Klonierung und Expression von *Shigella*-Pathogenitätsgenen sowie Interaktionsstudien mit ihren Produkten

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christian Hasewinkel

aus Jena

Marburg/Lahn 2013

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 14.05.2013

angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Reuter
Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerhard Klebe

Tag der mündlichen Prüfung am 15.05.2013

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis 3
II. Abkürzungen 7
1 Einleitung 9
1.1 Klassifizierung der Shigellen 9
1.2 Pathogenese 10
1.2.1 Krankheitsverlauf 10
1.2.2 Diagnose, Behandlung und Prävention 11
1.3 Shiga-Toxin (Stx) 11
1.4 Epithelzelleninvasion 12
1.4.1 Invasion über die M-Zellen 13
1.4.2 Invasion mit Hilfe der neutrophilen Granulozyten 14
1.4.3 Typ III Translokon und Invasion 15
1.4.4 Ausbreitung und Übertritt in weitere Epithelzellen 16
1.5 Pathogenitätsfaktoren 17
1.5.1 Chaperon IpgA 17
1.5.2 Effektor IcsB 17
1.5.3 Effektor IpgB oder IpgB1 18
1.5.4 Effektor TrcA oder IpgB2 18
1.5.5 Chaperon IpgC 18
1.5.6 Invasin IpaB 19
1.5.7 Invasin IpaC 20
1.5.8 Invasin IpaD 20
1.5.9 Transkriptionsaktivator MxiE 21
1.5.10 Antiaktivator OspD1 21
1.5.11 Chaperon Spa15 22
1.5.12 Effektor IpaA und das Wirtsprotein Vinculin 22
1.5.13 Chaperon IpgE 23
1.5.14 Effektor IpgD 23
1.5.15 Spa-orf11 23
1.5.16 Effektor IpgF 24
1.5.17 Effektor IpgH 24

2 Materialien und Methoden für die Molekularbiologie 25
2.1 Materialien 25
2.1.1 Chemikalien 25
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien 27
2.1.3 Lösungen, Puffer und Kulturmedien 29
2.1.4 Enzyme 33
2.1.5 Molekulargewichtstandards und Probenpuffer 34
2.1.6 Kits und Screens 35
2.1.7 Primer 36
2.1.8 Vektoren 39
2.1.9 Konstruierte Plasmide 43
2.1.10 Bakterienstämme 44
2.2 Methoden 46
2.2.1 DNA-Methoden 46
2.2.2 Protein-biochemische-Methoden 54
3 Materialien und Methoden für die organische Synthese 85
3.1 Materialien 85
3.1.1 Chemikalien 85
3.1.2 Geräte 87
3.1.3 Lösungen 88
3.2 Methoden 89
3.2.1 Festphasenpeptidsynthese mittels Syntheseroboter 89
3.2.2 Peptidabspaltung von der Festphase 92
3.2.3 Analytische HPLC nach Abspaltung 93
3.2.4 Präparative HPLC 93
3.2.5 Analytische HPLC der Fraktionen 94
3.2.6 Lyophilisieren 94
3.2.7 Analytische HPLC der voll aufgereinigten Peptide 95
3.2.8 ESI-Massenspektrometrie der voll aufgereinigten Peptide 95
4 Ergebnisse und Diskussion 97
4.1 Konstruktion der Expressionsplasmide pGEX-4T-mod, pHW1, pHW2 und pHW3 97
4.2 Untersuchung der Wechselwirkung des Chaperons IpgE mit dem Effektorprotein IpgD sowie mit Spa-orf11 100
4.2.1 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem IpgE 100

4.2.2 Stabilitätsuntersuchungen von IpgE mit dem Thermal Shift Assay 100
4.2.3 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem IpgD 100
4.2.4 Qualitative und quantitative Untersuchung der Interaktion zwischen IpgD und IpgE 100
4.2.5 Heterologe Produktion und Reinigung der verkürzten IpgD-Variante IpgD-30,-8 100
4.2.6 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem Spa-orf11 100
4.2.7 Qualitative und quantitative Untersuchung der Interaktion zwischen IpgE und Spa-orf11 100
4.3 Untersuchung der Wechselwirkung des Chaperons IpgC mit dem Invasin IpaC sowie mit dem Transkriptionsaktivator MxiE 100
4.3.1 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem IpgC 100
4.3.2 Heterologe Produktion und Versuch der Reinigung von rekombinantem IpaC 100
4.3.3 Qualitative Untersuchung der Interaktion zwischen IpgC und IpaC 100
4.3.4 Quantitative Untersuchung der Interaktion zwischen IpgC und vollsynthetischen IpaC-Peptiden 100
4.3.5 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem MxiE 100
4.3.6 Quantitative Untersuchung der Interaktion zwischen IpgC und vollsynthetischen MxiE-Peptiden 100
4.3.7 Heterologe Produktion und Reinigung der verkürzten IpgC-Variante IpgC0,-4S 100
4.4 Untersuchung der Wechselwirkung des Chaperons Spa15 mit dem Effektorprotein IpaA sowie mit dem Antiaktivator OspD1 100
4.4.1 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem Spa15 100
4.4.2 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem IpaA 100
4.4.3 Qualitative Untersuchung der Interaktion zwischen Spa15 und IpaA 100
4.4.4 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem OspD1 100
4.4.5 Qualitative Untersuchung der Interaktion zwischen Spa15 und OspD1 100
4.5 Untersuchung der Wechselwirkung des Chaperons IpgA mit dem Effektorprotein IcsB 100
4.5.1 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem IpgA 100
4.5.2 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem IcsB 100
4.5.3 Qualitative Untersuchung der Interaktion zwischen IpgA und IcsB 100
5 Zusammenfassung 100
6 Literaturverzeichnis 100

7 Anhang 100
7.1 Konstruierte Plasmide 100
7.2 Testexpression der pGEX-4T-mod Konstrukte 100

II. Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
Boc	*tert.*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
BSA	Bovine Serum Albumin
Da	Dalton
dest.	destilliert
DIPEA	Diisoprobylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ESI	Elektronen Spray Ionisation
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HOBT	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	High performance liquide chromatography
IfSG	Infektionsschutzgesetz
ipa	invasion plasmid antigen
ipg	invasion plasmid gene
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
L	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar (mol/L)
mxi	membrane expression of invasion plasmid antigens
MCS	Multiple cloning site

MOPS	3-Morpholin-propanylsulfonsäure
NMP	N-Methyl-2-Pyrrolidon
OD_λ	Optische Dichte bei λ nm
osp	outer shigella protein
OtBu	*tert.*-Butylester-Schutzgruppe
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydro-benzofuran-5-sulfonyl-Schutzgruppe
PBS	Phosphate Buffer Saline
RNA	Ribonucleic acid
rpm	rounds per minutes (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyarcrylamid-Gelelektrophorese
spa	surface presentation of invasion plasmid antigens
Stx	Shiga-Toxin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TfB	Transformation Buffer
Tis	Triisopropylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Trt	Trityl-Schutzgruppe
TYM	Trypticase yeast extract maltose
UV	Ultraviolet

1 Einleitung

In den letzten hundert Jahren sind Krankheiten wie Pest, Tuberkulose und Ruhr in den Industrieländern in Vergessenheit geraten, da hier der Hygienestandard verbessert wurde und Arzneimittel zur Bekämpfung dieser Krankheiten vorhanden sind. Aber gerade die ärmeren Länder, besonders die der Dritten Welt, haben noch unter diesen Krankheiten zu leiden.
Die Shigellenruhr oder Shigellose betrifft besonders den afrikanischen Kontinent. In den Jahren 2000 bis 2004 brachen im Sudan, Zentralafrika, Sierra Leone, Liberia und Lesotha Epidemien aus, die von der WHO erkannt und bekämpft wurden. Allgemein werden 163 Millionen Erkrankte pro Jahr in den Dritte Welt Ländern registriert, wobei 1.1 Millionen an den Folgen der Krankheit sterben. 61% davon sind Kinder unter 5 Jahren. Gründe für diese Epidemien sind Krieg, Hunger und schlechte Hygiene. Ziel sollte es somit sein, den Staaten eine Möglichkeit zur eigenen Bekämpfung der Krankheit in die Hand zu geben [1].

1.1 Klassifizierung der Shigellen

Shigellen gehören zur Familie der Enterobakterien und sind unbegeißelte, unbewegliche, gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien [2], die eine hohe Identität mit *Escherichia coli* haben [3]. Shigellen sind Lactose-negativ, säureproduzierend aber nicht gasproduzierend bei der Fermentierung von Kohlenhydraten [4].
Vier Spezies gehören zur Familie der Shigellen, die auf Grund von verschieden spezifischen O-Antigenen insgesamt 41 Serotypen beinhalten und deren natürlicher Lebensraum der Darm des Menschen ist, welcher das einzig relevante Reservoir darstellt [5]. In Deutschland sind Infektionen mit Shigellen nur von *S. sonnei* mit einem Anteil von 70-80% und *S. flexneri* mit einem Anteil von 10-20% von Bedeutung [6].

- Gruppe A (*S. dysenteriae*): in tropischen und subtropischen Gebieten, fermentiert kein Mannitol, 13 Serotypen, Typ 1 produziert Shiga-Toxin (besonders schwere Infektion in explosionsartigen Epidemien und selbst Pandemien)
- Gruppe B (*S. flexneri*): weltweit, fermentiert Mannitol, 8 Serotypen
- Gruppe C (*S. boydii*): hauptsächlich in Vorderasien und in Nordafrika, fermentiert Mannitol, 18 Serotypen
- Gruppe D (*S. sonnei*): weltweit, fermentiert Mannitol, 2 Serotypen, relativ milder Krankheitsverlauf.

1.2 Pathogenese

1.2.1 Krankheitsverlauf

Shigellen werden fäkal-oral als Schmierinfektion oder über kontaminierte Nahrungsmittel aufgenommen. Bereits 10 bis 100 Bakterien sind ausreichend eine Infektion auszulösen [7]. Der niedrige pH-Wert im Magen bietet kaum Schutz, da der Erreger selbst noch nach 20 h im Magen regenerationsfähig ist. Im Dünndarm angekommen beginnt die Vermehrung, wodurch der Titer nach 24-36 h bereits 10^9 mL^{-1} beträgt [8]. Somit kommt es in leichten Fällen zu dyspeptischen Beschwerden, Fieber und Durchfallerscheinungen. Bei schwereren Fällen kommt es zu Nekrosen und Geschwürbildungen im Dickdarmbereich, sowie Dickdarmschleimhautblutungen oder sogar Perforationen, die bei unzureichender Behandlung zum Tode führen. Bei Infektion mit *S. dysenteriae* vom Typ 1 entstehen darüber hinaus Schäden durch das Shiga-Toxin, die sich in einem hämolytisch urämischen Syndrom manifestieren.

Für diese Blutungen und Perforationen ist die Fähigkeit des Erregers verantwortlich, in Epithelzellen einzudringen [9][10], sich dort geschützt zu vermehren und weitere Epithelzellen nach dem Zelltod der Wirtszelle zu infizieren [11]. Durch diesen Prozess wird ein Großteil des Epithels zerstört, was zu einer verminderten Wasseraufnahme und somit zum Durchfall führt. Die Infektion endet mit dem Erreichen der Lamina propria durch den Erreger, da durch die daraufhin eintretende Entzündungsreaktion die Shigellen effizient vernichtet werden.

1.2.2 Diagnose, Behandlung und Prävention

Shigellen lassen sich kurz nach der Infektion schnell und einfach im Stuhl des Patienten nachweisen, wobei sich die Isolierung in späteren Stadien schwieriger gestalten kann.
Die Behandlung erfolgt über Aufrechterhaltung des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes. Die Infektion heilt eigenständig in ein bis zwei Wochen durch Exkretion der Keime via Stuhl und Entzündungsreaktion an der Lamina propria aus, aber bei Kindern sind zusätzlich noch Antibiotika angezeigt.
Gabe von Antibiotika kann grundsätzlich den Krankheitsverlauf verkürzen, wobei Ampicillin, Tetracyclin, Doxycyclin, Trimethoprim-Sulfamethoxal und Chinolone zur Behandlung geeignet sind.
Prävention ist beschränkt auf Händewaschen und allgemein Hygienemaßnahmen, da kein Impfstoff existiert und nur Immunitäten gegen jeweils einen Serotyp nach klinisch induzierten Infektionen aufgebaut werden kann. Mit Erregern infizierte Kleidung oder Gegenstände sollten bei 60 °C gewaschen oder 12 h in Desinfektionsmitteln eingeweicht werden.
Der direkte oder indirekte Nachweis von Shigellen ist nach § 7 Infektionsschutzgesetz (IfSG) meldepflichtig, im Besonderen nach § 6 IfSG für Personen gemäß § 42 IfSG, Personen des öffentlichen Lebens oder Personen, die mit Lebensmitteln in Berührung kommen, und bei der Infektion von zwei oder mehr Personen, bei denen ein epidemiologischer Zusammenhang wahrscheinlich ist oder vermutet wird [6].

1.3 Shiga-Toxin (Stx)

Das Shiga-Toxin (Stx) wird auch als Verotoxin oder Shiga-like Toxine bezeichnet und umfasst einige Varianten, wobei die Bezeichnung „Shiga-Toxin“ der Spezies *Shigella* vorbehalten ist. Die Toxine in *E. coli* werden auf Grund von Aminosäuresequenzunterschieden in zwei Hauptgruppen Stx1 und Stx2 aufgeteilt, wobei weitere Varianten dieser Toxine mit c, d, e oder f erweitert werden [12].
Das vom Serotyp 1 der Spezies *S. dysenteriae* produziert Shiga-Toxin ist nahezu identisch mit dem Shiga-Toxin 1 von enterohämorrhagischen *E. coli*. Das Toxin behindert die Aufnahme von Elektrolyten, Glucose und Aminosäuren durch Blockieren von deren Aufnahmerezeptoren.

Durch Abspaltung einer Adeninbase von der 28S-rRNA der 60S-Ribosomenuntereinheit wird die Proteinbiosynthese behindert, wodurch es zusätzlich zytotoxisch ist. Bei Kleintieren wirkt das Toxin lähmend und verursacht hämolytische uremische Syndrome, die in Nierenversagen enden können. Die Toxizität wurde mit Shiga-Toxin-Mangelmutanten belegt, die zwar ins Zellinnere eindringen aber keinen blutigen Durchfall auslösen.

Das Toxin besteht aus einer 32 kDa schweren A-Untereinheit, die die Abspaltung der Adeninbase verursacht, und fünf identischen 7.7 kDa schweren B-Untereinheiten, die die Bindung des Komplexes an den eukaryotischen Zellrezeptor Gb_3, Glycosphingolipid, und den Eintritt in die Zelle ermöglichen [13]. Die A-Untereinheit kann in zwei Isoformen Stx1 und Stx2 vorliegen, deren Identität 55% beträgt. Die Strukturen von Stx1 [14] und Stx2 [15] wurden von Fraser *et al.* gelöst.

1.4 Epithelzelleninvasion

Die Aufklärung des Mechanismus der Darmepithelinvasion ist Ziel vieler Arbeitsgruppen, wobei die Invasion an Hand von Studien mit *Shigella flexneri* bereits gut erforscht ist [16][17][18].

Die Fähigkeit zur Invasion der Shigellen hängt von einem 220 kB großen Virulenzplasmid mit einem 31 kB großen Bereich ab, der für die 32 wichtigsten Gene wie *ipgC*, *ipaA*, *ipaB*, *ipaC*, *ipaD*, sowie die *mxi*- und *spa*-Gene [19][20] kodiert.

Der Eintritt in die Epithelzellen erfolgt nach Adhäsion von der basolateralen und nicht von der apikalen Seite, die dem Darmlumen zugewandt ist [21]. Folglich muss ein Umweg über die M-Zellen der Peyerschen Plaques erfolgen [23][24].

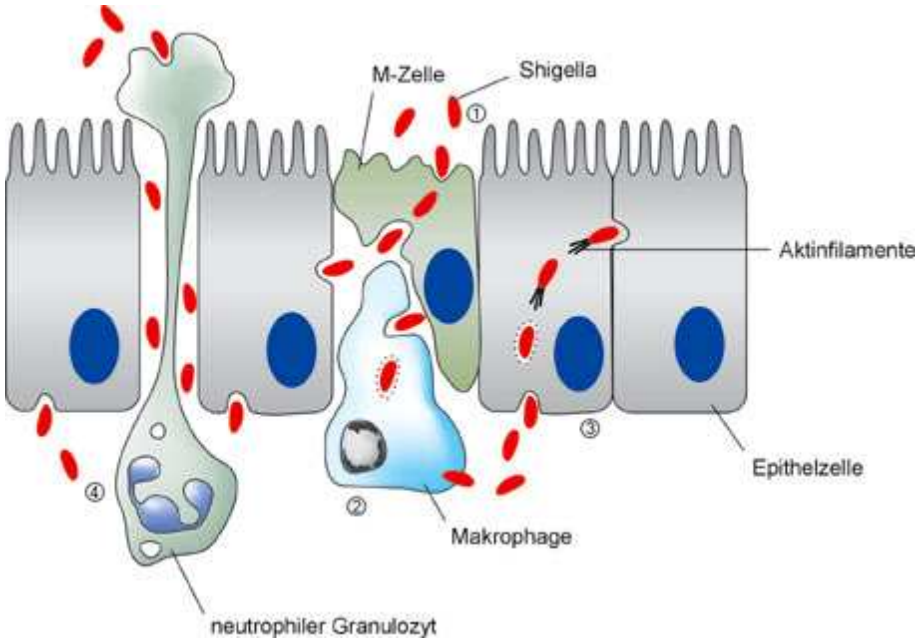

Abbildung 1.1: (1) Invasion über die M-Zellen der Peyerischen Plaques mit direkt anschließender Infizierung des Epithels. (2) Aufnahme durch Makrophagen zur Zerstörung der Shigellen. (3) Infizierung des Epithels nach Freisetzung durch Auslösen der Apoptose der Makrophagen. (4) Nach Einwanderung von Granulozyten und der damit verbundenen Auflösung der Zell-Zell-Verbindungen erfolgt direkte Infektion des Epithels. (Quelle: http://www.mpg.de/bilderBerichteDokumente/dokumentation/jahrbuch/2003/infektionsbiologie/forschungsSchwerpunkt/index.html, 09.09.2006)

1.4.1 Invasion über die M-Zellen

Die M-Zellen sind spezialisierte Darmephitelzellen der Peyerschen Plaques, die das Lymphgewebe bedecken und für die Aufnahme und den Transport von Antigenen und Pathogenen verantwortlich sind [23][24]. Nach Transport der Shigellen in die Lymphfollikel, können sie direkt die Invasion beginnen oder sie werden zunächst durch Makrophagen aufgenommen, welche die Aufgabe haben, den Erreger zu zerstören.

Die Aufnahme durch Makrophagen wird durch Sezernieren des bakteriellen IpaC vorangetrieben. Bei *ipaC*-Mutanten wurde eine 80%ige Reduktion der Aufnahme festgestellt [27]. Nach Phagozytose durch den Makrophagen entkommt der Erreger dem Phagosom durch Auflösen der Membran [28] und gelangt ins Makrophagenzytoplasma. Dort sezerniert das Bakterium IpaB, das das Interleukin-1β converting enzyme (Ice) oder Caspase-1 (Casp-1) aktiviert [29], das die Apoptose des Makrophagen ausgelöst [30][31].

Caspasen sind Cystein-Proteasen und spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose, da diese zur Spaltung von verschiedenen Proteinen fähig sind, unter anderem von DNA-Reparaturenzymen, Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktionsmolekülen und Strukturpoteinen.
Das Ice oder Casp-1 überführt die inaktiven Zytokine IL-1β und IL-18 in die jeweils aktive Form [32][33], wobei IL-1β die heftige Entzündungsreaktion auslöst, die zur starken Gewebeschädigung führt, und die antibakterielle Antwort durch IL-18 induziert wird. Ob die Konzentration an IL-18, welche durch die Zerstörung der Makrophagen freigesetzt wird, ausreicht, oder ob weitere Zellen des Organismus IL-18 produzieren, ist noch unklar. Die Aktivierung der Zytokine geschieht durch Abspaltung einer Domäne, so dass anschließend der 31 kDa schwere inaktive "Precursor" von IL-1β als 17 kDa schwere aktive Form vorliegt. Die Rolle der Zytokine wurde an Hand von IL-1β-Knockout-Mäusen, bei denen die Entzündungsreaktion fehlte, und mit IL-18-Knockout-Mäusen, bei denen die antibakterielle Reaktion ausblieb, bewiesen [34]. Durch die Apoptose werden die Shigellen wieder freigesetzt und können von der basolateralen Seite in das Darmepithel eindringen.

1.4.2 Invasion mit Hilfe der neutrophilen Granulozyten

Auf Grund der Entzündungsreaktion durch IL-1β wandern neutrophile Granulozyten zum Infektionsherd und öffnen die dichten Zell-Zell-Haft-Verbindungen, was es dem Erreger ebenfalls erlaubt auf die basolaterale Seite zu gelangen [24]. Blockierung der Granulozytentransmigration durch Inhibition der Interleukin-1 vermittelten Signaltransduktion führt zu einer verminderten Invasion von Shigellen, was für die Tragweite dieses Weges spricht [35][36].
Neutrophile sind wie die Makrophagen ein Teil des angeborenen Immunsystems und bilden die Frontlinie bei Infektionen mit Mikroorganismen wie Shigellen. Die Vernichtung des Erregers findet nach Phagozytose durch Aktivierung der O_2-Oxidase (Produktion von Sauerstoffradikalen) und iNO-Synthase (Produktion von Stickstoffmonoxid) und antimikrobiellen Peptiden statt. Zusätzlich wird das Protein Neutrophile-Elastase sezerniert, welches eine schnelle Degradierung der Ipa-Proteine und von IcsA (siehe Abschnitt 1.4.5) bewirkt.

1.4.3 Typ III Translokon und Invasion

Durch den physikalischen Kontakt mit Glykoproteinen der Epithelzelle, wie Fibronectin, Laminin oder Kollagen Typ IV [38] wird die Sekretion der Invasine IpaA, IpaB, IpaC und IpaD sowie wenigstens 15 weiterer Proteine durch ein spezifisches ATP-abhängiges Typ III Translokon stimuliert [39][40].

Das Translokon wird aus mindestens zwanzig Genprodukten des *mxi*-*spa*-Operons [41][42][43][44][45] aufgebaut, welche eine 50 nm lange helikale externe Nadel mit einem Außendurchmesser von 7 nm und einem Innendurchmesser von 2 nm bilden [46]. Diese Nadel ist mit der Halsdomäne verbunden, die aus zwei Ringen besteht, welche über ein 10 nm langes und 21 nm breites Stäbchen verbunden sind.

Abgeschlossen wird das Translokon von einer knollenähnlichen Protuberanz, die ins Zytoplasma des Bakteriums reicht und für die Substraterkennung und den Transport der Invasine in die Epithelzelle durch Basis und Nadel verantwortlich ist [47][48].

Die Sekretion erfolgt, indem zuerst die Ipa-Proteine an der Oberfläche angereichert werden und nach Kontakt mit der Wirtszelle ins externe Medium entlassen werden [39], wobei die Wechselwirkung zwischen IpaB und dem wirtseigenen Hyaluronanrezeptor CD44 die Sekretion von IpaA bewirkt [49][50]. Dieser Rezeptor ist nur auf der basolateralen Seite zu finden, was die Polarität der Shigellen erklären könnte. Der zytoplasmatische Anteil ist mit Ezrin-Radixin-Moesin-Proteinen assoziiert, welche als Linker zwischen Zytoskelett und Zellmembran durch Actinbindung dienen [51]. Die Sekretion scheint auch bei Membranbereichen zu funktionieren, die keinen CD44-Rezeptor, aber einen hohen Anteil an Cholesterol oder Shingoliphiden besitzen. IpaB bindet mit hoher Affinität direkt Cholesterol mit einer Stöchiometrie von einem Cholesterolmolekül auf sechs IpaB-Moleküle [52]. Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung der Sekretion wäre die Bindung von IpaB an das basolaterale $\alpha_5\beta_1$-Integrin, welches einen heterodimeren Matrixrezeptor darstellt [53]. Sind keine Sekretionssignale vorhanden, blockieren IpaB und IpaD durch Bildung eines Komplexes das Translokon. Nach Aktivierung der Sekretion wird die ATPase Spa47 benötigt, um sezernierte Proteinen in den Kanal des Typ III Translokon zu befördern [39][54].

Für den Invasionsprozess sind Hauptverantwortliche die Invasine IpaB und IpaC, die nach Komplexbildung eine 25 Å große Pore in der Wirtsmembran bilden [47][55], durch die weitere bakterielle Proteine in das Cytosol der Wirtszelle gelangen. Im bakteriellen Zytoplasma wird die Assoziation und der Abbau der beiden Proteine durch das Chaperon IpgC verhindert [56][57].

IpaD ist auf noch ungeklärte Weise für die Insertion der IpaB/IpaC-Pore in der Wirtsmembran verantwortlich [58]. Die Wirkung des IpaB/IpaC-Komplexes wurde mit Hilfe von bakteriengroßen Latexpartikeln gezeigt, die mit diesem Komplex assoziiert waren und daraufhin in-vitro von HeLa-Zellen aufgenommen wurden [55]. Die Aufnahme der Latexpartikel erfolgte mit einer erregerspezifischen Neuordnung des zellulären Zytoskeletts über einen phagozytoseähnlichen Mechanismus [59].

Die Invasion des Bakteriums erfolgt durch IpaC, das die Polymerisation von Actin auslöst, indem zytoskelettale Proteine der Wirtszelle rekrutiert werden [55][60]. Die Rolle von Actin konnte über die Inhibition der Actinpolymerase mit Zytochalasin B bewiesen werden, welches die Aufnahme des Bakteriums verhindert [61]. IpgD, welches noch vor dem Eintritt des Bakteriums in die Wirtszelle entlassen wird, dephosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Phosphatidylinositol-5-monophosphat. Dadurch wird in der Wirtszelle eine Signaltransduktionskette ausgelöst, die deren Vitalität steigert und Apoptose verhindert [62]. Durch die Polymerisation des Actins entsteht eine blütenförmige Struktur, die am Ende das ganze Bakterium umgibt. An der Eintrittsstelle sind für die Aufnahme des Erregers actinbindende Wirtsproteine wichtig, die eine parallele Bündelung durch Quervernetzung fördern, um mögliches Zurückdrängen zu vermeiden [63] [64] [65]. Das Invasin IpaA gelangt sehr schnell in die Wirtszelle, überführt das wirtseigene Protein Vinculin in seine aktive Form und rekrutiert α-Actinin zur Quervernetzung. Der Vinculin-IpaA-Komplex fördert die Depolymerisation von Actin, um ein mögliches Abstoßen des Bakteriums zu verhindern [66].

Die phagosomale Vakuole wird nun in einem makropinozytotischen Prozess in die Wirtszelle eingebracht [63] und dann innerhalb von 15 min lysiert, was durch IpaB [67][68] und IpaC [69] via Porenbildung [58] unter Hilfe von IpaD [70] geschieht. Danach kann sich der Erreger frei im Zytoplasma der Zelle fortbewegen [71].

1.4.4 Ausbreitung und Übertritt in weitere Epithelzellen

Da Shigellen unbegeißelte Bakterien sind, erfolgt auch die Fortbewegung in der Wirtszelle via Polymerisation von Actin und der Bündelung mit wirtseigenem Fibrin. Der Erreger entfernt sich vom Invasionspunkt mit einer Geschwindigkeit von 10-15 µm/min, um in benachbarte Zellen einzudringen [72]. Für die Polymerisation von Actin innerhalb der Zelle und somit für die intra- und interzelluläre Ausbreitung ist das Protein IcsA verantwortlich. *icsA*-Mutanten können zwar

in-vitro in Epithelzellen eindringen, sind aber nicht mehr in der Lage, sich im Epithel auszubreiten [73]. Ist der Erreger an der Zellmembran angelangt, erfolgt ein hochorganisierter Zell-Zell-Kontakt von der infizierten zur Nachbarzelle. Dieser Zell-Zell-Kontakt beruht auf einer schlauchförmige Vorstülpung, die weit in die Nachbarzelle hineinragt, wodurch das Bakterium vollständig aufgenommen werden kann und kurzzeitig von zwei Membran umgeben ist [74]. Die resultierende Membrandoppelschicht der Wirtszelle wird schließlich aufgelöst.

1.5 Pathogenitätsfaktoren

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, eine Reihe der Pathogenitätsfaktoren rekombinant in *E. coli* zu produzieren. Diese sollen im Folgenden vorgestellt werden.

1.5.1 Chaperon IpgA

IpgA ist ein Chaperon aus 129 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 15.1 kDa, welches im bakteriellen Zytosol vorliegt und der Stabilisierung und Sekretion des Effektorproteins IcsB dient [76].

1.5.2 Effektor IcsB

IcsB besteht aus 494 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 56.4 kDa, welches durch das Typ III-Translokationssystem sezerniert wird und in spätere Schritte der Invasion involviert ist. Die Interaktion mit dem Chaperon IpgA erfolgt im Bereich von Aminosäuren 171 bis 247 [76][77].

1.5.3 Effektor IpgB oder IpgB1

IpgB1 besteht aus 208 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 23.7 kDa. Im bakteriellen Zytoplasma liegt es mit dem Chaperon Spa15 assoziiert vor, welches für die Stabilität von IpgB1 notwendig ist [78][79]. Nach Kontakt mit der Wirtszelle wird IpgB1 über das Typ III-Translokationssystem in die Wirtszelle sezerniert [40], wo es im Bereich der Zytoplasmamembran und innerhalb der Membranausstülpungen akkumuliert. In der eukaryotischen Zelle scheint IpgB1 für die Aktivierung der Kinasen Rac und Cdc42 verantwortlich zu sein. Diese Kinasen sind für die Bildung von Lamellipodien und Filopodien verantwortlich, die beim Eintrittsprozess der Invasion wichtig sind [80].

1.5.4 Effektor TrcA oder IpgB2

IpgB2 ist ein 21.5 kDa Protein aus 188 Aminosäuren, das wie IpgB1 zu einer Familie von Effektorproteinen gehört, deren Mitglieder die GTP-aktive Form von GTPasen der Rho-Familie imitieren. Diese Effektorproteine binden weder ein Guanin-Nukleotid noch zeigen sie Sequenzhomologie zu den konservierten GTPase-Domänen. Essentiell für ihre Funktion ist in jedem Fall ein invariantes WxxxE-Motiv. IpgB2 wird durch das Typ III-Translokationssystem sezerniert und interagiert mit einer Reihe von eukaryotischen Kinasen, wie Citron-Kinase (CRIK), ROCKI, ROCKII und mDia1. ROCKI und ROCKII sind für die Stressfaserbildung erforderlich. IpgB2 interagiert mit den Rho-Bindungsdomänen dieser Proteine und stimuliert in der Wirtszelle den Aufbau von Stressfasern. Dieser Vorgang wird sonst durch GTP-aktiviertes RhoA ausgelöst [81].

1.5.5 Chaperon IpgC

IpgC besteht aus 155 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 17.8 kDa und dient im bakteriellen Zytoplasma als Chaperon für die Invasine IpaB und IpaC, um dort deren Assoziation und Abbau zu verhindern [56][57].

Nach Sezernierung der Invasine IpaB und IpaC über das Typ III-Translokationssystem fungiert IpgC als Coaktivator des Transkriptionsfaktors MxiE. Dieser Transkriptionsfaktor ist für die Expression der späten oder intrazellulären Pathogenitätsgene wie *virA* sowie der *osp*- und *ipaH*-Gene erforderlich [82]. Vermutlich bindet IpgC an den *N*-terminalen Teil von MxiE, wodurch eine Konformationsänderung von MxiE stattfindet, was das Binden an die entsprechenden Promotorregionen oder die Aktivierung der Transkription durch die RNA-Polymerase erlaubt.

1.5.6 Invasin IpaB

IpaB ist ein 580 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von 62.2 kDa, welches im bakteriellen Zytoplasma mit dem Chaperon IpgC assoziiert ist [56][57]. IpaB ermöglicht dem Erreger nach Lyse der phagosomalen Vakuole der Makrophagen [67][68] durch Aktivierung des Interleukin-1β converting enzyme (Ice) oder der Caspase-1 (Casp-1), welche die Apoptose des Makrophagen auslöst, wieder ins Zytoplasma freigesetzt zu werden [29][30] **[31**].

Ist das Typ III-Translokationssystem inaktiv, bildet IpaB mit IpaD innerhalb des Translokons einen Komplex, der die Sekretion anderer Effektoren blockiert [39]. Bei aktivem Typ III-Translokationssystem wird IpaB sezerniert und bildet mit dem ebenfalls sezernierten IpaC einen stabilen Komplex, der sich in Form einer 25 Å weiten Pore in die Wirtszellmembran einlagert [58]. Für die Interaktion von IpaB mit IpaC sind die Aminosäurereste 367 bis 458 von IpaB wichtig [83]. Durch diese Pore kann dann unter Anderem IpaA in die Wirtszelle gelangen [47] [49][50]. Durch die Sekretion weiterer Effektoren beginnt die Aufnahme des Bakteriums in die Wirtszelle [55]. IpaB und IpaC scheinen auch für die Lyse der Doppelmembran beim Übertritt von einer Epithelzelle zur nächsten verantwortlich zu sein [57].

1.5.7 Invasin IpaC

IpaC ist ein 363 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von 41.0 kDa, welches im bakteriellen Zytoplasma mit IpgC assoziiert vorliegt [56][57]. Nach Sekretion durch das Typ III-Translokationssystem spielt IpaC die Hauptrolle bei der Aufnahme durch die Makrophagen, wobei die Aminosäuren 117 bis 169 für die Interaktion mit der Makrophagenmembran wichtig sind [27]. Nach der Aufnahme ist IpaC an der Lyse der phagosomalen Vakuole der Makrophagen beteiligt [29][69]. Außerdem ist IpaC für die Aufnahme des Erregers in die Epithelzellen verantwortlich [70][84], indem es im Komplex mit IpaB eine 25 Å weite Pore bildet, welche sich in die Wirtszellmembran eingelagert [58]. Durch diese Pore gelangen weitere Effektoren in die Wirtszelle[55]. Außerdem soll IpaC das wirtseigene Protein Cdc42 aktivieren, was die Bildung von Filopodien induziert [88].
IpaC besteht vermutlich aus drei Domänen, von denen die *N*-termiale (Aminosäure 1 bis 116) wohl für die Interaktion mit IpaB verantwortlich ist. Die mittlere Domäne, welche die Aminosäuren 117 bis 191 umfasst und aus zwei α-Helices sowie einem Loop besteht, ist für die Einlagerung in die Wirtszytoplasma-Membran wichtig [27][86]. Die restlichen, *C*-terminalen Aminosäuren bilden die dritte Domäne, welche für die Induzierung der Actin-Polymerisation benötigt wird [60].

1.5.8 Invasin IpaD

IpaD besteht aus 332 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 36.6 kDa. Solange das Typ III-Translokon inaktiv ist, bildet es einen Komplex mit IpaB, der die Sekretion von anderen Effektoren durch das Translokon blockiert [39]. Außerdem soll die Effizienz der Insertion des Komplexes aus IpaB und IpaC in die Wirtszellmembran von IpaD abhängen [58].

1.5.9 Transkriptionsaktivator MxiE

MxiE besteht aus 251 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 29.3 kDa. Im bakteriellen Zytoplasma ist es zunächst mit OspD1 assoziiert, welches wiederum einen Komplex mit Spa15 bildet [90]. Während der Expression des *mxiE*-Gens muss ein Frameshift in einer (auf DNA-Ebene) sehr T-reichen Region erfolgen, indem ein zusätzliches U-Nukleotid in die resultierende mRNA eingefügt wird. Es wurde gezeigt, dass bei Shigellen, die in Vollmedium wachsen, die korrekte *mxiE*-Expression mit einer Effizienz von 30% stattfindet [91].
MxiE gehört zu den Transkriptionsaktivatoren der AraC-Familie und ist für die Expression der „späten Gene“ wie des *virA*-Gens, verschiedener *osp*-Gene und der *ipaH*-Gene verantwortlich. Dazu müssen die Invasine IpaB und IpaC über das Typ III-Translokon sezerniert werden, um IpgC freizusetzen. Nach der Sekretion des Antiaktivators OspD1 wird MxiE freigesetzt, welches nun mit IpgC assoziiert. Dadurch kommt es bei MxiE zu einer Konformationsänderung, die wiederum das Binden von MxiE an die entsprechenden Promoterregionen oder die Aktivierung der Transkription durch die RNA-Polymerase ermöglicht. MxiE bindet über ein 17 Basenpaare langes Motiv, welches als MxiE-Box bezeichnet wird und mit der „-35“-Region überlappt, an die Promoterregionen der jeweiligen Gene [92]. Die Bildung des Komplexes aus IpgC und MxiE ist für die Funktion von MxiE essentiell [82].

1.5.10 Antiaktivator OspD1

OspD1 ist ein 225 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von 24.8 kDa, das als Antiaktivator des Transkriptionsregulators MxiE dient. Es bindet im bakteriellen Zytoplasma und inaktiven Zustand des Typ III-Translokons mit Spa15 assoziiert an MxiE, wodurch die Bindung von MxiE an DNA-Abschnitte verhindert wird. Erst durch die Sekretion von OspD1 wird MxiE freigesetzt, woraufhin MxiE mit IpgC assoziieren kann, welches zuvor durch Sekretion von IpaB und IpaC freigesetzt wurde [82][90].

1.5.11 Chaperon Spa15

Spa15 besteht aus 133 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 15.1 kDa und dient als Chaperon von IpaA, IpgB1, OspC3, OspD1 und wahrscheinlich OspB. Spa15 bildet ein funktionelles Dimer, das für die Stabilität von IpgB1 aber nicht von IpaA wichtig ist. Dennoch muss im Zytoplasma gespeichertes IpaA mit Spa15 assoziiert sein, da sonst IpaA pämature lösliche Komplexe bildet, die die eigene Sekretion verhindern. Wenn das Typ III Translokon aktiv ist, benötigt IpaA kein Spa15, da es zu den ersten Pathogenitätsfaktoren gehört, die in die Wirtszelle entlassen werden. Die Interaktionsstelle von IpaA mit Spa15 befindet sich in der Region zwischen den Aminosäureresten 263 und 365 [79]. Die Kristallstruktur von Spa15 wurde von van Eerde *et al.* gelöst [89].

1.5.12 Effektor IpaA und das Wirtsprotein Vinculin

IpaA ist ein 633 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von 70.1 kDa, das über den IpaB/IpaC-Kanal sehr schnell in die Wirtszelle überführt wird, um dort das wirtseigene Protein Vinculin durch Entfalten in seine aktive Form zu überführen und α-Actinin zur Quervernetzung zu rekrutieren. Der Vinculin-IpaA-Komplex fördert die Depolymerisation von Actin, was ein Abstoßen des Bakteriums von der Wirtszelle während des Eintrittsprozesses verhindert. Während für das Binden an IpaA nur eine Subdomäne von Vinculin zwischen den Aminosäuren 1 und 265 benötigt wird, ist für seine vollständige Funktion das Volllängenprotein erforderlich. Das Abstoßen wird durch Rekrutierung von α-Actinin verhindert, das mit dem Vinculin-IpaA-Komplex aus den Mikrospikes durch Quervernetzung und Abtrennung von störenden Actinfilamenten an der Öffnung kleine Blättchen formt. Außerdem wird diskutiert, dass durch die Aktivierung von Vinculin lokale Adhäsionskomponenten rekrutiert werden, welche zur verstärkten Anheftung des Erregers an die Wirtszelle führen. Die Rekrutierung von zytoskelettalen Proteinen wirkt sich auf Signalmoleküle wie Tyrosin-Kinasen aus, die wiederum eine Herabregulierung der Actinpolymerisationen nach sich ziehen. IpaA wird vor der Aktivierung des Typ III Translokons im Zytoplasma durch Assoziation mit Spa15 gespeichert. Nicht mit Spa15 assoziiertes IpaA behindert nach Aktivierung des Typ III-Translokons die eigene Sekretion [66].

1.5.13 Chaperon IpgE

IpgE besteht aus 120 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 13.7 kDa. In der Bakterienzelle dient es als Chaperon zur Stabilisierung von IpgD [43][78]. Außerdem wurde eine Interaktion mit Spa-orf11 festgestellt, dessen Funktion noch unbekannt ist [88].

1.5.14 Effektor IpgD

IpgD besteht aus 538 Aminosäuren mit einer Masse von 59.8 kDa und ist im bakteriellen Zytoplasma mit dem Chaperon IpgE assoziiert [43][78]. IpgD wird durch das Typ III-Translokon sezerniert und löst in der Wirtszelle eine Signaltransduktionskette aus, die letztendlich deren Vitalität steigert und Apoptose verhindert [62]. Bei dem Protein handelt es sich um eine Phosphatidylinositol-Phosphatase, die spezifisch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Phosphatidylinositol-5-monophosphat degradiert. Außerdem scheint IpgD an der Ausbildung der Eintrittsstruktur durch Aktivierung der wirtseigenen Proteine Cdc42 und Rac beteiligt zu sein, welche die zytoskelletale Umgestaltung der Wirtszelle im Bereich der Eintrittsstruktur durch Bereitstellung von Actin-Monomeren zur Polymerisation erhöhen [87].

1.5.15 Spa-orf11

Spa-orf11, dessen Funktion noch ungeklärt ist, besteht aus 89 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 10.4 kDa. Es wurde berichtet, dass es einen Interaktionspartner von IpgE darstellt [88].

1.5.16 Effektor IpgF

IpgF ist eine Transglycosylase aus 152 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 17.6 kDa. Womöglich schneidet IpgF vom bakteriellen Zytoplasma aus kleine Löcher in die Zellmembran des Erregers, um dann das Typ III-Translokationssystem darin zu insertieren [93].

1.5.17 Effektor IpgH

IpgH ist ein 333 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 36.5 kDa, welches eine signifikante Homologie zu GlpT aus *E. coli* und 333UhpT aus *S. typhimurium* aufweist. Beide Proteine sind an der Aufnahme von Zuckerphosphaten beteiligt [94].

2 Materialien und Methoden für die Molekularbiologie

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die in Tabelle 2.1 aufgelistet Chemikalien wurden für die Herstellung von Medien, Lösungen oder Puffern verwendet.

Tabelle 2.1: Standardchemikalien in alphabetischer Reihenfolge

Name	**Hersteller**
1,4-Dithiothreitol (DTT)	ROTH
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0.8%)	ROTH
Agar-Agar	ROTH
Agarose	Fluka
Alexa 647	Invitrogen
Amidoschwarz 10B	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	ROTH
Ampicillin	ROTH
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (BisTris)	ROTH
Bovine Serum Albumin (BSA)	ROTH
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Merck
Chlorampenicol	ROTH
Coomassie Brilliant Blue R250	ROTH
Coomassie Brilliant Blue G250	ROTH
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Essigsäure 100%	ROTH
Ethanol 96%	Riedel-deHaën
Ethyldiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Glasperlen 2.85-3.3 mm	ROTH

Name	Firma
Glycerol 100%	Merck
Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare
Hefeextrakt	ROTH
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	ROTH
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	ROTH
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kit for Molecular Weights 12-200kD for GFC	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid	Merck
Mangandichlorid	Merck
Methanol	Fischer Scientific
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	ROTH
3-Morpholin-propanylsulfonsäure (MOPS)	Merck
Natriumacetat Trihydrat	Fluka
Natriumchlorid	ROTH
Natriumdodecylsulfat	SERVA
Natriumhydroxid	ROTH
N-Lauryl-Sarcosinat, Natriumsalz	Sigma
Nickelsulfat	Merck
Pepton aus Casein	ROTH
Phosphorsäure 85%	Riedel-deHaën
Rotiphorese Gel 30	ROTH
Salzsäure 37%	Riedel-deHaën
Sypro Orange 5000x	Invitrogen
Sybr Safe 10.000x	Invitrogen
Thrombin	CSL Behring
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	ROTH
Triton X-100	Sigma Aldrich

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2.2 sind die benutzten Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 2.2: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Name	**Hersteller**
HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade	Amercham Biosciences
HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade	Amercham Biosciences
PD10 Säule	GE Healthcare
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare
Pharmacia LKB Pump P-1	Pharmacia
HisTrap™ FF 5 mL	GE Healthcare
GSTTrap™ FF 5 mL	GE Healthcare
XK16/20 Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow 15 mL	Pharmacia Biotech
XK16/40 Sephadex G-25 60 mL	Pharmacia Biotech
HiTrap™ DEAE FF 5 mL	GE Healthcare
HiTrap™ Benzamidin FF 1 mL	GE Healthcare
PCR Mini Cycler	MJ Research
Eppendorfpipetten	Eppendorf
Vortexer REAX-1	Heidolph
Tischzentrifuge	ROTH
Stromquelle EC250-90	E-C Apparatus Corporation
Thermomixer comfort 2mL	Eppendorf
Agarose-Gelkammer OWL EASYCAST B1A	Thermo SCIENTIFIC
SDS-Gelkammer Mini PROTEAN Tetra System	BIO RAD
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Blockthermostat TCR100	ROTH
Rotilab Sterilfilter CME 0,22 µm	ROTH
Schüttelinkubator Innova 4200	New Brunswick Scientific
Schüttelinkubator Innova 4300	New Brunswick Scientific
UV-VIS-Messgerät SmartSpec™ 3000	BIO RAD
Sterilbank KS15	Thermo SCIENTIFIC

Name	**Hersteller**
Waage Typ 572/45	Kern
Begasungsbrutschrank	Heraeus
Ultraschallerzeuger Sonifier 250	Branson
Vakuumpumpe DNA Mini	Jouan Nordic
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter
Autoklave FVA/2 T-Line	Federgari Autoclavi Spa
Feinwaage Typ 404/13	Sauter
Feinwaage CP2P	Satorius
Zentrifuge Multifuge 3	Heraus
Mikrowelle 22023/01	Siemens
pH-Meter FiveEASY™ FE20	Mettler Toledo
Magnetheizrührer IKA RH basic 2	IKA
Fluoreszenzplatte Safe Imager™	Invitrogen
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph
Transilluminator mit Kamera	biostep
ÄKTA UPC-900, P-920, Frac-900	Amercham pharmacia biotech
Monolith NT.015	NanoTemper Technologies
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Kapillaren	NanoTemper Technologies
Reaktionsgefäße 1.5 mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße 2.0 mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße 0.5 mL	ROTH
Konzentratoren Vivaspin 20 MWCO 10.000	Satorius stedim biotech
Konzentratoren Vivaspin 20 MWCO 30.000	Satorius stedim biotech
Filter Express™ Plus 0.22 µm	Millipore
Pipettenspitzen	Biozym
Greiner-Röhrchen 15 mL	Greiner
Greiner-Röhrchen 50 mL	Greiner
Messzylinder	Schott
UV-Küvette	Eppendorf
Real-Time-PCR iQ 5	BIO RAD

Name	Hersteller
Einmal-Küvette	ROTH
Mikroskope SZ-PT	Olympus
Schott-Flaschen	Schott
Erlenmeyerkolben verschiedene Größen	Schott
Adhäsionsfolie	BIO RAD
96-Well Platten	BIO RAD
24-Well Sitting-Drop Platten	Hampton Research

2.1.3 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

Die Lösungen, Puffer oder Kulturmedien wurden je nach Masse mit der Feinwaage Type 404/13 (Sauter) oder der Waage Typ 572/45 (Kern) eingewogen und mit bidest. Wasser aufgefüllt. Zum Lösen wurde der Magnetheizrührer IKA RH basic 2 (IKA) benutzt, wobei die Einstellung des pH-Wertes, falls erforderlich, mit Hilfe des pH-Meters FiveEASY^{TM} FE20 (Mettler Toledo) erfolgte. Zur Sterilisierung wurden der Autoklav FVA/2 T-Line (Fedegari Autoclavi Spa) oder Rotilab Sterilfilter CME 0,22 µm (ROTH) benutzt. Die hergestellten Lösungen oder Puffer wurden in Greiner-Röhrchen (Greiner) oder Schott-Flaschen (Schott) gelagert und sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Kulturmedien (siehe Tabelle 2.4) wurden in Erlenmeyerkolben (Schott) gelagert und verwendet.

Tabelle 2.3: Lösungen und Puffer in alphabetischer Reihenfolge

Name	Zusammensetzung
APS-Lösung	10% (w/v) Ammoniumpersulfat ad 10 mL bidest. H_2O
Ampicillin-Lösung	1 g Ampicillin ad 10 mL bidest. H_20 steril filtrieren
Amidoschwarz-Puffer A	0.01% Amidoschwarz 10B 90% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure

Name	Zusammensetzung
Amidoschwarz-Puffer B	90% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Amidoschwarz-Puffer C	0.1 M NaOH
BisTris-Puffer	20 mM BisTris einstellen mit NaOH auf pH 6.0
BisTris-Elutionspuffer	20 mM BisTris 1 M NaCl einstellen mit NaOH auf pH 6.0
5xBradford-Lösung	50 mg Coomasie Blau G250 25 mL Methanol 50 mL Phosphorsäure 85% ad 100 mL bidest. H_2O
Chlorampenicol-Lösung	0.5 g Chlorampenicol ad 10 mL bidest. H_20 steril filtrieren
Coomasie-Blue Entfärberlösung	10% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Methanol ad 1000 mL bidest. H_2O
Coomasie-Blue Färbelösung	10% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Methanol 1 g Coomasie Brilliant Blau R250 ad 1000 mL bidest. H_2O
EDTA-Puffer	10 mM EDTA
GSH-Elutionspuffer	50 mM Tris 10 mM Glutathion einstellen mit HCl auf pH 8.0
GSH+S-Elutionspuffer	50 mM Tris 500 mM NaCl 10 mM Glutathion einstellen mit HCl auf pH 8.0
Guanidinumchlorid-Lösung	6 M Guanidinium-HCl
IPTG-Lösung	1 M IPTG steril filtrieren
Laemmli-Puffer	0.25 M Tris 2 M Glycin 1% (w/v) SDS pH 8.3
Labeling-Puffer	50 mM HEPES 150 mM NaCl einstellen mit NaOH auf pH 8.0

Name	**Zusammensetzung**
Ni-Binde-Puffer	20 mM Na_2HPO_4 500 mM NaCl pH 7.8
Ni-Elutions-Puffer	20 mM Na_2HPO_4 500 mM NaCl 500 mM Imidazol pH 7.8
Ni^{2+}-Puffer	100 mM $NiSO_4$
PBS-Puffer	140 mM NaCl 10 mM Na_2HPO_4 2.8 mM KCl 1.7 mM KH_2PO_4 3 mM DTT pH 7.3
PBS+S-Puffer	500 mM NaCl 10 mM Na_2HPO_4 2.8 mM KCl 1.7 mM KH_2PO_4 3 mM DTT pH 7.3
Sammelgel-Puffer	1 M Tris einstellen mit HCl auf pH 6.8
10% SDS-Lösung	10% (w/v) SDS ad 50 mL bidest. H_20
4xSDS-Proben-Puffer	250 mM Tris 8% (w/v) SDS 40% (v/v) Glycerol 0.04% (w/v) Bromphenolblau 200 mM DTT einstellen mit HCl auf pH 6.8
SEC6.0-Puffer	10 mM MES 150 mM NaCl 3 mM DTT einstellen mit NaOH auf pH 6.0
SEC7.5-Puffer	10 mM HEPES 150 mM NaCl 3 mM DTT einstellen mit NaOH auf pH 7.5
SEC7.5+S-Puffer	10 mM HEPES 500 mM NaCl 3 mM DTT einstellen mit NaOH auf pH 7.5

Name	Zusammensetzung
TfbI-Lösung	2.9% (w/v) Essigsäure 50 mM $MnCl_2$ 100 mM KCl 10 mM $CaCl_2$ 15% (v/v) Glycerin einstellen mit NaOH auf pH 5.8
TfbII-Lösung	10 mM KCl 10 mM NaMOPS 75 mM $CaCl_2$ 15% (v/v) Glycerin einstellen mit HCl auf pH 7.0
Thermophorese-Puffer	50 mM HEPES 150 mM NaCl 0.0001% Triton X-100 einstellen mit NaOH auf pH 7.5
Trenngel-Puffer	1 M Tris einstellen mit HCl auf pH 8.8

Tabelle 2.4: Medien in alphabetischer Reihenfolge

Name	Zusammensetzung
LB-Medium	1% (w/v) Pepton aus Casein 1% (w/v) NaCl 0.5% (w/v) Hefe ad 1000 mL bidest. H_20 pH 7.0, autoklavieren
LB-Agar	1% (w/v) Pepton aus Casein 1% (w/v) NaCl 0.5% (w/v) Hefe 1.5% (w/v) Agar-Agar ad 1000 mL bidest. H_20 pH 7.0, autoklaieren

2.1.4 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme für DNA-Arbeiten sind in Tabelle 2.5 aufgelistet, die Zusammensetzung der Reaktionspuffer findet sich in Tabelle 2.6.

Tabelle 2.5: Enzyme mit Konzentration

Name	Konzentration	Hersteller
*Bam*HI	10 U/µL	Fermentas
*Dpn*I	10 U/µL	Fermentas
*Nde*I	10 U/µL	Fermentas
*Not*I	10 U/µL	Fermentas
*Hin*dIII	10 U/µL	Fermentas
T4-Ligase	5 U/µL	Fermentas
*Xho*I	10 U/µL	Fermentas
*Eco*RI	10 U/µL	Fermentas
Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	2 U/µL	BioCat

Tabelle 2.6: Zusammensetzung der Enzymreaktionspuffer

Name	Hersteller	Bestandteile
10xPuffer O	Fermentas	0.5 mM Tris-HCl pH 7.5 0.1 mM $MgCl_2$ 1 M NaCl 1 g/mL BSA
5xHiFi	BioCat	10 mM Mg^{2+}
10xPuffer T4-Ligase	Fermentas	400 mM Tris-HCl (pH 7.8 bei 25 °C) 100 mM $MgCl_2$ 100 mM DTT 5 mM ATP
10xPuffer R	Fermentas	0.1 mM Tris-HCl pH 8.5 0.1 mM $MgCl_2$ 1 M KCl 1 g/mL BSA
dNTP Mix	Fermentas	25 mM ATP, GTP, TTP, CTP eingestellt mit NaOH auf pH 7.0

2.1.5 Molekulargewichtstandards und Probenpuffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Molekulargewichtsstandards für Agarosegele und SDS-Page sind in Tabelle 2.7 aufgelistet. Die Zusammensetzung des für die Agarosegelelektrophorese verwendeten Probenpuffers ist Tabelle 2.8 und der Probenpuffer für die SDS-Page ist Tabelle 2.3 zu entnehmen.

Tabelle 2.7: Molekulargewichtstandard mit Molekulargewichtsaufteilung und Hersteller

Name	Molekulargewichtsaufteilung	Hersteller
FastRuler DNA Ladder Middle Range	5000 B, 2000 B, 850 B, 400 B, 100 B,	Fermentas
FastRuler DNA Ladder High Range	10000 B, 4000 B, 2000 B, 1000 B, 500 B	Fermentas
PageRuler^{TM} Prestained	170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa	Fermentas

Tabelle 2.8: Zusammensetzung der Probenpuffer

Name	Bestandteile	Hersteller
6xFastRuler Loading Dye	10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 0.03% (v/v) Bromophenolblue 0.03% (v/v) Xylenecyanol FF 60% (v/v) Glycerol 60 mM EDTA	Fermentas

Für die Kalibrierung der Größenausschlusschromatographiesäule wurde ein Molekulargewichtsstandard verwendet, dessen Proteinzusammensetzung Tabelle 2.9 zu entnehmen ist.

Tabelle 2.9: Molekulargewichtstandard für die Kalibrierung der Größenausschlusschromatographie

Name	Molekulargewichtsaufteilung	Hersteller
Kit for Molecular Weights 12-200kD for GFC	2000 kDa (Dextran Blue), 200 kDa (β-Amylase), 150 kDa (Alcohol Dehydrogenase), 66 kDa (Albumin), 29 kDa (Carbonic Anhydrase), 12.4 kDa (Cytochrome C)	Sigma Aldrich

2.1.6 Kits und Screens

Tabelle 2.10 enthält die kommerziell erhältlichen Kits, die bei DNA-Arbeiten eingesetzt wurden.

Tabelle 2.10: DNA-Kits und Hersteller

Name	Hersteller
Plasmid Miniprep Kit I	peQ-Lab
Gel Extractions Kit	peQ-Lab

In Tabelle 2.11 sind die Screens und Kits für Kristallisationsversuche aufgeführt.

Tabelle 2.11: Kristallisationsscreens

Name	Hersteller
Additive Screen 1	Hampton Research
Additive Screen 2	Hampton Research
Additive Screen 3	Hampton Research
Wizard I & Wizard II	Emerald Biosciences
Crystal Screen	Hampton Research
PEG6000	Hampton Research
Ammoniumsulfat	Hampton Research

2.1.7 Primer

Für Amplifikationen, Mutationen oder Sequenzierungen wurden die in Tabelle 2.12 und Tabelle 2.13 aufgelisteten DNA-Primer eingesetzt. Die Synthese sämtlicher Oligonukleotide erfolgte durch die Firma MWG-Biotech (Martinsried).

Tabelle 2.12: Namen, Sequenzen und Annealing Temperaturen (T) der eingesetzten Primer für die Amplifikation der entsprechenden Gene vom Invasionsplasmid pWR501. In Großbuchstaben: Sequenzen der Pathogenitätsfaktorgene; in Kleinbuchstaben: Restriktionsendonuklease-Schnittstellen und Überhänge.

Name	**Sequenz 5' -> 3'**	**T**
icsB_f	ggccatATGAGCCTCAAAATTAGCAATTTCATTG	55 °C
icsB_b	ggcctcgagCTATATATTAGAATGAGAGTTATTCAATAAAAGCTTATTGA	55 °C
ipgA_f	ggcggatccATGTGTCGCAAACTATATGATAAACTTTAT	55 °C
ipgA_b	ggcgcggccgcTTAGTTCACTTCTGAAGTGATGTTTG	55 °C
ipgB_f	gcccatATGCAAATTCTAAACAAAATACTTCCACAG	55 °C
ipgB_b	ggcctcgagTTAATTTGTATTGCTTTGACGGTATACAG	55 °C
trcA_f	ggccatATGATTATAATGCTTGGAACATCTTTTAATAATTTTG	55 °C
trcA_b	ggcctcgagTCAGAAAGGCGATTCTAAATTTGTAATATAG	55 °C
ipgC_f	ggcggatccATGTCTTTAAATATCACCGAAAATGAAAGC	55 °C
ipgC_b	ggcgcggccgcTTACTCCTTGATATCCTGAATTGCG	55 °C
ipgD_f	ggcggatccATGCACATAACTAATTTGGGATTGC	55 °C
ipgD_b	ggcgcggccgcTTATACAAATGACGAATACCCTTTCACC	55 °C
ipgE_f	ggccatATGGAAGATTTAGCAGATGTTATTTGC	55 °C
ipgE_b	ggcctcgagTTAATACCCCTTCATTCTTCGCG	55 °C
ipgF_f	ggccatATGTCCCGTTTCGTATTTATTTTGC	55 °C
ipgF_b	ggctacgagTTATATCCTTCGATTATTCTGCTTGC	55 °C
ipgH_f	ggccatatgATGCCACTGCTGGATAAGC	59 °C
ipgH_b	ggcctcgagTCAGTACGATAAATGTGGCCC	59 °C
ipaA_f	ggccatATGCATAATGTAAATAATACTCAAGCGC	55 °C
ipaA_b	ggcctcgagTTAATCCTTATTGATATTCTTTAATACTTTTGATAGGGAAG	55 °C
ipaB_f	ggccatATGCATAATGTAAGCACCACAA	55 °C
ipaB_b	ggcctcgagTCAAGCAGTAGTTTGTTGCAAAATTG	55 °C

Name	Sequenz 5’ -> 3’	T
ipaC_f	ggcttaacatATGTTGCAAAAGCAATTTTGC	55 °C
ipaC_b	ggcctcgagTTAAGCTCGAATGTTACCAGC	55 °C
ipaD_f	ggcggatccATGAATATAACAACTCTGACTAATAGTATTTC	55 °C
ipaD_b	atagtttagcggccgcTCAGAAATGGAGAAAAAGTTTATCTGTATC	55 °C
spa15_f	ggcggatccATGAGTAACATTAATTTAGTTCAATTAGTTAGAGATAG	55 °C
spa15_b	ggcgcggccgcTTATAAGACCCCATTTAAGATTTCCATCC	55 °C
spa-orf11_f	ggcggatccATGATAAGACAGCAAAAACGACTG	55 °C
spa-orf11_b	ggcgcggccgcCTAATCATTTGGTATCTTTCGTGCTATT	55 °C
ospD1_f	ggccatATGTCAATAAATAACTATGGATTACATCCA	55 °C
ospD1_b	ggcctcgagTTAAAACAACTCTTGTATTTTGTCAGAAATAATATTAAACA	55 °C
Vinculin_f	gggatttcatATGATGCCAGTGTTTCATACGCG	55 °C
Vinculin_b	atagtttagcggccgcTCACTGGTACCAGGGAGTCTTTC	55 °C
mxiE_BN_f	ggcttaggatccATGAGTAAATATAAAGGTCTAAATAC	55 °C
mxiE_BN_f	gccaatgcggccgcTTAAATTTTTTCATTTATTTTTTTCAC	55 °C
mxiE_NX_f	ggcttacatATGAGTAAATATAAAGGTCTAAATAC	55 °C
mxiE_NX_b	gcctaactcgagTTAAATTTTTTCATTTATTTTTTTCAC	55 °C

Tabelle 2.13: Namen, Sequenzen und Annealing Temperaturen (T) der eingesetzten Primer für Mutationen. Die jeweiligen Mutationen wurden unterstrichen.

Name	Sequenz 5’ -> 3’	T
mxiE-Shift_f	CCAGCATGGAAGGGGTTCTTCTTCGTCCGAAATCAAAATATAAAATTCAG	57 °C
mxiE-Shift_b	CTGAATTTTATATTTTGATTTCGGACGAAGAAGAACCCCTTCCATGCTGG	57 °C
4T-Mod_f	ATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGCGGGGATCC	60 °C
4T-Mod_b	GGATCCCCGCATATGGGACCCACGCGGAACCAGATCCGATTTTGGAGGAT	60 °C
pHW1_f	CGGCCGCCCATCATCATCATCATCATCATCATTGACTGACGATCTGCCTC	55 °C
pHW1_b	CCTCGAGGGATCCCATATGCGAGTTTGGAGGATGGTCGCC	55 °C
pHW2_f	TGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAGATAGCATGGCCTTTGCAG	55 °C
pHW2_b	ACCTAGTATAGGGGACATGA	55 °C
pHW3_f	GGCGAATTCATAGCATGGCCTTTGCAG	55 °C
pHW3_b	CCGTAAAGCTTACCTAGTATAGGGGACATGA	55 °C

Name	Sequenz 5’ -> 3’	T
MBP_f	GGCATAAGCTTATGCATAAAATCGAAGAAGGTAAAC	55 °C
MBP_b	CCGGAATTCAGTCTGCGCGTCTTTC	55 °C

Tabelle 2.14: Namen, Sequenzen und Annealing Temperaturen (T) der eingesetzten Primer für trunkierte Pathogenitätsfaktorgene.

Name	Sequenz 5’ -> 3’	T
gE_f	GGGATTTCATATGTATCCGCGCGGCATGGAAGATTTAGCAGATGTTATTT	55 °C
gE-3_f	GGGATTTCATATGTATCCGCGCGGCTTAGCAGATGTTATTTGCCGAG	55 °C
gE-3_b	CCGCTCGAGTCACATTCTTCGCGCAAATTCATC	55 °C
gE-6_b	CCGCTCGAGTCACGCAAATTCATCCTTCAGCC	55 °C
gE-9_b	CCGCTCGAGTCAATCCTTCAGCCAACGCAC	55 °C
gD-30_f	GGCGGATCCATGTATCCGCGCGGCGTAAGCGTGATTTCATATCAAAG	55 °C
gD329_b	ATAGTTTAGCGGCCGCGCCGCGCGGATAAACGCTTACTTCTTTCAGAAG	55 °C
gD330_f	GGCGGATCCATGTATCCGCGCGGCAATCTAAAAGTGGTGACATTTAAC	55 °C
gD-8_b	ATAGTTTAGCGGCCGCGCCGCGCGGATACATATTCCATATTTTTGGGTCCC	55 °C
D1-15_f	GGGATTTCATATGTATCCGCGCGGCATGCACCTAATAATAGGCAGC	55 °C
D1-32_f	GGGATTTCATATGTATCCGCGCGGCAATAATATCATTAACGTGACAAAT	55 °C
D1-80_f	GGGATTTCATATGTATCCGCGCGGCAACCGCCATAATTTGTTTTCATTG	55 °C
D1-4_b	CCGCTCGAGGCCGCGCGGATATATTTTGTCAGAAATAATATTAAACATGT	55 °C
gC_f	GGCGGATCCATGTATCCGCGCGGCATGTCTTTAAATATCACCGAAAATG	55 °C
gC-9_f	GGCGGATCCATGTATCCGCGCGGCAGCATCTCTACTGCAGTAATTG	55 °C
gC-4_b	ATAGTTTAGCGGCCGCTTACTGAATTGCGTCCAAGTATGATTG	55 °C
gC_b	ATAGTTTAGCGGCCGCTTACTCCTTGATATCCTGAATTGCG	55 °C
Mx1_f	GGCGGATCCATGAGTAAATATAAAGGTCTAAATACAAG	55 °C
Mx1_b	ATAGTTTAGCGGCCGCACAACTATTAATGTTAAAGCGATAATG	55 °C
Mx2_f	GGCGGATCCTATCATTATCGCTTTAACATTAATAG	55 °C
Mx2_b	ATAGTTTAGCGGCCGCTGCATTACTTACATTCTGGTC	55 °C
Mx3_f	GGCGGATCCTTTTCATCTGACCAGAATGTAAG	55 °C
Mx3_b	ATAGTTTAGCGGCCGCAGTGTTCAGTTGTTCTTTGAC	55 °C
Mx4_f	GGCGGATCCGGGGCAAAAGTCAAAGAAC	55 °C
Mx4_b	TAGTTTAGCGGCCGCAATTTTTTCATTTATTTTTTTCACTAAAAAAGTAA	55 °C

2.1.8 Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmid-Vektoren sind in Tabelle 2.15 aufgeführt.

Tabelle 2.15: Plasmidvektoren mit Eigenschaften, Resistenzgen und Hersteller

Name	Eigenschaften	Resistenzgen	Hersteller
pET-Duet	2 MCS, T7-Promotor, *lacI*-Operon, N-terminaler His-*Tag* in der MCS1, C-terminlaler S-*Tag* in der MCS2	Ampicillin	Novagen
pET-Duet-M2	2 MCS, T7-Promotor, *lacI*-Operon, N-terminlaer His-*Tag* in der MCS1, C-terminlaler S-*Tag* in der MCS2	Ampicillin	Diplomarbeit Christian Hasewinkel
pGEX-6P-Mod	1 MCS, T7-Promotor, *lacI*-Operon, N-terminaler GST-*Tag*	Ampicillin	Dissertation Clemens Grimm
pGEX-4T-Mod	1 MCS, T7-Promotor, *lacI*-Operon, N-terminaler GST-*Tag*	Ampicillin	-
pHW1	1 MCS, T7-Promotor, *lacI*-Operon, N-terminaler GST-*Tag*	Ampicillin	-
pHW2	1 MCS, T7-Promotor, *lacI*-Operon, N-terminaler StrepII-*Tag*	Ampicillin	-
pHW3	1 MCS, T7-Promotor, *lacI*-Operon, N-terminaler MBP-*Tag*	Ampicillin	-
pUC18	1 MCS	Ampicillin	GenScript
pIVEX-MBP	1 MCS, T7-Promotor, N-terminaler MBP-*Tag*	Ampicillin	Roche

```
                                        SmaI--    XhoI--
                          NdeI--   BamHI-  EcoRI-     SalI--    NotI----
...CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCATATGCGGGGATCCCCGGAATTCCCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
...LeuGluValLeuPheGlnGlyProHisMetArgGlySerProGluPheProGlyArgLeuGluArgProHisArgAspEnd...
                     ▲PreScission™-Protease
```

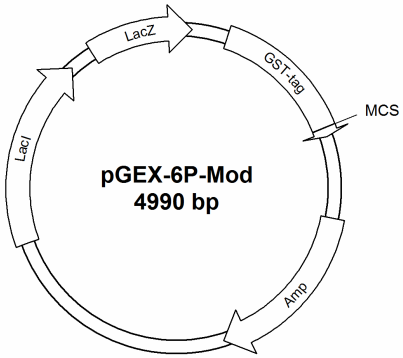

Abbildung 2.1: Detailansicht der "Multiple-cloning-site" mit DNA-Schnittstellen und PreScission™-Schnittstelle und die Vektorkarte von pGEX-6P-Mod. In Fett: Erkennungssequenz der PreScission™-Protease.

```
                                        SmaI--    XhoI--
                          NdeI--   BamHI-  EcoRI-     SalI--    NotI----
...CTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGCGGGGATCCCCGGAATTCCCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
...LeuValProArgGlySerHisMetArgGlySerProGluPheProGlyArgLeuGluArgProHisArgAspEND...
                     ▲Thrombin
```

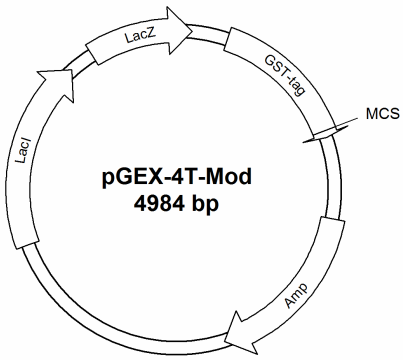

Abbildung 2.2: Detailansicht der "Multiple-cloning-site" mit DNA-Schnittstellen und der neuen Thrombin-Schnittstelle nach Mutagenese und die Vektorkarte von pGEX-4T-Mod. In Fett: Erkennungssequenz von Thrombin.

```
        NdeI--BamHI-XhoI--NotI---- 8xHis-Tag
...AACTCGCATATGGGATCCCTCGAGGCGGCCGCCCATCATCATCATCATCATCATTGA...
...AsnSerHisMetGlySerLeuGluAlaAlaAlaHisHisHisHisHisHisHisEND...
```

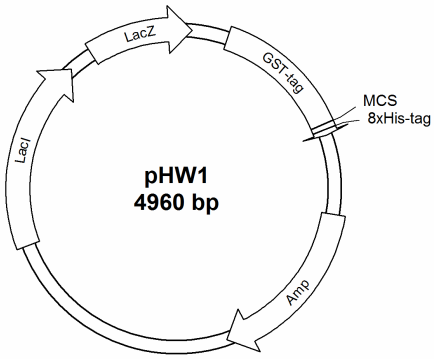

Abbildung 2.3: Die "Multiple-cloning-site" mit DNA-Schnittstellen und die Vektorkarte von pHW1.

```
        NdeI--BamHI-XhoI--NotI---- 8xHis-Tag
...AACTCGCATATGGGATCCCTCGAGGCGGCCGCCCATCATCATCATCATCATCATTGA...
...AsnSerHisMetGlySerLeuGluAlaAlaAlaHisHisHisHisHisHisHisEND...
```

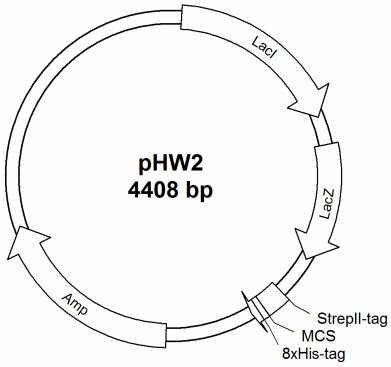

Abbildung 2.4: Detailansicht der "Multiple-cloning-site" mit DNA-Schnittstellen und Vektorkarte von pHW2.

```
          PaeI--PstI--                SmaI--
    HindIII    SdaI-- SalI--XbaI--BamHI-   KpnI--SacI--EcoRI-
...CAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGT...
...AlaSerAlaHisArgCysThrSerGluLeuProAspGlyProValSerSerSerAsnThr...
```

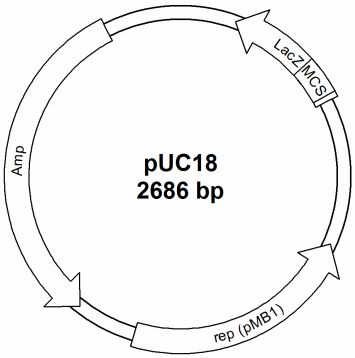

Abbildung 2.5: Die "Multiple-cloning-site" mit DNA-Schnittstellen und die Vektorkarte des Vektors pUC18.

```
          NdeI--BamHI-XhoI--NotI---- 8xHis-Tag
...AACTCGCATATGGGATCCCTCGAGGCGGCCGCCCATCATCATCATCATCATCATTGA...
...AsnSerHisMetGlySerLeuGluAlaAlaAlaHisHisHisHisHisHisHisEND...
```

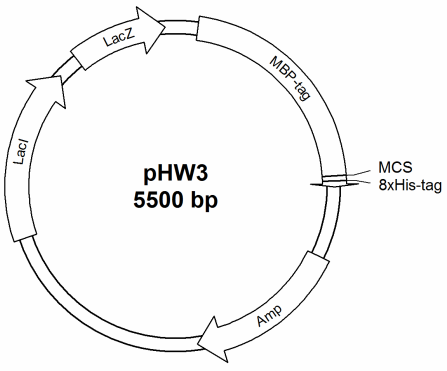

Abbildung 2.6: Die "Multiple-cloning-site" mit DNA-Schnittstellen und die Vektorkarte des Vektors pHW3.

```
MCS1:                      EcoRI-              PstI--      HindIII
                    BamHI-      SacI-- AscI----     SalI--      NotI----
           ...AGCCAGGGATCCGAATTCGAGCTCGGGCGCGCCTGCAGGTCGACAAGCTTGCGGCCGCTA...
           ...SerGlnGlySerGluPheGluLeuGlyArgAlaCysArgSerThrSerLeuArgProLeu...

MCS2:      NdeI--  BglII--MfeI--EcoRV- FseI--  AsiSI--- AatII-KpnI--XhoI--
        ...CATATGGCAGATCTCAATTGGATATCGGCCGGCCACGCGATCGCTGACGTCGGTACCCTCGAG...
        ...   MetAlaAspLeuAsnTrpIleSerAlaGlyHisAlaIleAlaAspValGlyThrLeuGlu...
```

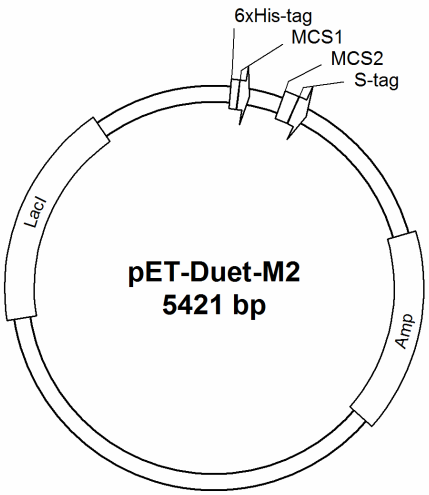

Abbildung 2.7: Die beiden "Multiple-cloning-sites" und die Vektorkarte von pET-Duet-M2.

2.1.9 Konstruierte Plasmide

Die Pathogenitätsfaktorgene wurden *via* PCR aus dem Virulenzplasmid pWR501 amplifiziert, gereinigt und anschließend mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, um diese in den Vektor pGEX-4T-Mod über die entsprechenden Schnittstellen einzufügen. Im Falle des *mxiE*-Gens musste im Anschluss eine Mutation durchgeführt werden, um die „Transcriptional Slippage Site“ (s. Ergebnisteil) zu entfernen. Die Mutagenese wurde mit den Primern mxiE-Shift_f und mxiE-Shift_b durchgeführt.

2.1.10 Bakterienstämme

In Tabelle 2.16 sind die *Escherichia coli*-Stämme aufgeführt, die zur Klonierung und anschließenden Expression benutzt wurden.

Tabelle 2.16: Zusammenfassung der Stämme mit Genotyp und Hersteller

Stamm	Genotyp	Hersteller
XL2-Blue	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F´*proAB lacl*^{q}ZΔ*M15* Tn*10* (Tet^{R}) Amy Cam^{R}]	Stratagene
BL21 CodonPlus(DE3)-RIL	F^{-} *ompT hsdS*($r_B^{-}m_B^{-}$) *dcm*$^{+}$ Tet^{r} *gal* λ(DE3) *endA* Hte [*argU proL* Cam^{r}] [*argU ileY leuW* Strp/Spec^{r}]	Stratagene
BL21 (DE3)pLysS	F^{-} *ompT hsdS*$_B$(*r*$_B^{-}$*m*$_B^{-}$) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cam^{R})	Novagen

2.1.10.1 XL2-Blue

Dieser Stamm bietet auf Grund seiner guten Transformationsrate stark verringerten Endonukleasenaktivität (*endA*) eine gute Grundlage für Plasmidvervielfältigung und anschließende –reinigung. Günstig wirkt sich in diesem Zusammenhang auch eine *hsdR17*-Mutation aus, die den Plasmidabbau durch das *Eco*K-Endonukleasensystem verhindert. Die verringerte Aktivität von Rekombinationsenzymen (*recA*) erhöht die Stabilität des Inserts. Durch das *lacl*^{q}ZΔ*M15* Gen kann ein Blue-White-Screening zur Erfolgskontrolle nach der Rekombination von DNA durchgeführt werden. XL2-Blue besitzt eine Tetracyclinresistenz und ist bis zu einer Konzentration von 40 µg/mL gegen Chlorampenicol resistent, jedoch sensitiv ab einer Konzentration von 100 µg/mL [95][96].

2.1.10.2 BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL

Dieser Stamm ist ein Derivat von *Escherichia coli* B [97], dem sowohl die ATP-abhängige Lon-Protease als auch die OmpT-Protease der äußeren Membran fehlt, weshalb nach Proteinexpressionen der Abbau von rekombinantem Protein weitgehend vermieden wird. Durch den Hte-Phänotyp wird eine Erhöhung der Transformationsrate erreicht [98], wobei zusätzlich durch die Deaktivierung von Endonuklease I (*endA*) der Abbau von rekombinanter DNA verhindert wird. Der Stamm besitzt eine Tetracyclinresistenz [99].
Der Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL ist geeignet für die Expression mit der T7 RNA Polymerase, da im Bakterienchromosom ein Teil des Prophagen DE3, ein Derivat des λ-Phagen mit der Immunitätsregion des Phagen 21, integriert ist, welche für den Laktose Repressor (*lac*I) und die T7 RNA Polymerase kodieren. Beide stehen unter der Kontrolle des lacUV5 Promotors, der durch IPTG induziert wird. Gene, die unter der Kontrolle dieses Systems stehen, werden durch die wesentlich höhere Aktivität der T7 RNA Polymerase im Vergleich zur zelleigenen Polymerase stärker transkribiert und somit exprimiert [100].
Zusätzlich besitzt dieser Stamm ein ColE1 kompatibles pACYC basiertes Plasmid, welches die Gene *argU* und *proL* für zusätzliche Kopien von diesen tRNAs trägt. Ein ColE1 und pACYC kompatibles pSC101 basiertes Plasmid trägt die Gene *argU*, *ileY* und *leuW* für zusätzliche Kopien für diese tRNAs. Die zusätzlichen tRNAs erkennen die Arginincodons AGA und AGG, das Isoleucincodon AUA, das Prolincodon CCC und das Leucincodon CUA, womit dieser Stamm Vorteile bei den Expressionen von AT- und GC-reichen Genen bietet. Bei der Expression von heterologen Genen kann die Anhäufung seltener Codons häufig zum Abbruch der Translation führen. Durch die zusätzlichen tRNAs, welche spezifisch seltene Codons erkennen, wird dieses Problem behoben.

2.1.10.3 BL21 (DE3)pLysS

Dieser Stamm ist ebenfalls ein Derivat von *Escherichia coli* B. Er enthält einen Teil des Prophagen DE3 und verfügt über ein zusätzliches Plasmid, welches das T7-Lysozym-Gen trägt, dessen Produkt einen natürlichen Inhibitor der T7 RNA Polymerase darstellt. Dadurch soll eine vorzeitige Expression des Zielgens verhindert werden, um eine ungehindertes Anwachsen der Bakterienkultur bis zur Induktion zu gewährleisten.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Methoden

2.2.1.1 Übernachtkultur

10 mL LB-Medium wurden unter der Sterilbank KS15 (Thermo SCIENTIFIC) mit einem der *Escherichia coli* Stämme angeimpft. Zur Selektion wurden die entsprechenden Antibiotika hinzu gegeben. Die Kultur wurde bei 37 °C für ungefähr 16 h im Schüttelinkubator Innova 4200 (New Brunswick Scientific) herangezogen.

2.2.1.2 Plasmid-Minipräparation

Zum Gewinnen von Plasmid-DNA wurde das Plasmid Miniprep Kit I (peQ-Lab) benutzt. Eine Übernachtkultur wurde in einem 2 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit der Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die weiteren Zentrifugationsschritte wurde dieselbe Zentrifuge benutzt. Das Pellet wurde mit 250 µL Lösung I resuspendiert und dann mit 250 µL Lösung II versetzt, invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die klare Lösung wurde mit 350 µL Lösung III versetzt und bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert.
Der Überstand wurde auf eine der mitgelieferten Säulen gegeben und bei 10000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut aufgetragen und zentrifugiert, danach konnte der Durchfluss verworfen werden. Die Säule wurde nun mit 500 µL HB-Puffer bei 10000 rpm für 1 min gewaschen. Anschließend wurde das Plasmid durch zweimaliges Waschen mit je 700 µL DNA-Waschlösung bei 10000 rpm für 1 min gereinigt. Zum Trocknen der Säule wurde diese bei 13000 rpm für mindestens 1 min zentrifugiert.
Die Plasmid-DNA wurde zweimal mit je 32 µL bidest. H_2O in einem neuen 1.5 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) bei 7000 rpm für 1 min eluiert.

2.2.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Mittels UV-Vis-Spektrometer SmartSpec™ 3000 (BIO RAD) kann bei 260 nm die spezifische Absorption von DNA gemessen werden, wodurch nach Gleichung (1) die Konzentration bestimmt werden kann.

$$Konzentration = 50\frac{ng}{\mu L} \cdot Absorption \cdot Verdünnungsfaktor \quad \textbf{(1)}$$

Dazu wurde ein Nullabgleich mit dem Lösungsmittel in einer UV-Küvette (Eppendorf) am Spektrometer durchgeführt. Danach wurde die Küvette geleert und in dieser mindestens 50 µL der Probe vermessen. Falls die Absorption zu hoch war, wurde die Probe entsprechend verdünnt, da eine genaue Messung nur in einem Absorptionbereich zwischen 0.1 bis 0.8 möglich ist.

2.2.1.4 Plasmidverdau

Die DNA-Probe wurde mit Restriktionsenzym(en), dazugehörigem Puffer und 10xBSA-Lösung versetzt und in einem verschlossenem 1.5 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) bei 37 °C für 1 h im Blockthermostat TCR100 (ROTH) inkubiert. Zur Deaktivierung der Enzyme wurde die Probe nochmals bei entsprechend erhöhter Temperatur und Zeit je nach Herstellerangabe stehen gelassen. Ein typischer Verdauansatz nach einer Plasmid-Minipräparation hatte folgende Zusammensetzung:

7.0 µL	Plasmid Probe
1.0 µL	Enzym Puffer
1.0 µL	10xBSA-Lösung
0.5 µL	Restriktionsenzym 1
0.5 µL	Restriktionsenzym 2

Bei Restriktionen für Klonierungen wurden Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µL hergestellt, wobei die Konzentration des Plasmides, des Vektors oder des PCR-Produktes bei 100 ng/µL lag. Der Ansatz wurde über Nacht im Begasungsbrutschrank (Heraeus) bei 37 °C inkubiert.

14.0 µL	Plasmid/Vektor/PCR-Produkt
2.0 µL	Enzym Puffer
2.0 µL	10xBSA-Lösung
1.0 µL	Restriktionsenzym 1
1.0 µL	Restriktionsenzym 2

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe. Aufgrund eines elektrischen Feldes wandern die geladenen DNA-Fragmente durch ein Gel, welches für unterschiedlich große DNA-Stücke eine unterschiedlich starke Barriere darstellt. Zur Herstellung des Gels wurden 0.4-0.5 g Agarose an der Feinwaage Typ 404/13 (Sauter) abgewogen und in 50 mL 1xTAE Puffer in einen Erlenmeyerkolben (Schott) gegeben. Anschließend wurde diese Suspension mit der Mikrowelle 22023/01 (Siemens) bis zum vollständigen Lösen der Agarose erwärmt. Eventuelle Wasserverluste wurden wieder durch Zugabe von dest. Wasser ausgeglichen. Zur Lösung wurde 5 µL des Farbstoffes Sybr Safe 10000x (Invitrogen) gegeben, der durch Interaktion mit DNA die zu untersuchenden Fragmente unter Blaulicht sichtbar machen kann. Die Lösung wurde in die Kammer OWL EASYCAST B1A (Thermo SCIENTIFIC) gegossen, dann wurde gewartet bis das Gel erstarrte, wobei Vertiefungen für die Proben durch einen Kamm gebildet wurden. Anschließend wurde die Kammer soweit mit 1xTAE Puffer befüllt bis das Gel vollständig vom Puffer bedeckt war. Die Geltaschen wurden mit Marker und den DNA-Proben befüllt, welche zuvor mit 6xProbenpuffer versetzt worden waren. Das elektrische Feld wurde durch die Stromquelle EC250-90 (E-C Apparatus Corporation) erzeugt, wobei die Elektrophorese bei 100-200 V für 10-20 min betrieben wurde bis sich die gewünschte Auftrennung einstellte. Mit Hilfe der Fluoreszenzplatte Safe Imager™ (Invitrogen) und entsprechendem Filter konnte die DNA sichtbar gemacht werden, um die richtigen Bandenmuster oder Größen zu verifizieren.

2.2.1.6 Gelextraktion

Nach Restriktion eines Plasmides konnte das entsprechende DNA-Fragment mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese von den restlichen Bestandteilen getrennt werden. Mit Hilfe der Fluoreszenzplatte Safe Imager™ (Invitrogen) und einer Brille mit entsprechendem Filter wurde die DNA sichtbar gemacht. Mit einem Skalpell wurde dann ein Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Durch die Nutzung der Fluoreszenzplatte wurde eine sehr geringe Mutationsrate in den DNA-Fragmenten erreicht, was sich in einer erhöhten Anzahl an Klonen am Ende des Prozesses bemerkbar machte. Die DNA wurde mit dem Gel-Extraktions-Kit (peQ-Lab) vom Gel befreit. Dazu wurde das Agarosegelstück mit 300 µL Binde-Puffer versetzt und für 10 min bei 50°C bei 300 rpm im Thermomixer comfort 2mL (Eppendorf) inkubiert, wobei sich das Gel vollständig auflöste. Diese Lösung wurde auf die peQ-Lab-Säule gegeben und mit der Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus) für 1 min bei 10000 rpm eluiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µL Binde-Puffer durch Zentrifugieren bei 10000 rpm für 1 min gewaschen. Zwei weitere Waschschritte mit je 600 µL CG-Wasch-Puffer wurden bei 10000 rpm für 1 min durchgeführt. Abschließend wurde die Säule bei 13000 rpm für mindestens 1 min getrocknet. Die DNA-Fragmente wurden zweimal mit je 32 µL Wasser bei 7000 rpm für 1 min eluiert und in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.2.1.7 Ligation

Für die Ligation wurde der Vektor und das Insert im Verhältnis 1:4 in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß vereinigt. Nach Zugabe von T4-Ligase und Ligase-Puffer wurde die Probe bei 22 °C für 1 h inkubiert. Der Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

1 µL Vektor
4 µL Insert
3 µL H_2O
1 µL Ligase-Puffer
1 µL T4-Ligase

2.2.1.8 Herstellung von kompetenten Zellen

Viele Bakterien, wie *Escherichia coli*, können in begrenztem Maße exogene DNA aufnehmen. Um die Aufnahme zu verbessern, müssen die Bakterien physikalisch oder chemisch behandelt werden, wobei die in dieser Arbeit verwendeten Stämme ihre Kompetenz durch Behandlung mit $CaCl_2$ erhielten.

Dazu wurde unter der Sterilbank KS15 (Thermo SCIENTIFIC) eine Kolonie von einer Agar-Platte aufgenommen, in 100 mL LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben (Schott) überführt und bis zu einer OD_{600} von 0.7 bei 37 °C im Schüttelinkubator Innova 4200 (New Brunswick Scientific) weitergeschüttelt. Die OD_{600}-Messung wurde am UV-VIS-Messgerät SmartSpec™ 3000 (BIO RAD) mit Einmalküvetten (ROTH) durchgeführt. Die Zellen wurden in ein 50 mL Greinerröhrchen (Greiner) überführt und mit der Zentrifuge Multifuge 3 (Heraeus) bei 2500 g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde unter der Sterilbank in 20 mL TfbI-Puffer resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Danach erfolgte Trennung vom Überstand durch Zentrifugieren bei 2500 g und 4 °C für 5 min. Anschließend wurde das Pellet in 4 mL TfbII-Puffer resuspendiert und auf 50 µL Aliquots in 1.5 mL Reaktionsgefäßen unter der Sterilbank aufgeteilt und erst bei -20 °C und dann bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.9 Transformation

1-5 µL eines Ligationsansatzes wurden zu 50 µL eines Aliquots mit kompetenten Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 25 s bei 42 °C im Blockthermostat TCR100 (ROTH), gefolgt von 5 min auf Eis. Dann wurden 950 µL LB-Medium hinzugegeben und für 45 min bei 37 °C im Thermomixer comfort 2mL (Eppendorf) inkubiert, damit sich die Antibiotikaresistenz ausbilden konnte. Die Probe wurde bei 13000 rpm für 1 min mit der Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus) zentrifugiert und 900 µL vom Überstand wurden unter der Sterilbank KS15 (Thermo SCIENTIFIC) entfernt. Das Pellet wurde im restlichen Medium resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion ausplattiert. Die Agrarplatten wurden für mindestens 16 h bei 37 °C im Begasungsbrutschrank (Heraeus) inkubiert.

Falls Kolonien wuchsen, wurden diese in LB-Medium mit Antibiotika über Nacht angezüchtet. Mittels Plasmid-Minipräparation wurde das Plasmid gewonnen und anschließend verdaut. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Agarose-Gelelektrophorese festgestellt.

2.2.1.10 PCR (Polymerase Chain Reaktion)

Mittels PCR können ganze Plasmide oder nur Teile daraus repliziert werden. Diese geschieht durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Die dazu benötigten Primer wurden für Klonierungszwecke mit Restriktionsschnittstellen versehen, um die Klonierung der resultierenden DNA-Fragmente in einen Plasmid-Vektor zu ermöglichen.
Die PCR verlief in drei zyklischen Schritten. Zuerst wurde der Doppelstrang gespalten, dann lagerten sich die Primer an, welche als Startpunkt für die Replikation dienten. Anschließend erfolgte die Vervollständigung des Stranges, wodurch sich die Anzahl an Plasmiden pro Zyklus verdoppelt, siehe Abbildung 2.8.

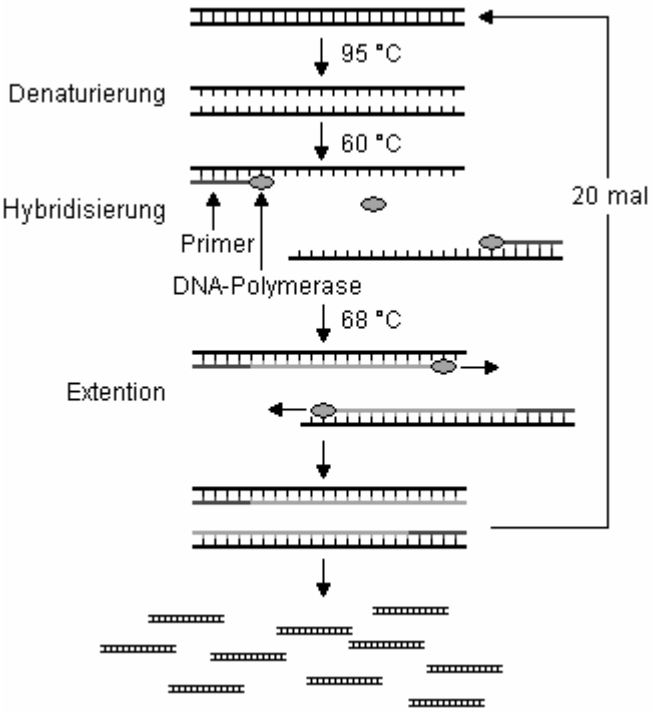

Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der PCR

Folgender Ansatz kam bei einer PCR zur Anwendung.

10 µL	5xHF-Puffer
0.5 µL	Phusion Polymerase (2 U/µL)
1 µL	Ausgangsplasmid (10 ng/µL)
1 µL	Primer 1 (25 nM)
1 µL	Primer 2 (25 nM)
1 µL	dNTP-Mix (jedes 25 mM)
35.5 µL	steriles H_2O

Um die Zyklen durchzuführen, wurde der Thermocycler PCR Mini Cycler (MJ Research) benutzt, der zum Beispiel folgendes Programm benutzte.

1. 30 s	95 °C		
2. 30 s	95 °C	Denaturierung	} 25 Wiederholungen
3. 1 min	55 °C	Hybridisierung	
4. 2 min	72 °C	Extention	
5. ∞	4 °C		

Damit der Primer spezifisch gebunden wurde, musste die Temperatur bei der Hybridisierung an den Primer angepasst werden, so dass dieser bei zu tiefen Temperaturen nicht mehrfach angelagert oder bei zu hohen Temperaturen gar nicht gebunden wurde. Die Extentionszeit wurde der Länge des zu replizierenden Gens angepasst, da in einer Minute 1000 Basen verknüpft werden können. Somit ergibt sich für ein Gen mit 3000 Basen eine Extentionsdauer von drei Minuten.

2.2.1.11 Ortsgerichtete Mutagenese via PCR

Mutationen wurden mittels Basenaustausch im Primer eingeführt. Die ortsgerichtete Mutagenese stellt einen Sonderfall der PCR dar, bei dem das komplette Plasmid vervielfältigt wird. Der Primer wurde jeweils so konstruiert, dass beide Seiten um die Mutation die gleiche Schmelztemperatur T_m besaßen.

Außerdem sollte der Primer auf der 3'-Seite mit einem Guanin oder Cytosin enden, um eine starke Bindung des Primers am Startpunkt der Replikation durch die Polymerase zu gewährleisten. Die Ansatzgröße und das Replikationsprogramm einer Mutagenese entsprachen einer normalen PCR, wobei hauptsächlich die Temperatur zur Hybridisierung des Primers im Programm angepasst werden musste.

2.2.1.12 *Dpn*I Verdau

Nach einer PCR oder einer Mutagenese war noch Ausgangsplasmid vorhanden, welches beseitigt werden musste, da es sonst unweigerlich zu einer großen Zahl von Klonen mit unmutiertem Originalplasmid führen würde. Deshalb wurde die DNase *Dpn*I benutzt, die nach methylierten Guaninen schneidet, welche im Ausgangsplasmid, das aus Zellen gewonnen wurde, in großer Zahl enthalten waren. Das *in vitro* synthetisierte PCR-Produkt wies diese Modifizierung nicht auf, weshalb es intakt blieb und nicht zerkleinert wurde. So konnte das replizierte Plasmid in einer Transformation von kompetenten Zellen aufgenommen werden.

2.2.1.13 Aufreinigung eines PCR-Produktes

Zur Beseitigung der übrigen Komponenten wie Primer oder dNTPs wurde das PCR-Produkt mit dem Gel-Extraktions-Kit (peQ-Lab) aufgereinigt. Dazu wurde der 50 µL Ansatz mit 300 µL des Binde-Puffers versetzt, auf die peQ-Lab Säulen gegeben und mit der Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus) für 1 min bei 10000 rpm eluiert. Der Durchfluss wurde verworfen und zwei Waschschritte mit je 600 µL CG-Wasch-Puffer wurden bei 10000 rpm für 1 min durchgeführt. Abschließend wurde die Säule bei 13000 rpm für mindestens 1 min getrocknet. Die DNA-Fragmente wurden zweimal mit je 32 µL Wasser bei 7000 rpm für 1 min eluiert und in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.2.1.14 Sequenzierung

Nach einer Plasmid-Minipräparation wurden 1 µg Plasmid von der Firma MWG Biotech (Martinsried) sequenziert, um den Erfolg einer Mutation oder Replikation, sowie die Abwesenheit von unerwünschten Mutationen zu bestätigen.

2.2.1.15 Glycerinstocks

Wurde eine erfolgreiche Klonierung nach einer Plasmidpräparation durch Restriktion oder Sequenzierung bestätigt, wurden 750 µL der entsprechenden Kultur mit 250 µL sterilem Glycerin gemischt und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Protein-biochemische-Methoden

2.2.2.1 Heterologe Expression von rekombinanten Genen in *E. coli*

Mit einer Übernachtkultur wurde das hundertfache Volumen an autoklaviertem LB-Medium angeimpft und mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion versetzt. Das Medium wurde in einem Schüttelinkubator Innova 4300 (New Brunswick Scientific) für mehrere Stunden bei 37 °C inkubiert.
Vom Medium wurde 1 mL Probe entnommen und im UV-Vis-Messgerät SmartSpec^{TM} 3000 (BIO RAD) bei 600 nm mit einer Einmalküvette (ROTH) vermessen, wobei der Nullabgleich mit LB-Medium erfolgte. Betrug die Absorption 0.6 bis 0.7, wurde 1 M IPTG-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zur Kultur gegeben, wodurch die Expression des Zielproteins induziert wurde. Vor Induktion wurde eine Probe entnommen, die einem OD_{600} von 0.5 entsprach. Diese wurde vom LB-Medium durch Zentrifugation mit der Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus) bei 13000 rpm für 1 min befreit und mit 30 µL SDS-Probenpuffer versetzt, um die Probe mittels SDS-Gelelektrophorese zu untersuchen.

Der Mechanismus der Induktion beruht auf der negativen Regulierung des *lac*-Operons, da ein Repressor die Transkription des nachfolgenden Gens verhindert. Durch Zugabe von IPTG dissoziiert der Repressor vom Operon, woraufhin die Transkription und schließlich die Translation stattfinden. Bei den verwendeten Stämmen zur Expression wurde nach IPTG-Zugabe die chromosomal codierte T7-RNA-Polymerase produziert, die wiederum das Gen auf dem eingefügten Plasmid transkribiert, was nach Translation zum gewünschten Proteinprodukt führte. Die Kultur wurde dann 12 h bei 15 °C inkubiert. Anschließend wurde eine weitere Probe entnommen, die einem OD_{600} von 0.5 entsprach. Das LB-Medium wurde durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 min entfernt und mit 30 µL SDS-Probenpuffer versetzt, um diese Probe mit einer SDS-Gelelektrophorese zu untersuchen. Das Medium konnte dann bei 6000 rpm, 4 °C für 15 min mit der Zentrifuge Avanti J-25 (Beckman Coulter) abzentrifugiert werden, um das Zellpellet vom LB-Medium zu trennen.

2.2.2.2 Zelllyse

Das Zellpellet aus 1 L Zellkultur wurde in 50 mL PBS-Puffer für die Aufreinigung über die Glutathion-Affinitäts-Säule oder in 50 mL Ni-Binde-Puffer für die Aufreinigung über die Ni^{2+}-Chelat-Säule resuspendiert. Der Aufbruch der Zellen erfolgte via Ultraschall am Sonifier 250 (Branson). Dazu wurde die Suspension fünfmal 1 min lang bei einer Stärke von 3/10 bei 70 % Output behandelt.
100 µL des Lysats wurden entnommen und mit der Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus) bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. 15 µL des Überstandes wurden genommen und mit 15 µL SDS-Probenpuffer versetzt, um die Probe mittels SDS-Gelelektrophorese zu untersuchen. Der Rest des Überstandes wurde verworfen. Der unlösliche Rückstand wurde mit 1 mL PBS-Puffer gewaschen, erneut für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, vom Überstand befreit und mit 30 µL SDS-Probenpuffer versetzt, um diese Probe mittels SDS-Gelelektrophorese zu untersuchen.
Das Lysat wurde mit der Zentrifuge Avanti J-25 (Beckman Coulter) bei 20000 rpm für 45 min zentrifugiert, um die unlöslichen von den löslichen Bestandteilen zu trennen.

2.2.2.3 Affinitätschromatographie mittels Glutathion-Sepharose

Lag das Zielprotein in der löslichen Fraktion des Lysats als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) vor, welche selektiv an die Glutathion-Sepharose bindet, wurde die lösliche Fraktion mittels Peristaltikpumpe Pharmacia LKB Pump P-1 (Pharmacia) auf die mit 15 mL Glutathion-Sepharose gefüllte XK16/20 Glutathion-Sepharose (Pharmacia Biotech) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1.5 mL/min aufgetragen. Hierbei wurden 15 µL des Durchflusses entnommen und mit 15 µL 4xSDS-Probenpuffer versetzt, um diese mittels SDS-PAGE zu analysieren. Die Säule wurde dann mit 200 mL PBS-Puffer mit 3 mL/min gewaschen. Das Fusionsprotein wurde mit dem GSH-Elutions-Puffer mit 3 mL/min von der Säule eluiert und in einem 50 mL Greiner-Röhrchen (Greiner) aufgefangen. 15 µL des Eluats wurden zur Analyse mittels SDS-PAGE mit 15 µL 4xSDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurde die Säule mit 50 mL Guanidin-Puffer mit 1 mL/min gereinigt und dann mit 100 mL PBS-Puffer mit 3 ml/min zum neuen Beladen bereit gemacht.

2.2.2.4 Affinitätschromatographie mittels Ni^{2+}-Chelat-Sepharose

Lag das Zielprotein in der löslichen Fraktion des Lysats als Fusionsprotein mit einem His-*Tag* vor, wurde diese mittels Peristaltikpumpe Pharmacia LKB Pump P-1 (Pharmacia) auf die 5 mL HisTrap™ FF (GE Healthcare) mit 1.5 mL/min aufgetragen,. Hierbei wurden 15 µL des Durchflusses entnommen und für die Analyse mittels SDS-PAGE mit 15 µL 4xSDS-Probenpuffer versetzt. Die Säule wurde dann mit 50 mL Ni-Binde-Puffer mit 3 mL/min gewaschen. Das Fusionsprotein wurde mit dem Ni-Elutions-Puffer mit 3 mL/min von der Säule eluiert und in einem 50 mL Greiner-Röhrchen (Greiner) aufgefangen. 15 µL des Eluats wurden für die Analyse mit der SDS-PAGE mit 15µL 4xSDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurde die Säule mit 10 mL EDTA-Puffer mit 3 mL/min vom Ni^{2+} befreit und mit 10 mL Wasser bei 3 mL/min gewaschen. Dann wurden die Säule mit 5 mL Ni-Puffer mit 1 mL/min neu beladen und mit 20 mL Ni-Binde-Puffer mit 3 mL/min gewaschen.

2.2.2.5 Thrombin-Spaltung

Das Fusionsprotein wurde mit 100 U Thrombin bei 4 °C für 12 h im Elutions-Puffer oder mit 375 U Thrombin auf der Säule in den jeweiligen Tag und das Zielprotein gespalten. Nach der Inkubation wurden 15 µL des verdauten Ansatzes für die SDS-PAGE mit 15 µL 4xSDS-Probenpuffer versetzt, um den Erfolg des Verdaues zu verifizieren. Wenn die Spaltung auf der Säule geschah, blieb das *Tag* direkt auf der Säule und das Zielprotein konnte nach Inkubation mit Hilfe der ÄKTA (Amercham pharmacia biotech) mit 1 mL/min eluiert werden. Nach Verdau in Lösung musste das jeweilige Tag mit der entsprechenden Affinitätssäule entfernt werden. Vor diesem Schritt wurde die Lösung mittels einer mit 60 mL Sephadex G-25 gefüllten XK16/40-Säule (Pharmacia Biotech) mit Hilfe der ÄKTA (Amersham Pharmacia Biotech) auf den jeweils erforderlichen Bindepuffer umgepuffert.

2.2.2.6 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Erfolg der Induktion oder des Aufschlusses wurde via Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft. Durch Erwärmen der entnommenen Proben bei 95 °C im Blockthermostat TCR100 (ROTH) wurden die Proteine denaturiert und erhielten durch Anlagerung des SDS eine gleichmäßige negative Ladungsverteilung. Mögliche Disulfidbrücken wurden durch DTT im SDS-Probenpuffer aufgebrochen. Die Proben wurden dann auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel bestand aus einem Sammelgel und einem Trenngel, deren Zusammensetzungen Tabelle 2.17 bzw. Tabelle 2.18 zu entnehmen sind.
Das Gel wurde in die Kammer gestellt und mit Laemmli-Puffer befüllt. Danach wurden die Taschen mit Proben und Marker befüllt. Das Sammelgel fokussierte alle Proteine in der Probe, damit beim Erreichen des Trenngels das Proteingemisch den gleichen Startpunkt für die Trennung hatte. Die Trennung erfolgte wie beim Agarosegel über das Wandern der negativ geladenen Proteine zur Anode, welche durch das Acrylamidnetz gemäß ihrer Größe aufgetrennt wurden. Die Elektrophorese wurde mit der Stromquelle EC250-90 (E-C Apparatus Corporation) im Sammelgel bei 130 V und beim Erreichen des Trenngels bei 160 V betrieben, wobei die Auftrennung ungefähr 2 h dauerte.

Tabelle 2.17: Zusammensetzung des Sammelgels

Komponente	**Volumen**
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0.8%)	0.50 mL
H_2O	1.87 mL
Sammelgelpuffer	0.60 mL
10% SDS-Lösung	30 µL
APS	30 µL
TEMED	3.0 µL

Tabelle 2.18: Zusammensetzung des Trenngels

Komponente	**Volumen**
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0.8%)	1.50 mL
H_2O	0.47 mL
Trenngelpuffer	1.00 mL
10% SDS-Lösung	30 µL
APS	30 µL
TEMED	3.0 µL

Das vom Sammelgel abgetrennte Trenngel wurde für mindestens 15 min bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler Polymax 1040 (Heidolph) mit Coomasie-Blue Färbelösung angefärbt und dann mit der Coomasie-Blue Entfärberlösung auf dem Taumelschüttler wieder entfärbt. Die Proteinbanden bleiben angefärbt, was auf den Wechselwirkungen zwischen basischen und aromatischen Aminosäuren des Proteins und dem Farbstoff beruht. Die Bandenmuster wurden dann am Transilluminator mit Kamera (biostep) dokumentiert.

2.2.2.7 Präparative Molekularsiebchromatographie

Die Molekularsiebchromatographie oder Größenausschlusschromatographie trennt nach der Größe der Moleküle, wobei als Säulenmaterial ein sehr poröses Polymer aus quervernetzter Agarose mit Dextran dient. Kleine Moleküle können ins Säulenmaterial hineinwandern, was zu einer längeren Verweildauer auf der Säule führt, wohingegen größere Moleküle hauptsächlich außerhalb der Matrix eluieren. Dies führt letztlich zu einem linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Masse und dem Elutionsvolumen eines Proteins.
Das Eluat von den Affinitätssäulen wurde mit den Konzentratoren Vivaspin 20 MWCO 10.000 (Satorius stedim biotech) oder Vivaspin 20 MWCO 30.000 (Satorius stedim biotech) in der Zentrifuge Multifuge 3 (Heraeus) auf 10 mL ankonzentrierten. Dieses Volumen wurde dann über den 10 mL Loop auf die HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grad (Amercham Biosciences) oder die HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grad (Amercham Biosciences) an der ÄKTA aufgetragen und gereinigt. Zuvor wurde die Säule mit 500 mL entsprechendem SEC-Puffer gespült. Die Elution wurde mit dem gleichen Puffer mit 4 mL/min durchgeführt. Dabei wurde die Elution fraktioniert gesammelt und jeweils 30 µL Fraktion mit 10 µL 4xSDS-Probenpuffer für die spätere Untersuchung mit der SDS-PAGE versetzt.

2.2.2.8 Analytische Molekularsiebchromatographie

Die analytische Molekularsiebchromatographie wurde mittels ÄKTA und der Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) durchgeführt. Dazu musste zuerst die Säule kalibriert werden. Dies geschah durch Elution von verschiedenen Kalibrierungsproteinen vom Kit for Molecular Weights 12-200kD for GFC (Sigma Aldrich). Da bei globulären Proteinen eine Korrelation zwischen dem Logarithmus der Masse und dem Elutionsvolumen besteht, kann eine Kalibriergerade erstellt werden, die für die Bestimmung der Masse aus dem Elutionsvolumen benutzt werden konnte.
Zur Kalibrierung wurden über einen 250 µL Loop an der ÄKTA 250 µL eines Gemisches der Kalibrierproteine mit je 1 mg/mL aufgetragen und mit 0.4 mL/min mit dem SEC7.5-Puffer eluiert. Das Elutionsprofil ist Abbildung 2.9 zu entnehmen. Die Masse der für die Kalibrierung verwendeten Proteine sowie die Elutionsvolumina sind in Tabelle 2.19 zusammengefasst.

Die sich daraus ergebende Kalibriergerade ist in Abbildung 2.10 gezeigt. Das Dextran Blue wird nicht für die Erstellung der Kalibriergeraden einbezogen, da in diesem Bereich die Linearität nicht mehr gegeben ist. Es dient lediglich der Bestimmung des Ausschlussvolumens, welches das minimale Elutionsvolumen darstellt.

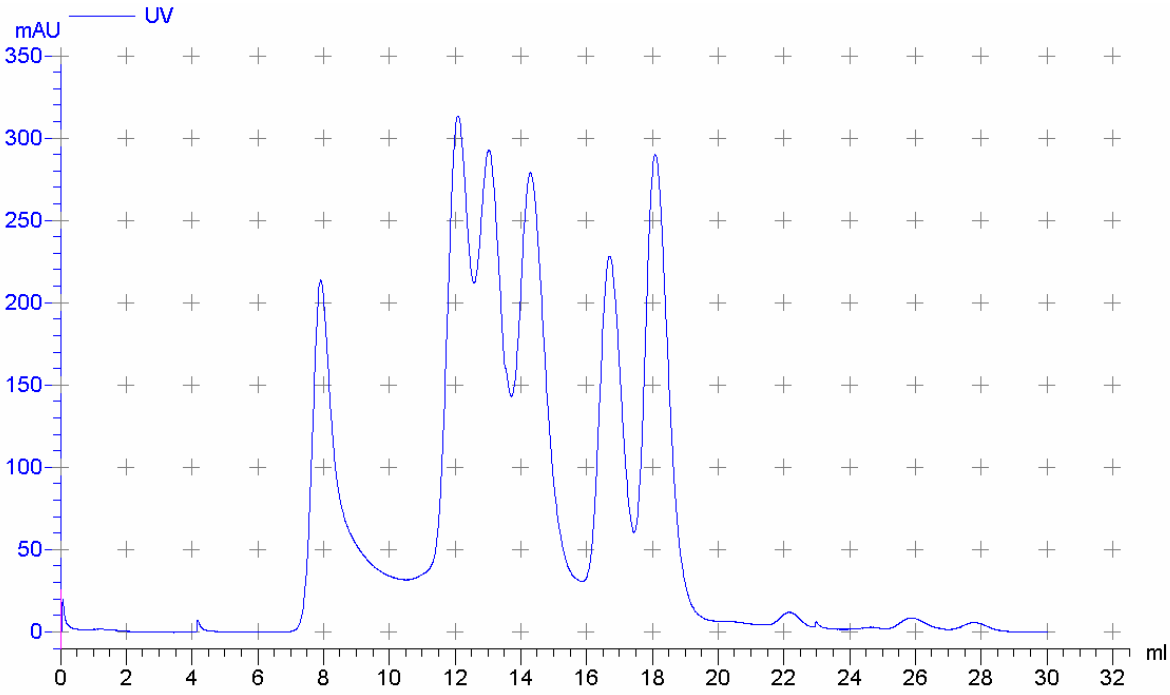

Abbildung 2.9: Chromatogramm der Elution mit der Säule Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) nach Auftragen der Proteine aus dem Kit for Molecular Weights 12-200kD for GFC (Sigma Aldrich).

Tabelle 2.19: Kalibrierproteine und deren Masse und Elutionsvolumen

Name	Masse	log(Masse)	Elutionsvolumen
Dextran Blue	2000 kDa	6.3010	7.91 mL±0.02 mL
β-Amylase	200 kDa	5.3010	12.09 mL±0.04 mL
Alcohol Dehydrogenase	150 kDa	5.1761	13.03 mL±0.05 mL
Albumin	66 kDa	4.8195	14.29 mL±0.03 mL
Carbonic Anhydrase	29 kDa	4.4624	16.71 mL±0.02 mL
Cytochrome C	12.4 kDa	4.1271	18.09 mL±0.01 mL

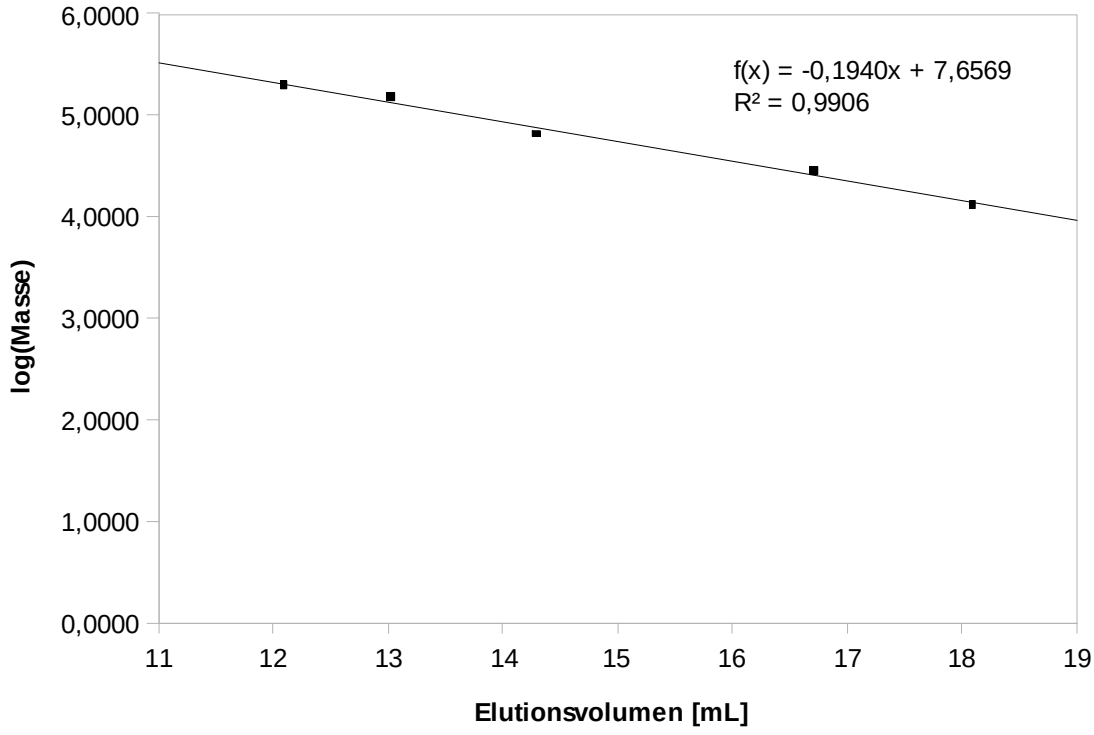

Abbildung 2.10: Auftragung des Elutionsvolumen gegen den Logarithmus der Masse und die daraus resultierende Ausgleichsgerade als Kalibriergerade.

Wie in Abbildung 2.10 sichtbar ergibt sich folgende Gleichung aus der Kalibriergeraden:

$$\log(Masse) = -0.1940 \cdot Elutionsvolumen + 7.6569 \quad \textbf{(2)}$$

Duch Delogarithmieren erhält man folgende Gleichung:

$$Masse = 10^{-0.1940 \cdot Elutionsvolumen + 7.6569} \quad \textbf{(3)}$$

Mit Hilfe der Gleichung (3) kann aus dem Elutionsvolumen die Masse bestimmt werden, wenn das Protein globulär ist.

2.2.2.9 Konzentrationsbestimmung über die UV-Absorption bei 280 nm

Um Ausbeuten zu bestimmen, Assays oder Kristallisationen durchzuführen, musste die Konzentration des jeweiligen Proteins bestimmt werden. Dazu wurde wie bei der Bestimmung der DNA-Konzentration die Absorption benutzt. Der Extinktionskoeffizient des Proteins wurde vorher theoretisch bestimmt. Hierfür wurde das Programm ProtParam benutzt, das auf folgender Internetseite zur Verfügung steht.

http://www.expasy.org/tools/protparam.html

Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten in L/g ergibt sich dann folgende Gleichung.

$$Konzentration = \frac{Absorption}{Extinktionskoeffizient} \cdot Verdünnungsfaktor \quad (4)$$

Nach Nullabgleich für das Lösungsmittel am UV-VIS- Spektrometer SmartSpec^{TM} 3000 (BIO RAD) wurden mindestens 50 µL der Probe in eine UV-Küvette (Eppendorf) gegeben und bei 280 nm vermessen. Falls die Absorption zu hoch war, wurde die Proteinlösung verdünnt, da eine korrekte und präzise Messung nur in einem Absorptionbereich zwischen 0.1 bis 0.8 gewährleistet ist.

2.2.2.10 Konzentrationsbestimmung mit dem Bradford-Assay

Eine weitere Konzentrationsbestimmung war mit dem Bradford-Assay möglich, wobei hier die Änderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomasie Blau G250 von 465 nm zu 595 nm im sauren Milieu bei Interaktion mit einem Protein benutzt wurde. Die Interaktion beruht auf den Wechselwirkungen mit den basischen und aromatischen Aminosäuren im Protein.

Zur Bestimmung einer unbekannten Proteinkonzentration musste ein Kalibriergerade mit verschieden BSA-Konzentrationen aufgenommen werden, die aus BSA und Wasser hergestellt wurden. Dazu wurde 1xBradford-Lösung für die Bestimmung benutzt, die aus der 5xBradford-Lösung durch Verdünnung mit Wasser und anschließendem Filtrieren hergestellt wurde. Zur Bestimmung wurden 950 µL 1xBradfordlösung mit 50 µL der verschiedenen Konzentrationen versetzt, invertiert und für 5 min inkubiert. Von diesem Ansatz wurden mindestens 50 µL in UV-Küvetten (Eppendorf) am UV-VIS-Spektrometer SmartSpec^{TM} 3000 (BIO RAD) bei 595 nm vermessen. Der Nullabgleich erfolgte mit einer Lösung aus 950 µL 1xBradford-Lösung und 50 µL Wasser, welche auch invertiert und für 5 min inkubiert wurde. Durch Auftragen der verschiedenen Endkonzentrationen in Abhängigkeit ihrer Absorption bei 595 nm ergab sich folgende Kalibriergerade in Abbildung 2.11.

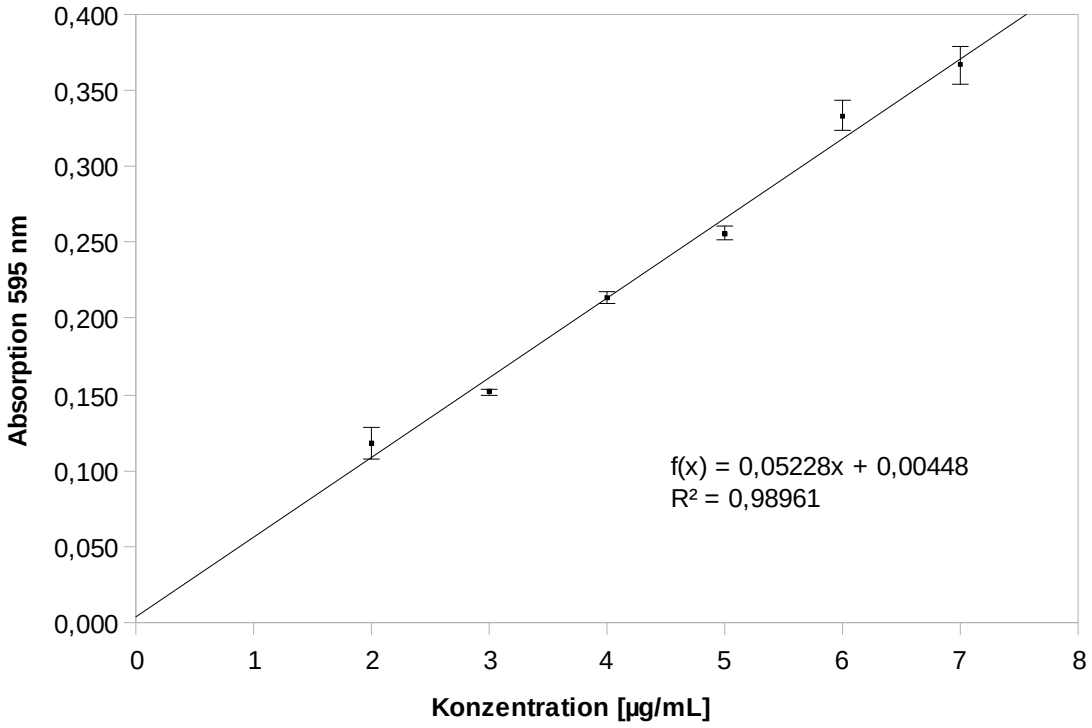

Abbildung 2.11: Auftragung der Absorption bei 595 nm der verschiedenen BSA-Konzentrationen und die daraus resultierende Kalibriergerade und Gleichung für den Bradford-Assay.

Aus Abbildung 2.11 ergab sich folgende Gleichung aus der Kalibriergeraden:

$$Absorption = 0.05228 \cdot Konzentration_{Bradford} + 0.00448 \quad \textbf{(5)}$$

Durch Umstellung der Gleichung ergab sich für die Konzentration:

$$Konzentration_{Bradford} = \frac{Absorption - 0.00448}{0.05228} \quad (6)$$

Damit gilt für die Konzentration in der Ausgangsprobe:

$$Konzentration_{Probe} = Konzentration_{Bradford} \cdot 20 \cdot Verdünnungfaktor \quad (7)$$

Zur Bestimmung einer unbekannten Konzentration wurden 950 µL der 1xBradford-Lösung mit 50 µL der Probe versetzt, invertiert und für 5 min inkubiert. Der Nullabgleich erfolgte mit einer Lösung aus 950 µL 1xBradford-Lösung und 50 µL des reinen Puffers der Probe, welche auch invertiert und für 5 min inkubiert wurde. Lag die Absorption nicht zwischen 0.1 und 0.8 musste die Probe verdünnt und nochmals entsprechend für die Messung behandelt werden. Die Konzentration der Probe berechnete sich mit allen Verdünnungen entsprechend nach Gleichung (7).

2.2.2.11 Konzentrationsbestimmung mit der Amidoschwarz-Fällung

Alternativ konnte die Konzentrationsbestimmung mit dem Farbstoff Amidoschwarz 10B durchgeführt werden, wobei hier das Protein mit dem Farbstoff einen 1:1 Komplex bildet, der ausfällt. Nach einem Waschschritt und Trocknung des gefällten Protein-Farbstoff-Komplexes wird der Farbstoff-Komplex wieder gelöst und bei 625 nm vermessen. Zur Bestimmung einer unbekannten Proteinkonzentration musste eine Kalibriergerade mit verschieden BSA-Konzentrationen aufgenommen werden, die aus BSA und Wasser hergestellt wurden. Zur Bestimmung wurden 800 µL Amidoschwarz Puffer A mit 200 µL der verschiedenen Konzentrationen versetzt, invertiert und für 10 min bei 13000 rpm in der Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Fällung mit 1000 µL Amidoschwarz Puffer B versetzt. Nach erneutem Zentrifugieren für 10 min bei 13000 rpm wurde wieder der Überstand verworfen. Der Niederschlag trocknete bei Raumtemperatur für 15 min und wurde mit 1000 µL Amidoschwarz Puffer C aufgenommen.

Dann wurden mindestens 50 µL der Lösung in UV-Küvetten (Eppendorf) am UV-VIS-Spektrometer SmartSpec™ 3000 (BIO RAD) bei 625 nm vermessen. Der Nullabgleich erfolgte mit Amidoschwarz Puffer C. Durch Auftragen der verschiedenen Endkonzentrationen in Abhängigkeit ihrer Absorption bei 625 nm ergab sich folgende Kalibriergerade in Abbildung 2.12.

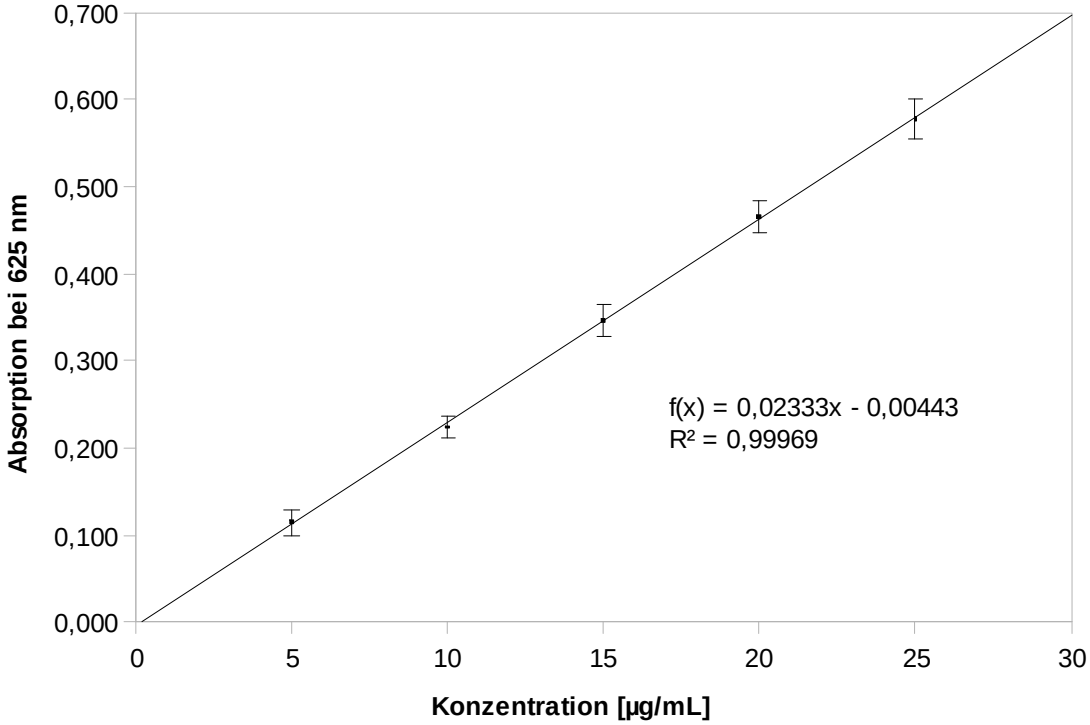

Abbildung 2.12: Auftragung der Absorption bei 625 nm der verschiedenen BSA-Konzentrationen und die daraus resultierende Kalibriergerade sowie Gleichung für die Amidoschwarz-Fällung.

Aus Abbildung 2.12 ergab sich folgende Gleichung aus der Kalibriergeraden:

$$Absorption = 0.02333 \cdot Konzentration_{Amidoschwarz} - 0.00443 \quad \textbf{(8)}$$

Durch Umstellung der Gleichung ergab sich für die Konzentration:

$$Konzentration_{Amidoschwarz} = \frac{Absorption + 0.00443}{0.02333} \quad \textbf{(9)}$$

Damit gilt für die Konzentration einer Probe:

$$Konzentration_{Probe} = Konzentration_{Amidoschwarz} \cdot 5 \cdot Verdünnungfaktor \quad \textbf{(10)}$$

Zur Bestimmung einer unbekannten Konzentration wurden 800 µL vom Amidoschwarz Puffer A zu 200 µL der Probe gegeben und in gleicher Weise verfahren. Lag die Absorption nicht zwischen 0.1 und 0.8 musste die Probe verdünnt und nochmals entsprechend für die Messung behandelt werden. Die Konzentration der Probe berechnete sich mit allen Verdünnungen entsprechend nach Gleichung (10).

2.2.2.12 Thermal Shift Assay

Mit Hilfe dieses Assays wurde die Stabilität eines Proteins in einer Lösung untersucht, indem diese langsam erwärmt wurde. Der Fluoreszenzfarbstoff Sypro Orange (Invitrogen) (Extinktionswellenlänge: 485 nM; Emissionswellenlänge: 575 nm), der in wässriger oder hydrophiler Umgebung nur geringe Fluoreszenz zeigt, kann sich auf Grund der Erwärmung und der damit einhergehenden Denaturierung des Proteins in die lipophilere Umgebung des Proteins einlagern, was zu einer deutlichen Erhöhung der Fluoreszenz führt. Wird nun die Fluoreszenz in Abhängigkeit der Temperatur aufgetragen, ergibt sich ein Verlauf wie in Abbildung 2.13. Deutlich ist die Zunahme der Fluoreszenz bis zu einem Maximum zu sehen, danach fällt die Fluoreszenz langsam wieder ab, da der Farbstoff durch Agglomeration des Proteins verdrängt wird. Das gefällte Lot vom Schnittpunkt auf die Temperaturachse des halbmaximalen Wertes zwischen anfänglichem Minimum und dem Maximum der Messkurve entspricht der Schmelztemperatur T_M, welche ein Maß für die Stabilität des Proteins darstellt. Bestandteile des Puffers, die das Protein stabilisieren, führen daher zum Anstieg der Schmelztemperatur und Bestandteile, die das Protein destabilisieren, erniedrigen die Schmelztemperatur. Das Erwärmen und die Detektion der Fluoreszenzänderung wurde durch den Real-Time-PCR-Cycler iQ 5 (BIO RAD) durchgeführt, wobei 96-Well Platten (BIO RAD) für die unterschiedlichen Bedingungen benutzt wurden. Da die Proben stark erwärmt wurden, mussten die Platten zum Schutz vor Verdunstung mit durchsichtiger Adhäsionsfolie (BIO RAD) versiegelt werden.

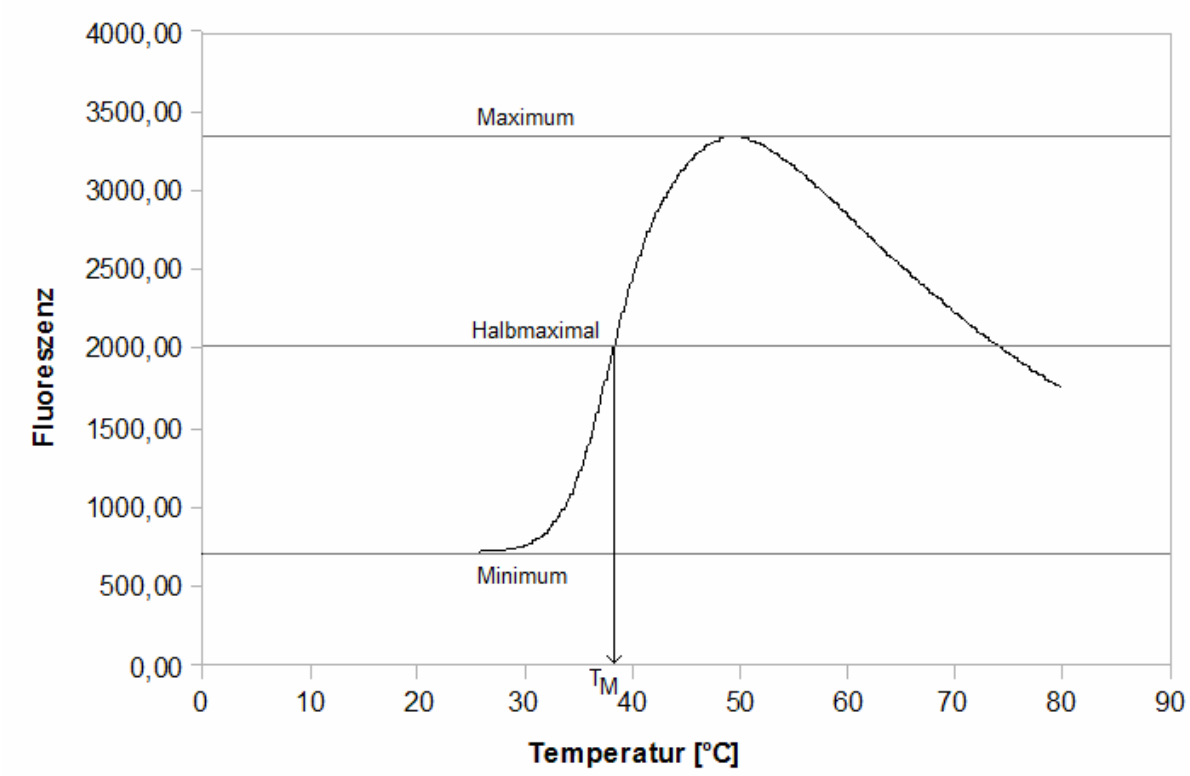

Abbildung 2.13: Kurve einer Thermofluoro-Messung mit Maximum und Minimum der Fluoreszenz, wobei das gefällte Lot vom Schnittpunkt der Halbmaximalen Fluoreszenz mit der Messkurve zur Temperaturachse die Schmelztemperatur T_M ergibt.

In einem 25 µL Ansatz befanden sich final 25 µM Protein und 2x Sypro Orange. Die weiteren Komponenten, wie die Konzentration von Natriumchlorid oder der pH-Wert, wurden für die jeweilige Untersuchung angepasst. Das Temperaturprogramm begann bei 20 °C und erhöhte pro 30 s die Temperatur um 0.5 °C bis eine Endtemperatur von 80 °C erreicht war. Die Auswertung erfolgte über das Programm Exel der Firma Microsoft.

2.2.2.13 Thermophorese Assay

Unter Thermophorese versteht man die gerichtete Bewegung von Teilchen entlang eines Wärmegradienten, die in der Regel aus dem wärmeren in den kälteren Bereich erfolgt. Das thermophoretische Verhalten eines Teilchens hängt von dessen Größe, Ladung und Hydrationshülle ab.

Im Fall eines Proteins werden diese Größen wiederum von der An- oder Abwesenheit eines gebundenen Liganden beeinflusst, weshalb das thermophoretische Verhalten eines Proteins in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration die Bestimmung von Bindungsaffinitäten ermöglicht. Die Thermophoresemessung erfolgt in Glaskapillaren, welche mit wenigen Mikrolitern Probelösung gefüllt sind. Die Konzentration des fluoreszenzmarkierten Proteins wird dabei konstant gehalten, die Konzentration des unmarkierten Liganden variiert. Der Temperaturgradient ist auf einen mikroskopisch kleinen Bereich beschränkt (daher *Microscale*-Thermophorese) und wird mit einem IR-Laser (λ = 1480 nm) erzeugt. Als Thermophoresesignal dient das Verhältnis der Proteinkonzentration im wärmeren Bereich zu der Proteinkonzentration im kälteren Bereich, welches wiederum aus der Fluoreszenz der Lösung im erwärmten Bereich vor und eine bestimmte Zeit (ca. 10 s) nach Einschalten des Lasers ermittelt wird. Die Fluoreszenzdetektion erfolgt mit einem Epifluoreszenzmikroskop, welches in die verwendete Messapparatur integriert ist. Auftrag des Thermophoresesignals gegen die Konzentration des Liganden ergibt bei logarithmischer Skalierung der Abszisse einen sigmoidalen Kurvenverlauf, aus dem mittels Gleichung 11 die Dissoziationskonstante K_D des Protein-Ligand-Komplexes berechnet werden kann. Da die manuelle Berechnung sehr aufwändig ist, wird zur Auswertung das Analyseprogramm NanoTemper Analysis 1.2.009 der Firma NanoTemper Technologies benutzt. Eine genaue Beschreibung der Micrsoscale-Thermophorese-Methodik sowie der zu Grunde liegenden Theorie ist in dem Review von Jerabek-Willemsen *et al.* (2011) nachzulesen [101].

T = Thermophoresesignal
U = ungebundener Bereich, minimales Signal, unteres Plateau
B = gebundener Bereich, maximales Signal, oberes Plateau
c_P = Konzentration vom gelabelten Protein
c_I = Konzentration des Interaktionspartners
K_D = Dissoziationskonstante

$$T = U + (B - U) \cdot \frac{c_P + c_I + K_D - \sqrt{(c_P + c_I + K_D)^2 - 4 \cdot c_P \cdot c_I}}{2 \cdot c_P} \quad \textbf{(11)}$$

Zur Detektion des zu untersuchenden Proteins wurde dieses mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 647 markiert (Extinktionswellenlänge: 650 nm; Emissionswellenlänge: 668 nm). Dabei wurde folgender Ansatz pipettiert und für 30 min im Dunklen inkubiert.

20 µL	100 µM IpgC
7.5 µL	1 µg/µL Alexa 647
ad 200 µL	Labeling Puffer

Anschließend wurde der Ansatz vom restlichen Farbstoff befreit, indem mit einer PD10 Säule (GE Healthcare) an der ÄKTA bei einer Flussrate von 1 mL/min für 10 mL auf Thermophorese-Puffer umgepuffert wurde. Das Eluat von 1.5 mL bis 1.9 mL wurde aufgefangen und der Rest verworfen. Die Konzentration des markierten Proteins wurde mit dem Bradford-Assay bestimmt und mit Thermophorese-Puffer auf 0.5 µM eingestellt.

Um die Interaktion von fluoreszenzmarkiertem IpgC mit verschiedenen synthetisch hergestellten Peptiden zu untersuchen, wurden die Peptide mit der Feinwaage CP2P (Satorius) eingewogen, in reinem DMSO angelöst und mit Thermophorese-Puffer aufgefüllt, so dass eine 2.5% DMSO-Lösung erhalten wurde. In der Verdünnungsreihe wurden durch 1:1 Verdünnungen mit Thermophorese-Puffer plus 2.5 % DMSO insgesamt 16 Lösungen erstellt. Jeweils 50 µL einer Verdünnung wurden mit 50 µL der markierten 0.5 µM Proteinlösung versetzt und für 3 h im Dunklen inkubiert. Die Verdünnungen wurden für 10 min bei 4 °C mit 13000 rpm in der Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus) abzentrifugiert.

Für die Untersuchung der Wechselwirkung von fluoreszenzmarkiertem IpgD oder GST-Spa-orf11 mit unmarkiertem IpgE wurde die Konzentration von IpgE mit dem UV-VIS-Messgerät SmartSpec™ 3000 (BIO RAD) bestimmt und durch Verdünnung mit SEC6.0-Puffer auf die gewünschte Konzentration eingestellt. In einer Verdünnungsreihe wurden durch 1:1-Verdünnungen mit SEC6.0-Puffer insgesamt 16 Lösungen hergestellt. Jeweils 50 µL einer verdünnten Lösung wurden mit 50 µL der markierten 0.5 µM Proteinlösung versetzt und für 1 h im Dunklen inkubiert. Im Anschluss wurden die Verdünnungen 10 min lang bei 4 °C mit 13000 rpm in der Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus) abzentrifugiert.

Ca. 10 µL jeder Lösung wurden in eine Standard-Kapillare (NanoTemper Technologies) aufgezogen, so dass diese ungefähr zur Hälfte gefüllt war, und am Thermophorese-Messgerät Monolith NT.015 (NanoTemper Technologies) vermessen. Dabei wurde die Messung bei jeder Kapillare an drei verschiedenen Positionen durchgeführt. Diese Prozedur wurde im Anschluss für jede Lösung noch zweimal wiederholt. Auf diese Weise wurden aus insgesamt drei Messungen mit jeweils drei verschiedenen Messpositionen neun Einzelmesswerte pro Konzentration erhalten. Bei jeder Messung wurde die Laser On Time auf 10 s und die Laser Power auf 30% gesetzt. Die Auswertung aller Daten erfolgte mit der Analysesoftware NanoTemper Analysis 1.2.009 der Firma NanoTemper Technologies, wobei als Relation für das Thermophoresesignal die Option „Thermophoresis+Jump“ gewählt wurde, die der Relation in der Abbildung 2.14 entspricht. Der Verlauf der gemessen Kurven entsprach der in Abbildung 2.14 dargestellten Kurven.

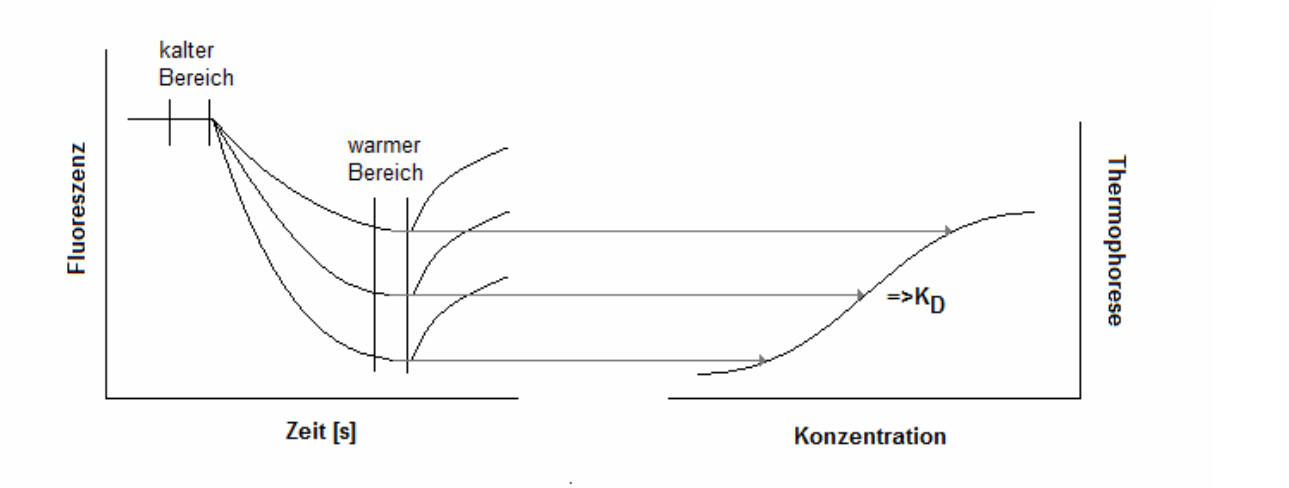

Abbildung 2.14: Der linke Teil gibt die Fluoreszenzsignale wieder, die mit ausgeschaltetem IR-Laser und eingeschaltetem IR-Lasers für verschiedene Konzentrationen erhalten werden. Aus den Relationen vom warmen Bereich zum kalten Bereich ergibt sich das Thermophoresesignal. Wird dieses gegen die entsprechende Konzentration logarithmisch aufgetragen, wird eine sigmoidale Kurve erhalten, aus der der K_D-Wert mittels Auswerte-Software ermittelt werden kann.

2.2.2.14 Qualitative Interaktionsstudien mit Hilfe von Affinitätssäulen

Proteine, die mit einem Affinitäts-*Tag* versehen sind, binden selektiv an ihre spezielle Affinitätsmatrix. Da die Bindung an diese Matrix meist bei physiologischen Bedingungen stattfindet, können die Fusionsproteine weitere Interaktionen eingehen. Daher kann nach Binden eines Fusionsproteins an die Matrix ein weiteres Protein, das keine Interaktion mit dem Säulenmaterial aber mit dem ersten Protein eingeht, indirekt an die Matrix gebunden werden. Nach einem Waschschritt kann das Fusionsprotein von der Matrix eluiert werden, womit sich im Eluat das Fusionsprotein und sein Interaktionspartner befinden. Gibt es keine Interaktion zwischen beiden Proteinen wird nur das Fusionsprotein eluiert, da der hypothetische Bindungspartner bereits beim Waschschritt von der Säule entfernt wurde (siehe Abbildung 2.15).

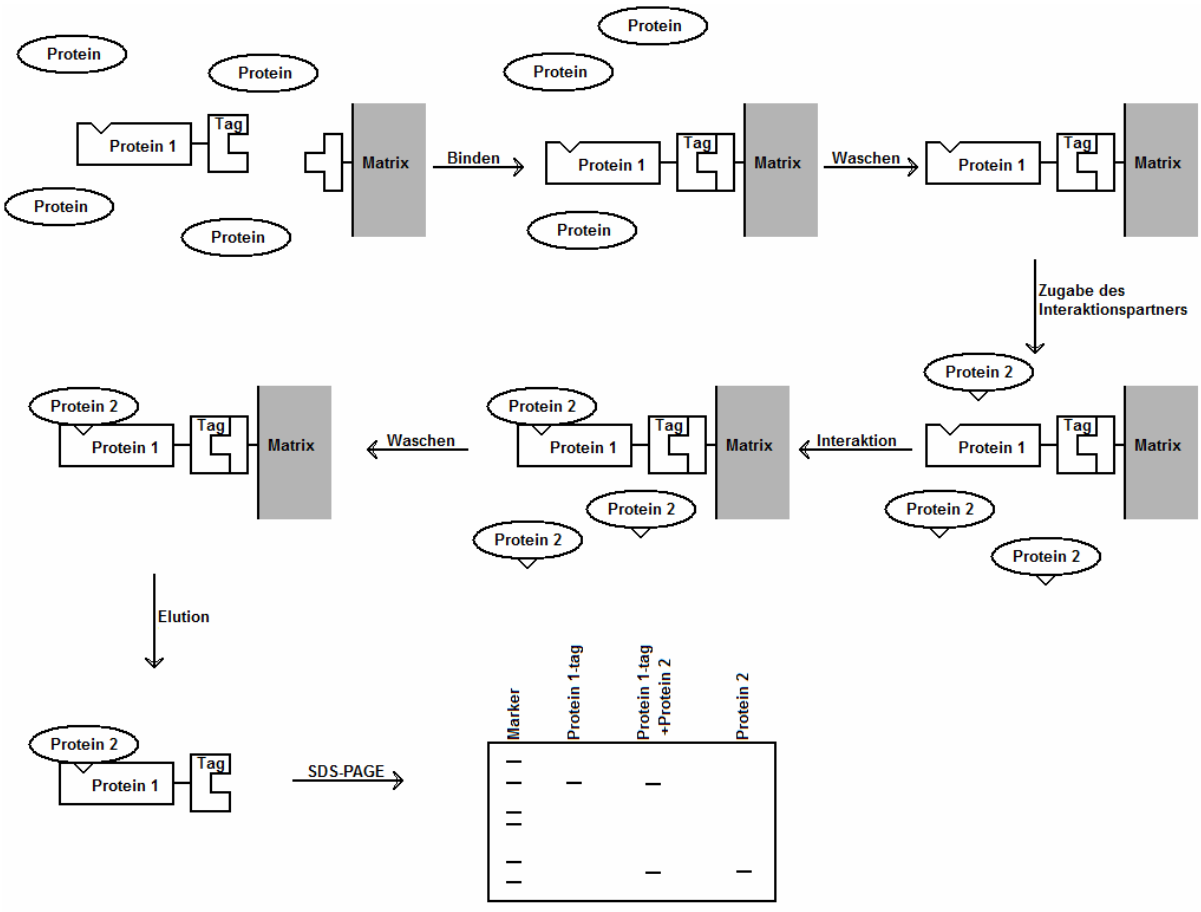

Abbildung 2.15: Schematischer Ablauf der Interaktionsstudie mittels Affinitätschromatographie.

Zur Untersuchung von Interaktionen zwischen zwei Proteinen wurde der lösliche Überstand der Lyse eines Fusionsproteins aus GST-*Tag* und Zielprotein auf die Säule XK16/20 (Pharmacia Biotech), die mit 15 mL Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow befüllt war, mit der Peristaltikpumpe Pharmacia LKB Pump P-1 (Pharmacia) mit 1 mL/min aufgetragen und anschließend mit 3 mL/min mit 100 mL PBS-Puffer gewaschen. Dann wurden 10 mL einer Proteinlösung des Interaktionspartners mit 1 mg/mL mit einer Geschwindigkeit von 1 mL/min aufgetragen und erneut mit 3 mL/min mit 100 mL PBS-Puffer gewaschen. Schließlich wurden die Proteine mit 50 mL Elutions-Puffer mit 3 mL/min eluiert und aufgefangen. Vom Eluat wurde eine Probe genommen und mittels SDS-PAGE untersucht, ob eine Interaktion stattgefunden hatte.

2.2.2.15 Sekundärstrukturvorhersage mit dem Internet-Interface NetSurfP

Zum Vorhersagen von Sekundärstrukturen wurde das Internet-Interface NetSurfP benutzt, welches unter folgender Internetadresse verfügbar ist:

http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/

Nach Eingabe einer Proteinsequenz werden die Wahrscheinlichkeiten für Loop-, α-Helices und β-Faltblatt-Regionen berechnet und ausgegeben. Die Berechnung beruht auf einem von Lundegraard *et al.* entwickelten Algorithmus (2009) [106].

2.2.2.16 Präparation von IpgE

10 mL LB-Medium wurden mit 10 µL Ampicillin-Lösung und 10 µL Chloramphenicol-Lösung unter der Sterilbank KS15 (Thermo SCIENTIFIC) versetzt. Dazu wurde der Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL mit dem Plasmid pGEX-4T-Mod-ipgE gegeben und über Nacht im Schüttelinkubator Innova 4200 (New Brunswick Scientific) inkubiert.

Mit der Übernachtkultur wurden 1.6 L LB-Medium angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0.6-0.7 im Schüttelinkubator Innova 4300 (New Brunswick Scientific) herangezogen. Die OD_{600} wurde von 1 mL Proben am UV-VIS-Messgerät SmartSpec™ 3000 (BIO RAD) mit Einmalküvetten (ROTH) gemessen. Die Induktion der Genexpression erfolgte mit 1.6 mL einer 1 M IPTG-Lösung, anschließend wurde für 12 h bei 15 °C inkubiert.

Die Kultur wurde auf zwei 400 mL Beckman-"Tubes" verteilt und bei 4 °C, 6000 rpm für 15 min an der Zentrifuge Avanti J-25 (Beckman Coulter) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jedes Pellet wurde in 35 mL PBS-Puffer für die Lyse resuspendiert und fünfmal mit dem Ultraschallerzeuger Sonifier 250 (Brandson) für 1 min bei 70% Duty Cycle und einer Stärke von 3/10 mit behandelt.

Der lösliche Bestandteil wurde bei 20000 rpm für 45 min mit der Zentrifuge Avanti J-25 (Beckman Coulter) von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Der Überstand wurde auf die mit 15 mL Glutathion-Sepharose gefüllte XK16/20-Säule (Pharmacia Biotech) mittels Peristaltikpumpe Pharmacia LKB Pump P-1 (Pharmacia) mit einer Geschwindigkeit von 1 mL/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 200 mL PBS-Puffer bei 3 mL/min gewaschen. Mit einer Spritze wurden langsam 15 mL PBS-Puffer, in dem zuvor 375 U Thrombin gelöst worden waren, auf die Säule gegeben. Die Säule wurde für 12 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das vom GST-*Tag* befreite Zielprotein mit PBS-Puffer mit 1 mL/min von der Säule an der ÄKTA (Amercham pharmacia biotech) eluiert. Je 10 mL des Eluats wurden an der ÄKTA mit einem 10 mL Loop mittels XK16/40 (Pharmacia Biotech), die mit 60 mL Sephadex G-25 befüllt war, auf BisTris-Puffer umgepuffert. Die umgepufferten Fraktionen wurden auf die HiTrap™ DEAE FF 5 mL (GE Healthcare) mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Die Elution erfolgte durch einen Stufengradient mit BisTris-Elutionspuffer. Zuerst wurden bei einem Anteil von 30:70 von BisTris-Elutionspuffer zu BisTris-Puffer Verunreinigungen wie Thrombin entfernen. Bei einem Anteil von 80:20 von BisTris-Elutionspuffer zu BisTris-Puffer wurde schließlich das Zielprotein in einem Volumen von 10 mL eluiert, siehe Abbildung 2.16. Das Eluat wurde direkt mit dem 10 mL Loop auf die HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade (Amercham Biosciences) mit 4 mL/min aufgetragen, wobei die Elution mit SEC6.0 Puffer erfolgte. Das Zielprotein eluiert bei einem Volumen von 160 mL bis 220 mL, siehe Abbildung 2.17.

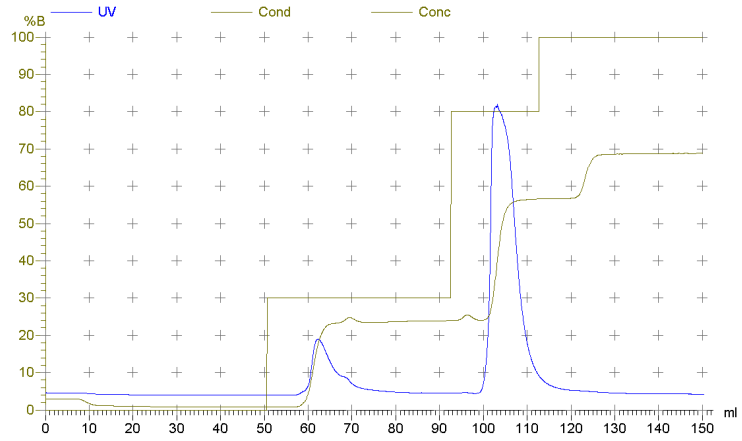

Abbildung 2.16: Elutionsprofil der HiTrap™ DEAE FF 5 mL mit der Elution von Verunreinigungen bei einem Anteil von 30:70 von BisTris-Elutionspuffer zu BisTris-Puffer. Die Elution des Zielproteins erfolgte bei einem Anteil von 80:20 von BisTris-Elutionspuffer zu BisTris-Puffer in 10 mL.

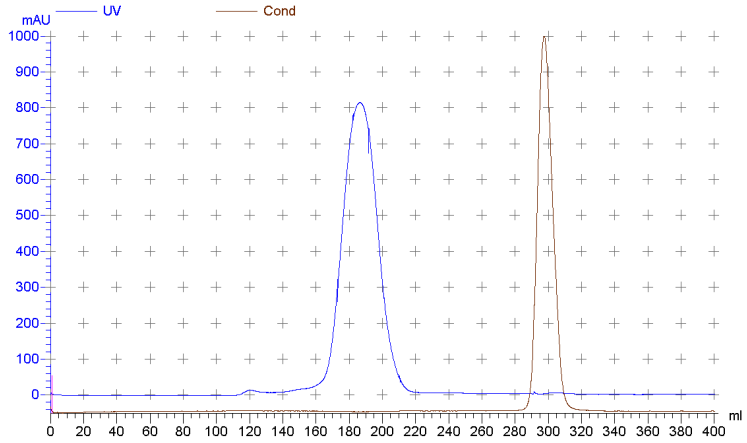

Abbildung 2.17: Elutionsprofil der HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade mit dem Zielprotein zwischen 160 mL und 220 mL.

Das Eluat wurden mit den Konzentratoren Vivaspin 20 MWCO 10.000 (Satorius stedim biotech) an der Zentrifuge Multifuge 3 (Heraeus) auf 10 mg/mL ankonzentriert. Die Ausbeute betrug 20 mg gereinigtes IpgE pro Liter Bakterienkultur .

2.2.2.17 Präparation von IpgC und der trunkierten Formen IpgC0,-4S

10 mL LB-Medium wurden unter der Sterilbank KS15 (Thermo SCIENTIFIC) mit 10 µL Ampicillin-Lösung und 10 µL Chloramphenicol-Lösung versetzt. Dazu wurde der Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL transformiert mit dem Plasmid pGEX-4T-Mod-ipgC oder pHW1-ipgC0,-4S, gegeben und über Nacht im Schüttelinkubator Innova 4200 (New Brunswick Scientific) inkubiert.

Mit der Übernachtkultur wurden 1.6 L LB-Medium angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0.6-0.7 im Schüttelinkubator Innova 4300 (New Brunswick Scientific) herangezogen. Die OD_{600} wurde von 1 mL Proben am UV-VIS-Messgerät SmartSpec™ 3000 (BIO RAD) mit Einmalküvetten (ROTH) gemessen. Die Induktion erfolgte mit 1.6 mL einer 1 M IPTG-Lösung. Anschließend wurde für 12 h bei 15 °C inkubiert.

Die Kultur wurde auf zwei 400 ml Beckman-"Tubes" verteilt und bei 4 °C, 6000 rpm für 15 min an der Zentrifuge Avanti J-25 (Beckman Coulter) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jedes Pellet wurde in 35 mL PBS+S-Puffer für die Lyse resuspendiert und fünfmal mit dem Ultraschallerzeuger Sonifier 250 (Brandson) für 1 min bei 70% Duty Cycle und einer Stärke von 3/10 mit behandelt.

Der lösliche Bestandteil wurde bei 20000 rpm für 45 min an der Zentrifuge Avanti J-25 (Beckman Coulter) von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Der Überstand wurde auf die mit 15 mL Glutathion-Sepharose gefüllte XK16/20-Säule (Pharmacia Biotech) mittels Peristaltikpumpe Pharmacia LKB Pump P-1 (Pharmacia) mit einer Geschwindigkeit von 1 mL/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 200 mL PBS+S-Puffer bei 3 mL/min gewaschen. Mit einer Spritze wurden langsam 15 mL PBS+S-Puffer, in dem zuvor 375 U Thrombin gelöst worden waren, auf die Säule gegeben.

Die Säule wurde für 12 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das vom GST-*Tag* befreite Zielprotein mit PBS+S-Puffer mit 1 mL/min von dieser Säule an der ÄKTA (Amercham pharmacia biotech) eluiert. Nachfolgend wurde zusätzlich eine HiTrap™ Benzamidin FF 1 mL (GE Healthcare) angeschlossen, um das Thrombin zu entfernen, gefolgt von einer GSTTrap™ FF 5 mL, um möglichen GST-*Tag* abzufangen. Das Eluat wurde mit den Konzentratoren Vivaspin 20 MWCO 10.000 (Satorius stedim biotech) an der Zentrifuge Multifuge 3 (Heraeus) auf ein Volumen von 10 mL ankonzentriert und dann über den 10 mL Loop auf die HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade (Amercham Biosciences) mit einer Flussrate von 4 mL/min aufgetragen, wobei die Elution mit SEC7.5 Puffer erfolgte.

Das Zielprotein eluierte bei einem Volumen von 150 mL bis 210 mL, siehe Abbildung 2.18 für IpgC und Abbildung 2.19 für IpgC0,-4S. Das Eluat wurden mit den Konzentratoren Vivaspin 20 MWCO 10.000 (Satorius stedim biotech) an der Zentrifuge Multifuge 3 (Heraeus) auf ein Volumen von 10 mg/mL ankonzentriert. Es konnten 30 mg IpgC beziehungsweise 10 mg IpgC0,-4S aus 1 L Kultur aufgereinigt werden.

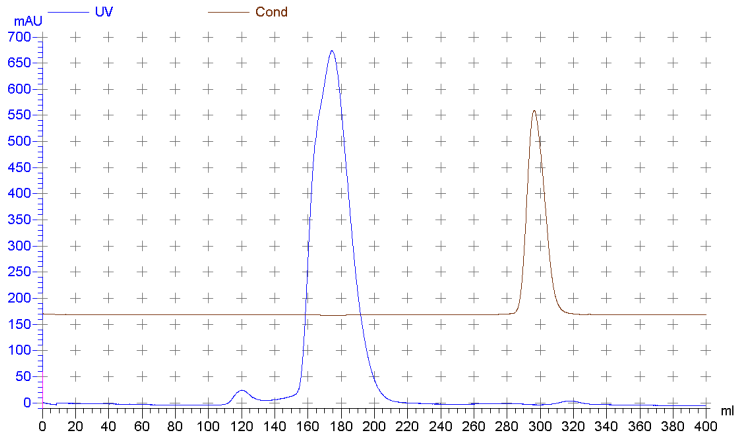

Abbildung 2.18: Elutionsprofil der HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade mit Zielprotein IpgC bei 150 mL bis 210 mL.

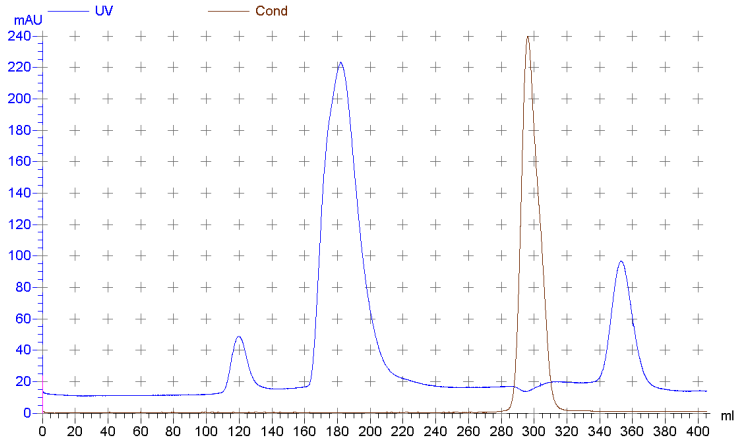

Abbildung 2.19: Chromatogramm der abschließenden Größenausschlusschromatographie während der Reinigung der verkürzten IpgC-Variante durchgeführt mit einer HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade Säule. Die Elution von IpgC0,-4S erfolgte in dem Volumenbereich zwischen 160 mL und 210 mL.

2.2.2.18 Präparation von IpgA

10 mL LB-Medium wurden mit 10 µL Ampicillin-Lösung und 10 µL Chloramphenicol-Lösung versetzt. Dazu wurde der Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL transformiert mit dem Plasmid pGEX-4T-Mod-ipgA gegeben und über Nacht im Schüttelinkubator Innova 4200 (New Brunswick Scientific) inkubiert. Die restliche Aufreinigung erfolgte analog zur Präparation von IpgC. Die Ausbeute belief sich auf 10 mg Protein aus 1 L Kultur, wobei das Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie in Abbildung 2.20 wiedergegeben ist.

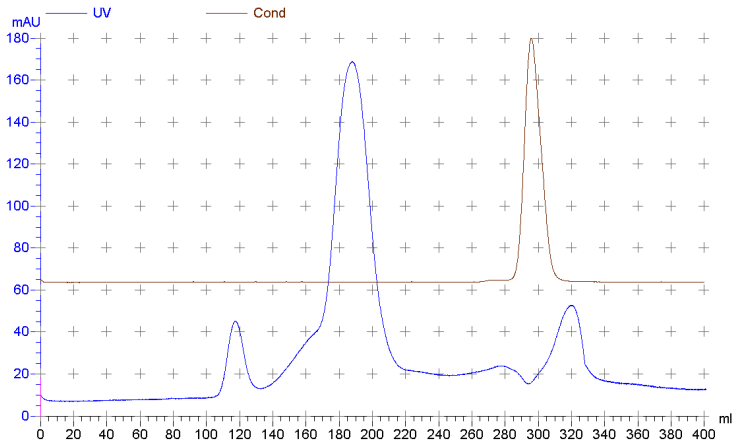

Abbildung 2.20: Elutionsprofil der HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade mit Zielprotein IpgA bei 170 mL bis 210 mL.

2.2.2.19 Präparation von Spa15

10 mL LB-Medium wurden mit 10 µL Ampicillin-Lösung und 10 µL Chloramphenicol-Lösung versetzt. Dazu wurde der Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL transformiert mit dem Plasmid pGEX-4T-Mod-spa15 gegeben und über Nacht im Schüttelinkubator Innova 4200 (New Brunswick Scientific) inkubiert, die restliche Aufreinigung erfolgte analog zur Präparation von IpgC mit dem Elutionsprofil der Größenausschlußchromatographie in Abbildung 2.21. Die Ausbeute belief sich auf 15 mg Protein aus 1 L Kultur.

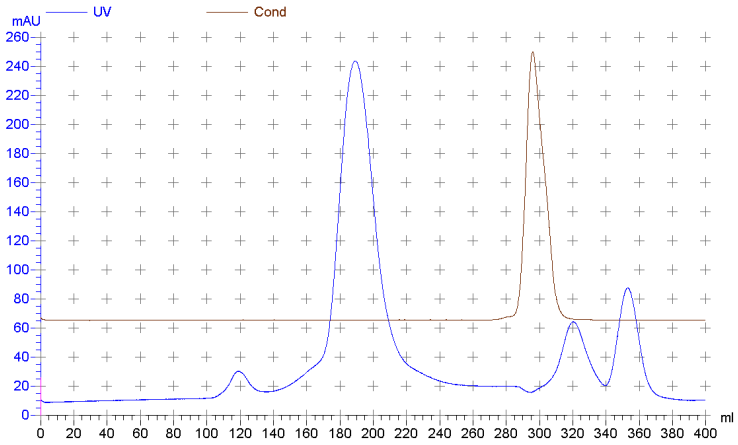

Abbildung 2.21: Elutionsprofil der HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade mit Zielprotein Spa15 bei 170 mL bis 220 mL.

2.2.2.20 Präparation von IpgD

10 mL LB-Medium wurden mit 10 µL Ampicillin-Lösung und 10 µL Chloramphenicol-Lösung versetzt. Dazu wurde der Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL transformiert mit dem Plasmid pGEX-4T-Mod-ipgD gegeben und über Nacht im Schüttelinkubator Innova 4200 (New Brunswick Scientific) inkubiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte bis zum Aufkonzentrieren des von der Glutathion-Sepharose-Säule erhaltenen Eluats analog zur Präparation von IpgC. Das Eluat wurde mit den Konzentratoren Vivaspin 20 MWCO 30.000 (Satorius stedim biotech) an der Zentrifuge Multifuge 3 (Heraeus) auf 10 mL ankonzentriert und dann über den 10 mL Loop auf die HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade (Amercham Biosciences) mit 4 mL/min aufgetragen, wobei die Elution mit SEC7.5+S Puffer erfolgte. Das Zielprotein eluiert bei einem Volumen von 210 mL bis 260 mL (siehe Abbildung 2.22). Die Ausbeute belief sich auf 3 mg Protein aus 1 L Kultur.

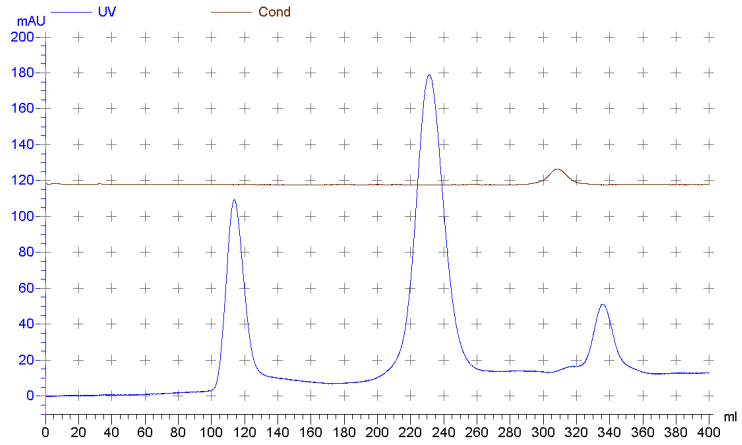

Abbildung 2.22: Elutionsprofil der HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade vom Zielprotein IpgD ab 210 mL bis 260 mL.

2.2.2.21 Präparation der trunkierten Form IpgD-30,-8

10 mL LB-Medium wurden mit 10 µL Ampicillin-Lösung und 10 µL Chloramphenicol-Lösung versetzt. Dazu wurde der Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL transformiert mit dem Plasmid pHW1-ipgD-30,-8 gegeben und über Nacht im Schüttelinkubator Innova 4200 (New Brunswick Scientific) inkubiert. Mit der Übernachtkultur wurden 1.6 L LB-Medium angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0.6-0.7 im Schüttelinkubator Innova 4300 (New Brunswick Scientific) herangezogen. Die OD_{600} wurde von 1 mL Proben am UV-VIS-Messgerät SmartSpec™ 3000 (BIO RAD) mit den Einmalküvetten (ROTH) gemessen. Die Induktion erfolgte mit 1.6 mL einer 1 M IPTG-Lösung, anschließend wurde für 12 h bei 15 °C inkubiert.
Die Kultur wurde auf zwei 400 ml Beckman-"Tubes" verteilt und bei 4 °C, 6000 rpm für 15 min an der Zentrifuge Avanti J-25 (Beckman Coulter) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jedes Pellet wurde in Ni-Binde-Puffer für die Lyse resuspendiert und fünfmal mit dem Ultraschallerzeuger Sonifier 250 (Brandson) für 1 min bei 70% Duty Cycle und einer Stärke von 3/10 mit behandelt.

Der lösliche Bestandteil wurde bei 20000 rpm für 45 min an der Zentrifuge Avanti J-25 (Beckman Coulter) von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Der Überstand wurde auf die HisTrap™ FF 5 mL-Säule (GE Healthcare) mittels Peristaltikpumpe Pharmacia LKB Pump P-1 (Pharmacia) mit einer Geschwindigkeit von 2 mL/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 100 mL Ni-Binde-Puffer mit 3 mL/min gewaschen. Mittels Stufengradient wurde mit einem Gemisch von Ni-Elutions-Puffer und Ni-Binde-Puffer im Verhältnis von 15:85 unspezifisch gebundenes Protein eluiert. Mit einem Gemisch von Ni-Elutions-Puffer zu Ni-Binde-Puffer im Verhältnis von 60:40 wurde schließlich das Zielprotein eluiert (siehe Abbildung 2.23).

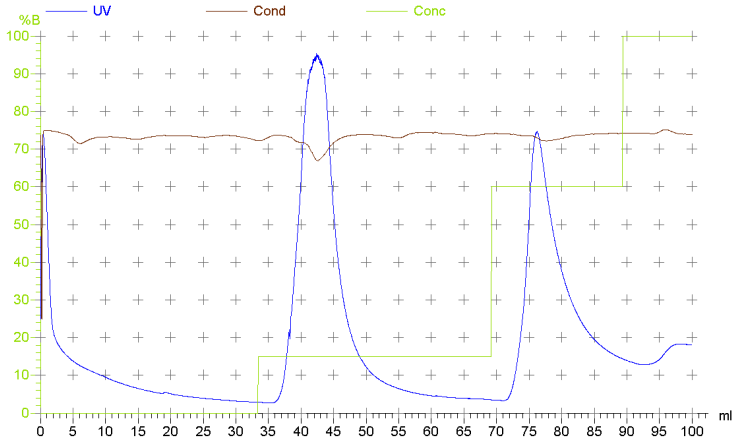

Abbildung 2.23: Elutionsprofil der HisTrap™ FF-Säule vom Zielprotein IpgD-30,-8, mit der Elution von unspezifisch gebundenes Protein bei 15:85 von Ni-Elutions-Puffer zu Ni-Binde-Puffer und von Zielprotein mit 60:40 von Ni-Elutions-Puffer zu Ni-Binde-Puffer.

Dieses Eluat wurde mittels Peristaltikpumpe Pharmacia LKB Pump P-1 (Pharmacia) mit einer Geschwindigkeit von 1 mL/min direkt auf eine mit 15 mL Glutathion-Sepharose gefüllte XK16/20-Säule (Pharmacia Biotech) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 200 mL PBS+S-Puffer bei einer Flussrate von 3 mL/min gewaschen. Mit einer Spritze wurden langsam 15 mL PBS+S-Puffer, in denen zuvor 375 U Thrombin gelöst worden waren, auf die Säule gegeben. Die Säule wurde für 12 h bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurde das vom GST-*Tag* befreite Zielprotein mit PBS+S-Puffer mit 1 mL/min von dieser Säule an der ÄKTA (Amercham pharmacia biotech) eluiert. Nachfolgend wurde zusätzlich eine HiTrap™ Benzamidin FF 1 mL (GE Healthcare) angeschlossen, um das Thrombin zu entfernen, gefolgt von einer GSTTrap™ FF 5 mL, um mögliches GST-*Tag* abzufangen.

Das Eluat wurde mit den Konzentratoren Vivaspin 20 MWCO 30.000 (Satorius stedim biotech) an der Zentrifuge Multifuge 3 (Heraeus) auf 10 mL ankonzentriert und dann über den 10 mL Loop auf die HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade (Amercham Biosciences) mit 4 mL/min aufgetragen, wobei die Elution mit SEC7.5+S Puffer erfolgte. Das Zielprotein eluierte bei einem Volumen von 220 mL bis 250 mL, siehe Abbildung 2.24.

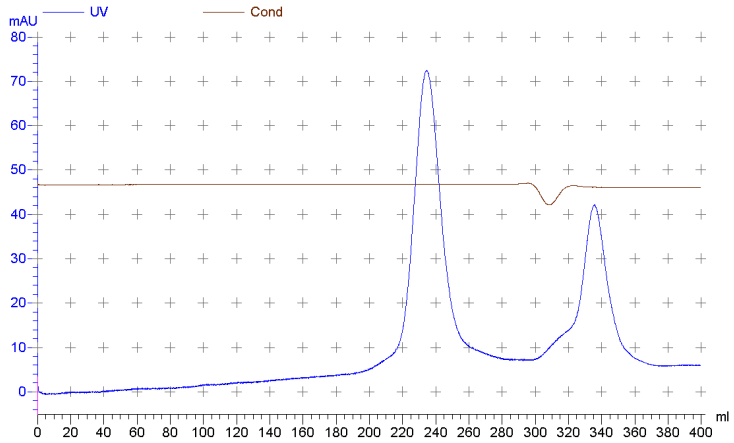

Abbildung 2.24: Elutionsprofil der HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade vom Zielprotein IpgD-30,-8.

Das Eluat wurden mit den Konzentratoren Vivaspin 20 MWCO 30.000 (Satorius stedim biotech) an der Zentrifuge Multifuge 3 (Heraeus) auf 10 mg/mL ankonzentriert. Die Ausbeute betrug 1 mg Protein aus 1 L Kultur.

2.2.2.22 Präparation von GST-Spa-orf11

10 mL LB-Medium wurden mit 10 µL Ampicillin-Lösung und 10 µL Chloramphenicol-Lösung versetzt. Dazu wurde der Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL transformiert mit dem Plasmid pGEX-4T-Mod-spa-orf11 gegeben und über Nacht im Schüttelinkubator Innova 4200 (New Brunswick Scientific) inkubiert. Mit der Übernachtkultur wurden 1.6 L LB-Medium angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0.6-0.7 im Schüttelinkubator Innova 4300 (New Brunswick Scientific) herangezogen. Die OD_{600} wurde von 1 mL Proben am UV-VIS-Messgerät SmartSpec™ 3000 (BIO RAD) mit den Einmalküvetten (ROTH) gemessen. Die Induktion erfolgte mit 1.6 mL einer 1 M IPTG-Lösung. Im Anschluss wurde für 12 h bei 15 °C inkubiert.

Die Kultur wurde auf zwei 400 ml Beckman-"Tubes" verteilt und bei 4 °C, 6000 rpm für 15 min an der Zentrifuge Avanti J-25 (Beckman Coulter) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jedes Pellet wurde in 35 mL PBS+S-Puffer für die Lyse resuspendiert und fünfmal mit dem Ultraschallerzeuger Sonifier 250 (Brandson) für 1 min bei 70% Duty Cycle und einer Stärke von 3/10 mit behandelt.

Der lösliche Bestandteil wurde bei 20000 rpm für 45 min an der Zentrifuge Avanti J-25 (Beckman Coulter) von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Der Überstand wurde auf die mit 15 mL Glutathion-Sepharose gefüllte XK16/20-Säule (Pharmacia Biotech) mittels Peristaltikpumpe Pharmacia LKB Pump P-1 (Pharmacia) mit einer Geschwindigkeit von 1 mL/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 200 mL PBS+S-Puffer bei 3 mL/min gewaschen. Das Fusionsprotein wurde mit 3 mL/min mit dem GSH+S-Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde mit den Konzentratoren Vivaspin 20 MWCO 3.000 (Satorius stedim biotech) an der Zentrifuge Multifuge 3 (Heraeus) auf ein Volumen von 10 mL ankonzentriert und dann über den 10 mL Loop auf die HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade (Amercham Biosciences) mit einer Flussrate von 4 mL/min aufgetragen, wobei die Elution mit SEC7.5+S Puffer erfolgte. Das Zielprotein eluierte bei einem Volumen von 210 mL bis 240 mL (siehe Abbildung 2.25). Das Eluat wurde mit den Konzentratoren Vivaspin 20 MWCO 3.000 (Satorius stedim biotech) an der Zentrifuge Multifuge 3 (Heraeus) auf 10 mg/mL ankonzentriert. Es konnten 5 mg GST-Spa-orf11 aus 1 L Kultur aufgereinigt werden.

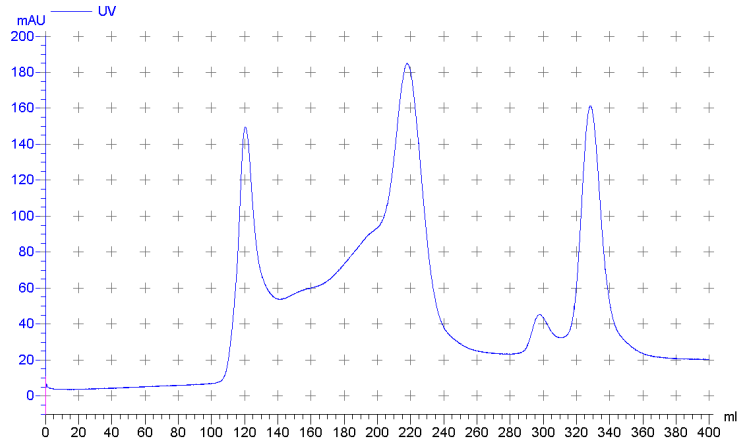

Abbildung 2.25: Elutionsprofil der HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade vom Zielprotein GST-Spa-orf11 ab 210 mL bis 240 mL.

2.2.2.23 Kristallisationsscreening

Um die Funktionsweise von Proteinen zu verstehen, ist die Kenntnis ihrer Struktur, welche durch NMR-Spektroskopie von Proteinen in Lösung und durch Röntgenbeugung von Proteinkristallen bestimmt werden kann, unentbehrlich. Durch die Kristallisation sollen Einkristalle erhalten werden, die anders als bei Kleinmolekülen bis zu 60% Wasser enthalten können. Bei der Kristallisation von Proteinen wird in der Regel die Methode der Dampfdiffusion angewendet, wobei man zwischen dem Verfahren des *Hanging-Drop* und des *Sitting-Drop* unterscheidet (s. Abbildung 2.26).

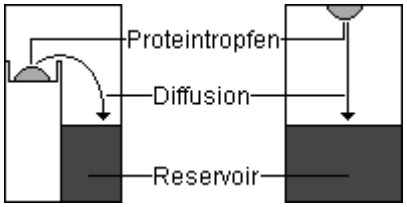

Abbildung 2.26: links die *Sitting-Drop*-Methode und rechts die *Hanging-Drop*-Methode

Durch Mischen der Reservoirlösung mit der Proteinlösung entsteht eine geringer konzentrierte Salzlösung im Vergleich zum Reservoir, welche nach Einstellen des Wasserdampfgleichgewichtes im geschlossenen System den Konzentrationsausgleich anstrebt. Durch Wasserabgabe nimmt das Volumen des Poteintropfens ab und die Konzentration von Protein und Fällungsmittel zu, was im günstigsten Fall zur Kristallisationen des Proteins führt, siehe Abbildung 2.27. Wegen der langsamen Konzentrationserhöhung wird im günstigen Fall die Entstehung eines amorphen Proteinpräzipitats verhindert, die Bildung von Einkristallen dagegen gefördert.

Zur Kristallisation wurden Platten für die *Sitting-Drop*-Methode benutzt, wobei diese 24 Kammern hatten. In diese Kammern wurden je 500 µL der Reservoirlösungen aus den Kristallisationsscreens gegeben. Jede Kammer enthielt eine Erhöhung für den Proteintropfen. Die Proteinlösung hatte eine Ausgangskonzentration von 10 mg/mL und wurde zuerst bei 4 °C für 30 min bei 13000 rpm in der Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus) von eventuell vorhandenem Präzipitat befreit.

Dann wurde die Proteinlösung in die Erhöhung gegeben und mit Reservoir-Lösung versetzt, wobei durch das Verhältnis von Proteintropfen zu Reservoir-Lösung von 1 µL+1 µL, 1.5 µL+1 µL und 2 µL+1 µL die Menge an Protein variert werden konnte. Die Platten wurden dann bei 18 °C oder 4 °C inkubiert und in Zeitabständen auf Veränderungen mit dem Mikroskop SZ-PT (Olympus) untersucht.

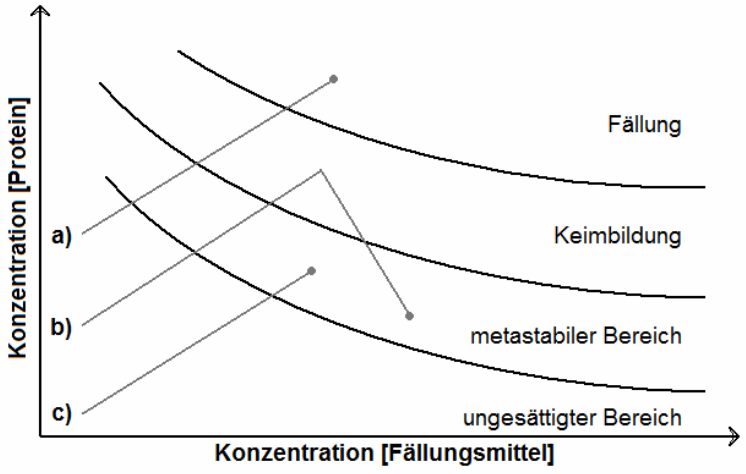

Abbildung 2.27: Phasendiagramm für die Proteinkristallisation, wobei a) einer zu hohen Anfangskonzentration an Protein entspricht und somit zum Ausfällen des Proteins führt. Nur die Konzentration bei b) führt zur Keimbildung, wodurch die Konzentration wieder abnimmt und schließlich im metastabilen Bereich endet, wobei die Konzentration von c) zu gering ist, um eine spontane Kristallkeimbildung zu ermöglichen. Die Pfeile geben die Konzentrationsentwicklung wieder, die durch die Diffusion mit der Zeit entsteht.

3 Materialien und Methoden für die organische Synthese

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

In Tabelle 3.1 sind die Standardchemikalien für Synthese und Aufreinigung aufgelistet.

Tabelle 3.1: Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge

Name	**Hersteller**
Acetonitril	Sigma-Aldrich
Dimethylformamid (DMF)	ACROS Organics
Essigsäure	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure (TFA)	Solvay Chemicals
Diisopropylethylamin (DIPEA)	Iris Biotech
Phenol	Riedel-deHaën
1,2-Ethandithiol	Fluka
Thioanisol	Fluka
N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)	Iris Biotech
Piperidin	Iris Biotech
2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HBTU)	Iris Biotech
1-Hydroxybenzotriazole (HOBT)	Orpe GenPharma
Triisoproylsilan (TIS)	Alfa Aesar
Diethylether	Sigma-Aldrich
Rink-Amid-Harz 0.72 mmol	Varian
Triton X-100	Freka Berlin

In Tabelle 3.2 sind die Aminosäuren mit Schutzgruppen für die Synthese der Peptide aufgelistet. Dabei steht vor der Aminosäure die Schutzgruppe, die an die α-Aminogruppe gekoppelt ist, wobei hier immer die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc) vorliegt.

In Klammern nach der Aminosäure, die Schutzgruppe der Seitenkette, falls diese geschützt sein muss und nachfolgend die Schutzgruppe der Säurefunktion, wobei hier immer die freie Carboxylfunktion ohne Schutzgruppe vorliegt, die durch „OH“ gekennzeichnet wird.

Tabelle 3.2: Aminosäuren mit ihren Schutzgruppen: Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe, Trt =Trityl-Gruppe, OtBU = *tert.*-Butylester-Gruppe, BOC = *tert.*-Butyloxycarbonyl-Gruppe, Pbf = 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydro-benzofuran-5-sulfonyl-Gruppe

Name	**Hersteller**
Fmoc-Alanin-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Cystein(Trt)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Aspartat(OtBu)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Glutamat(OtBu)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Phenylalanin-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Glycin-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Histidin(Trt)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Isoleucin-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Leucin-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Lysin(BOC)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Methionin-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Asparagin(Trt)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Glutamin(Trt-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Arginin(Pbf)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Serin(tBu)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Threonin(tBu)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Valin-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Thryphophan(BOC)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Tyrosin(tBu)-OH	Orpe GenPharma

3.1.2 Geräte

In Tabelle 3.3 sind die für die Peptid-Synthese und -Aufreinigung verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 3.3: Geräte in alphabetischer Reihenfolge

Name	**Hersteller**
Feinwaage BP211D	Sartorius
Rotationsverdampfer Rotapour RE111	Büchi
Waage SI-603	Denver Instrument
Waage SI-234	Denver Instrument
Zentrifuge Universal 16R	Hettich
Zentrifuge Galaxy 14D	VWR
Vortexer REAX2000	Heidolph
Reinswasseranlage ARIUM631	NowapureSelect
Syntheseroboter SYRO 2000	MultiSynTech
Eppendorfpipetten	Eppendorf
Polypropylenspritzen 2 mL mit Teflonfritte	Intavis
Analytische HPLC CTO-10A, 2xLC-10AT, SPD-M11A, SIL-10AXL, Sampler Cooler, DGU-14A	Shimadzu
Analytische Säule Nucleodur C18, 5 µm, 100 Å 4.6x250 mm	Machery-Nagel
Präparative HPLC Varian PrepStar Modell 218	Varian
Fraktionskollektor Varian Modell 701	Varian
Präparative Säule VP 250/32 Nucleosil 300-5 C18	Machery-Nagel
Lyophilisationsanlage Alpha 2-4 LDplus	Christ
Ultraschallbad Bandelin	Sonorex
Rundkolben 250 mL	Schott
Pasteurpipetten	VWR
Pipettenspitzen	VWR
Reaktionsgefäße 1.5 mL	VWR
Szintillations-Gefäß	VWR

Name	Hersteller
Greiner-Röhrchen 50 mL	Greiner
Inlay	VWR
Vial	VWR
Messzylinder	Schott
Jodzahlkolben	Schott
QTrap 2000 ESI Massenspekrometer	Applied Biosystems

3.1.3 Lösungen

Die Lösungen wurden mittels Messzylinder (Schott) und der Waage SI-234 (Denver Instrument) oder der Waage SI-603 (Denver Instrument) hergestellt und in Greiner-Röhrchen (Greiner) oder Jodzahlkolben (Schott) gelagert. Zum besseren Lösen wurde das Ultraschallbad Bandelin (Sonorex) und der Vortexer REAX2000 (Heidolph) benutzt. In Tabelle 3.4 sind die verwendeten Lösung für die Synthese und Aufreinigung aufgelistet.

Tabelle 3.4: Verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzung

Name	Hersteller
DIPEA-Lösung	1.5 M DIPEA in NMP
HBTU-Lösung	0.5 M HBTU in DMF
HOBT-Lösung	0.5 M HOBT in DMF
Piperidin/NMP/DMF-Lösung	Pipreridin/NMP/DMF (1:1:1) 1% Triton X-100
Fmoc-Aminosäure-Lösung	0.5 M Fmoc-Aminosäure in HOBT-Lösung
Acetylierungs-Lösung	0.5 M Essigsäure in HOBT-Lösung
Reagenz K	TFA/Phenol/Wasser/1,2-Ethandithiol/Thioanisol (82.5:5:5:5:2.5)
Abspaltlösung	TFA/TIS/Wasser (95:2.5:2.5)

3.2 Methoden

3.2.1 Festphasenpeptidsynthese mittels Syntheseroboter

Die Peptidsynthese erfolgte mittels Festphase mit Fmoc-Rink-Amid-Harz nach einem Standard-Fmoc-Protokoll mit dem Syntheseroboter SYRO 2000 (MultiSynTech). Dabei werden die Schritte „Fmoc-Schutzgruppe abspalten“ und „mit der nächsten aktivierten Aminosäure koppeln“ zyklisch wiederholt. Das Protokoll ist in Abbildung 3.1 schematisch wiedergegeben.

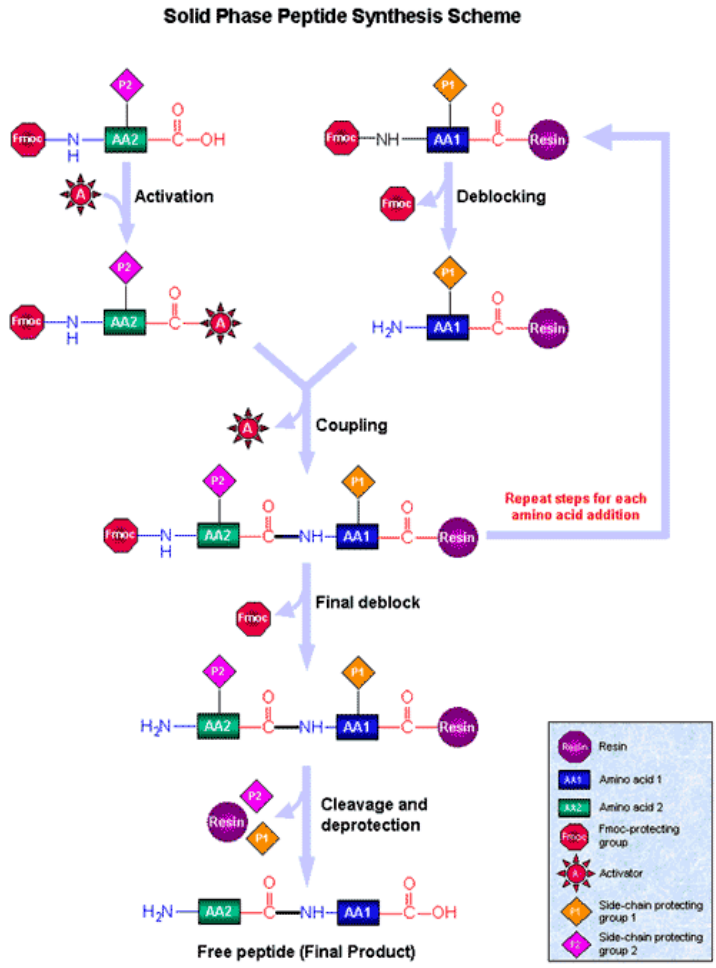

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der zyklischen Peptidsynthese mittels Fmoc-Protokoll. (Quelle: http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-peptides/learning-center/solid-phase-synthesis.html, 20.10.11)

Für die Synthese wurden für jedes Peptid 80 mg des Fmoc-Rink-Amid-Harzes mit der Feinwaage BP211D (Satorius) in die 2 mL Polypropylenspritzen mit Teflonfritte (Intavis) eingewogen, welche dann in den Syntheseroboter SYRO 2000 (MultiSynTech) eingespannt wurden. Der Roboter wurde mit der HBTU-Lösung, Piperidin/NMP/DMF-Lösung, NMP, DIPEA-Lösung und DMF als Systemliquid bestückt. Die Systemliquid wurde zum Spülen zwischen den Lösungen, zum Quellen und Waschen des Harzes benutzt. Der Roboter pipettierte nach einander die verschiedenen Lösungen in die Spritzen, und nach Inkubation wurde die Lösung abgesaugt. Somit wurde das Peptid vom C-Terminus zum N-Terminus aufgebaut.

Im ersten Zyklus wurde mit DMF das Harz zum Quellen gebracht, um dieses zugänglich für die weiteren Reaktionen zu machen. Anschließend begann die zyklische Abfolge mit der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit der Piperidin/NMP/DMF-Lösung, gefolgt von zwei Waschschritten, erst mit DMF dann mit NMP. Anschließend wurde die entsprechende mit HOBT voraktivierte Fmoc-Aminosäure, die HBTU-Lösung und die DIPEA-Lösung für die Kopplung hinzugegeben und inkubiert. Danach folgte ein Waschschritt mit DMF, und der Zyklus begann erneut. Der letzte Zyklus war die Acetylierung mit der Acetylierungs-Lösung, welche analog zu den Fmoc-Aminosäure-Lösungen eingesetzt wurde, weshalb sich zum Beispiel für 20 zu koppelnde Aminosäuren 21 Zyklen ergaben. In der Tabelle 3.5,

Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7 befinden sich die Reaktionszeit, Anzahl und die Volumina der einzelnen Lösungen für die jeweiligen Schritte im Zyklus.

Tabelle 3.5: Reaktionszeiten, Anzahl und Volumina der Reaktionsschritte vom ersten Zyklus

Schritt	Lösung	Volumen	Anzahl	Zeit
Quellen	DMF	1200 µL	2	10 min
Abspalten	Piperidin/NMP/DMF	1200 µL	2	30 min
Waschen 1	DMF	1200 µl	5	1 min
Waschen 2	NMP	1200 µL	2	1 min
Kopplung	Fmox-Aminosäure HBTU DIPEA	400 µL 400 µL 270 µL	2	95 min
Waschen	DMF	1200 µL	2	1 min

Tabelle 3.6: Reaktionszeiten, Anzahl und Volumina der Reaktionsschritte vom zweiten bis zehnten Zyklus

Schritt	Lösung	Volumen	Anzahl	Zeit [min]
Waschen	DMF	1200 µL	2	1 min
Abspalten	Piperidin/NMP/DMF	1200 µL	2	20 min
Waschen 1	DMF	1200 µl	5	1 min
Waschen 2	NMP	1200 µL	2	1 min
Kopplung	Fmox-Aminosäure HBTU DIPEA	400 µL 400 µL 270 µL	2	95 min
Waschen	DMF	1200 µL	2	1 min

Tabelle 3.7: Reaktionszeiten, Anzahl und Volumina der Reaktionsschritte ab dem elften Zyklus

Schritt	Lösung	Volumen	Anzahl	Zeit [min]
Waschen	DMF	1200 µL	2	1 min
Abspalten 1	Piperidin/NMP/DMF	1200 µL	1	20 min
Abspalten 2	Piperidin/NMP/DMF	1200 µl	1	25 min
Waschen 1	DMF	1200 µL	5	1 min
Waschen 2	NMP	1200 µL	2	1 min
Kopplung	Fmox-Aminosäure HBTU DIPEA	400 µL 400 µL 270 µL	2	95 min
Waschen	DMF	1200 µL	2	1 min

3.2.2 Peptidabspaltung von der Festphase

3.2.2.1 Peptide ohne Cystein

Peptide, die in ihrer Sequenz kein Cystein enthielten, konnten mit der Abspaltlösung vom Harz abgespalten und von ihren Schutzgruppen in der Seitenkette befreit werden. Dazu wurde das Harz in der 2 mL Spritze mit 2 mL Abspaltlösung in ein 50 mL Greiner-Röhrchen (Greiner) überführt. Die Spritze wurde noch zweimal mit 2 mL Abspaltlösung nachgespült, mit den ersten 2 mL vereint und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Direkte Abspaltung in der Spritze konnte nicht durchgeführt werden, da bei einigen Peptiden ein schwerlöslicher Niederschlag in nur 2 mL Abspaltlösung die weitere Aufarbeitung behinderte. Die Lösung wurde dann mittels der 2 mL Spritze vom Harz befreit, wobei das Filtrat in 45 mL gekühltem Diethylether in einem Greiner-Röhrchen (Greiner) getropft wurde und als weißer Niederschlag ausfiel. Anschließend wurde zweimal mit 2 mL Abspaltlösung das Harz gewaschen, und das Filtrat wurde gleichfalls in den Diethylether getropft. Der Niederschlag wurde mit der Zentrifuge Universal 16R (Hettich) bei 5000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der unlösliche Rückstand wurde noch zweimal mit je 50 mL Diethylether gewaschen, wobei der Überstand jedes Mal entfernt wurde. Der Rückstand wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mit der analytischen HPLC (Shimadzu) untersucht.

3.2.2.2 Peptide mit Cystein

War ein Cystein in der Sequenz vorhanden, wurde das Peptid mit Reagenz K vom Harz abgespalten und die Schutzgruppen von den Seitenketten befreit. Reagenz K enthält Reduktionsmittel, die Disulfidbrücken zwischen Cysteinen verhindern sollen. Die weitere Verfahrensweise entspricht der Aufarbeitung nach 3.2.2.1, nur dass die Abspaltlösung durch Reagenz K ersetzt wurde.

3.2.3 Analytische HPLC nach Abspaltung

Mit der analytischen HPLC (Shimadzu) und der analytischen Säule (Machery-Nagel) wurden die Rohpeptide untersucht, indem vorgefertigte Methoden benutzt wurden. Diese Methoden definieren einen linearen Gradienten aus Acetonitril/TFA 999:1 und Wasser/TFA 999:1, wobei die Methode das Anfangsverhältnis und das Endverhältnis in einer bestimmten Zeit umsetzte, wobei die Geschwindigkeit 1 mL/min betrug. Nach dem Gradienten erfolgte ein Reinigungsschritt bei 90% Acetonitril/TFA 999:1 und anschließend wurde die Säule wieder auf das Anfangsverhältnis eingestellt.
Die Probe wurde mit je 150 µL Acetonitril/TFA 999:1 und Wasser/TFA 999:1 gelöst und mit der Zentrifuge Galaxy 14D (VWR) zentrifugiert. Vom Überstand wurden 200 µL in ein Inlay (VWR) überführt und in einem Vial (VWR) in den Proben-Sampler der analytischen HPLC gestellt, wobei 20-50 µL für die Untersuchung verwendet wurden. Mit Hilfe des Chromatogramms konnte nun die Qualität des Rohpeptids festgestellt und die Aufreinigung über die Präparative HPLC (Varian) durchgeführt werden.

3.2.4 Präparative HPLC

Mit der präparativen HPLC Prepstar (Varian) und der präparativen Säule (Machery-Nagel) wurde das Rohpeptid von Verunreinigungen befreit. Hierbei wurden vorgefertigte Methoden benutzt, die einen linearen Gradienten aus Acetonitril/TFA 999:1 und Wasser/TFA 999:1 definieren, wobei die Methode das Anfangsverhältnis und das Endverhältnis in einer bestimmten Zeit umsetzt. Der Gradient wurde dabei um 0.5% pro Minute gesteigert, wobei eine Geschwindigkeit von 20 mL/min eingestellt war. Zuvor wurde die Säule mit 90% Acetonitril/TFA 999:1 für 15 min bei 20 mL/min gespült, dann wurde die Säule für 15 min bei 20 mL/min auf das Anfangsverhältnis gesetzt, welches sich aus dem Chromatogramm der analytischen HPLC des Rohpeptides ergab. Als Anfangsverhältnis wurde das Elutionsverhältnis auf der analytischen HPLC genommen, welches um 17% an Acetonitril verringert wurde.

Das Rohpeptid wurde in 8 mL Acetonitril/TFA 999:1 und Wasser/TFA 999:1 im Verhältnis des Elutionsverhältnis auf der analytischen HPLC mit dem Vortexer REAX2000 (Heidolph) gelöst. Enthielt das Peptid kein Cystein, so konnte zusätzlich das Ultraschallbad Bandelin (Sonorex) zum Lösen benutzt werden. Nach dem Auftragen des Rohpeptides wurde das Eluat in 20 mL Fraktionen aufgefangen, wobei die Fraktionen, die Zielpeptide enthalten sollten, mittels analytischer HPLC untersucht wurden.

3.2.5 Analytische HPLC der Fraktionen

Die Analyse der Fraktionen erfolgte analog zur Analyse des Rohpeptides, nur dass direkt 200 µL der einzelnen Fraktion in ein Inlay (VWR) in einem Vial (VWR) in den Proben-Sampler der analytischen HPLC gestellt wurden, wobei 20 µL für die Untersuchung verwendet wurden. Mit Hilfe des Chromatogramms konnte nun die Qualität der Fraktionen untersucht werden, wobei alle Fraktionen, die eine Reinheit >99% aufwiesen, in einem 250 mL Rundkolben (Schott) vereinigt wurden.

3.2.6 Lyophilisieren

Durch Lyophilisieren sollen die geringen Mengen der Peptide in eine volumenmäßig gut abmessbare Wägeform überführt und getrocknet werden. Dazu wurden die vereinigten Fraktionen im 250 mL Rundkolben (Schott) mittels Rotationsverdampfer Rotapour RE111 (Büchi) auf ein Volumen von 15 mL eingeengt. Dieses Volumen wurde vollständig mit einer Pasteurpipette (VWR) in ein Szintillations-Gefäß (VWR) überführt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und an der Lyophilisationsanlage Alpha 2-4 LDplus (Christ) getrocknet. Die getrockneten Peptide wurden mit der analytischen HPLC und zusätzlich mittels ESI-Massenspektrometrie analysiert.

3.2.7 Analytische HPLC der voll aufgereinigten Peptide

Die Analyse der voll aufgereinigten Peptide erfolgte analog zur Analyse der Rohpeptide, wobei die Reinheit >99% sein sollte.

3.2.8 ESI-Massenspektrometrie der voll aufgereinigten Peptide

Mit Hilfe der Elektronen Spray Ionisation (ESI) Massenspektrometrie sollte die Identität der Peptide verifiziert werden. Dazu wird die monoisotopische Masse eines Peptides benötigt, die aus den einzelnen Massen der Bestandteile in Tabelle 3.8, wie Acetyl-Teil, Aminosäuren und Amid-Teil aufaddiert wurde. Die durchschnittliche Masse wurde für die Berechnung der Molekülmasse für die Einwaage des Thermophorese-Assays benutzt, wobei für jede basische Aminosäure, Lysin, Arginin und Histidin, die Masse einer Trifluoressigsäure als Gegenion zum Gesamtgewicht hinzuaddiert werden musste, da die Peptide als Salze der Trifluoressigsäure vorlagen.

Tabelle 3.8: Name, monoisotopische und durchschnittliche Masse der einzelnen Bestandteile eines Peptids

Name	monoisotopische Masse	durchschnittliche Masse
Alanin	71.03711	71.0788
Arginin	156.10111	156.1875
Asparagin	114.04293	114.1038
Asparaginsäure	115.02694	115.0886
Cystein	103.00919	103.1388
Glutaminsäure	129.04259	129.1155
Glutamin	128.05858	128.1307
Glycin	57.02146	57.0519
Histidin	137.05891	137.1411
Isoleucin	113.08406	113.1594
Leucin	113.08406	113.1594
Lysin	128.09496	128.1741

Name	**monoisotopische Masse**	**durchschnittliche Masse**
Methionin	131.04049	131.1926
Phenylalanin	147.06841	147.1766
Prolin	97.05276	97.1167
Serin	87.03203	87.0782
Threonin	101.04768	101.1051
Tryptophan	186.07931	186.2132
Tyrosin	163.06333	163.176
Valin	99.06841	99.1326
H_2O	18.01056	18.01524
Acetyl	42.0106	42.0373
Amid	-0.984	-0.9847
Trifluoressigsäure	-	114.02

Zur Analyse wurde eine kleine Menge des fertig aufgereinigten Peptides in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß (VWR) überführt und an die hauseigene massenspektroskopische Abteilung übergeben, welche die Messung an einem QTrap 2000 ESI Massenspekrometer (Applied Biosystems) durchführte und auswertete.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Konstruktion der Expressionsplasmide pGEX-4T-mod, pHW1, pHW2 und pHW3

Bereits in meiner Diplomarbeit erfolgte die Überexpression mehrerer Gene für *Shigella*-Pathogenitätsfaktoren in Form von Glutathion-S-Transferase- (GST-) Fusionsgenen, um eine effiziente affinitätschromatographische Aufreinigung der Produkte sicherzustellen. Dazu wurde jeweils das PCR-amplifizierte Zielgen in den Expressionsvektor pGEX-6P-mod eingeführt (siehe 2.1.8). Dieser Vektor ermöglicht in *Escherichia coli* die rekombinante Produktion eines Fusionsproteins, das aus einem *N*-terminalen GST- und einem *C*-terminalen Zielproteinanteil besteht. Zwischen beiden Anteilen befindet sich die Erkennungssequenz für die PreScission™-Protease, die die proteolytische Abspaltung des Zielproteins vom GST-Anteil ermöglicht. Diese Protease ist jedoch äußerst kostspielig, weshalb in der vorliegenden Arbeit die entsprechende Erkennungssequenz in pGEX-6P-mod mittels ortsgerichteter Mutagenese durch eine Erkennungssequenz für Thrombin ausgetauscht wurde. Die Protease Thrombin steht unserer Arbeitsgruppe durch Spenden der Firma CSL Behring kostenfrei in großen Mengen zur Verfügung. Das resultierende Plasmid erhielt die Bezeichnung pGEX-4T-mod. Die Sequenzen der für die Mutagenese verwendeten Primer 4T-Mod_f und 4T-Mod_b sind dem Material- und Methodenteil zu entnehmen (siehe 2.1.7). Abbildung 4.1 a) zeigt die unmittelbar vor der "Multiple-cloning-site" (MCS) befindliche Protease-Erkennungssequenz des Ausgangsplasmides pGEX-6P-mod sowie die des neu erzeugten pGEX-4T-mod.

```
a) pGEX-6P-mod                                        SmaI--    XhoI--
                            NdeI--   BamHI-   EcoRI-    SalI--    NotI----
...CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCATATGCGGGGATCCCCGGAATTCCCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
...LeuGluValLeuPheGlnGlyProHisMetArgGlySerProGluPheProGlyArgLeuGluArgProHisArgAspEnd...
                     ▲PreScission™-Protease
b) pGEX-4T-mod                                        SmaI--    XhoI--
                            NdeI--   BamHI-   EcoRI-    SalI--    NotI----
      ...CTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGCGGGGATCCCCGGAATTCCCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
      ...LeuValProArgGlySerHisMetArgGlySerProGluPheProGlyArgLeuGluArgProHisArgAspEnd...
                     ▲Thrombin
```

Abbildung 4.1: Die MCS mit vorausgehender Protease-Erkennungssequenz des Vektors pGEX-6P-mod (a) und des Vektors pGEX-4T-mod (b). Die Protease-Erkennungssequenzen sind in Blau dargestellt, die Protease-Schnittstellen sind jeweils mit ▲ gekennzeichnet.

Aus klonierungstechnischen Gründen ist es unvermeidbar, dass mittels pGEX-4T-mod erzeugte Zielproteine nach Proteaseverdau des Fusionsproteins *N*-terminal zusätzliche, im Originalprotein nicht vorhandene Aminosäuren enthalten. Um die Anzahl zusätzlicher Aminosäuren möglichst gering zu halten, wurden bei der Klonierung von Zielgenen in diesen Vektor am 5´-Ende der MCS ausschließlich die Restriktionsschnittstellen *Nde*I oder *Bam*HI genutzt. In Abbildung 4.2 ist ersichtlich, dass ein resultierendes Zielprotein bei Verwendung der *Nde*I-Schnittstelle *N*-terminal die zusätzliche Aminosäuresequenz Gly-Ser-His erhält. Kommt bei der Klonierung die *Bam*HI-Schnittstelle zum Einsatz, erhält das Zielprotein *N*-terminal die aus sieben Aminosäuren bestehende zusätzliche Sequenz Gly-Ser-His-Met-Arg-Gly-Ser. Solche Erweiterungen der Polypeptidkette, die häufig keine definierte Faltung annehmen und flexibel bleiben, können sich bei Kristallisationsversuchen durchaus hindernd auswirken [102].

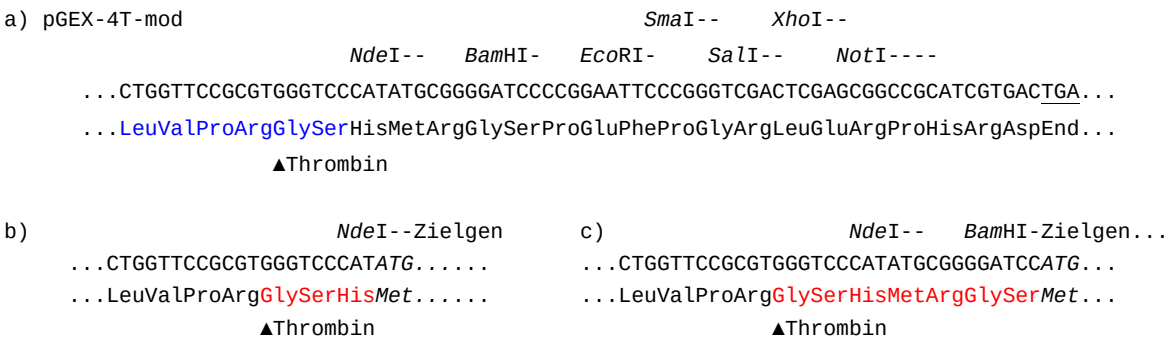

Abbildung 4.2: a) Die MCS mit vorausgehender Protease-Erkennungssequenz des Vektors pGEX-4T-mod. Die Protease-Erkennungssequenz ist blau dargestellt, die Thrombin-Schnittstellen sind jeweils mit ▲ gekennzeichnet. (b) Nach Thrombinverdau enthält das durch pGEX-4T-mod erzeugte Zielprotein *N*-terminal drei zusätzliche Aminosäuren, wenn das Zielgen über die *Nde*I-Schnittstelle der MCS eingebracht wurde (die in der *Nde*I-Schnittstelle enthaltene ATG-Sequenz repräsentiert das Codon für das *N*-terminale Methionin des Originalproteins). (c) Wenn das Zielgen über die *Bam*HI-Schnittstelle der MCS eingebracht wurde, enthält das Zielprotein nach Thrombinverdau sieben zusätzliche Aminosäuren. Die zusätzlichen, im Originalprotein nicht vorhandenen *N*-terminalen Aminosäuren sind jeweils rot dargestellt.

Aus diesem Grund wurde ausgehend von pGEX-4T-mod durch Mutagenese ein weiteres Plasmid für die Expression von *GST*-Fusionsgenen erzeugt, welches die Produktion von rekombinanten Zielproteinen erlaubt, die an ihrem *N*-Terminus lediglich durch einen einzigen Glycinrest erweitert sind. Bei vorausgehenden Projekten war darüber hinaus aufgefallen, dass die Translation mancher Zielgene teilweise nicht vollständig stattfand, was neben dem Volllängenprotein die Produktion *C*-terminal verkürzter Abbruchfragmente zur Folge hatte.

Da diese bei der Reinigung oft nur schwer von dem Volllängenprotein zu trennen waren, wurde in dem neu konstruierten Expressionplasmid unmittelbar stromabwärts der MCS die Sequenz für ein 8xHis-*Tag* eingebracht. Das ermöglicht die Produktion von Fusionsproteinen, die zusätzlich zum *N*-terminalen GST-Anteil ein *C*-terminales 8xHis-*Tag* enthalten. Da dieses *Tag* nur in Fusionsproteinen enthalten ist, deren Produktion vollständig erfolgt ist, ermöglicht es die affinitätschromatographische Abtrennung des kompletten Fusionsproteins von vorzeitigen Abbruchfragmenten. Schließlich war in dem neu konstruierten Expressionsplasmid, das die Bezeichnung pHW1 erhielt, die MCS so verkürzt, dass sie nur noch die Schnittstellen für *Nde*I, *Bam*HI, *Xho*I und *Not*I enthielt. Die Sequenzen der für die Mutagenese verwendeten Primer pHW1_f und pHW1_b sind dem Material- und Methodenteil zu entnehmen (siehe 2.1.7). Abbildung 4.3 a) zeigt einen Sequenzausschnitt von pHW1, der die verkürzte MCS sowie die unmittelbar stromabwärts befindliche Sequenz für das 8xHis-*Tag* enthält. Daraus ist ersichtlich, dass pHW1 weder zwischen dem *GST*-Anteil und dem Zielgen noch zwischen dem Zielgen und dem 8xHis-*Tag* eine Protease-Erkennungssequenz enthält, die auf Proteinebene die Abspaltung der Affinitäts-*Tags* vom Zielprotein erlaubt. Daher werden bei Verwendung des Expressionsplasmides pHW1 mittels der PCR-Primer für die Zielgenamplifikation jeweils eine Thrombin-Erkennungssequenz vor und hinter dem Zielgen eingebracht. Die dafür in dieser Arbeit ausschließlich verwendete Sequenz lautete 5'-TATCCGCGCGGC-3' kodierend für das Motiv Tyr-Pro-Arg▲Gly aus dem Gastrin Releasing Peptide (▲ kennzeichnet die Thrombin-Schnittstelle) [103].

Zur Verbesserung der proteolytischen Spaltung durch Thrombin an der *N*-terminalen Erkennungssequenz wurde diese Sequenz um ein 5'-ATG-3' am 5'-Ende erweitert, was die Sequenz 5'-ATGTATCCGCGCGGC-3' zur Folge hatte. Das 5'-ATG-3' kodiert für ein zusätzliches Methionin, das keine Auswirkung auf die Länge des Zielproteins hat, jedoch eine effizientere Spaltung bewirkt [103]. Dieses zusätzliche ATG muss lediglich bei Verwendung der *BamHI*-Schnittstelle eingeführt werden, da die *NdeI*-Schnittstelle bereits ein solches Methionincodon enthält.

In Abbildung 4.3 b) ist am Beispiel einer verkürzten Variante des *ipgD*-Gens gezeigt, dass ein resultierendes Zielprotein nach Entfernung der *Tags* durch Thrombin-Spaltung am *N*-Terminus ein einziges zusätzliches Glycin, am *C*-Terminus die aus drei Aminosäuren bestehende Sequenz Tyr-Pro-Arg enthält. Soll bei der Produktion des Zielproteins auf das 8xHis-*Tag* verzichtet werden, muss die Thrombin-Erkennungssequenz auf dem entsprechenden PCR-Primer lediglich durch ein Stopp-Codon ersetzt werden.

a) pHW1 *Nde*I--*Bam*HI-*Xho*I--*Not*I----

...AACTCGCATATGGGATCCCTCGAGGCGGCCGCCCATCATCATCATCATCATCATCATTGA...

...AsnSerHisMetGlySerLeuGluAlaAlaAlaHisHisHisHisHisHisHisHisEnd...

b) *Bam*HI- **Codon 31** ***ipgD*** **bis Codon 530** *Not*I----

...GGATCCATGTATCCGCGCGGC**GTAAGCGTGATTTCATATCAA...GACCCAAAAATATGGAATATG**TATCCGCGCGGCGCGGCCGCC...

...GlySer**Met**TyrProArgGly**ValSerValIleSerTyrGln...AspProLysIleTrpAsnMet**TyrProArgGlyAlaAlaAla...

▲Thrombin ▲Thrombin

Abbildung 4.3: a) Die MCS des Expressionsplasmides pHW1. Der MCS geht die für den GST-Anteil kodierende Sequenz voraus. Unmittelbar stromabwärts der MCS im Leserahmen mit dem *GST*-Gen befindet sich die Sequenz für ein 8xHis-*Tag*.

b) Verwendung von pHW1 am Beispiel einer verkürzten Form des *ipgD*-Gens, die mittels der *Bam*HI- und *Not*I-Schnittstellen in das Expressionsplasmid eingebracht wurde. Die durch die PCR-Primer für die Zielgenamplifikation eingeführten Thrombin-Erkennungssequenzen sind blau, das Zielgen fettgedruckt dargestellt. Das zusätzliche Methionin zur Verbesserung der Spaltung durch Thrombin auf der *N*-terminalen Seite des Zielgens ist rot dargestellt. Die Thrombin-Schnittstellen sind jeweils mit ▲ gekennzeichnet. Nach Entfernen des GST- und des 8xHis-*Tags* durch Thrombinverdau verbleiben auf dem Zielprotein *N*-terminal jeweils ein zusätzliches Glycin sowie *C*-terminal das zusätzliche Tripeptid Tyr-Pro-Arg.

Schließlich wurden ausgehend von pHW1 zwei weitere Expressionsvektoren mit der Bezeichnung pHW2 und pHW3 erzeugt, bei denen die GST-*Tag*-Sequenz durch eine StrepII-*Tag*- bzw. eine Maltosebindeprotein- (MBP-) Sequenz ausgetauscht war.

Dabei war das aus nur wenigen Aminosäuren bestehende StrepII-*Tag* für die Produktion von Zielproteinen mit einem überdurchschnittlich hohen Molekulargewicht vorgesehen, um die Gesamtgröße des resultierenden Fusionsproteins in einem vernünftigen Rahmen zu halten. Der entsprechende Vektor pHW2 wurde durch Amplifikation des Vektors pHW1 mit den Primern pHW2_f und pHW2_b (siehe 2.1.7) hergestellt. Der Bindungsbereich für den Forward-Primer pHW2_f, über den die StrepII-*Tag*-Sequenz eingefügt wurde, befand sich 21 Codons vor dem 3´-Ende der *GST*-Sequenz (in sense-Richtung bezüglich der *GST*-Sequenz) und damit vor der weiter stromabwärts liegenden MCS des Vektors. Der Backward-Primer pHW2_b (bezüglich des *GST*-Gens in antisense-Richtung orientiert) endete sechs Codons vor dem 5´-Ende des *GST*-Gens. So wurde ein lineares PCR-Produkt erhalten, bei dem das GST-*Tag* weitgehend deletiert und durch ein StrepII-*Tag* (in Abbildung 4.4 Blau dargestellt) ersetzt war.

Das lineare Amplifikationsprodukt wurde durch Ligation in das ringförmige Plasmid pHW2 überführt. Die genauen Bindepositionen der PCR-Primer im Vektor pHW1 sind in Abbildung 4.4 a) gezeigt. Die für das StrepII-*Tag* kodierende Sequenz einschließlich 5´- und 3´-flankierender Region in pHW2 ist in Abbildung 4.4 b) dargestellt.

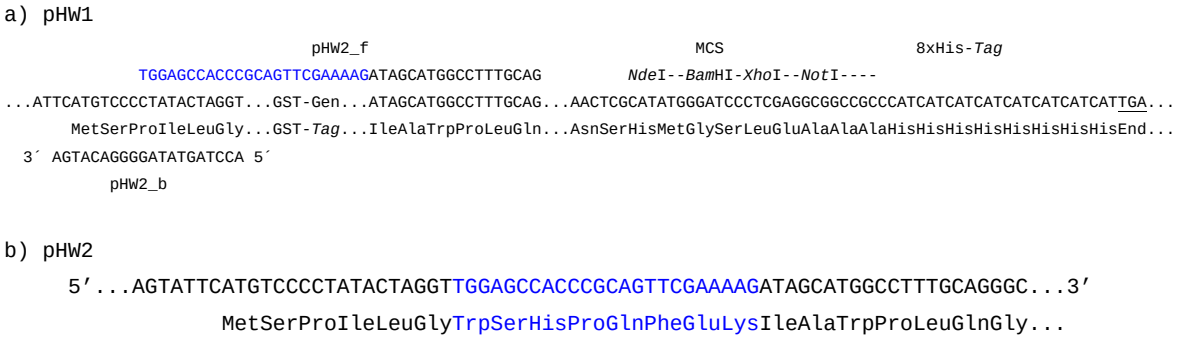

Abbildung 4.4: a) Sequenzausschnitt des Vektors pHW1 mit den Bindestellen und Sequenzen der PCR-Primer pHW2_f und pHW2_b. Durch die verwendeten Primer wurde nahezu der gesamte pHW1-Vektor amplifiziert jedoch ausschließlich des Großteils der GST-kodierenden Sequenz. Von dieser wurden über den Primer pHW2_b lediglich die sechs *N*-terminalen Codons, über den Primer pHW2_f 21 *C*-terminale Codons erfasst. Die an das 5´-Ende des Primers pHW2_f angefügte *StrepII-Tag*-Sequenz ist blau gefärbt.
b) Sequenzausschnitt des resultierenden Vektors pHW2 nach Ligation des linearen PCR-Produkts zum zirkulären Plasmid. Die eingefügte *StrepII-Tag*-Sequenz (in Blau dargestellt) ist am 5´-Ende von sechs, am 3´-Ende von 21 Codons des *GST*-Gens flankiert.
(Aus folgenden klonierungstechnischen Gründen war die *GST*-Sequenz nicht vollständig deletiert worden: i) Dem Met-Codon des *GST*-Gens geht in pHW1 unmittelbar eine Promoter- und Ribosomenbinde-Sequenz voraus, die in diesem Vektor in mehrfacher Kopienzahl vorliegt. Ein Primer, der an diese Sequenz bindet, würde folglich bei der PCR kein einheitliches PCR-Produkt liefern. ii) Innerhalb der *C*-terminalen 21 Codons der *GST*-Sequenz befindet sich die Bindestelle für einen Standardprimer, durch den das in die MCS insertierte Zielgen durch Sequenzanalyse überprüft werden kann. Deletion dieses Bereichs hätte für jedes Plasmid, das auf Grundlage von pHW2 erzeugt wird, die Synthese individueller Sequenzierprimer erfordert. Auf die Funktionalität des StrepII-*Tag*s im resultierenden Fusionsprotein haben haben die zusätzlichen Aminosäuren keinen Einfluss. Sie werden beim Abspalten des *Tag*s während der Reinigung vollständig entfernt.)

Das MBP-*Tag* sollte bei der Produktion von Zielproteinen zum Einsatz kommen, die allein oder als GST-Fusionsprotein nur schlecht löslich waren und in *E. coli* hauptsächlich in Form von Einschlusskörpern hergestellt wurden. Es ist bekannt, dass ein *N*-terminaler MBP-Anteil das Löslichkeitsverhalten von Proteinen in vielen Fällen deutlich verbessert. Unserer Arbeitsgruppe stand zunächst der Vektor pIVEX-MBP zur Verfügung, mit dem ein Fusionsprotein aus *N*-terminalem MBP-*Tag* und Zielgen produziert werden kann.

Jedoch enthält die MCS dieses Vektors die in dieser Arbeit benutzten Restriktionsendonuklease-Schnittstellen bezüglich der bisher erzeugten Konstrukte in falscher Orientierung. Außerdem verfügt der Vektor nicht über das *lacI*-Gen, was zur frühzeitigen Expression des Zielgens und damit sowohl bei der Transformation als auch bei der Produktion des Zielproteins zu Problemen führen kann.

Die Konstruktion von pHW3 erfolgte durch eine zweistufige Klonierung. Zunächst wurde das GST-*Tag* weitgehend aus dem Vektor pHW1 entfernt. Anschließend wurde der MBP-Anteil, der aus dem Vektor pIVEX-MBP durch PCR amplifiziert worden war, eingefügt. Die Entfernung des GST-*Tags* erfolgte analog zur Konstruktion von pHW2 durch Amplifikation des Vektors pHW1, in diesem Fall jedoch mit Hilfe der Primer pHW3_f und pHW3_b (siehe 2.1.7). Die Bindungsbereiche für den Forward-Primer pHW3_f und für den Backward-Primer pHW3_b in pHW1 waren identisch zu denen der Primer pHW2_f bzw. pHW2_b bei der Konstruktion von pHW2. Jedoch war der Primer pHW3_f an seinem 5´-Ende mit einer *Hin*dIII-Erkennungssequenz ausgestattet, welcher weitere drei Nukleotide mit der Sequenz GGC vorausgingen. An das 5´-Ende des Primers pHW3_b war eine *Eco*RI-Erkennungssequenz angefügt, welcher die fünf Nukleotide lange Sequenz GGCAT vorausging. Durch die PCR wurde zunächst ein lineares DNA-Produkt erzeugt, welches durch Ligation in ein zirkuläres Plasmid überführt wurde. In diesem Plasmid, das eine Zwischenstufe bei der Konstruktion von pHW3 darstellte, war die Sequenz für das GST-*Tag* weitgehend deletiert und durch die Restriktionsendonukleaseschnittstellen *Eco*RI und *Hin*dIII ersetzt. Für einen möglichst effizienten Verdau waren die beiden Schnittstellen durch einen insgesamt acht Nukleotide langen "Spacer" voneinander getrennt. Eine genaue Übersicht der Konstruktion des Vorläuferplasmids ist in Abbildung 4.5 gezeigt.

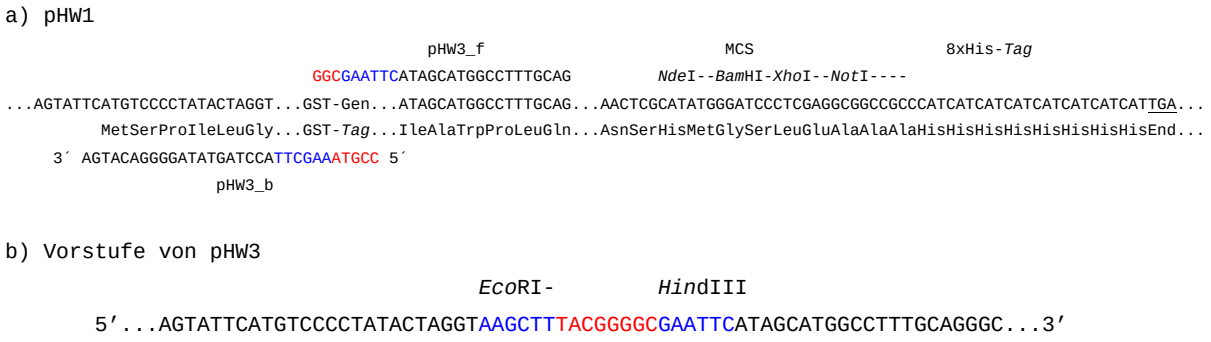

Abbildung 4.5: a) Sequenzausschnitt des Vektors pHW1 mit den Bindestellen und Sequenzen der PCR-Primer pHW3_f und pHW3_b. Durch die verwendeten Primer wurde nahezu der gesamte pHW1-Vektor amplifiziert jedoch ausschließlich des Großteils der GST-kodierenden Sequenz. Von dieser wurden über den Primer pHW3_b lediglich die sechs *N*-terminalen Codons, über den Primer pHW3_f 21 *C*-terminale Codons erfasst. Die einzufügenden Restriktionsendonuklease-Schnittstellen sind in Blau wiedergegeben. In Rot sind zusätzliche Nukleotide dargestellt, die lediglich dazu dienen, die Effizienz des späteren Verdaus mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen zu erhöhen.
b) Die resultierende Vorstufe des Vektors pHW3 mit den eingefügten Restriktionsendonuklease-Schnittstellen und den zusätzlichen "Spacer"-Nukleotiden nach Ligation des linearen PCR-Produktes zum zirkulären Plasmid. Eine Begründung, warum bei der Konstruktion dieses Plasmids die GST-kodierende Sequenz nicht vollständig entfernt wurde, ist Abbildung 5.4 zu entnehmen.

In einem zweiten Schritt wurde nun über die beiden neuen Schnittstellen die *MBP*-Sequenz eingefügt. Dazu wurde zuerst das *MBP*-Gen über die Primer MBP_f und MBP_b aus dem Vektor pIVEX-MBP (siehe 2.1.7) mitels PCR extrahiert. Durch den Primer MBP_f wurde am 5'-Ende eine *Hin*dIII-Schnittstelle und durch den Primer MBP_b am 3'-Ende eine *Eco*RI-Schnittstelle an das amplifizierte *MBP*-Gen angebracht. Über diese Schnittstellen wurde das amplifizierte *MBP*-Fragment jedoch zunächst in den Vektor pUC18 überführt, um es durch Sequenzierung auf Fehlerfreiheit zu überprüfen. Wäre das *MBP*-Fragment direkt in die Vorstufe des Vektors pHW3 kloniert worden, hätten für die Sequenzierung spezielle Primer synthetisiert werden müssen, da für die zu untersuchende Region keine Standard-Primer zur Verfügung stehen. Durch die Klonierung des *MBP*-Fragments in pUC18 war es möglich, die entsprechenden Standard-Primer von pUC18 zur Sequenzierung einzusetzen. Abschließend wurde das *MBP*-Gen über die Schnittstellen *Eco*RI und *Hin*dIII aus dem pUC18-Konstrukt in die Vorstufe des Vektors pHW3 umkloniert, was den finalen pHW3-Vektor zur Folge hatte. Vektorkarten der Plasmide pHW1, pHW2 und pHW3 sind dem Material- und Methodenteil (2.1.8) zu entnehmen.

4.2 Untersuchung der Wechselwirkung des Chaperons IpgE mit dem Effektorprotein IpgD sowie mit Spa-orf11

4.2.1 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem IpgE

Das Typ III-Translokon-spezifische Chaperon IpgE besteht aus 120 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 13.7 kDa. In der Bakterienzelle dient es hauptsächlich der Stabilisierung des Effektorproteins IpgD [43][78]. Bereits in meiner Diplomarbeit erfolgte die Aufreinigung des heterolog in *Escherichia coli* produzierten IpgE. Dabei wurde IpgE zunächst als lösliches Fusionsprotein mit einem *N*-terminalen GST-Anteil produziert, das im Batch-Verfahren an eine Glutathion-Sepharose-Affinitätsmatrix gebunden wurde. Nach Waschen des gebundenen Fusionsproteins wurde der IpgE-Anteil mittels einer entsprechenden Schnittstelle proteolytisch abgespalten und von dem an die Affinitätsmatrix gebundenen GST-Anteil abgetrennt. Obwohl die Aufreinigung prinzipiell erfolgreich verlief, wurde durch das in meiner Diplomarbeit etablierte Protokoll lediglich eine moderate Ausbeute von ca. 2,3 mg reinem IpgE pro Liter Bakterienkultur erzielt. Um für geplante Kristallisationsversuche ausreichende Mengen dieses Proteins darstellen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression des *GST-ipgE*-Fusionsgens und die anschließende Aufreinigung des Proteins optimiert.

Der Vektor pGEX-4T-mod bietet die Möglichkeit, ein solches Fusionsprotein aus *N*-terminalem GST-*Tag* und Zielprotein zu produzieren. Nach Aufreinigung kann das Zielprotein durch proteolytische Spaltung mit Thrombin vom *Tag* befreit werden. Zum Einbringen des Zielgens stehen eine MCS mit verschiedenen Restriktionsendonuklease-Schnittstellen zur Verfügung (siehe hierzu die Vektorkarte unter 2.1.8).

Das *ipgE*-Gen wurde durch Amplifikation mit den Primern ipgE_f und ipgE_b (siehe 2.1.7) aus dem Virulenzplasmid pWR501 erhalten, wobei durch den Primer ipgE_f eine *Nde*I-Schnittstelle am 5'-Ende (bezüglich der Sense-Richtung) und durch den Primer ipgE_b eine *Xho*I-Schnittstelle am 3'-Ende angefügt wurde (siehe dazu Abbildung 4.6 a). Das PCR-Produkt wurde über diese Schnittstellen in den Vektor pGEX-4T-mod (siehe Abbildung 4.6 b) eingeführt. Das erhaltene Plasmid wurde als pGEX-4T-mod-ipgE bezeichnet.

Abbildung 4.6: a) PCR-Produkt der Amplifikation von *ipgE* aus dem Virulenzplasmid pWR501 mit Hilfe der Primer IpgE_f und IpgE_b, die eine *Nde*I-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Xho*I-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. In Rot sind die Schnittstellen für *Nde*I und *Xho*I hervorgehoben.
b) Die MCS des Vektors pGEX-4T-mod, in die das Amplikon insertiert werden soll, wobei in Blau die Erkennungssequenz für Thrombin wiedergegeben und die Schnittstelle mit ▲ gekennzeichnet ist. In Rot sind die Schnittstellen für *Nde*I und *Xho*I hervorgehoben.
c) Konstrukt pGEX-4T-mod-ipgE, welches durch das Einfügen des PCR-Produktes über die *Nde*I- und *Xho*I-Schnittstellen erhalten wurde. In Blau sind die zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His hervorgehoben, die nach Spaltung mit Thrombin (die Schnittstelle ist mit ▲ gekennzeichnet) noch am Zielprotein verbleiben. In Rot sind die beiden Schnittstellen für *Nde*I und *Xho*I hervorgehoben.

Abbildung 4.6 c) gibt die MCS des Vektors mit eingefügtem *ipgE*-Gen wieder. Die Abbildung zeigt, dass nach Abspalten des GST-Anteils vom Zielprotein die drei zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His am *N*-Terminus des Zielproteins verbleiben, wodurch sich für das rekombinante IpgE ein Molekulargewicht von 14.0 kDa ergibt.

Nach Fertigstellung des *ipgE*-Expressionsplasmides wurde es in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL transformiert. Im Anschluss wurde die optimale Wuchstemperatur und -dauer der Bakterienkultur nach Induktion der Zielgenexpression ermittelt. Aus Tabelle 5.1 wird klar ersichtlich, dass eine Erniedrigung der Wuchstemperatur von 37 °C auf 15 °C sowie eine damit einhergehende Verlängerung der Expressionsdauer von 3 h auf 12 h eine deutliche Erhöhung der Produktion von Fusionsprotein zur Folge hatte.

Tabelle 4.1: Ausbeuten der verschiedenen Parametertests für die IpgE-Expression aus 1 L Kultur

Temperatur	Induktionsdauer	Menge Fusionsprotein aus 1 L Kultur
37 °C	3 h	11.3 mg
30 °C	6 h	24.0 mg
15 °C	12 h	87.2 mg

Eine weitere Steigerung der Proteinausbeuten wurde durch eine Veränderung des Reinigungsprotokolls erzielt. So wurde nach erfolgter Expression und Zellaufschluss die lösliche Fraktion des Bakterienlysats auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach Waschen des gebundenen Fusionsproteins mit PBS-Puffer erfolgte die proteolytische Abtrennung des IpgE-Anteils vom GST-Anteil, indem gelöstes Thrombin auf die Säule aufgetragen wurde. Nach mehrstündiger Inkubation bei 4 °C wurde das IpgE-Protein mit Waschpuffer eluiert und so von dem an die Affinitätsmatrix gebundenen GST-Anteil abgetrennt. Eine SDS-PAGE der so gewonnenen IpgE-Präparation zeigte, dass sie noch geringe Mengen an Verunreinigungen enthielt, weshalb ein zusätzlicher Anionenaustauschchromatographieschritt in das Reinigungsprotokoll aufgenommen wurde (siehe Abbildung 4.7).

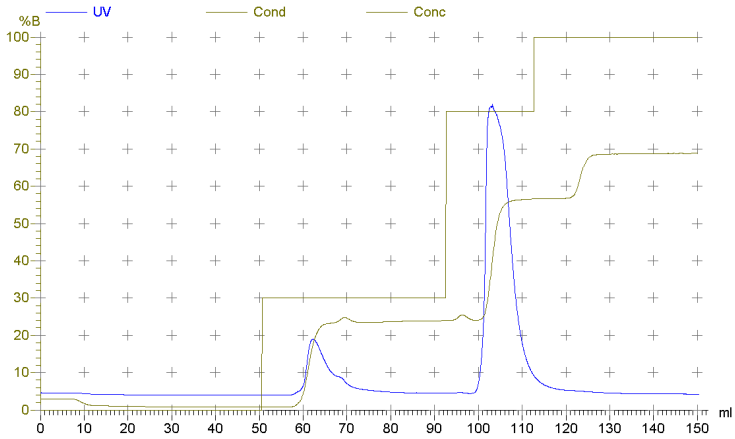

Abbildung 4.7: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie während der IpgE-Reinigung durchgeführt mit einer HiTrap™ DEAE FF-Säule. Die Elution von Verunreinigungen erfolgte bei einer NaCl-Konzentration von 300 mM. Die Elution des Zielproteins erfolgte in einem Volumen von 10 mL bei einer NaCl-Konzentration von 800 mM.

Schließlich wurde durch eine finale Größenausschlusschromatographie (siehe Abbildung 4.8) praktisch reines IpgE erhalten. SDS-PAGE der Präparation und anschließende Färbung des Gels mit Coomassie-Blau ließ keine Verunreinigungen mehr erkennen (siehe Abbildung 4.9).

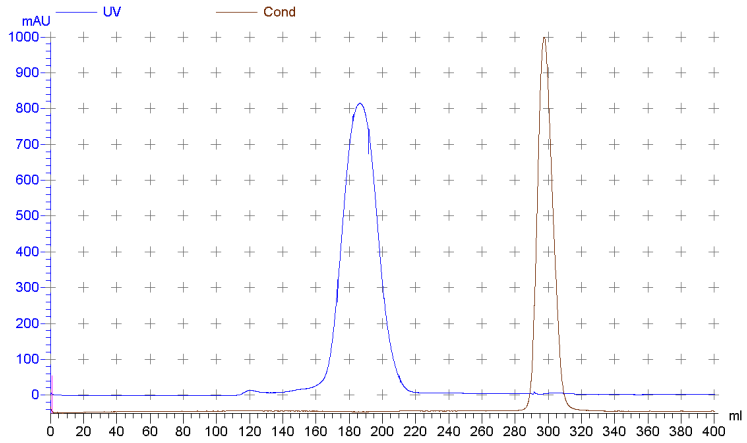

Abbildung 4.8: Chromatogramm der abschließenden Größenausschlusschromatographie während der IpgE-Reinigung durchgeführt mit einer HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade Säule. Die Elution von IpgE erfolgte in dem Volumenbereich zwischen 160 mL und 220 mL.

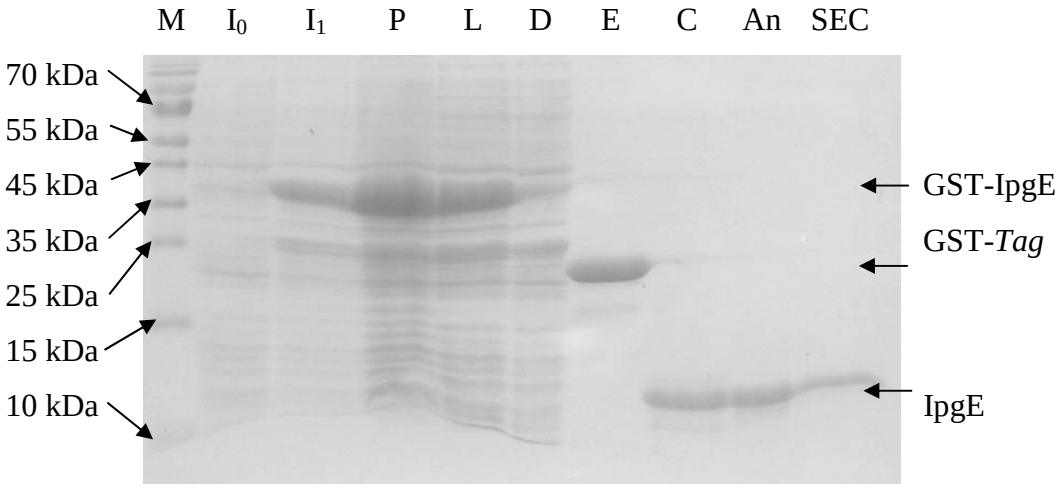

Abbildung 4.9: Aufreinigung von rekombinantem IpgE, verfolgt über SDS-PAGE: Marker (M), Gesamtzelllysat vor Induktion (I_0), Gesamtzelllysat 12 h nach Induktion; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des GST-IpgE-Fusionsproteins beträgt 40.2 kDa; deutlich ist eine Bande bei der entsprechenden Laufhöhe sichtbar (I_1), unlösliche Fraktion des Zelllysats (P), lösliche Fraktion des Zelllysats (L), Durchfluss nach Auftrag der löslichen Fraktion des Zelllysats auf die Glutathion-Sepharose-Säule (D), Eluat von der Glutathion-Sepharose-Säule mit GSH-Elutionspuffer nach Thrombinverdau mit dem GST-*Tag* bei 26 kDa (E), IpgE-haltiges Eluat von der Glutathion-Sepharose-Säule mit PBS-Puffer nach Thrombinverdau (C), Elution von der Anionenaustausch-Chromatographiesäule HiTrap™ DEAE FF bei 800 mM NaCl (An), Elutionspeak des Molekularsiebs HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 (SEC).

Die Ausbeute betrug 20 mg IpgE pro Liter Bakterienkultur. Experimentelle Einzelheiten der Aufreinigung sind dem Material- und Methodenteil (siehe 2.2.2.16) zu entnehmen.

Bei einer analytischen Größenausschlusschromatographie mit einer kalibrierten Säule (siehe 2.2.2.8) eluierte das gereinigte IpgE mit einem Volumen von 15.72 mL ± 0.03 mL (siehe Abbildung 4.10), woraus sich mit Hilfe von Gleichung (3) (siehe 3.2.2.8) ein Molekulargewicht von 40.5 kDa ± 0.5 kDa berechnen lässt. Tatsächlich liegt IpgE mit größter Wahrscheinlichkeit wie andere Typ III-Translokon-spezifische Chaperone als Homodimer vor. Die deutliche Abweichung des experimentell ermittelten Molekulargewichts von dem berechneten Molekulargewicht des homodimeren Komplexes (28.0 kDa) lässt darauf schließen, dass die Form des IpgE-Dimers signifikant von einer globulären Form abweicht.

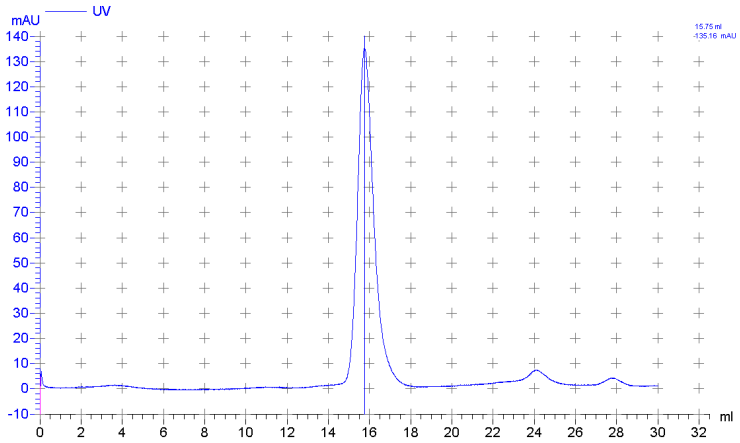

Abbildung 4.10: Chromatogramm einer analytischen Größenausschlusschromatographie mit gereinigtem IpgE. Die Chromatographie wurde mit einer Superdex 200 10/300 GL-Säule durchgeführt. Die Elution von IpgE erfolgte bei einem Volumen von 15.72 mL ± 0.03 mL.

Mit dem gereinigten IpgE wurden umfassende Kristallisationsversuche bei Temperaturen von 4°C und 18°C angestellt. Dabei kamen die kommerziell erhältlichen Screens von Hampton Research (Crystal Screen, PEG-Screen und Ammoniumsulfat-Screen) und von Emerald Biosciences (Wizard I und Wizard II) zum Einsatz (siehe Material- und Methodenteil Tabelle 2.11). Im Rahmen dieser Dr.-Arbeit konnte jedoch bisher keine Bedingung gefunden werden, die zur Kristallisation dieses Proteins führte.

4.2.2 Stabilitätsuntersuchungen von IpgE mit dem Thermal Shift Assay

Um die Chancen für eine erfolgreiche Kristallisation des gereinigten IpgE zu erhöhen, sollte mittels Thermal Shift Assay (siehe 2.2.2.12) nach Pufferkomponenten gesucht werden, welche eine möglichst hohe Stabilität dieses Proteins bewirken. In einem ersten Schritt sollte die Abhängigkeit der IpgE-Stabilität vom pH-Wert untersucht und gegebenenfalls der günstigste pH-Wert ermittelt werden. Überraschenderweise zeigten die durch den Assay erhaltenen Kurven unabhängig vom pH-Wert bereits zu Beginn, also bei einer Temperatur von 20°C, eine sehr hohe Fluoreszenz, die mit zunehmender Temperatur langsam abnahm (siehe Abbildung 4.11). Die Ergebnisse müssen dahingehend interpretiert werden, dass das Protein in der vorliegenden Präparation zwar in gelöster doch weitgehend entfalteter Form vorlag. Bei weiterer Erwärmung erfolgte schließlich die vollständige Denaturierung und die damit einhergehende Aggregation der Proteinmoleküle, was die beobachtete Abnahme der Fluoreszenz zur Folge hatte.

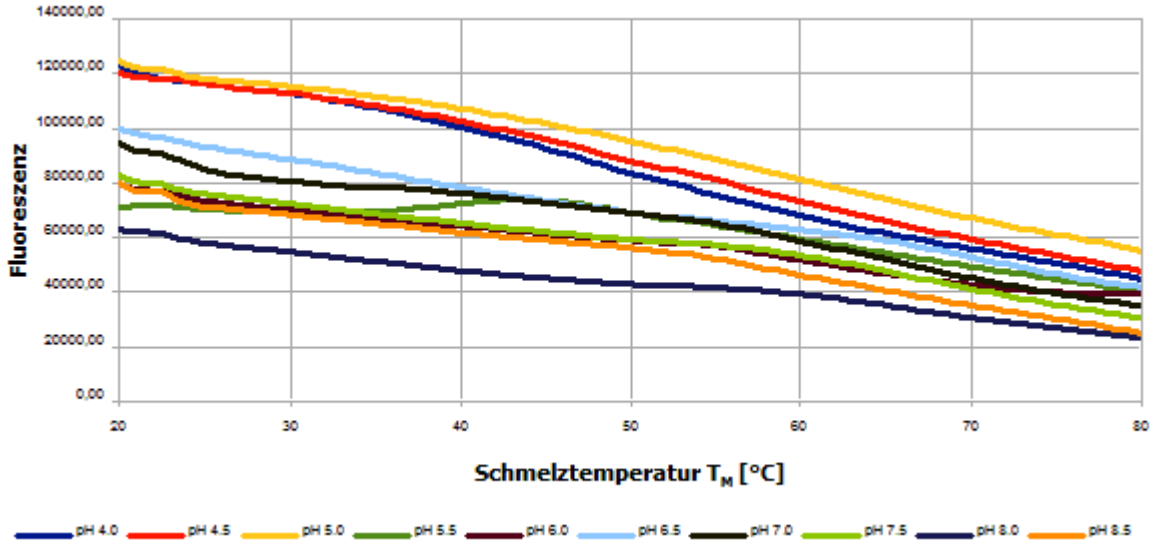

Abbildung 4.11: Bei verschieden pH-Werten ermittelte Schmelzkurven einer älteren IpgE-Präparation.

Um zu überprüfen, ob das Reinigungsprotokoll von IpgE unmittelbar entfaltetes Protein lieferte oder ob die im Thermal Shift Assay beobachtete Entfaltung auf eine längere Lagerung der verwendeten Präparation zurückzuführen war, wurde eine frische IpgE-Präparation angefertigt. Noch am Tag der Fertigstellung wurden von dieser Präparation Proben entnommen und dem Thermal Shift Assay unterzogen, wobei auch in diesem Fall bei den einzelnen Messungen der pH-Wert variiert wurde.

Auch die Messkurven, welche mit dem frisch präparierten IpgE erhalten wurden, zeigten durchweg eine hohe Anfangsfluoreszenz, die jedoch bei zunehmender Temperatur in manchen Fällen noch etwas zunahm, bzw. über einen längeren Temperaturbereich nur äußerst langsam abnahm. Dies deutete darauf hin, dass das neu präparierte Protein verglichen mit dem Protein der älteren Charge zumindest etwas weniger stark entfaltet vorlag. Der bei pH 6,0 durchgeführte Thermal Shift Assay lieferte trotz hoher Anfangsfluoreszenz eine auswertbare Schmelzkurve, wobei eine Schmelztemperatur (T_m) von 57°C ermittelt wurde (siehe Abbildung 4.12).

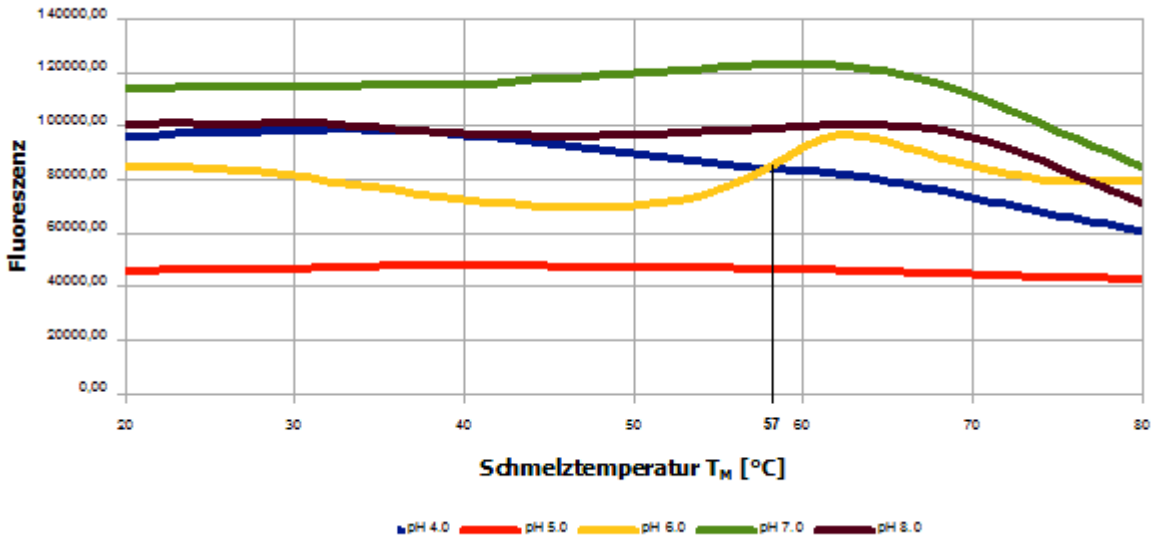

Abbildung 4.12: Schmelzkurven einer neueren Präparation von IpgE bei verschieden pH-Werten (der Thermal Shift Assay wurde noch am Tag der Fertigstellung der Präparation durchgeführt).

Unmittelbar nach Fertigstellung der Präparation wurde ein Teil davon mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert, während der verbleibende Teil bei bei 4°C gelagert wurde. Zwei Tage später wurden sowohl von der eingefrorenen als auch von der bei 4°C gelagerten Proteinlösung Proben entnommen und nochmals dem Thermal Shift Assay (bei variierendem pH-Wert) unterzogen. Die erhaltenen Messkurven zeigten praktisch den gleichen Verlauf wie die mit der älteren Proteinpräparation erhaltenen (in Abbildung 4.11 gezeigten) Kurven (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich hatte sowohl der Einfrier- und Auftauprozess als auch die zwei Tage dauernde Lagerung der Proteinlösung bei 4°C zur nahezu vollständigen Entfaltung von IpgE geführt.

So wurde erneut eine frische Präparation von IpgE angefertigt. Da der Thermal Shift Assay mit der vorausgehenden Präparation darauf hingedeutet hatte, dass das Protein bei pH 6,0 offensichtlich weniger stark entfaltet ist als bei niedrigeren oder höheren pH-Werten, wurde in der neu hergestellten Proteinlösung mit 10 mM MES ein pH von 6,0 eingestellt (in sämtlichen vorausgegegangenen Präparationen war mit 10 mM HEPES jeweils ein pH von 7,5 eingestellt worden). Darüber hinaus wurde die Proteinpräparation mit dem Reduktionsmittel DTT in einer Konzentration von 3 mM versetzt. Auch von dieser Charge wurden unmittelbar nach ihrer Fertigstellung Proben entnommen, mit denen der Thermal Shift Assay bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt wurde. Auch in diesem Fall lieferte die bei pH 6,0 durchgeführte Messung die beste Schmelzkurve, die darüber hinaus im Vergleich zu sämtlichen vorher durchgeführten Messungen eine deutlich erniedrigte Anfangsfluoreszenz zeigte (Abbildung 4.13). Die ermittelte T_m lag bei 56°C, war also nahezu identisch mit der bereits vorher gemessenen T_m von 57°C. Auch diese Messung zeigte, dass das Protein bei einem pH ≤ 5,0 praktisch vollständig entfaltet ist. Bei einem pH ≥ 7,0 liegt das Protein offensichtlich bereits teilweise entfaltet bzw. in einem wenig stabilen, für den Fuoreszenzfarbstoff leicht zugänglichen Zustand vor.

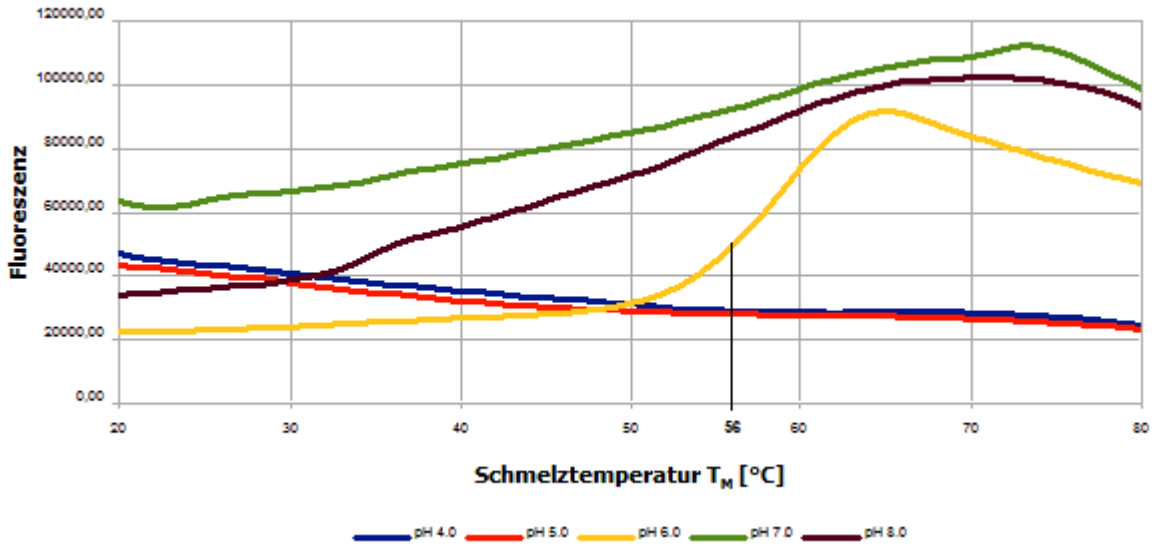

Abbildung 4.13: Schmelzkurven bei verschieden pH-Werten durchgeführt mit einer weiteren Präparation von IpgE die bei einem pH-Wert von 6.0 und in Anwesenheit von 3 mM DTT aufbewahrt wurde.

Auch von dieser Präparation wurde ein Teil mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert, während der Rest wurde bei 4°C gelagert wurde. Sowohl von der eingefrorenen als auch von der bei 4°C gelagerten Proteinlösung wurden vierzehn Tage später Proben entnommen, mit denen der Thermal Shift Assay durchgeführt wurde. Die erhaltenen Schmelzkurven waren nahezu identisch mit denen, die am Tag der Fertigstellung der Präparation aufgezeichnet worden waren (Daten nicht gezeigt). Das Protein war folglich weder durch den Einfrier- und Auftauprozess noch während der Lagerung bei 4°C entfaltet worden. Für die Stabilität und kompakte Faltung des Proteins sind daher offensichtlich neben einem pH-Wert von 6 die Anwesenheit eines Reduktionsmittels essentiell.

Um weitere Komponenten ausfindig zu machen, die einen positiven Einfluss auf die Stabilität und Kompaktheit von IpgE ausüben, wurden mit der zuletzt angefertigten Präparation zusätzliche Thermal Shift Assay Experimente durchgeführt. Sämtliche Messungen wurden bei konstantem pH 6,0 und jeweils mit 3 mM DTT, jedoch in Anwesenheit verschiedener Pufferkomponenten aus dem Additiv-Screen-Kit der Fa. Hampton Research (siehe Tabelle 2.11 im Material- und Methodenteil) angefertigt. Eine signifikante Erhöhung der T_m um 7°C wurde lediglich in Anwesenheit von 0,2 M NaCl beobachtet. Dieses Salz war jedoch in der IpgE-Präparation ohnehin in einer Konzentration von 0,15 M vorhanden. Ein vorläufiger Kristallisationsscreen, der mit der Präparation des nun offensichtlich gefalteten IpgE durchgeführt wurde, lieferte keine "Treffer". Eine umfassendere Suche nach Kristallisationsbedingungen für IpgE wurde im Rahmen der Dr.-Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr angestellt.

4.2.3 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem IpgD

Die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Phosphatase IpgD wird durch das Typ III-Translokon in die Wirtszelle sezerniert und löst dort eine Signaltransduktionskaskade aus, die letztlich zu einer gesteigerten Lebensfähigkeit der befallenen Wirtszelle führt [62]. Außerdem scheint IpgD an der Ausbildung der Eintrittsstruktur durch Aktivierung der wirtseigenen Proteine Cdc42 und Rac beteiligt zu sein, die die zytoskelletale Umgestaltung durch Bereitstellung von Actin-Monomeren zur Polymerisation erhöhen [87]. Für die Stabilität von IpgD im bakteriellen Zytoplasma ist seine Assoziation mit dem Chaperon IpgE erforderlich [43][78].

Für Kristallisationsversuche und biochemische Untersuchungen sollte IpgD in möglichst großen Mengen rein dargestellt werden. Dazu wurde es analog wie IpgE heterolog in *E. coli* als GST-Fusionsprotein produziert und affinitätschromatographisch gereinigt.

Zur Herstellung des dazu erforderlichen Überexpressionsplasmids wurde das *ipgD*-Gen *via* PCR mit den Primern ipgD_f und ipgD_b (siehe 2.1.7) aus dem Virulenzplasmid pWR501 amplifiziert. Dabei wurde am 5'-Ende (bezüglich der Sense-Richtung) durch den Primer ipgD_f eine *Bam*HI-Schnittstelle und am 3'-Ende durch den Primer ipgD_b eine *Not*I-Schnittstelle angefügt (siehe Abbildung 4.14 a). Das PCR-Produkt wurde über diese Schnittstellen in die MCS des Vektors pGEX-4T-mod (siehe Abbildung 4.14 b) eingesetzt. Das erhaltene Plasmid wurde als pGEX-4T-mod-ipgD bezeichnet. Abbildung 4.14 c) gibt die MCS des Vektors mit eingefügtem *ipgD*-Gen wieder.

a) *ipgD*-PCR-Produkt

```
          BamHI-                                                    NotI----
       GGCGGATCCATGCACATAACTAATTTGGGATTGC...ipgD...GGTGAAAGGGTATTCGTCATTTGTATAAGCGGCCGCGCC
                MetHisIleThrAsnLeuGlyLeuH...IpgD...tValLysGlyTyrSerSerPheValEnd
```

b) pGEX-4T-mod

```
                                                SmaI--    XhoI--
                              NdeI--   BamHI-  EcoRI-     SalI--    NotI----
         ...CTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGCGGGGATCCCCGGAATTCCCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
         ...LeuValProArgGlySerHisMetArgGlySerProGluPheProGlyArgLeuGluArgProHisArgAspEND...
                        ▲Thrombin
```

c) pGEX-4T-mod-ipgD

```
                              NdeI--   BamHI-                       NotI----
         ...CTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGGAAGGATCCATGCAC..ipgD..TTTGTATAAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
         ...LeuValProArgGlySerHisMetArgGlySerMetHis..IpgD..PheValEnd
                        ▲Thrombin
```

Abbildung 4.14: a) PCR-Produkt der Amplifikation von *ipgD* aus dem Virulenzplasmid pWR501 mit Hilfe der Primer IpgD_f und IpgD_b, die eine *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Not*I-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. Die beiden Schnittstellen *Bam*HI und *Not*I sind in Rot hervorgehoben.
b) Die MCS des Vektors pGEX-4T-mod, in die das Amplikon insertiert werden soll, wobei die Erkennungssequenz für Thrombin in Blau wiedergegeben und die Schnittstelle mit ▲ gekennzeichnet ist. In Rot sind die Restriktionsendonuklease-Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben.
c) Konstrukt pGEX-4T-mod-ipgE, welches durch das Einfügen des PCR-Produktes über die *Bam*HI- und *Not*I-Schnittstellen erhalten wurde. In Blau wurden die zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His-Met-Arg-Gly-Ser hervorgehoben, die nach Spaltung mit Thrombin (die Schnittstelle ist mit ▲ gekennzeichnet) noch am Zielprotein verbleiben. In Rot sind die beiden Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass nach Abspaltung des GST-Anteils vom Zielprotein die sieben zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His-Met-Arg-Gly-Ser am *N*-Terminus des Zielproteins verbleiben, woraus sich für das rekombinante IpgD ein Molekulargewicht von 60.4 kDa ergibt.

Zur Aufreinigung von IpgD wurde nach Expression des *GST-ipgD*-Fusionsgens in dem *E coli*-Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL und nach dem Aufschließen der Bakterienzellen die lösliche Fraktion des Lysats auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen und so das Fusionsprotein an die Säulenmatrix gebunden. Nach Waschen mit PBS-Puffer erfolgte auch in diesem Fall die proteolytische Abspaltung des IpgD- vom GST-Anteil durch Auftragen von gelöstem Thrombin auf die Affinitätssäule. Nach mehrstündiger Inkubation bei 4°C wurde IpgD mit Waschpuffer von dem an die Affinitätsmatrix gebundenen GST abgetrennt und von der Säule eluiert. Eine abschließende präparative Größenausschlusschromatographie (siehe Abbildung 4.15) lieferte nahezu reines IpgD mit einer Ausbeute von 3.0 mg Protein pro Liter Bakterienkultur. Die SDS-PAGE der Präparation und anschließende Färbung des Gels mit Coomassie-Blau ist in Abbildung 4.16 gezeigt. Weitere experimentelle Details der IpgD-Aufreinigung sind dem Material- und Methodenteil (2.2.2.20) zu entnehmen.

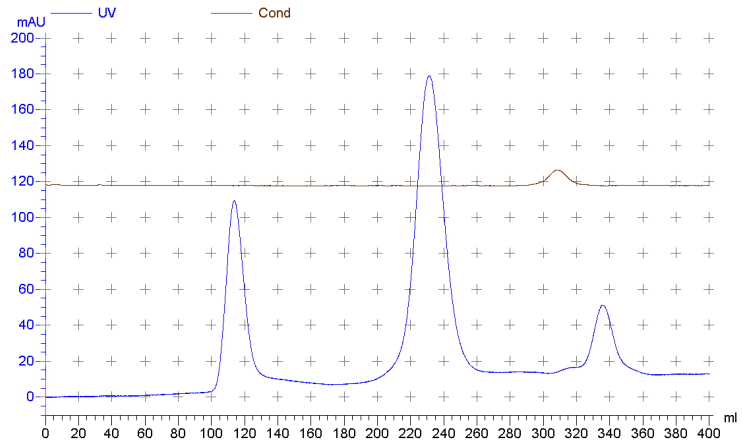

Abbildung 4.15: Chromatogramm der abschließenden Größenausschlusschromatographie während der IpgD-Reinigung durchgeführt mit einer HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade Säule. Die Elution von IpgD erfolgte in dem Volumenbereich zwischen 210 mL und 260 mL.

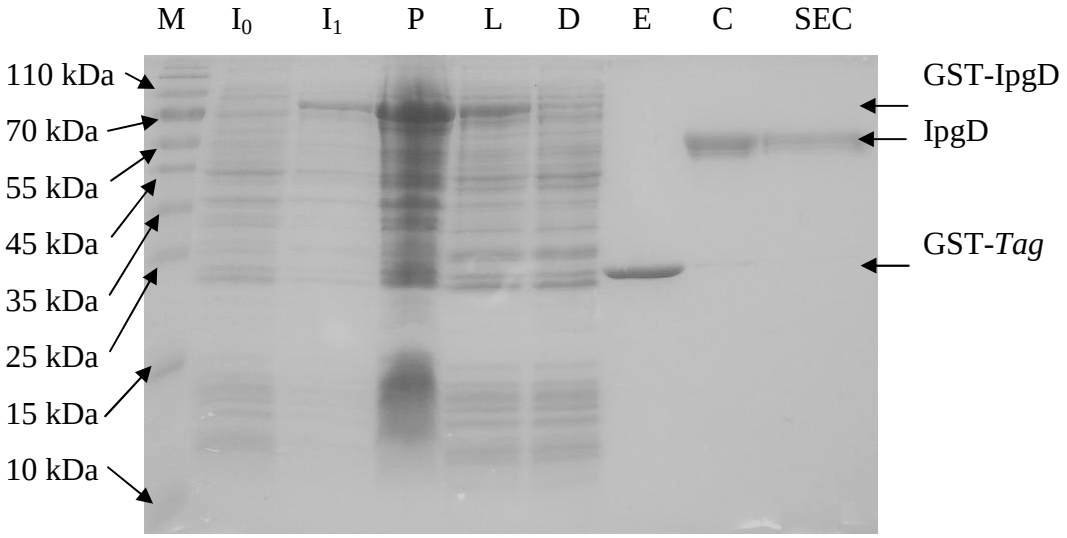

Abbildung 4.16: SDS-Page der Präparation von IpgD: Marker (M), Gesamtzelllysat vor Induktion (I_0), Gesamtzelllysat 12 h nach Induktion; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des GST-IpgD-Fusionsproteins beträgt 86.7 kDa; deutlich ist eine Bande bei der entsprechenden Laufhöhe sichtbar (I_1), unlösliche Fraktion des Zelllysats (P), lösliche Fraktion des Zelllysats (L), Durchfluss nach Auftrag der löslichen Fraktion des Zelllysats auf die Glutathion-Sepharose-Säule (D), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit GSH-Elutionspuffer nach Thrombinverdau (E), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit PBS-Puffer nach dem Thrombinverdau (C), Elutionspeak des Molekularsiebs HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 (SEC). In Bahn P ist erkennbar, dass sich offensichtlich ein signifikanter Anteil des Fusionsproteins in der unlöslichen Fraktion des Gesamtzelllysats befindet und somit unmittelbar bei der Aufreinigung verloren geht. Bahn SEC zeigt einige schwache Banden bei einem Molekulargewicht < 55 kDa. Ob es sich dabei um Abbauprodukte von IpgD, Abbruchfragmente bei der Biosynthese von IpgD oder sonstige Verunreinigungen handelt, konnte im Rahmen der Dr.-Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr ermittelt werden.

Bei einer analytischen Größenausschlusschromatographie, die mit einer kalibrierten Säule durchgeführt wurde (siehe 2.2.2.8), eluierte das gereinigte IpgD mit einem Volumen von 15.05 mL ± 0.02 mL (siehe Abbildung 4.17). Mit Hilfe von Gleichung (3) (siehe 3.2.2.8) berechnet sich aus dem Elutionsvolumen ein Molekulargewicht von 54.8 kDa ± 3.6 kDa. Dieser Wert weicht nur geringfügig von dem aus der Aminosäuresequenz des Proteins berechneten Molekulargewicht von 60.5 kDa pro Polypeptidkette ab. IpgD liegt folglich in Lösung offensichtlich als Monomer vor.

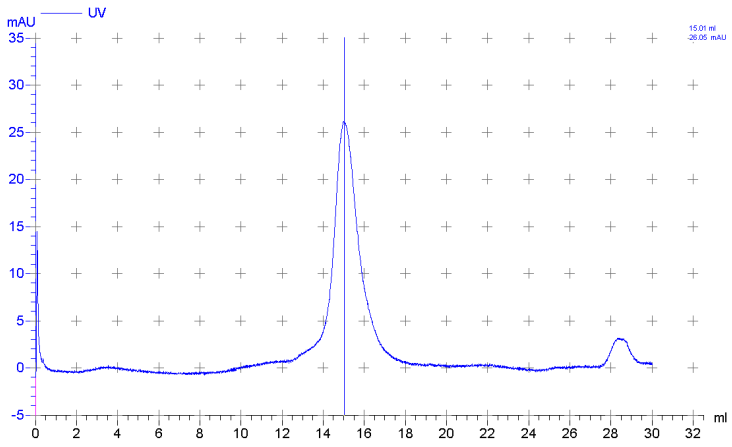

Abbildung 4.17: Chromatogramm einer analytischen Größenausschlusschromatographie mit gereinigtem IpgD. Die Chromatographie wurde mit einer Superdex 200 10/300 GL durchgeführt. Die Elution von IpgD erfolgte bei einem Volumen von 15.05 mL ± 0.02 mL.

Auch mit dem gereinigten IpgD wurden umfangreiche Kristallisationsversuche bei Temperaturen von 4°C und 18°C durchgeführt. Leider konnte auch für dieses Protein im Verlauf der vorliegenden Arbeit keine Bedingung gefunden werden, die zur Bildung von Kristallen führte (zu den verwendeten Screens siehe Material- und Methodenteil Tabelle 2.11).

4.2.4 Qualitative und quantitative Untersuchung der Interaktion zwischen IpgD und IpgE

In der vorliegenden Arbeit sollte die in der Literatur beschriebene Interaktion von IpgD und IpgE durch eine qualitative Analyse verifiziert werden [43][78]. Zu diesem Zweck wurde die lösliche Fraktion eines Gesamtzelllysats von Bakterien, die das GST-IpgD-Fusionsprotein rekombinant produziert hatten, auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen und so das Fusionsprotein an die Säulenmatrix gebunden. Nach einem Waschschritt wurde gereinigtes IpgE auf die Säule aufgetragen. Schließlich wurde nach einem weiteren Waschschritt das GST-IpgD-Fusionsprotein mit reduziertem Glutathion (GSH) von der Säule eluiert (siehe 2.2.2.14).

Die SDS-PAGE des Eluats und anschließende Färbung des Gels mit Coomassie-Blau zeigte, dass das Eluat neben dem Fusionsprotein auch IpgE enthielt, welches offensichtlich an den IpgD-Anteil des Fusionsproteins gebunden war (siehe Abbildung 4.18). Wurde IpgE in der gleichen Menge auf die Säule aufgetragen und gewaschen, ohne dass das GST-IpgD-Fusionsprotein vorher an die Affinitätsmatrix gebunden worden war, enthielt ein entsprechendes GSH-Eluat kein IpgE (Daten nicht gezeigt).

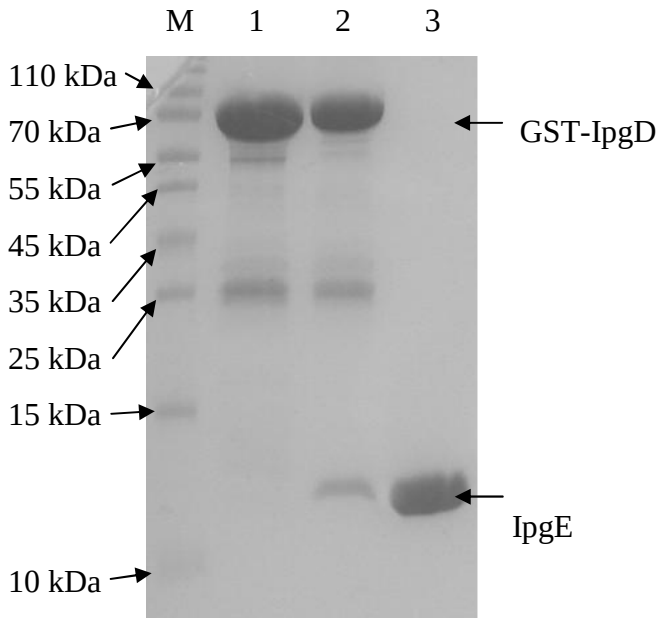

Abbildung 4.18: SDS-PAGE der Interaktionsstudie von IpgE mit dem Fusionsprotein GST-IpgD. Bahn 1: Elution des an die Glutathion-Sepharose-Säule gebundenen GST-IpgD-Fusionsproteins mit GSH-Elutionspuffer. Bahn 2: Elution mit GSH-Elutionspuffer nach Inkubation mit IpgE und erneutem Waschen. Neben dem GST-IpgD-Fusionsprotein ist klar eine Bande zu erkennen, die dem IpgE-Protein zuzuordnen ist, welches offensichtlich an IpgD gebunden war und so bei dem vorausgehenden Waschschritt nicht entfernt worden war. Bahn 3: reines IpgE.

Die quantitative Untersuchung der IpgD-IpgE-Wechselwirkung erfolgte mittels Microscale-Thermophorese (siehe 2.2.2.20). Dabei kam fluoreszenzmarkiertes IpgD zum Einsatz, dessen Konzentration innerhalb einer Messreihe konstant gehalten wurde. Die Konzentration des unmarkierten Interaktionspartners IpgE wurde dagegen variiert. In Abbildung 4.19 ist das Thermophoresesignal, welche bei den einzelnen Messungen ermittelt wurde, gegen die jeweils eingesetzte IpgE-Konzentration bei logarithmischer Skalierung der Abszisse aufgetragen. Mit Gleichung (11) wurde aus dem Kurvenverlauf mittels Auswerte-Software der Firma NanoTemper eine Dissoziationskonstante (K_D) des IpgD-IpgE-Komplexes von 51.4 µM ± 7.0 µM berechnet.

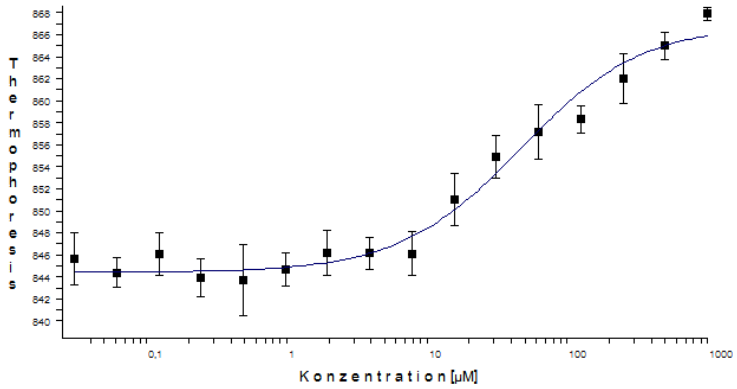

Abbildung 4.19: Microscale-Thermophorese von 250 nM fluoreszenzmarkiertem IpgD bei verschiedenen Konzentrationen des Interaktionspartners IpgE. Aufgetragen ist das Thermophoresesignal gegen die Konzentration von IpgE bei logarithmischer Skalierung der Abszisse. Die geplotteten Durchschnittswerte und Fehlerbalken resultierten aus jeweils neun Einzelmessungen.

Dieser Wert liegt in einer Größenordnung, der für die Wechselwirkung von Effektoren mit ihren spezifischen Typ III-Translokationssystem-Chaperonen durchaus typisch ist [104].

4.2.5 Heterologe Produktion und Reinigung der verkürzten IpgD-Variante IpgD-30,-8

Flexible und unstrukturierte *N*- und *C*-Termini von Proteinen erschweren häufig aus sterischen und/oder entropischen Gründen deren Kristallisation [105]. Eine Analyse der IpgD-Sequenz mit dem Sekundärstrukturvorhersageprogramm NetSurfP ergab (siehe 2.2.2.15), dass die *N*-terminalen 30 sowie die *C*-terminalen acht Aminosäuren von IpgD mit großer Wahrscheinlichkeit keinerlei Sekundärstruktur aufweisen, sondern bewegliche Loop-Regionen darstellen.

Um die Chancen einer erfolgreichen Kristallisation von IpgD zu erhöhen, wurde von dem Protein eine Variante konstruiert, die am *N*-Terminus um eben diese 30 Aminosäuren und am *C*-Terminus um weitere acht Aminosäuren verkürzt war. Die resultierende IpgDΔ1-30Δ531-538-Variante erhielt die Bezeichnung IpgD-30,-8.

Um das für die Darstellung notwendige Expressionsplasmid herzustellen, wurde der *ipgD*-Leserahmen ab Codon 31 bis inklusive Codon 530 mittels PCR amplifiziert. Durch die dabei verwendeten Primer gD-30_f und gD-8_b (siehe 2.1.7) wurde aus dem Virulenzplasmid pWR501 das entsprechend verkürzte *ipgD*-Gen erhalten, wobei durch den Primer gD-30_f am 5´-Ende des Leserahmens (bezüglich der Sense-Richtung) eine *Bam*HI- und durch den Primer gD-8_b am 3´-Ende eine *Not*I-Schnittstelle eingebracht wurde. So konnte das verkürzte *ipgD*-Gen im Leserahmen mit der vorausgehenden *GST*- und der nachgeschalteten 8xHis-*Tag*-Sequenz in die MCS des Expressionsplasmides pHW1 eingefügt werden.

a) *ipgD-30,-8*-PCR-Produkt

*Bam*HI- Codon 31 *ipgD* Codon 530 *Not*I----

GGCGGATCCATGTATCCGCGCGGCGTAAGCGTGATTTCATATCAAAG...GGGACCCAAAAATATGGAATATGTATCCGCGCGGCGCGGCCGCTAAACTAT

MetTyrProArgGlyValSerValIleSerTyrGlnAr...lyAspProLysIleTrpAsnMetTyrProArgGlyAlaAlaAla

▲Thrombin ▲Thrombin

b) pHW1 *Nde*I--*Bam*HI-*Xho*I--*Not*I----

...GST-Gen...AACTCGCATATGGGATCCCTCGAGGCGGCCGCCCATCATCATCATCATCATCATTGA...

...GST-*Tag*...AsnSerHisMetGlySerLeuGluAlaAlaAlaHisHisHisHisHisHisHisEnd...

c) pHW1-ipgD-30,-8

*Bam*HI- Codon 31 *ipgD* bis Codon 530 *Not*I----

...GGATCCATGTATCCGCGCGGCGTAAGCGTGATTTCATAT...CCAAAAATATGGAATATGTATCCGCGCGGCGCGGCCGCC...

...GlySerMetTyrProArgGlyValSerValIleSerTyr...ProLysIleTrpAsnMetTyrProArgGlyAlaAlaAla...

▲Thrombin ▲Thrombin

Abbildung 4.20: a) PCR-Produkt der Amplifikation der verkürzten Variante von *ipgD* aus dem Virulenzplasmid pWR501 mit Hilfe der Primer IpgD_f und IpgD_b, die eine *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Not*I-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. In Rot sind die beiden Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I und in Blau sind die zusätzlich eingefügten Thrombin-Schnittstellen hervorgehoben.

b) Die MCS des Expressionsplasmides pHW1 mit dem stromaufwärts liegenden GST-Anteil und dem stromabwärts liegenden 8xHis-*Tag*. GST-Tag, MCS und 8xHis-*Tag* befinden sich im gleichen Leserahmen. In Rot sind die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben.

c) Das Konstrukt pHW1-ipgD-30,-8, welches durch das Einfügen des PCR-Produktes über die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I erhalten wurde. In Blau wurden die zusätzlichen Aminosäuren Glycin am *N*-Terminus und Tyr-Pro-Arg am C-Terminus hervorgehoben, die nach Spaltung mit Thrombin (die Schnittstelle ist mit ▲ gekennzeichnet) noch am Zielprotein verbleiben. In Rot sind die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben.

Des Weiteren wurde durch die Amplifikationsprimer sowohl zwischen der *Bam*HI-Schnittstelle und der Zielgensequenz als auch zwischen der Zielgensequenz und der *Not*I-Schnittstelle jeweils eine Thrombin-Erkennungssequenz eingefügt. Das fertige Konstrukt, das die Bezeichnung pHW1-ipgD-30,-8 erhielt, erlaubte die heterologe Produktion eines Fusionsproteins mit *N*-terminalem GST-Anteil und *C*-terminalem 8xHis-*Tag*. [Für verkürzte Proteinvarianten wurde in dieser Arbeit prinzipiell folgende Nomenklatur benutzt: Nach dem Namen des Proteins folgt die Anzahl der am *N*-Terminus deletierten Aminosäuren, nach dem Komma folgt dann die Anzahl der am *C*-Terminus deletierten Aminosäuren. Abschließend kann ein „S“ für ein Stopp-Codon am Ende des entsprechenden Gens stehen, das in manchen Fällen eingefügt wurde, um die Translation des 8xHis-*Tags* zu unterbinden.]

Das Abspalten der beiden *Tags* mit Thrombin führt zu der oben genannten IpgD-Variante, welche am *N*-Terminus um einen Glycinrest, am *C*-Terminus um das Tripeptid Tyr-Pro-Arg erweitert ist. So beträgt das Molekulargewicht der verkürzten IpgD-Variante insgesamt 56.2 kDa.

Zur Aufreinigung wurde nach erfolgter Genexpression in BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL und Zellaufschluss die lösliche Fraktion des Bakterienlysats auf eine Nickel-Sepharose-Säule aufgetragen. Nachdem unspezifisch an die Affinitätsmatrix gebundenes Protein mit 75 mM Imidazol entfernt worden war, wurde das über das 8xHis-*Tag* gebundene Fusionsprotein mit einer Lösung, die Imidazol in einer Konzentration von 300 mM enthielt, von der Säule eluiert (siehe Abbildung 4.21).

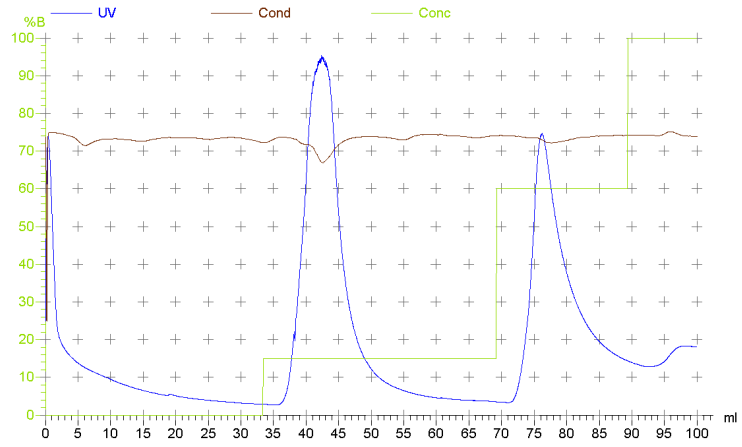

Abbildung 4.21: Elutionsprofil der HisTrap™ FF-Säule während der Reinigung von IpgD-30,-8. Die Elution von unspezifisch gebundenem Protein erfolgte mit 75 mM Imidazol, das Zielprotein wurde mit 300 mM Imidazol eluiert.

Das Eluat wurde im Anschluss auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach einem Waschschritt erfolgte die proteolytische Abspaltung des trunkierten IpgD- vom GST-Anteil sowie die Entfernung des 8×His-*Tags* durch Auftragen von gelöstem Thrombin auf die Affinitätssäule. Nach mehrstündiger Inkubation bei 4°C wurde das Zielprotein durch Elution mit Waschpuffer von dem an die Affinitätsmatrix gebundenen GST abgetrennt. Nachdem das in dem Eluat enthaltene Thrombin affinitätschromatographisch über eine Benzamidin-Sepharose-Säule entfernt worden war, lieferte eine finale Größenausschlusschromatographie (siehe Abbildung 4.22) nahezu reines IpgD-30,-8. Die Ausbeute betrug 1.0 mg pro Liter Bakterienkultur. Eine SDS-PAGE der bei den einzelnen Reinigungsschritten erhaltenen Fraktionen ist in Abbildung 4.23 gezeigt. Experimentelle Einzelheiten der Aufreinigung sind dem Material- und Methodenteil (2.2.2.21) zu entnehmen.

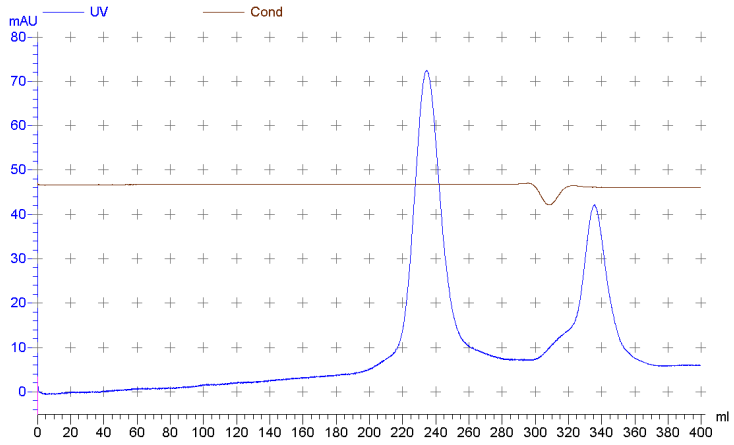

Abbildung 4.22: Chromatogramm der abschließenden Größenausschlusschromatographie während der Reinigung der verkürzten IpgD-Variante durchgeführt mit einer HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade Säule. Die Elution von IpgD-30,-8 erfolgte in dem Volumenbereich zwischen 210 mL und 260 mL.

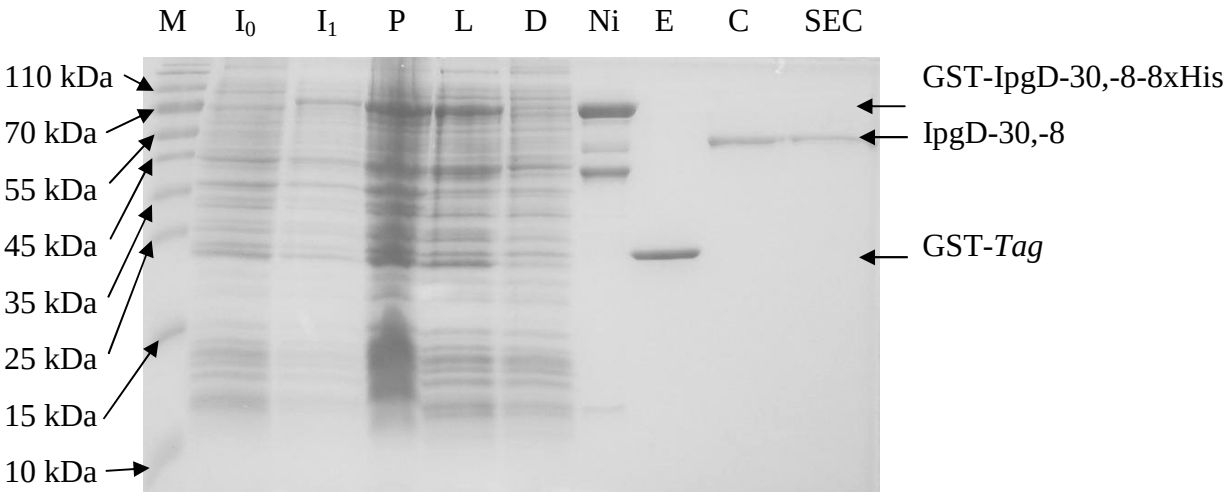

Abbildung 4.23: SDS-Page der Präparation von IpgD-30,-8: Marker (M), Gesamtzelllysat vor Induktion (I_0), Gesamtzelllysat 12 h nach Induktion; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des GST-IpgD-Fusionsproteins beträgt 84.1 kDa; deutlich ist eine Bande bei der entsprechenden Laufhöhe sichtbar (I_1), unlösliche Fraktion des Zelllysats (P), lösliche Fraktion des Zelllysats (L), Durchfluss nach Auftrag der löslichen Fraktion des Zelllysats auf die HisTrap™ FF-Säule (D), Elution der HisTrap™ FF-Säule (Ni), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit GSH-Elutionspuffer nach dem Thrombinverdau (E), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit PBS+S-Puffer nach Thrombinverdau (C), Elutionspeak des Molekularsiebs HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 (SEC). In Bahn P ist erkennbar, dass sich offensichtlich auch hier ein signifikanter Anteil des Fusionsproteins in der unlöslichen Fraktion des Gesamtzelllysats befindet.

Bei einer analytischen Größenausschlusschromatographie eluierte IpgD-30,-8 mit einem Volumen von 15.26 mL ± 0.08 mL. Dies entspricht einem Molekulargewicht von 49.7 kDa ± 1.8 kDa. Das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des Monomers beträgt 56.2 kDa. Die Größenausschlusschromatographie zeigte deutlich, dass auch die verkürzte Variante von IpgD als Monomer vorliegt und keinerlei Tendenz zeigt, höhermolekulare Aggregate auszubilden (siehe Abbildung 4.24).

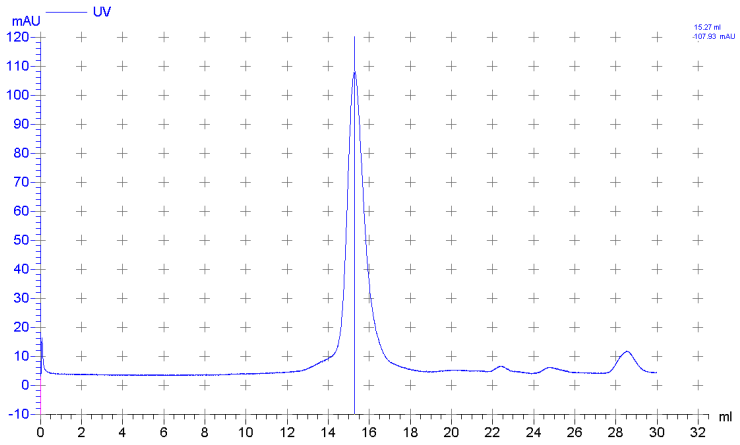

Abbildung 4.24: Chromatogramm einer analytischen Größenausschlusschromatographie mit der gereinigten verkürzten Variante IpgD-30,-8. Die Chromatographie wurde mit einer Superdex 200 10/300 GL durchgeführt. Die Elution von IpgD-30,-8 erfolgte bei einem Volumen von 15.26 mL ± 0.08 mL.

Mit der verkürzten Variante von IpgD konnten bis jetzt noch keine Kristallisationsversuche unternommen werden. Auch der Nachweis der Interaktion zwischen IpgE und der verkürzten IpgD-Variante mittels Affinitätssäule und Thermophorese steht noch aus.

4.2.6 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem Spa-orf11

Das Protein Spa-orf11, dessen Funktion noch unbekannt ist, besteht aus 89 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 10.4 kDa. Ein von Page *et al.* durchgeführter "Yeast Two Hybrid Screen" hatte gezeigt, dass es einen Interaktionspartner von IpgE darstellt [88]. Für Kristallisationsversuche und biochemische Untersuchungen sollte daher Spa-orf11 in möglichst großen Mengen rein dargestellt werden. Dazu wurde es wie IpgE und IpgD heterolog in *E. coli* als GST-Fusionsprotein produziert und affinitätschromatographisch gereinigt.

Um das dafür erforderliche Überexpressionsplasmid zu erzeugen, wurde das *spa-orf11*-Gen zunächst durch Amplifikation mit den Primern spa-orf11_f und spa-orf11_b (siehe 2.1.7) aus dem Virulenzplasmid pWR501 amplifiziert. Dabei wurde am 5’-Ende (bezüglich der Sense-Richtung) durch den Primer spa-orf11_f eine *Bam*HI-Schnittstelle und am 3’-Ende durch den Primer spa-orf11_b eine *Not*I-Schnittstelle angefügt (siehe Abbildung 4.25 a).

Das PCR-Produkt wurde mittels dieser Schnittstellen in die MCS des Vektors pGEX-4T-mod (siehe Abbildung 4.25 b) eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde als pGEX-4T-mod-spa-orf11 bezeichnet. Abbildung 4.25 c) zeigt die MCS des Vektors mit dem insertierten *spa-orf11*-Gen. Darüber hinaus zeigt die Abbildung, dass nach Abspaltung des GST-Anteils vom Zielprotein die sieben zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His-Met-Arg-Gly-Ser am *N*-Terminus des Zielproteins verbleiben, woraus sich für das rekombinante Spa-orf11 ein theoretisches Molekulargewicht von 11.1 kDa ergibt.

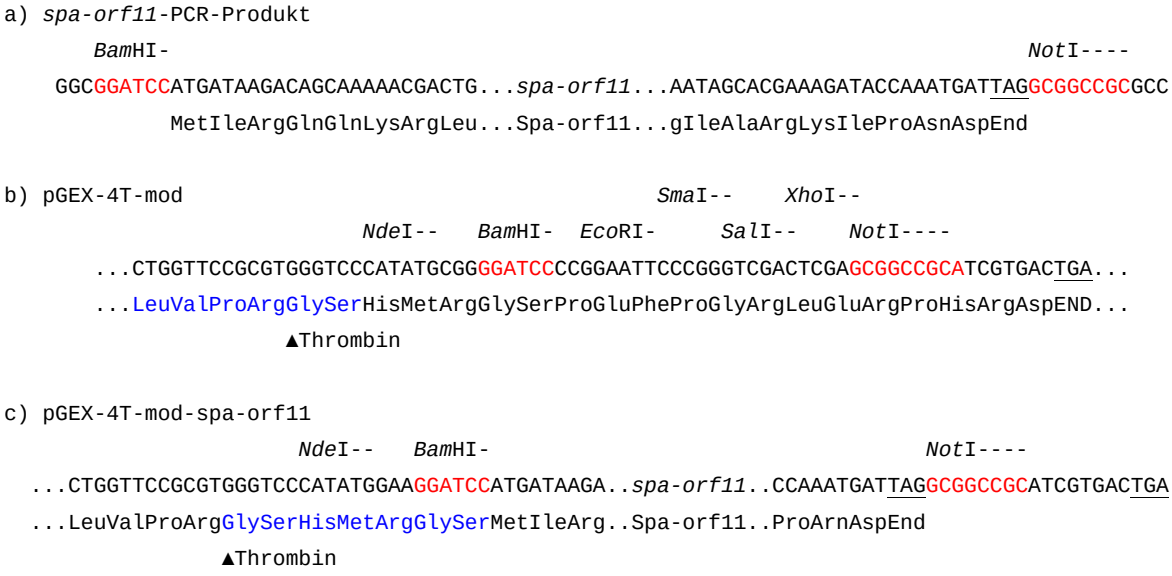

Abbildung 4.25: a) PCR-Produkt der Amplifikation von *spa-orf11* aus dem Virulenzplasmid pWR501 mit Hilfe der Primer spa-orf11_f und spa-orf11_b, die eine *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Not*I-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. Die beiden Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I sind in Rot hervorgehoben.
b) Die MCS des Vektors pGEX-4T-mod, in die das Amplikon insertiert werden soll. Die Erkennungssequenz für Thrombin ist in Blau wiedergegeben, die genaue Schnittstelle ist mit ▲ gekennzeichnet ist. In Rot sind die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen*Bam*HI und *Not*I hervorgehoben.
c) Konstrukt pGEX-4T-mod-spa-orf11, welches durch das Einfügen des PCR-Produkts über die *Bam*HI- und *Not*I-Schnittstellen erhalten wurde. In Blau sind die zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His-Met-Arg-Gly-Ser hervorgehoben, die nach Spaltung mit Thrombin am Zielprotein verbleiben. Die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I sind in Rot hervorgehoben.

Zur Aufreinigung wurde das Expressionsplasmid pGEX-4T-mod-spa-orf11 in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL tramsformiert. Nach rekombinanter Expression des Fusionsgens und Aufschluss der Bakterien wurde das Zelllysat auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen.

Die im Anschluss geplante proteolytische Abspaltung des Spa-orf11-Zielproteins vom GST-Anteil konnte jedoch nicht erfolgreich durchgeführt werden, da der unfusionierte Spa-orf11-Anteil unmittelbar seine Löslichkeit einbüßte und präzipitierte. Auch die Zugabe von Natriumchlorid bis zu einer Konzentration von 1 M oder die Anwesenheit des vermutlichen Interaktionspartners IpgE während des Thrombinverdaus konnten das Ausfällen des Proteins nicht verhindern.

Daher wurde das unverdaute Fusionsprotein aus Spa-orf11 und GST-*Tag* von der Glutathion-Matrix eluiert, um es für biochemische Untersuchungen einzusetzen. Eine abschließende präparative Größenausschlusschromatographie (siehe Abbildung 4.26) lieferte reines GST-Spa-orf11 mit einer Ausbeute von 5.0 mg Protein pro Liter Bakterienkultur. Die SDS-PAGE der Präparation nach Färbung des Gels mit Coomassie-Blau ist in Abbildung 4.27 gezeigt. Die experimentellen Details der Aufreinigung sind im Material- und Methodenteil (2.2.2.20) nachzulesen.

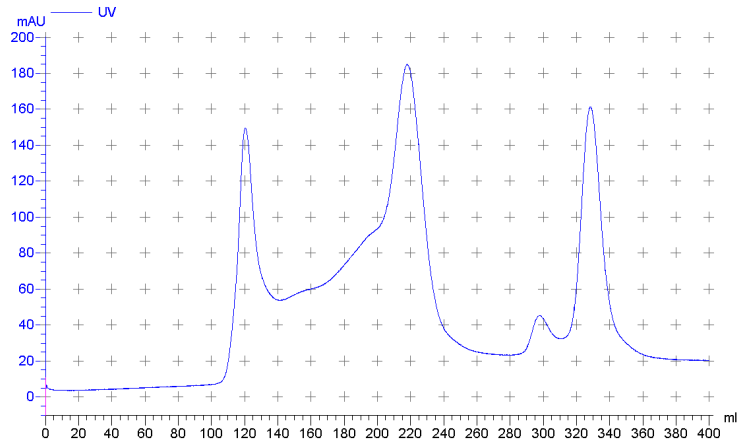

Abbildung 4.26: Chromatogramm der abschließenden Größenausschlusschromatographie während der GST-Spa-orf11-Reinigung durchgeführt mit einer HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade Säule. Die Elution von GST-Spa-orf11 erfolgte in dem Volumenbereich zwischen 210 mL und 240 mL.

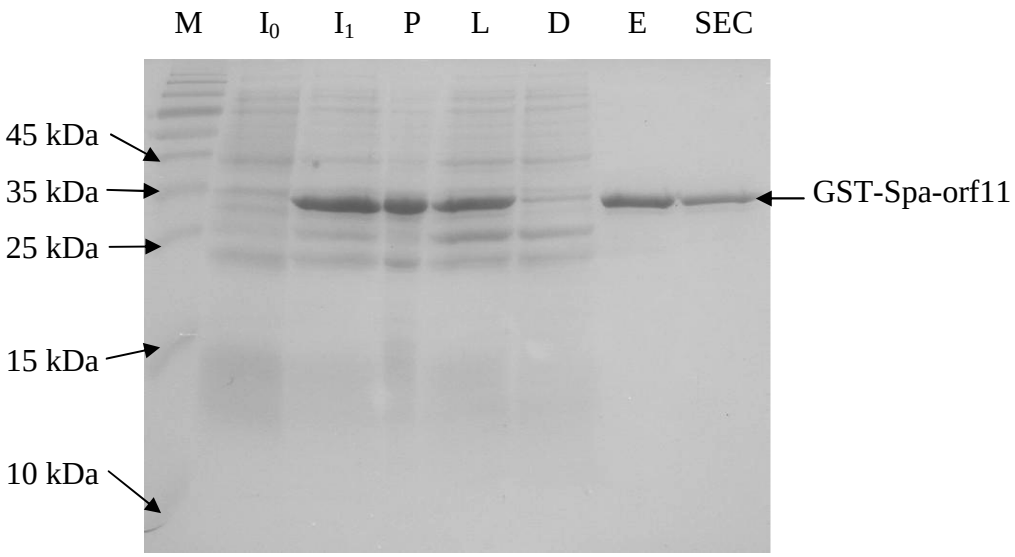

Abbildung 4.27: SDS-Page der Präparation von GST-Spa-orf11: Marker (M), Gesamtzelllysat vor Induktion (I_0), Gesamtzelllysat 12 h nach Induktion; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des GST-IpgD-Fusionsproteins beträgt 37.3 kDa; deutlich ist eine Bande bei der entsprechenden Laufhöhe sichtbar (I_1), unlösliche Fraktion des Zelllysats (P), lösliche Fraktion nach des Zelllysats (L), Durchfluss nach Auftrag der löslichen Fraktion des Zelllysats auf die Glutathion-Sepharose-Säule (D), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit GSH-Elutionspuffer (E), Elutionspeak des Molekularsiebs HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 (SEC). In Bahn P ist erkennbar, dass sich offensichtlich ein signifikanter Anteil des Fusionsproteins in der unlöslichen Fraktion des Gesamtzelllysats befindet und somit unmittelbar bei der Aufreinigung verloren geht.

4.2.7 Qualitative und quantitative Untersuchung der Interaktion zwischen IpgE und Spa-orf11

Zunächst sollte die in der Literatur beschriebene Interaktion von Spa-orf11 und IpgE durch eine qualitative Analyse verifiziert werden [88]. Zu diesem Zweck wurde die lösliche Fraktion eines Gesamtzelllysats von Bakterien, die das GST-Spa-orf11-Fusionsprotein rekombinant produziert hatten, auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen und so das Fusionsprotein an die Säulenmatrix gebunden. Nach einem Waschschritt wurde gereinigtes IpgE auf die Säule aufgetragen. Schließlich wurde nach einem weiteren Waschschritt das GST-Spa-orf11-Fusionsprotein mit reduziertem Glutathion (GSH) von der Säule eluiert (siehe 2.2.2.14).

Die SDS-PAGE des Eluats und anschließende Färbung des Gels mit Coomassie-Blau zeigte jedoch neben dem Fusionsprotein kein IpgE. Dies deutet darauf hin, dass eine Bindung von IpgE an den Spa-orf-11-Anteil des GST-Spa-orf11-Fusionsproteins nicht stattgefunden hatte oder zumindest zu schwach war, um die Elution von IpgE durch Waschpuffer zu verhindern (siehe Abbildung 4.28).

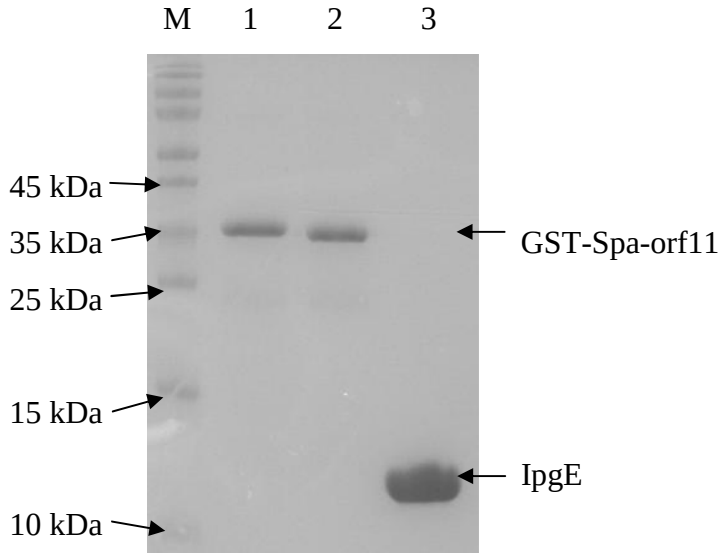

Abbildung 4.28: SDS-PAGE der Interaktionsstudie von IpgE mit dem Fusionsprotein GST-Spa-orf11. Bahn 1: Elution des an die Glutathion-Sepharose-Säule gebundenen GST-Spa-orf11-Fusionsproteins mit GSH-Elutionspuffer. Bahn 2: Elution mit GSH-Elutionspuffer nach Inkubation mit IpgE und erneutem Waschen. Eine Bande, die IpgE zugeordnet werden kann, ist nicht zu erkennen. Bahn 3: reines IpgE.

Die quantitative Untersuchung der Wechselwirkung zwischen GST-Spa-orf11 und IpgE erfolgte mittels Microscale-Thermophorese (siehe 2.2.2.20). Zuerst wurde als Negativkontrolle fluoreszenzmarkierte GST, deren Konzentration innerhalb einer Messreihe konstant gehalten wurde, mit verschiedenen Konzentrationen des unmarkierten IpgE vermessen. Dabei konnte keinerlei Interaktion zwischen GST und IpgE festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Um die Interaktion von IpgE mit dem Spa-orf11-Anteil des Fusionsproteins zu verifizieren, wurde nun das thermophoretische Verhalten von fluoreszenzmarkiertem GST-Spa-orf11, dessen Konzentration innerhalb einer Messreihe konstant gehalten wurde, in Abhängigkeit der Konzentration von IpgE untersucht. In Abbildung 4.29 ist das Thermophoresesignal, welche bei den einzelnen Messungen ermittelt wurde, gegen die jeweils eingesetzte IpgE-Konzentration bei logarithmischer Skalierung der Abszisse aufgetragen.

Mit Gleichung (11) wurde aus dem Kurvenverlauf mittels Auswerte-Software der Firma NanoTemper eine Dissoziationskonstante (K_D) des GST-Spa-orf11-IpgE-Komplexes von > 300 µM berechnet. Da der GST-Anteil keine Bindung gezeigt hatte, muss die beobachtete Interaktion auf die Bindung von IpgE an den Spa-orf11-Anteil zurückgeführt werden. Die geringe Affinität der Bindepartner erklärt das negative Ergebnis der qualitativen Interaktionsstudie mittels Glutathion-Sepharose-Säule und lässt darüber hinaus Zweifel aufkommen, ob es sich hier um eine spezifische Wechselwirkung handelt.

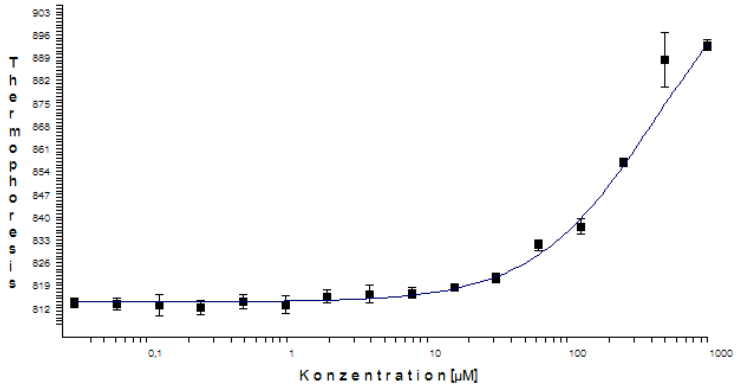

Abbildung 4.29: Microscale-Thermophorese von 250 nM fluoreszenzmarkiertem GST-Spa-orf11 bei verschiedenen Konzentrationen des potentiellen Interaktionspartners IpgE. Aufgetragen ist das Thermophoresesignal gegen die Konzentration von IpgE bei logarithmischer Skalierung der Abszisse. Die geplotteten Durchschnittswerte und Fehlerbalken resultieren aus jeweils neun Einzelmessungen pro Konzentration.

4.3 Untersuchung der Wechselwirkung des Chaperons IpgC mit dem Invasin IpaC sowie mit dem Transkriptionsaktivator MxiE

4.3.1 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem IpgC

IpgC dient im bakteriellen Zytoplasma als Chaperon für die Invasine IpaB und IpaC, um dort deren Assoziation und Abbau zu verhindern [56][57]. Außerdem fungiert IpgC nach Sekretion der Invasine IpaB und IpaC durch das Typ III-Translokationssystem als Coaktivator des Transkriptionsfaktors MxiE [82].

Um die Wechselwirkung von IpgC mit den genannten Proteinsubstraten kristallographisch und biochemisch untersuchen zu können, sollten möglichst große Mengen IpgC gereinigt werden.
Um das für die Darstellung notwendige Expressionsplasmid herzustellen, wurde das *ipgC*-Gen *via* PCR mit den Primern ipgC_f und ipgC_b (siehe 2.1.7) aus dem Virulenzplasmid pWR501 amplifiziert. Dabei wurde am 5'-Ende (bezüglich der Sense-Richtung) durch den Primer ipgC_f eine *Bam*HI-Schnittstelle und am 3'-Ende durch den Primer ipgC_b eine *Not*I-Schnittstelle angefügt (siehe Abbildung 4.30 a).

a) *ipgC*-PCR-Produkt

```
      BamHI-                                                                  NotI----
   GGCGGATCCATGTCTTTAAATATCACCGAAAATGAAAGC...ipgC...CGCAATTCAGGATATCAAGGAGTAAGCGGCCGCGCC
            MetSerProIleLeuGlyTyrTrpLysIle...IpgC...tAlaIleGlnAspIleLysGluEnd
```

b) pGEX-4T-mod

```
                                          SmaI--    XhoI--
                          NdeI--   BamHI-  EcoRI-     SalI--    NotI----
     ...CTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGCGGGGATCCCCGGAATTCCCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
     ...LeuValProArgGlySerHisMetArgGlySerProGluPheProGlyArgLeuGluArgProHisArgAspEND...
                   ▲Thrombin
```

c) pGEX-4T-mod-ipgC

```
                       NdeI--   BamHI-                                 NotI----
 ...CTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGGAAGGATCCATGTCTTTA...ipgC...ATCAAGGAGTAAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
 ...LeuValProArgGlySerHisMetArgGlySerMetSerPro...IpgC...IleLysGluEnd
               ▲Thrombin
```

Abbildung 4.30: a) PCR-Produkt der Amplifikation von *ipgC* aus dem Virulenzplasmid pWR501 mit Hilfe der Primer ipgC_f und ipgC_b, die eine *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Not*I-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. In Rot sind die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben.
b) Die MCS des Vektors pGEX-4T-mod, in die das Amplikon insertiert werden soll, wobei in Blau die Erkennungssequenz für Thrombin wiedergegeben und die Schnittstelle mit ▲ gekennzeichnet ist. In Rot sind die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben
c) Konstrukt pGEX-4T-mod-ipgC, welches durch das Einfügen des PCR-Produkts über die *Bam*HI- und *Not*I-Schnittstellen erhalten wurde. In Blau sind die zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His-Met-Arg-Gly-Ser hervorgehoben, die nach Spaltung mit Thrombin am Zielprotein verbleiben. In Rot sind die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben.

Das PCR-Produkt wurde über diese Schnittstellen in die MCS des Vektors pGEX-4T-mod eingeführt (siehe Abbildung 4.30 b). Das erhaltene Plasmid wurde als pGEX-4T-mod-ipgC bezeichnet. Abbildung 4.30 c) zeigt die MCS des Vektors mit eingefügtem *ipgC*-Gen. Außerdem ist aus dieser Abbildung ersichtlich, dass nach Abspaltung des Fusionsproteins vom Zielprotein die sieben zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His-Met-Arg-Gly-Ser am *N*-Terminus des Zielproteins verbleiben. Daraus resultiert für das rekombinante IpgC ein Molekulargewicht von 18.5 kDa.

Das Expressionsplasmid pGEX-4T-mod-ipgC wurde zur Produktion von rekombinantem IpgC in den *E. coli*-Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL transformiert. Nach Genexpression und Zellaufschluss wurde die lösliche Fraktion des Bakterienlysats auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen. Nachdem die Säulenmatrix mit dem gebundenen Fusionsprotein mit PBS-Puffer gewaschen worden war, erfolgte die proteolytische Abspaltung des IpgC- vom GST-Anteil durch Auftragen von gelöstem Thrombin auf die Affinitätssäule gefolgt von mehrstündiger Inkubation bei 4°C. Durch anschließende Elution mit Waschpuffer wurde IpgC von dem an die Affinitätsmatrix gebundenen GST-*Tag* abgetrennt, wonach das im Eluat enthaltene Thrombin affinitätschromatographisch über eine Benzamidin-Sepharose-Säule entfernt wurde. Eine abschließende präparative Größenausschlusschromatographie (siehe Abbildung 4.31) lieferte reines IpgC mit einer Ausbeute von 30.0 mg Protein pro Liter Bakterienkultur. Die SDS-PAGE der Präparation nach anschließender Färbung des Gels mit Coomassie-Blau ist in Abbildung 4.32 gezeigt. Die experimentellen Details der Aufreinigung sind im Material- und Methodenteil (2.2.2.17) nachzulesen.

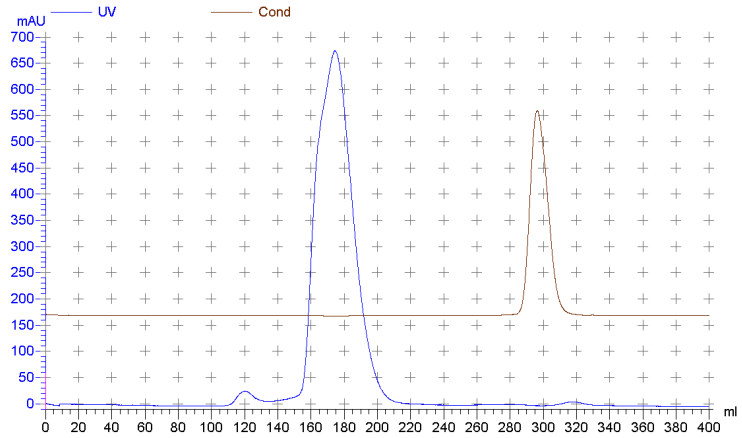

Abbildung 4.31: Chromatogramm der abschließenden Größenausschlusschromatographie während der IpgC-Reinigung durchgeführt mit einer HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade Säule. Die Elution von IpgC erfolgte in dem Volumenbereich zwischen 160 mL und 200 mL.

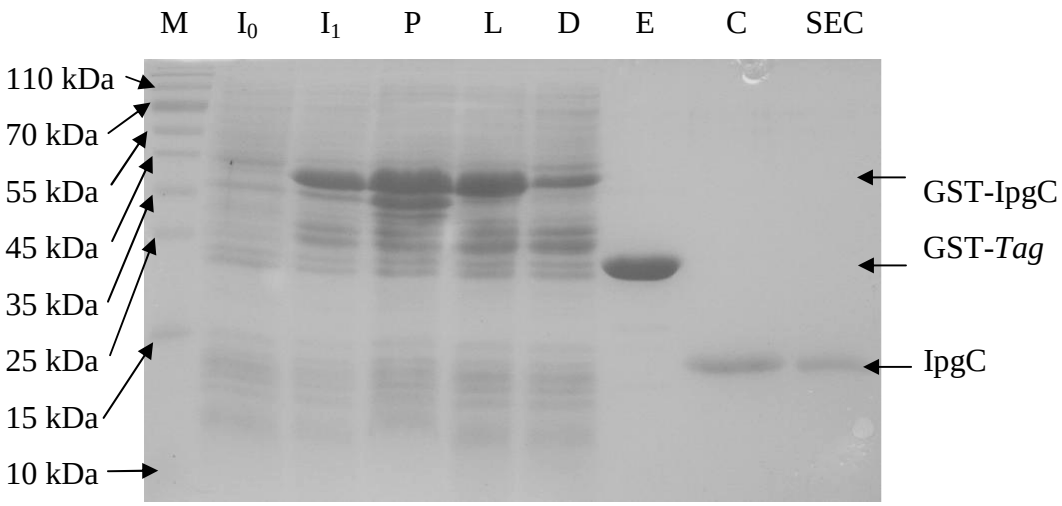

Abbildung 4.32: SDS-Page der Präparation von IpgC: Marker (M), Gesamtzelllysat vor Induktion (I_0), Gesamtzelllysat 12 h nach Induktion; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des GST-IpgC-Fusionsproteins beträgt 44.6 kDa; deutlich ist eine Bande bei der entsprechenden Laufhöhe sichtbar (I_1), unlösliche Fraktion des Zelllysats (P), lösliche Fraktion nach des Zelllysats (L), Durchfluss nach Auftrag der löslichen Fraktion des Zelllysats auf die Glutathion-Sepharose-Säule (D), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit GSH-Elutionspuffer nach Thrombinverdau (E), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit PBS-Puffer nach dem Thrombinverdau (C), Elutionspeak des Molekularsiebs HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 (SEC).

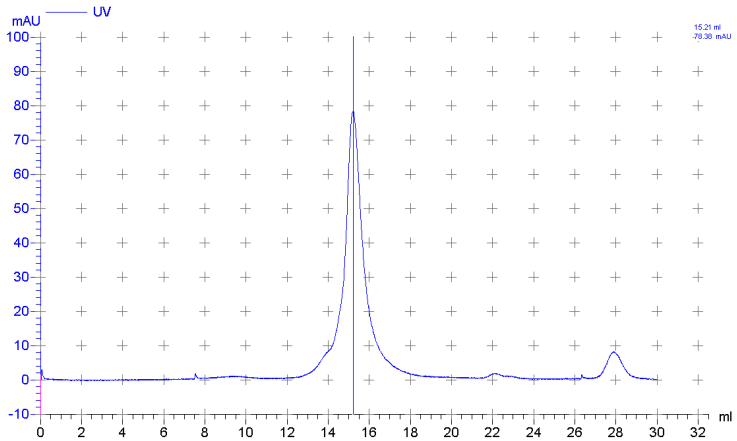

Abbildung 4.33: Chromatogramm einer analytischen Größenausschlusschromatographie mit gereinigtem IpgC. Die Chromatographie wurde mit einer Superdex 200 10/300 GL durchgeführt. Die Elution von IpgC erfolgte bei einem Volumen von 15.16 mL ± 0.04 mL.

Bei einer analytischen Größenausschlusschromatographie, die mit einer kalibrierten Säule durchgeführt wurde (siehe 2.2.2.8), eluierte das gereinigte IpgC mit einem Volumen von 15.16 mL ± 0.04 mL (Abbildung 4.33). Mit Hilfe von Gleichung (3) (siehe 3.2.2.8) ergibt sich aus diesem Elutionsvolumen ein Molekulargewicht von 51.91 kDa ± 0.93 kDa. Dieser Wert weicht deutlich von dem aus der Aminosäuresequenz des Proteins berechneten Molekulargewicht für ein IpgC-Dimer von 36.9 kDa ab.

4.3.2 Heterologe Produktion und Versuch der Reinigung von rekombinantem IpaC

Nach Sekretion durch das Typ III-Translokationssystem spielt IpaC die Hauptrolle bei der Aufnahme durch Makrophagen und der anschließenden Lyse der phagosomalen Vakuole [29][69]. Darüber hinaus ist IpaC für die Aufnahme des Erregers in die Epithelzellen verantwortlich, indem es zusammen mit IpaB in der Wirtszellmembran eine 25 Å weite Pore formt, durch die weitere bakterielle Effektoren in das Wirtscytoplasma gelangen [70][84][58]. Im bakteriellen Zytoplasma liegt IpaC mit dem Chaperon IpgC assoziiert vor [56][57].
Das *ipaC*-Gen wurde mit den Primern ipaC_f und ipaC_b (siehe 2.1.7) aus dem Virulenzplasmid pWR501 amplifiziert, wobei durch den Primer ipaC_f am 5'-Ende (bezüglich der Sense-Richtung) eine *Nde*I-Schnittstelle und durch den Primer ipaC_b am 3'-Ende eine *Xho*I-Schnittstelle angefügt wurde (siehe Abbildung 4.34 a). Das PCR-Produkt wurde über diese Schnittstellen in die MCS des Vektors pGEX-4T-mod (siehe Abbildung 4.34 b) eingesetzt. Das erhaltene Plasmid wurde als pGEX-4T-mod-ipaC bezeichnet. Abbildung 4.34 c) zeigt die MCS des Vektors mit eingefügtem *ipaC*-Gen. Aus der Abbildung geht hervor, dass nach Abspaltung des Fusionsproteins vom Zielprotein die drei zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His am *N*-Terminus des Zielproteins verbleiben, wodurch sich für das rekombinante IpaC ein Molekulargewicht von 41.3 kDa ergibt. Das GST-IpaC-Fusionsprotein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 67.5 kDa.

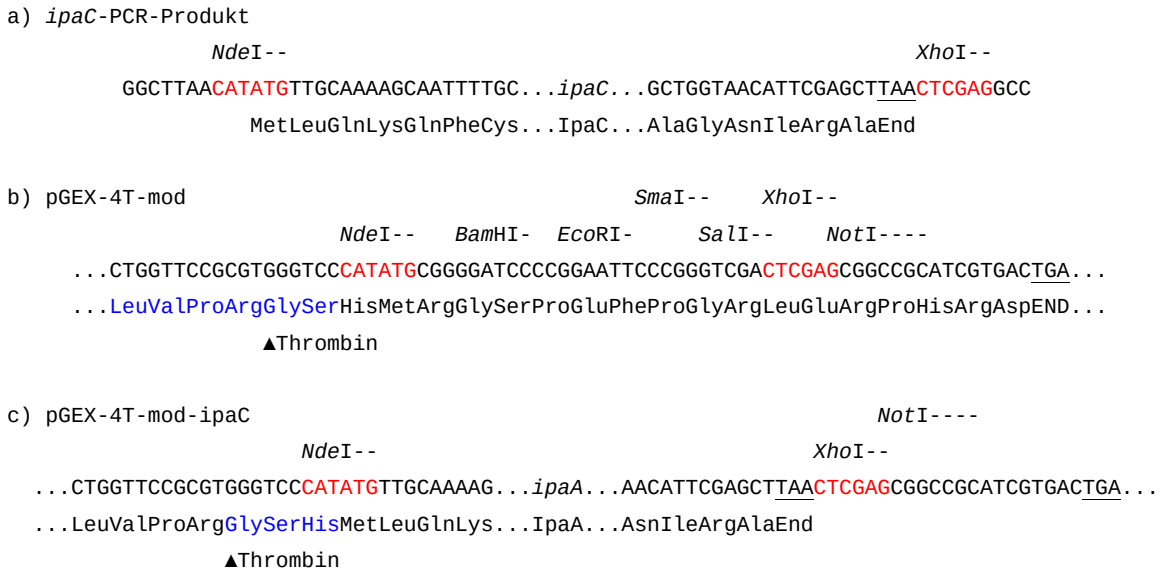

Abbildung 4.34: a) PCR-Produkt der Amplifikation von *ipaC* aus dem Virulenzplasmid pWR501 mit Hilfe der Primer ipaC_f und ipaC_b, die eine *Nde*I-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Xho*I-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. In Rot sind die beiden Restriktionsendonuklease-Schnittstellen hervorgehoben.
b) Die MCS des Vektors pGEX-4T-mod, in die das Amplikon insertiert werden soll, wobei in Blau die Erkennungssequenz für Thrombin wiedergegeben und die Schnittstelle mit ▲ gekennzeichnet ist. In Rot sind die Schnittstellen für *Nde*I und *Xho*I hervorgehoben
c) Konstrukt pGEX-4T-mod-ipaC, welches durch das Einfügen des PCR-Produktes über die für *Nde*I- und *Xho*I-Schnittstellen erhalten wurde. In Blau wurden die zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His hervorgehoben, die nach Spaltung mit Thrombin (▲ kennzeichnet die Schnittstelle) noch am Zielprotein verbleiben. In Rot sind die beiden Schnittstellen für *Nde*I und *Xho*I hervorgehoben.

Nach Transformation von pGEX-4T-mod-ipaC in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL und Genexpression erfolgte der Zellaufschluss. Die lösliche Fraktion des Bakterienlysats wurde auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach einem Waschschritt mit PBS-Puffer wurde der IpaC- vom GST-Anteil mit Thrombin, welches ebenfalls auf die Säule aufgetragen wurde, proteolytisch abgeschnitten. Durch anschließende Elution mit Waschpuffer wurde IpaC von dem an die Affinitätsmatrix gebundenen GST-*Tag* abgetrennt. Das im Eluat enthaltene Thrombin wurde mittels einer Benzamidin-Sepharose-Säule entfernt. Eine im Anschluss geplante präparative Größenausschlusschromatographie konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da das Protein während der dafür notwendigen Aufkonzentration praktisch vollständig präzipitierte.

Auch der Versuch das ungeschnittene Fusionsprotein aufzureinigen schlug fehl, da dieses eine ähnlich limitierte Löslichkeit aufwies und ebenfalls während der Aufkonzentration als vorbereitendem Schritt für die Größenausschlusschromatographie präzipitierte. Versuche, die Aggregation von IpaC bzw. von GST-IpaC-Fusionsprotein durch eine hohe NaCl-Konzentration oder durch die Anwesenheit von Detergentien zu verhindern, führten nicht zum Erfolg. So konnten aus einem Liter Bakterienkultur lediglich 9.2 mg schwach konzentriertes und wenig reines Fusionsprotein dargestellt werden (siehe Abbildung 4.35). Die experimentellen Details der partiellen Aufreinigung sind dem Material- und Methodenteil (2.2.2.1-2.2.2.6) zu entnehmen.

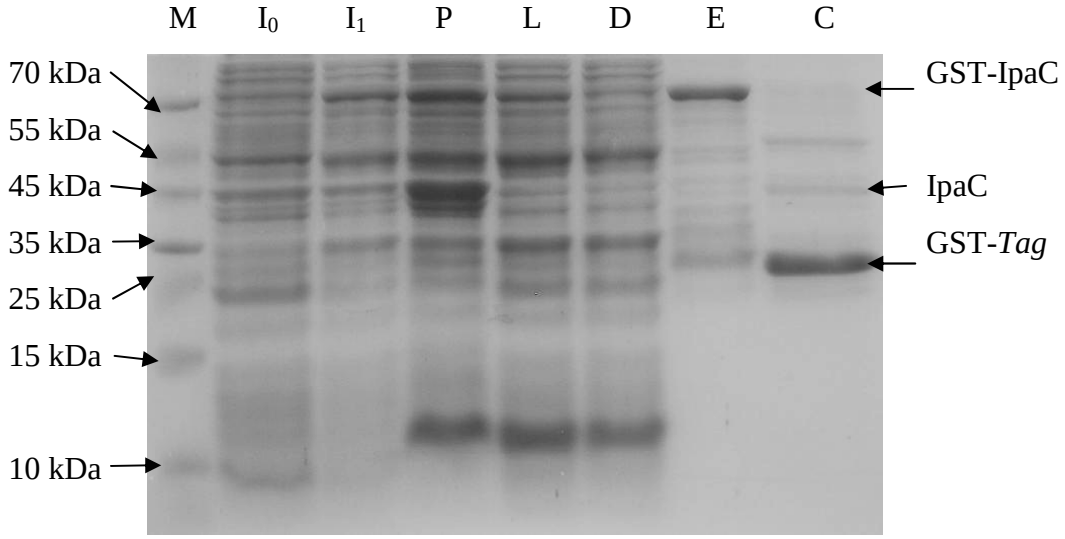

Abbildung 4.35: SDS-Page der partiellen Reinigung von IpaC: Marker (M), Gesamtzelllysat vor Induktion (I_0), Gesamtzelllysat 12 h nach Induktion; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des GST-IpaC-Fusionsproteins beträgt 67.5 kDa; eine entsprechende Bande ist bei der Laufhöhe sichtbar (I_1), unlösliche Fraktion des Zelllysats (P), lösliche Fraktion nach Zentrifugation des Zelllysats (L), Durchfluss nach Auftrag der löslichen Fraktion des Zelllysats auf die Glutathion-Sepharose-Säule (D), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit GSH-Elutionspuffer (E), Thrombinverdau des Eluats; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht von IpaC beträgt 41.3 kDa, eine entsprechende feine Bande ist bei der Läufhöhe sichtbar (C).

4.3.3 Qualitative Untersuchung der Interaktion zwischen IpgC und IpaC

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Bindestelle von IpaC für das Chaperon IpgC auf einen möglichst engen Bereich einzugrenzen und die Affinität dieses Bereichs zu IpgC zu quantifizieren. Zunächst sollte die Wechselwirkung zwischen IpaC und dem Chaperon jedoch qualitativ verifiziert werden.

Zu diesem Zweck wurde die lösliche Fraktion eines Gesamtzelllysats von Bakterien, die das GST-IpaC-Fusionsprotein rekombinant produziert hatten, auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen und so das Fusionsprotein an die Säulenmatrix gebunden. Nach einem Waschschritt wurde gereinigtes IpgC auf die Säule gegeben. Schließlich wurde nach einem weiteren Waschschritt das GST-IpaC-Fusionsprotein mit reduziertem Glutathion (GSH) von der Säule eluiert (siehe 2.2.2.14).

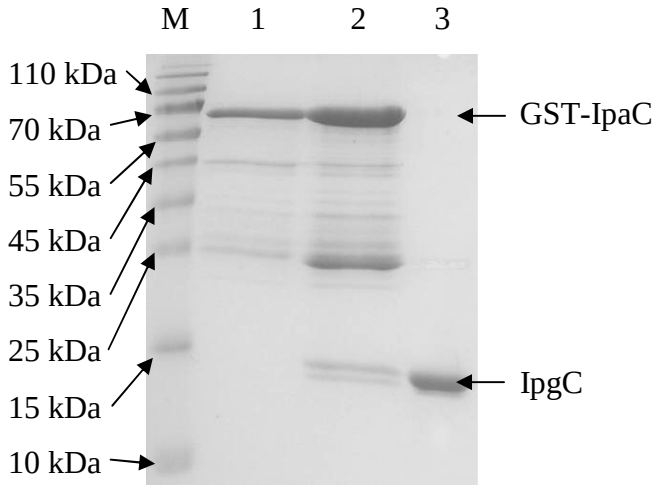

Abbildung 4.36: SDS-PAGE der qualitativen Interaktionsstudie von IpgC mit dem Fusionsprotein GST-IpaC. Bahn 1: Elution des an die Glutathion-Sepharose-Säule gebundenenGST-IpaC-Fusionsproteins mit GSH-Elutionspuffer. Bahn 2: Elution mit GSH-Elutionspuffer nach Inkubation mit IpgC und erneutem Waschen. Neben dem GST-IpaC-Fusionsprotein ist deutlich eine Bande zu erkennen, die dem IpgC-Protein entspricht, welches offensichtlich an IpaC gebunden und so bei dem vorausgehenden Waschschritt nicht entfernt worden war. Bahn 3: reines IpgC.

Die SDS-PAGE des Eluats und anschließende Färbung des Gels mit Coomassie-Blau zeigte neben dem GST-IpaC-Fusionsprotein auch IpgC, welches offensichtlich daran gebunden hatte (siehe Abbildung 4.36). Wurde IpgC in der gleichen Menge auf die Säule aufgetragen und gewaschen, ohne dass das GST-IpaC-Fusionsprotein vorher an die Affinitätsmatrix gebunden worden war, enthielt ein entsprechendes GSH-Eluat kein IpgC (Daten nicht gezeigt). Folglich bestätigte das durchgeführte Experiment die spezifische Interaktion zwischen dem Typ III-Translokon-spezifischen Chaperon IpgC und dem Invasin IpaC.

4.3.4 Quantitative Untersuchung der Interaktion zwischen IpgC und vollsynthetischen IpaC-Peptiden

In einer Studie von Harrington *et al.* war durch Fluoreszenzpolarisation gezeigt worden, dass für die Interaktion von IpgC mit IpaC die IpaC-Region zwischen den Aminosäuren 50 und 80 erforderlich ist [107]. Page *et al.* wiesen mittels der „Yeast Two Hybrid"-Methode eine Interaktion von IpgC mit einem IpaC-Fragment nach, das den Aminosäureresten 73 bis 122 des Volllängen-IpaC entsprach [78]. Die von den beiden Arbeitsgruppen ermittelten IpgC-Binderegionen von IpaC überlappen somit in dem Bereich zwischen Aminosäure 73 und 80. Tatsächlich bindet IpgC nur an einen jeweils kurzen Abschnitt seiner Substratproteine. So wurde von Lunelli *et al.* [104] gezeigt, dass für die Interaktion von IpgC mit einem weiteren Substrat, dem Invasin IpaB, eine IpaB-Sequenz aus sechs Aminosäuren ausreicht. Basierend auf dieser Information sollte mit Hilfe von vollsynthetisch hergestellten Peptiden untersucht werden, ob der IpaC-Bereich zwischen Aminosäure 73 und 80 tatsächlich die IpgC-Binderegion darstellt.
Auf Grund ungenauer Angaben in den Publikationen von Harrington *et al.* [107] und Page *et al.* [78] wurde jedoch der Überlappungsbereich der Abschnitte, welche in IpaC für die Wechselwirkung mit IpgC erforderlich sind, zunächst um 19 Aminosäuren zu nahe am *N*-Terminus angenommen. Das *ipaC*-Gen kodiert zunächst für ein Protein aus 382 Aminosäuren. Von Sankaran *et al.* [109] wurde gezeigt, dass nativem IpaC eventuell auf Grund post-translationaler Prozessierung am *N*-Terminus 19 Aminosäuren fehlen. Natives IpaC besteht folglich aus 363 Aminosäureresten und hat ein Molekulargewicht von 42 kDa.

Von Turbyfill *et al.* [110] wurde auf Grund dessen ein Nummerierungssystem eingeführt, bei dem der originale Leserahmen mit Aminosäure -19 beginnt. Die Region, welche in nativem IpaC nicht mehr vorhanden ist, erstreckt sich bis zu Aminosäure -1. Aminosäure 1 stellt dann die *N*-terminale Aminosäure in nativem IpaC dar. Dieses System wurde in der Arbeit von Harrington *et al.* übernommen. Ob es auch in der Arbeit von Page *et al.* zur Anwendung kam, geht aus der Veröffentlichung keineswegs hervor. Sollte von Page *et al.* die Aminosäure 1 der Aminosäure -19 in Harrington *et al.* entsprechen, würden die von den beiden Arbeitsgruppen ermittelten IpgC-Bindebereiche um 19 zusätzliche Aminosäuren überlappen (siehe Abbildung 4.37).
Um diesen Bereich auf seine Relevanz für die IpgC-Bindung hin zu untersuchen, wurden die in Abbildung 5.33 gezeigten Peptide hergestellt. Um ladungsfreie Termini zu schaffen, waren sämtliche Peptide am *N*-Terminus acetyliert und am *C*-Terminus amidiert.

```
1)  ...HIPLNVGKNPVLTTTLNDDQLLKLSEQVQHDSEIIARLTDKK
2)                     LNDDQLLKLSEQVQHDSEIIARLTDKKMKDRSEMSHTLTPENT...
        40         50         60         70         80
IpaC1  HIPLNVGKNPVLTTTLNDDQ
IpaC2             VLTTTLNDDQLLKLSEQVQH
IpaC3                        LLKLSEQVQHDSEIIARLTD
        40         50         60         70         80
```

Abbildung 4.37: 1) Das IpaC-Fragment, von dem in einer Studie von Harrington *et al.* (2003) gezeigt worden war, dass es für die Interaktion mit IpgC erforderlich ist. Die kursive dargestellte Sequenz ist in diesem Fragment nicht enthalten. 2) *N*-Terminus des IpaC-Fragments, von dem in einer Studie von Page *et al.* (2001) gezeigt worden war, dass es für die Interaktion mit IpgC notwendig ist. Da in der Veröffentlichung von Page *et al.* das IpaC-Nummerierungssystem nicht eindeutig definiert ist, könnte dieses Fragment mit dem in Blau oder dem in Grau dargestellten Abschnitt, also 19 Aminosäuren *N*-terminal davon beginnen. Die in 1) und 2) gezeigten Fragmente überlappen auf jeden Fall in dem Blau dargestellten Bereich, eventuell aber in einem Bereich, der in Richtung *N*-Terminus um weitere 19 Aminosäuren ausgedehnt ist. Zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit fälschlicherweise davon ausgegangen, dass Aminosäure -19 sowohl in der Publikation von Harrington *et al.* (2003) als auch in der von Page *et al.* (2001) Aminosäure 1 von IpaC entspricht. Dies hätte dazu geführt, dass die von den beiden Arbeitsgruppen ermittelten Abschnitte in der rot dargestellten Sequenz überlappt hätten.
3-5) Die drei synthetisch hergestellten IpaC-Peptide, die den zunächst als Überlappungsbereich angenommenen Abschnitt (in Rot) sowie flankierende Sequenzen vollständig abdecken.

Die quantitative Untersuchung der Wechselwirkung dieser Peptide mit IpgC sollte mittels Microscale-Thermophorese erfolgen (siehe 2.2.2.20). In einer früheren Arbeit hatten Lunelli *et al.* mittels Isothermischer Calorimetrie (ITC) eine Affinität von IpgC zu einem 22 Aminosäuren langen Peptid, welches die IpgC-Bindesequenz PELKAP aus IpaB enthält, von 72 µM bestimmt [104]. In der Kristallstruktur des Komplexes aus IpgC und dem genannten Peptid ist ersichtlich, dass nur 14 Aminosäuren dieses Peptids an der Interaktion mit IpgC beteilig sind [104]. Um die Anwendbarkeit der Microscale-Thermophorese auf die vorliegende Fragestellung zu testen, wurden diese 14 Aminosäuren als Referenzpeptid vollsynthetisch hergestellt und einem Thermophorese-Experiment mit IpgC unterzogen. Tatsächlich wurde durch Thermophorese ebenfalls einen K_D von 72 µM ermittelt, was exakt dem von Lunelli *et al.* [104] ermittelten Wert entspricht (Daten nicht gezeigt).

Um die Affinität der Peptide IpaC1, IpaC2 und IpaC3 zu IpgC zu bestimmen, wurde fluoreszenzmarkiertes IpgC, dessen Konzentration innerhalb einer Messreihe konstant gehalten wurde, mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen unmarkierten Peptids vermessen. Die erhaltenen Thermophoresesignale wurden jeweils gegen die Peptidkonzentration bei logarithmischer Skalierung der Abszisse aufgetragen. Im Anschluss wurden mit Gleichung (11) durch die Auswerte-Software der Firma NanoTemper aus den Kurvenverläufen die entsprechenden Dissoziationskonstanten (K_D) berechnet. Während für das Peptid IpaC1 mittels Thermophorese keine Wechselwirkung mit IpgC detektiert wurde, wurde für IpaC2 eine niederaffine Bindung an das Chaperon gemessen. Für den IpaC3-IpgC-Komplex hingegen wurde ein K_D von ca. 30 µM bestimmt. Die Sequenz LLKLSEQVQHDSEIIARLTD enthält also mit großer Wahrscheinlichkeit die IpgC-Bindestelle von IpaC. Die jeweiligen K_D-Werte der IpgC-IpaC-Peptid-Komplexe sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Durch Microscale-Thermophorese ermittelte Affinitäten verschiedener sequenzüberlappender Peptide mit einer Länge von jeweils 20 Aminosäuren. Die Thermophorese wurde mit 250 nM fluoreszenzmarkiertem IpgC bei verschiedenen Konzentrationen unmarkierter IpaC-Peptide durchgeführt.
Die Farbkodierung der Aminosäuren entspricht der in Abbildung 4.37.

Peptidname	**40**	**50**	**60**	**70**	**K_D [µM]**
IpaC1	HIPLNVGKNPVLTTTLNDDQ				-
IpaC2		VLTTTLNDDQLLKLSEQVQH			≥ 500
IpaC3			LLKLSEQVQHDSEIIARLTD		29.8 ± 4.8

Durch sieben sequenzüberlappende Peptide mit einer Länge von jeweils zehn Aminosäuren, die ebenfalls synthetisch hergestellt wurden, sollte der IpgC-Bindebereich in IpaC weiter eingegrenzt werden. Um ladungsfreie Termini zu schaffen, wurden auch diese Peptide *N*-terminal acetyliert und *C*-terminal amidiert. Im Anschluss wurde ihre Affinität zu IpgC wiederum durch Microscale-Thermophorese bestimmt (siehe Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Durch Microscale-Thermophorese ermittelte Affinitäten verschiedener sequenzüberlappender Peptide mit einer Länge von jeweils 10 Aminosäuren. Die Thermophorese wurde mit 250 nM fluoreszenzmarkiertem IpgC bei verschiedenen Konzentrationen unmarkierter IpaC-Peptide durchgeführt.
Die Farbkodierung der Aminosäuren entspricht der in Abbildung 4.37.

Peptidname	40	50	60	70	K_D [µM]
IpaC10.1	HIPLNVGKN				-
IpaC10.2	VGKNPVLTTT				-
IpaC10.3	VLTTTLNDDQ				-
IpaC10.4	LNDDQLLKLS				-
IpaC10.5	LLKLSEQVQH				107.0 ± 15.7
IpaC10.6	EQVQHDSEII				-
IpaC10.7	DSEIIARLTD				-

Nur das Peptid IpaC10.5 zeigte eine messbare Affinität zu IpgC, wobei der K_D des Komplexes aus IpgC und IpaC10.5 107.0 ± 15.7 µM betrug (siehe Thermophoresekurve in Abbildung 4.38).

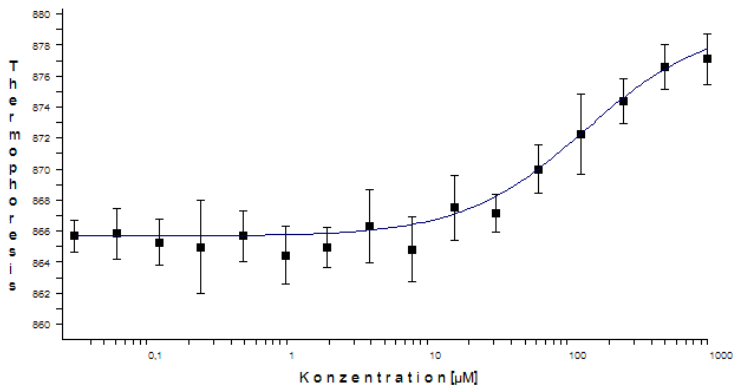

Abbildung 4.38: Microscale-Thermophorese von 250 nM fluoreszenzmarkiertem IpgC bei verschiedenen Konzentrationen des Peptides IpaC10.5. Aufgetragen ist das Thermophoresesignal gegen die Konzentration des Peptides IpaC10.5 bei logarithmischer Skalierung der Abszisse. Die geplotteten Durchschnittswerte und Fehlerbalken resultierten aus den jeweils neun Einzelmessungen.

Somit konnte die IpgC-Bindestelle von IpaC auf die Aminosäurereste 78 bis 87 des Volllängenproteins IpaC eingegrenzt werden. Der K_D-Wert des IpgC-IpaC10.5-Komplexes liegt in der gleichen Größenordnung wie der K_D-Wert des Komplexes aus IpgC und dem sechs Aminosäuren langen Peptid PELKAP, welches die IpgC-Bindestelle des Invasins IpaB darstellt. Mittels ITC wurde für diesen Komplex ein K_D von 625 µM bestimmt [104].

4.3.5 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem MxiE

MxiE gehört zu den Transkriptionsaktivatoren der AraC-Familie und ist für die Expression von Genen verantwortlich, deren Produkte zu einem relativ späten Zeitpunkt des Infektionscyclus benötigt werden. Für seine Funktion als Transkriptionsaktivator benötigt MxiE das Chaperon IpgC als Coaktivator. Das Binden von IpgC löst in MxiE vermutlich eine Konformationsänderung aus, die wiederum das Binden an die entsprechenden Promoterregionen und / oder die Aktivierung der Transkription durch die RNA-Polymerase erlaubt (Mavirs *et al.* 2002). Um die Wechselwirkung zwischen IpgC und MxiE biochemisch und kristallographisch untersuchen zu können, sollte auch MxiE rekombinant in *E. coli* in großen Mengen hergestellt und gereinigt werden.

Für die korrekte Expression des *mxiE*-Gens ist ein sogenanntes "Transcriptional Slippage" notwendig, d.h. bei der Transkription dieses Gens muss durch die RNA-Polymerase in einer bestimmten Sequenz aus neun T´s (im nicht-codogenen DNA-Strang) ein zusätzliches U-Nukleotid eingefügt werden, um in der resultierenden mRNA den *mxiEa*- und *mxiEb*-Anteil des Gens zu einem Leserahmen zu vereinigen. Bei *Shigellen*, die in Vollmedium wachsen, wird die Fusionierung der Leserahmen mit einer Effizienz von ca. 30% erreicht [91].

Für die Konstrution eines Überexpressionsplasmids wurde das *mxiE*-Gen mit Hilfe der Primer mxiE_f und mxiE_b (siehe 2.1.7) aus dem Virulenzplasmid pWR501 amplifiziert. Dabei wurde am 5'-Ende (bezüglich der Sense-Richtung) durch den Primer mxiE_f eine *Nde*I-Schnittstelle und am 3'-Ende durch den Primer mxiE_b eine *Xho*I-Schnittstelle angefügt (siehe Abbildung 4.39 a). Über diese Schnittstellen wurde das PCR-Produkt in die MCS des Vektors pGEX-4T-mod (siehe Abbildung 4.39 b) eingebracht. Das *mxiE*-Gen des resultierenden Plasmids, welches pGEX-4T-mod-MxiE(NX)-Shift (Abbildung 4.39 c) genannt wurde, enthielt noch den "Transcriptional Slippage"-Bereich.

Um einen durchgehenden Leserahmen zu produzieren und so das "Transcriptional Slippage" überflüssig zu machen, wurde schließlich durch ortsgerichtete Mutagenese mit den Primern mxiE-Shift_f und mxiE-Shift_b (siehe 2.1.7) die Sequenz GGT-TTT-TTT-TTG, welche die "Transcriptional Slippage"-Region aus neun T-Nukleotiden enthält, durch die Sequenz GG*G*-TTC-TTC-TTC-G ersetzt (kursiv: insertiertes G-Nukleotid; unterstrichen: mutierte Nukleotide; siehe [91] und (Abbildung 4.40). Das so erzeugte Plasmid erhielt die Bezeichnung pGEX-4T-mod-MxiE(NX). Das Zielprotein enthält nach Abspaltung des GST-Anteils die drei zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His am *N*-Terminus (siehe Abbildung 4.39 c), was ein Molekulargewicht von 29.6 kDa zur Folge hat. Das berechnete Molekulargewicht des GST-MxiE-Fusionsproteins beträgt somit 55.7 kDa.

a) *mxiE*-PCR-Produkt (noch mit originaler "Transcriptional Slippage"-Site; dieser Bereich ist in der abgebildeten Sequenz nicht enthalten)

```
          NdeI--                                                    XhoI--
    GGCTTACATATGAGTAAATATAAAGGTCTAAATAC...mxiE...GTGAAAAAAATAAATGAAAAAATTTAACTCGAGTTAGGC
             MetSerLysTyrLysGlyLeuAsnTh...MxiE...ValLysLysIleAsnGluLysIleEnd
```

b) pGEX-4T-mod

```
                                        SmaI--    XhoI--
                          NdeI--   BamHI-  EcoRI-     SalI--    NotI----
     ...CTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGCGGGGATCCCCGGAATTCCCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
     ...LeuValProArgGlySerHisMetArgGlySerProGluPheProGlyArgLeuGluArgProHisArgAspEND...
                   ▲Thrombin
```

c) pGEX-4T-mod-mxiE(NX)-Shift

```
                                                        NotI----
                       NdeI--                        XhoI--
  ...CTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGAGTAAATAT...mxiE...AATGAAAAAATTTAACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
  ...LeuValProArgGlySerHisMetSerLysTyr...MxiE...AsnGluLysIleEnd
                ▲Thrombin
```

Abbildung 4.39: a) PCR-Produkt der Amplifikation von *mxiE* aus dem Virulenzplasmid pWR501 mit Hilfe der Primer mxiE_f und mxiE_b, die eine *Nde*I-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Xho*I-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. Dem PCR-Produkt enthält noch die aus neun T-Nukleotiden bestehende "Transcriptional Slippage"-Site (siehe Haupttext). Die beiden durch die PCR-Primer angefügten Restriktionsendonuklease-Schnittstellen sind in Rot gezeigt.

b) Die MCS des Vektors pGEX-4T-mod, wobei die Erkennungssequenz für Thrombin in Blau wiedergegeben und die Schnittstelle mit ▲ gekennzeichnet ist. In Rot sind die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Xho*I hervorgehoben.

c) Konstrukt pGEX-4T-mod-mxiE-Shift, welches durch das Einfügen des PCR-Produktes über die *Nde*I- und *Xho*I-Schnittstellen erhalten wurde. Die zusätzlichen *N*-terminalen Aminosäuren Gly-Ser-His, die nach Spaltung mit Thrombin am Zielprotein verbleiben, sind in Blau hervorgehoben. In Rot sind die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Xho*I hervorgehoben.

a) *mxiE*-Frameshift Bereich vor der Mutagenese

...CCAGCATGGAAGGGTTTTTTTTTGTCCGAAATCAAAATATAAAATT...
...ProAlaTrpLysGlyPhePheLeuSerGluIleLysIleEnd

b) *mxiE*-Frameshift Bereich nach der Mutagenese

...CCAGCATGGAAGGGGTTCTTCTTCGTCCGAAATCAAAATATAAAATT...
...ProAlaTrpLysGlyPhePhePheValArgAsnGlnAsnIleLysPhe...

Abbildung 4.40: a) „Transcriptional Slippage"-Bereich des PCR-Produkts nach der Amplifikation aus dem Virulenzplasmid pWR501 und Einfügen in den Vektor pGEX-4T-mod. In Blau die T-reiche Region, die das „Transcriptional Slippage" ermöglicht bzw. erforderlich macht. Erfolgt das „Transcriptional Slippage" nicht, führt dies zum vorzeitigen Abbruch der Translation.
b) Frameshift-Bereich nach der Mutagenese, welche die durchgehende Translation des *mxiE*-Gens ermöglicht.

Eine Testexpression, die mit dem beschriebenen Expressionssystem durchgeführt wurde, zeigte, dass das GST-MxiE-Fusionsprotein von den transformierten *E. coli*-BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL-Zellen in großen Mengen produziert wurde. Jedoch lag das Protein praktisch vollständig in Form von Einschlusskörpern in der unlöslichen Fraktion des Gesamtzelllysats vor. Versuche, das Protein durch Renaturierung in eine lösliche, korrekt gefaltete Form zu überführen, wurden in der vorliegenden Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht unternommen. Die experimentellen Details sind im Material- und Methodenteil (2.2.2.1-2.2.2.6) nachzulesen.

4.3.6 Quantitative Untersuchung der Interaktion zwischen IpgC und vollsynthetischen MxiE-Peptiden

Da das MxiE-Protein aus dem GST-MxiE-Fusionsprotein im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgereinigt werden konnte, war es nicht möglich, die Wechselwirkung von MxiE mit dem Chaperon und Transkriptions-Coaktivator IpgC auf direktem Weg zu untersuchen. Deshalb sollte mit Hilfe synthetischer Peptide die IpgC-Bindestelle in MxiE auf einen möglichst kleinen Bereich eingeschränkt und seine Affinität zu IpgC quantifiziert werden. Durch Arbeiten von Pilonieta und Munson war bereits gezeigt worden, dass die *N*-terminalen 43 Aminosäuren von MxiE nicht an der Interaktion mit IpgC beteiligt sind [108]. Daher wurde der verbleibende Bereich (Aminosäuren 44 bis 251) einer Sekundärstrukturanalyse mit dem Sekundärstrukturvorhersageprogramm NetSurfP unterzogen (siehe 2.2.2.15), so sollten innerhalb des Proteins Loop-Regionen identifiziert werden.

Diese Regionen sollten mit größerer Wahrscheinlichkeit Interaktionsstellen für IpgC darstellen als Regionen innerhalb von α-Helices oder β-Strängen. Es konnten elf mutmaßliche Loop-Regionen in MxiE gefunden werden, welche in Tabelle 4.4 aufgelistet sind. Da die ersten beiden Loop-Regionen sehr umfangreich sind, wurden sie in mehrere sequenzüberlappende Peptide mit einer Länge von jeweils 20 Aminosäuren unterteilt (siehe Tabelle 4.4). Diese Peptide wurden dann vollsynthetisch hergestellt, um sie mittels Microscale-Thermophorese quantitativ auf ihre Affinität zu IpgC hin zu untersuchen (siehe 2.2.2.20). Dazu wurde fluoreszenzmarkiertes IpgC, dessen Konzentration innerhalb einer Messreihe konstant gehalten wurde, mit verschiedenen Konzentrationen der unmarkierten MxiE-Peptide vermessen. Die erhaltenen Thermophoresesignale wurden gegen die Peptid-Konzentration bei logarithmischer Skalierung der Abszisse aufgetragen. Mit Gleichung (11) wurde dann mit Hilfe der Auswerte-Software der Firma NanoTemper aus dem Kurvenverlauf eine Dissoziationskonstante (K_D) berechnet. Die K_D-Werte der jeweiligen IpgC-MxiE-Peptid-Komplexe sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Tabelle 4.4: Durch Microscale-Thermophorese ermittelte Affinitäten von IpgC zu Peptiden, welche die Sequenzen von insgesamt elf mutmaßlichen Loop-Regionen in MxiE repräsentieren. Die Microscale-Thermophorese wurde mit 250 nM fluoreszenzmarkiertem IpgC bei variierenden MxiE-Peptid-Konzentrationen durchgeführt.

Name	Region	AS-Position	Peptidsequenz	K_D [µM]
20.1	1	44-63	KGFFFVRNQNIKFSDNVNYH	-
20.2		54-73	IKFSDNVNYHYRFNINSCAK	-
20.3		64-83	YRFNINSCAKFLAFWDYFSG	-
20.4	2	70-89	CAKFLAFWDYFSGALVEHSH	-
20.5		80-99	FSGALVEHSHAEKCIHFYHE	7.1 ± 1.5
20.6		90-109	AEKCIHFYHENDLRDSCNTE	25.2 ± 4.4
P1	3	119-129	RIFSSDQNVSN	-
P2	4	130-139	ALAMIRMTES	-
P3	5	149-160	TIEKEKEVRIKS	-
P4	6	163-171	EHYGVSEAY	-
P5	7	178-186	KALGAKVKE	-
P6	8	199-208	DVFLHNQTIT	-
P7	9	213-221	NNGYASTSH	-
P8	10	228-236	TRLGFSARE	-
P9	11	245-251	KKINEKI	-

Lediglich für die Peptide 20.5 und 20.6 wurde eine Wechselwirkung mit IpgC beobachtet. Die Sequenzen der beiden Peptide überlappen in einem insgesamt zehn Aminosäuren umfassenden Bereich (Aminosäuren 90 bis 99). Die relativ niedrigen K_D-Werte, die für den IpgC-20.5- und den IpgC-20.6-Komplex gemessen wurden (7,1 bzw. 25,2 µM), deuten darauf hin, dass die Affinität von IpgC zu MxiE keineswegs geringer ist als die zu IpaB und IpaC (siehe Lunelli *et al.* 2009 und diese Arbeit). Dies steht im Gegensatz zu einer Vermutung von Mavris *et al.* (2002a), die postulierten, dass zwischen MxiE und IpgC nur eine relativ schwache Wechselwirkung stattfindet und IpgC erst dann an MxiE binden kann, wenn es von den Invasinen IpaB und IpaC nach deren Sekretion durch das Typ III-Translokon freigegeben wird.
Um zu verifizieren, dass der Bereich zwischen Aminosäure 90 und 99 die IpgC-Bindestelle in MxiE darstellt, wurden weitere Peptide, die diesen Bereich enthielten, synthetisiert und durch Microscale-Thermophorese auf ihre Affinität zu IpgC hin untersucht (siehe Tabelle 4.5). Die ermittelten K_D-Werte waren für sämtliche Peptide im Rahmen der Messgenauigkeit praktisch identisch. Selbst ein Peptid mit einer Länge von nur zehn Aminosäuren, das exakt den Bereich zwischen Aminosäure 90 und 99 umfasste, zeigte zu IpgC eine Affinität von 32,9 µM (siehe Thermophoresekurve in Abbildung 4.41).

Tabelle 4.5: Durch Microscale-Thermophorese ermittelte Affinitäten von MxiE-Peptiden zu IpgC. Sämtliche Peptide enthalten die vermutliche IpgC-Bindestelle in MxiE innerhalb der Sequenz AEKCIHFYHE. Die Microscale-Thermophorese wurde mit 250 nM fluoreszenzmarkiertem IpgC bei variierenden MxiE-Peptid-Konzentrationen durchgeführt.

Peptidname	**80**	**90**	**100**	**K_D [µM]**
20.5	FSGALVEHSHAEKCIHFYHE			7.1 ± 1.5
20.6		AEKCIHFYHENDLRDSCNTE		25.2 ± 4.4
20		VEHSHAEKCIHFYHENDLRD		21.3 ± 2.0
15.1		VEHSHAEKCIHFYHE		20.7 ± 2.9
15.2		AEKCIHFYHENDLRD		21.7 ± 3.0
14		SHAEKCIHFYHEND		22.3 ± 3.9
10		AEKCIHFYHE		32.9 ± 7.4

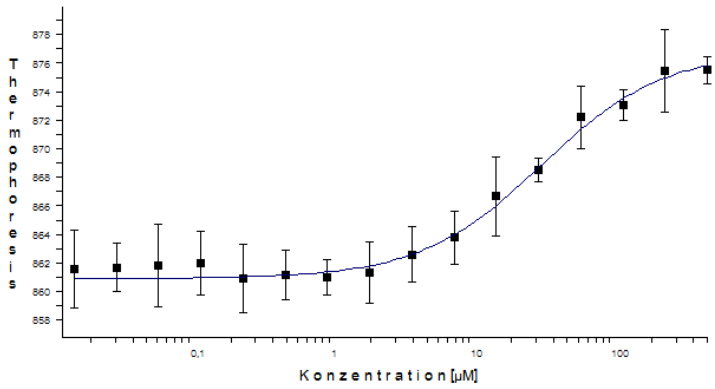

Abbildung 4.41: Microscale-Thermophorese von 250 nM fluoreszenzmarkiertem IpgC bei verschiedenen Konzentrationen des Peptides 10 von MxiE. Aufgetragen ist das Thermophoresesignal gegen die Konzentration des Peptides 10 von MxiE bei logarithmischer Skalierung der Abszisse. Die geplotteten Durchschnittswerte und Fehlerbalken resultierten jeweils aus neun Einzelmessungen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Thermophorese-Untersuchungen ließen darauf schließen, dass sich die IpgC-Erkennungssequenz von MxiE mit großer Wahrscheinlichkeit innerhalb des zehn Aminosäuren umfassenden Bereichs AEKCIHFYHE befindet. Um die Wechselwirkung von IpgC mit MxiE auf atomarer Ebene zu verstehen, ist die Bestimmung der Kristallstruktur eines Komplexes aus IpgC und einem Peptid, welches diese Sequenz enthält, Voraussetzung. Die Kristallisation eines solchen Komplexes sowie die allgemeine Handhabung der Peptide wird jedoch im vorliegenden Fall dadurch erschwert, dass die oben genannte Sequenz ein Cystein enthält. Dies bedingt sowohl bei der Lagerung als auch bei der Kristallisation Probleme, da Cystein-haltige Peptide sehr schnell Disulfidbrücken ausbilden.

Um dieses Problem zu umgehen, wurden weitere Peptide synthetisiert, die denen in Tabelle 4.5 entsprachen, wobei jedoch die Cysteinreste jeweils gegen Serin ausgetauscht waren. Im Anschluss wurde die Auswirkung dieses Austausches auf die Affinität zu IpgC durch Microscale-Thermophorese untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst. Es wird deutlich, dass durch den Austausch von Cystein zu Serin die Affinität bei allen Peptiden lediglich um den Faktor 2 bis 3 reduziert war, sodass die verbleibende Affinität für erfolgversprechende Kokristallisationsversuche (s. u.) jeweils völlig ausreichen sollte.

Tabelle 4.6: Durch Microscale-Thermophorese ermittelte Affinitäten verschiedener Peptide zu IpgC. Sämtliche Peptide enthalten die vermutliche IpgC-Bindestelle, wobei jedoch Cysteinreste durch Serin ersetzt sind (unterstrichen). Die Microscale-Thermophorese wurde mit 250 nM fluoreszenzmarkiertem IpgC bei variierenden Peptid-Konzentrationen durchgeführt. In der rechten Spalte sind die K_D-Werte der IpgC-Komplexe mit den analogen Cystein-haltigen Peptiden gezeigt.

Peptidname	80 90 100	$K_{D,\ Serin}$ [µM]	$K_{D,Cystein}$ [µM]
20.5S	FSGALVEHSHAEKSIHFYHE	16.5 ± 3.3	7.1 ± 1.5
20.6S	AEKSIHFYHENDLRDSSNTE	35.2 ± 5.5	25.2 ± 4.4
20S	VEHSHAEKSIHFYHENDLRD	38.8 ± 5.7	21.3 ± 2.0
15.1S	VEHSHAEKSIHFYHE	69.3 ± 13.6	20.7 ± 2.9
15.2S	AEKSIHFYHENDLRD	49.3 ± 11.7	21.7 ± 3.0
14S	SHAEKSIHFYHEND	50.3 ± 15.5	22.3 ± 3.9
10S	AEKSIHFYHE	86.8 ± 25.4	32.9 ± 7.4

4.3.7 Heterologe Produktion und Reinigung der verkürzten IpgC-Variante IpgC0,-4S

Lunelli *et al.* (2009) bestimmten die Kristallstruktur von IpgC in seiner Apo-Form sowie im Komplex mit einem 22 Aminosäuren umfassenden Peptid, das die IpgC-Bindestelle des Invasins IpaB enthält [104]. Diese Arbeitsgruppe berichtet, dass für den Erhalt gut streuender Kristalle die Deletion der *C*-terminalen vier Aminosäuren von IpgC erforderlich ist. Tatsächlich zeigte das Volllängenprotein auch in Kristallisationsversuchen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt worden waren, keinerlei Tendenz Kristalle zu bilden. So wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine Variante von IpgC erzeugt, deren *C*-Terminus um vier Aminosäuren verkürzt war.

Zur Herstellung des dafür erforderlichen Expressionsplasmids wurde der *ipgC*-Leserahmen ab Codon 1 bis inklusive Codon 151 mittels PCR amplifiziert. Durch die bei der Amplifikation verwendeten Primer gC_f und gC-4_b (siehe 2.1.7) wurde aus dem Virulenzplasmid pWR501 das entsprechend verkürzte *ipgC*-Gen erhalten, wobei durch den Primer gC_f am 5´-Ende des Leserahmens (bezüglich der Sense-Richtung) eine *Bam*HI- und durch den Primer gC-4_b am 3´-Ende eine *Not*I-Schnittstelle eingebracht wurde. So konnte das verkürzte *ipgC*-Gen im Leserahmen mit der vorausgehenden *GST*- und der nachgeschalteten 8xHis-*Tag*-Sequenz in die MCS des Expressionsplasmids pHW1 eingefügt werden.

Des Weiteren wurde durch den Amplifikationsprimer gC_f zwischen der *Bam*HI-Schnittstelle und der Zielgensequenz eine Thrombin-Erkennungssequenz und durch den Primer gC-4_b zwischen der Zielgensequenz und der *Bam*HI-Schnittstelle ein Stopp-Codon eingefügt. Das Stopp-Codon verhindert die Translation des 8xHis-*Tag*, sodass lediglich ein Fusionsprotein aus *N*-terminalem GST-Anteil und dem Zielgen produziert wird. Das erhaltene PCR-Produkt (siehe Abbildung 4.42 a) wurde über die entsprechenden Schnittstellen in die MCS des Vektors pHW1 eingebracht (siehe Abbildung 4.42 b). Das fertige Konstrukt wurde als pHW1-ipgC0,-4S bezeichnet. Abbildung 4.42 c zeigt die MCS des Vektors mit dem eingefügten verkürzten *ipgC*-Gen. Aus der Abbildung geht hervor, dass nach Abspaltung des GST-Anteils vom Zielprotein nur die zusätzliche Aminosäure Glycin am *N*-Terminus des Zielproteins verbleibt, was ein Molekulargewicht der verkürzten IpgC-Variante von 17.3 kDa zur Folge hat.

a) *ipgC*0,-4S-PCR-Produkt

```
     BamHI-                                                                    NotI----
  GGCGGATCCATGTATCCGCGCGGCATGTCTTTAAATATCACCGAAAATG...ipgC...CAATCATACTTGGACGCAATTCAGTAAGCGGCCGCTAAACTAT
           MetTyrProArgGlyMetSerProIleLeuGlyTyrTrpL...IpgC...GlnSerTyrLeuAspAlaIleGlnEnd
                       ▲Thrombin
```

b) pHW1 *Nde*I--*Bam*HI-*Xho*I--*Not*I---- 8xHis-*Tag*

```
...GST-Gen...AACTCGCATATGGGATCCCTCGAGGCGGCCGCCCATCATCATCATCATCATCATTGA...
...GST-Tag...AsnSerHisMetGlySerLeuGluAlaAlaAlaHisHisHisHisHisHisEND...
```

c) pHW1-ipgC0,-4S

```
         NdeI--BamHI                                                NotI---- 8xHis-Tag
...AACTCGCATATGGGATCCATGTATCCGCGCGGCATGTCTTTA...ipgC...GCAATTCAGTAAGCGGCCGCCCATCATCATCATCATCATCATTGA...
...AsnSerHisMetGlySerMetTyrProArgGlyMetSerPro...IpgC...AlaIleGlnEnd
                                  ▲Thrombin
```

Abbildung 4.42: a) PCR-Produkt der verkürzten Variante von *ipgC* aus dem Virulenzplasmid pWR501 mit Hilfe der Primer gC_f und gC-4_b, die eine *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Not*I-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. In Rot sind die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I und in Blau ist die zusätzlich eingefügte Thrombin-Schnittstelle hervorgehoben.

b) Die MCS des Expressionsplasmids pHW1 mit dem stromaufwärts liegenden GST-Anteil und dem stromabwärts liegenden 8xHis-*Tag*. GST-*Tag*, MCS und 8xHis-*Tag* befinden sich im gleichen Leserahmen. In Rot sind die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben.

c) Konstrukt pHW1-ipgC0,-4S, welches durch das Einfügen des PCR-Produktes über die *Bam*HI- und *Not*I-Schnittstellen erhalten wurde. In Blau ist die zusätzliche Aminosäure Glycin am *N*-Terminus hervorgehoben, die nach Spaltung mit Thrombin (die Schnittstelle ist durch ▲ gekennzeichnet) noch am Zielprotein verbleibt. Auf Grund eines Stopp-Codons unmittelbar hinter dem Zielgen und vor der *Not*I-Schnittstelle wird der 8xHis-*Tag* nicht translatiert. In Rot sind die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben.

Die Aufreinigung der *C*-terminal verkürzten IpgC-Variante erfolgte nach Expression und Zelllyse völlig analog zu der des unverkürzten IpgC (für experimentelle Datails siehe 2.2.2.17) und lieferte reines IpgC0,-4S in einer Ausbeute von 10.0 mg Protein pro Liter Bakterienkultur. Die SDS-PAGE der Präparation und anschließende Färbung des Gels mit Coomassie-Blau ist in Abbildung 4.43 gezeigt.

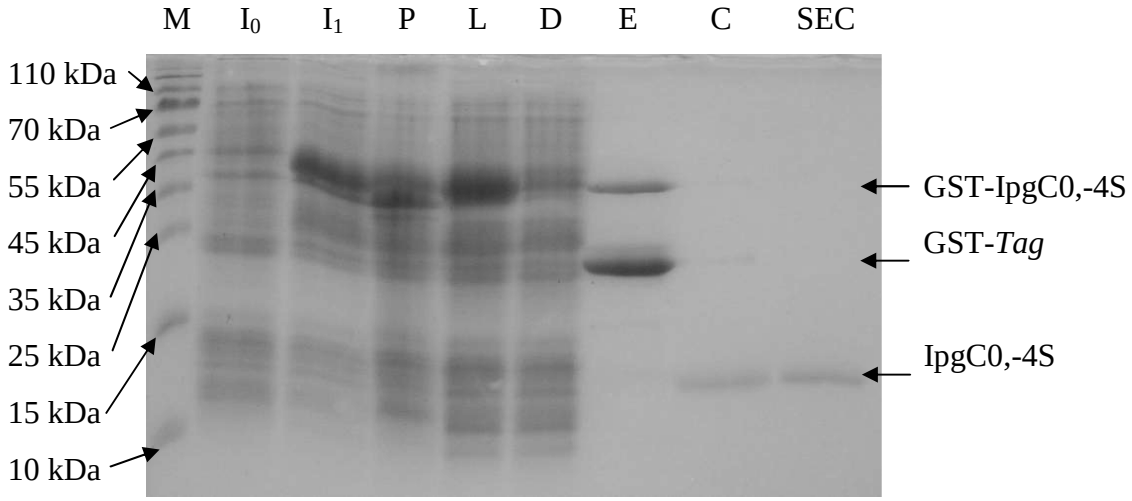

Abbildung 4.43: SDS-Page der Präparation von IpgC0,-4S: Marker (M), Gesamtzelllysat vor Induktion (I_0), Gesamtzelllysat 12 h nach Induktion; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des GST-IpgC-Fusionsproteins beträgt 42.8 kDa; deutlich ist eine Bande bei der entsprechenden Laufhöhe sichtbar (I_1), unlösliche Fraktion des Zelllysats (P), lösliche Fraktion nach des Zelllysats (L), Durchfluss nach Auftrag der löslichen Fraktion des Zelllysats auf die Glutathion-Sepharose-Säule (D), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit GSH-Elutionspuffer nach Thrombinverdau (E), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit PBS-Puffer nach dem Thrombinverdau (C), Elutionspeak des Molekularsiebs HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 (SEC).

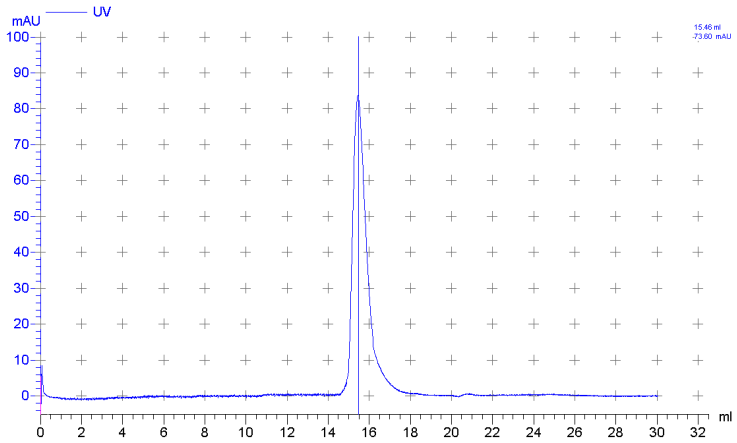

Abbildung 4.44: Chromatogramm einer analytischen Größenausschlusschromatographie mit der gereinigten verkürzten Variante IpgC0,-4S. Die Chromatographie wurde mit einer Superdex 200 10/300 GL durchgeführt. Die Elution von IpgC erfolgte bei einem Volumen von 15.42 mL ± 0.03 mL.

Bei einer analytischen Größenausschlusschromatographie, die mit einer kalibrierten Säule durchgeführt wurde (siehe 2.2.2.8), eluierte die gereinigte verkürzte Variante IpgC0,-4S bei einem Volumen von 15.42 mL ± 0.03 mL (Abbildung 4.44). Mit Hilfe von Gleichung (3) (siehe 3.2.2.8) ergibt sich aus dem Elutionsvolumen ein Molekulargewicht von 46.29 kDa ± 0.71 kDa. Dieser Wert weicht deutlich von dem aus der Aminosäuresequenz des Proteins berechneten Molekulargewicht für ein Dimer von IpgC0,-4S von 34.6 kDa ab. Die Abweichung des experimentell ermittelten Molekulargewichts von dem theoretischen Molekulargewicht des homodimeren Komplexes lässt darauf schließen, dass die Form des IpgC0,-4S-Dimers wie die des Volllängen-IpgC signifikant von einer globulären Form abweicht.

Mit der gereinigten, am *C*-Terminus verkürzten IpgC-Variante wurde nun versucht die von Lunelli *et al.* [104] beschriebene Kristallisation zu reproduzieren. Tatsächlich wurden unter den angegebenen Bedingungen [0.1 M *N*-(2-Acetamid)iminodiacetylsäure (ADA), pH 6.5 und 1 M Ammoniumsulfat] Kristalle von der apo-Form des Proteins erhalten, die an der hauseigenen Drehanode bis zu einer Auflösung von 4 Å streuten (Daten nicht gezeigt). Da hier lediglich die allgemeine Reproduzierbarkeit der Kristallisation gezeigt werden sollte, wurden keine weiteren Optimierungsversuche durchgeführt. Im Anschluss wurde der Versuch unternommen, IpgC0,-4S im Komplex mit einem der Peptide 20.5, 20.6, 20 oder 10 (siehe Tabelle 5.6), welche die IpgC-Bindestelle von MxiE enthielten, zu kristallisieren (siehe 2.2.2.23). Dabei kamen die kommerziell erhältlichen Kristallisationsscreens Wizard I, Wizard II, Crystal Screen, PEG-Screen sowie der Ammoniumsulfat-Screen zum Einsatz. Das verkürzte IpgC, welches in einer Konzentration von 12 $mg \cdot mL^{-1}$ vorlag, wurde für die Kristallisationsversuche mit dem jeweiligen Peptid in einem molaren Verhältnis von 1 : 2 gemischt. Der Komplex aus IpgC0,-4S und dem Peptid 20.6 (Sequenz: AEKCIHFYHENDLRDSCNTE ≡ Aminosäuren 90 bis 109 in MxiE) lieferte unter den beiden in Tabelle 4.7 aufgeführten Bedingungen Kristalle. Diese erwiesen sich jedoch als sehr instabil und zeigten an der hauseigenen Drehanode kaum Streuvermögen (Daten nicht gezeigt). Um die Reproduzierbarkeit der Kristallisation zu verbessern, soll diese in zukünftigen Versuchen mit dem Peptid 20.6S, bei dem die beiden in der Sequenz enthaltenen Cysteine durch Serine ausgetauscht sind, durchgeführt werden. Im Anschluss sollen die erhaltenen Bedingungen optimiert werden, sodass schließlich gut streuende Kristalle für die Strukturaufklärung des Protein-Peptid-Komplexes zur Verfügung stehen. Im Rahmen dieser Doktor-Arbeit konnten die Reproduktion und Optimierung der Kristallisation aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

Tabelle 4.7: Die erfolgreichen Kristallisationsbedingungen mit dem Name des Screens sowie Nummer und Zusammensetzung der Reservoirlösung.

Screen	Nummer	Zusammensetzung der Lösung
Wizard II	37	1.0 M K/Na-Tartrat 0.1 M Tris pH 7.0 0.2 M Li_2SO_4
Wizard II	48	1.0 M K/Na-Tartrat 0.1 M MES pH 6.0

4.4 Untersuchung der Wechselwirkung des Chaperons Spa15 mit dem Effektorprotein IpaA sowie mit dem Antiaktivator OspD1

4.4.1 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem Spa15

Das homodimere Typ III-Translokon-spezifische Chaperon Spa15 zeichnet sich durch eine relativ breite Substratpalette aus. Neben dem Invasin IpaA bindet es die Effektoren IpgB1, OspC3, OspB sowie den für die Regulation der "späten Gene" erforderlichen Antitranskriptionsaktivator OspD1. In der vorliegenden Arbeit sollte die Wechselwirkung von Spa15 mit IpaA sowie mit OspD1 biochemisch und kristallographisch untersucht werden. Während OspD1 von Spa15 stabilisiert wird, ist die Assoziation von IpaA mit Spa15 erforderlich, um die Ausbildung prämaturer löslicher Komplexe, die die eigene Sekretion verhindern, zu unterbinden [79]. Für die geplanten Untersuchungen sollte Spa15 in möglichst großen Mengen rein dargestellt werden. Du diesem Zweck wurde es heterolog in *E. coli* als GST-Fusionsprotein produziert und affinitätschromatographisch gereinigt.

Um das dafür notwendige Expressionsplasmid zu erzeugen, wurde das *spa15*-Gen *via* PCR mit den Primern spa15_f und spa15_b (siehe 2.1.7) aus dem Virulenzplasmid pWR501 amplifiziert. Durch den Primer spa15_f wurde dabei am 5'-Ende (bezüglich der Sense-Richtung) eine *Bam*HI-Schnittstelle und durch den Primer spa15_b am 3'-Ende eine *Not*I-Schnittstelle angefügt (siehe Abbildung 4.45 a). Nachdem das PCR-Produkt über diese Schnittstellen in die MCS des Vektors pGEX-4T-mod (siehe Abbildung 4.45 b) eingeführt worden war, erhielt das resultierende Plasmid die Bezeichnung pGEX-4T-mod-spa15.

Abbildung 4.45 c) gibt die MCS des Vektors mit dem insertierten *spa15*-Gen wieder. Aus der Abbildung geht hervor, dass nach Abspaltung des GST-Anteils am *N*-Terminus des Zielproteins die sieben zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His-Met-Arg-Gly-Ser verbleiben, was ein Molekulargewicht des rekombinanten Spa15 von 15.8 kDa zur Folge hat.

a) *spa15*-PCR-Produkt

```
   BamHI-                                                                    NotI----
GGCGGATCCATGAGTAACATTAATTTAGTTCAATTAGTTAGAGAT...spa15...ATGGAAATCTTAAATGGGGTCTTATAAGCGGCCGCGCC
         MetSerAsnIleAsnLeuValGlnLeuValArgAsp...Spa15...MetGluIleLeuAsnGlyValLeuEnd
```

b) pGEX-4T-mod

```
                                          SmaI--    XhoI--
                          NdeI--   BamHI-  EcoRI-     SalI--    NotI----
     ...CTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGCGGGGATCCCCGGAATTCCCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
     ...LeuValProArgGlySerHisMetArgGlySerProGluPheProGlyArgLeuGluArgProHisArgAspEND...
                   ▲Thrombin
```

c) pGEX-4T-mod-spa15

```
                       NdeI--   BamHI-                              NotI----
 ...CTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGGAAGGATCCATGAGTAAC..spa15..GGGGTCTTATAAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
 ...LeuValProArgGlySerHisMetArgGlySerMetSerAsn..Spa15..GlyValLeuEnd
               ▲Thrombin
```

Abbildung 4.45: a) PCR-Produkt der Amplifikation von *spa15* aus dem Virulenzplasmid pWR501 mit Hilfe der Primer spa15_f und spa15_b, die eine *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Not*I-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. In Rot sind die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben.
b) Die MCS des Vektors pGEX-4T-mod, in die das Amplikon insertiert werden soll, wobei in Blau die Erkennungssequenz für Thrombin wiedergegeben und die Schnittstelle mit ▲ gekennzeichnet ist. In Rot sind die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben
c) Konstrukt pGEX-4T-mod-spa15, welches durch das Einfügen des PCR-Produktes über die *Bam*HI- und *Not*I-Schnittstellen erhalten wurde. In Blau wurden die zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His-Met-Arg-Gly-Ser hervorgehoben, die nach Spaltung mit Thrombin (die Schnittstelle ist mit ▲ gekennzeichnet) noch am Zielprotein verbleiben. In Rot sind die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben.

Die affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinantem Spa15 erfolgte nach Expression des Fusionsgens völlig analog zu der von IpgC (siehe Abschnitt 5.3.1). Eine abschließende präparative Größenausschlusschromatographie (siehe Abbildung 4.46) lieferte reines Spa15 mit einer Ausbeute von 15.0 mg Protein pro Liter Bakterienkultur. Die SDS-PAGE der Präparation und anschließende Färbung des Gels mit Coomassie-Blau ist in Abbildung 4.47 gezeigt. Experimentelle Details der Aufreinigung sind dem Material- und Methodenteil (2.2.2.20) zu entnehmen.

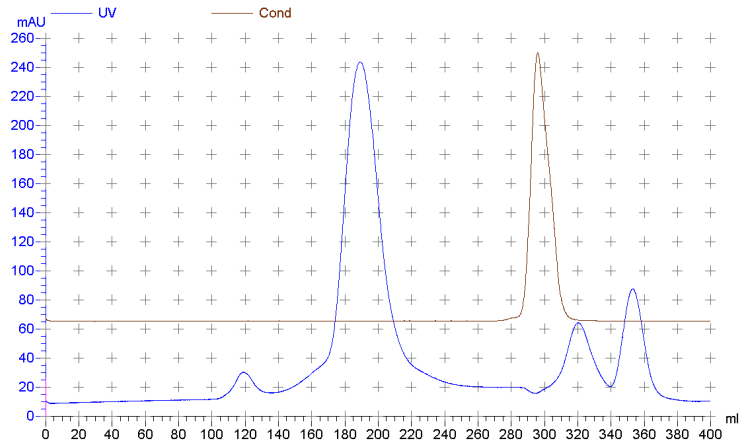

Abbildung 4.46: Chromatogramm der abschließenden Größenausschlusschromatographie während der Spa15-Reinigung durchgeführt mit einer HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade Säule. Die Elution von Spa15 erfolgte in dem Volumenbereich zwischen 170 mL und 220 mL.

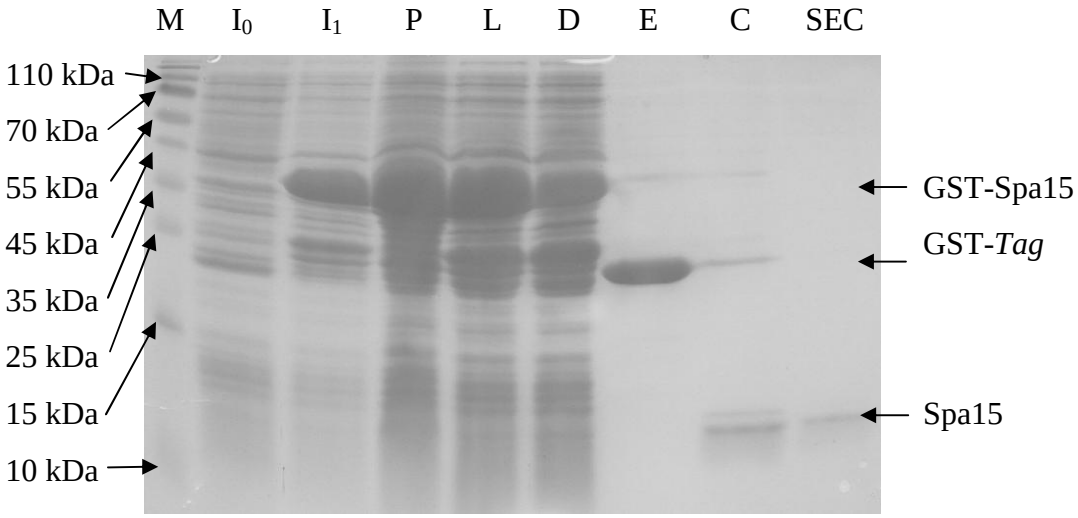

Abbildung 4.47: SDS-Page der Präparation von Spa15: Marker (M), Gesamtzelllysat vor Induktion (I_0), Gesamtzelllysat 12 h nach Induktion; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des GST-Spa15-Fusionsproteins beträgt 42.0 kDa; deutlich ist eine Bande bei der entsprechenden Laufhöhe sichtbar (I_1), unlösliche Fraktion des Zelllysats (P), lösliche Fraktion nach des Zelllysats (L), Durchfluss nach Auftrag der löslichen Fraktion des Zelllysats auf die Glutathion-Sepharose-Säule (D), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit GSH-Elutionspuffer nach Thrombinverdau (E), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit PBS-Puffer nach dem Thrombinverdau (C), Elutionspeak des Molekularsiebs HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 (SEC).

Bei einer analytischen Größenausschlusschromatographie, die mit einer kalibrierten Säule durchgeführt wurde (siehe 2.2.2.8), eluierte das gereinigte Spa15 mit einem Volumen von 16.00 mL ± 0.02 mL (siehe Abbildung 4.48). Mit Hilfe von Gleichung (3) (siehe 3.2.2.8) kann aus dem Elutionsvolumen ein Molekulargewicht von 35.72 kDa ± 0.28 kDa berechnet werden. Dieser Wert weicht nur geringfügig von dem aus der Aminosäuresequenz des Proteins berechneten Molekulargewicht für ein Dimer von Spa15 von 30.2 kDa ab.

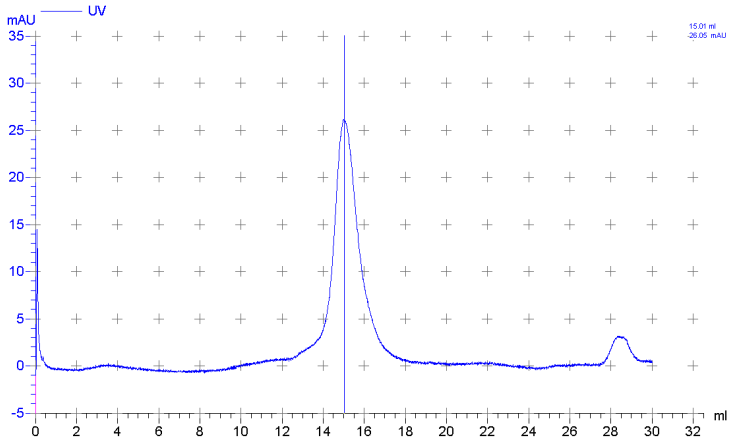

Abbildung 4.48: Chromatogramm einer analytischen Größenausschlusschromatographie mit gereinigtem Spa15. Die Chromatographie wurde mit einer Superdex 200 10/300 GL durchgeführt. Die Elution von Spa15 erfolgte bei einem Volumen von 16.00 mL ± 0.02 mL.

4.4.2 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem IpaA

IpaA bildet nach Sekretion in die Wirtszelle einen Komplex mit dem Wirtsprotein Vinculin, welches dadurch in eine aktive Form überführt wird. Der Vinculin-IpaA-Komplex fördert dann die Depolymerisation von Actin, was ein Abstoßen des Bakteriums an der Eintrittsstelle verhindert. Vor Aktivierung des Typ III Translokons liegt IpaA im Bakterienzytoplasma mit Spa15 assoziiert vor, da es sonst offensichtlich prämature lösliche Komplexe bildet, welche die eigene Sekretion behindern [66]. Um biochemische und kristallographische Untersuchungen bezüglich der Interaktion von IpaA und Spa15 zu ermöglichen, sollte IpaA heterolog in *E. coli* als GST-Fusionsprotein produziert und affinitätschromatographisch gereinigt werden.

Zu diesem Zweck wurde das *ipaA*-Gen durch PCR mit den Primern ipaA_f und ipaA_b (siehe 2.1.7) aus dem Virulenzplasmid pWR501 amplifiziert. Durch den Primer ipaA_f wurde dabei am 5'-Ende (bezüglich der Sense-Richtung) eine *Nde*I-Schnittstelle und durch den Primer ipaA_b am 3'-Ende eine *Xho*I-Schnittstelle angefügt (siehe Abbildung 4.49 a). Das PCR-Produkt wurde über diese Restriktionsschnittstellen in die MCS des Vektors pGEX-4T-mod (siehe Abbildung 4.49 b) eingesetzt. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pGEX-4T-mod-ipaA. Abbildung 4.49 c) gibt die MCS des Vektors mit eingefügtem *ipaA*-Gen wieder. Aus der Abbildung geht hervor, dass nach Thrombinverdau des Fusionsproteins die drei zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His am *N*-Terminus des Zielproteins verbleiben, was ein Molekulargewicht des rekombinanten IpaA von 70.4 kDa zur Folge hat. Das berechnete Molekulargewicht des GST-IpaA-Fusionsproteins beträgt 96.5 kDa.

a) *ipaA*-PCR-Produkt

```
   NdeI--                                                                                XhoI--
GGCCATATGCATAATGTAAATAATACTCAAGCGC...ipaA...CTTCCCTATCAAAAGTATTAAAGAATATCAATAAGGATTAACTCGAGGCC
      MetHisAsnValAsnAsnThrGlnAlaP...IpaA...hrSerLeuSerLysValLeuLysAsnIleAsnLysAspEnd
```

b) pGEX-4T-mod

```
                                                SmaI--    XhoI--
                          NdeI--   BamHI-  EcoRI-     SalI--    NotI----
     ...CTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGCGGGGATCCCCGGAATTCCCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
     ...LeuValProArgGlySerHisMetArgGlySerProGluPheProGlyArgLeuGluArgProHisArgAspEND...
                   ▲Thrombin
```

c) pGEX-4T-mod-spa15

```
                                                                    NotI----
                        NdeI--                                  XhoI--
   ...CTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGCATAATGTA...ipaA...ATCAATAAGGATTAACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
   ...LeuValProArgGlySerHisMetHisAsnVal...IpaA...IleAsnLysAspEnd
                 ▲Thrombin
```

Abbildung 4.49: a) PCR-Produkt der Amplifikation von *ipaA* aus dem Virulenzplasmid pWR501 mit Hilfe der Primer ipaA_f und ipaA_b, die eine *Nde*I-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Xho*I-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. In Rot sind die beiden Schnittstellen hervorgehoben.

b) Die MCS des Vektors pGEX-4T-mod, in die das Amplikon insertiert werden soll, wobei in Blau die Erkennungssequenz für Thrombin wiedergegeben und die Schnittstelle mit ▲ gekennzeichnet ist. In Rot sind die Schnittstellen für *Nde*I und *Xho*I hervorgehoben

c) Konstrukt pGEX-4T-mod-ipaA, welches durch das Einfügen des PCR-Produktes über die Schnittstellen für *Nde*I und *Xho*I erhalten wurde. In Blau wurden die zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His hervorgehoben, die nach Spaltung mit Thrombin (die Schnittstelle ist durch ▲ gekennzeichnet) noch am Zielprotein verbleiben. In Rot sind die Schnittstellen für *Nde*I und *Xho*I hervorgehoben.

Nachdem das Plasmid pGEX-4T-mod-ipaA in den *E. coli*-Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL transformiert worden war, wurde nach erfolgter Genexpression ein Reinigungsversuch durchgeführt. Völlig analog zu IpaC zeigte das rekombinante IpaA jedoch nur eine äußerst geringe Löslichkeit. Bereits in den Bakterienzellen lag der Hauptanteil des GST-IpaA-Fusionsproteins in Form von Einschlusskörpern vor. Bei dem Versuch, den löslichen Anteil nach Zellaufschluss und einem Affinitätschromatographie-Schritt anzukonzentrieren, präzipitierte sowohl das GST-IpaA-Fusionsprotein als auch das vom GST-Anteil getrennte IpaA nahezu vollständig. Dem konnte auch durch den Einsatz von 1 M NaCl oder durch des Detergents Triton X-100 (0.1%) nicht entgegengewirkt werden. So war es lediglich möglich 11,8 mg wenig reines GST-IpaA-Fusionsprotein in niedriger Konzentration darzustellen. Eine SDS-PAGE des Reinigungsversuchs ist in Abbildung 4.50 gezeigt. Experimentelle Details sind dem Material- und Methodenteil (2.2.2.1-2.2.2.6) zu entnehmen, welches dem Standardaufreinigungsverfahren entspricht.

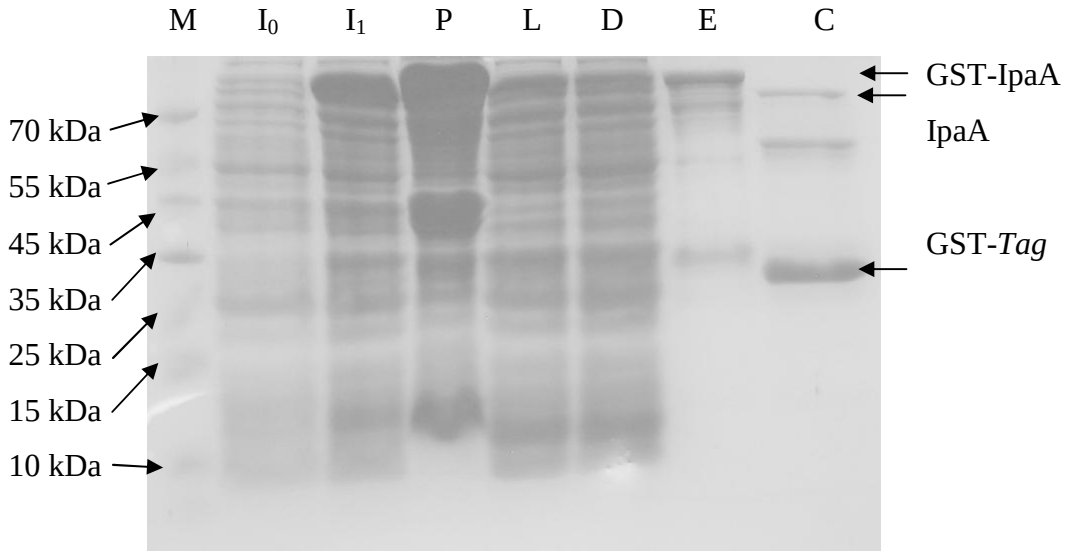

Abbildung 4.50: SDS-Page des Reinigungsversuchs von IpaA: Marker (M), Gesamtzelllysat vor Induktion (I_0), Gesamtzelllysat 12 h nach Induktion; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des GST-IpaA-Fusionsproteins beträgt 96.5 kDa; eine entsprechende Bande ist bei der Laufhöhe sichtbar (I_1), unlösliche Fraktion des Zelllysats mit einem Großteil des Fusionsproteins(P), lösliche Fraktion nach Zentrifugation des Zelllysats (L), Durchfluss nach Auftrag der löslichen Fraktion des Zelllysats auf die Glutathion-Sepharose-Säule (D), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit GSH-Elutionspuffer; das Eluat zeigt neben dem Volllängen-Fusionsprotein offensichtlich eine große Menge von *C*-terminalen Abbruchfragmenten (E), Thrombinverdau des Eluats nach 12 h bei 4 °C; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht von IpaA beträgt 70.4 kDa, eine entsprechend feine Bande ist bei erwarteten Läufhöhe sichtbar (C).

4.4.3 Qualitative Untersuchung der Interaktion zwischen Spa15 und IpaA

Die in der Literatur beschriebene Interaktion von Spa15 und IpaA sollte durch eine qualitative Analyse verifiziert werden [88]. Zu diesem Zweck wurde die lösliche Fraktion eines Gesamtzelllysats von Bakterien, die das GST-IpaA-Fusionsprotein rekombinant produziert hatten, auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen und so das Fusionsprotein an die Säulenmatrix gebunden. Nach einem Waschschritt wurde gereinigtes Spa15 auf die Säule aufgetragen. Schließlich wurde nach einem weiteren Waschschritt das GST-IpaA-Fusionsprotein mit reduziertem Glutathion (GSH) von der Säule eluiert (siehe 2.2.2.14).

Die SDS-PAGE des Eluats und anschließende Färbung des Gels mit Coomassie-Blau zeigte neben dem GST-IpaA-Fusionsprotein auch Spa15. Dieser Befund zeigt, dass Spa15 offensichtlich an den IpaA-Anteil des Fusionsproteins gebunden und deshalb während des Waschschritts nicht von der Säule entfernt worden war (siehe Abbildung 4.51). Wurde Spa15 in der gleichen Menge auf die Säule aufgetragen und diese gewaschen, ohne dass das GST-IpaA-Fusionsprotein vorher an die Affinitätsmatrix gebunden worden war, enthielt ein entsprechendes GSH-Eluat kein Spa15 (Daten nicht gezeigt).

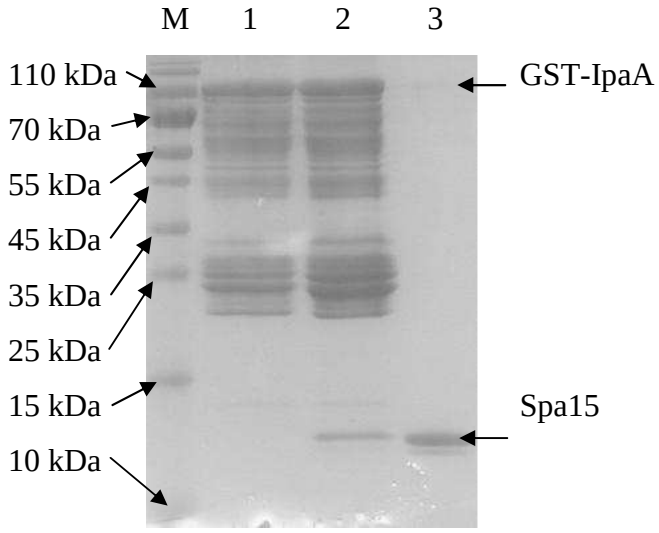

Abbildung 4.51: SDS-PAGE der Interaktionsstudie von Spa15 mit dem Fusionsprotein GST-IpaA. Bahn 1 Elution des GST-IpaA-Fusionsproteins von der Glutathion-Sepharose mit GSH-Elutionspuffer. Bahn 2 Elution des GST-IpaA-Fusionsproteins nach Inkubation mit Spa15 und erneutem Waschen. Bahn 3 zeigt reines Spa15.
Die zusätzlichen Banden in Bahn 1 und Bahn 2 zwischen der Laufhöhe des GST-IpaA-Fusionsproteins und einer Laufhöhe von etwa 20 kDa dürften Abbruchfragmenten bei der Translation des Fusionsproteins entsprechen.

4.4.4 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem OspD1

OspD1, das im bakteriellen Zytoplasma mit Spa15 assoziiert ist, fungiert als Antiaktivator von MxiE. Indem es an diesen Transkriptionsaktivator bindet, verhindert es die Bindung von MxiE an entsprechende regulatorische DNA-Abschnitte, sodass die Aktivierung der nachgeschalteten Gene nicht erfolgen kann [82][90].

Für biochemische und kristallographische Untersuchungen zur Wechselwirkung von OspD1 mit seinen Interaktionspartnern MxiE und Spa15 sollte OspD1 heterolog in *E. coli* als GST-Fusionsprotein produziert und affinitätschromatographisch gereinigt werden. Dazu wurde das *ospD1*-Gen *via* PCR mit den Primern ospD1_f und ospD1_b (siehe 2.1.7) aus dem Virulenzplasmid pWR501 amplifiziert.

a) *ospD1*-PCR-Produkt

```
   NdeI--                                                                    XhoI--
GGCCATATGCATAATGTAAATAATACTCAAGCGC...ipaA...CTTCCCTATCAAAAGTATTAAAGAATATCAATAAGGATTAACTCGAGGCC
      MetHisAsnValAsnAsnThrGlnAlaP...IpaA...hrSerLeuSerLysValLeuLysAsnIleAsnLysAspEnd
```

b) pGEX-4T-mod

```
                                          SmaI--    XhoI--
                        NdeI--   BamHI-  EcoRI-     SalI--    NotI----
     ...CTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGCGGGGATCCCCGGAATTCCCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
     ...LeuValProArgGlySerHisMetArgGlySerProGluPheProGlyArgLeuGluArgProHisArgAspEND...
                   ▲Thrombin
```

c) pGEX-4T-mod-ospD1

```
                                                              NotI----
                       NdeI--                            XhoI--
   ...CTGGTTCCGCGTGGGTCCCATATGCATAATGTA...ipaA...ATCAATAAGGATTAACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGA...
   ...LeuValProArgGlySerHisMetHisAsnVal...IpaA...IleAsnLysAspEnd
                  ▲Thrombin
```

Abbildung 4.52: a) PCR-Produkt der Amplifikation von *ipaA* aus dem Virulenzplasmid pWR501 mit Hilfe der Primer ipaA_f und ipaA_b, die eine *Nde*I-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Xho*I-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. In Rot sind die beiden Schnittstellen hervorgehoben.

b) Die MCS des Vektors pGEX-4T-mod, in die das Amplikon insertiert werden soll, wobei in Blau die Erkennungssequenz für Thrombin wiedergegeben und die Schnittstelle mit ▲ gekennzeichnet ist. In Rot sind die Schnittstellen für *Nde*I und *Xho*I hervorgehoben

c) Konstrukt pGEX-4T-mod-ipaA, welches durch das Einfügen des PCR-Produktes über die Schnittstellen *Nde*I und *Xho*I erhalten wurde. In blau wurden die zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His hervorgehoben, die nach Spaltung mit Thrombin (die Schnittstelle ist mit ▲ gekennzeichnet) noch am Zielprotein verbleiben. In Rot sind die Schnittstellen für *Nde*I und *Xho*I hervorgehoben.

Durch den Primer ospD1_f wurde dabei am 5'-Ende (bezüglich der Sense-Richtung) eine *Nde*I-Schnittstelle und durch den Primer ospD1_b am 3'-Ende eine *Xho*I-Schnittstelle angebracht (siehe Abbildung 4.52 a). Das resultierende PCR-Produkt wurde dann über diese Schnittstellen in die MCS des Vektors pGEX-4T-mod (siehe Abbildung 4.52 b) eingesetzt. Das so entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pGEX-4T-mod-ospD1.

Aus Abbildung 4.52 c) wird ersichtlich, dass nach Thrombinverdau des Fusionsproteins an dem abgespalteten OspD1-Anteil *N*-terminal die zusätzliche Aminosäuresequenz Gly-Ser-His verbleibt. Dies resultiert in einem Molekulargewicht des rekombinanten OspD1 von 25.1 kDa. Das berechnete Molekulargewicht des GST-OspD1-Fusionsproteins beträgt 51.3 kDa.

Um das GST-OspD1-Fusionsprotein heterolog in *E. coli* zu produzieren, wurde das Plasmid pGEX-4T-mod-ospD1 in den Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL transformiert. Nach Überexpression des Fusionsgens und anschließendem Zellaufschluss wurde die lösliche Fraktion des Aufschlusses auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen und diese mit PBS-Puffer gewaschen.

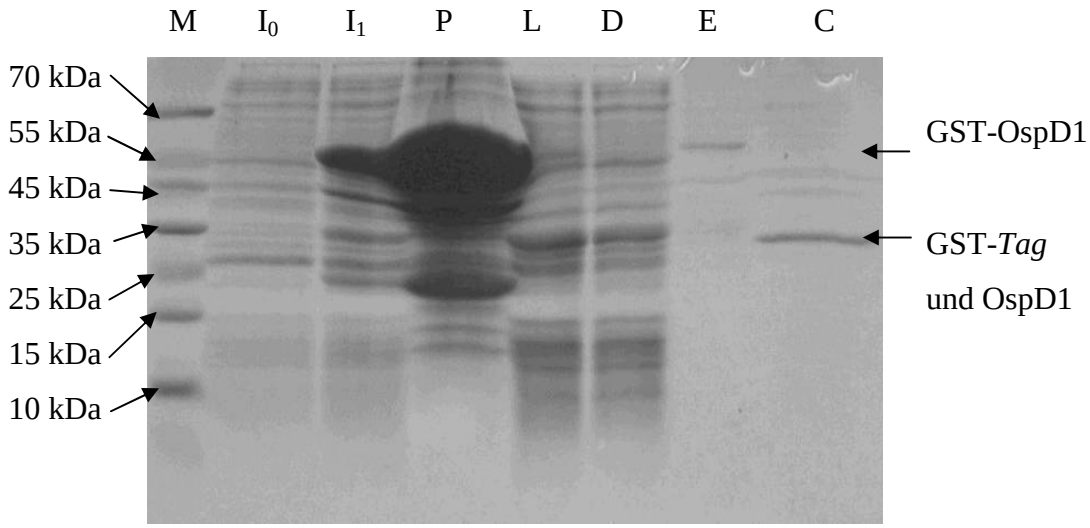

Abbildung 4.53: Aufreinigung von rekombinantem OspD1 verfolgt über SDS-PAGE: Marker (M), Gesamtzelllysat vor Induktion (I_0), Gesamtzelllysat 12 h nach Induktion; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des GST-OspD1-Fusionsproteins beträgt 51.3 kDa; bei der entsprechenden Laufhöhe ist eine deutliche Bande sichtbar (I_1), unlösliche Fraktion des Zelllysats mit einem Großteil des Fusionsproteins (P), lösliche Fraktion des Zelllysats (L), Durchfluss nach Auftrag der löslichen Fraktion des Zelllysats auf die Glutathion-Sepharose-Säule (D), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit GSH-Elutionspuffer (E), Thrombinverdau des Eluats nach 12 h bei 4 °C; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht von OspD1 beträgt 25.1 kDa; offensichtlich wandern das GST-*Tag* sowie OspD1 bei der SDS-PAGE auf Grund ihres ähnlichen Molekulargewichts auf gleicher Höhe (C).

Im Anschluss wurde das Fusionsprotein direkt mit GSH-Elutionspuffer von der Säule eluiert. Auf diese Weise wurden aus einem Liter Bakterienkultur zunächst 12.5 mg Fusionsprotein erhalten. Schließlich erfolgte die proteolytische Abtrennung des GST-Anteils vom Zielprotein durch Thrombin. Abbildung 4.53 zeigt eine SDS-PAGE der relevanten Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte. In Abbildung 4.53 C ist erkannbar, dass die GST und das rekombinante OspD1 nach ihrer Trennung auf Grund ihres ähnlichen Molekulargewichts praktisch auf der gleichen Laufhöhe wandern und durch die SDS-PAGE nicht voneinander getrennt werden können.

In einem nächsten Schritt wurde die GST- und OspD1-haltige Proteinlösung von dem noch vorhandenen GSH mit Hilfe einer PD10-Säule befreit. Anschließend wurde die Proteinlösung erneut auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen, um den GST-*Tag* daran zu binden. Der Durchfluss enthielt 1.6 mg des gereinigte OspD1 aus einem Liter Bakterienkultur (siehe Abbildung 4.54). Die experimentellen Details der Aufreinigung sind im Material- und Methodenteil (2.2.2.1-2.2.2.6) nachzulesen, das dem Standardaufreinigungsverfahren entspricht.

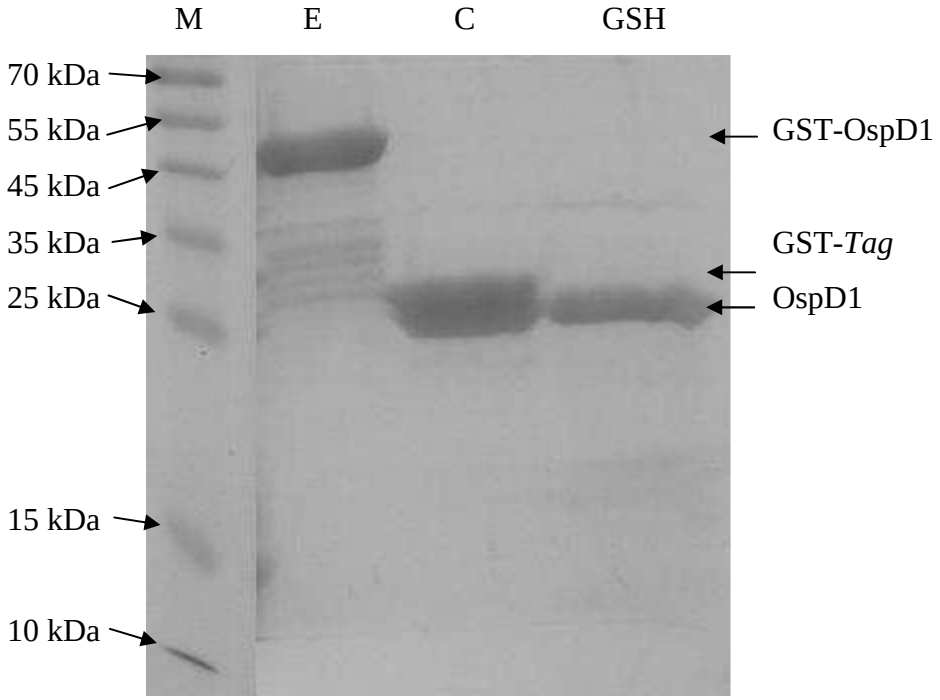

Abbildung 4.54: SDS-PAGE der finalen Reinigungsschritte von OspD1 (M), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit GSH-Elutionspuffer: das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des GST-OspD1-Fusionsproteins beträgt 51.3 kDa; eine entsprechende Bande ist bei der Laufhöhe sichtbar (E), Thrombinverdau des Eluats nach 12 h bei 4 °C; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht von OspD1 beträgt 25.1 kDa, sodass sich sein Laufverhalten in der SDS-PAGE von dem der GST (26 kDa) kaum unterscheidet (C), Entfernung des GST-*Tags* durch Auftragen des Eluats auf eine zweite Glutathion-Sepharose-Matrix (GSH).

Die Ausbeute der OspD1-Präparation war zu gering, um Kristallisationsversuche oder eine quantitative Analyse der Wechselwirkung mit Spa15 durchzuführen. Es soll hier angemerkt sein, dass im Rahmen der von mir mitbetreuten Diplomarbeit von Jessica Jüngel zwischenzeitlich eine Optimierung des Expressionssystems sowie die Etablierung eines veränderten Reinigungsprotokolls stattfand. Dabei wurde das in der vorliegenden Arbeit verwendete GST-*Tag* durch ein MBP-*Tag* ersetzt, was eine wesentlich bessere Löslichkeit des resultierenden Fusionsproteins zur Folge hatte. Darüber hinaus wurde an den *C*-Terminus des OspD1-Anteils ein 8xHis-*Tag* angefügt, um die bei der Translation offensichtlich in großer Zahl entstehenden Abbruchfragmente affinitätschromatographisch vom Volllängenprotein abtrennen zu können. Die Ausbeuten des neu etablierten Expressions- und Reinigungssystems betragen mehrere mg reines OspD1 pro Liter Bakterienkultur.

4.4.5 Qualitative Untersuchung der Interaktion zwischen Spa15 und OspD1

Die in der Literatur beschriebene Interaktion von Spa15 und OspD1 sollte durch eine qualitative Analyse verifiziert werden [82][90]. Zu diesem Zweck wurde die lösliche Fraktion eines Gesamtzelllysats von Bakterien, die das GST-OspD1-Fusionsprotein rekombinant produziert hatten, auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen und so das Fusionsprotein an die Säulenmatrix gebunden. Nach einem Waschschritt wurde gereinigtes Spa15 auf die Säule aufgetragen. Schließlich wurde nach einem weiteren Waschschritt das GST-OspD1-Fusionsprotein mit reduziertem Glutathion (GSH) von der Säule eluiert (siehe 2.2.2.14). Die SDS-PAGE des Eluats und anschließende Färbung des Gels mit Coomassie-Blau zeigte neben dem Fusionsprotein GST-OspD1 auch eine Bande, die eindeutig Spa15 zuzuordnen war. Das Ergebnis zeigt, dass Spa15 an den OspD1-Anteil des Fusionsproteins gebunden hatte, was seine Ablösung von der Säule während des Waschschritts verhinderte (siehe Abbildung 4.55). Wurde Spa15 in der gleichen Menge auf die Säule aufgetragen und die Säule im Anschluss gewaschen, ohne dass das GST-OspD1-Fusionsprotein vorher an die Affinitätsmatrix gebunden worden war, enthielt ein entsprechendes GSH-Eluat kein Spa15 (Daten nicht gezeigt).

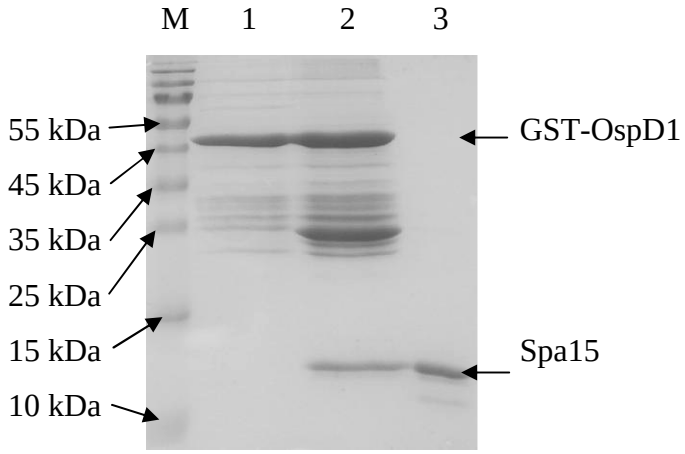

Abbildung 4.55: SDS-PAGE der Interaktionsstudie von Spa15 mit dem Fusionsprotein GST-OspD1. Bahn 1 entspricht der Elution mit GSH-Elutionspuffer von der Glutathion-Sepharose vom Fusionsprotein GST-OspD1. Auf Bahn 2 ist die Elution nach der Inkubation mit Spa15 und erneutem Waschen aufgetragen (die zusätzlichen Banden unterhalb des Fusionsproteins und oberhalb einer Laufhöhe von 20 kDa zeigen offensichtlich Abbruchfragmente der Translation des Fusionsproteins). Bahn 3 zeigt reines Spa15.

4.5 Untersuchung der Wechselwirkung des Chaperons IpgA mit dem Effektorprotein IcsB

4.5.1 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem IpgA

IpgA ist ein Chaperon, welches im bakteriellen Zytosol für die Stabilisierung und Sekretion des Effektors IcsB erforderlich ist [76]. Für biochemische und kristallographische Untersuchungen sollte IpgA in möglichst großen Mengen rein dargestellt werden. Zu diesem Zweck wurde es heterolog in *E. coli* als GST-Fusionsprotein produziert und affinitätschromatographisch gereinigt.

Um das für die Expression erforderliche Plasmid zu erzeugen, wurde das *ipgA*-Gen mittels PCR mit den Primern ipgA_f und ipgA_b (siehe 2.1.7) aus dem Virulenzplasmid pWR501 amplifiziert. Am 5'-Ende (bezüglich der Sense-Richtung) wurde dabei mit Hilfe des Primers ipgA_f eine *Bam*HI-Schnittstelle, am 3'-Ende mit Hilfe des Primers ipgA_b eine *Not*I-Schnittstelle angefügt (siehe Abbildung 4.56 a). Im Anschluss wurde das PCR-Produkt über diese Schnittstellen in die MCS des Vektors pGEX-4T-mod (siehe Abbildung 4.56 b) eingesetzt.

Das erhaltene Plasmid wurde pGEX-4T-mod-ipgA genannt. Abbildung 4.56 c) gibt die MCS des Vektors mit dem insertierten *ipgA*-Gen wieder. Es wird ersichtlich, dass nach Abspaltung des GST-Anteils vom Zielprotein die sieben zusätzliche Aminosäuren Gly-Ser-His-Met-Arg-Gly-Ser am *N*-Terminus des Zielproteins verbleiben, was ein Molekulargewicht des rekombinanten IpgA von 15.8 kDa zur Folge hat.

Abbildung 4.56: a) PCR-Produkt der Amplifikation von *ipgA* aus dem Virulenzplasmid pWR501 mit Hilfe der Primer ipgA_f und ipgA_b, die eine *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Not*I-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. In Rot sind die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben.
b) Die MCS des Vektors pGEX-4T-mod, in die das Amplikon insertiert werden soll, wobei in Blau die Erkennungssequenz für Thrombin wiedergegeben und die Schnittstelle mit ▲ gekennzeichnet ist. In Rot sind die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben
c) Konstrukt pGEX-4T-mod-ipgA, welches durch das Einfügen des PCR-Produktes über die Schnittstellen *BamH*I und *Not*I erhalten wurde. In blau wurden die zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His-Met-Arg-Gly-Ser hervorgehoben, die nach Spaltung mit Thrombin (die Schnittstelle ist mit ▲ gekennzeichnet) noch am Zielprotein verbleiben. In Rot sind die Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I hervorgehoben.

Die affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinantem IpgA verlief nach Expression des Fusionsgens in dem *E. coli*-Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL völlig analog zu der von IpgC (siehe Abschnitt 5.3.1). Die abschließende präparative Größenausschlusschromatographie (siehe Abbildung 4.57) lieferte reines IpgA mit einer Ausbeute von 10.0 mg Protein pro Liter Bakterienkultur. Die SDS-PAGE der Präparation nach Färbung des Gels mit Coomassie-Blau ist in Abbildung 4.58 gezeigt. Experimentelle Details zur Aufreinigung finden sich im Material- und Methodenteil (2.2.2.20).

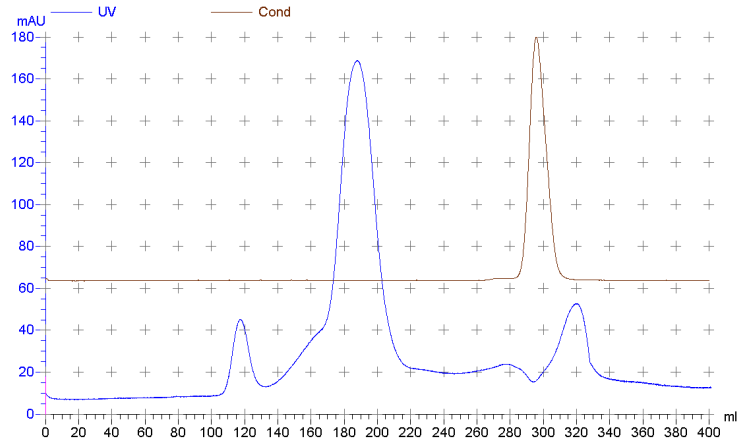

Abbildung 4.57: Chromatogramm der abschließenden Größenausschlusschromatographie während der IpgA-Reinigung durchgeführt mit einer HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade Säule. Die Elution von IpgA erfolgte in dem Volumenbereich zwischen 170 mL und 210 mL.

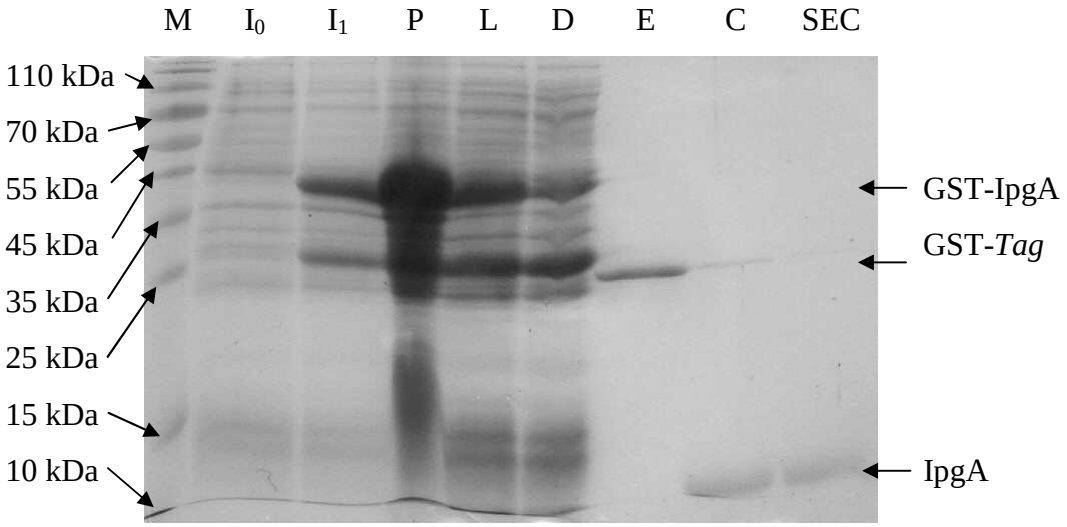

Abbildung 4.58: SDS-Page der Präparation von IpgA: Marker (M), Gesamtzelllysat vor Induktion (I_0), Gesamtzelllysat 12 h nach Induktion; das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des GST-IpgA-Fusionsproteins beträgt 41.9 kDa; deutlich ist eine Bande bei der entsprechenden Laufhöhe sichtbar (I_1), unlösliche Fraktion des Zelllysats (P), lösliche Fraktion nach des Zelllysats (L), Durchfluss nach Auftrag der löslichen Fraktion des Zelllysats auf die Glutathion-Sepharose-Säule (D), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit GSH-Elutionspuffer nach Thrombinverdau (E), Elution der Glutathion-Sepharose-Säule mit PBS-Puffer nach dem Thrombinverdau (C), Elutionspeak des Molekularsiebs HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 (SEC).

Bei einer analytischen Größenausschlusschromatographie, die mit einer kalibrierten Säule durchgeführt wurde (siehe 2.2.2.8), eluierte das gereinigte IpgA mit einem Volumen von 15.83 mL ± 0.02 mL (siehe Abbildung 4.48). Mit Hilfe von Gleichung (3) (siehe 3.2.2.8) kann aus dem Elutionsvolumen ein Molekulargewicht von 38.54 kDa ± 0.30 kDa berechnet werden. Dieser Wert weicht nur geringfügig von dem aus der Aminosäuresequenz des Proteins berechneten Molekulargewicht für ein IpgA-Dimer von 31.6 kDa ab.

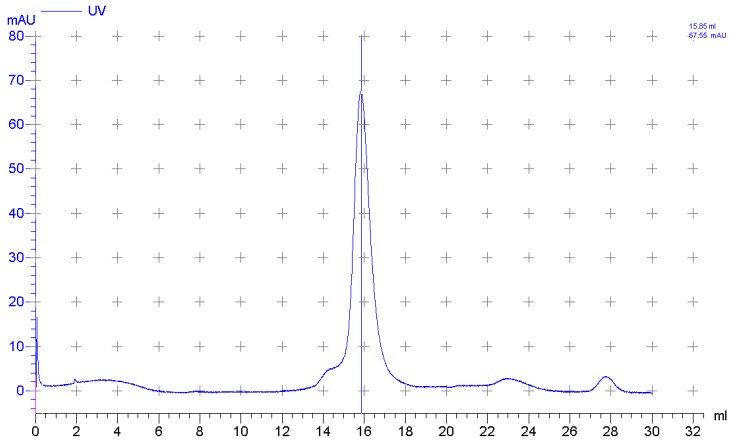

Abbildung 4.59: Chromatogramm einer analytischen Größenausschlusschromatographie mit gereinigtem IpgA. Die Chromatographie wurde mit einer Superdex 200 10/300 GL durchgeführt. Die Elution von IpgA erfolgte bei einem Volumen von 15.83 mL ± 0.02 mL.

4.5.2 Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem IcsB

IcsB wird, nachdem die Invasion der Bakterien in die Wirtszelle erfolgt ist, durch das Typ III-Translokationssystem sezerniert. Im Wirtszytoplasma verhindert es durch Binden an IcsA dessen Wechselwirkung mit dem Wirtszellprotein Atg5, welche Autophagie auslösen würde. Im bakteriellen Zytosol ist IcsB mit dem Chaperon IpgA assoziiert, das für seine Stabilität und Sekretion erforderlich ist [76][77].

Für kristallographische und biochemische Untersuchungen sollte IcsB heterolog in *E. coli* als GST-Fusionsprotein produziert und affinitätschromatographisch gereinigt werden. Dazu wurde das *icsB*-Gen *via* PCR mit den Primern icsB_f und icsB_b (siehe 2.1.7) aus dem Virulenzplasmid pWR501 amplifiziert.

Durch den Primer icsB_f wurde dabei am 5'-Ende (bezüglich der Sense-Richtung) eine *Nde*I-Schnittstelle und durch den Primer icsB_b am 3'-Ende eine *Xho*I-Schnittstelle angefügt (siehe Abbildung 4.49 a). Das PCR-Produkt wurde im Anschluss über diese Schnittstellen in die MCS des Vektors pGEX-4T-mod (siehe Abbildung 4.49 b) eingeführt. Das erhaltene Plasmid erhielt die Bezeichnung pGEX-4T-mod-icsB. Abbildung 4.49 c) zeigt die MCS des Vektors mit dem insertierten *icsB*-Gen. Aus der Abbildung geht hervor, dass nach Thrombinverdau des Fusionsproteins am Zielprotein die drei zusätzlichen *N*-terminalen Aminosäuren Gly-Ser-His verbleiben. Dies resultiert in einem Molekulargewicht des rekombinanten IcsB von 56.7 kDa. Das Fusionsprotein GST-IcsB hat ein berechnetes Molekulargewicht von 82.8 kDa.

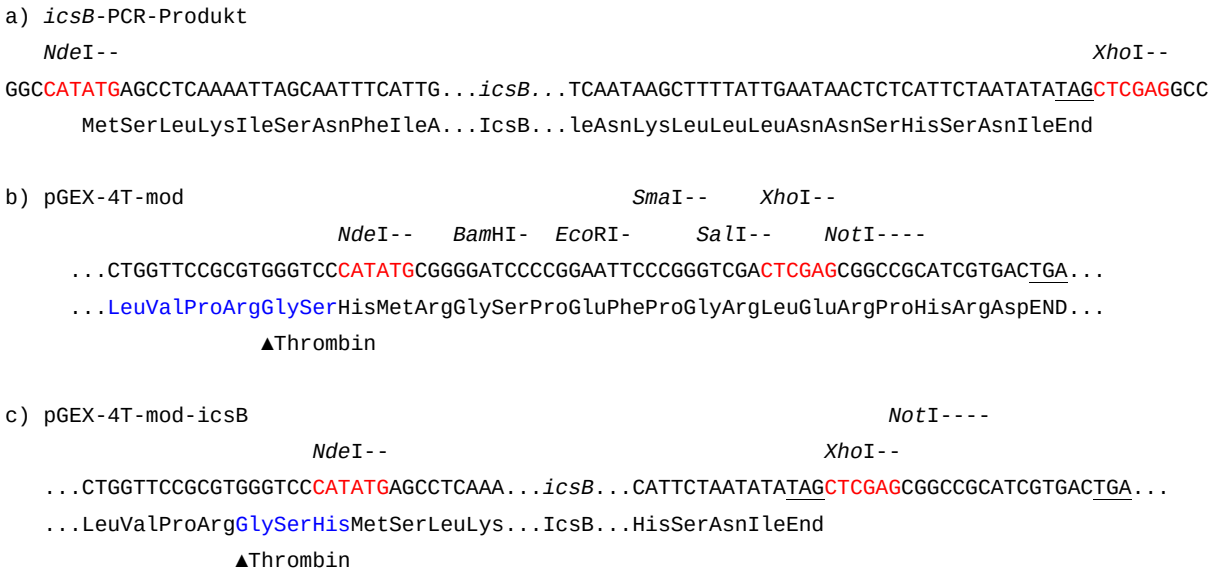

Abbildung 4.60: a) PCR-Produkt der Amplifikation von *icsB* aus dem Virulenzplasmid pWR501 mit Hilfe der Primer icsB_f und icsB_b, die eine *Nde*I-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Xho*I-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. In Rot sind die beiden Schnittstellen hervorgehoben.

b) Die MCS des Vektors pGEX-4T-mod, in die das Amplikon insertiert werden soll, wobei in Blau die Erkennungssequenz für Thrombin wiedergegeben und die Schnittstelle mit ▲ gekennzeichnet ist. In Rot sind die Schnittstellen für *Nde*I und *Xho*I hervorgehoben

c) Konstrukt pGEX-4T-mod-icsB, welches durch das Einfügen des PCR-Produkts über die *Nde*I- und *Xho*I-Schnittstellen erhalten wurde. In Blau wurden die zusätzlichen Aminosäuren Gly-Ser-His hervorgehoben, die nach Spaltung mit Thrombin (die Schnittstelle ist mit ▲ gekennzeichnet) noch am Zielprotein verbleiben. In Rot sind die Schnittstellen für *Nde*I und *Xho*I hervorgehoben.

Nach Transformation des Plasmids pGEX-4T-mod-icsB in den *E. coli*-Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL und erfolgter Genexpression wurde der Versuch unternommen, rekombinantes IpgB zu reinigen. Wie IpaC und IpaA war jedoch auch IcsB sowohl als GST-Fusionsprotein als auch nach Abspaltung des GST-Anteils nur in geringen Mengen löslich und präzipitierte beim Versuch es anzukonzentrieren nahezu vollständig. Aus einem Liter Bakterienkultur war es lediglich möglich 2,8 mg wenig konzentriertes und darüber hinaus stark verunreinigtes Fusionsprotein darzustellen (Daten nicht gezeigt). Da der Versuch der Reinigungs-Optimierung in einem überschaubaren Zeitrahmen wenig aussichtsreich erschien, wurde in der vorliegenden Arbeit darauf verzichtet. Die experimentellen Details der Aufreinigung sind im Material- und Methodenteil (2.2.2.1-2.2.2.6) nachzulesen.

4.5.3 Qualitative Untersuchung der Interaktion zwischen IpgA und IcsB

Die in der Literatur beschriebene Interaktion von IpgA und IcsB sollte durch eine qualitative Analyse verifiziert werden [76][77]. Zu diesem Zweck wurde die lösliche Fraktion eines Gesamtzelllysats von Bakterien, die das GST-IcsB-Fusionsprotein rekombinant produziert hatten, auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen und so das Fusionsprotein an die Säulenmatrix gebunden. Nach einem Waschschritt wurde gereinigtes IpgA auf die Säule aufgetragen. Schließlich wurde nach einem weiteren Waschschritt das GST-IpgA-Fusionsprotein mit reduziertem Glutathion (GSH) von der Säule eluiert (siehe 2.2.2.14).
Die SDS-PAGE des Eluats und anschließende Färbung des Gels mit Coomassie-Blau zeigte neben dem GST-IcsB-Fusionsprotein auch eine Bande, auf der Laufhöhe von gereinigtem IpgA. Dies zeigt, dass IpgA an den IcsB-Anteil des Fusionsproteins gebunden hatte, wodurch seine Elution bei dem vorausgehenden Waschschritt verhindert worden war (siehe Abbildung 4.51). Wurde IpgA in der gleichen Menge auf die Säule aufgetragen und und diese gewaschen, ohne dass das GST-IcsB-Fusionsprotein vorher an die Affinitätsmatrix gebunden worden war, enthielt ein entsprechendes GSH-Eluat kein IpgA (Daten nicht gezeigt).

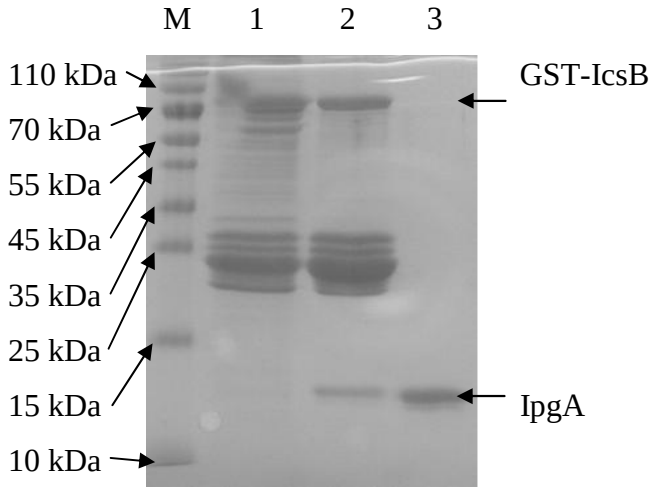

Abbildung 4.61: SDS-PAGE der Interaktionsstudie von Spa15 mit dem Fusionsprotein GST-IcsB. Bahn 1 entspricht der Elution mit GSH-Elutionspuffer von der Glutathion-Sepharose vom Fusionsprotein GST-IcsB. Auf Bahn 2 ist die Elution nach Inkubation mit IpgA und erneutem Waschen aufgetragen (bei den Banden zwischen einer Laufhöhe von 25 kDa und 70 kDa in Bahn 1 und Bahn 2 handelt es sich wohl um Abbruchfragmente der Translation des GST-IcsB-Fusionsproteins). Bahn 3 zeigt reines IpgA.

5 Zusammenfassung

Primäres Ziel dieser Arbeit war die Klonierung und rekombinante Expression verschiedener Pathogenitätsgene aus *Shigella flexneri* in *Escherichia coli* sowie die Aufreinigung der resultierenden Genprodukte. Mit den gereinigten rekombinanten Pathogenitätsfaktoren sollten dann biochemische Untersuchungen und Kristallisationsversuche durchgeführt werden. Dabei wurden zunächst zahlreiche Pathogenitätsgene in entsprechende Expressionsvektoren eingebracht, um nach erfolgter Expression mit den Faktoren, die in möglichst großer Menge und in löslicher Form produziert wurden, fortzufahren. Ein Fokus lag dabei auf den Chaperonen des Typ III-Translokationssystems und ihren jeweiligen Bindepartnern.

Zunächst wurden das *ipgE*-, das *ipgD*- und das *spa-orf11*-Gen in einen Expressionsvektor kloniert, der die Produktion des Zielproteins in Form eines Fusionsproteins mit *N*-terminalem Glutathion-S-Transferase- (GST-) Anteil ermöglicht. Das GST-*Tag* erlaubt eine einfache und schnelle Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie und erhöht darüber hinaus in vielen Fällen die Produktionsrate sowie die Löslichkeit des Zielproteins. Mittels einer Protease-Schnittstelle zwischen Zielprotein und *Tag* können die beiden Komponenten schließlich voneinander getrennt werden. Während das *ipgE*-Gen für ein Chaperon des Typ III-Translokationssystems kodiert, stellt die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Phosphatase IpgD einen nachgewiesenen Bindepartner von IpgE dar. Dem *spa-orf11*-Genprodukt konnte bisher noch keine Funktion zugewiesen werden, es ist jedoch ein weiteres mutmaßliches Substrat von IpgE. Mit Hilfe des in dieser Arbeit konstruierten Expressionsplasmids gelang es, IpgE mit einer Ausbeute von 20 mg pro Liter Bakterienkultur rein darzustellen. Weniger gute Ausbeuten wurden bei der Reinigung des Effektors IpgD erzielt, von dem nur 3 mg gereinigtes Proteins aus einem Liter Bakterienkultur erhalten wurden. Die Darstellung von Spa-orf11 war lediglich in Form des Fusionsproteins mit *N*-terminalem GST-Anteil möglich, da das Protein nach Abspalten des *Tags* seine Löslichkeit vollständig einbüßte. Das GST-Spa-orf11-Fusionsprotein wurde schließlich mit einer Ausbeute von 5 mg pro Liter Bakterienkultur gereinigt.

Mit Hilfe eines Assays, bei dem IpgE indirekt über das GST-IpgD-Fusionsprotein an eine Glutathion-Affinitätsmatrix gebunden wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit die in der Literatur beschriebene Wechselwirkung zwischen IpgE und IpgD verifiziert. Mittels der erst kürzlich entwickelten Methode der Microscale-Thermophorese, die auf der gerichteten Bewegung von Molekülen entlang eines Temperaturgradienten basiert, wurde für den IpgD-IpgE-Komplex ein K_D von 51,4 ± 7,0 µM bestimmt. Eine spezifische Interaktion zwischen Spa-orf11 und IpgE, welche von Page *et al.* (2001) im Rahmen eines „Yeast Two Hybrid Screens" entdeckt wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit dagegen nicht verifiziert werden.

Um die Voraussetzung für Untersuchungen zur Wechselwirkung des Chaperons IpgC mit seinen Bindepartnern IpaC (einem Invasin) und MxiE (einem Transkriptionsaktivator) zu schaffen, wurden auch das *ipgC*-, das *ipaC*- und das *mxiE*-Gen in einen Expressionsvektor eingebracht, der die Erzeugung des Zielproteins als Fusionsprotein mit *N*-terminalem GST-Anteil erlaubt. In löslicher Form wurde mit Hilfe der erzeugten Expressionsplasmide jedoch lediglich rekombinantes IpgC erhalten, sodass es mit einer Ausbeute von 30 mg pro Liter Bakterienkultur gereinigt werden konnte. Dagegen erwies sich das GST-IpaC-Fusionsprotein als schwer löslich. Bei dem Versuch es anzukonzentrieren, präzipitierte es nahezu vollständig, was auch durch den Einsatz hoher NaCl-Konzentrationen oder die Anwesenheit von Detergentien nicht verhindert werden konnte. Ausschließlich in Form unlöslicher Einschlusskörper lag das GST-MxiE-Fusionsprotein nach rekombinanter Produktion in *Escherichia coli* vor. Auf den Versuch einer Reinigung wurde daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit verzichtet.

Anhand verschiedener Literaturangaben konnte innerhalb von IpaC ein Abschnitt von maximal 40 Aminosäuren identifiziert werden, der für die Bindung des Invasins an IpgC erforderlich ist. Mit Hilfe synthetischer Oligopeptide, welche in der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden, war es möglich, die IpgC-Bindestelle von IpaC auf die zehn Aminosäuren umfassende Sequenz LLKLSEQVQH (Aminosäuren 78 bis 87) einzugrenzen. Durch Microscale-Thermophorese wurde für einen Komplex aus IpgC und einem Peptid mit der genannten Sequenz ein K_D von 107,0 ± 15,7 µM bestimmt. Ein 20 Aminosäuren umfassendes Peptid, welches den IpaC-Abschnitt zwischen den Aminosäuren 78 und 97 repräsentierte, band an IpgC mit einer Affinität von 29,8 ± 4,8 µM.

Im Gegensatz zu IpaC lagen für MxiE keinerlei Hinweise vor, welcher Bereich innerhalb dieses Transkriptionsfaktors für die Bindung an IpgC erforderlich ist. Daher wurde anhand der Aminosäuresequenz des Proteins eine Sekundärstrukturanalyse durchgeführt, um mögliche Schleifenregionen zu identifizieren, die als Interaktionsstellen für das Chaperon mit größerer Wahrscheinlichkeit in Frage kommen als Regionen innerhalb von α-Helices und β-Strängen. Im Anschluss wurden Peptide mit einer Länge von bis zu 20 Aminosäuren synthetisiert, welche diese Schleifenregionen repräsentierten. Diese Peptide wurden dann mittels Microscale-Thermophorese auf ihre Fähigkeit hin untersucht an IpgC zu binden. Durch dieses Vorgehen konnte die IpgC-Bindestelle von MxiE identifiziert und auf den Bereich zwischen Aminosäure 90 und 99 eingegrenzt werden. Ein zehn Aminosäuren umfassendes Peptid mit der Sequenz AEKCIHFYHE, das eben diesen Bereich repräsentiert, band an IpgC mit einer Affinität von 32,9 ± 7,4 µM. Ein 20 Aminosäuren umfassendes Peptid, welches dem MxiE-Abschnitt zwischen Aminosäure 80 und 99 entsprach, band gar mit einer Affinität von 7,1 ± 1,5 µM. Dies ist die höchste Affinität zu IpgC, die bisher für einen Bindepartner dieses Chaperons gemessen wurde. Um die Wechselwirkung von IpgC mit der Bindestelle von MxiE auf atomarer Ebene zu verstehen, ist die Strukturaufklärung und folglich die Kristallisation eines entsprechenden Komplexes Voraussetzung und Gegenstand zukünftiger Forschung. Die Kokristallisation von IpgC mit einem Peptid, welches die IpgC-Bindestelle aus MxiE enthält, wird im vorliegenden Fall jedoch dadurch erschwert, dass diese Bindestelle ein Cystein enthält. Cysteinhaltige Peptide bilden rasch Disulfidbrücken, was sich bei Kristallisationsversuchen nachteilig auswirkt. So wurden in der vorliegenden Arbeit Peptide hergestellt, bei denen das Cystein der IpgC-Erkennungsregion von MxiE durch ein Serin ausgetauscht war, und auf ihre Affinität zu IpgC hin untersucht. Der Affinitätsverlust im Vergleich zu den ansonst sequenzgleichen cysteinhaltigen Peptiden belief sich jeweils auf den Faktor zwei bis drei. Diese geringfügige Erniedrigung der Affinität sollte erfolgversprechenden Kristallisationsversuchen nicht im Wege stehen.

Schließlich wurden als Voraussetzung für strukturbiologische und biochemische Untersuchungen Expressionsplasmide für die rekombinante Produktion von Spa15, von OspD1 sowie von IpaA erzeugt. Spa15 ist ein Chaperon des Typ III-Translokationssystems mit einer relativ hohen Bandbreite an Substraten, OspD1 und IpaA stellen zwei seiner zahlreichen Interaktionspartner dar. Weitere Expressionsplasmide wurden für die rekombinante Herstellung von IpgA und IcsB generiert. Auch IpgA ist ein Chaperon des Typ III-Translokationssystems, IcsB stellt seinen einzigen bekannten Interaktionspartner dar. Während die Chaperone Spa15 und IpgA mit Hilfe der erzeugten Expressionssysteme mit guten Ausbeuten gereingt werden konnten (15 mg bzw. 10 mg pro Liter Bakterienkultur), erwiesen sich die Produktionsraten für die übrigen Faktoren als wenig zufriedenstellend. Eine Optimierung der Expressions- und Reinigungsprotokolle wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch aus Zeitgründen nicht mehr vorgenommen und wird Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Insgesamt wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Etablierung von Expressions- und Reinigungsprotokollen sowie durch die Identifizierung von Chaperon-Bindestellen die Voraussetzung für die strukturbiologische Untersuchung zahlreicher Pathogenitätsfaktoren geschaffen. Vorläufige Kristallisationsexperimente, die mit den in dieser Arbeit gereinigten Proteinen durchgeführt wurden, führten bisher noch zu keinen diffraktionsfähigen Kristallen.

6 Literaturverzeichnis

[1] WHO (2006), http://www.who.int/topics/shigella/en/, 30.07.06
WHO (2006), http://www.who.int/csr/don/archive/disease/shigellosis/en/, 30.07.06
WHO (2006), http://www.who.int/vaccine_research/diseases/shigella/en/, 30.07.06

[2] Sansonetti, P.J., d'Hauteville, H., Erabichon, C., Pourcel, C. (1983) Molecular comparison of virulence plasmids in *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli. Ann Microbiol (Paris)* **134A,** 295-318

[3] Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.B., Bui, H., Le Bouguénec, C., Denamur, E. (2004) A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1085-1094

[4] Tominga, A., Lan, R., Reves, P.R. (2005) Evolutionary chanegs of the *flhDC* flagellar master operon in *Shigella* strains. *J. Bacteriol.* **187**, 4295-4302

[5] Pupo, G.M., Lan, R., Reeves, P.R. (2000) Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 10567-10572

[6] Gesundheitsamt Biberbach (2006), http://www.biberach.de/fileadmin/user_upload/Gesundheitsamt/Files/Ruhr_Shigellose_neu.pdf, 04.08.2006

[7] DuPont; H.L., Levine, M.M., Hornick, R.B., Formal, S.B. (1989) Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J. Infect. Dis.* **159**, 1126-1128

[8] Purdy, G.E., Homg, M., Payne, S.M. (2002) *Shigella flexneri* DegP facilitates IcsA surface expression and is required for efficient intercellular spread. *Infect. Immun.* **70**, 6355-6364

[9] LaBrec, E.H.,Schneider, H., Magnani, T.J., Formal, S.B. (1964) Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. *J. Bacteriol.* **88**, 1503-1518

[10] Clerk, P., Sansonetti, P.J. (1987) Entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells: evidence for directed phagoZytosis involving actin polymerization and myosin accumulation. *Infect. Immun.* **55**, 2681-2688

[11] Kadurugamuwa, J.L., Rhode, M., Wehland, J., Timmis, K.N. (1991) Intercellular spread of *Shigella flexneri* through a monolayer mediated by membranous protrusions and associated with reorganisation of the Zytoskeletal protein vinculin. *Infect. Immun.* **59**, 3463-3471

[12] Calderwood, S.B., Acheson, D.W.K., Keusch, G.T., Barrett, T.J., Griffin, P.M., Strockbine, N.A., Swaminathan, B., Kaper, J.B., Levine, M.M., Kaplan, B.S., Karch, H., O'Brien, A.D., Obrig, T.G., Takeda, Y., Tarr, P.I., Wachsmuth, I.K. (1996) Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* **62 (3)**, 118-119

[13] Nakao, H., Takeda, T. (2000) *Escherichia coli* Shiga toxin. *J. Nat. Toxins*. **9**, 299-313

[14] Fraser, M.E., Chernaia, M.M., Kozlov, Y.V., James, M.N. (1994) Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 59-64

[15] Fraser, M.E., Fujinaag, M., Cherney, M.M., Melton-Celsa, A.R., Twiddy, E.M., O´Brien, A.D., James, M.N.G. (2004) Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.* **279**, 27511-27517

[16] Sansonetti, P.J. (1992) Molecular and cellular biology of *Shigella flexneri* invasiveness: from cell assay systems to shigellosis. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **180**, 1-19

[17] Parsot, C., Sansonetti, P.J. (1996) Invasion and the pathogenesis of *Shigella* infections. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **209**, 25-42

[18] Ménard, R., Dehio, C., Sansonetti, P.J. (1996) Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella. Trends Microbiol.* **4/6**, 220-226

[19] Sansonetti, P.J., Kopecko, D.J., Formal, S.B. (1982) Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **35/3**, 852-860

[20] Sasakawa, C., Kamata, K., Sakai, T., Makino, S., Yamada, M., Okada, N., Yoshikawa, M. (1988) Virulence-associated genetic regions comprising 31 kilobases of the 230-kilobase plasmid in *Shigella flexneri* 2a. *J. Bacteriol.* **170**, 2480-2484

[21] Mounier, J., Vasselon, T., Hellio, R., Lesourd, M., and Sansonetti, P.J. (1992) *Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 cells through their basolateral pole. *Infect. Immun.* **60**, 237-248

[22] Sakaguchi, T., Köhler, H., Gu, X., McCormick, B.A., Reinecker, H.-C. (2002) *Shigella flexneri* regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **4**, 367-381

[23] Wassef, J.F., Keren, D.F., Mailloux, J.L. (1989) Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in rabbit intestinal loop model of shigellosis. *Infect. Immun.* **57**, 858-863

[24] Perdomo, O.J.J., Cavaillon, J.M., Huerre, M., Ohayon, H., Gounon, P., Sansonetti, P.J. (1994) Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental Shigellosis. *J. Exp. Med.* **180**, 1307-1319

[25] Sakaguchi, T., Köhler, H., Gu, X., McCormick, B.A., Reinecker, H.-C. (2002) *Shigella flexneri* regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **4**, 367-381

[26] Benjelloun-Touimi, Z., Sansonetti, P.J., Parsot, C. (1995) SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: Autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol. Microbiol.* **17**, 123-135

[27] Kuwae, A., Yoshida, S., Tamano, K., Mimuro, H., Suzuki, T., Sasakawa, C. (2001) *Shigella* invasion of Makrophage requires the insertion of IpaC into the host plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **276**, 32230-32239

[28] Fernandez-Prada, C.M., Hoover, D.L., Tall, B.D., Hartman, A.B., Kopelowitz, J., Venkatesan, M.M. (2000) *Shigella flexneri* IpaH(7,8) facilitates escape of virulent bacteria from the endocytic vacuoles of mouse and human Makrophages. *Infect. Immun.* **68**, 3608-3619

[29] Zychlinsky, A., Kenny, B., Ménard, R., Prévost, M.C., Holland, I.B., Sansonetti, P.J. (1994) IpaB mediates Makrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **11**, 619-627

[30] Chen, Y., Smith., M.R., Thirumalai, K., Zychlinsky, A. (1996) A bacterial invasin induces Makrophage apoptosis by Binde directly to ICE. *EMBO J.* 15:3853-3860

[31] Hilbi, H., Moss, J.E., Hersh, D., Chen, Y., Arondel, J., Banerjee, S., Flavell, R.A., Yuan, J., Sansonetti, P.J., Zychlinsky, A. (1998) *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J. Biol. Chem.* **273**, 32895-32900

[32] Black, R.A. Kronheim S.R., Cantrell M., Deeley M.C., March C.J., Prickett K.S., Wignall J., Conlon P.J., Cosman D., Hopp T.P., et al. (1988) Generation of biologically active interleukine-1α by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *J. Biol. Chem.* **263**, 9437-9442

[33] Kostura, M.J., Tocchi, M.J., Limjuco, G., Chin, J., Cameron, P., Hillman, A.G., Chartrain, N.A., Schmidt, J.A. (1988) Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1β convertase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5227-5231

[34] Sansonetti, P.J., Phalipon, A., Arondel, J., Thirumalai, K., Banerjee, S., Akira, S., Takeda, K., Zychlinsky, A. (2000) Caspase-1 activation of IL-1β and IL-18 are essential for *Shigella flexneri*-induced inflammation. *Immunity* **12**, 581-590

[35] Perdomo, J.J., Gounon, P., Sansonetti, P.J. (1994) Polymorphonuclear leukocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayer by *Shigella flexneri. J. Clin. Invest.* **93**, 633-643

[36] Sansonetti, P.J., Arondel, J., Cavaillon, J.-M., Huerre, M. (1995) Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis. *J. Clin. Invest.* **96**, 884-892

[37] Francois, M., LeCabec, V., Dupont, M.-A., Sansonetti, P.J., Maridonneau-Parini**,** I. (2000) Induction of necrosis in human neutrophils by *Shigella flexneri* requires type III secretion, IpaB and IpaC invasins, and actin polymerization. *Infect. Immun.* **68**, 1289-1296

[38] Watari M, Tobe T, Yoshikawa M, Sasakawa C (1995) Contact of *Shigella* with host cells triggers release of Ipa invasins and is an essential function of invasiveness. *EMBO J.* **14/11**, 2461-2470

[39] Ménard, R., Sansonetti, P.J., Parsot, C. (1994). The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J.* **13**, 5293-5302

[40] Buchrieser, C., Glaser, P., Rusniok, C., Nedjari, H., d´Hauteville, H., Kunst, F., Sansonetti, P., Parsot, C. (2000) The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **38**, 760-771

[41] Allaoui, A., Sansonetti, P.J., Parsot, C. (1992) MxiJ, a lipoprotein involved in secretion of *Shigella* Ipa invasins, is homologous to YscJ, a secretion factor of the *Yersinia* Yop proteins. *J. Bacteriol.* **174**, 7661-7669

[42] Allaoui, A., Sansonetti, P.J, Parsot, C. (1993) MxiD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the *Shigella* Ipa invasins. *Mol. Microbiol.* **7**, 59-68

[43] Allaoui, A., Ménard, R., Sansonetti. P.J., Parsot, C. (1993) Characterization of the *Shigella flexneri ipgD* and *ipgF* genes, which are located in the proximal part of the *mxi* locus. *Infect. Immun.* **61**, 1707-1714

[44] Andrews, G.P., Maurelli, A.T. (1992) *mxiA* of *Shigella flexneri* 2a, which facilitates export of invasion plasmid antigens, encodes a homolog of the low-calcium-response protein, LcrD, of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* **60**, 3287-3295

[45] Venkatesan, M.M., Buysee, J.M., Oaks, E.V. (1992) Surface presentation of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigens requires the products of the *spa* locus. *J. Bacteriol.* **174**, 1990-2001

[46] Cordes, F.S., Komoriya, K., Larquet, E., Yang, S., Egelman, E.H., Blocker, A., Lea, S.A. (2003) Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J. Biol. Chem.* **278**, 17103-17107

[47] Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C, Sansonetti, P.J. 1999. The tripartite type III secreton of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J. Cell Biol.* **147**, 683-693

[48] Tamano, K., Aizawa, S.-I., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S., Sasakawa, C. (2000) Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J.* **19**, 3876-3887

[49] Skoudy, A., Van Nhieu, G.T., Mantis, N., Arpin, M., Gounon, P., Sansonetti, P.J. (1999) A functional role for ezrin during *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Cell. Sci.*, **112**, 2059-2068

[50] Skoudy, A, Mounier, J., Aruffo, A., Ohayon, H., Gounon, P., Sansonetti, P., Van Nhieu, G.T. (2000) CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **2**, 19-33

[51] Lafont, F., Van Nhieu, G.T., Hanada, K., Sansonetti, P.J., van der Goot, F.G. (2002) Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *EMBO J.* **21**, 4449-4457

[52] Hayward, R.D., Cain, R.J., McGhie, E.J., Phillips, N., Garner, M.J., Koronakis, V. 2005. Cholesterol Binde by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. *Mol. Miccrobiol.* **56**, 590-603

[53] Watarai, M., Funato, S., Sasakawa, C. (1996) Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with α5β1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J. Exp. Med.*, **183**, 991-999

[54] Parsot, C., Ménard, R., Gounon, P., Sansonetti, P.J. (1995) Enhanced secretion through the *Shigella flexneri* Mxi-Spa translocon leads to assembly of extracellular proteins into Makromolecular structures. *Mol. Microbiol.* **16**, 291-300

[55] Ménard, R., Prevost, M.-C., Gounon, P., Sansonetti, P.J., Dehio, C. (1996) The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 1254-1258

[56] Ménard, R., Sansonetti, P.J., Parsot, C., Vasselon, T. (1994). Extracellular association and Zytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* **79**, 515-525

[57] Page, A.-L., Ohayon, H., Sansonetti, P., Parsot, C. (1999) The secreted IpaB and IpaC invasins and their Zytoplasmic chaperone IpgC are required for intercellular dissemination of *Shigella flexneri*. *Cell. Microbiol.* **1**, 183-193

[58] Picking, W.L., Nishioka, H., Hearn, P.D., Baxter, M.A., Harrington, A.T., Blocker, A., Picking, W.D. (2005) IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infect. Immun.* **73**, 1432-1440

[59] Clerc, P.L., Sansonetti, P.J. (1987) Entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells: evidence for directed phagoZytosis involving actin polymerization and myosin accumulation. *Infect. Immun.* **55/11**, 2681-2688

[60] Kueltzo, L.A., Osiecki, J., Barker, J., Picking, W.L., Ersoy, B., Picking, W., Middaugh, C.R. (2003) Structure-function analysis of invasion plasmid antigen C (IpaC) from *Shigella flexneri*. *J. Biol. Chem.* **278**, 2792-2798

[61] Hale, T.L., Morris, R.E., Bonventre, P.F. (1979) *Shigella* infection of Henle intestinal epithelial cells: role of the host cell. *Infect. Immun.* **24/3**, 887-894

[62] Pendaries, C., Tronchere, H., Arbibe, L., et al. (2006) PtdIns(5)P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during Shigella flexneri infection. *EMBO J.* **25(5)**, 1024-1034

[63] Adam, T., Arpin, M., Prévost, M.C., Gounon, P., Sansonetti, P.J. (1995). Zytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J. Cell Biol.* **129:**367-381

[64] Van Nhieu, G.T., Ben-Ze´ev, A., Sansonetti, P.J. (1997) Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the *Shigella* IpaA invasin. *EMBO J.* **16**, 2717-2729

[65] Athman, R., Fernandez, M.-I., Gounon, P., Sansonetti, P., Louvard, D., Philpot, D., Robine, S. (2005) *Shigella flexneri* infection is dependent on villin in the mouse intestine and in primary cultures of intestinal epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **7**, 1109-1116

[66] Bourdet-Sicard, R., Rüdiger, M., Jockusch, B.M., Gounon, P., Sansonetti, P.J., Van Nhieu, G.T. (1999) Binde of the *Shigella* protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization. *EMBO J.* **18**, 5853-5862

[67] High, N., Mounier, J., Prévost, N.C., Sansonetti, P.J. (1992) IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J.* **11**, 1991-1999

[68] De Geyter, C., Wattiez, R., Sansonatti, P., Falmagne, P., Ruysschaert, J.-M., Parsot, C, Cabiaux, V. (2000) Characterization of the interaction of IpaB and IpaD, proteins required for entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells, with a lipid membrane. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5769-5776

[69] De Geyter, C., Vogt, B., Benjelloun-Touimi, Z., Sansonetti, P.J., Ruysschaert, J.-M., Parsot, C., Cabiaux, V. (1997) Purification of IpaC, a protein involved in entry of *Shigella flexneri* into epithelia cells and characterization of its interaction with lipid membranes. *FEBS Lett.* **400**, 149-154

[70] Ménard, R., Sansonetti, P.J., Parsot, C. (1993) Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of Shigella flexneri entry into epithelial cells. *J. Bacteriol.* **175**, 5899-5906

[71] Sansonetti, P.J., Ryter, A., Clerc, P., Maurelli, A.T., Mounier, J. (1986) Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect. Immun.* **51**, 461-469

[72] Bernardini, M.L., Mounier, J., D´Hauteville, H., Coquis-Rondon, M., Sansonetti, P.J. (1989) Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and extracellular spread through interaction with F-actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 3867-3871

[73] Sansonetti, P.J., Mounier, J., Prévost, M.C., Mège, R.-M. (1994) Cadherin expression is required for the spread of *Shigella flexneri* between epithelial cells. *Cell* **76**, 829-839

[74] Kadurugamuwa, J.L., Rhode, M., Wehland, J., Timmis, K.N. (1991) Intercellular spread of *Shigella flexneri* through a monolayer mediated by membranous protrusions and associated with reorganisation of the Zytoskeletal protein vinculin. *Infect. Immun.* **59**, 3463-3471

[75] Mantis, N., Prévost, M.-C., Sansonetti, P. (1996) Analysis of epithelial cell stress response during infection by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **64/8**, 2474-2482

[76] Ogawa, M., Suzuki, T., Tatsuno, I., Abe, H., and Sasakawa, C. (2003) IcsB, secreted via the type III secretion system, is chaperoned by IpgA and required at the post-invasion stage of *Shigella* pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **48**, 913-931.

[77] Allaoui, A., Mounier, J., Prévost, M.-C., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1992) icsB: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread. *Mol. Microbiol*. **6**, 1605-1616.

[78] Page, A.-L., Fromont-Racine, M., Sansonetti, P., Legrain, P., Parsot, C. (2001) Characterization of the interaction partners of secreted proteins and chaperons of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **42**, 1133-1145

[79] Page, A.-L., Sansonetti, P., Parsot, C. (2002) Spa15 of *Shigella flexneri*, a third type of chaperone in the type III secretion pathway. *Mol. Microbiol.* **43**, 1533-1542

[80] Ohya, K., Handa, Y., Ogawa, M., Suzuki, M., and Sasakawa, C. (2005) IpgB1 is a novel *Shigella* effector protein in bacterial invasion of host cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 24022-24034.

[81] Alto, N.M., Shao, F., Lazar, C.S., Brost, R.L., Chua, G.; Mattoo , S., McMahon, S.A., Ghosh; P. Hughes, T.R., Boone, C., Dixon, J.E, (2006) Identification of an bacterial type III effektor family with G protein mimicry function. *Cell* **124**, 133-145.

[82] Mavris, M., Page, A.-L., Tournebize, R., Demers, B., Sansonetti, P., and Parsot, C. (2002) Regulation of transcription by the activity of the Shigella flexneri type III secretion apparatus. *Mol. Microbiol.* **43**, 1543-1553.

[83] Ménard, R., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1993) Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Bacteriol.* **175**, 5899-5906.

[84] Marquart, M.E., Picking, W.L., and Picking, W.D. (1996) Soluble invasion plasmid antigen C (IpaC) from *Shigella flexneri* elicits epithelil cell responses related to pathogen invasion. *Infect. Immun.* **64**, 4182-4187.

[85] Van Nhieu, G.T., Caron, E., Hall, A., and Sansonetti, P.J. (1999) IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J.* **18**, 3249-3262.

[86] Harrington, A.T., Hearn, P.D., Picking, W.L., Barker, J.L., Wessel, A., and Picking, W.D. (2003) Structural characterization of the *N*-terminus of IpaC from *Shigella flexneri*. *Infect Immun.* **71**, 1255-1264.

[87] Niebuhr, K., Giuriato, S., Pedron, T., Philpott, D.J., Gaits, F., Sable, J., Sheetz, M.P., Parsot, C., Sansonetti, P.J., and Payrastre, B. (2002) Conversion of PtdIns(4,5)P_2 into PtdIns(5)P by the *S. flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology. *EMBO J.* **21**, 5069-5078.

[88] Niebuhr, K., Jouihri, N., Allaoui, A., Gounon, P., Sansonetti, P.J., Parsot, C. (2000) IpgD, a protein secreted by the type III secretion machinery of *Shigella flexneri*, is chaperoned by IpgE and implicated in entry focus formation. *Mol. Microbiol.* **38**, 8-19

[89] van Eerde, A., Hamiaux, C., Pérez, J., Parsot, C., Dijkstra, B.W. (2004) Structure of Spa15, a type III secretion chaperone from *Shigella flexneri* with broad specificity. *EMBO Reports* **5**, 477-483

[90] Parsot, C., Ageron, E., Penno, C., Mavris, M., Jamoussi, K., d´Hauteville, H., Sansonetti, P., Demers, B. (2005) A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **56**, 1627-1635

[91] Penno, C., Sansonetti, P, and Parsot, C. (2005) Frameshifting by transcriptional slippage is involved in production of MxiE, the transcriptional activator regulated by the activity of the type III secretion apparatus in *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **56,** 204-214.

[92] Mavris, M., Sansonetti, P., and Parsot, C. (2002) Identification of the cis-acting site involved in activation of promoters regulated by activity of the types III secretion apparatus in *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **184**, 6751-6759.

[93] Zahrl, D., Wagner, M., Bischof, K., Bayer, M., Zavecz, B., Beranek, A., Ruckenstuhl, C., Zarfeland, G. E. and Koraimann, G. (2005) Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* **151**, 3455-3467.

[94] Venkatesan, M.M., Alexander, W.A. and Fernandez-Prada, C. (1996) A *Shigella flexneri* invasion plasmid gene, *ipgH*, with homology to IS629 and sequences encoding bacterial sugar phosphate transport proteins. *Gene* **175**, 23-27.

[95] Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1987) *Biotechniques* **5(4)**, 376-378

[96] Greener, A., Jerpseth, B. (1993) *Strategies* **6(2)**, 57

[97] Jerpseth, M., Jerpseth, B., Briester, L., Greener, A. (1998) *Strategies* **11(1)**, 3-4

[98] Jerpseth, B., Callahan, M., Greener, A. (1997) *Strategies* **10(2)**, 37–38

[99] Weiner, M.P., Anderson, C., Jerpseth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B. *et al.* (1994). *Strategies* **7(2)**, 41–43

[100] Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage t7RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Biol.Chem.* **189(1)**, 113-130

[101] Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P., and Duhr, S. (2011) Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *ASSAY and Drug Development Technologies* **9**, 342-353.

[102] Derewenda, Z. S. (2010) Application of protein engineering to enhance crystallizability and improve crystal properties. *Acta Crystallogr. Sect. D* **66**, 604-615.

[103] Chang, J.-Y. (1985) Thrombin specificity - Requirement for apolar amino acids adjacent to the thrombin cleavage site of polypeptide substrate. *Eur. J. Biochem.* **151**, 217-224.

[104] Lunelli, M., Lokareddy, R. K., Zychlinsky, A. and Kolbe, M. (2009) IpaB–IpgC interaction defines Binde Motiv for type III secretion translocator. *PNAS*, **106**, 9661-9666.

[105] Derewenda, Z. S. (2010) Application of protein engineering to enhance crystallizability and improve crystal properties. *Acta Crystallogr. Sect. D* **66**, 604-615.

[106] Petersen, B., Petersen, N. T., Andersen, P., Nielsen, M. and Lundegaard, C. (2009) A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Structural Biology*, **9:51**.

[107] Harrington, A.T., Hearn, P.D., Picking, W.L., Barker, J.L., Wessel, A., and Picking, W.D. (2003) Structural characterization of the *N*-terminus of IpaC from *Shigella flexneri*. *Infect Immun.* **71**, 1255-1264.

[108] Pilonieta, M.C., Munson, G.P. (2008) The Chaperone IpgC Copurifies with the Virulence Regulator MxiE. *J. Bacteriol.* **71**, 2249-2251.

[109] Sankaran, K., Ramachandran, V., Subrahmanyam, Y.V.B.K., Rajarathnam, S., Elango, S. Roy, R.K. (1989) Congo Red-Mediated Regulation of Levels of *Shigella flexneri 2a* Membran Proteins. *American Society for Microbiology.* **57**(8), 2364-2371.

[110] Turbyfill, K.R., Joseph S.W., Oaks, E.V. (1995) Recognition of three epitopic regions on invasion plasmid antigen C by immune sera of rhesus monkeys infected with *Shigella flexneri 2a*. *Infection and Immunity.* **63**(10), 3927-3935.

7 Anhang

7.1 Konstruierte Plasmide

Folgende Plasmide wurden in dieser Arbeit konstruiert (siehe Tabelle 7.1), dabei wurden Plasmide mit den Schnittstellen *Nde*I und *Xho*I analog zur Konstruktion von IpgE (siehe 4.2.1) hergestellt. Wurden die Schnittstellen *Bam*HI und *Not*I benutzt, wurde diese analog zur Konstruktion von IpgC (siehe 4.3.1) hergestellt. Primer siehe Abschnitt 2.1.7. Das jeweilige Gen wurde in den Vektor pGEX-4T-mod eingefügt.

Tabelle 7.1: Pathogenitätsfaktoren mit DNA-Schnittstellen, Primer und entsprechende Annealingtemperatur für die PCR, welche dann in den Vektor pGEX-4T-Mod eingefügt worden.

Gen	5'-Schnittstelle	3'-Schnittstelle	Primer	Annealingtemp.
ipgA	*BamH*I	*Not*I	ipgA_f, ipgA_b	55 °C
ipgB	*Nde*I	*Xho*I	ipgB_f, ipgB_b	55 °C
trcA	*Nde*I	*Xho*I	trcA_f, trcA_b	55 °C
ipgC	*BamH*I	*Not*I	ipgC_f, ipgC_b	55 °C
ipgD	*BamH*I	*Not*I	ipgD_f, ipgD_b	55 °C
ipgE	*Nde*I	*Xho*I	ipgE_f, ipgE_b	55 °C
ipgF	*Nde*I	*Xho*I	ipgF_f, ipgF_b	55 °C
ipgH	*Nde*I	*Xho*I	ipgH_f, ipgH_b	58 °C
ipaA	*Nde*I	*Xho*I	ipaA_f, ipaA_b	55 °C
ipaB	*Nde*I	*Xho*I	ipaB_f, ipaB_b	55 °C
ipaC	*Nde*I	*Xho*I	ipaC_f, ipaC_b	55 °C
ipaD	*Nde*I	*Xho*I	ipaD_f, ipaD_b	55 °C
spa15	*BamH*I	*Not*I	spa15_f, spa15_b	55 °C
spa-orf11	*BamH*I	*Not*I	orf11_f, orf11_b	55 °C
ospD1	*Nde*I	*Xho*I	ospD1_f, ospD1_b	55 °C
mxiE	*Nde*I	*Xho*I	mxiENX_f, mxiENX_b	55 °C
mxiE	*BamH*I	*Not*I	mxiEBN_f, mxiEBN_b	55 °C
icsB	*Nde*I	*Xho*I	icsB_f, icsB_b	55 °C
Vinculin	*Nde*I	*Not*I	Vin_f, Vin_b	55 °C

Folgende trunkierte Varianten wurden in dieser Arbeit konstruiert (siehe Tabelle 7.2), welche analog zur Konstruktion der verkürzten IpgD-Variante pHW1-ipgD-30,-8 (siehe 4.2.1) hergestellt wurden. Primer siehe Abschnitt 2.1.7. Das Gen wurde jeweils in den Vektor pHW1 eingefügt.

Tabelle 7.2: Verkürzte Varianten mit Primer, Schnittstellen und Beschreibung der Konstrukte.

Name	**Primer**	**Schnittstelle**	**Beschreibung**
IpgE0,-3S	gE_f, gE-3_b	*Nde*I/*Xho*I	IpgEΔ118-120+Stopp-Codon
IpgE0,-6S	gE_f, gE-6_b	*Nde*I/*Xho*I	IpgEΔ115-120+Stopp-Codon
IpgE0,-9S	gE_f, gE-9_b	*Nde*I/*Xho*I	IpgEΔ111-120+Stopp-Codon
IpgE-3,-3S	gE-3_f, gE-3_b	*Nde*I/*Xho*I	IpgEΔ1-3Δ118-120+Stopp-Codon
IpgE-3,-6S	gE-3_f, gE-6_b	*Nde*I/*Xho*I	IpgEΔ1-3Δ115-120+Stopp-Codon
IpgE-3,-9S	gE-3_f, gE-9_b	*Nde*I/*Xho*I	IpgEΔ1-3Δ111-120+Stopp-Codon
IpgD-30,-8	gD-30_f, gD-8_b	*Bam*HI/*Not*I	IpgDΔ1-30Δ531-538
IpgD31-329	gD-30_f, gD329_b	*Bam*HI/*Not*I	IpgDΔ1-30Δ330-538
IpgD330-530	gD330_f, gD-8_b	*Bam*HI/*Not*I	IpgDΔ1-329Δ531-538
OspD1-15,-4	D1-15_f, D1-4_b	*Nde*I/*Xho*I	OspD1Δ1-15Δ222-225
OspD1-32,-4	D1-32_f, D1-4_b	*Nde*I/*Xho*I	OspD1Δ1-32Δ222-225
OspD1-80,-4	D1-80_f, D1-4_b	*Nde*I/*Xho*I	OspD1Δ1-80Δ222-225
IpgC0,-4S	gC_f, gC-4_b	*Bam*HI/*Not*I	IpgCΔ152-155+Stopp-Codon
IpgC-9,0S	gC-9_f, gC_b	*Bam*HI/*Not*I	IpgCΔ1-9+Stopp-Codon
IpgC-9,-4S	gC-9_f, gC-4_b	*Bam*HI/*Not*I	IpgCΔ1-9Δ152-155+Stopp-Codon
MxiE-F1	Mx1_f, Mx1_b	*Bam*HI/*Not*I	MxiEΔ71-251
MxiE-F2	Mx2_f, Mx2_b	*Bam*HI/*Not*I	MxiEΔ1-60Δ131-251
MxiE-F3	Mx3_f, Mx3_b	*Bam*HI/*Not*I	MxiEΔ1-120Δ191-251
MxiE-F4	Mx4_f, Mx4_b	*Bam*HI/*Not*I	MxiEΔ1-180

Der Vektor pET-Duet-M2 besitzt zwei „Multiple-cloning-sites“, siehe Abbildung 2.7, wodurch zwei Gene gleichzeitig exprimiert werden können. Zur besseren Aufreinigung wird das Gen in der ersten „Multiple-cloning-site“ als Fusionsprotein mit einem 6xHis-*Tag* am N-Terminus exprimiert. Somit kann bei einer positiven Interaktionen zwischen zwei Proteinen, dass Protein aus der zweiten „Multiple-cloning-site“ indirekt über seinen Interaktionspartner mit einer Ni^{2+}-Säule aufgereinigt werden.

Die erste „Multiple-cloning-site“ des pET-Duet-M2 Vektors besitzt unter anderem eine *BamH*I und *Not*I Schnittstelle und die zweit „Multiple-cloning-site“ eine *Nde*I und *Xho*I Schnittstelle in der jeweilig korrekten Orientierung, daher wurden die ausgewählten Gene entsprechenden ihre DNA-Schnittstellen am 5’- und 3’-Ende in die jeweilige „Multiple-cloning-site“ kloniert. Die Reihenfolge wurde dabei so gewählt, dass mögliche DNA-Schnittstellen im ersten Gen nicht mit den DNA-Schnittstellen vom 5’- und 3’-Endes des zweiten Gens übereinstimmten. Die erhaltenen Konstrukte für die Koexpression sind in Tabelle 7.3 zusammengefasst.

Tabelle 7.3: Konstrukte des pET-Duet-M2 Vektors für Koexpressionen

Gen	Aufgabe	MCS	Gen	Aufgabe	MCS
ipgA	Chaperon	1	*icsB*	Effektor	2
ipgC	Chaperon	1	*ipaB*	Effektor	2
ipgC	Chaperon	1	*ipaC*	Effektor	2
ipgD	Effektor	1	*ipgE*	Chaperon	2
spa-orf11	?	1	*ipgE*	Chaperon	2
spa15	Chaperon	1	*ipaA*	Effektor	2
spa15	Chaperon	1	*ospD1*	Effektor	2
spa15	Chaperon	1	*ipgB*	Effektor	2
spa15	Chaperon	1	*trcA*	Effektor	2

7.2 Testexpression der pGEX-4T-mod Konstrukte

Ausbeuten der Testexpressionen der pGEX-4T-mod-Konstrukte der Fusionsproteine aus 1 L Kultur.

Tabelle 7.4: Ausbeuten der Pathogenitätsfaktoren aus 1 L Kultur

GST-Fusionsprotein	Aufgabe	Ausbeute
IpgA	Chaperon	39.8 mg
IpgB	Effektor	7.2 mg
TrcA	Effektor	0.3 mg
IpgC	Chaperon	103.4 mg
IpgD	Effektor	4.1 mg
IpgE	Chaperon	80.4 mg
IpgF	Effektor	4.7 mg
IpgH	Effektor	0.2 mg
IpaA	Effektor	11.8 mg
IpaB	Effektor	4.3 mg
IpaC	Effektor	9.2 mg
IpaD	Effektor	48.2 mg
Spa15	Chaperon	49.8 mg
Spa-orf11	?	36.0 mg
OspD1	Effektor	12.5 mg
MxiE	Effektor	2.0 mg
IcsB	Effektor	2.8 mg
Vinculin	Wirtsprotein	38.1 mg

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei einigen Personen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten
- Herrn Prof. Dr. Klaus Reuter für die freundliche Betreuung und Beratung in praktischen und theoretischen Fragen
- Herrn Prof. Dr. Torsten Steinmetzer für die Hilfe und Unterstützung in der Peptidsynthese
- AG Klebe und AG Steinmetzer für die freundliche Aufnahme
- Meinen Freunden & Mitstreitern für die unterhaltsame Zeit im Laboralltag
- Meiner Frau Diana, für das Verständnis für mein Laborleben
- Meinen Eltern

E R K L Ä R U N G

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Klonierung und Expression von *Shigella*-Pathogenitätsgenen sowie Interaktionsstudien mit ihren Produkten“ selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 14.05.2013 .....

Christian Hasewinkel

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Dipl. chem. & Apotheker Christian Hasewinkel
Geburtsdatum & Ort	20.05.1980 in Jena
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	verheiratet

Schulische Ausbildung

06/2000	Gymnasium Aspe in Bad Salzuflen, Abschluss Abitur

Grundwehrdienst/Zivildienst

06/2000 – 05/2001	Zivildienstleistender im Stift zu Wüsten in Bad Salzuflen, Einsatz im Hol- und Bringdienst

Studium

10/2001 – 10/2005	Universität Marburg, Studium der Chemie
03/2006 – 09/2006	Diplomarbiet: Klonierung und Expression von Shigellen-Pathogenitätsgenen
10/2002 – 10/2007	Universität Marburg, Studium der Pharmazie
11/2007 – 04/2008	Praktikum in der Teich-Apotheke in Stadtallendorf
12/2008	Approbation
04/2009 – 09/2010	Universität Marburg, Zusatzqualifikation im Pharmarecht
10/2009 – 12/2010	Universität Hagen, Intensivkurs Betriebswirtschaftslehre und betriebliches Management
05/2008 – 10/2011	Universität Marburg, Promotion in der der Pharmazeutische Chemie in der AG Klebe
seit 01/2012	Leiter der Apotheke am Rathaus in Gedern

Marburg, den 14.05.2013 .....

Christian Hasewinkel