

**Struktur-Funktions-Analyse ausgewählter
Proteine des Typ-III-Sekretionssystems aus
Yersinia enterocolitica:
YopB, YopD, YopQ, SycD**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften

Universität Hamburg

vorgelegt von

Theresa Nuguid

Hamburg, Dezember 2016

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2013 bis Oktober 2016 in der Arbeitsgruppe von Prof. Christian Betzel im Laboratorium für Strukturbiologie von Infektion und Entzündung am Institut für Biochemie und Molekularbiologie des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg und am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Aepfelbacher angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Ch. Betzel
2. Gutachter: Prof. A. Torda

Datum der Druckfreigabe: 27.01.2017

INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 SUMMARY	3
3 EINLEITUNG	5
3.1 <i>Yersinia</i>	5
3.1.1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	6
3.2 Das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS)	6
3.2.1 Struktureller Aufbau des T3SS	7
3.3 Chaperone des T3SS	13
3.3.1 SycD aus <i>Y.enterocolitica</i> : Ein Klasse II Chaperon	14
3.4 Die hydrophoben Translokatoren des T3SS: YopB und YopD	19
3.4.1 Struktureller Aufbau und Funktion von YopB	21
3.4.2 Struktureller Aufbau und Funktion von YopD	23
3.5 Effektorproteine des T3SS	24
3.5.1 Immunmodulierende Effektoren	25
3.5.1 Effektorprotein YopQ	26
3.6 Zielsetzung	30
4 ERGEBNISSE	31
4.1 YopQ	31
4.1.1 Klonierung und initiale Expressionsversuche in <i>E.coli</i>	31
4.1.2 Expression, Reinigung und Optimierung der proteolytischen Spaltung des <i>GST-tags</i>	32
4.1.3 Initiale Charakterisierung	36
4.1.4 Kristallisationsexperimente	37
4.1.5 SAXS-Analyse	39
4.1.6 Sequenzanalyse von YopQ zur Herstellung optimierter Konstrukte	41
4.1.7 YopQ1-165	42
4.1.8 YopQ9-179	46

Inhaltsverzeichnis

4.1.9 YopQ37-179	51
4.2 SycD21-163	53
4.3 YopB	57
4.3.1 Sequenzanalyse	57
4.3.2 YopB1-168 Klonierung und initiale Expressionsversuche	58
4.3.3 Expression und Reinigung	58
4.3.4 Charakterisierung	60
4.4 YopB1-168 und SycD21-163 als Komplex	61
4.4.1 Reinigung und Komplexbildung	62
4.4.2 Charakterisierung und Kristallisationsexperimente	65
4.4.3 SAXS-Analyse	66
4.5 Co-Expression YopB/SycD21-163	70
4.5.1 Initiale Expressions- und Reinigungsexperimente	70
4.6 YopD	72
4.6.1 Sequenzanalyse	72
4.6.2 YopD1-130 Klonierung, initiale Expressionsversuche	72
4.6.3 Expression, Reinigung	73
4.7 Co-Expression YopD/SycD21-163	74
4.7.1 Expression, Reinigung, Komplexbildung	74
4.7.2 Charakterisierung	76
4.7.3 SAXS-Analyse	78
4.7.4 Kristallisationsexperimente	79
5 DISKUSSION	82
5.1 YopQ	82
5.2 YopB	85
5.2.1 Die N-terminale Domäne von YopB: YopB1-168	85
5.2.2 Co-Expression YopB/SycD21-163	90
5.3 YopD	90
5.3.1 Die N-terminale Domäne von YopD: YopD1-130	91
5.3.2 Co-Expression YopD/SycD21-163	92
5.4 Ausblick	94

6 MATERIAL	96
6.1 Chemikalien	96
6.2 Verbrauchsmaterialien	96
6.3 Medien, Puffer und Lösungen	97
6.4 Größenmarker	100
6.5 Kits und Enzyme	100
6.6 Proteinsequenzen	101
6.6.1 YopB	101
6.6.2 YopD	101
6.6.3 YopQ	101
6.6.4 SycD	101
6.7 Vektoren	102
6.8 Oligonukleotide	102
6.9 Bakterienstämme	104
6.10 Geräte	104
7 METHODEN	107
7.1 Molekularbiologische Methoden	107
7.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	107
7.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	108
7.1.3 Reinigung der PCR-Produkte	108
7.1.4 Restriktion	109
7.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	109
7.1.6 Ligation	109
7.1.7 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	110
7.1.8 Transformation	110
7.1.9 Plasmidpräparation	111
7.1.10 Sequenzierung	111
7.1.11 Rekombinante Genexpression	111
7.2 Proteinbiochemische Methoden	112
7.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	112
7.2.2 Coomassie-Färbung der Polyacrylamidgele	113

Inhaltsverzeichnis

7.2.3 Western Blot	113
7.2.4 Zellaufschluss	114
7.2.5 Nickel-NTA Affinitätschromatographie und proteolytische Spaltung des <i>(His)₆-tags</i>	115
7.2.6 Glutathion Affinitätschromatographie und proteolytische Spaltung des <i>GST-tags</i>	115
7.2.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	116
7.2.8 Konzentration der Proteinlösung	117
7.2.9 Größenausschlusschromatographie	117
7.2.10 Ionenaustauschchromatographie	117
7.3 Biophysikalische Methoden	118
7.3.1 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie	118
7.3.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)	119
7.3.3 Massenspektrometrie (MS)	120
7.3.4 Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXS)	122
7.3.5 Proteinkristallisation	122
7.3.6 <i>Second Order Nonlinear Imaging of Chiral Crystals</i> (SONICC)	124
8 LITERATURVERZEICHNIS	125
9 ANHANG	137
9.1 Gefahrenstoffe nach GHS	137
9.2 Gefahrenpiktogramme	143
9.2 H-Sätze (<i>Hazard Statements</i>)	143
9.3 P-Sätze (<i>Precautionary Statements</i>)	144
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	146
TABELLENVERZEICHNIS	148
DANKSAGUNG	149
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	151

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Ångström
AIEX	Anionenaustauschchromatographie
Aop	<i>Aeromonas outer protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriophosphat
Bis Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Circulardichroismus
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DLS	dynamische Lichtstreuung
D _{max}	maximaler Partikelabstand
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Esc	<i>Escherichia secretion component</i>
ESI	Elektrospray Ionisation
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FyB	<i>Fyn-binding protein</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Inv	<i>Invasion</i>

Abkürzungsverzeichnis

Ipa	<i>Invasion plasmid antigen</i>
Ipg	<i>Invasion plasmid gene</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted laser-desorption ionization</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>molecular weight</i>
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
Mxi	<i>Membrane expression of Ipa</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Ni-NTA-Agarose	Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PM	Proteingrößenstandard
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pop	<i>Pseudomonas outer protein</i>
PRK2	<i>Protein kinase C-related kinase 2</i>

pYV	<i>Plasmid of Yersinia virulence</i>
R _g	Gyrationsradius
R _h	hydrodynamischer Radius
<i>r.m.s.d.</i>	<i>Root mean square deviation</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RSK	<i>Ribosomal S6 protein kinase</i>
RT	Raumtemperatur
SAXS	<i>small angle X-ray scattering</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	Größenausschlusschromatographie
Sip	<i>Salmonella invasion protein</i>
SONICC	<i>Second Order Nonlinear Imaging of Chiral Crystals</i>
Spa	<i>Surface presentation of antigen</i>
Syc	<i>Specific yop chaperone</i>
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TEMED	<i>N,N,N', N'-Tetramethylethylen-1,2-diamin</i>
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TOF	<i>time of flight</i>
TPR	<i>tetratricopeptide repeat</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
Yop	<i>Yersinia outer protein</i>
Ysc	<i>Yersinia secretion component</i>

1 ZUSAMMENFASSUNG

Bakterielle Pathogene wie *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Shigella* und *Chlamydia sp.* sind für zahlreiche Krankheiten verantwortlich, die jährlich Millionen von Menschen infizieren. Das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) ist eine strukturelle Ansammlung von verschiedenen Proteinen, die in diesen gram-negativen Bakterien auftritt und für deren Pathogenität von essentieller Bedeutung ist. Es stellt eine direkte Verbindung des bakteriellen Cytosols zur eukaryotischen Wirtszelle dar, über die die Effektorproteine dort eingeschleust werden und durch verschiedenste Reaktionen das Überleben und die Ausbreitung der Bakterien ermöglichen. Um die Infektiosität und Pathogenität von gram-negativen Bakterien zu reduzieren, repräsentiert das T3SS daher einen aussichtsreichen therapeutischen Angriffspunkt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erste Grundlagen zur strukturellen Charakterisierung des Effektorproteins YopQ geschaffen werden. Dieses Protein ist für die Regulation der Translokation sowie für deren Substratspezifität von signifikanter Bedeutung. Nach rekombinanter Expression des löslichen Zielproteins konnten mit Hilfe von SAXS-Experimenten erste wichtige strukturelle Informationen über YopQ in Lösung gesammelt werden. Es konnten *ab initio* SAXS-Modelle für vier verschiedene Varianten des Zielproteins generiert werden. Die Rolle des N-Terminus zeigte sich hierbei von großer Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass es sich um einen flexiblen Bereich handelt, der einen möglicherweise unstrukturierten Überhang des Proteins darstellt.

Für die beiden hydrophoben Translokatoren YopB und YopD im Komplex mit ihrem Chaperon SycD konnten ebenso erste wichtige strukturelle Informationen gewonnen werden. Für die N-terminale Domäne von YopB1-168 konnte ein stabiler Komplex mit SycD21-163 hergestellt und in Lösung charakterisiert werden. SAXS-Experimente konnten erste wichtige Strukturinformationen darlegen. Die Berechnung eines *rigid body* Modells zeigte, dass YopB1-168 und SycD21-163 ein Heterodimer ausbilden und der N-Terminus von YopB eine flexible und teilweise unstrukturierte Konformation aufweist, die zu einer elongierten Form des Komplexes führt. YopD konnte ebenfalls als löslicher Komplex mit SycD21-163 hergestellt werden. Initiale strukturelle Charakterisierungen des Komplexes in Lösung konnten erstmals offenbaren, dass es sich um eine Stöchiometrie von 2:2 handelt. SAXS-

Zusammenfassung

Messungen konnten zusätzlich Informationen über eine elongierte und symmetrische Anordnung der Moleküle im Komplex liefern.

Zusätzlich konnten wichtige Grundlagen gesammelt und Ansatzpunkte geschaffen werden, auf deren Basis die Kristallisationsparameter der einzelnen Proteine und Komplexe zukünftig optimiert werden können, um schließlich unter Anwendung von Synchrotronstrahlung Diffraktionsdaten sammeln zu können. Hochauflösende Strukturdaten dieser Proteine wären von essentieller Bedeutung für einen detaillierteren Einblick in die Funktionalität des T3SS und stellen die Grundlage für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren und antibakterieller Wirkstoffe dar.

2 SUMMARY

Bacterial pathogens such as *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Shigella*, and *Chlamydia sp.* are responsible for many diseases that infect millions of people each year. The type III secretion system (T3SS) is a structural assembly comprising of different proteins that occur in these gram-negative pathogens and is essential for their pathogenicity. It forms a direct conduit that mediates a transport mechanism whereby effector proteins are directly translocated from the bacterial cytoplasm to the eucaryotic host cell. Here they can cause different reactions and facilitate the survival and spread of these bacteria. The inhibition of T3SS therefore represents a promising therapeutic target to reduce the infectivity and pathogenicity of gram-negative bacteria.

In the course of this work first fundamentals of the structural characterization of the effector YopQ could be accomplished. This protein is of high significance for regulation of translocation and to maintain its fidelity. After recombinant expression of soluble protein SAXS experiments could provide first structural information about YopQ in solution. It was possible to generate *ab initio* models for four different constructs. The significant role of the N-terminus could be revealed. A flexible part could be determined that possibly displays a partially unfolded tail of the protein.

Additionally first structural insights into the hydrophobic translocators YopB and YopD could be obtained in complex with their chaperon SycD. A stable complex of the N-terminal domain of YopB1-168 together with SycD21-163 could be formed and characterized in solution. SAXS data revealed first structural information. Calculation of a *rigid body* model could display the formation of a heterodimer of YopB1-168 and SycD21-163. The N-terminal part of YopB shows a flexible and partially unfolded conformation resulting in an elongated form of the complex. Likewise YopD could be produced as a soluble complex together with SycD21-163. Initial structural characterization of this complex unveils a formation containing 2:2 stoichiometry. SAXS measurements provide additional information that indicates an elongated and symmetric arrangement of the molecules.

Furthermore collection of important foundations and starting points could be shown. These data can be used in future to facilitate optimization of crystallization parameters and to receive crystals suitable for data collection using synchrotron radiation. Obtaining high-

Summary

resolution structure information of those proteins involved in the T3SS would greatly help to elucidate the mechanism in detail and form a basis for the development of specific inhibitors and drugs.

3 EINLEITUNG

Gram-negative Bakterien wie *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Shigella* und *Chlamydia sp.* vermitteln zahlreiche Krankheiten, die jährlich Millionen von Menschen infizieren. Das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) stellt einen der entscheidenden Virulenzfaktoren in diesen bakteriellen Pathogenen dar. T3SS vermittelt einen Transportmechanismus, durch den die Toxine eines extrazellulären Bakteriums in eine angrenzende Wirtszelle eingeschleust werden können. Dieser Infektionsapparat bildet eine komplexe, nadelförmige Struktur aus, über welche Effektorproteine direkt in das Cytoplasma der Wirtszelle injiziert werden und dort unterschiedliche Prozesse auslösen können. Eine Inhibierung des T3SS stellt daher einen vielversprechenden therapeutischen Ansatzpunkt dar, um die Infektiosität und Pathogenität von gram-negativen Bakterien zu reduzieren. Für eine detaillierte Aufklärung des Mechanismus, der die Grundlage für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren und Medikamente darstellt, sind hochauflösende, strukturelle Informationen über die Proteine, die an diesem System beteiligt sind, von großer Bedeutung.

3.1 *Yersinia*

Die Gattung *Yersinia* gehört zur Familie der Enterobacteriaceae. Es handelt sich um stäbchenförmige, gram-negative Bakterien, die sich fakultativ anaerob vermehren. Der Name dieser Bakterien-Gattung geht auf den Forscher Alexandre Yersin zurück, der 1894 in Hongkong erstmals in der Lage war, den Erreger der Pest zu isolieren und diesen auf Nagetiere zu übertragen.^{1,2} Es gibt insgesamt 18 verschiedene Spezies innerhalb dieser Gattung, davon sind jedoch nur *Y.enterocolitica*, *Y.pseudotuberculosis* und *Y.pestis* humanpathogen.³ *Y.enterocolitica* und *Y.pseudotuberculosis* sind zoonotische, infektiöse Pathogene, die selbstlimitierende Gastroenteritis im Menschen verursachen können. Die Ursache dieser Erreger ist hauptsächlich die Nahrungsaufnahme von kontaminiertem Fleisch oder Milchprodukten, wodurch diese in den menschlichen Körper gelangen.^{4,5} *Y.pestis* dagegen ist der Erreger der Pest, die von Nagetieren über Flöhe auf den Menschen übertragen werden kann.⁶ Der Krankheitsverlauf von *Y.pestis* unterscheidet sich deutlich von dem der anderen pathogenen Spezies und ist unbehandelt in ungefähr 90 % der Fälle tödlich. Obwohl das Krankheitsbild deutlich voneinander variiert, besitzen *Y.pestis* und *Y.pseudotuberculosis*

Einleitung

97 % Übereinstimmung in ihrer chromosomalen DNA und es ist allgemein anerkannt, dass sich *Y.pestis* vor 2,000-10,000 Jahren aus *Y.pseudotuberculosis* entwickelt hat.^{3,7,8}

3.1.1 *Yersinia enterocolitica*

Die ersten Referenzen über *Y.enterocolitica* gab es 1934 von McIver und Pike.⁴ Im Jahre 1939 erweckten sie damit die Aufmerksamkeit von Schleifstein und Coleman, die den beschriebenen Mikroorganismus als unidentifizierbar einstufte und ihm den Namen *Bacterium enterocoliticum* gaben. Frederiksen wies das *Bacterium enterocoliticum* 1964 der Gattung *Yersinia* zu und teilte *Y.enterocolitica* folglich in die Familie der Enterobacteriaceae ein.^{4,5,9}

Y.enterocolitica ist unter anderem der Erreger von Durchfallerkrankungen, mesenterialer Lymphadenitis, Ileitis, und der Yersiniose. Die Krankheiten verlaufen meist selbstlimitierend, so dass auf die Einnahme von Antibiotika verzichtet werden kann. Der Erreger findet sich in tierischen Reservoirien und überträgt sich durch den Verzehr von nicht ausreichend erhitzten tierischen Produkten, meistens Schweinefleisch, Milchprodukten oder kontaminiertem Wasser. Im Anschluss an die Aufnahme des Erregers gelangen die Bakterien zunächst in den Dünndarm. Nach Erreichen des Ileums befallen sie die Darmepithelien und können von dort aus bis in lymphatisches Gewebe vordringen.³

Die humanpathogenen Spezies von *Yersinia* tragen alle drei das Virulenzplasmid pYV (*plasmid of Yersinia virulence*), das für die Pathogenität der Erreger entscheidend ist. Dieses Virulenzplasmid kodiert für das Ysc Typ-III-Sekretionssystem, das in der Lage ist Toxine, sogenannte Effektorproteine, in die Wirtszellen zu schleusen, wo diese verschiedene Prozesse einleiten, um das Überleben des Bakteriums zu sichern und die körpereigene Immunantwort des Wirtes zu unterdrücken.¹⁰

3.2 Das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS)

Bei dem Typ-III-Sekretionssystem handelt es sich um einen konservierten Virulenzfaktor, der neben *Yersinia spp.* auch in verschiedenen anderen gram-negativen Pathogenen wie zum Beispiel *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.* und *Chlamydia spp.* auftritt.¹¹ Das T3SS ermöglicht eine direkte Zufuhr von Effektorproteinen aus dem bakteriellen Zytoplasma in die eukaryotische

Wirtszelle und ist somit für die Pathogenität verantwortlich.^{12,13} Mit Hilfe des T3SS können drei verschiedene Plasmamembranen, Peptidoglykanschichten sowie der extrazelluläre Raum überwunden werden, ohne vom wirtseigenen Immunsystem bemerkt zu werden. Eine phylogenetische Analyse erlaubt die Klassifizierung der T3SS in verschiedene Familien.¹¹ Die drei am besten erforschtesten sind das T3SS der Ysc Familie der *Yersinia* Spezies, die nah verwandt mit *P.aeruginosa* und *Aeromonas* spp. ist, die Inv-Mxi-Spa Familie aus *Shigella*, *Salmonella* und *Burkholderi* spp. und das Ssa-Esc System der *Escherichia coli* Spezies.^{11,14,15} Die Nomenklatur der T3SS-Komponenten ist innerhalb der Familien annähernd konsistent, jedoch nicht unter den verschiedenen Familien der einzelnen Spezies. Im Folgenden wird das T3SS aus *Y.enterocolitica* beschrieben und dessen Nomenklatur verwendet.

3.2.1 Struktureller Aufbau des T3SS

Das T3SS ist ein nadelförmiger Infektionsapparat, der mehrere Megadalton groß ist und aus mehr als 20 verschiedenen Komponenten besteht, die sich selbst zusammenschließen können.¹¹ Die Hauptkomponenten des T3SS sind die *yersinia secretion components* (Ysc) und die *yersinia outer proteins* (Yop).¹¹ Der Aufbau kann in vier separate Schritte unterteilt werden. Erster Schritt ist der Aufbau des Basalkörpers und des Exportapparates, der zweite Schritt besteht in der Ausbildung der Nadelstruktur, der dritte Schritt im Aufbau der Nadelspitze sowie des Porenkomplexes und der letzte Schritt in der Sekretion der Effektorproteine.¹¹ Damit die einzelnen Substrate durch das T3SS transloziert werden können, gibt es jeweils spezifische Yop Chaperone (Syc).¹⁵⁻¹⁷ Der genaue Mechanismus dieses Zusammenschlusses ist bis heute nicht genau aufgeklärt, jedoch gibt es viele Ansätze und vorhergesagte Modelle. Die Sekretionssysteme der einzelnen Organismen zeigen eine hohe Ähnlichkeit in ihrem strukturellen Aufbau, aber einige Diversitäten in ihrer Funktionsweise auf. Der Aufbau des T3SS ist evolutionär mit bakteriellen Flagellen strukturell verwandt.^{17,18}

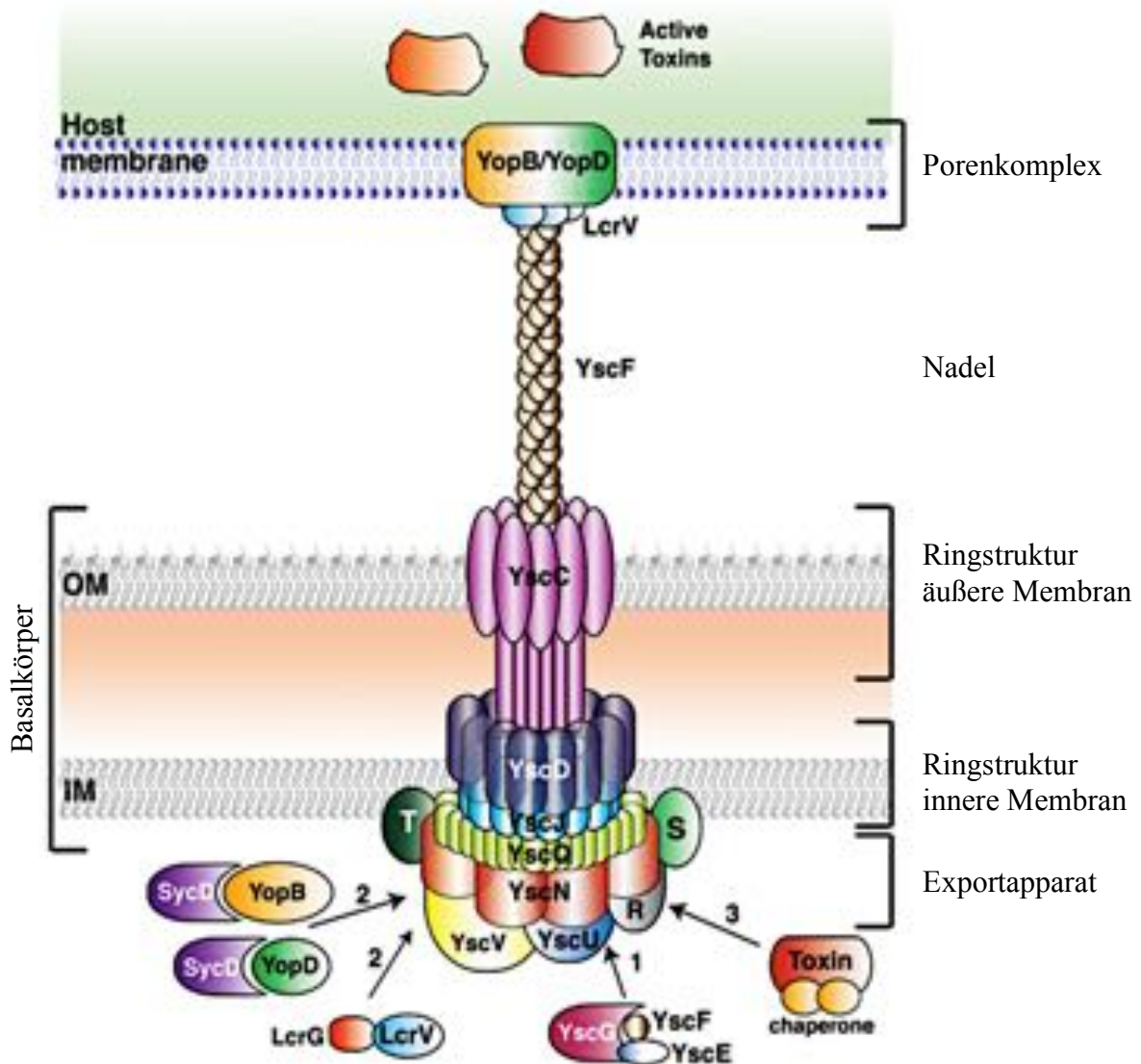


Abbildung 1: Struktureller Aufbau des T3SS
Schematische Darstellung des *Yersinia* T3SS. Modifiziert nach¹⁹

3.2.1.1 Der Basalkörper

Die Ausbildung des Basalkörpers startet mit der Oligomerisation von YscC, das sich zu einem Ring in der äußeren Membran des Bakteriums formt, während sich YscD ringförmig in der inneren Membran verankert und zusammen mit YscJ eine kanalförmige Verbindung zwischen den beiden Membranen ausbildet.²⁰⁻²² Diese drei Komponenten stellen das Gerüst für den Basalkörper dar. Dieses Gerüst weist aufgrund der nachgewiesenen Elastizität von YscD eine hohe intrinsische Flexibilität auf und kann dadurch auf äußere Einwirkungen reagieren ohne die Funktionalität zu verlieren.²³ Mittels Cryo-Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die membranständigen Ringe der *Salmonella* Homologe zu YscD und YscJ aus 24 Molekülen aufgebaut sind.²³ Diese Gegebenheit ist innerhalb der T3SS konserviert. Für YscC

hingegen konnten mit der gleichen Methode zwölf Untereinheiten nachgewiesen werden. Die Proteine YscN, YscK und YscL bilden den Adenosintriphosphatasekomplex (ATPase), der für die Energieversorgung zuständig ist.^{24,25} YscQ bildet den sogenannten C-Ring, der mit dem ATPase-Komplex assoziiert ist und als potentielle Sortierungs-Plattform für die Sekretion und dessen Regulierung zuständig ist.²⁶⁻²⁸ Der Exportapparat baut sich aus den vollständig in der inneren Membran verankerten Proteinen YscRSTUV auf.²⁹⁻³¹ Durch Zusammenschluss der Komponenten aus Gerüst, ATPase-Komplex und Exportapparat ist der Basalkörper vollständig und ist nun in der Lage weitere Proteine zu sekretieren.

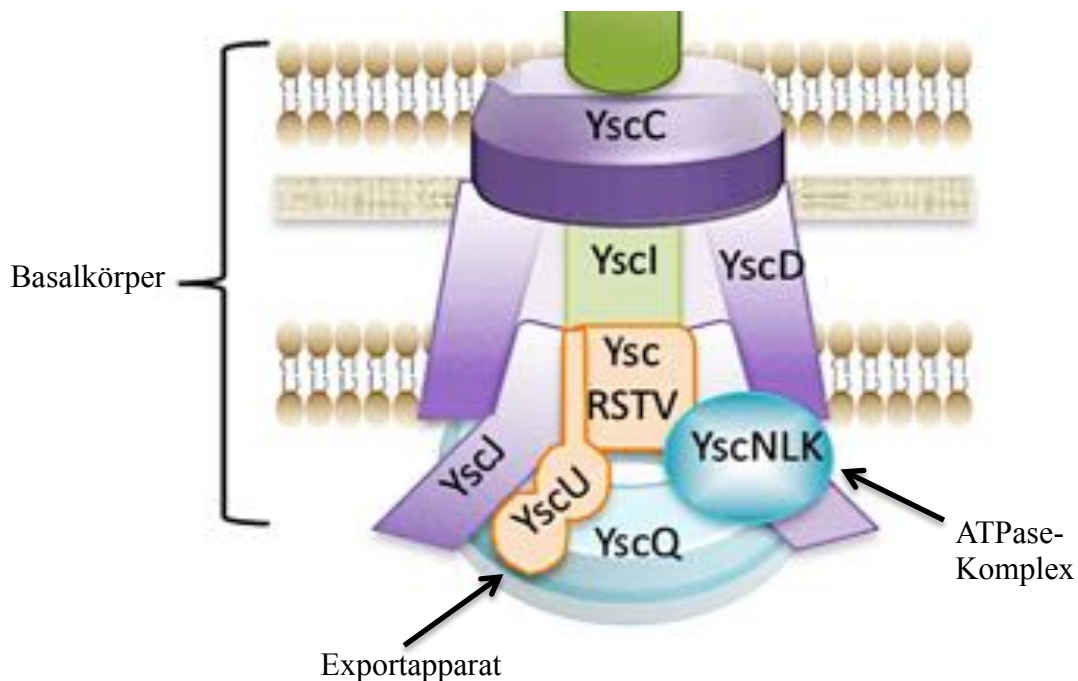


Abbildung 2: Basalkörper des T3SS

Schematische Darstellung des Basalkörpers inklusive des Exportapparates und des ATPase-Komplexes. Modifiziert nach¹⁸

3.2.1.2 Die Nadel

Nach Fertigstellung des Basalkörpers werden zunächst die folgenden Substrate YscIFPXO sowie YopR, die an der Ausbildung der Nadel des T3SS beteiligt sind, sekretiert.³²⁻³⁵ Obwohl mehrere Proteine zur Ausbildung beitragen, besteht die Nadel ausschließlich aus einem YscF-Polymer.^{11,17} YscI bildet voraussichtlich eine stabförmige Verbindung, durch die YscF sekretiert wird und dann zu einem Multimer polymerisiert, welches sich über eine Länge von ca. 58 nm in *Y. enterocolitica* erstreckt.³⁶ Der äußere Durchmesser dieses nadelförmigen Kanals beträgt 6-7 nm während der innere Durchmesser bei 2-3 nm liegt.³⁶⁻³⁹ YscP ist für Regulation der Nadellänge verantwortlich, während einige Studien darauf hindeuten, dass

Einleitung

YopR die Sekretion respektive Polymerisation von YscF reguliert.^{35,40,41} Über die Rolle der anderen Substrate gibt es verschiedenste Theorien, es konnte aber bisher nichts eindeutig belegt werden. YscO soll zum Beispiel eine unterstützende Rolle in der Regulation der Nadellänge durch YscP spielen, indem es dessen Interaktion mit dem Basalkörper begünstigt.^{41,42}

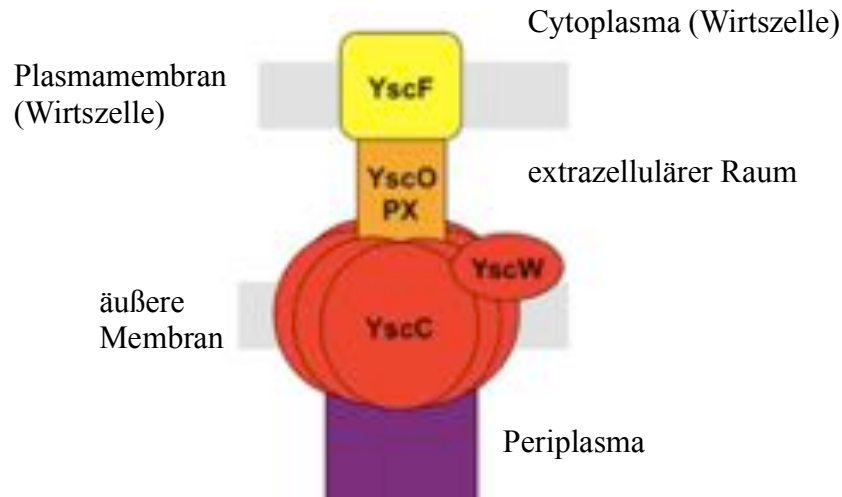


Abbildung 3: Ausbildung der Nadelstruktur

Schematischer Aufbau zur Ausbildung der Nadelstruktur. Modifiziert nach⁴³

YscX und YscY sind durch YscV mit dem Exportapparat verbunden,³⁶ wobei YscY ein potentiell Chaperon für YscX darstellt.⁴⁴⁻⁴⁶ Außerdem soll YscY mit SycD interagieren.⁴⁶ SycD fungiert als Chaperon für die Translokatoren YopB und YopD und erleichtert deren Sekretion.⁴⁷ Daher könnte YscY auch eine Rolle bei der Sekretionsspezifität zugesprochen werden.^{18,29,48,49} YscP tritt nach Abschluss der Nadelbildung zusätzlich mit YscU des Exportapparates in Interaktion und vermittelt hierüber eine Umstellung der Substratspezifität.^{23,41,42} Diese Umstellung führt dazu, dass neue Substrate erkannt und sekretiert werden, wodurch nun die Nadelspitze und der Porenkomplex ausgebildet werden können. Es wird vermutet, dass der C-Terminus von YscP über eine konservierte Umstellungs-Domäne verfügt, die mit der cytosolischen Domäne von YscU interagiert und deren Spaltung auslöst.^{32,48,50} Mutanten des *yscU* Gens, die sich dieser Proteolyse nicht unterziehen können, zeigen ernsthafte Auswirkungen auf Expression und Sekretion der späteren Substrate.^{41,51}

3.2.1.3 Der Porenkomplex und Transport der Effektorproteine durch das T3SS

Der Porenkomplex des T3SS besteht aus den drei Proteinen LcrV, YopB und YopD.⁵²⁻⁵⁴ Die Spitze der Nadel bildet ein Pentamer aus dem hydrophilen LcrV, das sich auf das äußere Ende des YscF-Polymers aufbaut.⁵⁵ Die Kristallstruktur des monomeren LcrV offenbart eine elongierte *Coiled-Coil* Region sowie eine α/β -Untereinheit, die über andere Organismen hinweg konserviert ist.^{55,56} Im Gegensatz dazu zeigt die Gesamtstruktur Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies auf. So besitzen LcrV sowie PcrV aus *Pseudomonas* spezifische Chaperone, wohingegen SipD und IpaD aus *Salmonella* und *Shigella* über eine eigene N-terminale Chaperon-Untereinheit verfügen.⁵⁷

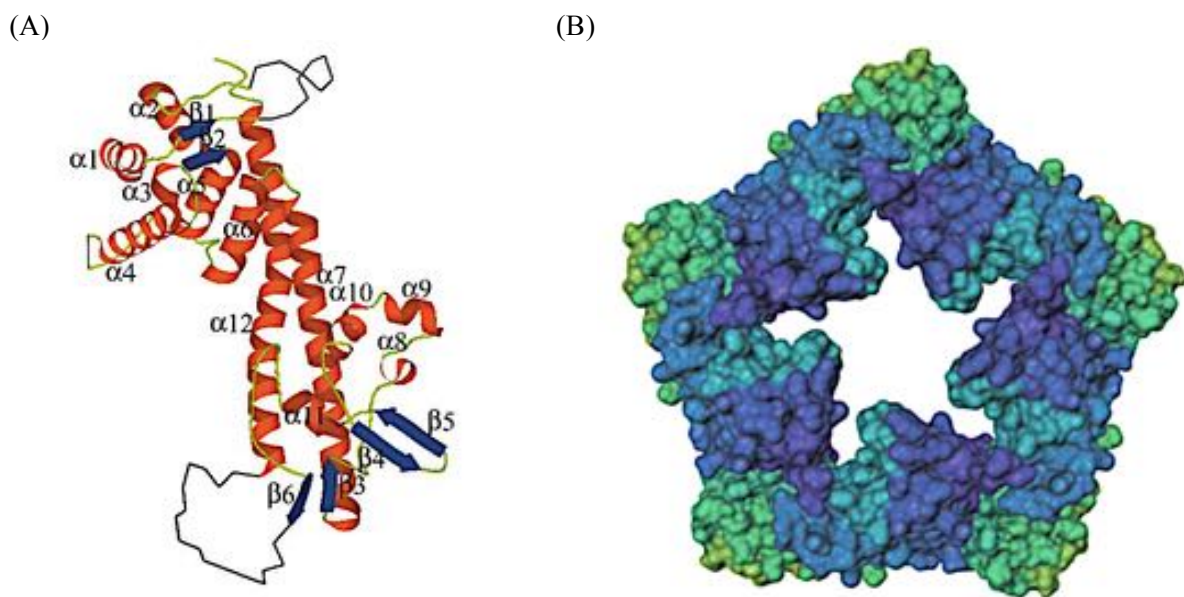


Abbildung 4: Kristallstruktur von LcrV und Modell der LcrV-Plattform

(A) Kristallstruktur des monomeren LcrV aus *Y.pestis*.⁵⁶ (B) Modell der pentameren Anordnung von LcrV im Spitzenkomplex.⁵⁸

Die hydrophoben Translokatoren YopB und YopD bilden einen multimeren Porenkomplex, der sich auf der LcrV-Plattform aufbaut.⁵⁸⁻⁶² LcrV spielt dabei eine essentielle Rolle im Aufbau und der Organisation der Pore und ermöglicht den Translokatoren das Eindringen in die Wirtsmembran.^{58,60-62} Durch diesen Schritt ist die direkte Verbindung des bakteriellen Cytosols zum Cytosol der Wirtszelle vollzogen. An dieser Stelle entsteht eine weitere Umstellung des T3SS und die Sekretion der Effektorproteine beginnt. Diese Umstellung wird ausgelöst durch die Spaltung des YopN/TyeA-Komplexes, der durch Bindung an den Basalkörper mit YscV eine Blockade für die Sekretion der Effektorproteine darstellt.^{63,64} Durch Fertigstellung des Porenkomplexes entsteht eine Kaskade von konformationellen

Einleitung

Änderungen innerhalb des T3SS, die TyeA von YopN löst.⁶⁵⁻⁶⁷ YopN kann nun in die Wirtszelle transloziert werden und die Blockade ist aufgehoben.⁶⁴

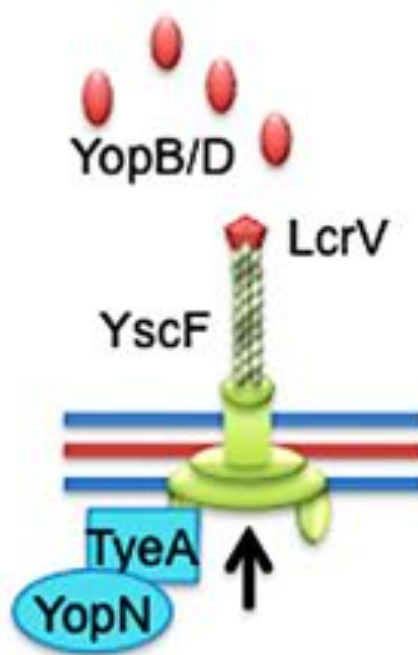


Abbildung 5: Blockade der Sekretion von Effektorproteinen durch den YopN/TyeA-Komplex

Durch die Blockade des YopN/TyeA-Komplexes können nur Translokatorproteine sekretiert werden. Nach Kontakt des Porenkomplexes mit der Wirtsmembran wird der Komplex gespalten und die Sekretion der Effektorproteine beginnt. Modifiziert nach⁶⁸

Die Effektorproteine werden mit Hilfe ihrer Chaperone dem Exportapparat nahe gebracht und treten dort nach Freigabe des Chaperons in die Sekretionsmaschinerie ein.⁶⁹ Aufgrund des geringen Durchmessers der Nadel mit 2-3 nm wandern die Effektoren in einem teilweise ungefalteten Zustand durch diese hindurch und falten sich nach Austritt aus dieser spontan in ihren Ursprungszustand zurück.^{11,17,18,70}

Der genaue Mechanismus der Translokation ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die Bildung des Porenkomplexes den Aufbau des T3SS abschließt und dieser fest verankert in der Wirtsmembran als Öffnung für die Sekretion weiterer Effektorproteine fungiert.¹⁸ Mittlerweile gibt es jedoch Studien, die darauf hinweisen, dass diese Effektoren bereits vor dem Kontakt mit der Wirtszelle in den extrazellulären Raum sekretiert werden, wo sie mit YopB und YopD assoziieren.^{71,72} Die Porenproteine die ebenfalls im extrazellulären Raum diffundieren, ermöglichen nun die Translokation durch die Plasmamembran in die Wirtszelle.^{71,72} Die zwei Modelle heben sich jedoch nicht gegenseitig auf, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass beide Mechanismen nebeneinander vorliegen.¹⁸

3.3 Chaperone des T3SS

Die Effektorsubstrate des T3SS besitzen jeweils zwei verschiedene Sekretionssignale innerhalb der ersten 50-100 Aminosäuren des N-Terminus. Das erste Sekretionssignal umfasst einen unstrukturierten Bereich am äußersten N-Terminus gefolgt vom zweiten Signal, der Chaperon-Bindungs-Region.¹⁷ Der äußerste N-Terminus ist zwar innerhalb der einzelnen Effektoren sehr unterschiedlich, dennoch konnten die Aminosäuren Serin, Threonin, Isoleucin und Prolin vermehrt in diesen Bereichen identifiziert werden.⁷³⁻⁷⁵ Es konnte nachgewiesen werden, dass Effektorproteine, die mit einem synthetischen ersten Sekretionssignal ausgestattet wurden, auch ohne das zweite Signal durch das T3SS sekretiert wurden.⁷⁶ Die Interaktion zwischen Effektor und Chaperon ist jedoch notwendig, um die Spezifität und Hierarchie der Sekretion zu gewähren.^{77,78} Im Vergleich zu klassischen Chaperonen sind die T3SS Chaperone nicht in der Lage ATP zu binden respektive zu hydrolysieren. Sie stabilisieren die Effektoren und übermitteln diese in einem teilweise ungefalteten Zustand innerhalb des bakteriellen Cytoplasmas an den ATPasen-Komplex, um sie auf die Sekretion vorzubereiten.¹¹ Vor dem Export löst sich das Chaperon begünstigt durch den ATPasen-Komplex wieder und verbleibt im Cytosol.⁶⁹ Zusätzlich können Chaperone durch ihre Bindung frühzeitige Polymerisation beziehungsweise Degradation der Substrate sowie unspezifische Interaktionen mit bakteriellen Proteinen und der Bakterienmembran verhindern.⁷⁹ Chaperone des T3SS weisen niedrige Molekulargewichte auf, besitzen einen pI im aziden Bereich und befinden sich normalerweise angrenzend an das Gen ihres korrespondierenden Virulenzfaktors auf dem Operon.^{80,81} Die Chaperone können anhand ihrer strukturellen Eigenschaften und ihres Substrattyps in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden.¹⁹

Klasse I Chaperone sind Homodimere bestehend aus sowohl α -helikalen als auch β -Faltblatt Sekundärstrukturelementen. Diese Klasse wird weiterhin in IA und IB unterteilt. Während Klasse IA Chaperone an nur ein einziges Effektorprotein binden, gibt es für Klasse IB Chaperone eine Vielzahl an Substraten. Als konserviertes Motiv konnte in mehreren Kristallstrukturen von Effektor/Chaperon-Komplexen in der Chaperon-Bindungs-Region ein intermolekulares β -Faltblatt identifiziert werden, das mit dem korrespondierenden Chaperon interagiert.⁸²⁻⁸⁴ Die Klasse II Chaperone binden die Translokonproteine und ermöglichen deren Sekretion. Sie zeichnen sich durch eine konservierte Faltung α -helikaler *tetratricopeptide repeat* (TPR)-Motive aus.^{47,81,85-87} Klasse III Chaperone bilden Heterodimere, die mit dem Nadel-Protein YscF interagieren und einen ternären Komplex

Einleitung

YscG/YscE/YscF formen.⁸⁸⁻⁹⁰ YscG interagiert mit YscE und besitzt ebenfalls ein TPR-Motiv, über das es den C-Terminus von YscF bindet. Dieser Komplex verhindert die vorzeitige Polymerisation von YscF im bakteriellen Cytosol.^{88,89}

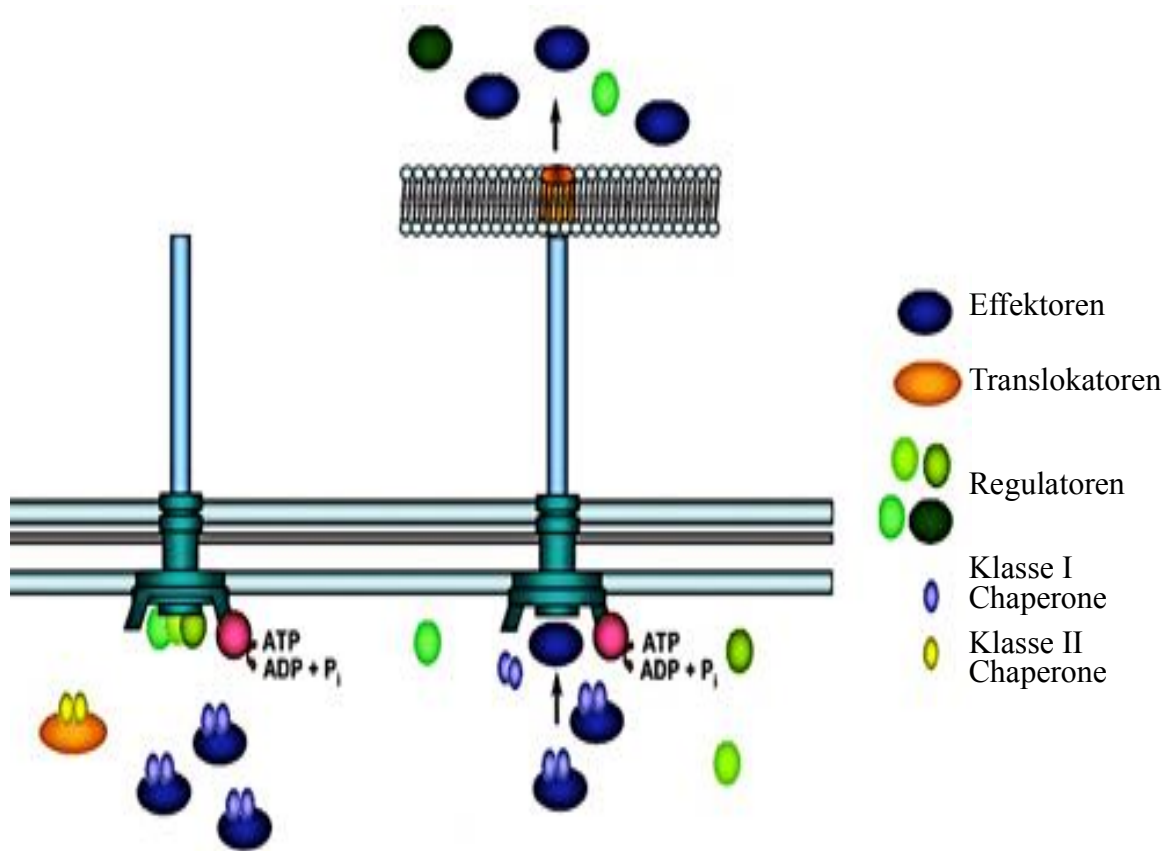


Abbildung 6: Funktion der unterschiedlichen Chaperone im T3SS

Schematische Darstellung der Funktion von Klasse I und II Chaperonen und der Regulation der Sekretion im T3SS. Modifiziert nach ⁹¹

3.3.1 SycD aus *Y. enterocolitica*: Ein Klasse II Chaperon

SycD ist ein Klasse II Chaperon aus *Yersinia enterocolitica* für die Translokatoren YopB und YopD. Das analoge Chaperon der anderen *Yersinia* Spezies ist LcrH.^{47,92,93} Die Struktur der Klasse II Chaperone ist hochkonserviert unter den verschiedenen Spezies im Gegensatz zu der strukturellen Diversität der einzelnen Translokatoren.⁸⁷ Neben seiner Funktion als Chaperon ist SycD außerdem in der Regulierung des T3SS involviert, indem es unter anderem die Sekretion der Yops kontrolliert sowie die negative Regulierung der *yop* Genexpression steuert.^{44,94,95} Infolge dieser vielfältigen Funktionalität gibt es für SycD neben den Translokatoren weitere vorhergesagte Interaktionspartner. TyeA, YscE und YscY, die ebenso

in der Regulierung des T3SS eine Rolle spielen, konnten bereits als solche identifiziert werden.⁴⁵

SycD besteht aus 168 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 19.4 kDa. Die Kristallstruktur des Homodimers von SycD²¹⁻¹⁶³ (16.1 kDa) konnte 2007 von Büttner *et al.* aufgeklärt werden.⁴⁷ Die Kristallisation des Vollängenkonstruktes war, aufgrund dessen Tendenz höhere Oligomere auszubilden, nicht möglich. Durch limitierte Proteolyse konnte das stabile Konstrukt SycD²¹⁻¹⁶⁸ ohne die ersten 20 Aminosäuren identifiziert werden. Zusätzlich wurden die fünf C-terminalen Reste entfernt, um das Cystein164 zu umgehen, das eine potentielle Rolle bei der Oligomerisation spielt.⁴⁷ Die Strukturaufklärung von SycD²¹⁻¹⁶³ nach reduktiver Methylierung der Lysine erfolgte mit einer maximalen Auflösung von 1.95 Å. In der asymmetrischen Einheit der monoklinen Kristallform liegen zwei SycD-Moleküle mit ausschließlich α -helikalen Sekundärstrukturelementen vor.⁴⁷ Die Dimerisierung von SycD konnte ebenso in Lösung beobachtet werden^{47,96} und es konnte nachgewiesen werden, dass die Verbindungsstelle der Dimere für die biologische Funktionalität von SycD relevant ist.

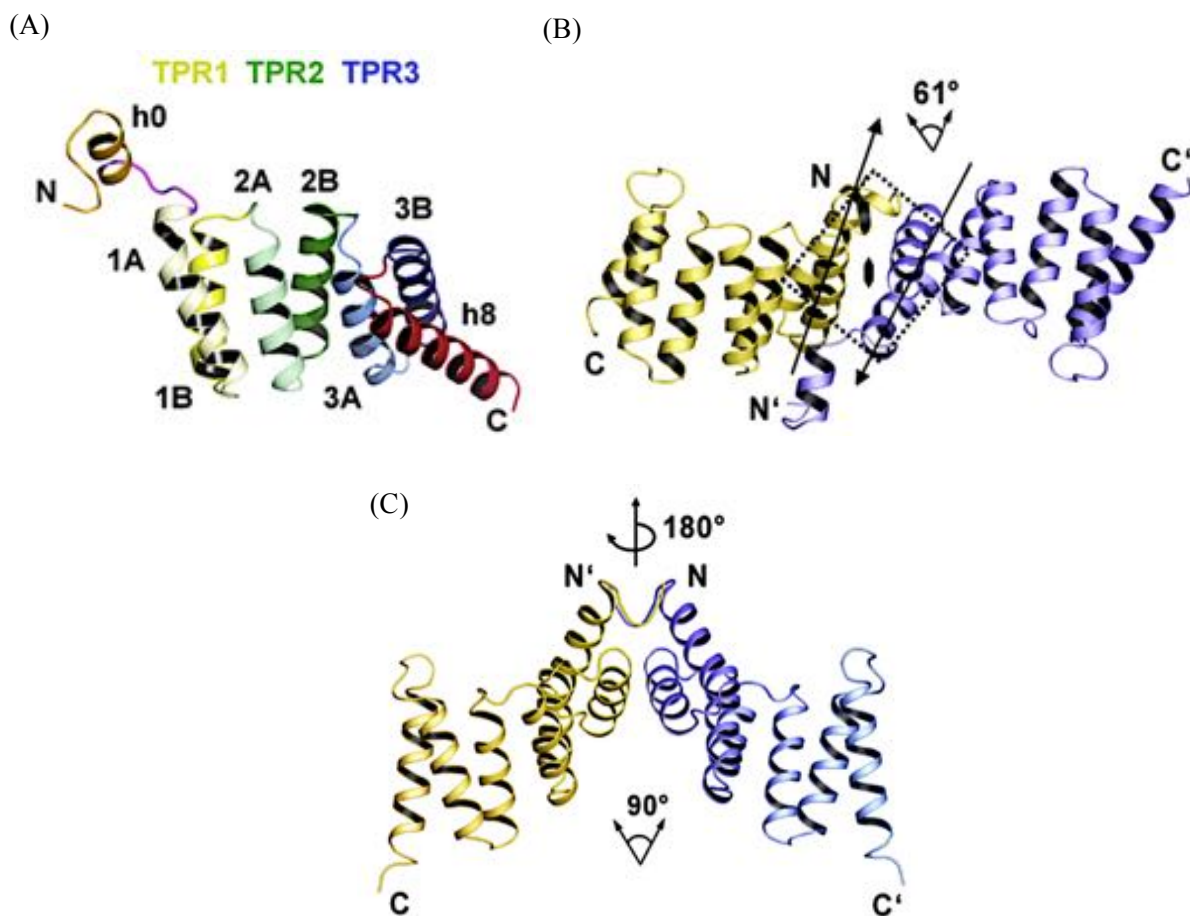


Abbildung 7: Kristallstruktur von SycD21-163

Kristallstruktur von SycD21-163 in seiner monomeren Form (A), in Form des elongierten Dimers (B) und des geknickten Dimers (C). Modifiziert nach⁴⁷

Einleitung

Ein SycD-Monomer besteht insgesamt aus acht α -Helices (h0, H1A/B, H2A/B, H3A/B, h8). Die sechs α -Helices zwischen den Aminosäureresten 36-137 (H1-3A/B) bilden je drei TPR-Motive mit antiparalleler Anordnung der Helices aus. Die C-terminale Helix (h8) ist ebenfalls antiparallel orientiert und ist als stabilisierende Helix charakteristisch für TPR-enthaltende Proteine. SycD bildet über TPR1 ein elongiertes Kopf an Kopf Dimer aus, das über eine konkave sowie eine konvexe Bindungsstelle für dessen Interaktionspartner verfügt. Diese putativen Bindungsstellen sind ebenfalls charakteristisch für TPR-enthaltende Proteine. Die Dimerisierung wird hauptsächlich durch hydrophobe Interaktionen und durch eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenkette von Gln60 mit dem Carbonylsauerstoff von Glu30 vermittelt. Für die SycD-Mutante S94E/Y95E konnte eine alternative, geknickte Variante des Dimers mit gleicher Verbindungsstelle identifiziert werden, die allerdings über keine Wasserstoffbrücke mehr verfügt.^{47,96}

Im Jahr 2009 konnte von Lunelli *et al.* ein Hexapeptid (P/V,x,L,x,x,P) als Bindungsmotiv in der Chaperon-Bindungs-Region des N-Terminus beider Translokatoren identifiziert werden, das für den Hauptteil der Translokatoren über alle Spezies hinweg an den Stellen 1, 3 und 6 konserviert ist.^{11,81} Die korrespondierende Sequenz in YopB ist ⁵⁰VQLPAP⁵⁵ und in YopD ⁵⁸PELIK⁶³.

	P1	P2	P3			
IpaB (<i>S. flexneri</i>)	P	E	L	K	A	P
IpaB (<i>EIEC</i>)	P	E	L	K	A	P
BipB (<i>B. mallei</i>)	P	A	L	R	A	P
YopB (<i>Y. enterocolitica</i>)	V	Q	L	P	A	P
YopD (<i>Y. enterocolitica</i>)	P	E	L	I	K	P
SipB (<i>S. typhimurium</i>)	V	G	L	K	P	P

Abbildung 8: Übersicht der Bindungsmotive einzelner Translokatoren⁸¹

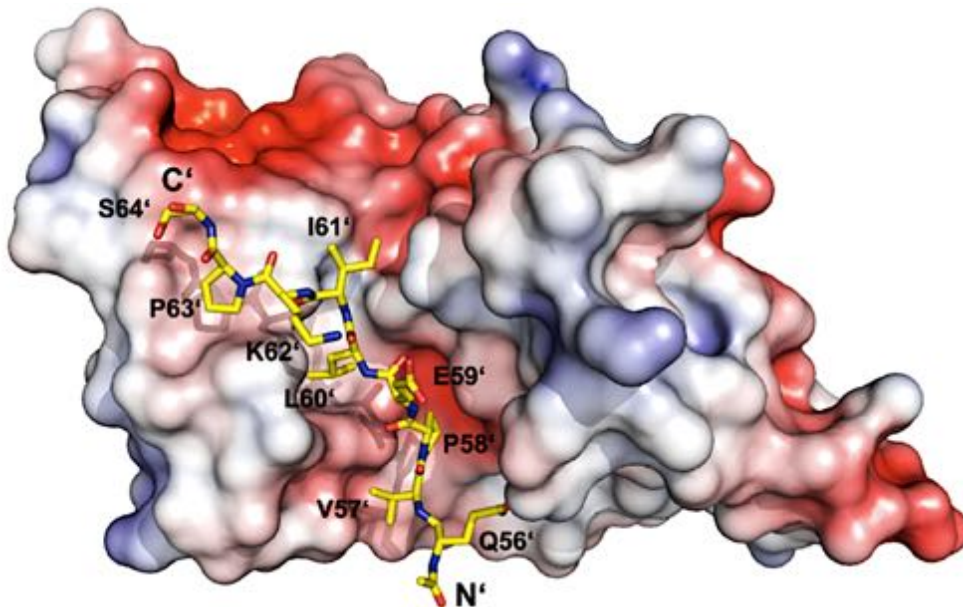
Die Struktur von IpgC, dem Homolog zu SycD aus *Shigella*, verfügt über eine ähnlich Gesamtstruktur wie SycD und weist die gleiche Anzahl und Orientierung der TPR-Motive auf. Der Komplex aus IpgC und dem Peptid aus der Chaperon-Bindungs-Region von IpaB⁵¹⁻⁷² (Homolog zu YopB) zeigte ein elongiertes Peptid in der Bindungsstelle mit einer antiparallelen Orientierung zur α -Helix H2 von IpgC auf.⁸¹

Eine Übersicht der Homologe der Proteine des Porenkomplexes und ihrer spezifischen Chaperone ausgewählter Spezies ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht der Translokatorproteine der einzelnen Organismen und ihre Chaperone

	Porenkomplex			Klasse II Chaperon
<i>Yersinia</i>	YopB	YopD	LcrV	SycD
<i>Pseudomonas</i>	PopB	PopD	PcrV	PcrH
<i>Aeromonas</i>	AopB	AopD	AcrV	AcrH
<i>Shigella</i>	IpaB	IpaC	IpaD	IpgC
<i>Salmonella</i>	SipB	SipC	SipD	SicA

Im Jahr 2012 wurde die Kristallstruktur von SycD ebenfalls mit einem synthetischen Peptid des Translokators YopD⁵⁶⁻⁶⁵ veröffentlicht.⁸⁷ Dieses Peptid enthält das als Bindungsmotiv vorhergesagte Hexapeptid und belegt die Vorhersage von Lunelli *et al.*^{81,87}

**Abbildung 9: Oberflächendarstellung des elektrostatischen Potentials des SycD/YopD-Komplexes**

Negativ geladene Bereiche von SycD sind in rot dargestellt, positiv geladene Bereiche in blau. Das YopD-Peptid ist in gelb dargestellt.⁸⁷

Die Struktur offenbart, dass SycD in Verbindung mit diesem Dekapeptid die alternative Dimerform annimmt, die ursprünglich als weniger favorisiert angesehen wurde.^{47,87} Das YopD-Peptid zeigt ebenfalls eine elongierte Form und befindet sich in einer hydrophoben Kerbe der konkaven Bindungsstelle, die für SycD vorausgesagt wurde. Die TPR-Motive 1 und 2 formen zusammen drei hydrophobe Taschen, in die die konservierten Aminosäurereste Pro⁵⁸, Leu⁶⁰ und Pro⁶³ des Hexapeptids perfekt hineinpassen. Stabilisiert wird der Komplex

Einleitung

zusätzlich durch Wasserstoffbrücken zwischen den zwei innerhalb Klasse II Chaperonen ebenso konservierten Tyrosinresten Tyr40 und Tyr47 von SycD mit Ile61 beziehungsweise Pro58 von YopD und Arg146 der C-terminalen Helix mit Gln56.⁸⁷

Eine Überlagerung der α -Atome der Chaperone der Komplexe von SycD/YopD mit IpgC/IpaB und dem ebenfalls kristallisierten Komplex aus PcrH und einem PopD-Peptid aus *Pseudomonas* zeigt eine fast identische Anordnung mit *r.m.s.d.*-Werten von 1.0 Å respektive 1.2 Å.^{81,86,87} Ein korrespondierendes Peptid des zweiten Translokators PopB aus *Pseudomonas* konnte 2014 ebenfalls mit PcrH kristallisiert werden und zeigt sich in der gleichen Bindungstasche.⁹⁷

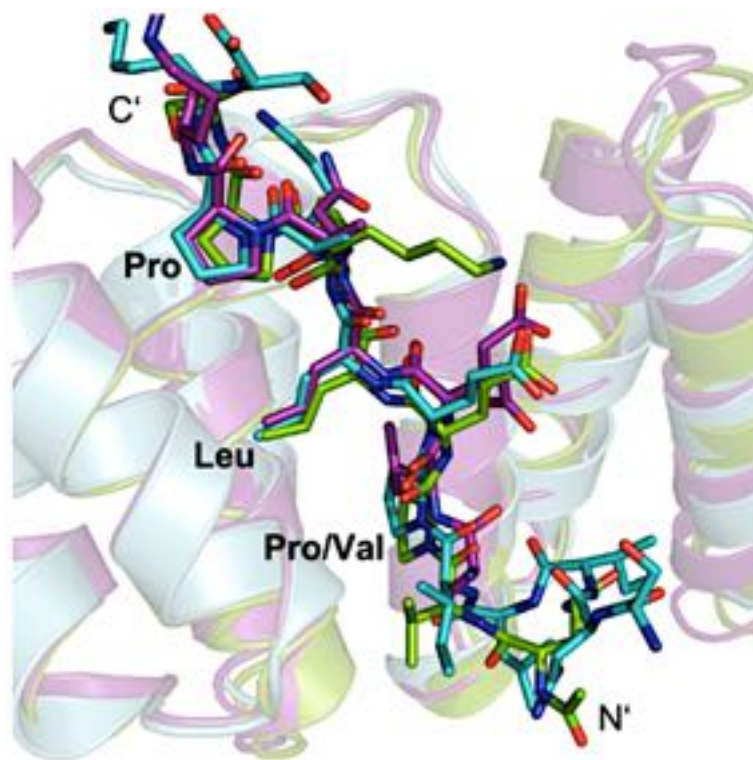


Abbildung 10: Überlagerung der Chaperon Bindungsdomäne der T3SS Translokatoren
Überlagerung der Komplexe aus SycD/YopD (grün), PcrH/PopD (violett) und IpgC/IpaB.⁸⁷

Die Identifizierung des Sequenzmotives, über das die Translokatoren an Klasse II Chaperone binden können, stellt einen Erklärungsansatz dar, dass diese Chaperone beide Translokatoren hochspezifisch binden, die abgesehen von dieser Konsensussequenz keine Sequenzhomologien aufweisen. Da sich gezeigt hat, dass beide Translokatoren in der gleichen Region des Chaperons binden, ist es nahezu ausgeschlossen, dass beide gleichzeitig an das Chaperon binden können und einen ternären Komplex ausbilden.^{86,97}

Obwohl die Diemerisierung für die Funktionalität als essentiell nachgewiesen werden konnte, wurde vermutet, dass die Klasse II Chaperone im Komplex mit den kompletten Translokatoren Heterodimere mit einer Stöchiometrie von 1:1 ausbilden.⁸⁷ Dies konnte kürzlich für den Komplex von AcrH/AopB aus *Aeromonas hydrophila* nachgewiesen werden.⁹⁸

3.4 Die hydrophoben Translokatoren des T3SS: YopB und YopD

Im T3SS von *Y. enterocolitica* gibt es drei Translokatoren (LcrV, YopB und YopD) die zusammen den Porenkomplex bilden. Diese Proteine sind von essentieller Bedeutung für die Injektion der Effektorproteine und somit auch für die Virulenz des Bakteriums.⁵⁹ YopB und YopD wurden 1993 von Håkansson *et al.* aufgrund ihrer vorhergesagten Transmembrandomänen als neue Klasse der Yop-Proteine eingestuft.⁹⁹ Im Gegensatz zu dem hydrophilen LcrV besitzen YopB und YopD einen hydrophoben Charakter und gelten als integrale Membranproteine.¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ Außerdem verfügen beide Translokatoren über eine α -helikale *Coiled-Coil*-Domäne.¹⁵ Die Gene für diese Translokatoren sind zusammen mit denen ihrer spezifischen Chaperone innerhalb des gleichen Operons kodiert.^{15,99}



Abbildung 11: Organisation des *lcrGVH-yopBD* Operons aus *Y.pseudotuberculosis*
Modifiziert nach⁹⁹

Innerhalb der *Yersinia* Spezies *pseudotuberculosis* und *enterocolitica* besitzen die YopB/YopD-Proteine eine Sequenzidentität von 96 % respektive 98 %.⁹⁹ Obwohl die Translokatoren unter den T3SS Familien über einige konservierte Strukturelemente verfügen, gibt es dennoch einige Variationen in ihrem strukturellen Aufbau und ihrer Funktionalität.^{59,105}

Die drei Komponenten des Translokons werden als die ersten Substrate angesehen, die nach dem Zellkontakt durch die Nadel sekretiert werden.¹⁸ Sie sind nicht für die Sekretion sondern vielmehr für die Injektion der Effektorproteine in das eukaryotische Cytoplasma der Wirtszelle von essentieller Bedeutung.^{15,106,107} Wie zuvor erwähnt, bildet LcrV als Spitze der Nadel eine Plattform in pentamerer Anordnung für die Porenbildung der zwei hydrophoben Translokatoren, die sich miteinander assoziiert direkt in die Wirtsmembran einbringen.^{56,58} YopB und YopD können nachweislich den *guanine nucleotide exchange factor* (GEF)

Einleitung

aktivieren und dadurch die Umwandlung der GTPase von seiner inaktiven in die aktive Form stimulieren. Diese wiederum ermöglicht die Porenbildung, führt zur Phagozytose und erlaubt es den Effektorproteinen in die Zelle einzudringen.¹⁰⁸

Der innere Porendurchmesser für YopB/YopD beträgt 2.4-3.2 nm.^{16,101,109} Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem inneren Durchmesser der Nadel, der ebenfalls im Bereich von 2-3 nm liegt.^{16,70} Für die Pore konnte 2011 von Montagner *et al.* eine Größe von 500-700 kDa detektiert werden, was zu 15-20 YopB/YopD-Moleküle passen würde.¹⁶ Eine genaue Struktur und Stöchiometrie der Pore konnte bisher nicht ermittelt werden. Ein Ansatz dazu gelang Thorslund *et al.*, die 2011 mittels Autoradiographie ein Verhältnis von 2.4 YopD- zu einem YopB-Protein in Erythrozytenmembranen nachweisen konnten.¹¹⁰

Innerhalb der Spezies erfolgt eine Unterteilung der beiden hydrophoben Translokatoren in den größeren (*major translocator*, YopB) und den kleineren Translokator (*minor translocator*, YopD).^{15,16,59} Untereinander besitzen die Translokatoren fast keine Sequenzhomologien. Sie zeigen sowohl in der Anwesenheit als auch ohne ihr Chaperon SycD Charakteristika für einen *molten globule* Zustand auf.^{88,111,112} Dies ist erwartungsgemäß, da sie aufgrund ihrer vielseitigen Funktionalität verschiedene Konformationen eingehen müssen. Unter anderem erfolgt eine Trennung vom Chaperon, die partielle Entfaltung für den Transport durch die enge Nadelstruktur und zusätzlich die Oligomerisation während der Porenbildung in der Wirtsmembran.¹⁵ Es wird spekuliert, dass die Translokatoren sich vor ihrem Export teilweise ungefaltet um ihre Chaperone herumwickeln können.¹⁵ Diese Flexibilität der Translokatoren deutet darauf hin, dass es auch für die ausgebildete Pore nicht ausschließlich eine feste Größe und Stöchiometrie gibt, sondern diese ebenfalls wandelbar ist.¹⁶ Experimente zeigen, dass zwar ein Translokator ohne die Anwesenheit des anderen in die Membran eingebracht werden kann, für die entsprechende Funktionalität aber immer beide Translokatoren anwesend sein müssen. In Bezug auf die Assoziation in die Membran zeigt YopD klare Unterschiede zu YopB auf. Während YopB fest in der Wirtsmembran verankert ist, gibt es Hinweise darauf, dass YopD nur locker assoziiert ist.¹⁶

Die Beschaffenheit der Wirtsmembran erscheint als eine tragende Rolle in der bakteriellen Invasion, der Einbringung der Translokatoren und in der Funktionalität des Porenkomplexes.¹¹³ Die Anwesenheit von Cholesterin in der Wirtsmembran konnte zum Beispiel sowohl als notwendig für die bakterielle Adhäsion sowie die Effektortranslokation in EPEC als auch für die Virulenz von *Salmonella* und *Shigella* bestätigt werden.¹¹³ Sowohl IpaB als auch SipB können Cholesterin in hoher Affinität binden.^{114,115} Da Cholesterin

allgegenwärtig in eukaryotischen Membranen ist, könnte die Interaktion mit den Translokatoren eine Erklärung dafür sein, dass sich das T3SS in eine so große Anzahl von Membranen einbringen kann.¹⁵ Auch für andere Komponenten, ebenso wie für den pH-Wert, die Polarität der Membran und eukaryotische Signalmoleküle wie Rac und Rho wird ein Einfluss auf die Porenbildung und Funktionalität vorhergesagt.¹¹⁶⁻¹¹⁸

3.4.1 Struktureller Aufbau und Funktion von YopB

YopB verfügt über eine Größe von 401 Aminosäuren (41.9 kDa) und besitzt als konservierte Strukturelemente unter den Spezies zwei vorhergesagte Transmembrandomänen an den Positionen 165-208 und 224-258 sowie eine N-terminale *Coiled-Coil*-Domäne.^{15,99} Innerhalb der Transmembrandomänen und der verbindenden Region zeigt sich die höchste Sequenzidentität zwischen YopB und seinen Homologen, was darauf hinweist, dass dieser Bereich eine bedeutende Rolle in der Membranassoziation, Porenbildung und Translokation einnimmt.^{15,119,120} Neben seiner Rolle als Translokator löst YopB unter anderem entzündungsfördernde Signalkaskaden aus.¹²¹ Sein Homolog IpaB kann ebenso auch eine Rolle als Effektorprotein einnehmen, da es zum Beispiel die Tötung von Makrophagen unterstützt, was wiederum zur Invasion von *Shigella* in Epithelzellen des Dickdarms führt.^{15,59,105,122}

Im Jahr 2011 konnten Barta *et al.* für die YopB-Homologe IpaB (*Shigella flexneri*) und SipB (*Salmonella enterica*) Kristallstrukturen eines N-terminalen Fragments (IpaB⁷⁴⁻²²⁴, SipB⁸²⁻²²⁶) aufklären.⁸⁵ Diese Strukturen offenbaren *Coiled-Coil*-Motive, die einen hohen Wert an struktureller Homologie aufweisen, obwohl nur 21 % Sequenzhomologie besteht. Dies legt nahe, dass es sich hierbei um ein konserviertes Strukturelement innerhalb der größeren Translokatoren des T3SS handelt und somit potentiell auch auf YopB zutrifft. Der Bereich der *Coiled-Coil*-Domäne ist zudem deutlich größer, als er für die beiden Proteine vorhergesagt wurde (IpaB 110-170, SipB 180-216).⁸⁵

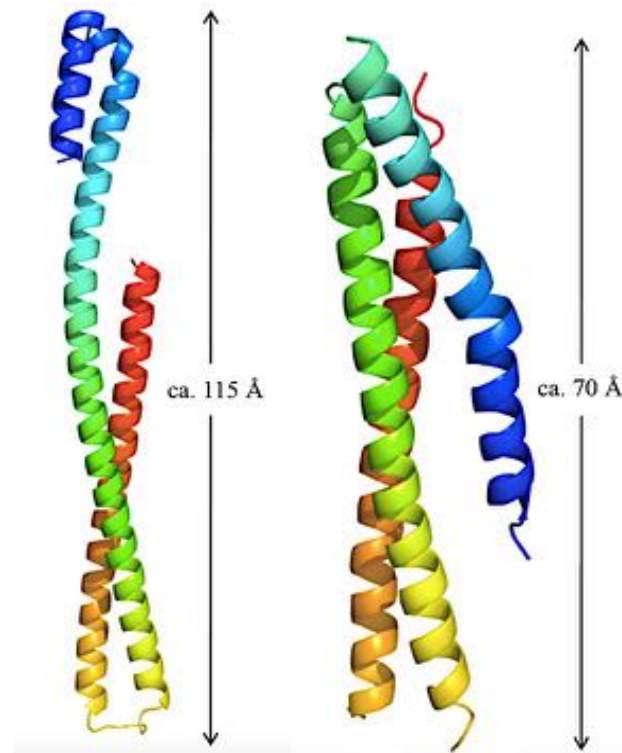


Abbildung 12: Kristallstrukturen der *Coiled-Coil-Domänen* von IpaB74-224 (links) und SipB82-226 (rechts)

Modifiziert nach ⁸⁵

Ende 2015 konnten Nguyen *et al.* die Kristallstruktur des Komplexes aus AcrH und AopB⁴⁰⁻²⁶⁴ aufklären und damit erstmals die Struktur eines Translokators inklusive der *Coiled-Coil*- und der Transmembrandomänen im Komplex mit seinem Chaperon offenbaren.⁹⁸ AcrH und AopB sind die entsprechenden Homologe von SycD beziehungsweise YopB aus *Aeromonas hydrophila* AH-1 und gehören ebenso zu der Ysc Familie der T3SS. AcrH und AopB⁴⁰⁻²⁶⁴ bilden ein Heterodimer in der Stöchiometrie 1:1 aus. Es konnte gezeigt werden, dass AopB⁴⁰⁻²⁶⁴ neben der zuvor erwähnten Konsensussequenz⁸¹ im N-Terminus auch die *Coiled-Coil*-Domänen sowie die Transmembrandomänen für die Interaktion zu AcrH einsetzt.⁹⁸ AcrH hingegen zeigt Bindung zu AopB⁴⁰⁻²⁶⁴ über die konkave und konvexe Bindungsstelle sowie die N-terminale Helix. Weiterhin wurde offenbart, dass die Transmembrandomänen von AopB⁴⁰⁻²⁶⁴ je zwei Paare von α -helikalen Haarnadelstrukturen formen, die sich nach der Trennung vom Chaperon in die Membran einbringen, während die *Coiled-Coil*-Domänen des N-Terminus sowie des C-Terminus im extrazellulären Raum verbleiben, um mit dem Spitzenkomplex der Nadelstruktur zu interagieren.⁹⁸ Es wurde postuliert, dass der komplette N-Terminus von AopB für die Einbringung in die Membran erforderlich ist. Bei dem für die

Kristallisation verwendeten Konstrukt wurde dieser jedoch vor dem Aminosäurerest Nummer 40 abgeschnitten und konnte in der Kristallstruktur nicht gezeigt werden.⁹⁸

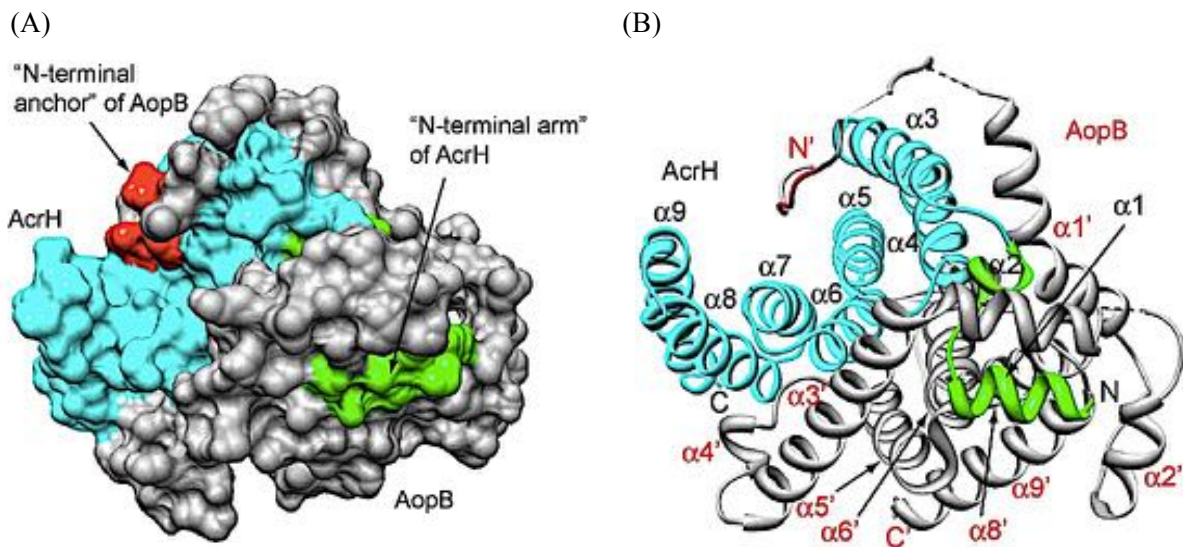


Abbildung 13: Kristallstruktur des Komplexes aus AopB40-246/AcrH

Oberflächendarstellung (A) und *Ribbon*-Darstellung (B) des Komplexes aus AcrH (hellblau/grün) und AopB₄₀₋₂₆₄ (grau/rot). Modifiziert nach⁹⁸

Die Struktur von AcrH überlagert sich eng mit den zuvor gelösten Strukturen von SycD, PcrH und IgpC und die Konsensussequenz fügt sich in gleicher Weise in das Chaperon wie für die Peptide zuvor gezeigt wurde.^{81,86,87,97,98} Desweiteren ist der N-Terminus von AcrH ein wichtiger Bestandteil der Interaktion zu AopB.⁹⁸ YopB weist eine Sequenzidentität von 46 % zu AopB auf, daher kann davon ausgegangen werden, dass weite Teile dieses Modells auch auf die Struktur von YopB zutreffen.

3.4.2 Struktureller Aufbau und Funktion von YopD

YopD ist 306 Aminosäuren lang (33.2 kDa) und verfügt im Gegensatz zu YopB nur über eine vorhergesagte Transmembrandomäne (Position 122-152), eine *Coiled-Coil*-Domäne (250-275) und eine C-terminale amphipathische Helix (278-292).^{15,105,123} Diese Helix spielt eine Rolle in der Interaktion mit LcrV und ist ebenso notwendig für die Oligomerisierung von YopD, spielt aber keine Rolle in der Erkennung von YopB.^{58,124} Zusätzlich konnten Interaktionen zwischen dieser Helix und dem entsprechenden Chaperon nachgewiesen werden.¹²⁴ YopD wird eine Funktion als Brückenverbindung zwischen dem Spitzenkomplex und YopB nachgesagt. Hochoflösende Strukturen sind für YopD nur für das Peptid im

Einleitung

Komplex mit SycD verfügbar.⁸⁷ Zudem konnte die amphipathische Helix 2002 mittels NMR Spektroskopie von Tengel *et al.* aufgeklärt werden.¹²⁴

Der kleinere der hydrophoben Translokatoren ist hochkonserviert unter den Spezies, so weist YopD 38 % Sequenzidentität zu PopD (*Pseudomonas*) und ebenso 29 % zu IpaC und SipC (*Shigella* und *Salmonella*) der Inv-Mxi-Spa Familie auf.¹⁵ Es konnten zum Beispiel Abschnitte von YopD und PopD ausgetauscht werden, ohne die Sekretion zu beeinflussen.¹²⁵⁻¹²⁷ Für PopD und IpaC konnte gezeigt werden, dass diese über teilweise unstrukturierte Bereiche verfügen, was ein voraussetzender Faktor für die Bindung und darauffolgende Trennung ihres Chaperons sowie deren Sekretion sein könnte. YopD ist multifunktionell und einer der bestimmenden Faktoren der *Yersinia* Virulenz.^{123,128} YopD nimmt sowohl strukturellen als auch regulatorischen Einfluss auf den sehr spezifisch organisierten Export der Effektoren in die Wirtszelle.^{99,101,129-132} Durch Komplexbildung mit SycD kann YopD die Expression der Effektoren sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene regulieren.^{108,133,134} In Mutationsstudien im Bereich der *Coiled-Coil*-Domäne konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich für die korrekte Einbringung in die Plasmamembran ebenso notwendig ist wie für die vollständige Virulenz, da sich sämtliche Mutationen, unabhängig von ihrer Fähigkeit Poren in der Membran auszubilden, als avirulent erwiesen.¹⁰⁵ Es konnte allerdings ebenso gezeigt werden, dass Mutationen in diesem Bereich keinen Einfluss auf die Oligomerisationsfähigkeit von YopD hat.¹⁰⁵ Geringe Mengen von YopD konnten zudem im Cytosol der Wirtszelle nachgewiesen werden, was auf eine Funktionalität als Effektor hinweist.¹⁰⁵

Für das YopD-Homolog SipC konnte neben der Porenbildung eine Funktion als Nukleationsinitiator für Actin nachgewiesen werden.¹³⁵ Zusätzlich kann SipC Exo70 rekrutieren und ermöglicht darüber die Fusion von exozytotischen Vesikeln mit der Plasmamembran, was die Invasionseffizienz von *Salmonella* erhöht.¹³⁶ Sowohl SipC als auch IpaC spielen eine Rolle in der Aufnahme durch Makrophagen und können Zellauswüchse in deren Membranen induzieren.^{125,137}

3.5 Effektorproteine des T3SS

Sobald der Porenkomplex im T3SS ausgebildet wurde, werden die Effektorproteine mit Hilfe von LcrV, YopB und YopD in das Cytoplasma der Wirtszelle transloziert. Dort greifen die Effektoren verschiedene wirtseigene Proteine an, stimulieren sich gegenseitig oder führen

antagonistische Prozesse durch, indem sie zum Beispiel intrazelluläre Enzyme aktivieren oder den programmierten Zelltod auslösen.^{108,138} Die Expression dieser Proteine wird durch YopD, SycD und YscM1 sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene reguliert.^{132,133,139-141} Die Erhöhung des Levels von YscM1 im bakteriellen Cytoplasma führt zu einer Unterdrückung des T3SS.¹⁴⁰ YopD und SycD hingegen bilden einen Komplex, der durch Bindung an das 5'-Ende der mRNA der T3SS-Gene deren Bindung zum Ribosom verhindert und damit die Translation der mRNA einschränkt.^{108,132-134} Diese Regulierungsmechanismen sind Calcium-abhängig, da eine Erhöhung der Calcium-Konzentration die Verringerung der Proteinexpression nach sich zieht.^{59,142}

3.5.1 Immunmodulierende Effektoren

Die Effektorproteine verändern unter anderem intrinsische Signale in der Wirtszelle und stören dadurch die angeborene Immunreaktion des Wirtes.^{143,144} Sie sorgen somit für das Überleben und die Ausbreitung der Bakterien. Intrazelluläre Proteine wie Rho-GTPasen und Transmembran-Rezeptoren spielen eine Rolle in der Pathogenese von *Yersinia* da sie durch Interaktion mit den Effektorproteinen für eine Verbindung des pathogenen Prozesses mit der Signalübertragung sorgen.^{108,145} Die sechs immunmodulierenden Effektorproteine in *Y. enterocolitica* sind YopM, YopE, YopH, YopP, YopO und YopT.¹⁴⁶ Sie unterbrechen jeweils an bestimmten Stellen die Signalwege der Wirtszelle im Cytosol und können das Zytoskelett kontrahieren sowie die Zellembryon auseinanderbrechen und Autophagozytose bewirken.^{143,147} Obwohl die Effektoren an unterschiedlichen Punkten angreifen, müssen sie alle im Zusammenspiel funktionieren, um die vollständige Pathogenität von *Yersinia* entfalten zu können.

Die Acetyltransferase YopP (YopJ in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*) kann zum Beispiel durch Modulation der NF- κ B- und MAPK-Signalwege die Expression der Zytokine supprimieren und damit Apoptose einleiten.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ YopH ist eine hochaktive Tyrosinphosphatase, der der Hauptanteil an der Inhibierung der Phagozytose in *Yersinia* zugesprochen wird.^{144,151} Die Substrate von YopH sind unter anderem FAK (*focal adhesion kinase*), Paxillin, p130Cas und FyB (*Fyn-binding protein*), deren Dephosphorylierung zur Zerstörung der Aktinstrukturen und des fokalen Adhäsionskomplexes führt.^{147,151,152} YopM hingegen ist ein Gerüstprotein, das aus Leucin-reichen Wiederholungen besteht (LRR-Protein).¹⁵³ YopM zeigt immunsuppressive Aktivität auf und aktiviert die cytoplasmatischen

Einleitung

Kinasen RSK1 (*ribosomal S6 protein kinase*) und PRK2 (*protein kinase C-related kinase 2*), wodurch der Caspase-1 Signalweg inhibiert wird.^{144,154} Die Effektorproteine YopT, YopE und YopO (YpkA in *Y.pseudotuberculosis*) können ebenfalls wie YopB und YopD Interaktionen mit GTPasen eingehen, bewirken so auf unterschiedliche Art und Weise deren Inaktivierung und tragen damit zur Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts bei.^{108,155-158} YopE wird zusätzlich eine Rolle in der Regulierung der Translokation zugesprochen.¹⁵⁹ Für eine direkte Interaktion mit dem Porenkomplex konnte aber bisher kein Anzeichen gefunden werden, so dass von einem indirekten Einfluss durch Manipulation des Zytoskelettes ausgegangen wird.^{18,160}

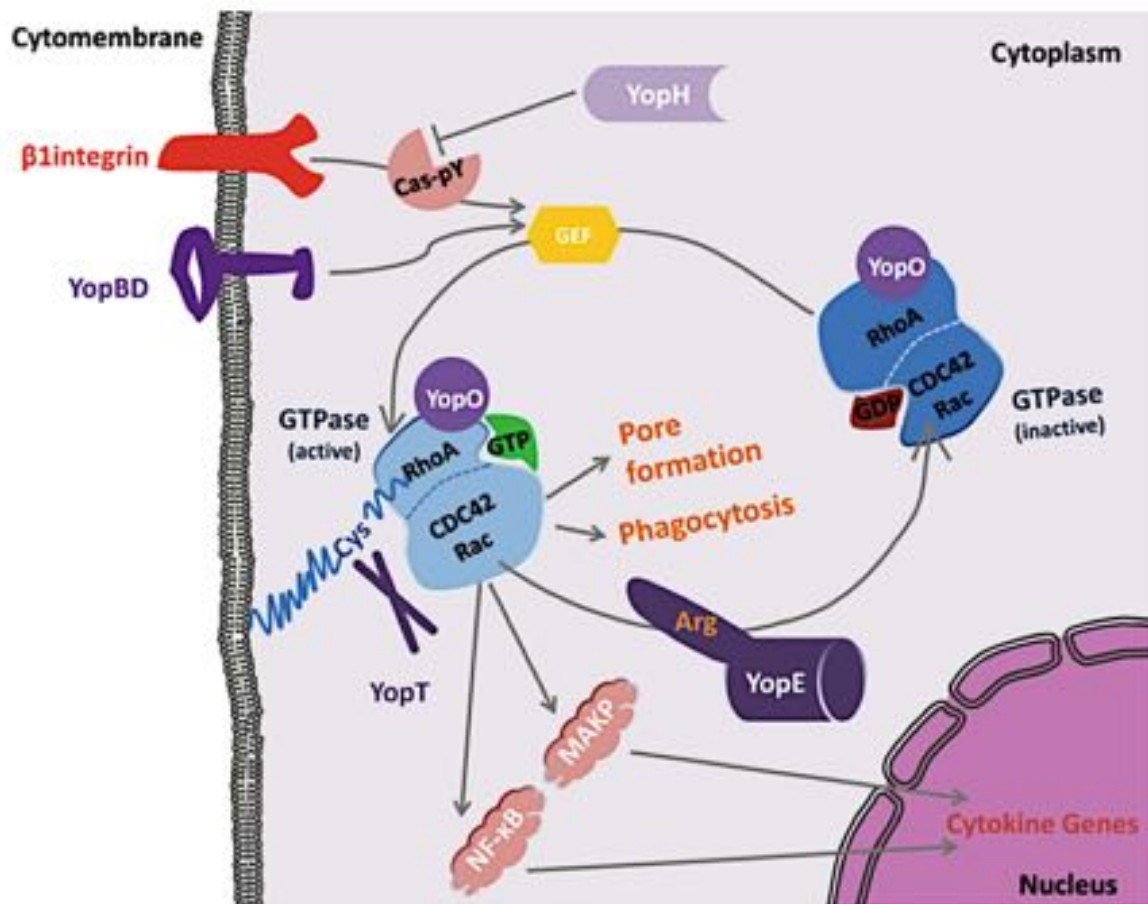


Abbildung 14: Interaktionen der Yop-Proteine mit GTPasen
Schematische Darstellung der Yop-Proteine in Interaktion mit GTPasen in der Wirtszelle.¹⁰⁸

3.5.1 Effektorprotein YopQ

Ein weiteres Effektorprotein, das über das T3SS in die Wirtszelle transloziert wird, ist YopQ. Dieser Effektor kommt in allen drei pathogenen *Yersinia* Spezies vor (YopK in *Y.pseudotuberculosis* und *Y.pestis*) und weist untereinander einen hohen Grad an Sequenzhomologie auf.¹⁶¹⁻¹⁶⁶ Daher wird auch von einer identischen Funktionalität

ausgegangen. Wie bei anderen T3SS Effektorsubstraten auch, wird die Expression von YopQ über Calcium und die Temperatur reguliert.¹⁶³⁻¹⁶⁶ YopQ verfügt über ein N-terminales Sekretionssignal, das in den Aminosäuren 1-10 liegt, allerdings konnte gezeigt werden, dass dieses Signal auf mRNA Ebene liegt.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ Dies äußerte sich in der Beobachtung, dass Punktmutationen, die nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führten, dennoch die Sekretion von YopQ verhinderten. In den Codons der Aminosäuren 11-15 sind zusätzliche Sekretionsinformationen gespeichert. Diese Codons reichen zwar allein nicht für die Sekretion aus, können aber Mutationen in den ersten zehn Codons supprimieren.^{167,168} Ein spezifisches Chaperon konnte für YopQ nicht identifiziert werden.¹⁷¹ Studien belegen auch, dass YopQ keines benötigt.¹⁷²

Für YopQ konnte bisher keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.^{162,173} Erst 2006 gelang es YopQ/K während der Infektion in der Wirtszelle nachzuweisen und damit dessen Translokation zu belegen.¹⁷⁴ Es wird vermutet, dass YopQ/K aufgrund seines geringen Expressionslevels in früheren Studien unterhalb der jeweiligen Detektionsgrenze lag und daher lange Zeit nicht nachgewiesen werden konnte.¹⁶² Bereits 1997 konnte gezeigt werden, dass es in *Y.pestis* Infektionen mit *yopK* Mutanten zu einer schnelleren Ausbreitung der Cytotoxizität in der Wirtszelle kommt, während diese bei einer Überexpression von YopK deutlich eingeschränkt ist.¹⁷⁵ Die Effektorproteine YopE und YopH konnten mittels Immunfluoreszenz in der *yopK* Mutante vermehrt und bei Überexpression gar nicht nachgewiesen werden.¹⁷⁵ Dies war ein erster Hinweis darauf, dass YopQ/K eine tragende Rolle in der Regulation der Translokation spielt. Unterstützt wird dieser Ansatz dadurch, dass YopQ/K weder in der Transkription noch in der Expression der Effektoren involviert ist.^{175,176} Es wurde ebenfalls vorhergesagt, dass YopQ/K einen Einfluss auf die Größe der Translokationspore hat und diese kontrollieren kann.¹⁷⁵ Für die Bildung des Porenkomplexes ist YopQ/K jedoch nicht von Bedeutung und es gibt auch noch keine eindeutigen Beweise für diesen regulatorischen Effekt, der sich ebenfalls auf die Translokation auswirken würde.⁶⁸ Mit Hilfe eines Bla Reporter-Systems konnten im Gegensatz zum *Y.pestis* Wildtyp in einer *yopK* Mutante deutlich mehr YopM-Bla Reporter detektiert werden, diese wurden zusätzlich in höherer Geschwindigkeit injiziert.^{160,177} Dies bestätigte die Rolle von YopQ/K bei der Injektion von Effektorproteinen. Zusätzlich wurde mit Hilfe einer nichtinjizierbaren YopK-Variante dargelegt, dass YopQ/K zunächst selbst in die Wirtszelle transloziert werden muss, um zur Regulierung der Translokation beitragen zu können.^{18,68,160} Daraufhin wird höchstwahrscheinlich ein Signal zurück ins Bakterium übermittelt, welches die Translokation

Einleitung

herunterreguliert. In unterschiedlichen Studien konnte eine Verbindung zwischen YopQ/K und dem Porenkomplex nachgewiesen werden. Die Daten von Thorslund *et al.*¹¹⁰ und Dewoody *et al.*⁶⁸ zeigen eine direkte Interaktion mit YopD aber nicht mit YopB. Für YopQ/K wird eine ähnliche Aufrechterhaltung der Substratspezifität wie für YopN vorhergesagt.⁶⁸ Während YopN durch eine Blockade dafür sorgt, dass nur die Translokatorsubstrate sekretiert werden, vermittelt YopQ/K die akkurate Sekretion der Effektorproteine in die Wirtszelle. Diese Tatsache zeigt die Funktionalität für YopQ/K sowohl in Bezug auf die Translokationsrate als auch auf die Substratspezifität der translozierten Effektoren. Eine Mutation in YopK (D46A) verhinderte die Regulierung nicht aber die Spezifität der Translokation. Die Mutante ist noch in der Lage YopD zu assoziieren und behält damit die Fähigkeit mit dem Porenkomplex in Interaktion zu treten. Andererseits wird durch direkte Expression von YopK in der Wirtszelle bei Infektion mit einer *yopK* Mutante die Regulierungsfunktion Aufrecht erhalten, ohne jedoch verhindern zu können, dass weiterhin die Translokatoren sekretiert werden.^{18,68,110}

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide Prozesse unabhängig voneinander ablaufen können. Für die regulatorische Funktionalität von YopQ/K gibt es derzeit zwei verschiedene Modelle, die von Dewoody *et al.* vorhergesagt wurden.⁶⁸

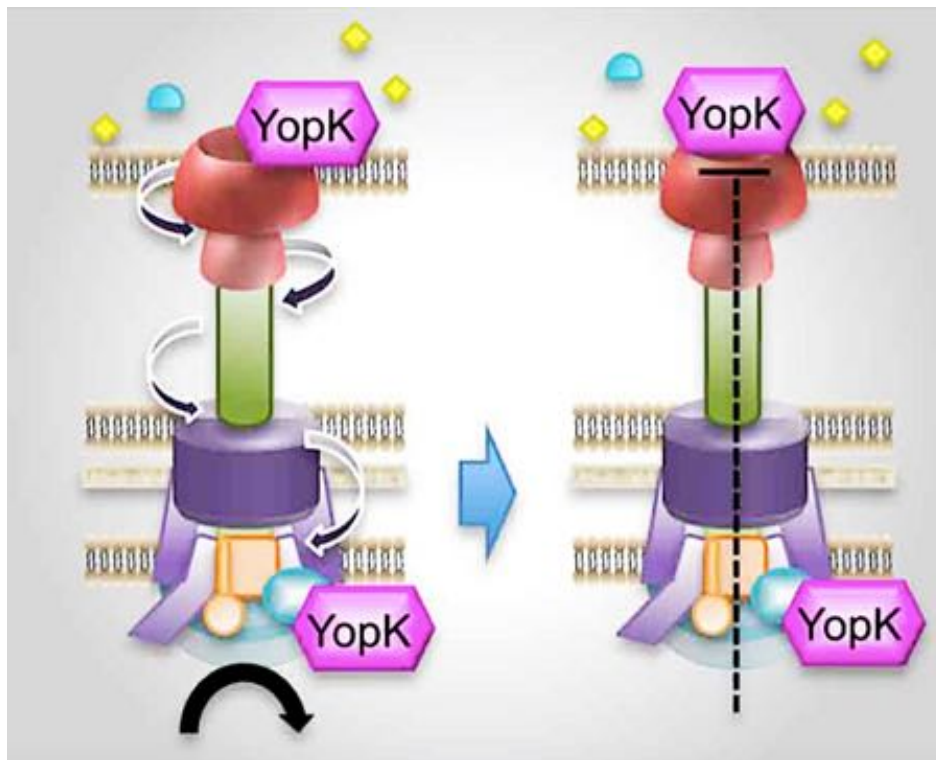


Abbildung 15: Modellvorhersagen für die Funktion von YopQ/K

Schematische Darstellung des Signalkaskaden-Modells sowie des Stopfen-Modells als Vorhersage der Funktion von YopQ/K als Translokationsregulator. Modifiziert nach¹⁸

Im ersten Fall interagiert YopQ/K mit dem Porenkomplex und leitet eine Kaskade von Konformationsänderungen ein, wodurch ein Signal zum Basalkörper übermittelt wird, das den Export weiterer Effektoren inhibiert. Im zweiten Modell bindet YopQ/K an den Porenkomplex und agiert dort als eine Art Stopfen, um den Sekretionskanal zu blockieren.¹⁸ Da die YopK (D46A)-Mutante, die keinen regulatorischen Einfluss mehr aufwies, jedoch noch fähig war an YopD zu binden, wird das erste Modell favorisiert.^{18,160}

Der genaue Mechanismus der Regulierung und Einhaltung der Spezifität verbleibt weiterhin unklar, ebenso ob und wenn ja über welche Proteine YopQ mit dem Basalkörper assoziiert ist und wie genau regulatorische Signale übermittelt werden können. Auch wie das Zusammenspiel von YopQ mit anderen Regulatoren wie zum Beispiel YopE funktioniert, verbleibt offen. Für ein detaillierteres Verständnis der Regulationsmechanismen müssen diese Punkte weiterhin untersucht werden.

3.6 Zielsetzung

Das T3SS ist ein konservierter Virulenzfaktor, der in unterschiedlichen gram-negativen Bakterien vorkommt und für deren Pathogenität entscheidend ist. Über das T3SS können Effektorproteine direkt in die eukaryotische Wirtszelle übermittelt werden und lösen dort eine Reihe von Reaktionen aus. Durch eine Inhibierung des T3SS kann potentiell die Infektiösität und Pathogenität der gram-negativen Bakterien reduziert werden.

Die vier Zielproteine, die in dieser Arbeit untersucht wurden, repräsentieren verschiedene, putative Angriffspunkte innerhalb des T3SS. Sie sind alle essentiell für die Virulenz des Systems, da sie entscheidend an der Injektion der Effektorproteine beteiligt sind. Zusätzlich spielen sie eine Rolle in der Regulierung der Translokation. Die Inhibierung einer dieser Punkte könnte zum Verlust der gesamten Pathogenität führen.

Zu Beginn der Forschungsarbeit gab es keinerlei hochauflösenden Strukturdaten zu den Proteinen YopB, YopD, und YopQ. Daher sollten im Rahmen der Promotionsarbeit für diese Proteine des T3SS aus *Yersinia enterocolitica* zunächst passende Konstrukte identifiziert, kloniert und systematisch in bakteriellen Expressionssystemen getestet werden. Ein geeignetes Reinigungsprotokoll sollte etabliert werden, um die Zielproteine löslich und in hoher Reinheit zu produzieren und anschließend strukturell zu charakterisieren.

Zusätzlich sollten die Translokatorproteine YopB und YopD hinsichtlich ihrer Interaktion mit ihrem Chaperon SycD untersucht werden. Klasse II Chaperone des T3SS sind von großer Bedeutung für die bakterielle Virulenz. Liganden, die deren Bindungsstelle blockieren und die Interaktion zwischen den Chaperonen und ihren Translokatoren unterbinden, sind ebenso ein Ansatzpunkt in der Entwicklung antibakterieller Wirkstoffe.

Diese Arbeit ist mit der Struktur-Funktions-Analyse ausgewählter Proteine des T3SS aus *Yersinia enterocolitica* in ein übergeordnetes Forschungsthema des Hamburg Centre of Ultrafast Imaging (CUI) eingebunden, dies steht in direkter Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Aepfelbacher am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

4 ERGEBNISSE

4.1 YopQ

4.1.1 Klonierung und initiale Expressionsversuche in *E.coli*

Da es zu Beginn dieser Arbeit an jeglichen strukturellen Informationen über YopQ fehlte, sollte zunächst das komplette Proteinkonstrukt kloniert und untersucht werden. Hierfür wurde es in zwei verschiedene Vektorsysteme eingebracht, um YopQ als Fusionsprotein mit N-terminalem *(His)₆-tag* (pRSET A) respektive mit N-terminalem *GST-tag* (pGEX-4T-1) herzustellen.

Im ersten Schritt der Klonierung wurde der genomische DNA-Abschnitt von YopQ mittels PCR amplifiziert. Durch ein speziell angefertigtes Oligonukleotidpaar wurden sowohl Restriktionsschnittstellen für die beiden Endonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI als auch eine TEV-Protease-Schnittstelle vor dem N-Terminus in die Gensequenz eingefügt. Der Erfolg der DNA-Amplifikation wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Für das zu amplifizierende DNA-Fragment wurde eine Größe von 579 Nukleotiden erwartet.

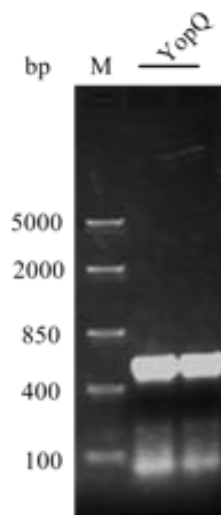


Abbildung 16: Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte auf einem 1%igen Agarosegel.

Spur 1 und 2: amplifiziertes PCR-Produkt, M: *FastRulerTM Middle Range DNA Ladder*.

In beiden Spuren ist deutlich ein amplifiziertes DNA-Fragment zu erkennen, dessen Größe etwas oberhalb der 400 bp-Markerbande den Erwartungen entspricht. Die PCR war demnach erfolgreich und die DNA wurde mit Hilfe des *peqGold Gel Extraction Kit* über eine Silikatmembran gereinigt.

Ergebnisse

Mit dem gereinigten PCR-Produkt sowie den beiden Expressionsvektoren pRSET A und pGEX-4T-1 wurde eine Restriktion mit den Endonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI durchgeführt und die generierten Produkte wurden erneut mit dem *peqGold Gel Extraction Kit* gereinigt. Es folgte die Ligation der Gensequenz in die jeweiligen Vektorsysteme. Der Ligationsansatz wurde direkt im Anschluss verwendet, um *E.coli* XL10 Gold-Zellen zu transformieren und somit die zuvor hergestellten Expressionsplasmide zu amplifizieren. Es folgte die Plasmidpräparation aus Einzelkolonien mit dem *peqGold Plasmid Miniprep Kit*.

Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA überprüft. Es konnte verifiziert werden, dass die Gensequenzen der hergestellten Konstrukte vollständig mit den Zielsequenzen übereinstimmten.

Um lösliches Protein zu generieren, wurden die Gensequenzen von YopQ unter Variation verschiedener Parameter in je acht unterschiedlichen *E.coli* Bakterienstämmen testexprimiert. Für das YopQ-Konstrukt im pRSET A-Vektor konnte für keinen dieser Bakterienstämme ein positives Ergebnis erzielt werden. YopQ als Fusionsprotein mit N-terminalem (*His*)₆-tag war folglich nicht geeignet für die rekombinante Genexpression in *E.coli*-Zellen. Die verschiedenen Testexpressionen des Fusionsproteins aus YopQ mit N-terminalem *GST*-tag zeigten sich lediglich bei Verwendung der BL21 (DE3) Rosetta-Zellen erfolgreich. Eine signifikante Überexpression konnte hierbei sowohl für die Expression bei 37 °C und über einen Zeitraum von vier Stunden als auch bei 20 °C über Nacht detektiert werden. Nachfolgend wurde ausschließlich dieser Bakterienstamm für die rekombinante Genexpression von YopQ als Konstrukt mit *GST*-tag (YopQ-GST) verwendet.

4.1.2 Expression, Reinigung und Optimierung der proteolytischen Spaltung des *GST*-tags

Die Expression von YopQ-GST erfolgte wie oben beschrieben. Es wurden vier Kolben mit jeweils 1 L –Expressionskultur angesetzt und nach erfolgter Induktion für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. In der folgenden Abbildung ist beispielhaft das Ergebnis einer SDS-PAGE-Analyse der Expression von YopQ-GST in BL21 (DE3) Rosetta-Zellen dargestellt. Das Molekulargewicht des YopQ-Fusionsproteins mit *GST*-tag beträgt 47.2 kDa.

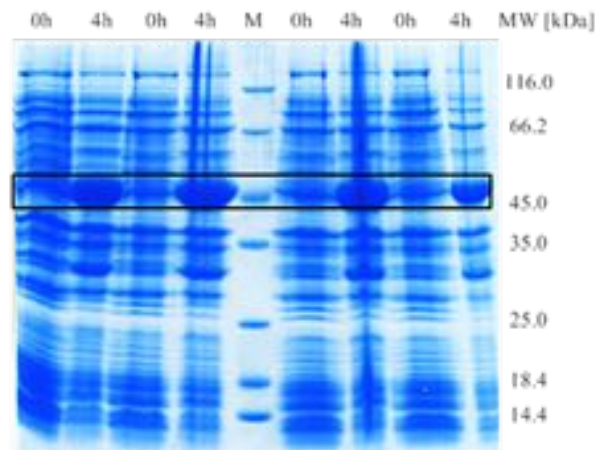


Abbildung 17: SDS-PAGE-Analyse, Expressionsprofil von YopQ-GST auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.

0h: Zellkultur zum Zeitpunkt $t = 0$ h, 4h: Zellkultur zum Zeitpunkt $t = 4$ h, M: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*. Die Banden des Zielproteins sind markiert.

Nach vier Stunden ist eine signifikante Überexpression des Zielproteins im erwarteten Molekulargewichtsbereich etwas oberhalb der 45.0 kDa-Bande des Proteingrößenstandards zu erkennen.

Der Aufschluss der geernteten Zellpellets wurde, wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, durchgeführt und es folgte eine affinitätschromatographische Reinigung über Glutathion-Agarose-Matrix. In den ersten Versuchen wurde YopQ-GST als Fusionsprotein mit Elutionspuffer von der Matrix eluiert und die anschließende proteolytische Spaltung des *GST-tags* erfolgte durch Zugabe von TEV-Protease und Inkubation bei 4 °C und zum Vergleich bei Raumtemperatur über Nacht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

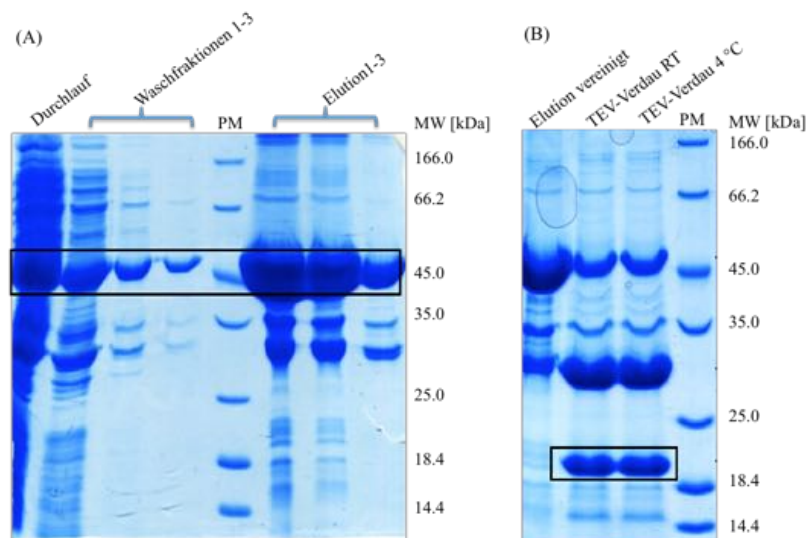


Abbildung 18: SDS-PAGE-Analyse, Reinigung von YopQ-GST (A) und anschließender TEV-Verdau (B) jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.

(A): Einzelne Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung von YopQ-GST. Das Zielprotein ist markiert und oberhalb der 45.0 kDa-Bande des PM zu sehen. Große Mengen löslichen Proteins finden sich in den Elutionsfraktionen. (B): Analyse des TEV-Verdaus bei RT und bei 4 °C. Das Zielprotein ist markiert und befindet sich oberhalb der 18.4 kDa-Bande des PM. Es ist kein Unterschied in der Proteinausbeute zwischen den beiden Temperaturen zu erkennen. PM: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*.

Ergebnisse

Das Molekulargewicht von YopQ beträgt 20.8 kDa. Auf dem rechten Polyacrylamidgel (B) sind neben dem gewünschten Zielprotein noch weitere stark ausgeprägte Banden zu sehen. Die Bande zwischen der 25.0 kDa- und der 35.0 kDa-Markerbande korrespondiert mit dem Molekulargewicht des *GST-tags* (26.4 kDa) sowie dem der TEV-Protease (27.0 kDa) und oberhalb der 45.0 kDa-Bande ist ungeschnittenes YopQ-GST erkennbar. Um die Reinheit des Zielproteins zu erhöhen, wurde die Reinigungsstrategie optimiert und die proteolytische Spaltung wurde von nun an nach den ersten zwei Waschschrritten direkt auf der Säule durchgeführt. Während der *GST-tag* an die Matrix gebunden vorlag, wurde YopQ mittels TEV-Protease von diesem gespalten. Der gesammelte Durchlauf nach erfolgter Inkubation enthielt nun das geschnittene YopQ während der *GST-tag* sowie eventuell vorliegendes, ungeschnittenes YopQ nachfolgend separat von der Matrix eluiert wurden. Da immer noch leichte Verunreinigungen zu erkennen waren, erfolgte ein zweiter Reinigungsschritt der vereinigten Lösungen aus dem 2. Durchlauf und den Waschfraktionen 2.1 und 2.2 mittels Größenausschlusschromatographie. Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analysen sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

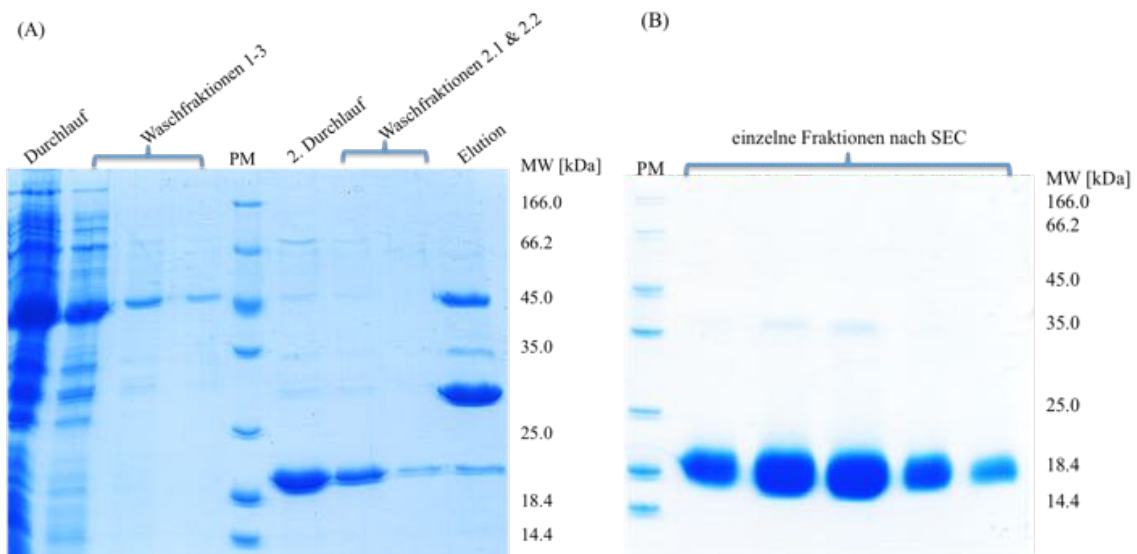


Abbildung 19: SDS-PAGE-Analyse, Reinigung und proteolytische Spaltung des *GST-tags* (A) und anschließende Größenausschlusschromatographie (B) jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel. (A): Einzelne Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung von YopQ-GST mit integriertem TEV-Verdau. (B): Analyse einzelner Fraktionen der Größenausschlusschromatographie, in denen YopQ eindeutig und in hoher Reinheit oberhalb der 18.4 kDa-Bande detektierbar ist. PM: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*.

Im Laufe der Arbeit wurde YopQ in den Vektor pGEX-6P-1 umkloniert, der im Gegensatz zum vorher verwendeten Vektor pGEX-4T-1 über eine *PreScission* Protease Schnittstelle verfügt. Die proteolytische Spaltung mit dieser Protease erfolgte analog zur TEV-Protease.

Der Vorteil an dieser Variante bestand darin, dass die *PreScission* Protease ebenfalls über einen *GST-tag* verfügt und somit während der proteolytischen Spaltung selber an die Glutathion Matrix bindet, was zu einer erhöhten Reinheit des Proteins führte.

Die SDS-PAGE-Analyse zeigt, dass YopQ in einem hohen Maß an Reinheit hergestellt werden konnte. Die Größenausschlusschromatographie erfolgte auf einer mit Standardproteinen kalibrierten Superdex 200 16/600 *prep grade*. Ein Vergleich des Retentionsvolumens von YopQ (91.2 mL) mit der Kalibriergeraden ergab ein kalkuliertes Molekulargewicht von 21.3 kDa. Dadurch konnte gezeigt werden, dass YopQ in einem monomeren Zustand vorlag.

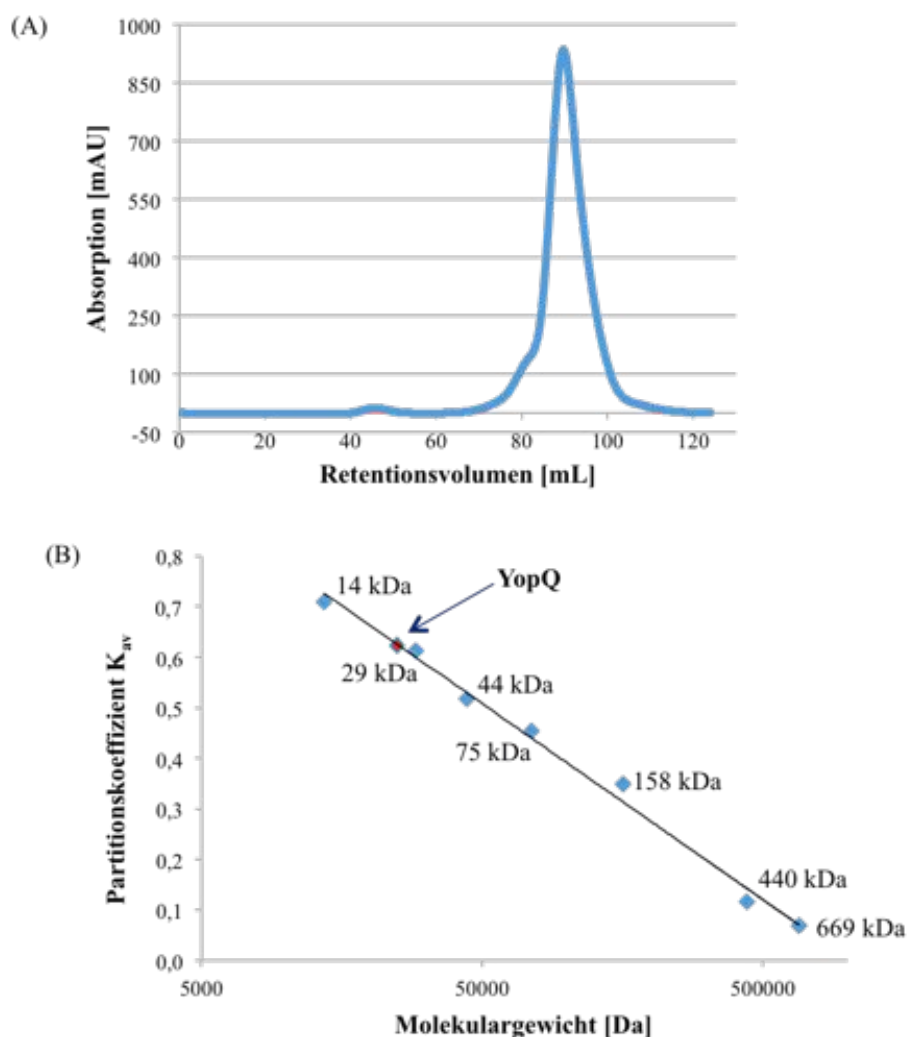


Abbildung 20: Größenausschlusschromatographie YopQ.

(A) Retentionsprofil der Größenausschlusschromatographie von YopQ mit einer Superdex 200 16/600 *prep grade* Säule. (B) Kalibriergeraden der Superdex 16/600 *prep grade* Säule mit folgenden Standardproteinen: Ribonuklease A (14 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Conalbumin (75 kDa), Aldolase (158 kDa), Ferritin (440 kDa).

Ergebnisse

Die einzelnen Fraktionen der Größenausschlusschromatographie, die eine hohe Reinheit aufwiesen, wurden vereinigt und für die anschließende Charakterisierung verwendet.

4.1.3 Initiale Charakterisierung

Um einen Eindruck über die Dispersität des Proteins in Lösung zu gewinnen und um die Annahme eines monomeren Zustandes zu bestätigen, wurden nach dem letzten Reinigungsschritt DLS-Messungen durchgeführt. Hierfür wurde die Proteinlösung zunächst auf 2 mg/mL konzentriert und anschließend für eine Stunde bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die DLS-Messungen zeigten einen hydrodynamischen Radius von $2.3 \text{ nm} \pm 0.1 \text{ nm}$ auf, woraus sich unter der Annahme eines globulären Proteins ein berechnetes Molekulargewicht von 22 kDa ergab. Des Weiteren konnte eindeutig eine monodisperse Lösung identifiziert werden.

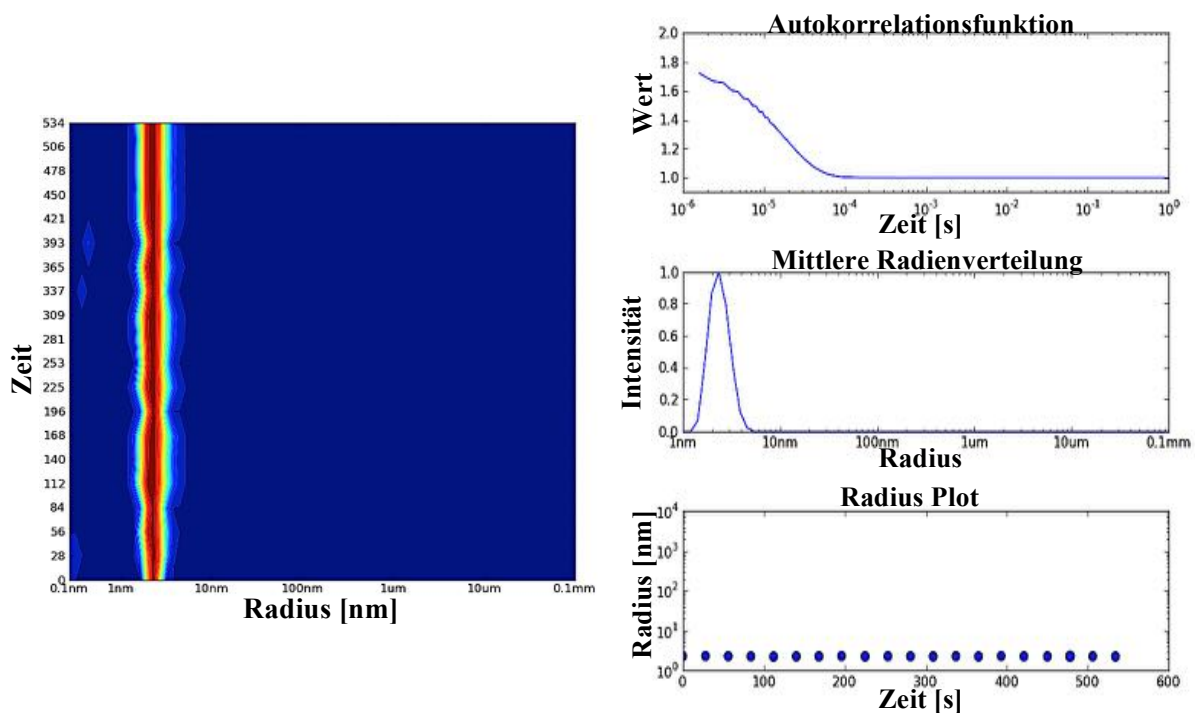


Abbildung 21: Ergebnisse der DLS-Messungen von YopQ

Linke Seite: Radienverteilung der DLS-Messung, der Radius ist in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Rechte Seite: Hier sind Autokorrelationsfunktion des DLS-Signals, die mittlere Radienverteilung und der Radiusplot, bei dem der Radius gegen die Zeit aufgetragen ist, dargestellt. Die DLS-Messungen zeigen ein monodisperses Signal und der hydrodynamische Radius weist eindeutig auf einen monomeren Zustand des Proteins in Lösung hin.

Zur weiteren strukturellen Untersuchung des Proteins wurden CD-spektroskopische Messungen durchgeführt. Die Proteinkonzentration hierfür betrug 0.4 mg/mL, es wurden 15

Proteinspektren über einen Wellenlängenbereich von 190-260 nm aufgenommen und akkumuliert. Zusätzlich wurden vom korrespondierendem Messpuffer je fünf Spektren aufgenommen und anschließend vom Proteinsignal subtrahiert. Die CD-Messungen konnten einen gefalteten Zustand des gereinigten Proteins verifizieren. Eine Sekundärstrukturvorhersage nach dem Algorithmus von Yang *et al* ¹⁷⁸ gab einen α -helikalen Anteil von 29 % vor, während 37 % als β -Faltblattstruktur vorlag. Der Rest teilte sich in 9 % *Coil*- sowie 25 % ungeordnete Teilstrukturen auf mit einem RMS-Wert von 12.8.

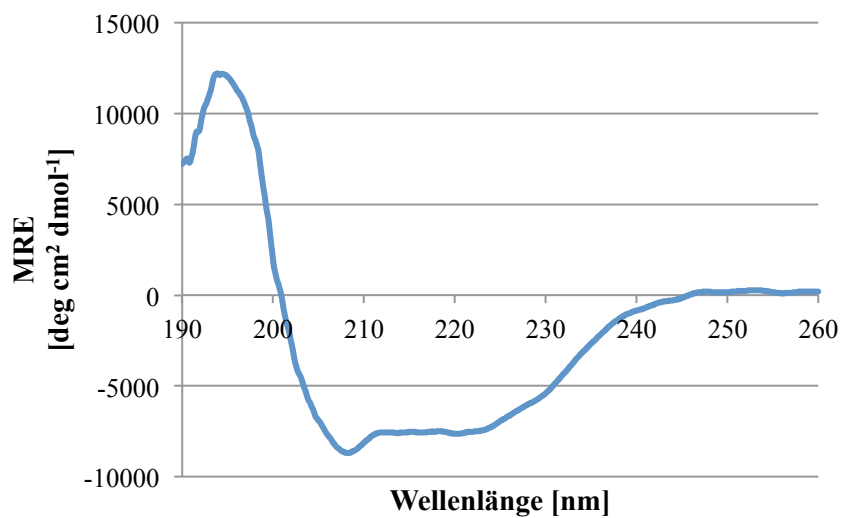


Abbildung 22: CD-spektroskopische Untersuchung nach erfolgter Reinigung von YopQ.

Auftragung der molaren Elliptizität pro Aminosäurerest (MRE) gegen die Wellenlänge. Der Kurvenverlauf zeigt einen gefalteten Zustand des Proteins in Lösung. Das Spektrum zeigt zwei Minima bei 210 und 224 nm und einen Nulldurchgang bei 201 nm.

Die Ergebnisse der initialen, biophysikalischen Charakterisierungen von YopQ in Lösung zeigten, dass das Protein in einem gefalteten und monomeren Zustand in einer monodispersen Lösung vorlag. Diese Kriterien bilden die Voraussetzungen für alle weiteren strukturellen Untersuchungen.

4.1.4 Kristallisationsexperimente

Die initiale Charakterisierung und die hohe Reinheit in der YopQ vorlag, deuteten auf ein vielversprechendes Target für die anschließenden Kristallisationsexperimente hin. Um initiale Kristallisationsbedingungen zu ermitteln, wurden zunächst *Screening*-Experimente mit den Pipettierrobotern Honeybee 961 (Genomic Solutions, USA) sowie Oryx4 (Douglas Instruments, UK) unter Verwendung der kommerziellen Kristallisations-*Screens*

Ergebnisse

durchgeführt. Es wurden sowohl die Dampfdiffusions-Methode als auch das Batch-Verfahren angewendet. Das Protein wurde hierbei in einem Konzentrationsbereich zwischen 10-25 mg/mL eingesetzt. Es konnten einige vielversprechende Bedingungen identifiziert werden. Diese wurden unter Anwendung der CrystalScore-Technik auf ihren proteinartigen Charakter überprüft.

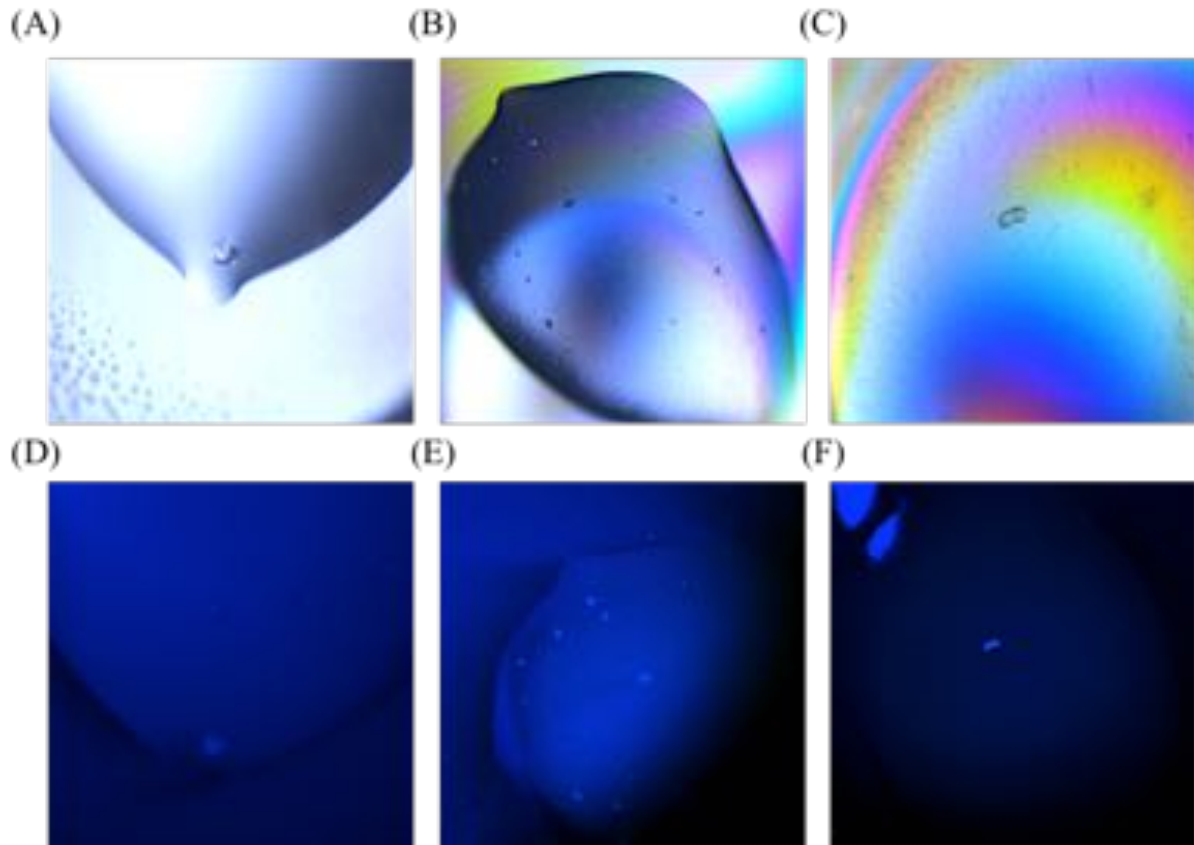


Abbildung 23: Lichtmikroskopische Untersuchungen der Kristallisationsansätze von YopQ

Oben: Initiale Treffer des Kristallisations-Screenings bei verschiedenen Bedingungen unter dem Lichtmikroskop mit der Dampfdiffusions-Methode (A; 0.2 M Imidazolmalat pH 8.5, 12.5 % PEG 10,000) und dem Batch-Verfahren (B; 0.01 M CaCl₂, 0.1 M Tris pH 8.5, 20 % Methanol, C; 0.1 M Natrium HEPES pH 7.5, 27 % PEG 600). Unten: Untersuchung der gleichen Ansätze unter dem UV-Mikroskop. Bei allen drei Ansätzen ist eine Fluoreszenz bei Illumination mit UV-Strahlung detektierbar. Dieser Umstand ließ auf einen proteinartigen Charakter der Kristalle schließen.

Die Kristalle wurden an einer Synchrotronstrahlungsquelle auf mögliche Diffraktion getestet, es konnte jedoch keine Diffraktion detektiert werden. Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass die Kristalle über kein ausreichend kristallines Gitter verfügten, beziehungsweise dieses zu ungeordnet war, um Diffraktionssignale aufzuzeigen.

Zur Optimierung der gefundenen Kristallisationsbedingungen wurden neue Experimente angesetzt, bei denen die einzelnen Parameter variiert wurden sowie das Protein unter verschiedenen Pufferbedingungen und pH-Werten eingesetzt wurde. Jegliche dieser

Optimierungsstrategien führten jedoch nicht zu dem erhofften Erfolg, so dass trotz großer Bemühungen keine geeigneten Kristallisationsbedingungen gefunden werden konnten, die zu einer erfolgreichen Ausbildung von Makrokristallen ausreichender Qualität für Diffraktionsaufnahmen führten. Daher wurde im Folgenden versucht, durch gekürzte Varianten des Proteins die Stabilität sowie die Proteinintegrität zu erhöhen, um somit YopQ der Kristallisation zugänglicher zu machen. Ziel hierbei war es, mögliche flexible Bereiche innerhalb der Proteinstruktur auszuschließen, die auf die Kristallisation negativen Einfluss nehmen können.

4.1.5 SAXS-Analyse

Um weitere strukturelle Informationen über YopQ in Lösung zu erlangen, wurden SAXS-Daten an der P12-Beamline des PETRA III- Speicherringes (DESY Hamburg) aufgenommen. Zur Vorbereitung wurde das Protein wie oben beschrieben gereinigt, mittels CD und DLS charakterisiert und auf vier verschiedene Konzentrationen eingestellt (1.5 mg/mL, 3.2 mg/mL, 5.2 mg/mL, 10.0 mg/mL). Da das Vorliegen einer monodispersen Lösung Voraussetzung für die SAXS-Analyse ist, wurden die Proben direkt vor den Messungen für eine Stunde bei 21000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die Dispersität aller Proteinlösungen nochmals mit DLS überprüft. Das Probenvolumen betrug jeweils 20 µL. Vor und nach jeder Messung wurde der identische Puffer gemessen und dessen Signal vom Proteinsignal abgezogen. Die Belichtungszeit der jeweiligen Messungen betrug 45 ms.

Die Streudaten der einzelnen Konzentrationen wurden mit dem Software-Paket PRIMUS¹⁷⁹ gemittelt und auf die konzentrationsunabhängige Streuintensität extrapoliert. Die folgende Guinier-Analyse zeigt einen überwiegend linearen Verlauf, was auf eine gute Datenqualität zurückzuführen ist. Des Weiteren konnten auch bei der höchsten Konzentration keine Aggregations-Merkmale beobachtet werden. Der zugehörige Gyrationradius R_g betrug 2.08 ± 0.12 nm. Mit dem in PRIMUS integrierten Programm GNOM wurde die Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$ generiert¹⁸⁰. Diese resultierte in einem maximalen Partikelabstand D_{\max} von 7.6 nm und einem Porod-Volumen von 44.68 nm^3 . Das entsprechend berechnete Molekulargewicht MW_{Porod} betrug 26 kDa und stimmte daher gut mit den vorherigen Erkenntnissen überein, dass YopQ als Monomer in Lösung vorlag.

Ergebnisse

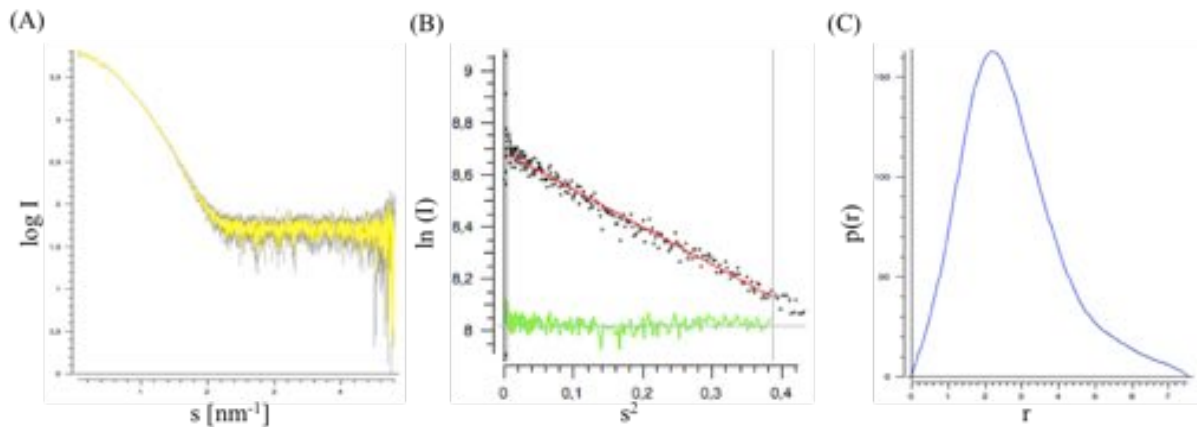


Abbildung 24: SAXS-Daten-Analyse von YopQ mit PRIMUS

(A) Gemittelte und extrapolierte Streudaten von YopQ mit zugehörigem Guinier-Plot (B) sowie der Abstandsverteilungsfunktion, aus der ein D_{max} von 7.6 nm berechnet wurde (C).

Der mit GNOM generierte *Outputfile* wurde für die anschließende *ab initio* Modellberechnung mit DAMMIF verwendet.¹⁸¹ Es wurden 20 verschiedene *ab initio* Modelle kalkuliert. Diese wurden anschließend mit Hilfe des integrierten Programmes DAMAVER¹⁸² gemittelt und zu einem endgültigen *ab initio* Modell geformt.

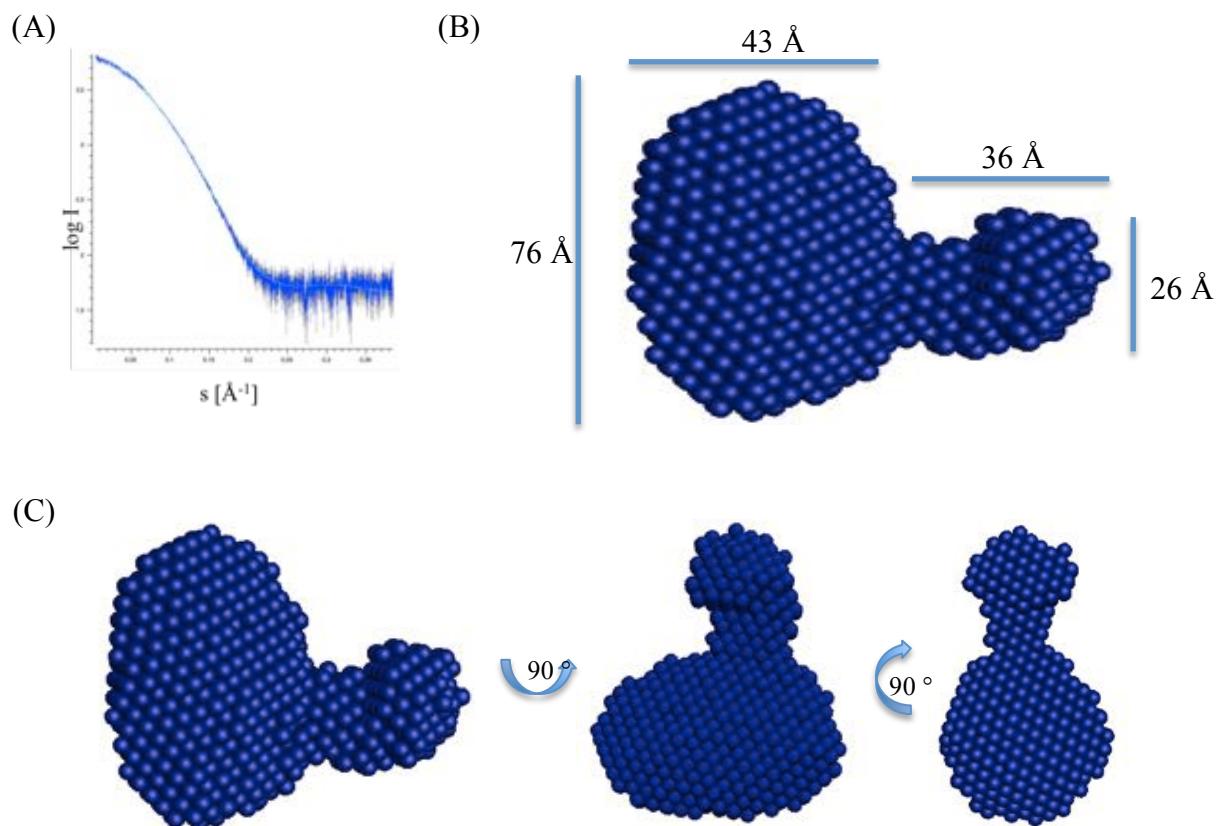


Abbildung 25: Mit DAMMIF und DAMAVER berechnetes *ab initio* Modell von YopQ.

(A) Fit des mit DAMMIF erstellten *ab initio* Modells. (B) *ab initio* Modell von YopQ mit den Abmessungen der einzelnen Seiten und in gedrehter Darstellung (C).

Das Modell verfügt über eine größere globuläre Untereinheit und eine elongierte kleinere Untereinheit, die ungefähr ein Viertel des Modells ausmacht. Diese kleinere Untereinheit könnte eventuell aus einem flexiblen Terminus bestehen, der wiederum einen Ansatzpunkt darstellen könnte, der bei der Kristallisation stören könnte. Das Endergebnis ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt. Der maximale Durchmesser des Modells betrug 76 Å und stimmt gut mit dem zuvor berechneten D_{\max} von 7.6 nm überein.

4.1.6 Sequenzanalyse von YopQ zur Herstellung optimierter Konstrukte

Da die Kristallisationsversuche bisher nicht zum gewünschten Erfolg führten, wurde die Primärstruktur von YopQ mit verschiedenen Programmen bioinformatisch analysiert. Ziel hierbei war es, das Protein zu verkürzen, um optimierte Konstrukte zu designen. Aus der SAXS-Analyse geht hervor, dass YopQ aus einer größeren und einer kleineren Domäne aufgebaut ist. Daher war ein Ansatz, die kleinere Untereinheit zu umgehen, um das Protein zu stabilisieren. Da es zu jeglichen Sequenzhomologen von YopQ keine hochauflösenden Strukturdaten gibt, war es nicht möglich, mit den üblicherweise angewendeten Algorithmen ein *in silico* Modell zu erstellen, um weitere Hinweise zu erlangen. Auch aus der SAXS-Struktur ist nicht ersichtlich, ob es sich bei der kleineren Untereinheit um den N- oder den C-Terminus handelt. Daher wurden zwei Konstrukte generiert, die jeweils an einem der Enden gekürzt wurden. Diese Konstrukte wurden mit Hilfe des Webserver-basierten Programms *XtalPred* designt¹⁸³. Dieses Programm macht auf Basis der Aminosäuresequenz Sekundärstrukturvorhersagen und berechnet verschiedene physikalische und biochemische Parameter. Zusätzlich wird eine hypothetische Kristallisationswahrscheinlichkeit angegeben. Diese wird berechnet auf der Grundlage von Strukturinformationen anderer Proteine aus verschiedenen Datenbanken, die über partielle Sequenzhomologien zur angegebenen Primärstruktur verfügen. Verschiedene verkürzte Konstrukte wurden mit *XtalPred* analysiert. Die vielversprechendsten Konstrukte waren YopQ9-179 und YopQ1-165, so dass sich dazu entschieden wurde, mit diesen weiter zu arbeiten. Die beiden Konstrukte wurden analog zum Vollängenkonstrukt unter Verwendung der Endonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in den Vektor pGEX-6P-1 kloniert. Vor dem Verwenden der neuen Konstrukte wurden diese mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

4.1.7 YopQ1-165

4.1.7.1 Expression, Reinigung, Charakterisierung

Die Expression des am C-Terminus gekürzten Konstruktes YopQ1-165 erfolgte über Nacht bei 20 °C in BL21 (DE3) Rosetta-Zellen. Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben aufgeschlossen und anschließend wurde das lösliche Protein mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathion-Agarose-Matrix gereinigt. Die proteolytische Spaltung des *GST-tags* erfolgte über Nacht bei 4 °C mit der *PreScission* Protease auf der Säulenmatrix. Die SDS-PAGE-Analysen zeigen, dass die Reinigungsschritte von YopQ1-165 erfolgreich waren. Im zweiten Durchlauf der Affinitätschromatographie ist deutlich eine Bande leicht oberhalb der 18.4 kDa-Bande des Proteingrößenstandards zu sehen. Diese Bande korrespondiert gut mit dem erwarteten Molekulargewicht von 18.9 kDa für YopQ1-165. Die Fraktion des zweiten Durchlaufs sowie die Waschfraktionen 2.1 und 2.2 wurden vereinigt und es folgte ein weiterer Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie mit Hilfe einer mit Standardproteinen kalibrierten Superdex 200 26/600 *prep grade* Säule. Die Ergebnisse der Reinigungsschritte sind in der folgenden Abbildung dargestellt. Das Retentionsvolumen der Größenausschlusschromatographie betrug 232 mL mit einem zugehörigen berechneten Molekulargewicht von 19.3 kDa. Dieser Wert ließ wie beim Volllängenkonstrukt auf einen monomeren Zustand des Proteins im vorliegenden Puffer schließen.

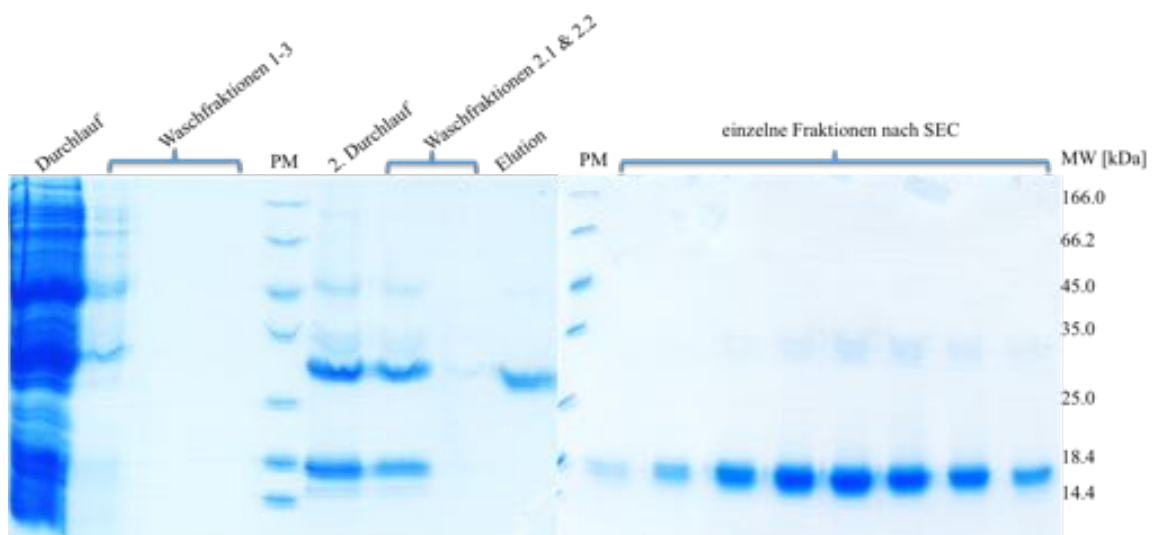


Abbildung 26: SDS-PAGE-Analyse YopQ1-165, Reinigung und proteolytische Spaltung des *GST-tags* und anschließende Größenausschlusschromatographie jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.

Einzelne Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung von YopQ1-165-GST mit integriertem *PreScission* Protease-Verdau. Analyse einzelner Fraktionen der Größenausschlusschromatographie, in denen YopQ1-165 eindeutig und in hoher Reinheit auf Höhe der 18.4 kDa-Bande detektierbar ist. PM: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*.

Folgend wurde YopQ1-165 mittels DLS und CD-Spektroskopie weiter charakterisiert. Die DLS-Messungen bei einer Konzentration von 2.2 mg/mL zeigten eine monodisperse Proteinlösung und ergaben einen hydrodynamischen Radius von 2.4 ± 0.1 nm mit entsprechend berechnetem Molekulargewicht von 25 kDa, unter Annahme eines globulären Proteins. Im Vergleich zum hydrodynamischen Radius des Volllängenkonstruktes ist der von YopQ1-165 größer, obwohl dieser aufgrund des geringeren Molekulargewichtes des gekürzten Konstruktes kleiner erwartet wurde. Diese Tatsache ließ darauf schließen, dass es sich zwar um einen monomeren Zustand des Proteins in Lösung handelte, die Form des Proteins aber im Vergleich zum vollen YopQ potentiell elongiert war.

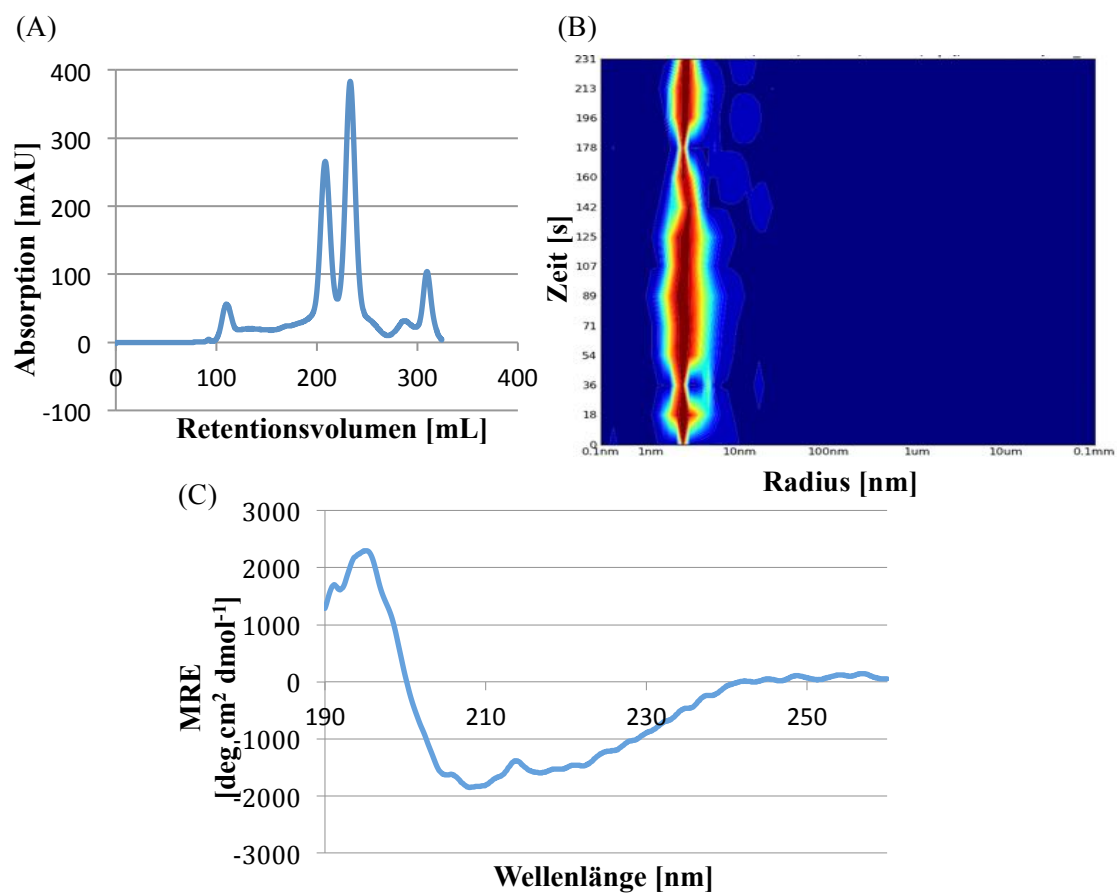


Abbildung 27: Initiale Charakterisierung von YopQ1-165 in Lösung

(A) Retentionsprofil der Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 26/600 *prep grade* Säule. Das Retentionsvolumen von YopQ1-165 betrug 232 mL und das über eine aus Standardproteinen aufgestellte Kalibriergeraden berechnete Molekulargewicht 19.3 kDa. (B) CD-spektroskopische Analyse von YopQ1-165, die molare Elliptizität pro Aminosäurerest ist gegen die Wellenlänge aufgetragen. Das Spektrum zeigt zwei Minima bei 209 und 217 nm und einen Nulldurchgang bei 200 nm. (C) Radienverteilung der DLS-Messung von YopQ1-165, der Radius ist in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die DLS-Messungen zeigen ein monodisperses Signal und der hydrodynamische Radius von 2.4 ± 0.1 nm weist auf eine monomere und elongierte Form des Proteins in Lösung hin.

Ergebnisse

Mittels CD-Messungen konnte gezeigt werden, dass YopQ1-165 einen gefalteten Zustand aufwies und die zugehörige Sekundärstrukturvorhersage nach dem Algorithmus von Yang *et al.*¹⁷⁸ gab einen α -helikalen Anteil von 30 % vor, während 35 % als β -Faltblattstruktur vorlag. Der Rest teilte sich in 11 % *Coil*- sowie 24 % ungeordnete Teilstrukturen auf. Der RMS-Wert betrug 12.6. Im Vergleich zum Vollängenkonstrukt bestätigt sich das Verhältnis von α -Helices zu β -Faltblättern und weicht nur minimal davon ab. Bei diesem Konstrukt gab es 3 % mehr α -Helices und 2 % weniger β -Faltblattstrukturen. Insgesamt lagen 1 % mehr gefaltete Anteile bei YopQ1-165 vor.

4.1.7.2 SAXS-Analyse

Für die SAXS-Datenanalyse von YopQ1-165 wurde das Protein wie zuvor beschrieben gereinigt und auf vier verschiedene Konzentrationen eingestellt (1.3 mg/mL, 3.4 mg/mL, 5.1 mg/mL und 10.2 mg/mL). Die einzelnen Proteinlösungen wurden vor den Messungen mittels DLS bezüglich ihrer Monodispersität überprüft. Die SAXS-Daten wurden mit einem Probenvolumen von 20 μ L an der P12-Beamline des PETRA III- Speicherringes (DESY Hamburg) aufgenommen. Vor und nach jeder Messung wurde der zugehörige Puffer gemessen und dessen Signal von den Streudaten der Proteinlösungen abgezogen. Die Belichtungszeit der jeweiligen Messungen betrug 45 ms.

Unter Verwendung von PRIMUS wurden die gemittelten Streudaten der einzelnen Konzentrationen auf die konzentrationsunabhängige Streuintensität extrapoliert¹⁷⁹. Der Kurvenverlauf der Streudaten zeigte für alle vier Konzentrationen deutliche Aggregationsmerkmale im Bereich der kleinsten Winkel. Dies bestätigte sich auch in der anschließenden Guinier-Analyse. Der Gyrationradius betrug 2.55 ± 0.53 nm und war damit größer als der des Vollängenkonstruktes. Die mit GNOM¹⁸⁰ berechnete Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$ lieferte einen maximalen Partikelabstand von 10.25 nm und ein Porod-Volumen von 50.41 nm^3 . Diese beiden Werte waren ebenfalls erhöht im Vergleich zu YopQ und bestätigten die Annahme einer deutlich elongierten Form der gekürzten Variante. Das entsprechend berechnete Molekulargewicht MW_{Porod} betrug 29.7 kDa.

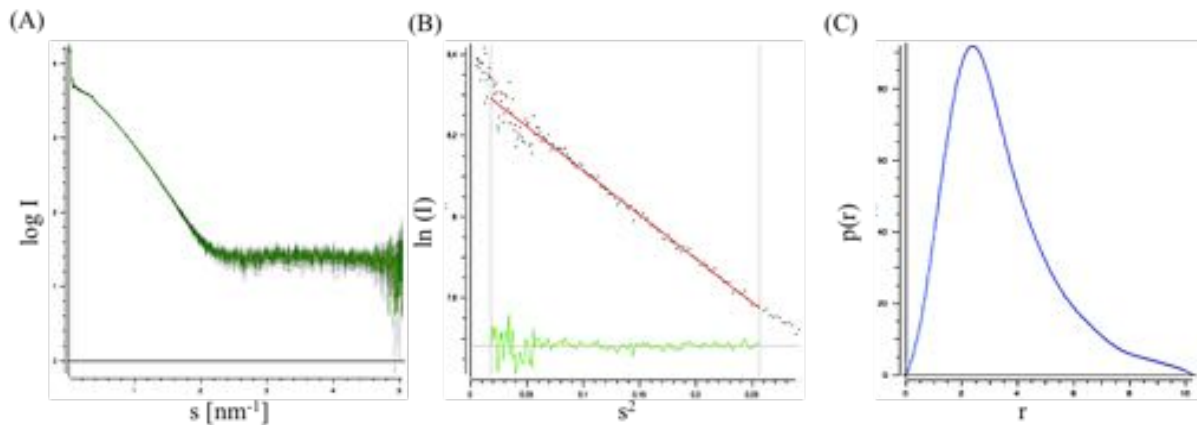


Abbildung 28: SAXS-Daten-Analyse von YopQ1-165 mit PRIMUS

(A) Gemittelte und extrapolierte Streudaten mit zugehörigem Guinier-Plot (B) sowie der Abstandsverteilungsfunktion, aus der ein D_{\max} von 10.25 nm berechnet wurde (C).

Bei der anschließenden *ab initio* Modellberechnung mit DAMMIF wurden 20 verschiedene *ab initio* Modelle kalkuliert, mit Hilfe von DAMAVER gemittelt und zu einem endgültigen *ab initio* Modell geformt.

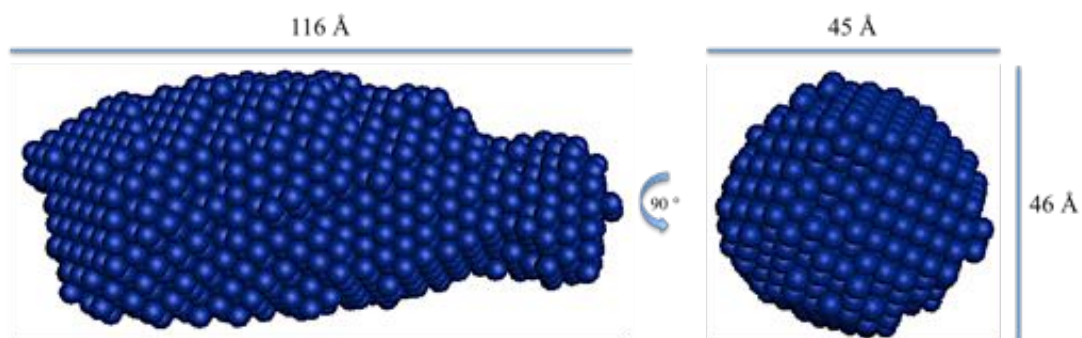


Abbildung 29: Mit DAMMIF und DAMAVER berechnetes *ab initio* Modell von YopQ1-165.

Das *ab initio* Modell von YopQ1-165 zeigt eine elongierte Form mit einem maximalen Durchmesser von 116 Å. Im Vergleich zum Modell von YopQ ist der Durchmesser deutlich größer und es ist nur noch eine Untereinheit erkennbar. Durch Entfernen des C-Terminus kann es zu einer Aufhebung von verschiedenen Interaktionen innerhalb des Proteins gekommen sein, die für die Ausbildung der Tertiärstruktur nötig sind. Dies resultierte in einer elongierten Variante des Proteins. Die Aggregationsmerkmale, die bereits bei der geringsten Konzentration sichtbar waren, deuten daraufhin, dass dieses Konstrukt von YopQ in Lösung weniger stabil ist als das Ausgangsprotein. Diese Tatsache konnte ebenfalls durch DLS-Messungen bestätigt werden, die zeigten, dass das Protein über einen Zeitraum von vier Tagen ebenfalls nicht stabil war. Aufgrund der fehlenden Stabilität und Tendenz zur

Ergebnisse

Aggregation zeigte sich dieses Konstrukt als ungeeignet für weitere strukturelle Untersuchungen und wurde daher nicht weiter verfolgt.

4.1.8 YopQ9-179

4.1.8.1 Expression, Reinigung, Charakterisierung

Das am N-Terminus gekürzte Konstrukt YopQ9-179 wurde analog zu YopQ und YopQ1-165 hergestellt und gereinigt. Die Expression erfolgte über Nacht bei 20 °C in BL21 (DE3) Rosetta-Zellen. Nach erfolgtem Zellaufschluss wurde die Proteinlösung anschließend mittels Affinitätschromatographie gereinigt und vom *GST-tag* gespalten. Mit den vereinten Fraktionen dieses ersten Reinigungsschrittes, die das Zielprotein enthielten, wurde nachfolgend eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 26/600 *prep grade* Säule durchgeführt.

Auf der SDS-PAGE-Analyse ist im zweiten Durchlauf der Affinitätschromatographie deutlich eine Bande oberhalb der 18.4 kDa-Bande des Proteingrößenstandards, passend zum Molekulargewicht von YopQ9-179 mit 19.5 kDa, erkennbar. Die Ergebnisse der Reinigung sind in der folgenden Abbildung dargestellt und zeigen, dass YopQ9-179 erfolgreich hergestellt werden konnte.

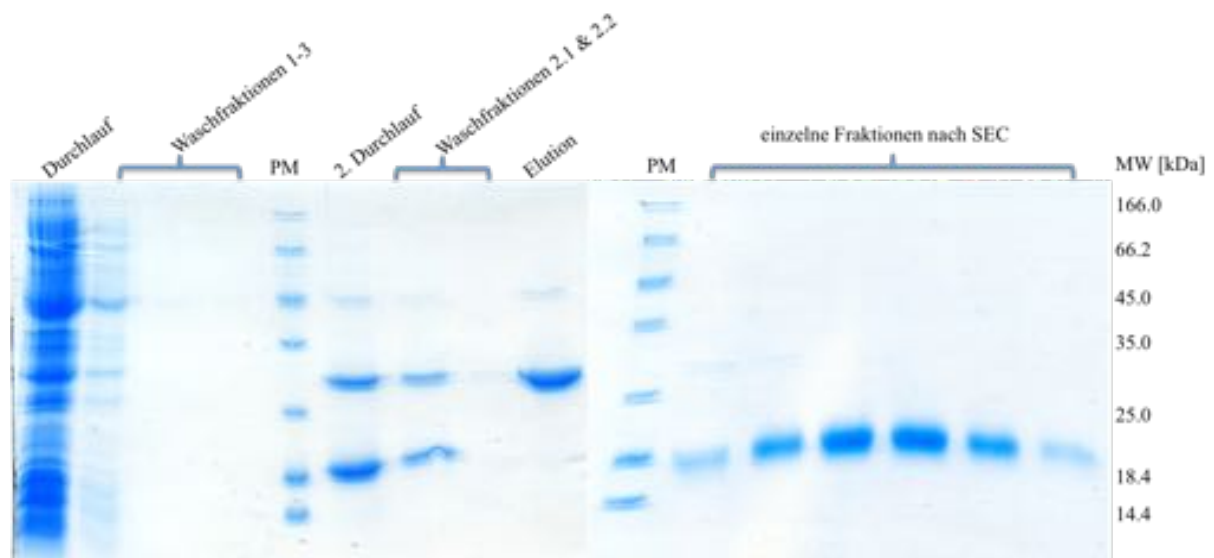


Abbildung 30: SDS-PAGE-Analyse YopQ9-179, Reinigung und proteolytische Spaltung des *GST-tags* und anschließende Größenausschlusschromatographie jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.

Einzelne Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung von YopQ9-179-GST mit integriertem *PreScission* Protease-Verdau. Analyse einzelner Fraktionen der Größenausschlusschromatographie, in denen YopQ9-179 eindeutig und in hoher Reinheit auf Höhe der 18.4 kDa-Bande detektierbar ist. PM: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*.

Während der Größenausschlusschromatographie wurde YopQ9-179 bei einem Retentionsvolumen von 230 mL eluiert. Das zugehörige, über die Kalibriergeraden berechnete Molekulargewicht betrug 20.4 kDa. Die weiteren Analysen von YopQ9-179 erfolgten mittels DLS und CD-Spektroskopie. Bei einer Konzentration von 3 mg/mL wurden DLS-Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine monodisperse Proteinlösung und ergaben einen hydrodynamischen Radius von 2.2 ± 0.1 nm. Damit bestätigte sich die Annahme, dass YopQ9-179 ebenfalls als monomeres Protein vorlag. Der hydrodynamische Radius ist deutlich kleiner als der von YopQ1-165 und wie erwartet auch als der des Vollängenkonstruktes. Mittels CD-Messungen konnte gezeigt werden, dass YopQ9-179 ebenfalls einen gefalteten Zustand aufwies. Die zugehörige Sekundärstrukturvorhersage nach dem Algorithmus von Yang *et al*¹⁷⁸ gab einen α -helikalen Anteil von 34 % vor, während 31 % als β -Faltblattstruktur vorlag. Der Rest erwies sich als 12 % *Coil*- sowie 23 % ungeordnete Teilstrukturen bei einem RMS-Wert von 10.6. Im Vergleich zum Vollängenkonstrukt hat sich das Verhältnis von α -Helices zu β -Faltblättern deutlich verändert. Bei diesem Konstrukt gab es 5 % mehr α -Helices und 6 % weniger β -Faltblattstrukturen. Insgesamt lagen 2 % mehr gefaltete Anteile bei YopQ9-179 vor.

Ergebnisse

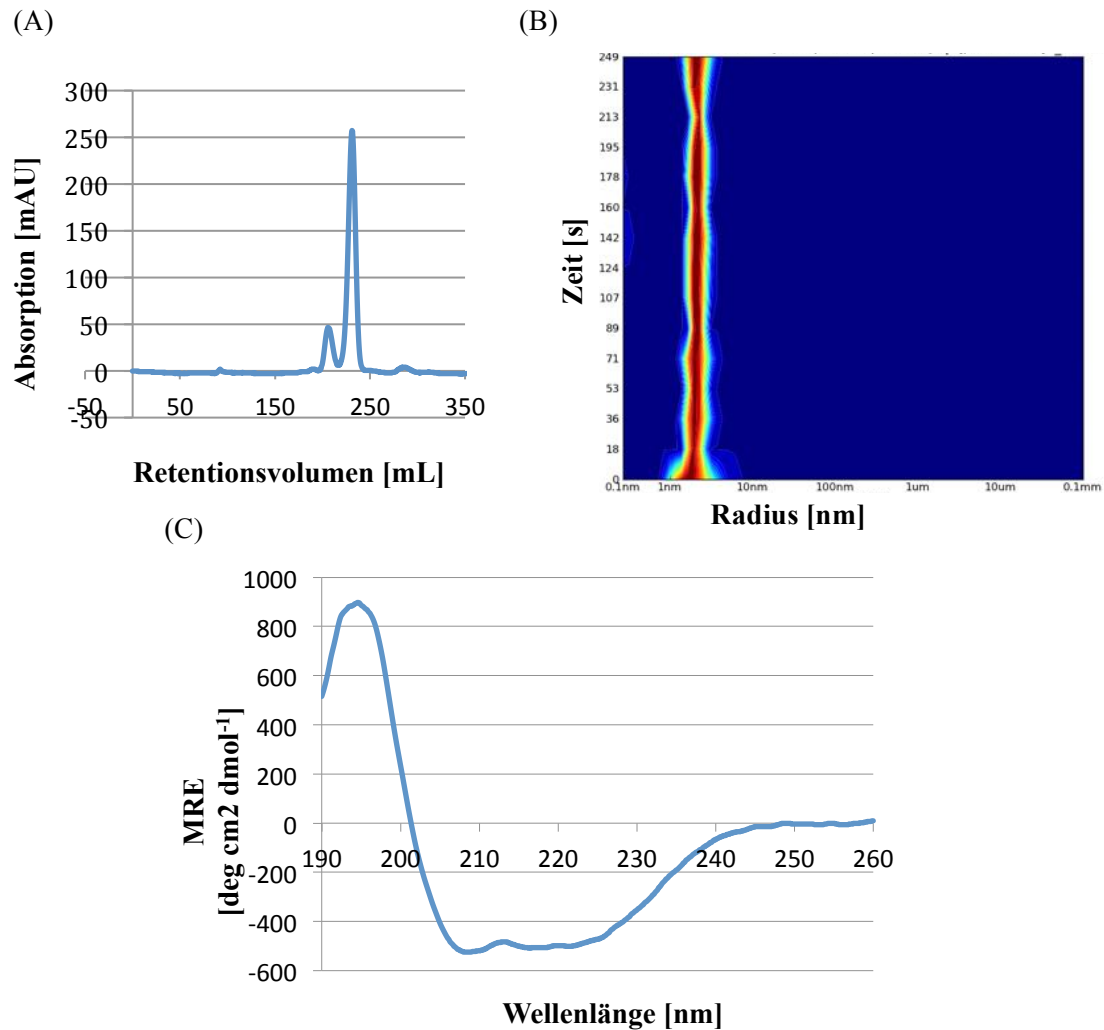


Abbildung 31: Initiale Charakterisierung von YopQ9-179 in Lösung

(A) Retentionsprofil der Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 26/600 *prep grade* Säule. Das Retentionsvolumen von YopQ9-179 betrug 230 mL und das über eine aus Standardproteinen aufgestellte Kalibriergeraden berechnete Molekulargewicht 20.4 kDa. (B) CD-spektroskopische Analyse von YopQ9-179, die molare Elliptizität pro Aminosäurerest ist gegen die Wellenlänge aufgetragen. Das Spektrum zeigt zwei Minima bei 210 und 219 nm und einen Nulldurchgang bei 201 nm. (C) Radienverteilung der DLS-Messung von YopQ9-179, der Radius ist in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die DLS-Messungen zeigen ein monodisperses Signal und der hydrodynamische Radius von 2.2 ± 0.1 nm weist eindeutig auf einen monomeren Zustand des Proteins in Lösung hin.

Das vorliegende Konstrukt sah nach initialer Charakterisierung vielversprechend für die anschließenden Kristallisationsexperimente aus. Es zeigte sich mittels DLS-Messungen stabil bis zu einer Konzentration von 37 mg/mL und ebenfalls über einen Zeitraum von mindestens einer Woche. Es wurde zunächst wieder eine hohe Anzahl an *Screening*-Experimenten mit den Pipettierrobotern Honeybee 961 (Genomic Solutions, USA) sowie Oryx4 (Douglas Instruments, UK) unter Verwendung der kommerziellen Kristallisations-*Screens* durchgeführt. Das Protein wurde dabei in einem Konzentrationsbereich zwischen 15 -

37 mg/mL eingesetzt. Bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit konnten jedoch noch kein Kristallwachstum beobachtet werden.

4.1.8.2 SAXS-Analyse

Für die SAXS-Datenanalyse wurde YopQ9-179 wie zuvor beschrieben gereinigt und auf vier verschiedene Konzentrationen eingestellt (1.1 mg/mL, 3.1 mg/mL, 5.3 mg/mL und 10.8 mg/mL). Die einzelnen Proteinlösungen wurden vor den Messungen mittels DLS bezüglich ihrer Monodispersität überprüft. Die SAXS-Daten wurden analog zu YopQ1-165 mit einem Probenvolumen von 20 μ L an der EMBL-Beamline P12 des PETRA III-Speicherringes (DESY Hamburg) aufgenommen.

Unter Verwendung von PRIMUS¹⁷⁹ wurden die gemittelten Streudaten der einzelnen Konzentrationen auf die konzentrationsunabhängige Streuintensität extrapoliert. Der Gyrationradius wurde mit Hilfe des Guinier-Plots berechnet und betrug 1.90 ± 0.02 nm. Im Gegensatz zu YopQ1-165 konnten keine Aggregationsmerkmale detektiert werden.

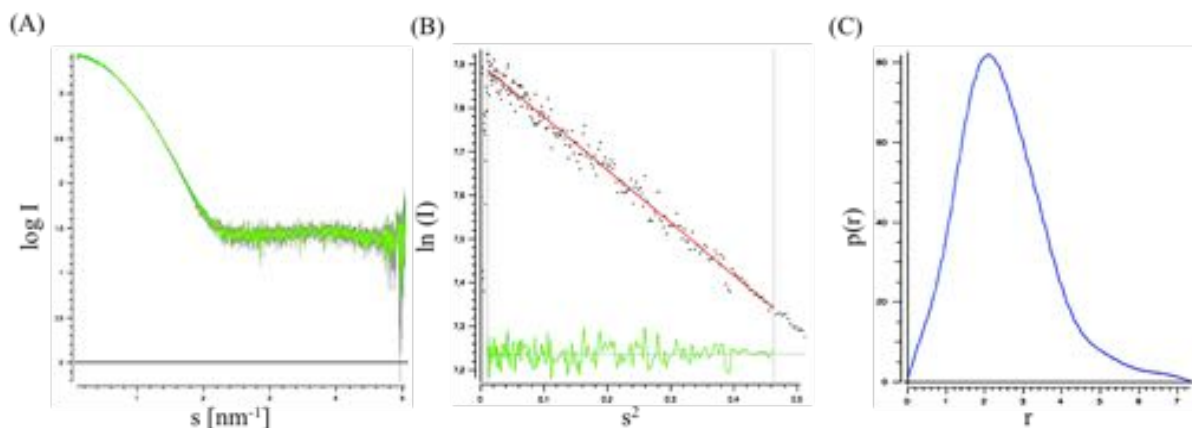


Abbildung 32: SAXS-Datenanalyse von YopQ9-179 mit PRIMUS

(A) Gemittelte und extrapolierte Streudaten mit zugehörigem Guinier-Plot (B) sowie der Abstandsverteilungsfunktion, aus der ein D_{max} von 7.35 nm berechnet wurde (C).

Die mit GNOM berechnete Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$ lieferte einen maximalen Partikelabstand von 7.4 nm und ein Porod-Volumen von 41.26 nm^3 . Das entsprechend berechnete Molekulargewicht MW_{Porod} betrug 24.3 kDa und bestätigte damit den monomeren Zustand von YopQ9-179. Bei der anschließenden *ab initio* Modellberechnung mit DAMMIF¹⁸¹ wurden 20 verschiedene *ab initio* Modelle kalkuliert, mit Hilfe von DAMAVER gemittelt und zu einem endgültigen *ab initio* Modell geformt. Das Modell ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Zusätzlich wurde das Modell abgebildet, dessen Chi^2 -Wert am

Ergebnisse

geringsten ist und somit die höchste Übereinstimmung mit den gemessenen Streudaten aufweist.

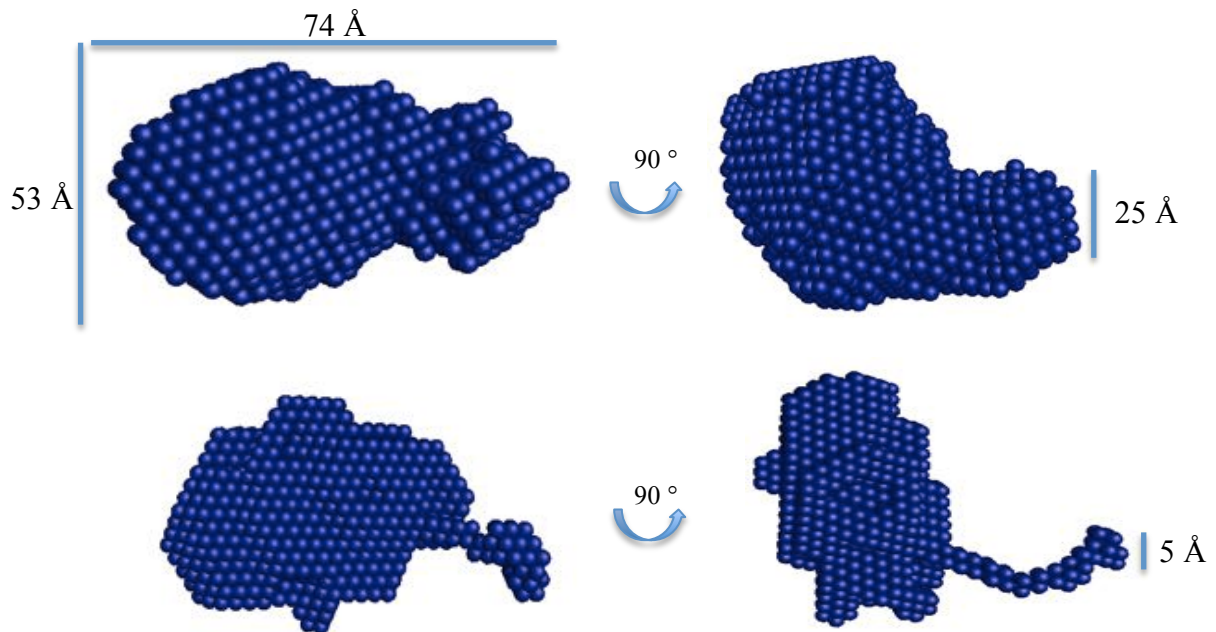


Abbildung 33: *Ab initio* Modelle von YopQ9-179

Oben: Das mit DAMAVER gemittelte *ab initio* Modell, unten: das mit DAMMIF berechnete *ab initio* Modell, das die höchste Übereinstimmung zu den Streudaten aufweist.

Das gemittelte SAXS-Modell besteht wie das von YopQ aus einer größeren und einer kleineren Untereinheit. Beim Vergleich mit dem Modell, das den besten Fit aufweist, wird deutlich, dass die kleinere Untereinheit ein flexibler Überhang am Protein ist. Durch die Flexibilität erscheint er im Mittel der Modelle deutlich breiter.

Die Ergebnisse der SAXS-Analyse zeigen, dass es sich bei der für YopQ gezeigten kleineren Untereinheit tatsächlich um den N-Terminus handelt. Allerdings hat die in diesem Konstrukt vorgenommene Kürzung des N-Terminus nicht ausgereicht, um diesen Bereich vollständig zu entfernen. Dieser Überhang ist potentiell dafür verantwortlich, dass auch dieses Konstrukt aufgrund der erhöhten Flexibilität in diesem Bereich bisher nicht kristallisiert ist. Es wurde daher ein weiteres Konstrukt erstellt, mit noch kürzerem N-Terminus, um diesen Überhang zu umgehen.

4.1.9 YopQ37-179

4.1.9.1 Expression, Reinigung, Charakterisierung

YopQ37-179 wurde identisch zu den anderen YopQ-Konstrukten exprimiert, gereinigt und proteolytisch vom *GST-tag* gespalten. Die Ergebnisse der Reinigung und der anschließenden Charakterisierung sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.

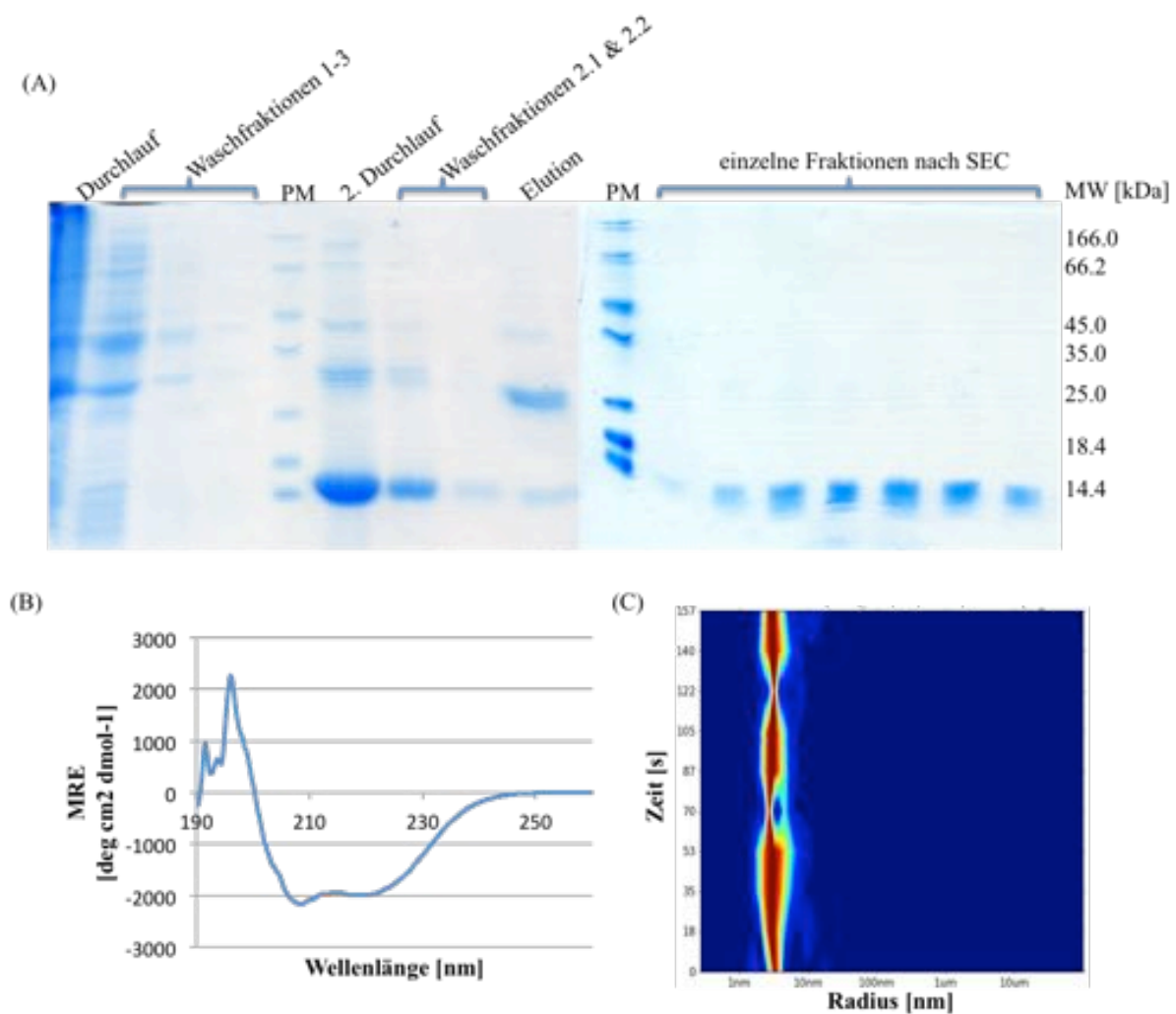


Abbildung 34: Reinigung und Charakterisierung von YopQ37-179.

(A) SDS-PAGE-Analyse der Reinigung, proteolytischen Spaltung des *GST-tags* und anschließenden Größenausschlusschromatographie jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel. Links: Einzelne Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung von YopQ37-179-GST mit integriertem *PreScission* Protease-Verdau. Rechts: Analyse einzelner Fraktionen der Größenausschlusschromatographie, in denen YopQ37-179 eindeutig und in hoher Reinheit oberhalb der 14.4 kDa-Bande detektierbar ist. PM: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*. (B) CD-spektroskopische Analyse von YopQ37-179, die molare Elliptizität pro Aminosäurerest ist gegen die Wellenlänge aufgetragen. Das Spektrum zeigt zwei Minima bei 209 und 221 nm und einen Nulldurchgang bei 200 nm. (C) Radienverteilung der DLS-Messung von YopQ37-179, hier ist der Radius in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die DLS-Messungen zeigen ein monodisperses Signal und der hydrodynamische Radius betrug 2.8 ± 0.9 nm.

Ergebnisse

Auch das Konstrukt YopQ37-179 konnte erfolgreich gereinigt werden. Die anschließende Charakterisierung zeigt, dass es sich um ein gefaltetes Protein in einer monodispersen Lösung handelt. Die zugehörige Sekundärstrukturvorhersage nach dem Algorithmus von Yang *et al* ¹⁷⁸ gab nur noch einen α -helikalen Anteil von 19 % vor, während 38 % als β -Faltblattstruktur vorlag. Der Rest teilte sich in 16 % *Coil*- sowie 28 % ungeordnete Teilstrukturen auf mit einem RMS-Wert von 19.6. Im Vergleich zu den anderen YopQ-Konstrukten ist der Anteil an α -Helices deutlich weniger geworden, während der Anteil an β -Faltblättern einem ähnlichen Bereich liegt. Der hydrodynamische Radius liegt mit 2.8 ± 0.9 nm und korrespondierendem, berechneten Molekulargewicht von 35 kDa über dem erwarteten Wert für ein Monomer und lässt auf eine Dimerisierung des Proteins in dieser Variante schließen.

4.1.9.2 SAXS-Analyse

Die SAXS-Datenanalyse erfolgte analog zu den anderen verkürzten Varianten von YopQ an der EMBL-Beamline P12 des PETRA III- Speicherringes (DESY Hamburg). Es wurden Daten für vier verschiedene Konzentrationen aufgenommen (1.2 mg/mL, 3.2 mg/mL, 5.3 mg/mL und 9.1 mg/mL). Unter Verwendung von PRIMUS ¹⁷⁹ wurden die gemittelten Streudaten der einzelnen Konzentrationen auf die konzentrationsunabhängige Streuintensität extrapoliert. Der Gyrationradius wurde mit Hilfe des Guinier-Plots berechnet und betrug 2.53 ± 0.08 nm. Es wurden keine Aggregationsmerkmale detektiert. Die mit GNOM ¹⁸⁰ berechnete Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$ lieferte einen maximalen Partikelabstand von 8.50 nm und ein Porod-Volumen von 59.21 nm³.

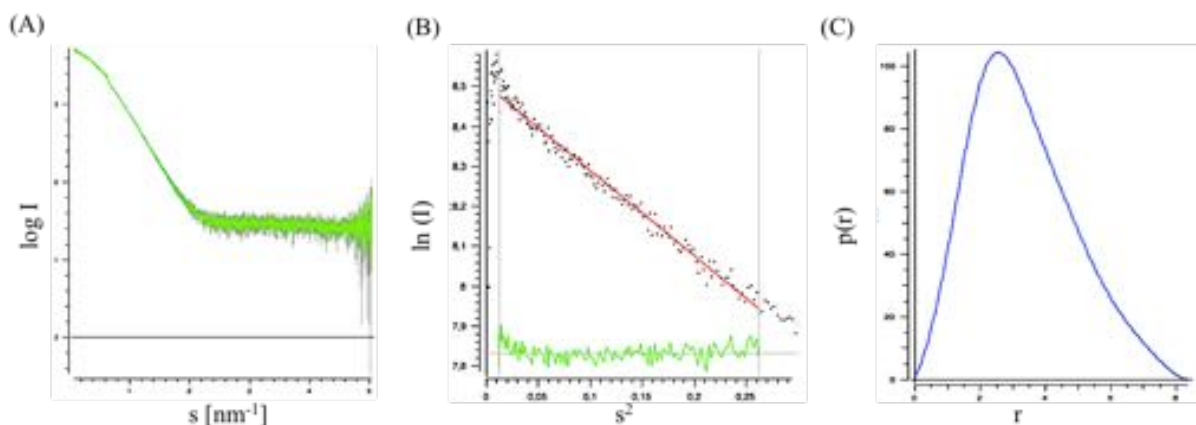


Abbildung 35: SAXS-Datenanalyse von YopQ37-179 mit PRIMUS

(A) Gemittelte und extrapolierte Streudaten mit zugehörigem Guinier-Plot (B) sowie der Abstandsverteilungsfunktion, aus der ein D_{\max} von 8.50 nm berechnet wurde (C).

Das entsprechend berechnete Molekulargewicht MW_{Porod} betrug 34.8 kDa und bestätigte damit die Annahme eines dimeren Zustandes von YopQ37-179. Die anschließende *ab initio* Modellberechnung erfolgte mittels DAMMIF¹⁸¹, wobei 20 verschiedene *ab initio* Modelle kalkuliert wurden und mit DAMAVER einem endgültigen *ab initio* Modell gemittelt wurden. Das gemittelte Modell ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

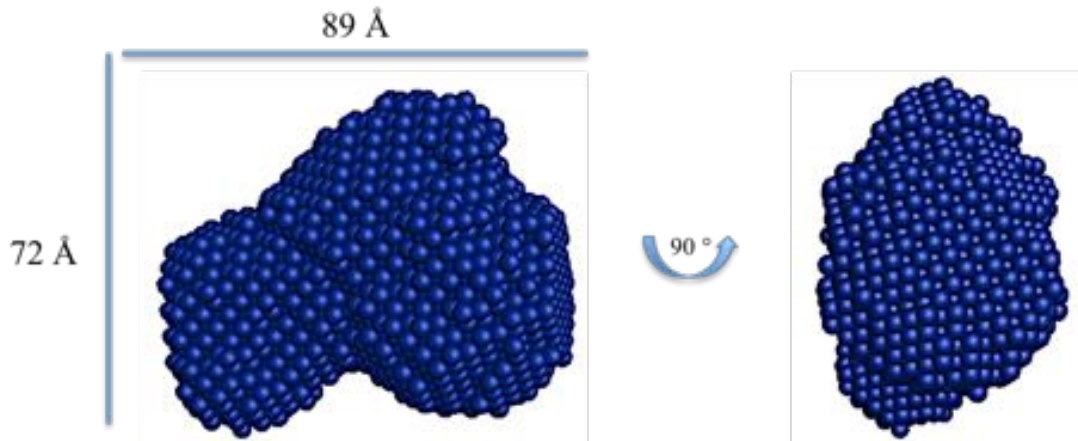


Abbildung 36: Mit DAMMIF und DAMAVER berechnetes *ab initio* Modell von YopQ37-179

Das Modell zeigt eine kompakte Form, die aus zwei Molekülen YopQ37-179 besteht. Es handelt sich wahrscheinlich um je eine globuläre Untereinheit pro Molekül, die für die vorherigen Modelle von YopQ und YopQ9-179 gezeigt werden konnten. Nach Entfernung der ersten 36 Aminosäuren, erfolgte eine Dimerisierung, während YopQ in seiner vollen Länge als Monomer vorliegt. Im Vergleich zu YopQ und YopQ9-179 zeigt sich dieses Konstrukt als weniger stabil in Lösung und konnte nur bis zu einer maximalen Konzentration von 10 mg/mL konzentriert werden, bevor Aggregation einsetzte, die mittels DLS-Messungen beobachtet werden konnte.

Für dieses Konstrukt wurden analog zu YopQ und YopQ9-179 ebenfalls Kristallisationsexperimente durchgeführt. Diese konnten aber bis zum jetzigen Zeitpunkt keine geeigneten Kristallisationsbedingungen offenbaren.

4.2 SycD21-163

SycD ist ein Klasse II Chaperon des Typ-III-Sekretionssystems aus *Yersinia enterocolitica*. SycD liegt auf dem selben Gen wie die beiden hydrophoben Translokatoren YopB und YopD

Ergebnisse

und fungiert innerhalb des T3SS als Chaperon für diese beiden Proteine. Die Struktur von SycD21-163 konnte bereits 2007 von Büttner *et al.* aufgeklärt werden.⁴⁷ Da SycD *in vivo* I mit YopB und YopD interagiert, wurde es zusätzlich mit in diese Arbeit aufgenommen. Im Jahr 2012 wurde die Struktur von SycD mit einem YopD-Peptid veröffentlicht und damit auch eine mögliche Komplexbildung *in vitro* bestätigt⁸⁷.

Da aus der Literatur bereits bekannt war, dass SycD in der am C-Terminus und N-terminus verkürzten Variante SycD21-163 stabiler vorliegt und erfolgreich kristallisiert werden konnte, wurde dieses Konstrukt übernommen.⁴⁷ Die Klonierung erfolgte standardmäßig über die beiden Endonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in die Expressionsvektoren pRSET A und pGEX-6P-1. Nach erfolgter Plasmidisolierung im letzten Schritt der Klonierung wurden die hergestellten Plasmide mittels Sequenzierungsreaktion auf ihre korrekte Gensequenz überprüft.

Zunächst wurden wie auch für die anderen Proteine Testexpressionen durchgeführt, bei denen sowohl das Konstrukt mit *GST-tag* in jeglichen getesteten Zellstämmen als auch das mit *(His)₆-tag* in BL21 (DE3) pLysS und in BL21 AI-Zellen als lösliches Protein exprimiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Da die Reinigung von SycD21-163 als Fusionsprotein mit *GST-tag* bereits etabliert war, wurde sich zunächst an dieses Konstrukt gehalten.

Die Expression von GST-SycD21-163 erfolgte in BL21 Codon plus (DE3) RIL-Zellen. Die Induktion mit 0.25 mM IPTG wurde bei einer OD₆₀₀ von 0.9 durchgeführt und die Zellen anschließend über Nacht bei 20 °C und 200 rpm inkubiert. Nach erfolgter Ernte wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, aufgeschlossen und es folgte die Affinitätschromatographie mit integriertem *PreScission* Protease Verdau auf der Säulenmatrix. Das Molekulargewicht von GST-SycD21-163 betrug 42.7 kDa und das von SycD21-163 16.1 kDa. Die Ergebnisse der zugehörigen SDS-PAGE-Analysen sind in Abbildung 37 zusammengefasst und zeigen die erfolgreiche Reinigung und proteolytische Spaltung von SycD21-163.

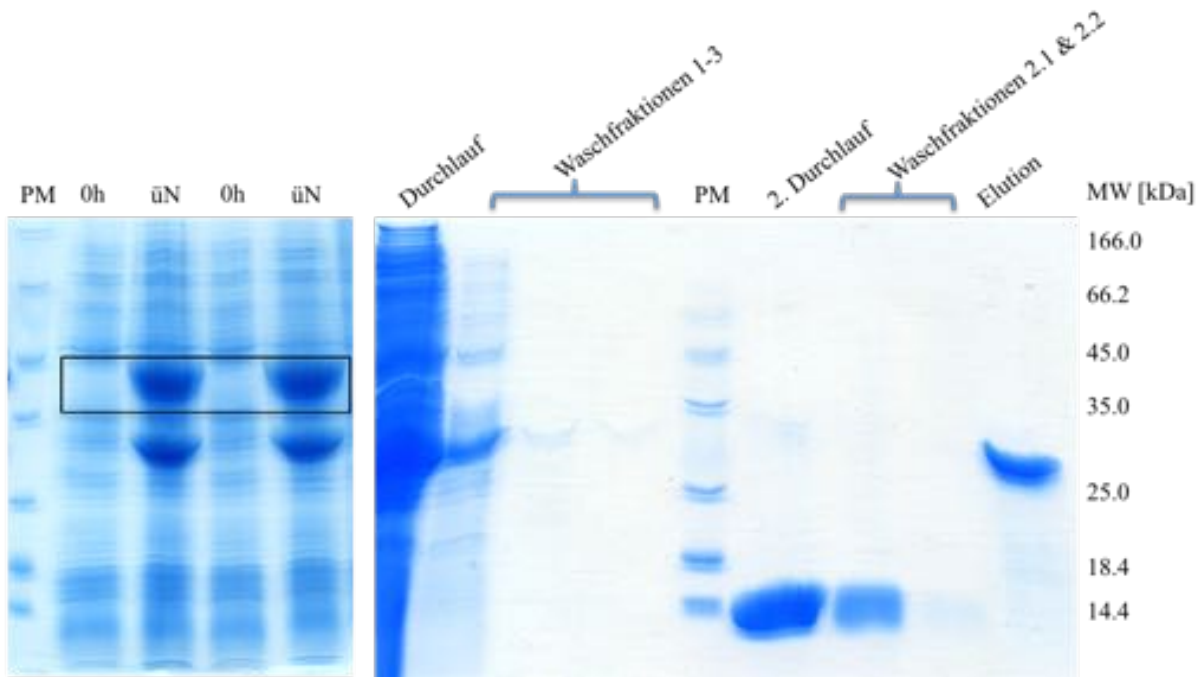


Abbildung 37: SDS-PAGE-Analyse, Expressionsprofil, Reinigung und proteolytische Spaltung des GST-tags von GST-SycD21-163 jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.

Links: 0h: Zellkultur zum Zeitpunkt $t = 0$ h, üN: Zellkultur zum Zeitpunkt $t =$ über Nacht, Die Banden des Zielproteins sind markiert. Über Nacht ist eine signifikante Überexpression des Zielproteins im erwarteten Molekulargewichtsbereich etwas unterhalb der 45.0 kDa-Bande des Proteingrößenstandards zu erkennen. Die untere ebenfalls deutlich stärker werdende Bande, deutet auf eine Überexpression von freiem GST hin. Rechts: Einzelne Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung von GST-SycD21-163 mit integriertem *PreScission* Protease-Verdau. Im 2. Durchlauf sowie in der Waschfraktion 2.1 ist eine stark ausgeprägte Proteinbande zu sehen, deren Höhe mit dem erwarteten Molekulargewicht von 16.1 kDa übereinstimmt. PM: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*.

Das gereinigte Protein der vereinten Fraktionen aus dem zweiten Durchlauf sowie der Waschfraktion 2.1 wurde anschließend über Nacht in einer Membran mit einem *Molecular Weight Cut-Off* (MWCO) von 3,500 Da gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 und 5 mM DTT dialysiert. Mit dem Dialysat erfolgte ein zweiter Reinigungsschritt mittels Ionenaustauschchromatographie auf einer MonoQ 5/50 GL-Säule. Um das Protein von der Matrix zu eluieren, wurde ein sukzessiver Pufferaustausch von Puffer 1 (ohne NaCl) mit einem linearen Gradienten durchgeführt, bis 100% Puffer 2 (1 M NaCl) erreicht wurde. Es folgte eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 16/600 *prep grade* Säule. Das zugehörige Retentionsvolumen betrug 84.3 mL. Nach Auftragen der Kalibriergeraden mit Standardproteinen ergab sich ein berechnetes Molekulargewicht von 36.2 kDa. Da das Molekulargewicht vom monomeren SycD21-163 16.1 kDa betrug, handelte es sich folglich um einen dimeren Zustand des Proteins in Lösung. Diese Tatsache zeigt sich in guter Übereinstimmung mit den bereits veröffentlichten Strukturinformationen, die ebenfalls

Ergebnisse

SycD21-163 als Dimer aufzeigen^{47,87}. Das Retentionsprofil ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

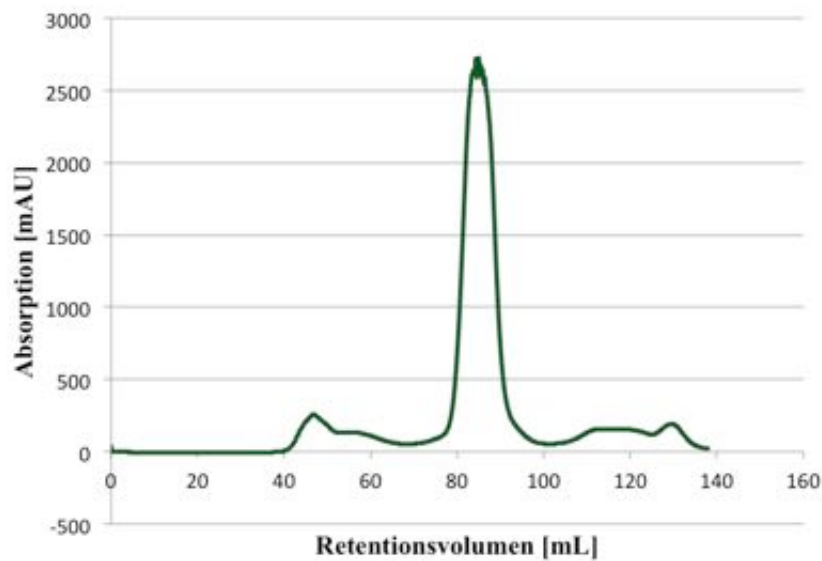


Abbildung 38: Größenausschlusschromatographie SycD21-163.

(A) Retentionsprofil der Größenausschlusschromatographie von SycD21-163 mit einer Superdex 200 16/600 *prep grade* Säule. Das zugehörige Retentionsvolumen betrug 84.3 mL. Für SycD21-163 wurde mit Hilfe einer Kalibriergeraden ein Molekulargewicht von 36.2 kDa berechnet.

Die DLS-Analyse von SycD21-163 bei einer Konzentration von 17 mg/mL zeigte einen hydrodynamischen Radius von 3.1 ± 0.1 nm. Dies bestätigte nochmals den dimeren Zustand von SycD21-163 in Lösung. Die CD-spektroskopischen Untersuchungen wurden bei einer Konzentration von 0.3 mg/mL durchgeführt. Die Ergebnisse ergaben einen gefalteten Zustand, in dem nach dem Algorithmus von Yang et al.¹⁷⁸ 67 % α -helikale Sekundärstrukturelemente vorlagen und keine β -Faltblattstrukturen. Dieses Ergebnis deckt sich ebenfalls mit den Daten der Kristallstrukturanalyse von SycD21-163 in der 69 % α -Helices und keine β -Faltblätter vorliegen⁴⁷.

Die Ergebnisse zeigen, dass SycD21-163 erfolgreich als lösliches Protein reproduziert werden konnte und für weitere Experimente als Interaktionspartner von YopB und YopD zur Verfügung stand.

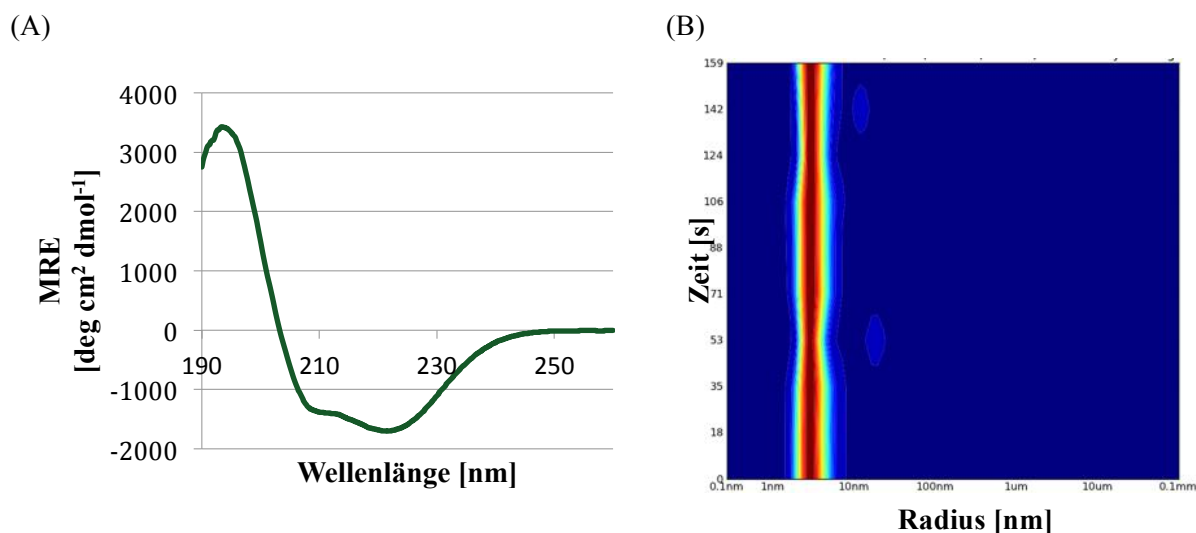


Abbildung 39: CD-spektroskopische Analyse sowie DLS-Messungen von SycD21-163.

(A) CD-spektroskopische Analyse von SycD21-163, die molare Elliptizität pro Aminosäurerest ist gegen die Wellenlänge aufgetragen. Das Spektrum zeigt zwei Minima bei 210 und 222 nm und einen Nulldurchgang bei 204 nm. (B) Radienverteilung der DLS-Messung von SycD21-163, der Radius ist in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die DLS-Messungen zeigen ein monodisperses Signal und der hydrodynamische Radius betrug 3.1 ± 0.1 nm.

4.3 YopB

4.3.1 Sequenzanalyse

YopB ist ein membranständiges Protein, dass zusammen mit YopD die Translokationsspore im T3SS ausbildet. Auf Grundlage der Primärstruktur wurden für YopB zwei Transmembrandomänen an den Positionen 165-208 und 224-258 sowie eine N-terminale *Coiled-Coil*-Domäne vorhergesagt. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass Expressionsversuche des Gesamt-Konstruktes von YopB nicht erfolgreich waren. Daher wurde zu Beginn der Arbeit ein neues Konstrukt erarbeitet. Hierfür wurde erneut *XtalPred* verwendet¹⁸³. Dadurch sollten die transmembranen Domänen umgangen werden, da Membranproteine aufgrund ihrer Hydrophobizität häufig schwer zu exprimieren respektive zu reinigen sind. Aus diesem Grund wurde zunächst das N-terminale Konstrukt YopB1-168 erstellt, welches zu Beginn der ersten vorhergesagten Transmembrandomäne von YopB aufhört.

4.3.2 YopB1-168 Klonierung und initiale Expressionsversuche

Das Konstrukt YopB1-168 wurde zunächst wie oben beschrieben in die zwei verschiedenen Vektorsysteme pRSET A und pGEX-4T-1 kloniert. Hierfür wurden die Endonukleasen *Bam*HI sowie *Eco*RI verwendet und eine TEV-Schnittstelle vor Beginn des N-Terminus eingefügt. Nach abgeschlossener Klonierung wurden die Expressionsplasmide mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Gensequenz, die für YopB1-168 kodiert, konnte erfolgreich in beide Vektoren eingefügt werden.

Mit den verifizierten Plasmiden wurden erste Testexpressionen durchgeführt. Das Fusionsprotein GST-YopB1-168 konnte in allen getesteten Zellstämmen erfolgreich exprimiert werden und resultierte in löslichem Protein. Während *(His)*₆-YopB1-168 zwar ebenfalls exprimiert werden konnte, lag dieses Konstrukt aber nach dem Zellaufschluss lediglich als unlösliche Fraktion im Zellpellet vor. Für die weitere Arbeit wurde daher ausschließlich GST-YopB1-168 verwendet. Die größte Ausbeute an löslichem Protein wurde während der Testexpression bei Verwendung von BL21 Star-Zellen über Nacht bei 20 °C identifiziert (Daten nicht gezeigt).

4.3.3 Expression und Reinigung

Um YopB1-168 herzustellen, wurde das Gen wie oben beschrieben rekombinant in kompetenten BL 21 Star-Zellen exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ zwischen 0.6-0.8 mit 1 mM IPTG. Anschließend wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Die Reinigung erfolgte affinitätschromatographisch unter Verwendung einer Glutathion Agarose-Matrix. Die proteolytische Spaltung des *GST-tags* mittels TEV-Protease wurde auf der Säulenmatrix durchgeführt. Das Molekulargewicht von YopB1-168-GST beträgt 44.9 kDa, während das von YopB1-168 bei 18.3 kDa liegt. Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analysen der Expression und Reinigung sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

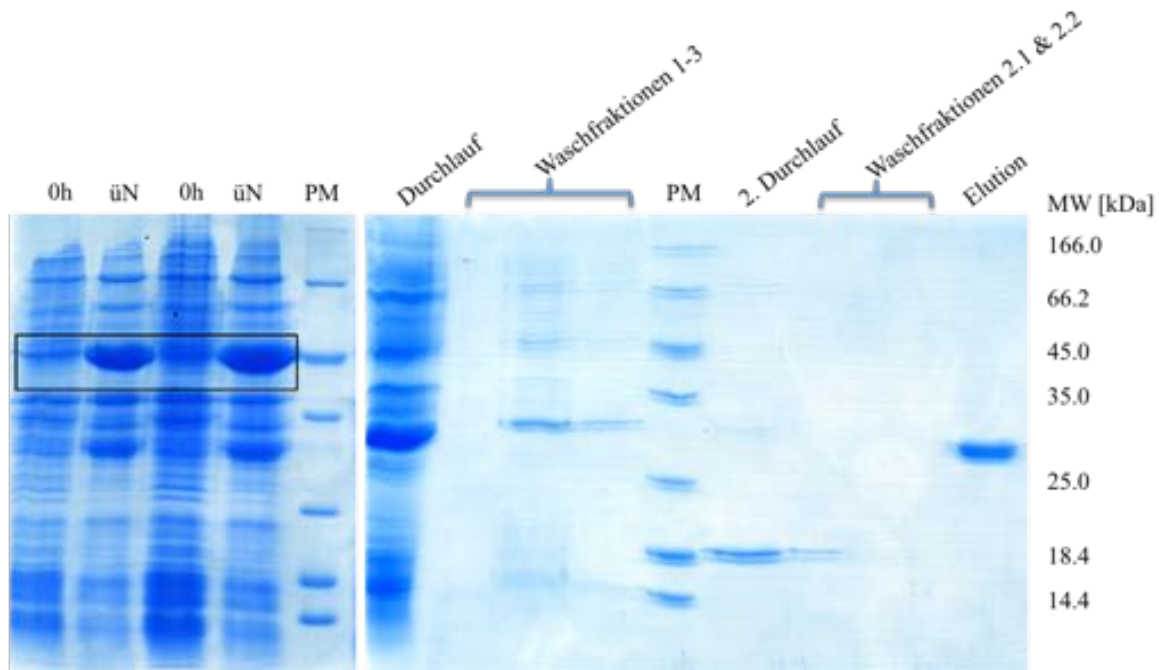


Abbildung 40: SDS-PAGE-Analyse, Expressionsprofil, Reinigung und proteolytische Spaltung des *GST-tags* von GST-YopB1-168 jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.

Links: 0h: Zellkultur zum Zeitpunkt $t = 0$ h, üN: Zellkultur zum Zeitpunkt $t =$ über Nacht, Die Banden des Zielproteins sind markiert. Über Nacht ist eine signifikante Überexpression des Zielproteins im erwarteten Molekulargewichtsbereich auf Höhe der 45.0 kDa-Bande des Proteingrößenstandards zu erkennen. Rechts: Einzelne Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung von GST-YopB1-168 mit integriertem TEV Protease-Verdau. Im 2. Durchlauf sowie in der Waschfraktion 2.1 ist eine einzige Proteinbande zu sehen, deren Höhe mit dem erwarteten Molekulargewicht von 18.3 kDa übereinstimmt. PM: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*.

Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analysen zeigen, dass YopB1-168 erfolgreich hergestellt und gereinigt werden konnte und die proteolytische Spaltung des *GST-tags* ebenfalls gelang. Die Fraktionen aus dem zweiten Durchlauf und der Waschfraktion 2.1 wurden vereinigt und auf ein Volumen von 5 mL konzentriert. Die nachfolgende Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 26/600 *prep grade* Säule zeigte, dass YopB1-168 in einem einzelnen Peak eluiert wurde.

Das entsprechende Retentionsvolumen der Größenausschlusschromatographie konnte mit Hilfe einer Kalibriergeraden einem Molekulargewicht von 55.4 kDa zugeordnet werden. Dieser Wert lag im Bereich eines trimeren Zustandes von YopB1-168. Die Fraktionen unter dem Peak wurden für die nachfolgende Charakterisierung vereinigt.

Ergebnisse

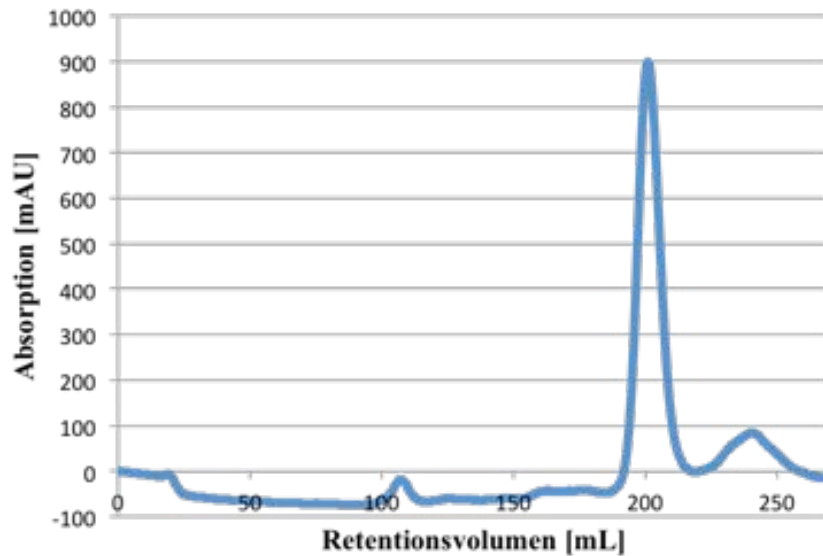


Abbildung 41: Größenausschlusschromatographie YopB1-168.

(A) Retentionsprofil der Größenausschlusschromatographie von YopB1-168 mit einer Superdex 200 26/600 *prep grade* Säule. Das zugehörige Retentionsvolumen betrug 200 mL. Für YopB1-168 wurde anhand der Kalibriergeraden ein Molekulargewicht von 55.4 kDa berechnet.

4.3.4 Charakterisierung

Die Charakterisierung des gereinigten YopB1-168 erfolgte mittels DLS und CD-Spektroskopie bei einer Konzentration von 0.8 mg/mL beziehungsweise 0.2 mg/mL. Die DLS-Messungen ergaben einen hydrodynamischen Radius von 3.6 ± 0.2 nm, dies würde unter der Annahme eines globulären Proteins einem berechneten Molekulargewicht von 61 kDa entsprechen. Dieses Ergebnis deckt sich annähernd mit dem berechneten Molekulargewicht der Größenausschlusschromatographie und spricht ebenso für ein Trimer in Lösung. Die Ergebnisse der CD-Spektroskopie und die zugehörige Sekundärstrukturvorhersage nach dem Algorithmus von Yang *et al*¹⁷⁸ offenbarten einen Anteil von über 50 % an β -Faltblättern. Zudem lagen 46 % als ungeordnete Teilstrukturen vor bei einem RMS-Wert von 21.9. Dieses Resultat und der Kurvenverlauf deuteten daraufhin, dass das Protein im vorliegenden Puffer wahrscheinlich nicht korrekt gefaltet war und somit auch die Sekundärstrukturvorhersage nicht valide ist.

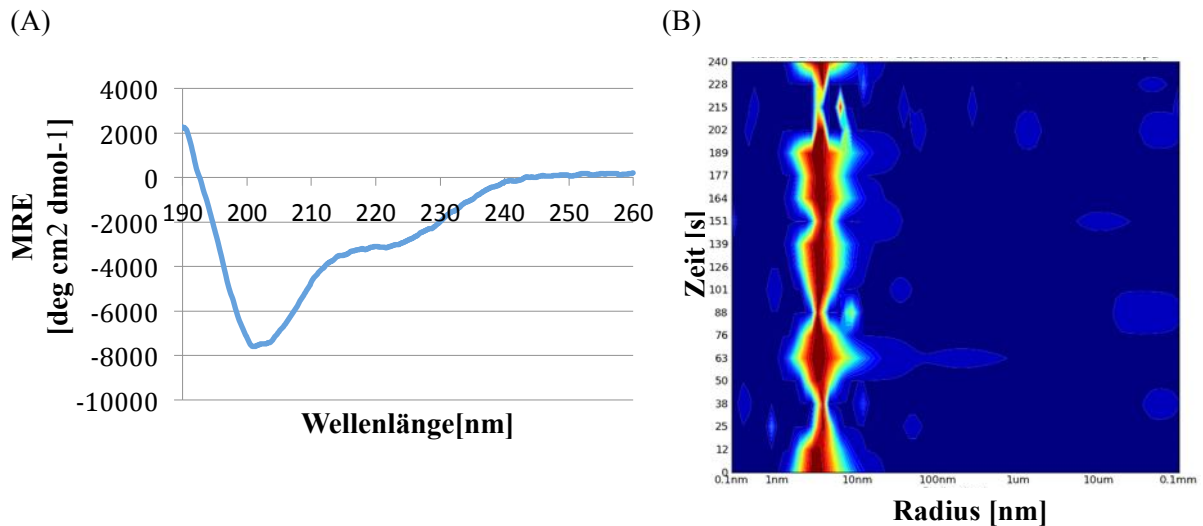


Abbildung 42: CD-spektroskopische Analyse sowie DLS-Messungen von YopB1-168.

(A) CD-spektroskopische Analyse von YopB1-168, die molare Elliptizität pro Aminosäurerest ist gegen die Wellenlänge aufgetragen. Das Spektrum zeigt ein breites Minimum zwischen 205 und 202 nm und einen Nulldurchgang bei 193 nm. (B) Radienverteilung der DLS-Messung von YopB1-168, der Radius ist in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die DLS-Messungen zeigen ein monodisperses Signal mit einem hydrodynamischen Radius von 3.6 ± 0.2 nm.

Für weitere Untersuchungen sollte das Protein zunächst konzentriert werden. Hierbei zeigten sich erneut Probleme bei der Stabilität des Proteins in Lösung. Es war nicht möglich, YopB1-168 auf eine Konzentration über 1 mg/mL einzustellen, da unkontrollierte Aggregation einsetzte, die in Form von DLS visualisiert werden konnte und zu einer polydispersen Lösung führte. Dieses Verhalten konnte auch bei Lagerung der Proteinlösung bei 4 °C über einen Zeitraum von mehr als zwei Tagen beobachtet werden. Folglich wurde versucht, das gereinigte Protein bei unterschiedlichen pH-Werten und unter Zugabe verschiedener Additive zu stabilisieren. Dies führte jedoch nicht zum gewünschten Erfolg. Das Konstrukt YopB1-168 zeigte sich demnach als nicht geeignet und konnte keinen weiteren strukturellen Untersuchungen zugänglich gemacht werden. Daher wurde dieses Konstrukt aufgrund seiner fehlenden Integrität in dieser Form nicht weiter verfolgt.

4.4 YopB1-168 und SycD21-163 als Komplex

Da es nicht gelungen ist, YopB1-168 als stabiles Protein zu produzieren, wurde eine neue Strategie entwickelt, das Protein zu stabilisieren. Aufgrund der Tatsache, dass SycD im T3SS als Chaperon von YopB fungiert, wurde sich dieser Ansatz zu Nutze gemacht, um die beiden Proteine als Komplex herzustellen.

4.4.1 Reinigung und Komplexbildung

Zunächst wurde versucht, die separat gereinigten Proteine zusammen zu inkubieren, um so eine Komplexbildung zu initiieren. Die nachfolgende Analyse zeigte aber, dass diese Vorgehensweise nicht zum gewünschten Erfolg führte (Daten nicht gezeigt) und sich kein Komplex gebildet hatte. Um die Komplexbildung zu ermöglichen, wurden die Proteine daher im Folgenden bereits beim Zellaufschluss miteinander vereinigt, noch bevor sie ihren Faltungszustand ausgebildet haben. Hierfür wurden die resuspendierten Zellen nach dem Auftauen vereinigt und nach Zugabe von Lysozym und anschließend PMSF zusammen sonifiziert. Da beide Proteine über einen GST-tag verfügten, wurde die Proteinlösung nach erfolgtem Aufschluss auf eine Glutathion-Agarose-Matrix gegeben und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Durchlauf gesammelt und analog zur etablierten Reinigung der einzelnen Proteine wurden drei Waschschrte durchgeführt. Die proteolytische Spaltung der jeweiligen *GST-tags* erfolgte ebenfalls, während diese an die Säulenmatrix gebunden war.

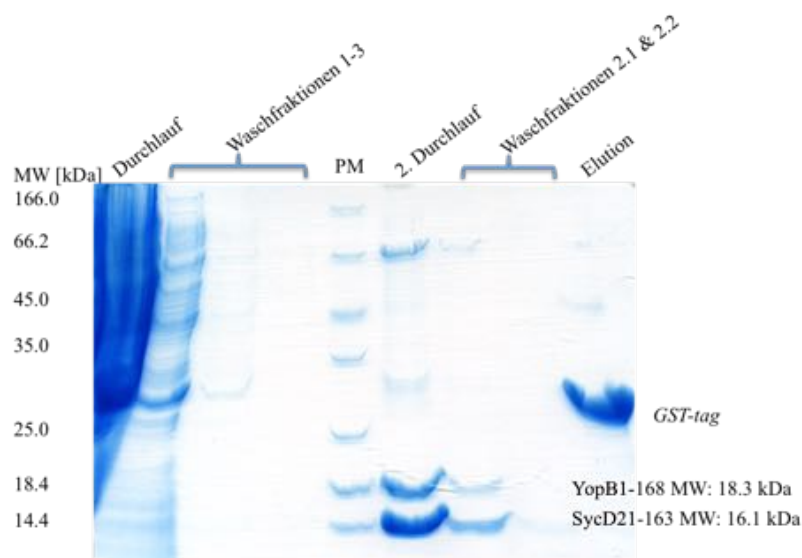


Abbildung 43: SDS-PAGE-Analyse YopB1-168 und SycD21-163, gemeinsame Reinigung und proteolytische Spaltung des *GST-tags* auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.

Einzelne Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung von YopB1-168 und SycD21-163 mit integrierter proteolytischer Spaltung des jeweiligen *GST-tags*. In der Fraktion des 2. Durchlaufs ist eindeutig eine Bande auf Höhe der 18.4 kDa-Bande und eine Bande oberhalb der 14.4 kDa-Bande detektierbar. PM: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*

Die SDS-PAGE-Analyse der Reinigung zeigt, dass sich beide Proteine im zweiten Durchlauf und in der Waschfraktion 2.1 befinden und erfolgreich von ihrem *GST-tag* getrennt werden konnten. Um herauszufinden, ob die beiden Proteine einen Komplex eingegangen sind oder nur nebeneinander vorlagen, wurde eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 26/600 *prep grade* durchgeführt. Hier gab es zunächst zwei verschiedene

Absorptionsmaxima, die beide auf einer SDS-PAGE analysiert wurden. Es konnte festgestellt werden, dass in dem Maximum Nummer 1 beide Proteine zusammen vorlagen, während im zweiten Maximum ausschließlich SycD21-163 detektiert werden konnte. Die Retentionskurve sowie die zugehörige SDS-PAGE-Analyse sind in der folgenden Abbildung gezeigt.

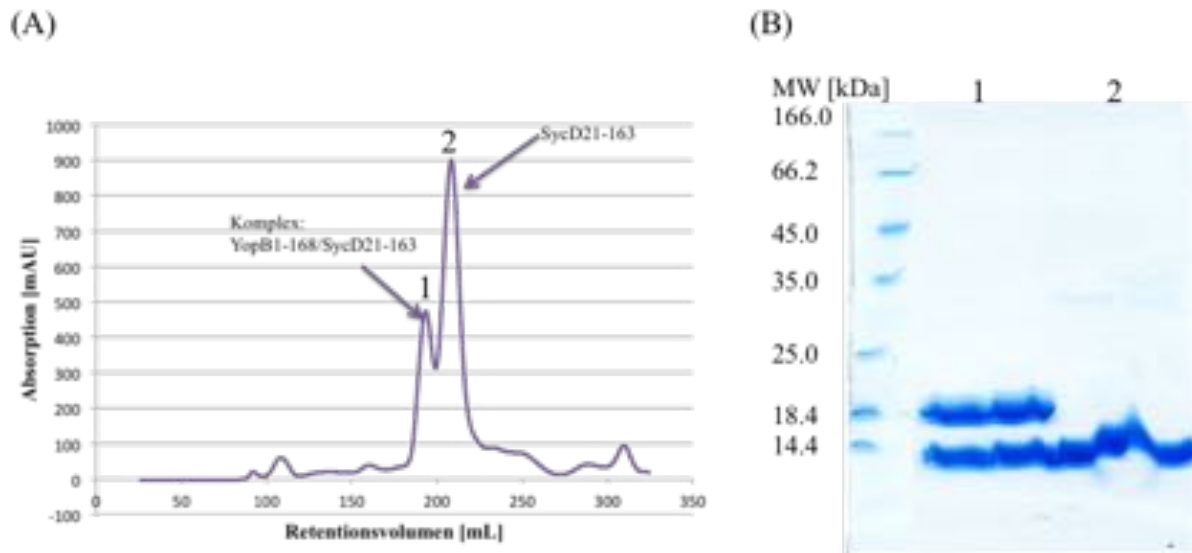


Abbildung 44: Größenausschlusschromatographie YopB1-168/SycD21-163.

(A) Retentionsprofil der Größenausschlusschromatographie von YopB1-168/SycD21-163 mit einer Superdex 200 26/600 *prep grade* Säule. Das zugehörige Retentionsvolumen betrug für Peak 1 193 mL und für Peak 2 208 mL. (B) Analyse von jeweils zwei Fraktionen der zwei Peaks der Größenausschlusschromatographie, in denen im ersten Peak eindeutig eine Bande auf Höhe der 18.4 kDa-Bande und eine Bande oberhalb der 14.4 kDa-Bande detektierbar sind und im zweiten Peak nur die oberhalb der 14.4 kDa-Bande. PM: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*.

Der zweite Peak zeigte ein Retentionsvolumen von 208 mL und konnte anhand der SDS-PAGE-Analyse und dem berechneten Molekulargewicht von 38 kDa dimerem SycD21-163 zugewiesen werden. Der erste Peak hingegen, der dem Komplex aus beiden Proteinen zugeordnet werden konnte, eluierte bei einem Retentionsvolumen von 193 mL. Dies entsprach einem kalkulierten Molekulargewicht von 63 kDa, dessen Wert kein eindeutiges Ergebnis in Hinsicht der Stöchiometrie zulässt. Es könnten sowohl ein elongierter 1:1 Komplex (MW = 34 kDa) als auch ein Protein im 2:1 Komplex (MW = 50-52 kDa) vorliegen. Zur anschaulicheren Darstellung wurden Größenausschlusschromatographien der einzelnen Proteine aus getrennten Reinigungen auf der gleichen Säule durchgeführt und die Retentionskurven miteinander verglichen. Die Retentionsprofile sind in überlagerter Form in Abbildung 45 dargestellt. Die anhand der Kalibriergeraden berechneten Molekulargewichte der zugehörigen Peaks sind ebenfalls der Abbildung zu entnehmen.

Ergebnisse

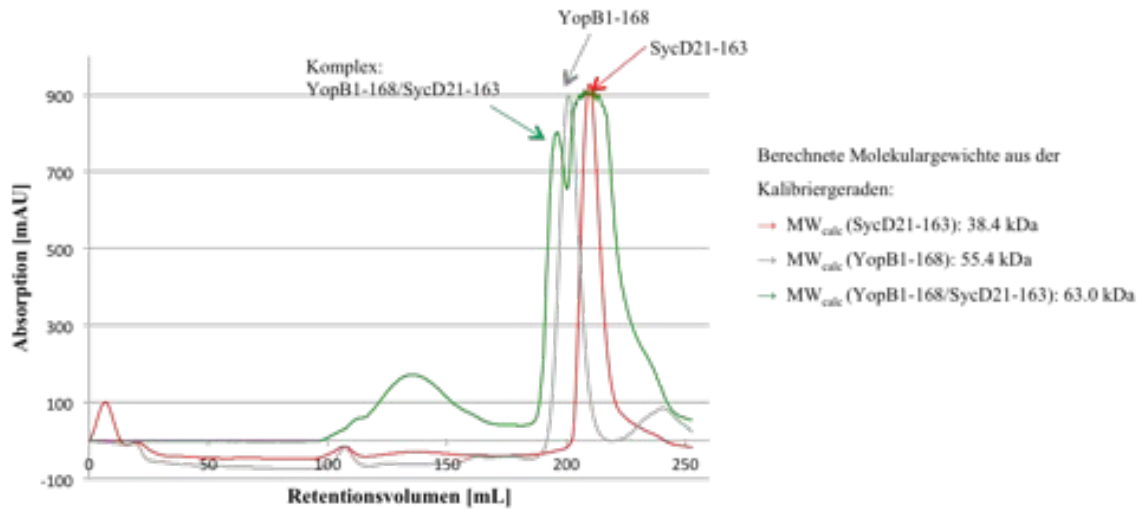


Abbildung 45: Größenausschlusschromatographie YopB1-168/SycD21-163.

(A) Überlagerte Retentionsprofile der Größenausschlusschromatographie von YopB1-168/SycD21-163 respektive der einzelnen Proteine mit einer Superdex 200 26/600 *prep grade* Säule. Die zugehörigen berechneten Molekulargewichte sind angegeben.

Um zu verifizieren, dass sich tatsächlich ein Komplex gebildet hatte, wurde ein Zellpellet SycD21-163 mit *(His)₆-tag* und ein Zellpellet YopB1-168 mit *GST-tag* aufgetaut, vereinigt und aufgeschlossen. Die affinitätschromatographische Reinigung erfolgte mittels Glutathion-Agarose-Matrix nach etabliertem Protokoll.

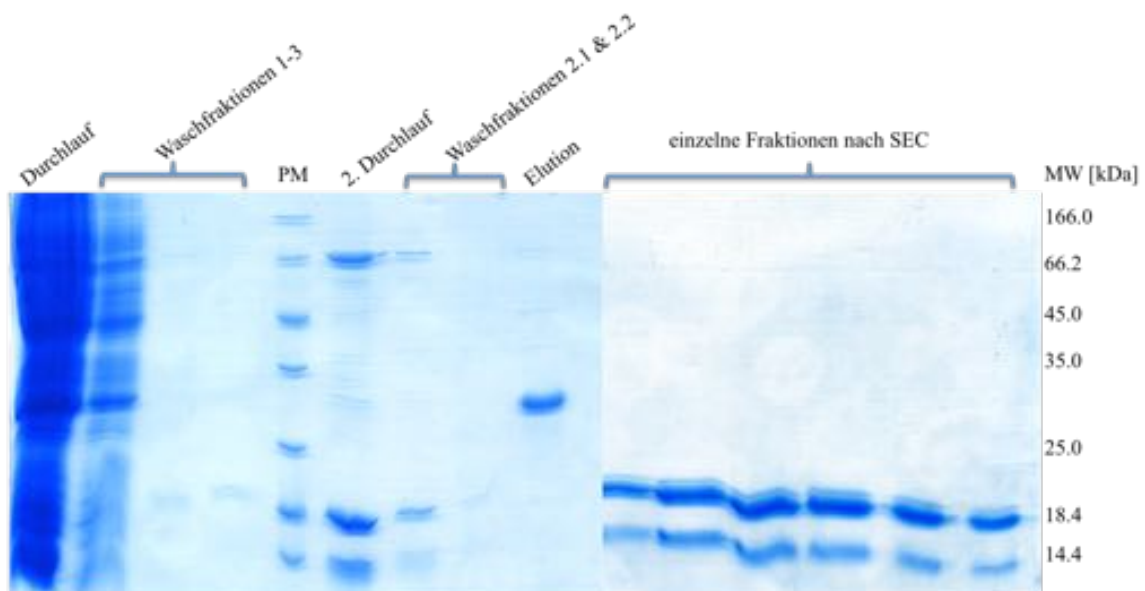


Abbildung 46: SDS-PAGE-Analyse YopB1-168 und SycD21-163, gemeinsame Reinigung und proteolytische Spaltung des *GST-tags* auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.

Analyse einzelner Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung von YopB1-168 und SycD21-163 mit integrierter proteolytischer Spaltung des jeweiligen *tags* und der Größenausschlusschromatographie. In der Fraktion des 2. Durchlaufs sowie nach der Größenausschlusschromatographie ist eindeutig eine Bande auf Höhe der 18.4 kDa-Bande und eine Bande oberhalb der 14.4 kDa-Bande detektierbar. PM: Proteinmolekulargewichtsmarker *Unstained Protein Molecular Weight Marker*

Da sich nach erfolgter proteolytischer Spaltung der Affinitäts-*tags* ebenfalls beide Proteine im zweiten Durchlauf befanden, konnte bewiesen werden, dass sich ein Komplex aus beiden Proteinen gebildet hat. Wäre dieses nicht der Fall gewesen, hätte SycD21-163 aufgrund des (*His*)₆-*tag* nicht an die Säule binden können und wäre direkt im ersten Durchlauf detektiert worden. Nur durch Verbindung mit YopB1-168 konnte es in dieser Fraktion auftauchen. Die gereinigten Fraktionen wurden ebenfalls über die Superdex 200 26/600 *prep grade* Säule gereinigt und das Retentionsvolumen des Komplexes entsprach dem der vorherigen Reinigung beider Proteine mit *GST-tag*. Ein zusätzlicher Vorteil dieser Variante war, dass kein dimeres SycD21-163 identifiziert und somit eine höhere Reinheit des Komplexes erlangt werden konnte. Anschließend wurde der Komplex charakterisiert.

4.4.2 Charakterisierung und Kristallisationsexperimente

Mit dem Komplex aus SycD21-163 und YopB1-168 wurden zunächst DLS-Messungen bei einer Konzentration von 1.5 mg/mL durchgeführt. Diese zeigten eine monodisperse Proteinlösung mit einem hydrodynamischen Radius von 3.4 ± 0.1 nm.

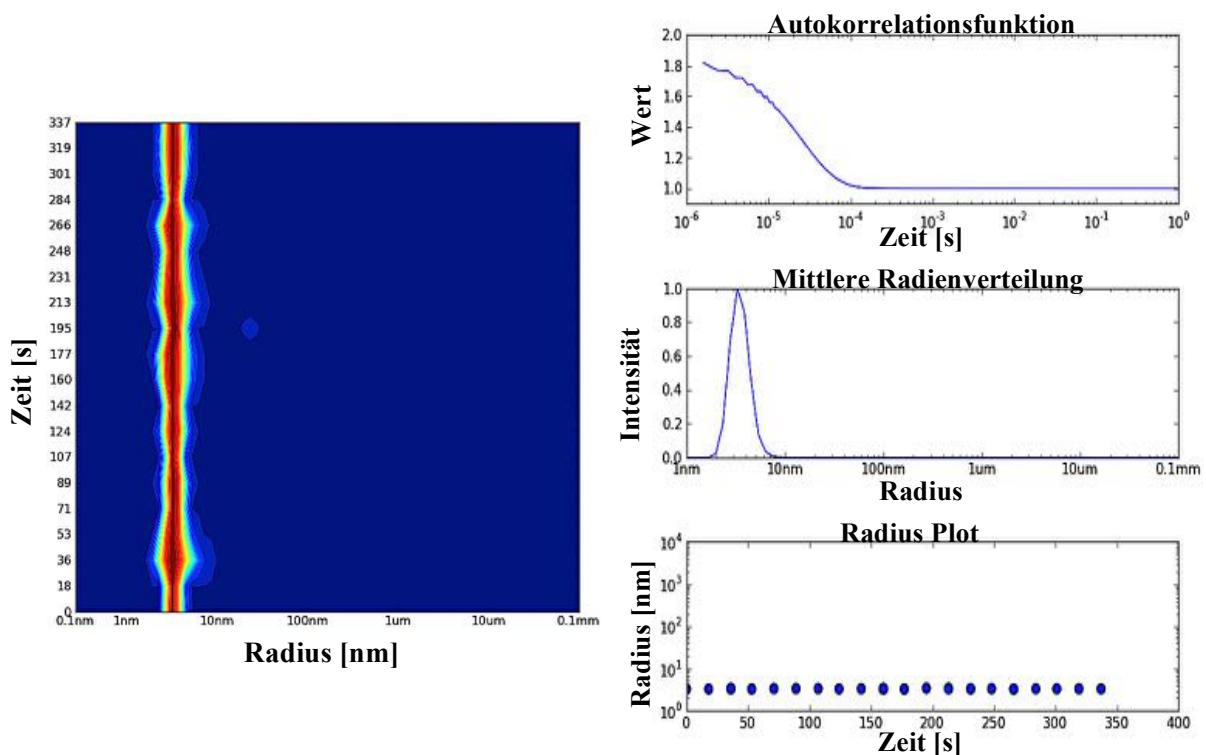


Abbildung 47: Ergebnisse der DLS-Messungen von YopB1-168/SycD21-163

Linke Seite: Radienverteilung der DLS-Messung, der Radius ist in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Rechte Seite: Hier sind Autokorrelationsfunktion des DLS-Signals, die mittlere Radienverteilung und der Radiusplot, bei dem der Radius gegen die Zeit aufgetragen ist, dargestellt. Die DLS-Messungen zeigen ein monodisperses Signal.

Ergebnisse

Zusätzlich wurden CD-spektroskopische Messungen bei einer Konzentration von 0.2 mg/mL durchgeführt. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Der Komplex aus YopB1-168 und SycD21-163 zeigt eindeutig einen gefalteten Zustand auf.

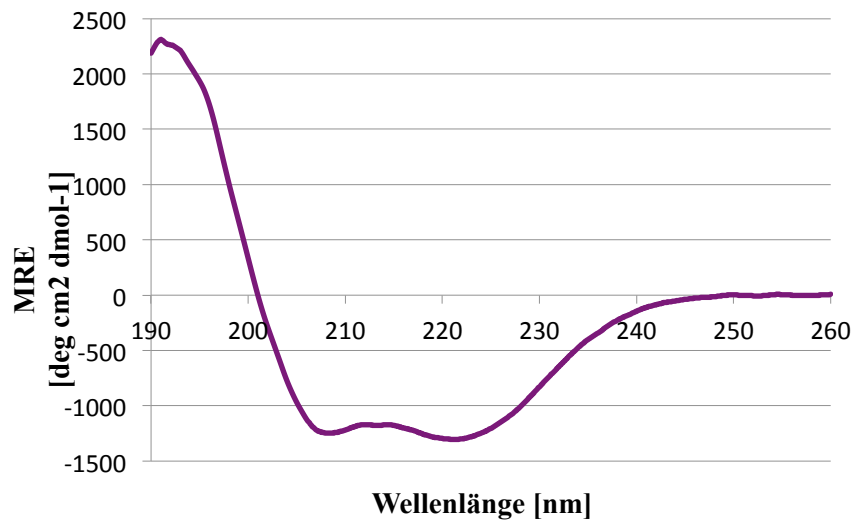


Abbildung 48: CD-spektroskopische Analyse von YopB1-168/SycD21-163.

CD-spektroskopische Analyse von YopB1-168/SycD21-163, die molare Elliptizität pro Aminosäurerest ist gegen die Wellenlänge aufgetragen. Das Spektrum zeigt zwei Minima bei 208 und 221 nm und einen Nulldurchgang bei 201 nm.

Eine Sekundärstrukturvorhersage nach dem Algorithmus von Yang *et al*¹⁷⁸ gab einen α -helikalen Anteil von 40 % vor, während 21 % als β -Faltblattstruktur vorlag. Der Rest teilte sich in 8 % *Coil*- sowie 31 % ungeordnete Teilstrukturen auf. Der RMS-Wert betrug 3.2.

Die Ergebnisse der Charakterisierung sahen erneut vielversprechend aus, um nachfolgend Kristallisationsexperimente durchzuführen. Daher wurden für den Komplex aus YopB1-168/SycD21-163 verschiedene *Screening*-Experimente mit den Pipettierrobotern Honeybee 961 (Genomic Solutions, USA) sowie Oryx4 (Douglas Instruments, UK) unter Verwendung der kommerziellen Kristallisations-*Screens* angesetzt. Das Protein wurde dabei in einem Konzentrationsbereich von 8 -14 mg/mL eingesetzt. Bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit konnte bisher kein Kristallwachstum identifiziert werden.

4.4.3 SAXS-Analyse

Mit dem Komplex aus YopB1-168/SycD21-163 wurde eine SAXS-Analyse für vier verschiedene Konzentrationen durchgeführt. Hierfür wurde der Komplex wie zuvor beschrieben gereinigt und mittels DLS die Monodispersität der Proteinlösung überprüft. Die

SAXS-Daten wurden an der P12-Beamline des PETRA III- Speicherringes (DESY Hamburg) aufgenommen. Das Probenvolumen betrug 20 μL und vor beziehungsweise nach jeder Messung wurde der identische Puffer gemessen und dessen Signal vom Proteinsignal abgezogen. Die Belichtungszeit der jeweiligen Messungen betrug 45 ms.

Die Streudaten der niedrigsten Konzentration wurden mit dem Software-Paket PRIMUS¹⁷⁹ analysiert und für die anschließende Modellberechnung verwendet. Die folgende Guinier-Analyse zeigte einen überwiegend linearen Verlauf. Der zugehörige Gyrationradius R_g betrug 2.95 ± 0.48 nm. Mit dem in PRIMUS integrierten Programm GNOM¹⁸⁰ wurde die Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$ generiert. Diese resultierte in einem maximalen Partikelabstand D_{max} von 12.5 nm und einem Porod-Volumen von 57.90 nm^3 . Das entsprechend berechnete Molekulargewicht MW_{Porod} betrug 34 kDa und deutet damit eindeutig auf einen Komplex mit einer Stöchiometrie von 1:1 hin.

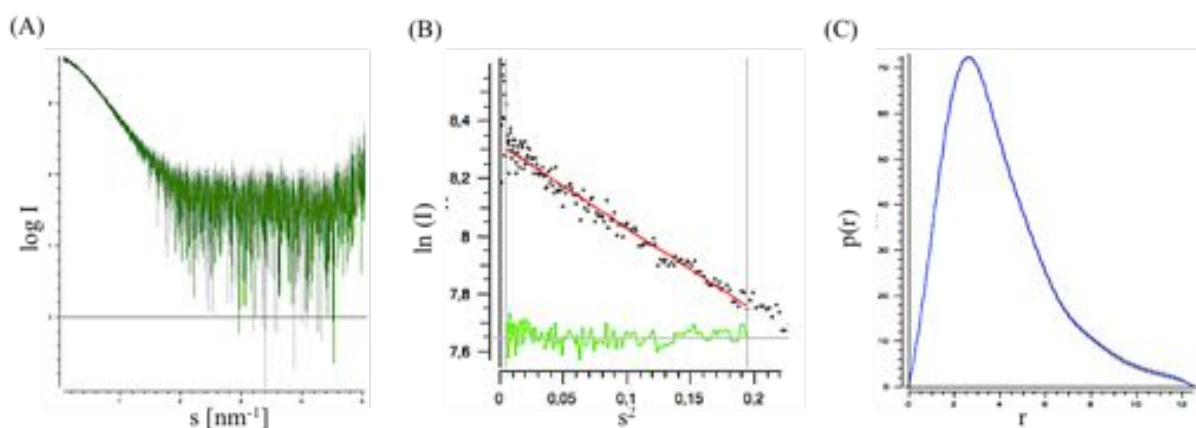


Abbildung 49: SAXS-Datenanalyse von YopB1-168/SycD21-163 mit PRIMUS

(A) Gemittelte und extrapolierte Streudaten mit zugehörigem Guinier-Plot (B) sowie der Abstandsverteilungsfunktion, aus der ein D_{max} von 12.5 nm berechnet wurde (C).

Ende 2015 wurde von Nguyen *et al.* die Struktur des Komplexes der entsprechenden Homologe AcrH10-159/AopB40-264 aus *A. hydrophila* aufgeklärt (PDB: 3WXX)⁹⁸. Der entsprechende Teil dieser Struktur wurde als Vorlage für die anschließende Modellberechnung mit CORAL verwendet¹⁸⁴. Hierfür wurde ein Sequenz-Alignment durchgeführt und anschließend die entsprechenden Aminosäurereste in der pdb-Datei angepasst (AopB45-166). AopB und YopB besitzen eine Sequenzidentität von 46 %, AcrH und SycD 65 %. Da in der hochauflösenden Struktur der N-Terminus fehlt, wurde dieser Teil zusätzlich von CORAL berechnet.

Ergebnisse

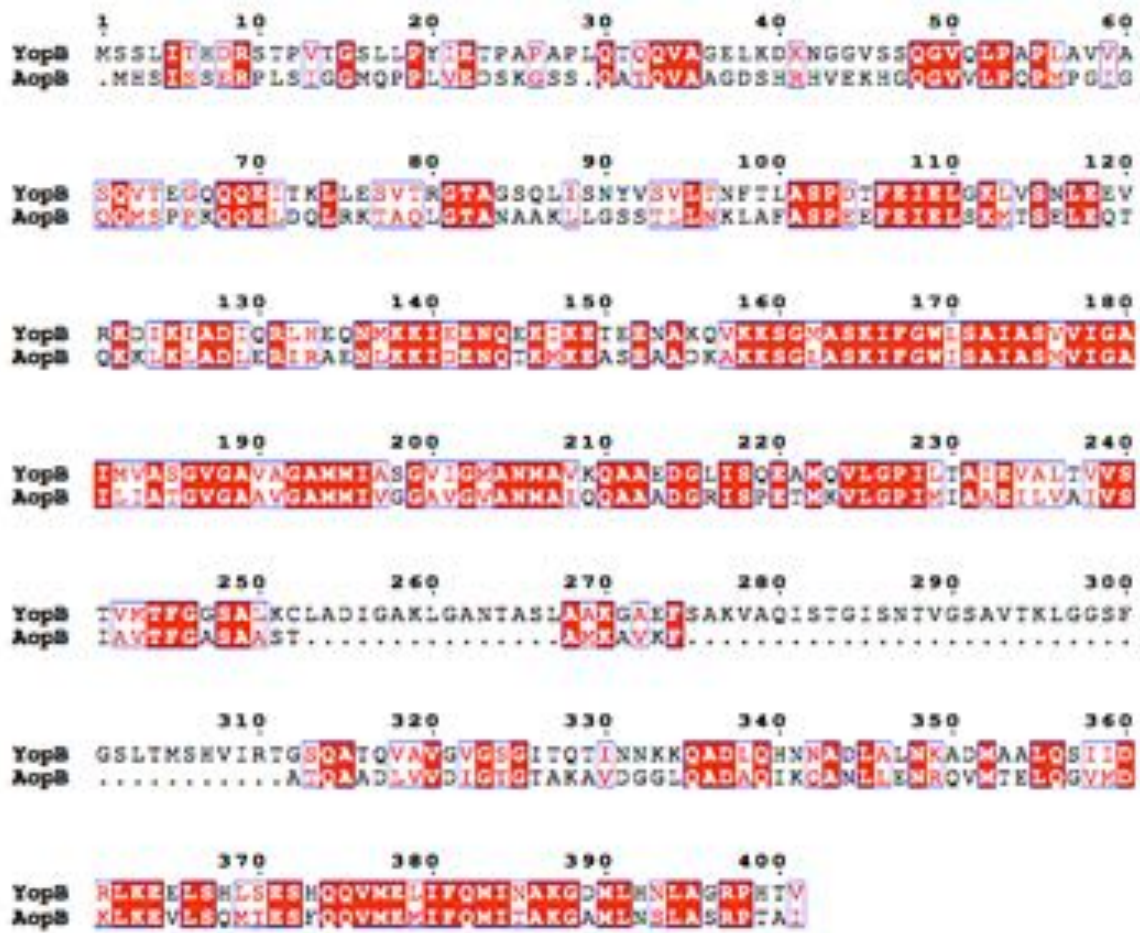


Abbildung 50: Sequenzvergleich von AopB aus *A. hydrophila* und YopB aus *Y. enterocolitica*

Vergleich der Aminosäuresequenzen von AopB (*A. hydrophila*) und YopB (*Y. enterocolitica*), durchgeführt mit Clustal Omega¹⁸⁵ und dargestellt mit ESPript¹⁸⁶. Identische Aminosäuren sind in roten Boxen dargestellt, Aminosäuren mit ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften sind in roter Schrift mit Umrandung dargestellt.

Des Weiteren wurde ein DAMMIF *ab initio* Modell erstellt¹⁸¹, welches gut mit dem über CORAL berechneten *rigid body* Modell übereinstimmt. Die berechneten Modelle sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

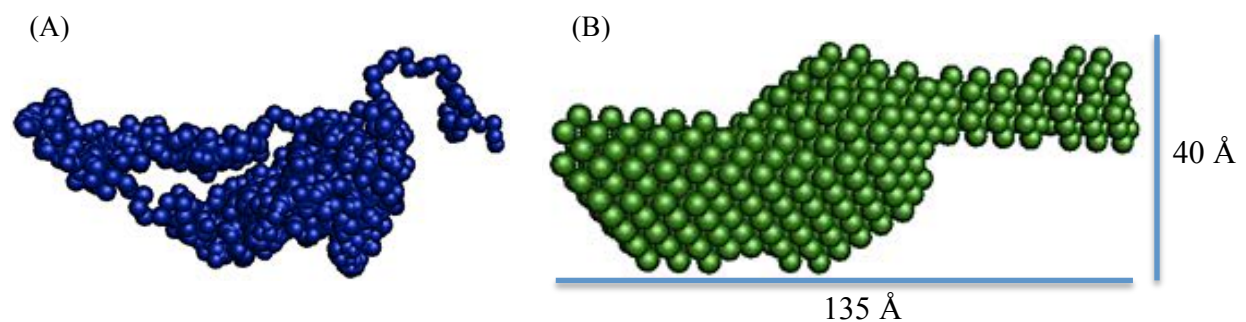
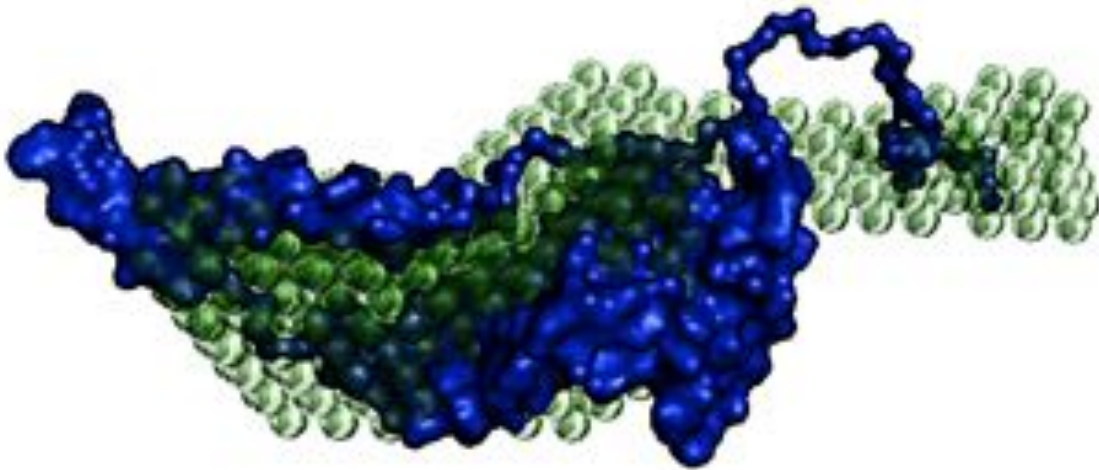


Abbildung 51: Berechnete SAXS-Modelle für YopB1-168/SycD21-163

(A) Mit CORAL berechnetes *rigid body* Modell des Komplexes aus YopB1-168 und SycD21-163. (B) Mit DAMMIF berechnetes *ab initio* Modell von YopB1-168/SycD21-163.

Beide SAXS-Modelle zeigten ein deutlich elongiertes Molekül. Das *rigid body* Modell wies einen maximalen Durchmesser von 13.1 nm auf, das *ab initio* Modell einen von 13.5 nm. Zur Veranschaulichung ist in der folgenden Abbildung eine Überlagerung der beiden Modelle dargestellt sowie eine Überlagerung des *rigid body* Modells mit der entsprechend angepassten, verwendeten Vorlage der hochaufgelösten Struktur.

(A)



(B)

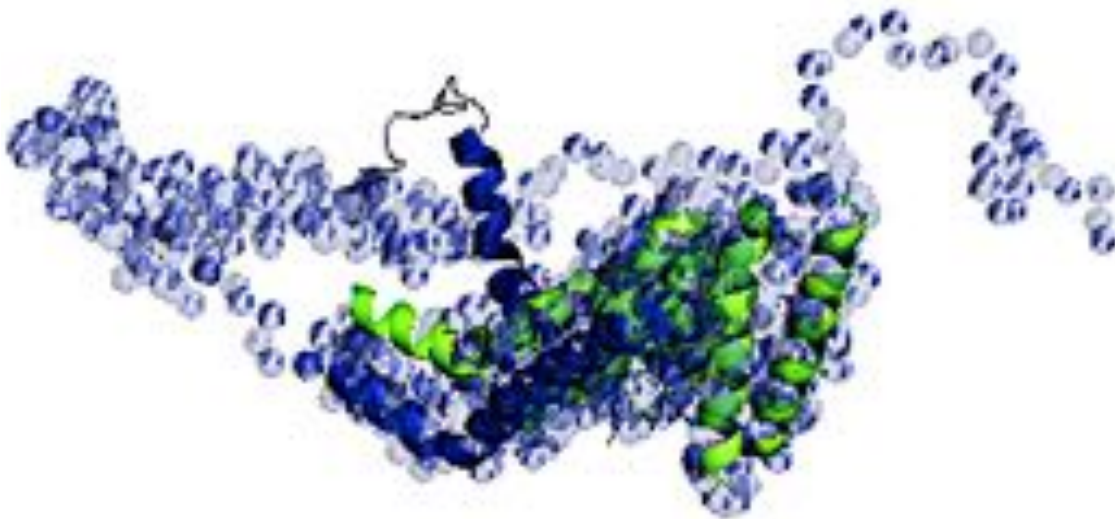


Abbildung 52: Überlagerung der beiden berechneten SAXS-Modelle von YopB1-168/SycD21-163

(A) Überlagerung des mit CORAL berechneten rigid body Modells (blau) und des mit DAMMIF berechneten ab initio Modell (grün, transparent). (B) Überlagerung des rigid body Modells (blau, transparent) mit der für die Berechnungen verwendeten Strukturvorlage. Der Komplex der Homologe AopB/AcrH (PDB: 3WXX) ist in der *Cartoon*-Darstellung gezeigt. Es ist nur der Abschnitt gezeigt, der mit dem verwendeten Komplex YopB1-168/SycD21-163 korrespondiert (AcrH10-159: grün, AopB45-166: blau).

Ergebnisse

Die SAXS-Daten zeigten deutlich, dass es sich um einen 1:1 Komplex aus YopB1-168 und SycD 21-163 handelte. Bei dem Teil, der sich nicht mit dem Strukturmodell überlagert, handelt es sich um den N-Terminus von YopB1-168. Dieser erscheint vornehmlich unstrukturiert und legt sich um den kompakten restlichen Teil des Komplexes herum.

Diese elongierte und anscheinend äußerst flexible Form des N-Terminus von YopB1-168 stellt einen Erklärungsansatz dar, dass dieses Konstrukt der Kristallisation bisher nicht zugänglich war. Die flexiblen Teile können auf die Ausbildung eines putativen Kristallgitters negativen Einfluss nehmen und diese verhindern.

4.5 Co-Expression YopB/SycD21-163

Da zuvor bewiesen werden konnte, dass YopB und SycD21-163 einen Komplex eingehen und in der Literatur für Homologe der Translokatoren ebenfalls gezeigt werden konnte, dass sie mit ihrem entsprechenden Chaperon co-exprimiert werden können^{187,188}, wurde dieser Ansatz verfolgt, um weitere Konstrukte von YopB der Expression und Reinigung zugänglicher zu machen. Auf Grundlage des Sequenzvergleiches mit AopB und der hochauflösenden Struktur wurden drei neue Konstrukte erarbeitet. Es wurde sich für YopB47-160, YopB47-266, YopB1-266 und das Volllängenkonstrukt von YopB entschieden.

Für die Co-Expression wurde der petDuet-1 Vektor verwendet, der über zwei *Multiple Cloning Sites* verfügt. In die erste wurde über die Endonukleasen BamHI und HindIII SycD21-163 kloniert, diese kodiert zusätzlich für einen N-terminalen *(His)₆-tag*, der den Komplex für eine affinitätschromatographische Reinigung über NiNTA-Matrix zugänglich macht. In die zweite *Multiple Cloning Site* wurden über die Endonukleasen NdeI und XhoI die jeweiligen YopB-Konstrukte kloniert. Der Erfolg wurde mittels Sequenzierungsreaktion überprüft. Alle Konstrukte konnten erfolgreich in den Vektor kloniert werden.

4.5.1 Initiale Expressions- und Reinigungsexperimente

Die Co-Expression von YopB/SycD21-163 erfolgte in BL21 (DE3) Rosetta-Zellen. Es wurden vier Kolben mit jeweils 1 L –Expressionskultur angesetzt. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 1.0 mit 1 mM IPTG und die Kulturen wurden für sechs Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und nach Zugabe von 0.2 mM PMSF und 0.1 mM Benzamidin aufgeschlossen. Die affinitätschromatographische Reinigung wurde auf

einer Ni-NTA-Agarose-Matrix durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Das Molekulargewicht von YopB betrug 41.9 kDa und das von SycD21-163 inklusive N-terminalem *(His)₆-tag* 18.4 kDa. Das Ergebnis der Analyse ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass SycD21-163 in hoher Ausbeute überexprimiert werden konnte, für YopB ist dagegen nur eine sehr schwache Bande zu sehen. Diese Bande konnte ebenfalls in der Elutionsfraktion detektiert werden, was bedeutet, dass sich ein Komplex gebildet hat aus YopB/SycD21-163. Allerdings ist der Anteil am Komplex gegenüber dem von SycD21-163 sehr gering und weitere Reinigungsschritte führten dazu, dass YopB nicht mehr detektiert werden konnte.

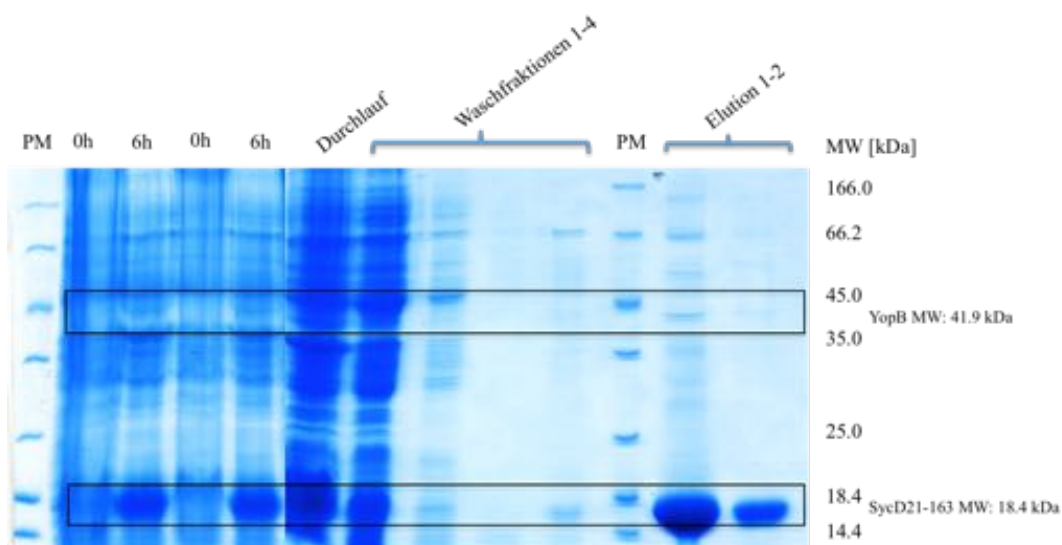


Abbildung 53: SDS-PAGE-Analyse, Expressionsprofil und Reinigung von YopB/SycD21-163, jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.

Links: 0h: Zellkultur zum Zeitpunkt $t = 0$ h, 6h: Zellkultur zum Zeitpunkt $t = 6$ h, Die Banden der Zielproteine sind markiert. Nach sechs Stunden ist eine signifikante Überexpression von SycD21-163 im erwarteten Molekulargewichtsbereich auf Höhe der 18.4 kDa-Bande des Proteingrößenstandards zu erkennen. Für YopB ist eine schwache Bande unterhalb der 45.0 kDa-Bande zu sehen. Rechts: Einzelne Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung mit Ni-NTA-Agarose-Matrix. In den Elutionsfraktionen sind erneut eine starke Bande für SycD21-163 und eine schwache Bande für YopB erkennbar. PM: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*

Da zusätzliche Reinigungsstrategien nicht zu einer Isolation des Komplexes führten, konnte dieser nicht weiter charakterisiert werden. Optimierungen der Expressionsparameter konnten nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Ausbeute an YopB führen. Für die Konstrukte YopB1-266 und YopB47-266 war dies ebenso der Fall, was wahrscheinlich auf die schwer zu exprimierenden, hydrophoben Bereiche der Transmembrandomänen zurückzuführen ist. Die Ausbeuten reichten auch hier nicht, um weitere Untersuchungen durchzuführen. Für das Konstrukt YopB47-160 ohne Transmembrandomänen konnte zwar eine signifikante

Ergebnisse

Überexpression detektiert werden, jedoch erfolgte die Komplexbildung mit SycD21-163 nicht vollständig, so dass der Hauptteil des Proteins in den Waschfraktionen wiederzufinden war.

Aufgrund der geringen Ausbeuten, die zu klein waren, um weiter damit zu arbeiten und strukturelle Untersuchungen durchzuführen, wurden diese Komplexe an dieser Stelle nicht weiter verfolgt. Für folgende Arbeiten müssen die Konstrukte weiter optimiert, beziehungsweise die Expressionsbedingungen und die nachfolgende Reinigung verbessert werden.

4.6 YopD

4.6.1 Sequenzanalyse

Zu Beginn der Arbeit wurde YopD ebenso wie YopB analysiert, um ein geeignetes Konstrukt zu designen, da in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass die Expression von YopD als ganzem nicht zu löslichem Protein geführt hat. Wie bei YopB wurden mehrere Analysen durchgeführt und es wurde sich dazu entschieden, ebenfalls den N-Terminus vor der Transmembrandomäne zu klonieren.

4.6.2 YopD1-130 Klonierung, initiale Expressionsversuche

YopD1-130 wurde analog zu den anderen Konstrukten in pRSET A und in pGEX-4T-1 kloniert. Im Gegensatz zu den anderen Zielproteinen konnte YopD1-130 als Fusionsprotein mit *GST-tag* in keinem der verwendeten Bakterienstämme exprimiert werden. Auch nicht bei Optimierung jeglicher Parameter. Es konnte immer nur eine Bande für das freie GST detektiert werden.

Für das Konstrukt mit *(His)₆-tag* konnte in mehreren Zellstämmen Expression detektiert werden, jedoch nur unlösliches Protein erzeugt werden. Daher wurde ein neuer Vektor mit C-terminalem *(His)₆-tag* ausgetestet, der über einen längeren Linker zwischen *Tag* und Protein verfügt und somit eventuell die Löslichkeit des Proteins steigern kann. Folglich wurde das YopD1-130 in pET-28a(+) umklont.

4.6.3 Expression, Reinigung

Die Expression von YopD1-130 im pET-28a(+)-Vektor erfolgte in BL21 (DE3)-Zellen. Bei einer OD_{600} von 0.6-0.8 wurden die Zellkulturen mit 1 mM IPTG induziert und über Nacht bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und der Zellaufschluss wurde wie in 3.4.2 beschrieben, durchgeführt. In Abbildung 54 ist das Ergebnis der Expression nach erfolgter SDS-PAGE-Analyse dargestellt. Das Molekulargewicht von YopD1-130 mit C-terminalem $(His)_6$ -tag betrug 17.1 kDa. Es ist eine signifikante Überexpression zu sehen. Die korrespondierende Bande liegt allerdings oberhalb des erwarteten Molekulargewichtsbereich zwischen der 18.4 kDa und der 25.0 kDa-Markerbande. Mittels Western Blot mit einem Tetra-His Antikörper (*mouse anti-(H)₄ IgG1*, BSA-free, Qiagen) konnte dennoch verifiziert werden, dass es sich bei dieser Bande um das erwartete Konstrukt YopD-1-130- $(His)_6$ -tag handelte. Die nachfolgende Reinigung erfolgte affinitätschromatographisch über eine Ni-NTA-Agarose-Matrix. In den Elutionsfraktionen zeigte sich jedoch, dass das Protein nicht spezifisch an die Matrix gebunden hat, beziehungsweise es konnte nur eine sehr geringe Ausbeute erzielt werden. Der Großteil des Proteins war im Durchlauf und in der ersten Waschfraktion zu erkennen. Nach Coomassie-Färbung der SDS-PAGE-Analyse war in den Elutionsfraktionen zunächst nichts erkennbar. Die Detektion konnte nur mit Western Blot erzielt werden.

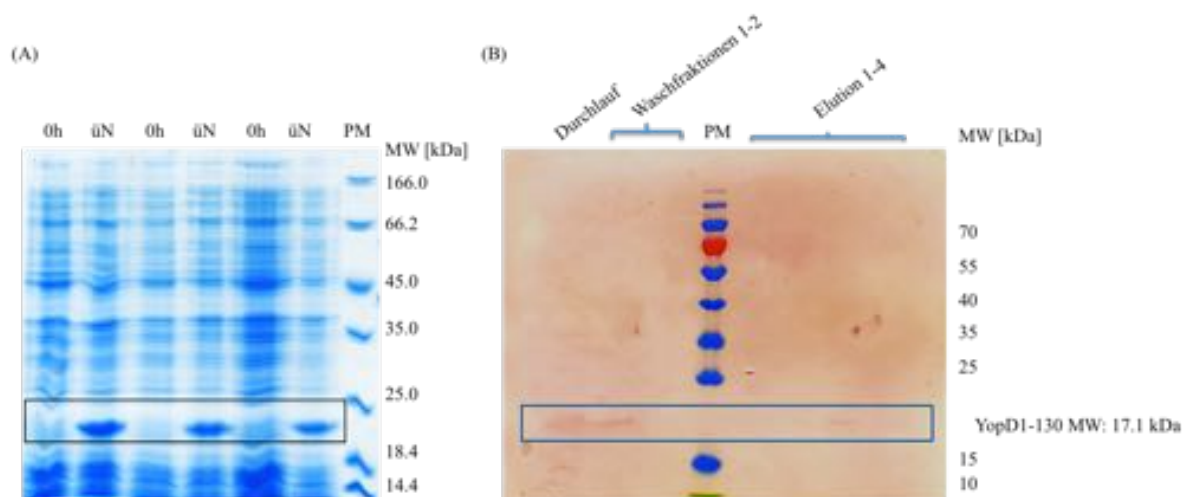


Abbildung 54: SDS-PAGE-Analyse, Expressionsprofil von YopD1-130- $(His)_6$ -tag auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel und Western Blot-Analyse der affinitätschromatographischen Reinigung von YopD1-130.

(A) Expressionsprofil YopD1-130, 0h: Zellkultur zum Zeitpunkt $t = 0$ h, üN: Zellkultur zum Zeitpunkt $t =$ über Nacht, PM: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*. Die Banden des Zielproteins sind markiert. (B) Western Blot-Analyse: Einzelne Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung mit Ni-NTA-Agarose-Matrix. Die Banden des Zielproteins sind markiert. PM: Proteingrößenstandard *PageRulerTM Prestained Protein Ladder*.

Ergebnisse

Die Ausbeute an gereinigtem Protein war so gering, dass es nicht möglich war weitere Untersuchungen und Charakterisierungen mit dem Protein durchzuführen, daher wurde dieses N-terminale Konstrukt von YopD entsprechend nicht weiterverfolgt.

4.7 Co-Expression YopD/SycD21-163

Analog zu YopB wurden ebenfalls Co-Expressionsversuche mit YopD durchgeführt. Hierfür wurde zunächst nur das Gesamtkonstrukt von YopD verwendet und in die zweite *Multiple Cloning Site* des pETDuet-1 Vektors kloniert. In der ersten *Multiple Cloning Site* befand sich bereits SycD21-163. Für die Klonierung von YopD wurden die Endonukleasen NdeI und XhoI verwendet. Per Sequenzierungsreaktion konnte verifiziert werden, dass die Klonierung erfolgreich war.

4.7.1 Expression, Reinigung, Komplexbildung

Die Co-Expression von YopD/SycD21-163 wurde in BL21 (DE3) Rosetta-Zellen durchgeführt. Die Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte bei einer OD_{600} von 1.2 und die Zellen wurden über Nacht bei 18 °C inkubiert. Nach der Ernte der Zellen wurden diese unter Zugabe von 0.2 mM PMSF und 0.1 mM Benzamidin aufgeschlossen. Zur Isolierung der Zielproteine wurde das Zelllysate anschließend auf eine Ni-NTA-Agarose-Matrix gegeben und inkubiert. Die Reinigung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.5 aufgeführt. Die Analyse der gesammelten Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE. Diese ist zusammen mit dem Expressionsprofil in Abbildung 55 dargestellt. Beide Proteine konnten erfolgreich exprimiert werden und haben den gewünschten Komplex ausgebildet, ansonsten wäre YopD nicht in den Elutionsfraktionen zu finden gewesen. Die ausgewählten Fraktionen, die die gewünschten Zielproteine enthielten, wurden vereint und über Nacht dialysiert, um das während der Elution verwendete Imidazol aus der Proteinlösung zu entfernen. Anschließend wurde diese für die proteolytische Spaltung des *(His)₆-tag* von SycD21-163 mit TEV-Protease versetzt. Es folgte ein zweiter Reinigungsschritt mit Ni-NTA-Agarose-Matrix, um YopD/SycD21-163 von dem gespaltenen *(His)₆-tag* und der TEV-Protease zu isolieren.

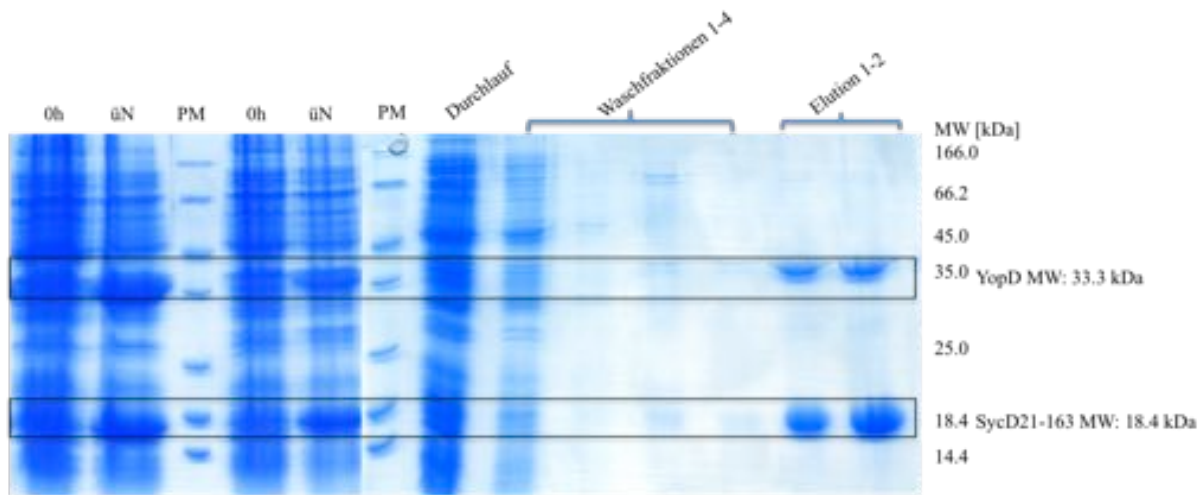


Abbildung 55: SDS-PAGE-Analyse, Expressionsprofil und Reinigung von YopD/SycD21-163, jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.

Links: 0h: Zellkultur zum Zeitpunkt $t = 0$ h, üN: Zellkultur zum Zeitpunkt $t =$ über Nacht, Die Banden der Zielproteine sind markiert. Über Nacht ist eine signifikante Überexpression von YopD und SycD21-163 im erwarteten Molekulargewichtsbereich des Proteingrößenstandards zu erkennen.. Rechts: Einzelne Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung mit Ni-NTA-Agarose-Matrix. In den Elutionsfraktionen sind erneut jeweils zwei ausgeprägte Banden der Zielproteine sichtbar. PM: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*

Nachfolgend wurde eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 26/600 *prep grade* Säule durchgeführt. Die Fraktionen unter den erhaltenen Peaks wurden mittels SDS-PAGE untersucht.

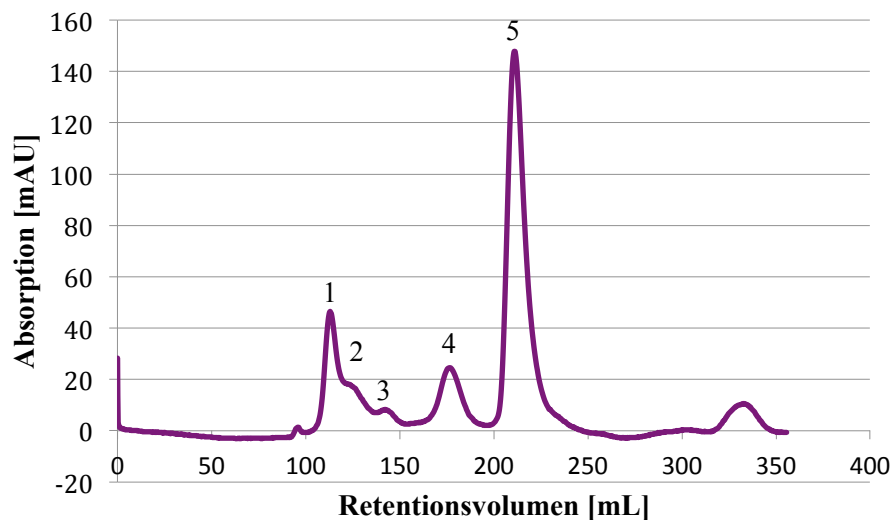


Abbildung 56: Größenausschlusschromatographie YopD/SycD21-163.

Retentionsprofil der Größenausschlusschromatographie von YopD/SycD21-163 mit einer Superdex 200 26/600 *prep grade* Säule. Das zugehörige Retentionsvolumen betrug für Peak 1 112 mL, für Peak 2 122 mL, für Peak 3 139 mL, für Peak 4 177 mL und für Peak 5 211 mL.

Ergebnisse

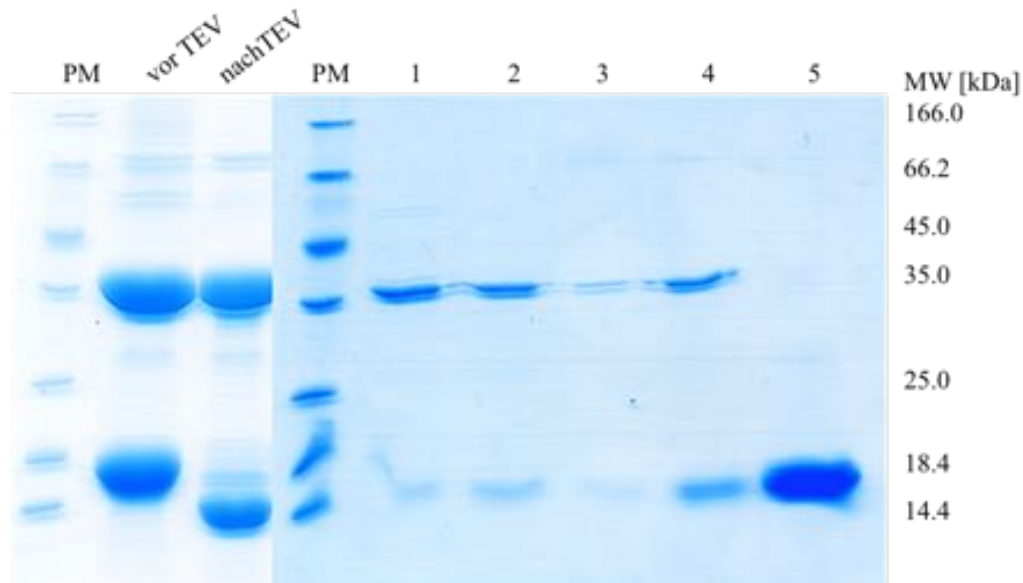


Abbildung 57: SDS-PAGE-Analyse, proteolytische Spaltung des $(His)_6$ -tag und Größenausschlusschromatographie von YopD/SycD21-163, jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.

SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen vor und nach dem TEV-Verdau sowie von jeweils einer Fraktion der fünf Peaks der Größenausschlusschromatographie. Es ist eindeutig erkennbar, dass der TEV-Verdau funktioniert hat. In den Peaks 1-4 sind eindeutig eine Bande unterhalb der 18.4 kDa-Bande und eine Bande auf Höhe der 35.0 kDa-Bande detektierbar. Im fünften Peak ist nur die unterhalb der 18.4 kDa-Bande. PM: Proteinmolekulargewichtsmarker *Unstained Protein Molecular Weight Marker*.

Die Analyse der proteolytischen Spaltung des $(His)_6$ -tags zeigt, dass die korrespondierende Bande von SycD21-163 ein geringeres Molekulargewicht aufwies, was dafür spricht, dass die Spaltung erfolgreich war. Die Peaks 1-4 der Größenausschlusschromatographie zeigen jeweils beide Proteine auf, in diesen Fraktionen liegt der Komplex aus YopD und SycD21-163 vor. Die Peaks 1, 2 und 3 enthielten wahrscheinlich aggregierte Formen des Komplexes. Das Retentionsvolumen von Peak 4 entspricht einem Molekulargewicht von 134 kDa, dies ist deutlich höher als es für einen 1:1 Komplex zu erwarten gewesen wäre. In Peak 5 konnte nur noch SycD21-163 identifiziert werden und das Retentionsvolumen entspricht dem der dimeren Form. Nachfolgend wurden die Fraktionen aus Peak 4 vereint und anschließend charakterisiert.

4.7.2 Charakterisierung

Zunächst wurde die Proteinlösung bei einer Konzentration von 0.3 mg/mL mittels CD-Spektroskopie untersucht. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Die CD-Messungen konnten einen gefalteten Zustand des Komplexes aus YopD und SycD21-163 verifizieren. Eine Sekundärstrukturvorhersage nach dem Algorithmus von Yang *et al*¹⁷⁸ gab

einen α -helikalen Anteil von 37 % vor, während 27 % als β -Faltblattstruktur vorlag. Der Rest teilte sich in 9 % *Coil*- sowie 27 % ungeordnete Teilstrukturen auf mit einem RMS-Wert von 7.5.

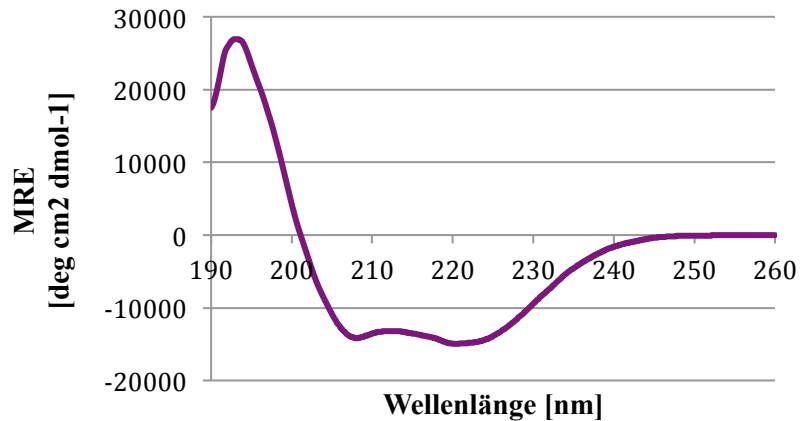


Abbildung 58 CD-spektroskopische Analyse von YopD/SycD21-163.

CD-spektroskopische Analyse von YopD/SycD21-163, die molare Elliptizität pro Aminosäurerest ist gegen die Wellenlänge aufgetragen. Das Spektrum zeigt zwei Minima bei 209 und 220 nm und einen Nulldurchgang bei 201 nm.

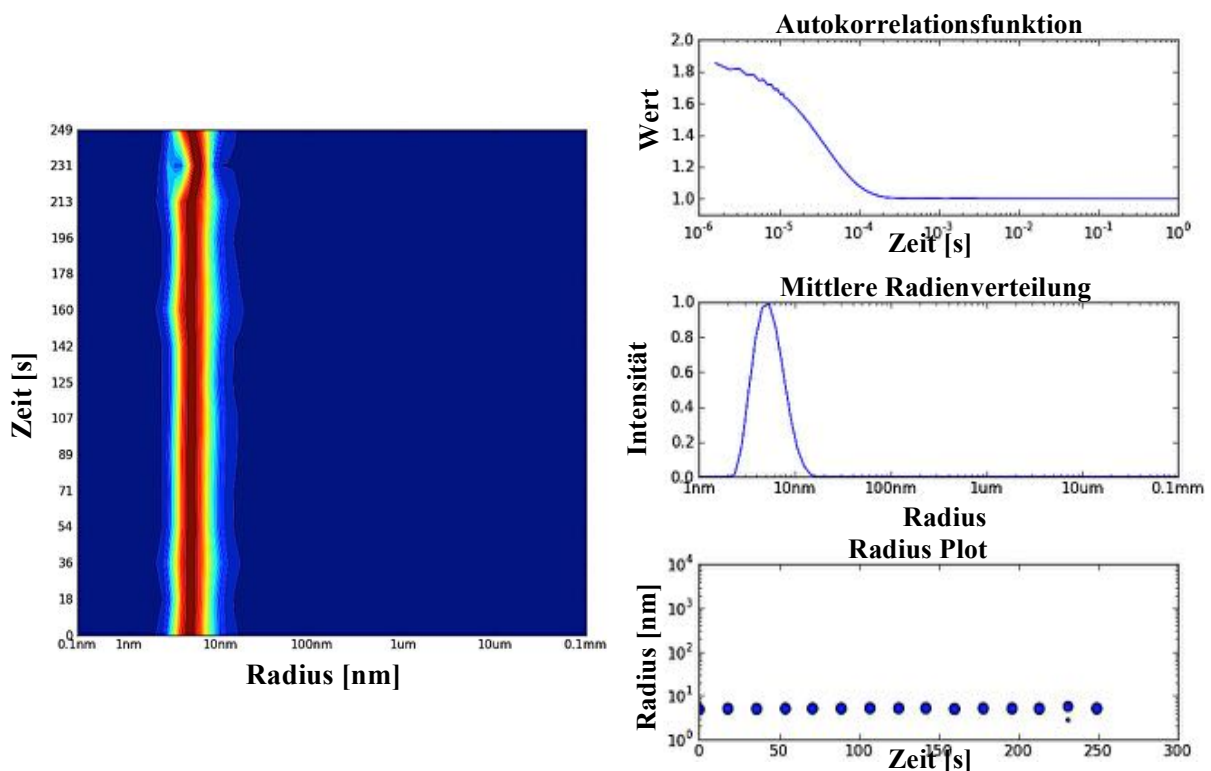


Abbildung 59: Ergebnisse der DLS-Messungen von YopD/SycD21-163

Linke Seite: Radienverteilung der DLS-Messung, der Radius ist in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Rechte Seite: Hier sind Autokorrelationsfunktion des DLS-Signals, die mittlere Radienverteilung und der Radiusplot, bei dem der Radius gegen die Zeit aufgetragen ist, dargestellt. Die DLS-Messungen zeigen ein monodisperses Signal.

Ergebnisse

Mit dem Komplex wurden ebenfalls DLS-Messungen durchgeführt. Die Konzentration betrug hierbei 2.9 mg/mL. Die Ergebnisse zeigten eine monodisperse Proteinlösung mit einem hydrodynamischen Radius von 5.1 ± 0.2 nm. Dies ließ auf einen Komplex höherer Stöchiometrie schließen und stimmte damit gut mit den Werten der Größenausschlusschromatographie überein.

4.7.3 SAXS-Analyse

Um den Proteinkomplex in Lösung zu charakterisieren, wurden SAXS-Daten an der EMBL-Beamline P12 des PETRA III- Speicherringes (DESY Hamburg) aufgenommen. Das Probenvolumen betrug 20 μ L. Vor und nach jeder Messung wurde der korrespondierende Puffer gemessen und dessen Signal vom Proteinsignal abgezogen. Die Belichtungszeit der jeweiligen Messungen betrug 45 ms. Es wurden Daten für vier verschiedene Konzentrationen der Proteinlösung gemessen (1.1 mg/mL, 3.4 mg/mL, 5.2 mg/mL und 10.0 mg/mL). Die Analyse erfolgte zunächst mit dem Softwarepaket PRIMUS¹⁷⁹. Die Daten, die für die geringste Konzentration aufgenommen wurden, zeigten ein zu schwaches Signal, um genauer analysiert werden zu können. Für die Konzentrationen von 5.2 mg/mL und 10.0 mg/mL wurden Aggregationsmerkmale in den Daten festgestellt, daher erfolgte die weitere Datenanalyse mit der Proteinlösung von 3.4 mg/mL. Der Gyrationradius wurde mittels Guinier-Analyse auf 4.96 ± 0.15 nm berechnet. Die Abstandsverteilungsfunktion in GNOM¹⁸⁰ zeigte einen maximalen Partikelabstand von 18.5 nm. Das Porod-Volumen betrug 171.61 nm^3 und das entsprechend berechnete Molekulargewicht MW_{Porod} 101 kDa.

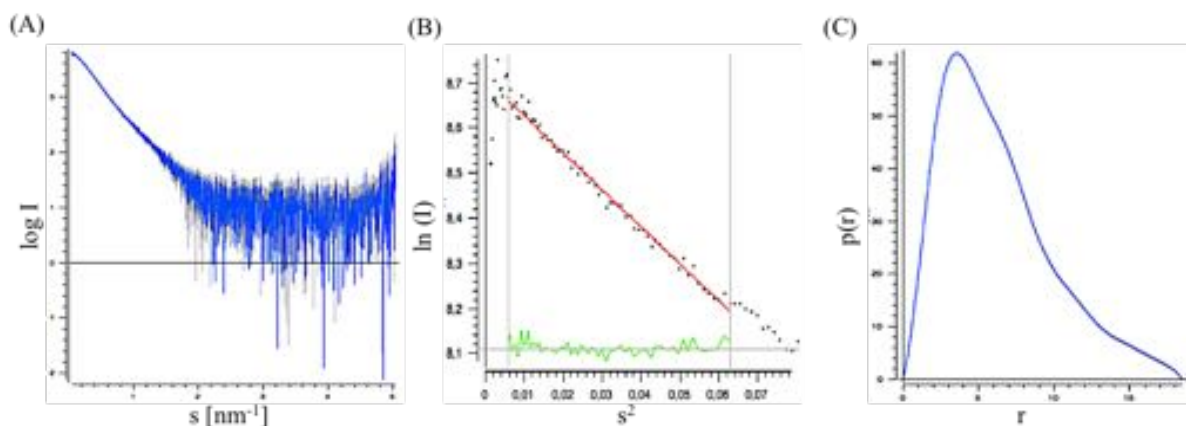


Abbildung 60: SAXS-Datenanalyse von YopD/SycD21-163 mit PRIMUS

(A) Gemittelte und extrapolierte Streudaten mit zugehörigem Guinier-Plot (B) sowie der Abstandsverteilungsfunktion, aus der ein D_{max} von 18.5 nm berechnet wurde (C).

Die *ab initio* Modellberechnung erfolgte mit dem Programm DAMMIN¹⁸⁹. Das berechnete Modell ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

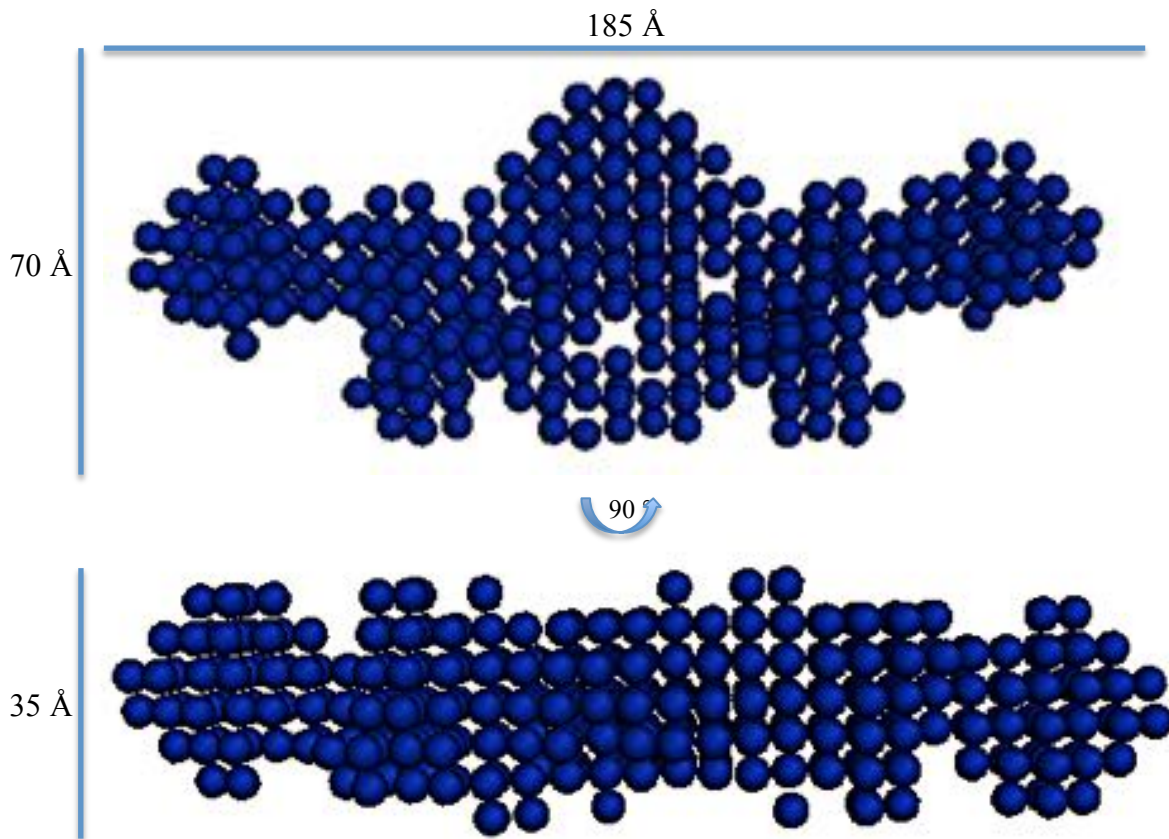


Abbildung 61: Mit DAMMIN berechnetes *ab initio* Modell von YopD/SycD21-163

Das *ab initio* Modell zeigt einen flachen und elongierten Aufbau und hat einen maximalen Durchmesser von 185 Å. Das Molekulargewicht mit 101 kDa, ist deutlich größer, als für einen 1:1-Komplex zu erwarten gewesen wäre und entspräche einem Komplex mit der Stöchiometrie von 2:2. Dies würde auch zum Aufbau des Modells passen, welches Symmetrieelemente aufzeigt. Es ist vorstellbar, dass die SycD-Moleküle in der Mitte des Modells ein Dimer formen, jeweils in Verbindung zu YopD, das sich an den äußeren Enden befindet.

4.7.4 Kristallisationsexperimente

Um initiale Kristallisationsbedingungen für den Komplex aus YopD/SycD21-163 zu ermitteln, wurden verschiedene *Screening*-Experimente mit dem Pipettierroboter Honeybee 961 (Genomic Solutions, USA) unter Verwendung der kommerziellen Kristallisations-

Ergebnisse

Screens durchgeführt. Hierbei wurde die Dampfdiffusions-Methode angewendet. Das Protein wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen 8-10 mg/mL eingesetzt. Es konnten zunächst einige vielversprechende Bedingungen in unterschiedlichen *Screens* identifiziert werden. Es handelte es sich unter anderem um die Ausbildung kleiner nadelförmiger Kristalle in einem Größenbereich von 15-20 μm . In der folgenden Abbildung sind beispielhaft drei Tropfen mit initialer Kristallbildung dargestellt.

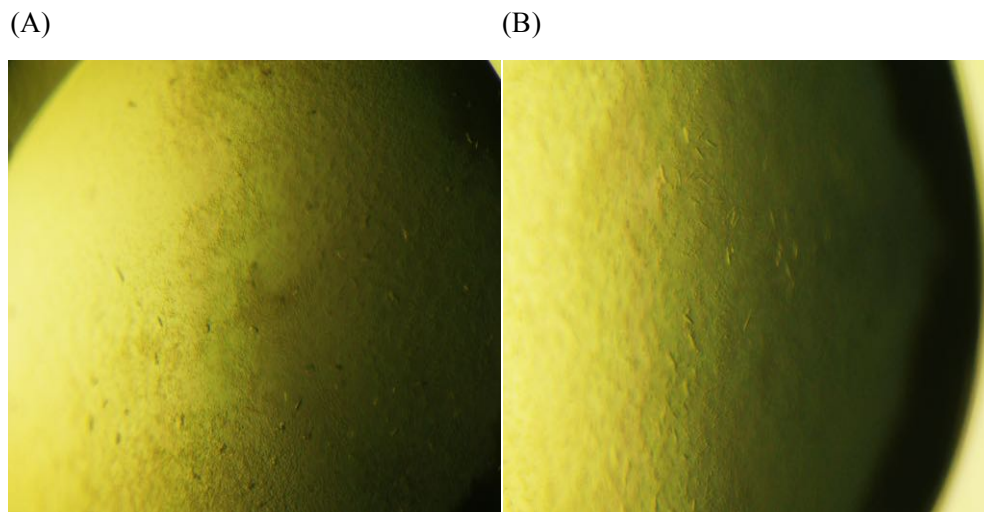


Abbildung 62: Lichtmikroskopische Untersuchungen der Kristallisationsansätze von YopD/SycD21-163

Initiale Treffer des Kristallisations-Screenings bei verschiedenen Bedingungen unter dem Lichtmikroskop mit der Dampfdiffusions-Methode (A) 0.2 M Natriumformiat, 0.1 M Bis Tris Propane pH 6.5, 20 % PEG 3350; (B) 0.2 M CaCl_2 , 0.1 M NaHEPES pH 7.5, 28 % PEG 400.

Diese drei initialen Kristallisationsbedingungen wurden anschließend optimiert. Die einzelnen Parameter wie der pH-Wert, die Salzkonzentration und die Präzipitantkonzentration der gefundenen Bedingung wurden sukzessive variiert, um größere Kristalle herzustellen. Die hierfür verwendeten MRC Maxi-Platten hatten ein Reservoirvolumen von 100 μL und die Tropfengröße betrug 3-4 μL . Zusätzlich wurde das Verhältnis von Protein zu Präzipitant ebenfalls variiert. Für die Bedingungen konnten Kristalle in größerer Form erreicht werden. Diese wurden mittels SONICC und UV-Messungen auf ihren Proteincharakter hin untersucht. Die Ergebnisse hierfür sind in Abbildung 63 dargestellt. Die Kristalle, die in 0.2 M Natriumformiat, 0.1 M Bis Tris Propane, pH 6.5 und 18 % PEG 3350 wuchsen, hatten einen Durchmesser von maximal 50-55 μm . Hierfür konnte eindeutig ein positives Signal im UV-Bereich sowie auch im SONICC-Kanal detektiert werden (Abbildung 63 A-C). Diese Resultate machen deutlich, dass es sich um Proteinkristalle handelt. Für die anderen optimierten Kristalle fielen die Messungen negativ aus. Weder mit UV noch mit SONICC

konnte ein Signal identifiziert werden (Abbildung 63 D-F), was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei um Salzkristalle handelte.

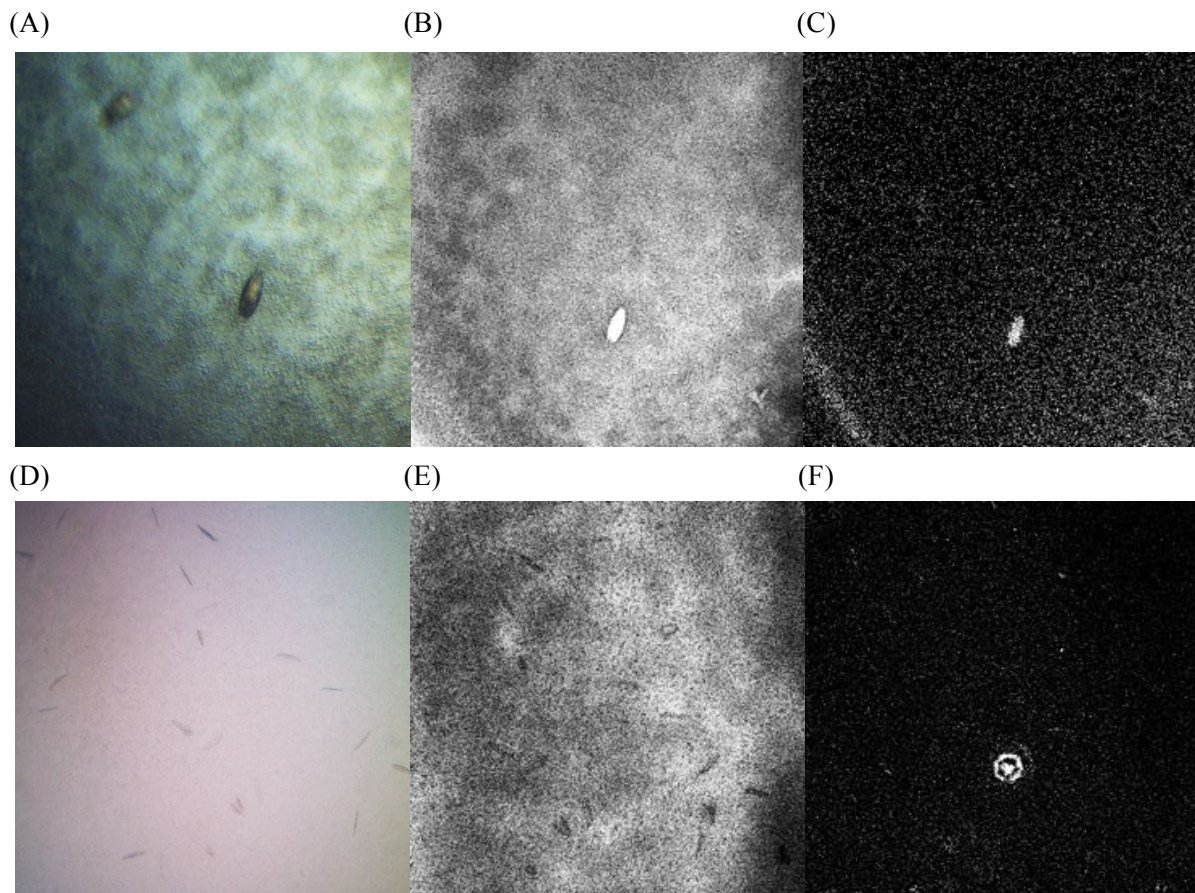


Abbildung 63: Lichtmikroskopische Untersuchung der optimierten Kristallisationsansätze von YopD/SYcD21-163

(A-C) Kristalle der optimierten Bedingung: 0.2 M Natriumformiat, 0.1 M Bis Tris Propane pH 6.5, 18 % PEG 3350. Diese zeigten ein positives Signal bei Untersuchung unter UV-Licht (B) und mittels SONICC- Technik (C). (D-F) Nadelförmige Kristalle der optimierten Bedingung: 0.2 M CaCl₂, 0.1 M NaHEPES pH 7.5, 25 % PEG 400. Diese zeigten in beiden Kanälen negative Ergebnisse.

Die Kristalle, die mit der SONICC-Technik und unter UV-Licht ein positives Ergebnis zeigten, wurden unter Anwendung von Synchrotronstrahlung untersucht. Es konnte jedoch keinerlei Diffraktion detektiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass das ausgebildete Kristallgitter nicht geordnet genug ist, um diffraktieren zu können. Das könnte daran liegen, dass das Molekül über unstrukturierte und flexible Bereiche verfügt, die eine periodische Anordnung der Moleküle verhindern. Daher ist eine zukünftige Optimierung der Kristallparameter notwendig.

5 DISKUSSION

5.1 YopQ

YopQ ist ein Effektorprotein des T3SS, das nach der Infektion in die Wirtszelle transloziert wird. Anders als die bisher beschriebenen Effektorproteine besitzt es keine enzymatische Aktivität.^{173,175} Es konnte herausgefunden werden, dass YopQ eine Rolle in Regulation der Translokation der Effektoren spielt sowie in der Spezifität der jeweils sekretierten Substrate.^{68,160} YopQ werden außerdem Interaktionen mit der Translokationspore vorhergesagt. Dabei wurde postuliert, dass YopQ mit YopD assoziieren kann aber nicht mit YopB.^{68,110} Der genaue Mechanismus der Regulierung und Einhaltung der Spezifität verbleibt allerdings unklar. Auch wie die Übermittlung der regulatorischen Signale abläuft und wie die Interaktion von YopQ mit anderen Regulatoren beziehungsweise den Translokatoren funktioniert, verbleibt ungewiss. Für YopQ sind derzeit keinerlei strukturelle Informationen verfügbar. Für ein genaueres Verständnis der Funktion von YopQ und den Mechanismen der Translokation und dessen Regulierung könnten Strukturdaten dieses Effektorproteins allerdings von enormer Bedeutung sein. Daher sollten in dieser Arbeit erste Grundlagen zur strukturellen Charakterisierung des Effektors geschaffen und YopQ strukturellbiologisch untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Gensequenz von YopQ erfolgreich in zwei Vektorsysteme kloniert werden. Für die rekombinante Genexpression von YopQ als Fusionsprotein mit N-terminalem *GST-tag* konnte ein *E.Coli*-Bakterienstamm identifiziert werden. Im Folgenden wurde eine geeignete Reinigungsstrategie entwickelt und etabliert. Besonders die proteolytische Spaltung des *GST-tags* konnte hierbei wirkungsvoll optimiert werden, so dass YopQ in einer sehr hohen Reinheit hergestellt werden konnte. Die anschließenden Charakterisierungen des Proteins in Lösung zeigten ein stabiles monodisperses System, in dem YopQ als gefaltetes Protein im monomeren Zustand vorlag. Erste initiale Kristallisationsbedingungen konnten identifiziert werden, deren Qualität jedoch nicht für Diffraktionsdaten am Synchrotron ausreichten. Jegliche Optimierungen führten nicht zu einer signifikanten Verbesserung, sodass sich YopQ in seiner vollen Länge der Kristallisation potentiell nicht zugänglich zeigte. Dies kann aufgrund flexibler, unstrukturierter Bereiche sein, die die Kristallisation erschweren. Ebenso kann die

Oberflächenbeschaffenheit der Proteine einen limitierenden Faktor darstellen. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt keine hochauflösenden Strukturdaten zu YopQ bekannt sind, kann hier nur spekuliert werden.

Mit Hilfe von SAXS-Experimenten konnten erste wichtige strukturelle Informationen über YopQ in Lösung gesammelt werden. Der monomere Zustand des Proteins konnte hierbei zunächst bestätigt werden. Zusätzlich wurde ein *ab initio* Modell generiert, das eine kompakte globuläre Domäne zeigt und eine kleine Untereinheit, die vom Volumen her ungefähr ein Viertel der Gesamtstruktur ausmacht. Hierbei handelt es sich potentiell um einen flexiblen Bereich an einem der beiden Termini des Proteins. Dies könnte auch ein Anhaltspunkt für das fehlende Kristallisationsvermögen sein. Daher wurde folglich versucht, durch trunke Varianten des Proteins, diese Untereinheit auszuschließen und das Protein der Kristallisation zugänglicher zu machen. Da aus den SAXS-Daten nicht hervorgeht, um welchen Bereich des Proteins es sich handelt, wurden zwei Varianten von YopQ hergestellt, die jeweils an einem Terminus gekürzt waren.

Eine Übersicht der Ergebnisse der einzelnen YopQ-Konstrukte ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht der Ergebnisse der YopQ-Konstrukte

	R_h [nm] (DLS)	Anteile α -Helix, β -Faltblatt (CD)		R_g [nm] (SAXS)	D_{max} [nm] (SAXS)	Porod- Volumen [nm ³] (SAXS)	MW_{Porod} [kDa] (SAXS)
YopQ MW: 20.8 kDa	2.3 ± 0.1	29 %	37 %	2.1 ± 0.1	7.6	44.68	26
YopQ1-165 MW: 18.9 kDa	2.4 ± 0.1	30 %	35 %	2.6 ± 0.5	10.3	50.41	30
Yop9-179 MW: 19.5 kDa	2.2 ± 0.1	34 %	31 %	1.9 ± 0.0	7.4	41.26	24
YopQ37-179 MW: 16.5 kDa	2.8 ± 0.9	19 %	38 %	2.5 ± 0.1	8.5	59.21	35

Diskussion

Die zuvor etablierte Reinigungsstrategie konnte ebenso erfolgreich auf die verkürzten Varianten von YopQ angewendet werden, so dass alle Konstrukte in hoher Reinheit hergestellt werden konnten. Für die am C-Terminus gekürzte Variante YopQ1-165 konnte während der Charakterisierung ein erhöhter hydrodynamischer Radius detektiert werden, was ein erstes Anzeichen darauf war, dass es sich um eine elongierte Form des Proteins handelte. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Integrität des Proteins sich verändert hat. Auch die SAXS-Experimente und das zugehörige berechnete *ab initio* Modell zeigten eine deutlich elongierte Konformation des Proteins mit einem erhöhten maximalen Durchmesser. Durch Entfernen der C-terminalen Aminosäurereste kann es zu einer Aufhebung von verschiedenen Interaktionen innerhalb des Proteins gekommen sein, die für die Ausbildung der Tertiärstruktur von Bedeutung sind. Dadurch löst sich die globuläre Faltung des Proteins und es kommt zu einer vermehrten Ausbildung flexibler Bereiche, die in einer elongierten Form resultieren. Zusätzlich konnten für YopQ1-165 Aggregationsmerkmale und eine verminderte Stabilität festgestellt werden, die dieses Konstrukt als ungeeignet für weitere strukturelle Untersuchungen darstellten.

Die zweite trunke Variante YopQ9-179 zeigte im Vergleich zu YopQ kleinere Werte für den hydrodynamischen sowie den Gyrationradius und D_{\max} auf. Das *ab initio* Modell zeigt Ähnlichkeiten zu dem von YopQ auf, nur dass die kleinere Untereinheit noch kleiner ist und aus einem putativ flexiblen Überhang besteht. Diese Ergebnisse beweisen, dass es sich bei dem flexiblen Bereich, der für YopQ detektiert werden konnte, um den N-Terminus des Proteins handelt. Der Überhang im SAXS-Modell von YopQ9-179 stellt den übrigen N-Terminus dar. Die Kürzung des N-Terminus hat demnach nicht ausgereicht, um den flexiblen Bereich zu eliminieren. Im zusätzlichen Konstrukt YopQ37-179, in dem der N-Terminus deutlich weiter gekürzt wurde, zeigte sich, dass diese Kürzung zu einer Dimerisierung des Proteins führte und somit nicht den nativen Zustand der Gesamtstruktur darstellte.

Der N-Terminus der Effektorproteine beinhaltet deren Sekretionssignal, um vom T3SS erkannt und transloziert werden zu können.¹⁶⁸ Die gezeigten Ergebnisse bestätigen, dass es sich um einen potentiell unstrukturierten Bereich handelt, der eine hohe Flexibilität aufweist. Diese Flexibilität ist in der Natur dafür nötig, die Nadelstruktur des T3SS zu passieren.

5.2 YopB

YopB ist einer der beiden hydrophoben Translokatoren des T3SS aus *Y. enterocolitica* und bildet zusammen mit YopD den Porenkomplex aus. Über diese Translokationspore werden die Effektorsubstrate direkt in die Wirtszelle transportiert. Daher spielen YopB und YopD beide eine essentielle Rolle bei der Injektion dieser Effektoren.⁵⁹ Die genaue Stöchiometrie der Pore und das Zusammenspiel dieser beiden Translokatoren verbleiben bis heute unklar. Daher könnten hochauflösende Strukturdaten einen großen Beitrag zur Aufklärung dieser Punkte beitragen.

5.2.1 Die N-terminale Domäne von YopB: YopB1-168

YopB ist ein integrales Membranprotein und besitzt zwei vorhergesagte Transmembrandomänen.⁹⁹ Da Membranproteine aufgrund ihrer Hydrophobizität häufig schwer zu exprimieren und zu reinigen sind, wurde zunächst nur der N-terminale Bereich von YopB untersucht. Das Konstrukt YopB1-168 wurde folglich in zwei verschiedene Expressionsvektoren eingebracht. Dabei konnte YopB1-168 nur als Fusionsprotein mit N-terminalem *GST-tag* als lösliches Protein hergestellt werden. Die Expression, Reinigung und proteolytische Spaltung vom *GST-tag* konnte für YopB1-168 erfolgreich etabliert werden und resultierte in löslichem Protein hoher Reinheit. Die Größenausschlusschromatographie sowie die Charakterisierung des Proteins mittels DLS offenbarte ein Molekulargewicht im Bereich eines trimeren Zustandes von YopB1-168. Die CD-spektroskopischen Untersuchungen zeigten, dass das Protein fast zur Hälfte ungeordnet in der Lösung vorlag und der zugehörige Kurvenverlauf deutete ebenfalls darauf hin, dass keine korrekte Faltung des Proteins existierte. Dies führte zu einer fehlenden Stabilität der Proteinlösung und zeigte YopB1-168 als ungeeignet für weitere strukturelle Untersuchungen.

Um die Stabilität von YopB1-168 zu erhöhen, wurde dieses Konstrukt folglich zusammen mit SycD21-163 aufgeschlossen und gereinigt. Die Bildung eines Komplexes dieser zwei Proteine konnte beobachtet und nachgewiesen werden. SycD ist das Klasse II Chaperon des T3SS aus *Y. enterocolitica* und übermittelt die Sekretion der hydrophoben Translokatoren YopB und YopD. Die hochauflösende Struktur des Homodimers von SycD21-163 konnte 2007 aufgeklärt werden⁴⁷. SycD zeigt ebenso wie die Klasse II Chaperone anderer Organismen eine konservierte Faltung von α -helikalen TPR-Motiven.^{47,81,86}

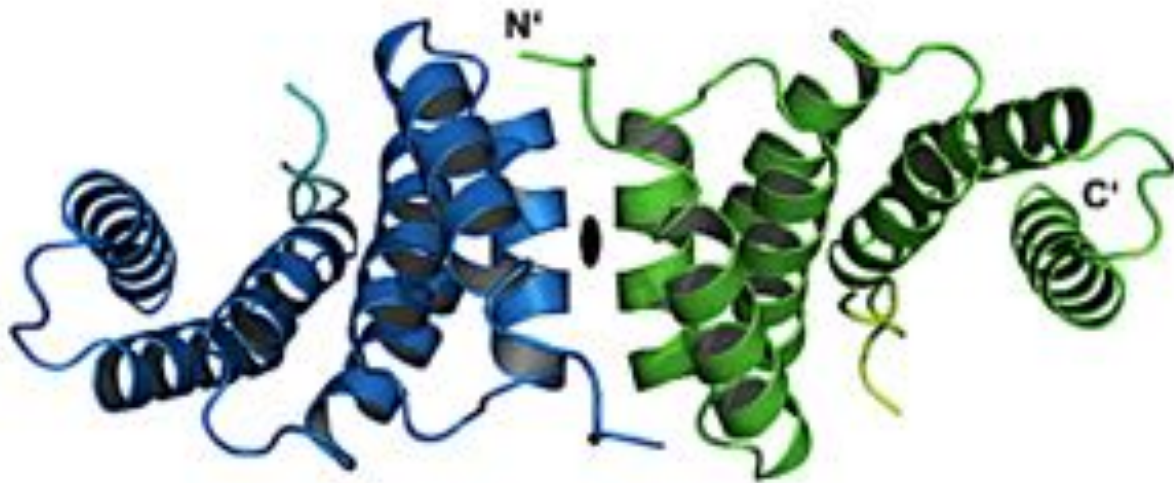


Abbildung 64: Kristallstruktur von SycD in Komplex mit einem YopD-Peptid⁸⁷

Da SycD in der Natur als Chaperon von YopB fungiert, wurde sich dieser Fakt zu Nutze gemacht, um YopB1-168 in Lösung zu stabilisieren. SycD21-163 konnte erfolgreich als Dimer in Lösung hergestellt werden. Die separat voneinander gereinigten Proteine zeigten jedoch keinerlei Interaktion miteinander. Für die Komplexbildung war es erforderlich, dass beide Proteine bereits beim Zellaufschluss miteinander interagieren konnten, bevor sie ihre für sich native Faltung ausgebildet hatten. Der Komplex konnte als stabile, monodisperse Lösung hergestellt werden und zeigte einen gefalteten Zustand auf. Anschließend wurden SAXS-Experimente durchgeführt. Das Molekulargewicht der SAXS-Datenanalyse betrug 34 kDa und konnte somit zeigen, dass sich ein 1:1-Komplex der zwei Proteine ausgebildet hatte. Die zuvor berechneten Molekulargewichte aus der Größenausschusschromatographie sowie den DLS-Messungen zeigten deutlich höhere Molekulargewichte im Bereich 54-63 kDa und deuteten auf eine andere Stöchiometrie hin. Diese Tatsache ist auf die elongierte Form des Proteinkomplexes zurückzuführen, die ebenfalls durch die SAXS-Daten verifiziert werden konnte. Bei der Berechnung des Molekulargewichtes der DLS-Messungen wird ein globulärer Zustand des Proteins angenommen, daher erscheinen elongierte Proteine deutlich größer.

Die Struktur von SycD21-163 konnte 2012 in Verbindung mit einem synthetischen Dekapeptid von YopD gezeigt werden⁸⁷. Dabei verblieb SycD jedoch als Homodimer, bei dem je ein SycD-Molekül ein YopD-Peptid gebunden hat. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne von YopB1-168 und SycD21-163 ein Heterodimer in

Lösung ausbilden und dadurch die Dimerisierung zweier SycD21-163-Moleküle unterbunden wird. Die Entstehung eines Heterodimers erklärt auch, warum sich die Komplexbildung nur entwickelt, wenn die Proteine bereits beim Zellaufschluss vereint werden. Bei der separaten Reinigung liegt SycD21-163 schon als Homodimer vor und es ist naheliegend, dass putative Bindungsstellen für YopB1-168 nicht mehr zugänglich sind.

In der Zwischenzeit veröffentlichten Nguyen *et al.* Ende 2015 die Kristallstruktur des Komplexes aus AopB⁴⁰⁻²⁶⁴ und AcrH.⁹⁸ Bei diesen Proteinen handelt es sich um die entsprechenden Homologe von YopB beziehungsweise SycD aus *Aeromonas hydrophila* AH-1, die ebenso zu der Ysc Familie der T3SS gehören und damit nahe verwandt mit den Zielproteinen sind. Damit gelang es zum ersten Mal einer Arbeitsgruppe die hochauflösende Struktur eines der beiden Translokatoren inklusive *Coiled-Coil*- und Membrandomänen aufzuklären.

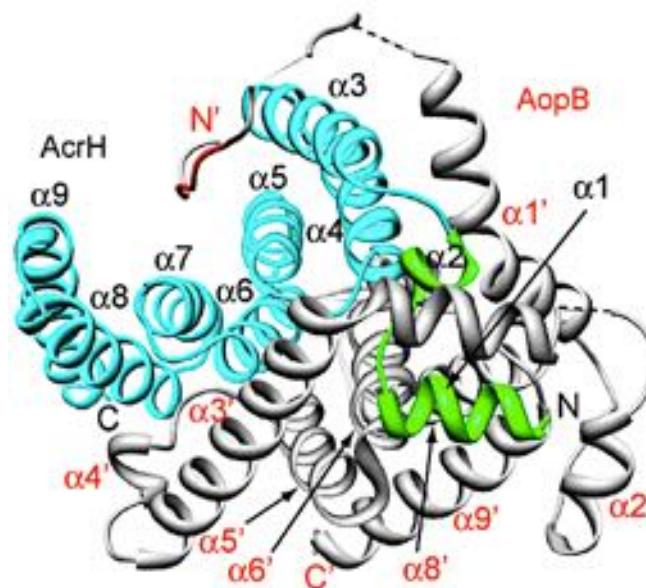


Abbildung 65: Kristallstruktur des Komplexes aus AopB40-246/AcrH

Ribbon-Darstellung des Komplexes aus AcrH (hellblau/grün) und AopB₄₀₋₂₆₄ (grau/rot). Modifiziert nach ⁹⁸

AcrH und AopB⁴⁰⁻²⁶⁴ bilden ebenso wie YopB1-168 und SycD21-163 ein Heterodimer in der Stöchiometrie 1:1 aus. Ein Sequenzvergleich der Homologe zeigt eine Sequenzidentität von 65 % für SycD21-163 und AcrH und 46 % für YopB und AopB. Interessanterweise gibt es einen Bereich zwischen den Aminosäureresten 252 und 311 bei YopB, der nicht in der Sequenz von AopB vorkommt und AopB ist insgesamt 54 Aminosäuren kürzer. Eine Überlagerung der Cα-Atome von AcrH und SycD ergab einen *r.m.s.d.*-Wert von 0.99 Å.⁹⁸

Diskussion

```

YopB      MSSLITHDRSTPVTGSELLPYIETPAFAPLQTOQVAGELKDFENGGVBSQQGVQLPAPLAVVA
AopB      -MREISSERPLSTGCMQPPPLVEDGRGSS-QATQVAAGDSRRHVVKHQQQVVLPGMPGIG
          * 1 *   1 *   * 1*   1 *1 ***. .111   .*** ** *1 1.

YopB      EQVTEGQQQGEITKLLSEVTRGTAGSQLIENYVSVLTFNPTLASPDTFEIELGKLVENLEEV
AopB      QQMSPFQDQQLDQLRXTAQLGTANAANKLLGSSSTLLNKLAFASPERFEIELSKMTSELDQT
          .*11 1***1 1* 11.  ***.1 1 . 11*.1111***; *****.*1.*1***.

YopB      RKDIKIADTQRLHEQNMKKIENQEKIKETEENAKQVKKSCMANKIPGMLSALASVVICG
AopB      QKKIKLADLERIRAEINLKKIDENQTFQKKEASEAADKAKKESGLASKIPGWSALASNVICA
          1*.1*1***11*11 1;1***;*** *1***. * .1.***;*****;*****;****

YopB      IMVADGVGAVAGAMMIASGVTCMANMAVWQAAEDGLIDQEAQVVLGPILTAIEVALTVF8
AopB      ILIATGVGAAVGAMMIVDGVAVGVMMAIQQAADGRISPETMSEVLGPIMIAAEILVAIV8
          *11*1***. .*****. .*.1*1***;1*** ** ** *1;1***; * *1 111**

YopB      TVMTFGSALKCLADIGAKLQANTASLAANGASPSAKVAQISTGIENTWGSAVTKLOGSF
AopB      IAVTFGASAAST-----ANKAVXF-----
          .1***.*** .          * *..1*

YopB      GSLTMSHVIRTGSQATQVAVGVGSGITQTINXXKQADLQENNADLALNKADMAALQSTID
AopB      -----ATQAADLVVDIGTGTAKAVDGGGLGADAQIEQANLLENQVMTLQGVMD
          .1***111.*.1*1* 1111.  *** * 11*1* *1 *1 **..11*

YopB      RLKEELSHLSERQQVMELIPQMINANGDMLENLACRPHTV
AopB      KLKEVLSQMTESFQQVMEMIPQMITANGAMLSLASHPTAI
          1*** **111**.******;*****.*** **1.*** ** 11

```

Abbildung 66: Sequenzvergleich von YopB aus *Y. enterocolitica* und AopB aus *A. hydrophila*

Vergleich der Aminosäuresequenzen von AopB (*A. hydrophila*) und YopB (*Y. enterocolitica*), durchgeführt mit Clustal Omega¹⁸⁵. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern markiert, Aminosäuren mit ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften sind mit einem Punkt und deutlich unterschiedliche mit zwei Punkten markiert.

Der entsprechende Teil der Strukturdaten von AopB und AcrH konnte nun als Vorlage für die *rigid body* Modellberechnung anhand der SAXS-Daten mit CORAL¹⁸⁹ verwendet werden. Dieses Modell zeigt ein deutlich elongiertes Molekül in guter Übereinstimmung mit dem *ab initio* Modell. Eine Überlagerung des *rigid body* Modells mit der entsprechenden Vorlage der hochaufgelösten Struktur zeigt im kompakten inneren Teil der Struktur den Komplex aus SycD21-163 mit dem C-terminalen Anteil von YopB1-168. Da die Strukturdaten von AopB erst ab Aminosäure 45 anfangen, handelt es sich bei dem Teil des *rigid body* Modells, der sich nicht mit dem Strukturmodell überlagert, um dem N-Terminus von YopB1-168. Dieser äußerst flexible N-Terminus erscheint vornehmlich unstrukturiert. Er legt sich um den inneren Teil herum und ist für die Elongation des Moleküls verantwortlich.

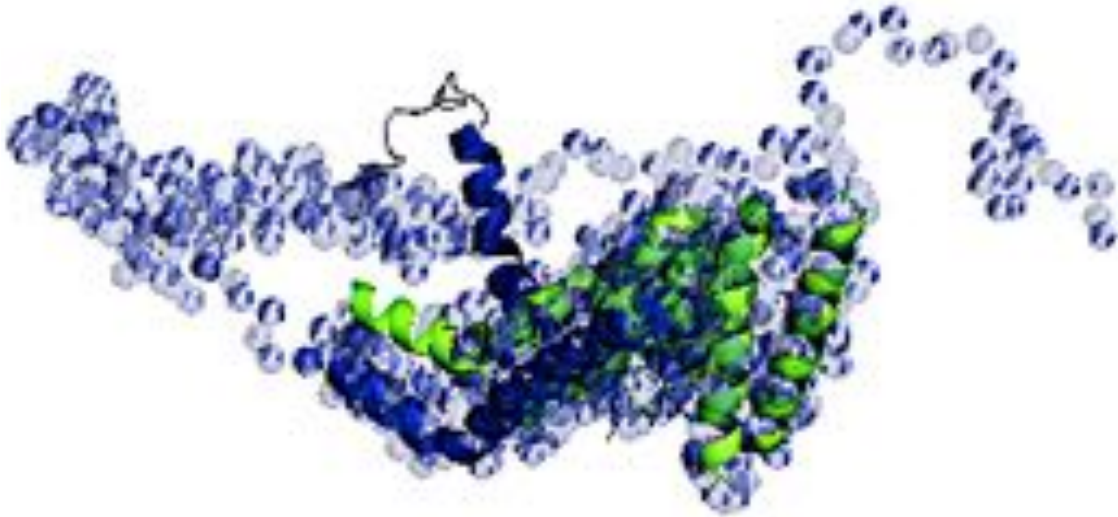


Abbildung 67: Überlagerung des berechneten SAXS-Modells von YopB1-168/SycD21-163 mit dem überlappenden Teil der homologen Struktur von AopB/AcrH

Überlagerung des *rigid body* Modells (blau, transparent) mit der für die Berechnungen verwendeten Strukturvorlage. Der Komplex der Homologe AopB/AcrH (PDB: 3WXX) ist in der *Cartoon*-Darstellung gezeigt. Es ist nur der Abschnitt gezeigt, der mit dem verwendeten Komplex YopB1-168/SycD21-163 korrespondiert (AcrH10-159: grün, AopB45-166: blau).

Der elongierte und hoch flexible N-Terminus von YopB1-168 könnte auch erklären, warum dieses Konstrukt der Kristallisation bisher nicht zugänglich war. Ebenso stellt er einen Erklärungsansatz dafür dar, dass das Konstrukt YopB1-168 ohne SycD sich so instabil zeigte und einen so hohen Anteil an unstrukturierten Bereichen, die mittels CD-Spektroskopie aufgedeckt wurden, aufwies. Die Vermutung liegt nun nahe, dass es bei diesem Konstrukt nicht zu der Ausbildung eines trimeren Zustandes in Lösung gekommen ist und es sich eigentlich um einen monomeren Zustand handelte. Die erhöhten Molekulargewichte können ebenso auf den elongierten Zustand zurückgeführt werden, wie es für den Komplex mit SycD21-163 der Fall gewesen ist. Nguyen *et al.* konnten aufzeigen, dass der N-Terminus von YopB nach der Einbringung in die Membran im extrazellulären Raum verbleibt und dort wichtige Interaktionen eingeht. Ebenso wurde postuliert, dass der N-Terminus für die Komplexbildung mit dem korrespondierenden Chaperon notwendig ist.⁹⁸ Der Komplex aus AopB und AcrH konnte aber erst Kristalle ausbilden, nachdem der N-Terminus um 40 Aminosäuren gekürzt wurde. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass für den vorliegenden Komplex aus YopB1-168 und SycD21-163 keine Kristallisationsbedingungen gefunden werden konnte.

5.2.2 Co-Expression YopB/SycD21-163

Die zuvor nachgewiesene Komplexbildung der N-terminalen Domäne von YopB1-168 mit SycD21-163 konnte zeigen, dass die Verbindung mit dem Chaperon das Konstrukt eindeutig stabilisiert hat und somit weitere strukturelle biologische Analysen ermöglicht werden konnten. Auf dieser Grundlage wurden neue Konstrukte für eine Co-Expression von YopB mit SycD21-163 konzipiert. Neben der Gesamtstruktur von YopB wurden drei weitere verkürzte Varianten in Anlehnung an die Kristallstruktur von AcrH/AopB erarbeitet. Nach einem Sequenzvergleich mit AopB wurden die Konstrukte YopB, YopB1-266, YopB47-266 und YopB47-160 in die zweite *Multiple Cloning Site* des pEtDuet-1 Vektors kloniert. In der ersten *Multiple Cloning Site* befand sich SycD21-163. Die initialen Co-Expressionsversuche der drei Konstrukte mit integrierter Transmembrandomäne zeigten nur sehr geringe Ausbeuten des jeweiligen YopB-Konstruktes, während für SycD21-163 eine signifikante Überexpression detektiert wurde. Dieser Umstand kann auf die hydrophoben Bereiche der Transmembrandomänen zurückgeführt werden, welche nachweislich die Expression erschweren können. Die Ausbeuten reichten nicht aus, um weitere Untersuchungen durchzuführen.

Für die Co-Expression von YopB47-160 konnte ebenso wie für SycD21-163 eine signifikante Menge an Protein hergestellt werden. Die anschließende affinitätschromatographische Reinigung über den *(His)₆-tag* am N-Terminus von SycD21-163 zeigte jedoch, dass der Hauptanteil von YopB47-160 sich nicht mit SycD21-163 komplexiert hatte, sodass beide Proteine in unterschiedlichen Fraktionen detektiert wurden. Diese Beobachtung deckt sich mit der von Nguyen *et al.* aufgestellten Hypothese, dass der komplette N-Terminus von YopB für die Komplexbildung erforderlich ist.⁹⁸

Für die Zukunft müssten diese Konstrukte weiter optimiert beziehungsweise die Expressionsbedingungen und die nachfolgende Reinigungsstrategie verbessert werden, damit eine ausreichende Ausbeute der Komplexe erzielt werden kann und eine strukturelle biologische Charakterisierung möglich wird.

5.3 YopD

YopD ist neben YopB der zweite hydrophobe Translokator der den Porenkomplex im T3SS ausbildet und eine tragende Rolle bei der Injektion der Effektorsubstrate in die eukaryotische Wirtszelle spielt. YopD kann strukturellen sowie auch regulatorischen Einfluss auf die

Sekretion der Effektorproteine nehmen.^{99,101,132} Aufgrund der Multifunktionalität von YopD im T3SS ist dieser Translokator einer der bestimmenden Faktoren der *Yersinia* Virulenz. Es gibt ebenfalls Hinweise auf eine Funktion als Effektor, da YopD in geringen Mengen in der Wirtszelle nachgewiesen werden konnte.¹⁰⁵ Sämtliche strukturelle Informationen zu YopD beziehen sich ausschließlich auf ein synthetisches Dekapeptid der Aminosäuren 56-65 im Komplex mit SycD⁸⁷ und die NMR-Struktur der amphipathischen Helix (Position 278-300)¹²⁴.

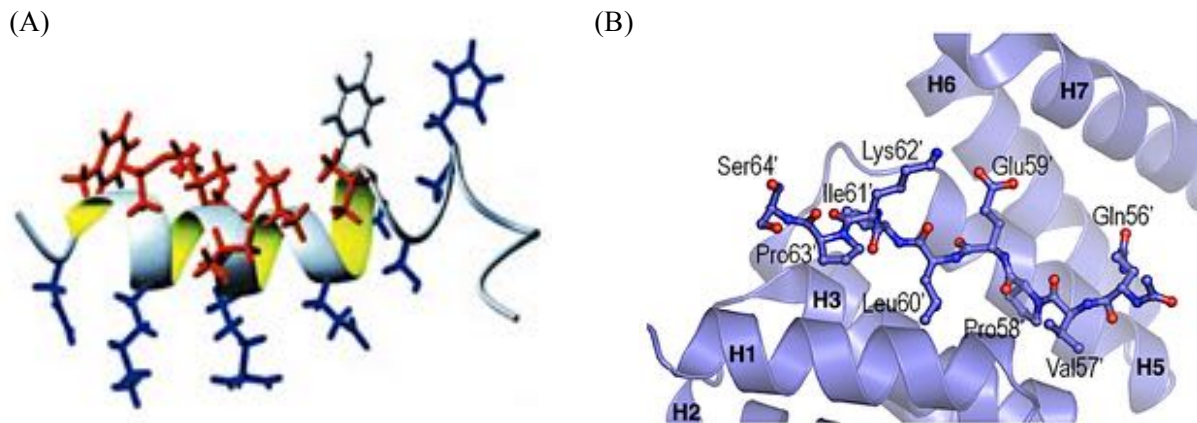


Abbildung 68: Strukturelle Informationen zu YopD

(A) NMR-Struktur der amphipathischen Domäne von YopD. Dargestellt sind die Reste 279-295, hydrophobe Reste in blau und hydrophile Reste in rot.¹²⁴ (B) Ausschnitt der Kristallstruktur des Komplexes aus SycD21-163 mit dem YopD-Peptid56-64.⁹⁷

Daher wären jegliche strukturelle Informationen von YopD ein großer Schritt zum besseren Verständnis der Mechanismen und Organisation des Porenkomplexes und könnten einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des Regulationsmechanismus leisten.

5.3.1 Die N-terminale Domäne von YopD: YopD1-130

YopD verfügt im Gegensatz zu YopB nur über eine vorhergesagte Transmembrandomäne zwischen den Aminosäureresten 122-152.⁹⁹ Auch für YopD wurde zunächst ein N-terminales Konstrukt designt, das zu Beginn der Transmembrandomäne endet. Für YopD1-130 konnte im Gegensatz zu den anderen Zielproteinen keine Expressionsbedingung gefunden werden, in der es mit dem *GST-tag* als lösliches Protein exprimiert werden konnte. Das Konstrukt mit N-terminalen *(His)₆-tag* führte lediglich zur Expression von unlöslichem und im Zellpellet verbleibendem Protein. Die Umstellung auf einen C-terminalen *(His)₆-tag* führte zu einer anständigen Ausbeute an löslichem Protein. Der anschließende affinitätschromatographische

Reinigungsschritt zeigte allerdings, dass das Protein keine spezifische Bindung zur Ni-NTA Agarose-Matrix eingehen konnte, so dass die Reinigung nur zu einer kaum nachweisbaren Menge an Protein führte. Ein Grund für die fehlende Spezifität kann sein, dass der *(His)₆-tag* aufgrund der Anordnung im Protein abgeschirmt und dadurch nicht zugänglich für die Nickel-Ionen ist. Dieses N-terminale Konstrukt YopD1-130 zeigte sich somit als ungeeignet, da die Ausbeute an gereinigtem Zielprotein zu gering war, um strukturbiochemische Charakterisierungen durchzuführen.

5.3.2 Co-Expression YopD/SycD21-163

Für YopD wurden ebenso wie für YopB Co-Expressionsstudien durchgeführt. Der Komplex aus YopD und SycD ist hochinteressant, da beide Proteine neben ihrer Funktion als Translokator beziehungsweise Chaperon auch eine bedeutende Rolle in der Regulation der Expression von Effektorsubstraten spielen.¹³³ Diese Regulation spielt sich auf transkriptioneller sowie auf posttranskriptioneller Ebene ab und es wird davon ausgegangen, dass YopD und SycD einen Komplex bilden, der durch Bindung an das 5'-Ende der mRNA der T3SS-Gene deren Bindung zum Ribosom verhindert und damit in der Lage ist, die Translation der mRNA einzuschränken.^{108,134} Strukturelle Informationen könnten daher einen genaueren Einblick in diesen Mechanismus liefern.

Die Co-Expression von YopD mit SycD21-163 resultierte in einer signifikanten Überexpression der beiden Zielproteine. Beide Proteine zeigten löslichen Charakter und die Affinitätschromatographische Reinigung über den N-terminalen *(His)₆-tag* von SycD21-163 konnte offenbaren, dass sich tatsächlich ein Komplex gebildet hat. Neben SycD21-163 konnte auch YopD, das nicht über einen *(His)₆-tag* verfügt, in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden. Dies war nur durch Komplexbildung der beiden Zielproteine möglich. Eine geeignete Reinigungsstrategie inklusive proteolytischer Spaltung des *(His)₆-tags* konnte erfolgreich entwickelt und etabliert werden, so dass der Komplex YopD/SycD21-163 in hoher Reinheit und in gefaltetem Zustand in einer monodispersen Proteinlösung produziert werden konnte. Die Molekulargewichtsberechnung über das Retentionsvolumen der Größenausschlusschromatographie sowie den hydrodynamischen Radius, der mittels DLS untersucht wurde, zeigte eine Molekülmasse im Bereich von 135 kDa auf. Dies war ein erstes Anzeichen dafür, dass es sich nicht wie bei dem Komplex aus YopB1-168 mit SycD21-163 um eine Stöchiometrie von 1:1 handelt, sondern mehr als ein Molekül pro Protein zu dem Komplex

beiträgt. Die CD-spektroskopische Analyse mit Sekundärstrukturvorhersage konnte 37 % α -Helices und 27 % β -Faltblätter aufzeigen. Da die Struktur von SycD21-163 ausschließlich aus α -helikalen Anteilen besteht, können die β -Faltblattstrukturen YopD zugesprochen werden. Zusätzlich konnten initiale Kristallisationsbedingungen gefunden werden, die erfolgreich reproduziert und teilweise optimiert werden konnten. Hieraus resultierten Kristalle einer Größe von 50-55 μm . Unter Verwendung der SONICC-Technologie konnte für Kristalle der einen Bedingung (0.1 M Bis Tris Propane, pH 6.5 und 18 % PEG 3350) ein positives Signal detektiert werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei um Proteinkristalle handelt. Unter UV-Licht konnte dies zusätzlich bestätigt werden. Diese Kristalle konnten jedoch unter Anwendung von Synchrotronstrahlung keine Diffraktion aufweisen. Gründe hierfür können die Ausbildung flexibler sowie unstrukturierter Bereiche im Proteinkristall sein, die eine periodische Anordnung des Kristallgitters verhindern und somit nicht von ausreichender Qualität sind, um Diffraktion aufzuzeigen. Daher müssten die Kristallisationsparameter in Zukunft weiter optimiert werden.

Für eine Charakterisierung des Komplexes aus YopD/SycD21-163 in Lösung wurden SAXS-Experimente durchgeführt. Aus der Datenanalyse ging ein Molekulargewicht von 101 kDa hervor. Die Molekulargewichte beider Proteine ergeben zusammen 49.3 kDa, so dass die SAXS-Daten klar auf einen Proteinkomplex der Stöchiometrie 2:2 hindeuten. Das zugehörige *ab initio* Modell zeigt einen flachen, elongierten Aufbau, der eindeutig Symmetriemerkmale aufweist.

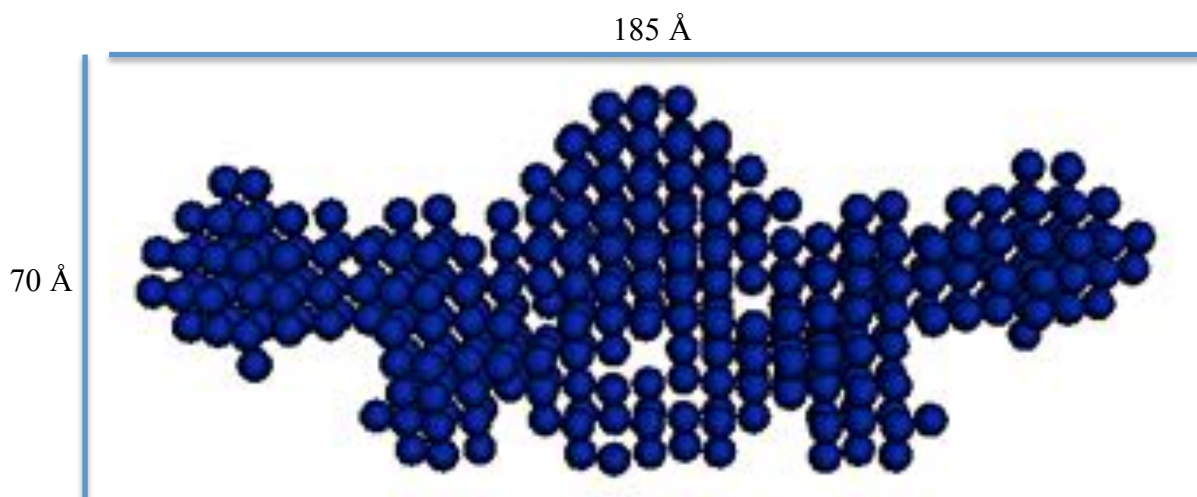


Abbildung 69: Mit DAMMIN berechnetes *ab initio* Modell von YopD/SycD21-163

Diskussion

Diese Anordnung festigt, die Annahme eines 2:2-Komplexes von YopD/SycD21-163 in Lösung. Anhand des Modells ist es vorstellbar, dass SycD21-163 wie für seine native Form gezeigt, ein Dimer ausbildet, wobei beide Moleküle sich jeweils mit einem Molekül YopD verbinden. Um diese Annahme bestätigen zu können sowie die genaue Anordnung der Proteine aufzuklären, sind jedoch hochauflösende Strukturdaten unabdingbar.

Im Verlaufe dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass der Komplex aus YopD und SycD21-163 sich in einer unterschiedlichen Stöchiometrie zusammensetzt als der für YopB1-168 und SycD21-163. Diese Feststellung ist besonders interessant vor dem Hintergrund, dass offenbart werden konnte, dass die beiden hydrophoben Translokatoren auf unterschiedliche Weise mit ihrem Chaperon interagieren. Allerdings müsste für eine detailliertere Aussage auch der Komplex der Gesamtstruktur von YopB mit SycD21-163 zum Vergleich herangezogen werden und die Ergebnisse bestätigen.

5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erste strukturelle Informationen über YopQ in Lösung erhalten werden. Dabei konnten *ab initio* SAXS-Modelle für vier verschiedene Varianten des Proteins generiert werden. Die Rolle des N-Terminus, der das Sekretionssignal von YopQ beinhaltet, ist hierbei von tragender Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass es sich um einen flexiblen und möglicherweise unstrukturierten Bereich handelt, der potentiell die Kristallisation verhindert. Eine zu ausgeprägte Kürzung dieses Bereichs resultierte in der Dimerisierung des Proteins. Obwohl die initialen Charakterisierungen der Proteinlösungen für YopQ und YopQ9-179 sehr vielversprechend aussahen, konnten keine geeigneten Kristallisationsbedingungen zur Ausbildung von Makrokristallen gefunden werden. Hier bedarf es in Zukunft weiterer Optimierung der Kristallisationsparameter. Ebenso könnte ein zusätzliches Konstrukt erarbeitet werden, das den flexiblen Bereich ganz ausschließt, ohne zu dimerisieren.

Für die N-terminale Domäne von YopB konnte ein stabiler Komplex mit SycD21-163 identifiziert werden. SAXS-Experimente konnten offenbaren, dass es sich um einen Komplex der Stöchiometrie von 1:1 der beiden Proteine handelte. Wie für YopQ konnte auch hier gezeigt werden, dass der N-Terminus von YopB eine flexible und teilweise unstrukturierte Konformation aufweist, die zu einer elongierten Form des Heterodimers führt. Die hohe Flexibilität und Ausbildung der unstrukturierten Bereiche kann darauf zurückzuführen sein,

dass die einzelnen Proteine während der Ausbildung des T3SS in der Lage sein müssen unterschiedliche Konformationen einzugehen. Für den Transport durch die Nadelstruktur zum Beispiel müssen sie sich teilweise entfalten und nach Austritt aus der Pore spontan zurückfalten können. Nur durch Interaktion mit SycD21-163 konnte die N-terminale Domäne von YopB überhaupt stabilisiert werden. Für die Ausbildung von Proteinkristallen zeigte sich der Komplex nicht zugänglich. Um hochauflösende strukturelle Informationen über YopB zu erlangen, sind potentiell andere Konstrukte günstiger. Hierfür wurde die Grundlage in der Ausarbeitung geeigneter Konstrukte für eine Co-Expression mit SycD21-163 geschaffen. Die Expressionsparameter für diese Konstrukte müssen in Zukunft optimiert werden, um die korrespondierenden Komplexe herzustellen und strukturell analysieren zu können.

Die Co-Expression von YopD/SycD21-163 resultierte in der Ausbildung eines stabilen Komplexes der beiden Komponenten. Mittels SAXS-Datenanalyse konnte für diesen Komplex eine Stöchiometrie von 2:2 vorhergesagt werden, damit unterscheidet sich dieser in seinem Aufbau verglichen mit dem Komplex für YopB1-168/SycD21-163. Erste Kristallisationsbedingungen konnten identifiziert werden, führten jedoch nicht zur Diffraktion. Die Kristallisationsparameter müssen dafür in Zukunft weiter optimiert werden, um für YopD erste hochauflösende Strukturinformationen zu bekommen. Ansätze hierfür, wären die Zugabe eines geeigneten Additivs oder die Methylierung der Lysinreste, die auch schon für die Strukturaufklärung von SycD21-163 angewendet wurde. Der Einsatz alternativer Kristallisationsmethoden wie zum Beispiel die Kristallisation in LCP (*Lipidic Cubic Phase*) könnten auch zum Erfolg führen, insbesondere da YopD über eine Transmembrandomäne verfügt. Der N-Terminus von YopD enthält wahrscheinlich ebenfalls unstrukturierte Bereiche, wie es schon für andere Proteine des T3SS gezeigt werden konnte. Daher stellt auch die Verkürzung des YopD-Konstruktes einen aussichtsreichen Ansatz dar, den Proteinkomplex weiter zu stabilisieren.

Eine Optimierung der untersuchten Systeme hinsichtlich ihrer Kristallisierbarkeit stellt für die Zukunft eine wichtige Herausforderung dar. Sollte dies gelingen, so könnten hochauflösende Strukturdaten dieser untersuchten Proteine für ein detaillierteres Verständnis ihrer Funktionalität auf molekularer Ebene führen. Ebenso wichtig wären diese Informationen, um das Zusammenspiel der Proteine mit ihren vorhergesagten Interaktionspartnern des T3SS genauer zu analysieren. Solche neuen Erkenntnisse könnten einen wertvollen Beitrag dazu leisten, die Mechanismen der Translokation der Effektorproteine des T3SS und deren Regulierung zukünftig besser zu verstehen.

6 MATERIAL

6.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in analytischer Qualität von den Firmen AppliChem, Fluka, Merck, Thermo Scientific, Roth, Serva und Sigma-Aldrich bezogen.

6.2 Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, serologische Pipetten sowie Falcon Tubes wurden von der Firma Sarstedt bezogen. Alle anderen Verbrauchsmaterialien sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 3: Übersicht der Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Amicon Ultra 4, Ultra 15, Ultra 0.5, MWCO 3 kDa, 10kDa	Merck Millipore
Dialyse Schlauchmembran	Roth
Glutathion Agarose Matrix	Macherey-Nagel
Immobilon-P Transfer Membrane, Filtertyp Polyvinylidenfluorid (PVDF), Porengröße 0.45 µm	Merck Millipore
Ni-NTA Agarose Matrix	Qiagen
Spritzen 1 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL	VWR
Spritzenvorsatzfilter	VWR
ZipTip _{C18} Pipette Tips	Millipore

6.3 Medien, Puffer und Lösungen

Die einzelnen Medien, Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders beschrieben, mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Zum Einstellen der jeweiligen pH-Werte wurden Salzsäure beziehungsweise Natronlauge verwendet.

Tabelle 4: Allgemein eingesetzte Medien, Puffer und Lösungen

Medium/Lösung/Puffer	Substanz	Konzentration
Agar-Medium	Trypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	Natriumchlorid	10 g/L
	Agar	15 g/L
Ampicillin-Stocklösung	Ampicillin Natriumsalz	100 mg/mL
Benzamidin-Stocklösung	Benzamidin-Hydrochlorid	200 mM
Blockierlösung Western Blot	BSA	3% (w/v) in TBS-Puffer gelöst
Coomassie-Entfärbelösung	Essigsäure	20% (v/v)
Coomassie-Färbelösung	Isopropanol	25% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
	Coomassie Blau	0.1% (w/v)
ECL <i>Solution A</i> Western Blot	Luminol	50 mg in Tris-Puffer (0.1 M, pH 8.6) gelöst
ECL <i>Solution B</i> Western Blot	<i>para</i> - Hydroxycoumarinsäure	11 mg in 10 mL DMSO gelöst
Elektrodenpuffer (10x)	Tris-HCl	250 mM
	Glycin	1.9 M
	SDS	1% (w/v)

Material und Methoden

Ethidiumbromid-Färbelösung	Ethidiumbromid	0.4 µg/mL in 1x TAE gelöst
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid-Stocklösung (IPTG)	IPTG	1 M
LB-Medium	Trypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	Natriumchlorid	5 g/L
Phenylmethylsulfonylfluorid-Stocklösung (PMSF)	PMSF	100 mM in Isopropanol gelöst
Probenpuffer (2x)	SDS	10% (w/v)
	Bromphenolblau	0.5% (w/v)
	Glycerin 100%	25% (v/v)
	Sammelgelpuffer (pH 6.8)	12.5% (v/v)
	DTT	0.2% (w/v)
Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen	Calciumchlorid	0.1 M
	Glycerin	10% (v/v)
Transferpuffer (pH 8.3) Western Blot	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Isopropanol	20% (v/v)
TBS-Puffer (pH 7.5)	Tris-HCl	20 mM
	Natriumchlorid	150 mM
TBS-T-Puffer (pH 7.5)	Tween-20	0.05% (v/v) in TBS-Puffer gelöst
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE, 50x)	Tris-Base	2 M
	Natriumacetat	250 mM

	EDTA	50 mM
Trenngelpuffer (pH 8.8)	Tris-Base	1.5 M
Tris-Puffer	Tris-Base	10 mM
Sammelgelpuffer (pH 6.8)	Tris-Base	500 mM

Tabelle 5: Verwendete Puffer für die Reinigung mit Glutathion-Agarose-Affinitätsmatrix

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7.4)	NaCl	140 mM
	KCl	2.7 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1.8 mM
<i>PreScission</i> Protease Puffer (pH 7.4)	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	150 mM
	β -Mercaptoethanol	10 mM
	EDTA	1 mM
Waschpuffer (pH 8.0)	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	150 mM
Elutionspuffer (pH 8.0)	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	150 mM
	red. Glutathion	10 mM

Tabelle 6: Verwendete Puffer für die Reinigung mit NiNTA-Agarose-Affinitätsmatrix

Puffer A (pH 8.0)	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	100 mM
Puffer F (pH 8.0)	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	150 mM
	Imidazol	500 mM

Tabelle 7: Verwendete Puffer für die Größenausschluss- (SEC) sowie Anionenaustauschchromatographie (AIEX)

SEC-Puffer (pH 8.0)	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	150 mM
AIEX-Puffer 1 (pH 8.0)	Tris-HCl	20 mM
AIEX-Puffer 2 (pH 8.0)	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	1 M

6.4 Größenmarker

Für die Agarosegelelektrophorese wurden die DNA-Längenstandards *FastRuler™ Low Range DNA Ladder*, *FastRuler™ Middle Range DNA Ladder* und *FastRuler™ High Range DNA Ladder* der Firma Fermentas verwendet. Für die SDS-PAGE wurden als Proteingrößenmarker der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* und der *Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder*, ebenfalls von Fermentas, eingesetzt.

6.5 Kits und Enzyme

Während der einzelnen Klonierungsschritte wurde mit folgenden kommerziell erworbenen Kits und Enzymen gearbeitet.

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Kits und Enzyme

Kits	Hersteller
peqGold Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB Biotechnologie
peqGold Gel Extraction Kit	PEQLAB Biotechnologie
Enzyme	Hersteller
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Thermo Scientific
<i>Pfu</i> Polymerase	Thermo Scientific
<i>DpnI</i>	Thermo Scientific
<i>BamHI</i>	Thermo Scientific

<i>EcoRI</i>	Thermo Scientific
<i>HindIII</i>	Thermo Scientific
<i>NdeI</i>	Thermo Scientific
<i>XhoI</i>	Thermo Scientific
T4-DNA Ligase	Thermo Scientific

6.6 Proteinsequenzen

6.6.1 YopB

MSSLITHDRSTPVTGSLLPYIETPAPAPLQTQQVAGELKDKNGGVSSQGVQLPAPLAVVASQ
VTEGQQQEITKLLESVTRGTAGSQLISNYVSVLTNFTLASPDTFEIELGKLVSNLEEVKDI
KIADIQRLHEQNMKKIEENQEKIKETEENAKQVKKSGMASKIFGWLSAIASVVI GAIMVASG
VGAVAGAMMIASGVIGMANMAVKQAAEDGLISQEAMQVLGPILTAIEVALTVVSTVMTFGGS
ALKCLADIGAKLGANTASLAAKGAEFSAKVAQISTGISNTVGS AVTKLGG SFGSLTMSHVIR
TGSQATQVAVGVGSGITQTINNKKQADLQHNNADLALNKADMAALQSIIDRLKEELSHLSES
HQQVMELIFQMINAKGDMLHNLGRPHTV

6.6.2 YopD

MTINIKTDSPIIT TGSQIDAIT TETV GQSGEVKKTEDTRHEAQAIKSSEASLSRSQVPELIK
PSQGINVALLSKSQGDLNGTLSILL LLELARKAREMGLQQRDIENKAAITAQKEQVAEMVS
GAKLMIAMAVVSGIMAATSTVASAFSIAKEVKIVKQEQILNSNIAGR DQLIDTKLQQMSNTS
DKAVSREDIGRIWKPEQVADQNKLALLDKEFRMTDSKANAFNAATQPLGQMANS AIQVHQGY
SQAEVKEKEVNASIAANEKQKAEEMNYNDNFMKDVLRRLIEQYVSSHTHAMKAAFVGV

6.6.3 YopQ

MFIKDDYNMRALCTALEQSAPDTIINTSKEENNSY CATAHLLRTDVC SLVNRV GIEPLKSG
SILSTLEELWQAVGI IYRLYEWQHVSDIDTNFKKLPNNSDFGIVF SVLDCDIGYVITGKKDS
KGNIELYDPKNSLLIENDDIKKYLYDENFHRFCIMLIISKSELEELSRESCDQKCIMG

6.6.4 SycD

MQQETTD TQEYQLAMESFLKGGGTIAMLNEISSDTLEQLYSLAFNQYQSGKYEDAHKVFQAL
CVLDHYDSRFFLGLGACRQAMGQYDLAIHSYSYGAIMDIKEPRFPFHAAECLLQKGELAEAE
SGLFLAQELIADKPEFKELSTRVSSMLEAIK LKEMEHEFVDNP

6.7 Vektoren

Tabelle 9: Verwendete Vektoren

Bezeichnung	Merkmale	Hersteller
pGEX-4T-1	Tac-Promoter, Amp-Resistenz, N-term. GST-tag, Thrombin Schnittstelle	GE Healthcare Life Sciences
pGEX-6P-1	Tac-Promoter, Amp-Resistenz, N-term. GST-tag, PreScission Protease Schnittstelle	GE Healthcare Life Sciences
pRSET A	T7-Promoter, Amp-Resistenz, N-term. (His) ₆ -tag, Enterokinase Schnittstelle	Invitrogen
pET-28a(+)	T7-Promoter, Kanamycin-Resistenz, N-term. T7-tag, C-term. (His) ₆ -tag	Novagen
pETDuet-1	T7-Promoter, Amp-Resistenz, zwei MCS für Coexpression, N-term. (His) ₆ -tag vor MCS1,	Novagen

6.8 Oligonukleotide

Die während der Klonierung eingesetzten Oligonukleotide wurden alle von der Firma Metabion bezogen.

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der YopB-Konstrukte

Oligonukleotid	Sequenz 5' -> 3'	Länge [bp]
YopB <i>Bam</i> HI TEV, <i>forward</i>	AAGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGAATGAGTTCGTTGATAACCCAT GA	52
YopB168 <i>Eco</i> RI, <i>reverse</i>	AAGAATTCCTATCAGCCAAAAATCTTTGATGCC	33
YopB <i>Nde</i> I, <i>forward</i>	AACATATGATGAGTTCGTTGATAACCCATG	30
YopB <i>Xho</i> I, <i>reverse</i>	AACTCGAGCTATCATTAACAGTATGGGGTCTGC	34
YopB47 <i>Nde</i> I, <i>forward</i>	AACATATGTCTCAGGGCGTACAGCTC	26
YopB160 <i>Xho</i> I, <i>reverse</i>	AACTCGAGCTATCAGGATTTCTTGACTTGCTTG	33
YopB266 <i>Xho</i> I, <i>reverse</i>	AACTCGAGCTATCAACTTGCGGTGTTAGCAC	31

Tabelle 11: Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der YopD-Konstrukte

Oligonukleotid	Sequenz 5' -> 3'	Länge [bp]
YopD <i>Bam</i> HI TEV, <i>forward</i>	AAGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGAATGACAATAAATATCAAGACA GACAGC	56
YopD130 <i>Eco</i> RI, <i>reverse</i>	AAGAATTCCTATCAGATCATCAGTTTTGCACC	32
YopD <i>Nde</i> I, <i>forward</i>	AACATATGATGACAATAAATATCAAGACAGACAGC	35
YopD <i>Xho</i> I, <i>reverse</i>	AACTCGAGCTATCATCAGACAACACCAAAGC	32

Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der YopQ-Konstrukte

Oligonukleotid	Sequenz 5' -> 3'	Länge [bp]
YopQ <i>Bam</i> HI TEV, <i>forward</i>	AAGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGAATGTTTATTAAAGATGATTAT AACATGCGT	59
YopQ <i>Eco</i> RI, <i>reverse</i>	AAGAATTCCTATCATCCATAATACATTTTTGATCG	36
YopQ <i>Bam</i> HI, <i>forward</i>	AAGGATCCATGTTTATTAAAGATGATTATAACATGCGT	38
YopQ9 <i>Bam</i> HI, <i>forward</i>	AAGGATCCATGCGTGCTTTTATGTACCGCTCTGA	34
YopQ179 <i>Eco</i> RI, <i>reverse</i>	AAGAATTCCTATCAACATTTTTGATCGCAGGATTCG	36
YopQ165 <i>Eco</i> RI, <i>reverse</i>	AGAATTCCTATCAAGATTTAGATATGATCAGCATA	35
YopQ37 <i>Bam</i> HI, <i>forward</i>	AAGGATCCTGCGCTACTGCTCATTTACTG	29

Tabelle 13: Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der SycD-Konstrukte

Oligonukleotid	Sequenz 5' -> 3'	Länge [bp]
SycD21 <i>Bam</i> HI TEV, <i>forward</i>	AAGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGAGGAGGGGAACTATCGCC	47
SycD21 <i>Bam</i> HI, <i>forward</i>	AAGGATCCGGAGGGGAACTATCGCC	26
SycD21 <i>Bam</i> HI TEV, <i>forward</i> , (pETDuet)	AAGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGAGGAGGGGAACTATCGCC	48
SycD163 <i>Eco</i> RI, <i>reverse</i>	AAGAATTCCTATCACTCATGTTCCATCTCCTTTTTTC	36

SycD163 <i>Hind</i> III, reverse	AAAAGCTTCTATCACTCATGTTCCATCTCC	30
----------------------------------	--------------------------------	----

6.9 Bakterienstämme

Tabelle 14: Verwendete *E.coli* Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
DH5 α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ -	Invitrogen
XL10 Gold	Tet ^r Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F ^c proABlacI ^q Z Δ M15 Tn10(Tet ^r) Amy Cam ^r]	Agilent
BL21 (DE3) Rosetta	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) gal dcm (DE3) pRARE (Cam ^R)	Novagen
BL21 Codon plus (DE3) RIL	F ⁻ ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) gal dcm+ Tet ^r gal λ [argU ileY leuW Cam ^r]	Agilent
BL21 (DE3)	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ , mB ⁻) gal dcm (DE3)	Invitrogen
BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ , ompT, hsdSB (rB ⁻ , mB ⁻), dcm, gal, λ (DE3), pLysS, Cm ^r	Invitrogen
BL21 (DE3) Star	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ , mB ⁻) gal dcm rne131 (DE3)	Invitrogen
BL21 AI	F ⁻ ompT hsdSB (rB ⁻ mB ⁻) gal dcm araB::T7RNAPtetA	Invitrogen

6.10 Geräte

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte aufgelistet.

Tabelle 15: Verwendete Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
CD-Spektrometer	J-815 CD	Jasco
DLS-Messgeräte	SpectroLight 600	Xtal Concepts GmbH
	SpectroSize 300	Xtal Concepts GmbH

FPLC-Anlage	ÄKTApurifier System	GE Healthcare
Gelelektrophorese-Kammer (Agarose)	PerfectBlue Gelsystem Mini M	PEQLAB Biotechnologie
Gelelektrophorese-Kammer (Polyacrylamid)	SE 260 Mighty Small II	Hofer
Gelelektrophorese-Netzgerät	EV231	PEQLAB Biotechnologie
Größenausschluss- chromatographiesäulen	HiLoad 16/600 Superdex 75 prep grade	GE Healthcare
	HiLoad 26/600 Superdex 200 prep grade	GE Healthcare
Gelgießstand (Polyacrylamid)	Multiple Gel Caster	Hofer
Inkubationsschüttler	Innova 4330	New Brunswick Scientific
Ionenaustausch- chromatographiesäule	Mono Q	GE Healthcare
	Poros	GE Healthcare
Kristallisationsroboter	Honeybee 961	Genomic Solutions, USA
	Oryx4	Douglas Instruments, UK
Magnetrührer	VMS-A	VWR International
Massenspektrometer (Universität Hamburg)	Maldi-TOF-TOF UltrafleXtreme	Bruker
Massenspektrometer (UKE)	LC/MSD Trap XCT Ultra	Agilent
NanoDrop-Spektrometer	ND-1000	PEQLAB Biotechnologie
	ND-2000	PEQLAB Biotechnologie
PCR-Thermocycler	PCR-Cycler Mastercycler personal	Eppendorf
pH-Meter	FE20-FiveEasy™ pH	Mettler-Toledo
Photometer	GeneQuant™ 1300 Spectrophotometer	GE Healthcare Life Sciences

Material und Methoden

Schüttler mit Kreisbewegungen	GFL-3017	GFL
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Ultraschallgerät	SonifierR S-250 A	Branson Ultrasonics
Waagen	TE3102S	Sartorius
	CP2245-OCE	Sartorius
Western Blot-Kammer (<i>Semi-Dry-Blotter</i>)	V20-SDB	Biorad
Zentrifugen	5810 R	Eppendorf
	5415 R	Eppendorf
	5418 R	Eppendorf
	Minispin Plus	Eppendorf

7 METHODEN

7.1 Molekularbiologische Methoden

7.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Klonierung der einzelnen genomischen DNA-Abschnitte in die entsprechenden Expressionsvektoren wurde zunächst eine Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation der DNA durchgeführt. Die einzelnen Komponenten wurden nach folgendem Schema vereint. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug insgesamt 50 μL . Die PCR wurde entweder mit der *Taq* oder mit der *Pfu* DNA Polymerase durchgeführt.

Tabelle 16: Zusammensetzung einzelner PCR-Ansätze

Komponente	Konzentration der Stocklösung	Volumen
Template DNA	10 pg - 1 μg	1 μL
Polymerase Puffer	10x	5 μL
dNTPs	2 mM	5 μL
Primer (<i>forward</i>)	200 pmol/ μL	1 μL
Primer (<i>reverse</i>)	200 pmol/ μL	1 μL
MgCl ₂	25 mM	5 μL
Polymerase	1 U	1 μL
ddH ₂ O		ad 50 μL

Die optimierten Parameter der einzelnen Schritte während der PCR und die dazugehörige Anzahl der Zyklen sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 17: Temperaturprogramm der PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit		Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	96 °C	2 min		1
Denaturierung	96 °C	30 s		30
Primer-Anlagerung	55 °C	30 s		
Elongation	72 °C	<i>Taq</i> : 1 min/kb	<i>Pfu</i> : 2 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min		1

7.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Proben können mit Hilfe von Agarosegelen in horizontalen Gelsystemen ihrer Größe nach getrennt und somit analysiert werden. Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, wurden hierfür jeweils 5 µL des PCR-Ansatzes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und anschließend elektrophoretisch getrennt. Zur Herstellung des Agarosegels wurde die Agarose (1% (w/v)) in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt, bis sie vollständig gelöst war und in eine horizontale Gelkammer mit Probenkamm gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1 µL *6x Loading Dye* versetzt und auf das vollständig polymerisierte Gel aufgetragen. Zur Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente wurde ein geeigneter Größenmarker eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 90 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 20 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung inkubiert. Anschließend konnten die einzelnen DNA-Banden aufgrund der Fluoreszenz des mit der DNA interkalierenden Ethidiumbromids unter UV-Licht detektiert werden.

7.1.3 Reinigung der PCR-Produkte

Für die Reinigung der DNA-Amplifikate wurde der PCR-Ansatz mit dem *peqGold Gel Extraction Kit* nach dem Herstellerprotokoll isoliert. Die Elution erfolgte mit 30 µL ddH₂O.

7.1.4 Restriktion

Die gereinigten DNA-Fragmente und die jeweiligen Expressionsvektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Das Reaktionsvolumen betrug 40 μL und die Reaktion wurde gemäß den Herstellerangaben der Enzyme mit den entsprechend empfohlenen Puffern angesetzt. Die Inkubation erfolgte für mindestens eine Stunde bei 37 °C. Im Anschluss wurde die DNA mit dem *peqGold Gel Extraction Kit* nach Angaben des Herstellers isoliert und zur Kontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

7.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der gereinigten und geschnittenen DNA wurde photometrisch mit einem NanoDrop-Spektrometer bestimmt. Hierbei wird die Absorption der Probe bei 260 nm gemessen, da DNA ein Extinktionsmaximum bei dieser Wellenlänge aufweist. Es wurde jeweils 1 μL DNA-Lösung mit dem Spektrometer analysiert. Eine Absorption A_{260} von 1.0 entspricht einer Konzentration von 50 ng/ μL für doppelsträngige DNA. Um den Reinheitsgrad der DNA-Lösung zu überprüfen, wird der Quotient aus A_{260}/A_{280} bestimmt. Liegt dieser Quotient bei 1.8-2.0 kann von einer reinen dsDNA-Lösung ausgegangen werden. Ein Quotient außerhalb dieses Bereiches weist auf Verunreinigungen in der Probe z.B. durch Proteine hin.

7.1.6 Ligation

Für die Ligation der PCR-Produkte mit dem Zielvektor wurden pro Ansatz 2 μL des 10x Ligase-Puffers und 0.5 μL der T4-DNA-Ligase (1 U) verwendet. Es wurden 50 bis 60 ng Vektor eingesetzt und das molare Konzentrationsverhältnis von Insert zu Vektor betrug drei zu eins. Das Gesamtvolumen betrug 20 μL und wurde mit bidestilliertem und Nuklease-freiem Wasser ergänzt. Die Reaktion wurde für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden entsprechende *E.coli*-Zellen mit 5 μL des Ansatzes transformiert.

7.1.7 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Aus Glycerinstocks der entsprechenden Bakterienstämme wurde mit einer Pipettenspitze eine Kratzkultur entnommen. Diese wurde in 5 mL LB-Medium überführt, gegebenenfalls mit geeignetem Antibiotikum der zugehörigen Resistenzen versetzt, und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm im Inkubationsschüttler kultiviert. Am folgenden Tag wurden 100 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit 1 mL der Übernachtskultur angeimpft und wiederum bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Der Rest der Übernachtskultur wurde zur Herstellung neuer Glycerinstocks verwendet. Hierfür wurden jeweils 800 µL der Übernachtskultur mit 600 µL Glycerin vermischt und bei -80 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Das Wachstum der Zellen wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm überprüft. Die Kultivierung erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 - 0.8. Danach wurden die Zellen für zehn Minuten auf Eis gekühlt und anschließend bei 800 x g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 mL kaltem Puffer (0.1 M CaCl₂/10% (v/v) Glycerin) mit der Pipette vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 1 mL kaltem Puffer (0.1 M CaCl₂/10% (v/v) Glycerin) vorsichtig resuspendiert. Es wurden jeweils 50 µL der Zellsuspension in 1.5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

7.1.8 Transformation

Zunächst wurde ein Aliquot (50 µL) der entsprechenden chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1.5 µL DNA versetzt. Für die Transformation erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis mit nachfolgendem Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden. Es wurde für zwei Minuten auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 450 µL LB-Medium folgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C und 300 rpm im Thermomixer. 100 µL des Ansatzes wurden auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert, der über Nacht bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert wurde. Die einzelnen Inkubationszeiten während der Transformation können je nach verwendetem Bakterienstamm variieren.

7.1.9 Plasmidpräparation

Die aus der Transformation der *E.coli*-Zellen resultierenden Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze einzeln gepickt und in jeweils 5 mL LB-Medium überführt. Das LB-Medium wurde zuvor mit entsprechendem Antibiotikum versetzt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte über Nacht bei 37 °C und 220 rpm. Anschließend wurden die Übernachtskulturen für 20 min bei 4000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Die folgende Minipräparation zur Extraktion der Plasmid-DNA aus dem Zellpellet wurde mit dem Kit *peqGold Plasmid Miniprep* nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 75 µL ddH₂O. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

7.1.10 Sequenzierung

Nach abgeschlossener Klonierung wurde die hergestellte Plasmid-DNA mittels Sequenzierung auf Richtigkeit ihrer Nukleotidsequenz überprüft. Hierfür wurden 5 µL Plasmid-DNA (80-120 ng) mit 5 µL des entsprechenden Sequenzierungsprimers versetzt. Die anschließende Sequenzierreaktion sowie die Analyse der Ergebnisse wurden von der Firma GATC Biotech mit der *LIGHTrun* Sequenzierungsmethode durchgeführt.

7.1.11 Rekombinante Genexpression

Für die rekombinante Expression der klonierten Gensequenz wurde zunächst eine Transformation von *E. coli* BL21 Zellen mit 1.5 µL der Plasmid-DNA wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben durchgeführt. Die transformierten Zellen wurden auf Ampicillinhaltigem LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Übernachtskultur von 200 mL LB-Medium versetzt mit 200 µL Ampicillin (100 mg/mL) wurde mit einer einzelnen Kolonie inokuliert. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C und 220 rpm.

Am nächsten Tag wurden für die Expression je 1 L LB-Medium mit 1 mL Ampicillin (100 mg/mL) und mit 30 mL der Übernachtskultur angeimpft. Der Ansatz wurde bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Induktion erfolgte bei der jeweils gewünschten OD₆₀₀ wenn nicht anders erwähnt mit 1 mM IPTG und die Zellen wurden je nach Konstrukt entweder für vier Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei 20 °C inkubiert. Der Ausdruck über Nacht impliziert hierbei einen Zeitraum von 14-16 Stunden.

Material und Methoden

Für die Ernte der Zellen wurde die Zellsuspension in 1 L-Zentrifugenbecher überführt und für 45 Minuten bei 4 °C und 4122 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets im entsprechenden Puffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Um den Erfolg der Expression zu verifizieren, wurde jeweils vor der Induktion und vor der Ernte 1 mL Probe der Zellsuspension entnommen. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in jeweils 50 µL Probenpuffer (2x) für zehn Minuten auf 96 °C erhitzt, nach dem Abkühlen kurz zentrifugiert und anschließend mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

7.2 Proteinbiochemische Methoden

7.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode, um Makromoleküle nach ihrem Molekulargewicht und ihrer Ladung zu trennen. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung in einem vertikalen Gelsystem wandern die Moleküle mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Polyacrylamidgel. Durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) erhalten die Moleküle eine konstante negative Ladung und werden nur noch in Bezug auf ihre Größe getrennt, wobei kleinere Moleküle schneller durch das Gel wandern als große. Die Polyacrylamidgele bestehen aus einem Sammelgel, welches die Proteine fokussiert, und einem nachfolgendem Trenngel.

Zur Vorbereitung und Denaturierung der jeweiligen Proteinproben wurden diese im entsprechenden Verhältnis mit 2x beziehungsweise 5x Probenpuffer versetzt und für fünf Minuten bei 96 °C erhitzt. Anschließend wurden jeweils 20 µL der Probe auf das Gel aufgetragen. Zur Abschätzung der Größe wurde das Gel zusätzlich mit 6 µL eines Proteingrößenstandards beladen. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte in 1x Elektrodenpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA.

Tabelle 18: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für jeweils vier Gele

Gel	Substanz	Volumen
Trenngel (15%)	ddH ₂ O	6.0 mL
	30% Acrylamid/Bisacrylamid Verhältnis 37.5:1	12.5 mL

	Trenngelpuffer (pH 8.8)	6.25 mL
	SDS (10%)	0.25 mL
	TEMED	12.5 µL
	APS (10%)	125 µL
Sammelgel (4%)	ddH ₂ O	6.1 mL
	30% Acrylamid/Bisacrylamid Verhältnis 37.5:1	1.3 mL
	Sammelgelpuffer (pH 6.8)	2.5 mL
	SDS (10%)	0.1 mL
	TEMED	10 µL
	APS (10%)	50 µL

7.2.2 Coomassie-Färbung der Polyacrylamidgele

Zur Visualisierung der Proteine auf Polyacrylamidgelen wurden dieses im Anschluss an die Gelelektrophorese mit dem Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. Hierfür wurde das Gel für mindestens 30 Minuten in der Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler mit Kreisbewegungen inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung gegen die Coomassie-Entfärbelösung ausgetauscht und erneut inkubiert, bis die Protein-Banden signifikant auf dem Gel sichtbar waren. Die Entfärbelösung wurde währenddessen je nach Bedarf erneuert.

7.2.3 Western Blot

Die Western Blot-Analyse ist eine Methode, bei der Proteine mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht getrennt, anschließend elektrophoretisch aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran transferiert und auf dieser mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert werden können.

Es wurde das *Semi-Dry-Blot*-System verwendet. Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Gel zusammen mit einer durch Isopropanol aktivierten Transfermembran (PVDF) zwischen

Material und Methoden

jeweils zwei Filterpapieren in eine Blot-Kammer überführt. Die Filterpapiere wurden zuvor in Transferpuffer getränkt und der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 160 mA für 45 Minuten. Anschließend wurde die Membran für 30 Minuten mit der Blockierlösung behandelt, um freie, unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren. Die nachfolgende Inkubation mit dem primären Antikörper (Tetra-His Antibody: *mouse anti-(H)₄ IgG1*, BSA-free, Qiagen) in einer Verdünnung von 1:1000 in 3 % (w/v) BSA in TBS-T-Puffer erfolgte über Nacht bei 4 °C. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für fünf Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen und für 30 Minuten mit dem sekundären Antikörper (*rabbit anti-mouse IgG-HRP*, Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:5000 in 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist mit dem Markerenzym Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugiert, das die Chemolumineszenzreaktion des Luminols in der ECL *Solution A* katalysiert. Die Membran wurde erneut dreimal für fünf Minuten mit TBS-T-Puffer und einmal mit TBS-Puffer gewaschen. Es folgte die Entwicklung der Membran mit einer Lösung aus 12 mL ECL *Solution A*, 1.2 mL ECL *Solution B* und 30 µL Wasserstoffperoxid für zwei Minuten unter Lichtausschluss. Um die Reaktion zu stoppen wurde die Membran aus der Lösung entnommen und anschließend sofort eingescannt.

7.2.4 Zellaufschluss

Die resuspendierten Zellpellets der Genexpression wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, mit Lysozym versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 0.1 mM PMSF wurde die Zellsuspension mit einem Sonifiziergerät (*duty cycle: 30, output control: 2-3*) viermal für eine Minute einer Ultraschall-Behandlung auf Eis unterzogen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 45 Minuten bei 4 °C und 16000 x g. Die löslichen Proteine befanden sich im Überstand und das Pellet konnte verworfen werden.

Für die Fusionsproteine, die als Konstrukte mit N-terminalem GST-tag exprimiert wurden, wurde vor dem Zentrifugationsschritt zusätzlich eine 30 minütige Inkubation mit Triton X-100 bei Raumtemperatur durchgeführt.

7.2.5 Nickel-NTA Affinitätschromatographie und proteolytische Spaltung des *(His)₆-tags*

Zur Isolierung der gewünschten Zielproteine wurde der finale Überstand des Zellaufschlusses auf eine zuvor mit Puffer A äquilibrierte Ni-NTA-Agarose-Matrix in einem Glassäulenkörper gegeben. Um das Zielprotein über seinen *(His)₆-tag* an die Säulenmatrix zu binden, wurde diese für 60 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Durchlauf aufgefangen und die Matrix erst zweimal mit 30 mL Puffer A und anschließend zweimal mit Puffer A inklusive 5 % Puffer F gewaschen. Die Elution erfolgte in 10 mL Fraktionen mit Puffer A und Puffer F im Verhältnis 1:1. Die Analyse der gesammelten Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE.

Ausgewählte Fraktionen, die das reine Zielprotein enthielten, wurden vereint und über Nacht gegen Puffer A dialysiert. Am folgenden Tag wurde das Dialysat für 60 Minuten bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert, um mögliches Proteinpräzipitat zu entfernen. Der Überstand wurde mit TEV-Protease versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es erfolgte ein zweiter Ni-NTA Reinigungsschritt, um das Zielprotein von dem gespaltenen *(His)₆-tag* und der TEV-Protease, welche ebenfalls über einen *(His)₆-tag* verfügt, zu isolieren. Das gewünschte Zielprotein befand sich nun im Durchlauf und wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

7.2.6 Glutathion Affinitätschromatographie und proteolytische Spaltung des *GST-tags*

Der Überstand des Zellaufschlusses wurde auf eine zuvor mit PBS äquilibrierte Glutathion-Agarose-Matrix in einem Glassäulenkörper gegeben und diese für 60 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Durchlauf aufgefangen, die Matrix zweimal mit 40 mL PBS gewaschen und folgend mit 30 mL Protease Puffer äquilibriert. Die proteolytische Spaltung des *GST-tags* erfolgte üblicherweise direkt auf der Säule, während das Protein über diesen an die Matrix gebunden war. Hierfür verblieben 15 mL des Protease Puffers auf der Säule und wurden mit *PreScission* Protease versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde der Durchlauf gesammelt, in dem sich nun das Zielprotein befand. Die Matrix wurde zweimal mit 10 mL Waschpuffer gespült und der *GST-tag* und die Protease, die ebenfalls über einen *GST-tag* verfügt, mit 20 mL Elutionspuffer eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

7.2.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung erfolgte photometrisch an einem NanoDrop-Spektrometer, indem die spezifische Absorption der aromatischen Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen wurde. Hierfür wurden 2 µL Proteinlösung mit dem Spektrometer analysiert. Über die Absorption, die nach folgender Gleichung mit der Proteinkonzentration in Beziehung steht, konnte die Konzentration berechnet werden.

$$c = \frac{A_{280} \cdot MW}{\epsilon \cdot d}$$

Gleichung 1: Berechnung der Proteinkonzentration unter Verwendung des NanoDrop-Spektrometers

Mit A_{280} = spezifische Absorption bei 280 nm, MW = Molekulargewicht, ϵ = Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm, d = Schichtdicke der Messküvette.

Die Parameter für Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient wurden mit Hilfe des Programms ProtParam des *ExpASY Proteomics Servers* basierend auf der zugehörigen Aminosäuresequenz errechnet.¹⁹⁰ Die eingesetzten Werte sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 19: Verwendete Werte der Parameter Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient

Konstrukt	MW [g/mol]	ϵ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
YopB	41918.1	8480
YopB 1-168	18257.7	24410
YopB 47-160	12677.4	1490
YopB 47-266	22957.6	6990
YopB 1-266	27746.0	8480
YopD	33257.8	9970
YopD 1-130	13971.0	-
YopD 50-306	28014.1	9970
YopQ	20872.8	24410
YopQ 1-165	18920.6	24410
YopQ 9-179	19544.2	22920
YopQ 37-179	16529.9	19940
SycD 21-163	16078.3	10430

7.2.8 Konzentration der Proteinlösung

In einem Zentrifugalkonzentrator Amicon Ultra-15 (Millipore) mit einem MWCO (*Molecular Weight Cut-Off*) von 3 kDa bzw. 10 kDa wurde die Proteinlösung bei 4 °C und 4000 x g mehrfach zentrifugiert, bis die gewünschte Konzentration erreicht wurde. Die anschließende Lagerung der Proteinlösung erfolgte bei 4 °C.

7.2.9 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie ist ein Verfahren, um Moleküle abhängig von ihrem Molekulargewicht und ihrer Form voneinander zu trennen. Die Proteinlösung wird hierbei auf eine Säule mit geeigneter Matrix gegeben. Kleinere Moleküle können in die Poren der stationären Phase eindringen, wodurch sich ihre Retentionszeit gegenüber größeren Molekülen erhöht, und sie eluieren später. Die Größenausschlusschromatographie wurde mit Hilfe eines *ÄKTApurifier* Systems durchgeführt.

Vor jedem Lauf wurde die jeweilige Säule zunächst mit einem Säulenvolumen ddH₂O gewaschen und dann mit einem Säulenvolumen des SEC-Puffers äquilibriert. Die auf 5 mL konzentrierte Probe wurde mit Hilfe einer Probenschleife injiziert. Während einer konstanten Flussrate von 1 mL/min wurde die spezifische Absorption des Eluats bei einer Wellenlänge von 220 nm und 280 nm kontinuierlich aufgezeichnet. Die Elutionsfraktionen, die eine signifikante Absorption aufwiesen, wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

7.2.10 Ionenaustauschchromatographie

Mit der Ionenaustauschchromatographie können Moleküle aufgrund unterschiedlicher Ladung voneinander getrennt werden. Die Proteinlösung wird hierbei über eine Säule geleitet, deren stationäre Phase kovalent gebundene, geladene Gruppen enthält, über die die Proteine mit der Säulenmatrix interagieren können. Über einen Konzentrationsgradienten der zugehörigen Gegenionen im Puffer, die eine höhere Affinität zu der ionischen Matrix besitzen als die zu trennenden Makromoleküle, werden die Proteine anschließend schrittweise in Abhängigkeit ihrer Bindungsaffinität wieder von der Matrix verdrängt.

Die Ionenaustauschchromatographie wurde mit Hilfe eines *ÄKTApurifier* Systems unter Verwendung einer Anionenaustauschchromatographiesäule durchgeführt. Die Säule wurde

Material und Methoden

vor dem Probenauftrag mit einem Säulenvolumen ddH₂O gewaschen und dann mit einem Säulenvolumen AIEX-Puffer 1 äquilibriert. Nachdem die Probe mit einem Volumen von 5 mL injiziert wurde, erfolgte die Elution über einen linearen Puffergradienten, indem Puffer 1 sukzessive gegen Puffer 2 ausgetauscht wurde. Die Flussrate betrug hierbei 1 mL/min und die spezifische Absorption des Eluats wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 220 nm und 280 nm aufgezeichnet. Die Elutionsfraktionen mit einem Volumen von 2 mL, die eine signifikante Absorption aufwiesen, wurden anschließend gelelektrophoretisch über ein Polyacrylamidgel analysiert.

7.3 Biophysikalische Methoden

7.3.1 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie ist eine Methode zur Untersuchung der Wechselwirkungen von optisch aktiven Molekülen mit zirkular polarisiertem Licht. Mit ihrer Hilfe können Vorhersagen über die Sekundärstrukturzusammensetzung von Proteinen in Lösung gemacht werden. Anhand der Lage von bestimmten Absorptionsmaxima beziehungsweise -minima einer Proteinlösung über einen bestimmten Wellenlängenbereich kann der Gehalt an α -Helices und β -Faltblatt-Strukturen abgeschätzt werden.¹⁹¹ Während α -helikale Strukturen charakteristische Absorptionsminima in einem Wellenlängenbereich von 208 nm sowie 222 nm und ein Maximum um 190 nm aufweisen, liegt bei β -Faltblatt-Strukturen nur ein Absorptionsminimum bei einer Wellenlänge von 215 nm und ein Maximum bei 195 nm vor. Die Nulldurchgänge sind ebenfalls charakteristisch.

Die CD-Messungen wurden an einem J-815 CD-Spektrometer von Jasco mit der entsprechenden Software *Spectra Manager* durchgeführt. Gemessen wurde in einer Quarzglas-Küvette der Schichtdicke 0.1 cm bei einer konstanten Temperatur von 20 °C. Vor jeder Messung wurde eine Hintergrundmessung des Puffers durchgeführt, die vom CD-Signal der Proteinspektren subtrahiert wurde. Für jede Probe wurden jeweils 15 CD-Spektren über einen Wellenlängenbereich von 260-190 nm in einem Intervall von 0.1 nm aufgenommen und anschließend akkumuliert. Die zu analysierenden Proben wurden vor der Messung für 30 Minuten bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert.

Die gemessene Elliptizität wurde nach folgender Gleichung für die Auswertung der Daten in die Einheit molare Elliptizität pro Aminosäurerest (*mean residue ellipticity*, $[\theta]$) umgewandelt, welche in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ angegeben wird.

$$[\theta] = \theta \frac{M}{10 c l n}$$

Gleichung 2: Berechnung der *mean residue ellipticity* $[\theta]$

Mit θ = gemessene Elliptizität [mdeg], M = molare Masse [g/mol], c = Proteinkonzentration [g/L], l = Schichtdicke der Küvette [cm], n = Anzahl der Aminosäuren.

7.3.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung beschreibt eine Frequenzverschiebung, die bei der Streuung von monochromatischem Licht an einem bewegten Objekt auftritt.¹⁹² Dieses Phänomen wird in der Strukturbiologie ausgenutzt, um die Verteilung der hydrodynamischen Radien einzelner Moleküle in einer Lösung zu messen. Bei der DLS-Technik wird die Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle in Lösung gemessen, woraus sich der Diffusionskoeffizient D ergibt. Dieser steht mit dem hydrodynamischen Radius R_h in Beziehung und lässt sich über die Stokes-Einstein-Gleichung berechnen.¹⁹²

$$R_h = \frac{k T}{6 \pi \eta D}$$

Gleichung 3: Berechnung des hydrodynamischen Radius R_h über den Diffusionskoeffizienten D

Mit k = Boltzmann-Konstante [J/K], T = Temperatur [K], η = Viskosität [Ns/m²].

Aus den erhaltenen hydrodynamischen Radien können sowohl die molekulare Masse als auch der Aggregationszustand der Moleküle in der untersuchten Lösung abgeleitet werden. Außerdem kann die Lösung mit diesem Verfahren auf ihre Dispersität untersucht werden, die für viele weitere Strukturanalysen von essentieller Bedeutung ist.

Die DLS-Messungen erfolgten an einem *SpectroSize 300*-Gerät der Firma Xtal Concepts. Vor der jeweiligen DLS-Messung wurden die einzelnen Proben für mindestens 30 Minuten bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert. Die Messungen erfolgten mit einem Probenvolumen von 15 μL in einer Quarzküvette und wurden bei einer konstanten Temperatur von 20 °C durchgeführt.

7.3.3 Massenspektrometrie (MS)

Für die massenspektrometrische Untersuchung der Proteine wurden diese zunächst mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Färbung elektrophoretisch voneinander getrennt. Anschließend wurden die Proteinbanden der zu untersuchenden Proben mit einem sterilen Skalpell aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten. Sofern nicht selber durchgeführt, erfolgte die proteolytische Spaltung mit dem Enzym Trypsin und die anschließende Analyse des Peptidfragment-Musters mittels Massenspektrometrie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schlüter.

7.3.3.1 Proteolytische Spaltung mit Trypsin

Vor der massenspektrometrischen Analyse wurden die Proteine proteolytisch mit Trypsin in kleinere Peptidfragmente gespalten. Die verwendeten Lösungen für die tryptische Spaltung und ihre Zusammensetzungen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 20: Zusammensetzung der Lösungen für die proteolytische Spaltung mit Trypsin

Lösung	Substanz	Konzentration
Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung	Ammoniumhydrogencarbonat	25 mM
Entfärbelösung	Acetonitril	50% (v/v)
	Ammoniumhydrogencarbonat	25 mM
Extraktionslösung	Acetonitril	50% (v/v)
	Ameisensäure	5% (v/v)
Trypsinlösung	Ammoniumhydrogencarbonat	25 mM
	Trypsin	12.5 ng/ μ L
Reduktionslösung	Ammoniumhydrogencarbonat	25 mM
	DTT	10 mM
Iodacetamid-Lösung	Ammoniumhydrogencarbonat	25 mM
	Iodacetamid	55 mM

Trypsin schneidet Proteine spezifisch hinter den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, indem es die Peptidbindung am Carboxyende hydrolysiert. Der optimale pH-Wert für Trypsin liegt zwischen 8.0 und 9.0.

Nachdem die Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und zerkleinert wurden, wurden die Gelstücke mit 100 μL Entfärbelösung versetzt, für 10 Minuten gevortext und kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Gelstücke gegebenenfalls mit 100 μL Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung durch erneutes Vortexen für 10 Minuten rehydriert und nochmal entfärbt. Beide Schritte wurden wiederholt, bis die Gelstücke vollständig farblos waren. Anschließend wurden die Gelstücke für 30 Minuten mit Hilfe einer *SpeedVac* getrocknet. Es folgte die Reduktion der Cystein-Reste, um eventuell vorhandene Disulfidbrücken aufzubrechen. Hierzu wurden die Gelstücke für eine Stunde bei 56 °C in 30 μL der Reduktionslösung inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung verworfen und die Gelstücke anschließend für 45 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss in 30 μL Iodacetamid-Lösung inkubiert. Hierdurch wurden die reduzierten Cysteine durch Carboxymethylierung vor einer Reoxidation geschützt. Die Lösung wurde erneut verworfen und die Gelstücke mit 100 μL Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung versetzt, 10 Minuten gevortext und kurz zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Gelstücke zweimal mit jeweils 100 μL Entfärbelösung versetzt, fünf Minuten gevortext und zentrifugiert. Anschließend wurden sie in der *SpeedVac* zur Trockene eingengt. Nun wurde die Trypsinlösung hinzugegeben und der Ansatz wurde nach zehnmütiger Rehydrierung auf Eis über Nacht bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Die Lösung wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Gelstücke wurden mit 20 μL Extraktionslösung versetzt, für 20 Minuten gevortext und für 15 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt. Die Lösung wurde wiederum in dasselbe Reaktionsgefäß wie zuvor überführt und die letzten drei Schritte für die Gelstücke wiederholt. Die Gelstücke wurden verworfen und die gesammelte Lösung an der *SpeedVac* auf ein Volumen von ungefähr 20 μL eingengt. Zum Entsalzen der Probe wurde diese mit *ZipTipC₁₈ Pipette Tips* von Millipore nach Herstellerangaben gereinigt. Die Lagerung der Probe erfolgte bei -20 °C. Die massenspektrometrische Messung wurde an einem MALDI-TOF-TOF der MS-Abteilung der Universität Hamburg durchgeführt.

7.3.4 Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXS)

Mit der Röntgenkleinwinkelbeugung können strukturelle Informationen von Makromolekülen in Lösung wie z.B. über die Form und die Größe gewonnen werden. Die elastische Beugung der Röntgenstrahlen bei kleinen Winkeln im Bereich von 0.1° bis 10° an Proteinmolekülen wird sich hierbei zu Nutze gemacht.

Für die SAXS-Experimente wurden die Proteine, wie vorher beschrieben, gereinigt und mittels DLS auf ihre Monodispersität untersucht. Es wurden jeweils vier verschiedene Konzentrationen im Bereich zwischen 1-10 mg/mL der jeweiligen Proteinkonstrukte gemessen. Die Messungen wurden an der EMBL-Beamline P12, PETRA III (DESY, Hamburg) mit einem Detektorabstand von 3.0 m und bei einer Wellenlänge von 1.24 Å durchgeführt. Das Probenvolumen betrug jeweils 20 µL. Vor und nach jeder Probenmessung wurde der identische Puffer gemessen und anschließend von den Streudaten der Proteinprobe subtrahiert.

Die Datenprozessierung erfolgte zunächst mit den Software-Paketen PRIMUS¹⁷⁹ und GNOM¹⁸⁰ der ATSAS Suite.¹⁸⁴ Hiermit wurden der Guinier- und Kratkyplot sowie die Abstandsverteilungsfunktion analysiert und der Gyrationradius R_g sowie der maximale Durchmesser D_{max} der Partikel bestimmt. Die *ab initio* Modelle wurden anschließend mit den Programmen DAMMIF¹⁸¹ und DAMMIN¹⁸⁹ des ATSAS Online Servers erstellt und mit DAMAVER¹⁸² gemittelt. Die Modelle der Proteinkomplexe wurden mit Hilfe der CORAL¹⁸⁴ Software generiert.

7.3.5 Proteinkristallisation

Für die Kristallisationsexperimente wurden alle Zielproteine mittels Affinitätschromatographie und zusätzlich Größenausschluss- oder Ionenaustauschchromatographie gereinigt und von ihrem Affinitätstag gespalten. Die Proteinproben wurden mit CD-Spektroskopie auf ihren Faltungszustand und mittels DLS auf ihre Monodispersität hin untersucht. Anschließend wurde die Proteinlösung auf ihre finale Konzentration eingestellt und für 60 Minuten bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert.

Initiale Kristallisationsversuche wurden unter Anwendung der Dampfdiffusions-Methode durchgeführt. Mit dem Kristallisationsroboter Honeybee 961 (Genomic Solutions, USA) und unter Einsatz kommerziell erwerblicher Kristallisations-Screens wurden üblicherweise 0.5 µL

Proteinlösung in MRC2-Platten im Verhältnis 1:1 mit der Präzipitantenlösung im sitzenden Tropfen (*sitting drop*) vereinigt. Das Reservoir enthielt 50 μL der Präzipitantenlösung. Die Kristallisationsplatten wurden mit einer Klebefolie luftdicht verschlossen und im Inkubatorschrank bei 4 °C beziehungsweise 20 °C gelagert. Die Platten wurden regelmäßig unter dem Mikroskop gesichtet und auf mögliches Kristallwachstum überprüft.

Tabelle 21: Verwendete Kristallisations-Screens

Kristallisations-Screen	Hersteller
AmSO ₄ -Suite	Qiagen, Deutschland
Classics Suite	Qiagen, Deutschland
ComPAS Suite	Qiagen, Deutschland
Cryos Suite	Qiagen, Deutschland
JCSG-plus	Molecular Dimensions, UK
Morpheus	Molecular Dimensions, UK
PACT premier	Molecular Dimensions, UK
Structure	Molecular Dimensions, UK
SturaFootprint&Macrosol	Molecular Dimensions, UK

Sobald initiale Kristallisationsbedingungen detektiert werden konnten, wurden diese durch Variation der einzelnen Parameter wie pH-Wert, Salzkonzentration und Präzipitantenkonzentration der gefundenen Bedingung optimiert. Hierfür wurden MRC Maxi-Platten verwendet mit einem Reservoirvolumen von 100 μL , die Tropfengröße betrug 3-4 μL , wobei das Verhältnis von Protein zu Präzipitant ebenfalls variiert wurde, sowie auch die jeweilige Proteinkonzentration.

Zusätzlich zur Dampfdiffusion wurde das Batch-Verfahren angewendet, bei dem unter Anwendung der gleichen kommerziellen Screens mit dem Pipettierroboter Oryx4 (Douglas Instruments, UK) 0.3 μL Proteinlösung mit 0.3 μL Präzipitant vermischt und anschließend mit Paraffinöl überschichtet wurde. Die Platten wurden ebenfalls im Inkubatorschrank bei 4 °C beziehungsweise 20 °C gelagert.

7.3.6 *Second Order Nonlinear Imaging of Chiral Crystals (SONICC)*

Mit der SONICC-Technologie lassen sich Kristalle auf ihren Proteincharakter hin untersuchen. Die Kristalle werden hierbei mit einem fs-Laserimpuls bestrahlt. Handelt es sich um einen chiralen Kristall, so kommt es zu einer Frequenzverdopplung, die als *second harmonic generation* (SHG) bezeichnet wird und detektiert werden kann. Unter Anwendung dieser Technik lassen sich somit chirale Kristalle von nicht chiralen und damit Proteinkristalle von möglicherweise entstandenen Salzkristallen differenzieren.

Für die Aufnahmen wurde ein SONICC-Gerät der Firma Formulatrix mit einer SHG-Belichtungszeit von 30 s verwendet.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Treille, G.-F. Y., a. La peste bubonique á Hong Kong. *Annales de l'Institut Pasteur* **8**, 662-667 (1894).
- 2 Butler, T. Plague history: Yersin's discovery of the causative bacterium in 1894 enabled, in the subsequent century, scientific progress in understanding the disease and the development of treatments and vaccines. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **20**, 202-209, doi:10.1111/1469-0691.12540 (2014).
- 3 McNally, A., Thomson, N. R., Reuter, S. & Wren, B. W. 'Add, stir and reduce': *Yersinia* spp. as model bacteria for pathogen evolution. *Nature reviews. Microbiology* **14**, 177-190, doi:10.1038/nrmicro.2015.29 (2016).
- 4 Bottone, E. J. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clinical microbiology reviews* **10**, 257-276 (1997).
- 5 Bottone, E. J. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and infection* **1**, 323-333 (1999).
- 6 Hinnebusch, B. J., Perry, R. D. & Schwan, T. G. Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (hms) locus in the transmission of plague by fleas. *Science (New York, N.Y.)* **273**, 367-370 (1996).
- 7 Achtman, M. *et al.* *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14043-14048 (1999).
- 8 Bos, K. I. *et al.* *Yersinia pestis*: new evidence for an old infection. *PloS one* **7**, e49803, doi:10.1371/journal.pone.0049803 (2012).
- 9 Frederiksen, W. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria ("Bacterium enterocoliticum" and Pasteurella X). In *Proceedings of the 14th Scandinavian Congress on Pathology and Microbiology, Oslo, Norway.*, 103-104 (1964).
- 10 Atkinson, S. & Williams, P. *Yersinia* virulence factors - a sophisticated arsenal for combating host defences. *F1000Research* **5**, doi:10.12688/f1000research.8466.1 (2016).
- 11 Burkinshaw, B. J. & Strynadka, N. C. Assembly and structure of the T3SS. *Biochimica et biophysica acta* **1843**, 1649-1663, doi:10.1016/j.bbamcr.2014.01.035 (2014).
- 12 Galan, J. E. & Collmer, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science (New York, N.Y.)* **284**, 1322-1328 (1999).
- 13 Gauthier, A., Thomas, N. A. & Finlay, B. B. Bacterial injection machines. *The Journal of biological chemistry* **278**, 25273-25276, doi:10.1074/jbc.R300012200 (2003).
- 14 Cornelis, G. R. The type III secretion injectisome. *Nature reviews. Microbiology* **4**, 811-825, doi:10.1038/nrmicro1526 (2006).
- 15 Mattei, P. J. *et al.* Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *The FEBS journal* **278**, 414-426, doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07974.x (2011).
- 16 Montagner, C., Arquint, C. & Cornelis, G. R. Translocators YopB and YopD from *Yersinia enterocolitica* form a multimeric integral membrane complex in eukaryotic

- cell membranes. *Journal of bacteriology* **193**, 6923-6928, doi:10.1128/jb.05555-11 (2011).
- 17 Notti, R. Q. & Stebbins, C. E. The Structure and Function of Type III Secretion Systems. *Microbiology spectrum* **4**, doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0004-2015 (2016).
- 18 Dewoody, R. S., Merritt, P. M. & Marketon, M. M. Regulation of the Yersinia type III secretion system: traffic control. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **3**, 4, doi:10.3389/fcimb.2013.00004 (2013).
- 19 Izore, T., Job, V. & Dessen, A. Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure (London, England : 1993)* **19**, 603-612, doi:10.1016/j.str.2011.03.015 (2011).
- 20 Burghout, P. *et al.* Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in Yersinia enterocolitica. *Journal of bacteriology* **186**, 5366-5375, doi:10.1128/jb.186.16.5366-5375.2004 (2004).
- 21 Diepold, A. *et al.* Deciphering the assembly of the Yersinia type III secretion injectisome. *The EMBO journal* **29**, 1928-1940, doi:10.1038/emboj.2010.84 (2010).
- 22 Koster, M. *et al.* The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of Yersinia enterocolitica forms a ring-shaped multimeric complex. *Molecular microbiology* **26**, 789-797 (1997).
- 23 Kudryashev, M. *et al.* In situ structural analysis of the Yersinia enterocolitica injectisome. *eLife* **2**, e00792, doi:10.7554/eLife.00792 (2013).
- 24 Blaylock, B., Riordan, K. E., Missiakas, D. M. & Schneewind, O. Characterization of the Yersinia enterocolitica type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *Journal of bacteriology* **188**, 3525-3534, doi:10.1128/jb.188.10.3525-3534.2006 (2006).
- 25 Sorg, J. A., Blaylock, B. & Schneewind, O. Secretion signal recognition by YscN, the Yersinia type III secretion ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16490-16495, doi:10.1073/pnas.0605974103 (2006).
- 26 Driks, A. & DeRosier, D. J. Additional structures associated with bacterial flagellar basal body. *Journal of molecular biology* **211**, 669-672, doi:10.1016/0022-2836(90)90063-r (1990).
- 27 Kubori, T., Yamaguchi, S. & Aizawa, S. Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of Salmonella typhimurium does not require any other flagellar proteins. *Journal of bacteriology* **179**, 813-817 (1997).
- 28 Thomas, D. R., Francis, N. R., Xu, C. & DeRosier, D. J. The three-dimensional structure of the flagellar rotor from a clockwise-locked mutant of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology* **188**, 7039-7048, doi:10.1128/jb.00552-06 (2006).
- 29 Allaoui, A., Woestyn, S., Sluiter, C. & Cornelis, G. R. YscU, a Yersinia enterocolitica inner membrane protein involved in Yop secretion. *Journal of bacteriology* **176**, 4534-4542 (1994).
- 30 Spreter, T. *et al.* A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nature structural & molecular biology* **16**, 468-476, doi:10.1038/nsmb.1603 (2009).
- 31 Woestyn, S., Allaoui, A., Wattiau, P. & Cornelis, G. R. YscN, the putative energizer of the Yersinia Yop secretion machinery. *Journal of bacteriology* **176**, 1561-1569 (1994).

- 32 Agrain, C. *et al.* Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Molecular microbiology* **56**, 54-67, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04534.x (2005).
- 33 Payne, P. L. & Straley, S. C. YscO of *Yersinia pestis* is a mobile core component of the Yop secretion system. *Journal of bacteriology* **180**, 3882-3890 (1998).
- 34 Payne, P. L. & Straley, S. C. YscP of *Yersinia pestis* is a secreted component of the Yop secretion system. *Journal of bacteriology* **181**, 2852-2862 (1999).
- 35 Blaylock, B., Berube, B. J. & Schneewind, O. YopR impacts type III needle polymerization in *Yersinia* species. *Molecular microbiology* **75**, 221-229, doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06988.x (2010).
- 36 Diepold, A., Wiesand, U., Amstutz, M. & Cornelis, G. R. Assembly of the *Yersinia* injectisome: the missing pieces. *Molecular microbiology* **85**, 878-892, doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08146.x (2012).
- 37 Blocker, A. *et al.* Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. *Molecular microbiology* **39**, 652-663 (2001).
- 38 Journet, L., Agrain, C., Broz, P. & Cornelis, G. R. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science (New York, N.Y.)* **302**, 1757-1760, doi:10.1126/science.1091422 (2003).
- 39 Kubori, T. *et al.* Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science (New York, N.Y.)* **280**, 602-605 (1998).
- 40 Lee, V. T. & Schneewind, O. Type III secretion machines and the pathogenesis of enteric infections caused by *Yersinia* and *Salmonella* spp. *Immunological reviews* **168**, 241-255 (1999).
- 41 Riordan, K. E. & Schneewind, O. YscU cleavage and the assembly of *Yersinia* type III secretion machine complexes. *Molecular microbiology* **68**, 1485-1501, doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06247.x (2008).
- 42 Riordan, K. E., Sorg, J. A., Berube, B. J. & Schneewind, O. Impassable YscP substrates and their impact on the *Yersinia enterocolitica* type III secretion pathway. *Journal of bacteriology* **190**, 6204-6216, doi:10.1128/jb.00467-08 (2008).
- 43 Sait, M. *et al.* Genomic and Experimental Evidence Suggests that *Verrucomicrobium spinosum* Interacts with Eukaryotes. *Frontiers in Microbiology* **2**, doi:10.3389/fmicb.2011.00211 (2011).
- 44 Day, J. B. & Plano, G. V. The *Yersinia pestis* YscY protein directly binds YscX, a secreted component of the type III secretion machinery. *Journal of bacteriology* **182**, 1834-1843 (2000).
- 45 Iriarte, M. & Cornelis, G. R. Identification of SycN, YscX, and YscY, three new elements of the *Yersinia yop* virulon. *Journal of bacteriology* **181**, 675-680 (1999).
- 46 Broms, J. E., Edqvist, P. J., Carlsson, K. E., Forsberg, A. & Francis, M. S. Mapping of a YscY binding domain within the LcrH chaperone that is required for regulation of *Yersinia* type III secretion. *Journal of bacteriology* **187**, 7738-7752, doi:10.1128/jb.187.22.7738-7752.2005 (2005).
- 47 Buttner, C. R., Sorg, I., Cornelis, G. R., Heinz, D. W. & Niemann, H. H. Structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion translocator chaperone SycD. *Journal of molecular biology* **375**, 997-1012, doi:10.1016/j.jmb.2007.11.009 (2008).
- 48 Sorg, I. *et al.* YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome. *The EMBO journal* **26**, 3015-3024, doi:10.1038/sj.emboj.7601731 (2007).
- 49 Edqvist, P. J. *et al.* YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *Journal of bacteriology* **185**, 2259-2266 (2003).

- 50 Lavander, M. *et al.* Proteolytic cleavage of the FlhB homologue YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for bacterial survival but not for type III secretion. *Journal of bacteriology* **184**, 4500-4509 (2002).
- 51 Bjornfot, A. C., Lavander, M., Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. Autoproteolysis of YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is important for regulation of expression and secretion of Yop proteins. *Journal of bacteriology* **191**, 4259-4267, doi:10.1128/jb.01730-08 (2009).
- 52 Cheng, L. W. & Schneewind, O. *Yersinia enterocolitica* TyeA, an intracellular regulator of the type III machinery, is required for specific targeting of YopE, YopH, YopM, and YopN into the cytosol of eukaryotic cells. *Journal of bacteriology* **182**, 3183-3190 (2000).
- 53 DeBord, K. L., Lee, V. T. & Schneewind, O. Roles of LcrG and LcrV during type III targeting of effector Yops by *Yersinia enterocolitica*. *Journal of bacteriology* **183**, 4588-4598, doi:10.1128/jb.183.15.4588-4598.2001 (2001).
- 54 Lee, V. T., Anderson, D. M. & Schneewind, O. Targeting of *Yersinia* Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. *Molecular microbiology* **28**, 593-601 (1998).
- 55 Mueller, C. A. *et al.* The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science (New York, N.Y.)* **310**, 674-676, doi:10.1126/science.1118476 (2005).
- 56 Derewenda, U. *et al.* The structure of *Yersinia pestis* V-antigen, an essential virulence factor and mediator of immunity against plague. *Structure (London, England : 1993)* **12**, 301-306, doi:10.1016/j.str.2004.01.010 (2004).
- 57 Johnson, S. *et al.* Self-chaperoning of the type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD. *The Journal of biological chemistry* **282**, 4035-4044, doi:10.1074/jbc.M607945200 (2007).
- 58 Broz, P. *et al.* Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex. *Molecular microbiology* **65**, 1311-1320, doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05871.x (2007).
- 59 Mueller, C. A., Broz, P. & Cornelis, G. R. The type III secretion system tip complex and translocon. *Molecular microbiology* **68**, 1085-1095, doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06237.x (2008).
- 60 Picking, W. L. *et al.* IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infection and immunity* **73**, 1432-1440, doi:10.1128/iai.73.3.1432-1440.2005 (2005).
- 61 Goure, J., Broz, P., Attree, O., Cornelis, G. R. & Attree, I. Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *The Journal of infectious diseases* **192**, 218-225, doi:10.1086/430932 (2005).
- 62 Goure, J. *et al.* The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infection and immunity* **72**, 4741-4750, doi:10.1128/iai.72.8.4741-4750.2004 (2004).
- 63 Ferracci, F., Day, J. B., Ezelle, H. J. & Plano, G. V. Expression of a functional secreted YopN-TyeA hybrid protein in *Yersinia pestis* is the result of a +1 translational frameshift event. *Journal of bacteriology* **186**, 5160-5166, doi:10.1128/jb.186.15.5160-5166.2004 (2004).
- 64 Ferracci, F., Schubot, F. D., Waugh, D. S. & Plano, G. V. Selection and characterization of *Yersinia pestis* YopN mutants that constitutively block Yop secretion. *Molecular microbiology* **57**, 970-987, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04738.x (2005).

- 65 Davis, A. J., Diaz, D. A. & Mecsas, J. A dominant-negative needle mutant blocks type III secretion of early but not late substrates in *Yersinia*. *Molecular microbiology* **76**, 236-259, doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07096.x (2010).
- 66 Hamad, M. A. & Nilles, M. L. Roles of YopN, LcrG and LcrV in controlling Yops secretion by *Yersinia pestis*. *Advances in experimental medicine and biology* **603**, 225-234, doi:10.1007/978-0-387-72124-8_20 (2007).
- 67 Torruellas, J., Jackson, M. W., Pennock, J. W. & Plano, G. V. The *Yersinia pestis* type III secretion needle plays a role in the regulation of Yop secretion. *Molecular microbiology* **57**, 1719-1733, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04790.x (2005).
- 68 Dewoody, R., Merritt, P. M. & Marketon, M. M. YopK controls both rate and fidelity of Yop translocation. *Molecular microbiology* **87**, 301-317, doi:10.1111/mmi.12099 (2013).
- 69 Akeda, Y. & Galan, J. E. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**, 911-915, doi:10.1038/nature03992 (2005).
- 70 Cordes, F. S. *et al.* Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *The Journal of biological chemistry* **278**, 17103-17107, doi:10.1074/jbc.M300091200 (2003).
- 71 Akopyan, K. *et al.* Translocation of surface-localized effectors in type III secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 1639-1644, doi:10.1073/pnas.1013888108 (2011).
- 72 Edgren, T., Forsberg, A., Rosqvist, R. & Wolf-Watz, H. Type III secretion in *Yersinia*: injectisome or not? *PLoS pathogens* **8**, e1002669, doi:10.1371/journal.ppat.1002669 (2012).
- 73 Arnold, R. *et al.* Sequence-based prediction of type III secreted proteins. *PLoS pathogens* **5**, e1000376, doi:10.1371/journal.ppat.1000376 (2009).
- 74 McDermott, J. E. *et al.* Computational prediction of type III and IV secreted effectors in gram-negative bacteria. *Infection and immunity* **79**, 23-32, doi:10.1128/iai.00537-10 (2011).
- 75 Samudrala, R., Heffron, F. & McDermott, J. E. Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems. *PLoS pathogens* **5**, e1000375, doi:10.1371/journal.ppat.1000375 (2009).
- 76 Lloyd, S. A., Norman, M., Rosqvist, R. & Wolf-Watz, H. *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Molecular microbiology* **39**, 520-531 (2001).
- 77 Stebbins, C. E. & Galan, J. E. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **414**, 77-81, doi:10.1038/35102073 (2001).
- 78 Stebbins, C. E. & Galan, J. E. Priming virulence factors for delivery into the host. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 738-743, doi:10.1038/nrm1201 (2003).
- 79 Letzelter, M. *et al.* The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *The EMBO journal* **25**, 3223-3233, doi:10.1038/sj.emboj.7601202 (2006).
- 80 Feldman, M. F. & Cornelis, G. R. The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS microbiology letters* **219**, 151-158 (2003).
- 81 Lunelli, M., Lokareddy, R. K., Zychlinsky, A. & Kolbe, M. IpaB-IpgC interaction defines binding motif for type III secretion translocator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 9661-9666, doi:10.1073/pnas.0812900106 (2009).

- 82 Costa, S. C. *et al.* A new means to identify type 3 secreted effectors: functionally interchangeable class IB chaperones recognize a conserved sequence. *mBio* **3**, doi:10.1128/mBio.00243-11 (2012).
- 83 Janjusevic, R., Quezada, C. M., Small, J. & Stebbins, C. E. Structure of the HopA1(21-102)-ShcA chaperone-effector complex of *Pseudomonas syringae* reveals conservation of a virulence factor binding motif from animal to plant pathogens. *Journal of bacteriology* **195**, 658-664, doi:10.1128/jb.01621-12 (2013).
- 84 Lilic, M., Vujanac, M. & Stebbins, C. E. A common structural motif in the binding of virulence factors to bacterial secretion chaperones. *Molecular cell* **21**, 653-664, doi:10.1016/j.molcel.2006.01.026 (2006).
- 85 Barta, M. L. *et al.* The structures of coiled-coil domains from type III secretion system translocators reveal homology to pore-forming toxins. *Journal of molecular biology* **417**, 395-405, doi:10.1016/j.jmb.2012.01.026 (2012).
- 86 Job, V., Mattei, P. J., Lemaire, D., Attree, I. & Dessen, A. Structural basis of chaperone recognition of type III secretion system minor translocator proteins. *The Journal of biological chemistry* **285**, 23224-23232, doi:10.1074/jbc.M110.111278 (2010).
- 87 Schreiner, M. & Niemann, H. H. Crystal structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycD in complex with a peptide of the minor translocator YopD. *BMC structural biology* **12**, 13, doi:10.1186/1472-6807-12-13 (2012).
- 88 Sun, P., Tropea, J. E., Austin, B. P., Cherry, S. & Waugh, D. S. Structural characterization of the *Yersinia pestis* type III secretion system needle protein YscF in complex with its heterodimeric chaperone YscE/YscG. *Journal of molecular biology* **377**, 819-830, doi:10.1016/j.jmb.2007.12.067 (2008).
- 89 Chatterjee, C. *et al.* Crystal structure of the heteromolecular chaperone, AscE-AscG, from the type III secretion system in *Aeromonas hydrophila*. *PloS one* **6**, e19208, doi:10.1371/journal.pone.0019208 (2011).
- 90 Quinaud, M. *et al.* Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 7803-7808, doi:10.1073/pnas.0610098104 (2007).
- 91 Mota, L. J., Sorg, I. & Cornelis, G. R. Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express. *FEMS microbiology letters* **252**, 1-10, doi:10.1016/j.femsle.2005.08.036 (2005).
- 92 Neyt, C. & Cornelis, G. R. Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Molecular microbiology* **31**, 143-156 (1999).
- 93 Wattiau, P., Bernier, B., Deslee, P., Michiels, T. & Cornelis, G. R. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 10493-10497 (1994).
- 94 Francis, M. S., Lloyd, S. A. & Wolf-Watz, H. The type III secretion chaperone LcrH co-operates with YopD to establish a negative, regulatory loop for control of Yop synthesis in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Molecular microbiology* **42**, 1075-1093 (2001).
- 95 Cambronne, E. D., Sorg, J. A. & Schneewind, O. Binding of SycH chaperone to YscM1 and YscM2 activates effector yop expression in *Yersinia enterocolitica*. *Journal of bacteriology* **186**, 829-841 (2004).
- 96 Schmid, A. *et al.* *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycD: recombinant expression, purification and characterization of a homodimer. *Protein expression and purification* **49**, 176-182, doi:10.1016/j.pep.2006.04.012 (2006).

- 97 Discola, K. F. *et al.* Membrane and chaperone recognition by the major translocator protein PopB of the type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry* **289**, 3591-3601, doi:10.1074/jbc.M113.517920 (2014).
- 98 Nguyen, V. S. *et al.* Structure of AcrH-AopB Chaperone-Translocator Complex Reveals a Role for Membrane Hairpins in Type III Secretion System Translocon Assembly. *Structure (London, England : 1993)* **23**, 2022-2031, doi:10.1016/j.str.2015.08.014 (2015).
- 99 Hakansson, S., Bergman, T., Vanooteghem, J. C., Cornelis, G. & Wolf-Watz, H. YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins. *Infection and immunity* **61**, 71-80 (1993).
- 100 Hakansson, S. *et al.* The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *The EMBO journal* **15**, 5812-5823 (1996).
- 101 Neyt, C. & Cornelis, G. R. Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Molecular microbiology* **33**, 971-981 (1999).
- 102 Faudry, E., Vernier, G., Neumann, E., Forge, V. & Attree, I. Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **45**, 8117-8123, doi:10.1021/bi060452+ (2006).
- 103 Warawa, J., Finlay, B. B. & Kenny, B. Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity* **67**, 5538-5540 (1999).
- 104 Ide, T. *et al.* Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular microbiology* **3**, 669-679 (2001).
- 105 Costa, T. R. *et al.* Type III secretion translocon assemblies that attenuate *Yersinia* virulence. *Cellular microbiology* **15**, 1088-1110, doi:10.1111/cmi.12100 (2013).
- 106 Enninga, J., Mounier, J., Sansonetti, P. & Tran Van Nhieu, G. Secretion of type III effectors into host cells in real time. *Nature methods* **2**, 959-965, doi:10.1038/nmeth804 (2005).
- 107 Mills, E., Baruch, K., Charpentier, X., Kobi, S. & Rosenshine, I. Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell host & microbe* **3**, 104-113, doi:10.1016/j.chom.2007.11.007 (2008).
- 108 Zhang, L. *et al.* The Functions of Effector Proteins in *Yersinia* Virulence. *Polish journal of microbiology* **65**, 5-12 (2016).
- 109 Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y. & Attree, I. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Molecular microbiology* **40**, 76-85 (2001).
- 110 Thorslund, S. E. *et al.* The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with *Yersinia pseudotuberculosis* virulence function. *PloS one* **6**, e16784, doi:10.1371/journal.pone.0016784 (2011).
- 111 Hamada, D. *et al.* EspB from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* is a natively partially folded protein. *The FEBS journal* **272**, 756-768, doi:10.1111/j.1742-4658.2004.04513.x (2005).
- 112 Faudry, E., Job, V., Dessen, A., Attree, I. & Forge, V. Type III secretion system translocator has a molten globule conformation both in its free and chaperone-bound forms. *The FEBS journal* **274**, 3601-3610, doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05893.x (2007).

- 113 Schroeder, G. N. & Hilbi, H. Cholesterol is required to trigger caspase-1 activation and macrophage apoptosis after phagosomal escape of *Shigella*. *Cellular microbiology* **9**, 265-278, doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00787.x (2007).
- 114 Hayward, R. D. *et al.* Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. *Molecular microbiology* **56**, 590-603, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04568.x (2005).
- 115 van der Goot, F. G., Tran van Nhieu, G., Allaoui, A., Sansonetti, P. & Lafont, F. Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism. *The Journal of biological chemistry* **279**, 47792-47798, doi:10.1074/jbc.M406824200 (2004).
- 116 Viboud, G. I. & Bliska, J. B. A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes. *The EMBO journal* **20**, 5373-5382, doi:10.1093/emboj/20.19.5373 (2001).
- 117 Bridge, D. R., Novotny, M. J., Moore, E. R. & Olson, J. C. Role of host cell polarity and leading edge properties in *Pseudomonas* type III secretion. *Microbiology (Reading, England)* **156**, 356-373, doi:10.1099/mic.0.033241-0 (2010).
- 118 Yu, X. J., McGourty, K., Liu, M., Unsworth, K. E. & Holden, D. W. pH sensing by intracellular *Salmonella* induces effector translocation. *Science (New York, N.Y.)* **328**, 1040-1043, doi:10.1126/science.1189000 (2010).
- 119 Blocker, A. *et al.* The tripartite type III secretion system of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *The Journal of cell biology* **147**, 683-693 (1999).
- 120 Ryndak, M. B., Chung, H., London, E. & Bliska, J. B. Role of predicted transmembrane domains for type III translocation, pore formation, and signaling by the *Yersinia pseudotuberculosis* YopB protein. *Infection and immunity* **73**, 2433-2443, doi:10.1128/iai.73.4.2433-2443.2005 (2005).
- 121 Viboud, G. I., So, S. S., Ryndak, M. B. & Bliska, J. B. Proinflammatory signalling stimulated by the type III translocation factor YopB is counteracted by multiple effectors in epithelial cells infected with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Molecular microbiology* **47**, 1305-1315 (2003).
- 122 Picking, W. L. & Picking, W. D. The Many Faces of IpaB. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **6**, 12, doi:10.3389/fcimb.2016.00012 (2016).
- 123 Costa, T. R., Amer, A. A., Fallman, M., Fahlgren, A. & Francis, M. S. Coiled-coils in the YopD translocator family: a predicted structure unique to the YopD N-terminus contributes to full virulence of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **12**, 1729-1742, doi:10.1016/j.meegid.2012.07.016 (2012).
- 124 Tengel, T., Sethson, I. & Francis, M. S. Conformational analysis by CD and NMR spectroscopy of a peptide encompassing the amphipathic domain of YopD from *Yersinia*. *European journal of biochemistry* **269**, 3659-3668 (2002).
- 125 Osiecki, J. C. *et al.* IpaC from *Shigella* and SipC from *Salmonella* possess similar biochemical properties but are functionally distinct. *Molecular microbiology* **42**, 469-481 (2001).
- 126 Harrington, A. T. *et al.* Structural characterization of the N terminus of IpaC from *Shigella flexneri*. *Infection and immunity* **71**, 1255-1264 (2003).
- 127 Broms, J. E., Sundin, C., Francis, M. S. & Forsberg, A. Comparative analysis of type III effector translocation by *Yersinia pseudotuberculosis* expressing native LcrV or PcrV from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of infectious diseases* **188**, 239-249, doi:10.1086/376452 (2003).
- 128 Amer, A. A., Ahlund, M. K., Broms, J. E., Forsberg, A. & Francis, M. S. Impact of the N-terminal secretor domain on YopD translocator function in *Yersinia*

- pseudotuberculosis type III secretion. *Journal of bacteriology* **193**, 6683-6700, doi:10.1128/jb.00210-11 (2011).
- 129 Hartland, E. L., Green, S. P., Phillips, W. A. & Robins-Browne, R. M. Essential role of YopD in inhibition of the respiratory burst of macrophages by *Yersinia enterocolitica*. *Infection and immunity* **62**, 4445-4453 (1994).
- 130 Williams, A. W. & Straley, S. C. YopD of *Yersinia pestis* plays a role in negative regulation of the low-calcium response in addition to its role in translocation of Yops. *Journal of bacteriology* **180**, 350-358 (1998).
- 131 Tardy, F. *et al.* *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *The EMBO journal* **18**, 6793-6799, doi:10.1093/emboj/18.23.6793 (1999).
- 132 Anderson, D. M., Ramamurthi, K. S., Tam, C. & Schneewind, O. YopD and LcrH regulate expression of *Yersinia enterocolitica* YopQ by a posttranscriptional mechanism and bind to yopQ RNA. *Journal of bacteriology* **184**, 1287-1295 (2002).
- 133 Kopaskie, K. S., Ligtenberg, K. G. & Schneewind, O. Translational regulation of *Yersinia enterocolitica* mRNA encoding a type III secretion substrate. *The Journal of biological chemistry* **288**, 35478-35488, doi:10.1074/jbc.M113.504811 (2013).
- 134 Chen, Y. & Anderson, D. M. Expression hierarchy in the *Yersinia* type III secretion system established through YopD recognition of RNA. *Molecular microbiology* **80**, 966-980, doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07623.x (2011).
- 135 Chang, J. *et al.* SipC multimerization promotes actin nucleation and contributes to *Salmonella*-induced inflammation. *Molecular microbiology* **66**, 1548-1556, doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06024.x (2007).
- 136 Nichols, C. D. & Casanova, J. E. *Salmonella*-directed recruitment of new membrane to invasion foci via the host exocyst complex. *Current biology : CB* **20**, 1316-1320, doi:10.1016/j.cub.2010.05.065 (2010).
- 137 Kuwae, A. *et al.* *Shigella* invasion of macrophage requires the insertion of IpaC into the host plasma membrane. Functional analysis of IpaC. *The Journal of biological chemistry* **276**, 32230-32239, doi:10.1074/jbc.M103831200 (2001).
- 138 Zheng, T. S. *et al.* Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 13618-13623 (1998).
- 139 Cambronne, E. D. & Schneewind, O. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: yscM1 and yscM2 regulate yop gene expression by a posttranscriptional mechanism that targets the 5' untranslated region of yop mRNA. *Journal of bacteriology* **184**, 5880-5893 (2002).
- 140 Rimpilainen, M., Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. A novel protein, LcrQ, involved in the low-calcium response of *Yersinia pseudotuberculosis* shows extensive homology to YopH. *Journal of bacteriology* **174**, 3355-3363 (1992).
- 141 Wilharm, G., Neumayer, W. & Heesemann, J. Recombinant *Yersinia enterocolitica* YscM1 and YscM2: homodimer formation and susceptibility to thrombin cleavage. *Protein expression and purification* **31**, 167-172 (2003).
- 142 Straley, S. C. & Bowmer, W. S. Virulence genes regulated at the transcriptional level by Ca²⁺ in *Yersinia pestis* include structural genes for outer membrane proteins. *Infection and immunity* **51**, 445-454 (1986).
- 143 Aepfelbacher, M. & Heesemann, J. Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by *Yersinia* outer proteins (Yops). *International journal of medical microbiology : IJMM* **291**, 269-276, doi:10.1078/1438-4221-00130 (2001).

- 144 Viboud, G. I. & Bliska, J. B. Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annual review of microbiology* **59**, 69-89, doi:10.1146/annurev.micro.59.030804.121320 (2005).
- 145 Wolters, M., Zobiak, B., Nauth, T. & Aepfelbacher, M. Analysis of Yersinia enterocolitica Effector Translocation into Host Cells Using Beta-lactamase Effector Fusions. *Journal of visualized experiments : JoVE*, doi:10.3791/53115 (2015).
- 146 Swietnicki, W., Powell, B. S. & Goodin, J. Yersinia pestis Yop secretion protein F: purification, characterization, and protective efficacy against bubonic plague. *Protein expression and purification* **42**, 166-172, doi:10.1016/j.pep.2005.02.016 (2005).
- 147 Aepfelbacher, M. & Wolters, M. Acting on Actin: Rac and Rho Played by Yersinia. *Current topics in microbiology and immunology*, doi:10.1007/82_2016_33 (2016).
- 148 Mukherjee, S. & Orth, K. In vitro signaling by MAPK and NFkappaB pathways inhibited by Yersinia YopJ. *Methods in enzymology* **438**, 343-353, doi:10.1016/s0076-6879(07)38024-5 (2008).
- 149 Vladimer, G. I. *et al.* The NLRP12 inflammasome recognizes Yersinia pestis. *Immunity* **37**, 96-107, doi:10.1016/j.immuni.2012.07.006 (2012).
- 150 Mukherjee, S. *et al.* Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)* **312**, 1211-1214, doi:10.1126/science.1126867 (2006).
- 151 Hamid, N. *et al.* YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microbial pathogenesis* **27**, 231-242, doi:10.1006/mpat.1999.0301 (1999).
- 152 Black, D. S. & Bliska, J. B. Identification of p130Cas as a substrate of Yersinia YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *The EMBO journal* **16**, 2730-2744, doi:10.1093/emboj/16.10.2730 (1997).
- 153 Berneking, L. *et al.* Immunosuppressive Yersinia Effector YopM Binds DEAD Box Helicase DDX3 to Control Ribosomal S6 Kinase in the Nucleus of Host Cells. *PLoS pathogens* **12**, e1005660, doi:10.1371/journal.ppat.1005660 (2016).
- 154 Ruckdeschel, K., Deuretzbacher, A. & Haase, R. Crosstalk of signalling processes of innate immunity with Yersinia Yop effector functions. *Immunobiology* **213**, 261-269, doi:10.1016/j.imbio.2007.11.001 (2008).
- 155 Andor, A. *et al.* YopE of Yersinia, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cellular microbiology* **3**, 301-310 (2001).
- 156 Groves, E. *et al.* Sequestering of Rac by the Yersinia effector YopO blocks Fcgamma receptor-mediated phagocytosis. *The Journal of biological chemistry* **285**, 4087-4098, doi:10.1074/jbc.M109.071035 (2010).
- 157 Prehna, G., Ivanov, M. I., Bliska, J. B. & Stebbins, C. E. Yersinia virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell* **126**, 869-880, doi:10.1016/j.cell.2006.06.056 (2006).
- 158 Aepfelbacher, M., Roppenser, B., Hentschke, M. & Ruckdeschel, K. Activity modulation of the bacterial Rho GAP YopE: an inspiration for the investigation of mammalian Rho GAPs. *European journal of cell biology* **90**, 951-954, doi:10.1016/j.ejcb.2010.12.004 (2011).
- 159 Aili, M., Isaksson, E. L., Hallberg, B., Wolf-Watz, H. & Rosqvist, R. Functional analysis of the YopE GTPase-activating protein (GAP) activity of Yersinia pseudotuberculosis. *Cellular microbiology* **8**, 1020-1033, doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00684.x (2006).

- 160 Dewoody, R., Merritt, P. M., Houppert, A. S. & Marketon, M. M. YopK regulates the *Yersinia pestis* type III secretion system from within host cells. *Molecular microbiology* **79**, 1445-1461, doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07534.x (2011).
- 161 Fernandez-Lago, L., Gomez, M., Vizcaino, N. & Chordi, A. Analysis of the immune response to *Yersinia enterocolitica* serotype-O:9-released proteins by immunoblot and ELISA. *Research in microbiology* **145**, 553-561 (1994).
- 162 Holmstrom, A., Rosqvist, R., Wolf-Watz, H. & Forsberg, A. Virulence plasmid-encoded YopK is essential for *Yersinia pseudotuberculosis* to cause systemic infection in mice. *Infection and immunity* **63**, 2269-2276 (1995).
- 163 Mehigh, R. J., Sample, A. K. & Brubaker, R. R. Expression of the low calcium response in *Yersinia pestis*. *Microbial pathogenesis* **6**, 203-217 (1989).
- 164 Michiels, T., Wattiau, P., Bresseur, R., Ruyschaert, J. M. & Cornelis, G. Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*. *Infection and immunity* **58**, 2840-2849 (1990).
- 165 Sample, A. K., Fowler, J. M. & Brubaker, R. R. Modulation of the low-calcium response in *Yersinia pestis* via plasmid-plasmid interaction. *Microbial pathogenesis* **2**, 443-453 (1987).
- 166 Straley, S. C., Plano, G. V., Skrzypek, E., Haddix, P. L. & Fields, K. A. Regulation by Ca²⁺ in the *Yersinia* low-Ca²⁺ response. *Molecular microbiology* **8**, 1005-1010 (1993).
- 167 Ramamurthi, K. S. & Schneewind, O. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: mutational analysis of the yopQ secretion signal. *Journal of bacteriology* **184**, 3321-3328 (2002).
- 168 Ramamurthi, K. S. & Schneewind, O. *Yersinia* yopQ mRNA encodes a bipartite type III secretion signal in the first 15 codons. *Molecular microbiology* **50**, 1189-1198 (2003).
- 169 Anderson, D. M. & Schneewind, O. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. *Molecular microbiology* **31**, 1139-1148 (1999).
- 170 Michiels, T. & Cornelis, G. R. Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system. *Journal of bacteriology* **173**, 1677-1685 (1991).
- 171 Trcek, J., Wilharm, G., Jacobi, C. A. & Heesemann, J. *Yersinia enterocolitica* YopQ: strain-dependent cytosolic accumulation and post-translational secretion. *Microbiology (Reading, England)* **148**, 1457-1465, doi:10.1099/00221287-148-5-1457 (2002).
- 172 Trulzsch, K. *et al.* Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *International journal of medical microbiology : IJMM* **293**, 167-177, doi:10.1078/1438-4221-00251 (2003).
- 173 Holmstrom, A., Rosqvist, R., Wolf-Watz, H. & Forsberg, A. YopK, a novel virulence determinant of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Contributions to microbiology and immunology* **13**, 239-243 (1995).
- 174 Garcia, J. T. *et al.* Measurement of effector protein injection by type III and type IV secretion systems by using a 13-residue phosphorylatable glycogen synthase kinase tag. *Infection and immunity* **74**, 5645-5657, doi:10.1128/iai.00690-06 (2006).
- 175 Holmstrom, A. *et al.* YopK of *Yersinia pseudotuberculosis* controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane. *Molecular microbiology* **24**, 73-91 (1997).
- 176 Aili, M., Hallberg, B., Wolf-Watz, H. & Rosqvist, R. GAP activity of *Yersinia* YopE. *Methods in enzymology* **358**, 359-370 (2002).









- 177 Marketon, M. M., DePaolo, R. W., DeBord, K. L., Jabri, B. & Schneewind, O. Plague bacteria target immune cells during infection. *Science (New York, N.Y.)* **309**, 1739-1741, doi:10.1126/science.1114580 (2005).
- 178 Yang, J. T., Wu, C. S. & Martinez, H. M. Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods in enzymology* **130**, 208-269 (1986).
- 179 Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J. & Svergun, D. I. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography* **36**, 1277-1282, doi:doi:10.1107/S0021889803012779 (2003).
- 180 Svergun, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495-503 (1992).
- 181 Franke, D. a. S., D.I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Cryst.* **42**, 342-346 (2009).
- 182 Volkov, V. V. & Svergun, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography* **36**, 860-864, doi:doi:10.1107/S0021889803000268 (2003).
- 183 Slabinski, L. *et al.* XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics (Oxford, England)* **23**, 3403-3405, doi:10.1093/bioinformatics/btm477 (2007).
- 184 Petoukhov, M. V. *et al.* New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography* **45**, 342-350, doi:doi:10.1107/S0021889812007662 (2012).
- 185 Larkin, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)* **23**, 2947-2948, doi:10.1093/bioinformatics/btm404 (2007).
- 186 Robert, X. & Gouet, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic acids research* **42**, W320-324, doi:10.1093/nar/gku316 (2014).
- 187 Romano, F. B. *et al.* Efficient isolation of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion translocators and assembly of heteromeric transmembrane pores in model membranes. *Biochemistry* **50**, 7117-7131, doi:10.1021/bi200905x (2011).
- 188 Romano, F. B. *et al.* Type 3 Secretion Translocators Spontaneously Assemble a Hexadecameric Transmembrane Complex. *The Journal of biological chemistry* **291**, 6304-6315, doi:10.1074/jbc.M115.681031 (2016).
- 189 Svergun, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J.* , 2879-2886 (1999).
- 190 Artimo, P. *et al.* ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research* **40**, W597-603, doi:10.1093/nar/gks400 (2012).
- 191 Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et biophysica acta* **1751**, 119-139, doi:10.1016/j.bbapap.2005.06.005 (2005).
- 192 Atkins, P. W. Vol. 3 (WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2006).

9 ANHANG







9.1 Gefahrenstoffe nach GHS











Die verwendeten Chemikalien sind mit ihren jeweiligen Gefahrenpiktogrammen sowie ihren H- (*Hazard Statements*) und P-Sätzen (*Precautionary Statements*) in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Verwendete Chemikalien









Substanz	Gefahrenpiktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Acetonitril		225-302-312-319-332	210-280-305+351+338
Acrylamid		301-312-315-317-319-332-340-350-361f-372	201-280-301+310-305+351+338-308+313
Agarose	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Ameisensäure		226-314	260-280-301+330+331-305+351+338-309+310
Ammoniumhydrogencarbonat		302	-
Ammoniumpersulfat		272-302-315-317-319-334-335	280-302+352-305+351+338-342+311
Ampicillin Natriumsalz		315-317-319-334-335	261-280-305+351+338-342+311
Arabinose	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Bisacrylamid		302	-
Bis Tris		315-319-335	261-305+351+338




Anhang

Bis Tris Propan	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Bovines Serumalbumin	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Bromphenolblau	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Calciumchlorid		319	305+351+338
Coomassie Brilliant Blue	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Dimethylsulfoxid	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Dinatriumhydrogenphosphat	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Dithiothreitol		302-315-319	305+351+338
EDTA	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Essigsäure		226-314	280-301+330+331-310-305+351+338
Ethanol		225	210
Ethidiumbromid		302-315-319-330-335-341	302+352-304+340-305+351+338-309-310
Formaldehyd (37%)		301-311-314-317-330-351	301+310-303+361+353-305+351+338-320-361-405-501
Glucose	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
red. Glutathion	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Glycerin	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Glycin	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		

Guanidinium-Hydrochlorid		302-315-319	305+351+338-302+352
HEPES	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Imidazol		302-314-361d	280-301+330+331-305+351+338-309+310
Iodacetamid		315-317-319-335	280-302+352-304+340-305+351+338
IPTG		319-351-335	233-280-302+350-305+351+338
Isopropanol		225-319-336	210-233-305+351+338
Kaliumchlorid	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Kanamycin		360	201-308+313
Lithiumsulfat		302-315-319-335	261-280-304+340-305+351+338-405-501
Luminol		315-319-335	261-305+351+338
Magnesiumchlorid	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
β -Mercaptoethanol		301-310-318-400-410-315-317-335	261-301+310-305+351+338-361-405-501
Milchpulver	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Natriumacetat	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Natriumcarbonat		319	260-305+351+338

Anhang

Natriumchlorid	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Natrium-dodecylsulfat		228-302-311-315-319-335	210-280-302+352-304+340-305+351+338-309+310
Natriumformiat	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Natriumhydroxid		290-314	280-301+330+331-305+351+338-309+310
Natriumthiosulfat	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Ni-NTA-Agarose		302-319	305+351+338
Nickel(II)sulfat		350i-341-360d-372-302+332-315-334-317-410	201-280-273-308+313-342+311-302+352
Paraffinöl		319	264-280-305+351+338-337+313
PEG 3350	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
PEG 400	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
PMSF		301-314	260-301+310-303+361+353-305+351+338-405-501
Salzsäure		314-335	260-264-280-301+330+331-303+361+353-304+340-305+351+338-310-321-403+233-405-501
TEMED		225-332-302-314	210-233-280-301+330+331-305+351+338-309+310


Tris-Base, Tris-HCl		315-319-335	261-305+351+338
Trypsin		315-319-334-335	-
Trypton	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Triton X100	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Tween-20	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Wasserstoffperoxid (30%)		271-302-314-332-335	220-261-280- 305+351+338-310

In Tabelle 23 sind die verwendeten KMR-Stoffe aufgelistet.









Tabelle 23: Verwendete KMR-Stoffe der Kategorie 1A und 1B

CAS-Nummer	Substanz	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie
79-06-1	Acrylamid	SDS-PAGE	K: 1B M: 1B
7786-81-4	Nickel(II)sulfat	Lösung (100mM) zur Regeneration der Ni-NTA- Agarose-Matrix	K: 1A R: 1B
288-32-4	Imidazol	Elutionspuffer (250 mM)	R: 1B

Tabelle 24: Verwendete Kristallisations-Screens

Kristallisations-Screen	Gefahrenpiktogramme	H-Sätze	P-Sätze
AmSO ₄ -Suite (Qiagen)		225-301-330-350-340- 360FD-372-411	101-201-273-280- 309+311

Anhang

Classics Suite (Qiagen)		225-301-302-315-319- 331-332-335-340-350- 360FD-373-411	101-201-270-280- 305+351+338-309+311- 313
ComPAS Suite (Qiagen)		225-301-302-315-319- 331-332-335-340-350- 360FD-373-411	101-201-270-273-280- 305+351+338-309+311- 313
Cryos Suite (Qiagen)		225-301-302-315-319- 331-332-335-340-350- 360FD-373-411	101-201-270-273-280- 305+351+338-309+311- 313
JCSG-plus (Molecular Dimensions)		225-301-312-315-318- 331-335-350-411	101-201-270-280- 305+351+338-309+311- 313
Morpheus (Molecular Dimensions)		225-301-302-315-319- 331-332-335-340-350- 360FD-361d-373-411	101-201-270-273-280- 305+351+338-309+311- 313
PACT premier (Molecular Dimensions)		301-331-412	101-270-273-280- 309+311
Structure (Molecular Dimensions)		225-301-302-315-319- 331-332-335-340-350- 360FD-361d-373-411	101-201-270-273-280- 305+351+338-309+311- 313
SturaFootprint&M acrosol (Molecular Dimensions)		225-301-302-315-319- 332-335-340-350- 360FD-373-411	101-201-270-273-280- 305+351+338-309+311- 313

9.2 Gefahrenpiktogramme



GHS02



GHS03



GHS05



GHS06



GHS07



GHS08



GHS09

Abbildung 70: Gefahrenpiktogramme

9.2 H-Sätze (*Hazard Statements*)

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H271	Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
H272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H301	Giftig bei Verschlucken.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H302+332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.
H310	Lebensgefahr bei Hautkontakt.
H311	Giftig bei Hautkontakt.
H312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H330	Lebensgefahr bei Einatmen.
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H340	Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H350	Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

Anhang

H350i	Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.
H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H360	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H361d	Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H361f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H372	Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H400	Sehr giftig für Wasserorganismen.
H410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

9.3 P-Sätze (*Precautionary Statements*)

P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen.
P220	Von Kleidung/ brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P260	Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
P261	Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
P264	Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
P301+310	Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.
P301+330+331	Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.
P302+352	Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P303+361+353	Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
P304+340	Bei Einatmen: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
P305+351+338	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P308+313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P310	Sofort Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.
P320	Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
P321	Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).

- P337+313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P342+311 Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.
- P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
- P403+322 Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P405 Unter Verschluss aufbewahren.
- P501 Inhalt/Behälter ... zuführen.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Struktureller Aufbau des T3SS	8
Abbildung 2: Basalkörper des T3SS	9
Abbildung 3: Ausbildung der Nadelstruktur	10
Abbildung 4: Kristallstruktur von LcrV und Modell der LcrV-Plattform	11
Abbildung 5: Blockade der Sekretion von Effektorproteinen durch den YopN/TyeA-Komplex	12
Abbildung 6: Funktion der unterschiedlichen Chaperone im T3SS.....	14
Abbildung 7: Kristallstruktur von SycD21-163	15
Abbildung 8: Übersicht der Bindungsmotive einzelner Translokatoren ⁸¹	16
Abbildung 9: Oberflächendarstellung des elektrostatischen Potentials des SycD/YopD-Komplexes...17	
Abbildung 10: Überlagerung der Chaperon Bindungsdomäne der T3SS Translokatoren	18
Abbildung 11: Organisation des <i>lcrGVH-yopBD</i> Operons aus <i>Y.pseudotuberculosis</i>	19
Abbildung 12: Kristallstrukturen der <i>Coiled-Coil-Domänen</i> von IpaB74-224 (links) und SipB82-226 (rechts).....	22
Abbildung 13: Kristallstruktur des Komplexes aus AopB40-246/AcrH.....	23
Abbildung 14: Interaktionen der Yop-Proteine mit GTPasen.....	26
Abbildung 15: Modellvorhersagen für die Funktion von YopQ/K.....	28
Abbildung 16: Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte auf einem 1%igen Agarosegel.....	31
Abbildung 17: SDS-PAGE-Analyse, Expressionsprofil von YopQ-GST auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.....	33
Abbildung 18: SDS-PAGE-Analyse, Reinigung von YopQ-GST (A) und anschließender TEV-Verdau (B) jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.....	33
Abbildung 19: SDS-PAGE-Analyse, Reinigung und proteolytische Spaltung des <i>GST-tags</i> (A) und anschließende Größenausschlusschromatographie (B) jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.....	34
Abbildung 20: Größenausschlusschromatographie YopQ.....	35
Abbildung 21: Ergebnisse der DLS-Messungen von YopQ	36
Abbildung 22: CD-spektroskopische Untersuchung nach erfolgter Reinigung von YopQ.....	37
Abbildung 23: Lichtmikroskopische Untersuchungen der Kristallisationsansätze von YopQ.....	38
Abbildung 24: SAXS-Daten-Analyse von YopQ mit PRIMUS	40
Abbildung 25: Mit DAMMIF und DAMAVER berechnetes <i>ab initio</i> Modell von YopQ.....	40
Abbildung 26: SDS-PAGE-Analyse YopQ1-165, Reinigung und proteolytische Spaltung des <i>GST-tags</i> und anschließende Größenausschlusschromatographie jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.....	42
Abbildung 27: Initiale Charakterisierung von YopQ1-165 in Lösung.....	43
Abbildung 28: SAXS-Daten-Analyse von YopQ1-165 mit PRIMUS.....	45
Abbildung 29: Mit DAMMIF und DAMAVER berechnetes <i>ab initio</i> Modell von YopQ1-165.....	45
Abbildung 30: SDS-PAGE-Analyse YopQ9-179, Reinigung und proteolytische Spaltung des <i>GST-tags</i> und anschließende Größenausschlusschromatographie jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.....	46
Abbildung 31: Initiale Charakterisierung von YopQ9-179 in Lösung.....	48
Abbildung 32: SAXS-Datenanalyse von YopQ9-179 mit PRIMUS	49
Abbildung 33: <i>Ab initio</i> Modelle von YopQ9-179.....	50
Abbildung 34: Reinigung und Charakterisierung von YopQ37-179.....	51
Abbildung 35: SAXS-Datenanalyse von YopQ37-179 mit PRIMUS	52
Abbildung 36: Mit DAMMIF und DAMAVER berechnetes <i>ab initio</i> Modell von YopQ37-179	53
Abbildung 37: SDS-PAGE-Analyse, Expressionsprofil, Reinigung und proteolytische Spaltung des <i>GST-tags</i> von GST-SycD21-163 jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.....	55
Abbildung 38: Größenausschlusschromatographie SycD21-163.....	56
Abbildung 39: CD-spektroskopische Analyse sowie DLS-Messungen von SycD21-163.....	57

Abbildung 40: SDS-PAGE-Analyse, Expressionsprofil, Reinigung und proteolytische Spaltung des <i>GST-tags</i> von GST-YopB1-168 jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.	59
Abbildung 41: Größenausschlusschromatographie YopB1-168.	60
Abbildung 42: CD-spektroskopische Analyse sowie DLS-Messungen von YopB1-168.	61
Abbildung 43: SDS-PAGE-Analyse YopB1-168 und SycD21-163, gemeinsame Reinigung und proteolytische Spaltung des <i>GST-tags</i> auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.	62
Abbildung 44: Größenausschlusschromatographie YopB1-168/SycD21-163.	63
Abbildung 45: Größenausschlusschromatographie YopB1-168/SycD21-163.	64
Abbildung 46: SDS-PAGE-Analyse YopB1-168 und SycD21-163, gemeinsame Reinigung und proteolytische Spaltung des <i>GST-tags</i> auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.	64
Abbildung 47: Ergebnisse der DLS-Messungen von YopB1-168/SycD21-163.	65
Abbildung 48: CD-spektroskopische Analyse von YopB1-168/SycD21-163.	66
Abbildung 49: SAXS-Datenanalyse von YopB1-168/SycD21-163 mit PRIMUS.	67
Abbildung 50: Sequenzvergleich von AopB aus <i>A. hydrophila</i> und YopB aus <i>Y. enterocolitica</i>	68
Abbildung 51: Berechnete SAXS-Modelle für YopB1-168/SycD21-163.	68
Abbildung 52: Überlagerung der beiden berechneten SAXS-Modelle von YopB1-168/SycD21-163.	69
Abbildung 53: SDS-PAGE-Analyse, Expressionsprofil und Reinigung von YopB/SycD21-163, jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.	71
Abbildung 54: SDS-PAGE-Analyse, Expressionsprofil von YopD1-130- <i>(His)₆-tag</i> auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel und Western Blot-Analyse der affinitätschromatographischen Reinigung von YopD1-130.	73
Abbildung 55: SDS-PAGE-Analyse, Expressionsprofil und Reinigung von YopD/SycD21-163, jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.	75
Abbildung 56: Größenausschlusschromatographie YopD/SycD21-163.	75
Abbildung 57: SDS-PAGE-Analyse, proteolytische Spaltung des <i>(His)₆-tag</i> und Größenausschlusschromatographie von YopD/SycD21-163, jeweils auf einem 15%igen Polyacrylamidtrenngel.	76
Abbildung 58 CD-spektroskopische Analyse von YopD/SycD21-163.	77
Abbildung 59: Ergebnisse der DLS-Messungen von YopD/SycD21-163.	77
Abbildung 60: SAXS-Datenanalyse von YopD/SycD21-163 mit PRIMUS.	78
Abbildung 61: Mit DAMMIN berechnetes <i>ab initio</i> Modell von YopD/SycD21-163.	79
Abbildung 62: Lichtmikroskopische Untersuchungen der Kristallisationsansätze von YopD/SycD21-163.	80
Abbildung 63: Lichtmikroskopische Untersuchung der optimierten Kristallisationsansätze von YopD/SycD21-163.	81
Abbildung 64: Kristallstruktur von SycD in Komplex mit einem YopD-Peptid ⁸⁷	86
Abbildung 65: Kristallstruktur des Komplexes aus AopB40-246/AcrH.	87
Abbildung 66: Sequenzvergleich von YopB aus <i>Y. enterocolitica</i> und AopB aus <i>A. hydrophila</i>	88
Abbildung 67: Überlagerung des berechneten SAXS-Modelle von YopB1-168/SycD21-163 mit dem überlappenden Teil der homologen Struktur von AopB/AcrH.	89
Abbildung 68: Strukturelle Informationen zu YopD.	91
Abbildung 69: Mit DAMMIN berechnetes <i>ab initio</i> Modell von YopD/SycD21-163.	93
Abbildung 70: Gefahrenpiktogramme.	143

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht der Translokatorproteine der einzelnen Organismen und ihre Chaperone	17
Tabelle 2: Übersicht der Ergebnisse der YopQ-Konstrukte	83
Tabelle 3: Übersicht der Verbrauchsmaterialien	96
Tabelle 4: Allgemein eingesetzte Medien, Puffer und Lösungen	97
Tabelle 5: Verwendete Puffer für die Reinigung mit Glutathion-Agarose-Affinitätsmatrix	99
Tabelle 6: Verwendete Puffer für die Reinigung mit NiNTA-Agarose-Affinitätsmatrix	99
Tabelle 7: Verwendete Puffer für die Größenausschluss- (SEC) sowie Anionenaustauschchromatographie (AIEX)	100
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Kits und Enzyme	100
Tabelle 9: Verwendete Vektoren	102
Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der YopB-Konstrukte	102
Tabelle 11: Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der YopD-Konstrukte	103
Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der YopQ-Konstrukte	103
Tabelle 13: Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der SycD-Konstrukte	103
Tabelle 14: Verwendete <i>E.coli</i> Bakterienstämme	104
Tabelle 15: Verwendete Geräte	104
Tabelle 16: Zusammensetzung einzelner PCR-Ansätze	107
Tabelle 17: Temperaturprogramm der PCR	108
Tabelle 18: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für jeweils vier Gele	112
Tabelle 19: Verwendete Werte der Parameter Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient	116
Tabelle 20: Zusammensetzung der Lösungen für die proteolytische Spaltung mit Trypsin	120
Tabelle 21: Verwendete Kristallisations-Screens	123
Tabelle 22: Verwendete Chemikalien	137
Tabelle 23: Verwendete KMR-Stoffe der Kategorie 1A und 1B	141
Tabelle 24: Verwendete Kristallisations-Screens	141

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Christian Betzel bedanken für die Bereitstellung des Themas, die Begutachtung der Arbeit sowie für die Betreuung während meiner gesamten Promotionszeit.

Mein weiterer herzlicher Dank geht an PD Dr. Markus Perbandt ebenfalls für die Betreuung während meiner Arbeit und die vielen Hilfestellungen und Anregungen, die meine Arbeit stets vorangetrieben haben.

Ich bedanke mich bei Prof. Andrew Torda für die Übernahme des Zweitgutachtens und bei meinen Disputationsgutachtern Prof. Martin Aepfelbacher und Dr. Thomas Hackl.

Bei Prof. Aepfelbacher und seiner gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich zusätzlich für die gute Zusammenarbeit an diesem interessanten Forschungsthema bedanken. Vor allem danke ich Franziska Huschka für die Unterstützung und Bereitstellung der Materialien zu Beginn meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei Alexey Kikhney für die Hilfe bei der Auswertung der SAXS-Ergebnisse.

Ein großer Dank geht an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe für die tolle Zusammenarbeit und die Hilfestellungen bei allen alltäglichen Herausforderungen. Hervorzuheben sind hierbei besonders Sabine Botha und Christina Schmidt, die mir stets meinen Alltag erhellen, sowie Aline Melro Murad und Robin Schubert. Meine größte Wertschätzung geht an Svetlana Kapis, dafür dass wir die gesamte Zeit zusammen verbracht haben, ich immer auf sie zählen kann und wir uns auch ohne Worte verstehen. Ich danke auch Lena Carstensen und Joanna Fafinska, deren Freundschaft mich den ganzen Weg des Studiums über begleitet hat.

Mein besonderer Dank gilt natürlich auch meinen Freunden und meiner Familie speziell meinen Eltern und Großeltern für ihre immerwährende Unterstützung.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 12.12.2016

Theresa Nuguid