Charakterisierung eines Typ III-Sekretionssystems für Virulenzproteine aus *Salmonella typhimurium*

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

vorgelegt von
Catherine Rappl
München, November 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. V. Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Ebel
Sondergutachter: Prof. Dr. M. Hensel

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2002

Während dieser Arbeit entstanden folgende Publikationen:

Nikolaus, T., Deiwick, J., Rappl, C., Freeman, J.A., Schröder, W., Miller, S.I. and Hensel, M. (2001) SseBCD proteins are secreted by the type III secretion system of S*almonella* pathogenicity island 2 and function as a translocon. *J Bacteriol* **183**: 6036-45.

Deiwick, J., Rappl, C., Jungblut, P.R. and Hensel, M. (eingereicht) Proteomic approaches to *Salmonella* Pathogenicity Island 2-encoded proteins and the SsrAB regulon. *Proteomics*.

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG 10

1. Proteinsekretionssysteme in Gram-negativen Bakterien 10
2. Typ III-Sekretionssysteme 11
3. Pathogenese von *Salmonella* spp. 13
4. *Salmonella typhimurium* besitzt zwei Typ III-Sekretionssysteme 14
5. Induktion der Genexpression der SPI2 und Sekretion von Substratproteinen 15
6. Untereinheiten verschiedener Typ III-Sekretionssysteme gehören Proteinfamilien an 16
7. Struktur und Aufbau von Typ III-Sekretionssystemen 17
8. Isolierte Typ III-Sekretionssysteme weisen nadelförmige Strukturen auf 19
9. Zielsetzung der Arbeit 21

II. MATERIAL UND METHODEN 23

1. Bezugsquellen der Substanzen 23
   - 1.1 Chemikalien 23
   - 1.2 Enzyme 23
2. Bakterielle Stämme 23
3. Kulturbedingungen 24
   - 3.1 Medien 24
   - 3.2 Dauerkulturen 26
   - 3.3 Beimpfung und Inkubation 26
4. Genetische Methoden 26
   - 4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 26
   - 4.2 Ligation 27
   - 4.3 Elektrotransformation 28
     - 4.3.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen 28
     - 4.3.2 Elektroporation 28
   - 4.4 Kolonie-PCR 28
   - 4.5 Überproduktion rekombinanter Proteine im kleinen Volumen 29
   - 4.6 Überproduktion rekombinanter Proteine im Fermenter 29
   - 4.7 Luziferase-Reportergen-Messungen 29
   - 4.8 β-Galaktosidase-Reportergen-Messungen 30
5. Proteinbiochemische Methoden 30
   - 5.1 Reinigung der GST-Fusionsproteine SsaJ und SsaN 30

5.2 Reinigung der His-tag-Fusionsproteine 31
5.2.1 Reinigung des His-tag-Fusionsproteins SsaV 31
5.2.2 Reinigung des His-tag-Fusionsproteins SsaC 31
5.2.3 Reinigung der His-Tag-Fusionsproteine SsaB, SsaO und SsaS 32
5.3 Reinigung von OmpA 32
5.4 Fällung von Proteinen 33
5.4.1 Aceton-Fällung 33
5.4.2 Trichloressigsäure (TCA)-Fällung 33
5.5 Quantifizierung von Proteinen 33
5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 33
5.6.1 Probenvorbereitung 34
5.7 Semidry-Blot (Towbin et al., 1979) 34
5.8 Semidry-Blot (Kyhse-Andersen, 1984) 34
5.9 Färbung von Proteinen 35
5.9.1 Coomassie Brilliant-Blue G 250-Färbung 35
5.9.2 Ponceau S-Färbung 35
5.9.3 Silberfärbung 35
5.9.4 Kupferchlorid-Färbung (Lee et al., 1987) 36
5.10 Immundetektion 36
5.11 Detektion der 6× His-tag-Fusionsproteine durch Nickel-NTA-Konjugat 36
5.12 Detektion der GST-Fusionsproteine 37
5.13 Abtrennung von Oberflächenstrukturen 37
5.14 Membranfraktionierung mit N-Lauroyl-Sarcosin 37
5.15 Membranfraktionierung mit Hilfe eines Saccharose-Dichte-Gradienten (modifiziert nach Osborn et al., 1972) 38
5.16 Isolierung eines Sekretionssystem-Apparates (modifiziert nach Blocker et al., 2001 und Kubori et al., 1998) 38
5.17 Untersuchung der molekularen Nachbarschaft von Proteinen durch Quervernetzung 39
5.18 Erzeugung polyklonaler Antikörper 39
5.19 Reinigung von Antiseren 40
5.19.1 Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose 4B 40
5.19.2 Kopplung an invertierte Membranvesikel 41

III. ERGEBNISSE 42

1. Erzeugung und Reinigung von SPI2-Fusionsproteinen 42

2. Präadsorption der polyklonalen Antiseren zur Entfernung unspezifischer Bindungspartner 44
3. Identifizierung multimerer Komplexe nach Quervernetzung 47
3.1 Abhängigkeit der Quervernetzung von der DSS-Konzentration 48
3.2 Untersuchung der Fähigkeit verschiedener Mutanten, oligomere Komplexe von SsaC auszubilden 50
3.3 Nachweis multimerer Komplexe von SseD 51
4. Analyse der subzellulären Lokalisation verschiedener Untereinheiten des Sekretionsapparates 52
4.1 Membranfraktionierung mit N-Lauroyl-Sarcosin 52
4.2 Membranfraktionierung mit Hilfe eines Saccharose-Dichte-Gradienten 55
5. Effekte von SPI2-Mutationen auf die Synthese von Apparatsproteinen 58
6. Einfluss des pH-Wertes auf die Synthese von Apparatsproteinen 60
6.1 Quantifizierung der Blot-Signale 66
6.2 Untersuchung zur Kinetik des Aufbaus des Sekretionsapparates in Abhängigkeit des pH-Wertes 67
7. Bedeutung von SsaB bei der Sekretion der Translokator-Komponenten SseB und SseC 69
8. Isolierung eines Sekretionsapparates 70
9. Erstellung einer Proteinkarte von SPI2-Proteinen 73

IV. DISKUSSION 75

1. Subzelluläre Lokalisation einzelner Proteinuntereinheiten des Sekretionsapparates 75
2. Bedeutung einzelner SPI2-Proteine für die Synthese und den Aufbau des Sekretionsapparates 78
3. Einfluss des pH-Wertes auf die Synthese von verschiedenen Proteinen des Sekretionsapparates 79
4. Zeitpunkt der pH-induzierten Sekretion und des Aufbaus des Sekretionsapparates 81
5. SsaB, ein Effektorprotein oder eine Komponente des Typ III-Sekretionssystem-Apparates? 83
6. Identifikation multimerer Komplexe durch Vernetzungsexperimente 85
7. Isolierung von Nadel-Komplexen 87
8. Modell zur Struktur und zum Aufbau des Typ III-Sekretionsapparates 90
9. Ausblick 92

V. ZUSAMMENFASSUNG **94**

VI. LITERATURVERZEICHNIS **96**

Dank **102**

Lebenslauf **103**

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ak	Antikörper
bidest	zweimal destilliert
Bis-Tris	2,2-Bis-(Hydroxyethyl)-(iminotris)-(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CNBr	Cyanogen-Bromid
dH_2O	destilliertes Wasser
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPEC	enteropathogene *Escherichia coli*
GC	Guanin + Cytosin
IPTG	Isopropylthio-β-D-thiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	KiloDalton
LB	Luria Bertani Broth
Luc	Luziferase
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MOPS	2-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPa	Megapascal
mTn	mini-Transposon
MW	Molekulargewicht
NC	Nitrozellulose
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulphonyl-Fluorid
rpm	„rotation per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	„sodium dodecyl sulphate“, Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPI	„*Salmonella* Pathogenicity Island“, *Salmonella*-Pathogenitätsinsel

spp.	Spezies
STM	„signature-tagged mutagenesis“, Signatur-markierte Mutagenese
TCA	„trichlor acetic acid“, Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N’, N’-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
v/v	Volumen/Volumen
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
∅	Durchmesser

I. Einleitung

1. Proteinsekretionssysteme in Gram-negativen Bakterien

Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien ist eine komplexe Struktur, bestehend aus einer Zytoplasmamembran, einer Peptidoglykanschicht und einer äußeren Membran. Bei der Proteinsekretion müssen die zu sekretierenden Proteine somit über drei morphologisch getrennte Schichten transportiert werden. Obwohl es eine große Anzahl an sekretierten Proteinen mit den verschiedensten Funktionen gibt, existieren nur einige Wege, über die die Proteine vom bakteriellen Zytoplasma in den extrazellulären Raum transportiert werden. So unterscheidet man innerhalb Gram-negativer Bakterien die Proteinsekretionssysteme der Typen I-IV. Der Begriff „Sekretion“ bezeichnet in diesem Zusammenhang den aktiven Transport von Proteinen vom Zytoplasma über die innere und äußere Membran in das umgebende Medium oder auf die Oberfläche der bakteriellen Zelle (Hueck, 1998).

Durch ein Typ I-Sekretionssystem wird z.B. das Hämolysin in *Escherichia coli* sekretiert (Oropeza-Wekerle et al., 1990). Dieses System besteht aus drei Proteinuntereinheiten: einer ATPase, die in der inneren Membran lokalisiert ist, einem äußeren Membranprotein und einem Membranprotein, das in der inneren Membran verankert ist und den periplasmatischen Raum durchspannt.

Eine Vielzahl von Proteinen wird über das Typ II-Sekretionssystem, das auch als genereller Sekretionsweg („general secretory pathway“, GSP) bezeichnet wird (Pugsley, 1993) transportiert. Diese Proteine werden aus dem Zytoplasma in die innere oder äußere Membran exportiert oder in das Periplasma freigesetzt. Auch existieren verschiedenste Proteine, die über beide Membranen vollständig transloziert und dabei in das extrazelluläre Milieu sekretiert werden. Die über dieses System exportierten bzw. sekretierten Proteine besitzen eine N-terminale Signalsequenz, die aus einer langen, hydrophoben Region (H-Domäne, > 8 Aminosäurereste) und einer kurzen, hydrophilen Region (N-Domäne, 2 bis > 15 Aminosäurereste) zusammengesetzt ist. Diese Signalsequenz wird während des Transportes über die Zytoplasmamembran von einer Signalpeptidase abgespalten (Pugsley, 1993). Für den Transport von Proteinen über das Typ II-Sekretionssystem sind zahlreiche innere und teilweise auch äußere Membranproteine, eine an die Zytoplasmamembran assoziierte ATPase und Chaperone erforderlich. Die Sekretion von Pullulanase durch *Klebsiella oxytoca* ist ein gut untersuchtes Beispiel für ein Typ II-Sekretionssystem.

Das Typ III-Sekretionssystem zeigt einen sehr komplexen Aufbau und setzt sich aus mindestens 20 verschiedenen Proteinuntereinheiten zusammen, wobei die meisten in der

inneren Membran lokalisiert sind (Hueck, 1998). Im Gegensatz zum Typ II-Sekretionssystem besitzen die Typ III-Substratproteine keine konservierten N-terminalen Signalsequenzen, die während der Sekretion abgespalten werden. Darüber hinaus scheint die Proteinsekretion, wie auch beim Typ I-System, ein Prozess zu sein, der in einem Schritt abläuft, da bisher keine periplasmatischen Intermediate identifiziert werden konnten. Während Typ I-Sekretion ein rein sekretorisches System ist, bei dem die sekretierten Enzyme im extrazellulären Raum aktiv sind, stellt das Typ III-Sekretionssystem einen Mechanismus dar, der die Translokation von pathogenen Proteinen in das Zytosol eukaryontischer Zellen vermittelt. Die meisten inneren Membranproteine des Typ III-Sekretionssystems sind zu Komponenten des Flagellen-Syntheseapparates homolog (Hueck, 1998), so dass beide Systeme möglicherweise auf den gleichen Ursprung zurückzuführen sind.

Das Typ IV-Sekretionssystem stellt eine Besonderheit dar, da ein Komplex aus DNA und Protein sekretiert wird. *Agrobacterium tumefaciens* besitzt ein Typ IV-System und transloziert auf diese Weise einen DNA-Protein-Komplex in pflanzliche Zielzellen (Winans et al., 1996). Des weiteren beinhaltet das Typ IV-Sekretionssystem eine Gruppe von sogenannten Autotransportern, wie z.B. das Zytotoxin VacA aus *Helicobacter pylori*, das die Vakuolenbildung von Epithelzellen induziert (Cover et al., 1994) und die sekretierten Proteine SepA aus *Shigella flexneri* (Benjelloun-Touimi et al., 1995) und EspC aus enteropathogenen *E. coli* (Stein et al., 1996). Dabei werden die zu sekretierenden Proteine durch das Typ II-Sekretionssystem unter Abspaltung der Signalsequenz über die innere Membran transportiert. Diese Proteine vermitteln jedoch ihre eigene Passage über die äußere Membran indem sie scheinbar eine Pore bilden, durch die sie hindurchtreten. Nach einer autoproteolytischen Spaltung wird das Protein ins Medium freigesetzt (Finlay und Falkow, 1997).

2. Typ III-Sekretionssysteme

Eine Vielzahl verschiedener Gram-negativer, pathogener Bakterien verwendet Typ III-Sekretionssysteme als einen konservierten und gleichzeitig hoch adaptierten Virulenz-Mechanismus (Hueck, 1998). So wurden Typ III-Sekretionssysteme bisher identifiziert in den tier- und humanpathogenen Bakterien *Yersinia* spp., *Shigella flexneri*, *Salmonella* spp., enteropathogene *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia* spp. und *Bordetella pertussis*, und in den Pflanzenpathogenen *Erwinia* spp., *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* und *Xanthomonas campestris*. Aber auch in den symbiontischen Bakterien *Rhizobium* spp. konnten Gene identifiziert werden, die ein Typ III-

Sekretionssystem kodieren und eine Rolle bei der Knöllchenbildung bei Leguminosen spielen.

Während der Mechanismus der Proteinsekretion hoch konserviert ist, besitzen die sekretierten Proteine eine große Divergenz. Dies spiegelt sich in der Vielzahl der Krankheiten, die durch diese Pathogene in den verschiedenen Wirten verursacht werden wider. Viele der sekretierten Proteine interagieren direkt mit den Wirtszell-Komponenten, um die Signaltransduktion zu beeinflussen. Die meisten sekretierten Proteine agieren im eukaryontischen Zytosol, in das sie durch den Typ III-Sekretionsmechanismus transloziert werden (Hueck, 1998).

Yersinia spp. besitzen ein Typ III-Sekretionssystem, das von einem Virulenzplasmid (pYV) kodiert wird. Aufgrund der Tyrosin-Phosphatase-Aktivität eines Effektorproteins (YopH) wird die Aufnahme durch Phagozyten inhibiert (Andersson et al., 1996). Für das Substratprotein YopE konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus als Zielsignal der Typ III-Sekretion dient (Lloyd at al., 2001). *Shigella flexneri*, das ebenfalls ein plasmidkodiertes Typ III-Sekretionssystem besitzt, sekretiert Effektorproteine (Ipa), die Membranausstülpungen („membrane ruffles“) in Epithelzellen induzieren. Auf diese Weise wird die eigene Aufnahme von *S. flexneri* in die Zielzellen des Wirtsorganismus vermittelt (Adam et al., 1995). Darüber hinaus ist *S. flexneri* in der Lage, phagozytische Membranen zu lysieren (Sansonetti et al., 1986) und Apoptose in Makrophagen zu induzieren (Zychlinsky et al., 1992). Neben der Invasion der Epithelzellen ist auch die Lyse der phagosomalen Vakuole und Induktion der Apoptose von dem *S. flexneri* Typ III-Sekretionssystem abhängig.

Auch innerhalb pflanzenpathogener Bakterien wie *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* und *Xanthomonas* sind Typ III-Sekretionssysteme vertreten und rufen verschiedene Krankheiten in den sensitiven Wirtspflanzen hervor. Typ III-Sekretion ist dabei unter anderem essentiell für die Induktion einer Abwehrreaktion in resistenten Pflanzen, die normalerweise keinen Wirt für das entsprechende Pathogen darstellen. Diese Reaktion wird als „hypersensitive response“ (HR) bezeichnet und ist charakterisiert durch rasches, lokales Absterben von Gewebe und die Produktion von antimikrobiellen Agenzien an der Stelle des bakteriellen Kontaktes. Dadurch wird die weitere Ausbreitung der infizierenden Bakterien in der Pflanze verhindert.

Tab. 1 Typ III-Sekretionssysteme von Gram-negativen Pathogenen

Spezies	**Lokalisation**	**Genbezeich-nungen**	**Substrat-proteine**	**Funktion**
Yersinia spp.	Virulenzplasmid, pYV	*ysc*, *lcr*, *tye*	Yop	Inhibierung der Aufnahme durch Phagozyten
Pseudomonas aeruginosa	Chromosom	*psc, pcr*	Exo, Pop	Zytotoxizität
Shigella flexneri	Virulenzplasmid	*mxi*, *spa*	Ipa	Invasion, Apoptose
Salmonella spp.	Chromosom, SPI1	*inv*, *spa*, *prg*	Sip, Sop, Spt	Invasion, Apoptose, Zytokin-Induktion
Salmonella spp.	Chromosom, SPI2	*ssa*	Sse	Proliferation in Wirtsorganen
			STE	Überleben in Makrophagen
EPEC	Chromosom, LEE	*esc, sep*	Esp, Tir	“attachment and effacement”-Effekt bei Darmepithelzellen
pflanzen-pathogene Bakterien	Chromosom (ein Cluster), Plasmide	*hrc*	Hrp, Pop	Pathogenese bei Pflanzenzellen, „hypersensitive response“
Chlamydia spp.	Chromosom ?	*cds*	?	?

3. Pathogenese von *Salmonella* spp.

Salmonella spp. sind fakultativ intrazelluläre Erreger und können selbstlimitierende, lokale Darminfektionen, aber auch lebensbedrohliche, systemische Infektionen verursachen. Typhus abdominalis ist eine schwere Verlaufsform einer Salmonellose und ist mit hohem Fieber, Apathie und Benommenheit (typhus = der Nebel), abdominalen Schmerzen und Durchfällen verbunden. Nach Schätzung der WHO treten jährlich 16,6 Millionen Fälle des typhoiden Fiebers auf, wovon 600 000 tödlich verlaufen. Vor allem in Asien und Afrika ist Typhus weit verbreitet (Pang et al., 1998). *S. enterica* Serotyp Typhi (*S. typhi*), der Erreger

des Typhus abdominalis beim Menschen, wird aufgrund seiner hohen Wirtsspezifität auch als humanpathogen bezeichnet. Im Gegensatz dazu besitzt *S. enterica* Serotyp Typhimurium (*S. typhimurium*) eine breite Wirtsspezifität (Kingsley und Bäumler, 2000) und kann sowohl beim Menschen als auch innerhalb verschiedener Tierarten lokale Darminfektionen hervorrufen. Bei der Infektion von Mäusen durch *S. typhimurium* kommt es jedoch zur systemischen Infektion, die in ihrer Verlaufsform mit der Infektion vom Menschen mit *S. typhi* vergleichbar ist. Somit dient die murine Salmonellose, verursacht durch *S. typhimurium*, als Modell für typhoides Fieber beim Menschen (Lucas und Lee, 2000).

Nach oraler Aufnahme kolonisieren *Salmonella* spp. den Darm und sind in der Lage, sowohl M-Zellen als auch Enterozyten zu invadieren (Wallis und Galyov, 2000). Die M-Zellen sind mit darunter liegendem lymphatischen Gewebe assoziiert und gehäuft innerhalb einzelner Bereiche des Dünndarms, den sogenannten „Peyer's patches", lokalisiert. Nach Interaktion mit den Wirtszellen induziert *Salmonella* Umlagerungen des Actin-Zytoskeletts, die Ausstülpungen („membrane ruffles") der apikalen Membranen von Enterozyten und M-Zellen hervorrufen und die Bakterien einschließen. Intrazelluläre Bakterien sind in phagozytischen Vesikeln lokalisiert (Wallis und Galyov, 2000). *Salmonella* besitzt die Fähigkeit, sich in diesen Vesikeln zu vermehren. Die *Salmonella*-enthaltenden Phagosomen azidifizieren kurz nach der Aufnahme der Bakterien (Rathman et al., 1996). Durch *Salmonella* infizierte Enterozyten werden in das Darmlumen freigesetzt, wodurch das Darmepithel zerstört wird und absorbierende Oberflächen verloren gehen (Wallis und Galyov, 2000).

Die molekularen Grundlagen der Invasion von *Salmonella* spp. in eukaryontische Zellen wurden intensiv untersucht (Galan, 1996). Jedoch ist der intrazelluläre Phänotyp, verbunden mit den Vorgängen, die zur systemischen Infektion führen, bisher nur teilweise charakterisiert.

4. *Salmonella typhimurium* besitzt zwei Typ III-Sekretionssysteme

Während der verschiedenen Phasen der Pathogenese ist *Salmonella* den zahlreichen antimikrobiellen Abwehrmechanismen des Wirtes (z.B. Phagozytose, Defensine) und Stressfaktoren (z.B. saurer pH-Wert, Nährstoffmangel, O_2-Radikale) ausgesetzt. Um den Wirtsorganismus erfolgreich zu kolonisieren und dabei dem Immunsystem zu entkommen, besitzt *Salmonella* sowohl unterschiedliche Stressantwortsysteme sowie eine große Zahl von virulenzassoziierten Genen. Diese Gene sind häufig innerhalb großer, chromosomaler Bereiche lokalisiert, die als Pathogenitätsinseln bezeichnet werden. Pathogenitätsinseln

wurden bei einer Vielzahl Gram-negativer und Gram-positiver Erreger identifiziert und stellen charakteristische genetische Elemente bakterieller Virulenz dar, die in einer verwandten apathogenen Spezies nicht vorhanden sind (Hacker et al., 1997).

Salmonella typhimurium besitzt zwei Typ III-Sekretionssysteme für Virulenzfaktoren, die von den *Salmonella*-Pathogenitätsinseln 1 (SPI1) und 2 (SPI2) kodiert werden. Diese beiden Typ III-Sekretionssysteme spielen während der Pathogenese eine unterschiedliche Rolle: Während SPI1 die Invasion von Epithelzellen vermittelt, ist SPI2 für das Überleben und die Replikation innerhalb der Wirtszellen und die im Verlauf systemischen Infektionen erforderlich.

Die Gene der SPI2, die Komponenten des Typ III-Sekretionssystems kodieren, wurden in vier funktionelle Gruppen eingeteilt (Abb. 1): Mit *ssa* werden die Gene bezeichnet, die den Sekretionssystem-Apparat kodieren, *ssr* sind die Gene, die den Sekretionssystem-Regulator kodieren, *ssc* sind die Gene, die die Sekretionssystem-Chaperone kodieren, und *sse* sind die Gene, die die Sekretionssystem-Effektoren kodieren (Hensel et al., 1997).

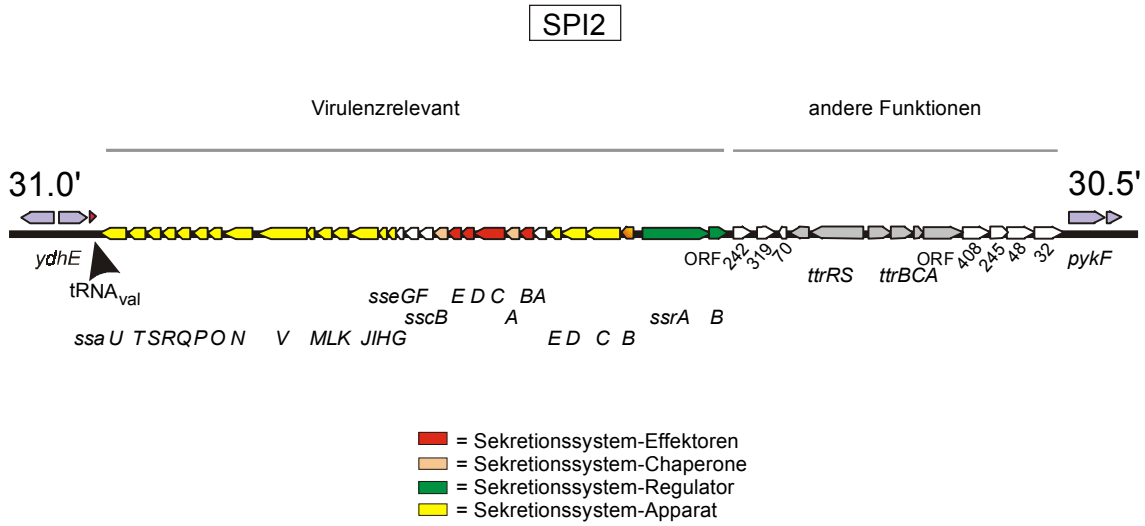


Abb. 1 Genetische Organisation der SPI2. Die verschiedenen funktionellen Gruppen der SPI2-Gene sind farblich dargestellt.

5. Induktion der Genexpression der SPI2 und Sekretion von Substratproteinen

Durch Analyse der SPI2-Genexpression und der Mengen an synthetisierten SPI2-Proteinen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen wurde gezeigt, dass das Wachstum in Minimalmedium sowohl mit niedrigen Mg^{2+}- oder Ca^{2+}-Konzentrationen als auch unter Phosphatmangel die Genexpression induziert (Deiwick et al., 1999). Dieser Effekt von

mikromolaren Mg^{2+}-Konzentrationen ist ähnlich der Regulation von Genen, die unter Kontrolle des PhoPQ-Systems stehen, einem globalen Zweikomponenten-Regulationssystem in *Salmonella*. PhoPQ induziert und reprimiert die Expression von ca. 40 Genloci in *Salmonella*, worunter sich wichtige Virulenzgene befinden (Miller, 1991; Soncini et al., 1996; Groisman und Ochman, 1997). Die Aktivierung von PhoPQ erfolgt dabei durch limitierte Mg^{2+}-Konzentrationen (Garcia Vescovi et al., 1996). Bei der Analyse der SPI2-Genexpression in verschiedenen genetischen Hintergründen wurde beobachtet, dass das PhoPQ-System die Expression von SPI2-Genen moduliert, jedoch nicht direkt reguliert (Deiwick et al., 1999).
Die Gene *ssrA* und *ssrB* der SPI2 kodieren den Sensor bzw. den Regulator eines lokalen Zweikomponenten-Regulationssystems (Shea et al., 1996). Die Funktion des SsrAB-Systems ist für die Expression struktureller SPI2-Gene erforderlich (Deiwick et al., 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Transkription des SsrAB-Systems durch OmpR-EnvZ reguliert wird, ein weiteres Zweikomponenten-System mit globaler Regulationsfunktion. In *S. typhimurium* stellt OmpR-EnvZ möglicherweise einen Sensor für niedrige Osmolarität und niedrigen pH-Wert in den Phagosomen dar (Lee et al., 2000). Durch Wachstum von *S. typhimurium* in Minimalmedium mit saurem pH-Wert (pH 5,0-5,8) konnte die Sekretion von SseB (Beuzón et al., 1999) und anderen Substratproteinen der SPI2 (Nikolaus et al., 2001) induziert werden. Die Substratproteine sind überwiegend auf der Zelloberfläche lokalisiert und bilden dabei möglicherweise eine stabile Translokatorstruktur aus. Da allein ein niedriger pH-Wert die SPI2-Genexpression nicht beeinflusst, könnte der saure pH-Wert das physiologische Signal sein, das die Sekretion von SPI2-Substratproteinen induziert, die für die intrazelluläre Proliferation von *Salmonella* erforderlich sind.

6. Untereinheiten verschiedener Typ III-Sekretionssysteme gehören Proteinfamilien an

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der einzelnen Apparatskomponenten zeigt, dass die meisten Proteine des SPI2-Systems die größte Sequenzähnlichkeit zu den Proteinen des Typ III-Sekretionssystems in *Yersinia* spp. besitzen (Tab. 2). Die Genprodukte von *ssaL*, *ssaM* und *ssaP* haben keine signifikante Ähnlichkeit zu Produkten anderer Typ III-Sekretionssysteme und könnten für SPI2-spezifische Funktionen von Bedeutung sein (Hensel et al., 1997).

Tab. 2 Sequenzvergleiche zwischen Komponenten der Typ III-Sekretionssysteme der SPI2 und SPI1 und verwandten Bakterien*.

Salmonella **SPI2**	***Salmonella*** **SPI1**	***Yersinia***	***Shigella***	**EPEC**	***Erwinia***
SsaC	InvG 39% (48%)	YscC 32% (42%)	MxiD 29% (37%)	EscC 45% (55%)	-
SsaJ	PrgK 29% (56%)	YscJ 37% (62%)	MxiJ 24% (51%)	EscJ 39% (50%)	-
SsaV	InvA 40% (67%)	LcrD/YscV 43% (69%)	MxiA 39% (66%)	EscV 49% (61%)	HrcV 40% (64%)
SsaN	InvC 41% (62%)	YscN 53% (71%)	SpaL 44% (64%)	EscN 51% (61%)	HrcN 49% (67%)
SsaQ	InvK 20% (49%)	YscQ 22% (49%)	SpaO 18% (47%)	SepQ 26% (37%)	HrcQ 17% (41%)
SsaR	InvL 39% (66%)	YscR 54% (75%)	SpaP 34% (69%)	EscR 52% (67%)	HrcR 40% (67%)
SsaS	InvM 37% (66%)	YscS 50% (71%)	SpaQ 34% (69%)	EscS 43% (65%)	HrcS 42% (70%)
SsaT	InvN 24% (56%)	YscT 31% (59%)	SpaR 29% (58%)	EscT 37% (53%)	HrcT 26% (56%)
SsaU	SpaS 29% (56%)	YscU 36% (61%)	SpaS 29% (55%)	EscU 39% (54%)	HrcU 30% (56%)

* Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil identischer und ähnlicher (in Klammern) Aminosäuren im Vergleich zum SPI2-kodierten Protein (Hensel et al., 1997).

7. Struktur und Aufbau von Typ III-Sekretionssystemen

Für einige Untereinheiten der Typ III-Sekretionssysteme konnte die Lokalisation und die Funktion innerhalb des Sekretionsapparatkomplexes bestimmt werden. InvG, MxiD und YscC sind äußere Membranproteine und gehören zu der Familie der Sekretine. Sekretine besitzen einen homologen Bereich im C-Terminus, während der N-terminale Bereich nur zwischen Proteinen verwandter Systeme konserviert ist (Genin und Boucher, 1994). Sie bilden häufig große, stabile Multimere. Das YscC-Protein aus *Y. enterocolitica* konnte als solch ein stabiler, multimerer Komplex mit einer molekularen Masse von 600 kDa identifiziert werden. Dabei bildet YscC eine ringförmige Struktur mit einer zentralen Pore aus, die in der äußeren Membran lokalisiert ist (Koster et al., 1997). Ein weiteres

essentielles Protein für die Yop-Sekretion ist LcrD/YscV, ein 70 kDa großes Protein der inneren Membran, dessen Sekundärstruktur aus einem hydrophoben N-terminalen Bereich mit acht transmembranen Domänen und einem hydrophilen C-terminalen Bereich besteht (Plano et al., 1991). Diese Struktur ist hoch konserviert und konnte in allen bisher untersuchten Typ III-Sekretionssystemen nachgewiesen werden. YscN besitzt eine ATP-Bindungsstelle und ist im Zytoplasma lokalisiert oder an der inneren Membran assoziiert. Für InvC, das YscN-homologe Protein der SPI1 von *S. typhimurium*, konnte eine ATPase-Aktivität nachgewiesen werden. SsaJ zeigt eine signifikante Sequenzähnlichkeit zu der YscJ/MxiJ/PrgK-Familie von Lipoproteinen (Michiels et al., 1991; Allaoui et al., 1992) und besitzt die Lipoprotein-spezifische Signalsequenz (Hensel et al., 1997). Die Proteine SsaR, SsaS, SsaT und SsaU könnten membrangebundene Untereinheiten des Typ III-Sekretionssystems darstellen (Hensel et al., 1997). Für YscR und YscU, die homologen Proteine zu SsaR und SsaU, konnten transmembrane Domänen und ihre Lokalisation in der inneren Membran nachgewiesen werden (Fields et al., 1994; Allaoui et al., 1994). SseB, SseC und SseD zeigen eine schwache aber signifikante Ähnlichkeit zu den Aminosäuresequenzen von EspA, EspD und EspB, die über das Typ III-Sekretionssystem von enteropathogenen *E. coli* sekretiert werden (Hensel et al., 1998). EspA ist die Hauptkomponente einer filamentösen Struktur, die während des „attaching and effacing"-Effekts auf der Zelloberfläche gebildet wird. EspA-Filamente stellen eine direkte Verbindung zwischen dem Bakterium und der Wirtszelle her und sind für die Translokation von EspB in die infizierten Epithelzellen erforderlich (Knutton et al., 1998). SseC hat neben EspD auch Sequenzähnlichkeit zu YopB aus *Y. enterocolitica* und PopB aus *Pseudomonas aeruginosa*. Diese Gruppe von Effektorproteinen sind alle bei der Translokation von anderen Effektoren in die Zielzelle beteiligt. Für SscA und SscB wäre aufgrund einer Sequenzhomologie zu SycD aus *Y. pseudotuberculosis* bzw. zu IppI aus *S. flexneri* eine Funktion als spezifische Chaperone für Substratproteine denkbar (Hensel et al., 1998). Basierend auf den Sequenzhomologien zwischen den einzelnen Komponenten der Typ III-Sekretionssysteme würde sich für den SPI2-Typ III-Sekretionssystem-Apparat folgendes Modell ergeben (Abb. 2):

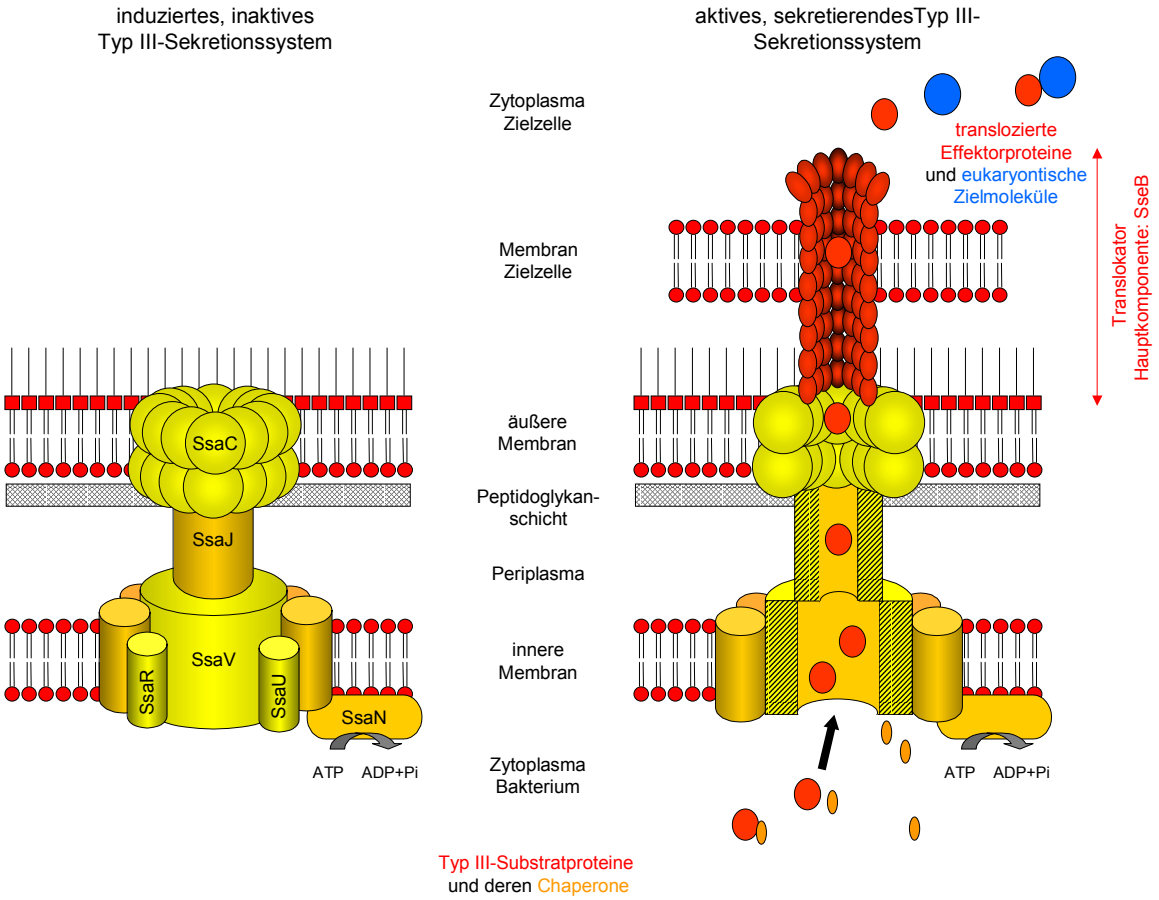


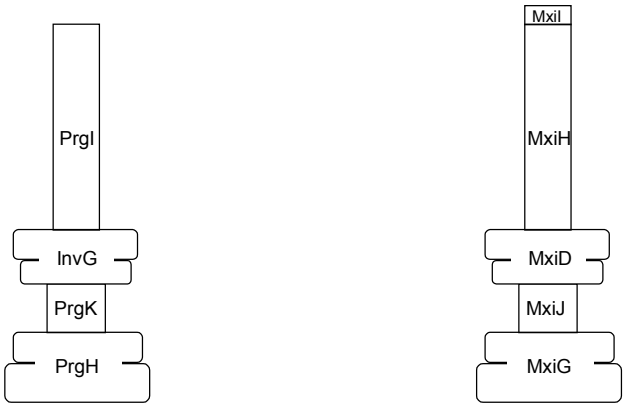
Abb. 2 Modell des SPI2-Typ III-Sekretionssystems. Der Sekretionsapparat (gelb) besteht aus zahlreichen Proteinuntereinheiten, die in der Zytoplasmamembran, in der äußeren Membran oder im Periplasma lokalisiert sein können. Die Substratproteine (rot) liegen im Zytoplasma vor und besitzen zum Teil spezifische Chaperone (orange). Im aktiven Zustand des Typ III-Sekretionssystems werden die Substratproteine vom Zytoplasma über die innere und äußere Membran auf die Zelloberfläche sekretiert und bilden dabei möglicherweise eine Translokatorstruktur aus. Mit Hilfe dieses Translokators werden dann die Effektorproteine in die eukaryontische Zielzelle transloziert. Die Energie für diesen Prozess liefert dabei eine membranassoziierte ATPase.
Basierend auf Sequenz-Ähnlichkeiten kann folgende Topologie von SPI2-Untereinheiten angenommen werden: SsaC bildet das Sekretin in der äußeren Membran. SsaJ ist ein Lipoprotein und ist im Periplasma lokalisiert. Mit den Proteinen SsaV, SsaR und SsaU ist der Apparat in der inneren Membran verankert. SsaN, eine ATPase, ist an der Zytoplasmamembran assoziiert. Die Hauptkomponente der Translokatorstruktur ist SseB.

8. Isolierte Typ III-Sekretionssysteme weisen nadelförmige Strukturen auf

Kubori *et al.* (1998) identifizierten und isolierten eine makromolekulare Struktur aus *S. typhimurium*, die sie als Nadel-Komplex bezeichneten. Diese Komplexe stellen den

Sekretionsapparat des SPI1-kodierten Typ III-Sekretionssystems dar. Im Elektronenmikroskop zeigen die Nadel-Komplexe eine zylindrische Struktur. Die basale Struktur ähnelt mit den zwei oberen und zwei unteren Ringen dem flagellaren Basalkörper (Kubori et al., 1998). Die Nadel selbst ist ca. 50 nm lang (Kimbrough und Miller, 2000). Die Hauptkomponenten der Nadel-Komplexe aus *S. typhimurium* (SPI1) sind InvG, PrgH und PrgK (Kubori et al., 1998; Kubori et al., 2000). InvG bildet vermutlich die beiden äußeren Ringe, die mit der äußeren Membran und der Peptidoglykanschicht in engem Kontakt stehen. Aus PrgH und PrgK sind die inneren Ringe zusammengesetzt, mit denen der Komplex in der Zytoplasmamembran verankert ist (Kimbrough und Miller, 2000). Die Hauptuntereinheit der Nadelstruktur ist PrgI (Kubori et al., 2000; Abb. 3).

Auch bei *Shigella flexneri* wurden ähnliche Nadel-Komplexe isoliert und beschrieben (Blocker et al., 1999). Der Nadel-Komplex aus *S. flexneri* ist zusammengesetzt aus den Untereinheiten MxiD, MxiG, MxiJ MxiH und MxiI (Tamano et al., 2000; Blocker et al., 2001). MxiD ist ein äußeres Membranprotein und bildet vermutlich die äußeren Ringe. MxiG und MxiJ sind in der inneren Membran inseriert und bilden die Basis des Nadel-Komplexes. Die Nadel ist hauptsächlich aus MxiH-Untereinheiten zusammengesetzt. MxiI bildet vermutlich den Abschluss der Nadelspitze (Blocker et al., 2001). Inzwischen konnten auch bei *Yersinia enterocolitica* nadelähnliche Strukturen auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Nach der Anreicherung und Reinigung der Nadeln konnte das Protein YscF als Untereinheit der Nadelstruktur identifiziert werden (Hoiczyk und Blobel, 2001).



	Salmonella typhimurium	*Shigella flexneri*
Nadellänge:	50 nm	45 nm
Nadelbreite:	8 nm	8-9 nm
Nadelkomplexe pro Zelle:	10-100	50-100
kodierende Region:	SPI1	*mxi*/*spa*
identifizierte Komponenten:	InvG, PrgK, PrgH PrgI	MxiD, MxiJ, MxiG MxiH, MxiI

Abb. 3 Schematische Darstellung und Eigenschaften der Nadel-Komplexe aus *Salmonella typhimurium*, die von der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 (Kubori et al., 1998; Kubori et al., 2000; Kimbrough und Miller, 2000) kodiert wird, und *Shigella flexneri* (Blocker et al., 1999; Tamano et al., 2000; Blocker et al., 2001).

9. Zielsetzung der Arbeit

Im Hinblick auf die Entwicklung neuer antibakterieller Therapeutika könnten Typ III-Sekretionssysteme eine Zielstruktur für neuartige Antibiotika darstellen. Durch eine Inhibierung der Sekretion von Virulenzproteinen durch Typ III-Sekretionssysteme könnte dadurch ein entscheidender Schritt in der Pathogenese von Infektionen mit Gram-negativen Bakterien unterbunden werden. Deshalb ist es von großem Interesse, den molekularen Mechanismus der Sekretion durch Typ III-Sekretionssysteme zu verstehen. Dazu sind grundlegende Untersuchungen zum strukturellen Aufbau eines Typ III-Sekretionssystems notwendig.

Das Ziel dieser Arbeit war die proteinbiochemische Charakterisierung des Typ III-Sekretionssystems, das von der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2 kodiert wird. Dazu sollten zunächst polyklonale Antikörper gegen rekombinante Proteine des Sekretionsapparates erzeugt werden, die dann zur Untersuchung der Struktur und des Aufbaus des Sekretionsapparates, sowie zur Aufklärung von Interaktionen zwischen den Untereinheiten eingesetzt werden könnten.

- Zur Charakterisierung von Protein-Interaktionen zwischen den Untereinheiten des SPI2-Sekretionsapparates sollten zunächst Analysen zur Identifizierung von Proteinkomplexen durchgeführt werden. Durch die Verwendung von Quervernetzern sollten mögliche Proteinkomplexe nachgewiesen werden, die durch Detektion im Western-Blot mit bereits vorhandenen und den neuen Antiseren weiter analysiert werden könnten.
- Nach einer Membranfraktionierung sollte die subzelluläre Lokalisation einzelner Proteinuntereinheiten des SPI2-Sekretionsapparates analysiert werden. Durch Immunoblotanalysen könnten anschließend die einzelnen Fraktionen untersucht werden.
- Für den Sekretionsapparat des SPI1-kodierten Typ III-Sekretionssystems konnten mit Hilfe der Elektronenmikroskopie nadelförmige Strukturen nachgewiesen werden (Kubori et al., 1998). Für den SPI2-kodierten Sekretionsapparat konnten bisher noch keine definierten Strukturen gezeigt werden. Deshalb sollten verschiedene Isolierungsmethoden zur Gewinnung des kompletten SPI2-Sekretionsapparates erprobt werden.
- Im Rahmen der strukturellen Analysen sollte durch den Einsatz von Mutanten mit Transposon-Insertionen in verschiedenen SPI2-Genen überprüft werden, welche Proteine für den Aufbau und die Funktion des Sekretionsapparates notwendig sind.
- Die Sekretionssignale für Typ III-Sekretionssysteme sind im allgemeinen noch unbekannt. Ein Signal für die Sekretion von Effektorproteinen des SPI2-kodierten Typ III-Sekretionssystems ist ein saurer pH-Wert (Beuzón et al., 1999; Nikolaus et al., 2001). Deshalb sollte untersucht werden, inwieweit der pH-Wert als äußerer Stimulus einen Effekt auf die Synthese verschiedener Apparatsproteine ausübt.

II. Material und Methoden

1. Bezugsquellen der Substanzen

1.1 Chemikalien

Die allgemeinen Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, mit dem Reinheitsgrad p.a. von der Firma Merck, Darmstadt, oder von Sigma, Deisenhofen, bezogen.

1.2 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme waren, wenn nicht anders vermerkt, von Boehringer, Mannheim.

2. Bakterielle Stämme

Die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3 Bezeichnung und Eigenschaften von Bakterienstämmen und Plasmiden

Stamm	**relevante Eigenschaften**	**Ursprung/Referenz**
***Salmonella* spp.-Stämme**		
S. typhimurium NCTC12023	Wildtyp	National Culture Type Collection, Colindale, UK
P2D6	*ssaV*::mTn*5*	Shea *et al*. (1996)
P3B12	*invG*::mTn*5*	Shea *et al*. (1996)
P3F4	*ssrA*::mTn*5*	Shea *et al*. (1996)
P7A3	*ssaD* oder *ssaE*::mTn*5*	Shea *et al*. (1996)
P7B8	*ssrA*::mTn*5*	Shea *et al*. (1996)
P7G2	*ssaC*::mTn*5*	Shea *et al*. (1996)
P8G12	*ssrB*::mTn*5*	Shea *et al*. (1996)
P9B6	*ssaG*::mTn*5*	Shea *et al*. (1996)
P9B7	*ssaT*::mTn*5*	Shea *et al*. (1996)
P9G4	*ssaD*::mTn*5*	Shea *et al*. (1996)
P10E11	*sscA*::mTn*5*	Shea *et al*. (1996)

P11B9	*ssaB*::mTn*5*	Shea *et al*. (1996)
P11C3	*ssaV*::mTn*5*	Shea *et al*. (1996)
P11D10	*ssaJ*::mTn*5*	Shea *et al*. (1996)
NP*ssaV*	*ssaV*::*aphT*	Deiwick *et al*. (1998)
HH 102	*sseB*Δ*::aphT*	Hensel e*t al*. (1998)
HH 104	*sseC::aphT*	Hensel e*t al*. (1998)
HH 106	*sseE*Δ	Hensel e*t al*. (1998)
MvP 101	*sseD::aphT*	Medina *et al*. (1999)
MvP 131	*ssaB*::*luc*	Deiwick *et al*. (1999)
S.t. [pWSK29 *ssrAB*]	*ssrAB* in pWSK29	Deiwick *et al*. (1999)
S.t. [pWSK2127]	*ssaB*::*M45* in pWSK2127	erhalten von M. Hensel
EG10128	*spiC*::*kan*	Uchiya *et al*. (1999)
EG10128 [pEG9127]	*spiC* in pBAC108L	Uchiya *et al*. (1999)
EG10128 [pWSK2127]	*spiC*::kan, *ssaB*::*M45* in pWSK2127	erhalten von M. Hensel

***Escherichia coli*-Stämme**

XL1-Blue MRF’	siehe Herstellerangaben	Stratagene, Heidelberg
SG13009 [pREP4]	pREP Amp^r, Kan^r	Qiagen, Hilden

Plasmide

pQE30	Amp^r, 6× His-tag Expressionsvektor	Qiagen, Hilden
pGEX-2T	Amp^r, GST-Genfusionsvektor	Amersham Pharmacia, Freiburg
pGEX-4T-3	Amp^r, GST-Genfusionsvektor	Amersham Pharmacia, Freiburg

3. Kulturbedingungen

3.1 Medien

LB-Medium:

NaCl	5 g
Bactotrypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
dH_2O	ad 1 l

pH 7,5, einstellen mit NaOH

YENB-Medium:

Hefeextrakt	0,75%
Nutrient broth	0,8%

2× YT-Medium:

NaCl	5 g
Hefeextrakt	10 g
Bactotrypton	16 g
dH_2O	ad 1 l

F-Medium:

KCl	5 mM
$(NH_4)_2SO_4$	7,5 mM
K_2SO_4	0,5 mM
KH_2PO_4	1 mM
BIS-TRIS/HCl, pH 7,0	0,1 M
$MgCl_2$	30 µM
Glycerin	38 mM
Casaminosäuren	0,1%
pH 5,0, einstellen mit HCl	

PCN-Medium:

NaCl	0,05 M
K_2SO_4	0,276 mM
MOPS/MES-KOH	80 mM
pH 7,4/pH 5,8	
Eisen-Stammlösung	1×
K_2HPO_4/KH_2PO_4	337,5 µM
NH_4Cl	15 mM
Glukose	0,4%
$MgSO_4$	1 mM
$CaCl_2$	1 µM

100× Eisen-Stammlösung:

$FeSO_4$	1 mM
Na_3Citrat/Citronensäure, pH 7,0	40 mM
Spurenelementelösung	100×

SOC-Medium:

Bactotrypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
250 mM KCl	10 ml
2 M $MgCl_2$	5 ml
1 M Glukose	20 ml
pH 7, einstellen mit NaOH; Die sterilfiltrierte Glukose-Lösung wurde nach dem Autoklavieren zugegeben	

G-Medium:

KCl	5 mM
$(NH_4)_2SO_4$	7,5 mM
K_2SO_4	0,5 mM
KH_2PO_4	1 mM
BIS-TRIS/HCl, pH 7,0	0,1 M
$MgCl_2$	10 mM
Glycerin	38 mM
Casaminosäuren	0,1%
pH 7,0	

250 mM Phosphat-Stammlösung (10×):

K_2HPO_4	7,05 g
KH_2PO_4	1,29 g
ddH_2O	ad 200 ml
pH 7,4	

10000× Spurenelementelösung:

$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	10 µM
$Na_2SeO_3 \times 5\ H_2O$	10 µM
H_3BO_3	4 mM
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	0,3 mM
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,1 mM
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	0,8 mM
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,1 mM

Die Komplex-Medien wurden durch Autoklavieren (121°C, 200 kPa, 20 min) sterilisiert, die Stammlösungen und Minimalmedien wurden sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße).

3.2 Dauerkulturen

Dauerkulturen wurden von Einzelkolonien in LB-Medium, das mit entsprechenden Antibiotika versetzt war, angeimpft und zu je 1 ml der stationären Kultur 7% (v/v) Dimethylsulfoxid gegeben und bei -20°C und -80°C eingefroren.

3.3 Beimpfung und Inkubation

Bakterienstämme wurden aus den Dauerkulturen auf LB-Platten, die mit entsprechenden Antibiotika versetzt waren, ausgestrichen. Die daraus gewonnenen Einzelkulturen wurden anschließend in LB-Flüssigmedium oder Minimalmedium überimpft. Kulturvolumina von 3-4 ml wurden in Kulturröhrchen in einer drehenden Trommel („roller drum“, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) mit 50 rpm bei 37°C inkubiert, größere Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyer-Kolben mit bzw. ohne Schikanen in Schüttelinkubatoren (Certomat BS-1, B. Braun Biotech International, Melsungen) bei 37°C und 150-200 rpm inkubiert.

4. Genetische Methoden

4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation einzelner SPI2-Gene und Genfragmente wurde das „Expand^{TM} High Fidelity PCR System“ (Boehringer, Mannheim) angewendet. Der PCR-Ansatz (20 µl) war folgendermaßen zusammengesetzt: 1 ng/µl genomische DNA; je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP; 0,3 pmol/µl Starteroligonukleotide; 2,5 Einheiten Taq-Polymerase; 2 µl 10× Taq-Puffer; ddH_2O ad 20 µl. Die Anlagerungstemperatur T_m der Oligonukleotide wurde aus dem GC-Gehalt berechnet: $T_m = 4 \times [GC] + 2 \times [AT]$. Der PCR-Zyklus betrug 95°C → 5 min, 30 × [T_m → 45 s, 72°C → 2 min, 95°C → 30 s] 72°C → 10 min, 4°C → ∞.

Tab. 4 Starteroligonukleotide für die Amplifikation verschiedener SPI2-Gene bzw. Genfragmente. Die Schnittstellen für die jeweiligen Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Gen/ Genfragment	Vorwärts-Starteroligonukleotid	Rückwärts-Starteroligonukleotid
ssaB	5’-CTCAGATCTGAGGAGGGATTCATG-3’	5’-ATCGTCGACTTATACCCCACCCGAATA-3’
ssaC	5’-GCAGGATCCGATGAGTTATCATGGAAAG-3’	5’-TTGCCCGGGATCATTGCGAAACAAATGAC-3’

ssaD	5'-CATGGTTGGATCCAAGAGTTCCTGG-3'	5'-CAGTAATAAGTAATTACCATGG-3'
ssaJ	5'-CTTGGATCCTGTGATGTGGATCTTTATC	5'-TAACCCGGGCGGATAAGGGTATTTCATC-3'
ssaN	5'-GAATGGATCCATGCAACGTCTGAG-3'	5'-CCACCCGGGCTCGGTGAGTATTTGG-3'
ssaO	5'-CTCAGATCTTTGCTGGAGATAATCGC-3'	5'-GCTGTCGACTCAACTTTGGTAATACGC-3'
ssaS	5'-CTCAGATCTGATTCTGAATTGACGCAAT-3'	5'-AGAGTCGACTCAACCATGCTCTCCAAT-3'
ssaT	5'-TTAGGATCCGCACTTTTACG-3'	5'-TCTCCCGGGTACAGATGGAAACC-3'
ssaU	5'-CTGTGGATCCGAGAAAACAGAACAG-3'	5'-CAAAAGCCCGGGTGGTGTTTCGGTAG-3'
$ssaU_{(verkürzt)}$	5'-CAAGGATCCAAGATTAGAAAAGATCTAAA-3'	5'-CAAAAGCCCGGGTGGTGTTTCGGTAG-3'
ssaV	5'-ACCGGATCCGTTGATATCCTGATTAC-3'	5'-GCATCCCCGGGTTCTTCATTGTCCG-3'
$ssaV_{(verkürzt)}$	5'-ATCGGATCCCGCCGCAAAAAGTCTG-3'	5'-GCATCCCCGGGTTCTTCATTGTCCG-3'
sseF	5'-AAGGGATCCTCGTTTCCTCCCCCT-3'	5'-ATGGGTCGACCCGAGATGTATGATC-3'
ssrA I	5'-ATTAAGATAGTCGACAGTAATGGTGTAGT-3'	5'-GGTGAATTCACGGCAGCATATAATAG-3'
ssrA II	5'-ATTAAGATAGTCGACAGTAATGGTGTAGT-3'	5'-ATGGTTGCATGCCGGCAGCATATAATA-3'

4.2 Ligation

Die verschiedenen SPI2-Gene bzw. Genfragmente wurden mit der T4-DNA-Ligase (Boehringer, Mannheim) in die Expressionsvektoren ligiert. Die Ligation wurde in dem vom Hersteller mitgelieferten Ligationspuffer unter den angegebenen Bedingungen angesetzt und bei 16°C über Nacht inkubiert.

Tab. 5 Ligation verschiedener SPI2-Gene bzw. Genfragmente in Expressionsvektoren

Gen	Schnittstellen	Fragmentgröße [bp]	Vektor
ssaB	*Bgl* II/*Sal* I	404	pQE40
ssaC	*Bam* HI/*Sma* I	1364	pGex-2T, pQE30
ssaD	*Bam* HI/*Sma* I	1066	pGex-2T, pQE30
ssaJ	*Bam* HI/*Sma* I	626	pGex-2T, pQE30
ssaN	*Bam* HI/*Sma* I	1289	pGex-2T, pQE30
ssaO	*Bgl* II/*Sal* I	377	pQE40
ssaS	*Bgl* II/*Sal* I	269	pQE40
ssaT	*Bam* HI/*Sma* I	677	pGex-2T, pQE30
ssaU	*Bam* HI/*Sma* I	1058	pGex-2T, pQE30
$ssaU_{(verkürzt)}$	*Bam* HI/*Sma* I	442 (AS 203-353)	pGex-2T, pQE30
ssaV	*Bam* HI/*Sal* I	1914	pQE30
$ssaV_{(verkürzt)}$	*Bam* HI/*Sma* I	1072 (AS 327-682)	pGex-2T, pQE30
sseF	*Bam* HI/*Sal* I	700	pGex-4T-3, pQE30
ssrA I	*Sal* I/*Eco* RI	2652	pGex-4T-3
ssrA II	*Sal* I/*Sph* I	2652	pQE30

4.3 Elektrotransformation

4.3.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

YENB-Medium + Tetracyclin (15 µg/ml) wurde mit einer stationären Vorkultur des Rezipientenstammes XL1-Blue MRF' (Qiagen, Hilden) angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6 angezogen. Dann wurden die Zellen ca. 5 min auf Eis gekühlt und anschließend abzentrifugiert (4000×g, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wurde 2× mit 0,5 Volumen eiskaltem ddH_2O und 1× mit 0,1 Volumen eiskaltem, 10%-igem Glycerin (v/v) gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in eiskaltem 10%-igem Glycerin aufgenommen (100-fach konzentriert), aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

4.3.2 Elektroporation

In die vorgekühlten Elektroporationsküvetten wurden 2 µl Ligationsansatz (0,1-1 µg/µl DNA) pipettiert und mit 40 µl der kompetenten Zellen gemischt. Dieser Ansatz wurde ca. 1 min auf Eis inkubiert und anschließend elektroporiert. Die Einstellungen am Elektroporator (BioRad, München) betrugen 25 µF, 200 Ω, 2,5 kV. Zu dem Ansatz wurde sofort 1 ml 37°C warmes SOC-Medium dazupipettiert und 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 3200×g abzentrifugiert und zu dem Zellpellet 100 µl LB + Antibiotikum dazupipettiert. Je 10 und 90 µl wurden von dem Transformationsansatz auf LB-Agarplatten, die selektive Antibiotika enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.4 Kolonie-PCR

500 µl steriles ddH_2O wurde in einzelne Eppendorf-Gefäße vorgelegt. Aus dem Transformationsansatz wurden von einer Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher Bakterien abgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und resuspendiert. Nach kurzem Durchmischen auf dem Vortex-Mischer wurden die Ansätze 5 min bei 100°C aufgekocht und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden 1 µl/20 µl Reaktionsansatz für die PCR eingesetzt. Zur Kontrolle wurde von einer erfolgreichen Transformation Plasmid-DNA isoliert und ein Restriktionsverdau durchgeführt.

Die Reinigung von Plasmid-DNA, DNA-Fragmenten und PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe von Reinigungskits der Firma Qiagen (Hilden).

4.5 Überproduktion rekombinanter Proteine im kleinen Volumen

3 ml 2× YT-Medium + Antibiotikum wurden 1:100 mit einer Vorkultur angeimpft und bei 37°C inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,5-0,6 erreicht war. Dann wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1,0 mM zugegeben. Nach 2-3 h Inkubation bei 28°C wurde 5 min bei 3200×g abzentrifugiert und das Pellet in Lysispuffer (siehe 5.6.1) aufgenommen.

4.6 Überproduktion rekombinanter Proteine im Fermenter

Die Überproduktion rekombinanter Proteine im 5 l-Maßstab wurde in einem Fermenter (Biostat B, B. Braun Biotech International, Melsungen) durchgeführt. Dabei wurden 5 l autoklaviertes 2× YT-Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit 20 ml einer Übernachtkultur angeimpft. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von $NaOH/H_2SO_4$ reguliert. Die Schaumbildung wurde durch Zugabe von Anti-foam B (1/100 Verdünnung, Merck, Darmstadt) unterdrückt. Die Belüftung erfolgte durch einen Kompressor. Die Überproduktion des rekombinanten Proteins wurde bei einer OD_{600} von 0,5-0,7 mit 0,2 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 h Inkubation wurde die Kultur durch Zentrifugation geerntet und die Zellpellets bei -80°C eingefroren.

4.7 Luziferase-Reportergen-Messungen

Ein bestimmtes Volumen einer bakteriellen Kultur, entsprechend 250 µl bei einer OD_{600}=1,0, wurde für 5 min bei 20000×g bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl Lysispuffer (100 mM KH_2PO_4-KOH, pH 7,8; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100; 5 mg/ml BSA; 1 mM DTT; 5 mg/ml Lysozym) resuspendiert (Vortex-Mischer), 15 min bei RT inkubiert und dabei ca. alle 3 min auf dem Vortex-Mischer kurz durchgemischt. Die Probe wurde bei -20°C 1 h eingefroren. Je 25 µl Probe wurden in eine Mikrotiterplatte (MicroFluor-Platte, Dynatech, Denkendorf) pipettiert und kurz vor der Messung 50 µl Luc-Reagenz (20 mM Tricin-HCl, pH 7,8; 1,07 mM $(MgCO_3)_4Mg(OH)_2 \times 5\ H_2O$; 100 µM EDTA; 33,3 mM DTT; 270 µM Li_3-Coenzym A; 470 µM D(-)-Luciferin; 530 µM Mg-ATP) zugegeben. Dann wurde die Lumineszenz der einzelnen Proben für 5 s im Beta-Plate (1450 MicroBetaTriLux, Wallac) gemessen. Die Aktivität wurde in LCPS (luminescence counts per second) angegeben. 1 LCPS entspricht 100 CPS (counts per second). Die einzelnen Werte wurden in CPM (counts per minute; Multiplikation mit dem Faktor 1200) umgerechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Die in den Graphen angegebenen Werte wurden aus jeweils drei hintereinander folgenden Messwerten gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

4.8 β-Galaktosidase-Reportergen-Messungen

Die Messung der β-Galaktosidaseaktivität erfolgte mit einer Methode modifiziert nach Miller (1992).

15-50 µl Kultur wurden mit Z-Puffer (60 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 7,0; 10 mM KCl; 1 mM $MgSO_4$; 50 mM β-Mercaptoethanol) auf 1 ml aufgefüllt, 40 µl Chloroform und 20 µl 0,1% SDS zugegeben und ca. 10 s auf dem Vortex-Mischer durchmischt. Die Probe wurde 5 min bei 28°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl ONPG gestartet. Nach Entwicklung einer Gelbfärbung (einige Minuten) wurde die Reaktion mit 500 µl 1 M Na_2CO_3 gestoppt. Der Ansatz wurde 5 min bei 20000×g abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Von diesem Überstand wurde dann im Photometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg) die Absorption bei 420 nm gemessen. Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde in Miller-Einheiten angegeben und folgendermaßen berechnet:

$$\frac{1000 \times OD_{420}}{t \times V \times OD_{600}} = \text{β-Galaktosidase-Einheiten}$$

OD_{420}	Absorption bei 420 nm nach der Reaktion
t	Reaktionszeit [min]
V	Kulturvolumen [ml]
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm der Kultur kurz vor der Reaktion

Die Aktivitätsmessung wurde zweimal wiederholt.

5. Proteinbiochemische Methoden

5.1 Reinigung der GST-Fusionsproteine SsaJ und SsaN

Das Zellpellet aus der Fermenterexpression (siehe 4.6) wurde in 10 ml PBS pro g Feuchtgewicht resuspendiert. Anschließend wurde Lysozym in einer Endkonzentration von 1,25 mg/ml zugegeben und der Ansatz ca. 1 h bei -80°C eingefroren. Die Bakteriensuspension wurde zweimal mit einer French Press (SLM-Aminco, Spectronic Instruments, Rochester) bei einem Druck von 110,2 MPa aufgeschlossen. Dann wurde das Lysat für 20 min bei 10000×g bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert und anschließend in 8 M Harnstoff, 0,5 M NaCl, 1% Triton X-100 in PBS resuspendiert und ca. 2 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10000×g für 20 min wurde der Überstand mit 1× Lysispuffer 1:1 gemischt, erneut abzentrifugiert und auf 12% SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970) aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele mit 0,3 M $CuCl_2$

angefärbt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und das Protein durch Elektroelution (Elektro-Eluter Modell 422, BioRad, München) extrahiert. Nach Acetonfällung (siehe 5.4.1) wurde das Protein in PBS aufgenommen. Um die Proteinmenge zu bestimmen, wurden definierte BSA-Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,0 mg/ml) auf ein Coomassie-gefärbtes Gel aufgetragen und diese mit dem gereinigten Protein verglichen. Die Reinheit und Identität des isolierten Proteins wurden im Coomassie-gefärbten Gel und im Western-Blot überprüft.

5.2 Reinigung der His-tag-Fusionsproteine

Die Reinigung der His-tag-Fusionsproteine erfolgte in Anlehnung an das Handbuch „The QIAexpressionist™“ von Qiagen. Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeiten der Fusionsproteine wurden bei der Reinigung sowohl native als auch denaturierende Bedingungen gewählt.

5.2.1 Reinigung des His-tag-Fusionsproteins SsaV

Nach Zellaufschluss mit der French Press wurde das Lysat in der Ultrazentrifuge (Beckman Optima™ LE-80K, Beckman Instruments, Kalifornien) 1 h bei 40000 rpm (Rotor Ti 60) und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,45 µm) und mit Hilfe der Pumpe P-1 auf eine 1 ml HiTrap-Säule (Amersham Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule in die Chromatographie-Apparatur (Gradi Frac, Amersham Pharmacia, Freiburg) eingespannt und mit ca. 15 ml Startpuffer A (50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 8,0; 1 M NaCl; 1 mM Imidazol) gewaschen. Das Fusionsprotein wurde in einem Gradienten von 1-250 mM Imidazol eluiert (Elutionspuffer B: 20 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 8,0; 0,5 M NaCl; 250 mM Imidazol) und die Fraktionen gesammelt. Einzelne Fraktionen wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung und Western-Blot-Analyse auf Reinheit und Identität des Zielproteins getestet. Bei der quantitativen Proteinbestimmung wurde erneut BSA als Protein-Standard im Coomassie-gefärbten Gel verwendet (siehe 5.1).

5.2.2 Reinigung des His-tag-Fusionsproteins SsaC

Nach Zellaufschluss wurde das gewaschene Pellet (siehe 5.1) in 9 M Harnstoff, 1 M NaCl, 0,1% Triton X-100, 10 mM Imidazol in 100 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4,, pH 8,0 aufgenommen, gründlich resuspendiert und ca. 2 h bei RT und über Nacht bei 4°C inkubiert. Um die unlöslichen Zellbestandteile zu entfernen, wurde bei 10000×g 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in der Ultrazentrifuge 1 h bei 54000 rpm (Rotor Ti 60) abzentrifugiert. Die lösliche Fraktion wurde sterilfiltriert (0,8 µm und 0,45 µm). Der

Probenauftrag auf die HiTrap-Säule und die anschließende chromatographische Auftrennung wurde wie in 5.2.1 beschrieben durchgeführt. Als Startpuffer A wurde 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 8,0, 1 M NaCl, 1 mM Imidazol, 8 M Harnstoff und 0,1% Triton X-100 und als Elutionspuffer B wurde 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 8,0, 0,5 M NaCl, 250 mM Imidazol, 8 M Harnstoff und 0,1% Triton X-100 verwendet. Durch Dialysieren der ausgewählten Fraktionen gegen 10 mM EDTA, pH 8,0 wurden Harnstoff und Salze wieder entfernt. Zum Schluss wurden die Fraktionen in einer Vakuumzentrifuge durch Einengen im Vakuum aufkonzentriert.

5.2.3 Reinigung der His-Tag-Fusionsproteine SsaB, SsaO und SsaS

Hier wurden die Zellpellets jeweils aus einer überexprimierten 500 ml-Kultur gewonnen. Der Zellaufschluss erfolgte wie in 5.1 beschrieben. Das gewaschene Pellet wurde anschließend in 50 mM Na_2HPO_4, 8 M Harnstoff, 1 M NaCl, 0,1% Triton X-100, pH 8,0 (H_3PO_4) resuspendiert und 2-3 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach wurde bei 10000×g 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in der Ultrazentrifuge bei 40000 rpm (Rotor Ti 60) 90 min zentrifugiert und vor dem Auftragen auf die Säule sterilfiltriert (0,2 µm), um noch eventuell unlösliche Zellfragmente zu entfernen. Für die affinitätschromatographische Auftrennung wurde als Startpuffer A 50 mM Na_2HPO_4, 8 M Harnstoff, 0,5 M NaCl, 0,01% Triton X-100, pH 8,0 (H_3PO_4) und als Elutionspuffer B 50 mM Na_2HPO_4, 8 M Harnstoff, 1 M NaCl, 0,01% Triton X-100, pH 3,5 (H_3PO_4) eingesetzt. Da durch die Affinitätschromatographie (siehe 5.2.1) keine ausreichende Trennung erzielt wurde, wurden die Fraktionen, die das Zielprotein enthielten vereinigt, anschließend 1:1 mit 1× Lysispuffer gemischt und auf 12% SDS-Gele (Schägger und von Jagow, 1987) aufgetragen. Bei SsaS wurden die vereinigten Fraktionen gegen 5 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 8,5 dialysiert und in der Vakuumzentrifuge konzentriert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Nach Elektroelution wurden die Proben in der Vakuumzentrifuge konzentriert.

5.3 Reinigung von OmpA

Nach einer Membranfraktionierung mit N-Lauroyl-Sarcosin (siehe 5.14) wurde die äußere Membranfraktion auf ein präparatives 8% SDS-Gel (Schägger und von Jagow, 1987) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Nach Anfertigung eines Blots (siehe 5.8) auf PVDF- und Nitrozellulose-Membran wurde die PVDF-Membran in Coomassie-Lösung angefärbt und die entsprechende Bande ausgeschnitten und für die N-terminale Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzierung wurde von Dr. W. Schröder, Freie Universität Berlin, durchgeführt. Dabei konnte die erwartete Sequenz von OmpA (APKD)

bestätigt werden. Die Nitrozellulose-Membran wurde mit Ponceau S angefärbt, ebenfalls die entsprechende Bande ausgeschnitten und in kleinere Membranstückchen geteilt. Danach wurden die Membranstückchen 3× mit PBS gewaschen und entfärbt und nach dem Trocknen auf Whatman-Papier bei -20°C eingefroren.

5.4 Fällung von Proteinen

5.4.1 Aceton-Fällung

Die zu konzentrierende Proteinlösung wurde mit dem mindestens 4-fachen Volumen an eiskaltem Aceton versetzt und 1 h bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 10000×g für 30 min bei 0°C wurde das Pellet bei RT getrocknet.

5.4.2 Trichloressigsäure (TCA)-Fällung

Nach Zugabe von TCA in einer Endkonzentration von 10%, wurde der Ansatz 1 h auf Eis inkubiert und anschließend bei 30000×g für 30 min bei 0°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem Aceton gewaschen und getrocknet.

5.5 Quantifizierung von Proteinen

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte nach Markwell *et al.* (1978). Diese Methode basiert auf der nach Lowry (Übersichtsartikel von Peterson, 1979) und ist speziell für Membranproteine geeignet. Des weiteren wurde auch die Methode nach Bradford (1976) eingesetzt.

5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe zwei verschiedene Gelsysteme verwendet. Für Proteine mit einer höheren molekularen Masse (>50 kDa) wurde das Gelsystem nach Laemmli (1970) mit einer Acrylamid-Konzentration von 7,5-12% im Trenngel verwendet. Das Gelsystem nach Schägger und von Jagow (1987) zeigte für kleinere Proteine eine höhere Auftrennung, wobei die Acrylamid-Konzentration im Trenngel 8% bzw. 12% betrug.

Für kleine SDS-Polyacrylamid-Gele (81×69×0,75 mm) wurde die Mini-Protean II (BioRad, München) eingesetzt. Die großen SDS-Gele (160×200×1,5 mm) wurden in der Protean II xi (BioRad, München) angefertigt. Die eingesetzten Volumina der Trenngele betrugen für 2 kleine SDS-Gele 10 ml und für 13-14 kleine SDS-Gele (Multi-Casting) 75 ml. Für 2 große SDS-Gele wurden 100 ml Trenngel und für 6 große Doppelgele (Multi-

Casting) 550 ml eingesetzt. Für die Herstellung eines Sammel- bzw. Trenngels wurde Protogel 30% (w/v) Acrylamid:0,8% (w/v) Bis-Acrylamid (37,5:1) bzw. Accugel 40% (w/v) 29:1 Acrylamid:Bis-Acrylamid (National Diagnostics, Georgia) verwendet.
Die eingestellte Zeit und Spannung während der SDS-PAGE nach Laemmli (1970) betrugen für kleine SDS-Gele 15 min bei 35 V, 20 min bei 50 V, 30 min bei 90 V und 55 min bei 135 V und für große SDS-Gele 1 h bei 35 V und 16 h bei 70 V bei 4°C. Die Auftrennung der Proteine nach dem Gelsystem nach Schägger und von Jagow (1987) erfolgte bei kleinen SDS-Gelen bei 1 h bei 30 V und 2 h 10 min bei 80 V und bei großen SDS-Gelen 1 h bei 30 V, 1 h bei 80 V, 2 h bei 100 V, 2 h bei 120 V und 12 h bei 150 V bei 4°C.

5.6.1 Probenvorbereitung

Die Proben wurden in einem denaturierenden, reduzierenden Lysispuffer (12,5% Glycerin; 4% SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% β-Mercaptoethanol; 0,01% Bromphenolblau) resuspendiert, 3-5 min bei 105°C in einem Heizblock aufgekocht und anschließend auf Eis abgekühlt (OD_{600}=1,0 ⇒ Pellet von 1 ml Kultur in 100 µl Lysispuffer aufnehmen). Um die durch Lyse freigesetzte DNA abzutrennen, wurden die Proben vor dem Probenauftrag 10 min bei 21000×g und 4°C abzentrifugiert. Je nach Größe des eingesetzten Kammes wurden zwischen 3 und 10 µl des Lysates auf das Gel aufgetragen.

5.7 Semidry-Blot (Towbin et al., 1979)

Das Gel wurde nach der Elektrophorese in Semidry-Puffer (3,03 g Tris; 14,4 g Glycin; 10% Methanol; ad 1 l mit ddH_2O) 15 min äquilibriert. Die geschnittenen Blotpapiere (GB40, GLW, Würzburg) und die Nitrozellulose-Membran (Protran BA85, Schleicher & Schuell, Dassel) wurden kurz in Semidry-Puffer getränkt und ein Blotpapier, dann die Membran und das Gel und das zweite Blotpapier auf die Anode der Semidry-Blotkammer (BioRad, München) aufgelegt. Der Transfer erfolgte 25 min bei 18 V.

5.8 Semidry-Blot (Kyhse-Andersen, 1984)

Insgesamt 6 Blotpapiere (GB40, GLW, Würzburg) wurden jeweils in der Größe des Gels geschnitten und dabei 2 Blotpapiere in Anodenpuffer 1 (0,3 M Tris; 20% Methanol), 1 Blotpapier in Anodenpuffer 2 (25 mM Tris; 20% Methanol) und 3 Blotpapiere in Kathodenpuffer (25 mM Tris; 40 mM 6-Aminocapronsäure; 10% Methanol) inkubiert. Nitrozellulose-Membranen (Protran BA85, Schleicher & Schuell, Dassel) wurden in Anodenpuffer 2, Polyvinylfluorid-Membranen (PVDF, Immobilon P, Millipore, Bedford)

wurden zunächst 10 s in Methanol, dann 10 s in Wasser und schließlich in Anodenpuffer 2 inkubiert.
Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 2× 5 min in Kathodenpuffer inkubiert. Die 2 Blotpapiere Anode 1 wurden auf die Anode der Semidry-Blotkammer (BioRad, München) aufgelegt. Dann folgte 1 Blotpapier Anode 2 und die Blotmembran. Anschließend wurde das Gel aufgelegt. Überschüssige Flüssigkeit und Lufteinschlüsse wurden mit einem Glasspatel herausgestrichen. Nach Auflegen der 3 Blotpapiere Kathode wurde der Elektrotransfer gestartet (0,8 mA/cm^2, 1 h/12% Gele, 50 min/8% Gele).

5.9 Färbung von Proteinen

5.9.1 Coomassie Brilliant-Blue G 250-Färbung

Das Gel wurde ca. 10 min in Fixierlösung (40% Methanol; 10% Essigsäure; 50% Wasser v/v) gewaschen und dann mindestens 1 h in Coomassie Brilliant-Blue G 250 Färbelösung (0,05% Coomassie Brilliant-Blue G 250 in Fixierlösung) inkubiert. Entfärbt wurde mit einer Entfärbelösung (30% Methanol; 10% Essigsäure; 60% Wasser v/v). Die gebrauchte Entfärbelösung wurde mit Aktivkohle regeneriert.

5.9.2 Ponceau S-Färbung

Die reversible Färbung von Proteinen auf NC-Membranen mit Ponceau S ermöglichte die qualitative Überprüfung des Elektrotransfers. Eine konzentrierte Stammlösung (2% Ponceau S in 30% TCA; 30% Sulfosalicylsäure) wurde kurz vor dem Gebrauch 1:10 mit ddH_2O verdünnt und zur NC-Membran gegeben. Nach ca. 5 min Inkubation wurde die überschüssige Färbelösung mit deionisiertem Wasser entfernt. Anschließend konnte der Protein-Größenstandard und die einzelnen Spuren angezeichnet werden. Das vollständige Entfärben erfolgte mit dem Waschpuffer der Immundetektion (siehe 5.10).

5.9.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde nach einer Methode von Heukeshoven und Dernick (1988) durchgeführt. Alle Inkubationsschritte wurden unter leichtem Schütteln durchgeführt. Das Gel (81×69×0,75 mm) wurde, falls es mit Coomassie gefärbt war, vollständig entfärbt. Dann wurde das Gel in 50 ml Fixierlösung (30% Ethanol; 10% Essigsäure) 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel in 35 ml Farmers Reduzierungslösung (0,5% Glutaraldehyd; 0,1% $Na_2S_2O_3$; 30% Ethanol; 0,4 M Natriumacetat/Essigsäure, pH 6,0) weitere 30 min inkubiert. Nach 5× Waschen mit ddH_2O für jeweils 10 min wurde das Gel 20 min in 35 ml Färbelösung (0,1% $AgNO_3$; 0,007% Formaldehyd) inkubiert. Dann wurde

das Gel kurz in ddH_2O gewaschen und in 50 ml Entwicklungslösung (2,5% $NaCO_3$; 0,03% Formaldehyd) bis zur gewünschten Intensität inkubiert (ca. 5-20 min). Die Reaktion wurde mit 5% Essigsäure abgestoppt.

5.9.4 Kupferchlorid-Färbung (Lee et al., 1987)

Das Gel (160×200×1,5 mm) wurde mehrmals kurz in ddH_2O gewaschen und anschließend 5-20 min mit dem mindestens 5-fachen Gelvolumen an 0,3 M $CuCl_2$ unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Bereiche des Gels, die kein Protein enthalten, bilden ein weißes, opakes Präzipitat, während Proteinbanden klar bleiben (Negativ-Bild). Nach kurzem Waschen in ddH_2O wurde das Gel auf eine Glasplatte gelegt, und die gewünschten Banden konnten mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Die Glasplatte wurde dabei auf einen schwarzen Hintergrund gelegt, um die einzelnen Banden besser sichtbar zu machen. Die Gelfragmente wurden durch Inkubation in 0,25 M EDTA, 0,25 M Tris, pH 9,0 (3× 2-3 min) entfärbt.

5.10 Immundetektion

Der Ponceau S-gefärbte Blot wurde durch mehrmaliges Waschen mit TBST-ECL (20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 137 mM NaCl; 0,1% Tween 20) vollständig entfärbt und mit 5% Rinderserumalbumin (BSA) in TBST-ECL 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C blockiert. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min wurde die Membran 1 h mit einer Verdünnung des Primärantikörpers von 1:10000 bis 1:30000 in TBST-ECL mit 0,5% BSA inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3× 5 min mit TBST-ECL gewaschen und 1 h mit dem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase gekoppelt) in einer Verdünnung von 1:20000 inkubiert. Die Membran wurde 3× 5 min gewaschen und dann ca. 2 min mit „ECL-Detektionsreagenzien“ (Amersham Pharmacia, Freiburg) überschichtet. Durch Auflegen eines Filmes (ECL-Hyperfilm, Amersham Pharmacia, Freiburg) in einer Filmkassette konnte so die Antikörperbindung detektiert werden.

5.11 Detektion der 6× His-tag-Fusionsproteine durch Nickel-NTA-Konjugat

Der Western-Blot wurde 2× mit TBS-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) gewaschen und mit 1% BSA in TBS 1 h bei RT blockiert. Dann wurde die Membran 2× 10 min mit TBST-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,05% Tween 20) gewaschen und 1 h in einer 1:1000 Verdünnung des Ni-NTA-Konjugates, gekoppelt an alkalische Phosphatase, in TBST-Puffer inkubiert. Anschließend wurde 3× 10 min mit

TBST-Puffer gewaschen und 66 µl NBT-Lösung (5% Nitroblau-Tetrazoliumchlorid in 70% Dimethylformamid) und 33 µl BCIP-Lösung (5% 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in 100% Dimethylformamid) in 10 ml Puffer A (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM $MgCl_2$) hinzugefügt.

5.12 Detektion der GST-Fusionsproteine

Puffer und Lösungen siehe 5.11
Nach dem Blockieren und Waschen (siehe 5.11) wurde die Membran mit einem anti-GST-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 inkubiert. Als 2. Antikörper wurde ein anti-Ziege-Antikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase, in einer Verdünnung von 1:5000 in TBST eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit 66 µl NBT- und 33 µl BCIP-Lösung in 10 ml Puffer A.

5.13 Abtrennung von Oberflächenstrukturen

50 ml Medium wurden mit einer Vorkultur angeimpft und ca. 16 h unter leichtem Schütteln (150 rpm) bei 37°C in einem Erlenmeyer-Kolben ohne Schikanen inkubiert. Die Übernachtkultur wurde bei 5000×g 5 min abzentrifugiert, das Pellet wurde in 3 ml PBS resuspendiert. Die Oberflächenstrukturen wurden durch mechanische Scherkräfte (Vortex-Mischer, 1 min bei max.) abgetrennt. Die Bakterien wurden bei 10000×g pelletiert, und der Überstand nach Sterilfiltration (0,20 µm) mit Aceton bzw. TCA gefällt.

5.14 Membranfraktionierung mit N-Lauroyl-Sarcosin

100 ml Übernachtkultur wurden bei 8000 rpm (Sorvall® RC 5C Plus, Newtown, Connecticut, Rotor SLA 3000) 20 min und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde 1× mit PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert und anschließend in 20 ml PBS aufgenommen. Nach Zugabe von 125 µl Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma, Deisenhofen; 5 mg Protease-Inhibitor-Cocktail gelöst in 25 µl DMSO + 100 µl ddH_2O pro 0,5 g Zellmasse) wurde die Zellsuspension 2× mit einer French Press aufgeschlossen (82,7 MPa). Grobe Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 400×g für 30 min bei 4°C entfernt. Nach Zentrifugation bei 100000×g für 1 h bei 4°C wurde das Pellet (Membranfraktion) mit ddH_2O gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde noch einmal bei 100000×g für 1 h bei 4°C zentrifugiert. Das Membranpellet wurde in 1 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit einer Kanüle (0,45×25 mm) resuspendiert, 10 ml 1% N-Lauroyl-Sarcosin (Sarkosyl), 10 mM EDTA, pH 8,0 zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Trennung der sarkosyllöslichen von den sarkosylunlöslichen Bestandteilen

durch Zentrifugation bei 100000×g für 2 h bei 4°C. Die sarkosylunlösliche äußere Membran befindet sich im Sediment und wurde 1× in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert und erneut bei 100000×g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert, um das überschüssige N-Lauroyl-Sarcosin zu entfernen. Die Proteine der löslichen Fraktion und der sarkosyllöslichen inneren Membranfraktion wurden mit Aceton gefällt.

5.15 Membranfraktionierung mit Hilfe eines Saccharose-Dichte-Gradienten (modifiziert nach Osborn et al., 1972)

Das gewonnene Membranpellet (siehe 5.14) wurde in 0,25 M Saccharose, 3,3 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,8 mit einer Kanüle (0,45×25 mm) resuspendiert, dann auf ca. 30 ml aufgefüllt und 1 h bei 100000×g bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 25% Saccharose (w/w), 5 mM EDTA, pH 7,5 resuspendiert. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (1976) durchgeführt. Dann wurde 1 ml Membransuspension (ca. 3 mg Protein) auf einen Saccharose-Dichte-Gradienten (30-55% Saccharose w/w; 5 mM EDTA, pH 7,5) aufgetragen und 16 h bei 35000 rpm (Rotor SW 40) bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient fraktioniert. Dabei wurden die einzelnen Fraktionen (800 µl) vorsichtig mit einer Pipette von oben abgenommen. Von jeder Fraktion wurden 50 µl für die Messung mit dem Refraktometer und 10 µl für die NADH-Aktivitätsmessung eingesetzt. Zu den einzelnen Fraktionen wurde eiskaltes TCA (100%) in einer Endkonzentration von 10% zugegeben, mit ddH_2O auf 1,5 ml aufgefüllt und 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurde 30 min bei 30000×g bei 0°C abzentrifugiert, das Pellet 1× mit eiskaltem Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert.
Für die Bestimmung der NADH-Oxidase-Aktivität (Osborn et al., 1972) wurden zu jeweils 10 µl Fraktion 990 µl Inkubationspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,12 mM NADH; 0,2 mM Dithiothreitol) pipettiert und anschließend die Abnahme der Absorption in einem Photometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg) bei 340 nm gemessen.

5.16 Isolierung eines Sekretionssystem-Apparates (modifiziert nach Blocker et al., 2001 und Kubori et al., 1998)

2 l Übernachtkultur wurden für 20 min bei 6000 rpm (Rotor SLA 3000) bei 4°C pelletiert. Die Zellpellets wurden 1× mit PBS gewaschen und anschließend in 80 ml 0,5 M Saccharose, 100 mM Tris, pH 8,0 resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurde 2 mg/ml Lysozym und EDTA, pH 8,0 in einer Endkonzentration von 10 mM gegeben, 1h auf Eis und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Bildung der Sphäroplasten (Abrunden der Zellen) wurde mikroskopisch überprüft. Die Sphäroplasten wurden in 1% Triton X-100 in

Gegenwart von 0,5 mM PMSF in DMSO lysiert und 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von $MgSO_4$ (Endkonzentration: 10 mM) und 10 µl Benzonase (Reinheitsgrad I, 10 000 Einheiten/Glas, Merck, Darmstadt) wurde weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Um nicht-aufgeschlossene Zellen und Zellfragmente zu entfernen, wurde die Suspension 20 min bei 5000×g und 4°C abzentrifugiert. Dann wurde der Überstand 1 h bei 70000×g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 5 ml 150 mM KCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 in 10 mM Tris, pH 8,0 aufgenommen und nacheinander mit einer 21 G- (0,80×40 mm), 24 G- (0,55×25 mm) und 27 G- (0,40×20 mm) Kanüle resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 20000×g für 20 min und 4°C wurde der Überstand bei 70000×g für 1 h bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml TET-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM EDTA, 0,1% Triton X-100) resuspendiert, durch einen 0,2 µm-Filter filtriert und noch einmal bei 70000×g 1h zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Pellet in 500 µl TET-Puffer aufgenommen, auf einen 30% (w/v) CsCl-Gradienten aufgetragen und in einem SW 40-Rotor bei 17000 rpm bei 15°C 16 h zentrifugiert. Die Gradienten-Fraktionen wurden 1:10 mit TET-Puffer verdünnt und 1 h bei 80000×g und 4°C pelletiert. Die Pellets wurden 1× mit 500 µl TET-Puffer gewaschen und in 20 µl TET-Puffer aufgenommen.

5.17 Untersuchung der molekularen Nachbarschaft von Proteinen durch Quervernetzung

Durch den Einsatz von Quervernetzern können eng benachbarte Untereinheiten innerhalb eines Proteinkomplexes identifiziert werden. Wird eine kovalente Bindung zwischen Untereinheiten und Quervernetzer ausgebildet, dann befinden sich diese Untereinheiten innerhalb des Proteinkomplexes in nächster Nachbarschaft zueinander.
1 ml einer Übernachtkultur wurden 5 min bei 21000×g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einem errechneten Volumen PBS, pH 8,0 aufgenommen, um eine OD_{600} von 10 zu erzielen. Zu diesem Ansatz wurde der membrangängige Quervernetzer DSS (Disuccinimidyl suberate, Pierce, Rockford), gelöst in wasserfreiem DMSO, in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und 60 min auf Eis inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 2 µl 1M Tris-HCl, pH 8,0 zugegeben und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz 5 min bei 21000×g und 4°C abzentrifugiert und in 1,5× Lysispuffer resuspendiert.

5.18 Erzeugung polyklonaler Antikörper

Die Immunisierung von Kaninchen wurde von Fachkräften unter Einhaltung der „Tierschutzaspekte bei der Immunisierung von Versuchstieren“ (W. Nicklas, K. Cußler

und J. Hartinger, Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V.) durchgeführt. Für die Erzeugung des polyklonalen Antikörpers gegen rSsaC wurde das Kaninchen mit insgesamt 1 mg rekombinantem Protein in Abständen von 3-4 Wochen immunisiert. Für die initiale Immunisierung wurde das Protein 1:1 mit komplettem Freunds Adjuvans (Difco Laboratories, Detroit) gemischt und subkutan an mehreren Stellen auf dem Rücken injiziert. Die nachfolgenden Booster-Immunisierungen wurden mit inkomplettem Freunds Adjuvans durchgeführt. Der Antikörpertiter der Seren wurde durch Immunoblotanalysen untersucht.

Für die Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit OmpA wurde ¼ des gesamten, auf einer NC-Membran immobilisierten Proteins, in eine 1 ml Spritze überführt, in 100 µl DMSO aufgenommen und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 µl PBS (nur bei 1. und 2. Immunisierung zugegeben) aufgezogen und der gesamte Ansatz 1:1 mit komplettem Freunds Adjuvans für die 1. Immunisierung und mit inkomplettem Freunds Adjuvans für die drei folgenden gemischt und subkutan gespritzt.

Die Immunisierungen von Kaninchen mit den restlichen rekombinanten Proteinen wurden von einem Antikörper-Service (Dr. Pineda, Berlin) nach einem Standard-Protokoll durchgeführt.

5.19 Reinigung von Antiseren

5.19.1 Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Kopplung des Liganden

500 ml einer Übernachtkultur wurden 20 min bei 6000 rpm (Rotor SLA 3000) und 4°C abzentrifugiert. Die Pellets wurden 2× mit Kopplungspuffer (0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,3; 0,5 M NaCl) gewaschen, in 30 ml aufgenommen, 0,1% Triton X-100 zugegeben und 1 h bei -80°C eingefroren. Die Zellsuspension wurde 2× mit einer French Press bei 137,8 MPa und 1× 3 min (Puls) mit Ultraschall (Branson Sonifier® Cell Disruptor B 15, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd) aufgeschlossen. Unlösliche Zellfragmente wurden 10 min bei 1600×g und 4°C abzentrifugiert. Die CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Pharmacia, Freiburg) wurde mit kalter 1 mM HCl auf einem Glasfilter 15 min gewaschen (200 ml 1 mM HCl/g gefriergetrocknete Sepharosepulver). Zu 2-3 ml Überstand nach Zellaufschluss (siehe oben) wurde 1 ml Gelvolumen gegeben (5-10 mg Protein/ml Gel) und 2 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Überschüssige Liganden wurden mit 5 Gelvolumen Kopplungspuffer weggewaschen und die verbleibenden aktiven Gruppen durch Zugabe von 0,2 M Glycin, pH 8,0 für 2 h bei RT blockiert. Das Gel wurde dann 3× abwechselnd mit 5 Gelvolumen Kopplungspuffer und

Acetatpuffer (0,1 M NaOAc/HOAc, pH 4,0; 0,5 M NaCl) gewaschen und in PBS aufgenommen.

Präadsorption der Seren an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Für die Entwicklung eines Immunoblots (69×81 mm) wurden zu 800 µl PBS + 0,1% BSA 4-6 µl des Primärantikörpers pipettiert, ca. 500 µl Gelvolumen zugegeben und 2 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Der Ansatz wurde 1 min bei 350×g abzentrifugiert, und zu ca. 1 ml Überstand wurde 9 ml TBST-ECL (siehe 5.10) + 0,1% BSA zugegeben. Mit dieser Verdünnung wurde die Membran 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Als 2. Antikörper wurde ein Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat in einer Verdünnung von 1:20000 in TBST-ECL + 0,1% BSA eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit ECL-Detektionsreagenzien (Amersham Pharmacia, Freiburg, siehe 5.10).

Bei der Verwendung einer NHS-aktivierten Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia Biotech, Freiburg) erfolgte die Kopplung des Liganden und Präadsorption der Seren nach der gleichen Methode. Als Blockierungspuffer wurde 0,5 M Ethanolamin, pH 8,3 verwendet. Nach dem Blockieren wurde abwechselnd mit 0,5 M Ethanolamin, pH 8,3, 0,5 M NaCl und Acetatpuffer gewaschen.

5.19.2 Kopplung an invertierte Membranvesikel

Präparation der invertierten Membranvesikel

1 l Übernachtkultur (G-Medium) wurden 15 min bei 6000 rpm (Rotor SLA 3000) bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM $MgCl_2$ (Puffer 1) resuspendiert und nach Zugabe von 1 mg DNase I 10 min auf Eis gerührt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 2× mit der French Press (137,8 MPa) aufgeschlossen und zur Abtrennung der invertierten Vesikel von den unaufgeschlossenen Zellen bei 14000×g 30 min zentrifugiert. Die Membranvesikel wurden dann 90 min bei 190000×g bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde erneut in 20 ml Puffer 1 aufgenommen und 90 min bei 190000×g bei 4°C abzentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 2 ml Puffer 1 resuspendiert und eine Proteinbestimmung nach Markwell *et al.* (1978) durchgeführt.

Präadsorption an invertierte Membranvesikel

Zu 1 ml Serum (1:10 verdünnt mit Puffer 1) wurden 10 mg invertierte Membranvesikel gegeben. Dieser Ansatz wurde im Ultraschallwasserbad 5 min homogenisiert und anschließend 2 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Vesikel in der Miniultrazentrifuge 1 h bei 270000×g bei 4°C pelletiert und der Überstand bei -20°C eingefroren. Die präadsorbierten Seren wurden in verschiedenen Konzentrationen im Immunoblot getestet.

III. Ergebnisse

1. Erzeugung und Reinigung von SPI2-Fusionsproteinen

Für die proteinbiochemische Untersuchung der strukturellen Komponenten des Typ III-Sekretionssystems, das von der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2 kodiert wird, wurde zuerst versucht, polyklonale Antikörper gegen rekombinante Apparatsproteine zu erzeugen. Dazu wurden die SPI2-Gene bzw. Genfragmente *ssaB*, *ssaC, ssaD, ssaJ, ssaN, ssaO, ssaS, ssaT, ssaU, ssaV, sseF* und *ssrA* in Expressionsvektoren ligiert, diese durch Elektroporation in einen kompetenten *E. coli*-Stamm (XL1-Blue MRF') transformiert und unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors exprimiert.

Tab. 6 Erzeugung und Reinigung rekombinanter SPI2-Fusionsproteine*.

Gen/ Genfragment	Fusionsprotein	Expression	Kulturvolumen	Proteinreinigung
ssaB	His-tag	+	500 ml	HiTrap-Säule und präparative SDS-PAGE
ssaC	His-tag	+	5 l	HiTrap-Säule
ssaJ	GST	+	5 l	präparative SDS-PAGE
ssaN	GST	+	5 l	präparative SDS-PAGE
ssaO	His-tag	+	500 ml	HiTrap-Säule und präparative SDS-PAGE
ssaS	His-tag	+	500 ml	HiTrap-Säule und präparative SDS-PAGE
$ssaV_{(verkürzt)}$	His-tag	+	5 l	HiTrap-Säule

* Inwieweit die einzelnen Gene exprimiert und Fusionsproteine synthetisiert wurden, wurde anhand von Coomassie-gefärbten Gelen und durch Detektion im Western-Blot überprüft.

Eine deutliche Expression mit relevanten Mengen des zu reinigenden Proteins konnte dabei nur bei *ssaB*, *ssaC*, *ssaJ*, *ssaN*, *ssaO* und *ssaS* erzielt werden (Tab. 6). Bei den restlichen Genen war die Expression nur schwach, oder es konnte kein Signal detektiert werden. Auch durch die Anwendung des kompetenten *E. coli*-Stammes SG13009 [pREP4], der aufgrund seiner hohen Expressionsrate besonders für schwach exprimierende Gene geeignet ist, konnten keine weiteren Gene exprimiert werden.

Rekombinante Membranproteine zeigen aufgrund ihrer starken Hydrophobizität häufig einen toxischen Effekt auf die Zellen. Um eine gegebenenfalls übermäßige Expressionsrate zu reduzieren und somit die intrazellulären Mengen toxischer Proteine abzusenken, wurde die IPTG-Konzentration auf 0,5 mM und 0,1 mM reduziert. Aber auch dadurch konnte keine Expression erzielt werden. Daraufhin wurden von *ssaU* und *ssaV* verkürzte Fragmente erzeugt, bei denen jeweils der stark hydrophobe N-terminal-kodierende Bereich fehlt (Abb. 4). Auf diese Weise konnte das verkürzte Fragment von *ssaV* erfolgreich exprimiert werden.

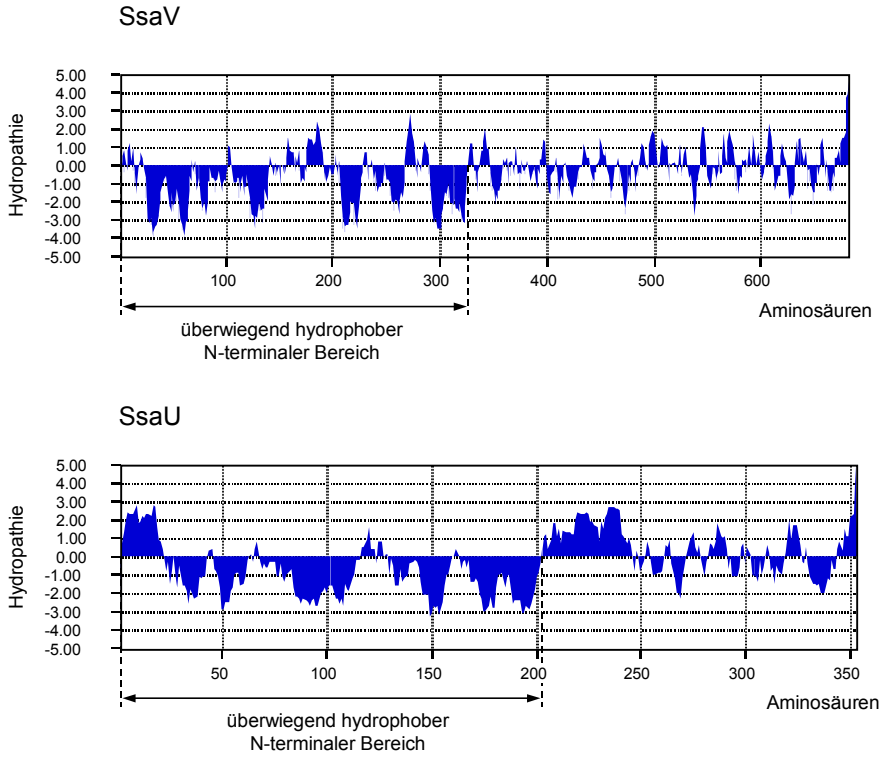


Abb. 4 Graphische Darstellung der Hydropathie der Proteine SsaV und SsaU. Verkürzte Fragmente von *ssaV* und *ssaU*, bei denen der stark hydrophobe N-terminal-kodierende Bereich fehlt (gekennzeichnet durch gestrichelte Linien), wurden zur Expression eingesetzt.

Von *ssaN* (GST), *ssaJ* (GST), *ssaC* (His-tag) und $ssaV_{(verkürzt)}$ (His-tag) wurde die Expression in einem 5 l-Fermenter durchgeführt, um für die folgende Proteinreinigung genügend Zellmaterial zu erhalten. Die GST-Fusionsproteine SsaJ und SsaN bildeten bei der Überproduktion unlösliche Einschlusskörper und konnten unter denaturierenden Bedingungen (3 M Harnstoff) nicht über eine Glutathion-Sepharose-Säule isoliert werden. Bei SsaN konnten auch nach Zugabe von 0,5 M NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM DTT und Erhöhung der Harnstoffkonzentration auf 8 M keine ausreichenden Mengen des Fusionsproteins für eine affinitätschromatographische Auftrennung solubilisiert werden.

Deshalb wurde bei beiden GST-Fusionsproteinen eine präparative Auftrennung durch SDS-PAGE und anschließende Elution durchgeführt.
Das His-tag-Fusionsprotein SsaC, das ebenfalls in Form von Einschlusskörpern vorlag, konnte in 9 M Harnstoff solubilisiert und anschließend durch Ni-NTA-Metall-Affinitätschromatographie mittels einer HiTrap-Säule gereinigt werden. Das Fusionsprotein wurde in einem Gradienten von 1-250 mM Imidazol eluiert. Da bei dem His-tag-Fusionsprotein $SsaV_{(verkürzt)}$ der überwiegend hydrophobe N-terminale Bereich fehlt, zeigte dieses Protein einen wesentlich löslicheren Charakter und konnte dadurch unter nativen Bedingungen durch Ni-NTA-Metall-Affinitätschromatographie im Imidazol-Gradienten isoliert werden.
Die Expression von *ssaB* (His-tag), *ssaO* (His-tag) und *ssaS* (His-tag) wurde jeweils in einer 500 ml-Kultur durchgeführt. Auch die His-tag-Fusionsproteine SsaB, SsaO und SsaS wurden aufgrund ihrer Unlöslichkeit als Einschlusskörper überproduziert, die unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) solubilisiert wurden. Durch Ni-NTA-Metall-Affinitätschromatographie wurden die Fusionsproteine in einem pH-Gradienten von pH 8,0-3,5 isoliert. Da durch die Chromatographie jedoch keine ausreichende Trennung erzielt wurde, wurden die Zielproteine von den übrigen Proteinen durch anschließende präparative SDS-PAGE getrennt. Da SsaS im Coomassie-gefärbten Gel und im Western-Blot nach Elution und Aufkonzentration ein anderes Laufverhalten zeigte und die Proteinbande um ca. 3 kDa gegenüber der Bande vor der Elution versetzt war, wurde dieses Protein nicht zur Immunisierung verwendet. Die anderen isolierten rekombinanten Proteine wurden zur Erzeugung polyklonaler Antikörper für die Immunisierung eingesetzt.

2. Präadsorption der polyklonalen Antiseren zur Entfernung unspezifischer Bindungspartner

Der Antikörpertiter der einzelnen Seren wurde durch Western-Blot-Analysen untersucht. Dazu wurde das gereinigte Antigen, Ganzzelllysate von *S. typhimurium* und Ganzzelllysate von *E. coli*, bei denen die Genexpression der Kontrolle eines T7-Promotors unterliegt, eingesetzt. Dabei zeigten die Seren zahlreiche Kreuzreaktionen mit anderen *Salmonella*-Proteinen. Um diese unspezifischen Bindungspartner zu entfernen, wurde versucht, diese Seren mit Hilfe einer Affinitätschromatographie zu reinigen.
Für die Reinigung der Antiseren anti-SsaC, anti-SsaV, anti-SsaJ und anti-SsaB wurden Ganzzelllysate der Mutanten P7G2 (*ssaC*::mTn*5*), P2D6 (*ssaV*::mTn*5*), P11D10 (*ssaJ*::mTn*5*) bzw. P11B9 (*ssaB*::mTn*5*) an eine CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt. Die aktivierten Gruppen der Sepharose sind Cyanat-Estergruppen und reagieren mit den primären Aminogruppen des Liganden. Nach Adsorption der Antiseren an die Sepharose

sollten so kreuzreagierende Antikörper durch Bindung an die gekoppelten Proteine entfernt werden. Da für die Reinigung von anti-SsaN und anti-SsaO keine entsprechenden Mutanten vorhanden waren, wurde die Regulationsmutante P8G12 (*ssrB*::mTn*5*) eingesetzt. Die Mutation in dem Regulator des Zweikomponenten-Regulationssystems hat zur Folge, dass keine Gene exprimiert werden, die für SPI2-Apparatsproteine kodieren (Deiwick et al., 1999). Deshalb wurde P8G12 in den folgenden Immunoblots auch als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Als zusätzliche Positiv-Kontrolle wurde *S. typhimurium* [pWSK29 *ssrAB*] verwendet, eine Mutante, bei der die *ssrAB*-Gene, die für das Regulationssystem kodieren, zusätzlich plasmidkodiert sind (Deiwick et al., 1999). Dieser Stamm zeigt zumeist größere Mengen an SPI2-Proteinen als der Wildtyp.

Die Antiseren anti-SsaC, anti-SsaN und anti-SsaV konnten erfolgreich gereinigt werden und wurden für Immunoblotanalysen eingesetzt. Im Gegensatz dazu konnten die unspezifischen Reaktionen der Antiseren anti-SsaJ, anti-SsaB und anti-SsaO nicht vollständig entfernt werden. Deshalb wurde noch eine weitere Kopplungsreaktion mit einer NHS-aktivierten Sepharose durchgeführt. Bei dieser Sepharose wird der Ligand über einen „Spacer"-Arm über freie Amine an die Matrix gekoppelt. Dadurch wird eine effektive Bindung erleichtert. Aber auch hier traten nach Präadsorption noch zahlreiche Kreuzreaktionen auf.

Eine weitere Methode, unspezifische Bindungspartner der Seren zu entfernen, ist die Präadsorption an invertierte Membranvesikel. Dabei wurden von den Mutanten P11B9 (*ssaB*::mTn*5*) und P8G12 (*ssrB*::mTn*5*) invertierte Membranvesikel präpariert und die Seren anti-SsaB und anti-SsaO präadsorbiert. Auch hier konnte jedoch keine ausreichende Reinigung erzielt werden. Vermutlich waren die Epitope der invertierten Membranvesikel für die unspezifischen Proteine nicht zugänglich.

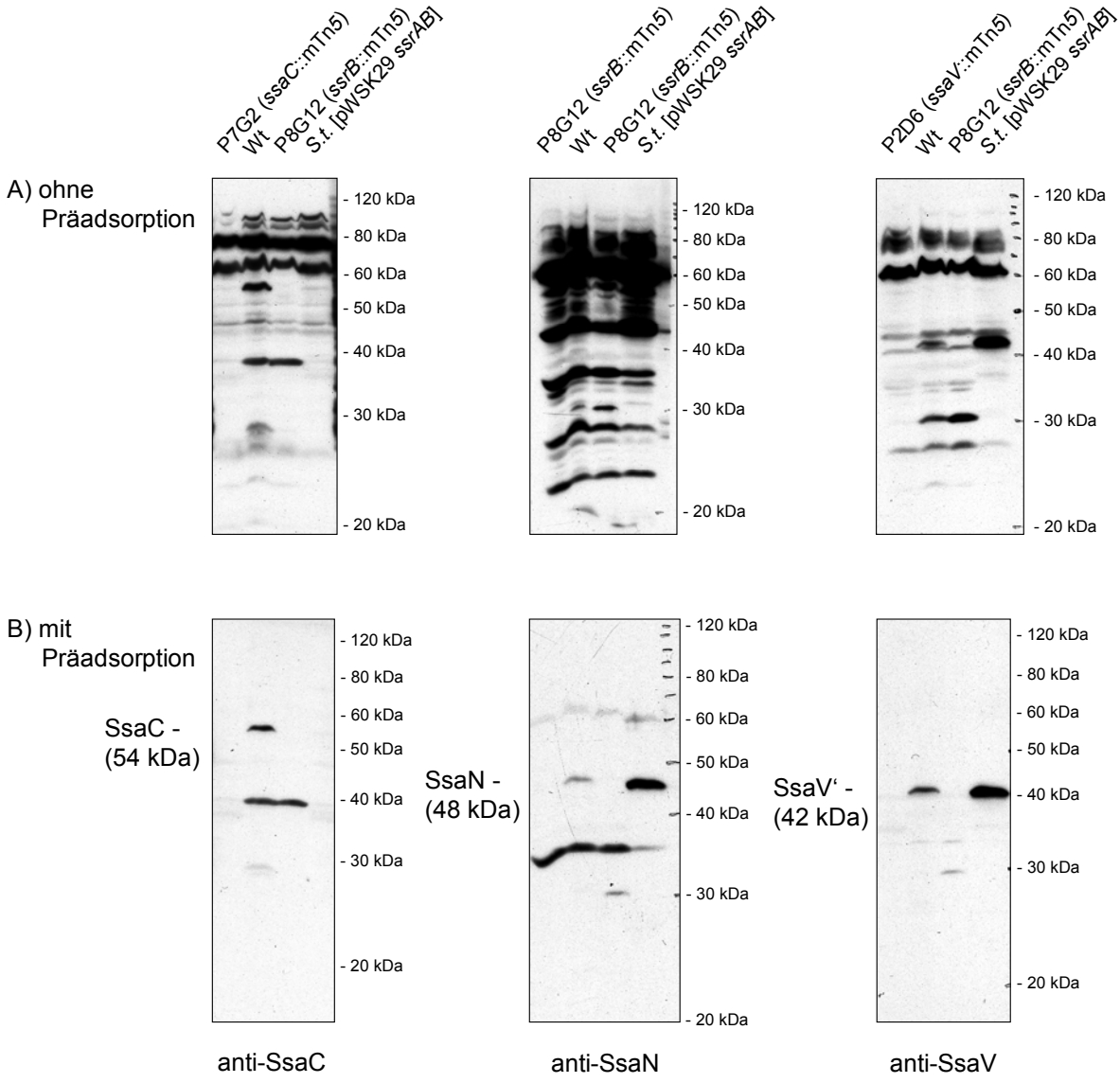


Abb. 5 Präadsorption zur Entfernung unspezifischer Bindungspartner der Antiseren anti-SsaC, anti-SsaN und anti-SsaV. **A)** Immunoblotanalysen mit anti-SsaC, anti-SsaN und anti-SsaV gegen Ganzzelllysate von *S. typhimurium*-Wildtyp, P8G12 (*ssrB*::mTn*5*), P2D6 (*ssaV*::mTn*5*), P7G2 (*ssaC*::mTn*5*) und *S. typhimurium* [pWSK29 *ssrAB*] ohne Präadsorption und **B)** mit Präadsorption. Einige unspezifische Bindungspartner konnten nicht vollständig entfernt werden. Da jedoch diese unspezifischen Reaktionen in einem anderen Molekulargewichtsbereich als das Zielprotein auftraten, war die Detektion und Identifikation des Zielproteins dadurch nicht beeinflusst, so dass diese Antiseren für Immunoblotanalysen eingesetzt werden konnten.

Bei den ersten Immunoblotanalysen wurde eine Instabilität von SsaV, einem Apparatsprotein mit einer molekularen Masse von 75 kDa, beobachtet. Ein Fragment wurde bei 70 kDa detektiert (SsaV), das andere bei 42 kDa (SsaV'). Wurde ein Ganzzelllysat vor dem Auftragen auf ein Polyacrylamidgel in Lysispuffer nicht aufgekocht, befand sich der größte Anteil des Proteins bei 70 kDa und nur ein kleiner Teil

bei 42 kDa. Mit Verlängerung der Zeit des Aufkochens nahm die Proteinmenge bei 70 kDa ab und bei 42 kDa zu (Abb. 6). Das bedeutet, dass SsaV möglicherweise thermolabil ist.

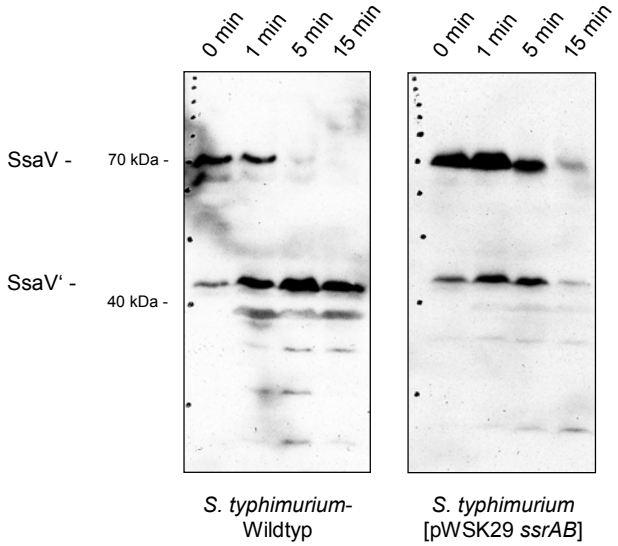


Abb. 6 Thermolabilität von SsaV. Die Ganzzelllysate von *S. typhimurium*-Wildtyp und *S. typhimurium* [pWSK29 *ssrAB*] wurden 0, 1, 5 oder 15 min in Lysispuffer aufgekocht und auf einem SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit dem Antiserum anti-SsaV.

3. Identifizierung multimerer Komplexe nach Quervernetzung

Zur Analyse der Struktur des Typ III-Sekretionsapparates sollten die Protein-Interaktionen zwischen den Untereinheiten charakterisiert werden. Über Interaktionen zwischen Proteinuntereinheiten von Typ III-Sekretionssystemen existieren nur wenig experimentelle Daten. Daher sollten zunächst Analysen zur Identifizierung von Proteinkomplexen durchgeführt werden.

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnten für das putative Translokatorprotein SseB oligomere Komplexe mit Hilfe eines Quervernetzers nachgewiesen werden. Da auch das Sekretin in der äußeren Membran einen multimeren Komplex darstellt und vermutlich aus SsaC-Untereinheiten zusammengesetzt ist, sollte untersucht werden, ob auch hier oligomere Komplexe nachweisbar sind. Dazu wurde der membranpermeable Quervernetzer DSS (Disuccinimidyl suberate) verwendet. Bei diesem Quervernetzer handelt es sich um einen wasserunlöslichen, nichtspaltbaren, homobifunktionalen N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester). Durch nukleophile Substitution wird NHS gegen das Amin ausgetauscht. Dabei wird eine kovalente Amidbindung ausgebildet. Findet eine

Vernetzung von eng benachbarten Untereinheiten statt, sollten die oligomeren Strukturen mit dem entsprechenden Antiserum im Western-Blot detektierbar sein.

3.1 Abhängigkeit der Quervernetzung von der DSS-Konzentration

Um die geeignete Konzentration des Quervernetzers zu ermitteln, so dass man sowohl Monomere als auch eventuell multimere Komplexe im Western-Blot detektieren kann, wurde der Quervernetzer DSS in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0, 0,25, 1, 5 und 10 mM. Dabei wurden Zellsuspensionen von *S. typhimurium*-Wildtyp und P9B6 (*ssaG*::mTn*5*) mit den jeweiligen Konzentrationen des Quervernetzers inkubiert (Abb. 7). Die Mutante P9B6 besitzt eine Transposon-Insertion in *ssaG*, einem Gen, das für ein SPI2-Apparatsprotein kodiert, und wurde deshalb als Negativ-Kontrolle eingesetzt.

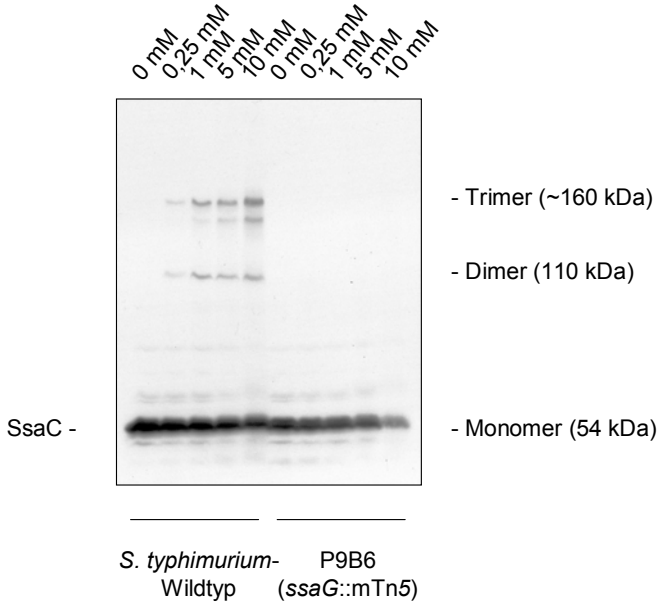


Abb. 7 Abhängigkeit der Quervernetzung von SsaC durch DSS von der DSS-Konzentration. Übernachtkulturen von *S. typhimurium*-Wildtyp und P9B6 (Negativ-Kontrolle) wurden in PCN-Medium unter Phosphatmangel, pH 5,8 angezogen. Die Zellsuspensionen wurden ohne, mit 0,25, 1, 5 und 10 mM DSS (Endkonzentration) behandelt. Um von jedem Ansatz die gleiche Proteinmenge auf das SDS-Gel aufzutragen, wurden die einzelnen Proben in einem definierten Volumen Lysispuffer resuspendiert (Die Menge entspricht jeweils 100 µl einer 1 ml-Kultur von OD_{600} 1,0). Die Proteine wurden durch ein 7,5% SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) getrennt. Monomere von SsaC (54 kDa) sind bei *S. typhimurium*-Wildtyp und P9B6 (*ssaG*::mTn*5*) deutlich zu erkennen. Die Signale bei 110 kDa und ca. 160 kDa, die nur bei *S. typhimurium*-Wildtyp auftreten, könnten Dimere und Trimere aus SsaC darstellen.

Man konnte beobachten, dass bei *S. typhimurium*-Wildtyp und P9B6 (*ssaG*::mTn*5*) mit zunehmender Konzentration des Quervernetzers die Mengen des Monomers abnahmen. Bei den Vernetzungsprodukten bei *S. typhimurium*-Wildtyp war eine Zunahme zu

erkennen. Die Mutante P9B6 (*ssaG*::mTn*5*) bildet das Monomer, jedoch keine detektierbaren Mengen multimerer Komplexe. Für die weiteren Versuche wurde eine Konzentration des Quervernetzers von 1 mM ausgewählt.

Da bei ca. 160 kDa mehrere Banden zu erkennen waren, stellte sich die Frage, ob es sich hier um Heterooligomere handelt. Da SsaC in der äußeren Membran lokalisiert ist und SseB vermutlich die Translokatorstruktur ausbildet, wäre es möglich, dass eine der Banden ein Vernetzungsprodukt aus SsaC und SseB darstellt. Auch SseD ist wahrscheinlich auf der Zelloberfläche lokalisiert und könnte mit SsaC ein Heterooligomer bilden, falls es sich innerhalb des Sekretionssystems in enger Nachbarschaft zu SsaC befindet. Um dies zu untersuchen, wurde *S. typhimurium*-Wildtyp und die Negativ-Kontrolle NP*ssaV* bzw. P9B6 (*ssaG*::mTn*5*) im Immunoblot sowohl mit anti-SsaC als auch mit den bereits vorhandenen Antiseren anti-SseB und anti-SseD getestet. Jedoch konnte im untersuchten Bereich kein Vernetzungsprodukt mit SseB (Abb. 8) bzw. SseD (hier nicht gezeigt) detektiert werden.

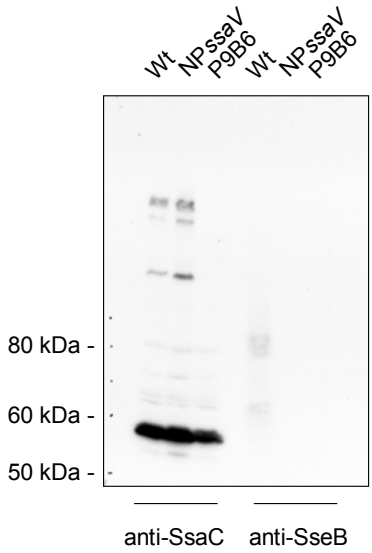


Abb. 8 Die multimeren Komplexe stellen keine Vernetzungsprodukte aus SsaC und SseB dar. Aufgetragen wurden Ganzzelllysate von *S. typhimurium*-Wildtyp, NP*ssaV* (Negativ-Kontrolle für die Detektion mit anti-SseB) und P9B6 (Negativ-Kontrolle für die Detektion mit anti-SsaC). Eingesetzte Konzentration des Quervernetzers DSS: 1 mM; 1. Ak: anti-SsaC bzw. anti-SseB. Bei der Detektion mit anti-SseB waren die möglichen Trimere (ca. 60 kDa) und Tetramere (ca. 80 kDa) von SseB als schwache Banden zu erkennen. Um jeweils gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE zu analysieren, wurden die Proben wie in Abb. 7 beschrieben, in einem definierten Volumen Lysispuffer resuspendiert und aufgetragen.

3.2 Untersuchung der Fähigkeit verschiedener Mutanten, oligomere Komplexe von SsaC auszubilden

Zellsuspensionen verschiedener Signatur-markierter Mutagenese-Mutanten (STM) und der nichtpolaren Mutante NP*ssaV* wurden mit dem Quervernetzer DSS getestet, um zu überprüfen, welche der Mutanten noch in der Lage sind, multimere Komplexe von SsaC auszubilden (Abb. 9). Nur P2D6 (*ssaV*::mTn*5*), P10E11 (*sscA*::mTn*5*) und NP*ssaV* sind in der Lage, neben dem Monomer auch Dimere und eventuell Trimere auszubilden. Bei der STM-Mutante P9B6 (*ssaG*::mTn*5*) konnte, wie bereits gezeigt, nur das Monomer detektiert werden (Abb. 7). P9B7 (*ssaT*::mTn*5*), P11C3 (*ssaV*::mTn*5*) und P11D10 (*ssaJ*::mTn*5*) bilden ebenfalls nur das Monomer, jedoch in wesentlich geringeren Mengen als P9B6. Bei neutralem pH-Wert wurden keine Vernetzungsprodukte gebildet.

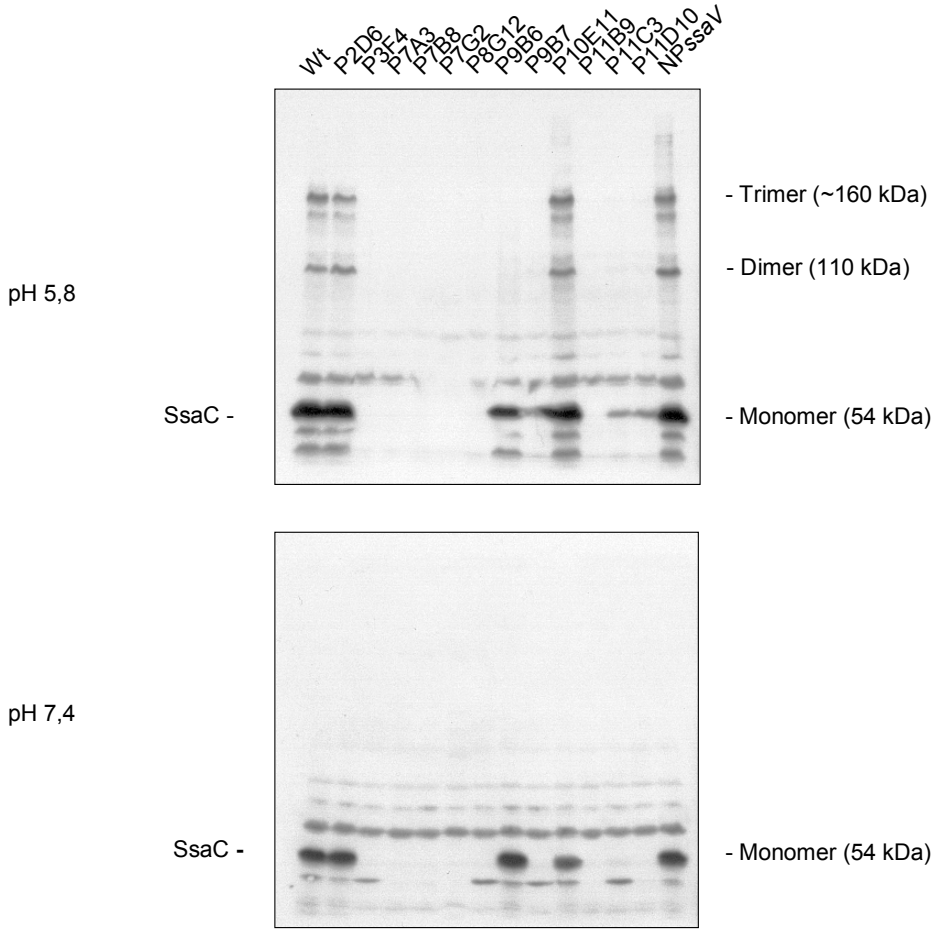


Abb. 9 Zellsuspensionen von STM-Mutanten und NP*ssaV* wurden mit 1 mM DSS behandelt. Die Übernachtkulturen wurden in PCN-Medium mit Phosphatmangel, pH 5,8 (oben) und pH 7,4 (unten) angezogen. Um jeweils gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE zu analysieren, wurden die Proben wie in 3.1, Abb. 7 beschrieben, in einem definierten Volumen Lysispuffer resuspendiert und aufgetragen.

3.3 Nachweis multimerer Komplexe von SseD

SseD konnte kürzlich als ein weiteres Substratprotein identifiziert werden, das auf die Zelloberfläche sekretiert wird. Dabei ist SseD vermutlich an der Ausbildung einer heterooligomeren Translokatorstruktur beteiligt (Nikolaus et al., 2001). Deshalb sollte untersucht werden, ob auch für SseD oligomere Strukturen nachweisbar sind.

Mit dem Quervernetzer DSS konnten multimere Komplexe nachgewiesen werden. Neben dem Monomer (21 kDa) war bei 42 kDa eine deutliche Bande und bei ca. 85 kDa noch eine schwache Bande zu erkennen (Abb. 10). Ob es sich hierbei um Homooligomere oder um SseD/SseB-Vernetzungsprodukte handelt, konnte nicht überprüft werden, da im Western-Blot die zu erwartenden Mono- und Dimere von SseD und SseB nahezu auf gleicher Höhe laufen. Bei Verwendung eines modifizierten SseD (C-terminales M45-Epitop) könnte zwischen SseD und SseB differenziert werden, jedoch konnte hier kein Vernetzungsprodukt detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass die oligomere Struktur den nativen C-Terminus des Proteins benötigt.

Da neben SseD auch SseC auf der Zelloberfläche identifiziert wurde (Nikolaus et al., 2001) und diese beiden Effektorproteine zusammen mit SseB möglicherweise die Translokatorstruktur aufbauen, sollte untersucht werden, inwieweit eine Mutation in *sseB* oder *sseC* Einfluss auf die Vernetzung von SseD ausübt. Auch die *sseC*$^-$- und *sseB*$^-$-Mutante bildeten multimere Komplexe aus SseD, jedoch in geringeren Mengen als *S. typhimurium*-Wildtyp. Vor allem die Monomer-Banden waren nur noch schwach zu erkennen. Die *sseB*$^-$-Mutante zeigte dabei noch geringere Mengen der Multimere und des Monomers gegenüber der *sseC*$^-$-Mutante. Weder SseD-Monomere noch Multimere konnten bei der *sseE*$^-$-Mutanten detektiert werden (Abb. 10). SseE könnte ein Chaperon für SseD darstellen.

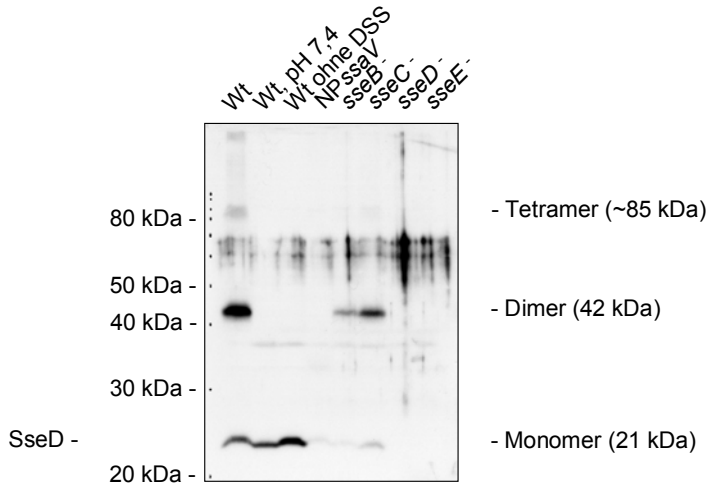


Abb. 10 Detektion multimerer Komplexe aus SseD. Oligomere Strukturen sind nur bei *S. typhimurium*-Wildtyp, *sseB*⁻- und *sseC*⁻-Mutante zu beobachten. Unter nicht-sekretierenden Bedingungen wurde bei *S. typhimurium*-Wildtyp (Spur 2) nur das SseD-Monomer detektiert. Negativ-Kontrolle: *S. typhimurium*-Wildtyp ohne Zugabe von DSS (Spur 3). In dem Bereich von 60-70 kDa sind unspezifische Reaktionen des Antiserums anti-SseD zu sehen. Trotz der Präadsorption des Serums an eine mit einem P8G12 (*ssrB*::mTn*5*)-Lysat gekoppelte CNBr-aktivierte Sepharose 4B, konnten die unspezifischen Bindungspartner nicht vollständig entfernt werden. Um jeweils gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE zu analysieren, wurden die Proben wie in 3.1, Abb. 7 beschrieben, in einem definierten Volumen Lysispuffer resuspendiert und aufgetragen.

4. Analyse der subzellulären Lokalisation verschiedener Untereinheiten des Sekretionsapparates

4.1 Membranfraktionierung mit N-Lauroyl-Sarcosin

Nach der Untersuchung der räumlichen Nähe von Proteinen innerhalb des Sekretionsapparates sollte für die weitere strukturelle Analyse die subzelluläre Lokalisation einzelner Proteinuntereinheiten bestimmt werden. Dazu wurde eine Zellfraktionierung in Membranfraktion und lösliche Fraktion durchgeführt und anschließend die Membranfraktion mit Hilfe von N-Lauroyl-Sarcosin (Sarkosyl) fraktioniert. Dabei reichert sich die innere Membran in der sarkosyllöslichen Fraktion und die äußere Membran in der sarkosylunlöslichen Fraktion an (Filip et al., 1973). Anschließend sollte die subzelluläre Lokalisation von SsaC, SsaN, SsaV und SsaB (M45-Epitop) bestimmt werden. Darüber hinaus sollte auch untersucht werden, inwieweit die Lokalisation von SsaC, SsaN und SsaV vom pH-Wert abhängig ist. Da die Mutante P9B6 (*ssaG*::mTn*5*) nicht mehr in der Lage war, oligomere Komplexe aus SsaC zu bilden und somit möglicherweise kein Sekretin in der äußeren Membran aufbauen kann, sollte durch eine Membranfraktionierung überprüft werden, ob SsaC in der äußeren Membranfraktion

nachweisbar ist. Für die Bestimmung der Lokalisation von SsaB wurde der Stamm *S. typhimurium* [pWSK2127] verwendet. Dieser Stamm besitzt ein Plasmid mit niedriger Kopienzahl, auf dem *ssaB* mit einem M45-Epitop fusioniert ist. Somit kann SsaB-M45 in den Immunoblotanalysen mit einem anti-M45-Antiserum detektiert werden. Für die verschiedenen Analysen wurde *S. typhimurium* in PCN-Medium unter Phosphatmangel bei pH 5,8 und pH 7,4 angezogen, P9B6 (*ssaG*::mTn*5*) und *S. typhimurium* [pWSK2127] nur bei pH 5,8.

Bei *S. typhimurium*-Wildtyp, angezogen bei pH 5,8, wurde SsaC sowohl in der Membranfraktion als auch in der löslichen Fraktion nachgewiesen. Nach Trennung der inneren von der äußeren Membran konnte SsaC in der äußeren Membranfraktion detektiert werden, jedoch war SsaC auch in der inneren Membranfraktion zu finden. SsaN war in der löslichen Fraktion und in der Membranfraktion nachweisbar. Die Membrantrennung mit Sarkosyl zeigte, dass SsaN in der inneren Membranfraktion lokalisiert war. Auch SsaV konnte in der sarkosyllöslichen inneren Membranfraktion detektiert werden. Auffallend war, dass das 70 kDa-Fragment von SsaV überwiegend in den Membranfraktionen und das 40 kDa-Fragment nur in der löslichen Fraktion und im Ganzzelllysat zu finden war (Abb. 11).

Bei *S. typhimurium*-Wildtyp, angezogen in Phosphatmangel-Medium mit pH 7,4, war die Verteilung von SsaC, SsaN und SsaV innerhalb der einzelnen Fraktionen ähnlich wie bei *S. typhimurium*-Wildtyp, angezogen bei pH 5,8. Bei der Detektion mit anti-SsaC waren die einzelnen Proteinbanden insgesamt schwächer. Dadurch war SsaC in der äußeren Membran kaum noch detektierbar. Bei SsaN und SsaV waren die einzelnen Banden eher stärker, so dass bei der Solubilisierung der Membranen SsaV auch in der äußeren Membran detektiert wurde.

Die Mutante P9B6 (*ssaG*::mTn*5*) zeigte in der Membranfraktion und löslichen Fraktion ähnliche Mengen an SsaC wie *S. typhimurium*-Wildtyp, angezogen bei pH 5,8. Jedoch konnte in der äußeren Membranfraktion weniger SsaC und in der inneren Membranfraktion eher mehr SsaC detektiert werden. Auch die Mengen an SsaN und SsaV waren deutlich geringer als bei *S. typhimurium*-Wildtyp, angezogen bei pH 5,8. So war SsaN nur schwach und SsaV kaum noch in der inneren Membranfraktion detektierbar (Abb. 11).

Um zu überprüfen, ob eine Trennung der inneren von der äußeren Membran stattgefunden hat, wurden die Fraktionen mit einem Antiserum gegen die *b*-Untereinheit der ATP-Synthase aus *E. coli* getestet (das Antiserum wurde von Dr. G. Deckers-Hebestreit, Universität Osnabrück, freundlicherweise zur Verfügung gestellt). Die Kreuzreaktivität des Antiserums zwischen *E. coli* und *Salmonella* spp. reichte aus, um die in der inneren Membran lokalisierte *b*-Untereinheit der ATP-Synthase in *Salmonella* spp. detektieren zu

können. Als Marker für die äußere Membranfraktion wurde das Antiserum eingesetzt, das gegen das äußere Membranprotein OmpA (outer membrane protein A) aus *S. typhimurium* erzeugt wurde (Abb. 11).

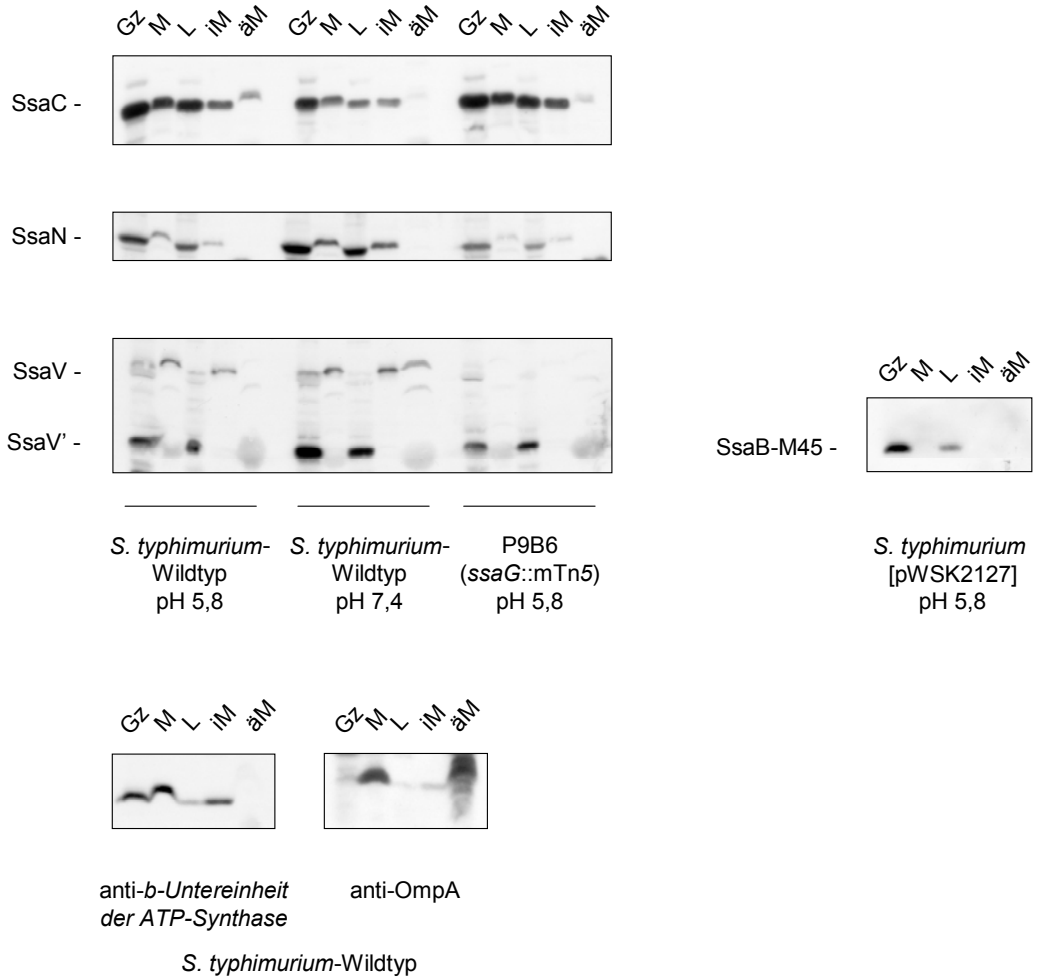


Abb. 11 Zelluläre Lokalisation von SsaC, SsaN, SsaV und SsaB-M45. *S. typhimurium*-Wildtyp wurde angezogen unter Phosphatmangel bei pH 5,8 und pH 7,4, P9B6 (*ssaG*::mTn*5*) und *S. typhimurium* [pWSK2127] wurden angezogen unter Phosphatmangel bei pH 5,8. Um jeweils gleiche Proteinmengen auf das SDS-Polyacrylamidgel aufzutragen wurde nach der Membranfraktionierung von den einzelnen Fraktionen (nur *S. typhimurium*-Wildtyp) eine Proteinbestimmung nach Bradford (1976) durchgeführt. Die daraus ermittelten Proteinmengen der einzelnen Fraktionen wurden zusätzlich in einem Coomassie-gefärbten Gel überprüft und gegebenenfalls angeglichen. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE getrennt. Anschließend wurden SsaC, SsaN, SsaV und SsaB-M45 im Western-Blot detektiert.
Gz: Ganzzelllysat, M: Membranfraktion, L: lösliche Fraktion, iM: innere Membranfraktion, äM: äußere Membranfraktion. Als Kontrolle, inwieweit innere und äußere Membranfraktion gegenseitig „kontaminiert" waren, wurden die Fraktionen mit anti-*b*-Untereinheit der ATP-Synthase (Marker für iM) und anti-OmpA (Marker für äM) untersucht.

Für die Bestimmung der zellulären Lokalisation von SsaB-M45 wurde der Stamm *S. typhimurium* [pWSK2127] eingesetzt. Ob dieser Stamm in der Lage ist, den Sekretionsapparat vollständig aufzubauen und somit für die Bestimmung der Lokalisation von Proteinen des Sekretionssystems geeignet ist, wurde anhand der Sekretion überprüft. Bei *S. typhimurium* [pWSK2127] wurde nach der Abtrennung von Oberflächenstrukturen SseB in der Abwaschfraktion detektiert. Als Kontrolle, ob eine Mutation in *ssaB* durch das Plasmid komplementiert werden kann, wurde die Abwaschfraktion der Mutante EG10128 [pWSK2127] untersucht. Auch hier wurde SseB nachgewiesen (Abb. 12). Nach Membranfraktionierung von *S. typhimurium* [pWSK2127] konnte SsaB-M45 nur in der löslichen Fraktion detektiert werden (Abb. 11).

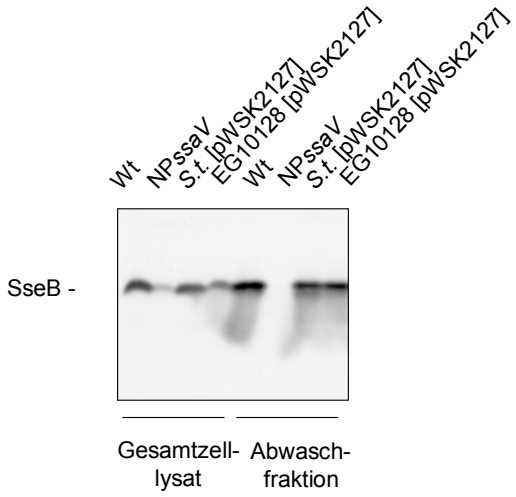


Abb. 12 *S. typhimurium* [pWSK2127] war in der Lage, SseB zu sekretieren. Eine Mutation in *ssaB* kann durch das Plasmid pWSK2127 komplementiert werden. Sowohl Ganzzelllysate als auch Abwaschfraktionen der Stämme *S. typhimurium*-Wildtyp, NP*ssaV*, *S. typhimurium* [pWSK2127] und EG10128 [pWSK2127] wurden auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel (Schägger und von Jagow, 1987) aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit anti-SseB.

4.2 Membranfraktionierung mit Hilfe eines Saccharose-Dichte-Gradienten

Durch die Membranfraktionierung mit Sarkosyl konnte SsaC in der äußeren Membran, SsaN und SsaV in der inneren Membran und SsaB-M45 in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sollten mit einer zweiten Methode bestätigt werden. Die zelluläre Lokalisation der Untereinheiten wurde deshalb durch eine Membranfraktionierung mit Hilfe eines Saccharose-Dichte-Gradienten untersucht. Zur Identifizierung der inneren Membranfraktionen wurde die NADH-Oxidase-Aktivität der einzelnen Fraktionen gemessen. Die NADH-Oxidase ist in der inneren Membran

lokalisiert. Ihre Aktivität wurde durch Messen der Oxidation von NADH (Abnahme der Absorption bei 340 nm) bestimmt (Osborn et al., 1972). Dies ist bei der Membranfraktionierung mit N-Lauroyl-Sarcosin nicht möglich, da durch das Detergenz die NADH-Oxidase denaturiert und die Aktivität zerstört wird. Um äußere Membranfraktionen nachzuweisen, wurden die einzelnen Fraktionen mit dem Antiserum anti-OmpA im Western-Blot getestet.

Alle untersuchten Apparatsproteine befanden sich mit zunehmenden Mengen in den Fraktionen 5-15 (Abb. 13). Nur das 70 kDa-Fragment von SsaV war überwiegend im Bereich der inneren Membranfraktionen (Fraktion 5-10) lokalisiert. Das 40 kDa-Fragment zeigte hingegen eine ähnliche Verteilung wie SsaC und SsaN (Abb. 13). Aufgrund der NADH-Oxidase-Aktivitätsmessung und der Kontrolle der Fraktionen mit anti-OmpA konnte jedoch angenommen werden, dass eine Trennung der Membranen stattgefunden hat. Die stärkste NADH-Oxidase-Aktivität konnte in den Fraktionen 5-10 gemessen werden. Somit wurden in diesen Fraktionen innere Membranen angereichert. Das äußere Membranprotein OmpA wurde dagegen ausschließlich in den Fraktionen 9-15 lokalisiert (Abb. 13).

SsaB, fusioniert mit einem M45-Epitop, wurde nach der Membranfraktionierung mit Sarkosyl ausschließlich in der löslichen Fraktion detektiert und sollte deshalb in den Fraktionen des Saccharose-Dichte-Gradienten nicht auftreten. Aber sowohl in den inneren als auch in den äußeren Membranfraktionen des Gradienten wurde SsaB-M45 lokalisiert. Inwieweit die einzelnen Fraktionen möglicherweise mit zytoplasmatischen Proteinen kontaminiert waren, wurde im Immunoblot anhand des zytoplasmatischen Proteins RecA getestet. Da auch RecA in den Fraktionen des Saccharose-Dichte-Gradienten detektiert wurde ist anzunehmen, dass die Membranfraktion, die über den Saccharose-Dichte-Gradienten getrennt wurde, demnach auch einen bestimmten Anteil an zytoplasmatischen Proteinen beinhaltet.

Um auszuschließen, dass in den Fraktionen intakte Zellen enthalten waren und deshalb alle untersuchten Proteine überwiegend in den Fraktionen hoher Dichte detektiert wurden, wurde bei der Präparation der Membranfraktion nach dem Zellaufschluss der Überstand sterilfiltriert (0,22 µm, Millipore). Darüber hinaus könnte es sein, dass die einzelnen Proteine des Sekretionsapparates Aggregate bilden und deshalb im Gradienten nicht getrennt werden können. Deshalb wurde die Salzkonzentration um 50 mM Tris erhöht. Die Proteine SsaC und SsaN waren daraufhin überwiegend in den Fraktionen 6-12 lokalisiert. Somit konnte auch hierbei keine Trennung erzielt werden.

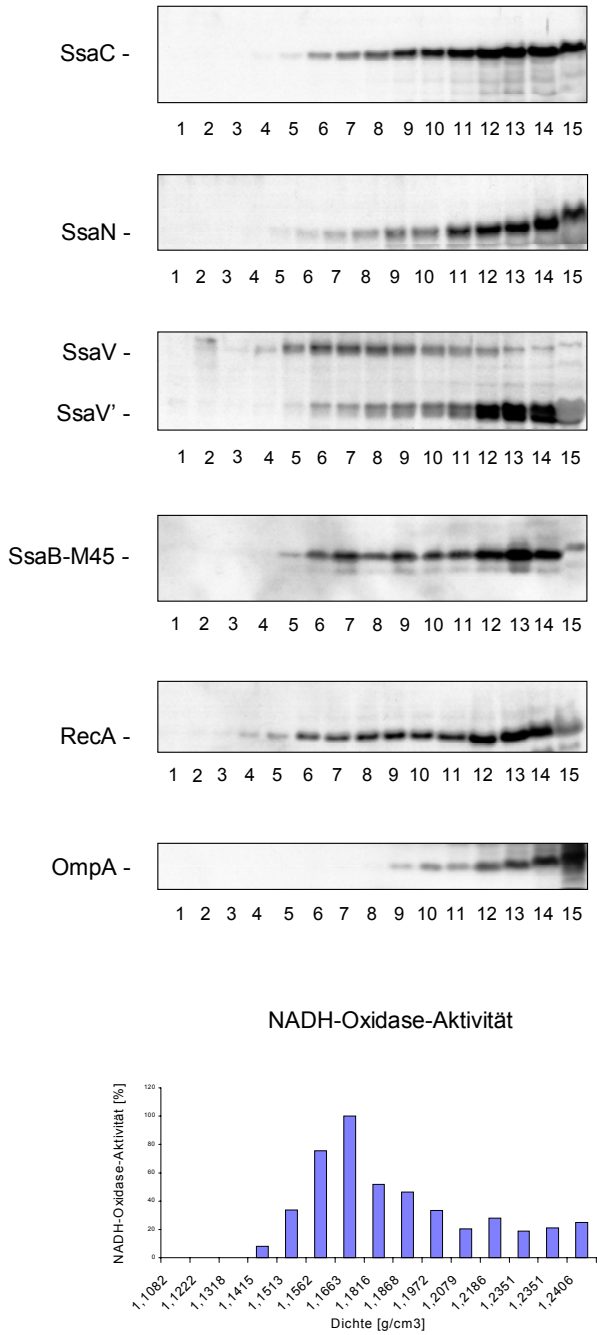


Abb. 13 Membranfraktionierung mit Hilfe eines Saccharose-Dichte-Gradienten. Die Membransuspension (ca. 3 mg Protein) von *S. typhimurium*-Wildtyp wurde über einen Saccharose-Dichte-Gradienten (30-55% Saccharose w/w) aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot mit anti-SsaC, anti-SsaN, anti-SsaV, anti-M45, anti-RecA und anti-OmpA analysiert. Das veränderte Laufverhalten der Fraktionen hoher Dichte ist vermutlich auf die höhere Viskosität aufgrund des höheren Saccharosegehaltes zurückzuführen. Die NADH-Oxidase-Aktivität ist in % der maximalen gemessenen Aktivität dargestellt. Die Dichte der einzelnen Fraktionen wurde mit dem Refraktometer ermittelt.

Neben den strukturellen Analysen sollten auch Daten über den Aufbau des Sekretionsapparates gewonnen werden. Dabei sollten Effekte von SPI2-Mutationen sowie der Einfluss des pH-Wertes auf die Synthese einzelner Apparatsproteine untersucht werden.

5. Effekte von SPI2-Mutationen auf die Synthese von Apparatsproteinen

Um herauszufinden, welche Proteine für den Aufbau und die Funktion des Sekretionsapparates essentiell sind, wurden Ganzzelllysate verschiedener Mutanten mit Transposon-Insertionen in Immunoblotanalysen getestet. Diese STM-Mutanten (signature-tagged mutagenesis) besitzen miniTn*5*-Insertionen in verschiedenen Genen, die für Apparats- oder Regulatorproteine von SPI2 kodieren. Für die Immunoblotanalysen wurden die STM-Mutanten in PCN-Medium unter Phosphatmangel, pH 5,8 über Nacht angezogen. Die Detektion erfolgte mit den Antiseren anti-SsaC, anti-SsaN und anti-SsaV (Abb. 14).

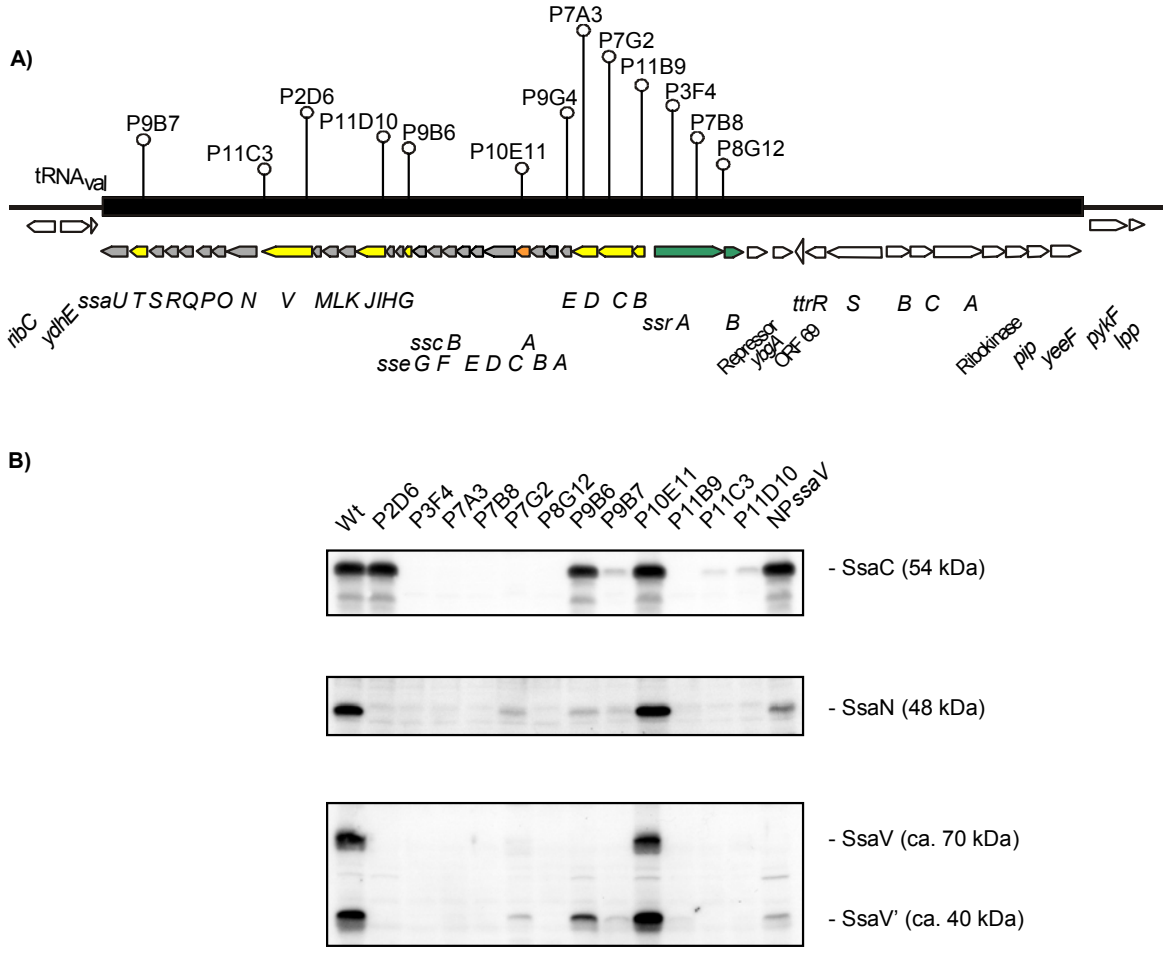


Abb. 14 Einfluss von SPI2-Mutationen auf die Synthese der Apparatsproteine SsaC, SsaN und SsaV. **A)** Genetische Organisation der SPI2 und Positionen der mTn*5*-Insertionen; **B)** Immunoblotanalysen von Ganzzelllysaten verschiedener STM-Mutanten und NP*ssaV*. Die Übernachtkulturen wurden pelletiert und entsprechend ihrer OD_{600} in Lysispuffer resuspendiert (Die Menge entspricht jeweils 100 µl einer 1 ml-Kultur von OD_{600} 1,0). Die Ganzzelllysate wurden auf 8% (für die Detektion von SsaC) bzw. auf 12% SDS-Polyacrylamidgele (Schägger und von Jagow, 1987) aufgetragen. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und SsaC, SsaN und SsaV detektiert.

Stämme mit Mutationen in Regulatorgenen (P3F4, P7B8 und P8G12) zeigten keine detektierbaren Mengen an SsaC, SsaN und SsaV. Im Gegensatz dazu hatte eine Mutation in einem Gen, das für ein Chaperon kodiert (P10E11), keinen Effekt auf die Synthese dieser Apparatsproteine. Die Apparatsmutanten P7A3 und P11B9 konnten kein SsaC, SsaN und SsaV synthetisieren. Bei P9B7, P11C3 und P11D10 war die Proteinsynthese stark bzw. völlig einsgeschränkt. Aber es existierten auch Mutanten wie P2D6, P9B6 und die nichtpolare Mutante NP*ssaV*, die in der Lage waren, SsaC in gleichen Mengen wie der Wildtyp zu synthetisieren, aber bei der Synthese von SsaN und SsaV beeinträchtigt waren.

Eine Transposon-Mutation in *ssaC* (P7G2), dem Gen, das vermutlich für das Sekretin in der äußeren Membran kodiert, führte zu stark verringerten Mengen an SsaN und SsaV.
Somit konnte gezeigt werden, dass das Regulationssystem und auch alle untersuchten Apparatsproteine eine essentielle Rolle in der Synthese bzw. im Aufbau des Sekretionsapparates spielen.

6. Einfluss des pH-Wertes auf die Synthese von Apparatsproteinen

Die Expression der SPI2-Gene wird durch Mg^{2+}- oder Phosphatmangel-Bedingungen induziert (Deiwick et al., 1999). Die SPI2-vermittelte Sekretion findet dabei nur bei saurem pH-Wert (pH≤5,0) statt. Die Sekretion des putativen Effektorproteins SseB konnte durch Wachstum der Bakterien bei pH 5,0 oder durch Absenkung des pH-Wertes während des Wachstums von pH 7,0 auf pH 5,0 induziert werden (Beuzón et al., 1999). SseB wurde innerhalb weniger Minuten nach der Ansäuerung des Mediums auf der Zelloberfläche detektiert. Die Absenkung des pH-Wertes hatte dabei keinen signifikanten Effekt auf die *sseB*-Expression oder die intrazellulären Mengen an SseB (Beuzón et al., 1999).

Hier stellt sich die Frage, welchen Einfluss eine Ansäuerung des Mediums auf die Synthese von Apparatsproteinen hat. Dazu wurden *S. typhimurium*-Wildtyp und eine Apparatsmutante (NP*ssaV*) in PCN-Medium unter Phosphatmangel (pH 7,4) angezogen. Hatten die Zellen eine OD_{600} von ca. 0,5 erreicht (mittlere logarithmische Phase), wurden die Zellen pelletiert, in frischem Phosphatmangel-Medium mit pH 5,8 bzw. pH 7,4 resuspendiert und weiter inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde dann eine Probe entnommen und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch Verwendung der Antiseren anti-SsaC, anti-SsaV und anti-SsaN konnte so der Einfluss des pH-Wertes auf die einzelnen synthetisierten Proteinmengen untersucht werden (Abb. 15 und 16).

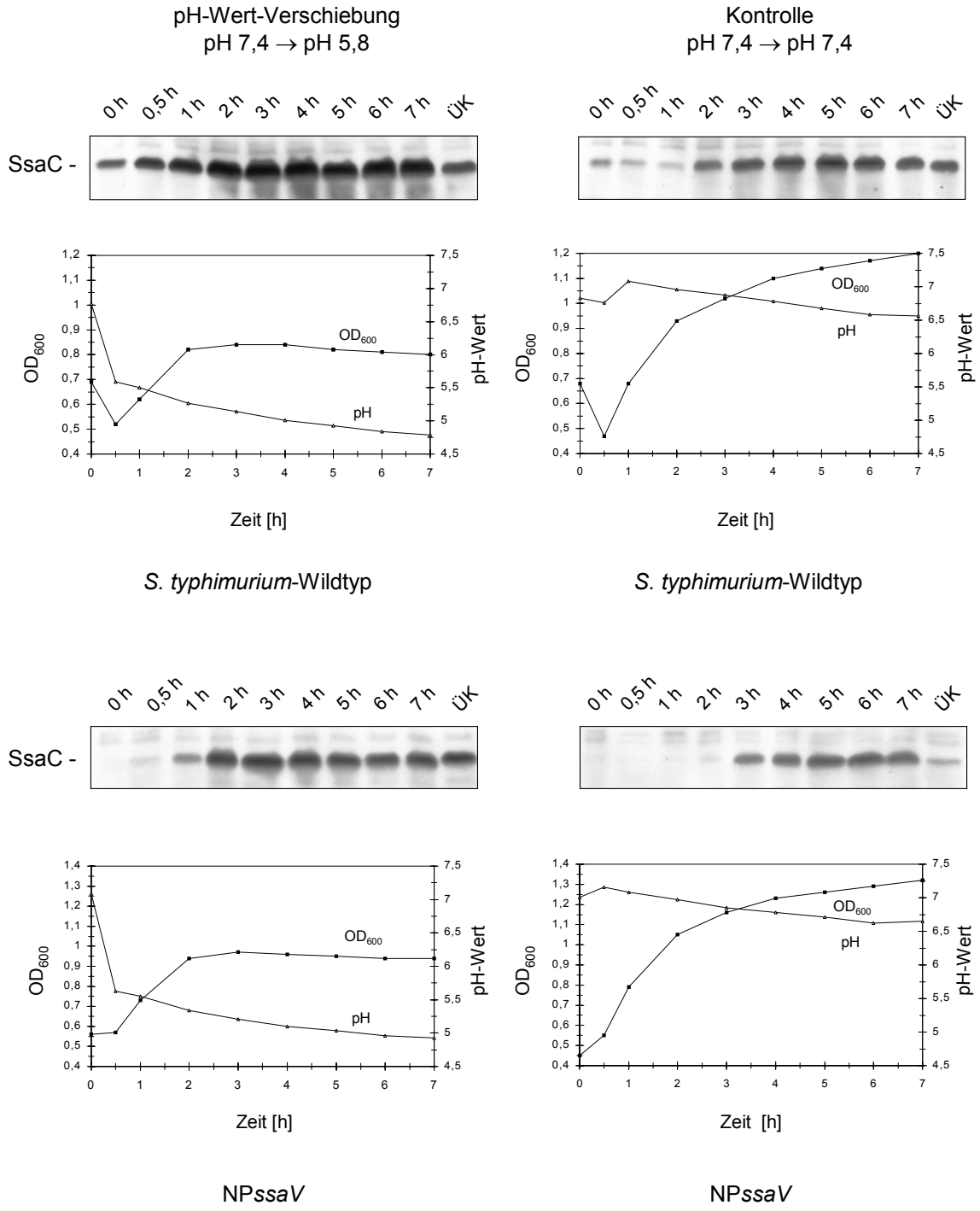


Abb. 15 Zunahme der Proteinmenge an SsaC nach Absenkung des pH-Wertes auf pH 5,8. Aufnahme von *S. typhimurium* und NP*ssaV* in Phosphatmangel-Medium, pH 5,8 (links) und Phosphatmangel-Medium, pH 7,4 (rechts, Kontrolle). Die 20 ml-Kulturen wurden in 100 ml Erlenmeyer-Kolben bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten wurde aus der Kultur eine Probe entnommen, entsprechend ihrer OD_{600} in Lysispuffer resuspendiert (Die Menge entspricht jeweils 100 µl einer 1 ml-Kultur von OD_{600} 1,0) und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Expositionszeit zur Detektion von SsaC war bei *S. typhimurium*-Wildtyp und NP*ssaV* sowie den jeweiligen Kontrollen identisch. Der 0 h-Wert entspricht dem Zeitpunkt kurz vor der Aufnahme der Zellen in frischem Medium. Von den einzelnen Proben wurde neben der OD_{600} auch der pH-Wert bestimmt.

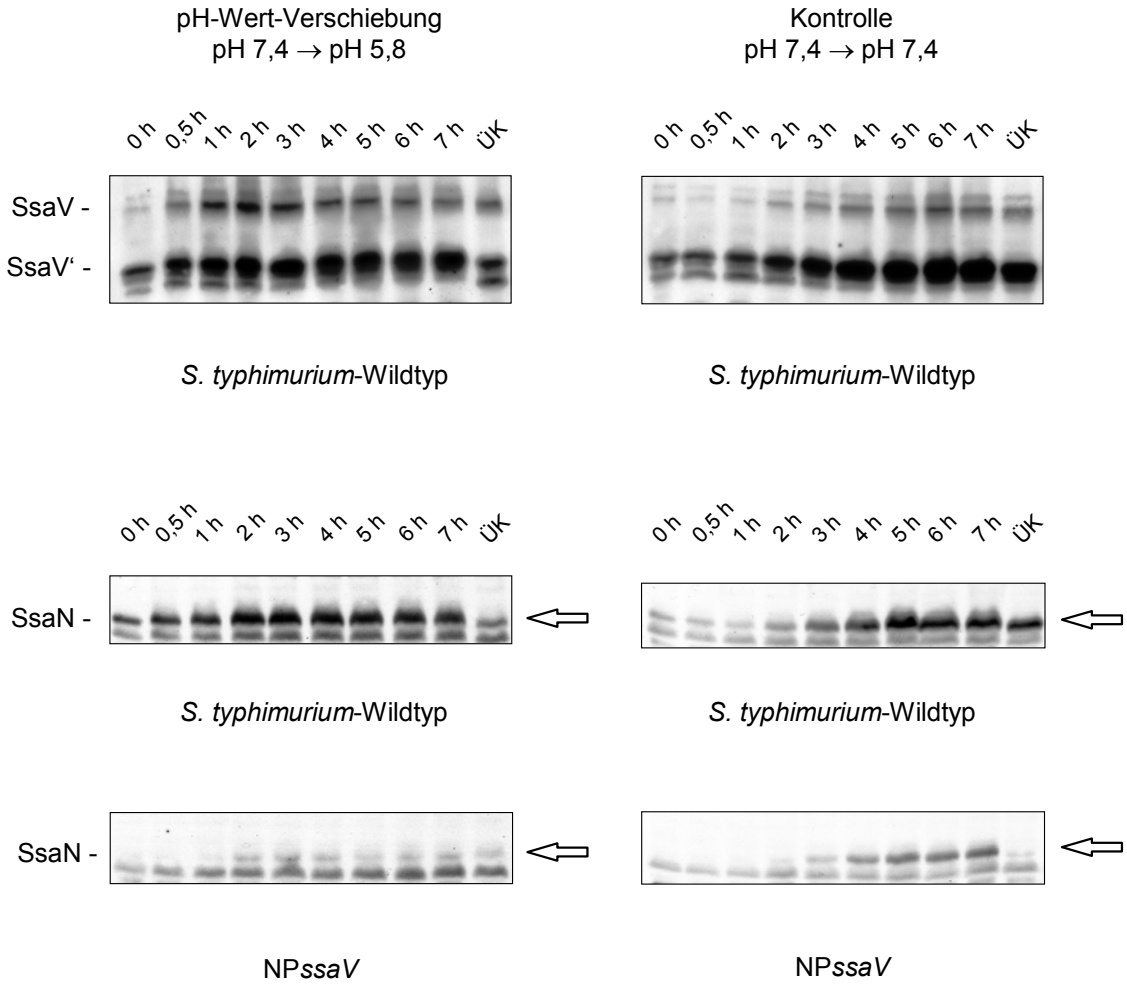


Abb. 16 Zunahme der Proteinmenge an SsaV und SsaN nach Absenkung des pH-Wertes auf pH 5,8. Aufnahme der Bakterien in Phosphatmangel-Medium, pH 5,8 (links) und Phosphatmangel-Medium, pH 7,4 (rechts, Kontrolle); 1. Antikörper: anti-SsaV bzw. anti-SsaN.

Man konnte beobachten, dass bei *S. typhimurium*-Wildtyp bereits 30 min nach Absenkung des pH-Wertes die Proteinmengen an SsaC, SsaV und SsaN zunahmen und bei ca. 3 h ein Maximum erreicht war. Bei der Apparatsmutante NP*ssaV* konnte SsaC erst ca. 1 h nach der pH-Wert-Verschiebung auf pH 5,8 deutlich detektiert werden und SsaN sogar erst nach 2 h. Darüber hinaus waren hier die Proteinmengen gegenüber *S. typhimurium*-Wildtyp insgesamt deutlich geringer, was auf den Defekt im Sekretionsapparat zurückzuführen sein könnte. Die Übernachtkulturen wurden jeweils ca. 16 h in Phosphatmangel-Medium, pH 5,8 bzw. pH 7,4 inkubiert, ohne Austausch des Mediums. Hier wurden im Vergleich zu den Proben, die nach dem Austausch des Mediums entnommen wurden, meist weniger Proteinmengen synthetisiert.

Als Kontrolle, ob die Zunahme der Proteinmengen eine Folge der pH-Wert-Absenkung auf pH 5,8 ist, und nicht durch das frische Medium verursacht wird, wurden zu den einzelnen Zeitpunkten die Bakterien jeweils parallel in PCN-Medium, pH 5,8 und PCN-Medium, pH 7,4 aufgenommen. Auch wenn bei der Aufnahme der Zellen in neutralem Medium eine leichte Zunahme der Proteinmengen zu erkennen war, so wurden gegenüber der Aufnahme in saurem Medium zu den einzelnen Zeitpunkten doch wesentlich geringere Mengen an SsaC, SsaN und SsaV detektiert.
Um zu überprüfen, ob dieser Unterschied in den synthetisierten Proteinmengen, in Abhängigkeit des pH-Wertes, auf einen Effekt auf Transkriptionsebene zurückzuführen ist, wurde mit Hilfe eines Reporterstammes (MvP 131) die Transkription von *ssaC* analysiert. Der Reporterstamm MvP 131 besitzt transkriptionelle Fusionen mit Reportergenen im Promotorbereich A_2, die für eine Luziferase („firefly-luciferase“, *luc*) bzw. β-Galaktosidase (*lacZ*) kodieren (Abb. 17).

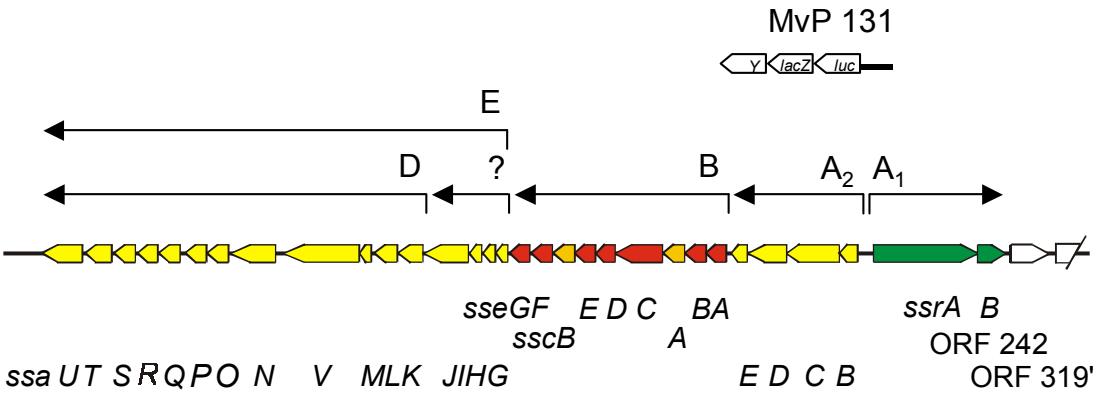


Abb. 17 *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2 (SPI2) und Transkriptionseinheiten (modifiziert nach Deiwick et al., 1999). Die Position der Reportergen-Fusionen *luc* bzw. *lacZ* im Promotorbereich A_2 des Reporterstammes MvP 131 ist eingezeichnet.

Dieser Reporterstamm wurde, wie *S. typhimurium*-Wildtyp und die Apparatsmutante NP*ssaV*, in Phosphatmangel-Medium bei pH 7,4 angezogen, bis eine OD_{600} von 0,5 erreicht war, und dann in frischem Medium mit pH 5,8 bzw. pH 7,4 aufgenommen. Von den einzelnen Proben, die zu den bestimmten Zeitpunkten entnommen wurden, wurde anschließend die Luziferase-Aktivität (Abb. 18) bzw. die β-Galaktosidase-Aktivität (Abb. 19) gemessen. In beiden Fällen konnte nach der Absenkung des pH-Wertes auf pH 5,8 keine verstärkte Transkription gemessen werden. Dies bedeutet, dass die Zunahme der Proteinmengen an SsaC, SsaN und SsaV nach Absenkung des pH-Wertes auf pH 5,8 interessanterweise nicht auf eine verstärkte Transkription zurückzuführen ist, sondern dass die Proteinsynthese pH-abhängig reguliert wird.

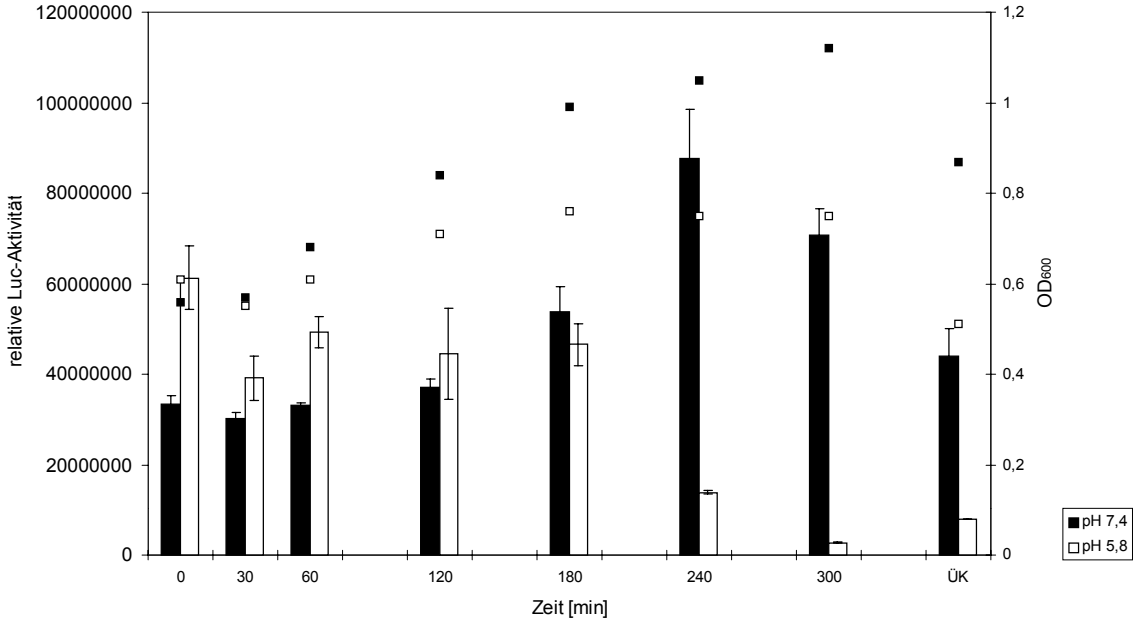


Abb. 18 Relative Luc-Aktivität der Ganzzelllysate von MvP 131 (*ssaB*::*luc*) nach Austausch des Phosphatmangel-Mediums, pH 7,4 durch Phosphatmangel-Medium, pH 5,8 und pH 7,4 (Kontrolle). Die relative Luc-Aktivität ist in Balken und die OD_{600} in Punkten angegeben. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an.

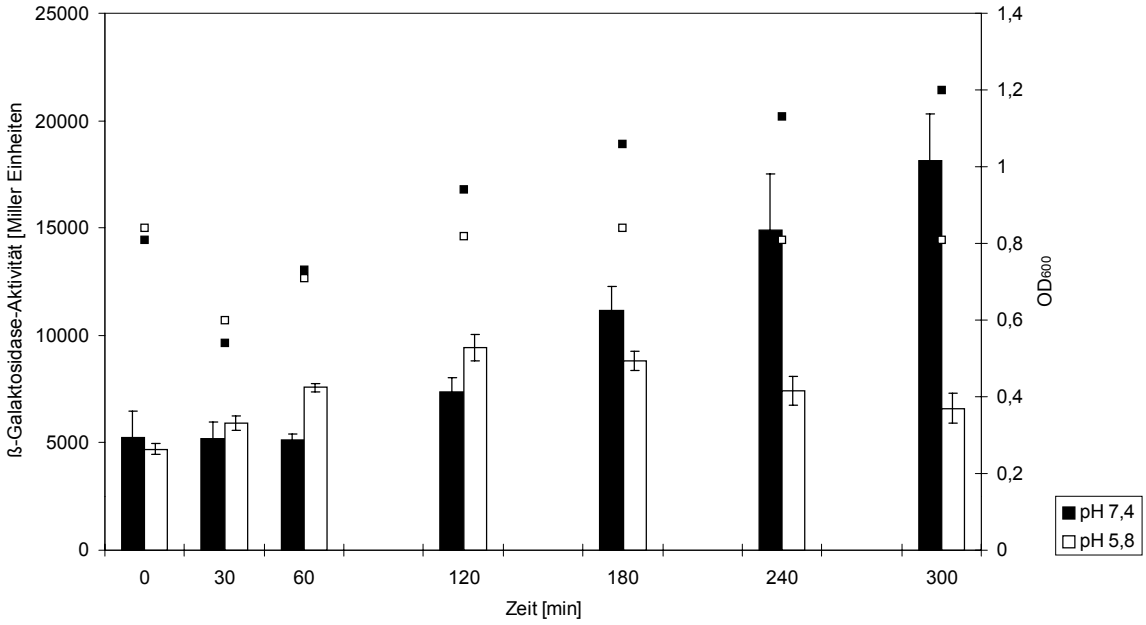


Abb. 19 β-Galaktosidase-Aktivität von MvP 131 (*ssaB*::*lacZ*) nach Austausch des Phosphatmangel-Mediums, pH 7,4 durch Phosphatmangel-Medium, pH 5,8 und pH 7,4 (Kontrolle). Die β-Galaktosidase-Aktivität ist in Balken und die OD_{600} in Punkten angegeben. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an.

Als Nachweis, dass die Zunahme der Proteinmengen aufgrund des sauren pH-Wertes ein SPI2-spezifischer Effekt ist, wurde das Experiment der pH-Wert-Verschiebung unter den beschriebenen Bedingungen erneut durchgeführt und neben dem Antiserum anti-SsaC ein Antiserum gegen rekombinantes RecA aus *Helicobacter pylori* eingesetzt (das Antiserum anti-RecA wurde freundlicherweise von Wolfgang Schmitt, Max von Pettenkofer-Institut, München, zur Verfügung gestellt). RecA ist ein konserviertes, zytoplasmatisches Protein, das konstitutiv exprimiert wird. Aufgrund der großen Sequenz-Ähnlichkeit zwischen RecA aus *H. pylori* und *S. typhimurium* (57% Identität, 75% Ähnlichkeit; BLAST Search) konnte das Antiserum auch für *Salmonella*-Lysate in Immunoblotanalysen angewandt werden.
Sowohl bei *S. typhimurium* als auch bei der Apparatsmutante NP*ssaV* war keine Zunahme an RecA zu beobachten. Die Proteinmengen sind während des gesamten Zeitraumes nahezu konstant. Bei NP*ssaV* konnte man nach der pH-Wert-Absenkung sogar eine Abnahme der Mengen an RecA beobachten. Dies zeigt, dass durch den niedrigen pH-Wert spezifisch die Synthese von SPI2-Proteinen induziert wird (Abb. 20).

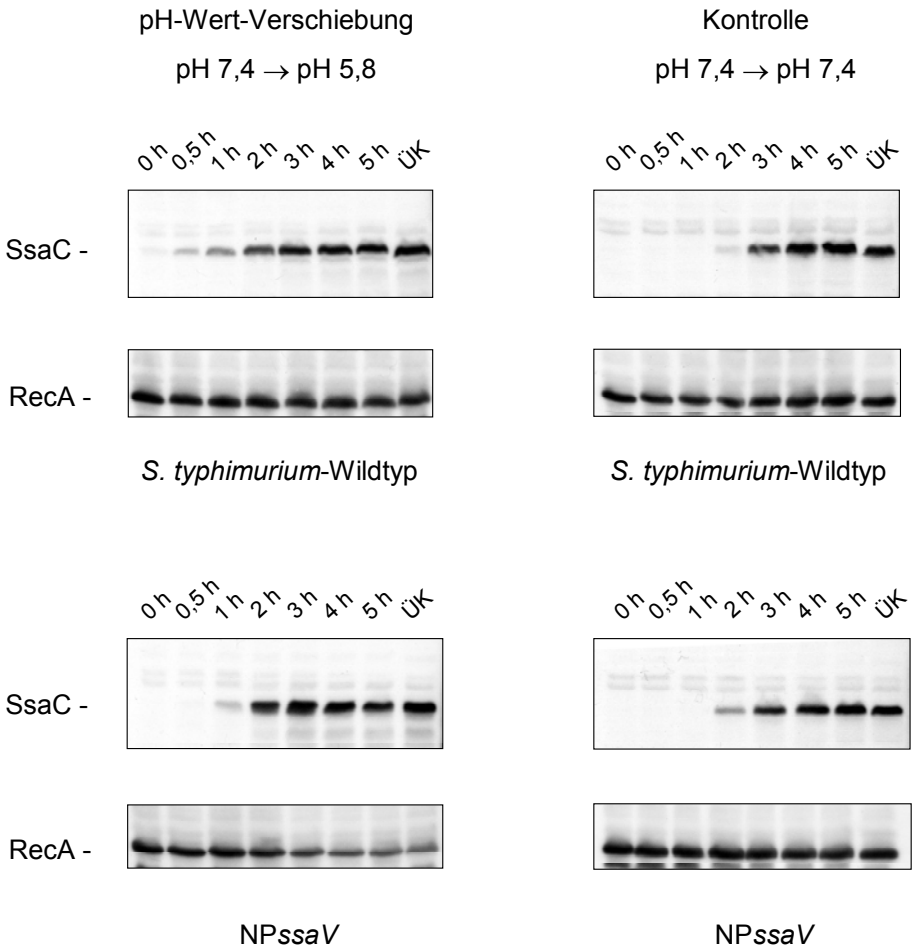


Abb. 20 Die Proteinmenge an RecA bleibt im Gegensatz zu SsaC nach der pH-Wert-Verschiebung auf pH 5,8 konstant. Bei NP*ssaV* war nach der pH-Wert-Absenkung eine Abnahme an RecA zu beobachten. Aufgetragen wurden Ganzzelllysate von *S. typhimurium*-Wildtyp und NP*ssaV*. Die Detektion wurde mit dem 1. Antikörper anti-SsaC bzw. anti-RecA durchgeführt.

6.1 Quantifizierung der Blot-Signale

Um den Unterschied der Proteinmengen, der durch die Absenkung des pH-Wertes auf pH 5,8 verursacht wurde, zu quantifizieren, wurde von dem 3 h-Wert der pH-Wert-Verschiebung auf pH 5,8 von *S. typhimurium* eine Verdünnungsreihe erzeugt und anschließend eine Eichkurve angefertigt (Abb. 21). Dabei wurde sowohl die Fläche als auch die Intensität der einzelnen Banden gemessen und ein entsprechender Wert daraus ermittelt (Software: Image-Master 2D, Amersham Pharmacia, Freiburg).

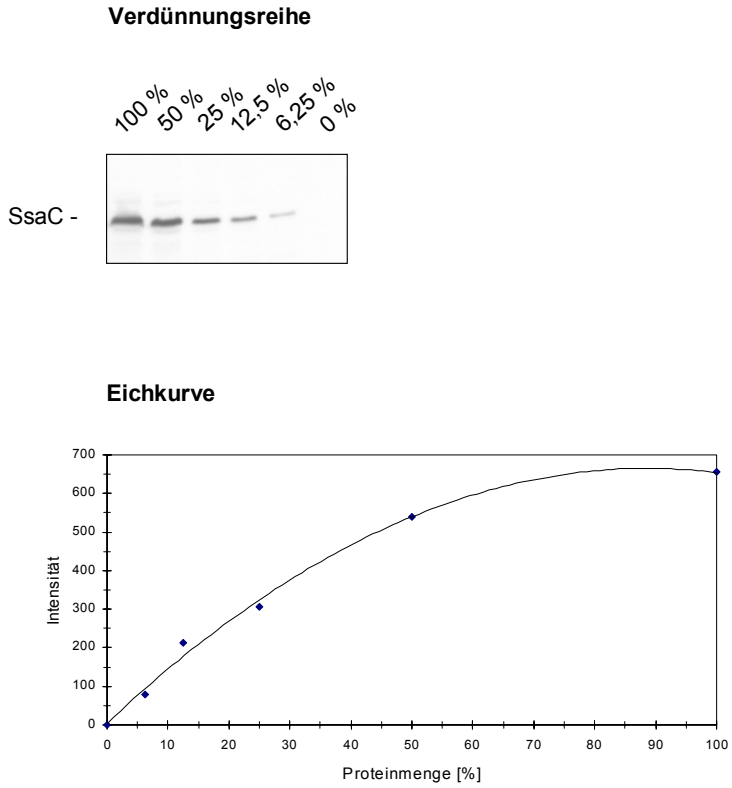


Abb. 21 Verdünnungsreihe und Eichkurve zur Ermittlung der Intensitäten der einzelnen Blot-Signale. Verdünnungsreihe: Der 3 h-Wert der pH-Wert-Verschiebung auf pH 5,8 von *S. typhimurium*-Wildtyp (siehe Abb. 15) wurde unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 mit Lysispuffer verdünnt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Eichkurve: Von der Verdünnungsreihe wurde die Intensität der einzelnen Blot-Signale gemessen (Software: ImageMaster 2D, Amersham Pharmacia, Freiburg) und gegen die Proteinmenge [%] aufgetragen.

Nach dem Vermessen der einzelnen Blot-Signale wurden anhand der Eichkurve die Proteinmengen in % ermittelt (Abb. 22). So konnte beispielsweise 3 h nach Austausch des Mediums ohne pH-Wert-Verschiebung (Kontrolle) nur knapp 1/3 der Proteinmenge gegenüber dem Austausch mit pH-Wert-Verschiebung auf pH 5,8 detektiert werden.

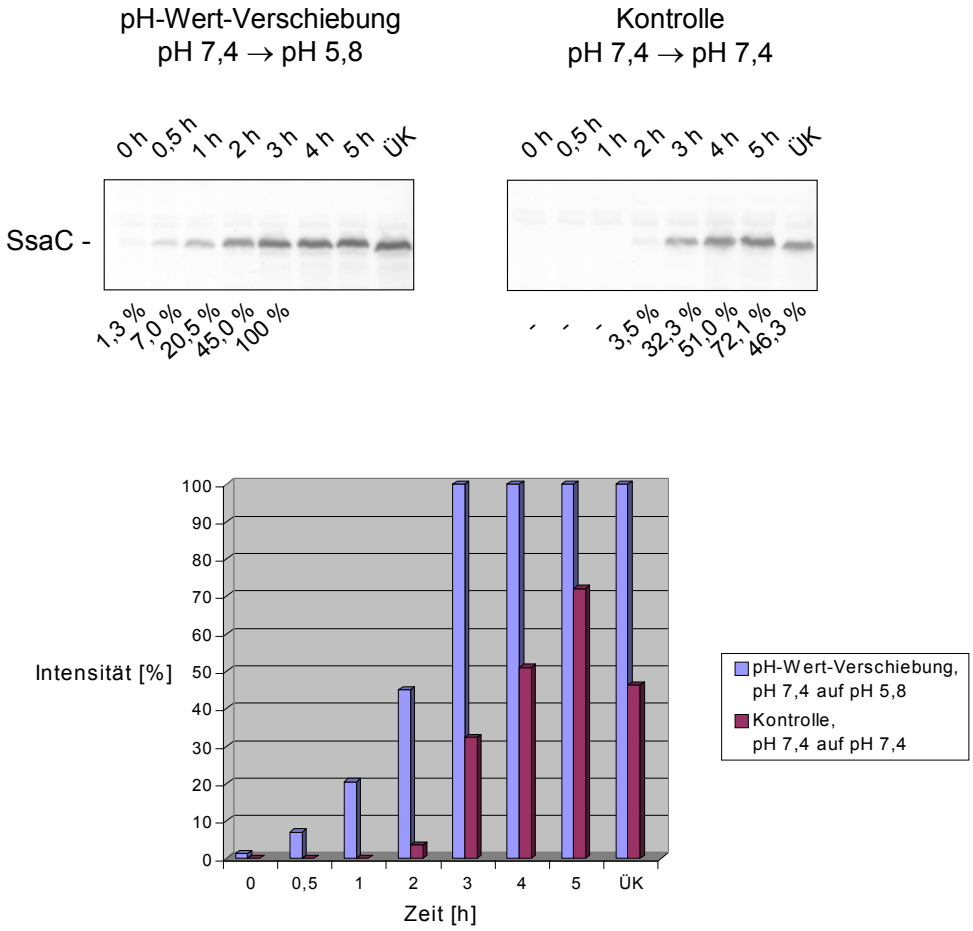


Abb. 22 Quantifizierung der Blot-Signale und Vergleich der synthetisierten Proteinmengen in Abhängigkeit des pH-Wertes. Angegeben ist jeweils die Proteinmenge in %. Der 3 h-Wert der pH-Wert-Verschiebung auf pH 5,8 entspricht 100%. Für den 4 h-Wert, den 5 h-Wert und die Übernachtkultur wurden Intensitäten über 100% gemessen. Da diese Werte jedoch weit außerhalb des Linearitätsbereiches der Eichkurve lagen, konnten keine Intensitätswerte ermittelt werden. Deshalb wurden diese Werte im Histogramm gleich 100% gesetzt.

Diese Daten zeigen deutlich den Einfluss des pH-Wertes auf die synthetisierten Proteinmengen. Der niedrige pH-Wert stellt somit nicht nur das Signal für die Sekretion von SPI2-Effektoren dar, sondern hat auch eine Zunahme der Mengen einzelner Apparatsproteine zur Folge.

6.2 Untersuchung zur Kinetik des Aufbaus des Sekretionsapparates in Abhängigkeit des pH-Wertes

Im Rahmen der Experimente zur pH-Wert-Verschiebung und Analyse der darauffolgenden Synthese verschiedener Apparatsproteine sollte nun untersucht werden, zu welchem

Zeitpunkt der Sekretionsapparat vollständig aufgebaut ist. SseB, das Protein, das möglicherweise die Translokatorstruktur aufbaut und auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, kann durch mechanische Scherkräfte abgetrennt und mit anti-SseB im Western-Blot detektiert werden. Ist der Sekretionsapparat vollständig aufgebaut, sollte SseB in dieser sogenannten Abwaschfraktion enthalten sein. So wurden 1 h und 3 h nach pH-Wert-Verschiebung auf pH 5,8 die Abwaschfraktionen von *S. typhimurium*-Wildtyp und der Apparatsmutante NP*ssaV* untersucht (Abb. 23).

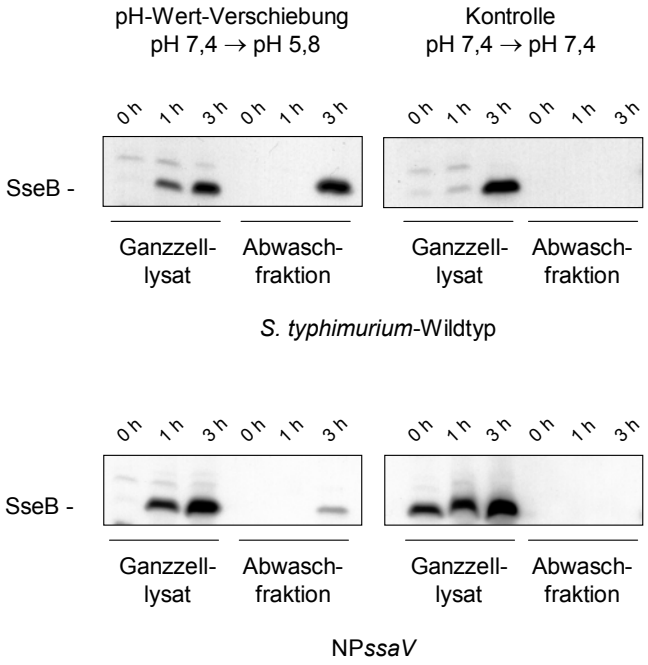


Abb. 23 Ganzzelllysate und Abwaschfraktionen von *S. typhimurium*-Wildtyp und NP*ssaV* kurz vor (0 h), 1 h und 3 h nach pH-Wert-Verschiebung auf pH 5,8 und ohne pH-Wert-Verschiebung (Kontrolle). 1. Antikörper: anti-SseB.

Erst 3 h nach der Aufnahme der Bakterien in Phosphatmangel-Medium pH 5,8 ist das Translokatorprotein SseB in der Abwaschfraktion detektierbar. 1 h nach der pH-Wert-Verschiebung ist SseB im Ganzzelllysat nachweisbar, dagegen nicht in der Abwaschfraktion. Das heißt, innerhalb dieser Zeitspanne beginnt die pH-induzierte Sekretion von SseB. Sobald SseB auf der Zelloberfläche lokalisiert werden kann, ist auch der Sekretionsapparat vollständig aufgebaut. Die Apparatsmutante NP*ssaV* sollte nicht in der Lage sein, SseB zu sekretieren, und wurde hier als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Jedoch ist hier 3 h nach der pH-Wert-Verschiebung auf pH 5,8 eine schwache Bande zu sehen. Möglicherweise sind in diesem Ansatz durch die mechanischen Scherkräfte eine bestimmte Anzahl von Zellen lysiert, so dass intrazelluläres SseB nach außen gelangt und

in der Abwaschfraktion zu finden ist. Da Sekretion nur bei saurem pH-Wert stattfindet, ist nach der Aufnahme der Bakterien in Phosphatmangel-Medium, pH 7,4 kein SseB detektierbar. Dies zeigt, dass durch die Scherkräfte prinzipiell keine Zelllyse verursacht wird. In einem Vergleich der β-Galaktosidase-Aktivität des Reporterstammes MvP 131 zu einer Kultur (6003,5 Miller-Einheiten) konnte in der Abwaschfraktion nur eine minimale Aktivität (0,3 Miller-Einheiten) gemessen werden. Das heißt, dass durch die mechanischen Scherkräfte keine zytoplasmatischen Proteine aufgrund von Zelllyse freigesetzt werden (Nikolaus et al., 2001).

7. Bedeutung von SsaB bei der Sekretion der Translokator-Komponenten SseB und SseC

SsaB (SpiC) wurde kürzlich als ein transloziertes Effektorprotein des SPI2 Typ III-Sekretionssystems beschrieben (Uchiya et al., 1999). Eine *ssaB*-Mutante ist in ihrer Virulenz bei Mäusen stark attenuiert und im Gegensatz zu *S. typhimurium*-Wildtyp nicht in der Lage, die Fusion von Phagosomen mit Lysosomen und Endosomen zu inhibieren (Uchiya et al., 1999). Dies könnte auch darauf hinweisen, dass SsaB für die Translokation von SPI2-Effektoren erforderlich ist, selbst jedoch nicht sekretiert wird.
Um zu testen, inwieweit SsaB (SpiC) für die Sekretion der Translokatorproteine SseB und SseC erforderlich ist, wurden *S. typhimurium*-Wildtyp, P11B9 (*ssaB*::mTn*5*), EG1028 (*spiC*::*kan*), EG10128 [pEG9127], P7G2 (*ssaC*::mTn*5*) und die Apparatsmutante NP*ssaV* unter Magnesium-Mangel (F-Medium, pH 5,0) angezogen und nach Abtrennung der Oberflächenstrukturen die Abwaschfraktionen untersucht. Für die Detektion von SseB und SseC wurden bereits vorhandene Antiseren verwendet (Abb. 24).

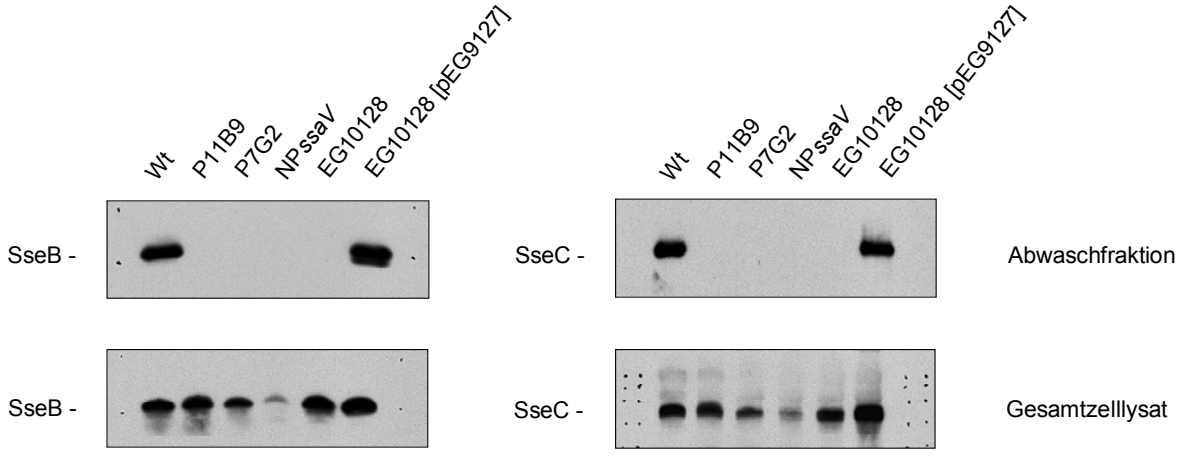


Abb. 24 Abwaschfraktionen und Ganzzelllysate von *S. typhimurium*-Wildtyp, *ssaB*-Mutanten und Apparatsmutanten. F-Medium, pH 5,0; 1. Antikörper: anti-SseB bzw. anti-SseC.

Bei *S. typhimurium*-Wildtyp waren SseB und SseC auf der Zelloberfläche lokalisiert. Die *ssaB*-Mutanten konnten dagegen kein SseB und SseC sekretieren. Der Sekretionsdefekt von EG10128 (*spiC*::*kan*) konnte durch das Plasmid pEG9127, das eine Wildtyp-Kopie von *spiC* (*ssaB*) enthält, komplementiert werden. Dass die intrazellulären Mengen von SseB und SseC in den *ssaB/spiC*-Mutanten unbeeinflusst waren, zeigte, dass SsaB für die Sekretion, aber nicht für die Synthese von SseB und SseC erforderlich ist. Auch bei P7G2 (*ssaC*::mTn*5*) konnten die beiden Translokator-Komponenten in der intrazellulären Fraktion detektiert werden, nicht jedoch in der Abwaschfraktion. Aufgrund des fehlenden oder defekten Sekretins in der äußeren Membran konnte keine Sekretion stattfinden. NP*ssaV* zeigte neben dem Sekretionsdefekt auch verminderte intrazelluläre Mengen von SseB und SseC.

8. Isolierung eines Sekretionsapparates

Die als Nadel-Komplexe bezeichneten makromolekularen Strukturen konnten bisher aus *S. typhimurium* (Kubori et al., 1998) und *S. flexneri* (Blocker et al., 1999) isoliert werden. Für den SPI2-kodierten Sekretionsapparat wurden bisher noch keine definierten Strukturen nachgewiesen. Deshalb war es von großem Interesse, anhand der bereits beschriebenen Methoden zur Isolierung der Nadel-Komplexe eine Methode zu finden, mit der der SPI2-kodierte Sekretionsapparat gereinigt und angereichert werden kann. Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Analysen könnten somit wichtige Daten zum strukturellen Aufbau und zur Morphologie des Sekretionsapparates gewonnen werden.
Wie bei der Isolierung der SPI1-kodierten Sekretionsapparate und den Apparaten aus *S. flexneri* wurden die Zellen sphäroplastiert und anschließend durch Zugabe eines Detergenz lysiert. Die Disintegration der Nadel-Komplexe aus den angereicherten Membranen erfolgte bei den SPI1-Apparaten durch Erhöhung des pH-Wertes auf pH 11 (Kubori et al., 1998). Auf diese Weise konnten die SPI2-Sekretionsapparate nicht isoliert werden. Vermutlich findet eine zu starke Degradation statt. Deshalb wurde eine weitere Methode eingesetzt, die zuvor bei *S. flexneri* angewandt wurde. Hier wurde die Membranen-enthaltende Lösung mit Hilfe von Kanülen mit abnehmender Größe resuspendiert. Durch die dabei entstehenden Scherkräfte werden die Komplexe aus den Membranfragmenten gelöst. Auf diese Weise konnten nach weiterer Reinigung über einen CsCl-Dichte-Gradienten Nadel-Komplexe aus *S. typhimurium*-Wildtyp isoliert werden. Einzelne Fraktionen aus dem CsCl-Dichte-Gradienten wurden dann im Elektronenmikroskop analysiert (Abb. 25).

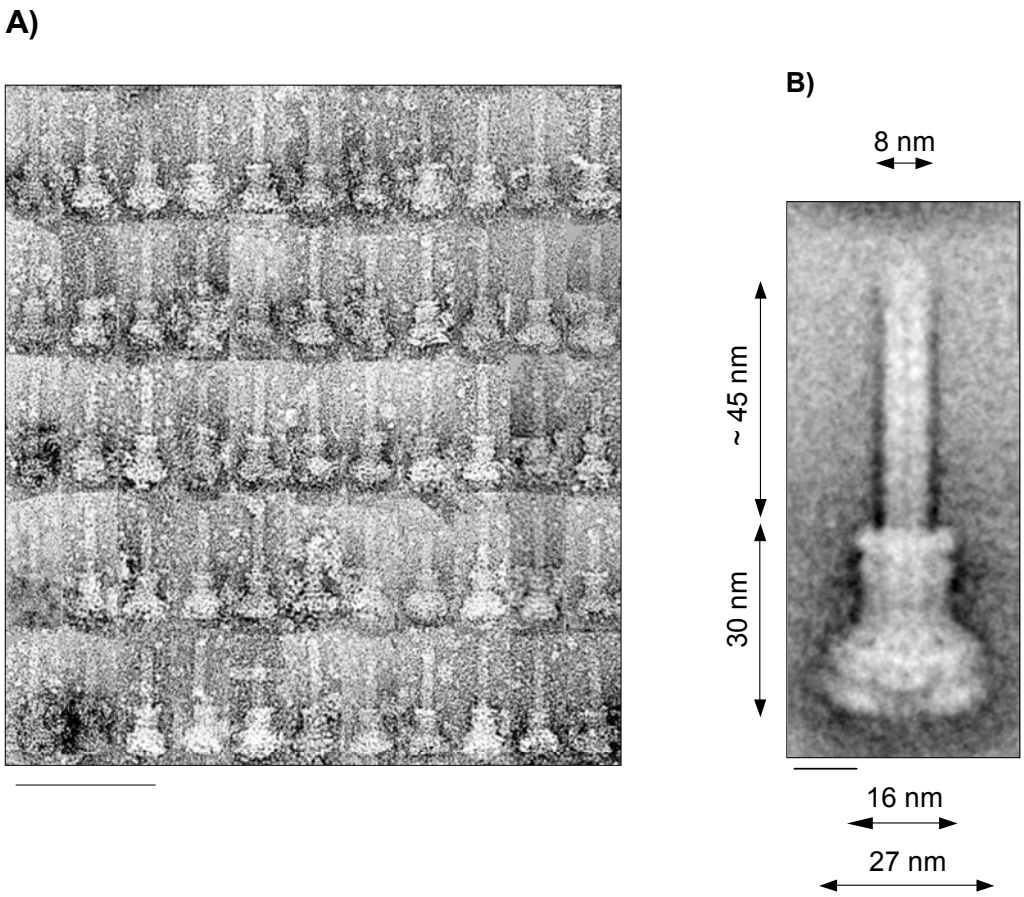


Abb. 25 Nadel-Komplexe aus *S. typhimurium*-Wildtyp. Die Übernachtkulturen für die Präparation wurden unter SPI2-induzierenden Bedingungen in PCN-Medium unter Phosphatmangel angezogen. Sowohl bei PCN-Medium, pH 5,8, als auch bei PCN-Medium, pH 7,4, konnten Nadelkomplexe isoliert werden. Einzelne Fraktionen aus dem CsCl-Dichte-Gradienten wurden nach Negativ-Färbung mit 2% Uranylacetat im Elektronenmikroskop untersucht. **A)** Einzelne Nadel-Komplexe aus angereicherten Fraktionen der CsCl-Dichte-Gradienten. Balken, 100 nm. **B)** Mittelung des Nadel-Komplexes aus den in A) abgebildeten Nadel-Komplexen. Balken, 10 nm.

Aus der ermittelten Struktur (Abb. 25) konnte die Größe der einzelnen Komponenten berechnet werden. Der Basalkörper hatte eine Breite von ca. 27 nm und eine Höhe von ca. 30 nm. Die Nadel hatte einen Durchmesser von ca. 8 nm. Die Länge der Nadel ist nicht genau begrenzt, da unterschiedlich lange Exemplare in die Mittelung eingegangen sind. Deshalb konnte die Länge nicht genau bestimmt werden.

Auch flagellare Basalkörper wurden durch diese Präparation isoliert. Die Filamente der Flagellen besitzen einen wesentlich größeren Durchmesser (ca. 20 nm) als die Nadeln und sind somit deutlich von diesen unterscheidbar (Abb. 26).

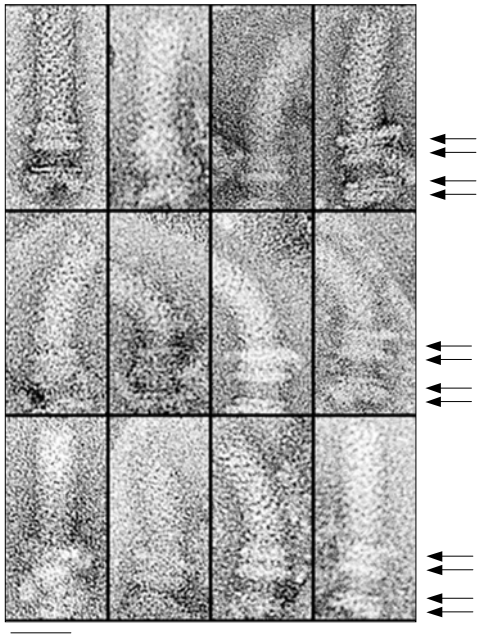


Abb. 26 Flagellare Basalkörper. Die äußeren und inneren Ringe des Basalkörpers sind erkennbar (siehe Pfeile). Teilweise ist der Haken des Filaments sichtbar. Aufgrund der Größe können die flagellaren Basalkörper von den Nadel-Komplexen unterschieden werden. Balken, 30 nm.

Da *S. typhimurium* zwei Typ III-Sekretionssysteme besitzt, war es zur eindeutigen Identifizierung der Nadel-Komplexe erforderlich, auch von einer SPI1-Mutante, die nicht mehr in der Lage ist, den SPI1-Sekretionsapparat aufzubauen, eine Präparation durchzuführen und elektronenmikroskopisch zu analysieren. Dazu wurde die Mutante P3B12 (*invG*::mTn*5*) ausgewählt, die eine Transposon-Insertion in *invG* besitzt, dem Gen, das für das Sekretin kodiert. Überraschenderweise konnten aus der Mutante P3B12 (*invG*::mTn*5*) keine Nadel-Komplexe isoliert werden. Um zu überprüfen, inwieweit die Mutation in *invG* Einfluss auf die *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2 und dadurch auf die Synthese des Sekretionsapparates ausübt, wurde P3B12 auf die Sekretion von SseB untersucht. SseB konnte in der Abwaschfraktion von P3B12 detektiert werden. Somit ist anzunehmen, dass auch der SPI2-Sekretionsapparat vorhanden sein muss. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den isolierten Nadel-Komplexen aus *S. typhimurium*-Wildtyp möglicherweise um SPI1-Nadel-Komplexe handelt. Trotz der SPI2-induzierenden Bedingungen, unter denen die Kulturen für die Präparation der Nadel-Komplexe gewachsen waren, werden vermutlich auch einige SPI1-Sekretionsapparate synthetisiert. Mit der angewandten Methode lassen sich vermutlich SPI1-, aber keine SPI2-Sekretionsapparate isolieren.

Neben den Nadel-Komplexen konnten wesentlich kleinere Strukturen mit einem ähnlichen Aufbau beobachtet werden. Diese Strukturen waren aus einem Basalkörper und einer kleinen Nadel zusammengesetzt. Die Länge der gesamten Nadel-Struktur betrug ca. 32 nm. Diese kleinen Nadel-Strukturen waren in der Präparation von *S. typhimurium*-Wildtyp und P3B12 (*invG*::mTn*5*) zu finden (Abb. 27).

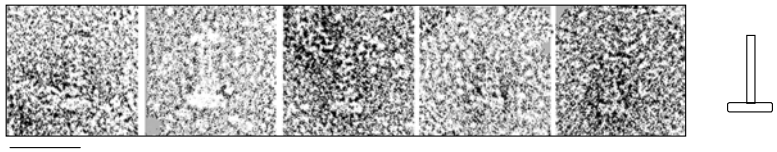


Abb. 27 Elektronenmikroskopische Aufnahmen und schematische Darstellung der kleinen Nadel-Strukturen. Sowohl bei *S. typhimurium*-Wildtyp als auch bei P3B12 (*invG*::mTn*5*) konnten diese Strukturen beobachtet werden. Mit einer Länge von ca. 32 nm sind diese Strukturen wesentlich kleiner als die isolierten Nadel-Komplexe. Balken, 30 nm.

9. Erstellung einer Proteinkarte von SPI2-Proteinen

Zur Identifizierung von SPI2-Proteinen sollte durch eine hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE) in Zusammenarbeit mit einem Mitglied unserer Arbeitsgruppe eine Proteinkarte der SPI2-Proteine erstellt werden. Die isoelektrische Fokussierung (IEF) erlaubt die Trennung von Proteinen entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt in einem pH-Gradienten. Nach anschließender SDS-PAGE erfolgt die Trennung der Proteine nach ihrer Größe.

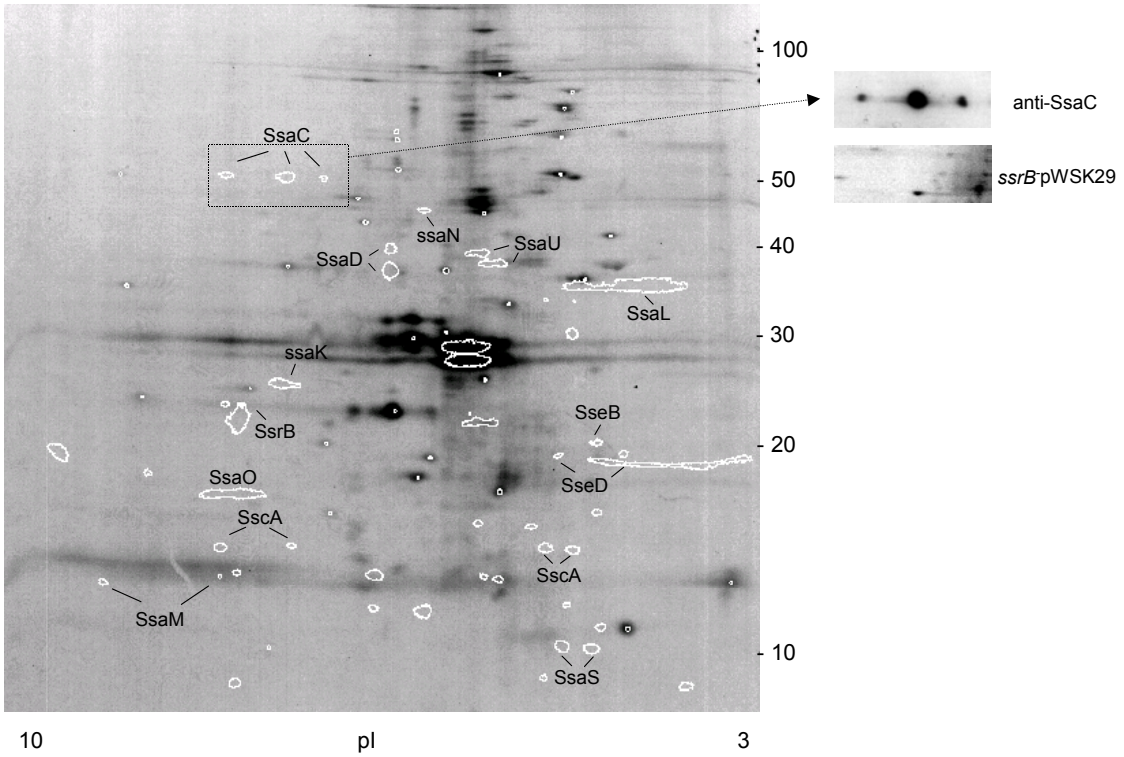


Abb. 28 Proteinkarte von SPI2-Proteinen. Verschiedene Ganzzelllysate von *E. coli*-Stämmen, die definierte Genabschnitte der SPI2 exprimieren, wurden mittels 2D-GE getrennt. Durch eine Übereinanderlagerung der Expositionen der verschiedenen T7-Konstrukte mit dem *E. coli*-Stamm mit pET21 im Hintergrund, wurde eine Proteinkarte von SPI2-Proteinen erstellt. Die SPI2-Proteine wurden mit Hilfe eines pH 3-10 immobilisierten pH-Gradienten in der ersten und eines 12% SDS-Polyacrylamidgels (Schägger und von Jagow, 1987) in der zweiten Dimension aufgetrennt. Die mit ^{35}S-Methionin/Cystein markierten Proteine wurden durch Autoradiographie visualisiert. Apparente molekulare Massen sind rechts in kDa und der pH-Gradient ist unten angegeben. Die 2D-GE wurde von J. Deiwick durchgeführt. Die Lokalisation von SsaC in der Proteinkarte konnte nach Anfertigung eines Immunoblots unter Verwendung des Antiserums anti-SsaC verifiziert werden. Als Negativ-Kontrolle wurde P8G12 (*ssrB*$^-$) eingesetzt.

Nach der 2D-GE konnte das Sekretin-bildende Protein SsaC im Immunoblot detektiert und die Position in der Proteinkarte bestätigt werden. Dabei wurden für SsaC drei Signale beobachtet, die bei unterschiedlichen isoelektrischen Punkten auftraten. Dieser Effekt, dass ein Protein mehrere Signale liefert, wurde bei einigen SPI2-Proteinen beobachtet. Für SsaD traten beispielsweise zwei Signale bei unterschiedlichem Molekulargewicht auf. Wie bei SsaC wurden z.B. auch für SseD, SscA und SsaS Signale bei jeweils unterschiedlichen isoelektrischen Punkten identifiziert. Mögliche Ladungsinhomogenität bzw. Degradation eines rekombinant erzeugten Proteins könnten hier das Auftreten von mehr als einem Produkt zur Folge haben. Einige Proteine, wie z. B. SsaV, SseC oder SsrA konnten in der Proteinkarte nicht detektiert werden.

IV. Diskussion

1. Subzelluläre Lokalisation einzelner Proteinuntereinheiten des Sekretionsapparates

Zur Analyse des Aufbaus des Typ III-Sekretionssystems wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation einzelner Proteinuntereinheiten untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Nach einer Zellfraktionierung wurde die Membranfraktion mit N-Lauroyl-Sarcosin (Sarkosyl) fraktioniert bzw. über einen Saccharose-Dichte-Gradienten aufgetrennt. Die zytoplasmatische Membran und die äußere Membran besitzen eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Detergenzien. Eine selektive Solubilisierung zytoplasmatischer Membranen wird durch das ionische Detergenz Sarkosyl erzielt. Die äußere Membran ist dagegen resistent gegenüber der Solubilisierung mit Sarkosyl (Filip et al., 1973). Da die innere und äußere Membran auch eine unterschiedliche Dichte aufweisen, können die Membranen auch durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation voneinander getrennt werden. Ein allgemeines Problem der Membranfraktionierung ist, eine optimale Trennung der inneren von der äußeren Membran zu erhalten. Häufig kann zwar eine Anreicherung, aber keine 100%-ige Trennung innerer und äußerer Membranproteine erzielt werden. Nach der Solubilisierung der Membranfraktion mit Sarkosyl konnte die Lokalisation von SsaC, SsaN, SsaV und SsaB-M45 bestimmt werden. SsaC konnte in der äußeren, SsaN und SsaV in der inneren Membranfraktion detektiert werden. SsaB-M45 wurde nur in der löslichen Fraktion detektiert. SsaC war aber auch in der inneren Membranfraktion enthalten. Dies zeigt, dass durch die Solubilisierung mit Sarkosyl vermutlich keine ausreichende Trennung statt gefunden hat. Obwohl die äußere Membran resistent gegenüber der Solubilisierung mit Sarkosyl ist, ist nicht auszuschließen, dass einzelne äußere Membranproteine nicht vollständig vor der Solubilisierung durch das Detergenz geschützt sind. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Proteinuntereinheiten des Sekretionsapparates bei der Membranfraktionierung größtenteils nicht voneinander getrennt werden, und der gesamte Sekretionsapparat als ein stabiler Komplex aus der äußeren Membran gelöst wird. Die einzelnen Untereinheiten wären dann für das Detergenz zugänglich und nach der Solubilisierung mit Sarkosyl in der inneren Membranfraktion zu finden. Dies würde auch erklären, dass eine relativ geringe Proteinmenge an SsaC in der äußeren Membran detektiert wurde.

Mit Hilfe des Saccharose-Dichte-Gradienten konnten innere und äußere Membranen angereichert werden. Dies konnte durch die Bestimmung der NADH-Oxidase-Aktivität und durch die Untersuchung der Fraktionen mit einem Antiserum gegen das äußere

Membranprotein OmpA überprüft und bestätigt werden. Da jedoch auch in den Fraktionen hoher Dichte noch eine NADH-Oxidase-Aktivität zu messen war, muss auch hier davon ausgegangen werden, dass keine vollständige Trennung erzielt wurde. Alle untersuchten Apparatsproteine wurden im gleichen Dichte-Bereich des Gradienten lokalisiert. Nur das 70 kDa-Fragment von SsaV wurde in den inneren Membranfraktionen detektiert. Aufgrund der Detektion von SsaB-M45 und des zytoplasmatischen Proteins RecA in den inneren und äußeren Membranfraktionen des Gradienten kann angenommen werden, dass die einzelnen Fraktionen mit zytoplasmatischen Proteinen kontaminiert sind. Bei der Membranfraktionierung mit Sarkosyl konnte SsaC, SsaN und SsaV auch in der löslichen Fraktion lokalisiert werden. So wäre es möglich, dass eine intrazelluläre Akkumulation der Apparatsproteine stattfindet, bevor sie in die Zellmembran transportiert werden. Enthält die Membranfraktion somit auch SsaC, SsaN und SsaV aus dem Zytoplasma, hätte dies eine Verfälschung des Trennergebnisses im Saccharose-Dichte-Gradienten zur Folge.
Ein weiterer Grund für die beobachtete Verteilung der untersuchten Apparatsproteine im Gradienten wäre, dass keine Trennung der Proteinuntereinheiten des Sekretionsapparates stattgefunden hat. Beide Methoden der Membranfraktionierung deuten darauf hin, dass es sich bei dem Sekretionsapparat um einen sehr stabilen Komplex handelt. Die Proteinuntereinheiten sind vermutlich ohne Zugabe eines Detergenz im Dichte-Gradienten nicht voneinander zu trennen. Durch eine Behandlung mit Sarkosyl konnte zumindest teilweise eine Trennung des Apparates erzielt und somit die Lokalisation einzelner Untereinheiten bestimmt werden.

Das SsaC-Protein besitzt eine Sequenzhomologie zu einer Gruppe von äußeren Membranproteinen, den Sekretinen, die für den Transport von Makromolekülen einen Kanal in der äußeren Membran bilden. Für die Bestimmung der Lokalisation des Sekretins des Typ III-Sekretionssystems aus *Y. enterocolitica* YscC wurde die Membranfraktion ebenfalls mit Sarkosyl behandelt. Während auch hier ein kleiner Anteil an YscC durch das Sarkosyl aus den Membranen extrahiert wurde, konnte der größte Anteil an YscC in der sarkosylunlöslichen, äußeren Membranfraktion detektiert werden. Aufgrund der Stabilität des multimeren YscC-Komplexes konnte nach einer Anreicherung die makromolekulare Struktur im Elektronenmikroskop analysiert werden. Dabei konnten ringförmige Partikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 20 nm mit einer zentralen Pore von 5 nm identifiziert werden (Koster et al., 1997). InvG, das YscC-homologe Protein der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1, wurde nach einer Trennung der Membranen über einen Saccharose-Dichte-Gradienten überwiegend in den äußeren Membranfraktionen lokalisiert und in geringen Mengen in einigen Fraktionen der inneren Membranen (Daefler und Russel, 1998). Für das InvG-Oligomer wurde im Elektronenmikroskop ebenfalls eine ringförmige Struktur (∅ 15 nm) mit einer zentralen Pore (∅ 7 nm) beobachtet. Die

hexagonale Symmetrie könnte auf eine Zusammensetzung des InvG-Ringes aus sechs Monomere oder sechs Dimere, die ein Dodecamer bilden, deuten (Crago und Koronakis, 1998).

Das SPI1-Protein InvC besitzt eine signifikante Ähnlichkeit zu einer Familie von Proteinen, die eine Sequenzhomologie mit der katalytischen β-Untereinheit der F_0F_1-ATPase einer Vielzahl von Mikroorganismen aufweist. Darüber hinaus zeigten gereinigte Präparationen von InvC eine signifikante ATPase-Aktivität (Eichelberg et al., 1994). Das homologe Protein YscN aus *Yersinia* spp. besitzt zwei ATP-Bindungsstellen (Walker boxes A und B) und zeigt ebenfalls eine Sequenzähnlichkeit zu der katalytischen Untereinheit der F_0F_1-ATPase und verwandter ATPasen (Woestyn et al., 1994). Für SsaN wird aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu dieser Proteinfamilie ebenfalls die Funktion einer ATPase angenommen. Bei der Membranfraktionierung mit Sarkosyl wurde SsaN in geringen Mengen in der inneren Membranfraktion und zum größten Anteil in der löslichen Fraktion detektiert. Dies unterstützt die vermutete Lokalisation der ATPasen der Typ III-Sekretionssysteme im Zytoplasma bzw. mit der inneren Membran assoziiert.

SsaV kann zu einer Gruppe von inneren Membranproteinen gezählt werden, dessen Sekundärstrukturen innerhalb der verschiedenen Typ III-Sekretionssysteme hoch konserviert sind. Zu dieser Gruppe von Proteinen gehören beispielsweise InvA aus *S. typhimurium* (SPI1), MxiA aus *Shigella* spp. und LcrD aus *Yersinia* spp.. Diese Proteine besitzen einen hydrophoben N-terminalen Bereich, bestehend aus sechs bis acht transmembranen Domänen und einem hydrophilen C-terminalen Bereich, der in das Zytoplasma hineinreicht. Da die N- und C-terminalen Domänen in verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisiert sind, wird angenommen, dass sie auch unterschiedliche Funktionen besitzen. Der Membran-durchspannende Bereich könnte als Verankerung dienen oder einen Kanal bilden, durch den die zu sekretierenden Effektorproteine über die innere Membran transportiert werden. Der C-terminale Bereich könnte spezifische Domänen enthalten, die von einzelnen Komponenten des Sekretionsapparates erkannt werden und Interaktionen mit diesen ermöglichen (Ginocchio und Galan, 1995).

Die subzelluläre Lokalisation der untersuchten Untereinheiten des SPI2-Sekretionsapparates stimmt somit mit der Lokalisation der homologen Proteinuntereinheiten anderer Typ III-Sekretionssysteme überein. Doch nicht nur innerhalb der Typ III-Sekretionssysteme findet man eine Analogie der Lokalisation homologer Proteine, sondern auch zu anderen Systemen, wie z.B. zu dem Flagellen-Biosynthesesystem oder zu dem Typ II-Sekretionssystem existieren strukturelle Ähnlichkeiten. Die meisten inneren Membranproteine des Typ III-Sekretionsapparates besitzen homologe Proteine im Flagellen-Syntheseapparat. So stellt FlhA aus *S.*

typhimurium das homologe Protein zu SsaV dar. FlhA ist am Aufbau des Export-Apparates für das Flagellin beteiligt. Sowohl die Membran-durchspannenden Domänen, als auch die Lokalisation von FlhA in der Zytoplasmamembran konnten nachgewiesen werden (Minamino et al., 1994). FliI zeigt eine Sequenzähnlichkeit zu der katalytischen β-Untereinheit der F_0F_1-ATPase, ist aber den putativen ATPasen der Typ III-Sekretionssysteme ähnlicher (Fan und Macnab, 1996). Während die subzelluläre Lokalisation der ATPasen der Typ III-Sekretionssysteme noch nicht bestimmt wurde, wird aufgrund der Homologie zur löslichen F_1-Komponente der F_0F_1-ATPase eine zytoplasmatische Lokalisation angenommen (Hueck, 1998). Die bisher einzigen Proteine der Typ III-Sekretionssysteme, die in der äußeren Membran identifiziert wurden, sind die Sekretine. Neben der Sekretion von Virulenzproteinen durch das Typ III-Sekretionssystem sind Sekretine z.B. auch an der Sekretion extrazellulärer Enzyme über das Typ II-Sekretionssystem beteiligt (Hueck, 1998). Das äußere Membranprotein PulD des Typ II-Sekretionssystems aus *Klebsiella oxytoca* stellt das homologe Protein zu den Sekretinen der Typ III-Sekretionssysteme dar. Dies zeigt deutlich, dass einige Komponenten der Typ III-Sekretionssysteme hoch konserviert sind und nicht nur innerhalb eines Systems auftreten, sondern auch in funktional unterschiedlichen Systemen vorhanden sind.

2. Bedeutung einzelner SPI2-Proteine für die Synthese und den Aufbau des Sekretionsapparates

Die *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2 setzt sich aus vier Gruppen von Genen zusammen: Als *ssa* werden die Gene bezeichnet, die den Sekretionssystem-Apparat kodieren*, sse* sind die Gene, die die Sekretionssystem-Effektoren kodieren*, ssr* stellen die Gene dar, die den Sekretionssystem-Regulator kodieren und *ssc* kodieren die Sekretionssystem-Chaperone (Hensel et al., 1997). Welchen Einfluss Mutationen in Genen verschiedener SPI2-Gruppen auf die Synthese einzelner Proteine des Sekretionsapparates ausüben, wurde mit Hilfe von Transposon-Mutanten untersucht.

In den Ganzzelllysaten der SPI2-Apparatsmutanten P2D6 (*ssaV*::mTn*5*), P9B6 (*ssaG*::mTn*5*) und der nichtpolaren Mutante NP*ssaV* konnte SsaC in Wildtypmengen nachgewiesen werden. Die Synthese an SsaN und SsaV war jedoch stark bzw. völlig eingeschränkt. Bei den Stämmen P8G12 (*ssrB*::mTn*5*), P7B8 (*ssrA*::mTn*5*) bzw. P3F4 (*ssrA*::mTn*5*) mit Mutationen im Zwei-Komponenten-Regulationssystem SsrAB wurden kein SsaC, SsaN und SsaV detektiert. Die Mutanten mit Tranposon-Insertionen im Sekretionsapparat P7A3 (*ssaD* oder *ssaE*::mTn*5*), P9B7 (*ssaT*::mTn*5*), P11B9 (*ssaB*::mTn*5*), P11C3 (*ssaV*::mTn*5*) und P11D10 (*ssaJ*::mTn*5*) konnten kein oder nur sehr geringe Mengen an SsaC, SsaN und SsaV synthetisieren.

Dies zeigt, dass Mutationen in *ssaV* oder *ssaG* einen weniger drastischen Effekt auf die Synthese von Proteinen des SPI2-Sekretionsapparates haben, als Transposon-Insertionen in anderen Genen des SPI2-Apparates. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass auch die Position der Transposon-Insertion innerhalb des Gens *ssaV* eine entscheidende Rolle spielt, da P2D6 und P11C3, beide mit Transposon-Insertionen in *ssaV*, unterschiedliche phänotypische Effekte zeigen. Dies könnte auf die zwei funktional unterschiedlichen Domänen von SsaV zurückzuführen sein. So wäre es denkbar, dass eine Mutation im Membran-durchspannenden Bereich eine andere Auswirkung auf den Aufbau des Sekretionsapparates hat, als eine Mutation im C-terminalen Bereich.
Bei der Untersuchung von Effekten verschiedener SPI2-Mutationen auf die Sekretion und Proteingehalte von SPI1-Proteinen wurde für das Invasionsprotein SipC der SPI1 der gleiche Effekt beschrieben, wie er hier für SsaC aufgetreten ist. Sowohl in den Kulturüberständen, als auch in Ganzzelllysaten der SPI2-Mutanten P2D6, P9B6 und NP*ssaV* wurden dem Wildtyp vergleichbare Gehalte an SipC nachgewiesen. Stark reduzierte Gehalte an SipC wurden hingegen in den SPI2-Mutanten P8G12, P9B7, P11C3 und P11D10 vorgefunden (Deiwick et al., 1998). Die Transposon-Mutanten P7B8, P3F4, P7A3 und P11B9 wurden hier nicht untersucht.
Die einzige Transposon-Insertion, die bei dieser Untersuchung keinen Einfluss auf die Synthese der Apparatsproteine SsaC, SsaN und SsaV hatte, war die Insertion in *sscA*, dem Gen, das ein Chaperon für ein oder mehrere Effektorproteine kodiert. Alle anderen untersuchten SPI2-Proteine besitzen eine essentielle Funktion im Zusammenbau des Sekretionsapparates. Ein Defekt in einem Apparatsprotein führte dabei immer zu einer verminderten Synthese anderer Apparatsproteine. Dies könnte bedeuten, dass aufgrund eines defekten Sekretionsapparates die Proteine nicht an ihre korrekte Position im Sekretionssystem eingebaut werden können und deshalb die Synthese weiterer Apparatsproteine unterbunden wird.

3. Einfluss des pH-Wertes auf die Synthese von verschiedenen Proteinen des Sekretionsapparates

S. typhimurium ist ein fakultativ intrazellulärer Erreger. Nach dem Eintritt in die Wirtszelle ist *Salmonella* in phagozytischen Vesikeln lokalisiert, in denen sie sich vermehren können. Kurz nach der Aufnahme der Bakterien sinkt der pH-Wert in den *Salmonella*-enthaltenden Phagosomen von pH ≥ 6 auf pH 4-5 ab (Rathman et al., 1996). Ein saurer pH-Wert könnte das intrazelluläre Signal für die SPI2-vermittelte Sekretion darstellen. Dabei ist es durchaus denkbar, dass der niedrige pH-Wert nicht nur die Sekretion von SPI2-Effektoren induziert, sondern auch eine verstärkte Synthese der Proteine des SPI2-Sekretionsapparates

hervorruft. Dies hätte zur Folge, dass aufgrund der größeren Anzahl an synthetisierten Typ III-Sekretionsapparaten die Effektivität der Sekretion noch optimiert wird, um den Stressbedingungen im Phagosom erfolgreich entgegenwirken zu können.
Nach der Untersuchung der Effekte von Mutationen in verschiedenen SPI2-Genen wurde deshalb auch der Einfluss des pH-Wertes auf die Synthese verschiedener Apparatsproteine analysiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass nach einer Absenkung des pH-Wertes auf pH 5,8 die Proteinmengen zu den gemessenen Zeitpunkten zunahmen. Gerade beim Eintritt der Kultur in die stationäre Phase, war eine deutliche Zunahme der Proteinmengen zu erkennen. So wäre es denkbar, dass die Regulation verschiedener SPI2-Gene von dem alternativen Sigma-Faktor RpoS abhängig ist. RpoS reguliert die Expression der *spv*-Gene des *Salmonella* Virulenzplasmids. Die *spv*-Gene werden während der stationären Phase oder bei Nährstoffmangel exprimiert. Eine *rpoS*-Mutante ist gegenüber verschiedenen Stressfaktoren wie z.B. Nährstoffmangel, oxidativen Stress oder auch Säure-Stress wesentlich empfindlicher als der Wildtyp (Fang et al., 1992). Die Absenkung des pH-Wertes auf pH 5,8 wäre hier der zusätzliche Stressfaktor, der für die verstärkte Expression verantwortlich wäre. Dadurch wären die größeren Proteinmengen, die nach der pH-Wert-Verschiebung detektiert wurden, erklärbar. Jedoch konnten bisher keine SPI2-Gene identifiziert werden, die von RpoS reguliert werden. Mit Hilfe von Reportergen-Fusionen wurde die Expression von SPI2-Genen bereits untersucht. Eine Mutation in *rpoS* hatte dabei keinen Einfluss auf die SPI2-Genexpression (Deiwick et al., 1999). Darüber hinaus konnte bei der Analyse der Transkription von *ssaC* durch die Messung der Luc- bzw. β-Galaktosidase-Aktivität eines Reporterstammes nach der Absenkung des pH-Wertes auf pH 5,8 keine verstärkte Expression beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der untersuchten SPI2-Gene nicht von dem alternativen Sigma-Faktor RpoS abhängig ist.
Während Stressfaktoren, wie z.B. Nährstoffmangel, oder der Eintritt der Zellen in die stationäre Phase, die Transkription von RpoS induzieren, wird RpoS auch auf translationaler Ebene reguliert. Dabei spielen kleine, regulatorische RNA-Moleküle eine wichtige Rolle. DsrA, ein nichttranslatiertes RNA-Molekül (87 Nukleotide) ist eines dieser regulatorischen RNA-Moleküle. DsrA bindet spezifische Sequenzen der *rpoS*-mRNA, wodurch die *rpoS*-mRNA-Stabilität und RpoS-Translation verstärkt wird. Niedrige Temperaturen erhöhen dabei die Menge an DsrA (Lease und Belfort, 2000). RprA ist ein weiteres regulatorisches RNA-Molekül (106 Nukleotide), das die Translation von RpoS verstärkt. Somit existieren mindestens zwei kleine RNA-Moleküle, DsrA und RprA, die an der positiven Regulation der RpoS-Translation beteiligt sind (Majdalani et al., 2001). Da die größeren Proteinmengen, die nach der Absenkung des pH-Wertes beobachtet wurden, nicht auf eine verstärkte Transkription zurückzuführen sind, ist es möglich, dass wie bei

dem Sigma-Faktor RpoS eine Riboregulation auf Translationsebene stattfindet. So könnten kleine regulatorische RNA-Moleküle durch RNA-RNA-Interaktionen die Translation einzelner SPI2-Apparatsproteine verstärken, induziert durch eine Absenkung des pH-Wertes. Der pH-Wert könnte auch an einer anderen Stelle die Translation beeinflussen. Es wäre denkbar, dass durch die Ansäuerung des Mediums die Synthese der Ribosomen verstärkt wird und durch die erhöhte Anzahl der Ribosomen dadurch größere Mengen an Protein synthetisiert werden.
Beuzón *et al.* (1999) haben gezeigt, dass die pH-induzierte Sekretion des putativen Translokatorproteins SseB von der *sseB*-Transkription unabhängig ist. Deshalb wird vermutet, dass der Transport von SseB auf die Zelloberfläche von der pH-induzierten Freisetzung synthetisierter SseB-Moleküle, die im Zytosol lokalisiert sind, abhängig ist. Während wenige Minuten nach der Absenkung des pH-Wertes die Sekretion von SseB stattfindet, ist keine Änderung der intrazellulären Mengen an SseB zu beobachten. Im Gegensatz zu den untersuchten Apparatsproteinen SsaC, SsaN und SsaV beeinflußt die pH-Wert-Absenkung die SseB-Produktion scheinbar nicht (Beuzón et al., 1999).

4. Zeitpunkt der pH-induzierten Sekretion und des Aufbaus des Sekretionsapparates

Neben den Analysen zur Synthese einzelner Apparatsproteine wurde auch die Kinetik des Aufbaus des Sekretionsapparates in Abhängigkeit des pH-Wertes untersucht. Da die Sekretion von Effektorproteinen einen vollständig aufgebauten Sekretionsapparat voraussetzt, konnte anhand der Lokalisation des Translokatorproteins SseB auf der Zelloberfäche die Kinetik des Aufbaus des Apparates bestimmt werden. So wurden nach Säure-Induktion Ganzzelllysate und abgetrennte Oberflächenstrukturen auf das Vorhandensein von SseB hin untersucht. 1 h nach der pH-Wert-Verschiebung auf pH 5,8 konnte eine intrazelluläre Akkumulation von SseB beobachtet werden, die Sekretion fand aber zu einem späteren Zeitpunkt statt. Diese Daten stimmen nicht mit den Ergebnissen von Beuzón *et al.* (1999) überein, da hier gezeigt wurde, dass bereits wenige Minuten nach Azidifizierung des Mediums SseB sekretiert wird. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass SseB nicht durch mechanische Scherkräfte, sondern durch das hydrophobe Lösungsmittel n-Hexadecan von der bakteriellen Oberfläche extrahiert wurde. Durch SDS-PAGE-Analysen konnte gezeigt werden, dass durch mechanische Scherkräfte Sse-Proteine wesentlich spezifischer von der Zelloberfläche entfernt werden, als durch Extraktion mit n-Hexadecan (Nikolaus et al., 2001). Somit stellt die Abtrennung von zellassoziierten Strukturen durch mechanische Scherkräfte eine wesentlich schonendere Methode dar. Darüber hinaus wurden die Zellen erst beim Eintritt in die stationäre Phase (OD≈1,0) in

frischem Medium, pH 5,0 aufgenommen. Diese verschiedenen experimentellen Voraussetzungen könnten die Ursache für die unterschiedliche Kinetik der SseB-Sekretion darstellen.

In unserer Arbeitsgruppe wurden Analysen zur Sekretionskinetik von SPI2-Substratproteinen durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien in Minimalmedium mit Mg^{2+}-Mangel bei neutralem pH-Wert angezogen. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600}≈0,3) wurden die Bakterien in frischem Minimalmedium, pH 5,0 aufgenommen und weiter inkubiert. Dabei konnten erst 2 h nach der pH-Wert-Absenkung SseB und SseC in der Abwaschfraktion detektiert werden (Nikolaus et al., 2001). Die Abtrennung der Oberflächenstrukturen erfolgte auch hier durch mechanische Scherkräfte.

Ein weiterer Hinweis, dass die pH-induzierte Sekretion nicht nach einigen Minuten, sondern zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet, liefern Experimente zur Vernetzung von SseB- bzw. SsaC-Untereinheiten nach der pH-Wert-Verschiebung. Dabei konnte neben der Sekretion auch die Ausbildung des Sekretionsapparates beobachtet werden. So konnten für das Translokatorprotein SseB 1 h nach Azidifizierung erste Dimere und eventuelle Tetramere nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt ein funktional intakter Sekretionsapparat vorhanden sein muss. Für SsaC wurden erst nach 2-3 h oligomere Komplexe detektiert. Dies könnte auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Antiseren zurückzuführen sein. Ebenso ist es sehr wahrscheinlich, dass bei den Ganzzelllysaten eine größere Anzahl an SseB-Untereinheiten vorliegt als an SsaC (Abb. 29).

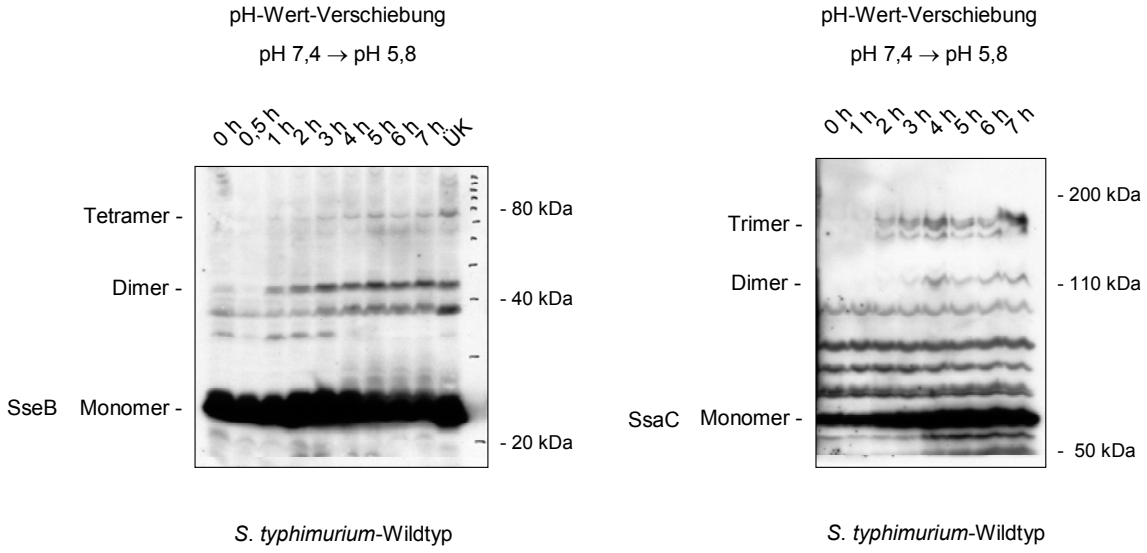


Abb. 29 Kinetik-Analyse der Oligomerisation von SseB und SsaC nach pH-Wert-Verschiebung auf pH 5,8. Für SseB sind nach 1 h, für SsaC sind nach 2-3 h Oligomere detektierbar. Quervernetzer: DSS; 1. Antikörper: anti-SseB bzw. anti-SsaC.

Bei den Untersuchungen zur Kinetik des Aufbaus des Typ III-Sekretionsapparates nach Absenkung des pH-Wertes konnten anhand der Sekretion und Oligomerisation einzelner SPI2-Proteine gezeigt werden, dass mindestens 1 h nach Azidifizierung des Mediums für den kompletten Zusammenbau des Sekretionsapparates benötigt wird.

5. SsaB, ein Effektorprotein oder eine Komponente des Typ III-Sekretionssystem-Apparates?

Die Rolle des SPI2-Proteins SsaB (SpiC) wird bisher kontrovers diskutiert. SsaB ist mit SsaC, SsaD und SsaE innerhalb einer Transkriptionseinheit der SPI2 lokalisiert (Abb. 30).

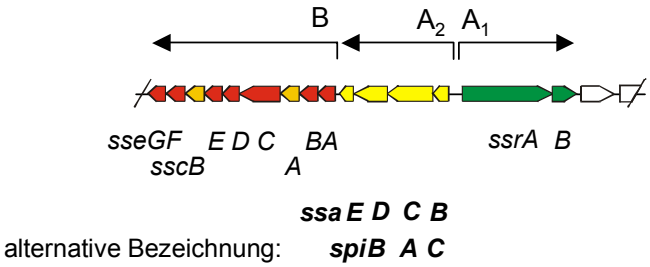


Abb. 30 Transkriptionseinheit *ssaE-B*. Dargestellt ist ein Ausschnitt der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2.

Für SsaB wurde angenommen, dass es sich um eine Komponente des Sekretionsapparates handelt. SsaB zeigt jedoch keine Sequenzähnlichkeit zu den bisher untersuchten Proteinen anderer Typ III-Sekretionssysteme. Uchiya *et al.* (1999) postulierte für SsaB (SpiC) die Funktion eines Effektorproteins des SPI2 Typ III-Sekretionssystems. Durch Immunofluoreszenz-Analysen konnte die Translokation von SsaB in das Zytosol der Makrophagen gezeigt werden (Uchiya et al., 1999). Bei einer genauen Betrachtung ihrer Ergebnisse ist aber der größte Anteil von SsaB mit den internalisierten Bakterien kolokalisiert. SsaB könnte somit auch im Zytoplasma oder in der inneren oder äußeren Membran der intrazellulären Bakterien lokalisiert sein und die Funktion eines Chaperones besitzen bzw. eine strukturelle Komponente des Sekretionssystems darstellen.
Nachdem ein *in vitro*-Modell zur Sekretion von SPI2-Effektorproteinen zur Verfügung stand, konnte die Funktion von SsaB bei der Sekretion untersucht werden. Die *ssaB*-Mutanten P11B9 (*ssaB*::mTn*5*) und EG10128 (*spiC*::*kan*) waren nicht in der Lage, SseB und SseC auf die Zelloberfläche zu sekretieren, obwohl die beiden Translokatorproteine in Wildtyp-Mengen synthetisiert werden. Die *ssaB*-Mutanten zeigten den gleichen Sekretionsdefekt wie die Mutante P7G2 (*ssaC*::mTn*5*), bei der das Sekretin in der äußeren Membran defekt ist. Dies lässt vermuten, dass SsaB eine Komponente des

Sekretionsapparates darstellen könnte, die für die Sekretion dieser Translokatorproteine essentiell ist.

Ein charakteristisches Merkmal von Typ III-Sekretionssystemen ist das Vorhandensein von zytoplasmatischen Chaperonen bzw. Chaperon-ähnlichen Molekülen, die für die Stabilität und Sekretion von Proteinen erforderlich sind. Diese Chaperone besitzen ein niedriges Molekulargewicht (15000-20000), einen niedrigen isoelektrischen Punkt (pI~4,5) und sind meist in direkter bzw. enger Nachbarschaft zu den sekretierten Proteinen kodiert (Wattiau et al., 1996). So könnte SsaB mit einer molekularen Masse von 14,7 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 5,29 ein Chaperon für ein oder mehrere Effektorproteine darstellen. Auch die zytoplasmatische Lokalisation von SsaB, fusioniert mit einem M45-Epitop, konnte durch eine Membranfraktionierung nachgewiesen werden. Da *ssaB* innerhalb der Pathogenitätsinsel unmittelbar neben *ssaC* lokalisiert ist, wäre für SsaB auch eine Chaperon-Funktion für das Sekretin-bildende Protein denkbar. SsaC besitzt eine sekretorische Signalsequenz und wird vermutlich über den generellen Sekretionsweg (GSP) in die äußere Membran exportiert. Als ein GSP-spezifisches Chaperon könnte SsaB für den Transport von SsaC in die zytoplasmatische Membran verantwortlich sein und einzelne synthetisierte, zytosolische SsaC-Moleküle vor Aggregation und vorzeitiger Faltung schützen (Pugsley, 1993). Da in einem Ganzzelllysat von P11B9 (*ssaB*::mTn*5*) kein SsaC detektiert wurde (Abb. 31) führt das Fehlen des Chaperones vermutlich zu einer vorzeitigen Degradation des sekretorischen Proteins.

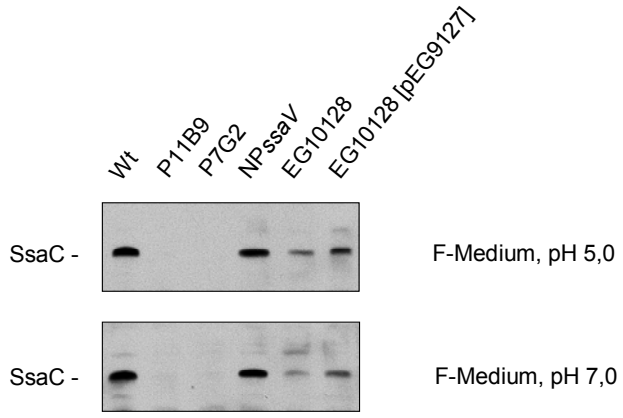


Abb. 31 SsaB, ein GSP-spezifisches Chaperon für SsaC? In dem Ganzzelllysat von P11B9 (*ssaB*::mTn*5*) konnte kein SsaC detektiert werden, sowohl unter SPI2-exprimierenden (F-Medium, pH 7,0) als auch unter sekretierenden Bedingungen (F-Medium, pH 5,0). EG10128 (*spiC*::*kan*) und EG10128 [pEG9127] zeigen verminderte Mengen an SsaC.

Eine weitere Ursache für den Sekretionsdefekt der *ssaB*-Mutanten könnte sein, dass SsaB eine essentielle Funktion bei dem Einbau von SsaC in die äußere Membran besitzt. Für das

SPI1-homologe Sekretin InvG konnte nachgewiesen werden, dass InvH, ein Lipoprotein (Monomer 15 kDa), das ebenfalls in der äußeren Membran lokalisiert ist, für die korrekte Lokalisation von InvG in der äußeren Membran verantwortlich ist. Dabei bilden InvG und InvH möglicherweise einen stabilen, multimeren Komplex (Crago und Koronakis, 1998). Für das Sekretin PulD des Typ II-Sekretionssystems von *Klebsiella oxytoca* existiert ebenfalls ein in der äußeren Membran verankertes Lipoprotein, PulS, das für die Lokalisation von PulD und zusätzlich auch für dessen Stabilisierung erforderlich ist (Hardie et al., 1996). Im Gegensatz zu InvG-InvH konnte ein stabiler Komplex aus PulD und PulS isoliert werden, der sich von den bisher analysierten Sekretinen stark unterscheidet. Zu der ringförmigen Struktur mit einer zentralen Pore, besitz der PulD-PulS Komplex radial angeordnete Strukturen, die als Speichen bezeichnet werden (Nouwen et al., 1999). Während die Aminosäure-Sequenz von PulD 22% identisch zu InvG ist, konnte zwischen PulS und InvH keine Sequenzhomologie gefunden werden. Auch VirG, ein Lipoprotein aus *Yersinia enterocolitica* mit analoger Funktion zu PulS (Koster et al., 1997) besitzt keine Sequenzhomologie zu PulS oder InvH. Obwohl die kleinen Lipoproteine keine strukturell homologe Gruppe bilden, so scheint der Mechanismus der korrekten Lokalisation der Sekretine, in Abhängigkeit der Lipoproteine innerhalb der verschiedenen Sekretionssysteme ähnlich zu sein. Für SsaB wäre eine solche Funktion denkbar, doch wären weitere Analysen notwendig, wie z.B. die Bestimmung der Lokalisation von SsaC in Abhängigkeit von SsaB und der Nachweis von SsaB in der äußeren Membran. SsaB, fusioniert mit einem M45-Epitop, konnte nur in der löslichen Fraktion nach einer Zellfraktionierung identifiziert werden. Auch wenn *ssaB*$^-$ durch das plasmidkodierte *ssaB*-M45 komplementiert werden konnte, ist jedoch nicht auszuschließen, dass der korrekte Einbau von SsaB in die Membran durch das Epitop beeinflusst wird. Des weiteren könnte durch eine Sequenzanalyse SsaB auf das Vorhandensein einer Lipoprotein-spezifischen Signalsequenz hin untersucht werden.

6. Identifikation multimerer Komplexe durch Vernetzungsexperimente

Zur Untersuchung der räumlichen Nähe von Proteinen innerhalb des Typ III-Sekretionsapparates wurde der membranpermeable Quervernetzer DSS (Disuccinimidyl suberate) eingesetzt. Dabei wurde untersucht, ob für das Sekretin-bildende Protein SsaC und für das putative Translokatorprotein SseD oligomere Komplexe nachgewiesen werden können.

Mit dem Quervernetzer DSS konnten für SsaC neben dem Monomer (54 kDa) mögliche Dimere (110 kDa) und Trimere (ca. 160 kDa) identifiziert werden. Da im Bereich von

160 kDa mehrere Banden auftraten, wurde untersucht, ob es sich hier um heterooligomere Komplexe, z.B. aus SsaC und SseB oder SsaC und SseD handelt. Dies konnte jedoch ausgeschlossen werden, da in diesem Molekulargewichtsbereich keinerlei Vernetzungsprodukte mit SseB bzw. SseD detektiert werden konnten. Unter nicht-sekretierenden Bedingungen war nur das Monomer detektierbar.
Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit verschiedene STM-Mutanten und die Apparatsmutante NP*ssaV* oligomere Komplexe aus SsaC bilden können. Nur P2D6 (*ssaV*::mTn*5*), P10E11 (*sscA*::mTn*5*) und die nichtpolare Mutante NP*ssaV* besaßen die Fähigkeit, oligomere Strukturen zu bilden. Im Gegensatz dazu konnte bei der Mutante P9B6 (*ssaG*::mTn*5*) nur das Monomer nahezu in Wildtyp-Mengen, aber keine Dimere und eventuell Trimere detektiert werden. Während hier die Synthese von SsaC unbeeinflusst ist, ist diese Mutante jedoch nicht mehr in der Lage, das Sekretin zu bilden. SsaC besitzt eine N-terminale Signalsequenz und wird vermutlich über den generellen Sekretionsweg in die äußere Membran transportiert. SsaG scheint dabei eine essentielle Funktion bei der Lokalisation von SsaC in die äußere Membran bzw. bei der Stabilisierung der multimeren Form von SsaC zu besitzen. Auch bei der Membranfraktionierung mit N-Lauroyl-Sarcosin konnte beobachtet werden, dass bei der Mutante P9B6 (*ssaG*::mTn*5*) im Vergleich zu *S. typhimurium*-Wildtyp geringere Mengen an SsaC in der äußeren Membranfraktion und dafür mehr SsaC in der inneren Membranfraktion enthalten waren.
Kürzlich konnten zwei weitere Effektorproteine des Typ III-Sekretionssystems auf der Zelloberfläche identifiziert werden, und zwar SseC und SseD (Nikolaus et al., 2001). Zusammen mit SseB bilden sie vermutlich nach der Sekretion einen heterooligomeren Komplex auf der Zelloberfläche aus, der die Translokation von SPI2-Effektorproteinen vermittelt. Auch für SseD konnten mit dem Quervernetzer DSS multimere Komplexe nachgewiesen werden. Da in einem *sseB*-negativen Hintergrund SseD hauptsächlich in den Kulturüberstand sekretiert wird und nur sehr geringe Mengen auf der Zelloberfläche assoziiert sind (Nikolaus et al., 2001), konnten auch hier nur geringe Mengen des 42 kDa-Vernetzungsproduktes detektiert werden. Darüber hinaus sind auch die synthetisierten Mengen des SseD-Monomers bei fehlendem SseB wesentlich geringer als beim Wildtyp. Auch ein Defekt in *sseC* führt zu stark eingeschränkten Mengen an SseD auf der Zelloberfläche. Jedoch konnte hier keine Zunahme an SseD im Überstand nachgewiesen werden (Nikolaus et al., 2001). Möglicherweise führt diese Mutation zu einem Sekretionsdefekt bzw. zu einer stark verminderten Synthese von SseD. Dadurch war auch hier die Bildung oligomerer Komplexe gegenüber dem Wildtyp deutlich geringer.

Durch Vernetzungsexperimente wurden in unserer Arbeitsgruppe auch für SseB oligomere Komplexe nachgewiesen. Dabei wurde der nicht-membranpermeable Quervernetzer BS^3 [Bis(sulfosuccinimidyl)suberate], der überwiegend mit Strukturen der Zelloberfläche

reagiert, und der membranpermeable Quervernetzer DSS eingesetzt. Nach der Vernetzung von Bakterien mit BS^3, die unter SPI2-induzierenden Bedingungen bei neutralem pH-Wert angezogen wurden, konnte im Western-Blot nur das Monomer von SseB (21 kDa) detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte in Lysaten von Bakterien, die unter sekretierenden Bedingungen gewachsen sind, ein Vernetzungsprodukt von SseB bei ca. 43 kDa identifiziert werden. Da in einem *sseC*- bzw. *sseD*-negativen Hintergrund das 43 kDa-Produkt ebenfalls zu beobachten war, kann angenommen werden, dass das Vernetzungsprodukt höchstwahrscheinlich ein Dimer sekretierter SseB-Untereinheiten darstellt. Bei der Verwendung des membranpermeablen Quervernetzers DSS konnte neben dem 43 kDa-Produkt ein weiteres Produkt bei ca. 34 kDa identifiziert werden, das jedoch nur bei Bakterien, die bei pH 7,4 gewachsen waren, aufgetreten ist. Dabei könnte es sich um ein Produkt aus SseB und einem spezifischen, zytoplasmatischen Chaperon handeln.
SseB hat eine Sequenz-Ähnlichkeit (25% Identität/47% Ähnlichkeit) zu EspA aus enteropathogenen *E. coli* (EPEC) und stellt möglicherweise das homologe Protein dar. EspA ist an der Ausbildung filamentöser Anhängsel beteiligt. Für die EspA-enthaltenden Strukturen auf der Zelloberfläche von Shigatoxin-produzierenden *E. coli*-Stämmen (STEC) konnten EspA-Multimere bereits identifiziert werden. Dabei wurden mit einem STEC-Stamm infizierte HeLa-Zellen mit dem Membran-impermeablen Quervernetzer BS^3 inkubiert und anschließend im Immunoblot analysiert. Für EspA konnten Banden detektiert werden, die bei den erwarteten Molekulargewichten für EspA-Dimere, Trimere und Tetramere auftraten. Zusätzliche Banden mit höherem Molekulargewicht sind höchstwahrscheinlich auf das Vorhandensein noch größerer EspA-Oligomere zurückzuführen (Ebel at al., 1998). Filamentöse Oberflächenstrukturen, zusammengesetzt aus Komponenten, die über das Typ III-Sekretionssystem sekretiert werden, wurden auch während des Infektionsverlaufs von *Pseudomonas syringae* beobachtet (Roine et al., 1997). Die Bildung solcher Strukturen auf der Zelloberfläche könnte somit ein gemeinsames Merkmal tier- und pflanzenpathogener Bakterien, die ein Typ III-Sekretionssystem besitzen, darstellen.

7. Isolierung von Nadel-Komplexen

Neben der Identifizierung von intra- und extrazellulären Proteinkomplexen innerhalb des Sekretionsapparates war es für die weitere morphologische Untersuchung von großem Interesse, den gesamten Sekretionsapparat aus *S. typhimurium* zu isolieren und elektronenmikroskopisch zu analysieren.
In dieser Arbeit wurden Nadel-Komplexe aus *S. typhimurium* isoliert. Diese konnten jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. *S. typhimurium* besitzt zwei strukturell ähnliche

Typ III-Sekretionssysteme. Die Expression der Typ III-Sekretionssysteme durch SPI1 und SPI2 wird durch unterschiedliche Bedingungen induziert. Unter Medienbedingungen, die die Genexpression der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2 induziert, konnte keine signifikante Expression von SPI1-Genen beobachtet werden (Deiwick et al., 1999). Im Gegensatz dazu induzieren hohe Osmolarität und Sauerstoff-Limitierung die SPI1-Genexpression (Bajaj et al., 1996), jedoch nicht die SPI2-Genexpression. Aufgrund dieser inversen Regulation der Expression der SPI1- und SPI2-Gene (Deiwick et al., 1999) wurde davon ausgegangen, dass bei der Isolierung der Komplexe aus *S. typhimurium*-Kulturen, die unter SPI2-induzierenden Bedingungen angezogen wurden, wenig SPI1-Apparate enthalten sind. Ob es sich bei den Komplexen, die aus *S. typhimurium*-Wildtyp, jedoch nicht aus der SPI1-Mutanten isoliert werden konnten, möglicherweise um SPI1-Apparate handelt, ist fraglich. Dies würde bedeuten, dass trotz der SPI2-induzierenden Bedingungen eine geringe Expression der SPI1-Gene stattfinden muss und einige Sekretionsapparate synthetisiert werden. Zu berücksichtigen ist hier jedoch, dass bei den Untersuchungen zur inversen Regulation als SPI2-induzierende Bedingungen nur Mg^{2+}-Mangel (8 µM) untersucht wurde. Die Kulturen für die Isolierung der Nadel-Komplexe wurden jedoch unter Phosphatmangel angezogen. Möglicherweise übt Phosphatmangel einen anderen Effekt auf die Expression der SPI1-Gene aus als Mg^{2+}-Mangel.

Eine weitere Ursache, warum in der Präparation der SPI1-Mutanten keine Nadel-Komplexe identifiziert werden konnten, wäre, dass die Mutation in *invG* einen Effekt auf die Expression der SPI2-Gene ausübt. Analysen zu Reporter-Fusionen verschiedener SPI1-Gene haben gezeigt, dass einige SPI2-Mutationen die Expression von SPI1-Genen beeinflussen (Deiwick et al., 1998). Dabei zeigen einige Mutanten mit Transposon-Insertionen in verschiedenen SPI2-Genen, die Komponenten des Sekretionsapparates (P11C3, P11D10 und P9B7) oder des Zwei-Komponenten-Regulationssytems (P8G12) kodieren, eine reduzierte Expression der Reporter-Fusion von *prgK* (Deiwick et al., 1998). *PrgK* kodiert eine Komponente des SPI1-Nadel-Komplexes. Da jedoch die SPI1-Mutante in der Lage war, das Translokatorprotein SseB auf die Zelloberfläche zu sekretieren, konnte von einem funktional intakten SPI2-Sekretionsapparat ausgegangen werden. Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, dass durch die Mutation in *invG* eine Instabilität des SPI2-Komplexes verursacht wird und deshalb keine Nadel-Komplexe isoliert werden konnten.

Bei *S. typhimurium* (SPI1) und *S. flexneri* konnten bis zu 100 Nadel-Komplexe pro Zelle nachgewiesen werden. Werden in *S. typhimurium* ebensoviele SPI2-kodierte Sekretionsapparate synthetisiert? Mit Hilfe eines Fluoreszein-markierten Antikörpers gegen SseB wurde die Lokalisation von SseB auf der Zelloberfläche nach Sekretion analysiert (Nikolaus et al., 2001). SseB konnte nur bei einigen Bakterien lokalisiert werden. Dabei waren SseB-enthaltende Strukturen nicht gleichmäßig über die ganze

bakterielle Oberfläche verteilt, sondern überwiegend an einem Pol der Zelle inseriert. Falls *S. typhimurium* nur einen oder wenige SPI2-kodierte Sekretionsapparate pro Zelle besitzt, wäre dies eine Erklärung, warum keine Nadel-Komplexe in der Präparation der SPI1-Mutanten identifiziert werden konnten.

Bei einem Vergleich der isolierten Nadel-Komplexe zu den Komplexen aus *S. typhimurium* (SPI1) und *Shigella flexneri* ist sowohl der strukturelle Aufbau als auch die Größe der einzelnen Komponenten sehr ähnlich (Abb. 32). Der Basalkörper, bestehend aus den inneren und äußeren Ringen, ist bei den drei isolierten Komplexen 30-31,6 nm lang. Die Nadel hat eine Länge von 45-50 nm. Die Breite der inneren Ringe beträgt 22-27 nm, die der äußeren 15-16 nm. Da sich die isolierten Nadel-Komplexe in ihrem strukturellen Aufbau und in der Größe der verschiedenen Komponenten nicht signifikant von den SPI1-Apparaten unterscheiden, konnten auch auf diese Weise die angereicherten Komplexe nicht eindeutig identifiziert werden.

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass die angewandte Methode zur Isolierung des gesamten SPI2-Sekretionsapparates möglicherweise ungeeignet ist. Die Sekretionsapparate aus enteropathogenen *E. coli*, kodiert von der chromosomalen Pathogenitätsinsel LEE („locus for enterocyte effacement), konnten bisher ebenfalls nicht isoliert werden. Dies zeigt, dass Typ III-Sekretionssysteme sehr spezifische biochemische Eigenschaften besitzen, die bei einer Isolierung und Anreicherung der Sekretionsapparate berücksichtigt werden müssen. Darum ist es gerade hier von besonderer Bedeutung, weitere Daten über die strukturellen und biochemischen Eigenschaften der SPI2-Sekretionsapparate zu gewinnen.

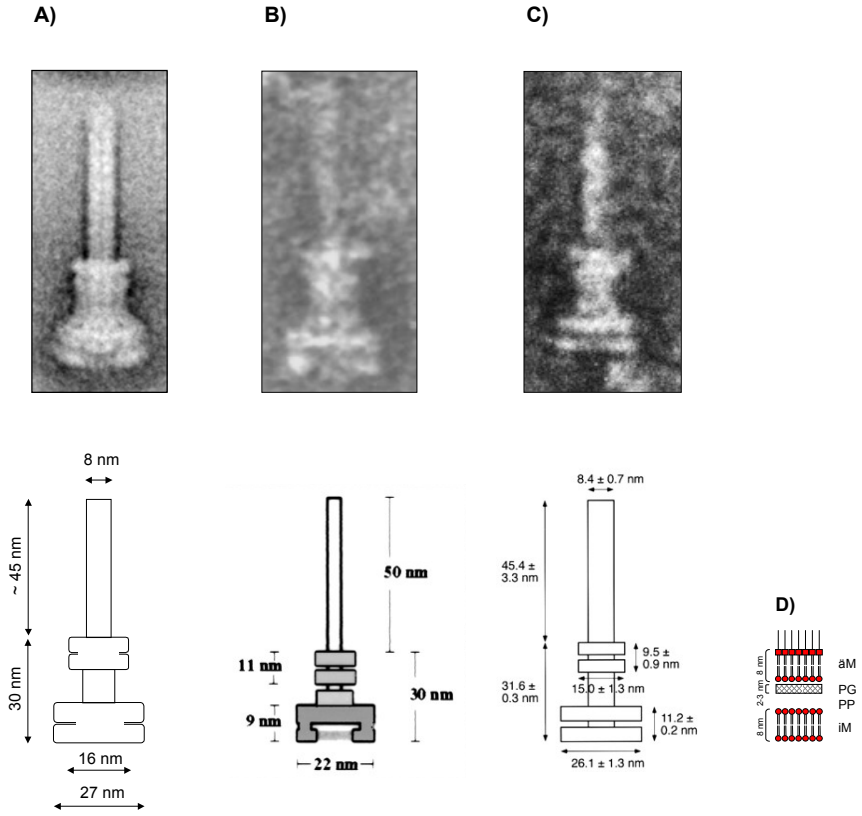


Abb. 32 Vergleich der Nadel-Komplexe aus *S. typhimurium* und *Shigella flexneri*. **A)** Gemittelter Nadel-Komplex der aus *S. typhimurium* isolierten Komplexe. **B)** Nadel-Komplex aus *S. typhimurium* kodiert von der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 (Kimbrough und Miller, 2000). **C)** Nadel-Komplex aus *Shigella flexneri* (Tamano et al., 2000). **D)** Zum Vergleich ist die Größe einer Zellwand eines Gram-negativen Bakteriums angegeben. ÄM: äußere Membran, PG: Peptidoglykanschicht, PP: Periplasma, iM: innere Membran.

8. Modell zur Struktur und zum Aufbau des Typ III-Sekretionsapparates

Aus den hier gewonnenen Daten, verbunden mit den Sequenz-Ähnlichkeiten einzelner Proteinuntereinheiten zu Komponenten anderer Typ III-Sekretionssysteme kann folgendes Modell zur Struktur und zum Aufbau des Sekretionsapparates aufgestellt werden:

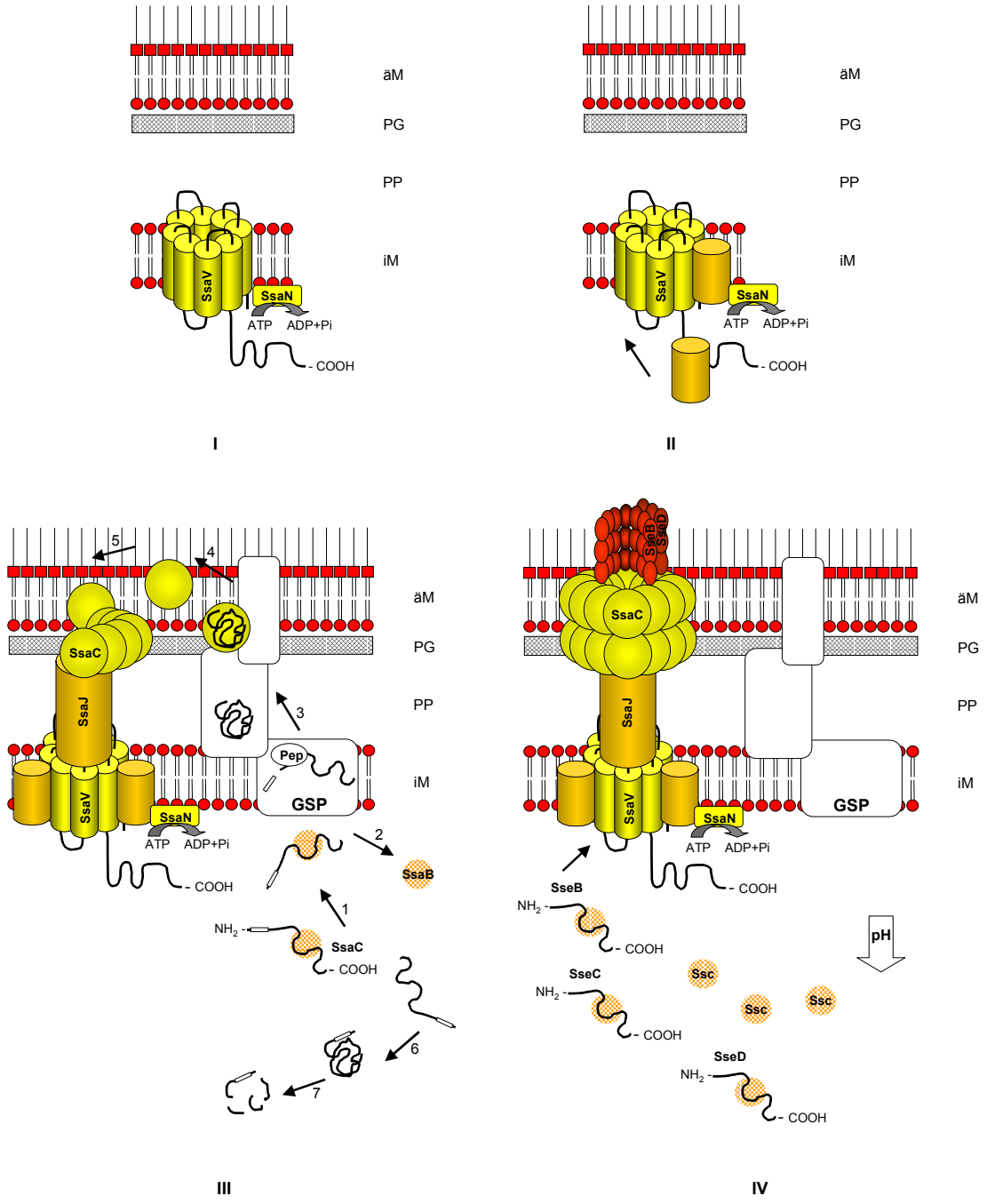


Abb. 33 Modell zur Struktur und zum Aufbau des Sekretionsapparates. **I.** SsaV, ein inneres Membranprotein zur Verankerung des Sekretionsapparates bzw. ein Kanal-bildendes Protein. **II.** Einbau einzelner Komponenten des Sekretionsapparates nach Erkennung und Interaktion mit spezifischen Domänen des C-terminalen Bereiches von SsaV. **III.** Einbau von SsaC in die äußere Membran über den generellen Sekretionsweg (1-5), möglicherweise ausgelöst durch eine Absenkung des pH-Wertes. Vorzeitige Faltung (6) und Degradation des Proteins (7) bei fehlendem Chaperon SsaB. **IV.** pH-induzierte Sekretion von Effektorproteinen und Aufbau einer heterooligomeren Translokatorstruktur. ÄM: äußere Membran, PG: Peptidoglykanschicht, PP: Periplasma, iM: innere Membran, GSP: genereller Sekretionsweg, Pep: Peptidase.

Die transmembranen Domänen von SsaV könnten einen Kanal in der inneren Membran bilden (I), oder auch eine Verankerung für den Sekretionsapparat darstellen. Die einzelnen Proteinuntereinheiten, die den Sekretionsapparat aufbauen, erkennen spezifische Domänen des C-terminalen Bereiches von SsaV, interagieren mit diesen und werden an ihre Zielposition transportiert. Die Energie liefert dabei die membranassoziierte ATPase SsaN (II). SsaC besitzt eine N-terminale Signalsequenz und wird über den generellen Sekretionsweg (GSP) in die äußere Membran exportiert. Die einzelnen SsaC-Untereinheiten oligomerisieren und bilden das Sekretin (III, 1-5). Während des Transportes über die Zytoplasmamembran wird die Signalsequenz von einer Peptidase (Pep) abgespalten (III, 3). SsaB stellt das GSP-spezifische Chaperon für SsaC dar. Bei Fehlen des Chaperones kommt es zur vorzeitigen Faltung von SsaC, die eine Degradation des Proteins zur Folge hat (III, 6-7). Nach dem Aufbau des Sekretionsapparates in der inneren und äußeren Membran folgt die Sekretion der Substratproteine SseB, SseC und SseD auf die Zelloberfläche. Da sowohl für SseB, als auch für SseD oligomere Komplexe identifiziert wurden, ist anzunehmen, dass SseB und SseD an der Ausbildung einer heterooligomeren Translokatorstruktur beteiligt sind (IV). Ein saurer pH-Wert induziert sowohl die Sekretion als auch eine verstärkte Synthese von Proteinen des Sekretionsapparates. Aufgrund der beobachteten Sekretions- und Oligomerisationskinetik einzelner SPI2-Proteine nach einer Absenkung des pH-Wertes, wird vermutlich für den vollständigen Aufbau des Sekretionsapparates mindestens 1 h nach Azidifizierung benötigt.

9. Ausblick

In dieser Arbeit wurden grundlegende Analysen zur Struktur und zum Aufbau des Typ III-Sekretionssystems durchgeführt. Für eine weiterführende proteinbiochemische Charakterisierung der strukturellen Komponenten des Sektretionssystems ist es sicherlich notwendig, weitere Antikörper gegen einzelne Apparatsproteine zu erzeugen. Dadurch können die subzelluläre Lokalisation weiterer Proteine bestimmt, sowie weitere mögliche Proteinkomplexe innerhalb des Sekretionsapparates identifiziert werden. Diese Daten würden einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der komplexen Topolgie des Sekretionsapparates liefern.

Im Mittelpunkt weiterer Analysen wird die Isolierung der sogenannten Nadel-Komplexe stehen. Zunächst müssen weitere Methoden zur Isolierung und Anreicherung der Komplexe getestet werden. Zur Identifikation der Nadel-Komplexe können Immunogold-markierte Antikörper, z.B. gegen die Hauptkomponente der Translokatorstruktur auf der Zelloberfläche eingesetzt werden. Die einzelnen Proteinuntereinheiten der Nadel-

Komplexe können über eine 2D-GE einer angereicherten Fraktion getrennt werden. Nach einer Zuordnung der detektierten Proteine mit der erstellten SPI2-Proteinkarte werden die einzelnen Komponenten der Nadel-Komplexe identifiziert.
Der pH-Wert spielt nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Sekretion von SPI2-Effektorproteinen, sondern beeinflusst auch die Synthese von Proteinen des SPI2-Sekretionsapparates. Deshalb ist eine weitere wichtige Fragestellung, an welcher Stelle der pH-Wert bei der Synthese der SPI2-Apparatsproteine wirkt, bzw. inwieweit einzelne Komponenten des SPI2-Typ III-Sekretionssystems vom pH-Wert reguliert werden. Arbeiten dazu sind für das Verständnis der Funktionsweise des SPI2-Typ III-Sekretionssystems von großer Bedeutung und werden der Schwerpunkt weiterer Untersuchungen sein.

V. Zusammenfassung

Zur Strukturanalyse des Typ III-Sekretionssystems, kodiert von der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2, wurden polyklonale Antikörper gegen rekombinante Proteine des Sekretionsapparates erzeugt. Zur Entfernung unspezifischer Bindungen wurden die polyklonalen Antiseren an eine CNBr-aktivierte Sepharose 4B, gekoppelt mit *Salmonella*-Lysaten, präadsorbiert. Anschließend konnten die Antiseren für verschiedene Immunoblotanalysen eingesetzt werden.

Durch eine Membranfraktionierung mit N-Lauroyl-Sarcosin konnte die subzelluläre Lokalisation der Apparatsproteine SsaC, SsaN, SsaV und SsaB bestimmt werden. Dabei wurde SsaC in der äußeren, SsaN und SsaV in der inneren Membranfraktion nachgewiesen. SsaB war nur in der löslichen Fraktion detektierbar. Um mögliche Proteinkomplexe innerhalb des Sekretionsapparates zu identifizieren, wurde der membranpermeable Quervernetzer DSS eingesetzt. So konnten für das Sekretin-bildende Protein SsaC und für das putative Translokatorprotein SseD oligomere Strukturen nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der Effekte von Mutationen in verschiedenen SPI2-Genen auf die Synthese einzelner Proteine des Sekretionsapparates wurde deutlich, dass das Zwei-Komponenten-Regulationssystem SsrAB sowie alle untersuchten Apparatsproteine eine essentielle Rolle in der Synthese bzw. im Aufbau des Sekretionsapparates spielen. Lediglich eine Mutation in *ssaV* oder *ssaG* hatte einen weniger starken Effekt auf die Synthese der Apparatsproteine, so dass SsaC in Wildtyp-Mengen detektiert werden konnte. Darüber hinaus wurde die Synthese einzelner Proteine des Sekretionsapparates auch in Abhängigkeit des pH-Wertes analysiert. Nach einer Absenkung des pH-Wertes auf pH 5,8 nahmen die Proteinmengen weitaus stärker zu als ohne pH-Wert-Veränderung. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass dieser Unterschied in den synthetisierten Proteinmengen, in Abhängigkeit des pH-Wertes, nicht auf eine verstärkte Transkription zurückzuführen ist und dass es sich um einen SPI2-spezifischen Effekt handelt.

Die Kinetik des Aufbaus des Sekretionsapparates wurde anhand der Sekretion des putativen Translokatorproteins SseB bestimmt. 1 h nach der Absenkung des pH-Wertes auf pH 5,8 wurde eine intrazelluläre Akkumulation von SseB detektiert. Zu diesem Zeitpunkt konnte kein SseB auf der Zelloberfläche lokalisiert werden. Eine Sekretion von SseB wurde erst 3 h nach der Säure-Induktion beobachtet. Demzufolge muss der Sekretionsapparat in diesem Zeitraum vollständig aufgebaut und funktional intakt sein, um die pH-induzierte Sekretion zu ermöglichen.

Das SPI2-Protein SsaB (SpiC) ist für die Sekretion der putativen Translokatorproteine SseB und SseC erforderlich. So könnte SsaB eine Komponente des Typ III-Sekretionsapparates darstellen oder die Funktion eines Chaperones für die Effektorproteine, bzw. eines GSP-spezifischen Chaperones für das Sekretin-bildende Protein SsaC besitzen. Ebenso wäre es möglich, dass SsaB für die korrekte Lokalisation von SsaC in der äußeren Membran verantwortlich ist.

Aus *S. typhimurium* konnten die als Nadel-Komplexe bezeichneten makromolekularen Strukturen, die den gesamten Sekretionsapparat darstellen, isoliert aber nicht eindeutig identifiziert werden. Da in einer SPI1-Mutante, die einen Defekt im Typ III-Sekretionsapparat hat, keine Nadel-Komplexe mehr angereichert werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Nadel-Komplexen, isoliert aus *S. typhimurium*-Wildtyp, um die SPI1-Strukturen handelt.

VI. Literaturverzeichnis

Adam, T., Arpin, M., Prevost, M.C., Gounon, P. and Sansonetti, P.J. (1995) Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J Cell Biol* **129**: 367-81.

Allaoui, A., Sansonetti, P.J. and Parsot, C. (1992) MxiJ, a lipoprotein involved in secretion of *Shigella* Ipa invasins, is homologous to YscJ, a secretion factor of the *Yersinia* Yop proteins. *J Bacteriol* **174**: 7661-9.

Allaoui, A., Woestyn, S., Sluiters, C. and Cornelis, G.R. (1994) YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J Bacteriol* **176**: 4534-42.

Andersson, K., Carballeira, N., Magnusson, K.E., Persson, C., Stendahl, O., Wolf-Watz, H. and Fallman, M. (1996) YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. *Mol Microbiol* **20**: 1057-69.

Bajaj, V., Lucas, R.L., Hwang, C. and Lee, C.A. (1996) Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol* **22**: 703-14.

Benjelloun-Touimi, Z., Sansonetti, P.J. and Parsot, C. (1995) SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol Microbiol* **17**: 123-35.

Beuzón, C.R., Banks, G., Deiwick, J., Hensel, M. and Holden, D.W. (1999) pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **33**: 806-16.

Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C. and Sansonetti, P. (1999) The tripartite type III secreton of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* **147**: 683-93.

Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P. and Allaoui, A. (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secreton. *Mol Microbiol* **39**: 652-63.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.

Cover, T.L., Tummuru, M.K., Cao, P., Thompson, S.A. and Blaser, M.J. (1994) Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* **269**: 10566-73.

Crago, A.M., Koronakis, V. (1998) *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Mol Microbiol* **30**: 47-56.

Daefler, S., Russel, M. (1998) The *Salmonella typhimurium* InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG. *Mol Microbiol* **28**: 1367-80.

Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S. and Hensel, M. (1999) Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* **31**: 1759-73.

Deiwick, J., Nikolaus, T., Shea, J.E., Gleeson, C., Holden, D.W. and Hensel, M. (1998) Mutations in *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI2) genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to antimicrobial agents. *J Bacteriol* **180**: 4775-80.

Ebel, F., Podzadel, T., Rohde, M., Kresse, A.U., Kramer, S., Deibel, C., Guzman, C.A. and Chakraborty, T. (1998) Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. *Mol Microbiol* **30**: 147-61.

Eichelberg, K., Ginocchio, C.C. and Galan, J.E. (1994) Molecular and functional characterization of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: homology of InvC to the F0F1 ATPase family of proteins. *J Bacteriol* **176**: 4501-10.

Fan, F., Macnab, R.M. (1996) Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **271**: 31981-8.

Fang, F.C., Libby, S.J., Buchmeier, N.A., Loewen, P.C., Switala, J., Harwood, J. and Guiney, D.G. (1992) The alternative sigma factor katF (rpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11978-82.

Fields, K.A., Plano, G.V. and Straley, S.C. (1994) A low-Ca2+ response (LCR) secretion (ysc) locus lies within the lcrB region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **176**: 569-79.

Filip, C., Fletcher, G., Wulff, J.L. and Earhart, C.F. (1973) Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *J Bacteriol* **115**: 717-22.

Finlay, B.B., Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 136-69.

Galan, J.E. (1996) Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol* **20**: 263-71.

Garcia Vescovi, E., Soncini, F.C. and Groisman, E.A. (1996) Mg2+ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* **84**: 165-74.

Genin, S., Boucher, C.A. (1994) A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N- terminal domain. *Mol Gen Genet* **243**: 112-8.

Ginocchio, C.C., Galan, J.E. (1995) Functional conservation among members of the *Salmonella typhimurium* InvA family of proteins. *Infect Immun* **63**: 729-32.

Groisman, E.A., Ochman, H. (1997) How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* **5**: 343-9.

Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I. and Tschape, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**: 1089-97.

Hardie, K.R., Lory, S. and Pugsley, A.P. (1996) Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J* **15**: 978-88.

Hensel, M., Shea, J.E., Raupach, B., Monack, D., Falkow, S., Gleeson, C., Kubo, T. and Holden, D.W. (1997) Functional analysis of *ssaJ* and the *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Mol Microbiol* **24**: 155-67.

Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S.R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F.C. and Holden, D.W. (1998) Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* **30**: 163-74.

Heukeshoven, J., Dernick, R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**: 28-32.

Hoiczyk, E., Blobel, G. (2001) Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4669-74.

Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.

Kimbrough, T.G., Miller, S.I. (2000) Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11008-13.

Kingsley, R.A., Bäumler, A.J. (2000) Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. *Mol Microbiol* **36**: 1006-14.

Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M.J., Nisan, I., Neves, B.C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G. and Frankel, G. (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* **17**: 2166-76.

Koster, M., Bitter, W., de Cock, H., Allaoui, A., Cornelis, G.R. and Tommassen, J. (1997) The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* **26**: 789-97.

Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E. and Aizawa, S.I. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-5.

Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.I. and Galan, J.E. (2000) Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10225-30.

Kyhse-Andersen, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**: 203-9.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.

Lease, R.A., Belfort, M. (2000) Riboregulation by DsrA RNA: trans-actions for global economy. *Mol Microbiol* **38**: 667-72.

Lee, A.K., Detweiler, C.S. and Falkow, S. (2000) OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* **182**: 771-81.

Lee, C., Levin, A. and Branton, D. (1987) Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **166**: 308-12.

Lloyd, S.A., Norman, M., Rosqvist, R. and Wolf-Watz, H. (2001) *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol Microbiol* **39**: 520-31.

Lucas, R.L., Lee, C.A. (2000) Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **36**: 1024-33.

Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., St John, K. and Gottesman, S. (2001) Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol* **39**: 1382-94.

Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L. and Tolbert, N.E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**: 206-10.

Medina, E., Paglia, P., Nikolaus, T., Müller, A., Hensel, M. and Guzman, C.A. (1999) Pathogenicity island 2 mutants of *Salmonella typhimurium* are efficient carriers for heterologous antigens and enable modulation of immune responses. *Infect Immun* **67**: 1093-9.

Michiels, T., Vanooteghem, J.C., Lambert de Rouvroit, C., China, B., Gustin, A., Boudry, P. and Cornelis, G.R. (1991) Analysis of *virC*, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **173**: 4994-5009.

Miller, J. H. (1992) A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Miller, S.I. (1991) PhoP/PhoQ: macrophage-specific modulators of *Salmonella* virulence? *Mol Microbiol* **5**: 2073-8.

Minamino, T., Iino, T. and Kutuskake, K. (1994) Molecular characterization of the *Salmonella typhimurium* flhB operon and its protein products. *J Bacteriol* **176**: 7630-7.

Nikolaus, T., Deiwick, J., Rappl, C., Freeman, J.A., Schröder, W., Miller, S.I. and Hensel, M. (2001) SseBCD proteins are secreted by the type III secretion system of S*almonella* pathogenicity island 2 and function as a translocon. *J Bacteriol* **183**: 6036-45.

Nouwen, N., Ranson, N., Saibil, H., Wolpensinger, B., Engel, A., Ghazi, A. and Pugsley, A.P. (1999) Secretin PulD: association with pilot PulS, structure, and ion- conducting channel formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8173-7.

Oropeza-Wekerle, R.L., Speth, W., Imhof, B., Gentschev, I. and Goebel, W. (1990) Translocation and compartmentalization of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA). *J Bacteriol* **172**: 3711-7.

Osborn, M.J., Gander, J.E. and Parisi, E. (1972) Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Site of synthesis of lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **247**: 3973-86.

Pang, T., Levine, M.M., Ivanoff, B., Wain, J. and Finlay, B.B. (1998) Typhoid fever-important issues still remain. *Trends Microbiol* **6**: 131-3.

Peterson, G.L. (1979) Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* **100**: 201-20.

Plano, G.V., Barve, S.S. and Straley, S.C. (1991) LcrD, a membrane-bound regulator of the *Yersinia pestis* low-calcium response. *J Bacteriol* **173**: 7293-303.

Pugsley, A.P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 50-108.

Rathman, M., Sjaastad, M.D. and Falkow, S. (1996) Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infect Immun* **64**: 2765-73.

Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiaho-Lassila, E.L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M. and He, S.Y. (1997) Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3459-64.

Sansonetti, P.J., Ryter, A., Clerc, P., Maurelli, A.T. and Mounier, J. (1986) Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect Immun* **51**: 461-9.

Schägger, H., von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368-79.

Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C. and Holden, D.W. (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 2593-7.

Soncini, F.C., Garcia Vescovi, E., Solomon, F. and Groisman, E.A. (1996) Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *J Bacteriol* **178**: 5092-9.

Stein, M., Kenny, B., Stein, M.A. and Finlay, B.B. (1996) Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J Bacteriol* **178**: 6546-54.

Tamano, K., Aizawa, S., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S. and Sasakawa, C. (2000) Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J* **19**: 3876-87.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4.

Uchiya, K., Barbieri, M.A., Funato, K., Shah, A.H., Stahl, P.D. and Groisman, E.A. (1999) A *Salmonella virulence* protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J* **18**: 3924-33.

Wallis, T.S., Galyov, E.E. (2000) Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol* **36**: 997-1005.

Wattiau, P., Woestyn, S. and Cornelis, G.R. (1996) Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol* **20**: 255-62.

Winans, S.C., Burns, D.L. and Christie, P.J. (1996) Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol* **4**: 64-8.

Woestyn, S., Allaoui, A., Wattiau, P. and Cornelis, G.R. (1994) YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J Bacteriol* **176**: 1561-9.

Zychlinsky, A., Prevost, M.C. and Sansonetti, P.J. (1992) *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* **358**: 167-9.

Dank

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die freundliche Aufnahme am Lehrstuhl für Bakteriologie am Max von Pettenkofer-Institut.

Bei Prof. Dr. V. Müller bedanke ich mich für die Betreuung dieser Arbeit. In den regelmäßigen Gesprächen konnte ich stets wissenschaftliche Anregungen finden. Auch bei aktuellen Fragen erhielt ich jederzeit fachlichen Rat.

Prof. Dr. M. Hensel danke ich für die Bereitstellung eines sehr interessanten Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen motivierenden wissenschaftlichen Ratschläge waren mir stets eine wertvolle Hilfe.

Bei allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe bedanke ich mich ganz herzlich für die große Hilfsbereitschaft und die sympathische Atmosphäre in unserem Labor. Besonders bedanke ich mich bei Jörg Deiwick, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und großes Interesse am Fortgang meiner Arbeit zeigte. Gerade in der Endphase der Arbeit im Labor, war seine Unterstützung für mich sehr hilfreich.

An dieser Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. H. Engelhardt für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried. Neben seinem großen Interesse an den Nadel-Komplexen zeigte er viel Geduld bei der Untersuchung der zahlreichen Fraktionen im Elektronenmikroskop.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Catherine Rappl
Geburtsdatum	31.07.1968
Geburtsort	Donauwörth
Familienstand	ledig
Eltern	Gotthard Rappl
	Yvonne Rappl, geb. Geiser

Ausbildung

1974 - 1981	Grund- und Hauptschule, Asbach-Bäumenheim
1981 - 1985	Staatliche Realschule, Rain am Lech
1985 - 1988	Lehre zur Reprophotographin, Repro-Mayr GmbH, Donauwörth
1988 - 1989	Reprophotographin, Repro-Mayr GmbH, Donauwörth
1989 - 1991	Berufsoberschule, Augsburg
1991 - 1997	Studium der Biologie an der Universität Regensburg
06/1997 - 08/1997	Wissenschaftliche Hilfskraft Lehrstuhl für Mikrobiologie, Prof. Stetter Universität Regensburg
1998 - 2001	Arbeiten zur Dissertation am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und med. Mikrobiologie, München unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Hensel