteinander verglichen. Die Einteilung in Subgruppen (Sg) erfolgte aufgrund von Differenzen der DNA-Sequenz im 5`- und Protein-Bereich. Die Subgruppen Sg1 und Sg2 enthalten das vollständig Snk i.p.–Gen, während den Subgruppen Sg5 und Sg6 17

N-terminale Aminosäuren fehlen. Die Buchstabenerklärung für Basen und Aminosäuren ist im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

Drei Klone enthielten Einschübe des *Mus musculus spindlin* –Genes. Die 5´ bzw. 3´-Bereiche dieser Einschübe waren einheitlich. Deshalb ließen sich keine Untergruppen bilden.

3.2 Prüfung auf Interaktion von weiteren Mitgliedern der Rho–Familie mit YopO / YpkA im Yeast Two–Hybrid System

Rac1 gehört neben Rac2, RhoA und Cdc42 zur Rho-Familie, einer Gruppe von kleinen GTP-bindenden Proteinen, die der Ras Superfamilie angehören (22). Diese kleinen G-Proteine sind in komplexer und unvollkommen verstandener Weise u.a. an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt (35). Aufgrund der relativ großen Sequenzhomologien innerhalb der Rho-Familie, stellt sich die Frage, ob andere Familienmitglieder wie RhoA und Cdc42 ebenfalls eine Interaktion mit YopO im Yeast Two–Hybrid System aufweisen. Es ist außerdem von Interesse, ob auch das zu YopO analoge Effektorprotein YpkA aus *Y. pseudotuberculosis* zu Mitgliedern der Rho-Familie eine Affinität besitzt. Als weiterer Köder sollte neben YopO und YpkA auch die Deletionsmutante von YpkA, ΔYpkA, eingesetzt werden. ΔYpkA hat durch Deletion der Aminosäuren 207 bis 388 die Kinase-Domäne verloren und weist deshalb keine autophosphorilierende Aktivität auf (30).
Durch Austausch von Glycin durch Valin an Aminosäureposition 12 des Rac1-Proteins, verliert die GTPase ihre Phosphatase-Aktivität. Dadurch entsteht die ständig aktive Rac1V12–Mutante. Die Überprüfung einer Interaktion von YopO/YpkA mit der Rac1V12-Mutante im Two-Hybrid System ist ein erster Schritt zur Klärung der Frage, ob die Interaktion von YopO bzw. YpkA mit Rac1 abhängig vom Funktionszustand der GTPase ist.
Für die erwähnten Untersuchungen mußten zuvor die in Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Klonierungen vorgenommen werden.

3.2.1 Klonierung von Rac1, RhoA, Cdc42 und Rac1V12 in den Zielvektor pJG4-5

Wie in Kapitel 3.1.3.8 beschrieben, enthalten die positiven Rac1-Klone zwischen dem HA-Tag und dem Start-Kodon von Rac1, einen mehr oder weniger großen 5´ -Bereich aus chromosomaler DNA, der mittranslatiert wird und das Two-Hybrid Ergebnis beeinflussen könnte. Um sicherzustellen, dass die Two-Hybrid Interaktion unabhängig von dem mittranslatiertem 5´ -Bereich ist, sollte das isolierte Rac1-Gen in den Zielvektor pJG4-5 kloniert werden. Mit Hilfe der Primer REU und RXD wurde eine PCR eines Rac1-enthaltenden Genbankplasmides durchgeführt. Das so vom 5´ -Bereich isolierte Rac1-Gen wurde nach Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *Xho I* in den ebenso verdauten und aufgereinigten Zielvektor pJG4-5 kloniert.

Mit PCR–Technik wurde Cdc42 aus dem Vektor pGEX2TK–Cdc42 (39) vervielfältigt. Als Primer dienten 42EU und 42XD. RhoA wurde aus dem Vektor pGEX2T–RhoA (82) mit den Primern RhEU und RhXD amplifiziert. Die ständig aktive Rac1–Mutante Rac1V12 wurde mit Hilfe der Primer REU und RXD aus dem Vektor pGEX2T-Rac1V12 (39) gewonnen.

Die erhaltenen PCR Produkte wurden in den mit *EcoRI* und *Xho I* verdauten Zielvektor pJG4-5 ligiert und in den *E. coli*-Stamm DH5α elektroporiert. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten und mit *EcoRI* und *Xho I* verdauten Plasmide ist in Abb. 3-9 gezeigt.

Die DNA–Sequenz der Konstrukte wurde durch Sequenzierung überprüft. Als Primer dienten 5´tf, 3´tf, Rac1 und Rac2. Die Rac1- , RhoA- , Cdc42- und Rac1V12-Gene waren mutationsfrei und lagen im Leseraster zur Aktivationsdomäne B42. Am Rac1V12-Gen konnte als 35. Base Thymin nachgewiesen werden (Rac1 enthält an dieser Stelle die Base Guanin). Dadurch kodiert das 12. Triplett von Rac1V12 die hydrophobe Aminosäure Valin anstelle von Glycin.

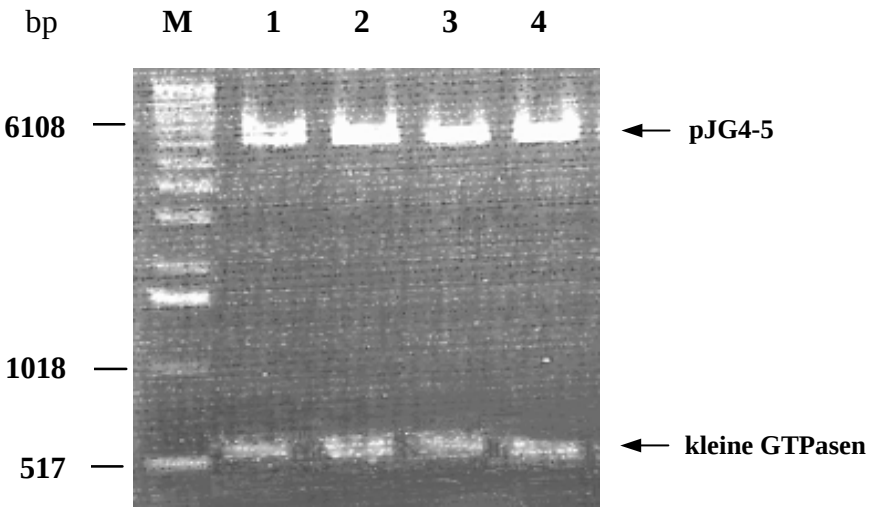

Abbildung 3-9 Gelelektophorese der verdauten pJG4-5–GTPase Konstrukte.

Die pJG4-5-GTPase Konstrukte wurden aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *Xho I* verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. **M:** Markerbanden **1**: pJG4-5–Rac1, **2**: pJG4-5–RhoA, **3**: pJG4-5–Cdc42, **4**: pJG4-5–Rac1V12

3.2.2 Klonierung von YpkA und ΔYpkA in den Ködervektor pEG202

Aus dem *Y. pseudotuberculosis* Wildtypstamm YPIII (pIB102) wurde das YpkA-enthaltende Virulenzplasmid isoliert. Aus dem Stamm YPIII (pIB44) wurde das Plasmid pIB44 isoliert. pIB44 enthält das Gen für die YpkA–Mutante ΔYpkA. Mit Hilfe der Primer PKNU2 und PKXD2 wurden YpkA und ΔYpkA aus den isolierten Plasmiden amplifiziert und in die *Nco I* und *Xho I* Schnittstellen von pEG202 ligiert. Ein Verdau der Konstrukte ist in Abb. 3-1, Bande 4 und 5, gezeigt. Die beiden Konstrukte wurden mit dem Primer 5` bf ansequenziert um das Leseraster zu kontrollieren. Hierbei konnte das richtige Leseraster bestätigt und Mutationen der ersten 400 bp ausgeschlossen werden.

3.2.3 Hefepaarungstest von Mitgliedern der Rho–Familie mit YopO, YpkA und ΔYpkA

Mit Paarungsversuchen sollte festgestellt werden, ob eine Yeast Two–Hybrid Interaktion zwischen Mitgliedern der Rho–Familie und YopO, YpkA und ΔYpkA existiert. In den Akzeptorstamm RFY206 wurden die jeweiligen Köder– und Reporterplasmide transformiert. Dieser wurde mit dem Donorstamm EGY48, in den die jeweiligen Zielplasmide transformiert wurden, gepaart (siehe Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2 Ergebnis der X-Gal–Versuche nach Paarung der gelisteten Akzeptor – und Donorstämme.

Akzeptorstamm RFY206 mit	**Donorstamm EGY48 mit**	**Ergebnis des X-Gal – Versuchs nach der Hefepaarung**
pEG202-YopO und pSH17-4	pJG4-5-Rac1	**Blauverfärbung**
	pJG4-5-RhoA	**Blauverfärbung**
	pJG4-5-Cdc42	keine Anfärbung
	pJG4-5-Rac1V12	keine Anfärbung
pEG202-YpkA und pSH17-4	pJG4-5-Rac1	**Blauverfärbung**
	pJG4-5-RhoA	**Blauverfärbung**
	pJG4-5-CDC42	keine Anfärbung
	pJG4-5-Rac1V12	keine Anfärbung
pEG202-ΔYpkA und pSH17-4	pJG4-5-Rac1	keine Anfärbung
	pJG4-5-RhoA	keine Anfärbung
	pJG4-5-CDC42	keine Anfärbung
	pJG4-5-Rac1V12	keine Anfärbung
Positivkontrolle		**Blauverfärbung**
Negativkontrolle		keine Anfärbung

Als Positivkontrolle diente EGY48 mit pJG4-5-Rac1 (Isolat aus Klon 36, nicht umkloniert), welches mit dem Akzeptor RFY206 mit pEG202-YopO und pSH17-4 gepaart wurde. Als Negativkontrolle wurde EGY48 mit pJG4-5-Rac1, welches mit dem Akzeptor RFY206 mit pRFHM1 und pSH17-4 gepaart wurde, gewählt. Es ergab sich eine Blauverfärbung im X-Gal-Versuch für Klone, die YopO bzw. YpkA als Köder und Rac1 bzw. RhoA als Zielprotein enthielten. Somit weisen diese Klone eine Two-Hybrid Interaktion auf, denn sie sind in der Lage den β-Galaktosidase Reporter zu induzieren. Klone, die Cdc42 bzw. Rac1V12 als Zielprotein oder ΔYpkA als Köderprotein enthielten, waren nicht in der Lage den β-Galaktosidase Reporter zu induzieren (zeigten keine Blauverfärbung im X-Gal Versuch) und weisen somit keine Two-Hybrid Interaktion auf.

Zur Prüfung auf Induktion des *Leu2*–Reporters wurden folgende Plasmide in den Hefestamm EGY48 transformiert (Tabelle 3-3):

Tabelle 3—3. EGY48 Transformanden mit denen ein Test auf Induktion des Leuzin-Reporters durchgeführt wurde.

EGY48
• pEG202-YopO, pJG4-5-Rac1 • pEG202-YopO, pJG4-5-RhoA • pEG202-YopO, pJG4-5-Cdc42 • pEG202-YopO, pJG4-5-Rac1V12 • pEG202-YpkA, pJG4-5-Rac1 • pEG202-YpkA, pJG4-5-RhoA • pEG202-YpkA, pJG4-5-Cdc42 • pEG202-YpkA, pJG4-5-Rac1V12 • pEG202-ΔYpkA, pJG4-5-Rac1 • pEG202-ΔYpkA, pJG4-5-RhoA • pEG202-ΔYpkA, pJG4-5-Cdc42 • pEG202-ΔYpkA, pJG4-5-Rac1V12 • Positivkontrolle: pEG202-YopO, pJG4-5-Rac1 (Isolat K36) • Negativkontrolle: pRFHM1, pJG4-5-Rac1

Die Induktion des Leucin-Reporters wurde durch vergleichenden Ausstrich auf Leucin-freiem Hefemedium untersucht (Abb. 3-10).

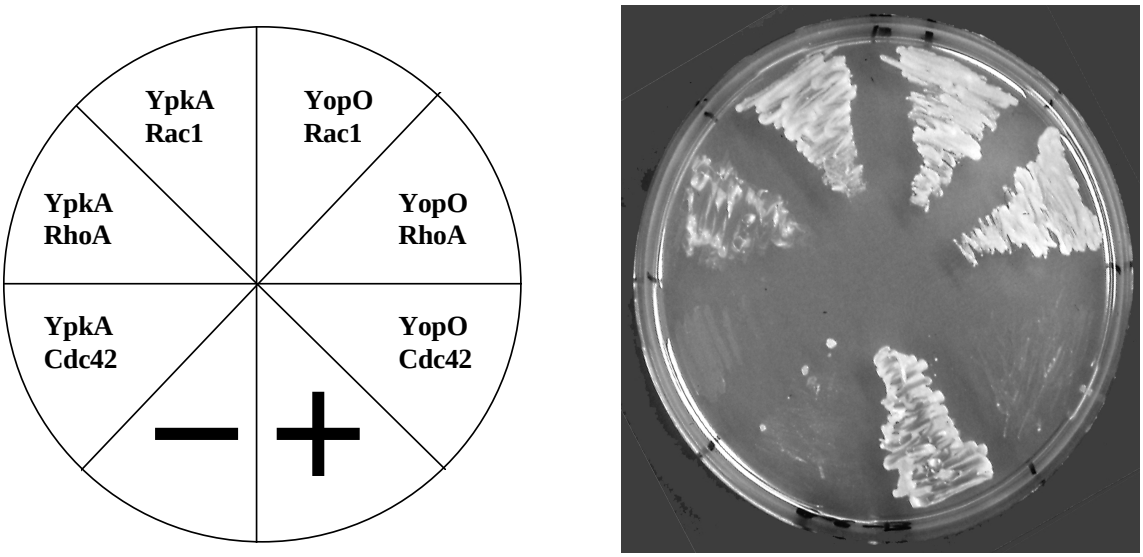

Abbildung 3-10 Prüfung der Induktion des *Leu2*-Reporters.

Die in Tabelle 3-3 aufgeführten Klone wurden auf eine YNB(Gal) –His, –Trp, –Leu Platte ausgestrichen und für 48 h inkubiert. Nur die Rac1 und RhoA enthaltenden Klone wuchsen auf der Leuzin-defizienten Platte, unabhängig davon ob sie YopO oder YpkA als Köderprotein enthielten. Die ΔYpkA enthaltenden Klone sowie alle Rac1V12 enthaltenden Klone zeigten kein Wachstum (Daten nicht gezeigt). **+:**

Konsistent mit den Ergebnissen X-Gal-Versuche, ergab sich nur für die pJG4-5-Rac1 und pJG4-5-RhoA enthaltenden Klone ein Wachstum, unabhängig davon, ob der Köder YopO oder YpkA ist. Daraus folgt, dass diese Klone eine Two-Hybrid Interaktion aufweisen, denn sie sind in der Lage das *Leu2*-Reportergen zu induzieren. Die Cdc42 oder Rac1V12 als Zielprotein enthaltenden Klone zeigten kein Wachstum und waren somit nicht in der Lage das *Leu2*-Reportergen zu induzieren. Klone die ΔYpkA als Köderprotein enthielten zeigten kein Wachstum, unabhängig davon, ob sie Rac1, RhoA, Cdc42 oder Rac1V12 als Zielprotein enthielten (Daten nicht gezeigt).

3.2.4 Überprüfung der Expression der Zielproteine mit einem Immunoblot

Cdc42 und Rac1V12 zeigten in den Interaktions-Tests mit YpkA bzw. YopO keine Aktivierung der Reportergene *LacZ* und *Leu2*. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass YopO bzw. YpkA nicht mit Cdc42 oder Rac1V12 interagiert. Es wäre aber auch denkbar,

dass die GTPasen (v.a. das sich ständig im aktiven Zustand befindende Rac1V12) für die Hefezelle so toxisch sind, dass diese herunterreguliert, abgebaut oder erst gar nicht exprimiert werden. In diesem Fall müsste es, auch bei Interaktion zwischen Köder- und Zielprotein, nicht zu einer Induktion der Reportergene kommen. Aus diesem Grund sollte die Expression der Zielproteine überprüft werden. Hierfür wurde ein Immunoblot auf die Zellysate der interagierenden bzw. nicht–interagierenden Hefezellklone durchgeführt. Wie in Abb. 2-2 ersichtlich, enthält der Vektor pJG4-5 eine HA-Domäne zwischen der Aktivierungsdomäne B42 und dem Zielgen. Mit einem Westernblot des Hefezellysates kann das Vorhandensein des Zielproteins, über den Nachweis der HA–Domäne, gezeigt werden.

Nach 12 stündiger Inkubation in galaktosehaltigem Selektivmedium zur Induktion des Gal1-Promotors wurde ein Zellysat der in Tabelle 3-4 aufgeführten Klone aus dem Hefepaarungstest (Kapitel 3.1.3.7) erstellt. Das Zellysat wurde in einem SDS-Proteingel elektrophoretisch aufgetrennt, und die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurde eine Immunodetektion mit Anti-HA-Antikörpern durchgeführt um die B42-GTPase Fusionsproteine darszustellen (Abb. 3-11).

Tabelle 3-4 Aus dem Zellysat der folgenden Klone sollte das B42-GTPase Fusionsprotein nachgewiesen werden.

RFH206 mit pEG202-YopO, pSH17-4 und	
• pEG202-YopO, pJG4-5-Rac1	• pEG202-YpkA, pJG4-5-Rac1
• pEG202-YopO,pJG4-5-RhoA	• pEG202-YpkA, pJG4-5-RhoA
• pEG202-YopO, pJG4-5-Cdc42	• pEG202-YpkA, pJG4-5-Cdc42
• pEG202-YopO, pJG4-5-Rac1V12	• pEG202-YpkA, pJG4-5-Rac1V12

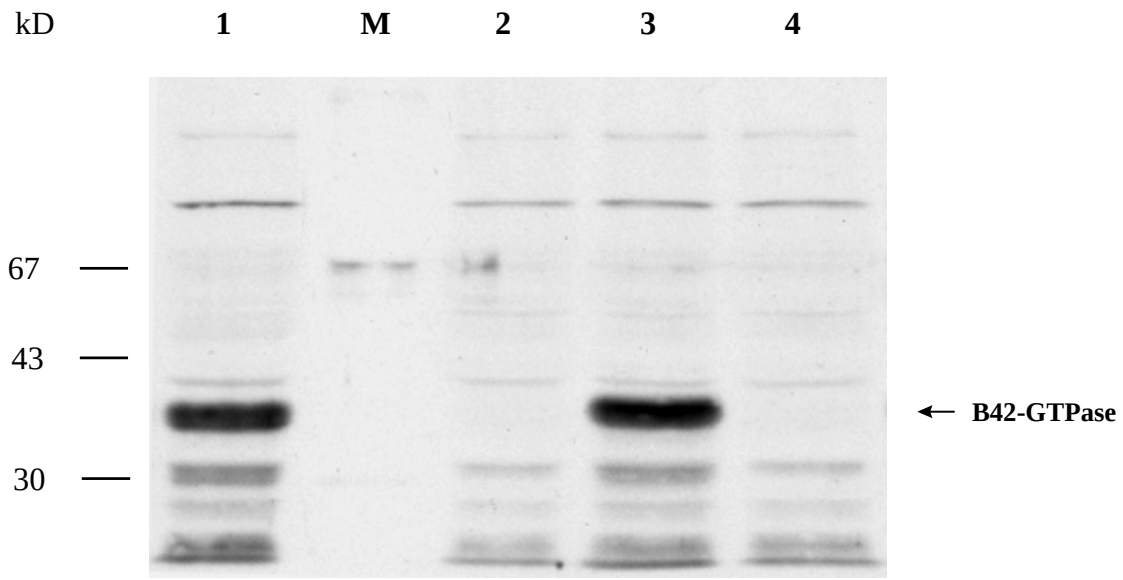

Abbildung 3-11 Anti-HA-Westernblot zur Darstellung der B42-GTPase-Fusionsproteine

Es wurde ein Zellysat der in Tabelle 3-4 aufgeführten Hefeklone erstellt und in einem SDS-Proteingel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulsemembran transferiert und eine Immunodetektion mit Anti-HA-Antikörpern wurde durchgeführt. Für die B42-Rac1 und B42-Cdc42 Fusionsproteine zeigten sich deutliche Banden. B42-RhoA und B42-Rac1V12 konnten nicht im Zellysat der Hefezelle nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein identisches Ergebnis für YopO und YpkA enthaltende Klone. **M**: Markerbanden **1**: B42-Rac1, **2**: B42-RhoA, **3**: B42-Cdc42, **4**: B42-Rac1V12.

Der Immunoblot zeigte lediglich für Rac1 und Cdc42 deutliche Signale. Die Existenz des RhoA- und des Rac1V12- Fusionsproteines konnte nicht nachgewiesen werden. Der fehlende RhoA-Nachweis erstaunt in Anbetracht der positiven Two-Hybrid Interaktion, schließt aber das Vorhandensein des B42-RhoA Fusionsproteins nicht aus (siehe Kapitel 4.4). Für Cdc42 kann man folgern, dass es trotz Expression keine Interaktion mit YopO und YpkA im Yeast Two-Hybrid System zeigt.

Zusammenfassend können aus den Ergebnisse der Kapitel 3.2.3 und 3.2.4 folgende Aussagen getroffen werden.

Es besteht eine Yeast Two-Hybrid Interaktion zwischen den Proteinen

YopO und Rac1	YpkA und Rac1
YopO und RhoA	YpkA und RhoA

Es kann keine Yeast Two-Hybrid Interaktion zwischen den Proteinen

YopO und Cdc42	YpkA und Cdc42
ΔYpkA und Rac1	ΔYpkA und RhoA
ΔYpkA und Cdc42	

nachgewiesen werden.

Eine Interaktion zwischen

YopO und Rac1V12	YpkA und Rac1V12

kann weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

3.3 Koimmunopräzipitation von RhoA und Rac1 aus infizierten COS – Zellen

Um die Interaktion zwischen YopO / YpkA mit Rac1 und RhoA in einem *in vivo* Modell zu untersuchen, wurden COS–Zellen mit der YpkA-überexprimierenden Mutante WA-C (pTRANS, pCJYE138-YpkA) infiziert bzw. uninfiziert gelassen. Die Verwendung von WA-C (pTRANS, pCJYE138-YpkA) ist notwendig, da der Wildtypstamm YpkA nur in einem sehr geringem Maße ins Wirtszellzytoplasma transloziert (34). In einem Vorversuch konnte eine starke Translokation der YopE(138)-YpkA Fusion in das COS-Zellzytoplasma gezeigt werden. Nach 2 h Infektion wurde jeweils ein Zellysat erstellt, aus dem mit Anti–YpkA–Antikörpern YpkA präzipitiert wurde. Zellysat sowie das Präzipitat wurden auf ein SDS–Proteingel geladen und ein Westernblot durchgeführt. Die erhaltenen Nitrozellulose–Membranen wurden in einem Immunodetektionsverfahren mit den Antikörpern Anti–YpkA, Anti–RhoA, Anti–Rac1 und Anti-CDC42 inkubiert (siehe Abb. 3-12).

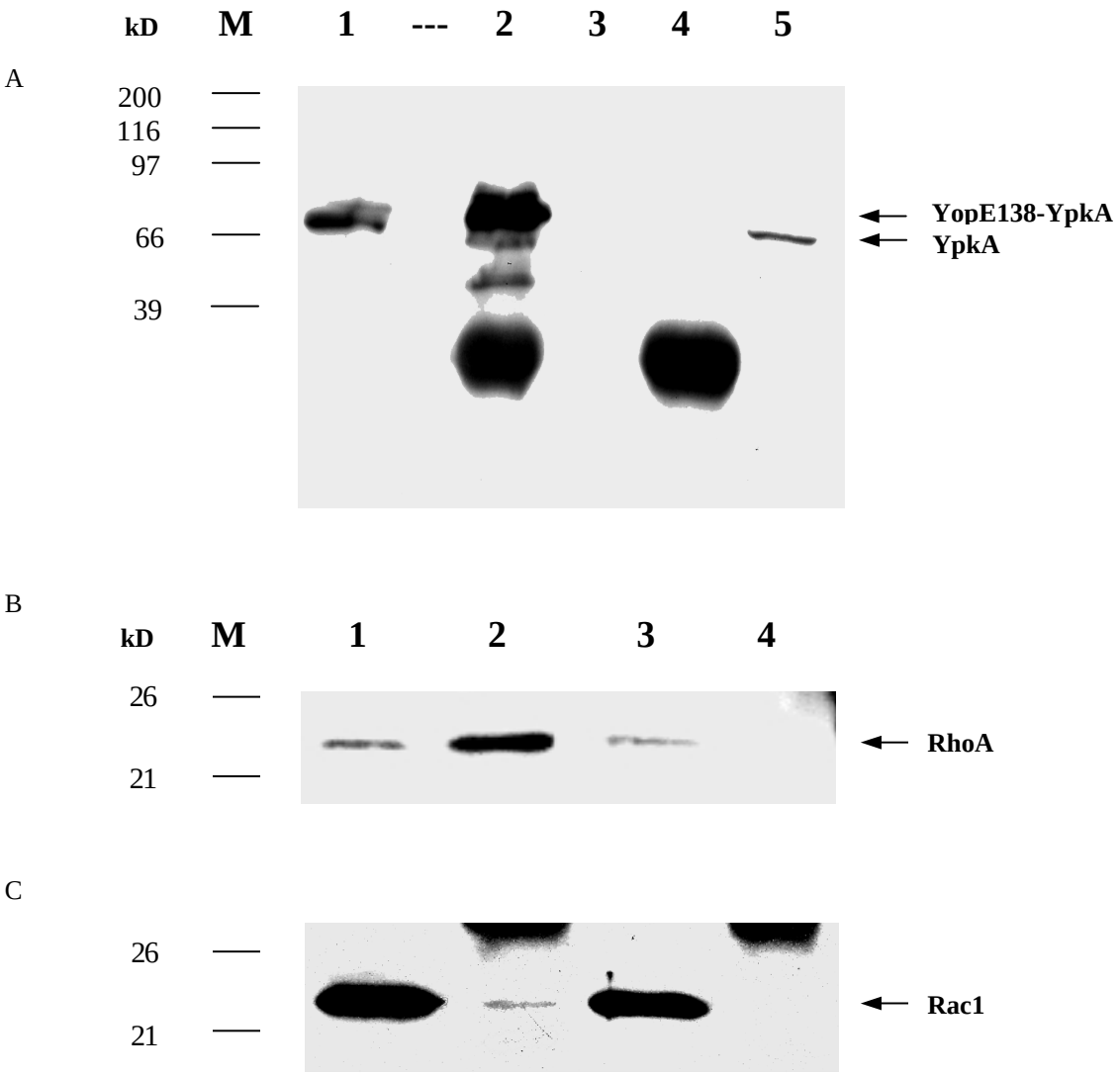

Abbildung 3-12 Immunopräzipitation von YpkA, RhoA und Rac1 mit Anti-YpkA-Antikörpern aus einem Zellysat infizierter COS-Zellen.

COS-Zellen wurden mit WA-C (pTRANS, pCJYE138-YpkA) für 2 h infiziert bzw. uninfiziert gelassen. Nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und das Lysat mit Anti-YpkA-Antikörpern präzipitiert. Zellysat sowie das Präzipitat wurden auf ein SDS-Proteingel geladen und ein Westernblot durchgeführt. Mit den erhaltenen Nitrozellulosemembranen wurde ein Immunodetektioneverfahren mit Anti-YpkA- (Bild **A**), Anti-RhoA- (Bild **B**) und Anti-Rac1-Antikörpern (Bild **C**) durchgeführt. **1:** Zellysat der infizierten Zellen. **2:** Präzipitation des Zellysates der infizierten Zellen. **3:** Zellysat der uninfizierten Zellen. **4:** Präzipitation des Zellysates der uninfizierten Zellen. **5** (nur in Bild A): Rekombinantes YpkA als Kontrolle.
Bild A: Man erkennt deutliche YpkA-Signale aus dem Zellysat der infizierten Zellen (1) sowie aus der Präzipitation dieses Zellysates (2). Das Zellysat der uninfizierten Zellen (**3**) zeigt ebenso wie dessen Präzipitat (4) keine YpkA-Banden. Beachte das das rekombinante YpkA etwas schneller Richtung Anode wandert als YopE138-YpkA.
Bild B: Der Anti-RhoA-Immunoblot zeigt ko-präzipitiertes RhoA aus dem Zellysat der infizierten COS-Zellen (Bande 2), während sich aus dem Lysat der uninfizierten Zellen RhoA nicht mit Anti-YpkA-Antikörpern präzipitieren ließ (Bande 4).
Bild C: Anti-Rac1-Immunoblot (analog zu B) zeigt, dass sich Rac1 nur in Gegenwart von transloziertem YpkA mit Anti-YpkA-Antikörpern präzipitieren lässt (Bande 2 und 4). Beachte, dass sich RhoA in einem deutlich stärkeren Maße als Rac1 koimmunopräzipitieren lässt (vergl. Bande 2, Bild A und B).

Auf dem Anti–YpkA Blot (Abb. 3-12, A) erkennt man YpkA–Signale des Zellysates der infizierten Zellen (Bande 1) und der Präzipitation dieses Lysates (Bande 2). Dies besagt, dass YopE(138)–YpkA von Yersinien in das COS–Zellzytoplasma transloziert wird, und dass YopE(138)–YpkA in einer Präzipitation des Zellysates an Anti–YpkA–Antikörper bindet und nachgewiesen werden kann. Bei nicht-infizierten Zellen erhält man weder aus deren Lysat (Bande 3), noch aus deren Präzipitation (Bande 4) YpkA-Signale. In Bande 5 ist rekombinantes YpkA als Kontrolle aufgetragen. Es wandert im elektrischen Feld aufgrund der fehlenden 138 YopE Aminosäuren etwas schneller in Richtung Anode als die YopE(138)–YpkA Fusion.

RhoA und Rac1 sind zelluläre Proteine. Deshalb sollten sie im Lysat infizierter sowie nicht infizierter Zellen vorhanden sein. Auf den Anti–RhoA (Abb. 3-12, B) bzw. Anti–Rac1 Blots (Abb. 3-12, C) sind die entsprechenden Banden bei etwa 24 kDa sichtbar (jeweils Banden 1 und 3). In der Präzipitation des Zellysates infizierter Zellen (Bande 2) läßt sich RhoA (B) und Rac1 (C) über Anti-YpkA-Antikörpern koimmunopräzipitieren. Aus dem Zellysat der uninfizierten Zellen läßt sich demgegenüber kein RhoA (B, Bande 4) bzw. Rac1 (C, Bande 4) präzipitieren. Das bedeutet, dass sich transloziertes YopE(138)–YpkA an Anti-YpkA-Antikörper bindet, und dass sich daran zelluläres RhoA bzw. Rac1 bindet und präzipitieren läßt. Es fällt auf, dass sich RhoA in einem stärkeren Maße als Rac1 ko-präzipitieren läßt (vergl. Bande 2 in B und C).

Mit der gleichen Nitro-Zellulosemembran wurde einen Immunodetektion mit Anti-Cdc42-Antikörper durchgeführt. Es konnte Cdc42 weder im Zellysat der infizierten noch der uninfizierten Zellen sowie deren Präzipiate nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies besagt, dass entweder zuwenig zelluläres Cdc42 vorhanden ist, oder dass der Anti-Cdc42-Antikörper Cdc42 nur insuffizient erkennt.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde versucht die intrazellulären Bindungspartner für die *Yersinia* Effektorproteine YopM und YopO/YpkA zu identifizieren. Als orientierende Screening-Methode wurde das Yeast Two-Hybrid System gewählt, für das sich YopM als nicht geeignet herausstellte. Im Gegensatz dazu lieferte die Yeast Two-Hybrid Untersuchung von YopO vielversprechende Ergebnisse, die sich durch Koimmunopräzipitation aus *Yersinia*-infizierten COS-Zellen bestätigen ließen.

4.1 YopM

Es wurde zunächst versucht, YopM als Köderprotein für eine Yeast Two-Hybrid-Untersuchung zu verwenden. Es stellte sich jedoch heraus, dass YopM als Köderprotein die Transkription der Reportergene aktiviert. Unter der Vorstellung, die transkriptionsauslösende Domäne auszusparen, wurde nur ein Teilbereich von YopM (YopM-Fragment) an LexA fusioniert. Es zeigte sich jedoch, dass auch das YopM-Fragment die Transkription der Reportergene aktiviert. Durch Sequenzierung konnte ausgeschlossen werden, dass die Ursache für die Autoaktivierung in einer Mutation oder Leserasterverschiebung der Ködergene lag. Die Fusionsproteine LexA–YopM und LexA–YopM–Fragment konnten somit in dieser Form nicht für eine Yeast Two-Hybrid–Untersuchung herangezogen werden.

YopM weist Homologien zum *Shigella flexneri* IpaH (40) und *Rhizobium meliloti* y4fR (27) auf, doch ist von diesen Proteinen bis heute weder Funktion noch Interaktionspartner bekannt. YopM zeigt ebenfalls Homologien zur α Kette des Plättchenmembran-Glycoproteins 1b (GP1bα) (66). Da GP1bα in der Lage ist, Thrombin und den von Willebrand Faktor zu binden, wurden YopM extrazelluläre Effekte in der Pathogenese zugeschrieben (56). Doch dies erscheint fraglich, da zum einen keine Thrombin Bindungsstellen auf YopM gefunden werden konnten. Zum anderen sind die GP1bα-Domänen, die mit Thrombin interagieren nicht zu YopM homolog (20). Boland et al. konnten hingegen durch Infektion von Makrophagen mit Yersinien, die ein YopM–Cya Hybridprotein exprimieren, zeigen, dass YopM in das Makrophagenzytosol transloziert wird (12). In *Y. pestis* konnte kürzlich die nukleäre Lokalisation von YopM gezeigt werden

(77). Dies legt die Vermutung nahe, dass YopM an der Regulation von Genen beteiligt sein könnte. So könnte YopM als Transkriptionsfaktor für bestimmte Wirtsgene fungieren und somit eine intrinsische transkriptionsinitiierende oder auch hemmende Aktivität aufweisen. Ein Indiz für die transkriptionsinitiierende Aktivität könnte die in dieser Arbeit gezeigte, autoaktivierende Eigenschaft von YopM im Yeast Two-Hybrid System sein. Viele bekannte transkriptionsaktivierende Proteine, wie auch die Aktivationsdomäne B42, besitzen eine saure bzw. negativ geladene Domäne (2). Da auch YopM saure Domänen enthält, scheint die Rolle von YopM als Transkriptionsfaktor möglich.

4.2 YopO / YpkA

Das in dieser Arbeit verwendete Gen für YopO entstammt dem Virulenzplasmid des *Y. enterocolitika*-Stammes WA-314 (Serotyp O:8). Die Sequenzierung des pEG202–YopO Konstruktes ergab die in Tabelle 4-1 dargestellten Unterschiede zu der in der Genbank veröffentlichten YopO-Sequenz des Stammes O:9 (pYVA2635) (7).

Tabelle 4-1 Unterschiede in der YopO Gensequenz zwischen dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm WA-314 (O:8) und dem veröffentlichten Stamm A2635 (O:9) (7).

Position Base / Aminosäure	A2635 (O:9) Base / Aminosäure	WA-314 (O:8) Base / Aminosäure
135 / 45	C / Val	G / Val
136 / 46	G / Val	C / Leu
983 / 328	G / Ser	C / Thr
1246 / 416	A / Lys	G / Glu
1657 – 1659 / 553	- - - / -	Insertion TTT / Phe
1750 / 584	A / Thr	T / Ser
1913 / 638	T / Leu	A / Gln

Demnach gibt es, neben einer stummen Mutation, fünf Aminosäureaustausche und eine Aminosäureninsertion. Hierbei stellt sich die Frage, ob diese Veränderungen stammespeziefisch für O:8 (WA-314) sind, oder ob es sich um Klonierungsfehler (Mutationen, die z.B. durch PCR oder UV-Bestrahlung entstanden sein könnten) handelt.

Letztere können, müssen sich aber nicht, auf Funktion und Affinität des Effektorproteins auswirken. Bei drei der Aminosäuren vollzieht sich der Austausch innerhalb der gleichen Aminosäureklasse (Val → Leu, unpolar, aliphatischer Rest; Ser ↔ Thr, polar, ungeladener Rest), was wahrscheinlich keine oder nur geringe Effekte auf das Protein ausübt. Durch den Aminosäureaustausch an Position 638 erhält das WA-314 YopO eine polare Seitenkette. Insbesondere der Austausch an Position 416, bei dem das in der Zelle positiv geladene Lysin durch das negativ geladene Glutamat ersetzt wird, kann möglicherweise Auswirkungen auf Struktur und Funktion haben. Ebenso unklar bleibt die Auswirkung der Phenylalanininsertion an Position 553. Doch hier erscheint eine stammespezifische, evolutionäre Veränderung wahrscheinlich, da eine im Leseraster gelegene Insertion von genau drei Basen ein unwahrscheinliches Ereignis für einen Klonierungsfehler darstellt.
Abschließend kann nicht geklärt werden, ob bzw. in welchem Ausmaß die oben beschriebenen Veränderungen Einfluß auf Struktur, Funktion und Affinität des in dieser Arbeit verwendeten LexA–YopO Fusionsprotein nehmen.

4.3 Das Ergebnis der Yeast Two-Hybrid Filter-Untersuchung

Um das Ergebnis einer Yeast Two-Hybrid Untersuchung einschätzen und bewerten zu können, muß man sich vergegenwärtigen, dass das Yeast Two-Hybrid System mit Fusionsproteinen in einem Hefezellsystem arbeitet. Dadurch ergeben sich Fehlerquellen, die im folgendem erörtert werden sollen.
Ladungen, Konformation oder andere biochemische bzw. biophysikalische Eigenschaften des einen Fusionspartners können in Wechselwirkung mit dem anderen treten, und die Funktion bzw. Affinität der Proteine könnte dadurch verändert werden. Bei derartigen Wechselwirkungen zwischen den Fusionspartnern könnte es sich z.B. um hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen oder S—S Disulfid-Brücken handeln. Ebenso könnten andere posttranslationale Modifikationen die Funktion der für die Hefezelle fremden Fusionsproteine beeinflussen.
Eine weitere Artefaktmöglichkeit liegt in der Beschaffenheit der Genbankvektoren. Wie oben schon beschrieben, liegt zwischen der *EcoRI* Schnittstelle und dem eigentlichen Startkodon des Zielgenes eine mehr oder weniger lange Polynukleotidsquenz (bei Rac1 zwischen 30 und 180 bp). Diese aus Promotorregion-DNA bestehende Sequenz wird

zusammen mit der *EcoRI* Schnittstelle mittranslatiert, und kann daher Einfluß auf die Konformation und Funktion des Fusionsproteins nehmen.

Im Repressions–Versuch kann für das LexA–Köder Fusionsprotein die Eintrittsfähigkeit in den Kern gezeigt werden. Um für die B42-Ziel Fusionsproteine eine Kerngängigkeit zu gewährleisten, enthalten die Genbankplasmide zwischen dem Startkodon und der B42-Aktivations-Sequenz eine NLS-Sequenz (nuclear localisation site) (siehe Abb. 2-2). Die NLS-Domäne enthält eine Erkennungssequenz für Transportsysteme der Zellkernmembran und führt in der Regel zu einem gerichteten Transport der B42-Ziel-Fusionsproteine vom Zytosol in den Zellkern. Trotz NLS-Domäne kann allerdings nicht für alle B42–Ziel Fusionsproteine eine Kerngängigkeit garantiert werden. Aus diesem Grund ist damit zu rechnen, dass nicht alle transformierten und exprimierten Genbankproteine an dem Screen teilnehmen. Ebenso kann ein bestimmtes Protein nur dann an einem Genbankscreen teilnehmen und als Interaktionspartner erkannt werden, wenn es in der Genbank enthalten ist. Deshalb ist die Effektivität einer Yeast Two-Hybrid Untersuchung stark von der Qualität der eingesetzten Genbank abhängig.

All diese möglichen Fehlerquellen können erklären, weshalb relevante Zielproteine manchmal nicht mit einem Two-Hybrid Screen erkannt werden können (z.B. RhoA). Auch stellen sie eine Erklärungsmöglichkeit dar, weshalb manche Zielproteine im Yeast Two-Hybrid System eine Interaktion mit einem Köderprotein zeigen, dies aber in anderen Systemen (z.B. Immunopräzipitation) nicht tun, und umgekehrt.

Die Yeast Two-Hybrid Filter-Untersuchung mit YopO erbrachte nach der ersten Leuzin–Selektion bis zum 5. Inkubationstag 43 positive Klone. Im Verlauf der weiteren Selektion wurden 12 Klone als falsch-positiv identifiziert und nicht weiter untersucht. Die meisten der falsch-positiven Klone (10 Klone) zeigten nach Plasmidisolation und Retransformation keine Interaktion mit YopO mehr. Gründe dafür könnten in Mutationen der Hefezellen liegen, so dass diese unabhängig von einer Köder–Ziel Interaktion auf –Leuzin Medium wachsen. Bei 10^7 ausgestrichenen Zellen ist es durchaus vorstellbar, dass einige Klone solche Mutationen enthalten. Bei der Prüfung auf Galaktoseabhängigkeit der Interaktion wurden lediglich zwei Klone ausselektioniert. Einer zeigte auf Galaktose- und Glukose-Medium bei beiden Reportern eine Interaktion, was z.B. durch einen Verlust der Galaktoseabhängigkeit des Gal1 Promotors erklärbar wäre.

Die Rac1 bzw. Snk i.p. enthaltenden Plasmide der 31 identifizierten Klone erwiesen sich als nicht einheitlich. So konnten, aufgrund unterschiedlich langer Einschübe von chromosomaler DNA am 5´- und 3´- Ende von Rac1, vier unterschiedliche pJG4-5–Rac1 Plasmide (Untergruppen) ermittelt werden (siehe Tab. 3-1, Abb. 3-7). In analoger Weise liesen sich die Snk i.p. enthaltenden Genbankplasmide in sechs Untergruppen einteilen (Abb. 3-8). Demnach musste es in mindestens 4 unterschiedlichen Rac1-Klonen (bzw. mindestens 6 unterschiedlichen Snk i.p.-Klonen) zu einer Two-Hybrid Interaktion kommen. Diese Polyklonalität belegt, dass die gefischten Genbankplasmide der unterschiedlichen Untergruppen nicht einfach nur Kopien ein und desselben Klones sind. Vielmehr spricht die Polyklonalität der gefischten Genbankplasmide für die reale Existenz der Two-Hybrid Interaktion und gegen einen Artefakt.

Zur Erlangung der notwendigen Transformandenzahl wurden zwei Genbanktransformationen mit 6 bzw. 30 µg Genbank DNA durchgeführt. Nach Selektion der ersten Genbanktransformation (Einsatz von 6 µg Genbank-DNA) auf –Leuzin haltigem Medium, erschienen 11 Klone am 5. Inkubationstag. Nach Retransformation und Prüfung der Galaktoseabhängigkeit der Reporterinduktion stellten sich 4 Klone als falsch-positiv heraus. Die Identifikation der übrigen sieben Genbankvektoren ergab viermal Snk i.p. und dreimal *Mus musculus spindlin*, jedoch kein Rac1. Die ersten Kolonien der zweiten Genbanktransformation (Einsatz von 30 µg Genbank-DNA) zeigten sich hingegen schon ab dem dritten Tag. Die ersten 33 Klone wurden weiter untersucht und von den 24 Klonen, die die weitere Selektion überstanden, zeigte sich in den identifizierten Genbankvektoren 17 mal Rac1 und siebenmal Snk i.p.. Da allerdings auch in den Klonen des dritten Tages dreimal Snk i.p. enthalten war, kann kein Unterschied im Zeitpunkt des Auftretens der Rac1 und Snk i.p. enthaltenden Klonen festgestellt werden. Die zeitliche Abfolge des Erscheinens der ersten Kolonien stellt ein unsicheres Maß für die Zuverlässigkeit einer Two-Hybrid Interaktion dar. So sind Klone, die zu einem späteren Zeitpunkt (z.B. 5. Inkubationstag) als Kolonien sichtbar werden, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit falsch-positiv als solche, die schon zu einem früheren Zeitpunkt (3. Inkubationstag) sichtbare Kolonien bilden. Grund dafür ist, dass mit zunehmender Länge der Selektionsdauer zunehmend Resistenzen (also Mutanten die unabhängig einer Köder – Ziel Interaktion auf –Leu Selektionsplatten wachsen) auftreten. Aus diesem Grund wurden Klone, die erst ab dem 6. Inkubationstag als sichtbare Kolonien erschienen, nicht untersucht. Von den 12 in dieser Arbeit als falsch-positiv identifizierten Klone erschienen

8 am 5. Inkubationstag und 4 am 4. Inkubationstag. Die drei *Mus musculus spindlin* enthaltenden Klone erschienen am fünften Inkubationstag.

Die Yeast Two-Hybrid Filter-Untersuchung wurde mit YopO aus *Y. enterocolitica* durchgeführt. Um Informationen über das Bindungsverhalten des homologen Effektor-Proteins YpkA aus *Y. pseudotuberculosis* zu erhalten, wurde YpkA als Köderprotein in Hefepaarungs-Versuchen verwendet. Ebenso wurde die Deletionsmutante ΔYpkA auf ihr Interaktionsverhalten getestet. Gleichzeitig wurde überprüft, ob sich die Two-Hybrid Interaktion von YopO bzw. YpkA auch auf andere Mitglieder der RhoA-Familie ausweiten läßt. YpkA und ΔYpkA wurden in den Ködervektor kloniert (siehe Kapitel 3.2.2) und ansequenziert. Dabei zeigte sich, dass die ersten 400 Basenpaare von YpkA und ΔYpkA mutationsfrei im Leseraster zur DNA-bindenden Domäne LexA liegen. Auf eine aufwendige und kostspielige komplette Sequenzierung der etwa 2,1 bzw 1,6 kbp großen Sequenzen wurde verzichtet, da im Gegensatz zu YopO keine Yeast Two-Hybrid Filter-Untersuchung durchgeführt wurde, sondern YpkA bzw. ΔYpkA auf ihr Two-Hybrid Interaktionsverhalten mit definierten Proteinen der Rho-Familie untersucht werden sollte. Demgegenüber wurden die Gene der Zielproteine (RhoA, Rac1, Cdc42 und Rac1V12) sequenziert. Sie waren mutationsfrei und lagen im Leseraster zur B42-Aktivationsdomäne. Durch Hefepaarungs-Versuche konnte gezeigt werden, dass YopO bzw. YpkA mit Rac1 und RhoA im Yeast Two-Hybrid System interagieren. Eine Interaktion mit Cdc42 und Rac1V12 konnte dagegen nicht beobachtet werden. Möglicherweise könnte es sich dabei um ein falsch negatives Ergebnis handeln. So könnten z.B. die in hoher Zahl exprimierten Cdc42 und Rac1V12 Gene in der Hefezelle toxisch wirken. Besonders das dominant aktive Rac1V12 könnte in den komplexen und vernetzten Signalwegen der Hefezelle erheblich stören. Hefezellen sind unter Umständen in der Lage, für sie toxische Fremdproteine abzubauen oder sie vermindert zu exprimieren (33). In diesem Fall könnte eine vorhandene Interaktion im Two-Hybrid System nicht erkannt werden.
Um die Expression der B42–Ziel Fusionsproteine zu überprüfen, wurde ein Immunoblot des Zellysates der im Paarungs–Versuch verwendeten Stämme durchgeführt (Abb. 3-11). Für die B42-Rac1 und B42-Cdc42 Fusionsproteine sind deutliche Expressionsbanden sichtbar. Somit kann deren Toxizität auf teilenden Hefezelle weitgehend ausgeschlossen werden. Für Cdc42 kann gefolgert werden, dass es trotz Expression nicht mit YopO bzw. YpkA im Yeast Two-Hybrid System interagiert. Dagegen verwunderte die fehlende Expressionsbande von RhoA. Möglicherweise wird das B42–RhoA Fusionsprotein

aufgrund Toxizität degradiert oder die Expression herunterreguliert. So könnten einige wenige intakte Fusionsproteine u.U. das Interaktionssignal bewirken, wären aber für einen Expressionsnachweis quantitativ nicht ausreichend. Die Nachweisgrenze für Proteine im Westernblot liegt im µg Bereich, während für einen Interaktionsnachweis im Two-Hybrid System lediglich einige ng Protein benötigt werden (80). Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass das B42-RhoA Fusionsprotein vom Anti-HA-Antikörper aufgrund seiner bio-physikalischen Eigenschaft nicht erkannt werden kann. Da Rac1V12 in dem entsprechenden Klon nicht nachgewiesen werden konnte, bleibt die Frage offen, ob Rac1V12 nun mit YopO bzw. YpkA im Two-Hybrid System interagiert. Degradation oder Nicht–Expression von Rac1V12 aufgrund seiner Toxizität könnte eine eventuell vorhandene Affinität nicht erkennbar werden lassen.

Die Deletionsmutante ΔYpkA zeigte als Köderprotein im Yeast Two-Hybrid System weder mit Rac1 noch mit RhoA, Cdc42 oder Rac1V12 eine Interaktion. Da bei ΔYpkA die Kinase-Domäne deletiert ist (Aminosäurebereich 207 - 388), gibt dies einen Hinweis, dass dieser Proteinbereich an der Interaktion mit Rac1 und RhoA beteiligt ist.

4.4 Koimmunopräzipitation von Rac1 und RhoA mit Anti-YpkA Antikörpern aus infizierten COS-Zellen

Die Resultate einer Yeast Two-Hybrid Untersuchung sollten aufgrund der allgemein relativ hohen Anzahl an falsch-positiven Ergebnissen mit einer anderen, unabhängigen Methode überprüft werden. Hierfür wurden humane COS-Zellinien mit Yersinien infiziert und aus dem daraus gewonnenen Zellysat die Interaktionspartner von YpkA mit Hilfe von Anti-YpkA-Antikörpern koimmunopräzipitiert. Diese Methode hat im Gegensatz zum Yeast Two-Hybrid System zwei wichtige Vorteile. Zum einen wird das artifizielle Hefezellsystem verlassen, wodurch die interagierenden bakteriellen und humanen Proteine nicht mehr den modifizierenden Enzymsystemen der Hefezelle ausgesetzt sind. Zum anderen ist man durch die Immunopräzipitation nicht mehr auf Fusionsproteine angewiesen (siehe Kap. 4.3). Während YpkA über den natürlichen Weg der Infektion in die Zelle gelangt, entstammen deren potentielle Interaktionspartner wie Rac1, RhoA oder Cdc42 dem Zytosol der infizierten humanen Zelle. Somit ist das beschriebene

Infektionsmodell einer humanen Yersinien-Infektion biologisch sehr viel näher als das Yeast Two-Hybrid System.

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, konnte über Koimmunopräzipitation eine Interaktion zwischen YpkA und Rac1 bzw. RhoA nachgewiesen werden. Der Nachweis gelang über Infektion von COS-Zellen mit der YpkA- überexprimierenden *Y. pseudotuberculosis* Mutante WA-C (pTRANS, pCJYE138-YpkA).

Es fiel auf, dass die Präzipitationsbande von RhoA viel stärker erscheint als die von Rac1 (vergl. B und C, Bande 2, Abb. 3-12). Unter der Voraussetzung, dass RhoA bzw. Rac1 durch ihre Antikörper gleich gut erkannt werden, kann man schließen, dass sich RhoA besser mit Anti-YpkA-Antikörpern ko-präzipitieren lässt als Rac1. Somit hätte RhoA eine höhere Affinität zu YpkA und ist in der Lage Rac1 aus seiner Bindung mit YpkA zu verdrängen.

Cdc42 konnte, konsistent mit den Two-Hybrid Ergebnissen, nicht mit YpkA koimmunopräzipitiert werden (Daten nicht gezeigt). Cdc42 konnte im Zellysat der infizierten als auch der uninfizierten Zellen nachgewiesen werden, allerdings in einer deutlich geringeren Quantität als Rac1 oder RhoA. Auch dies gilt wiederum unter der Voraussetzung, dass die Sensitivität der verwendeten Antikörper vergleichbar ist. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass Cdc42 aufgrund geringer Proteinmengen nicht mit YpkA koimmunopräzipitiert werden konnte. Allerdings konnte mit *in vitro* GST-Bindungsversuchen zwischen YpkA und den kleinen G-Proteinen ebenfalls keine Interaktion zwischen YpkA und Cdc42 festgestellt werden (8, 23), so dass man insgesamt davon ausgehen kann, dass YpkA nicht mit Cdc42 interagiert.

Durch *in vitro* Versuche konnte gezeigt werden, dass YopE als GTPase aktivierendes Protein (GAP) für Rho-GTPasen fungiert (79). Kürzlich konnte durch Infektion von embryonalen Nabelschnurzellen gezeigt werden, dass YopE selektiv als GAP für RhoA wirkt und die Bildung von *membran ruffles* verhindert (3). Da bei Infektion mit WA-C (pTRANS, pCJYE138-YpkA) mit einer YopE138-YpkA-Fusion gearbeitet wurde, stellt sich die Frage, ob das Ergebnis aufgrund der ersten 138 YopE-Aminosäuren zustandekam. Aus diesem Grund wurden in einem analogem Versuch COS-Zellen mit dem *Y. pseudotuberculosis* Wildtypstamm YPIII (pIB102) infiziert. Dieser translociert YpkA in seiner nativen Form, ohne YopE-Sekretionsdomäne. Es zeigte sich, dass transloziertes YpkA nachgewiesen werden konnte, allerdings in einem sehr viel geringeren Maße als bei Infektion mit WA-C (pTRANS, pCJYE138-YpkA) (Daten nicht gezeigt). RhoA oder Rac1 konnten aus dem Zellysat der mit dem Wildtypstamm infizierten Zellen nicht eindeutig ko-

präzipitiert werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise reichte die Menge an Wildtyp - YpkA für die Koimmunopräzipitation von RhoA bzw. Rac1 nicht aus. Da allerdings im Two-Hybrid System sowie in GST-Bindungsversuchen (8) die Interaktion zwischen YpkA und RhoA bzw. Rac1 ohne die YopE-Sekretionsdomäne zustande kam, ist davon auszugehen, dass die YopE-Sekretionsdomäne nicht für die Affinität zwischen YpkA und RhoA bzw. Rac1 verantwortlich ist.

4.5 Biologische Relevanz der Interaktion zwischen YpkA/YopO und RhoA bzw. Rac1

Die Rho (ras homologe) Familie ist Teil der Ras-Superfamilie und zählt derzeit mindestens 14 verschiedene Proteine, die aufgrund ihrer Sequenz und Funktion in drei Hauptgruppen eingeteilt werden können (72):

- Rac-Gruppe (Rac1, Rac2 und Rac3)
- Rho-Gruppe (RhoA, RhoB, RhoC...)
- Cdc42-Gruppe (Cdc42, TC10)

Die GTPasen der Ras-Superfamilie (und damit auch der Rho-Familie) haben die Funktion von molekularen Schaltern: Im GTP-gebundenen Zustand sind sie aktiv (*on*-Zustand) während sie im GDP-gebundenen Zustand inaktiv sind (*off*-Zustand). Wegen ihrer intrinsischen GTPase-Aktivität inaktivieren sich die Proteine selbst. Diese Inaktivierung kann durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) stimuliert werden. Andererseits kann durch GDP/GTP *exchange factors* (GEFs) ein Austausch von GDP zu GTP erreicht werden, was die GTPase in den *on*–Zustand versetzt. Darüber hinaus gibt es Proteine die die GTPase in ihrem jeweiligem Aktivitätszustand stabilisieren, sogenannte GDP/GTP *dissociation inhibitors* (GDIs).

Mitglieder der Rho-Familie sind u.a. an der Regulation des Aktinzytoskelettes, der Zytokinfreisetzung, Chemotaxis und NADPH Oxidaseaktivität beteiligt. Rho-GTPasen können unabhängig über Membran-Rezeptoren (G-Protein gekoppelte Rezeptoren, GPCRs) und über verwandte GTPasen quervernetzender Signaltransduktionswege aktiviert werden (73). Anders als bei heterotrimerischen G-Proteinen, werden die GTPasen nicht direkt durch Bindung eines Liganden an einen GPCR aktiviert. Neuere Daten zeigen vielmehr, dass die Untereinheiten $G\alpha_{12/13}$ der an die GPCRs gekoppelten trimerischen G-Proteine an Rho-spezifische GEFs binden und diese aktivieren (72). Die so aktivierten

RhoGTPasen assoziieren und interagieren mit einer Vielzahl von Proteinen und steuern so direkt oder indirekt den Aufbau des Aktin-Zytoskeletts (18). So konnte den Rho-Hauptvertretern spezifische zytoarchitektonische Funktionen zugeordnet werden. Die Aktivierung von RhoA führt zur Stressfaserbildung, Rac bewirkt trichterartige Membrannausstülpungen (*membran ruffles*/Lamellopodien) und aktives Cdc42 führt zu Filopodien (*microspikes*) (35). Neben ihrer Stellung als Regulatoren des Zytoskelett, besitzen RhoGTPasen auch Verbindungen zu zentralen Signaltranskriptionskaskaden. Rac und Cdc42 können über Aktivierung von Pak (p21-aktivierte Kinase) zur Aktivierung von MAPK (Mitogen-aktivierte Protein Kinase)-Kinasen führen. MAPK-Kinasen können pro-inflammatorische und anti-apoptotische Signaltranskriptionskaskaden (u.a. *nuklear factor* κB, NFκB) aktivieren (siehe auch Kapitel 1.3). So kann die Transkription eines durch Bradykinin induzierten NFκB-Reportergenes durch dominant negatives RhoA inhibiert oder durch konstitutiv aktives RhoA aktiviert werden (72).
Forschungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass auch andere Yop-Effektoproteine an RhoGTPasen angreifen. YopT modifiziert und inaktiviert RhoA (82). YopE hat die Fähigkeit das Aktinzytoskelett zu zerstören (68). YopE wirkt *in vitro* als GAP für Rho, Rac und Cdc42 (79), während es *in vivo* selektiv die von Rac1 erzeugte Bildung von *membran ruffles* verhindert (3). YopH nimmt durch Dephosphorylierung von Proteinen der *focal adhesions* (FAK und $p130^{CAS}$) ebenfalls Einfluss auf das Aktinzytoskelett und *oxidative burst* (9, 36).

In diesem komplexem Geschehen könnte YopO bzw. YpkA über Interaktion mit Rho bzw. Rac Einfluß nehmen. Dabei könnte YopO bzw. YpkA prinzipiell als GAP, GEF, GDI oder mit einem anderen, bisher noch nicht bekanntem Prinzip, auf Rho und Rac einwirken und über diesen Weg Veränderungen an der infizierten Wirtszelle herbeiführen. Da Rho und Rac, wie oben aufgeführt, an vielen Zellfunktionen beteiligt sind, sind auch die potentiell denkbaren Veränderungen, die durch YpkA/YopO während einer Yersinien-Infektion hervorgerufen werden könnten, sehr weitreichend.
In der kürzlich von Dukuzumuremyi et al. veröffentlichen Arbeit konnte die Interaktion von YpkA mit RhoA und Rac1 mit Two-Hybrid- und GST-Bindungs-Versuchen bestätigt werden. Eine Interaktion mit Cdc42 konnte ebenso nicht beobachtet werden. Die Arbeitsgruppe führte auch Präzipitationsversuche durch, doch sie konnte keine Ko-präzipitation von endogenem RhoA mit Anti-YpkA-Antikörpern aus infizierten HeLa-Zellen beobachten. Im Gegensatz zu der hier vorgestellten Arbeit, führten Dukuzumuremyi

et al. keine Yeast Two-Hybrid Screeninguntersuchung durch, sondern es wurde aufgrund von Sequenzhomologien zwischen RhoA-bindenen Kinasen und YpkA, gezielt YpkA auf Interaktion mit Rac1, RhoA und Cdc42 untersucht. Ferner konnte gezeigt werden, dass YpkA in transfizierten Zellen zu einer Reduktion der Stressfaserbildung führt und dass es in der Lage ist, die Aktivierung von RhoA zu blockieren. Für diese Funktionen konnte der C-terminale Bereich (Aminosäuren 543-640) verantwortlich gemacht werden (23).

Zytoskelettveränderungen wurden kürzlich ebenso von der Arbeitsgruppe um Juris et al. beschrieben. Sie zeigten, dass translozierte inaktives YpkA in der Wirtszelle durch Aktin aktiviert wird. Durch Transfektion von HeLa-Zellen mit einem YpkA enthaltenden Expressionsvektor konnten sie beobachten, dass es in den transfizierten Zellen zu einer Zerstörung des mit Rhodamin-Phalloidin gefärbten Aktin-Zytoskeletts kommt. In diesen Zellen wurde translozierte YpkA durch die gleichzeitige Anwesenheit von grün floureszierendem Protein (GFP), welches ebenfalls auf dem Expressionsvektor kodiert ist, nachgewiesen (49).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es starke Hinweise für die *in vivo* Interaktion zwischen YpkA/YopO mit RhoA und Rac1 gibt. Die Interaktion konnte von unabhängigen Arbeitgruppen mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen werden. Als biologischen Effekt von YpkA/YopO konnten Zytoskelettveränderungen beobachtet werden, die durch Inhibition von RhoA verursacht sein könnten (23, 49). Welche Bedeutsamkeit diesen Veränderungen während einer Yersinien-Infektion zugeschrieben werden kann, müssen zukünftige Forschungen ebenso klären, wie die Frage, ob YpkA/YopO noch weitere Wirstzellveränderungen, über Manipulation von GTPasen oder auch GTPase unabhängig, bewirkt.

5 Zusammenfassung

Die enterpathogenen *Yersinia*-Spezies unterlaufen die primären Abwehrmechanismen des Wirtes durch Einflußnahme auf Signaltransduktionskaskaden. Diese Subversion wird von einem 70 kDa Virulenzplasmid vermittelt, welches für ein Typ III Sekretion/Translokationsssystem und einige Virulenzfaktoren, sogenannte Yops (*Yersinia outer proteins*) kodiert. Die sechs bisher bekannten Effektor-Yops gelangen über das Sekretionssystem ins Zytoplasma von Makrophagen und Granulozyten, was in diesen zu einer Inhibition von Phagozytose, *oxidative burst* und Zytokinfreisetzung sowie zur Induktion der Apoptose führt. Ziel dieser Arbeit war es, die zellulären Angriffsproteine der Effektor-Yops YopM und YopO zu identifizieren. Als Methode diente das Yeast Two-Hybrid System.

Es stellte sich heraus, dass YopM für diese Methode aufgrund seiner transskriptionsaktivierenden Eigenschaft nicht verwendbar ist. Dies und die Beobachtung, dass YopM in den Zellkern lokalisiert wird (77) deuten darauf hin, dass YopM möglicherweise als Transkriptionsfaktor in der Wirtszelle wirken könnte.

Für YopO erbrachte die Two-Hybrid Untersuchung 31 positiv interagierende Klone, die als Rac1 (17 Klone, davon 4 unabhängige), Snk i.p. (11 Klone, davon 6 unabhängige) und Mus musculus spindlin (3 Klone) identifiziert werden konnten. Rac1 gehört zur Familie der Rho-GTPasen zu denen u.a. auch die Proteine RhoA und Cdc42 gehören. Diese kleinen G-Proteine sind in komplexer und in noch unvollkommen verstandener Weise an der Regulation vielfältiger Zellfunktionen beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass YopO neben Rac1 auch mit RhoA, nicht jedoch mit Cdc42 im Yeast Two-Hybrid System interagiert. Für YpkA, dem zu YopO homologen Protein aus *Y. pseudotuberculosis* zeigte sich das gleiche Interaktionsverhalten.

Durch Koimmunopräzipitation konnten die Ergebnisse der Yeast Two-Hybrid Untersuchung mit einer zweiten, unabhängigen Methode bestätigt werden. Aus dem Zellysat von mit Yersinien infizierten humanen COS-Zellen, ließen sich RhoA und Rac1, nicht aber Cdc42 mit Hilfe von Anti-YpkA-Antikörpern koimmunopräzipitieren.

In dieser Arbeit konnte mit zwei unabhängigen Methoden eine bis dahin unbekannte Affinität zwischen YpkA/YopO mit RhoA und Rac1 gezeigt werden. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass RhoA und Rac1 die intrazellulären Angriffspunkte der Effektor-Yops YpkA bzw. YopO darstellen.

6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
Da	Dalton
ddH_2O	doppelt destilliertes, steriles Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EGTA	Ethylenglycobis(2-amino-ethylether)-N,N,N`,N´,-tetraacetat
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-broth
min	Minute
m.o.i.	
OD_{600}	optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm
PAGE	Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pYV	Yersinia-Virulenzplasmid
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Seite
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
vergl.	vergleiche
X–Gal	5Br 4Cl 3Indolyl β- 3 Galaktopyranose

Aminosäuren

Ala	Alanin	Gly	Glycin	Pro	Prolin
Arg	Arginin	His	Histidin	Ser	Serin
Asn	Asparagin	Ils	IsoLeuzin	Thr	Threonin
Asp	Aspartat	Leu	Leuzin	Trp	Tryptophan
Cys	Cystein	Lys	Lysin	Tyr	Tyrosin
Gln	Glutamin	Met	Methionin	Val	Valin
Glu	Glutamat	Phe	Phenylalanin		

Nukleoside

A	Adenosin	T	Thymidin
C	Cytosin	G	Guanosin

7 Literaturverzeichnis

1 **Aepfelbacher, M., Zumbihl, R., Ruckdeschel, K., Jacobi, C., Barz, C. and J. Heesemann.** The Tranquilizing Injection of *Yersinia* Proteins: A Pathogens`s Strategy to Resist Host Defens. *Biol. Chem.* 1999

2 **Almlof T., Wright, A.P., and J.A. Gustafsson.** Role of acidic and phosphoylated residues in gene activation by the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* 1995;270(29):17535-40.

3 **Andor, A., Trülzsch, K., Essler, M., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Heesemann, J., and M. Aepfelbacher.** YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell. Microbiol.* 2001;3:1-11

4 **Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith, Struhl.** Current Protocols in Molecular Biology. Volume 1-4. Wiley.1980-2001

5 **Autenrieth, I. B. and R. Firsching.** Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica:* an ultrastructUral and Histological study. *J. Med. Microbiol.* 1996;44:285-294

6 **Barbacid M.** Ras genes. *Ann. rev. biochem* 1987;56:779-827

7 **Barry E.M., Robins-Brown, R.M., and J. G. Jr. Morris** Identification and sequence of the Yersinia enterocolitica ypkA gene and surrounding region. Genbank-Accession: U59895; NID g1401294; submitted on 04-JUN-1996

8 **Barz, C., Abahji, T.N., Trülzsch, K., and J. Heesemann.** The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Letters.* 2000;482:139-143

9 **Black, D.S. and J.B. Bliska.** Identification of $p130^{Cas}$ as a substrate of *Yersinia* YopH, a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammilian cells and targets focal adhesions. *EMBO J.* 1997;16:2730-2744

10 **Blast Search-Programm:** http://www.ncbi.nlm.nih.gov./cgi-bin/BLAST/

11 **Boland, A. and G. R Cornelis.** Suppression of macrophage TNF-α release during *Yersinia* infection : role of YopP. *Infect. Immun.* 1998;66:1878-1884.

12 **Boland, A., Sory, M. P., Iriarte, M., Kerbourch, C., Wattiau, P., and G. R. Cornelis.** Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolilica* is internalized inside the cylosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J.* 1996;15:5191-5201

13 **Bouza, E., Dominguez, A., Meseguer, M., Buzon, L., Boixeda, D., Revillo, M. J., de Rafael, L., and J. Martinez Beltran.** *Yersinia enterocolitica* Septicemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 1980;74:404-409

14 **Bradford, M. M.** A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254

15 **China, B., Michiels, T., and G. R. Cornelis.** The pYV plasmid of *Yersinia* encodes a lipoprotein, YlpA, related to TraT. *Mol. Microbiol.* 1990;4:1585-1593

16 **Clark, E. A. and J. S. Brugge.** Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995;268:233-239

17 **Clark, M. A., B. H. Hirst, and M. A. Jepson.** M-cell surface pi integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect. Immun.* 1998;66:1237-1243

18 **Cooper, J.A. and Schafer, D.A.** Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2000;12:97-103

19 **Cornelis, G. R., Boland, A., Boyd, A. P., Geuijen, C., Iriate, M., Neyet, C. and M.P. Sory.** The virulence Plasmid of Yersinia, an Antihost Genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998;62:1316–1346

20 **De Marco, L., Mazzucato, M., Masotti, A., Ruggeri, Z.M.** Localization and characterization of an alfa thrombin binding site on platelet glycoprotein Ib alfa. *J. Biol. Chem.* 1994;269:6478-6484

21 **Delor, I. and G. R. Cornelis.** Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect. Immun.* 1992;60:4269-4277

22 **Drivas, GT., Palmieri, S., Eustachio, P. D, and M.G. Rush,**. Evolutionary grouping of the RAS-protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176(3):1130-1135

23 **Dukuzumuremyi, J-M., Rosqvist, R., Hallberg, B., Akerström, B., Wolf-Watz, H., and K. Schesser.** The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *JBC.* 2000;45:35281-90

24 **Fallman, M., Persson, C., and H. Wolf-Watz.** *Yersinia* proteins that target host cell signaling pathways**.** *J. Clin. Invest.* 1997;99:1153-1157

25 **Fauci, Braunwald, Isselbacher, Wilson, Martin, Kasper, Hauser, Longo.** Harrison`s principles of internal medicine 14th edition. McGraw Hill Verlag, New York: 1998

26 **Fields S. and O. Song.** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989;340:245-246

27 **Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A., and X. Perret.** Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 1997; 387:394-401

28 **Fu, Y. and J.E. Galan.** A *Samonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 1999;401:293-297

29 **Galyov, E. E., Hakansson, S., and H. Wolf-Watz.** Characterization of the operon encoding the YpkA Ser/Thr protein kinase and the YopJ protein of *Yersinia pseudotuberculosis. J. Bacteriol.* 1994;176:4543-4548

30 **Galyov, E. E., Hakansson, S., Forsberg, A., and H. Wolf-Watz.** A secreted protein kinase of *Yersinia pseudoluberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* 1993;361:730-732

31 **Gralnick, H. R., Williams, S., McKeown, L. P., Hansmann, K., Fenton II J. W., and H. Krutzsch.** High-affinity a thrombin binding to platelet glycoprotein Ibα: identification of two binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91:6334-6338

32 **Guan, K.L. and J.E. Dixon.** Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 1990; 249:553-556

33 **Guthrie, C., Fink, G.** Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Academic Press. 1991

34 **Hakansson, S., Galyov, E. E., Rosqvist, R., and H. Wolf-Watz.** The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol. Microbiol*. 1996;20:593-603

35 **Hall, A.** Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* 1998;279:509-514

36 **Hamid, N., Gustavsson, A., Andersson, K., McGee, K., Persson, C., Rudd, C.E., and M. Fallman.** YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb. Pathog.* 1999;27(4):231-242

37 **Hanahan, D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 1983;166:557-580

38 **Hanski, C, Kutschka, U., Schmoranzer, H. P., Naumann, M., Stallmach, A., Hahn, H., Menge, H., and E. 0. Riecken.** ImmunoHistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect. Immun.* 1989;57:673-678

39 **Hardt, W.D., Chen, L.M., Schueble, K.E., Bustelo, X.R., and J.E. Galan.** *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membran ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 1998; 93(5):815-826

40 **Hartman, A.B., Venkatesan, E.V., and J.M. Buysse**. Sequence and molecular charakterisation of a multicopy invasion plasmid antigen gene, ipaH of *Shigella flexneri. J. Bacteriol.* 1990;172:1905-1915

41 **Heesemann, J.** unveröffentlichte Ergebnisse

42 **Heesemann, J. and L. Grüter.** Genetic evidence that the outer membrane protein Yopl of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol. Letts* 1987;40:37-41

43 **Hoiczyk, E., Roggenkamp, A., Reichenbacher, M., Lupas, A., and J. Heesemann.** Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAS reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.* 2000;19(22):5989-5999

44 **Holmes and Quigley.** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 1981;114(1):193-197

45 **Hope, I. A. and K. Struhl**. Functional dissection of eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of Yeast. *Cell* 1986;46:885-894

46 **Internet-Adresse:**
www.clontech.com/archive/OCT96UPD/KC8Competent.html

47 **Iriarte, M., Sory, M.P., Boland, A., Boyed, A.P., Mills, S.D., Lambermont, I., and G.R. Cornelis.** TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J.* 1998;17:1907-1918

48 **Iriate, M. and G.R. Cornelis.** YopT, a new *Yersinia* effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol. Microbiol.* 1998;29:915-929

49 **Juris, S.J., Rudolph, A.E., Huddler, D., Orth, K., and J.E. Dixon.** A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: Actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97(17):9431-9436

50 **Keegan, L., Gill, G., and M. Ptashne.** Separation of DNA binding from the transkription activation function of eukaryotic regulatory protein. *Science* 1986;231:699-704

51 **Kobe, B., Deisenhofer J.** The Leuzin-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* 1994;19:415-420

52 **Kuroda, S., Tokunaga, C., Kiyohara, Y., Higuchi, O., Konishi, H., Mizuno, K., Gill, G. N., and U. Kikkawa.** Protein-protein interaction of zink finger LIM domains with protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 1996;271:23363-23367

53 **Lämmli U.K.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685

54 **Lee, V.T., Anderson, D.M., and O. Schneewind.** Targeting of *Yersinia* Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across

bacterial and eukaryotic membrans is dependent on SycE chaperone. *Mol Microbiol*. 1998:28:593-601

55 **Lehninger, A., Nelson, D., Cox, M.** Prinzipien der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford. 1993

56 **Leung, K. Y., Reisner, B. S., and S. C. Straley.** YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect. Immun.* 1990;58:3262-3271

57 **Leung, K.Y., and S.C. Straley.** The YopM gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alfa. *J. Bacteriol.* 1989;171:4523-4632

58 **Maniatis, T., Fritsch, E.F., and J. Sanbrook.** Anonymous molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y. 1982

59 **Mullis, K., Faloonia, F.., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and H. Ehrlich.** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1986;51:263

60 **Munemitsu S., Innis, M.A., Clerk, R., McCornick, F., Ullrich, A., and P. Polakis.** Molekular cloning and expression of a G25K cDNA, the human homolog of the yeast cell cycle gene CDC42. *Mol. Cell. Biol.* 1990;10:5977-5982

61 **National Center of Biotechnology Information:** http://www.ncbi.nlm.nih.gov

62 **Orth, K., Palmer, L.E., Bao, Z.Q., Steward, S., Rudolph, A., Bliska, J., Dixon, J**. Inhibition of the Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Superfamily by a *Yersinia* Effector *Science* 1999;285:1920-1923

63 **Orth, K., Xu, Z., Mudgett M.B., Bao, Z.Q., Palmer L.E., Bliska J.B., Mangel, W.F., Staskawicz, B., and J.E. Dixon.** Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science*. 2000;290(5496):1594-7

64 **Pederson, K.J., Vallis, A.J., Aktories, K., Frank, D.W., and J.T. Barbieri.** The amino-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS disrupts actin filaments via small-molekular-weight GTP-binding proteins. *Mol. Microbiol*. 1999;32:393-401

65 **Phizicky, E.M., and S. Fields.** Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* 1995;59:94-123

66 **Reisner, B. S. and S. C. Straley.**. *Yersinia pestis* YopM: thrombin binding and overexpression. *Infect. Immun*. 1992;60:5242-5252

67 **Roggenkamp, A., Ruckdeschel, K., Leitritz, L., Schmitt, R., and J**. **Heesemann.** Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of Y. enterocolitica serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect. Immun.* 1996;64:2506-2514

68 **Rosqvist, R., Forsberg, A., and H. Wolf-Watz.** Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect. Immun.* 1991;59:4562-4569

69 **Rosqvist, R., I. Bö1in, and H. Wolf-Watz.** Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis:* a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. *Infect. Immun*. 1988;56:2139-2143

70 **Ruckdeschel, K., Harb, S., Roggenkamp, A., Hornef, M., Zumbihl, R., Köhler, S., Heesemann, J., and B. Rouot.**. *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-κB : involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor α production. *J. Exp. Med.* 1998;187:1-11

71 **Ruckdeschel, K., Machold, J., Roggenkamps, A., Schubert, S., Pierre, J., Zumbihl, R., Liautard, J.-P., Heesemann, J. and B. Rouot.** *Yersinia enterocolitica* promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH_2-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 1997;272:15920-15927

72 **Sah, V., Seasholtz, T., Sagi, S., and J.H. Brown**. The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000;40:459-489

73 **Sander, E.E., ten Klooster, J.P., van Delft, S., van der Kammen, R.A., and J.G. Collard.** Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J. Cell. Biol.* 1999;147:1009-1022

74 **Sanger, F., Nicklen, S., and A.R. Coulson.** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977;74:3993-3999

75 **Schulte, R., Kerneis, S., Klinke, S., Bartels, H., Preger, S., Kraehenbuhl, J.P., Pringault, E., and I.B. Autenrieth.** Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. *Cell. Microbiol.* 2000;2:173-185

76 **Shayegani, M., DeForge, I., McGlynn D.M., and T. Root.** Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from human and enviromental sources. *J. Clin. Microbiol.* 1982;14:304-312

77 **Skrzypek, E., Cowan, C., and S. C**. **Straley.** Targeting of the Yersinia pestis YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucLeus. *Mol Microbiol.* 1998;30(5):1051-1065

78 **Toivanen, A., Granfors, K., Lahesmaa-Rantala, R., Leino, R., Stahlberg, T., and R. Vuento.** Pathogenesis of *Yersinia* - triggered reactive arthritis: immunological, microbiological and clinical aspects. *Immunol. Rev.* 1985;86:47-70

79 **Von Pawel-Rammingen, U., Telepnev, M.V., Schmidt, G., Aktories, K., Wolf-Watz, H., and R. Rosqvist.** GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structures. *Mol. Microbiol.* 2000;36:737-748

80 **Yang, M., Wu, Z., and S. Fields.** Protein-peptide interactions analysed with the yeast two-hybrid system. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:1152-1156

81 **Yao, T., Mecsas, J., Healy, J.I., Falkow, S., and Y. Chien**. Supression of T and B activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *J. Exp. Med.* 1999;190(9):1343-1350

82 **Zumbihl, R., Aepfelbacher, M., Andor, A., Jacobi, C.A., Ruckdeschel, K., Rouot, B. and J. Heesemann.** The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J. Biol. Chem*. 1999;274:29289-29293

Die vorliegende Arbeit wurde vom 1. Juli 1997 bis zum 1. Dezember 2001 am Max vom Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie in München unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann und Frau Dr. C. Barz angefertigt.

Allen Mitarbeitern des Max von Pettenkofer-Institutes möchte ich meinen großen Dank aussprechen. Die allseitige Hilfsbereitschaft, die wissenschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie die sehr guten Rahmenbedingungen trugen maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit bei. Mein besonderer Dank richtet sich (in alphabetischer Reihenfolge) an:
Herrn Andreas Andor, Herrn PD Dr. Martin Äpfelbacher, Herrn Dr. Jörg Daiwik, Herrn Dr. Wolf-Dietrich Hardt, Herrn Dr. Christoph Jakobi, Frau Nattalie Jetter, Frau Christina Nölting, Frau Dr. Cosima Pelludat, Herr Dr. Klaus Ruckdeschel, Frau Monika Söder, Frau Claudia Trassak, Frau Agnes Wiedemann und an all jene, die ich jetzt vergessen habe.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die Überlassung des Themas und für sein beständiges Interesse und Engagement an dieser Arbeit. Herr Prof. Heesemann steht seinen Doktoranden jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und läßt ihnen alle wissenschaftlichen Freiräume eigene Ideen umzusetzen.

Frau Dr. Corinna Barz, die diese Arbeit in jeder Hinsicht vorzüglich betreute, möchte ich ganz besonders danken. Sie hat mir u.a. mit viel Geduld und Einsatz die mikro- und molekularbiologischen Arbeitstechniken von Grund auf beigebracht, mein wissenschaftliches Denken geschärft und viel Motivationsarbeit geleistet.

Hagenbacherstr.15a
81243 München

Tel.: 0 89 / 87 48 01
Fax: 0 89 / 755 71 04
Email: tabahji@yahoo.com

Thomas Abahji

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: ***17.11.1974***
Geburtsort: ***München***
Staatsangehörigkeit: ***deutsch***
Familienstand: ***ledig***

Schulbildung

09/1981 – 07/1985	Grundschule Ravensburger Ring, München
09/1985 – 06/1994	Max-Planck-Gymnasium, München

Wehrdienst

07/1994 – 05/1995	Sanitätseinheit, München

Hochschulstudium

05/1995 – 09/1995	Studium der Humanmedizin an der Justus-von-Liebig Universität, Gießen (1.Semester)
09/1995 – 09/2001	Studium der Humanmedizin an der LMU München (2.–13. Semester)
03/1997	**Physikum**
03/1998	**1. Staatsexamen**
08/2000	**2. Staatsexamen**
12/2001	**3. Staatsexamen**

Promotion

09/97 – 04/01	Promotionsarbeit am Max von Pettenkofer Institut der Universität München bei Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Thomas Abahji München, 10. Dezember 2001