Fachbereich Pharmazie

Philipps-Universität Marburg

Rekombinante Produktion, Aufreinigung und Kristallisation der *Shigella* Pathogenitätsfaktoren Spa15, IpgC und OspD1

Dissertation

vorgelegt von

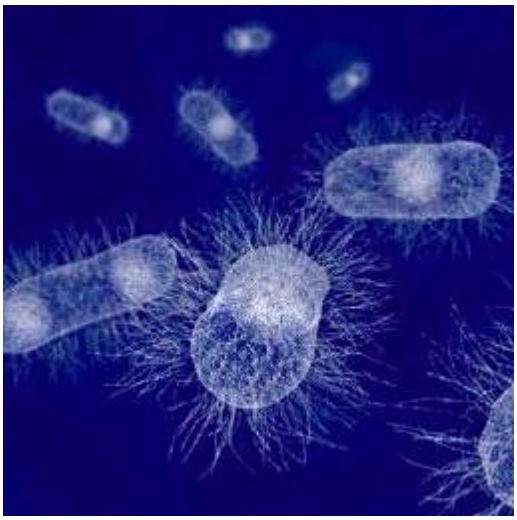
Jessica Jüngel

aus Grünberg

Marburg, November 2016

Fachbereich Pharmazie

Philipps-Universität Marburg



Rekombinante Produktion, Aufreinigung und Kristallisation der *Shigella* Pathogenitätsfaktoren Spa15, IpgC und OspD1

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Jessica Jüngel

(Master of Science)

aus Grünberg

Marburg, November 2016

“Per sviluppare una mente complete:
studia la scienza dell'arte,
studia l'arte della scienza.
Sviluppa i tuoi sensi, impara soprattutto a vedere.
Comprendi che tutto è connesso.”
Leonardo da Vinci

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 2011 bis

Juli 2015 im Laboratorium für Pharmazeutische Chemie am Fachbereich Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gerhard Klebe unter der Aufsicht von Prof. Dr. Klaus Reuter durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Reuter

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerhard Klebe

Eingereicht am: 04. November 2016

Tag der Verteidigung: 16. Dezember 2016

Hochschulkennziffer 1180

Inhaltsverzeichnis

1.1 Summary ... *1*

1.2 Zusammenfassung ... *2*

2 Einleitung ... 5

2.1 Shigella als Krankheitserreger ... *5*

2.1.1 Shigellose ... 5

2.1.2 Klassifizierung der Shigellen ... 5

2.1.3 Infektion ... 5

2.2 Molekulare Prozesse der Invasion ... *7*

2.2.1 Invasion durch die Epithelzellen ... 7

2.2.2 Invasion über die M-Zellen ... 7

2.2.3 Ausbreitung und Beweglichkeit ... 9

2.3 Typ-III-Translokon ... *11*

2.3.1 Proteinsekretionssysteme in gramnegativen Bakterien ... 11

2.3.2 Struktureller Aufbau des Typ-III-Translokons ... 13

2.3.3 Regulation der Sekretion des Typ-III-Translokons bei *S. flexneri* ... 14

2.4 Virulenzgene von Shigella ... *15*

2.4.1 Virusplasmid ... 15

2.4.2 Regulation der Virulenzgene ... 16

2.4.3 Der Antiaktivator OspD1 ... 19

2.4.4 Das Chaperon Spa15 ... 20

2.4.5 Der Coaktivator IpgC ... 21

2.4.6 Zielsetzung der Arbeit ... 22

3 Material und Methoden ... 24

3.1 Chemikalien und Reagenzien ... *24*

3.1.1 Bakterienstämme ... 25

3.1.2 XL2-Blue ... 26

3.1.3 BL 21 CodonPlus (DE3)-RIL ... 26

3.1.4 SoluBL21™ ... 27

3.1.5 B834 (DE3) pLysS ... 27

3.1.6 Plasmide ... 27

3.1.7 Medien ... 31

3.1.8 Lösungen und Puffer ... 34

3.1.9 Molekulargewichtstandards, Restriktionsenzyme und Probenpuffer ... 37

3.1.10 Verwendete Geräte ... 41

3.2 Mikrobiologische Methoden ... *43*
3.2.1 Sterilisation ... 43
3.2.2 Wachstumsbedingungen und Kultivierung der Bakterien ... 43
3.2.3 Ermittlung der Zelldichte ... 44
3.3 Molekularbiologische und genetische Methoden ... *45*
3.3.1 Übernachtkultur ... 45
3.3.2 Präparation von Plasmid-DNA ... 45
3.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung ... 45
3.3.4 DNA-Restriktion ... 45
3.3.5 PCR (Polymerase Chain Reaktion) ... 46
3.3.6 Agarose-Gelelektrophorese ... 48
3.3.7 Isolation und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen ... 49
3.3.8 Reinigung der verdauten Vektoren ... 49
3.3.9 Ligation ... 49
3.3.10 Herstellung kompetenter *E. coli* -Zellen ... 49
3.3.11 Transformation von *E. coli* über Hitzeschock ... 50
3.3.12 Sequenzierung der DNA ... 50
3.4 Biochemische Methoden ... *51*
3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 51
3.4.2 Bestimmung des Proteingehalts ... 52
3.4.2.1. durch Absorptionsmessung ... 52
3.4.2.2. nach Bradford ... 53
3.4.3 Heterologe Produktion von rekombinanten Proteinen in *E.coli* ... 53
3.4.4 Zelllyse und Zellaufschluss ... 54
3.4.5 Affinitätschromatographie mit Protein-*tags* ... 55
3.4.5.1. GST-*tag* bei Spa15 und IpgC ... 55
3.4.5.2. *Double-tag*-Kombination von MBP-*tag* und His-*tag* bei OspD1-Varianten ... 55
3.4.6 Spaltung der Fusionsproteine mit Thrombin ... 56
3.4.7 Aufreinigung von Spa15 mittels *Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)* ... 56
3.4.8 Aufreinigung von IpgCΔ152-155 mittels *Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)* 59
3.4.9 Aufreinigung der verkürzten Varianten von OspD1 mittels *Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)* ... 60
3.4.10 Aufreinigung der verkürzten SeMet-Varianten von OspD1 mittels *Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)* ... 62
3.4.11 Analytische Molekularsiebchromatographie ... 62
3.4.12 Mikroskalierte Thermophorese *(Microscale Thermophoresis (MST))* ... 63
3.4.13 *Thermal Shift Assay (TSA, Thermofluoro-Messung)* ... 65
3.4.14 Dynamische Lichtstreuung *(Dynamic Light Scattering)* ... 68

3.5 Kristallographische Methoden ... *70*
3.5.1 Kristallisations*screening* ... 70
3.5.2 Durchführung der Kristallisationsexperimente ... 72
3.5.3 Optimierung erfolgreicher Kristallisationsbedingungen ... 75
3.5.3.1. *Seeding* ... 75
3.5.3.2. Zugabe von Additiven ... 76
3.5.3.3. Co-Kristallisation ... 77
3.5.3.4. *Free Mounting System* ... 77
3.5.4 Montieren von Proteinkristallen ... 78
3.5.5 Datensammlung ... 78
3.5.6 Phasenproblem ... 79
3.5.7 Selenomethionin & Schwermetallderivatisierung ... 80
3.5.8 Datenprozessierung ... 80
3.5.9 Bestimmung des Wassergehalts (Matthews-Koeffizient) ... 81
3.5.10 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese ... 81

3.6 Material und Methoden bei der organischen Synthese ... *83*
3.6.1 Chemikalien der organischen Synthese ... 83
3.6.2 Geräte der organischen Synthese ... 84
3.6.3 Lösungen ... 85
3.6.4 Festphasenpeptidsynthese mittels Syntheseroboter ... 86
3.6.5 Peptidabspaltung von der Festphase ... 88
3.6.6 Analytische HPLC nach Abspaltung ... 88
3.6.7 Präparative HPLC ... 89
3.6.8 Analytische HPLC der Fraktionen ... 89
3.6.9 Lyophilisieren ... 90
3.6.10 Analytische HPLC der vollständig aufgereinigten Peptide ... 90
3.6.11 ESI-Massenspektrometrie der vollständig aufgereinigten Peptide ... 90

4 Ergebnisse und Diskussion ... 91

4.1 Verbesserung der Produktion und Aufreinigung verkürzter OspD1-Varianten ... *92*
4.1.1 Expressionsplasmid pHW3 mit MBP-*tag* ... 93
4.1.2 Expression und Aufreinigung von OspD1Δ1-15/Δ222-225 ... 95
4.1.3 Expression und Aufreinigung von OspD1Δ1-32/Δ222-225 ... 98
4.1.4 Expression und Aufreinigung von OspD1Δ1-80/Δ222-225 ... 101
4.1.5 Expression und Aufreinigung der verkürzten OspD1-Varianten als SeMet-Derivate ... 103

4.2 Reinigung von Spa15 ... *105*

4.3 Reinigung von IpgCΔ152-155 ... *107*

4.4 Analytische Molekularsiebchromatographie ... *110*

4.5 Mit OspD1Δ1-15/Δ222-225 und IpgCΔ152-155 durchgeführter Thermal Shift Assay (TSA) ... *113*

4.5.1 Additiv*screening* ... 114
4.5.2 Fragment*screening* ... 118

4.6 Peptidsynthese der OspD1-Peptide ... 119

4.7 Microscale Thermophoresis (MST) mit OspD1 und Spa 15 ... 121
4.7.1 OspD1Δ1-15/Δ222-225 mit Spa15 ... 121
4.7.1.1. Stöchiometrieexperiment ... 123
4.7.2 OspD1 mit MxiE-Peptiden ... 125
4.7.3 Spa15 mit OspD1-Peptiden ... 127

4.8 Dynamic Light Scattering mit OspD1Δ1-15/Δ222-225, Spa15 und IpgCΔ152-155 ... 128
4.8.1 IpgCΔ152-155 ... 128
4.8.2 OspD1Δ1-15/Δ222-225 ... 131
4.8.3 Spa15 ... 132

4.9 Kristallisationsergebnisse ... 133
4.9.1 OspD1 ... 133
4.9.1.1. Kristallisation von OspD1 und Optimierung der Kristalle ... 133
4.9.1.2. Phasierung mit Schwermetallderivaten ... 141
4.9.2 Ko-Kristallisation ... 149
4.9.2.1. IpgCΔ152-155 mit Peptiden ... 149
4.9.2.2. OspD1 mit Spa15 ... 152
4.9.2.3. Spa15 mit OspD1-Peptiden ... 152

5 Ausblick ... 154

6 Danksagung ... 155

7 Curriculum Vitae ... 157

8 Anhang ... 158

Literaturverzeichnis ... 169

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ad	auffüllen auf
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
Da	Dalton
dH_2O	destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DNA	*Desoxyribonucleic acid*
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic acid*
E. coli	*Escherichia coli*
et al	*et alii* = und Mitarbeiter
FPLC	*Fast Performance Liquid Chromatography*
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ipa	*invasion plasmid antigen*
ipg	*invasion plasmid gene*
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo/tausend
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	molar (mol/l)
mid-log	mittlere logarithmische Wachstumsphase
min.	Minute
mxi	*membrane expression of invasion plasmid antigens*
MCS	*multiple cloning site*
MES	2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-Morpholin-propanylsulfonsäure

OD	optische Dichte
OD_{578}	optische Dichte bei der Wellenlänge 578 nm
osp	*outer Shigella protein*
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
ppm	Teile pro Million (*parts per million*)
rpm	Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)
SDS	*sodiumdodecylsulfate*
Spa	*surface presentation of invasion plasmid antigens*
s.u.	siehe unten
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TSA	*Thermal Shift Assay*
Tris	Tris-(hydroxymethl-)aminomethan
UV	Ultraviolett
vol/vol	Volumen pro Volumen (volume per volume)
wt/vol	Gewicht pro Volumen (weight per volume)

1.1 *Summary*

Many gram-negative bacteria, including *Shigella flexneri*, use a type III secretion apparatus (T3SA) serving the secretion of bacterial proteins into eukaryotic cells. These proteins enable bacteria to infect eukaryotic cells. About 20 structural proteins and chaperones encoded by the *mxi-spa*-operon are needed to form the T3SA. The so-called "early genes" of the *Shigella* virulence plasmid obtain information for the synthesis of the structural proteins of the T3SA and invasins. They are regulated by VirF. The "later read-off genes" of the plasmid ensure that the host cell remains alive and are transcriptionally regulated by MxiE. Their transcriptional activation is achieved by activating the T3SA.

The main focus of this thesis lies on the pathogenicity factor OspD1. The interaction of OspD1 with the chaperone Spa 15 and the transcriptional regulator MxiE was investigated biochemically and by X-ray crystallography.

Within this thesis, an improved expression system was established which enables the purification via the maltose-binding protein-tag and finally results in pure OspD1 protein. After extensive attempts crystallization conditions (at 4 °C) were found which enable crystal growth of OspD1. The following improvement of the crystallization condition leads to a native data set of 2.34 Å. Unfortunately, the structure of OspD1 could not be solved within the scope of this thesis. Attempts to solve the structure by molecular replacement were not successful due to the absence of a suitable structural model with sufficient homology. Subsequent extensive efforts using heavy metal derivatives resulted in several datasets, which however, could not be evaluated. The constructed selenomethionine derivative, which in general enables structure elucidation using multi-wavelength anomalous diffraction (MAD), was expressed successfully but could not be purified.

In order to crystallographically characterize the interaction of Spa15 with OspD1, co-crystallization experiments of the complex as well as crystallisation attempts of Spa15 with synthesized OspD1peptides of different length were conducted.

The quantitative studies of protein interactions between Spa15 and OspD1 were performed by microscale thermophoresis. This relatively new method is based on the directed movement of molecules along a temperature gradient, which is influenced in a measurable and concentration-dependent manner by the binding of a

ligand. For interaction of Spa15 with OspD1 a K_D of about 40 nM was determined. Thereafter, various OspD1 peptides were measured with Spa15 to investigate the binding of individual peptides and determine the loss of the binding strength compared to the full-length protein. Furthermore, this method was used to investigate the binding of the MxiE peptides.

In addition, the binding of MxiE and IpaC peptides to the chaperone IpgC was tested by microscale thermophoresis and co-crystallization experiments were conducted with the most potent peptides. Within this thesis, it was possible to find and improve crystallization conditions which results in a dataset with a resolution of 2.6 Å measured at BESSY in Berlin. However, no peptide was found in the refined crystal structure. For the biochemical characterisation of IpgC, the fragment library of the AG Klebe, consisting of over 320 fragments, was screened against IpgC utilizing the thermal shift assay. Within this project, it was investigated whether individual fragments have the potential to bind to IpgC.

1.2 Zusammenfassung

Viele gramnegative Bakterien, so auch *Shigella flexneri*, benutzen einen Typ-III Sekretionsapparat (T3SA), welcher der Sekretion bakterieller Proteine in eukaryotische Zellen dient. Diese Proteine ermöglichen es den Bakterien, die eukaryotischen Zellen zu infizieren. Etwa 20 strukturelle Proteine sowie Chaperone aus dem *mxi-spa*-Operon sind nötig, um den T3SA zu bilden. Die sogenannten „frühen Gene“ des *Shigella*-Virulenzplasmids erhalten Informationen für die Synthese der strukturellen Proteine und Invasine. Sie werden von VirF reguliert. Die „später abgelesenen Gene“ des Plasmids stellen sicher, dass die Wirtszelle möglichst lange am Leben bleibt und werden vom Transkriptionsaktivator MxiE reguliert. Ihre Regulation auf Transkriptionsebene erfolgt durch die Aktivierung des Typ-III-Translokons.

In dieser Arbeit steht der Pathogenitätsfaktor OspD1 im Vordergrund, dessen Wechselwirkung mit dem Chaperon Spa15 sowie mit dem Transkriptionsregulator MxiE biochemisch und kristallographisch untersucht wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein verbessertes Expressionssystem für OspD1 mit einem Maltose-Bindeprotein-Fusionsanteil etabliert, um das Protein rein darzustellen. Kristallisationsversuche zeigten Bedingungen, unter denen es möglich war, OspD1-

Kristalle bei 4 °C wachsen zu lassen. Nach einigen Verbesserungen konnte ein nativer Datensatz mit einer Auflösung von 2,34 Å gesammelt werden. Jedoch war es trotz intensiver Bemühungen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich die Struktur aufzuklären. Versuche, den gesammelten Datensatz mittels *Molecular Replacement* zu lösen, waren aufgrund des Fehlens eines geeigneten Strukturmodells mit ausreichend Homologie nicht erfolgreich. Bei zahlreichen darauffolgenden Versuchen, die Struktur mit Hilfe von Schwermetallderivaten aufzuklären, konnten Datensätze gesammelt werden, welche allerdings nicht auswertbar waren. Ein Selenomethioninderivat, welches die Strukturaufklärung mittels eines *MAD*-Experiments ermöglichen sollte, wurde erfolgreich exprimiert, konnte aber final aufgereinigt werden.

Um die Wechselwirkung von Spa15 mit OspD1 dennoch kristallographisch zu charakterisieren, wurden zum einen Kristallisationsversuche des Komplexes unternommen und zum anderen Peptide unterschiedlicher Länge von OspD1 synthetisiert, deren Sequenz in dem Bereich der Interaktion mit Spa15 liegt.

Die quantitative Untersuchung von Proteinwechselwirkungen zwischen Spa15 und OspD1 erfolgte durch die *Microscale Thermophorese*. Diese relativ neu entwickelte Methode beruht auf der gerichteten Bewegung von Molekülen entlang eines Temperaturgradienten, welche durch das Binden eines Liganden messbar und konzentrationsabhängig beeinflusst wird. Hier gelang es, die Wechselwirkung von Spa15 und OspD1 auf einen K_D von etwa 40 nM zu determinieren. Danach wurden die verschiedenen OspD1-Peptide mit Spa15 vermessen, um zu ermitteln, wie gut die einzelnen Peptide binden und wie hoch der Verlust der Bindungsstärke im Vergleich zum obengenannten K_D Volllängenprotein war.

Desweiteren war es mit dieser Methode möglich, die im Rahmen von Christian Hasewinkels Dissertation angefertigten MxiE-Peptide mit OspD1 zu vermessen und dabei eine Bindung bei einem K_D von 100 nM und 500 nM für zwei MxiE Peptide zu detektieren. Ebenso wurde die Bindung von MxiE- und IpaC-Peptiden an das Chaperon IpgC untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls Kristallisationsversuche mit jeweils den beiden bindungsstärksten Peptiden unternommen. Nach Optimierung der dabei gefundenen Kristallisationsbedingungen wurde ein Datensatz mit einer Auflösung von 2,6 Å erhalten. Nach Lösung der Struktur konnte allerdings kein Peptid in der Kristallstruktur gefunden werden. Zur

weiteren biochemischen Charakterisierung von IpgC wurde die Fragmentbibliothek der AG Klebe (über 360 Fragmente) mit Hilfe des *Thermal Shift Assays* vermessen. Hierbei konnte kein Fragment ermittelt werden, welches zu einer signifikanten thermischen Stabilisierung von IpgC führte.

2 Einleitung

2.1 Shigella als Krankheitserreger

2.1.1 Shigellose

Die Shigellose ist eine bakterielle, entzündliche Erkrankung des Kolons. Synonym werden die Begriffe Bakterienruhr oder Dysenterie verwendet. Die Erreger dieser Erkrankung sind enteropathogene Shigellen. Der Name *Shigella* ist auf den japanischen Bakteriologen Kiyoshi Shiga zurückzuführen, der 1896 erstmals den Erreger der Shigellose *Bacillus dysenteriae* (heute: *S. dysenteriae*, Typ 1) isolierte. Die Shigellose zeigt unter schlechten hygienischen Bedingungen eine hohe Prävalenz. Dies erklärt das häufige Auftreten der Bakterienruhr in Kriegszeiten und warum sie heute in „entwickelten" Ländern allenfalls sporadisch auftaucht, wogegen sie in den sogenannten „Entwicklungsländern" noch immer von Bedeutung ist. Ihr Vorkommen ist dort meist endemisch, wird aber ebenso epidemisch beobachtet. Es besteht weltweit eine jährliche Inzidenz von 150 Millionen Fällen, wovon ca. 95 % in „Entwicklungsländern" auftreten. Ähnlich verhält es sich mit den ungefähr 600.000 Todesfällen pro Jahr (Sansonetti und Phalipon 1999).

2.1.2 Klassifizierung der Shigellen

Shigella gehört als Variante der Spezies *E. coli* der Familie *Enterobacteriaceae* an (Pupo et al. 1997a; Pupo et al. 1997b). Morphologisch sind es gramnegative Stäbchenbakterien. Desweiteren sind Shigellen fakultativ anaerob, unbegeißelt und unbeweglich. Unterscheiden lassen sich anhand biochemischer und serologischer Merkmale vier Serogruppen: *S. boydii, S. dysenteriae, S. flexneri* und *S. sonnei* (Kayser 1998).

2.1.3 Infektion

Die Infektion erfolgt fäkal-oral direkt oder indirekt über kontaminierte Lebensmittel, wie vor allem Trinkwasser. Seltener kommt auch eine Schmierinfektion vor. Als Infektionsquelle und Wirt dienen nur der Mensch und höhere Affen (Kayser 1998). Schon außerordentlich geringe Erregerzahlen zwischen zehn bis 100 Bakterien können zum klinischen Bild der Ruhr führen (DuPont et al. 1989). Im Vergleich dazu ist bei den verwandten, enterotoxischen *E. coli* eine Bakterienanzahl von über 10^4 Zellen für eine Infektion notwendig. Dies ist vor allem durch die hohe Virulenz der

Erreger bedingt. Alle vier Serotypen sind in der Lage, die dysenterische Symptomatik hervorzurufen. Schwere Verläufe werden hauptsächlich durch *S. dysenteriae* verursacht. Nur *S. dysenteriae* Typ 1 produziert das Shiga-Toxin. Dieses inhibiert die eukaryotische Protein-biosynthese durch Bindung an die 60S-Untereinheit des Ribosoms und Spaltung der 28S-rRNA. Dadurch entstehen die Epithelschäden im Kolon und die Dünndarm-diarrhoe (Brown et al. 1980; Middlebrook und Dorland 1984). Das Toxin behindert außerdem die Aufnahme von Elektrolyten, Glucose und Aminosäuren durch die Blockierung ihrer Aufnahmerezeptoren. Für das endemische Auftreten der Ruhr sind in der Regel *S. flexneri* in tropischen Gebieten und *S. sonnei* in hiesigen Breitengraden verantwortlich (Khan et al. 1985; Mhalu et al. 1984; Sansonetti und Phalipon 1999). Infektionen mit *S. sonnei* verlaufen in der Regel mit einer milden Diarrhoe. *S. boydii* wird selten beobachtet. Der Erregernachweis erfolgt kulturell aus dem Stuhl im Rahmen der TPER-Untersuchung (= Typhus, Paratyphus, Enteritis, Ruhr), die neben Shigellen auch die obligat darmpathogenen Salmonellen und Yersinien nachweist.

Die genaue Klassifikation erfolgt wie oben beschrieben serologisch bzw. biochemisch. Im Rahmen einer Shigellose werden unterschiedliche Verlaufsformen beobachtet. So kann die Ruhr als harmlose Durchfallerkrankung auftreten. Ebenso kommen Krankheitsbilder mit massiver Dysenterie und schwersten Komplikationen vor. Die Inkubationszeit der Erkrankung beträgt gewöhnlich zwei bis fünf Tage. Dann zeigen sich die typischen Symptome der Ruhr: blutige, schleimig-eitrige Diarrhoe, Fieber, Tenesmen und Leibschmerzen. Begleitend treten allgemeine Krankheitszeichen wie Müdigkeit, Appetitlosigkeit und Gliederschmerzen auf. In der Regel verläuft die Shigellose nach ca. 14 Tagen selbstlimitierend. Lokale Komplikationen sind das toxische Megakolon, sowie nekrotisierende Kolitis mit Perforationsgefahr. Systemisch werden das hämolytisch-urämische Syndrom, Sepsis, Exsikkose und Enzephalopathie als komplizierend erwähnt (Goren et al. 1992; Koster et al. 1978; Raghupathy et al. 1978). Diese sind selten und kommen hauptsächlich bei Kindern vor. 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 (http://www.biberach.de/fileadmin/user_upload/ Gesundheitsamt /Files/Ruhr_Shigellose_neu.pdf, https://www.rki.de/ DE /Content /Infekt/EpidBull/ Merkblaetter/Ratgeber_Shigellose.html Stand 30.02.2016.).

Bei der Therapie ist differenziert zu verfahren. So sind bei leichten Verläufen Allgemeinmaßnahmen wie Flüssigkeitssubstitution und Diät anzuwenden. Nur bei schwerer Erkrankung, Immunsuppression oder epi- bzw. endemischem Auftreten sollte eine antibiotische Therapie erfolgen.

Die Prävention besteht aus Händewaschen, sowie allgemeinen Hygienemaßnahmen. Bislang ist kein Impfstoff zum Schutz vor Shigellen-Infektionen zugelassen und nach klinisch induzierten Infektionen wurden nur Immunitäten gegen jeweils einen Serotyp aufgebaut. Nach §7 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) ist der direkte oder indirekte Nachweis von Shigellen meldepflichtig, im Besonderen nach §6 IfSG für alle Personen, die gemäß §42 IfSG Personen des öffentlichen Lebens sind oder Personen, die mit Lebensmitteln in Berührung kommen.

2.2 Molekulare Prozesse der Invasion

2.2.1 Invasion durch die Epithelzellen

Die Symptomatik der Bakterienruhr wird primär durch die Invasion von *Shigella* in Kolonepithelzellen verursacht (Labrec et al. 1964). Die Epithelzellen des Dünndarms sind von einer Schicht aus Mucinen bedeckt. Mucine sind komplexe Glycoproteine, deren Kohlenhydratanteile durch O-Glycosylierung an ein Peptidrückgrat gekoppelt sind. Sophie Nutten und Kollegen (Nutten et al. 2002) erhielten im Rahmen ihrer Forschung Hinweise, dass die Mucine eine physikalische Barriere darstellen, welche den Shigellen den Zugang zu den Darmepithelzellen erschwert. Die Penetration der Epithelzellen erfolgt deshalb nicht von der apikalen, sondern von der basolateralen Seite aus (Mounier et al. 1992).

2.2.2 Invasion über die M-Zellen

Shigella benutzt M-Zellen als Eintrittspforte zur Überwindung der Epithelbarriere (Sansonetti et al. 1996). M-Zellen sind Bestandteil des follikelassoziierten Epithels und spielen eine wichtige immunologische Rolle: Sie nehmen Makromoleküle (zum Beispiel Antigene) und Mikroorganismen aus dem Darmlumen auf, transportieren sie durch das Epithel, übergeben sie an Makrophagen, B-Lymphozyten oder dendritische Zellen und induzieren so eine spezifische, lokale Immunabwehr (Neutra et al. 1996). Die Aufnahme der Mikroorganismen erfolgt via Phagozytose. Obwohl innerhalb der Phagosomen in den M-Zellen ein saures Milieu vorherrschen kann, erreichen die

meisten Pathogene die basale Zellseite lebendig (Neutra et al. 1996). Dort befinden sich die Shigellen teilweise frei beweglich in der Submukosa und können die Kolonzellen direkt invadieren. Ein anderer Teil von *Shigella* wird direkt durch residente Makrophagen phagozytiert (Sansonetti et al. 1996).

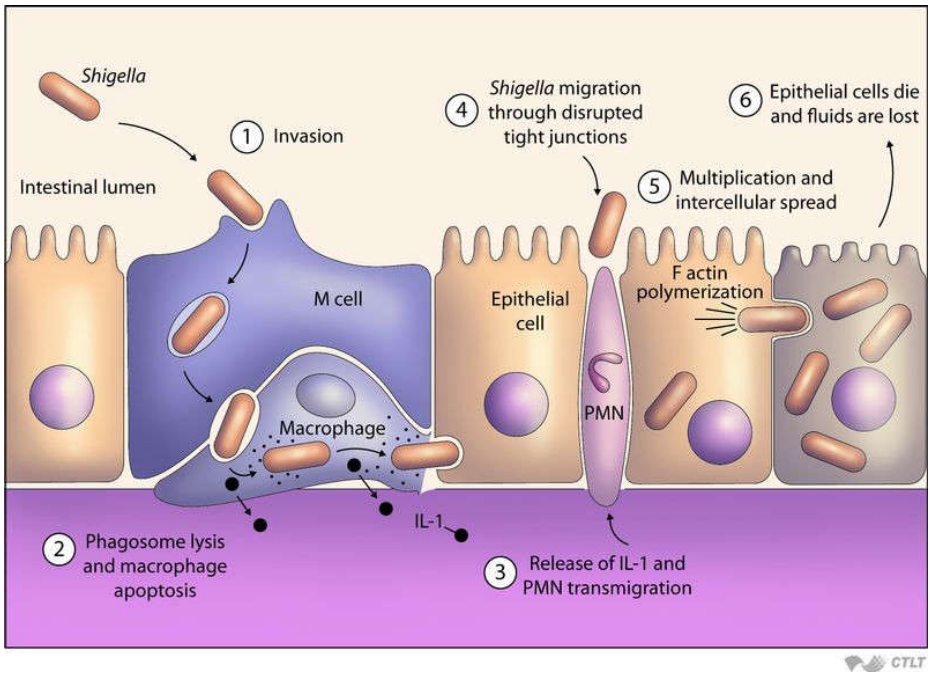


Abb. 1: *Shigella*-Infektionsschema: (1) Invasion der Shigellen über die M-Zellen (*M cell*) der Payerischen Plaques. (2) Aufnahme der Bakterien durch die Makrophagen. Dort leiten sie deren Apoptose ein. (3) Durch die Apoptose wird die Aktivierung von Interleukin-1β sowie weiterer proinflammatorischer Cytokine bewirkt. (4) Nach Einwanderung von Granulozyten (*PMN)* und der damit verbundenen Auflösung der Zell-Zell-Verbindungen, erfolgt eine direkte Infektion des Epithels. (5) *Shigella* sezerniert Invasionsproteine und gelangt so in die Wirtszelle. Dort entkommt es aus einer Vakuole und bewegt sich durch die Polymerisation (*F actin polymerization*) von Aktin fort. (6) Die Epithelzellen (*Epithelial cell*) sterben ab und ein Großteil des Epithels wird zerstört (übernommen aus Epidemiology of Infectious Disease http://ocw.jhsph.edu, Stand 30.02.2015).

Durch bakterielle Sekretion von IpaB wird die Apoptose der Makrophagen bedingt, wodurch sich *Shigella* der lytischen Verdauung entzieht (Zychlinsky et al. 1992). IpaB aktiviert die Caspase-1 (Casp-1), welche auch Interleukin-1β *converting enzyme (Ice)* genannt wird (Zychlinsky et al. 1994). Casp-1 / Ice ermöglicht die Aktivierung der inaktiven Cytokine Interleukin-1β (IL-1β) und Interleukin-18 (IL-18). Durch IL-1β werden die polymorphkernigen Leukozyten dann in die Zell-zwischenräume freigesetzt (Black et al. 1988; Kostura et al. 1989). Nachdem *Shigella* die Barriere des Darmepithels überwunden und den Intrazellulärraum

erreicht hat, werden eine Reihe proinflammatorischer Cytokine, wie IL-8, aktiviert. IL-8 lockt polymorphkernige Leukozyten an und fördert so die lokale Entzündung (Jung et al. 1995). Es konnte gezeigt werden, dass durch Blockade von IL-1-Rezeptoren bzw. der Leukozytenmigration das Ausmaß sowohl der bakteriellen Invasion als auch der Gewebszerstörung vermindert wird. Dies deutet darauf hin, dass die Entzündungsreaktion des Wirts in der Anfangsphase der Erkrankung nicht zur Bekämpfung des Pathogens beiträgt, sondern im Gegenteil dessen Ausbreitung unterstützt und für einen großen Teil der Gewebsläsionen unmittelbar verantwortlich ist (Perdomo et al. 1994; Sansonetti et al. 1995).

2.2.3 Ausbreitung und Beweglichkeit

Die primäre Invasion bewältigt *Shigella* mit einem Phagozytose-ähnlichen Mechanismus (Clerc und Sansonetti 1987), denn aufgrund seiner Unbeweglichkeit ist der Erreger auf passive intra- und interzelluläre Transportmöglichkeiten angewiesen, um ins Zellinnere zu gelangen.

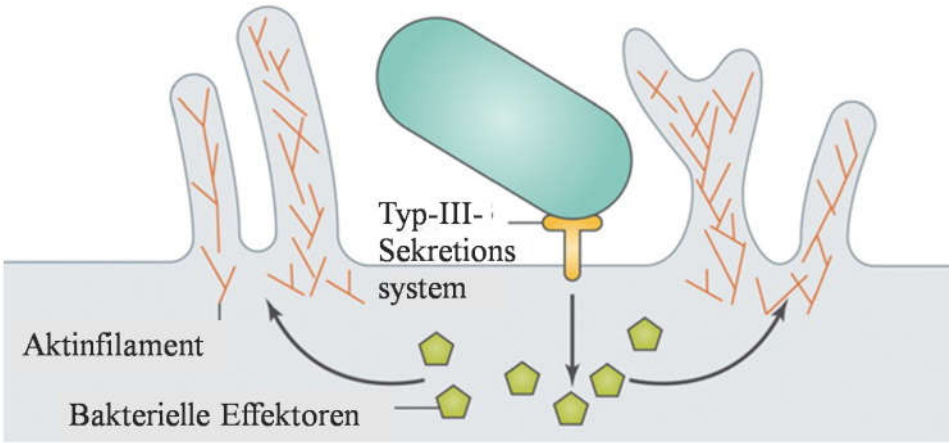


Abb. 2: *Shigella* benutzt Aktin und Mikrotubuli zur Invasion. Ausgelöst wird dies durch Injektion von bakteriellen Effektorproteinen, welche mit Hilfe des Typ III-Sekretionsapparats (TTSA) über die Wirtzellenmembran in die Wirtszelle gelangen. Dies führt zur Aktin-abhängigen Makropinozytose, bei der Membranfalten das Bakterium in einer Vakuole einschließen (modifiziert nach Haglund und Welch 2011) .

Um das Bakterium herum wachsen „pfeilerartige“ Protrusionen mehrere Mikrometer über das Zelloberflächenniveau hinaus. Ihr Gerüst wird von F-Aktin-Bündeln gebildet, welche mit ihrem Ende in Richtung der Protrusionsspitzen

orientiert sind (Adam et al. 1995; Clerc und Sansonetti 1987). Da die Membran durch die Aktinbündel stellenweise angehoben wird, bildet sich eine blütenähnliche Struktur aus, die das Pathogen weit überragt. Membranfalten erstrecken sich von „Pfeiler“ zu „Pfeiler“, während das Bakterium am Grund des „Blütenkelchs“ liegt. Unterhalb des Bakteriums führt die weitere Ansammlung von F-Aktin dagegen zur Ausbildung einer in Richtung des Zellinneren orientierten „sprinklerartigen“ Filamentstruktur. Durch die Verschmelzung beider freier Enden wird das Bakterium schließlich unter Vakuolenbildung internalisiert (Adam et al. 1995). Die Vesikel werden in 90 % der Fälle 15 min. später lysiert. Nachdem sich die Bakterien frei im Zytoplasma befinden, setzt ihre starke Vermehrung ein.

Shigella, im extrazellulären Medium unbeweglich, kann im Zytoplasma der Wirtszelle zelluläre Komponenten zur Fortbewegung nutzen: So führt in Fibroblasten eine zentripetale „organellenartige“ Bewegung von *Shigella* entlang von Stressfilamenten zur Bildung von Mikrokolonien um den Zellkern (Vasselon et al. 1991). Stressfasern sind vorübergehend gebildete Bündel aus Aktin und Myosin-II, die mit einem Ende in einem sogenannten Fokalkontakt bzw. Adhäsionsplaque innerhalb der Plasmamembran inserieren.

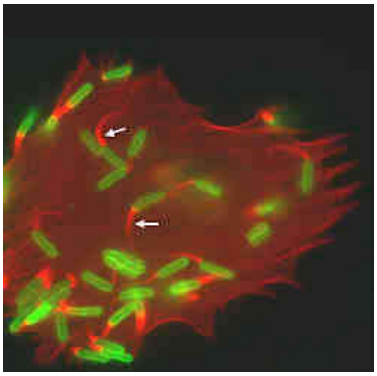


Abb. 3: Der Aktinschweif. Shigellen (grün), welche sich durch Aktin-Polymerisation in der Wirtszelle (rot) fortbewegen. Die Filamente (weiße Pfeile) werden von einem Pol ausgehend gebildet (entnommen von http://www.innovations-report.de/bilder_neu/4970_shigellen.jpg, Stand 25.02.2015).

Eine weitere, von Stressfilamenten unabhängige Form der Beweglichkeit wird durch Induktion von Aktinfilamenten an einem Pol der Bakterien ermöglicht. Dabei entsteht eine kometenschweifähnliche F-Aktin-Struktur (siehe Abb. 3).

Während der Elongation der Aktinfilamente werden diese von Wirtszell-Fibrin dicht gebündelt, was den zylindrischen Aktinschwanz mutmaßlich kontrahiert. Nachdem die innere Oberfläche der Wirtszelle erreicht wird, erfolgt die Invasion benachbarter Epithelzellen durch eine schlauchförmige Vorstülpung. Diese Vorstülpung reicht weit in die benachbarte Zelle und wird von ihr vollständig aufgenommen, d.h. endocytiert (Bernardini et al. 1989; Prevost et al. 1992). Auch aus diesen doppelwandigen Vakuolen kann sich *Shigella* durch Lyse der Membranen befreien, sich im Zytoplasma vermehren und von dort aus weitere Zellen kolonisieren (Kadurugamuwa et al. 1991). Die Lyse des Phagosoms wird durch die Invasine IpaB (High et al. 1992; Geyter et al. 2000), IpaC (Geyter et al. 1997) und IpaD (Menard et al. 1993) bewirkt. IpaB und IpaC bilden beim Eintritt der Bakterien in die Wirtszelle eine Pore, durch die weitere bakterielle Proteine gelangen. Für die Insertation dieser Pore in der Wirtsmembran ist IpaD auf noch ungeklärte Weise verantwortlich (Picking et al. 2005).

Das bakterielle Protein IcsA vermittelt die intra- und interzelluläre Ausbreitung von *Shigella* (Allaoui et al. 1992a; Bernardini et al. 1989; Goldberg et al. 1993) und bildet somit die molekulare Grundlage der effizienten Ausbreitung innerhalb größerer Epithelzellverbände. Für die primäre Invasion von Epithelzellen ist es jedoch nicht essentiell.

2.3 Typ-III-Translokon

2.3.1 Proteinsekretionssysteme in gramnegativen Bakterien

Die bakterielle Proteinsekretion bezeichnet die Ausscheidung diverser Proteine (wie spezielle Enzyme oder auch bakterielle Toxine) in das sie umgebende Medium. Der Transport durch die Cytoplasmamembran erfolgt auf unterschiedliche Weise, abhängig vom Sec-System (Madigan et al. 2013).

Gramnegative Bakterien besitzen sechs Hauptgruppen von Proteinsekretions-systemen, die Proteine über die innere und äußere Bakterienmembran in das extrazelluläre Medium sekretieren (Abb. 4, (Thanassi und Hultgren 2000).

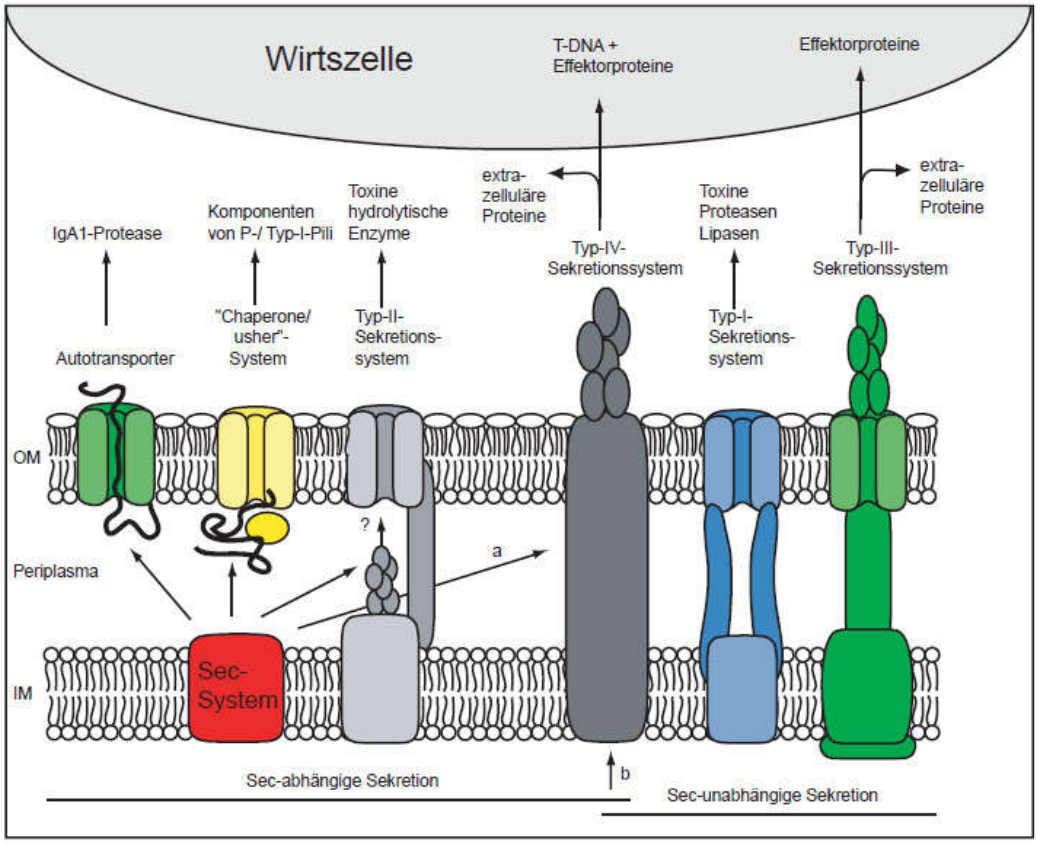


Abb. 4: Schematische Darstellung von Proteinsekretionsapparaten in gramnegativen Bakterien. Exemplarisch aufgeführte sekretierte und translozierte Substrate einzelner Sekretionsapparate. Zu ihnen zählen Autotransporter, wie die IgA1-Protease von *Neisseria gonorrhoeae* (Henderson et al. 1998). „Chaperone/usher"-Sekretionssysteme bestehen aus einem periplasmatischen Chaperon und einem Protein in der äußeren Membran, dem sogenannten „*usher*", das den Transportkanal bildet (Thanassi DG. et al. 1998). In *E. coli* dienen sie z.B. der Bildung von P- und Typ-I-Pili. In komplexeren Typ-II-Sekretionssystemen, die häufig dem Export von extrazellulären Enzymen und Toxinen dienen, erfolgt der Proteintransport über die äußere Membran durch einen Kanalkomplex, der von einem Mitglied der Sekretin-Proteinfamilie gebildet wird (Sandkvist 2001a). Vier mit der inneren Membran assoziierte Proteine bilden möglicherweise eine Pilus-ähnliche Struktur (Nunn 1999). Typ-IV-Sekretion kann sowohl unter Beteiligung des Sec-Systems (a) als auch Sec-unabhängig (b), wie z.B. bei der Translokation von T-(Transfer)-DNA durch *Agrobacterium tumefaciens*, erfolgen. Das Sec-System ist nicht an Typ-I- und Typ-III-Sekretionssystemen beteiligt. Typ-I-Sekretionssysteme sekretieren Toxine, Proteasen oder Lipasen (Binet R1 et al. 1997), während durch Typ-III-Sekretionssysteme u.a. Effektorproteine direkt in die Wirtszelle transloziert werden (Hueck 1998). Einige Sekretionsapparate sind mit Pilus-ähnlichen Strukturen assoziiert (Carolin Berger 2005), (Abbildung modifiziert nach Büttner und Bonas 2002).

Vier dieser Gruppen sind vom Sec-System abhängig, welches Proteine nach Abspaltung eines N-terminalen Sekretionssignals über die innere Bakterienmembran transportiert (Driessen et al. 1998). Die Substrate des Typ-III-Sekretionsapparats

(TTSA) besitzen kein abspaltbares Signalpeptid und werden unabhängig vom Sec-System und damit wahrscheinlich ohne das Auftreten periplasmatischer Intermediate sekretiert (Hueck 1998). Der TTSA ermöglicht die Proteinsekretion in das extrazelluläre Medium sowie die Proteintranslokation über die eukaryontische Wirtszellmembran (Hueck 1998).

Am Aufbau des membranständigen Sekretionsapparates sind in etwa 20 Proteine beteiligt. Das kanalbildende Protein in der äußeren Membran gehört zur Familie der Sekretine und ist außerdem homolog zu den äußeren Membranproteinen von Typ-II-Sekretionssystemen (Sandkvist 2001b).

Einige der inneren Membranproteine weisen dagegen Homologien zu Komponenten des Flagellumexportapparates auf, der ebenfalls zu den TTSA gezählt wird (He 1998; Hueck 1998; Aizawa 2001; Macnab 1999; Young und Young 2002). Die TTSA wurden erstmals in dem Bakterium *Yersinia spp.* identifiziert (Michiels et al. 1990) und sind seither in vielen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien charakterisiert worden (Cornelis und van Gijsegem 2000).

2.3.2 Struktureller Aufbau des Typ-III-Translokons

Die für die Ausbildung des invasiven Phänotyps essentiellen Gene liegen auf dem sogenannten Virulenzplasmid in einem Abschnitt von 31 kb Länge, der die *ipa*-, *mxi*- und *spa*-Operons enthält (Menard et al. 1993).

Die *mxi*- und *spa*-Genprodukte bilden den Typ-III-Sekretionsapparat, über den Effektoren innerhalb von Minuten in das Zytoplasma der Wirtszelle sezerniert werden können (Bahrani et al. 1997). Das experimentelle Ausschalten einzelner Komponenten des Sekretionsapparats geht mit dem Verlust der Invasivität von *Shigella* einher (Allaoui et al. 1992b, 1993b). Das ATP-abhängige sogenannte Typ-III- oder kontaktabhängige Translokon (Buchrieser et al. 2000; Menard et al. 1994a) besteht aus mindestens zwanzig Komponenten. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass sich das Translokon aus drei Teilen zusammensetzt (siehe Abb. 5).

Es besteht zunächst aus einer externen ca. 50 nm langen, helikalen Nadel, die einen Kanal mit einem Durchmesser von ca. 2 nm enthält und einen Außendurchmesser von ca. 7 nm aufweist (Cordes et al. 2003). Daran schließt sich eine Basis oder Halsdomäne an, die wiederum aus zwei Ringen besteht, welche über

eine zentrale stäbchenähnliche Struktur, der Nadel, verbunden sind (10 nm lang, 21 nm breit) (Hodgkinson et al. 2009). Abgeschlossen wird das Translokon durch eine knollenähnliche Struktur, welche in das Bakterienzytoplasma reicht (27 nm lang, 44 nm breit) und als C-Ring bezeichnet wird. Dieser besteht unter anderem aus Export-Proteinen, welche die Substrate erkennen und deren Translokation durch die beiden anderen Teile bewirken (Blocker et al. 1999; Tamano et al. 2000).

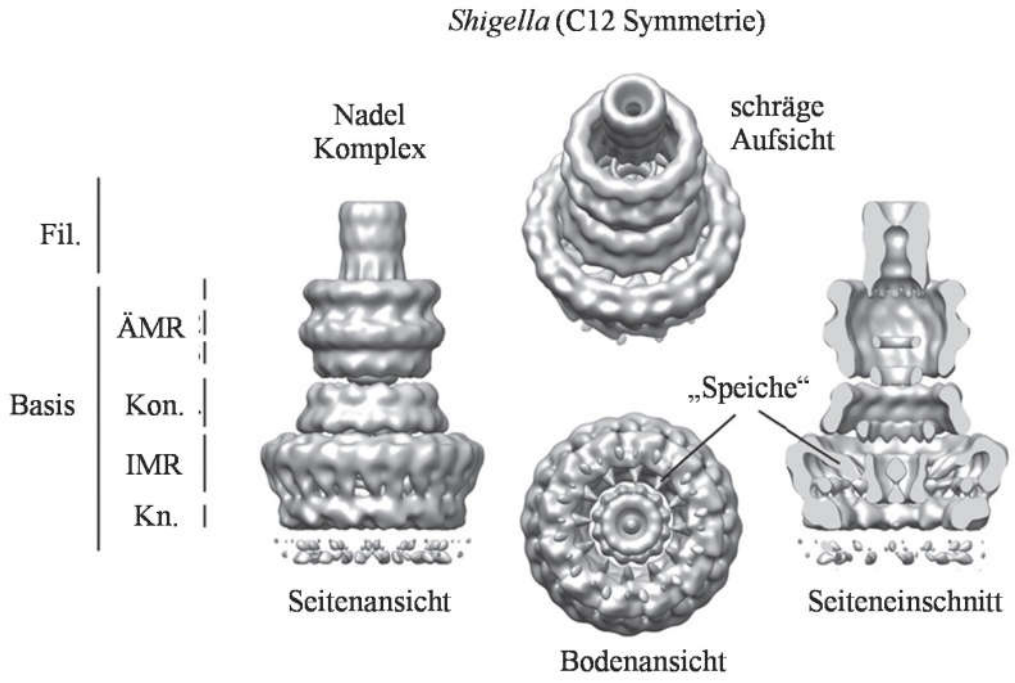


Abb. 5: Typ-III-Translokon von *Shigella* (Elektronenmikroskopie**):** Die Abbildung zeigt den Aufbau des Typ-III-Translokons bestehend aus Nadelfilament und Basis. Fil. = Nadelfilament, ÄMR = äußerer Membranring, IMR = Innerer Membranring, Kon.= Konnektor, Kn. = Knollenähnliche Struktur oder C-Ring (modizifiert nach Kosarewicz et al. 2012, Accession code: EMD-1617).

2.3.3 Regulation der Sekretion des Typ-III-Translokons bei *S. flexneri*

Die Sekretion erfolgt durch einen Zweischrittmechanismus. Im ersten Schritt reichern sich die Ipa-Proteine an der Oberfläche an. Anschließend findet ein durch den Bakterium-Wirtszell-Kontakt ausgelöstes Entlassen dieser Proteine ins externe Medium statt (Menard et al. 1994b). Durch den wirtseigenen Hyaluronanrezeptor CD44 und dessen Wechselwirkung mit IpaB wird die Sekretion von IpaA bewirkt (Skoudy et al. 1999; Skoudy et al. 2000). Diesen Rezeptor findet man nur auf der

basolateralen Seite der Epithelzellen, was die Polarität der Eintrittsregion der Shigellen erklären könnte. Die Sekretion scheint jedoch auch bei Membranbereichen zu funktionieren, die keinen CD44-Rezeptor haben, aber einen hohen Anteil an Cholesterol oder Shingolipiden besitzen. Mit hoher Affinität binden jeweils sechs Moleküle IpaB direkt an ein Cholesterol (Hayward et al. 2005).

Die im bakteriellen Zytoplasma gespeicherten Ipa-Invasine einschließlich der Chaperone werden nach Kontaktaktivierung durch etwaige Zielzellen oder experimentell durch den Farbstoff Kongorot freigesetzt (Bahrani et al. 1997). Unterschieden werden IpaA, IpaB, IpaC, IpaD und IpaH mit Molekulargewichten von 36,5 kDa (IpaH) bis 70 kDa (IpaA).

Die genaue Charakterisierung der Ipa-Invasine ergab, dass außer IpaA und IpaH alle für die Zellinvasion von *Shigella* erforderlich sind (High et al. 1992; Menard et al. 1993; Toyotome et al. 2001; Venkatesan et al. 1996). Eine regulierende Funktion im Kontext der Sekretion wird für die Invasine IpaB und IpaD vermutet (Menard et al. 1996). IpaB und IpaC bilden nach ihrer Sekretion mittels ihrer hydrophoben Molekülanteile einen Komplex in der Zielmembran. Dieser enthält eine ca. 25 Å große Pore, über die weitere Effektorproteine in die Zielzelle eingeschleust werden (Blocker et al. 1999). Das IpaD-Protein ist involviert in die Regulation der Sekretion von IpaB und IpaC und die optimale Insertion des IpaB-IpaC-Komplexes in die Zellmembran. IpaD wird außerdem unmittelbar nach Aktivierung des Typ-III-Sekretionsapparates ausgeschüttet und konnte mittels Immunofluoreszenz-experimenten nur in der Nadelspitze des Typ-III-Sekretionsapparates nachgewiesen werden (Espina et al. 2006; Picking et al. 2005). Das Invasin IpaA gelangt sehr schnell in die Wirtszelle und überführt das wirtseigene Protein Vinculin in seine aktive Form. Damit wird α-Actinin zur Quervernetzung von Aktinfilamenten rekrutiert.

2.4 Virulenzgene von *Shigella*

2.4.1 Virusplasmid

Die Penetration des Epithels und damit die Invasion hängt wie die anschließende Vermehrung von einem nicht konjugativen, ca. 140 MDa (230 kbp) großen Plasmid ab. Dieses kodiert für die meisten der Virulenzfaktoren und besteht zu etwa einem

Drittel aus Insertionssequenz-(IS)-Elementen (Buchrieser et al. 2000). Auf einem 31 kbp Abschnitt des Plasmids sind die Gene kodiert, die für den Eintritt der Shigellen in die Wirtszelle notwendig sind. Diese Region wird deswegen auch oft als „Eintrittsregion“ bezeichnet. Stämme, die dieses Plasmid verloren haben, sind apathogen (Sansonetti et al. 1982).

2.4.2 Regulation der Virulenzgene

Die *ipa*-, *ics-, ipg-, mxi*-, *spa*- und weitere für die Bakterieninvasion erforderliche, sogenannten frühe Gene benötigen den Transkriptionsregulator VirB für ihre Expression (siehe Abb. 6, gelb dargestellt). Die Expression des *virB*-Gens wiederum ist auf den Transkriptionsaktivator VirF angewiesen.

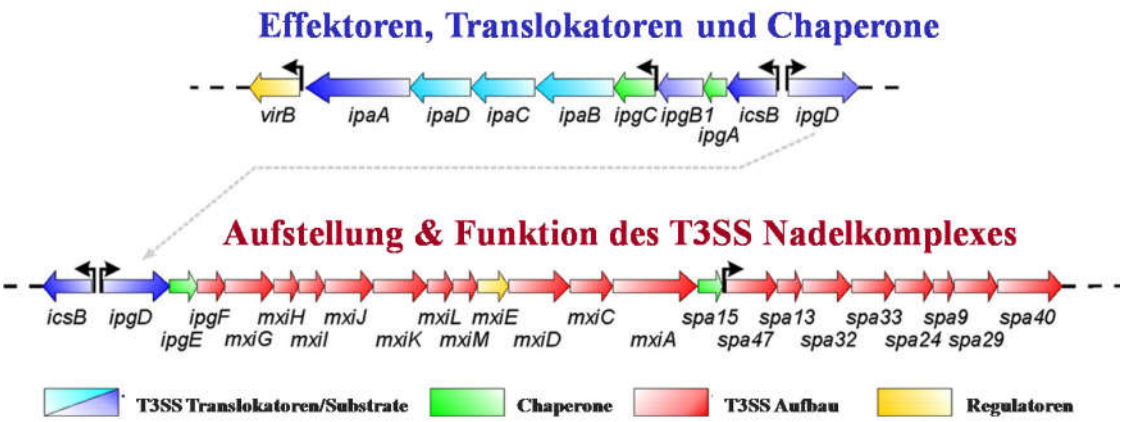


Abb. 6: Karte der 31kb großen “Eintrittsregion“ des *S. flexneri*-Virulenzplasmid pWR100. Die abgebildeten Gene zeigen unterschiedliche Zugehörigkeiten: Mxi-Spa TTSS (rot), Translokatoren und Effektor-Proteine (blau), Chaperone (grün) und regulatorische Proteine (gelb) (übernommen aus Schroeder und Hilbi 2008).

Die Invasionsgene werden temperatur-, pH- und osmoreguliert transkribiert (Allaoui et al. 1993a; Andrews et al. 1991; Day, W. A., Jr. und Maurelli 2001; Hromockyj und Maurelli 1989; Hromockyj et al. 1992; Hromockyj und Maurelli 1989; Maurelli et al. 1984; Murphy und Payne 2007; Prosseda et al. 2004; Tobe et al. 1991; Watanabe et al. 1990).

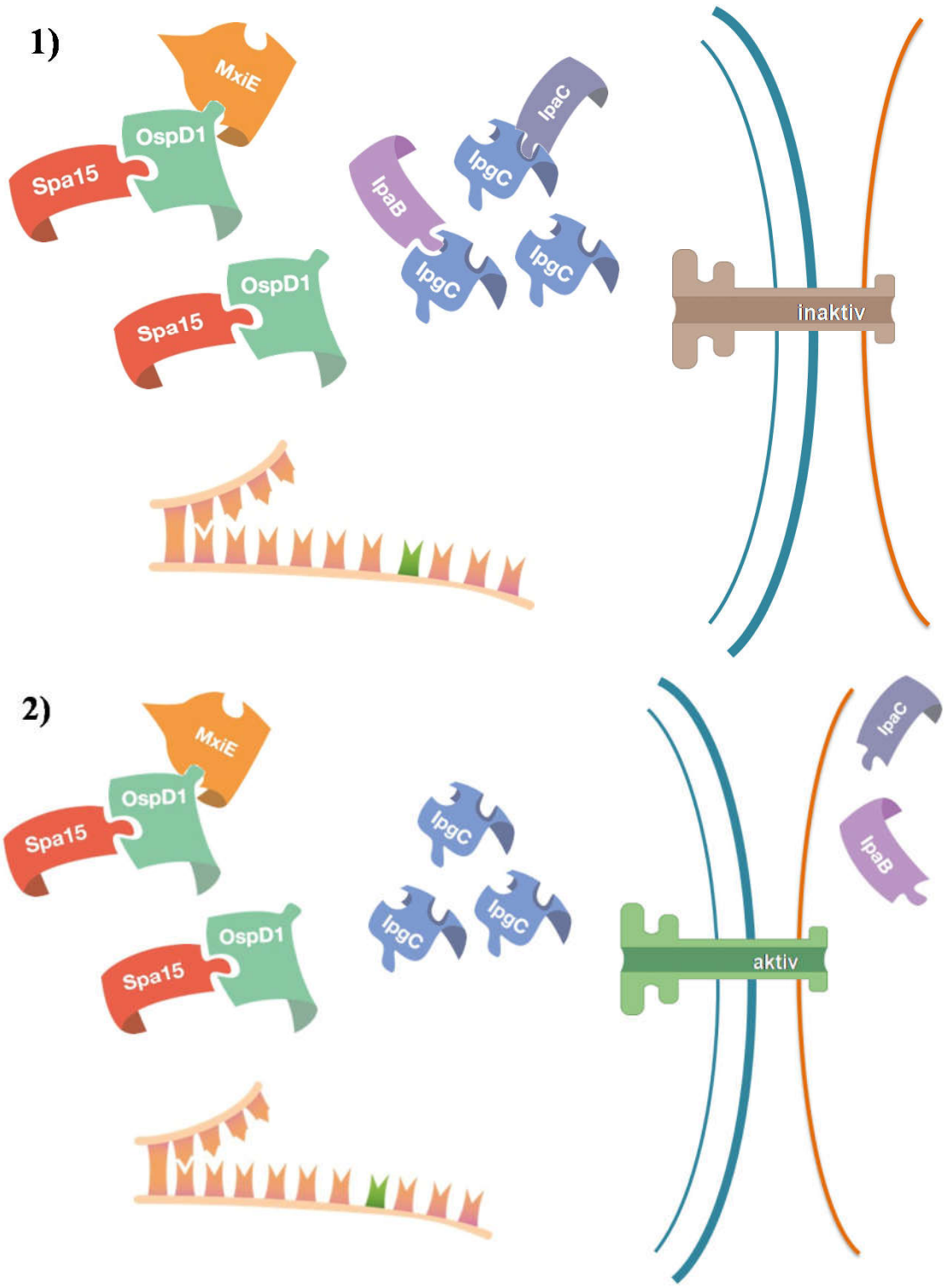


Abb. 7 Teil 1: Schema der Transkriptionsregulation durch Aktivierung des Typ-III-Translokons. 1) IpaB und IpaC sind mit IpgC assoziiert, der OspD1-Spa15-Komplex mit MxiE 2) Sekretion von IpaB und IpaC, IpgC liegt frei vor. Die Zellmembran und die äußere Membran von *Shigella* sind in blauen Bögen dargestellt, die Zellmembran der Zielzelle als ein oranger Bogen (modifiziert nach(Parsot et al. 2005).

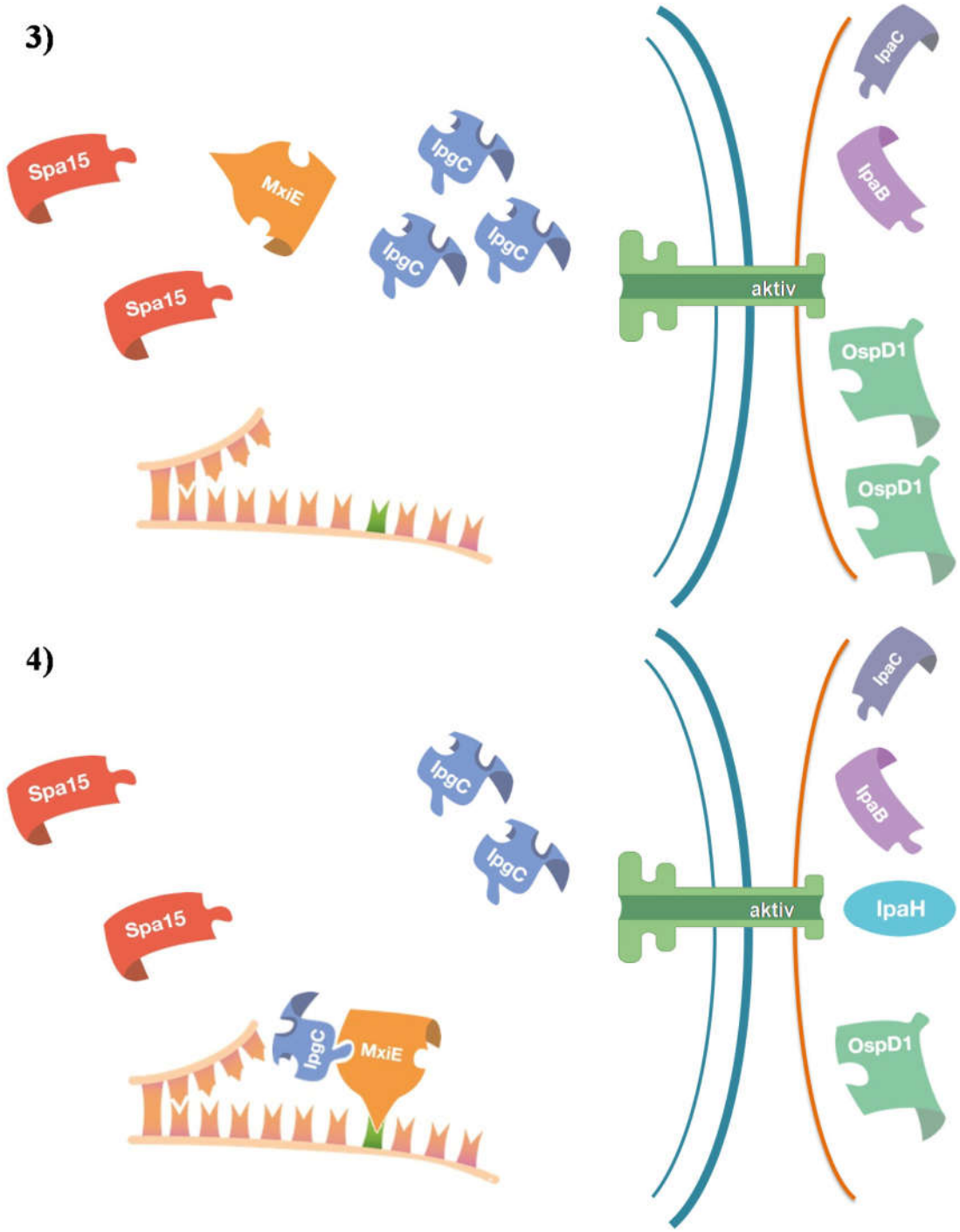


Abb. 7 Teil 2: Schema der Transkriptionsregulation durch Aktivierung des Typ-III-Translokons. 3) Sekretion von OspD1, Aktivierung des freien MxiE durch IpgC. 4) Produktion und Sekretion von IpaH. Die Zellmembran und die äußere Membran von *Shigella* sind in blauen Bögen dargestellt, die Zellmembran der Zielzelle als ein oranger Bogen (modifiziert nach Parsot et al. 2005).

Die Transkription des *virA*-Gens sowie der *osp*-*ipaH*-Gene, welche für sogenannte späte oder "intrazelluläre Effektoren" kodieren, erfolgt unabhängig von der Temperatur. Die Produkte dieser Gene greifen in verschiedene Signaltransduktions-kaskaden der Wirtszelle ein, was letztlich zu einer Modulierung der durch *Shigella* hervorgerufenen Immunantwort führt. Andere steigern die Vitalität der Wirtszelle, indem sie den Zellzyklus anhalten bzw. die Apoptose verhindern. Wieder andere Genprodukte destabilisieren das Netzwerk aus Mikrotubuli, um die intrazelluläre Bewegung der Bakterien zu erleichtern.

Die Expression dieser „späten“ Gene ist von einem aktiven T3SA abhängig. Dies ist darauf zurückzuführen, dass MxiE, ein Transkriptionsaktivator der oben genannten Gene, auf IpgC als Coaktivator angewiesen ist (siehe Abb. 7). IpgC ist jedoch, solange das Typ-III-Translokon inaktiv ist, im bakteriellen Zytoplasma fest an IpaB und IpaC gebunden. Erst wenn IpaB und IpaC sezerniert werden, wird IpgC frei für die Interaktion mit MxiE (Mavris et al. 2002). Als zweiter Sensor der Typ-III-Translokon-Aktivität dient OspD1.

2.4.3 Der Antiaktivator OspD1

Das *ospD1*-Gen kodiert für einen Antiaktivator des Transkriptionsfaktors MxiE. OspD1 ist ein durch das Chaperon Spa15 stabilisierter Sensor der Typ-III-Translokonaktivität. Im inaktiven Zustand des T3SA bindet OspD1 an MxiE, wodurch dessen Bindung an entsprechende DNA-Abschnitte verhindert wird. Erst nach Aktivierung des Typ-III-Translokationsapparates wird OspD1 sezerniert und gibt MxiE frei, so dass dieses mit Hilfe des Coaktivators IpgC als Transkriptionsaktivator fungiert (siehe Abb. 7). MxiE bindet über ein 17-bp langes Motiv (MxiE-Box), das jeweils mit der 35er-Region überlappt, an die Promoterregionen der aktivierten Gene (Mavris et al. 2002). OspD1 besteht aus 225 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 24,8 kDa (Parsot et al. 2005). La Gall fand in einer *Microarray*-Analyse heraus, dass es wie viele andere Gene, ausschließlich durch (VirF/)VirB reguliert wird. Diese Regulation ist abhängig von Temperatur, pH und Osmose (Le Gall et al. 2005).

2.4.4 Das Chaperon Spa15

Das Chaperon Spa15 besteht aus 133 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 15,1 kDa. Spa15 bindet an IpaA, IpgB1, OspC3, OspD1 und wahrscheinlich auch an OspB als sogenanntes TTSS-Chaperon (Sasakawa et al. 1993; Andrews und Maurelli 1992). Spa15 bildet ein funktionelles Dimer. Die Sekretion im Zytoplasma gespeicherter IpaA-Moleküle erfordert die Assoziation mit dem Chaperon Spa15. Dabei wird vermutet, dass IpaA in Abwesenheit von Spa15 im Zytoplasma prämature lösliche Komplexe bildet, die die Sekretion verhindern. Die Interaktionsstelle von IpaA mit Spa15 befindet sich in der Region zwischen den Aminosäureresten 263 und 365 (Page et al. 2002). Die Kristallstruktur von Spa15 (siehe Abb. 8) wurde 2004 gelöst (van Eerde et al. 2004).

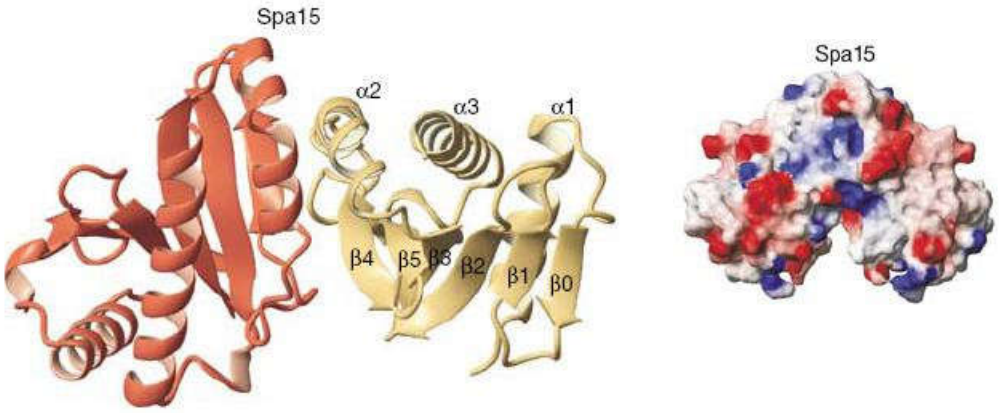


Abb. 8: Die Kristallstrukturen des Spa15-Dimers und des Spa15 Monomers aus *S. flexneri*. Der linke Teil der Abbildung zeigt Spa15 als Dimer in der Bänderdarstellung. Jede Untereinheit besitzt drei α–Helices und ein Faltblatt aus sechs β–Strängen. Rechts ist die Oberflächenstruktur eines Monomers dargestellt (modifiziert nach van Eerde et al. 2004).

Bei TTS-Chaperonen werden zwei Gruppen unterschieden. Klasse I ist spezifisch für Effektorproteine und Klasse II für Translokatorproteine. Klasse I wird noch einmal in zwei Untergruppen geteilt. Während die Untergruppe I-A nur ein Substrat binden kann, kann I-B mehrere, unterschiedliche Effektorproteine binden (Parsot et al. 2003). Costa und Kollegen (Costa et al. 2012) konnten eine Chaperon-Bindedomäne-Sequenz in Typ-III-Effektoren identifizieren, die Klasse I-B Chaperone wie Spa15 erkennen und binden. Diese konservierte, gefundene Sequenz

lautet [(L/**M**/I/F)$_1$XXX(**I**/V)$_5$XX(I/**V**)$_8$X(**N**)$_{10}$]. Die Interaktion von Spa15 und OspD1 mit trunkierten Varianten von OspD1 wurde bereits von der Verfasserin untersucht (Jüngel 2010). In dieser Untersuchung konnte der essentielle Bindebereich von OspD1 mit Spa15 auf die Aminosäuren 16-32 eingegrenzt werden.

2.4.5 Der Coaktivator IpgC

IpgC nimmt im Cytoplasma die Rolle eines Chaperons ein, indem es an IpaB und IpaC bindet und diese stabiliert (Menard et al. 1994b). Die Stöchiometrie des heterodimeren Komplexes wird mit 1:1 oder auch 2:2 angegeben (Birket et al. 2007). Lunelli und Kollegen (Lunelli et al. 2009) bestimmten 2009 sowohl die Apo-Struktur des Proteins als auch im Komplex mit einem Peptid aus der Sequenz von IpaB (AS 51-72, wovon nur 63-72 in der Struktur von Abb. 9 zu sehen sind).

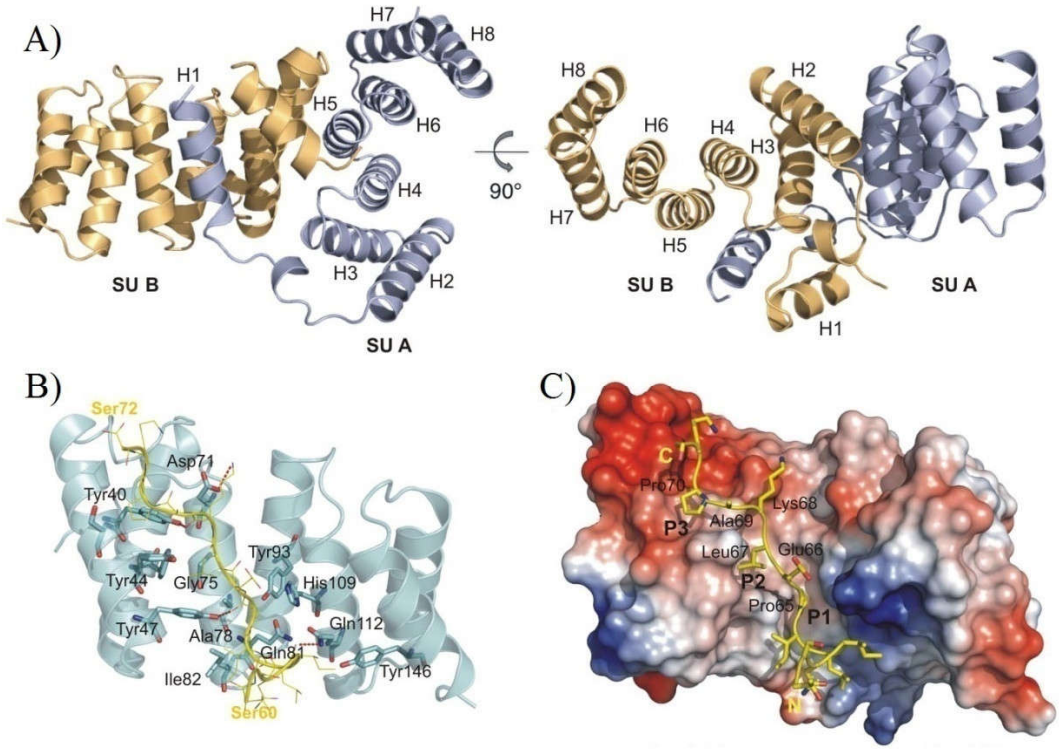


Abb. 9: Die Kristallstruktur des IpgC aus *S. flexneri*. A) *Ribbon*-Darstellung der Apostruktur von IpgC als Dimer, Untereinheiten sind braun (SUB) und blau (SUA) eingefärbt, Helices entsprechend beschriftet. B) Interaktion der katalytischen Bindedomäne von IpaB (gelb) und IpgC (hellblau). C) Die Oberflächenrepräsentation von IpgC, die Oberfläche ist entsprechend dem ohne Wasser und Ligand kalkulierten elektrostatischen Potential gefärbt (blau für positiv, rot für negative Ladung). Das IpaB-Peptid (Reste 65-70) ist in gelb dargestellt (entnommen aus Lunelli et al. 2009).

IpgC liegt in der Kristallstruktur als nicht-symmetrisches Homodimer vor, in dem eine Art „*Helix-Swapping*“ (=Helixtausch) zu beobachten ist. Pro Untereinheit hat ein IpaB-Peptid gebunden. IpgC ist ein Klasse-II-Chaperon und besteht aus einem Tetratrico-Peptidmotiv (TRP-Motiv), welches eine relativ kurze Sequenz des Bindepartners bindet. TPR-Motive spielen eine Rolle bei einer Reihe von Zellprozessen, in denen sie Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Zum Beispiel greifen sie in den Zellzyklus ein und sind an der Regulation der Transkription sowie des Proteintransports beteiligt (Kreppel et al. 1997).

Ebenso fungiert IpgC als Coaktivator von MxiE. Solange das Typ-III-Translokon nicht aktiv ist, ist IpgC fest mit IpaB und IpaC assoziiert und wird erst frei, wenn diese sezerniert wurden (siehe Abb. 7). Es ist davon auszugehen, dass IpgC an die N-terminale Domäne von MxiE bindet und damit eine Konformationsänderung auslöst, so dass MxiE an die entsprechenden Promotor-regionen binden kann. Die Interaktion zwischen MxiE und IpgC gilt als nicht sehr stabil (Mavris et al. 2002). Trotzdem gelang es Pilonieta und Munson (Pilonieta und Munson 2008), den durch Coexpression in *E.coli* gewonnenen MxiE-IpgC-Komplex aufzureinigen. Die Reinigung gelang ebenso mit einem Maltose-Bindeprotein-MxiE(Δ1-44)-IpgC-Komplex, was dafür spricht, dass die 44 *C*-terminalen Aminosäuren von MxiE für die Bindung an IpgC nicht essentiell sind.

2.4.6 Zielsetzung der Arbeit

Entzündliche Darmerkrankungen, die durch Bakterien verursacht werden, stellen ein gesundheitliches Problem dar, welches weltweit auftritt. Vor allem in „Entwicklungsländern“ und in Gebieten mit schlechter Wasserversorgung kommt es immer wieder zu vielen Erkrankungen und einer hohen Sterblichkeitsrate. Shigellen, als Erreger der Bakterienruhr, gehören hierbei zu den weitverbreitesten Krankheitserregern. Wie bei anderen Mikroben breiten sich auch Antibiotika-resistenzen bei Shigellabakterien aus, zuletzt gab es im April 2015 einen größeren Ausbruch von multi-resistenten *S. sonnei* in den USA (Bowen, http://www.cdc.gov /shigella, 21.02.2016). Für die Entwicklung neuer Medikamente ist die Kenntnis über Pathogenitätsfaktoren von *Shigella*, deren Rolle im Infektionsgeschehen sowie ihren molekularen Aufbau essentiell.

In dieser Arbeit steht der Pathogenitätsfaktor OspD1 im Vordergrund, dessen Wechselwirkungen mit dem Chaperon Spa15 sowie mit dem Transkriptionsregulator MxiE biochemisch und kristallographisch untersucht werden sollen. In einer vorausgehenden Masterarbeit der Verfasserin konnte bereits gezeigt werden, dass in OspD1 ein Bereich zwischen Aminosäure 15 und 32 für die Interaktion mit Spa15 essentiell ist.

Der genaue Bereich der Interaktion soll in weiteren Versuchen aufgeklärt und die Affinität zwischen den beiden Proteinen quantifiziert werden. Die quantitative Untersuchung von Proteinwechselwirkungen soll dabei vorwiegend durch die "Microscale-Thermophorese" erfolgen. Darüber hinaus wird angestrebt, die bisher unbekannte Kristallstruktur von OspD1, eines Komplexes aus OspD1 und Spa15 und/oder eines Komplexes aus OspD1 und MxiE zu bestimmen.

Ebenso soll das Chaperon IpgC mit den bindungsstärksten MixE- und IpaC-Peptiden, deren Bindung gegenüber IpgC im Rahmen der Dissertation von Christian Hasewinkel (Hasewinkel 2012b) mittels *Microscale Thermophorese* untersucht wurde, co-kristallisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, stammten die verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deutschland, Taufkirchen), AppliChem (Deutschland, Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co (Deutschland, Karlsruhe), Merck KGaA (Deutschland, Darmstadt) und Fluka Chemie AG (Schweiz, Buchs).

Tabelle 1: Chemikalien

Name	***Hersteller***
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (30 % /0,8 %)	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ampicillin	Roth
Bis (2-hydroxyethyl)amino-tris (hydroxymethyl)methan (BisTris)	Roth
Rinderalbumin *(BSA, Bovine Serum Albumin)*	Roth
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Merck
Chloramphenicol	Roth
Coomassie Brillant Blue R250	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Essigsäure 100 %	Roth
Ethanol 96 %	Roth
EDTA	Merck
Glasperlen 2,85-3,3mm	Roth
Glycin	Roth
Glycerin 100 %	Merck
Guanidin HCl	Roth
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Roth

Name	*Hersteller*
Imidazol	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol	Fisher Scientific UK
3-Morpholin-propanylsulfonsäure (MOPS)	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydroxid	Roth
Pepton aus Casein	Roth
Rotiphorese Gel 30	Roth
Salzsäure 37 %	Riedel-deHaën
Tris(hydroxymethylaminomethan)	Roth
TEMED	Roth

3.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2 : Verwendete Klonierungs- und Expressions- *E. coli* -Stämme

Stämme E. coli	*Genotyp*	*Referenz*
BL21 Codon plus (DE3) RIL	*E. coli* B F^- *ompT hsdS*(r_B^- m_B^-) *dcm*$^+$ Tet^R *gal* λ(DE3) *endA* Hte [*argU ileY leuW* Cam^R]	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
SoluBL21™	*E.coli* F^- *ompT hsdS* (r_B^- m_B^-) *gal dcm*$^+$ (DE3)	Genlantis (San Diego, USA)
XL2-Blue Ultracompentent Cells	*E. coli recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI*^{q} ZΔ*M15* Tn*10* (Tet^R) Amy Cam^R]	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
B834(DE3)pLysS	*E. coli* F^- *ompT hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) *gal dcm*$^+$ *met* (DE3) pLys [Cam^R]	Novagen Merck (Darmstadt, Deutschland)

3.1.2 XL2-Blue

Dieser *E.coli*-Stamm bietet durch seine gute Transformationsrate und durch seine stark verringerte Endonukleaseaktivität (*endA*) eine gute Grundlage für Plasmidvervielfältigung. Der Abbau des Plasmids durch das *Eco*K-Endonukleasesystem wird durch die *hsdR*17-Mutation verhindert. Die verringerte Aktivität von Rekombinationsenzymen (*rec*A) erhöht die Stabilität des Inserts. Ein *Blue-White-Screening* kann zur Erfolgskontrolle nach der Rekombination von DNA durchgeführt werden, da ein lac_qZΔM15-Gen vorhanden ist. XL2-Blue besitzt außerdem eine Tetracyclinresistenz und ist bis zu einer Konzentration von 40 µg/ml gegen Chloramphenicol resistent, jedoch sensitiv ab einer Konzentration von 100 µg/ml (Greener et al. 1997). Zur Kultivierung wurde nur die Chloramphenicoltoleranz benutzt, da Chloramphenicol im Labor vorrätig war.

3.1.3 BL 21 CodonPlus (DE3)-RIL

Dieser Stamm ist ein Derivat von *E. coli* B (Greener et al. 1997), dem aber sowohl die ATP-abhängige Lon-Protease als auch die OmpT-Protease der äußeren Membran fehlen. Dadurch kann der Abbau von rekombinantem Protein weitgehend vermieden werden. Durch den *hte*-Phänotyp wird eine Erhöhung der Transformationsrate erreicht, wobei zusätzlich durch die Deaktivierung von Endonuklease I (*end*A) der Abbau von rekombinanter DNA verhindert wird. Der Stamm ist tetracyclinresistent (Weiner, M. P., Anderson, C., Jerpseth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B. et al. 1994). Bei der Expression von heterologen Genen kann die Anhäufung seltener Codons zum Abbruch der Translation führen. Durch die zusätzlichen tRNAs, welche spezifisch seltene Codons erkennen, wird dieses Problem behoben. Die BL21-Stämme sind besonders 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. Der Teil des Prophagen DE3 kodiert für den Laktose-Repressor (*lac*I) und die T7-RNA-Polymerase, welche unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors stehen. Dieser Promotor wird durch IPTG induziert. 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 (Studier und Moffatt 1986).

3.1.4 SoluBL21™

Viele Proteine können mit den gängigen *E.coli*-Derivaten nicht in ausreichend löslicher Form exprimiert werden. Sie liegen unlöslich (*inclusion bodies*) vor. Der mutierte BL21 (DE)-Stamm SoluBL21 unterscheidet sich vom oben erwähnten BL21 CodonPlus durch nicht charakterisierte Mutationen, welche ihn in die Lage versetzen, unlösliche Proteine in komplett löslicher oder teilweise löslicher Form zu exprimieren (Patent: AMS Biotechnology, San Diego).

3.1.5 B834 (DE3) pLysS

Der methioninauxotrophe Stamm *E. coli* B834 (DE3) pLysS (Novagen) wurde aus dem Elternstamm BL21 entwickelt. Dieser Stamm wird für die Expression von selenomethioninmarkiertem Protein verwendet (Wood 1966). Damit ist eine Markierung von Zielproteinen mit 35S-Methionin und Selenomethionin für Kristallographie möglich (Leahy et al. 1992). Dieser Stamm besitzt ebenfalls das Plasmid pLysS, welches neben einer Chloramphenicolresistenz ein Gen für die Expression von Lysozym, das einen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase darstellt, enthält. Nach Induktion der Zellen wird dadurch auch Lysozym exprimiert, das den Zellaufschluss erleichtert.

3.1.6 Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Plasmid-Vektoren

Plasmid	***Beschreibung***	***Referenz***
pGEX-6Pmod.	4,98 kb, Expressionsvektor mit N-terminalem GST-*tag*, (T7, *lacI*), 1 MCS	GE Healthcare (UK) modifiziert durch Clemens Grimm, Dissertation
pGEX-4Tmod.	Expressionsvektor mit N-terminalem GST-*tag*, (T7, *lacI*), 1 MCS	pGEX-6P-mod. modifiziert durch Christian Hasewinkel, Dissertation

Plasmid	***Beschreibung***	***Referenz***
pGEX-4Tmod.-Spa15	Expressionsvektor mit N-terminalem GST-*tag* und Thrombin-Schnittstelle (T7, *lacI*), 1 MCS mit Spa15-Sequenz	Christian Hasewinkel, Dissertation
pGEX-4Tmod.-IpgCΔ152-155	Expressionsvektor mit N-terminalem GST-*tag* und Thrombin-Schnittstelle (T7, *lacI*), 1 MCS mit IpgC-Sequenz	Christian Hasewinkel, Dissertation
pHW1	Expressionsvektor mit N-terminalem GST-*tag* und C-terminalem His-*tag* (8-fach), Thrombin-Schnittstelle (T7, *lacI*), 1 MCS	pGEX-4T-mod. modifiziert durch Christian Hasewinkel, Dissertation
pIVEX MBP Fusion Vector	Expressiomsvektor mit N-terminalem MBP-Tag, (T7, *lacI*), 1 MCS	Roche (Basel, Schweiz)
pHW3	Expressionsvektor mit N-terminalem MBP-*tag* und C-terminalem His-*tag* (8-fach), Thrombin-Schnittstelle (T7, *lacI*), 1 MCS	pHW1 modifiziert durch Christian Hasewinkel, Dissertation
pHW3-OspD1-Δ1-15/Δ222-225	Expressionsvektor mit N-terminalem MBP-*tag* und C-terminalem His-*tag* (8-fach), Thrombin-Schnittstelle (T7, *lacI*), 1 MCS mit trunkierter OspD1-Variante	diese Arbeit
pHW3-OspD1-Δ1-32/Δ222-225	Expressionsvektor mit N-terminalem MBP-*tag* und C-terminalem His-*tag* (8-fach), Thrombin-Schnittstelle (T7, *lacI*), 1 MCS mit trunkierter OspD1-Variante	diese Arbeit
pHW3-OspD1-Δ1-80/Δ222-225	Expressionsvektor mit N-terminalem MBP-*tag* und C-terminalem His-*tag* (8-fach), Thrombin-Schnittstelle (T7, *lacI*), 1 MCS mit trunkierter OspD1-Variante	diese Arbeit

Der Vektor pGEX-6P-mod. basiert auf pGEX-6P der Firma GE-Healthcare. Dieser wurde in der Dissertation von Clemens Grimm durch eine *Nde*I-Schnittstelle am Anfang der *multiple cloning site* (MCS) erweitert (Grimm 2001). Die Glutathion-S-Transferase ermöglicht als Fusionsprotein eine erleichterte Aufreinigung durch Affinitätschromatographie und verbessert häufig die Löslichkeit. Für die Dissertation von Christian Hasewinkel wurde der pGEX-6P-mod. weiter verändert und statt mit

einer PreScission™-Schnittstelle mit einer Thrombin-Schnittstelle ausgestattet, so dass das wesentlich preisgünstigere Thrombin zum Schneiden des GST-*tags* eingesetzt werden konnte (=pGEX-4T-mod. (Hasewinkel 2012b). Um die Anzahl der zusätzlichen *N*-terminalen Aminosäuren, welche durch die Klonierung mit der *Bam*HI-Schnittstelle entstehen, gering zu halten, wurde ein weiteres Konstrukt (pHW1, (Hasewinkel 2012b) mit einen Glycinrest am *N*-Terminus kloniert. Dieser kann durch die Verkürzung besser zur Kristallisation eingesetzt werden. Vorausgegangene Studien der Verfasserin hatten vor allem für das OspD1 gezeigt, dass die Translation des Zielgens teilweise nicht vollständig stattfand, was neben dem Volllängenprotein auch *C*-terminale Abbruchfragmente zur Folge hatte.

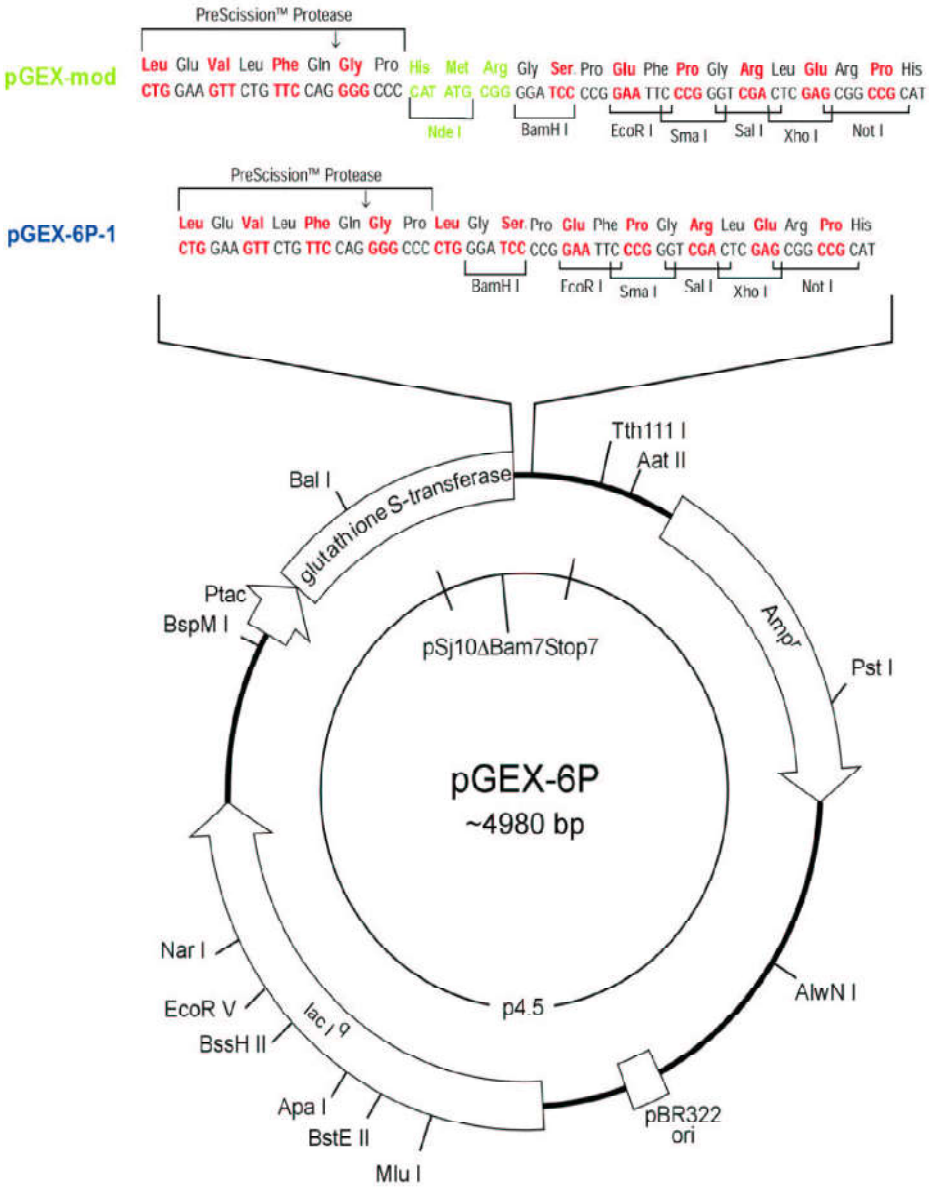


Abb. 10: Vektorkarte von pGEX-6P-mod. mit zusätzlicher *Nde*I-Schnittstelle (Grimm, 2001).

Deswegen wurde in das Konstrukt unmittelbar nach der *MCS* die Sequenz eines 8x His-*tags* eingebracht. Dies ermöglichte die Produktion von Fusionsproteinen, die zusätzlich zum *N*-terminalen GST-*tag*, *C*-terminal einen 8x His-*tag* haben. Die Fusionsproteine können in dieser Form von den Abbruchfragmenten getrennt werden. Außerdem wurden weitere Plasmide konstruiert, welche statt des GST-*tags* ein Strep-*tag* (pHW2) oder ein Maltose-Bindeprotein-*tag* (pHW3) enthalten (Hasewinkel 2012b). Die Maltose-Bindeprotein-Fusionsproteine (MBP-Fusionsproteine) binden an eine Amylose-Matrix und werden

mit 10 mM Maltose eluiert. Der MBP-*tag* erhöht die Löslichkeit des Zielproteins. (Nallamsetty und Waugh 2007).

Die Vektoren besitzen zur selektiven und starken Expression von Genen einen T7-Promotor (Studier und Moffatt 1986). Der T7-Promotor wird durch die T7-RNA-Polymerase erkannt, die durch die DE3-lysogenen Wirtstämme exprimiert wird. Die *MCS* dieser Vektoren enthält für verschiedene Restriktionsendonukleasen Schnittstellen. Über diese Schnittstellen können Gensequenzen inseriert werden, deren Expression unter der Kontrolle des vektoreigenen T7-Promotors bzw. des nachgeschalteten LacI-Operators steht. Dabei wird die Transkription durch den Plasmid-kodierten Lac-Repressor, der an den Operator bindet, reprimiert. Bindung von IPTG an den Lac-Repressor hebt die reprimierende Wirkung auf, so dass zunächst die Expression des T7-RNA-Polymerase-Gens und anschließend die des in den Vektor inserierten Gens induziert wird. Zur Selektion enthalten die Vektoren außerdem eine Antibiotikumresistenz für Ampicillin.

3.1.7 Medien

Um Plasmide zu gewinnen, wurden die verwendeten Stämme aerob auf Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) kultiviert (Sambrook et al. 1989). Alle Medien wurden autoklaviert. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurden Antibiotika zugesetzt, wenn diese zur Selektion benötigt wurden.

Tabelle 4: Nährmedien für *E. coli*

Medium	***Zusammensetzung (pro l)***
lysogeny broth (LB)	10 g Pepton aus Casein 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 900 ml H_2O mit HCl/NaOH auf pH 7,0 einstellen, H_2O ad 1l
LB-Agarplatten	LB-Medium 15 g Agar (vor Einstellen des pH-Wertes zugeben)

Medium	*Zusammensetzung (pro l)*
TYM-Medium	20 g Pepton aus Casein
	5 g Hefeextrakt
	100 mM NaCl
	10 mM $MgCl_2$
	900 ml H_2O
	mit HCl/NaOH auf pH 7,0 einstellen H_2O ad 1l
SeMet-Medium	100 ml 10x MMA (s.u.)
	2 ml $MgSO_4$ (1M)
	4 ml $CaCl_2$ (100mg/ml)
	4 ml $FeSO_4$ (100 mg/ml)
	10 ml Aminosäure-Mix I (4 mg/ml) (s.u.)
	10 ml Aminosäure-Mix II (4 mg/ml) (s.u.)
	1 ml Vitamin-Mix (1 mg/ml) (s.u.)
	1 ml Basen- Mix (1 mg/ml) (s.u.)
	20 ml Glucose 20 %
	1 ml Ampicillin 100 mg/ml
	8 ml L-Selenomethionin-Lösung (5 mg/ml)
	900 ml H_2O
	mit HCl/NaOH auf pH 7,0 einstellen, H_2O ad 1l
10x MMA	105 g $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$
	45 g KH_2PO_4
	10 g NaCitrat
	5 g $(NH_4)_2SO_4$
	900 ml H_2O
	mit HCl/NaOH auf pH 7,4 einstellen, H_2O ad 1l

Medium	*Zusammensetzung (pro l)*
Aminosäure-Mix I (je 4 mg/ml)	Glycin Glutamin Glutaminsäure Asparaginsäure Asparagin Alanin Isoleucin Leucin Valin Cystein Serin Threonin Arginin Lysin Prolin Histidin
Aminosäure-Mix II (je 4mg/ml)	Tyrosin Phenylalanin Tryptophan
Vitamin-Mix (je 1mg/ml)	Riboflavin (Vitamin. B2) Niacinamid (Vitamin B3) Pyridoxinmonohydrochlorid (Vitamin B6) Thiamin (Vitamin B1)
Basen- Mix (je 1mg/ml)	Adenin Guanin Thymin Uracil

Aminosäure-Mix I und II, Vitamin-Mix, Basen-Mix, $MgSO_4$, $CaCl_2$ und $FeSO_4$ sowie Antibiotika und IPTG wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und sterilfiltriert. 10x MMA, LB-Medium, LB-Agar, TYM-Medium und H_2O für SeMet-Medium wurden autoklaviert.

Tabelle 5: Antibiotika und Expressionszusätze

Zusatz	*Konzentration der Stammlösungen*	*Endkonzentration*
Ampicillin-Natriumsalz (in dH_2O)	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol (in EtOH)	32 mg/ml	32 µg/ml
IPTG (in dH_2O)	1 M	1 mM

3.1.8 Lösungen und Puffer

Im Rahmen dieser Dissertation kamen verschiedenste Lösungen und Puffer zum Einsatz. Diese Lösungen und Puffer wurden je nach Masse mit der Feinwaage Type 404/13 (Sauter) oder der Waage Typ 572/45 (Kern) einwogen und mit Reinstwasser aus der Entsalzungsanlage Purelab Plus (USF Elga) aufgefüllt. Zum Lösen wurden Magnetrührer (IKA RH basic 2) von IKA benutzt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit dem pH-Meter Five EASY™ von Mettler Toledo. Alle für die FPLC verwendeten Puffer wurden sterilfiltriert, um Verunreinigungen und Partikel zu entfernen (Porengröße 0,2 µm, Schleicher und Schuell, Dassel). Die Lagerung erfolgte je nach Stabilität bei Raumtemperatur, 4 °C oder -20 °C. Zum Sterilisieren wurde ein Autoklav T-Line (Fedegari Autoclavi Spa) benutzt. Lösungen wurden in Zentrifugenröhrchen (Falcon ®) 15 / 50 ml der Firma Greiner oder Sarstedt aufbewahrt, bei größeren Volumina in Glasflaschen der Firma Schott.

Sämtliche Einwaagen von Chemikalien für verwendete Lösungen und Puffer wurden in destilliertem Wasser gelöst, soweit nicht anders angegeben.

Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Puffer bei der Aufreinigung und in Assays

Lösungen	*Zusammensetzung*
BisTris-Puffer	20 mM BisTris einstellen mit NaOH auf pH 6,0
BisTris-Puffer+S	20 mM BisTris, 1M NaCl einstellen mit NaOH auf pH 6,0
Guanidinchlorid-Lösung	6 M Guanidinium-HCl

Lösungen	***Zusammensetzung***
EDTA-Puffer Ni-Säule	10 mM EDTA
Natriumhydroxid-Lösung	0,5 M NaOH oder 1,0 M NaOH
Ni+-Puffer	190 mM NaCl 10 mM Na_2HPO_4 2,8 mM KCl 1,7 mM KH_2PO_4 500 mM Imidazol einstellen mit NaOH auf pH 7,5
Maltose-Puffer	190 mM NaCl 10 mM Na_2HPO_4 2,8 mM KCl 1,7 mM KH_2PO_4 100 mM Maltose einstellen mit NaOH auf pH 7,3
PBS-Puffer	140 mM NaCl 10 mM Na_2HPO_4 1,7 mM KH_2PO_4 einstellen mit NaOH auf pH 7,3
PBS-Puffer+S (Spa15 und IpgC)	500 mM (IpgC) oder 300 mM (Spa15) NaCl 10 mM Na_2HPO_4 2,8 mM KCl 1,7 mM KH_2PO_4 einstellen mit NaOH auf pH 7,3
PBS-Puffer+S* (OspD1-Varianten)	190 mM NaCl 10 mM Na_2HPO_4 2,8 mM KCl 1,7 mM KH_2PO_4 einstellen mit NaOH auf pH 7,3

Lösungen	*Zusammensetzung*
QSeph-Puffer	20 mM Tris einstellen mit HCl auf pH 7,0
QSeph+S-Puffer	20 mM Tris 300 mM NaCl einstellen mit HCl auf pH 7,0
Tris-Puffer pH 7,0	50 mM Tris-HCl 100 mM NaCl einstellen mit HCl auf pH 7,0
HEPES-Puffer	10 mM HEPES 500 mM NaCl 3 mM DTT einstellen mit NaOH auf pH 7,5
TfbI-Lösung	2,9 % (w/v) Essigsäure 50 mM $MnCl_2$ 100 mM KCl 75 mM $CaCl_2$ 15 % (v/v) Glycerin einstellen mit NaOH auf pH 5,8
TfbII-Lösung	10 mM NaMOPS 10 mM KCl 75 mM $CaCl_2$ 15 % (v/v) Glycerin einstellen mit NaOH auf pH 5,8
SEC 6.0 (Spa15)	10 mM MES 150 mM NaCl 3 mM DTT einstellen mit NaOH auf pH 6,0

Lösungen	*Zusammensetzung*
SEC 7.5 (IpgC)	10 mM HEPES 150 mM NaCl 3 mM DTT einstellen mit NaOH auf pH 7,5
SEC 8.0 (OspD1-Varianten)	20 mM Tris 300 mM NaCl einstellen mit NaOH auf pH 8,0
Thermophorese *Labeling*-Puffer	50 mM HEPES 150 mM NaCl einstellen mit NaOH auf pH 8,0
Thermophorese Messpuffer	50 mM HEPES 150 mM NaCl 0.01 % Triton X 100 2.5 % DMSO einstellen mit NaOH auf pH 8,0

3.1.9 Molekulargewichtstandards, Restriktionsenzyme und Probenpuffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Molekulargewichtstandards (*Marker*) für Agarose-Gele und SDS-PAGE sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Pufferlösungen für die SDS-PAGE sind Tabelle 8 zu entnehmen. Sämtliche Einwaagen von Chemikalien für verwendete Lösungen und Puffer wurden in destilliertem Wasser gelöst, soweit nicht anders angegeben.

Tabelle 7: Puffer und Marker für die Gelelektrophorese (Bilder aus https://www.lifetechnologies.com, Stand 03.03.2015)

Puffer	*Zusammensetzung*
50x TAE-Puffer	2 M Tris 50 mM EDTA mit Essigsäure auf pH 7,8

Puffer	***Zusammensetzung***
6x MassRuler™ DNA Loading Dye (Thermo Scientific)	10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 0,03 % Bromphenolblau 60 % Glycerol 60 mM EDTA
Restriktionsendonukleasen von Thermo Scientific Konzentration soweit nicht anders angegeben 10 U/µl	*Bam*HI *Dpn*I *Nde*I *Not*I *Hin*dIII *Eco*RI *Xho*I
Thermo Scientific Ligase	DNA-T4-Ligase
DNA Polymerase BioCat	Phusion Hot Start High-Fidelity (2 U /µl)
Enzymreaktionspuffer Thermo Scientific 10xO –Puffer	0,5 mM Tris-HCl pH 7,5 0,1 mM $MgCl_2$ 1 M NaCl 1 g/ml BSA
10x T4 Ligase-Puffer	0,4 M Tris-HCl pH 7,8 0,1 M $MagCl_2$ 0,1 M DTT 5 mM ATP
10x R-Puffer	0,1 mM Tris-HCl pH 8,5 0,1 mM $MgCl_2$ 1 M KCl 1 g/ml BSA
	25 mM ATP, GTP, TTP, CTP

Puffer	*Zusammensetzung*
dNTP-Mix	eingestellt mit NaOH auf pH 7,0
5x HiFi-Puffer	10 mM Mg^{2+}

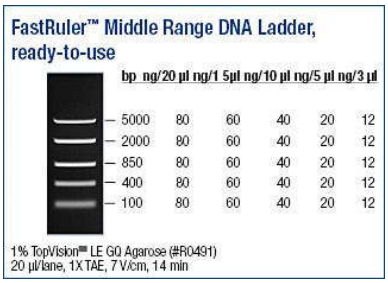
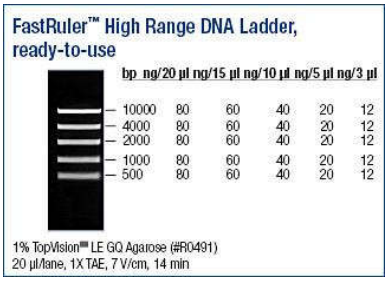
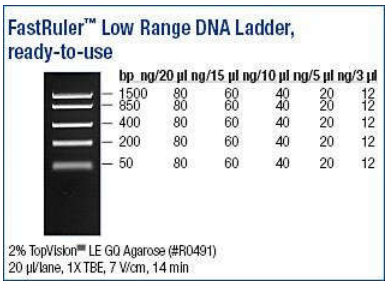
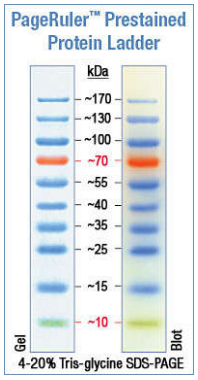
Marker	*Zusammensetzung*
FastRuler™ Middle Range DNA Ladder (Thermo Scientific)  FastRuler™ Middle Range DNA Ladder, ready-to-use bp ng/20 µl ng/1 5µl ng/10 µl ng/5 µl ng/3 µl 5000 80 60 40 20 12 2000 80 60 40 20 12 850 80 60 40 20 12 400 80 60 40 20 12 100 80 60 40 20 12 1% TopVision™ LE GQ Agarose (#R0491) 20 µl/lane, 1X TAE, 7 V/cm, 14 min	10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 10 mM EDTA 0,005 % Bromphenolblau 10 % Glycerol
FastRuler™ High Range DNA Ladder (Thermo Scientific)  FastRuler™ High Range DNA Ladder, ready-to-use bp ng/20 µl ng/15 µl ng/10 µl ng/5 µl ng/3 µl 10000 80 60 40 20 12 4000 80 60 40 20 12 2000 80 60 40 20 12 1000 80 60 40 20 12 500 80 60 40 20 12 1% TopVision™ LE GQ Agarose (#R0491) 20 µl/lane, 1X TAE, 7 V/cm, 14 min	10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 10 mM EDTA 0,005 % Bromphenolblau 10 % Glycerol
FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific)  FastRuler™ Low Range DNA Ladder, ready-to-use bp ng/20 µl ng/15 µl ng/10 µl ng/5 µl ng/3 µl 1500 80 60 40 20 12 850 80 60 40 20 12 400 80 60 40 20 12 200 80 60 40 20 12 50 80 60 40 20 12 2% TopVision™ LE GQ Agarose (#R0491) 20 µl/lane, 1X TBE, 7 V/cm, 14 min	10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 10 mM EDTA 0,005 % Bromphenolblau 10 % Glycerol

Tabelle 8: Lösungen (https://www.lifetechnologies.com) für SDS-PAGE

Puffer	***Zusammensetzung***
4x SDS-Probenpuffer	250 mM 0,5 M Tris-Cl, pH 6,8 8 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerin 0,04 % (w/v) Bromphenolblau 200 mM DTT einstellen mit HCl auf pH 6,8
SDS-Laufpuffer aus Rotiphorese 10x SDS-PAGE Puffer (Firma Carl Roth)	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin und 1 % (g/v) SDS in destilliertem, deionisiertem Wasser
APS-Lösung	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat ad 10 ml bidest. H_2O
Coomassie Brillant Blue G 250-Färbelösung (pro Liter)	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,05 % (w/v) *Coomassie Brillant Blue* G 250
Entfärbelösung (pro Liter)	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) 	0,1-0,2 mg/ml pro Protein 62,5 mM Tris-H_3PO_4, pH 7,5 1 mM EDTA 2 % SDS 1 mM NaN_3 10 mM DTT 33 % Glycerin

3.1.10 Verwendete Geräte

Die im Laufe dieser Doktorarbeit verwendeten Geräte sind in der nachfolgenden Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Geräte

Geräte	***Typ***	***Hersteller***
Zentrifugen	Avanti J-25	Beckman Coulter
	Biofuge pico	Heraeus
	Multifuge 3	Heraeus
	Tischzentrifuge	Carl Roth
PCR-Maschine	PCR Mini Cycler	MJ Research
Real-Time PCR Detection System	IQ 5	Bio-Rad (München, Deutschland)
Microscale Thermophoresis	Monolith NT.115	Nanotemper Technologies
UV-Leuchttisch	Fluoreszenzplatte Safe Imager	Invitrogen
Cell disrupter-Geräte	Emulisi Flex C3	Avestin (Mannheim, Deutschland)
	Ultraschall Branson Sonifier 250	Heinemann (Schwäbisch Gmünd, Deutschland)
Agarose-Gelkammer	OWL Easycast B1 A	Thermo Fisher Scientific (Braunschweig, Deutschland)
SDS-Page-Apparatur	Mini-Protean III	Bio-Rad (München, Deutschland)
Schüttelinkubatoren	Innova 4200	New Brunswick Scientific
	Innova 4300	New Brunswick Scientific
Pipetten	5 ml, 1 ml, 200 µl, 20 µl, 10 µl, 2 µl Research / Research plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
pH-Meter	Five easy	Mettler Toledo
Säulen FLPC	HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade	alle Säulen von GE Healthcare

Geräte	***Typ***	***Hersteller***
Säulen FLPC (Fortsetzung)	HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade	alle Säulen von GE Healthcare
	Superdex 200 10/300GL	
	HisTrap FF 5 ml	
	XK16/20 Glutathion-Sepharose Fast Flow 15 ml	
	XK 16/20 Nickel-Sepharose Fast Flow 15 ml	
	LKB Pump P-1	Pharmacia Biotech
Mikrowelle	22023/01	Siemens
Vortexer	VF2	Jouan Nordic
	REAX-1	Heidolph
Spektral-Photometer	UV-Vis-Spektrometer Smart Spec 3000	Bio-Rad (München, Deutschland)
	Nanodrop 2000c	ThermoFisher Scientific (Braunschweig, Deutschland)
Sterilbank	8511	Köttermann
Rührer	Variomag Monotherm	H+P Labortechnik GmbH
Waagen	Waage Typ 572/45	Kern
Dynamic Light Scattering	Spectro Size 300	Xtal Concepts (Hamburg, Deutschland)
FPLC	ÄKTAbasic	GE Healthcare Europe (München,
	ÄKTAprime	Deutschland)
Röntgengeräte	X8 PROSPECTOR mit IμS^{TM} Mikrofokusröhre APEX II CCD Detektor	Bruker (Karlsruhe, Deutschland)
	MAR345 Image Plate Detektor mit Iμ^{TM} Mikrofokusröhre	MAR-Incoatec (Geesthacht, Deutschland)
	Free Mounting System	Proteros Biostructures (Martinsried, Deutschland)

Geräte	*Typ*	*Hersteller*
Synchrotronquelle	Beamline MX_14.1; MX14.2	BESSY II (Helmholz Zentrum Berlin, Deutschland)

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Sterilisation

Medien und hitzeunempfindliche Lösungen wurden 20 min. und bei 121 °C bei einem Überdruck von 1 bar autoklaviert. Die Sterilisation hitzeempfindlicher Lösungen wie Antibiotika erfolgte mittels Sterilfiltration durch Spritzen (50 ml Braun) und einem Sterilfilter, 0,22 µm Porendurchmesser, (Carl Roth) und wurde den abgekühlten Medien hinzugeben.

3.2.2 Wachstumsbedingungen und Kultivierung der Bakterien

Die Kulturen wurden aerob bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation der Kulturen erfolgte abhängig vom Volumen im Reagenzglas auf einem Roller (bis 10 ml) oder in Erlenmeyerkolben (größere Volumina) schüttelnd bei 220 rpm im Inkubator Innova 4200 von New Brunswick Scientific, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Die heterologe Produktion erfolgte in 5 l Erlenmeyerkolben zur besseren Durchlüftung mit Schikanen. Die 1,6 l Kulturen wurden mit 220 rpm geschüttelt. Nach Induktion wurde die Temperatur auf 15 °C gesenkt und für mindestens 12 weitere Stunden inkubiert.

Die Senkung der Expressionstemperatur ist ein Weg, die Ablagerung von rekombinant produzierten Proteinen in Einschlusskörpern zu verhindern. Die hydrophobe Interaktion von Proteinen sinkt mit fallender Temperatur, und die Proteine haben mehr Zeit, in ihre native Konformation überzugehen. Der Absenkung der Temperatur ist eine natürliche Grenze gesetzt, denn das Wirtsbakterium kann ab einer gewissen Temperatur nicht mehr oder nur noch sehr langsam wachsen (Wilkinson und Harrison 1991).

Für die Stammhaltung wurden die Bakterien auf Festmedien kultiviert, wobei das Animpfen der Agarplatten nach der 3-Strich-Technik oder durch Ausplattieren mit Hilfe von sterilen Glaskügelchen erfolgte. Die Lagerung der Bakterienstämme erfolgte maximal vier Wochen bei 4 °C auf Festmedien. Für die weitere

Aufbewahrung wurden sie als Glycerin-*Stocks* (1 ml Bakterienkultur mit steriler 80 % Glycerin-Lösung; Endkonzentration 10 % Glycerin) bei -80 °C weggefroren.

3.2.3 Ermittlung der Zelldichte

Die Ermittlung der Zelldichte von Bakteriensuspensionen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm am Nanodrop™. Es wird angenommen, dass eine OD_{578} von 1 einer Zelldichte von $1x10^9$ Zellen/ml Kultur entspricht (Miller 1992).

3.3 Molekularbiologische und genetische Methoden

3.3.1 Übernachtkultur

10 ml LB-Medium wurden unter einer Sterilbank mit einem der *E. coli*-Stämme angeimpft. Zur Selektion wurden die entsprechenden Antibiotika hinzugegeben. Die Kultur wurde bei 37 °C für 16 h im Schüttelinkubator herangezogen.

3.3.2 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA, die zur Transformation eingesetzt werden sollte, wurde über HiBind®-Säulen präpariert (PEQlab, E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II Classic-Line). Die Herstellerangaben wurden folgendermaßen modifiziert: Beim Zentrifugieren der Übernachtkultur (XL2-blue-Stamm) wurde 10 min. mit 7.000 rpm zentrifugiert. Es wurde nach Auftragen der DNA auf die Säule dreimal gewaschen, einmal mit dem Puffer HB und zweimal mit dem Puffer W (beide aus dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II Classic-Line). Eluiert wurde mit 30 µl demineralisiertem, sterilfiltriertem Wasser. Alle weiteren Schritte wurden wie im Handbuch für den Miniprep (PEQlab, Erlangen) beschrieben durchgeführt.

3.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Mittels UV-Vis-Spektrometer (Nanodrop™) wurde bei 260 nm die spezifische Absorption von DNA gemessen, wodurch mit Hilfe der Auswertungssoftware des Gerätes die Konzentration nach der Formel (1) bestimmt wurde.

$$Konzentration = 50\ ng/ml \quad Absorption \bullet Verdünnungsfaktor \quad (1)$$

Dazu wurde vorher ein Nullabgleich für das Lösungsmittel durchgeführt. Es wurden immer 2 µl der zu messenden Probe auf die Messapparatur aufgetragen.

3.3.4 DNA-Restriktion

Zum Verdau der Plasmid-DNA zur Kontrolle der Insertion wurden Ansätze von 12 µl verwendet. Die eingesetzten Enzymmengen sowie die dazugehörigen Puffer und Inkubationszeiten entsprachen den Angaben des Herstellers (Thermo Scientific). Dabei wurde(n) Restriktionenzym(e) zusammen mit dem zugehörigen Puffer, 10 % BSA-Lösung und Wasser in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Dieses wurde verschlossen und meist 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Deaktivierung der

Enzyme wurde die Probe hitzeinaktiviert.

Ein Verdau nach einer Plasmid-Miniprep war folgendermaßen zusammengesetzt:

5,0 µl Plasmid-Probe

1,0 µl Enzym-Puffer

1,0 µl 10x BSA-Lösung

0,5 µl Restriktionsenzym 1

0,5 µl Restriktionsenzym 2

4,0 µl H_2O

Bei Restriktionen für Klonierungen wurden Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 30 µl, davon meist 20 µl Plasmid-Probe, hergestellt. Hierbei wurde über Nacht geschnitten.

3.3.5 PCR (Polymerase Chain Reaktion)

Mittels PCR können ganze Plasmide oder Teile daraus amplifiziert werden. Dies geschieht durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Die dazu benötigten DNA-*Primer* wurden für Klonierungszwecke mit Restriktionsschnittstellen versehen, um diese leichter in einen Vektor zu klonieren. Die benutzten *Primer* sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Oligonukleotide mit Namen, Sequenzen und *Annealing*-Temperaturen

Name	Sequenz 5´zu 3´ Richtung	Temp-ratur	Lage, Bemerkung
D1 -15 f	GGGATTTCATATGTATCCGCG CGGCATGCACCTAATAATAGG CAGC (46)	55 °C	kodierender Strang; für OspD1-Δ1-15/Δ222-225
D1 -32 f	GGGATTTCATATGTATCCGGC GGCAATAATATCATTAACGTG ACAAAT (48)	55 °C	kodierender Strang; für OspD1-Δ1-32/Δ222-225
D1 -80 f	GGGATTTCATATGTATCCGCG CGGCAACCGCCATAATTTGTTT TCATTG (49)	55 °C	kodierender Strang für OspD1-Δ1-80/Δ222-225

Name	Sequenz 5´zu 3´ Richtung	Temp-ratur	Lage, Bemerkung
D1-4 b	CCGCTCGAGGCCGCGCGGATA TATTTTGTCAGAAATAATATTA AACATGT (50)	55 °C	nichtkodierender Strang für alle verkürzten OspD1-Varianten
Spa15_f	ggcggatccATGAGTAACATTAAT TTAGTTCAATTAGTTAGAGAT AG (47)	55 °C	kodierender Strang für Spa15
Spa15_b	ggcgcggccgcTTATAAGACCCCAT TTAAGATTTCCATCC (40)	55 °C	nichtkodierender Strang für Spa15
IpgC_f	ggcggatccATGTCTTTAAATATCA CCGAAAATGAAAGC (39)	55 °C	kodierender Strang für IpgC
IpgC-4_b	ggcgcggccgcTTACTCCTTGATAT CCTGAATTGCG (36)	55 °C	nichtkodierender Strang für verkürzte IpgC-Variante
pHW3_f	ggcgaattcATAGCATGGCCTTTGC AG (27)	55 °C	kodierender Strang für pHW3
pHW3_b	ccgtaaagcttACCTAGTATAGGGG ACATGA (31)	55 °C	nichtkodierender Strang für pHW3

Die Abkürzung f steht für vorwärts (*forward)* und b für rückwärts (*reverse)*. In Großbuchstaben sind Sequenzen der Pathogenitätsfaktoren und in Kleinbuchstaben die Restriktionsendonuklease-Schnittstellen dargestellt. Hinter der Basensequenz ist in Klammern die jeweilige Anzahl der Basen angeben.

Die Herstellung synthetischer Oligonukleotide erfolgte durch die Firma MWG-Biotech (Martinsried, Deutschland). Die Protokolle für die Amplifikationsreaktion sind Tabelle 11 zu entnehmen, der verwendete Thermocycler stammte von der Firma MJ Research.

Tabelle 11 : Protokoll der PCR-Reaktion

	Schritt	*Temperatur*	*Zeitdauer*
1x	1. Initiale Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
25x	2. Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
	3. Primer-Anlagerung	60 °C	15 Sekunden
	4. Extention	72 °C	45 Sekunden
1x	5. Aufbewahrung	4 °C	beliebig

Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 50 µl in einem 100 µl Reaktionsgefäß (Easy Start100 Molecular Bio Products). Folgender Ansatz kam zur Anwendung:

10,0 µl 5x HF-Puffer

0,5 µl Phusion Polymerase

1,0 µl DNA (10 ng/µl)

1,0 µl *Primer* I (25 nM)

1,0 µl *Primer* II (25 nM)

1,0 µl dNTP-Mix (je 25 mM)

35,5 µl steriles H_2O

3.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurden 1%ige Agarose-Gele (bestehend aus 0,5 g Agarose und 49,5 ml 1-fach TAE-Puffer) in 1-fach TAE-Puffer verwendet (Sambrook et al. 1989). Dazu wurde 0,5 µl einer 10.000-fach konzentrierten SYBR *Green* Farbstoff-Lösung (SG; Invitrogen) zugegeben. SG ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der in der Molekularbiologie zum Nachweis von doppelsträngiger DNA benutzt wird (Zipper et al. 2004). Er dient als Ersatz für das giftige Ethidiumbromid. Der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge λ_{max} = 494 nm und emittiert grünes Licht bei λ_{max} = 521 nm. Die Auftrennung der DNA-Fragmente der kleinen

Gele (50 ml) erfolgte bei 100 V und 500 mA zwischen 30 und 60 min. Als Größenstandard diente *Low*, *Middle* oder *High FastRage* Marker von Thermo Scientific (siehe Tabelle 7).

3.3.7 Isolation und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach präparativer, elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmenten mit Hilfe eines 1,0%igen Agarose-Gels wurden die DNA-Banden durch Blaulichtbestrahlung sichtbar gemacht und die gewünschte DNA-Bande aus dem Gel herausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des Qiaquick-Gel-Extraktionskits (Qiagen, Hilden) aus dem Gel extrahiert und mit Silikagelmembran-Säulen (QIAquick spin columns, QIAGEN, Hilden) gereinigt. Dabei wurde nach Hersteller-Angaben (Qiaquick Handbuch, QIAGEN, Hilden) vorgegangen. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl sterilem Wasser. Der Erfolg wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.3.8 Reinigung der verdauten Vektoren

Die Aufreinigung verdauter Vektoren erfolgte mit dem Qiagen *PCR Purification Kit* nach dem Qiaquick *PCR Purification Kit Protocol* aus dem zugehörigen Handbuch (QIAGEN, Hilden).

3.3.9 Ligation

Zur Konstruktion der Vektoren (siehe Tabelle 3) wurde folgendes Protokoll zur Ligation von komplementären Restriktionsenden verwendet: In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 1 µl DNA-T4-Ligase (Thermo Scientific), 1 µl des dazugehörigen Puffers, 5-8 µg (1 µl) der restriktionsverdauten Vektoren und 500 ng (3 µl) der aufgereinigten *PCR*-Produkte eingesetzt und das fehlende Volumen mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei 22 °C oder über Nacht bei 16 °C.

3.3.10 Herstellung kompetenter *E. coli* -Zellen

Viele Bakterien, wie *E. coli*, können im begrenzten Maße exogene DNA aufnehmen. Um die Aufnahme zu verbessern, müssen die Bakterien physikalisch oder chemisch behandelt werden, wobei die verwendeten Stämme ihre Kompetenz durch Behandlung mit $CaCl_2$ erhielten. Dazu wurde eine Kolonie von einer Agarplatte aufgenommen und in 5 ml TYM-Medium bei 37 °C für 2 h bei 220 rpm (Inkubator Innova 4300, New Brunswick Scientfic) geschüttelt. Diese Kultur wurde dann in

100 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD_{578} von 0,5 bei 37 °C weitergeschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 2500 rpm (Avanti J-25, Rotor: JA-10, Beckman Coulter) und 4 °C für 5 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml TfbI-Puffer resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Trennung vom Überstand durch Zentrifugieren (5 min.; 4 °C; 2500 rpm JA-10). Anschließend wurde das Pellet in 4 ml TfbII-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde in 50 µl Aliquots aufgeteilt und erst bei 20 °C und dann bei -80 °C eingefroren.

3.3.11 Transformation von *E. coli* über Hitzeschock

5 µl eines Ligationsansatzes wurden in 50 µl eines Aliquots mit kompetenten Zellen überführt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 20-25 s bei 42 °C in einem Thermomixer (Eppendorf), woraufhin das Aliquot wieder für 10 min. auf Eis gelegt wurde. Die Kultur wurde mit LB-Medium auf 1 ml aufgefüllt und für 45 min. bei 37 °C im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert, damit sich die Antibiotikaresistenz ausbilden konnte. Es wurden 900 µl LB-Medium abgenommen, nachdem die Probe bei 13.000 rpm (Biofuge pico Heraus) für 1 min. zentrifugiert worden war. Das Pellet wurde im verbleibenden LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion ausplattiert. Die Agar-Platten wurden für mindestens 16 h bei 37 °C inkubiert. Kolonien wurden im LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz über Nacht angezüchtet. Mittels Plasmid-Minipräparation wurde das Plasmid gewonnen. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Restriktionsverdau (siehe 3.3.4) und anschließende Gelelektrophorese (siehe 3.3.6) überprüft.

3.3.12 Sequenzierung der DNA

Sequenzierungen wurden nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger durch die Firma MWG Biotech (München, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden jeweils 1 µg Plasmid in 30 µl dH_2O zur Verfügung gestellt. Die dazu verwendeten Primer wurden von MWG zur Verfügung gestellt und trugen die Bezeichungen pGEX-f und pGEX-r.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde zur Bestimmung der molekularen Masse und der Überprüfung der Reinheit der isolierten Proteine eingesetzt (Laemmli 1970). Der Gellauf wurde in Elektrophorese-Kammern von BioRad durchgeführt. 15 %ige Mini-Gele (8,0 x 6,0 x 0,75 cm^3) setzten sich wie in Tabelle 7 beschrieben zusammen. Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer (250 mM Tris-HCl pH 6,8; 8 % (w/v) SDS; 200 mM DTT, 40 % (v/v) Glycerin und 0,04 % (w/v) Bromphenolblau) auf eine Konzentration von ca. 2,5 mg/ml eingestellt.

Tabelle 12: SDS-PAGE nach Laemmli

Komponenten	*Volumen*
Trenngel (15 %)	
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,0 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (38:0,8)	1,5 ml
SDS 10 %	30 µl
H_2O	0,47 ml
TEMED	3,0 µl
10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)	30 µl
Sammelgel	
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,6 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (38:0,8)	0,5 ml
SDS 10 %	30 µl
H_2O	1,87 ml
TEMED (100%ig)	3,0 µl
10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)	30 µl

Die Denaturierung erfolgte für 5-10 min. bei 95 °C bei 350 rpm schüttelnd im Heizblock (Eppendorf). Danach wurden die Proben bei Raumtemperatur abgekühlt, bevor pro Spur 20 µl Probe aufgetragen wurden. Als Elektrodenpuffer diente 1x Tris-

HCl Puffer (25 mM Tris-HCl pH 8,8; 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 140-180 V für ca. ein bis zwei Stunden. Als Standard zur Bestimmung der Molekulargewichte der getrennten Proteine wurde der Marker *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) verwendet.

Die Gele wurden anschließend in einer aus 1 g Coomassie™ Brilliant Blue G250 (Merck, Darmstadt), 40 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure ad 1000 ml H_2O bestehenden Lösung gefärbt. Dazu wurde das Gel für 30 min. schüttelnd in der Färbelösung belassen. Die Entfärbung erfolgte über Nacht auf dem Schüttler. Der Entfärber setzte sich wie folgt zusammen: 40 % (w/v) Methanol, 10 % Essigsäure, 50 % destilliertes Wasser. Bei dieser Methode bleiben Proteinbanden angefärbt, aufgrund einer Wechselwirkung zwischen basischen Aminosäuren und dem Farbstoff. Die SDS-Gele wurden anschließend in einem Behälter, gefüllt mit destilliertem Wasser, aufbewahrt. Die Bandenmuster wurden dann mit einem Scanner (Canon CanoScan LIDE 100) oder einer Digitalkamera (Panasonic DMC-G2) dokumentiert.

3.4.2 Bestimmung des Proteingehalts

3.4.2.1. durch Absorptionsmessung

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde auch über deren Extinktion im UV-Bereich bestimmt. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei $\lambda = 280$ nm. Bei dieser Wellenlänge hängt der Extinktionskoeffizient in erster Näherung nur von der Proteinkonzentration und damit der Anzahl der Tryptophane und Tyrosine ab.

Die Konzentration aufgereinigter Proteine wurde mittels UV-Vis-Spektrometer Nanodrop™ über die Absorption bei 280 nm bestimmt. Dazu wurde ein Nullabgleich für das Lösungsmittel am Spektrometer durchgeführt. 2 µl der Probe wurden auf die Messapparatur aufgetragen und nach Messung mit einem fusselfreien Zellstofftuch wieder abgewischt und mit H_2O gespült. Mit Hilfe der Auswertungssoftware wurde die Konzentration bestimmt. Dazu war es notwendig, den Extinktionskoeffizienten des Proteins einzugeben.

Der Extinktionskoeffizient des Proteins wurde vorher theoretisch mit einem Programm namens ProtParam (http://www.expasy.org/tools/protparam.html, Stand 03.03.2015) anhand der Aminosäuresequenz bestimmt.

3.4.2.2. **nach Bradford**

Konzentrationsbestimmungen mit dem Bradford-Assay dienten vor allem zur Überprüfung der durch die Absorptionsmessung (siehe 3.4.2.1) erhaltenen Proteinkonzentration. Die Änderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomasie Blau G250 von 465 nm zu 595 nm im sauren Milieu bei Interaktion mit einem Protein wird bei dieser Methode detektiert. Die Interaktion beruht auf den Wechselwirkungen mit den basischen und aromatischen Aminosäuren im Protein (Bradford 1976).

Zur Bestimmung einer unbekannten Proteinkonzentration musste eine Kalibriergerade mit verschiedenen BSA-Konzentrationen aufgenommen werden, die aus BSA und Wasser hergestellt wurden. Dazu wurde 1-fach Bradfordlösung für die Bestimmung benutzt, die aus einer 5-fachen Bradfordlösung durch Verdünnung mit Wasser und anschließendem Filtrieren hergestellt wurde. Zur Bestimmung der Kalibiergeraden wurden 950 µl 1-fach Bradfordlösung mit 50 µl der verschiedenen BSA-Konzentrationen versetzt, invertiert und für 5 min. inkubiert. Von diesem Ansatz wurden mindestens 50 µl in UV-Küvetten (Eppendorf) am Nanodrop™ bei 595 nm vermessen. Der Nullabgleich erfolgte mit einer Lösung aus 950 µl 1-fach Bradfordlösung 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 eine Kalibriergerade. Anhand der Kalibiergraden konnte die Konzentration der Probe ermittelt werden.

3.4.3 **Heterologe Produktion von rekombinanten Proteinen in *E.coli***

Zur heterologen Produktion wurden zwei oder vier 5 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit je 1,6 l LB-Medium, 1,6 ml Chloramphenicolstammlösung (Endkonzentration 32 µg/ml) und 1,6 ml der Ampicillinstammlösung (Endkonzentration 100 µg/ml) befüllt. Die Kulturkolben wurden mit je 20 ml einer zuvor gezogenen Übernachtkultur angeimpft.

Die Gene der Pathogenitätsfaktoren liegen auf dem entsprechend modifizierten pGEX-4T mod.-Vektor. Die Produktion der einzelnen Proteine erfolgt über die negative Regulierung des Repressors des *lac*-Operons. Negative Kontrolle bedeutet, dass das *lac*-Operon nur dann transkribiert wird, wenn der *lac*-Repressor vom Operator dissoziiert. Im reprimierten Zustand ver-hindert der *lac*-Repressor,

dass die RNA-Polymerase an die DNA binden und die Transkription initiieren kann. Durch Zugabe von IPTG dissoziiert der Repressor vom Operon ab, so dass Transkripton und Translation möglich sind. Bei den verwendeten Expressionsstämmen wird nach der Zugabe von IPTG die chromosomal kodierte T7-RNA-Polymerase produziert, die wiederum das Gen auf dem eingefügten Plasmid transkribiert. Die Translation der mRNA führt schließlich zum gewünschten Proteinprodukt.

Die Kultur wurde jeweils bis zu einer OD_{578} von 0,6 bis 1,0 gezogen und durch Zugabe von 1,6 ml IPTG-Lösung (Endkonzentration: 1 mM) die Produktion der Proteine gestartet. Sie wurde anschließend bei 15 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Zellkultur durch 15 min. Zentrifugation mit der Avanti J-25 (Beckman Coulter) bei 6000 rpm (Rotor JA-10), 4 °C abgeerntet. Das gewonnene Zellpellet wurde anschließend wie in 3.4.4 beschrieben aufgereinigt.

Vor der Induktion und kurz vor dem Abernten der Zellen wurde 1 ml Kultur, bei einer OD_{578} von 0,5 entnommen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde für spätere Auftrennung mittels SDS Gelelektrophorese in 40 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert.

3.4.4 Zelllyse und Zellaufschluss

Das abzentrifugierte Zellpellet aus 1,6 l Bakterienkultur (siehe 3.4.3) wurde in je 30 ml PBS-Aufschlusspuffer (siehe Tabelle 6) resuspendiert. Für Spa15 und IpgC wurde hierbei 1x PBS-Puffer mit 3 mM DTT benutzt. Für OspD1 wurde dieser Puffer zusätzlich mit 350 mM NaCl versetzt.

Der Zellaufschluss zur Herstellung zellfreier Lysate ist der einleitende Schritt im Anreicherungsprozess von Proteinen. Der Aufbruch der Zellen erfolgte mechanisch via Ultraschall am Sonifier 250 (Branson) oder durch Druckluft mit dem Emulsiflex C3 (Avestin). Dazu wurde beim Sonifier die Suspension 1 min. lang bei einer Stärke von 3/10 bei 70 % Ausgabe (*Output)* behandelt. Der Vorgang des Aufschlusses am Sonifier wurde so lange wiederholt, bis eine deutliche Klärung der Zellsuspension und Abnahme der Viskosität zu erkennen war. Dies wurde meist nach drei- bis fünfmaliger Durchführung erreicht.

Beim Emulsiflex wurde die Suspension zweimal durch den Kreislauf des

Gerätes gepumpt. Dies sollte laut Hersteller 99,9 % der Zellen mechanisch zerstören. Anschließend wurden die Zelltrümmer und Membranbestandteile für 1 h bei 20.000 rpm (Avanti J-25 Beckman Coulter, Rotor JA 25.50) bei 4 °C abzentrifugiert und mit dem Lysat weitergearbeitet.

3.4.5 Affinitätschromatographie mit Protein-*tags*

Zur Isolierung von Proteinen wurden Fusionsproteine mit den in 3.4.5.1 und 3.4.5.2 vorgestellten *Tags* hergestellt. Dabei sind der eigentlichen Proteinsequenz einige Nukleotide hinzugefügt worden, die dem Protein entsprechend zusätzliche Aminosäuren anfügen. Über diese zusätzlichen Aminosäuren lässt sich das Protein mit Hilfe der Affinitätschromatographie isolieren.

3.4.5.1. GST-*tag* bei Spa15 und IpgC

Durch die Expression eines Gens im pGEX-4Tmod.-Vektor entsteht ein Fusionsprotein aus der Glutathion-S-Transferase (GST) am *N*-Terminus des Zielproteins (Spa15 oder IpgC). Dieses Fusionsprotein kann sehr selektiv an das Säulenmaterial Glutathion-Sepharose binden. So war eine Aufreinigung und Trennung von den übrigen Proteinen möglich. Das GST-*tag* wurde anschließend durch Spaltung mit Thrombin vom Zielprotein abgetrennt.

3.4.5.2. *Double-tag*-Kombination von MBP-*tag* und His-*tag* bei OspD1-Varianten

Für die Varianten von OspD1 konnte im Rahmen der Masterarbeit der Verfasserin (Jüngel 2010) festgestellt werden, dass die Ausbeute an löslichem Fusionsprotein der OspD1-Varianten nur unzureichend war. Deswegen wurde statt des GST-*tags* ein N-terminaler Maltose-Bindeprotein-(MBP)-*tag*, von dem bekannt ist, dass er die Löslichkeit des Fusionsproteins positiv beeinflusst, eingeführt. Dies wurde durch Umklonierung in den Vektor pHW3 erreicht. Das erlangte MBP-Fusionsprotein kann an eine Amylose-Matrix binden und mit der affineren Maltose eluiert werden. Das etwa 40 kDa große MBP-*tag* kann, wie auch das GST-*tag,* mit Hilfe von Thrombin vom Zielprotein getrennt werden.

Der Vektor pHW3 enthält einen Genabschnitt für ein zweites *Tag*. So ist das MBP-OspD1-Fusionsprotein zusätzlich am *C*-Terminus mit einem His-*tag* ausgestattet. Dieses besteht aus acht Histidinen, die mit Thrombin durch eine Thrombin-

schnittstelle vom Protein abgetrennt werden können. Das His-*tag* bindet spezifisch an ein Säulenmaterial mit zweiwertigen Nickel-Ionen. Das Ni^{2+}-Ion liegt in einem oktaedrischen Komplex mit dem Trägermaterial und Wasser-Molekülen vor. Letztere können durch Histidin verdrängt werden, wodurch ein sehr stabiler Chelat-Komplex entsteht. Ni^{2+} ist auf diesen Säulen durch Nitrilotriessigsäurereste gebunden und kann mit zwei Histidin-Resten des Proteins im Austausch gegen Wasser interagieren. Diese Spezifität gewährleistet, dass fast ausschließlich das Fusionsprotein an das Säulenmaterial bindet.

3.4.6 Spaltung der Fusionsproteine mit Thrombin

Die entstanden Fusionsproteine wurden mit 200 U Thrombin (humanes Thrombin, CSL Behring oder Sigma Aldrich) bei 4 °C für 20 h im Elutions-Puffer oder 500 U Thrombin auf der Säule gespalten. Hierbei wurden anschließend 15 µl des verdauten Ansatzes als Probe mit 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt, um durch SDS-Page den Erfolg des Verdaus zu prüfen.

3.4.7 Aufreinigung von Spa15 mittels *Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)*

Das Affinitätsmedium Glutathione Sepharose™ befindet sich dicht gepackt in einer Säule, die einen Zu- und Abfluss besitzt. Über einen zuführenden Schlauch wird das Zelllysat mittels einer Pumpe automatisch durch die Säule gepumpt.

Das Lysat wurde in eine 250 ml Schott-Glasflasche überführt und auf eine mit PBS-Aufschlusspuffer äquilibrierte GSH-Säule (30 ml Säulenvolumen) mit Durchflussvolumen von 1,5 ml/min. aufgetragen. Dabei wurde das Lysat durch Eis gekühlt. Nach dem Auftrag wurde die beladene Säule mit 400 ml 1x PBS-Puffer gewaschen, um nicht gebundenes Protein von der Säule zu entfernen. 500 U Thrombin (Beriplast, CSL Behring, Marburg) wurden in 20 ml 1x PBS-Puffer gelöst und mit einer Spritze auf die Säule gegeben. Diese wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Zur Elution wird das Gerät Äkta FPLC (Amershan Biosciences) oder das Gerät Äkta prime (GE Healthcare) eingesetzt. Die Anlage wird durch einen Computer mittels der zugehörigen *Unicorn-Software* gesteuert. Der Säulendurchfluss passiert eine UV-Lampe, deren Signale an die Steuereinheit weitergegeben und auf einem Bildschirm als UV-Kurve ausgegeben werden. Durch Kontrolle der OD lässt sich der Aufreinigungsprozess verfolgen und z.B. feststellen, wann der Wasch-

durchfluss keine Verunreinigungen mehr enthält oder nach welchem Elutionsvolumen das Protein vollständig eluiert wurde. Mittels des zum System gehörenden Fraktionssammlers kann das eluierte Protein in beliebig großen Fraktionen automatisch gesammelt werden.

Die GSH-Säule wurde mit einem Durchflussvolumen von 1 ml/min. mit dem Elutionspuffer 1x PBS eluiert. Vom Eluat des Elutions*peaks* wurden 20 µl in 20 µl SDS-Probenpuffer gegeben und für die SDS-PAGE aufbewahrt. Die GSH-Säule wurde mit 50 ml 6 M Guanidin und anschließendem Auftragen von 50 ml 1x PBS-Puffer + 2 % Triton X 100 regeneriert. Anschließend wurde sie für den nächsten Gebrauch mit 1x PBS-Puffer oder für eine längere Zwischenlagerung auf 20 % unvergälltem Ethanol gespült. Das Eluat, welches das Zielprotein Spa15 enthielt, wurde mit einer PD-10-Säule umgepuffert.

PD-10-Säulen sind mit dem Makromolekülmaterial *Sephadex* gefüllt, welches einen Molekularsiebeffekt besitzt. Die Entsalzung erfolgt dadurch, dass größere Moleküle wie Proteine im Volumen des Säulenmaterials eluieren, während die kleineren Moleküle oder Salzionen in den Poren des Gelfiltrationsmaterials zurückgehalten werden und folglich verzögert eluieren.

Eine PD-10-Säule wurde vor dem Umpfuffern mit 50 ml Bis-Tris-Puffer äquilibiert. Danach wurde das Eluat der GSH-Säule mittels einer Spritze über einen 10 ml *Loop*, welcher, je nach Eluatvolumen, drei- bis viermal beladen wurde, auf die Säule gegeben. Mit dem Bis-Tris-Puffer wurde das aufgetragene Eluat erneut eluiert. Auch hier wurden 20 µl des PD-10-Eluats mit 20 µl SDS-Probenpuffer vermischt. Das restliche PD-10-Eluat (etwa 30 ml) konnte dann auf den Anionenaustauscher aufgetragen werden.

Die Ionenaustausch-Chromatographie beruht auf der kompetitiven Wechselwirkung geladener Moleküle. Eine Ionenaustauscher-Matrix besitzt geladene Gruppen, auf die Probenmoleküle mit Ladungen und Ionen binden können. Erst binden die Moleküle (Proteine) an den fixierten Ladungen der stationären Phase, dann erfolgt deren Verdrängung und Elution durch eine steigende Salzkonzentration des Eluenten.

Um das rekombinant produzierte Spa15 von Verunreinigungen abzutrennen, wurde ein Anionenaustauscher verwendet. Spa15 hat einen theoretischen, iso-

elektrischen Punkt von 4,38 (http://expasy.org/cgi-bin/pi_tool, Stand 03.03.2015) und weist daher deprotonierte Aminosäurenreste im Bis-Tris-Puffer auf, dessen pH bei einem Wert von 6,0 eingestellt wurde.

Infolgedessen verhalten sich die Proteine wie Anionen und können an negativ geladene Gruppen der stationären Phase binden. Das Material der festen stationären Phase besteht aus einer makromolekularen unlöslichen Matrix (DEAE, GE Healthcare, Säulenvolumen 10 ml, bestehend aus 2 mal 5 ml), die mit Diethylaminogruppen besetzt ist. Die Pumpen der Äkta ermöglichen einen kontinuierlichen Zufluss der Proben und der Elutionslösung.

Nach Äquilibrierung der Säule mit 50 ml Bis-Tris-Puffer-Durchlauf, konnte die Proteinprobe mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. auf die Säule aufgetragen werden. Danach wurde die Säule mit ca. 50 ml Bis-Tris-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte graduell mit einer Mischung von Bis-Tris-Puffer und BisTris-Puffer+S. Der Gradient wurde zunächst auf eine Salzkonzentration von 400 mM NaCl, dann auf 800 mM NaCl und zum Schluss auf 1 M NaCl gestellt. Das Eluat wurde in 3 ml-Proben fraktioniert. Die gesammelten Fraktionen des entsprechenden *Peaks* wurden vereint und es wurde eine 20 µl Probe genommen und mit 20 µl SDS-Probenpuffer versetzt. Die vereinten Fraktionen wurden mittels 5 kD Vivaspin Zentrikon (Sartorius stedim biotech GmbH, Göttingen) auf 5 ml aufkonzentriert.

In der Gelpermeations-Chromatographie (GPC) werden die Proteine ihrer Molekulargröße nach aufgetrennt, weshalb sie auch als Größenausschluss-Chromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, *SEC*) bekannt ist. Eine HiLoad™-26/60-Superdex 75 Chromatographie-Säule wurde zu der anschließenden Proteinreinigung verwendet. Die Trennung der Proteine findet hier aufgrund unterschiedlicher Größe (genauer: des hydrodynamischen Volumen) in Lösung statt. Die Trennleistung der verwendeten GPC-Säule erstreckte sich über einem Bereich von 3-75 kDa. Eine SEC 75-Säule wurde mit 400 ml 6.0 SEC-Puffer äquilibriert. Danach wurden die aufkonzentrierten 5 ml des Anionentauscher-Eluats auf die Säule gegeben und mit 4 ml/min. eluiert. Dabei wurden mittels des Fraktionssammlers der ÄKTA 5 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen des Elutions*peaks* von Spa15 wurden mittels SDS-Gel (20 µl der Fraktion + 20 µl Probenpuffer) auf das Verhandenseins von Spa15 überprüft und anschließend vereint. Das vereinte Eluat wurde erneut mittels

Vivaspin Zentrikons aufkonzentriert und mit SEC-Puffer auf 10 mg/ml eingestellt. Zum Schluss wurde die Anlage noch mit Aqua dest. gewaschen, um das Salz aus den Leitungen der FPLC zu waschen (basierend auf Hasewinkel 2012a).

3.4.8 Aufreinigung von IpgCΔ152-155 mittels *Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)*

Das Lysat wurde in eine 250 ml Schott-Glasflasche überführt und auf eine mit PBS-Aufschlusspuffer äquilibrierte XK16/20 Glutathion Sepharose-Säule (30 ml Säulenvolumen) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min. aufgetragen. Dabei wurde das Lysat mit Eis gekühlt. Nach dem Auftragen wurde die beladene Säule mit 400 ml 1x PBS gewaschen, um nicht gebundenes Protein von der Säule zu entfernen. 500 U Thrombin (Beriplast, CSL Behring, Marburg) wurden in 20 ml 1x PBS gelöst und mit einer Spritze auf die Säule gegeben. Diese wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Zur Elution wurde das Gerät Äkta FPLC (Amershan Biosciences) oder das Gerät Äkta *prime* (GE Healthcare) eingesetzt. Als Elutionspuffer wurde 1x PBS eingesetzt und das Thrombin/IpgC-Gemisch mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min von der GSH-Säule (mit gekoppelter Hi Trap Benzamidin FF 1 ml, um das Thrombin abzufangen) eluiert. Von dem Eluat des Elutions*peaks* wurden 20 µl in 20 µl SDS-Probenpuffer gegeben und für die SDS-PAGE aufbewahrt. Die GSH-Säule wurde mit 50 ml 6 M Guanidin und anschließendem Auftragen von 50 ml 1x PBS-Puffer + 2 % Triton X 100 regeneriert. Anschließend wurde sie für den nächsten Gebrauch mit 1x PBS-Puffer oder für eine längere Zwischenlagerung auf 20 % unvergälltem Ethanol gespült.

Das Eluat, welches das Zielprotein IpgC enthielt, wurde mit einer PD-10 Säule umgepuffert. Da das Elutionsvolumen sehr groß war, wurde es mit den Konzentratoren von Vivaspin 20 MWCO 10 kDa an der Zentrifuge (Multifuge 3, Hereaus) auf 10 ml ankonzentriert. Die PD-10-Säule wurde vor dem Umpfuffern mit 50 ml QSeph-Puffer äquilibiert. Danach wurde das Eluat der GSH-Säule mittels einer Spritze über einen 10 ml *Loop* auf die Säule gegeben. Mit dem QSeph-Puffer wurde das aufgetragene Eluat erneut eluiert. Auch hier wurden 20 µl des PD-10-Eluats mit 20 µl SDS-Probenpuffer vermischt.

Das restliche PD-10-Eluat (etwa 30 ml) konnte dann auf den starkbindenden Anionenaustauscher *HiTrap*™ Q Sepharose FF (Säulenvolumen 5 ml) aufgetragen

werden. Nach Äquilibrierung der Säule mit 50 ml QSeph-Puffer, konnte die Proteinprobe mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. auf die Säule aufgetragen werden. Danach wurde die Säule mit ca. 50 ml QSeph-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte graduell mit einer Mischung von QSeph-Puffer und QSeph+S-Puffer. Der Stufengradient wurde zunächst auf eine Salzkonzentration von 50 mM NaCl, dann auf 200 mM NaCl und zum Schluss auf 300 mM NaCl gestellt. Das Eluat wurde in 3 ml Proben fraktioniert. Die gesammelten Fraktionen des entsprechenden *Peaks* wurden vereint. Es wurde eine 20 µl Probe genommen und mit 20 µl SDS-Probenpuffer versetzt. Die vereinten Fraktionen wurden mittels 5 kD Vivaspin Zentrikon (Sartorius stedim biotech GmbH, Göttingen) auf 5 ml aufkonzentriert.

Eine *HiLoad*™-26/60-Superdex 75 Chromatographie-Säule wurde zu dem anschließenden Reinigungsschritt verwendet. Die SEC 75-Säule wurde mit 400 ml SEC 7.5-Puffer äquilibriert. Danach wurden die aufkonzentrierten 5 ml des Anionentauscher-Eluats auf die Säule gegeben und mit einer Flussgeschwindigkeit von 4 ml/min. eluiert. Dabei wurden mittels des Fraktionssammlers der ÄKTA 5 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen des Elutions*peaks* von IpgC wurden mittels SDS-Gel (20 µl der Fraktion + 20 µl Probenpuffer) auf das Vorhandensein von IpgC überprüft und anschließend vereint. Das vereinte Eluat wurde erneut mittels Vivaspin Zentrikons aufkonzentriert und mit SEC-Puffer auf 10 mg/ml eingestellt. Zum Schluss wurde die Anlage noch mit Aqua dest. gewaschen, um das Salz aus den Leitungen der FPLC zu waschen (basierend auf Hasewinkel 2012a).

3.4.9 Aufreinigung der verkürzten Varianten von OspD1 mittels *Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)*

Das Zellaufschluss-Lysat wurde in eine 100 ml Schott-Glasflasche überführt und auf eine mit 1x PBS +S*-Puffer äquilibrierte Dextrin-Säule (25 ml Säulenvolumen) mit 1,5 ml/min. aufgetragen. Nach dem Auftrag wurde die beladene Säule mit 200 ml 1x PBS +S*-Puffer gewaschen, um nicht gebundenes Protein von der Säule zu entfernen. Das gebundene MBP-His_8-OspD1 wurde direkt im Anschluss mit 1x PBS +S* +100 mM Maltose-Puffer von der Dextrin-Säule an der ÄKTA mit Flussgeschwindigkeit 2 ml/min. eluiert. Von dem Eluat des Elutions*peaks* wurden 20 µl in 20 µl SDS-Probenpuffer gegeben und für die SDS-PAGE aufbewahrt. Die Dextrinsäule wurde mit 100 ml dH_2O und anschließendem Auftragen von 0,5 M NaOH und erneutem Waschen mit 100 ml dH_2O regeneriert.

Das erhaltene Eluat wurde im Anschluss mittels Peristaltikpumpe auf die eine mit 1x PBS +S*-Puffer equilibierten Ni^{2+}-Chelat-Sepharosesäule (15 ml Säulenvolumen) mit 1,5 ml/min. aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 1x PBS +S* +150 mM Imidazol gespült, um noch vorhandene Abbruchfragmente des Fusionsproteins zu entfernen. Der Spülvorgang wurde fortgesetzt, bis am Detektor eine Basislinie zu sehen war. Das vollständige Fusionsprotein wurde mit 1x PBS +S* +400 mM Imidazol eluiert und in einem 50 ml Falcon aufgefangen. Zur Qualitätskontrolle wurden auch hier 20 µl des PD-10-Eluats mit 20 µl SDS-Probenpuffer vermischt. Die Ni^{2+}-Chelat-Sepharosesäule wurde zunächst mit 50 ml 1x PBS +S* + 10 mM EDTA (Flussrate Peristaltikpumpe 3 ml/min.) von Ni^{2+} befreit, dann mit 50 ml dH_2O (3 ml/min.) gewaschen, mit 25 ml 100 mM $NiSO_4$ (1 ml/min.) wieder beladen und abschließend erneut mit 50 ml 1x PBS +S* (3 ml/min.) gespült. Da Imidazol Thrombin an der Abspaltung der *Tags* hindert, musste das Imidazol entfernt werden. Dazu wurde mit einer PD10-Säule umgepuffert. Die PD-10-Säule wurde vor dem Umpuffern mit 1x PBS +S* äquilibiert. Danach wurde das Eluat mittels einer Spritze über einen 10 ml *Loop*, welcher je nach Eluatvolumen zwei- bis dreimal beladen wurde, auf die Säule gegeben. Mit dem 1x PBS +S*-Puffer wurde die aufgetragene Probe erneut eluiert. Auch in diesem Fall wurden 20 µl des PD-10-Eluats mit 20 µl SDS -Probenpuffer vermischt. Als nächster Schritt wurden 200 U Thrombin (Sigma Aldrich, humanes Thrombin) in PBS +S*-Puffer gelöst und zum PD-10-Eluat gegeben. Das Gemisch wurde bei 4 °C mindestens über Nacht inkubiert.

Erneut wurde das Gemisch über die Dextrinsäule gegeben, an die direkt eine Ni^{2+}-Chelat-Sepharose-Säule angeschlossen war, um MBP-*tag* und His-*tag* vom Rest des Gemisches abzutrennen. Genutzt wurde bei diesem Vorgang 1x PBS+S*. Der Durchfluss sowie weitere 20 ml des anschließenden Spülvorgangs wurden gesammelt und mittels 10 kD Vivaspin Zentrikon (Sartorius stedim biotech GmbH, Göttingen) auf 5 ml aufkonzentriert. Eine HiLoad™-26/60-Superdex 200 Chromatographie-Säule wurde für die anschließende Größenausschlusschromatographie verwendet. Die SEC 200-Säule wurde mit 400 ml SEC 8.0-Puffer äquilibriert. Danach wurden die aufkonzentrierten 5 ml des Eluats auf die Säule gegeben und mit 4 ml/min. eluiert. Mittels des Fraktionssammlers der ÄKTA wurden 5 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen des Elutions*peaks* des OspD1 wurden

mittels SDS-Gel (20 µl der Fraktion + 20 µl Probenpuffer) auf das Vorhandensein von OspD1 überprüft und anschließend vereint. Das vereinte Eluat wurde erneut mittels Vivaspin Zentrikons aufkonzentriert und mit SEC-Puffer auf 10 mg/ml eingestellt.

3.4.10 Aufreinigung der verkürzten SeMet-Varianten von OspD1 mittels *Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)*

Die Aufreinigung der SeMet-Variante erfolgte analog zum oben beschriebenen Protokoll (siehe 3.4.9), wobei SeMet-Medium (siehe Tabelle 4) zur Kultivierung eingesetzt wurde. Aufgrund der bestehenden Oxidationsgefahr des Selens wurde in jedem Puffer 3 mM DTBA als Reduktionsmittel hinzugesetzt (Perkel 2012). Vor der Induktion mit IPTG bei einer OD_{578} von 0,5 wurden pro Liter Kultur 1 ml einer L-Selenomethionin-Stammlösung (5 mg/ml) zugegeben.

3.4.11 Analytische Molekularsiebchromatographie

Die analytische Molekularsiebchromatographie (Barth et al. 1994; Hefti 1982) wurde mittels ÄKTA und der Säule Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) durchgeführt. Für die Bestimmung der Masse aus dem Elutionsvolumen wurde eine Kalibriergerade erstellt, da bei globulären Proteinen eine Korrelation zwischen dem Logarithmus der Masse und dem Elutionsvolumen besteht (*Kit for Molecular Weights 12-200 kD for GFC*, Sigma Aldrich).

Tabelle 13: Proteine des Kalibrierungskits von Sigma

Protein	*Masse*
Dextran Blue	2000 kDa
Amylase	200 kDa
Alkoholdehydrogenase	150 kDa
Albumin	66 kDa
Carbonic Anhydrase	29 kDa
Cytochrome C	12,4 kDa

Zur Kalibrierung wurden über einen 300 µl Loop an der ÄKTA 300 µl eines Gemisches der Kalibrierproteine mit je 1 mg/ml aufgetragen und mit 0,5 ml/min mit

dem SEC 7.5-Puffer eluiert. Die molaren Massen der für die Kalibrierung verwendeten Proteine sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Für die Erstellung der Kalibriergeraden muss das Dextran Blue nicht mit einbezogen werden, da in diesem Bereich die Linearität nicht mehr gegeben ist. Es dient lediglich der Bestimmung des Ausschlussvolumens, welches das minimale Elutionsvolumen darstellt.

3.4.12 Mikroskalierte Thermophorese *(Microscale Thermophoresis (MST))*

Die *MST*-Technologie ist eine Methode zur Messung von Interaktionen von biologischen Makromolekülen mit anderen Biomolekülen oder Kleinmolekül-liganden. Sie beruht auf dem Grundprinzip der Thermophorese, also der gerichteten Bewegung von Teilchen entlang eines Temperaturgefälles.

Der Infrarot-Laser erzeugt einen mikroskopischen Temperaturgradienten, während die Änderung der Molekülkonzentration in dem erwärmten Bereich mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie verfolgt und gemessen werden kann. Binden Moleküle aneinander, verändert das ihre thermophoretische Bewegung, so dass über die Messung auch die Stärke der Bindung ermittelt werden kann. Die Thermophorese reagiert empfindlich auf verschiedene Eigenschaften von Biomolekülen, etwa Oberflächenparameter wie die Ladung oder auch Änderungen der umgebenden Wasserhülle, wie sie bei allen Bindungsreaktionen auftreten.

Anders als bei herkömmlichen Methoden wie zum Beispiel Radioaktiv-Bindeassays können so auch interagierende Moleküle mit sehr großen Massen- oder Größenunterschieden analysiert werden, ob nun bei einer Ionenbindung oder einer Interaktion von Kleinmolekülen mit Proteinen (Wienken et al. 2010).

Mithilfe des Geräts Monolith NT.115T von Nanotemper wurden mit dieser Methode Affinitäten zwischen OspD1 und Spa15 gemessen. Da sich durch die Bindung von Spa15 an das Zielmolekül OspD1 typischerweise zumindest Größe, Ladung oder Solvationsentropie der Moleküle ändert, unterscheidet sich die Thermophorese der einzelnen, ungebundenen Proteinmoleküle deutlich von der Thermophorese des Spa15-OspD1-Komplexes. Außerdem wurden mittels *Microscale Thermophoresis* OspD1-Peptide mit Spa15 und MxiE-Peptide mit OspD1 vermessen.

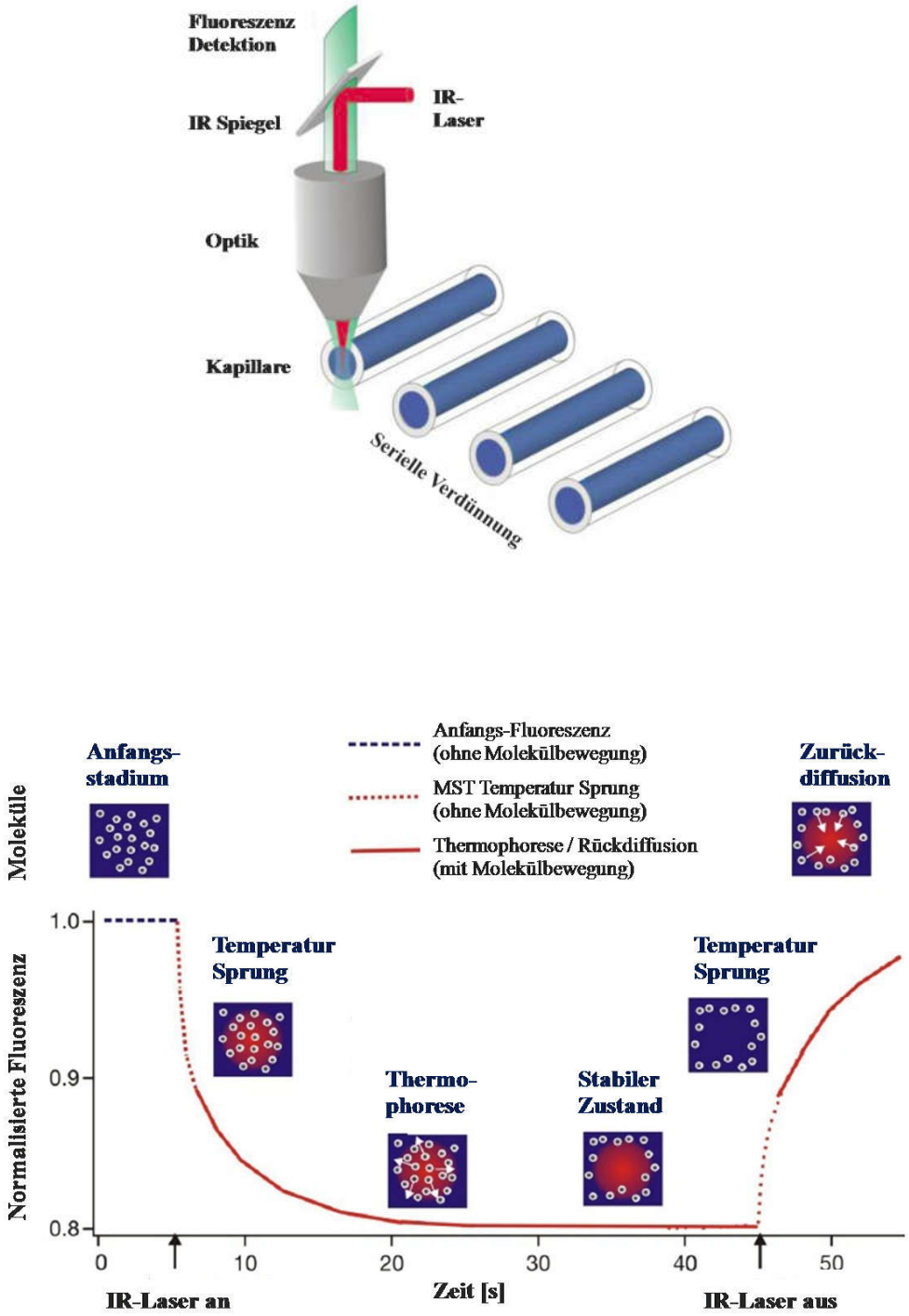


Abb. 11: Verfahren der *Microscale Thermophoresis*. Oben ist der experimentielle Aufbau gezeigt. Rechts ist die Kurve der normalisierten Fluoreszenz gegen die Zeit in Sekunden während des Messprozesses aufgetragen. Über bestimmten Werten ist die Abbildung des Molekularprinzips gezeigt (verändert nach www.nanotemper.de, Stand 03.03.2015).

Für die Messung wurde OspD1 (bei den OspD1-Peptiden analog Spa15) mit dem Farbstoff *RED fluorescent dye NT-647* markiert. Dazu wurde das *Monolith*

NT™ Protein Labeling Kit RED verwendet. Dieses Kit wurde vor allem für die Verwendung von Proteinen mit einer Molekülmasse von über 20 kDa optimiert. Alle Schritte wurden nach dem dazugehörigen Handbuch von Nanotemper durchgeführt. Markiert wurden die verkürzten Varianten von OspD1 (Endkonzentration 30 nM) oder im Falle der Messung von OspD1-Peptiden Spa15. Von Spa15 wurde eine 1:1 Verdünnungsreihe mit einer Endkonzentration von 128 µM in 16 Schritten angefertigt. Ein 30 µl Ansatz wurde aus der Lösung des markierten OspD1 (15 µl) und den verschiedenen Spa15-Konzentrationen (15 µl) zusammenpipettiert.

Um die Interaktion von fluoreszenzmarkiertem OspD1 mit synthetisch hergestellten MxiE-Peptiden (Hasewinkel 2012b) und die Interaktion von fluoreszenzmarkiertem Spa15 mit synthetisch hergestellten OspD1-Peptiden (diese Arbeit) zu untersuchen, wurden die Peptide mit der Feinwaage (CP2P, Sartorius) eingewogen, in reinem DMSO angelöst und als 12 µM Stammlösung aufbewahrt. Zur Messung wurde die Stammlösung so mit Thermophorese-*Labeling*-Puffer verdünnt, dass eine 2,5 % DMSO-Lösung erhalten wurde. In einer Verdünnungsreihe wurden 16 1:1 Verdünnungen je 15 µl angesetzt. Dazu wurden 15 µl fluoreszenz-markiertes OspD1 oder Spa15 (Endkonzentration 30 nM) zugeben und vermischt.

Nach einer Inkubationszeit von 15 min. wurden die Proben 10 min. bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Danach wurde je eine Standard-Glaskapillare (Nanotemper) mit ca. 5 µl Probe beladen. Dabei wurde darauf geachtet, die Kapillare beim Befüllen nicht an den Boden des *Eppendorf Cups* zu drücken, damit keine größeren Partikel die Messung störten. Die Kapillare wurde in das Gerät auf den Adapter gelegt und anschließend die enthaltene Lösung dreimal bei 20 % LED *Power* und verschiedener MST-*Power* (20 %, 40 % und 80 %) gemessen. Die Auswertung aller Daten erfolgte mit der Analysesoftware *Nanotemper Analysis* der Firma Nanotemper Technologies, wobei als Relation für das Thermophoresesignal die Option „*Thermophoresis + Jump*“ gewählt wurde.

3.4.13 *Thermal Shift Assay (TSA, Thermofluoro-Messung)*

Es gibt viele Faktoren wie pH-Wert, Salzkonzentration und Interaktionen mit Liganden, die einen Effekt auf die Stabilität der Proteine haben. Viele Kombinationen der Faktoren sind denkbar. Man kann diese Faktoren testen, um

optimale Umgebungsbedingungen für eine maximale Proteinstabilität zu schaffen. Eine einfache und schnelle Methode ist der *Thermal Shift Assay*. Hierzu benötigt man einen leicht messbaren Fluoreszenzfarbstoff wie *Sypro Orange* (Invitrogen, Karlsruhe). Proteine sind meistens so aufgebaut, dass ihre im nativen Zustand dem Wasser zugewandten Oberflächen hydrophil sind. Daher kann der Farbstoff nicht binden. Bei der Entfaltung des Proteins wird der hydrophobe Kernbereich zugänglich. Dadurch kann der Farbstoff in hydrophoben Taschen gebunden werden. Dies führt zu einer massiven, messbaren Zunahme der Fluoreszenz. Trägt man die Temperatur gegen die Fluoreszenz auf, ist das Ergebnis eine näherungsweise sigmoidale Kurve, aus der die Schmelztemperatur (T_m) errechnet werden kann. In der Praxis ist die Kurve nie exakt sigmoidal, weil durch Präzipitation Protein aus der Lösung entfernt wird, und die Fluoreszenz des Fluorophors bis zu einem bestimmten Grad von der Temperatur abhängig ist. Dies führt dazu, dass nach Erreichen eines Fluoreszenzmaximums die Fluoreszenz mit weiter ansteigender Temperatur wieder langsam abnimmt (siehe Abb. 12). *TSA*-Messungen können zum Screening von Liganden und optimierten Pufferbedingungen für Proteine verwendet werden. Beides wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Erste *Thermal Shift*-Messungen wurden von Dr. Stephane Boivin am EMBL in Hamburg für die Proteine OspD1 und IpgC durchgeführt. Um die Ergebnisse von Dr. Boivin am hauseignen Gerät (iQ5 RTPCR QPCR, Biorad) zu reproduzieren, wurde die Methode basierend auf einem Protokoll von Pantoliano und Kollegen (Pantoliano et al. 2001) verwendet.

Um die Stabilität der untersuchten Proteine unter variierenden Pufferbedingungen und verschiedenen Natriumchloridkonzentrationen zu testen, wurden zu 37 µl der Proteinlösung (20 µmol/ml) mit 1 µl einer 5000-fachen Lösung von *Sypro Orange* (Invitrogen, Karlsruhe) in dH_2O gemischt. Das jeweilige Ansatzvolumen betrug 40 µl bestehend aus 38 µl *Mastermix* (Protein, H_2O und *Sypro Orange*) und 2 µl der verschiedenen Puffer-Lösungen. Ein Negativansatz (Nullwert), welcher das Verhalten des Proteins in H_2O beschreiben sollte, bestand aus 38 µl *Mastermix* und 2 µl H_2O.

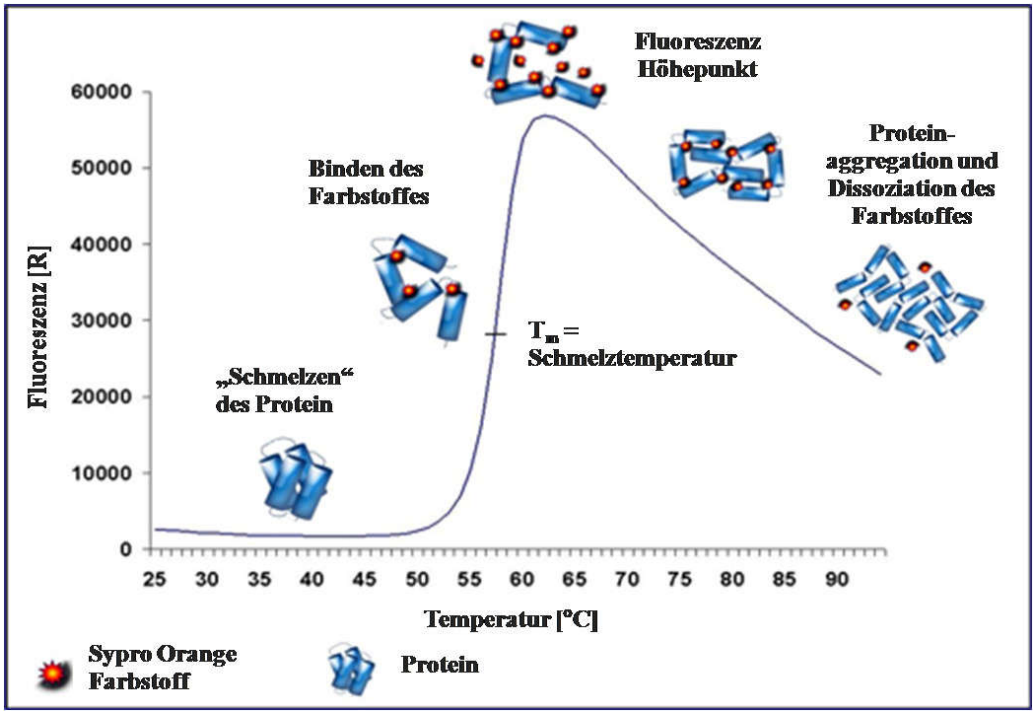


Abb. 12: ***Thermal Shift Assay*:** Proteine zeigen bei Erhöhung der Temperatur einen Verlust ihrer nativen Tertiärstruktur. Während des *Assays* wird das Fluorenzsignal des Farbstoffs *Sypro orange* detektiert. Dieser lagert sich bei Entfaltung des Proteins an dessen exponierte, hydrophobe Regionen an. Die Schmelztemperatur (T_m) erhöht sich in Anwesenheit der Liganden, welche stärker an den nativen Zustand des Proteins binden als an das ungefaltete Protein. Dadurch kann auf die Bindungsstärke des Liganden geschlossen werden (entnommen aus http://www.bio.anl.gov/molecular_and_systems_biology/Sensor/sensor2.html, Stand 05.03. 2015).

Für ein Screening der hauseignen Fragmentbibliothek wurden 20 µM des zu untersuchenden Proteins mit 1 µl einer 5000-fachen Lösung von *Sypro Orange* in Thermophoresepuffer gelöst. Das Ansatzvolumen betrug 40 µl und bestand aus 39 µl / 38 µl Mastermix und 1 µl / 2 µl der jeweiligen Stammlösungen 100 mM / 50 mM in DMSO (Köster et al. 2011). Als Negativansatz diente reines DMSO.

Die Ansätze wurden in einer 96-*well* Platte mit einem speziellen Plastikfilm der Firma BioRad versiegelt. Anschließend wurden sie in 0,5 °C-Schritten von 20 °C auf 80 °C erhitzt. Dabei wurde das Fluoreszenzsignal von *Sypro Orange* nach jeder Temperaturerhöhung gemessen.

Tabelle 14: Zusammensetzung des Mastermixes beim *Thermal Shift Assay*

Zusatz	*Menge (1000 µl)*
Protein	20 µM
5000x Sypro Orange Farbstoff	1 µl
dH_2O oder	
Thermophoresepuffer	ad 1000 µl

3.4.14 Dynamische Lichtstreuung *(Dynamic Light Scattering)*

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine etablierte Technik im Bereich der Proteinkristallographie. Mit der DLS können wichtige Kriterien für die Kristallisierbarkeit von Proteinen wie hydrodynamische Radien, Verteilungsbreiten (Polydispersitäten) und Aggregationseffekte von Proteinproben bestimmt werden. Liegt eine Probe monomodal (einheitlich) vor, so ist die Wahrscheinlichkeit, sie kristallisieren zu können, wesentlich höher als bei polydispersen Systemen (viele unterschiedlich große Einheiten) (D'Arcy 1994).

Ein modernes DLS-Instrument ist mit einem kompakten Diodenlaser und einer hochwertigen Faseroptik ausgestattet. Diese Instrumente messen in sehr kurzen Zeitabständen die Streulichtintensität einer Probe und korrelieren die Messwerte miteinander. Durch die unterschiedlich schnellen Bewegungen von großen und kleinen Makromolekülen entsteht eine definierte Korrelationsfunktion, aus der über einen mathematischen Fit der Diffusionskoeffizient D der gelösten Makromoleküle bestimmt werden kann. Aus diesem wiederum kann der hydrodynamische Radius R der gelösten Probe ermittelt werden:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

Dabei ist k die Boltzmann-Konstante, T stellt die Temperatur und η die Viskosität des Lösungsmittels dar (Meyer et al. 2015).

Die ersten Messungen wurden am Gerät Spectro Size 300 (Nano Biochem

Technology NaBiTec) in der Arbeitsgruppe von Prof. Betzel am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg durchgeführt. Die Ergebnisse wurden analog auf dem hauseignen Gerät Spectro Size 300 (Molecular Dimensions, Hamburg) reproduziert.

Die zu vermessenden Proteinproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und auf Eis gelagert. Zunächst wurden die Proteinproben bei 4 °C für 5 min. und in einem zweiten Durchlauf 60 min. bei 13.000 rpm (16.000 g; Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert. Danach wurden 10 µl der Probe in eine Küvette luftblasenfrei pipettiert. Die Küvette wurde in der Messkammer des Geräts positioniert, und die Messung am verbundenen PC gestartet. Dabei wurde jede Messung mit 30 s eingestellt und 25-mal hintereinander wiederholt. Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung wurden in der Histogramm- und *carpet*-Darstellung visualisiert.

3.5 Kristallographische Methoden

Die röntgenkristallographische Untersuchung eines Proteins erfordert zuallererst Protein, welches in hoher Reinheit und Homogenität vorliegt. Die Kristallisation von Proteinen ist ein multidimensionales Optimierungsproblem mit vielen variierbaren Parametern.

3.5.1 Kristallisations*screening*

Bis heute ist es nicht möglich, Kristallisationsbedingungen für Proteine verlässlich vorherzusagen. Kristallisationsbedingungen, unter denen streuende Kristalle des verwendeten Proteins wachsen, werden daher durch Testen vieler Bedingungen gefunden (Rhodes 2006). Beim Versuch, ein Protein zu kristallisieren, steht deshalb zu Beginn meist ein statistischer Ansatz mit verschiedenen Präzipitations-bedingungen nach dem Prinzip des *sparse matrix screens* (Carter 1979; Jancarik et al. 1991)

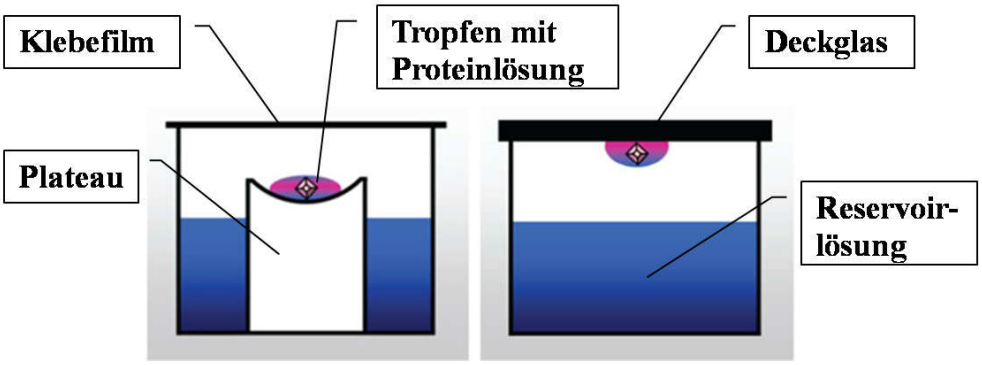


Abb. 13 Der Tropfen der proteinhaltigen Lösung kann entweder in einer Vertiefung überhöht **über der Reservoirlösung sitzen (*Sitting Drop*)** oder **hängend über dem Reservoir platziert werden (*Hanging Drop*)** (modifiziert nach http://molecularsciences.org/files/images/drop-web.gif).

Durch die Kristallisation sollen Einkristalle erhalten werden, die aber anders als bei kleinen Molekülen oder Salzen bis zu 60 % Wasser enthalten können. Bei der Kristallisation von Proteinen wird in der Regel die Methode der Dampfdiffusion (McPherson 1982) angewendet, wobei man zwischen dem Verfahren des *Hanging Drop* und des *Sitting Drop* unterscheidet (siehe Abb. 13).

Dort erfolgt die Kristallisation durch langsame Konzentrationsänderungen der Präzipitanz-, Salz- oder Proteinlösungen bei konstantem pH-Wert und konstanter

Temperatur. Es wird über ein Reservoir mit definierter Pufferkonzentration ein proteinhaltiger Tropfen mit geringerer Pufferkonzentration positioniert.

Durch Mischen der Reservoirlösung mit der Proteinlösung entsteht eine geringer konzentrierte Salzlösung im Vergleich zum Reservoir, welche durch Einstellen des Wasserdampfgleichgewichtes im geschlossenen System den Konzentrationsausgleich anstrebt. Durch Wasserabgabe nimmt das Volumen des Proteintropfens ab und die Konzentration von Protein und Präzipitat zu, was im günstigsten Fall zur Kristallisationen des Proteins führt.

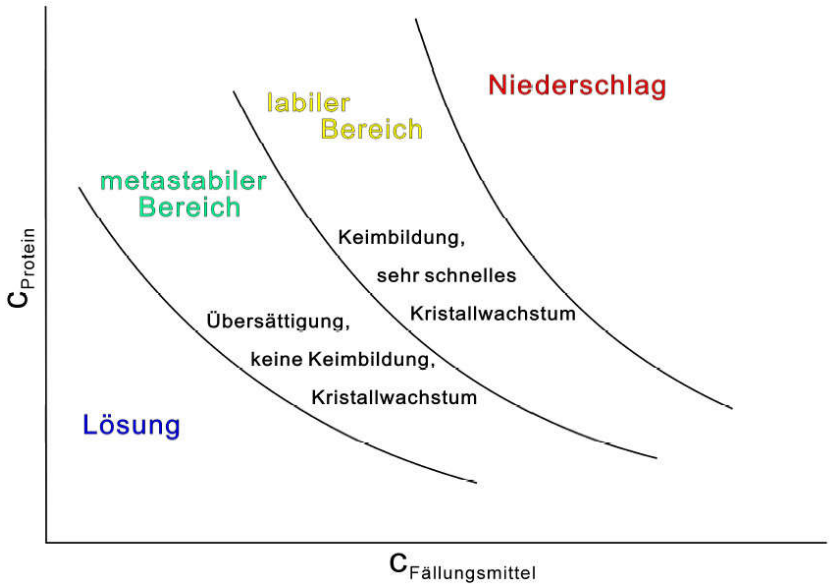


Abb. 14: Schematisches Phasendiagramm der Proteinkristallisation. Bei der Kristallisation unterscheidet man prinzipiell zwei Schritte: 1. die Keimbildung (Nukleation) und 2. das Kristallwachstum. Beide Schritte erfolgen bei richtig gewählten Bedingungen in einem Bereich des Phasendiagramms, der als übersättigte Lösung bezeichnet wird. Allerdings benötigt man ein höheres Maß an Übersättigung für die Keimbildung als für das Kristallwachstum. Der Keimbildungsbereich wird auch als labile Zone bezeichnet, der Wachstumsbereich als metastabile Zone. Zur Keimbildung muss man also die labile Zone erreichen (entnommen aus JBS Proteinkristallisation *Starter Kit Manual*, Jena Bioscience 04/15).

Bei der Keimbildung, der ersten Phase der Kristallisation, bilden sich so bereits erste geordnete Proteinaggregate, an die sich in der Phase des Wachstums weitere Moleküle anlagern können. Die Keimbildung ist generell energetisch aufwändig, während das weitere Wachstum des Kristalls ein exergonischer Prozess ist. Um ein geeignetes Mileu für die Kristallisation des Proteins zu schaffen, werden verschiedene Arten von Additiven zugegeben, sowie der pH-Wert und die

Temperatur variiert.

Tabelle 15: Additve bei der Dampffusions-Proteinkristallographie

Faktoren	***Eigenschaft***	***Anmerkungen***
Präzipitanzien	Löslichkeit des Proteins wird erniedrigt	Ethanol, Isopropanol, 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD), Polyethylenglycole (PEG) oder verschiedene Salze
pH-Wert	Löslichkeit aller Proteine hängt vom pH-Wert ab	Am isoelektrischen Punkt hat das Protein seine niedrigste Oberflächen-Nettoladung sowie seine niedrigste Löslichkeit
Temperatur	Bestimmt den Dampfdruck	Konzentrationsausgleich wird darüber mitbestimmt
Detergenzien	Löslichkeit des Proteins wird erhöht	Aufgrund bestimmter Wechselwirkungen kann ein Molekül mit hohen hydrophoben Anteilen zu einem geordneten Kristallwachstum kommen
Salzzugabe	Ionenstärke der Lösung kann erhöht werden	Löslichkeit der Proteine kann ab- oder zunehmen
Crosslinker	Sind vernetzende Reagenzien	Können unter bestimmten Bedingungen das Kristallwachstum positiv beeinflussen

3.5.2 Durchführung der Kristallisationsexperimente

Zur Kristallisation wurde in der vorliegenden Arbeit die Dampfdiffusions-Methode sowohl nach dem *Hanging Drop*-Verfahren als auch nach dem *Sitting Drop*-Verfahren angewandt (siehe Abb. 13).

Zur Kristallbildung der Proteine wurden geeignete Pufferlösungen mit dem hauseigenen Satz an Kristallisierpuffern (*in-house screens*) als auch mit *Screens* des Kristallisationsroboters Digilab Honeybee 963™ im MAR**X**TAL–Kristallisationslabor (https://www.uni-marburg.de/fb15/ag-essen/marxtal) ermittelt. Die *Screens* zur Kristallisation können systematisch die Konzentration eines Pufferbestandteiles oder den pH-Wert ändern oder beinhalten eine Zusammenstellung von Puffern, bei der bereits einmal eine Kristallisation von Protein stattfand. Die Proteinlösung hatte eine Ausgangskonzentration von etwa

10 mg/ml und wurde zuerst bei 4 °C für 30-60 min. bei 13.000 rpm in der Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus) von eventuell vorhandenem Präzipitat befreit.

Beim *Screening* mit *in-house screens* (siehe Tabelle 16) wurde die *Sitting Drop*-Methode benutzt, wobei Kristallisationsplatten mit je 24 voneinander abgetrennten Kammern zum Einsatz kamen. Die Proteinkonzentration wurde durch Verdünnung der Ausgangskonzentration zu Beginn auf 10 mg/ml variiert. In das Reservoir wurde manuell ein Anfangsvolumen von 1000 µl Pufferlösung eingefüllt. In das Vorratsgefäß für die Proteinlösung wurde manuell ein für das *Screening* ausreichendes Volumen an Proteinlösung pipettiert. Das Zusammenpipettieren aus 1-2 µl Proteinlösung und dem gleichen Volumen an Reservoirlösung erfolgte ebenfalls manuell. Die Kristallisationsplatte wurde mit *Crystal Clear Sealing Tape* luftdicht verschlossen und bei 4 °C oder 20 °C gelagert.

Tabelle 16: Kristallisations*screens In-House* mit Eigenschaften und Hersteller

Name	***Eigenschaft***	***Anzahl***	***Hersteller***
Wizard I & II	Erfolgsscreen	96	Emerald Biosciences
Cryo I & II	Erfolgsscreen	96	Emerald Biosciences
Crystal	Erfolgsscreen	48	Hampton
PEG 6000	Systematisch	24	Hampton
Ammoniumsulfat	Systematisch	24	Hampton
MIDAS™	Erfolgsscreen	96	Molecular Dimensions
ProPlex™	Erfolgsscreen	96	Molecular Dimensions

Das *Screening* mit den Kristallisations-*Screens* der Firma Qiagen wurde mit Hilfe des Pipettierrobotor Digilab *Honeybee* 963™ durchgeführt. Dabei betrug das Reservoirvolumen 80 µl und das Volumen der Kristallisationstropfen 0,30 µl (zusammengesetzt aus 0,15 µl konzentrierter Proteinlösung und 0,15 µl Kristallisationspuffer). Die verwendeten Kristallisationsplatten waren *96-well NeXtal Evolution µplate*-Platten der Firma Qiagen. Für diese Platten wurde das *Sitting Drop* -Verfahren verwendet. Auf den zwei Plateaus wurden zwei verschiedene Proteinkonzentrationen (meist 10 mg/ml und 5 mg/ml) gleichzeitig angesetzt. Die

Kristallisationsplatten wurden unverzüglich nach dem Pipettieren mit *VIEWseal* verschlossen. Mit den zwei Formulatrix Rock Imager™-Dokumentationssystemen wurde die Inkubation bei 4 °C und bei 20 °C durchgeführt. Um den zeitlichen Ablauf des Experimentes zu beobachten, wurden in regelmäßigen Abständen Fotos mit Hilfe des Dokumentationssystems unter einem Mikroskop aufgenommen.

Tabelle 17: Kristallisations*screens* mit Kristallisationsroboter Digilab Honeybee 963™ mit Eigenschaften und Hersteller

Name	***Eigenschaft***	***Anzahl***	***Hersteller***
Cryos	Erfolgsscreen	96	Qiagen
Classics	Erfolgsscreen	96	Qiagen
Classics light	Erfolgsscreen	96	Qiagen
PACT Suite	Erfolgsscreen	96	Qiagen
JSCG Core I-IV	Erfolgsscreen	384	Qiagen
JSCG+	Erfolgsscreen	96	Qiagen
MBC I & II	Erfolgsscreen	192	Qiagen
AmSO4	Erfolgsscreen	96	Qiagen
Anions	Erfolgsscreen	96	Qiagen

Nach einigen Tagen wurden die Proteintropfen visuell auf Kristalle untersucht, wobei die Kristallisation mit erfolgreichen Bedingungen in größerem Maßstab reproduziert wurde, um größere Kristalle zu erhalten. Alle beobachteten Kristalle wurden zunächst mit dem *Izit crystal dye* (Hampton Research) angefärbt, um Salzkristalle von Proteinkristallen unterscheiden zu können. Bei erfolgreicher Reproduktion wurden die Kristalle an einem *in-house*-Röntgendiffraktometer auf ihr Streuvermögen getestet.

3.5.3 Optimierung erfolgreicher Kristallisationsbedingungen

Die erhaltene initiale Kristallisationsbedingung wurde mit Hilfe weiterer Feinabstimmung durch systematische Variation der pH- und Präzipitanz-Bedingungen und schließlich der Tropfenverhältnisse (1,5:1, 2:1, 3:2 und 4:2 µl Protein- zu Präzipitanzlösung) optimiert.

3.5.3.1. *Seeding*

Da die Nukleation von Proteinkristallen ein vom Kristallwachstum nahezu unabhängiger Prozess ist und einen hohen Grad an Übersättigung der Proteinlösung erfordert, während das Wachstum von wohlgeordneten Proteinkristallen durch eine geringe Übersättigung begünstigt wird, kann es sinnvoll sein, beide Prozesse zu entkoppeln und in Kristallisationstropfen einzelne Kristallisationskeime einzubringen. Beim sogenannten *Seeding* werden Impfkristalle aus Ausgangskristallen für die Züchtung von größeren Kristallen verwendet (Bergfors 2003). Das primäre Ziel von *Seeding* in der Proteinkristallographie ist, Kristalle besserer Qualität und meist auch größere Kristalle zu erhalten. So findet es häufig Anwendung, wenn Kristallisationen nur kleine und schlecht streuende Kristalle hervorbringen.

Proteinkristalle, vor allem kleinere Exemplare, wurden mittels *Macroseeding* in neue Tropfen mit derselben Konstellation umgesetzt. Dazu wurden die Kristalle mit Hilfe eines *Loops* gefischt und in einem Tropfen der entsprechenden Kristallisationsbedingung gewaschen. Anschließend wurden die Kristalle erneut in entweder einen frisch angesetzten Tropfen oder auch in einen Tropfen, der noch klar war (wenn vorhanden), überführt.

Beim sogenannten *Microseeding* wurden größere Kristalle vorsichtig zerstoßen. Als gängigste Form des *Microseedings* wurde das *Streakseeding* eingesetzt. Dabei wurden die Kristallsplitter beim Durchziehen eines Tropfens, in dem Kristalle zerstoßen waren, mit Hilfe eines Pferdeschweifhaares aufgenommen. Anschließend wurden durch Durchziehen des Haares in klare Tropfen die anhängenden Kristallsplitter in den Tropfen abgegeben. Hierbei wurde das Haar nach jedem Tropfen ausgewaschen und neu benetzt. In einem weiteren Versuch wurde das Haar nacheinander durch verschiedene Tropfen gezogen, wenn sich viele Kristallsplitter am Haar befanden. Neben dem *Streakseeding* kam auch ein Kit von

Hampton mit *Sead Beads*^{TM} zum Einsatz, welches als Form des *Microseedings* eingesetzt wurde. Hier wurden einige Kristalle mit Hilfe einer Kugel in einem Eppendorfreaktionsgefäß im Ultraschallbad oder Vortexer mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde eine serielle Verdünnungsreihe gemäß dem Handbuch angesetzt und diese dann im *Sitting Drop*-Verfahren ausplattiert (Bergfors 2003).

3.5.3.2. **Zugabe von Additiven**

Additive werden eingesetzt, um die Löslichkeit und die Kristallisation der biologischen Makromoleküle, also sowohl von löslichen Proteinen als auch von Membranproteinen zu beeinflussen.

- **Zugabe von Ectoin:** Harjes et al. (2004) berichteten, dass bei Zugabe von 100 mM (*S*)-2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure (Ectoin) zu einer erfolgreichen Kristallisationsbedingung die Kristalle gleichmäßiger und bis zu ihrer fünffachen Größe wuchsen. Deswegen wurde zu erfolgreichen Kristallisationsbedingungen je 1 µl aus 1 M Ectoinstammlösung zum Kristallisationstropfen (Volumen des Tropfens 3 µl) gegeben (Harjes et al. 2004).
- **Zugabe von Kronenether:** Lee et al (2014). berichteten, dass es bei Zugabe von 16 Krone-8-ether in einer Konzentration von 25-50 mM zu einer Verbesserung der Kristallqualität sowie Vergrößerung der Kristalle in fast der Hälfte der getesteten Fälle kam. Deswegen wurde zu den Tropfen 16 Krone-8-ether im Verhältnis 1 % zur Proteinkonzentration geben (Volumen des Tropfens 3 µl) (Lee et al. 2014).
- **Zugabe von Zinksulfat:** Zur Kristallisationsbedingung wurde ein Zusatz von 100 mM Zinksulfat-Heptahydrat gegeben (Cha et al. 2012).
- **Additiv*screen* von Hampton:** Die Additive dieser Reagenzien-Bibliothek können die Proben-Lösungsmittel-Wechselwirkungen manipulieren, aber auch die Wasserstruktur verändern und verbessern. Außerdem sind sie in der Lage, durch spezifische Interaktion mit den Makromolekülen Kristallisationsprozesse zu stabilisieren und so zu einer Verbesserung der Kristallqualität zu führen. Hierbei wurde nach dem dazugehörigen *Manual* gearbeitet. Das eingesetzte Resevoirvolumen betrug 1000 µl. Auf dem Plataeu wurde im *Sitting Drop*-Verfahren zunächst 2 µl Proteinlösung mit 0,5 µl eines

nichtflüchtigen Additivs vermischt und anschließend mit weiteren 2 µl der Kristallisationsbedingung. War das Additiv flüchtig, wurden davon 100 µl zu 900 µl Kristallisationsbedingung als Reservoirlösung eingesetzt und ein Tropfenverhältnis von 2 µl Protein : 2,5 µl Reservoirlösung gewählt (Cudney et al. 1994).

- ***Silica-Hydrogel Kit™* von Hampton:** Je nach Makromolekül und ausgewählter Bedingung kann das Gel Kristallwachstum verlangsamen und bietet zusätzliche Stabilität, so dass es Kristallen ermöglicht, größer zu wachsen. Das Silica-Hydrogel wurde eingesetzt wie im *Manual* beschrieben (Robert et al. 1992).

3.5.3.3. Co-Kristallisation

Bei mehreren der oben genannten *Screens* (vergleiche Tabelle 16 und Tabelle 17) wurde zusätzlich die Co-Kristallisation angewandt. Hierbei wurden zum eigentlichen Protein entweder ein weiteres Protein (z.B. bei OspD1 Spa15) oder Peptid hinzugegeben und 30 min. inkubiert, bevor die Lösung zentrifugiert wurde.

3.5.3.4. *Free Mounting System*

Um die Qualität der Kristalle weiter zu verbessern, wurden die Kristalle der Methode des *Free Mounting Systems* (FMS) unterzogen. In diesem System umgibt ein Luftstrom mit regelbarer Feuchte den Kristall, wodurch der Wassergehalt im Kristall gezielt verändert werden kann. Die relative Feuchte des Luftstroms kann auf 0-100 % eingestellt werden.

Der Kristall wurde in den Röntgenstrahl eines Drehanodengenerators gebracht und die Qualität des Kristalls und das Streuvermögen über mehrere Diffraktionsbilder hinweg beobachtet. Kontrollierte Reduktion der Humidität des Gasstroms und dementsprechend auch der Kristalle hat oft zu einer Steigerung der Streuqualität geführt (Kiefersauer et al. 2000). Um geeignete Bedingungen für Kristalle zu finden, wurden zunächst Kristalle des Modellproteins Lysozym in einen speziellen Loop der FMS-Apparatur eingespannt. Anschließend wurde die Start-Humidität des Gasstroms durch visuelle Überprüfung des konstanten Tropfenvolumens bestimmt (Überwachung und Auswertung mit dem zugehörigen Videosystem). Die Kristalle wurden von der restlichen Mutterlösung mit einem Wattefilter vorsichtig entfernt. Danach begann die Reduktion der Humidität und es

wurden Testbilder bei jeder Absenkung aufgenommen, um den Punkt zu ermitteln, an dem die Streuung des Kristalls zu einem Maximum bezüglich der Auflösung gebracht werden konnte.

3.5.4 Montieren von Proteinkristallen

Um während der Datenaufnahme die molekularen Eigenbewegungen und Strahlungsschäden in den Kristallen möglichst gering zu halten, werden Messungen meist bei 100 K im Stickstoffstrom durchgeführt. Zur Datensammlung werden die Kristalle in Nylon-Schleifen, die der Größe des Kristalls angepasst sind, montiert. Dies verhindert das vorzeitige Schädigen der Kristalle durch die ionisierende Röntgenstrahlung (Kiefersauer et al. 2000).

Um zu verhindern, dass beim dazu nötigen Einfrieren der Kristalle im flüssigen Stickstoff Eiskristalle entstehen, die die geordnete Struktur im Inneren der Kristalle zerstören würden, muss ein geeignetes Cryoprotektans gefunden werden. Dieses sorgt dafür, dass das Wasser der Mutterlauge zu einem glasartigen Aggregatzustand gefriert. Weiterhin sollte dieses Cryoprotektans keinen Effekt auf die Kristalle haben.

Für die hier verwendeten OspD1-Kristalle hat sich ein Zusatz von 30 % PEG 400 als effektivster Cryopuffer erwiesen. Bei IpgC war es 30 % Glycerol. Wurden Additive oder Peptide zur Kristallisationsbedingung gegeben, waren diese auch der Cryobedingung in entsprechender Konzentration zugefügt.

3.5.5 Datensammlung

Um Strukturen von Proteinen sichtbar machen zu können, muss Licht eines Wellenlängenbereiches verwendet werden, der in der Größenordnung von Atom Abständen liegt. Dazu werden weiche Röntgenstrahlen verwendet, welche in dem benötigten Wellenlängen Bereich von 0,1 bis 0,15 nm (1-1,5 Å) liegen.

Zum Testen wurden die Kristalle an der hauseigenen Drehanode (Bruker X8 PRSPECTOR mit IμS^{TM} Mikrofokusröhre und APEX II CCD Detektor) montiert. Der Abstand zwischen dem Kristall und dem Detektor wurde so gewählt, dass zum einen alle gebeugten Reflexe gemessen werden können, zum anderen diese aber nicht zu stark überlappen. Streuten diese ausreichend wurden sie in Transport Dewars zur Photonenquelle am Helmholz Zentrum Berlin (BESSY II, Berlin) gebracht und dort mit der intensiven und hoch kohärenten Synchrotron-Strahlung an der Beamline 14.1 Streubilder aufgenommen. Alle Kristalle wurden zunächst am Synchrotron bezüglich ihrer

Beugungskraft mit zwei Aufnahmen bei 0° und 90° charakterisiert und die Raumgruppe der Kristalle bestimmt (Leslie 1992).

Von Kristallen mit guten Beugungseigenschaften wurden anschließend Datensätze nach Anpassung der vorgeschlagenen Strategie gesammelt. Alle Messungen wurden unter ständiger Kühlung des Kristalls durch Stickstoff bei einer Temperatur von 100 K durchgeführt

3.5.6 **Phasenproblem**

Während der Datenaufnahme werden nur die Intensitäten I_{hkl} der Reflexe gemessen. Um die Elektronendichte berechnen zu können, werden jedoch die Strukturfaktoren F_{hkl} benötigt. Für diese gilt:

$F_{hkl}=IF_{hkl}I \exp(i\varphi_{hkl})$ [1]

wobei

$If_{hkl}I = \sqrt{IF_{hkl}I}$ [2]

Die Phaseninformation φ_{hkl} geht jedoch während des Messvorganges komplett verloren. Um diese Phaseninformation φ_{hkl} zu erhalten, werden beispielsweise Schwermetallionen in die Einheitszelle eingebaut, woraus sich ergibt:

$F_{hkl}deriv.= F_{hkl}nat+ f_{hkl}$ [3]

Hierbei repräsentiert $F_{hkl}deriv.$ die Strukturfaktoren des mit Schwermetallionen dotierten Kristalls, $F_{hkl}nat$ die Strukturfaktoren des nativen Kristalls und f_{hkl} die Strukturfaktoren des Schwermetalls. Die Strukturfaktoren des Schwermetalls f_{hkl} lassen sich anhand der Strukturgleichung aus der Atomzahl des verwendeten Schwermetalls und seinen Positionen in der Einheitszelle errechnen. Da F_{hkl} schon aus den Datensätzen bekannt ist, erfährt Gleichung [1] eine Lösung. Um die Position(en) des Schwermetalls in der Einheitszelle zu bestimmen, bedient man sich der Patterson-Methode.

3.5.7 Selenomethionin & Schwermetallderivatisierung

Um das Phasenproblem zu lösen, kann man aucch durch die Insertion von Selen ein MAD -(*multi wavelength anomalous diffraction*)-Experiment durchführen. Hierbei wird Selenmethionin mit Hilfe der rekombinanten Proteinbiosynthese in einen methionin-auxotrophen *E.coli*-Stamm eingebaut. Gelingt es, das Selenomethionin-Protein zu kristallisieren, nimmt man während des MAD-Experiments Datensätze bei drei verschiedenen Wellenlängen (*peak*, *inflection* und *remote*) im Bereich der Absorptionskante des anomal streuenden Atoms auf. Für eine Phasierung muss im Protein auf 100 Aminosäuren mindestens ein Methionin vorkommen (Smith und Thompson 1998).

Da in einigen Fällen die Expression von selenomethioninmarkiertem Protein zu Löslichkeitsproblemen oder die Derivatisierung SeMet zu keinem aussagekräftigen Ergebnis führten, wurde versucht, Kristalle mit Schwermetallen zu dotieren, um MAD-Experimente durchführen zu können.

Dazu wurden Kristalle in eine Lösung bestehend aus Muttertropfen und diversen Schwermetalllösungen (v.a. Hg, Pt, Ir) in einer Konzentration von 0,1-10 mM für 20 min. oder länger inkubiert. Anschließend wurde der Kristall mit einem Loop gefischt und schnell durch das Cryoprotektans gezogen, bevor er zur Datenaufnahme montiert wurde. Da bei Verwendung von Cu-Kα-Strahlung kein anomales Signal detektiert werden kann, muss zur Beurteilung der Qualität eines potentiellen Derivates der Kristalle mit der entsprechenden Wellenlänge am Synchrotron gemessen werden. Die Absorptionskante kann sich dabei in den Proteinkristallen im Vergleich zu der theoretischen ermittelnden etwas verschieben. Man beschreibt das anomale Streuverhalten mit den Streufaktoren f‘ und f‘‘ (Hendrickson und Ogata 1997).

3.5.8 Datenprozessierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Programme zur Indizierung der Reflexe und zur Prozessierung genutzt. Zum einen wurde XDS bzw. das Folgeprogramm XDSAPP (Krug et al. 2012) verwendet und zum anderen als Alternative MOSFLM (Leslie 1992). Bei den IpgC Kristallen wurde zusätzlich HKL 2000 und das CCP4-Paket benutzt (Otwinowski und Minor 1997; Winn et al. 2011).

3.5.9 Bestimmung des Wassergehalts (Matthews-Koeffizient)

Die Anzahl der Moleküle pro asymmetrische Einheit wurde über den Matthews-Koeffizienten abgeschätzt (http://www.ruppweb.org/mattprob/default.html, Stand 27.07.2015). Bei dieser Methode wird zugrundegelegt, dass alle Proteine eine vergleichbare Dichte aufweisen. Das Verhältnis zwischen Volumen der Einheitszelle und Molekulargewicht des Proteins sollte zwischen 1,7 und 3,5 Å 3/Da liegen (Matthews 1968). Über die Anzahl der Moleküle in der Einheitszelle kann man dann den Lösungsmittel-Gehalt eines Kristalles berechnen.

3.5.10 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die native PAGE wird üblicherweise unter Bedingungen durchgeführt, unter denen das Protein seine natürliche Konformation behält.

Tabelle 18: Lösungen und Zusammensetzung der nativen PAGE

Puffer	***Zusammensetzung***
5x Tris-Glycin-Puffer	125 mM Tris und 960 mM Glycin in deionisiertem Wasser ad pH 8,3
Nativ Gel-Laufpuffer	Verdünnung von 5x Tris-Glycin-Puffer auf 1x Tris-Glycin-Puffer, Kühlung bei 4 °C
5x Probenpuffer	1,55 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8 0,25 ml 1% Brom 0,7 ml deionisiertes Wasser 2,5 ml Glycerol
APS-Lösung	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat ad 10 ml bidest. H_2O
Coomassie Brillant Blue G 250-Färbelösung (pro Liter)	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,05 % (w/v) *Coomassie Brillant Blue* G 250
Entfärbelösung (pro Liter)	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Zusammensetzung des nativen	2,5 ml 5x Tris-Glycin-Puffer

Gels (5% Gele)	2,1 ml 30% Acrylamid (80:1) 7,9 ml deionisiertes Wasser 87,5 µl 10% APS 12,5 µl TEMED

Im Gegensatz zur SDS-PAGE (siehe 3.4.1), bei der Proteine nur anhand ihrer Größe aufgetrennt werden, erfolgt bei der nativen Gelelektrophorese eine Trennung nach ihrem isoelektrischen Punkt und dem hydrodynamischen Volumen des Proteins. Die native PAGE wird besonders dann eingesetzt, wenn multimere Proteine bzw. Proteinkomplexe im Gel detektiert werden oder wenn nach der Elektrophorese Aktivitätsassays mit dem Protein durchgeführt werden sollen (Rehm und Letzel 2009).

Boggon and Shapiro (Boggon und Shapiro 2000) benutzten die native PAGE als Methode, um damit Schwermetallderivate zu sichten, die potentiell an Aminosäuren innerhalb des zu untersuchenden Proteins binden. Sie konnten beobachten, dass sich die molekularen Veränderungen, die durch Interaktion mit einem Schwermetallderivat entstanden sind, auch im nativen Gel detektieren ließen. Außerdem ist leicht zu sehen, ob ein Protein denaturiert, da es dann nicht mehr innerhalb des Gels wandert. Die native PAGE mit Schwermetallderivaten bietet so eine Möglichkeit, viele Schwermetalle in kurzer Zeit zu untersuchen.

Als Puffer für das Protein und zum Lösen der Schwermetallesalze wurde 20 mM Tris + 300 mM NaCl bei einem pH von 8,0 eingesetzt. In eine Tasche des Gels wurde ein Gemisch aus 5 µl Proteinlösung (2 mg/ml), 5 µl Schwermetallsalzlösung (10 mM) plus 2 µl des 5x Probenpuffers pipettiert. Als Referenz wurde das native Protein ohne Schwermetallsalzzusatz verwendet. Die Kammer der Apparatur wurde in eine mit Eis gefüllte Box gestellt, um den Laufpuffer (1x Tris-Glycin) während des Laufs über 80-90 min. bei 90 V zu kühlen. Als Färbemethode wurde die Coomassiefärbung eingesetzt (siehe 3.4.1).

3.6 Material und Methoden bei der organischen Synthese

Die Festphasenpeptidsynthese (*Solid Phase Peptide Synthesis*, *SPPS*) basiert auf einer schrittweisen Anbindung von Aminosäuren an einen unlöslichen polymeren Träger - das sogenannte Harz. Da die Anbindung über die Säuregruppe erfolgt, muss die Aminogruppe der Aminosäuren durch eine Schutzgruppe geschützt werden. Nach der Entschützung der ersten polymergebundenen Aminosäure wird die nächste N-geschützte Aminosäure zugegeben. Die Kopplung der Aminosäure erfolgt durch ein Kopplungsreagenz unter Zugabe einer Base. Durch wiederholte Durchführung des Zyklus kann das Peptid bis zur gewünschten Länge aufgebaut werden.

3.6.1 Chemikalien der organischen Synthese

In Tabelle 19 sind die Chemikalien für Synthese und Aufreinigung aufgelistet.

Tabelle 19: Chemikalien der organischen Peptidsynthese in alphabetischer Reihenfolge

Name	***Hersteller***
Acetonitril	Sigma-Aldrich
Dimethylformamid (DMF)	ACROS Organics
Essigsäure 99 %	Roth
Trifluoressigsäure (TFA)	Solvay Chemicals
Diisopropylehtylamin (DIPEA)	Iris Biotech
Phenol	Riedel-deHaën
1,2 Ethandithiol	Fluka
Thioanisol	Fluka
N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)	Iris Biotech
Piperidin	Iris Biotech
2-(1H Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl uroniumhexafluorophosphat (HBTU)	Iris Biotech
1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)	Orpe Gen Pharma
Triisoproylsilan (TIS)	Alfa Aesar
Diethylether	Sigma-Aldrich
Rin-Amid-Harz : 0,68 mmol (bis 10AS) und 0,41 mmol (ab 10 AS)	Varian
Triton X-100	Freka
TEMED	Roth

In Tabelle 20 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 steht 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 20: Verwendete Aminosäuren mit ihren Schutzgruppen: Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe, *t*Bu = *tert*-Butylester-Gruppe, BOC = *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe

Name	***Hersteller***
Fmoc-Alanin-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Aspartat-(O*t*Bu)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Glycin-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Glutamat-(O*t*Bu)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Isoleucin-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Lysin-(BOC)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Methionin-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Norleucin-OH	PolyPeptide Group
Fmoc-Serin-(*t*Bu)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Threonin-(*t*Bu)-OH	Orpe GenPharma
Fmoc-Valin-OH	Orpe GenPharma

3.6.2 Geräte der organischen Synthese

In Tabelle 21 sind die für die Peptidsynthese und -aufreinigung verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 21: Geräte der organischen Peptidsynthese in alphabetischer Reihenfolge

Name	***Hersteller***
Analytische HPLC CTO-10 A, LC-10AT, SPD-M11A	Shimadzu
Analytische Säule Nucleodur C18, 5 µm, 100 Å, 4,6•250 mm	Machery-Nagel
Eppendorfpipetten	Eppendorf
Falconröhrchen 50 ml	Greiner
Feinwaage BP211D	Sartorius
Fraktionskollektor Varian Modell 701	Varian
Inlay	VWR
Jodzahlkolben	Schott
Lyophilisationsanalage Alpha 2-4 LDplus	Christ
Messzylinder	Schott
Päparative HPLC Varian PrepStar Modell 218	Varian
Pasteurpipetten	VWR
Pipettenspitzen	VWR
Polypropylenspritzen 2 ml mit Teflonfritte	Intavis
Präparative Säule VP 250/32 Nucleodur 100-5 C18ec	Machery-Nagel
QTrap 2000 ESI Massenspektrometer	Applid Biosystems
Reaktionsgefäße 1,5 ml	VWR
Reinstwasseranalage ARIUM631	Nowapure Select
Rotationsverdampfer Rotapour RE111	Büchi
Syntheserobotor SYRO 2000	MultiSynTech
Szintillations-Gefäße	VWR
Ultraschallbad Bandelin	Sonorex
Vial	VWR
Vortexer REAX2000	Heidolph
Waage SI-234	Denver Instrument
Waage SI-603	Denver Instrument
Zentrifuge Galaxy 14D	VWR

3.6.3 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 REAX 2000 (Heidolph) benutzt. In Tabelle 22 sind die verwendeten Lösungen für die Synthese und Aufreinigung aufgelistet.

Tabelle 22: Verwendte Lösungen der Peptidsynthese und ihre Zusammensetzung

Name	*Zusammensetzung*
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	Piperidin/NMP/DMF (1:1) 1 % Triton X-100
Fmoc-Aminosäure-Lösung	0,5 M Fmoc-Aminosäure in HOBT-Lösung
Acetylierungslösung	0,5 M Esigsäure in HOBT-Lösung
Abspaltlösung	TFA/TIS/Wasser (95 : 2,5 : 2,5)

3.6.4 Festphasenpeptidsynthese mittels Syntheseroboter

Mit Hilfe des Syntheserobotors SYRO 2000 von MultiSynTech wurde mittels Festphase das Standard-Fmoc-Protokoll durchgeführt, um die entsprechenden Peptide zu synthetisieren (siehe schematische Darstellung Abb. 15). Für jedes Peptid wurden 80 mg des Fmoc-Rink-Amid-Harzes mit der Feinwaage BP211D in eine 2 ml Polypropylenspritze mit Teflonfritte eingewogen, welche dann in den Syntheseroboter SYRO 2000 eingespannt wurden. Der Roboter wurde mit der HBTU-Lösung, Piperidin/NMP/DMF-Lösung, NMP, DIPEA-Lösung und DMF bestückt. Die genannten Flüssigkeiten wurden zum Spülen zwischen den Lösungen, zum Quellen und Waschen des Harzes benutzt. Der Roboter pipettierte nacheinander die verschiedenen Gemische in die Spritzen, und nach einer gewissen Inkubationzeit wurde die Lösung automatisch abgesaugt. Das Peptid wurde also beginnend vom C-Terminus zum N-Terminus aufgebaut.

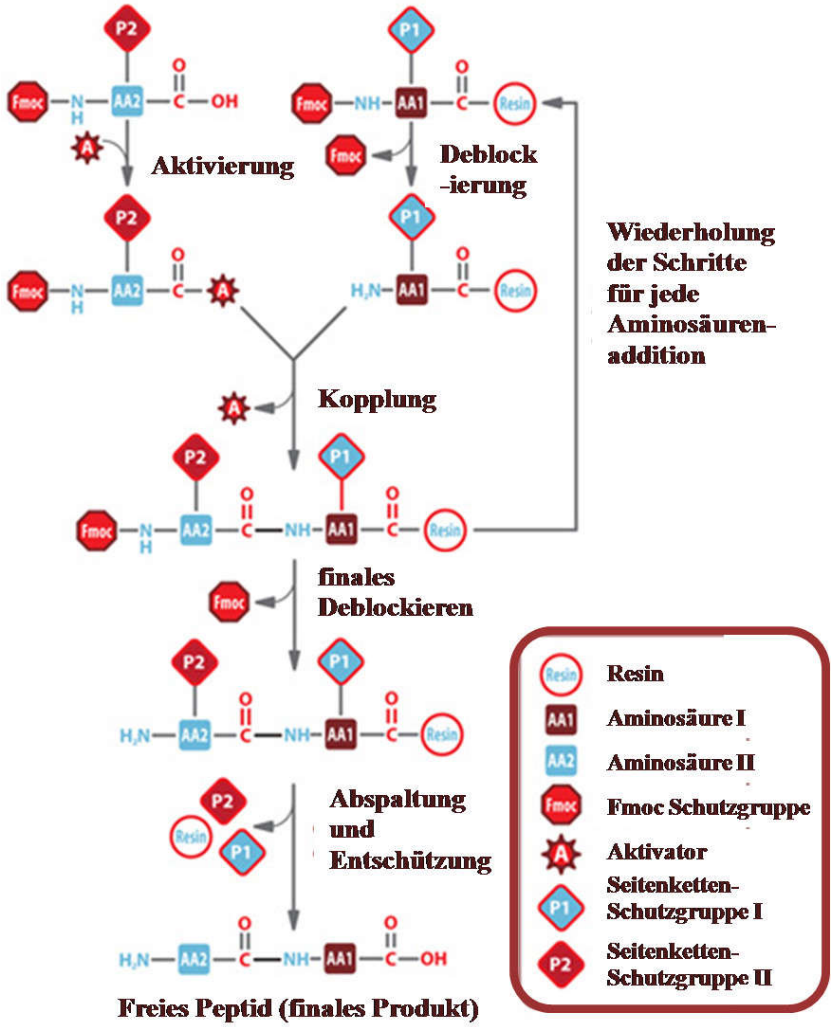


Abb. 15: Schematische Darstellung der iterativen Peptidsynthese mittels Fmoc-Protokoll (modifiziert nach http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-peptides/product-highlights/pepscreen-peptides/pepscreen-brochure/custom-peptide-libraries.html, Stand 20.03.2015).

Im ersten Synthesezyklus 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 Acetylierungslösung, welche analog zu den Fmoc-Aminosäure-Lösungen eingesetzt wurde, weshalb sich zum

Beispiel für 20 zu koppelnde Aminosäuren 21 Zyklen ergaben (Protokoll nach (Hasewinkel 2012b). In der Tabelle 23 befinden sich die Reaktionszeit, Anzahl und die Volumina der einzelnen Lösungen für die jeweiligen Schritte im Zyklus.

Tabelle 23: Reaktionszeiten, Anzahl und Volumina der Reaktionsschritte. Im ersten Zyklus wurde für den Abspaltschritt *= 30 min. verwendet, ab dem zweiten Zyklus 20 min.

Schritt	*Lösung*	*Volumen*	*Anzahl*	*Zeit*
Quellen	DMF	1200 µl	2	10 min.
Abspalten	Piperidin/ NMP /DMF	1200 µl	2	20/30 min.*
Waschen	DMF	1200 µl	2	1 min.
Koppeln	Fmoc-AS + HBTU + DIPEA	400 µl + 400 µl + 270 µl	2	95 min.
Waschen	DMF	1200 µl	2	1 min.

3.6.5 Peptidabspaltung von der Festphase

Die gewonnenen Peptide konnten mit der Abspaltlösung vom Harz abgespalten und von ihren Schutzgruppen in der Seitenkette befreit werden. Dazu wurde das Harz in eine 2 ml Spritze mit 2 ml Abspaltlösung in ein 50 ml Falcon (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. Die Lösung wurde dann mittels der 2 ml Spritze vom Harz befreit, wobei das Filtrat in 45 ml gekühltem Diethylether in ein Falcon (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.

3.6.6 Analytische HPLC nach Abspaltung

Mit der analytischen HPLC (Shimadzu) und der analytischen Säule Nucleodur C18 (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. Die Geschwindigkeit betrug 1 ml/min. 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 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.

3.6.7 Präparative HPLC

Mit der präparativen HPLC Prepstar (Varian) und der präparativen Säule Nucleodur 100-5 C18 (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. einzustellen 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 10 % Acetonitril gewählt.

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. Zusätzlich konnte das Ultraschallbad Bandelin (Sonorex) zum Lösen benutzt werden. Nach dem Auftragen des Rohpeptids wurde das Eluat in 20 ml Fraktionen aufgefangen, wobei die Fraktionen, die die Zielpeptide enthalten sollten, mittels analytischer HPLC untersucht wurden.

3.6.8 Analytische HPLC der Fraktionen

Die Analyse der Fraktionen erfolgte analog zur Analyse des Rohpeptids, nur dass direkt 200 µl der einzelnen Fraktion in ein *Inlay* (VWR) oder 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. Anschließend wurden alle Fraktionen, die eine Reinheit von > 99 % aufwiesen, in einem 250 ml Rundkolben (Schott) vereinigt.

3.6.9 Lyophilisieren

Um die Peptide gut abwiegen zu können, wurde die Methode des Lyophilisierens eingesetzt. 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 Szintillationsgefäß (VWR) überführt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und an der Lyophilisationsanlage Alpha 2-4 LD plus (Christ) getrocknet. Die getrockneten Peptide wurden mit der analytischen HPLC und zusätzlich mittels ESI-Massenspektrometrie analysiert.

3.6.10 Analytische HPLC der vollständig aufgereinigten Peptide

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

3.6.11 ESI-Massenspektrometrie der vollständig aufgereinigten Peptide

Mit Hilfe der Elektronen Spray Ionisation (ESI)-Massenspektrometrie sollte die Identität der Peptide verifiziert werden. Dazu wird die monoisotopische Masse eines Peptids benötigt, die aus den einzelnen Massen der Bestandteile in Tabelle 24, 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 24: Name, monoisotopische und durchschnittliche Masse der einzelnen Bestandteile eines Peptids

Name	*Monoisotopische Masse**	*Durchschnittliche Masse*
Alanin	71,03711	71,0788
Asparaginsäure	115,02694	115,0886
Glycin	57,02146	57,0519
Glutaminsäure	129,04259	129,1155
Isoleucin	113,08406	113,1594
Lysin	128,09496	128,1741
Methionin	131,04049	131,1926
Norleucin	131,09408	131,1732
Serin	87,03203	87,0782
Threonin	101,04768	101,1051
Valin	99,06841	99,1326
H_2O	18,01056	18,01524
Acetyl	42,01060	42,0373
Amid	-0,984	-0,9847
Trifluoressigsäure	-	114,0200

Zur Analyse wurde eine kleine Menge des fertig aufgereinigten Peptids 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 Verbesserung der Produktion und Aufreinigung verkürzter OspD1-Varianten

Die Zielsetzung dieser Arbeit erforderte die heterologe Überproduktion des OspD1 in *E. coli*, sowie dessen Aufreinigung mit einer akzeptablen Ausbeute. Mit dem gereinigten Protein sollten Untersuchungen zur Wechselwirkung mit dem Chaperon Spa15 und Kristallisationsversuche durchgeführt werden. Im Vorfeld waren in der Masterarbeit der Verfasserin (Jüngel 2010) aufbauend auf den Erkenntnissen der Diplomarbeit von Christian Hasewinkel (Hasewinkel 2006) Versuche in diesem Bereich getätigt worden. In diesen war es gelungen, OspD1 durch Herabsetzen der Expressionstemperatur auf 15 °C in löslicher Form zu erhalten, während die Expression bei 37 °C zur Produktion des Proteins in Form von Einschlusskörpern geführt hatte. Bei der Aufreinigung des Volllängenproteins von OspD1 zeigten sich im SDS-Gel Verunreinigungen, welche kleiner waren als OspD1 (vermutlich handelte es sich dabei um Abbruchfragmente des Proteins). Um dieses Problem zu beheben, wurde zusätzlich zum bereits vorhandenen *N*-terminalen GST-tag *C*-terminal ein His-*tag* eingefügt, mit dem ein weiterer Aufreinigungsschritt über eine Nickelsäule möglich war. Desweiteren wurden verkürzte Varianten hergestellt. Bei allen Varianten wurden *C*-terminal vier Aminosäuren entfernt, da für diese als Struktur mit Hilfe einer Sekundärstrukturvorhersage des Programms NetSurfP (http://www.cbs.dtu.dk/ services/NetSurfP/; Stand 27.03.2015) eine *Loop*-Region vorausgesagt wurde. Zusätzlich zum *C*-Terminus wurde der *N*-Terminus verkürzt. Dabei entstanden innerhalb der Masterarbeit der Verfasserin (Jüngel 2010) folgende Varianten:

OspD1**Δ**1-15/**Δ**222-225: Die ersten 15 Aminosäuren dienen bekanntermaßen als Signal für den Export aus dem Zytoplasma durch das Typ-III-Translokon sezernierter Proteine und wurden im Interesse einer besseren Aufreinigung und Kristallisation ebenfalls entfernt.

OspD1**Δ**1-32/**Δ**222-225: Die Entfernung der ersten 32 Aminosäuren diente dabei vor allem der Untersuchung, in welchem Abschnitt eine Interaktion mit Spa15 stattfindet.

OspD1**Δ**1-80/**Δ**222-225: Ein Nebeneffekt, der von dieser Variante erhofft wurde, war eine verbesserte Löslichkeit des Proteins, sowie die bessere Fähigkeit zur Kristallisation des Proteins (*persönliche Mitteilung, Professor Parsot, Paris*).

Da die Ausbeute nach dem letzten Aufreinigungsschritt der OspD1-Varianten unter einem mg bei zehn Litern Bakterienkultur lag und somit nicht ausreichend Protein für Kristallisationsversuche zur Verfügung stand, sollten die Expression und Aufreingung der Varianten weiter optimiert werden (Jüngel 2010).

Im Zuge dessen wurden in dieser Arbeit Plasmide (siehe 3.1.1) mit GST- und His-*tag* der verschiedenen Varianten zunächst in den *E.coli*-Expressionsstamm SoluBL21™ von Genlantis (siehe 3.1.4) transformiert. Dieser Expressionsstamm ist darauf ausgelegt, in Fällen, in denen dies vorher nicht möglich war, teilweise oder ganz lösliches Protein zu erhalten. Eine Expression der OspD1-Varianten in diesen Zellen konnte die Ausbeute jedoch nicht erhöhen.

4.1.1 Expressionsplasmid pHW3 mit MBP-*tag*

Der nächste Ansatz, der verfolgt wurde, war das Austauschen des GST-*tags* gegen ein Maltose-Bindeprotein-*tag* (MBP-*tag*) (siehe 3.4.5.2). Das MBP sollte zur Erhöhung der Löslichkeit des Fusionspartners beitragen. Der His-*tag* sollte zusätzlich erhalten bleiben. Als Ausgangsvektor wurde zunächst der pIVEX-MBP von Roche benutzt, durch den nach der Expression *N*-terminal ein MBP-*tag* im Fusionprotein vorlag. Allerdings stimmte innerhalb der MCS des Vektors pIVEX-MBP die Orientierung der vorher verwendeten Restriktionsendonukleasen-Schnittstellen nicht. Auch verfügte der Vektor nicht über das *lacI*-Gen. Durch die Abwesenheit von *lacI* könnte es zur frühzeitigen Expression kommen. Außerdem könnte die Transformation dieses Vektors Probleme bereiten. In Zusammenarbeit mit Christian Hasewinkel wurde das Konstrukt pHW3 über eine zweistufige Klonierung entworfen. Im ersten Schritt wurde das GST-*tag* aus dem Vektor pHW1 entfernt. Anschließend wurde der MBP-*tag*, der aus dem pIVEX-MBP Vektor durch PCR amplifiziert worden war, in die entstandene “Lücke“ eingefügt (siehe Hasewinkel 2012b).

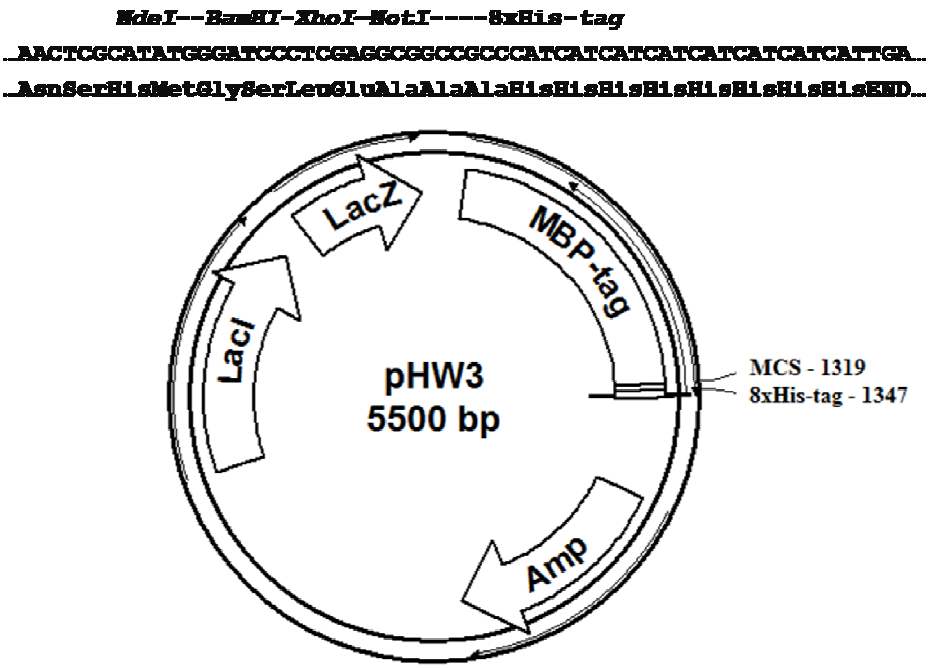


Abb. 16: pHW3 Vektor MCS mit den dazugehörigen Schnittstellen und Vektorkarte des finalen pHW3

Aus dem Vektor pGEX-4Tmod.-OspD1 (siehe 3.1.1) wurden die Sequenzen für OspD1-Varianten, die am 5' Ende um die Codons der ersten 15, 32 und 80 Aminosäuren, sowie am 3' Ende die Codons der letzten vier Aminosäuren verkürzt waren, herausamplifiziert. Diese wurden in den Vektor pHW3 kloniert.

			NdeI	*Thrombin*	*ospD1Δ1-15Δ222-225*	*Thrombin*	*XhoI*		
1)	5'	MBP	CA TATG	TATCCGCGCGGC	CACCTAATAA...CAAAATACAA	TATCCGCGCGGC	CT CGAG	His	3'
	3'		GTAT AC	ATAGGCGCGCCG	GTGGATTATT...GTTTTATGTT	ATAGGCGCGCCG	GAGC TC		5'
	AS	...PPNS	HM	YPRG	HLIIG...ISDKI	YPRG	LE	8xH	

			NdeI	*Thrombin*	*ospD1Δ1-32Δ222-225*	*Thrombin*	*XhoI*		
2)	5'	MBP	CA TATG	TATCCGCGCGGC	AATATCATTA...CAAAATACAA	TATCCGCGCGGC	CT CGAG	His	3'
	3'		GTAT AC	ATAGGCGCGCCG	CCACAGTAAT...GTTTTATGTT	ATAGGCGCGCCG	GAGC TC		5'
	AS	...PPNS	HM	YPRG	NNIIN...ISDKI	YPRG	LE	8xH	

			NdeI	*Thrombin*	*ospD1Δ1-80Δ222-225*	*Thrombin*	*XhoI*		
3)	5'	MBP	CA TATG	TATCCGCGCGGC	CGCCATAATT...CAAAATACAA	TATCCGCGCGGC	CT CGAG	His	3'
	3'		GTAT AC	ATAGGCGCGCCG	GCGGTATTAA...GTTTTATGTT	ATAGGCGCGCCG	GAGC TC		5'
	AS	...PPNS	HM	YPRG	NRHNL...ISDKI	YPRG	LE	8xH	

Abb. 17: Sequenzausschnitte der Varianten von OspD1 des Vektors pHW3 mit MBP-*tag*, Thrombinschnittstelle, Schnittstelle *Nde*I, dem trunkierten Gen *ospD1*, Schnittstelle *Xho*I und His-*tag,* sowie entsprechende Ausschnitte der Aminosäuresequenzen. 1) *ospD1Δ1-15/Δ222-225* 2) *ospD1Δ1-32/Δ222-225* 3) *ospD1Δ1-80/Δ222-225*

4.1.2 Expression und Aufreinigung von OspD1Δ1-15/Δ222-225

Die im Klonierungsstamm XL-2 blue produzierten Plasmide pHW3-OspD1-Δ1-15/Δ222-225 wurden in den Expressionsstamm BL 21 Codon plus transformiert. Anschließend wurden Expression und Aufreinigung der OspD1Δ1-15/Δ222-225-Variante durchgeführt. Um den Fortgang der Aufreinigung zu verfolgen, wurden während der Präparation Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 18). Der Pfeil A in der Abbildung zeigt die Laufhöhe des Fusionsproteins an und Pfeil B zeigt die Laufhöhe des von den *Tags* befreiten OspD1Δ1-15/Δ222-225 an (Abb. 18, Bahn 2 und Bahn 3). Das Protein lag nach Ernte und Aufschluss der Zellen löslich im Zelllysat vor (Abb. 18, Bahn 4).

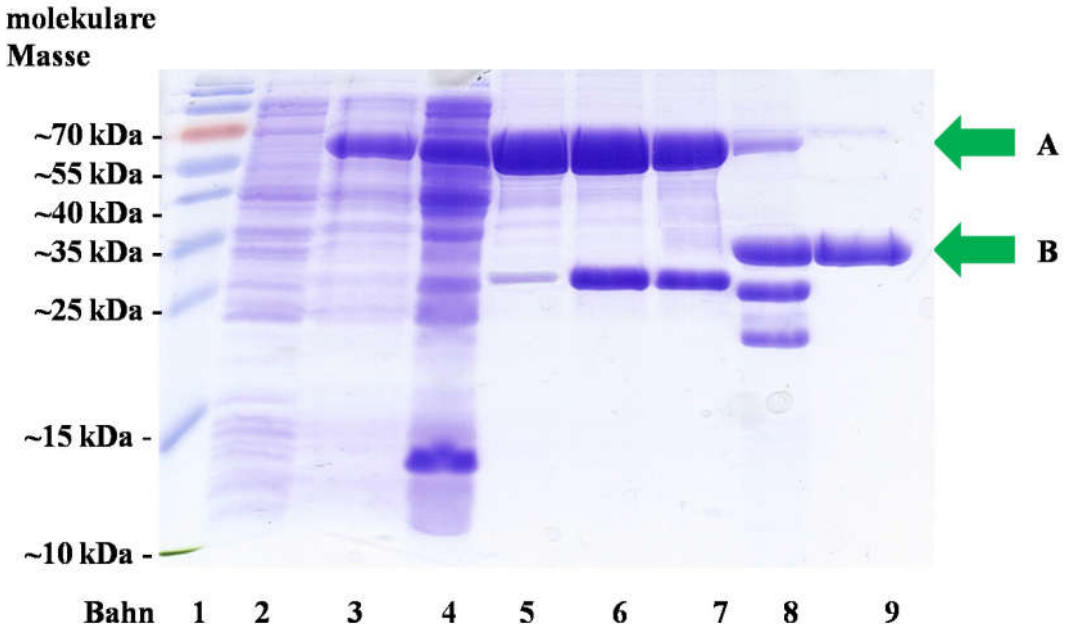


Abb. 18: 15% SDS Gel OspD1Δ1-15/Δ222-225: 1) *Thermo Fisher Scientific Prestained Protein Marker.* 2) Gesamtzellextrakt vor der Induktion. 3) Gesamtzellextrakt nach der Induktion. 4) Zellysat nach Aufschluss und Zentrifugation. 5) Elution der Dextrinsäule. 6) Elution der Nickelsäule bei einer Konzentration von 400 mM Imidazol. 7) Elution der PD10. 8) Nach Inkubation mit Thrombin. 9) Probe der vereinigten Fraktionen der SEC 200-Säule nach Aufkonzentration mit Vivaspin.

Pfeil A: Laufhöhe des vollständigen Fusionsproteins MBP-OspD1Δ1-15/Δ222-225-His. Pfeil B: Laufhöhe des durch Thombin-Behandlung von den Tags befreiten OspD1Δ1-15/Δ222-225.

So wurde nach Zentrifugation des Lysats der Überstand für einen ersten affinitätschromatographischen Reinigungsschritt auf eine Dextrinsäule aufgetragen

und mit einem PBS Puffer, der Maltose in einer Konzentration von 150 mM enthielt, gewaschen. Das Eluat, in dem das Fusionsprotein stark angereichert vorlag, wurde im Anschluss für einen zweiten affinitätschromatografischen Reinigungsschritt auf eine Ni^{2+}-Chelatsäule aufgetragen. Nachdem durch einen Waschschritt mittels eines Puffers, der Imidazol in einer Konzentration von 150 mM enthielt, unspezifisch an die Säule gebundenes Protein entfernt worden war, wurde das Fusionsprotein mit einem Puffer, der 400 mM Imidazol enthielt, eluiert (siehe Abb. 19).

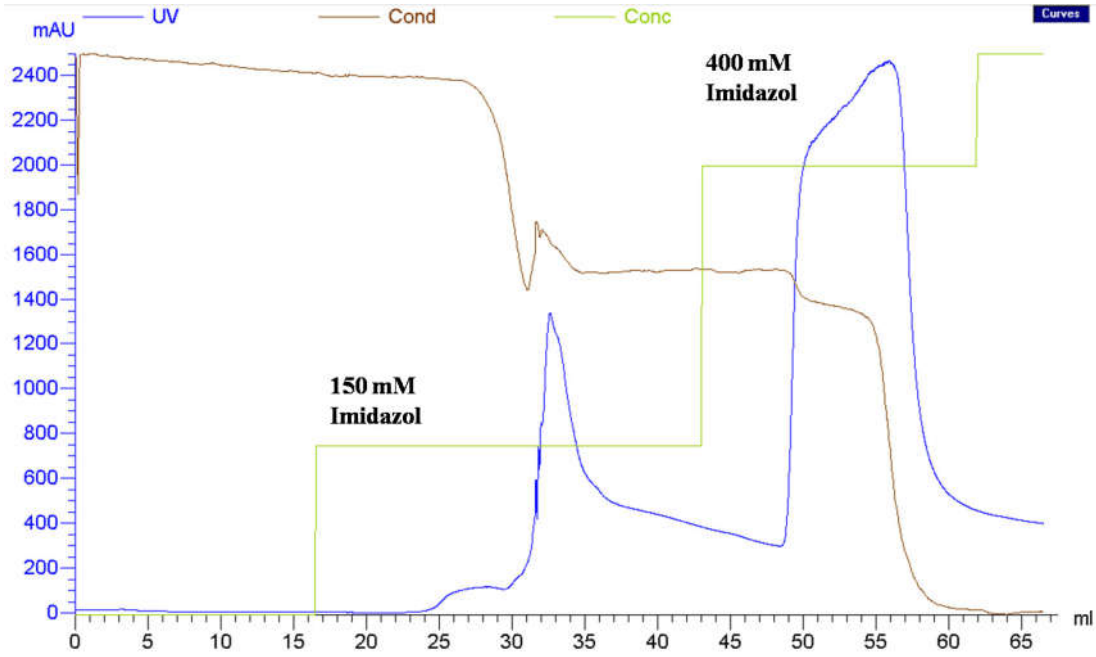


Abb. 19: Chromatogramm der OspD1Δ1-15/Δ222-225. Aufreinigung über eine 15 ml Nickel-Chelatsäule: die blaue Linie zeigt die UV-Absorption (UV) bei 280 nm. Bei einer Imidazolkonzentration von 150 mM des Puffers B sieht man Verunreinigungen, bei 400 mM Imidazol zeigt der Peak verkürztes OspD1 an. Der gestufte Anstieg der Absorption ist der Erhöhung der Imidazolkonzentration zuzuschreiben, da Imidazol selbst auch absorbiert. Die braune Linie zeigt Leitfähigkeit (Cond) in s/m und die grüne Linie zeigt die Konzentration des Puffers B (Conc) in % an.

Nach Entfernen des Imdidazols aus dem Eluat durch eine PD10-Säule wurden sowohl das MBP- als auch das His_8-*tag* mit Thrombin proteolytisch vom Zielprotein abgespalten. Ermöglicht wurde dies duch die zwei Thrombinschnittstellen, von denen sich jeweils eine zwischen jedem *Tag* und dem Zielprotein befand. Schließlich wurden die abgespaltenen *Tags* affinitätschromatographisch mittels der o.g. Dextrin-und Ni^{2+}-Säule aus der Zielproteinhaltigen Lösung entfernt.

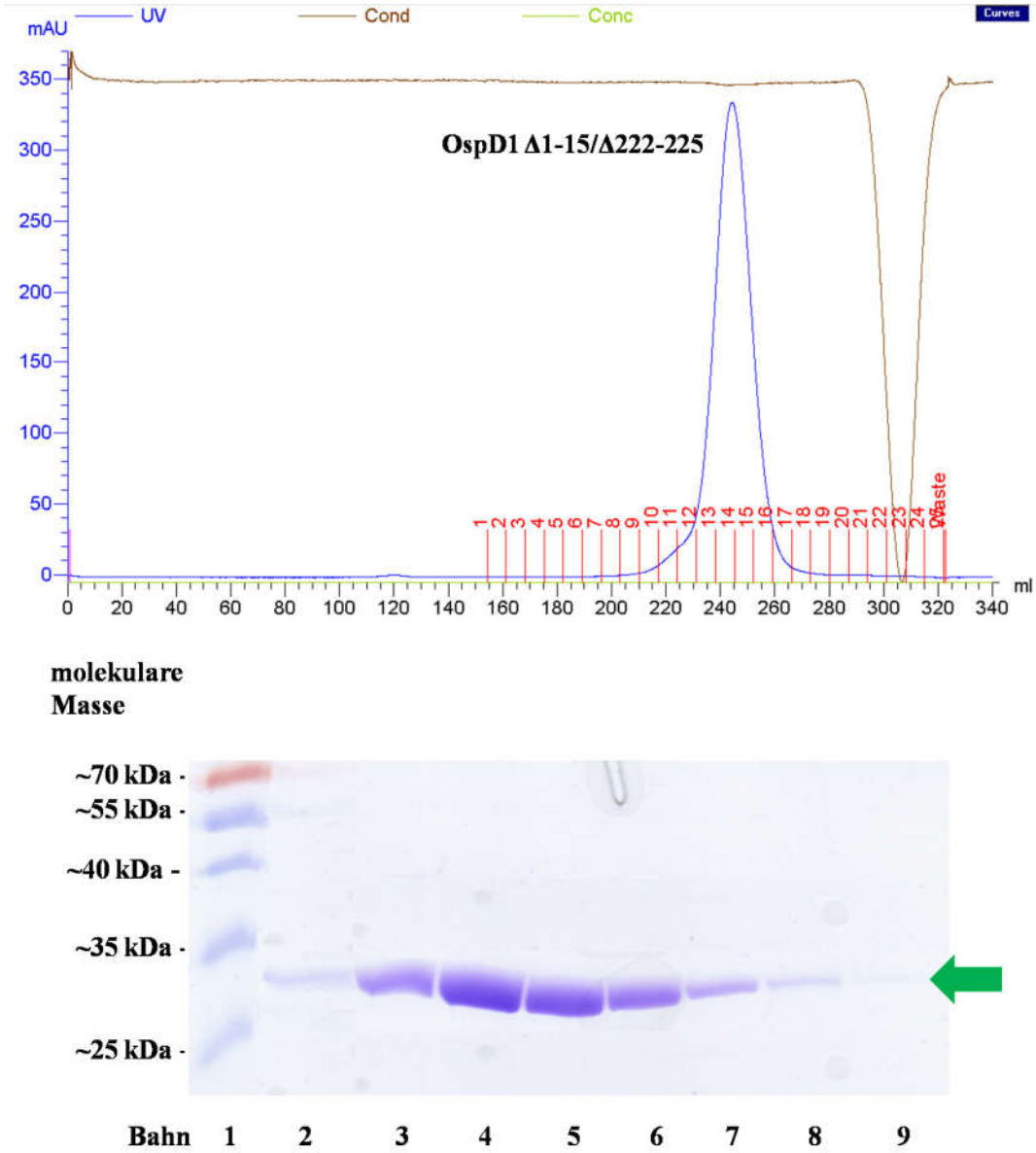


Abb. 20 oben: Chromatogramm der OspD1Δ1-15/Δ222-225: Aufreinigung über eine SEC 200-Säule. Die blaue Linie zeigt die UV-Absorption bei 280 nm. Die Elution des Proteins erfolgte im Volumenbereich von 220-270 ml. Die braune Linie zeigt Leitfähigkeit (Cond) in s/m und die grüne Linie zeigt die Konzentration des Puffers B (Conc) in % an.

unten: SDS-Gel der Proben aus den einzelnen Fraktionen der SEC 200-Säule 1) *Thermo Fisher Scientific Prestained Protein Marker*. 2) Fraktion 9. 3) Fraktion 10. 4) Fraktion 11. 5) Fraktion 12. 6) Fraktion 13. 7) Fraktion 14. 8) Fraktion 15. 9) Fraktion 16. Der Pfeil marktiert das reine OspD1 Δ1-15/Δ222-225.

Durch eine abschließende präparative Größenauschlusschromatographie gelang es schließlich, OspD1Δ1-15/Δ222-225 zu mehr als 95 % rein darzustellen (Abb. 20). (Die technischen Details der Aufreinigung sind in Absatz 3.4.9 des Material und Methoden-Teils zu entnehmen).

Im letzten Schritt wurden die Fraktionen, in denen sich OspD1Δ1-15/Δ222-225 befand, mittels eines Vivaspin 10 kDa-Röhrchens aufkonzentriert. Zur Lagerung wurden 50 µl Aliquots (SEC 8.0 Puffer) mit einer Konzentration von 10 mg/ml hergestellt. Die Ausbeute lag bei etwa acht mg Protein pro Liter Bakterienkultur.

Damit war es erstmals gelungen, das Expressions- und Aufreinigungsprotokoll so zu verändern, dass OspD1 löslich und in einer ausreichenden Menge hergestellt werden konnte. An dieser Stelle konnten weiterführende Experimente wie die Kristallisation in Angriff genommen werden.

4.1.3 Expression und Aufreinigung von OspD1Δ1-32/Δ222-225

Die Expression und Aufreinigung von OspD1Δ1-32/Δ222-225 erfolgte analog zu der von OspD1Δ1-15/Δ222-225. Zunächst wurde ein Fusionsprotein mit MBP- und His-*tag* exprimiert, welches über Dextrin- und Nickelsäule aufgereinigt wurde. Anschließend wurden die *Tags* durch Zugabe von Thrombin abgetrennt. Die verkleinerte Variante des OspD1 wurde im letzten Aufreinigungsschritt noch einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Der Erfolg der Aufreinigungsschritte wurde durch gelelektrophoretische Analyse untersucht. In Abb. 21 ist in Bahn 5 eine Probe der Elution der Dextrinsäule aufgetragen. Das Fusionsprotein aus MBP- und His-*Tag* und OspD1 Δ1-32/Δ222-225 weist ein Molekulargewicht von 64,4 kDa auf (Pfeil). Nach dem Auftragen auf eine Nickelsäule ist eine Probe des Ergebnisses der Elution der Nickelsäule in Abb. 21 Bahn 6 gezeigt. Als nächster Schritt erfolgte die Umpufferung mit einer PD-10-Säule (Bahn 7).

Nach Schneiden des Fusionsproteins mit Thrombin (Bahn 8) wurde die Lösung erneut auf eine Dextrinsäule mit gekoppelter Nickelsäule aufgetragen, um beide *Tags* zu entfernen. Im Chromatogramm dieses Reinigungsschrittes (nicht gezeigt) wurden zwei *Peaks* sichtbar. Beim ersten *Peak*, Bahn 2, ist eine breitere Bande für OspD1 zu sehen, im zweiten *Peak* eine wesentlich schwächere (Bahn 3). Es wurden beide *Peaks* vereint und aufkonzentriert. Das OspD1Δ1-32/Δ222-225 hat eine Größe von 20,8 kDa.

Neben dem Zielprotein sind noch kleinere und größere Verunreinigungen auf dem Gel zu erkennen. Bei der größeren Bande könnte es sich um Thrombin (37 kDa)

handeln.

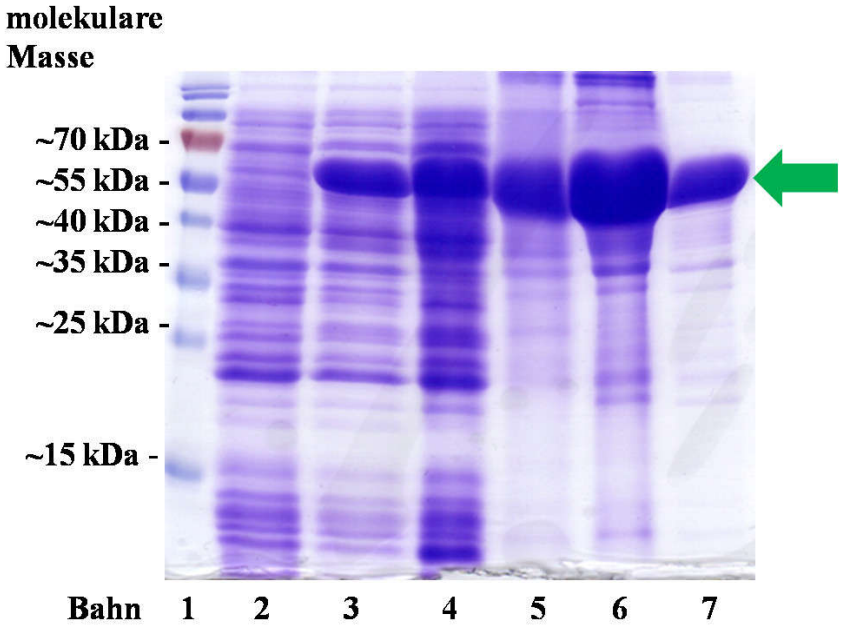
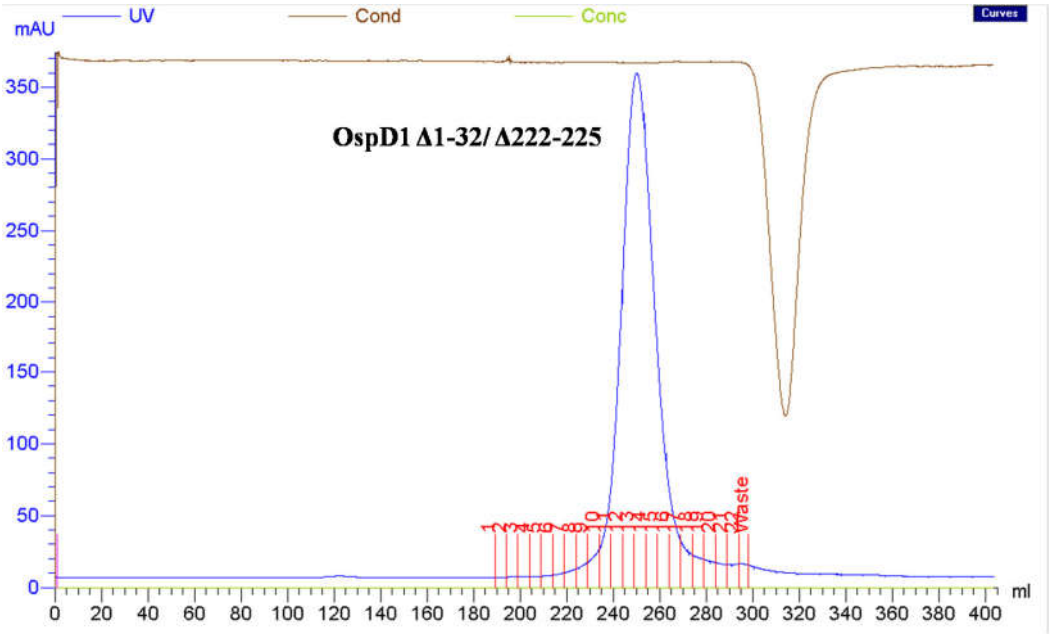


Abb. 21: 15% SDS Gel OspD1Δ1-32/Δ222-225 Aufreinigung: 1) Thermo Fisher Scientific Prestained Protein Marker. 2) Gesamtzellextrakt vor der Induktion. 3) Gesamtzellextrakt 12h nach der Induktion. 4) lösliche Fraktion des Zelllysats. 5) Elution der Dextrinsäule. 6) Elution der Nickelchelatsäule. 7) Elution nachdem Umpuffern mit PD10-Säule. Die Laufhöhe von MBP-OspD1Δ1-32/Δ222-225 ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

Um die restlichen Verunreinigungen zu entfernen, wurde auch OspD1Δ1-32/Δ222-225 über eine SEC 200-Säule aufgereinigt. Die Fraktionen (siehe Abb. 22, Bahn 4 bis 7) wurden vereint und zum Schluss mit einem Vivaspin 10 kDa-Röhrchen aufkonzentriert (siehe Abb. 22, Reihe 8).

Es konnten etwa acht mg Protein aus einem Liter Kultur gewonnen werden. Auch die verkürzte Variante OspD1Δ1-32/Δ222-225 konnte in hoher Reinheit aufgereinigt werden.



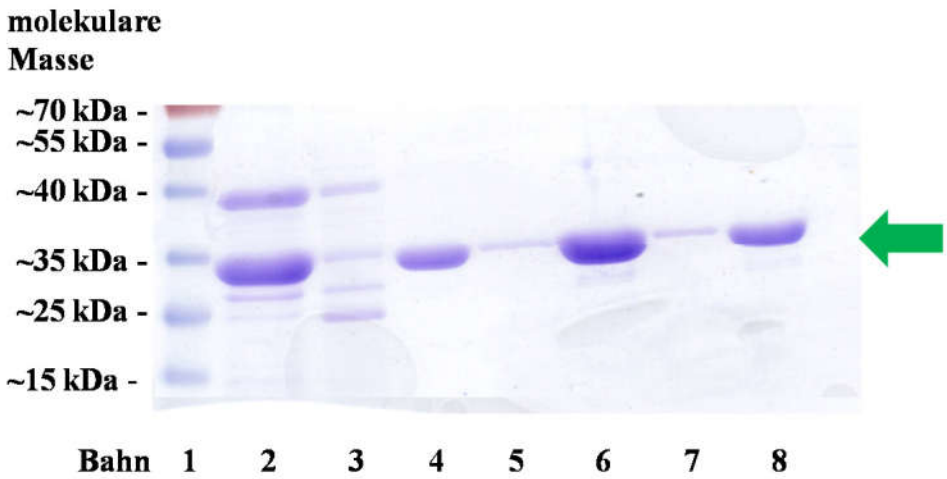


Abb. 22 oben: Chromatogramm der OspD1Δ1-32/Δ222-225: Aufreinigung über eine SEC 200. Die blaue Linie zeigt die UV-Absorption bei 280 nm. Die Elution des Proteins erfolgte im Volumenbereich von 220-270 ml. Die braune Linie zeigt Leitfähigkeit (Cond) in s/m und die grüne Linie zeigt die Konzentration des Puffers B (Conc) in % an.

unten: 15 % SDS Gel OspD1Δ1-32/Δ222-225: 1) *Thermo Fisher Scientific Prestained Protein Marker*. 2) Elution der gekoppelten Dextrin- und Nickelsäule 1. Peak. 3) Elution der gekoppelten Dextrin- und Nickelsäule 2. Peak. 4) Fraktionen F11 und F12. 5) Fraktion F13. 6) Fraktionen F14 und F15. 7) Fraktion F16. 8) Probe der vereinigten Fraktionen der SEC 200 nach Aufkonzentrieren. Der Pfeil zeigt die Laufhöhe für das aufgereinigte OspD1Δ1-32/Δ222-225.

4.1.4 Expression und Aufreinigung von OspD1Δ1-80/Δ222-225

Nach demselben Prinzip wie die Expression und Aufreinigung der beiden oben genannten OspD1-Varianten, wurde auch OspD1Δ1-80/Δ222-225 überexprimiert und aufgereinigt. Zunächst wurde ein Fusionsprotein mit MBP- und His-*tag* exprimiert und über Dextrin- und Nickelsäule aufgereinigt. Anschließend wurden die *Tags* durch Zugabe von Thrombin abgetrennt. Die verkürzte Variante des OspD1 wurde im letzten Aufreinigungsschritt einer Größenausschlusschromatographie unterzogen.

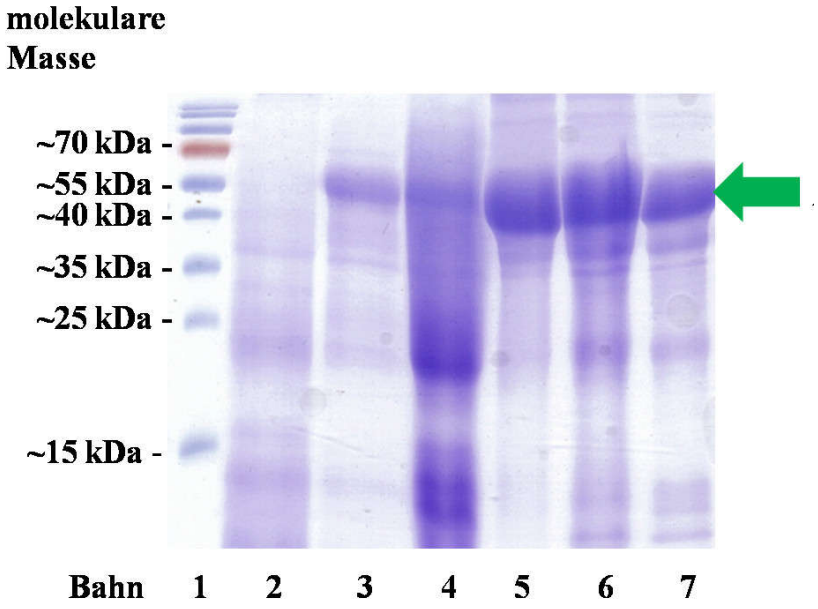
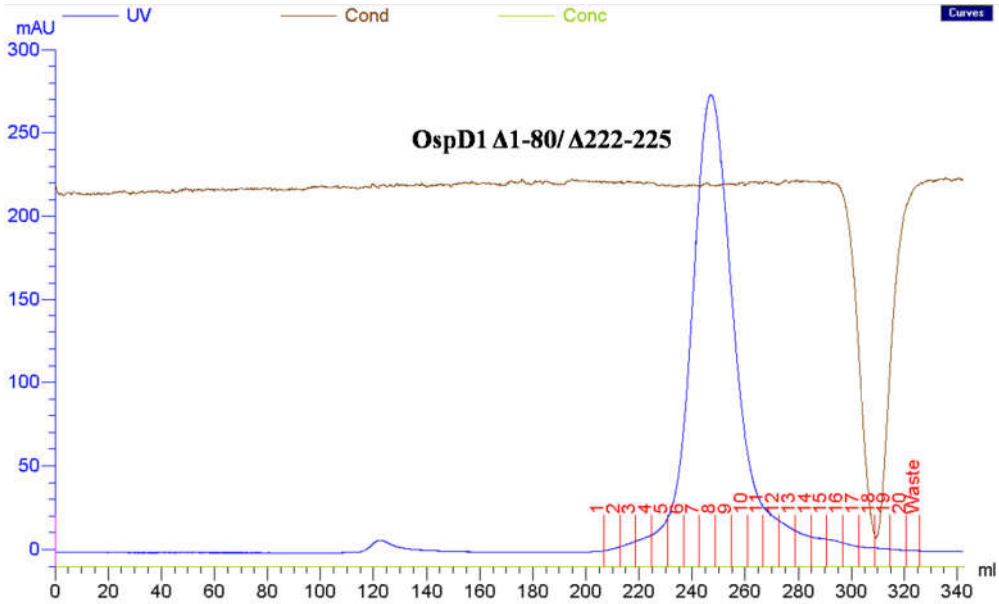


Abb. 23: 15% SDS Gel Osp D1Δ1-80/Δ222-225-Aufreinigung: 1) *Thermo Fisher Scientific Prestained Protein Marker.* 2) Gesamtzellextrakt vor der Induktion. 3) Gesamtzellextrakt 12 h nach der Induktion. 4) lösliche Fraktion des Zelllysats. 5) Elution der Dextrinsäule. 6) Elution der Nickelsäule. 7) Elution nachdem Umpuffern mit PD10-Säule. MBP-OspD1Δ1-80/Δ222-225 ist auf der mit einem grünen Pfeil gekennzeichenden Laufhöhe zu sehen.

Nach Elution der Dextrinsäule (Abb. 23 Bahn 5) sieht man bei 55 kDa die Bande des Fusionsproteins (59,2 kDa) aus MBP- und His-*tag* sowie OspD1Δ1-80/Δ222-225. Das Bandenmuster bleibt nach Elution der Nickelsäule und dem Umpuffern über eine PD10-Säule (Bahn 7) erhalten.

Nach dem Abschneiden von MBP- und His-*tag* durch Thrombin erfolgte die Aufreinigung über eine Dextrinsäule, an die eine Nickelsäule angeschlossen war. Dieser Schritt erfolgte zur Differenzierung von *Tags* und restlichem Protein. Danach

wurde das Eluat über eine SEC 200-Säule aufgereinigt (Abb.24).



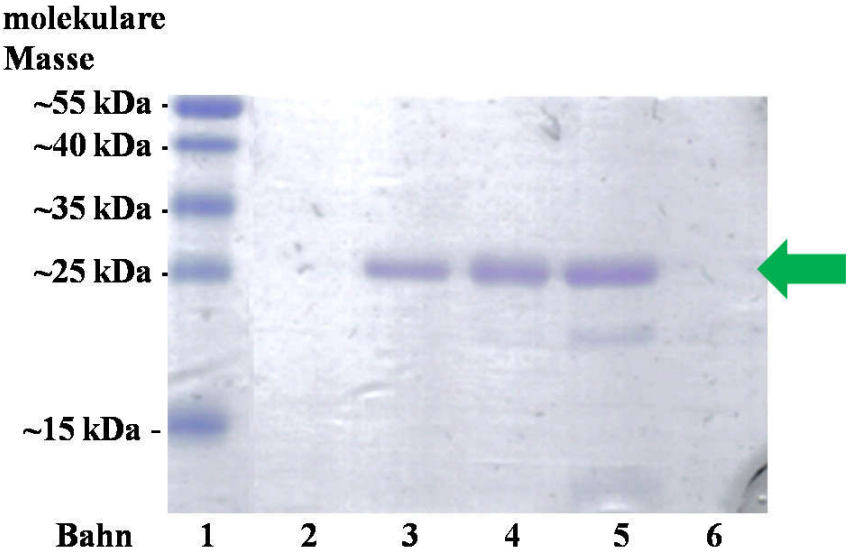


Abb.24 oben: Chromatogramm der OspD1Δ1-80/Δ222-225-Aufreinigung über eine SEC 200-Säule: die blaue Linie zeigt die UV-Absorption bei 280 nm. Die Elution des Proteins erfolgte im Volumenbereich von 220-270 ml. Die braune Linie zeigt Leitfähigkeit (Cond) in s/m und die grüne Linie zeigt die Konzentration des Puffers B (Conc) in % an.

unten: 15 % SDS Gel OspD1Δ1-80/Δ222-225: 1) *Thermo Fisher Scientific Prestained Protein Marker*. 2) Fraktion F7. 3) Fraktion F8. 4) Fraktion F9. 5) Fraktion F10. 6) Fraktion F11. Der Pfeil zeigt die Laufhöhe für das aufgereinigte OspD1Δ1-80/Δ222-225.

Die Fraktionen 7 bis 11 wurden ebenfalls mittels SDS-PAGE analysiert. Auf dem Coomassie-blau gefärbten Gel wurde OspD1**Δ**1-80/**Δ**222-225 als Bande bei 25 kDa detektiert.

Die Fraktionen, die OspD1**Δ**1-80/**Δ**222-225 in reiner Form enthielten, wurden mittels Vivaspin 10 kDa Röhrchen aufkonzentriert. Es wurden sieben mg des stark verkürzten OspD1-Variante aus einem Liter Bakterienkultur gewonnen.

4.1.5 Expression und Aufreinigung der verkürzten OspD1-Varianten als SeMet-Derivate

Nachdem es gelungen war, OspD1**Δ**1-15/**Δ**222-225 zu kristallisieren und einen vollständigen Diffraktionsdatensatz von einem Kristall aufzunehmen (siehe 4.9.1.1), sollte zur Lösung des Phasenproblems durch ein MAD-Experiments ein SeMet-Derivat des Proteins erzeugt werden.

Die im Klonierungsstamm XL-2 blue produzierten Plasmide pHW3-OspD1Δ1-15/Δ222-225, pHW3-OspD1Δ1-32/Δ222-225 sowie pHW3-OspD1Δ1-80/Δ222-225 wurden dafür in den methioninauxotrophen Expressionstamm *E. coli B834 (DE3)* transformiert. Die Expression des Zielproteins erfolgte dann in einem definierten Medium, das kein S-Met, sondern ausschließlich SeMet enthielt (siehe Absatz 3.4.10).

Anschließend wurde die Aufreinigung der trunkierten OspD1-Varianten durchgeführt. Um den Erfolg der Aufreinigung zu verfolgen, wurden während der Präparation Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 25). Nach Ernte und Zellaufschluss lag das Fusionprotein sowohl im Pellet wie auch im Zelllysat vor (Abb. 25, Bahn 3 und 4), was ein Anzeichen dafür war, dass das Protein durch den Austausch von Schwefel-Methionin durch SeMet eine deutlich reduzierte Löslichkeit aufwies. Die Aufreinigung mittels *FPLC* bestand zu Beginn aus einem affinitätschromatographischen Schritt über eine Dextrinsäule (Chromatogramm Abb. 25).

Neben dem sehr schwach erkennbaren Fusionsprotein (insgesamt 66,6 kDa) sind auf dem Gel noch einige Abbruchfragmente und Verunreinigungen zu sehen. In Bahn 7 und 8 von Abb. 25 ist im Eluat der Nickelsäule das Protein nur noch schwach konzentriert, so dass man keine Bande mehr wahrnehmen kann. Gleiches gilt für den weiteren Umpufferungsschritt über die PD10-Säule.

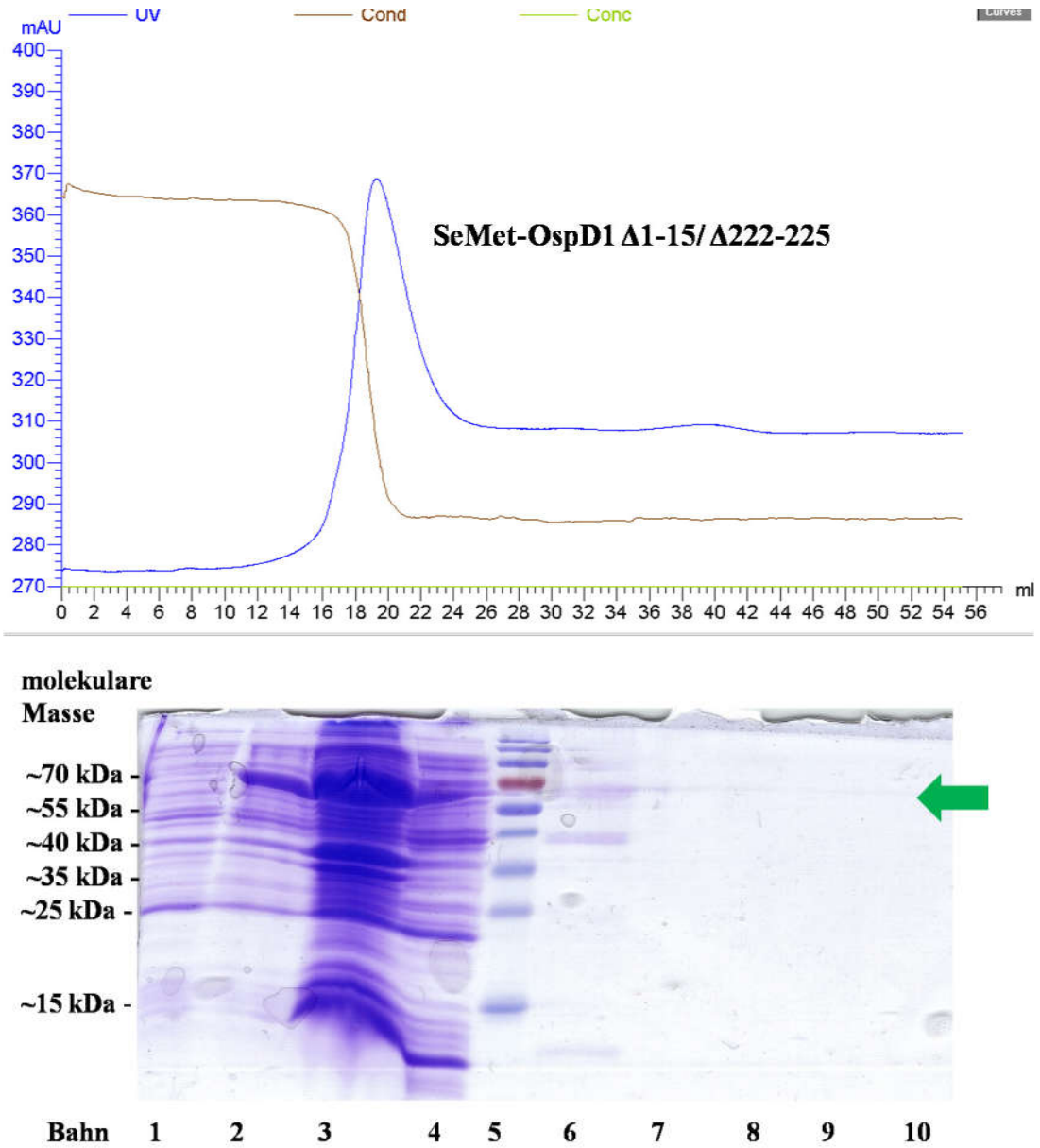


Abb. 25 oben: Chromatogramm der SeMet-OspD1Δ1-15/Δ222-225-Aufreinigung über eine Dextrinsäule: die blaue Linie zeigt die UV-Absorption bei 280 nm. Die braune Linie zeigt Leitfähigkeit (Cond) in s/m und die grüne Linie zeigt die Konzentration des Puffers B (Conc) in % an.

unten: 15 % SDS Gel SeMet-OspD1Δ1-15/Δ222-225: 1) Gesamtzellextrakt vor der Induktion. 2) Gesamtzellextrakt 12h nach der Induktion. 3) unlösliche Fraktion nach Zentrifugation (Pellet). 4) lösliche Fraktion des Zelllysats. 5) *Thermo Fisher Scientific Prestained Protein Marker.* 6) Elution der Dextrinsäule. 7) Elution der Nickelsäule bei 150 mM Imidazol. 8) Elution der Nickelsäule bei 400 mM Imidazol. 9) Eluat PD10 0-35 ml. 10) Eluat PD10 36-55 ml. Der Pfeil zeigt die Laufhöhe für das Fusionprotein SeMet-MBP-OspD1Δ1-15/ Δ222-225-8xHis.

Im Gel ist in Bahn 3 erkennbar, dass das SeMet-Fusionsprotein nach der Expression zum größten Teil ungelöst vorlag. Nur ein kleiner Teil wurde gelöst

(Bahn 4). In weiteren Aufreinigungsschritten ging immer mehr Fusionsprotein verloren. Die Varianten OspD1Δ1-32/Δ222-225 und OspD1Δ1-80/Δ222-225 verhielten sich analog, auch hier war keine weitere Aufreinigung möglich. Eine Senkung der Expressionstemperatur auf 12 °C brachte keinerlei Verbesserung der Löslichkeit (nicht gezeigt). Es war zwar gelungen, die trunkierten OspD1-Varianten mit Markierung durch SeMet zu exprimieren, allerdings konnte nur der erste Aufreinigungsschritt erfolgreich durchgeführt werden. Für Kristallisationsversuche war die Reinheit des Proteins nach diesem Aufreinigungsschritt nicht ausreichend.

4.2 Reinigung von Spa15

Das von Christian Hasewinkel etablierte Protokoll zur Expression und Aufreinigung (Hasewinkel 2012a) wurde durch einen Anionenaustausch-Chromatographie-Schritt erweitert. Nur durch diesen Schritt konnte man die für Kristallisationsversuche erforderliche Reinheit erzielen. Zur Überprüfung der Expression und der Aufreinigungsschritte wurden Proben zur Analyse mittels SDS-Page entnommen.

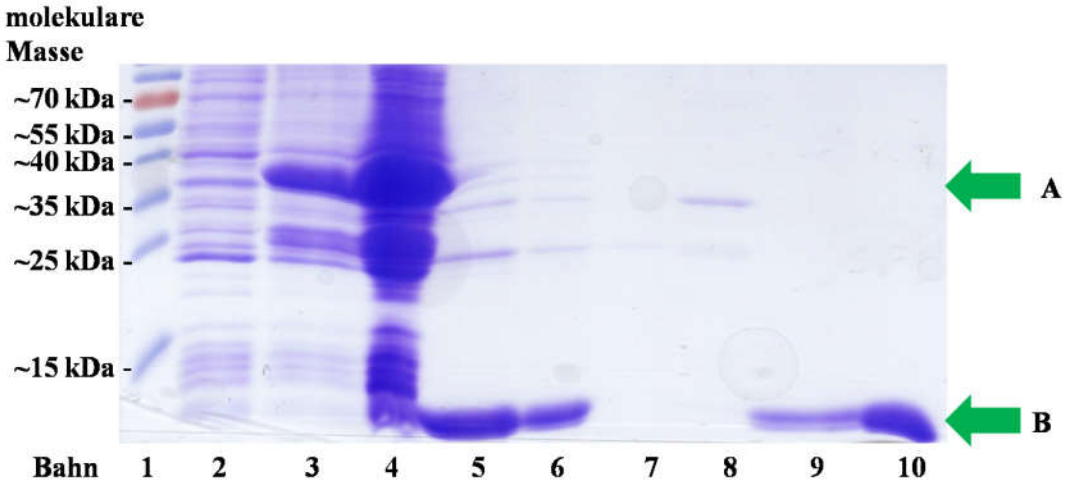


Abb. 26: 15% SDS-Gel Spa 15 Aufreinigung: 1) *Thermo Fisher Scientific Prestained Protein Marker.* 2) Gesamtzellextrakt vor der Induktion. 3) Gesamtzellextrakt 12 h nach der Induktion. 4) lösliche Fraktion des Zelllysats. 5) Elution der GSH-Säule nach Behandlung mit Thrombin. 6) Elution nach Umpuffern mit PD10-Säule. 7) Durchfluss der DEAE. 8) Elution der DEAE bei 400 mM NaCl. 9) Elution der DEAE bei 800 mM NaCl. 10) Nach Aufreinigung über SEC 75-Säule und Aufkonzentration über Vivaspin Zentrikon auf eine Konzentration von 10 mg/ml. Der Pfeil A zeigt die Laufhöhe des Fusionsprotein GST-Spa15, während bei Pfeil B die Laufhöhe des Zielproteins Spa15 ohne den GST-*tag* angezeigt ist.

Spa15 wurde als Fusionprotein mit GST-*tag* exprimiert (siehe Abb. 26). Bahn 3 zeigt das GST-Spa15 (42 kDa) bei 40 kDa. Nach Behandlung mit Thrombin und Abtrennung des GST-*tags* ist das Zielprotein bei unter 15 kDa auf Höhe von Pfeil B zu sehen (Bahn 5).

Ergänzend zum etablierten Protokoll wurde zur Entfernung des NaCl mit einer PD10-Säule auf Bis-Tris-Puffer umgepuffert (Eluat Bahn 6) und das Eluat auf die DEAE-Säule aufgetragen. Im Durchfluss der DEAE-Säule konnte kein Spa15 mehr detektiert werden (Bahn 7). Verunreinigungen konnten durch Elution des Bis-Tris-Puffers mit 400 mM NaCl (Bahn 8) vom reinen Protein bei Elution mit 800 mM NaCl (Bahn 9) getrennt werden.

Zur abschließenden Reinigung des Proteins wurde eine Molekularsiebchromatographie mit einer *HiLoad* 26/60 Superdex 75-Säule als letzten Aufreinigungsschritt gemäß dem ursprünglichen Protokoll durchgeführt. Das Elutionsprofil dieser Chromatographie (Abb.27) zeigt einen einzelnen *Peak*, welcher in Fraktionen aufgefangen wurde. Proben der einzelnen Fraktionen wurden im SDS-Gel aufgetrennt (nicht gezeigt) und die Fraktionen, welche Spa15 enthielten, vereint.

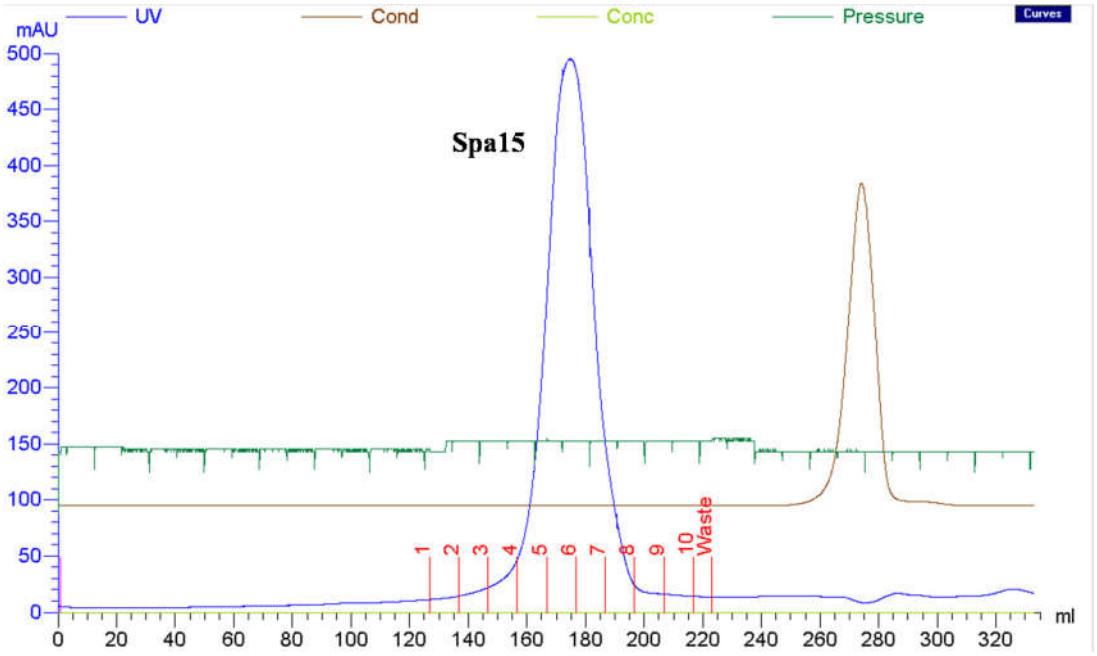


Abb.27: Chromatogramm der Spa 15 Aufreinigung über SEC 75-Säule: die blaue Linie zeigt die UV-Absorption bei 280 nm. Die braune Linie zeigt Leitfähigkeit (Cond) in s/m und die grüne Linie zeigt die Konzentration des Puffers B (Conc) in % an.

In Abb. 26 ist in Bahn 10 das finale Spa15 nach Aufkonzentration über ein 5 kDa Vivaspin Zentrikon aufgetragen. Die Ausbeute lag bei fünfzehn mg Spa15 pro Liter Bakterienkultur. Spa15 konnte erfolgreich aufgereinigt werden und stand in ausreichender Menge für die Interaktionsassays und Kristallisationsversuche mit OspD1 zur Verfügung.

4.3 Reinigung von IpgCΔ152-155

Lunelli et al. (Lunelli et al. 2009) berichteten, dass die Deletion der *C*-terminalen vier Aminosäuren von IpgC zum Erhalt gut streuender Kristalle Voraussetzung ist. Christian Hasewinkel fand im Rahmen seiner Promotion heraus, dass die Kristallisierung der Volllängenprodukte unter verschiedensten Bedingungen nicht zu erreichen war. Deswegen erzeugte er eine Variante, bei der *C*-terminal vier Aminosäuren fehlten (Hasewinkel 2012a). Für die Expression und Aufreinigung wurde das von ihm beschriebene Protokoll als Grundlage benutzt und durch einen Anionenaustausch-Chromatographie-Schritt erweitert.

Das verkürzte *ipgC*-Gen wurde in die MCS des Plasmids pHW1 eingefügt und enthielt zusätzlich ein *C*-terminales Stopp-Codon, was die Translation des 8xHis-*tags* verhindert. Es entstand also Fusionsprotein aus dem verkürzten IpgC und dem *N*-terminalen GST (siehe Abb. 28 Bahn 3).

Nach Elution der GSH-Säule wurde das IpgCΔ152-155 von der Säule gespült (Abb. 28 Bahn 4). Das Zielprotein (17,3 kDa) ist im SDS-Gel unterhalb der 15 kDa zu erkennen.

Nach einem neu etablierten Umpufferungsschritt mit einer PD10-Säule (Bahn 5) wurde IpgC zunächst einer Ionenaustausch-Chromatographie unterzogen und eluierte bei 300 mM NaCl (Bahn 6). Dieser Schritt wurde eingeführt, um IpgCΔ152-155 in der für Kristallversuche erforderlichen Reinheit erhalten zu können.

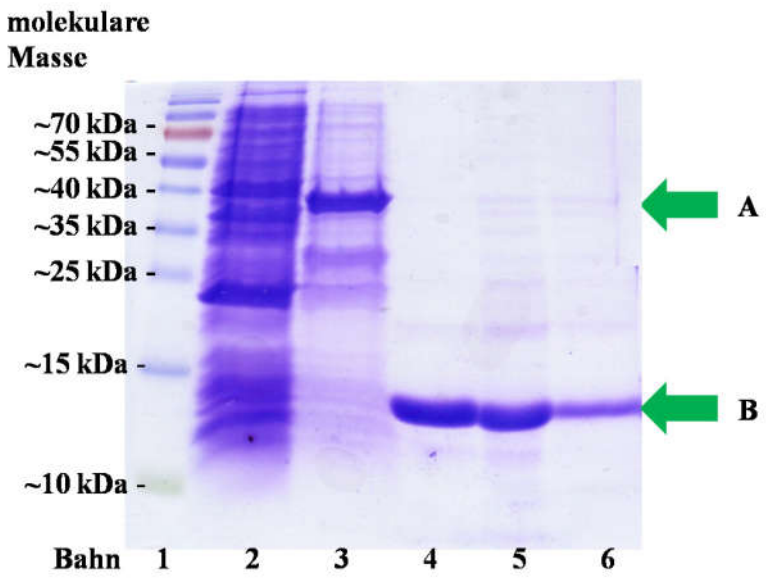
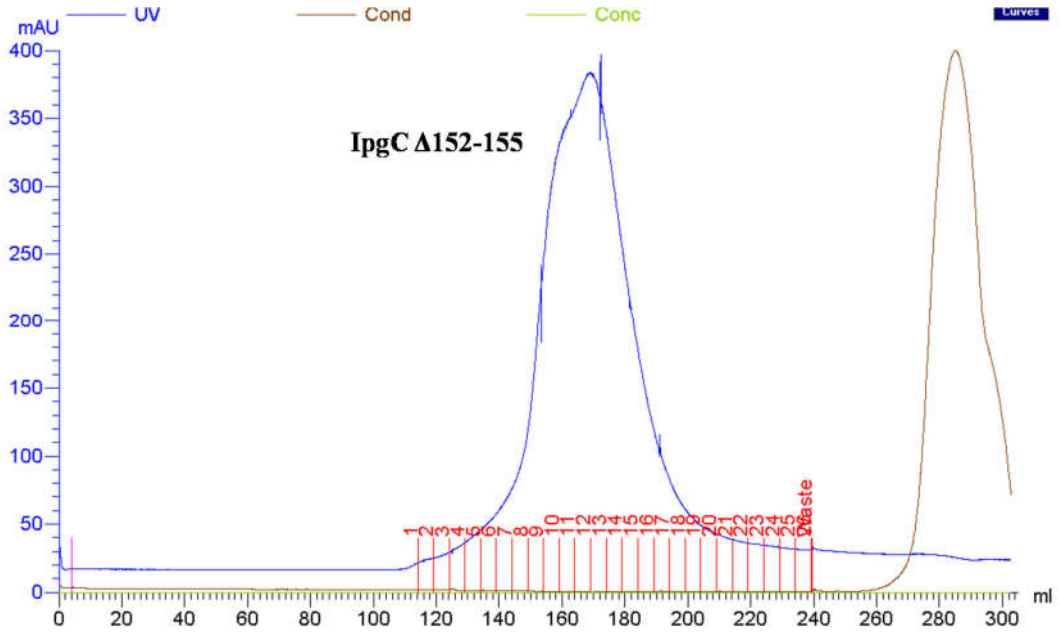


Abb. 28: 15% SDS-Gel IpgCΔ152-155 Aufreinigung: 1) *Thermo Fisher Scientific Prestained Protein Marker.* 2) Gesamtzellextrakt vor der Induktion. 3) Gesamtzellextrakt 12h nach der Induktion. 4) Elution der GSH-Säule nach Behandlung mit Thrombin. 5) Elution nach Umpuffern mit PD10-Säule. 6) Elution der Q-Sepharose bei 300 mM NaCl. Pfeil A zeigt die Laufhöhe des Fusionsproteins GST-IpgCΔ152-155, während Pfeil B die Laufhöhe des Zielproteins IpgCΔ152-155 zeigt.

Zur abschließenden Reinigung gemäß dem bestehenden Protokoll wurde die Proteinlösung einer Molekularsiebchromatographie mit einer HiLoad 26/60 Superdex 75-Säule unterzogen.



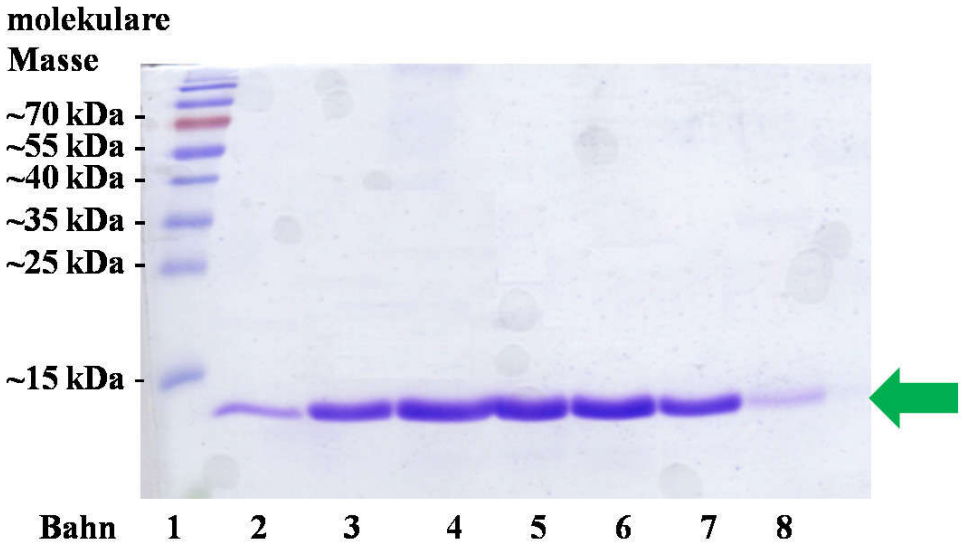


Abb. 29 oben: Chromatogramm der IpgCΔ152-155-Aufreinigung über SEC 75: die blaue Linie zeigt die UV-Absorption bei 280 nm.

unten: 15 % SDS Gel IpgCΔ152-155: 1) *Thermo Fisher Scientific Prestained Protein Marker*. 2) Fraktion 9. 3) Fraktion 10. 4) Fraktion 11. 5) Fraktion 12. 6) Fraktion 13. 7) Fraktion 14. 8) Fraktion 15. Der Pfeil zeigt die Laufhöhe des aufgereinigten IpgCΔ152-155.

Das Elutionsprofil dieser Chromatographie (Abb. 29 oben) zeigte einen einzelnen *Peak*, welcher in mehreren Fraktionen aufgefangen wurde. Proben der einzelnen Fraktionen wurden im SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 29 unten) und die Fraktionen, welche IpgC enthielten vereint und über ein 5 kDa Vivaspin Zentrikon aufkonzentriert. Das Protein wurde auf 10 mg/ml eingestellt, in Reaktionsgefäße à 50 µl aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Ausbeute lag bei sechzehn mg pro Liter Bakterienkultur. IpgC konnte erfolgreich aufgereinigt werden und stand in ausreichender Menge für die Kristallisationsversuche zu Verfügung.

4.4 Analytische Molekularsiebchromatographie

Das Elutionsprofil verschiedener Kalibrierungsproteine an der Superdex 200 10/300 GL-Säule wurde benutzt, um die Molekülmasse der Proteine abzuschätzen.

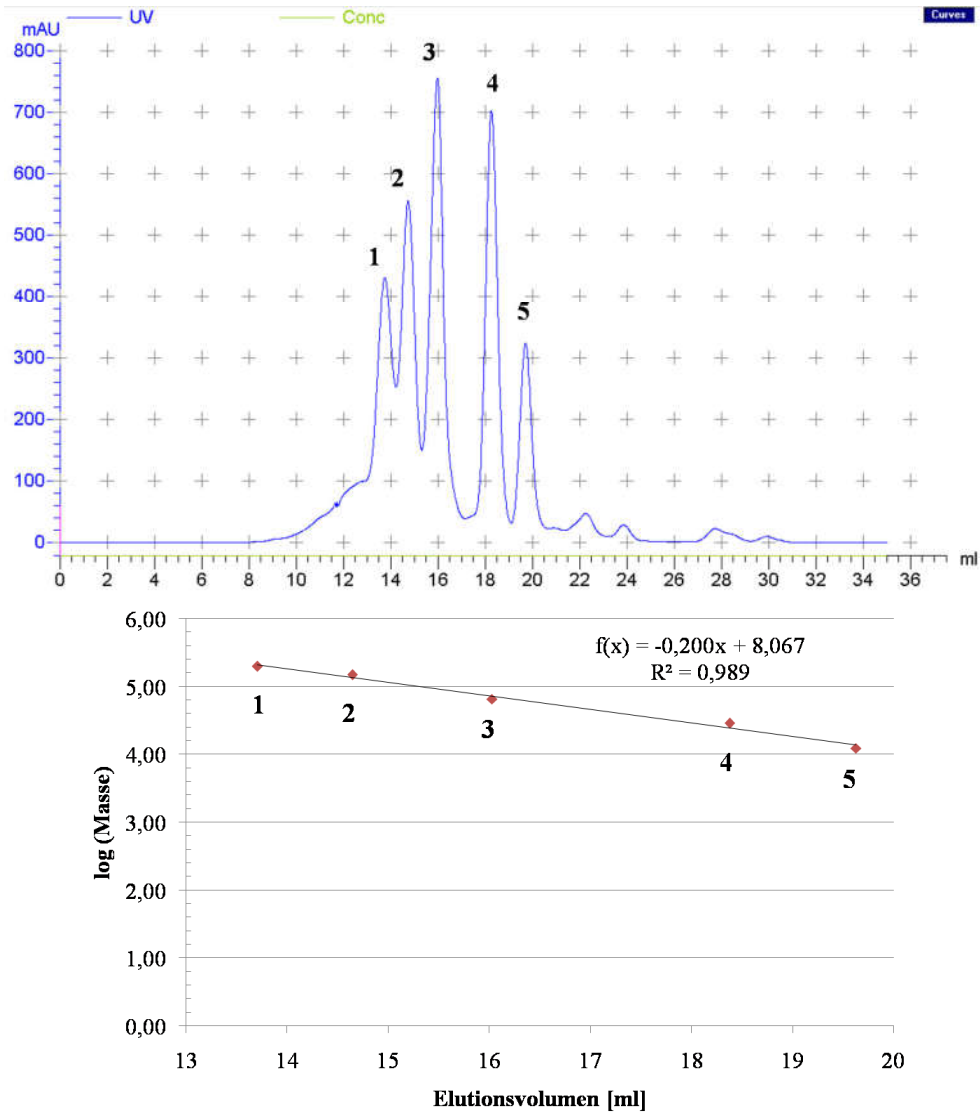


Abb.30: Molekülmassenbestimmung über analytische Superdex SEC 200 10/300 GL

oben: Chromatogramm nach Auftragen der Proteine aus *dem Kit for Molecular Weights 12-200 kD for GFC* (Sigma Aldrich) ohne Dextran Blue**.** Die blaue Linie zeigt die UV-Absorption bei 280 nm.

unten: Auftragung des Elutionsvolumen gegen den Logarithmus der Masse und die daraus resultierende Ausgleichsgerade (Kalibiergrade); 1 = β-Amylase, 2 = Alkoholdehydrogenase, 3 = Albumin, 4 = Carbonische Anhydrase, 5 = Cytochrom C.

Dazu wurde ein Gemisch aus Proteinen verschiedener Molekülmassen auf die Säule appliziert und unter identischen Bedingungen mit dem SEC 7.5-Puffer eluiert.

Aus der Kalibiergeraden ergibt sich folgende Gleichung:

$\log(\text{Masse}) = -0{,}200 \cdot \text{Elutionsvolumen} + 8{,}067$ [1]

Durch Exponentieren erhält man:

$\text{Masse} = 10^{-0{,}2 \cdot \text{Elutionsvolumen} + 8{,}067}$ [2]

Mit Hilfe dieser Gleichung [2] kann aus dem Elutionsvolumen die molare Masse ermittelt werden, wenn das Protein globulär vorliegt.

Tabelle 25: Proteine des Kalibrierungskits von Sigma Aldrich mit Masse und Elutionsvolumen

Protein	*Masse*	*log(Masse)*	*Elutionsvolumen [ml]*
β-Amylase	200 kDa	5,3010	13,71 ± 0,04
Alkoholdehydrogenase	150 kDa	5,1761	14,65 ± 0,05
Albumin	66 kDa	4,8195	16,03 ± 0,04
Carbonic Anhydrase	29 kDa	4,4624	18,38 ± 0,04
Cytochrome C	12,4 kDa	4,0934	19,63 ± 0,03

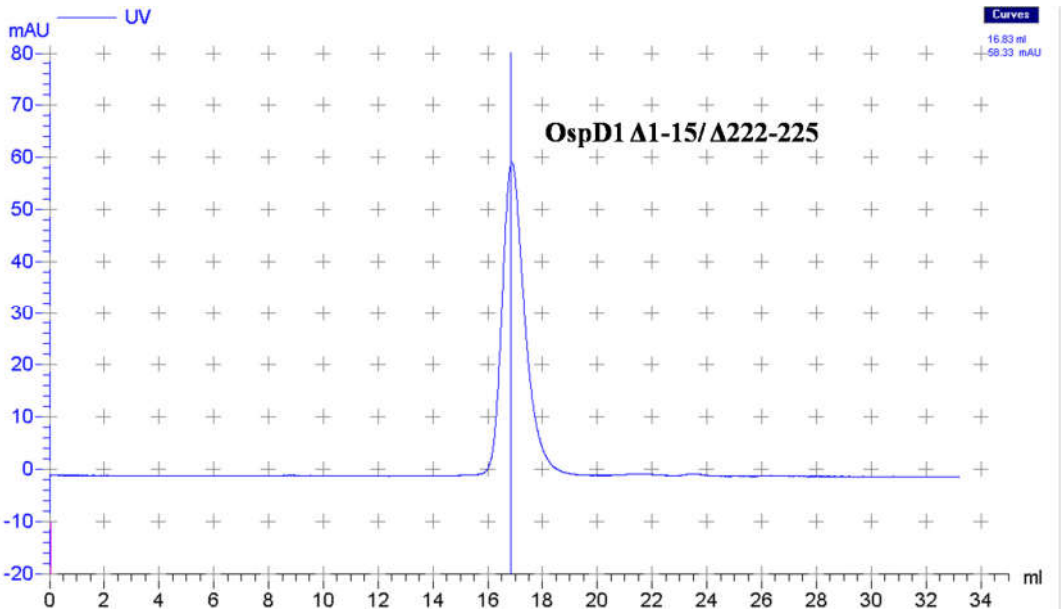


Abb. 31: Chromatogramm der analytischen Superdex SEC 200 10/300 GL nach Auftragen von OspD1Δ1-15/Δ222-225. Die Elution des Proteins erfolgte bei 16,83 ± 0,04 ml. Die blaue Linie zeigt die UV-Absorption bei 280 nm.

Bei der analytischen Größenausschlusschromatographie mit der kalibrierten Säule eluierte OspD1Δ1-15/Δ222-225 bei 16,83 ± 0,04 ml. Mit Hilfe der Gleichung [3] lässt sich daraus ein Molekulargewicht von 50,3 ± 0,5 kDa ermitteln (siehe Abb. 31) was darauf hindeutet, dass OspD1Δ1-15/Δ222-225 eventuell als ein Homodimer vorliegt (45,2 kDa).

Spa15 eluierte mit einem Volumen von 17,31 ± 0,03 ml. Durch Gleichung [3] konnte ein Molekulargewicht von 33,3 ± 0,4 kDa (siehe Abb. 32) ermittelt werden. Damit weicht der experimentell ermittelte Wert nur geringfügig vom Literaturwert (30,2 kDa) des Spa15-Homodimers ab (van Eerde et al. 2004).

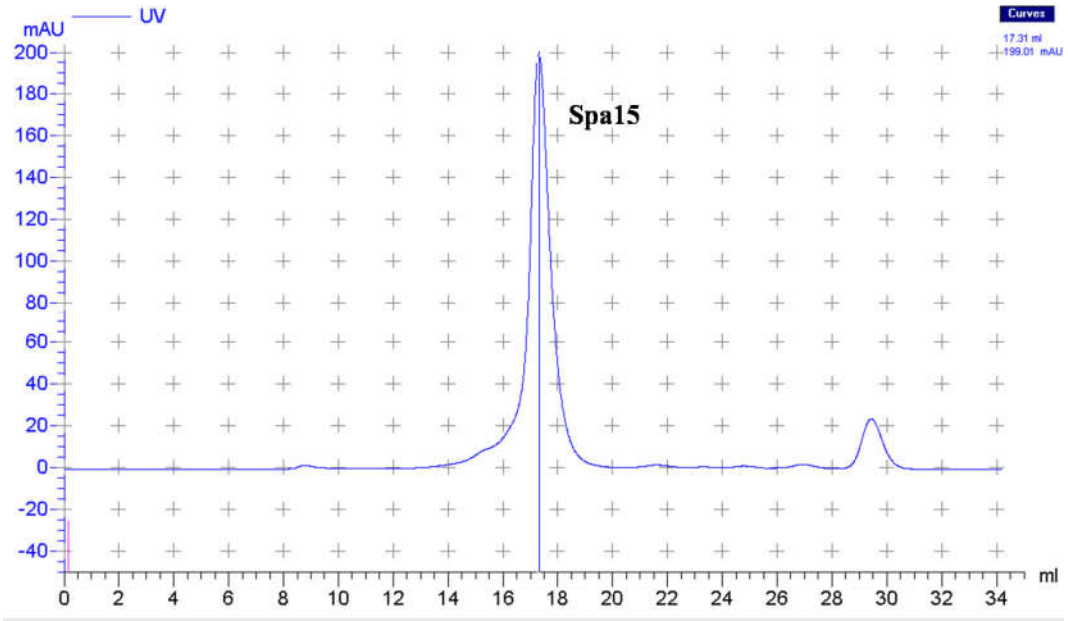


Abb. 32: Chromatogramm der analytischen Superdex SEC 200 10/300 GL nach Auftragen von Spa15. Die Elution des Proteins erfolgte bei 17,31 ± 0,03 ml. Die blaue Linie zeigt die UV-Absorption bei 280 nm.

Nach Inkubation eines Gemisches aus OspD1Δ1-15/Δ222-225 und Spa15 im Verhältnis 1:1 (Puffer SEC 7.5) und Auftragen des Gemisches auf die analytische SEC-Säule zeigt die Elution des Komplexes ein Elutionsvolumen von 17,16 ± 0,05 ml. Setzt man dieses in die Gleichung [3] ein, errechnet sich ein Molekulargewicht von 43,2 ± 0,03 kDa. Aus der Addition der Molekulargewichte von OspD1Δ1-15/Δ222-225 (22,6 kDa) und Spa15 (15,1 kDa) errechnet sich ein Wert von 37,7 kDa (siehe Abb. 33). Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich um ein Hetero-Dimer aus einem OspD1Δ1-15/Δ222-225 und einem Spa15 handelt. Geht

man von einem Komplex aus einem OspD1Δ1-15/Δ222-225 (22,6 kDa) und einem Spa15-Dimer (30,2 kDa) aus, wäre das zu erreichende Molekulargewicht bei 52,8 kDa. Dafür ist der experimentell ermittelte Wert allerdings zu niedrig. Eine Erklärung für dieses Resultat wäre, dass der ermittelte Wert als globuläre Form des Komplexes von dem theoretischen Molekulargewicht abweicht (Hong et al. 2012). Vergleichend spricht das Ergebnis aus dem *MST*-Stöchiometrie-Experiment (vergleiche dazu 4.7.1.1.) für einen Komplex aus einem OspD1Δ1-15/Δ222-225 und einem Spa15-Dimer.

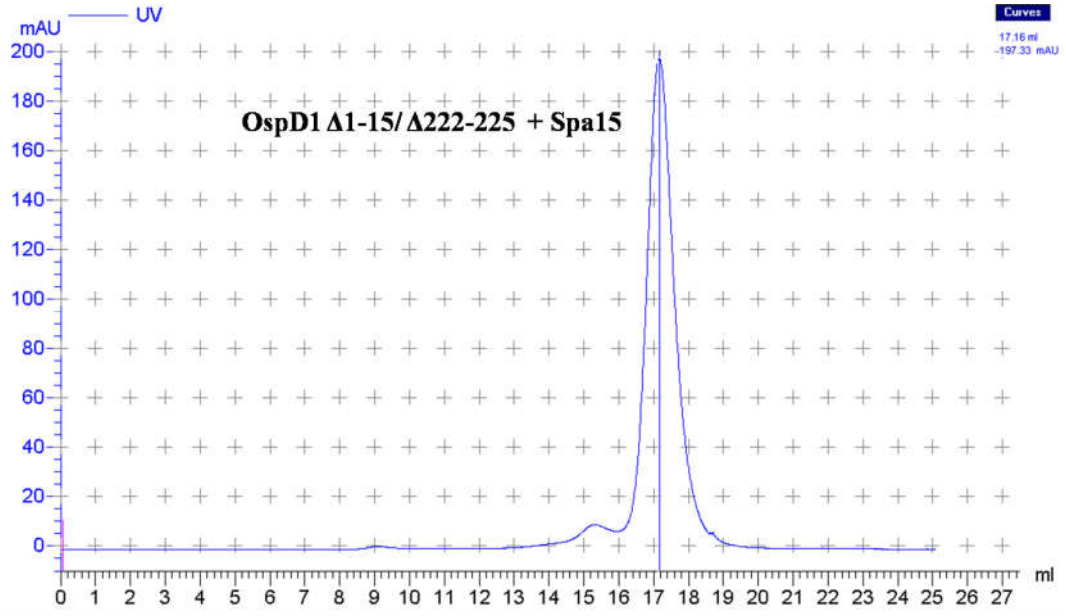


Abb. 33: Chromatogramm der analytischen Superdex SEC 200 10/300 GL nach Auftragen von OspD1Δ1-15/Δ222-225 mit Spa15. Die Elution des Proteinkomplexes erfolgte bei 17,16 ± 0,05 ml. Die blaue Linie zeigt die UV-Absorption bei 280 nm.

4.5 Mit OspD1Δ1-15/Δ222-225 und IpgCΔ152-155 durchgeführter *Thermal Shift Assay (TSA)*

Der *TSA* ist eine biochemische Methode zur Messung der Thermostabilitätsänderung bei Faltung eines Proteins nach Zugabe eines Bindungspartners (Niesen et al. 2007). Die Stabilisierung äußert sich unter anderem durch eine erhöhte Hitzebeständigkeit des Proteins, so dass die biologische Aktivität des Proteins auch bei vergleichsweise höheren Temperaturen erhalten bleibt. Erfahrungsgemäß korrelieren Homogenität, Stabilität und Löslichkeit einer Proteinpräparation signifikant mit der Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Kristallisation des Proteins (Ericsson et al. 2006). Um die stabilsten Bedingungen für die Proteine OspD1Δ1-15/Δ222-225 und

IpgCΔ152-155 zu finden, wurde der *TSA* mit verschiedenen Puffersystemen und Additiven durchgeführt. In vorhergehenden Studien konnten bereits pH-Bereiche ermittelt werden, in denen die Proteine OspD1Δ1-15/Δ222-225 und Spa15 stabil vorlagen. OspD1Δ1-15/Δ222-225 zeigte sich stabil im Bereich von pH 6,0 bis 8,5. Für Spa15 erwies sich der pH-Bereich zwischen 7,5 und 8,5 am günstigen. Bei der Untersuchung von verschiedenen Natriumchloridkonzentrationen in 1 M HEPES pH 8,0 konnte für beide Proteine festgestellt werden, dass die Stabilität der Proteine praktisch nicht von der Natriumchloridkonzentration bzw. der Ionenstärke abhängig ist (Jüngel 2010).

4.5.1 Additiv*screening*

Am EMBL Hamburg wurde in Kooperation mit Stephane Boivin ein großflächiges Screening mit 96 verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

IpgCΔ152-155 zeigte beim Erhitzen keine normalen sigmoidalen Schmelzkurven, sondern Schmelzkurven mit einen vorgelagerten *Peak*. Das deutet darauf hin, dass sich zuerst das Dimer destabilisiert und dann jedes Monomer für sich denaturiert. Insgesamt weist IpgCΔ152-155 aber eine gute Thermostabilität auf (siehe Tabelle 26) und die Schmelztemperaturen (T_m) der getesteten Bedingungen liegen zwischen 45 °C und 52 °C. Die besten zehn Bedingungen des Screens liegen im pH-Bereich zwischen pH 6,5 und pH 9,0. Ihnen ist gemein, dass alle eine Konzentration von 250 mM NaCl aufweisen.

Tabelle 26: Zusammenfassung der Ergebnisse des Additivscreens am EMBL Hamburg für OspD1Δ1-15/Δ222-225 und IpgCΔ152-155

Protein	***OspD1Δ1-15/Δ222-225***	***IpgCΔ152-155***
Thermostabilität insgesamt	hohe Thermostabilität, T_m = 46,6-54,1 °C, entfaltet sich ab 40 °C	hohe Thermostabilität, T_m 45-52 °C, keine sigmoidalen Schmelzkurven, vermutlich 2 strukturelle Domänen
+/- 250mM NaCl	Bei 250 mM NaCl verringert sich die Thermostabilität	Bei 250 mM NaCl verringert sich die Thermostabilität

Protein	*OspD1Δ1-15/Δ222-225*	*IpgCΔ152-155*
Succinylsäure / Orthophosphor-säure / Glycin	Bei pH 6,8 bis pH 7,8 verringert sich die Thermostabilität	Unter pH 6,5 verringert sich die Thermostabilität, ist am stabilsten bei pH 7,2- 7,8
Citronensäure / CHES / HEPES	stabil bei pH 5,1 bis pH 9,0	Unter pH 6,0 verringert sich die Thermostabilität, ist am stabilsten bei pH 7,2 bis 8,2
NaCl-Effekt bei 50 mM HEPES pH 7,5 sowie bei 50 mM Tris pH 8,0	Bei 50 mM NaCl verringert sich die Thermostabilität	Bei Anwesenheit von NaCl verringert sich die Thermostabilität, ab 500 mM destabilsiert sich Dimer
Puffer-Konzentrations-effekt HEPES pH 7,5 Na_2HPO_4 pH 7,5	Pufferkonzentration hat wenig Effekt auf die Thermostabilität, am stabilsten sind 50 mM HEPES, 10 mM und 50 mM Na_2HPO_4	Pufferkonzentration hat keinen Effekt auf die Thermostabilität
Puffer-Konzentrations-effekt Tris pH 8.0	hohen Pufferkonzentrationen (ab 100 mM) wirken sich destabilisierend aus, am stabilsten ist 50 mM Tris	Pufferkonzentration hat keinen Effekt auf die Thermostabilität
Top 10 der getesteten Bedingungen	1 Bis-Tris pH 6,5 2 Natriumacetat pH 4,5 3 MOPS pH 3,0 4 Na Caco pH 6,5 5 Tris-HCl pH 7,5 6 Citronensäure pH 6,0 250 mM NaCl 7 10 mM HEPES pH 7,0 8 Kaliumphosphat pH 6,0 250 mM NaCl 9 50mM HEPES pH 7,5 10 Citronensäure pH 6,0	alles mit 250 mM NaCl : 1 Bis-Tris pH 6,5 2 MOPS pH 7.0, 3 Ammonuimacetat pH 7,3 4 Tris-HCl pH 7,5 5 Tris-HCl pH 8,0 6 Tris-HCl pH 8,5 7 Tricin pH 8,0 8 Bicin pH 8,0 9 Bicin pH 8,5 10 Bicin pH 9,0

OspD1 Δ1-15/Δ222-225 hat ebenfalls eine gute Thermostabilität mit einer Schmelztemperatur zwischen 46,6 °C bis 54,1 °C. Die Top 10-Bedingungen befinden sich im pH-Wert-Bereich zwischen 4,5 und 7,5. Nur zwei der Bedingungen enthalten 250 mM NaCl (siehe Tabelle 26).

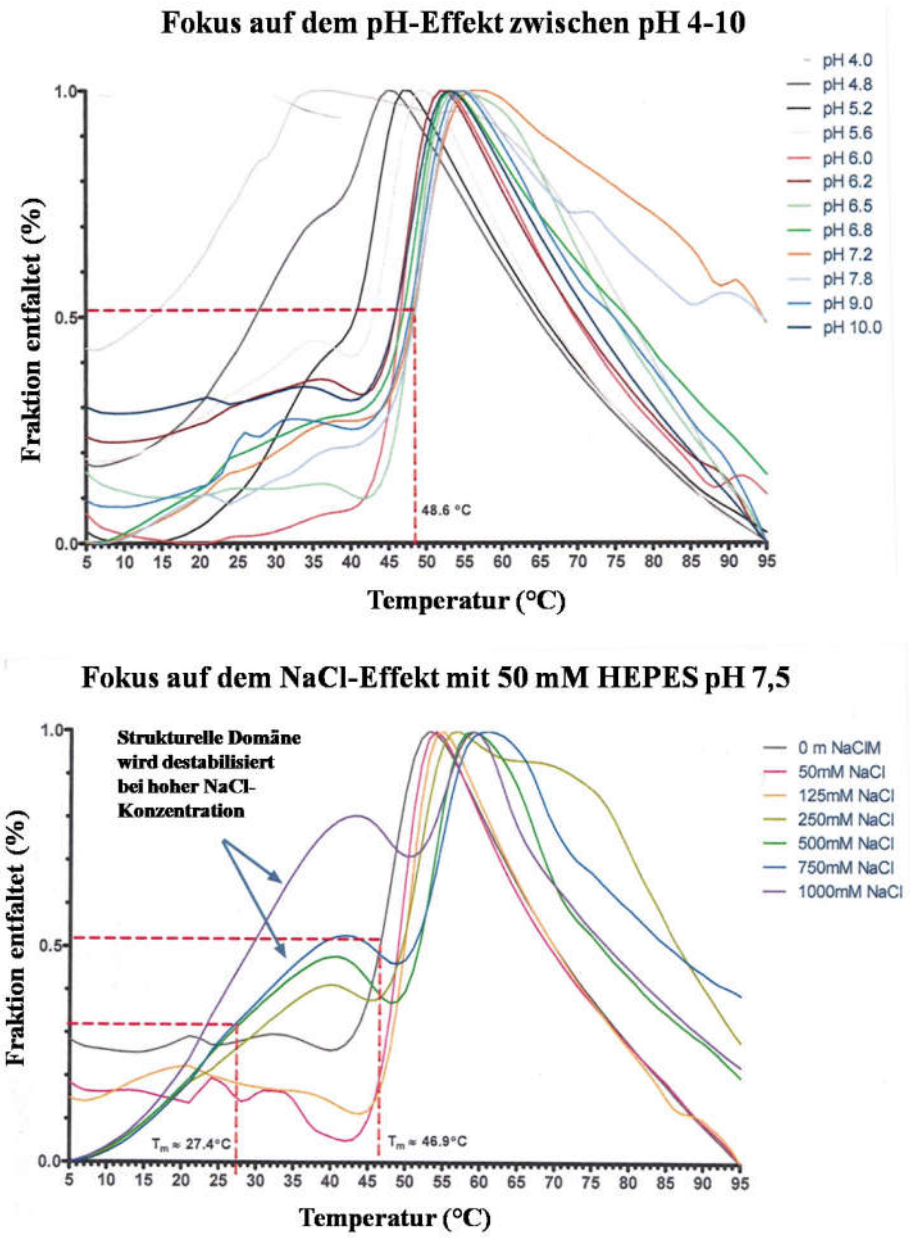


Abb. 34: ***Thermal Shift Assay*** **mit IpgCΔ152-155 oben:** Messung mit Citronensäure-, CHES-, HEPES-Puffer im einem Bereich zwischen pH 4 bis 10.

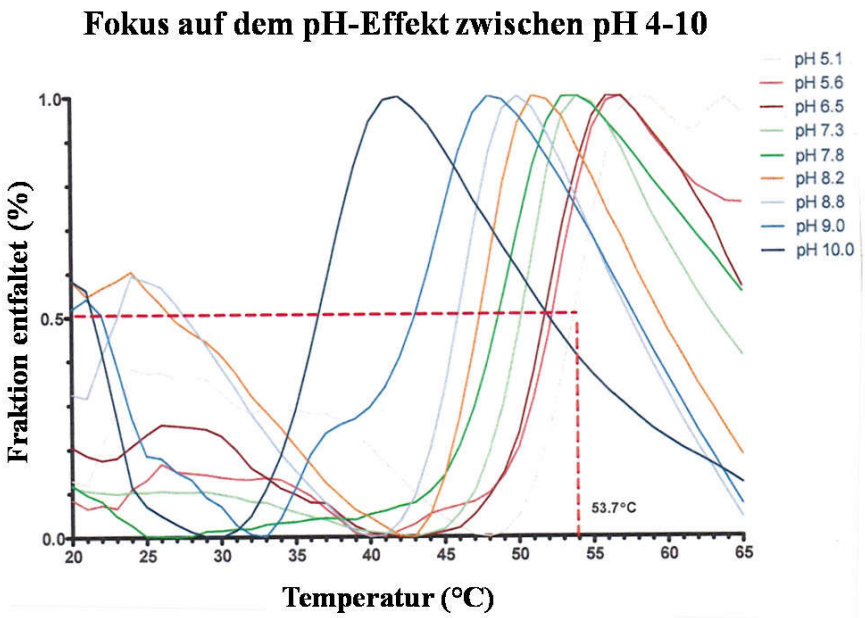
unten: Messung mit 50 mM HEPES in einem NaCl-Bereich von 0-1000 mM.

Der Effekt des pH-Wertes bei IpgCΔ152-155 (Abb. 34, oben) ist beim Auftragen der Temperatur (°C) gegen die entfaltete Fraktion (%) zu sehen. IpgCΔ152-155 ist bei pH 6,5 unstabil. Die stabilsten Werte mit einer T_m von 48,6 °C wurden bei pH-Werten zwischen 7,2 und 7,8 gemessen. Wird das Protein in 50 mM HEPES pH 7,5 mit NaCl gelöst, scheint dieses Gemisch das Protein zu stabilisieren

(Abb. 34, unten). Bei Salzkonzentrationen ab 250 mM NaCl stabilisiert sich das Dimer. Für diese Konzentrationen konnte neben den ersten Schmelzpunkten ein weiterer Schmelzpunkt bei 27,4 °C gemessen werden. Dieser Effekt tritt außerdem auf, wenn das Protein in 50 mM Tris-HCl pH 8,0 vorliegt (Daten nicht gezeigt).

Mit OspD1Δ1-15/Δ222-225 zeigte sich, dass das Protein stabiler wird, je niedriger der pH-Wert ist. Bei einem pH von 5,1 konnte eine T_m von 53,7 °C detektiert werden, während bei einem pH von 10 die T_m etwa 36 °C betrug. Über den kompletten pH-Bereich blieb das Protein allerdings stabil (siehe Abb. 35, oben).

NaCl zeigte bei den durchgeführten Experimenten mit OspD1Δ1-15/Δ222-225 einen destablisierenden Effekt: je höher die Konzentration, desto niedriger T_m. Allerdings bleibt auch hier das Protein über den kompletten Messbereich der NaCl-Konzentration stabil (siehe Abb. 35, unten). Um die Ergebnisse am EMBL Hamburg zu überprüfen, wurden sowohl für IpgCΔ152-155 als auch für OspD1Δ1-15/Δ222-225 Einzelmessungen am Real Time PCR Cycler iQ5 von Biorad *in-house* wiederholt. Zu verschiedenen pH-Werten wurden Messungen, angefangen bei pH 4,0 in 0,5-Schritten bis 9,5, durchgeführt.



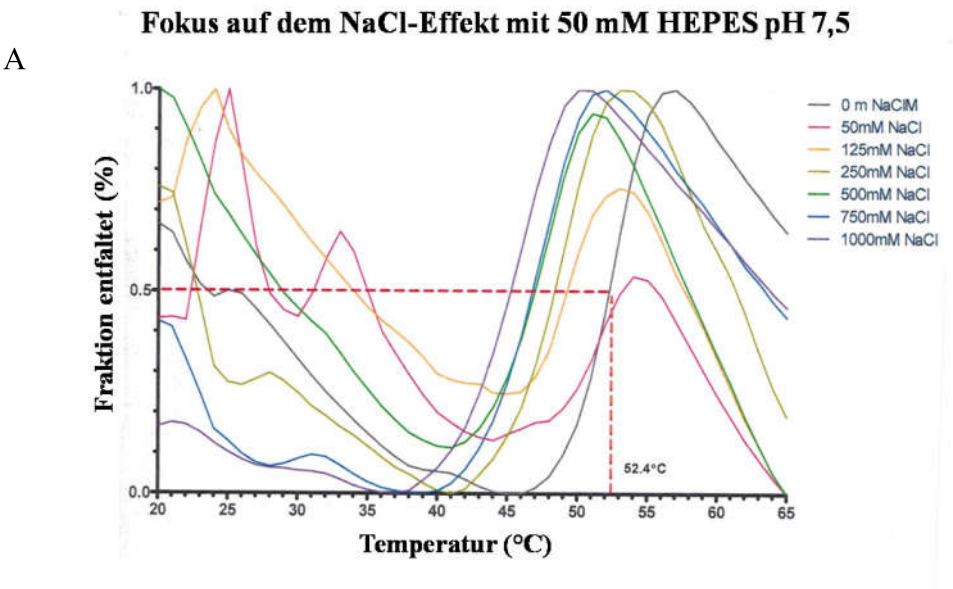


Abb. 35: ***Thermal Shift Assay*** **mit OspD1Δ1-15/Δ222-225 oben:** Messung mit Citronensäure-, CHES-, HEPES-Puffer im einem Bereich von pH 4 bis 10. Aufgrund der Übersichtlichkeit sind die Kurven der unstabilen Messungen bei pH 5,1 nicht gezeigt.

unten: Messung mit 50 mM HEPES in einem NaCl-Bereich von 0-1000 mM

außerdem wurden T_m zu verschiedenen NaCl Konzentrationen von 0 bis 1000 mM (0 mM, 50 mM, 125 mM, 250 mM, 500 mM und 1000 mM) in 50 mM HEPES-Puffer pH 7,5 gemessen. Die ermittelten Ergebnisse entsprachen den Messungen am EMBL Hamburg (Daten nicht gezeigt).

4.5.2 Fragment*screening*

Der floureszenzbasierte *TSA* kann als allgemeines Verfahren für die Identifizierung von Inhibitoren aus Fragmentbibliotheken für verschiedene Zielproteine eingesetzt werden (Lo et al. 2004). Für ein *Screening* wurde für das Protein IpgCΔ152-155 sowie die Fragmentbibliothek der Arbeitsgruppe Klebe (Köster et al. 2011) eingesetzt. Liganden, die die thermische Denaturierung stabilisieren, so dass sich die Schmelztemperatur des Komplexes erhöht, gelten typischerweise als sogenannte *Hits* (Treffer). Alle löslichen Verbindungen der 364 Fragmente wurden für das Screeningexperiment in DMSO gelöst und mittels *TSA* vermessen. Für das Protein IpgCΔ152-155 konnte festgestellt werden, dass kein Fragment in der Lage war, mit dem Protein so zu interagieren, dass seine T_m maßgeblich stieg. Als maßgeblich wurde hier die 3-fache Standardabweichung der Negativkontrolle in DMSO angesehen (Kuhnert et al. 2015). 41 der gemessenen Fragmente senkten die T_m

maßgeblich ab und destabilisierten IpgCΔ152-155. Obwohl *TSA* oft zum Fragment*screening* eingesetzt wird, da es günstig ist und schnell durchgeführt werden kann, ist es als Methode zur Identifizierung von bindenden Liganden umstritten, so dass man zur Bestätigung der *Hits* zu einer weiteren Methode wie zum Beispiel der mikroskalierten Thermophorese oder der isothermen Titrations-kalorimetrie greifen sollte (Davis und Erlanson 2013).

4.6 Peptidsynthese der OspD1-Peptide

Costa und seine Kollegen untersuchten die *N*-terminalen 70 Aminosäurenreste von dreizehn *Shigella-* und *Samonella*-Effektoren wie OspD1, welche mit Spa15 und/oder dem *Samonella*-ortholog InvB interagierten.

Dabei identifizierten sie ein konserviertes Chaperonbindemotiv mit dem Muster $(LMIF)_{\mathbf{1}}XXX(IV)_{\mathbf{5}}XX(IV)_{\mathbf{8}}X(N)_{\mathbf{10}}$. Durch zielgerichte Mutagenese konnten die Aminosäuren an Position eins, fünf, acht und zehn, welche essentiell für die Bindung waren, ermittelt werden. Für OspD1 war das die Sequenz von Aminosäure 31-41 **M**KNN**I**IN**V**T**N** (Costa et al. 2012). In der Masterarbeit der Verfasserin (Jüngel 2010) konnte in Übereinstimmung damit gezeigt werden, dass die Aminosäuren 16-31 von OspD1 für eine Interaktion mit Spa15 notwendig sind. Um die Ergebnisse von Costa und Kollegen zum einen mittels Thermophorese zu überprüfen und zum anderen OspD1 mit der entsprechenden Sequenz zu kristallisieren, wurde die von Costa ermittelte Aminosäurensequenz als Peptid dargestellt. Darüber hinaus wurde bei der Thermophoresemessung die Peptidsequenz *N*- und *C*-terminal um 2 AS und um 5 AS verlängert. Da Methionin für schnelle Oxidation anfällig ist, die sich negativ auf die Spaltung von Schutzgruppen und die Peptidreinigung sowie die Kristallisation auswirken kann, wurde jeweils ein weiteres Peptid hergestellt, bei dem Methionin durch Norleucin ersetzt wurde. Dieses ist fast isosterisch, obwohl es keinen Schwefel enthält.

Mittels der Fmoc-basierten Festphasenpeptidsynthese wurden die Peptide JK-01-122.1 bis JK-01-122.6 ausgehend von einem Fmoc-geschützten beladenen Rink-Amid-Harz dargestellt. Mit dem Aktivierungsreagenz DMF wurde das Harz zunächst vorgequollen. Danach erfolgte die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen und durch Zugabe der voraktivierten Fmoc-Aminosäure und der Kopplungsreagenzien fand die Kopplung statt. Der Zyklus wurde so oft wiederholt, wie Aminosäuren gekoppelt

werden sollten. Den Abschluss bildete die Acetylierung.

Nach der präparativen HPLC-Aufreinigung und der analytischen HPLC wurden die jeweiligen vollaufgereinigten Peptide mittels ESI-Massenspektrometrie untersucht. Abb. 36 zeigt exemplarisch die ESI-MS-Analytik eines gereinigten Peptids und belegt durch die Ionenmasse seine Identität. Häufig waren mehr als ein Pseudomolekularion pro Verbindung zu beobachten. Mit der Größe der Moleküle steigt die Chance, dass sich doppelt (mehrfach) geladene Ionen bilden, z.B. $[M+2H]^{2+}$. Diese konnten durch den Abstand der Isotopen*peaks* erkannt werden (1 Da Abstand für einfach geladene Ionen, ½ Da für doppelt geladene und 1/3 Da für dreifach geladene Moleküle, etc.).

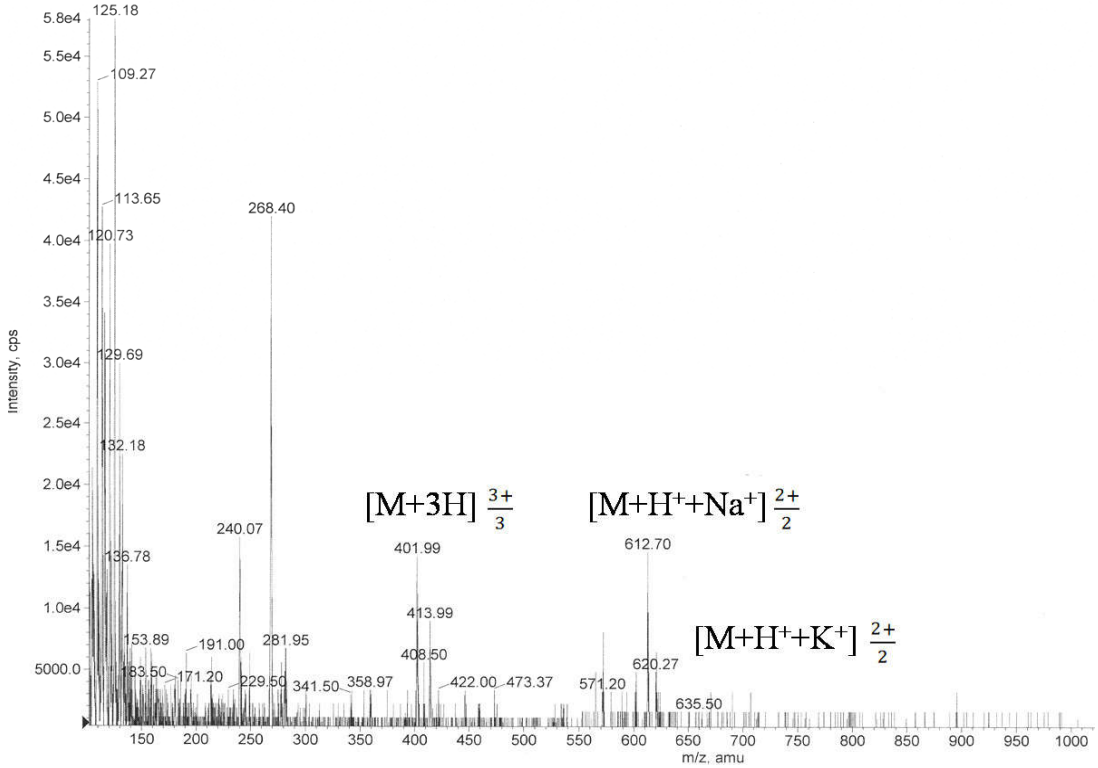


Abb. 36: ESI-MS-Spektrum von JK-01-122.1 (M_{calc}= 1201,40) nach HPLC-Reinigung

Die ESI-MS-Spektren aller Peptide aus dieser Arbeit sind im Anhang zu finden (Abb.56 bis Abb. 61). Die erhaltenen M_{exp} m/z-Werte sind zusammen mit den errechneten Massen in Tabelle 27 wiedergegeben.

Tabelle 27: OspD1-Peptide mit Sequenz, errechneter Masse und den ermitteltenden M_{exp} m/z

Peptid	*Sequenz*	*$M_{berechnet}$ [g/mol]*	*M_{exp} m/z*
JK-01-122.1	Ac-MKNNIINVTN-NH_2	1201,40	612,70 $[M+H^{+}+Na^{+}]\frac{2+}{2}$
JK-01-122.2	Ac-KGMKNNIINVTNTA-NH_2	1558,80	780,48 $[M+2H]\frac{2+}{2}$
JK-01-122.3	Ac-NENKGMKNNIINVTNTAISH-NH_2	2252,13	1127,70 $[M+2H]\frac{2+}{2}$
JK-01-122.4	Ac-Nle-KNNIINVTN-NH_2	1182,67	592,69 $[M+2H]\frac{2+}{2}$
JK-01-122.5	Ac-KG-Nle-KNNIINVTNTA-NH_2	1540,76	771,44 $[M+2H]\frac{2+}{2}$
JK-01-122.6	Ac-NENKG-Nle-KNNIINVTNTA-NH_2	2234,18	1119,00 $[M+2H]\frac{2+}{2}$

Insgesamt sind die ermitteltenden Ionenmassen Indiz dafür, dass es sich bei den festphasensynthesierten Peptiden um die gewünschten Produkte handelt. Die entstandenen Peptide wurden bei der *MST* und der Co-Kristallisation mit Spa15 eingesetzt.

4.7 *Microscale Thermophoresis (MST)* mit OspD1 und Spa 15

Um die Affinität von Proteininteraktion bei Protein/Peptidinteraktionen zu erfassen, wurde die *Microscale Thermophoresis* eingesetzt.

4.7.1 OspD1Δ1-15/Δ222-225 mit Spa15

In der Masterarbeit der Verfasserin wurde mit dieser Methode mit dem Gerät Monolith NT.015 ein K_D-Wert von 14,9 µM für die Interaktion zwischen OspD1Δ1-15/Δ222-225 mit Spa15 bestimmt (Jüngel 2010). Da dieser Prototyp gegen ein Serienmodell (NT.115) ausgetauscht wurde und dieses noch sensitiver sein sollte, wurde der K_D-Wert der Interaktion erneut bestimmt. Dazu wurde das fluoreszenzmarkierte OspD1Δ1-15/Δ222-225 in konstanter Menge vorgelegt und Spa15 wurde in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Als Messsignal wurden die Veränderungen der Fluoreszenzverteilung mit einem Epifluoreszenzmikroskrop aufgenommen. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software von NanoTemper.

Die gemessenen Daten wurden in Abb. 37 als halblogarithmische Auftragung der Spa15-Konzentrationen gegen die Thermophorese gezeigt. Als Maß für die

Stärke der Interaktion konnte aus den ermittelten Messwerten über eine Ausgleichsfunktion ein K_D-Wert von 40,6 ± 1.51 nM ermittelt werden. Der mit dem neuen Gerät gemessene Wert lag deutlich unter dem zuvor ermittelten Wert. Der K_D-Wert zeigte eine messbar stärkere Bindung zwischen OspD1**Δ**1-15/**Δ**222-225 und Spa15, als zuvor angenommen.

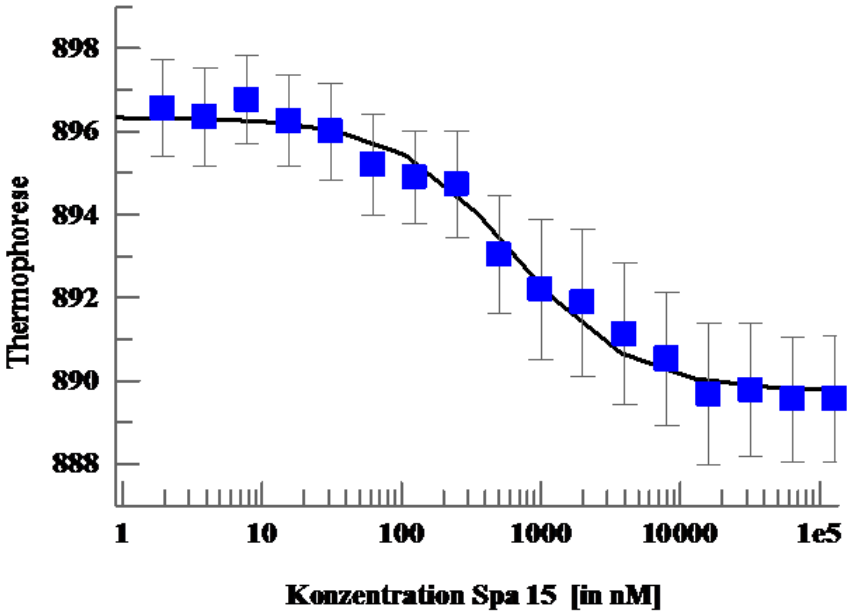


Abb. 37: ***Microscale Thermophoresis*** von 30 nM OspD1Δ1-15/Δ222-225 bei verschiedenen Konzentrationen von Spa15: Aufgetragen ist die Konzentration von Spa15 in logarithmischer Skalierung gegen die Thermophorese. Die geplotteten Durchschnittswerte und Fehlerbalken resultieren jeweils aus zehn Einzelmessungen.

Ebenfalls erneut gemessen wurden OspD1Δ1-32/**Δ**222-225 und OspD1**Δ**1-80/**Δ**222-225 jeweils analog mit Spa15. Bei diesem Experimentteil konnte in beiden Fällen keine Änderung des thermophoretischen Verhaltens gemessen werden (Daten nicht gezeigt). So bestätigen sich die Ergebnisse der Masterarbeit der Verfasserin. Bei den beiden längeren trunkierten Varianten findet keine Stabilisierung durch Spa15 und somit auch keine Interaktion von OspD1**Δ**1-80/**Δ**222-225 und OspD1**Δ**1-32/**Δ**222-225 mit Spa15 statt.

4.7.1.1. Stöchiometrieexperiment

MST erlaubt nicht nur eine genaue Bestimmung der Bindeaffinitäten, es ist außerdem möglich, Informationen über den molekularen Mechanismus der Wechselwirkung abzuleiten. So ist es möglich, die Stöchiometrie der Interaktion zu bestimmen, wenn der K_D-Wert bekannt ist. Die Software verfügt über ein *Tool*, mit dem es möglich ist, Bindekurven bei entsprechender Konzentration zu simulieren. In Stöchiometrieexperimenten sollte die Konzentration des fluoreszenten Moleküls mindestens 20-fach höher sein als der ermittelte K_D-Wert der Interaktion (persönliche Mitteilung Dr. Nina Schlick, Nanotemper München). Als Näherungswert wurde ein K_D-Wert von 40 nM für die Interaktion zwischen OspD1Δ1-15/Δ222-225 und Spa15 verwendet.

Für das markierte OspD1Δ1-15/Δ222-225 konnte eine Konzentration von 1 µM als Sättigungspunkt ermittelt werden.

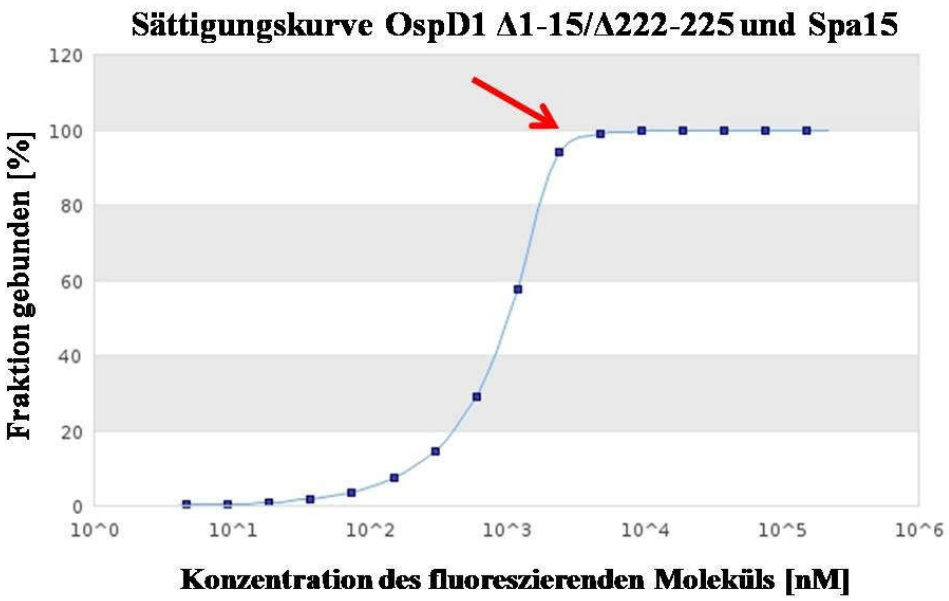


Abb. 38: Sättigungskurve Stöchiometrieexperiment von OspD1Δ1-15/Δ222-225 bei verschiedenen Konzentrationen von Spa15: Aufgetragen ist mit Hilfe des Konzentrationsfindetools der Nanotemper Software die Konzentration von OspD1Δ1-15/Δ222-225 gegen die prozentuale Reihung der gebundenen Fraktion. Die Sättigungskurve zeigt bei einer Konzentration von 1000 nM einen charakteristischen „Knick“ (roter Pfeil), nachdem der Bindepartner gesättigt ist.

Im ersten Teil des Stöchiometrieexperiments (Abb. 39) wurde der genaue Konzentrationsbereich des Fluorophors festgelegt, indem eine Standardtitration mit 1 µM markiertem OspD1Δ1-15/Δ222-225 gegen Spa15 von 0,156 bis 512 µM durch Gebrauch einer 1: 1 Verdünnungsreihe gemessen wurde. Dieser erste Versuch gab bereits einen ersten Hinweis auf die potentielle Stöchiometrie, da der Sättigungsknick ab einer Ligandkonzentration von 2 µM auftrat.

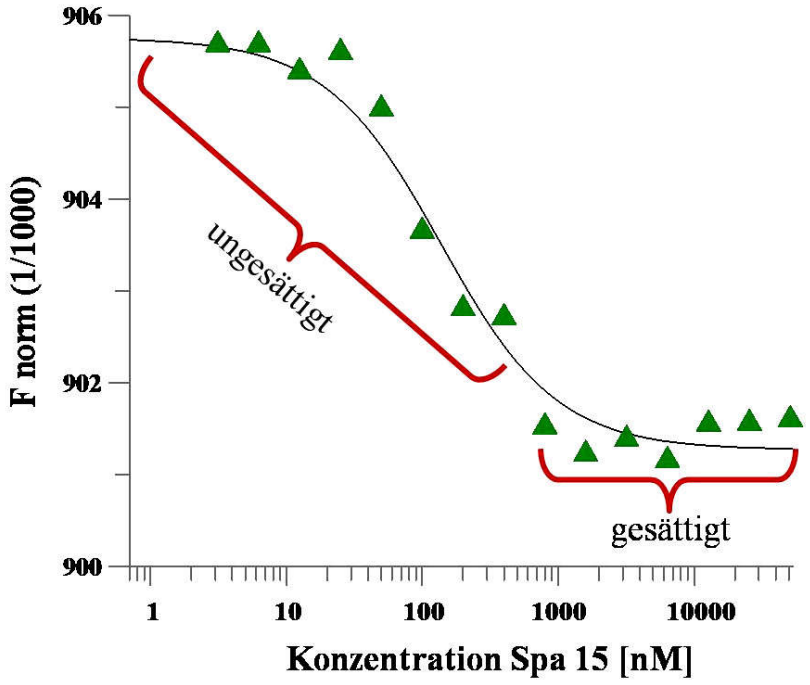


Abb. 39: Experimentell ermittelte Sättigungskurve des Stöchiometrieexperiments von OspD1Δ1-15/Δ222-225 bei verschiedenen Konzentrationen von Spa15: Aufgetragen ist die Konzentration von Spa15 in logarithmischer Skalierung gegen die Thermophorese.

Da aber eine 1:1 Verdünnungsreihe verwendet wurde, war es notwendig in einem zweiten Experiment (Abb. 40) den genauen Konzentrationsbereich des Liganden einzugrenzen, um genügend Datenpunkte für eine genaue Bestimmung der Wechselwirkung zu erhalten. Daher wurde in einem zweiten Experiment die gleiche Konzentration an Spa15 im Bereich um den Sättigungspunkt aus dem ersten Experimentteil titriert. Eingesetzt wurden 200 bis 3200 nM. Eine 1:1 Verdünnungsreihe wurde in diesem Fall nicht mehr verwendet, da unterschiedliche Ligandkonzentrationen separat pipettiert wurden. Idealerweise lagen weniger Datenpunkte im gesättigten Bereich der Kurve (■) und die meisten Datenpunkte im ungesättigten Teil der Kurve (◆).

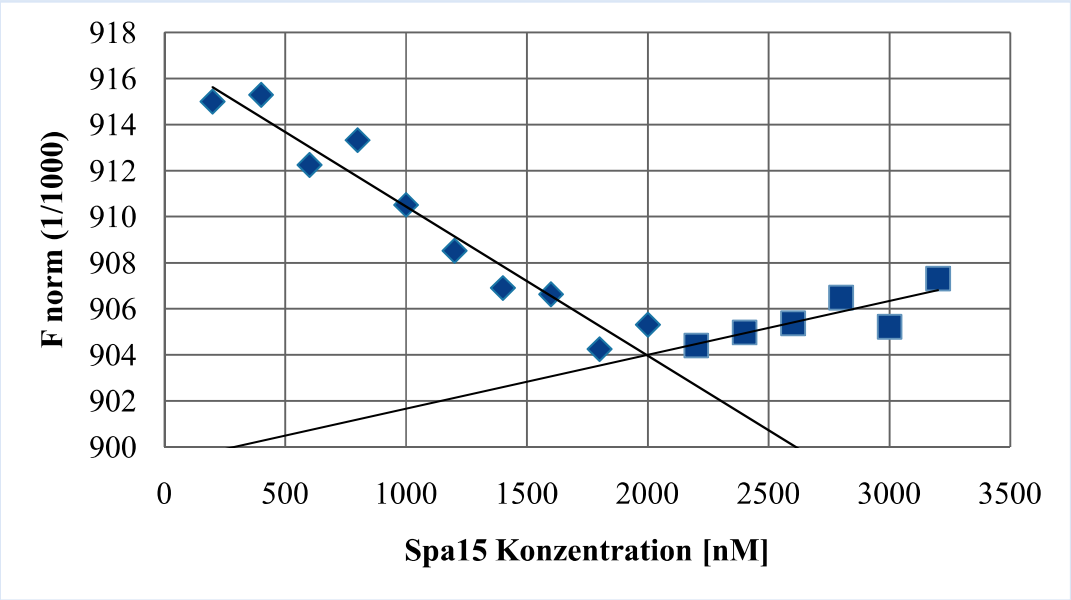


Abb. 40: Eingrenzung des Konzentrationsbereichs im zweiten Teil des Stöchiometrieexperiment von OspD1Δ1-15/Δ222-225 bei verschiedenen Konzentrationen von Spa15: Aufgetragen ist die Konzentration von Spa15 gegen die Thermophorese**.**

Die linerare Regression der Datenpunkte zeigte eine Sättigung von OspD1Δ1-15/Δ222-225 bei einer Konzentration von 1,98 µM Spa15. Daraus ließ sich eine Bindungsstöchiometrie von einem OspD1Δ1-15/Δ222-225 zu zwei Spa15 ableiten. Spa15 zeigt sich auch in der Kristallstruktur als funktionelles Dimer und anhand dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass es auch für diese Interaktion als Dimer vorliegt.

4.7.2 OspD1 mit MxiE-Peptiden

In der Arbeit von Christian Hasewinkel wurden sechzehn vollsynthetische MxiE-Peptide hergestellt, um die Wechselwirkung von MxiE mit IpgC zu untersuchen (Hasewinkel 2012b). Die vorliegenden MxiE-Peptide (siehe Tabelle 28) wurden in dieser Arbeit eingesetzt, um die Interaktion von MxiE mit OspD1 mittels *MST* zu untersuchen. Dazu wurde fluoreszenzmakiertes OspD1 mit verschiedenen Konzentrationen der unmarkierten MxiE-Peptide vermessen. Die erhaltenen Signale der Thermophorese wurden gegen die Konzentration der MxiE-Peptide in logarithmischer Skalierung aufgetragen (nicht gezeigt). Die Datenanalyse erfolgte mit der Software von NanoTemper.

Tabelle 28: Ermittelte Affinitäten mit MST von OspD1 (Endkonzentration 30nM) zu MxiE-Peptiden (verschiedene Konzentrationen).

Peptid	*AS-Position*	*Sequenz*	*K_D[nM]*
20.1	44-63	KGFFFVRNQNIKFSDNVNYH	-
20.2	54-73	IKFSDNVNYHYRFNINSCAK	-
20.3	64-83	YRFNINSCAKFLAFWDYFSG	-
20.4	70-89	CAKFLAFWDYFSGALVEHSH	-
20.5	80-99	FSGALVEHSHAEKCIHFYHE	-
20.6	90-109	AEKCIHFYHENDLRDSCNTE	-
P1	119-129	RIFSSDQNVSN	-
P2	130-139	ALAMIRMTES	-
P3	149-160	TIEKEKEVRIKS	-
P4	163-171	EHYGVSEAY	103,2 ± 20,8
P5	178-186	KALGAKVKE	7390,3 ± 840,0
P6	199-208	DVFLHNQTIT	-
P7	213-221	NNGYASTSH	474,6 ± 66,9
P8	228-236	TRLGFSARE	-
P9	245-251	KKINEKI	-

Affinitäten konnten nur für die MxiE-Peptide P4, P5 sowie P7 mit jeweils zehn Aminosäuren bestimmt werden, welche im Bereich von AS 163 bis 221 lagen. Den niedrigsten K_D-Wert lieferte die Messung von OspD1 mit dem MxiE-Peptid P4. Die Ergebnisse der durchgeführten Thermophorese-Untersuchungen lassen eine erste Aussage treffen, nämlich dass sich die Erkennungssequenz von MxiE für OspD1 möglicherweise in diesem Bereich befindet. Weitere Erkenntnisse könnte die Untersuchung mit z.B. neu synthetisierten, AS-überlappenden Peptiden aus diesem Bereich bringen, die im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr möglich war. Um die Wechselwirkung von OspD1 und MxiE auf atomarer Ebene zu untersuchen, sind aber Kristallstrukturen des Komplexes von OspD1 sowie den MxiE-Peptiden unumgänglich.

4.7.3 Spa15 mit OspD1-Peptiden

In der vorliegenden Arbeit wurden drei vollsynthetische OspD1-Peptide hergestellt, um die Wechselwirkung von Spa15 mit OspD1 zu untersuchen. Die von Costa und Kollegen ermittelte konservierte Aminosäurensequenz 31-41 von OspD1 wurde sowohl als 10 AS langes Peptid einmal mit Methionin an erster Stelle und einmal mit Norleucin in erster Position hergestellt, sowie N- und C-terminal um jeweils 2 bzw. 5 AS verlängert (siehe Tabelle 28) (Costa et al. 2012). Diese Peptide wurden im ersten Schritt dazu eingesetzt, die Interaktion von Spa15 mit OspD1 mittels MST zu untersuchen. Dazu wurde fluoreszenzmarkiertes Spa15 mit verschiedenen Konzentrationen der unmarkierten OspD1-Peptide vermessen. Die erhaltenen Signale der Thermophorese wurden gegen die Konzentration der OspD1-Peptide in logarithmischer Skalierung aufgetragen (nicht gezeigt). Die Datenanalyse erfolgte mit der Software von NanoTemper.

Tabelle 29: Ermittelte Affinitäten mit MST von Spa15 (Endkonzentration 30nM) zu OspD1-Peptiden (verschiedene Konzentrationen).

Peptid	*Sequenz*	*K_D[nM]*
JK-01-122.1	Ac-MKNNIINVTN-NH_2	422,0 ± 26,1
JK-01-122.2	Ac-KGMKNNIINVTNTA-NH_2	437,2 ± 28,4
JK-01-122.3	Ac-NENKGMKNNIINVTNTAISH-NH_2	413,4 ± 30,2
JK-01-122.4	Ac-Nle-KNNIINVTN-NH_2	627,2 ± 54,2
JK-01-122.5	Ac-KG-Nle-KNNIINVTNTA-NH_2	756,5 ± 64,8
JK-01-122.6	Ac-NENKG-Nle-KNNIINVTNTA-NH_2	699,7 ± 49,7

Bei der Vermessung von gelabeltem OspD1 mit Spa15 ergab sich ein K_D-Wert von 40,6 ± 1.51 nM (siehe 4.7.1). Die ermittelte OspD1-Sequenz von Costa und Kollegen zeigte in der Vermessung mit gelabeltem Spa15 im Thermophorese-Experiment eine Affinität, die um den Faktor zehn reduziert war. Dabei machte es keinen signifikanten Unterschied, ob die vermessenen Peptide zehn AS oder mehr umfassten (Tabelle 29). Ersetzte man Methionin durch Norleucin, nahm die Bindestärke geringfügig ab. Die verbleibende Affinität sollte aber für Co-Kristallisationsversuche vollkommen ausreichen.

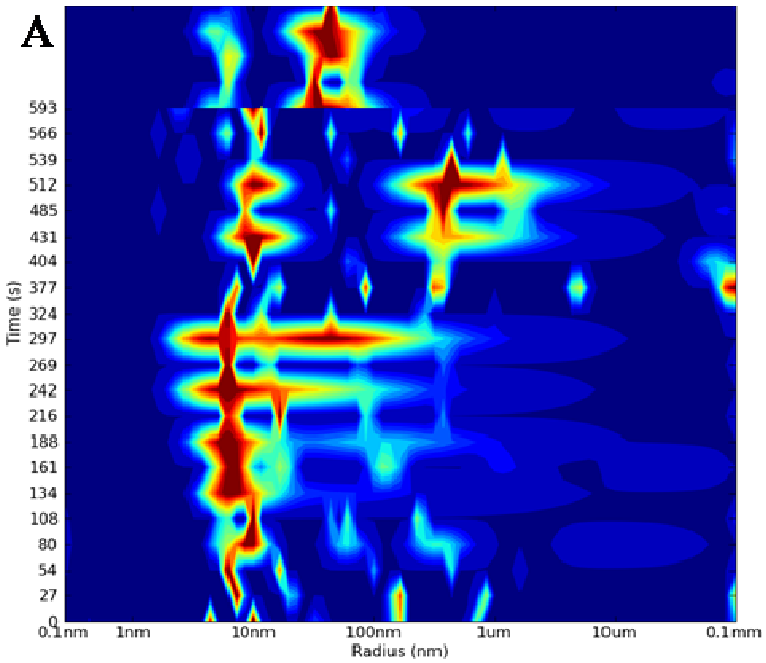
4.8 *Dynamic Light Scattering* mit OspD1Δ1-15/Δ222-225, Spa15 und IpgCΔ152-155

Die dynamische Lichtstreuung ist eine leistungsstarke Technik im Bereich der Proteinkristallographie. Mit ihrer Hilfe können zuverlässig hydrodynamische Radien, Polydispersitäten und Aggregationen von Proteinmolekülen bestimmt werden, wobei sich Proteinkristallographen weniger für den absoluten hydrodynamischen Radius ihrer Probe interessieren, sondern vielmehr für die Polydispersität und das Vorhandensein von Proteinaggregaten, die den Kristallisationsprozess stören könnten. So wurden die verschiedenen Proteinlösungen auf ihre Dispersität untersucht. Dabei wurde eine homogene und monodisperse Lösung angestrebt, die keine größeren Aggregate enthalten sollte.

Die Proteine waren zuvor in SEC-Puffer bei -80° C gelagert. Nach dem Auftauen wurden sie zunächst für 5 min. bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert, um unspezifische, größere Aggregate zu entfernen. Mit dem Überstand wurden dann die DLS-Messungen durchgeführt (siehe 3.4.14).

4.8.1 IpgCΔ152-155

Die Ergebnisse der DLS-Messung von IpgC in einer Konzentration von 10 mg/ml sind in Abb. 41 zu sehen.



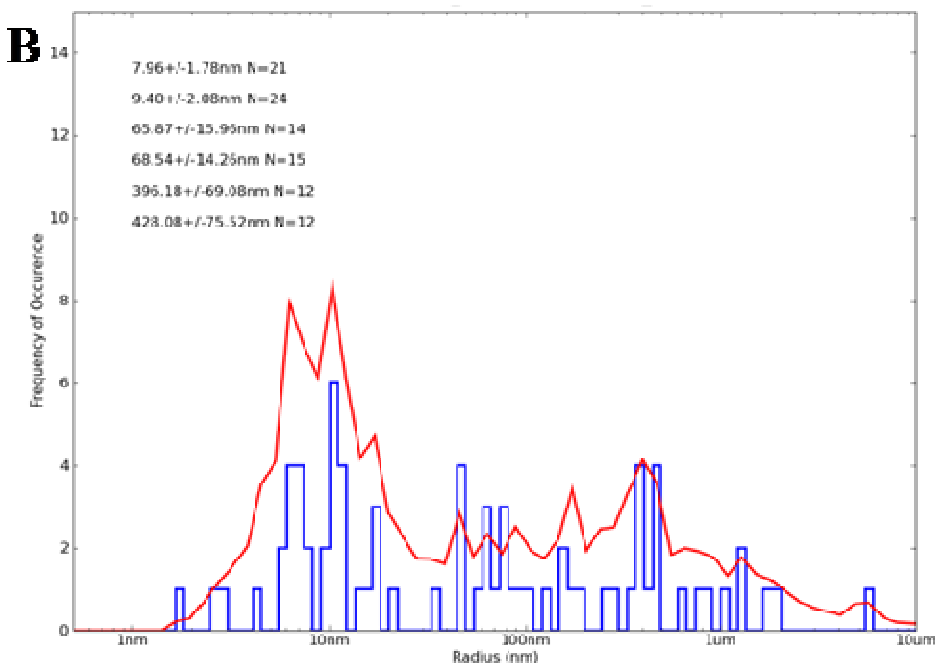


Abb. 41: Dynamische Lichtstreuung von IpgCΔ152-155 - Teil I: A) *Carpet*-Darstellung direkt nach dem Auftauen mit 5 min. Zentrifugation. B) Histogramm-Darstellung direkt nach dem Auftauen nach 5 min. Zentrifugation.

A und B zeigen das Verhalten der Lösung nach 5 min. Zentrifugation. Hier ist deutlich zu sehen, dass die Lösung sich polydispers verhält. Neben dem ungebundenen IpgC (etwas unter 10 nm) liegen größere Proteinaggregate vor (alles über 10 nm).

Zentrifugiert man das Protein für 60 min., zeigt sich (Abb. 42) sowohl in der *Carpet* (C)- als auch in der Histogramm-Darstellung (D) ein monodisperses Verhalten, so dass neben dem ungebundenen Protein (unter 10 nm) keine größeren Aggregate vorliegen. So ist es bei der IpgC-Lösung unbedingt notwendig, dass die aufgetaute Lösung wenigstens 60 min. bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert wird, um zu vermeiden, dass die Kristallisation durch größere Aggregate gestört wird.

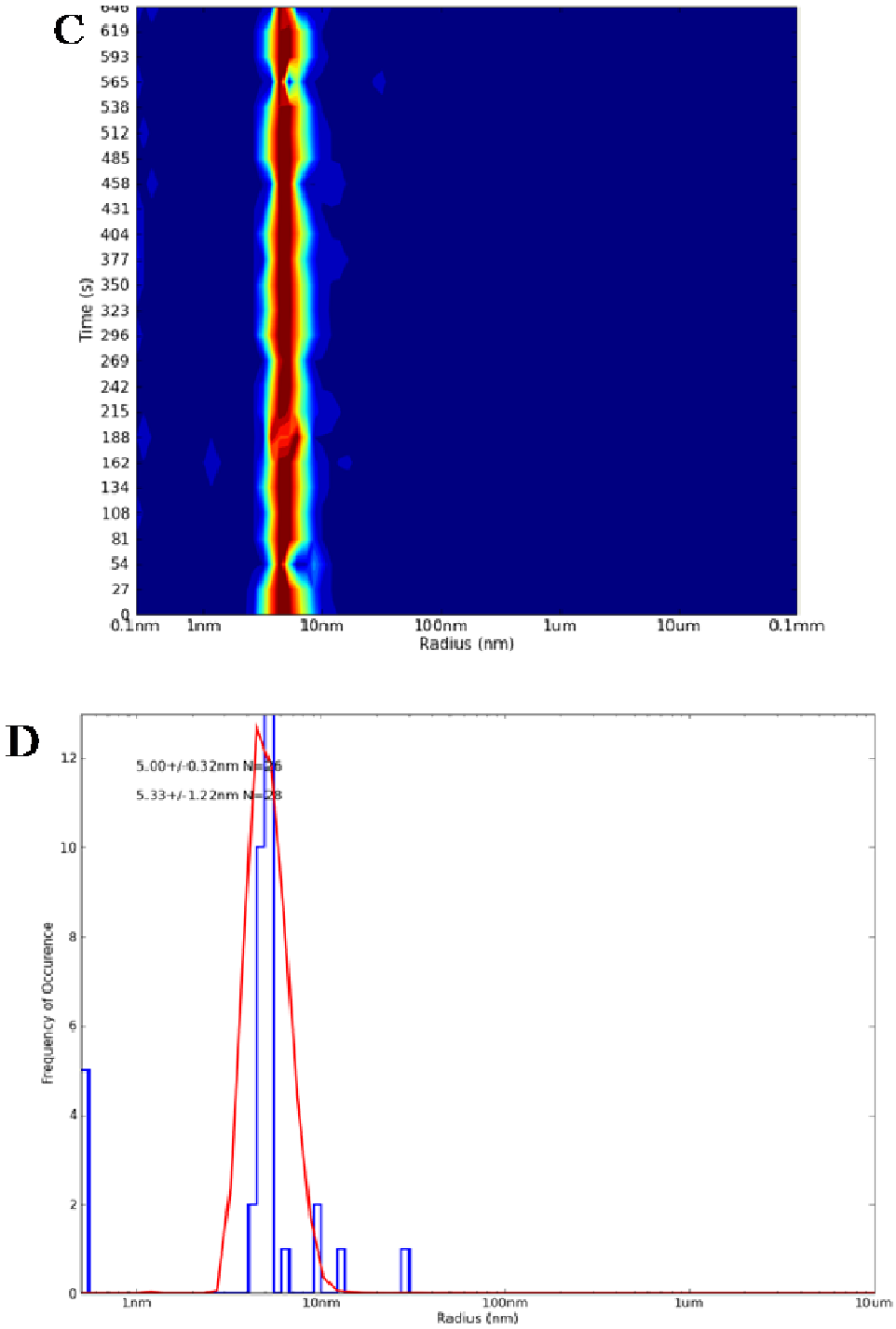


Abb. 42: Dynamische Lichtstreuung von IpgCΔ152-155 - Teil II: C) *Carpet*-Darstellung nach Zentrifugation über 60 min. D) Histogramm-Darstellung nach Zentrifugation über 60 min.

4.8.2 **OspD1Δ1-15/Δ222-225**

Die Ergebnisse der DLS-Messung von OspD1Δ1-15/Δ222-225 in einer Konzentration von 10 mg/ml ist in Abb. 43 zu sehen.

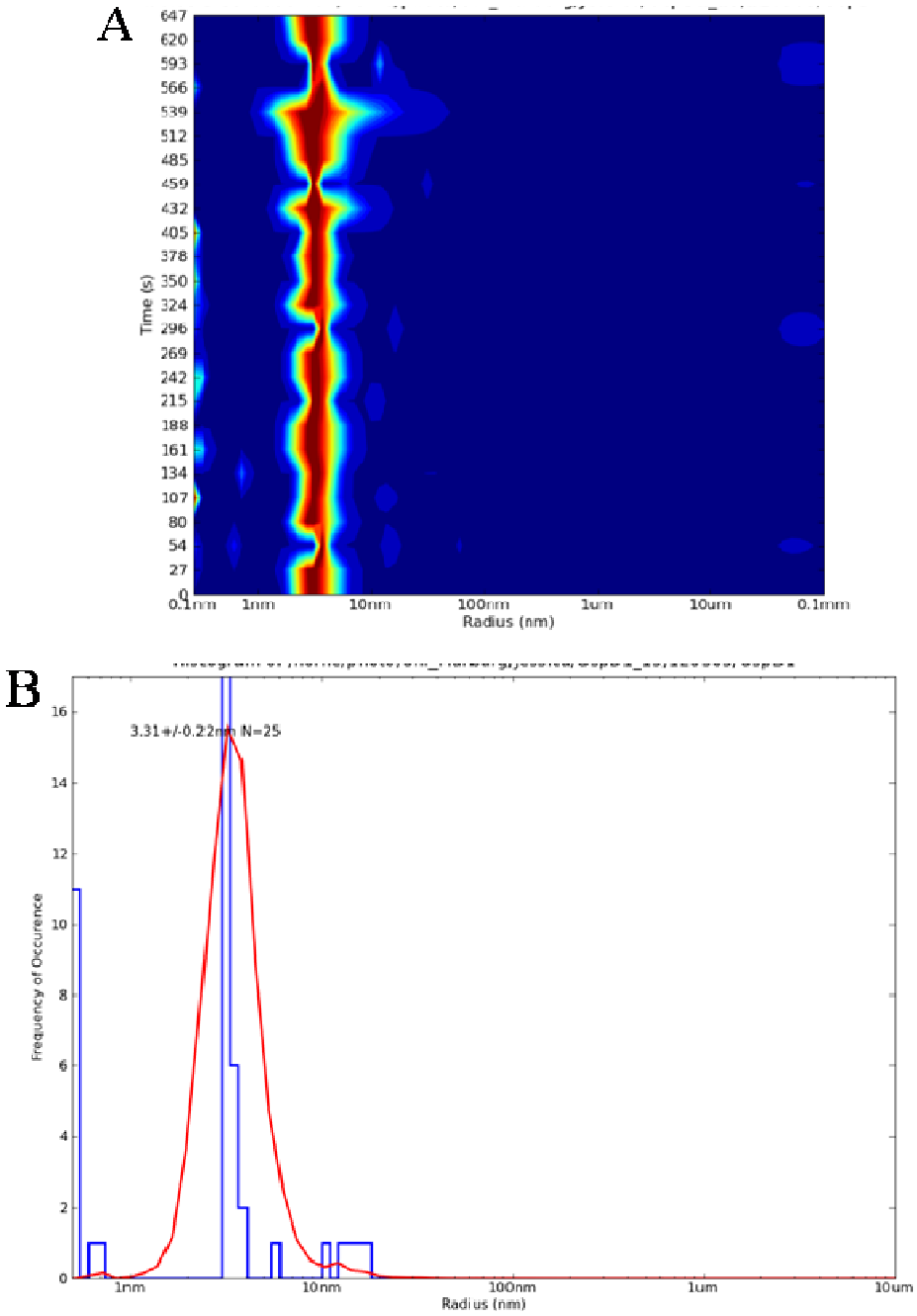
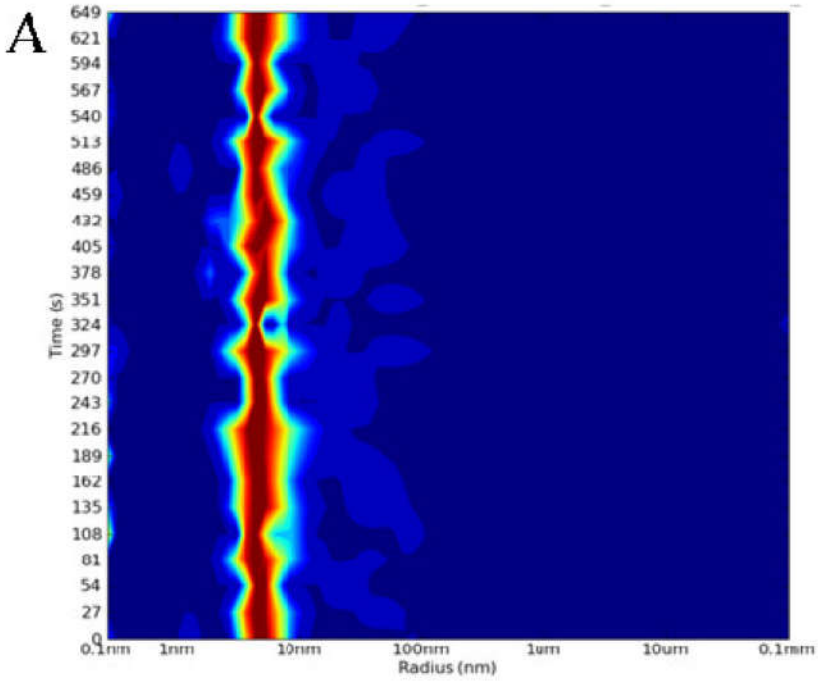


Abb. 43: Dynamische Lichtstreuung von OspD1Δ1-15/Δ222-225: A) *Carpet*-Darstellung direkt nach dem Auftauen mit 5 min. Zentrifugation. B) Histogramm-Darstellung direkt nach dem Auftauen nach 5 min. Zentrifugation.

A und B zeigen das Verhalten der Lösung nach 5 min. Zentrifugation in der *Carpet* und der Histogramm-Darstellung. Hier ist deutlich zu sehen, dass die Lösung sich polydispers verhält. Die Lösung zeigt neben einem dünnen Streifen bzw. hohen *Peak* bei unter 10 nm fast keine weiteren größeren Aggregate und ist somit bereits nach 5 min. Zentrifugation für Kristallisationsansätze ausreichend monodispers.

4.8.3 **Spa15**

Eine 10 mg/ml Spa15-Lösung verhielt sich analog zu der OspD1-Lösung und zeigt ebenfalls nach 5 min. Zentrifugation ein monodisperses Verhalten. In der *Carpet*-Darstellung (A) sowie in der Histogramm-Darstellung (B) in Abb. 44 ist ein dünner Steifen bzw. ein höherer *Peak* bei unter 10 nm zu sehen. Größere Aggregate (über 100 nm) sind nicht verhanden, so dass auch dieses Protein nach 5 min. Zentrifugation ausreichend homogen und monodispers für Kristallisationsansätze ist.



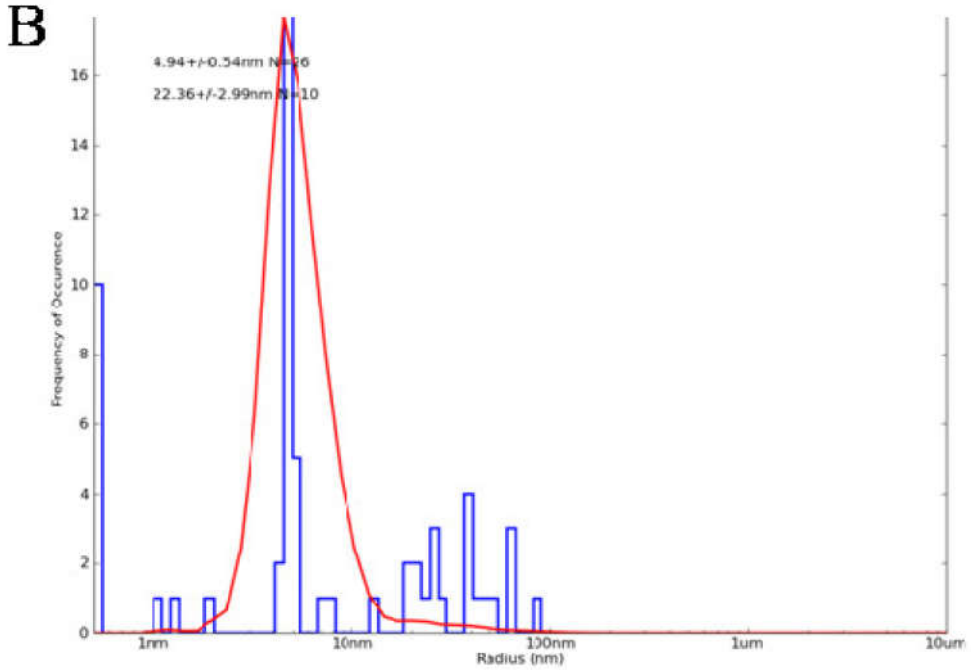


Abb. 44: Dynamische Lichtstreuung von Spa15: A) *Carpet*-Darstellung direkt nach dem Auftauen mit 5 min. Zentrifugation. B) Histogramm-Darstellung direkt nach dem Auftauen nach 5 min. Zentrifugation.

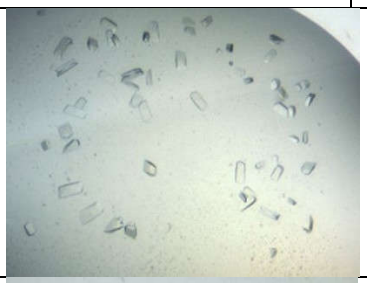
4.9 Kristallisationsergebnisse

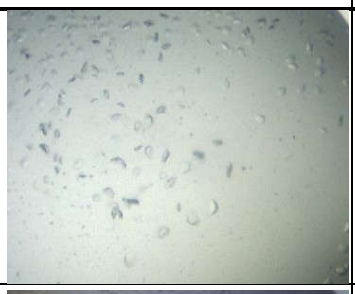
4.9.1 OspD1

4.9.1.1. Kristallisation von OspD1 und Optimierung der Kristalle

Erste Kristallisationen der trunkierten OspD1-Varianten wurden mit den *in-house*-Kristallisations*screens* (Tabelle 16) per Pipettieren mit der Hand, sowie am MarXtal mit Kristallisations*screens* (Tabelle 17) mit eingesetztem Kristallisationsroboter *Honeybee* durchgeführt. Die Präparation der Platten wurde bei einer Konzentration von 10 mg/ml der verwendeten Proteinlösungen durchgeführt. Die Proteine lagen in SEC 8.0-Puffer bei pH 8 vor. Die Inkubation der fertig gestellten Platten erfolgte bei 4 °C und 18 °C (MarXtal) bzw. 20 °C *(in-house*). Die trunkierten Versionen von OspD1 ließen sich nur bei bei 4 °C erfolgreich kristallisieren, wobei es viele Bedingungen gab, in denen sich nur kleine, sehr brüchige Kristalle bildeten oder die Reproduktion in den selbst angesetzten Bedingungen nicht funktionierte (Tabelle 30).

Tabelle 30: Erfolgreiche Kristallisationsbedingungen von OspD1Δ1-15/Δ222-225

Bedingung	*Bild der Kristallisation*	*Izit crystal dye Test*	*Reproduk-tion*	*Bemerkung*
Wiz I 41 0,1 M CHES pH 9,5; 30 % (w/v) PEG 3000		ja	möglich	kleine Kristalle
Cryo I 6 0,1 M Tris pH 8.5; 30 % (w/v) PEG 4000; 0,2 M $MgCl_2$		ja	nicht möglich	winzige Kristalle
PEG 24 10 mM TAPS pH 9,0; 30 % (v/w) PEG 6000		ja	nicht möglich	sehr dünne Kristallplatten
Core II A1 0,1 M CAPS pH 8,0; PEG 8000 20 % (v/w); 0,2 M NaCl		ja	nicht möglich	sehr winzige Kristalle, lösen sich nach vier Tagen wieder auf
Core II B1 0,1 M Tris pH 8,5; PEG 8000 20% (w/v); 0,2 M $MgCl_2$		ja	möglich	Kleinere, gut definierte Kristalle
Core IV C3 0,1M Tris pH 8.5; 25,5 % PEG 4000; 0,17M CH_3COONa; 12 % w/v Glycerol		ja	nicht möglich	spitzere, mittelgroße Kristalle

Bedingung	*Bild der Kristallisation*	*Izit crystal dye Test*	*Reproduk-tion*	*Bemerkung*
Core IV C8 0,1 M HEPES pH 7,5; PEG 10000 20 % w/v Ethylenglykol 8 % w/v		ja	möglich	kleinere, brüchige Kristalle
Cryos H6 3,6 M Natriumformiat Glycerol 10 % w/v		ja	möglich	winzige, brüchige Kristalle
MBC I G4 0,05 M Tris pH 8.5; PEG 4000 22 % w/v; 0,5 M NaCl		ja	nicht möglich	kleinere, brüchige Kristalle

Erste Messungen am Synchrotron Berlin (BESSY II, Berlin) erzielten für die Bedingungen Wiz I 41 mit 30 % Glycerol als Cryoprotektans eine nominale Auflösung von 8 Å, für Core III B1 und 20 % PEG 400 als Cryoprotektans 4 Å und für Core IV C3 und 20 % PEG 400 6 Å. Bei allen anderen Bedingungen konnten keine streufähigen Kristalle gewonnen werden. Für eine atomare Bestimmung der Struktur werden Kristalle, die zu einer nominalen Auflösung von wenigstens 3 Å streuen, vorausgesetzt.

Um die Kristalle größer und streufähiger zu bekommen, wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Die Bedingungen Wiz I 41 und Core II B1 konnten reproduziert werden und wurden somit optimiert.

- **pH-Bereich-Optimierung**

Es wurde ein pH-*Screen* zwischen pH 7-10 durchgeführt. Im unteren pH-Bereich (bis etwa 8,8) wurde Tris eingesetzt, ab einem pH von 9,0 CHES. Bei der Bedingung Wiz I 41 wuchsen Kristalle im pH-Wert Bereich von 9,0-9,5. Morphologisch unterschieden sich die Kristalle kaum. In der Bedingung Core II B1 kam es nur beim

pH-Wert von 8,5 zu Kristallwachstum, so dass mit dieser Bedingung keine weitere Optimierung des pH stattfinden konnte.

- **PEG-Konzentration-Optimierung**

Es wurden PEG-Konzentrationen von 15-35 % (w/v) getestet. In Bedingung Wiz I wuchsen Kristalle nur im Bereich von 28-35 % PEG 3000. Die morphologisch schönsten Kristalle bildeten sich hier bei 30 % und 32 % PEG 3000, so dass die ursprüngliche PEG Konzentration für diese Bedingung beibehalten wurde. Für die Core II-Bedingung wuchsen Kristalle im Bereich von 18-23 % PEG 8000. Die morphologisch besten Kristalle bildeten sich bei 18 % PEG 8000, so dass die Konzentration von PEG bei dieser Bedingung angepasst wurde.

- **Tropfenverhältnis Reservoirlösung zu Proteinlösung**

Das Verhältnis von Reservoirlösung zur Proteinlösung wurde verändert. Als bestes Verhältnis stellte sich in beiden Bedingungen 1,5 µl Proteinlösung (10 mg/ml) zu 1,0 µl Reservoirlösung heraus. Gute Erfahrungen wurden auch mit doppelt so großen Tropfen im selben Verhältnis gemacht, vor allem in Fällen, in denen das *Hanging Drop* Verfahren eingesetzt wurde (siehe Abb. 13).

- ***Macroseeding***

Vor allem sehr kleine Kristalle wurden mittels *Macroseeding* in neue Tropfen mit derselben Konstellation umgesetzt. Eine weitere Variante war, die Kristalle in einen Tropfen zu setzen, in dem die Proteinkonzentration verändert war (5 mg/ml, 8 mg/ml statt 10 mg/ml). *Marcoseeding* kam auch bei Tropfen, die klar blieben, zum Einsatz und in denen nach einer Woche nichts gewachsen war. Ebenfalls wurde ein „*Seeding* mit Zeitverzug“ durchgeführt. Dazu wurde eine Platte angesetzt und 18 h geschlossen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Folie (*Sitting Drop*) oder die Deckelgläser (*Hanging Drop*) entfernt und dann Kristallisationskeime zugefügt. Nach dem *Seeding* wurde die Platte weiter bei 4 °C inkubiert.

Bei allen *Seeding*methoden konnte weder morphologisch noch im Streuvermögen eine signifikante Verbesserung der Kristalle beobachtet werden.

- ***Microseeding***

Etwas größere Kristalle wurden zum *Seeden* vorsichtig zerstoßen und diese Kristallsplitter als Keime eingesetzt. Die Anwendung des *Microseeding* erfolgte analog zum *Marcoseeding*. Auch hier konnten keine morphologische Verbesserung oder ein besseres Streuvermögen festgestellt werden. Lediglich in einigen klaren Bedingungen konnten die Kristallsplitter als Nukleationskeime dienen und so bewirken, dass sich noch Kristalle ausbildeten.

Außerdem wurde das *Seed Bead Kit* von Hampton als Form des *Microseedings* eingesetzt. Hier wurden einige Kristalle mit Hilfe einer Kugel in einem Eppendorfcup im Ultraschallbad oder Vortexer mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt und diese dann im *Sitting Drop*-Verfahren ausplattiert. Mit dieser Methode konnte kein Kristallwachstum festgestellt werden.

- **Zugabe von Ectoin, Kronenether oder Zinksulfat**

In einem Versuch wurde 1 µl aus einer 1 M Ectoinstammlösung zu jedem Kristallisationstropfen gegeben. Bei einer anderen Kristallisationsplatte wurde 1 % 16-8-Kronenether zu den Tropfen gegeben. Weiterhin wurde in einem weiteren Versuch zu den Kristallisationsbedingungen ein Zusatz von 100 mM Zinksulfat-Heptahydrat gegeben. Der Zusatz der Additive bewirkte keinerlei Kristallwachstum. Auch durch *Seeding* konnte kein Wachstum von Kristallen initiiert werden. In den Negativkontrollen ohne die Zusätze wuchsen die Kristalle hingegen wie gewohnt.

- **Kristallisation mit MBP-*tag***

Mit OspD1 als Fusionsprotein mit MBP- und His-*tag* wurden erneut die vorhandenen *Screens* (siehe Tabelle 16 und Tabelle 17) durchgeführt. Das Fusions-protein konnte nicht kristallisiert werden.

- ***Free Mounting System***

Am *Free Mounting System* wurden bei Raumtemperatur und unter Einstellen der Feuchtigkeit die OspD1-Kristalle vermessen. Allerdings lösten sich diese recht schnell bei Raumtemperatur ohne Kühlung auf. Das Gerät ließ sich nicht weiter als

bis 10 °C kühlen. Der Schaden an den Kristallen war dabei so groß, dass diese gar nicht mehr streuten.

- **Optimierung des Cryoprotektans mit PEG 400**

Beim Testen der Kristalle wurden häufiger Eisringe festgestellt. Um Eisringe zu vermeiden und die Kristalle schonender mit dem Cyroprotektans zu vermischen, wurde ein gradueller Prozess angewandt, bei dem die Konzentration von PEG 400 schrittweise erhöht wurde (2,5 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %). Dieses Vorgehen führte dazu, dass die Kristalle durchschnittlich um etwa 0,5 Å besser streuten, als wenn sie unmittelbar mit der höchsten Konzentration des Crypprotectans konfrontiert wurden.

- **Silicia Hydrogel *Kit* von Hampton**

Um das Kristallwachstum zu verlangsamen und eventuell größere Kristalle zu erhalten, wurde das Silica Hydrogel *Kit* eingesetzt wie im Handbuch der Firma Hampton beschrieben. Mit dem Zusatz fand allerdings kein Kristallwachstum statt.

- **Additivscreen von Hampton**

Ein Additivscreen (*Additive Screen HT*) von Hampton wurde durchgeführt, in dem 96 Additive getestet wurden. Hierbei konnten mehrere Erfolge bei Bedingung Wiz I 41 verbucht werden. Mit dem Additiv Nr. 31 3 % (w/v) 1,5 - Diaminopentandihydrochlorid (Cadaverin) konnten die morphologisch besten Kristalle gewonnen werden.

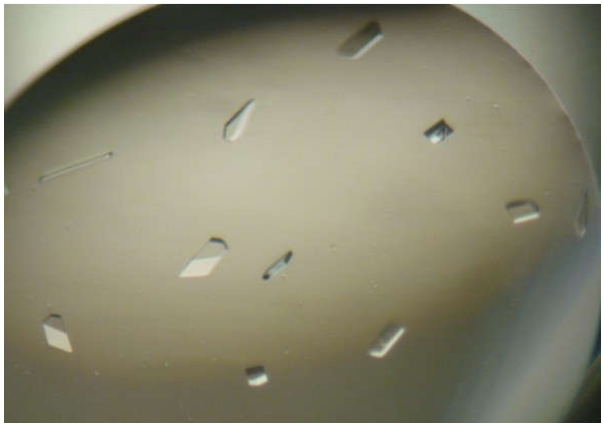


Abb. 45: Kristalle bei der Bedingung Wiz I 41 mit Additiv Nr. 31

Mit diesen konnte ein Datensatz am BESSY bei einer Auflösung besser als 3 Å aufgenommen werden. Dabei war es erstmals möglich, die Raumgruppe sowie andere Parameter des Kristalles zu bestimmen (siehe Tabelle 31).

Kristalle, die in Bedingung Core II B1 wuchsen, streuten um die 4 Å. Allerdings ließ sich diese Bedingung mit den oben genannten Methoden nicht weiter verbessern.

Tabelle 31: Kristallographische Tabelle des ersten Datensatzes von OspD1Δ1-15/Δ222-225 aufgenommen als Datensatz OspD_2a am 02.11.2013 am BESSY II in Berlin (Die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungschale).

Parameter	***OspD_2a (02.11.2013)***
Beamline	BL 14.1
λ (Å)	0,91841
Raumgruppe	20 ($C222_1$)
a, *b*, *c* (Å)	90,5Å, 156,4Å, 194,2Å
a = β = γ (°)	90°, 90°,90°
Vollständigkeit (%)	99,7 (98,8)
I/σ(I)	21,8 (2,9)
Auflösung (Å)	50-2,90 (3,08-2,90)
R_{merge}(%)	7,0 (71,6)
Anzahl der Bilder	2000
Wassergehalt (%)	51,4
Redundanz	6,5 (6,4)
Mosaizität (°)	1,1

Die Mosaizität der vermessenen Daten ist mit 1,1 zu hoch. Dies könnte an einer nicht optimalen Cryobedingung liegen oder auch an zu schnellem Kristallwachstum, wobei letzteres eher auszuschließen ist, da die Kristalle bei 4 °C zwei Wochen Wachstumszeit benötigten. Der R_{merge} ist ebenfalls deutlich zu hoch, sowohl über den kompletten Datensatz gesehen, als auch in der höchsten Auflösungsschale. Die Vollständigkeit der Reflexe in kompletter Auflösung liegt bei 99,7 %, damit erreicht dieser Wert die für die Lösung des Datensatz notwendigen

95 %. Der Wassergehalt des Kristalls wurde über den Matthew Koeffizent (http://www.ruppweb.org/mattprob/default.html, Stand 25.07.15) bestimmt, es befinden sich demnach sechs Moleküle in der asymmetrischen Einheit. Insgesamt wurde dieser erste Datensatz allerdings als Schritt in die richtige Richtung gesehen, weshalb fortan immer 3 % Cadaverin zu der Kristallisationsbedingung Wiz I 41 gegeben wurde.

Abb. 46: Kristalle bei der Bedingung Wiz I 41 mit Additiv Nr. 31 und Additiv Nr. 59

Eine nochmalige Verbesserung brachte schießlich ein weiterer Additivscreen auf die neu optimierte Bedingung mit Cadaverin. Mit dem Zusatz von AS 59 3 % (w/v) D-Trehalose konnten morpholisch noch größere Kristalle gewonnen werden. Die Kristalle sahen aus wie plattenartige „Benzolringe“ oder etwas kleinere, dickere Kristalle. Die zuletzt angewandte Bedingung (Abb. 46) bestand aus

0,1 M CHES pH 9,5
30 % PEG 3000
3 % Cadaverin (0,29 M)
3 % D-Trehalose (0,079 M)
Nach Zusatz der Additive lag der End-pH bei 9,0.

Die erhaltenen Kristalle wurden am BESSY getestet und erreichten eine Auflösung von unter 2,5 Å. Der Datensatz ist vollständig, die Parameter R_{merge} und die Mosaizität haben sich deutlich verbessert. Der Wassergehalt hat sich nur geringfügig verändert, es befindet sich immer noch sechs Moleküle in der asymetrischen Einheit.

Tabelle 32: Kristallographische Tabelle des zweiten Datensatzes von OspD1Δ1-15/Δ222-225 aufgenommen als Datensatz OspD1_Treh_2 am 12.12.2013 am BESSY II in Berlin. (Die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale).

Parameter	***OspD1_Treh_2 (12.12.2013)***
Beamline	BL 14.1
λ (Å)	0,91841
Raumgruppe	20 ($C222_1$)
a, *b*, *c* (Å)	91Å, 156 Å, 193Å
a = β = γ (°)	90°, 90°,90°
Vollständigkeit (%)	99,9 (99,7)
I/σ(I)	23,5 (2,9)
Auflösung (Å)	50-2,45 (2,6-2,45)
R_{merge}(%)	5,2 (59,4)
Anzahl der Bilder	1400
Wassergehalt %	51,3
Redundanz	5,2 (5,1)
Mosaizität (°)	0,2

Damit war das Ziel, ausreichend streuende OspD1-Kristalle zu erhalten und einen kompletten Datensatz für die Strukturlösung aufzunehmen, erfüllt.

4.9.1.2. **Phasierung mit Schwermetallderivaten**

Nach der Aufnahme eines verwendbaren Datensatzes muss für die Berechnung der Elektronendichte das Phasenproblem gelöst werden. Dazu stehen molekularer Ersatz (MR – *molecular replacement*), multipler isomorpher Ersatz (MIR – *multiple isomorph replacement*) und anomale Dispersion (MAD – *multiple anomalous dispersion*) sowie eine Kombination aus MIR und MAD, dem multiplen isomorphen Ersatz mit anomaler Dispersion (M(S)IRAS – *multiple/single isomorphous replacement with anomalous scattering*) zur Verfügung.

Da es keine Proteinstruktur eines Proteins mit hoher Sequenzidentität (nötig

sind 40 %) zu OspD1 gab, wurde *MAD* als Methode gewählt. Für die Messung wurde ein Schwermetallatomderivat des Proteins benötigt. Die Bereitstellung eines SeMet-Proteins ist nicht gelungen (siehe 4.1.5.). So musste ein Schwermetall gefunden werden, welches sich durch Binden an das Protein in definierten Positionen der Einheitszelle einlagert.

Schwermetallverbindungen werden gewöhnlich als Klasse A oder Klasse B eingestuft. Klasse A-Verbindungen, wie Alkalimetalle und Erdalkalimetalle binden an ihre Zielproteine ohne kovalente Modifizierung. Klasse A-Schwermetalle sind bei höherem pH-Wert (pH > 7,5) schwer anzuwenden, da sich oft unlösliche Hydroxide bilden. Klasse B-Verbindungen wie Platin, Gold und Quecksilber-Ionen sind polarisierbar, im Gegensatz zu den Klasse A-Verbindungen können sie kovalent an Sulfhydryl-, Imidazol- und Thiolgruppen binden. Sie sind die am häufigsten verwendeten Schwermetalle in der Proteinkristallographie. Thallium und Blei unterscheiden sich von den anderen B-Metallen, da sie Liganden wie Carboxylat favorisieren, statt Imidazol- und Schwefelgruppen. Diese Derivate lassen sich nicht gut bei niedrigem pH-Wert benutzen, da die möglichen Liganden, Cystein und Histidin, protoniert und weniger reaktiv vorliegen.

Die Aminosäurensequenz von OspD1 wurde auf vorhandene Bindestellen für Schwermetalle untersucht (siehe Abb. 47). Für die Bindung mit Klasse A-Schwermetallen kämen 23 Asparagine, 16 Glutamate, sieben Aspartate, fünf Tyrosine und vier Glutamine in Frage. Klasse B-Schwermetalle könnten an sieben Histidine, vier Methionine und ein Cystein binden.

MHLIIGSNTANENKGMKNNIINVTNTAISHAINEEKSGGGYSGVS
FRKLAKIQNISIPTKNNKEYNRHNLFSLIWHGNADAARKYSESLL
AAEIPKEEKLEVLAARNNAGESALFIALQEGHSAAIQAYGDFIKT
FDLSPKETIKLLDVRDNEGLPGLFLAAGKGNIEAMMAYINICHHS
GIKLTEIADRLNNNEQDMFNIISDKI

Abb. 47: Sequenz von OspD1Δ1-15/Δ222-225 mit Markierungen für mögliche Schwermetallbindestellen, grün = Klasse A-Schwermetallbindemöglichkeiten, gelb = Klasse B-Schwermetallbindemöglichkeiten.

Die Kondition, in der die OspD1-Kristalle wachsen, hat einen End-pH-Wert von 9,0 und eine Temperatur von 4 °C. Unter diesen Bedingungen sollten die

eingesetzten Schwermetalle noch reaktiv sein. Unter verschiedenen Schwermetall-datenbanken (http://www.shapirolab.org/lab-links/had.html, Stand 15.05.2015) und mit Hilfe des *Heavy Atom Screen Kit* von Hampton wurden zunächst 14 Schwermetalle (siehe Tabelle 33) gefunden, die getestet wurden.

Zuerst wurde die Methode der nativen PAGE angewandt. Wird durch die Inkorporation des Schweratomions der Ladungszustand des Proteins verändert, ändert sich auch das Laufverhalten der Probe in der nativen PAGE. Eine Derivatisierung, die nicht zu einer Veränderung der Ladungsverhältnisse des Proteins führt, kann mit dieser Methode nicht detektiert werden.

Tabelle 33: Ausgewählte Schwermetalle für das Schwermetall*soaking* der OspD1Δ1-15/Δ222-225-Kristalle

#	*Schwermetall*	*Formel*
1	Kaliumtetrachloroplatinat(II)	K_2PtCl_4
2	Quecksilber(II)chlorid	$HgCl_2$
3	Kaliumtetraiodomercurat(II)	K_2HgI_4
4	Natriumhexachloroiridat(III)hydrat	$Na_3IrCl_6 \bullet H_2O$
5	Ethylquecksilberphosphat	$C_2H_5HgOH_2PO_3$
6	Diamminplatin(II)nitrit	$Pt(NH_3)_2(NO_2)_2$
7	Kaliumtetranitroplatinat	$K_2Pt(NO_2)_4$
8	Ammoniumtetrachloroplatinat	$(NH_4)_2PtCl_4$
9	Gold(III)chloride	$AuCl_3$
10	Kaliumdicyanidoaurat(I)	$KAu(CN)_2$
11	Hexaphenyldiplumbat	$[(C_6H_5)_3Pb]_2$
12	Bleiacetat	$Pb(CH_3COO)_2$
13	Kaliumiodid	KI
14	5-Amino-2,4,6-triiodisophthalsäure	$C_6I_3NH_2$-1,3-$(COOH)_2$

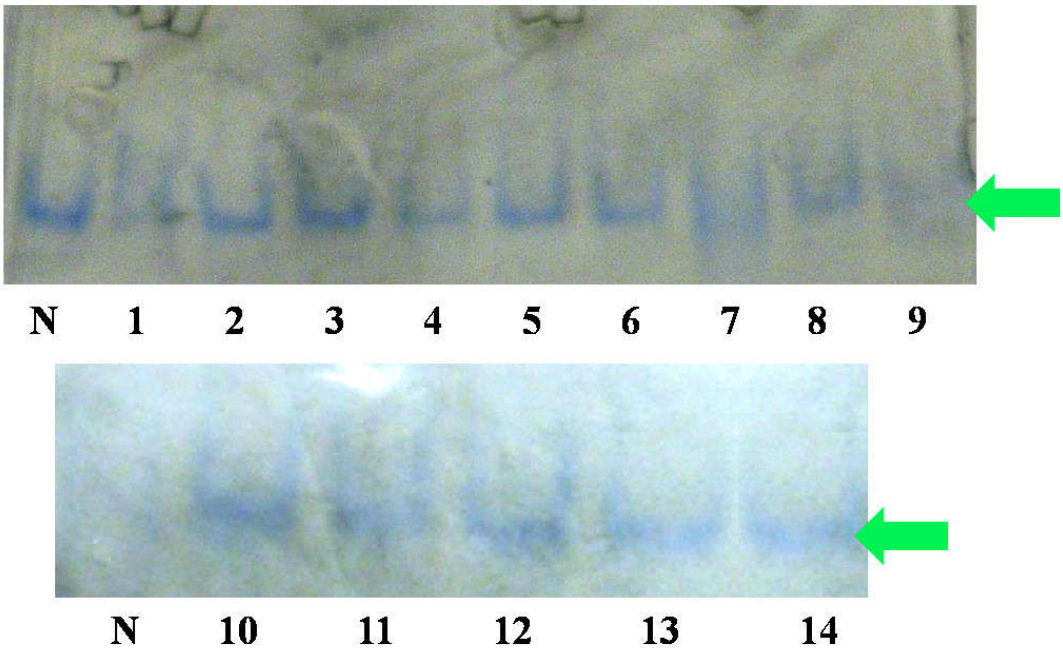


Abb. 48: 5% Natives Gel mit ausgewählten Schwermetallen (Endkonzentration 4,2 mM) N = Natives Protein; 1 = Kaliumtetrachloroplatinat(II); 2= Quecksilber(II)chlorid; 3 = Kaliumtetraiodomercurat(II) ; 4 = Natriumhexachloroiridium(III)hydrat; 5 = Ethylquecksilber-phosphat; 6 = Diaminplatin(II)nitrit; 7 = Kaliumtetranitroplatinat, 8 = Ammoniumtetra-chloroplatinat; 9 = Gold(III)chlorid, 10 = Kaliumdicyanidoaurat(I), 11 = Hexaphenyldiplumbat; 12 = Bleiacetat, 13 = Kaliumiodid, 14 = 5-Amino-2,4,6-triiodisopthalsäure. Der grüne Pfeil zeigt die Laufhöhe des nativen Proteins an.

Eine leichte Verschiebung der Laufhöhe konnte nur bei Schwermetall 7 (Kaliumtetranitroplatinat) und Schwermetall 9 (Gold(III)chlorid) festgestellt werden. Das Schwermetall 4 (Natriumhexachloroiridium(III)hydrat) wurde ebenfalls in eine engere Auswahl genommen, da es in der Publikation von Boggon & Shapiro in der nativen PAGE keine Verschiebung verursachte, allerdings trotzdem im Kristall an das Protein kooperierte (Boggon und Shapiro 2000).

Trotz des Vorab*screens* mit der nativen PAGE wurden alle 14 Schwermetallesalze in verschiedenen Konzentrationen (1,5 und 10 mM Endkonzentation) eingewogen (Sun et al. 2002; Garman und Murray 2003). Bei den *Soaking*-Zeiten der Schwermetallsalzlösungen wurden 10 min., 4 h, 10 h, und wenn die Kristalle bis zu diesem Punkt noch nicht zerstört waren, eine Inkubation über Nacht gewählt. In der nachfolgenden Tabelle sind die Konzentrationen und Inkubationszeiten der Schweratomverbindungen zusammengestellt.

Tabelle 34: Ergebnisse beim *Soaking* von Schwermetallen bei verschiedenen Zeiten und Konzentrationen. + = Kristall ist intakt, - = Kristall hat sich aufgelöst oder ist zerfallen

#	*Schwermetall*	*10 min*			*4 h*			*10 h*			*üN*		
	Konzentration (mM)	*1*	*5*	*10*	*1*	*5*	*10*	*1*	*5*	*10*	*1*	*5*	*10*
1	K_2PtCl_4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	$HgCl_2$	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	K_2HgI_4	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
4	Na_3IrCl_6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	$C_2H_5HgOH_2PO_3$	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
6	$Pt(NH_3)_2(NO_2)_2$	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	$K_2Pt(NO_2)_4$	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
8	$(NH_4)_2PtCl_4$	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
9	$AuCl_3$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	$KAu(CN)_2$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	$[(C_6H_5)_3Pb]_2$	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	$Pb(CH_3COO)_2$	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
13	KI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	$C_6I_3NH_2$-1,3-$(COOH)_2$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

***bei Schwermetall 14 wurden als *Soaking*-Konzentrationen 25, 125 und 250 mM eingesetzt laut JBS Magic Triangle Phasing Kit von Jena Bioscience**

Die Kristalle, die keine sichtbaren Schäden aufwiesen, wurden wieder in Stabilisierungspuffer überführt und für eine halbe Stunde inkubiert. Dies diente vor allem der Entfernung überflüssiger Schwermetallionen (sogenanntes *backsoaking*). Anschließend wurden die Kristalle nochmals in die Cryobedingung mit graduellen PEG-Konzentrationen eingelegt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die eingefrorenen Kristalle wurden an der *in-house* Drehanode getestet. Viele der Kristalle hatten eine deutliche Einbuße in ihrem Streuvermögen erlitten. Die Kristalle, die noch am besten streuten, wurden am BESSY in Berlin vermessen. Zuerst wurde für die Messung der Kristalle ein Fluoreszenz-Scan (Beispiel siehe

Abb. 49) durchgeführt, damit die Wellenlängen für die Datensätze festgelegt werden konnten.

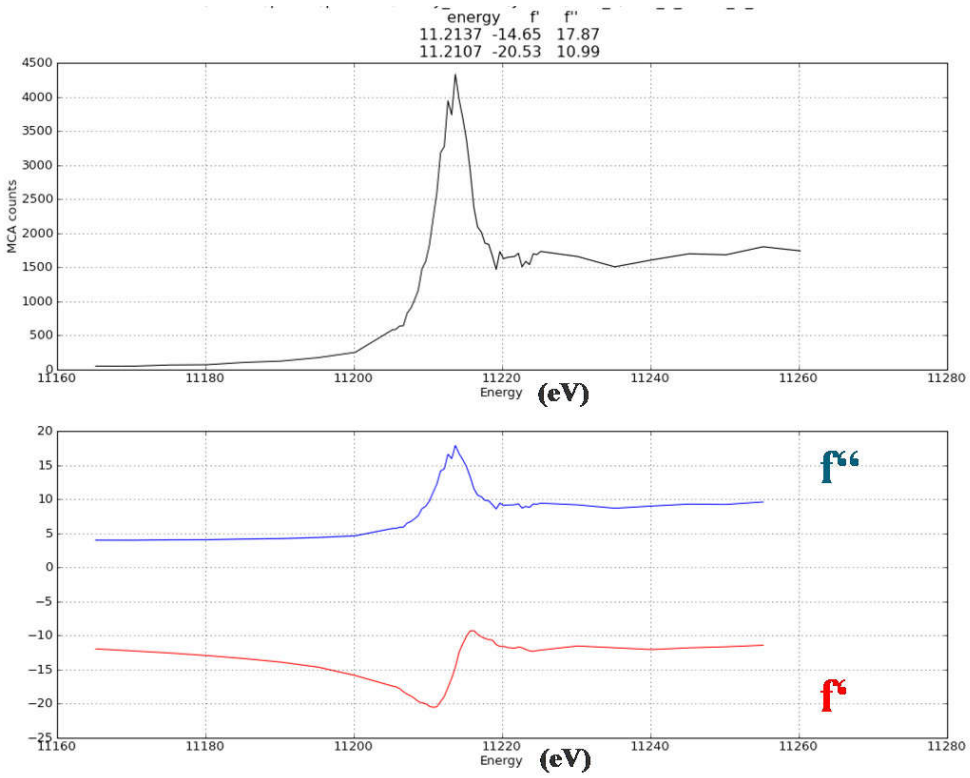


Abb. 49: Floureszenzscan an der Beamline 14.1 für den theoretischen Wert von Ir. Das obere Diagramm zeigt die Intensitätzählung gegen die Energie (eV). Das untere Diagramm zeigt die Aufzeichung von f' und f'' der Absorptionskante um den theoretischen Wert von Ir.

Für die Schwermetalle Gold(III)chlorid und Kaliumtetranitroplatinat konnte je ein *MAD*-Datensatz an den Punkten der *inflection*, *peak* und *high energy remote* Energie aufgenommen werden. Für diese Schwermetalle konnten außerdem zwei weitere *SAD*-Datensätze bei der *peak*-Wellenlänge aufgenommen werden. Außerdem konnten *SAD*-Datensätze aufgenommen werden für Natriumhexachloro-iridium(III)hydrat und 5-Amino-2,4,6-triiodisopthalsäure.

Trotz Fluoreszenzscans hatte beim Auswerten der Datensätze mit den Programmen SHLEX C, D und E keiner ein ausreichend anomales Signal. Für Ir, welches in Form von Natriumhexachloroiridium(III)hydrat eindiffundiert wurde, waren die Kristalle zum Teil voller Risse, deswegen sollte dort bei einem zweiten Versuch mit einer niedrigeren Konzentration gearbeitet werden, dies gegebenfalls auch über eine längeren Zeitraum. Für Au in Form von Gold(III)chlorid und für Pt in Form von Kaliumtetranitroplatinat war das anomale Signal nicht stark genug. Bei

diesen Schwermetallen sollte über einen längeren Zeitraum das *Soaking* durchgeführt werden.

Bei einem zweiten Versuch wurden Kristalle mit einer Konzentration von 0,5 mM und 1 mM der oben genannten Schwermetallsalze mit Ir, Au und Pt über 36 h exponiert. In den aufgenommenen Datensätzen, in denen vorher per Floureszenzscan das entsprechende Schwermetall gefunden werden konnte, konnte allerdings kein ausreichendes anomales Signal detektiert werden.

Um eine größere Auswahl an Schwermetallen nutzen zu können, wurden die Kristalle langsam in einen pH von 7,0 überführt. Dazu wurden alle 2 h die Kristalle in eine um 0,2 pH Einheiten niedrigere Lösung gesetzt. Die Kristalle wurden *in-house* getestet und es wurde festgestellt, dass sie schon durch die pH-Verschiebung einen erheblichen Schaden genommen hatten und das Streuvermögen rapide gesenkt worden war (um 5 Å).

Weitere Schwermetalle wurden für Tests ausgewählt. In der nativen PAGE wurden alle Schweratome bis auf das gasförmige Xenongas, wie in 3.5.8 beschrieben, getestet. Keines der Schweratome zeigte eine Verschiebung in der Laufhöhe (Daten nicht gezeigt). Trotzdem wurden Kristalle mit den weiteren ausgewählten Schwermetallsalzen (siehe Tabelle 35) getränkt. Schwermetall Nummer 15-19 und 22-25 wurden bei einer Konzentration von 1, 5 und 10 mM über einen Zeitraum von 2 h, 4 h und 24 h eingesetzt. Schwermetall 21 wurde über denselben Zeitrahmen mit einer höheren Konzentration von 100 mM exponiert. Bei Schwermetall 26 und 27 wurden *Quicksoak* über 90 s bei den Konzentrationen 10, 100, 300 und 1000 mM ausprobiert (Bieger und Essen 2001a, 2001b, 2001b; Bieger et al. 2003). Enthielten die Schwer-metallsalze Pb, Hg oder Pt wurde im Stabilisierungs- und auch im Cryopuffer auf Cadaverin verzichtet, da dieses mit den genannten Metallen interagiert und diese so nicht mehr für die Schwermetallderivatisierung des Proteins zu Verfügung stehen würden.

Im Falle von Atom 20, dem Xenongas, wurden Kristalle bei 3000 psi für 3-5 min. mit einer Xenondruckapparatur begast (Sauer et al. 1997). Auf das Testen *in-house* wurde verzichtet, um nicht zu riskieren, dass die Kristalle antauen und das möglicherweise eindiffundierte Xenon wieder verlieren. Am BESSY streuten diese Kristalle nicht.

Tabelle 35: Weitere Schwermetalle für das Schwermetallsoaking der OspD1 Δ1-15/Δ222-225 Kristalle

#	*Schwermetall bzw. Edelgas*	*Formel*
15	Natriumtetrachloroaurat(III)-dihydrat	$NaAuCl_4 \cdot 2H_2O$
16	Ytterbium(III)chlorid	$YbCl_3 \cdot H_2O$
17	Blei(II)nitrat	$Pb(NO_3)_2$
18	Kaliumperrhenat	$KReO_4$
19	Hexanatriummetawolframat	$3Na_6WO_4 \cdot 9WO_3 \cdot H_2O$
20	Xenon Gas	Xe
21	Cobalt(II)chlorid	$CoCl_2$
22	Kaliumpentafluorooxyuranat(VI)	$K_3UO_2F_5$
23	Quecksilber(II)-(2-methoxy-3-ureidopropyl)-chlorid	$ClHgCH_2C(OCH_3)HCH_2NHCONH_2$
24	Chloro(2-oxoethyl)quecksilber	$ClHgCH_2CHO$
25	Dibromodiamminplatinum(II)	$Pt(NH_3)_2Br_2$
26	Rubidiumchlorid	RbCl
27	Gadoliniumchlorid	$GdCl_3$

Viele der weiteren getesteten Schwermetallsalze führten beim *Soaking* zum Auflösen der Kristalle oder zu schlechter Diffraktion. Aufgenommen wurden nach dem Floureszenzscan am BESSY Datensätze von OspD1 Kristallen, die mit 1 mM Natriumhexa-chloroiridium(III)hydrat, 1 mM Gold(III)chlorid oder 1 mM Kaliumtetranitroplatinat über 36 h getränkt wurde. Nach Auswertung der Daten mit SHELX C, D und E konnte erneut kein ausreichendes anomales Signal gefunden werden.

Der sehr hohe pH-Wert der Kristallisationsbedingung stellte beim Phasieren mit Schwermetallen ein großes Problem da. Viele Verbindungen konnten nicht zum Einsatz kommen, da sie in diesem pH-Wert als Hydroxide ausgefallen wären, wie zum Beispiel die Quecksilberverbindungen.

Xenon konnte vermutlich nicht binden, da OspD1 ein kleines Protein ist und sich für Xenon keine ausreichend große Bindetasche bilden konnten.

4.9.2 Ko-Kristallisation

Um Informationen über die Bindemodi von Protein-Proteinbindungen auf atomarer Ebene zu bekommen, ist es notwendig, beide Proteine zusammen zu Ko-kristallisieren. Außerdem ist es möglich, Proteine mit einzelnen Peptiden anderer Proteine zu untersuchen. Beide Möglichkeiten kamen in dieser Arbeit zur Anwendung.

4.9.2.1. IpgCΔ152-155 mit Peptiden

Christian Hasewinkel konnte in seiner Dissertation (Hasewinkel 2012b) die Bindestelle für das Chaperon IpgC mit Peptiden der Interaktionspartner IpaC und MxiE näher charakterisieren. Die Peptide wurden mittels Thermophorese untersucht. Die folgenden Peptide (Tabelle 36) wurden jeweils aufgrund der stärksten Affinität zu IpgC und das kürzere noch bindungsfähige Peptid ausgewählt und mit IpgCΔ152-155 ko-kristallisiert. Für die Ko-Kristallisation der MxiE-Peptide wurde jeweils die Serinvariante statt der Cysteinvariante eingesetzt, um Disulfidbrücken während der Kristallisation zu vermeiden.

Tabelle 36: Affinitäten ausgewählter Peptide zu IpgC, S = Serin statt Cystein (Hasewinkel 2012b)

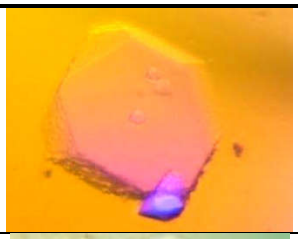
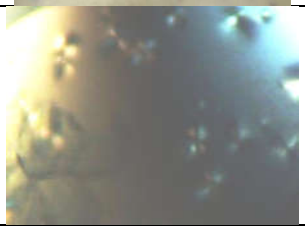
Protein	*Peptid*	*Sequenz*	*Kd [µM]*
IpaC	IpaC3	LLKLSEQVQHDSEIIARLTD	29,8 ± 4,8
IpaC	c10.5	LLKLSEQVQH	107,0 ± 15,7
MxiE	20.5S	FSGALVEGSHAEKSIHFYHE	16,5 ± 3,3
MxiE	10S	AEKSIHFYHE	86,8 ± 25,4

Zur Kristallisation wurde 10 mg/ml IpgC in einem Verhältnis 1,5 µl Protein : 1 µl Reservoirlösung als *Sitting Drop*-Verfahren eingesetzt. Die lyophylisierten Peptide wurden in einem molaren Verhältnis von 2:1 direkt zur Proteinlösung eingewogen und gut vermischt. Beim Screening nach Kristallisations-bedingungen kamen die *in-house-Screens* Wizard I, Wizard II, Crystal Screen, PEG-Screen sowie der Ammoniumsulfat-*Screen* zum Einsatz. Ebenfalls getestet wurde die

publizierte Kristallisationsbedingung von Lunelli et. al. für die Kristallisation von IpgC mit dem IpaB-Peptid PELKAP (AS 65-70) 0,1 M HEPES pH 7,4; 20 % w/v PEG 8000; 8 % Ethylenglykol (Lunelli et al. 2009).

Kristalle entstanden mit den Peptiden 20.5S, 10S und c10.5 in der Bedingung Wiz I 37 (0,1 M Tris pH 7,0; 1 M Natrium-Kalium-Tatrat; 0,2 M $LiSO_4$). Weitere Kristalle wuchsen bei 10S und 20.5S in Bedingung Wiz I 48 (0,1 M MES pH 6,0; 1 M Natrium-Kalium-Tatrat). Beide Bedingungen stimmen mit den Ergebnissen von Christian Hasewinkel für die Ko-Kristallisation von IpgC mit 20.6 (AEKCIHFYHENDLRDSCNTE) überein. Mit den erhaltenen Kristallisations-bedingungen fand eine Optimierung des pH Wertes (MES pH 5,5-6,5; Tris pH 6,5-7,5) und der Natrium-Kalium-Tatrat-Konzentration (0,5-1,4 M) statt.

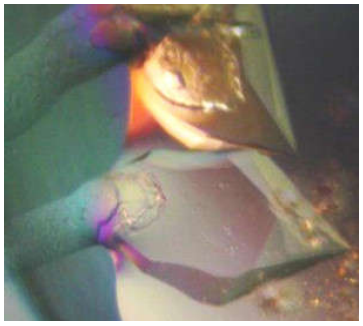
Tabelle 37: Erfolgreiche Kristallisationsbedingungen von IpgCΔ152-155 mit Peptiden

Bedingung	*Bild der Kristallisation*	*Peptid*	*Reproduk-tion*	*Bemerkung*
0,1 M MES pH 6,7; 1,2 M Na/K Tatrat		e10S	möglich	gut definierte Kristalle
0,1 M MES pH 6,5; 0,9 M Na/K Tatrat		C10.5	möglich	Kristalle mit vielen Rissen und Hohlräumen
0,1 M Tris pH 6,5; 0,9 M Na/K Tatrat; 0,2 M $LiSO_4$		20.5S	nicht möglich	sehr kleine Kristalle
0,1 M MES pH 6,5; 0,9 M Na/K Tatrat		20.5S	nicht möglich	kleinere, gut definierte Kristalle

Die Kristalle wurden gefischt und mit 40 % Glycerol als Cryoprotektans in der entsprechenden Bedingung mit Zusatz von Peptid getestet. Ein niedrigerer Glycerolanteil führte zu Eisringen in den Diffraktionsmustern. Beim Testen streuten die verschiedenen Kristalle mit Peptid 20.5S nicht. Kristalle mit Peptid c10.5 streuten bis zu 6 Å und mit Peptid bis zu 4 Å.

Um die Kristalle zu verbessern, wurde ein Additivscreen durchgeführt und auch *Seeding* eingesetzt. Mit der Methode des *Streakseeding* wurden Kristalle in die Bedingung 0,1 M Tris pH 6,5 oder 0,1 M MES pH 6,5 mit 0,9 M Natrium-Kalium-Tatrat und dem entsprechenden Peptid im *Sitting Drop*-Verfahren angesetzt.

Während für IpgCΔ152-155 mit c10.5 keine Verbesserung des Streuvermögens festgestellt werden konnte, streuten die Kristalle von IpgCΔ152-155 mit e10S bis 3,0 Å auf der *in-house* Anlage. Beim Messungen am BESSY auf BL 14.2 streute der Kristall bis 2,6 Å.



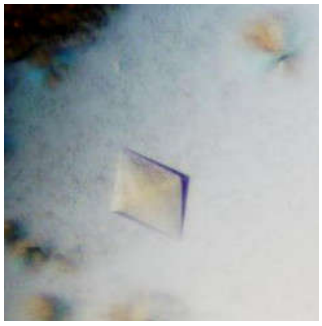


Abb. 50: Kristalle IpgCΔ152-155 mit e10S nach *Streakseeding* in 0,1 M Tris pH 6,5; 0,9 M Natrium-Kalium Tatrat

Beim Betrachten der Diffraktionsbilder fiel auf, dass sich der Kristall anisotrop verhielt. Dieses Verhalten wurde beim Prozessieren der Daten mit *HKL2000* berücksichtigt. Die ermittelte Raumgruppe war $P32_1$. Nach dem molekularen Ersatz mit dem Programm Phaser aus dem *CCP4* Paket und dem Bilden des Modells mit *Arp Warp* (ebenfalls aus dem *CCP4* Paket) konnte die Struktur verfeinert werden. Nach 16 Verfeinerungszyklen zeigte sich, dass keine Elektronendichte für das Peptid zu erkennen war. Somit muss davon ausgegangen werden, dass kein Peptid gebunden hatte. Die Struktur wurde deswegen nicht weiter bearbeitet. Weitere Versuche zeigten ebenfalls keine Elektronendichte für einen gebundenen Liganden, so dass es innerhalb der Arbeit der Verfasserin nicht möglich war, eine weitere Struktur von IpgC mit einem Peptid zu erhalten.

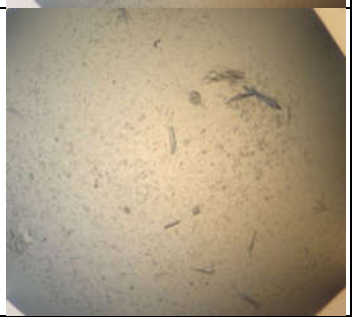
4.9.2.2. OspD1 mit Spa15

Ebenfalls wurde OspD1 mit Spa15 in 20 mM Tris +300 mM NaCl ko-kristallisiert. Sollte es möglich sein, beide Proteine zu ko-kristallisieren, könnte man das Phasenproblem über die Präsenz der gefalteten Struktur von Spa15 (van Eerde et al. 2004) lösen. Außerdem wäre es möglich, die exakte Protein-Protein-Interaktion auf atomarer Ebene zu erkennen. Für das Experiment wurden verschiedene Verhältnisse, zunächst OspD1 20 mg/ml (10 mg/ml) zu Spa15 10 mg/ml (5 mg/ml), sowie OspD1 10 mg/ml zu Spa15 10 mg/ml und OspD1 5 mg/ml zu Spa15 10 mg/ml eingesetzt. Dabei wurden die erwähnten *Screens* benutzt (siehe Tabelle 16 und Tabelle 17). Kristallwachstum konnte auch in diesem Fall nicht beobachtet werden.

4.9.2.3. Spa15 mit OspD1-Peptiden

Aufgereinigtes 3 mg/ml bzw. 5 mg/ml Spa15 in 20 mM Tris und 100 mM NaCl wurde mit den hergestellten Peptiden JK-01-122.1-122.6 ko-kristallisiert. Die lyophylisierten Peptide wurden in einem Verhältnis von 2:1 direkt zur Proteinlösung eingewogen und gut vermischt (Endkonzentration 200 µM), dann mit den oben erwähnten *Screens* angesetzt (siehe Tabelle 16 und Tabelle 17).

Tabelle 38: Erste erfolgreiche Kristallisationsbedingungen von Spa15 mit OspD1-Peptiden

Bedingung	*Bild der Kristallisation*	*Peptid*	*Reproduk-tion*	*Bemerkung*
0,1 M Tris pH 8,0; 20 % (w/v) PEG 6000; 0,2 M NaCl		122.3	Möglich	winzige Nadeln, weitere Optimierung nötig
0,1M Tris pH 8,0; 20 % (w/v) PEG 6000; 0,2 M NaCl		122.2	möglich	kleinere Nadeln, weitere Optimierung nötig

0,2 M $NaNO_3$; 20 % (w/v) PEG 3350		122.2	nicht möglich	sehr kleine Kristalle
0,1 M HEPES pH 7,5; 0,6 M $MgSO_4$; 4% (w/v) PEG 400		122.2	möglich	Kristalle nicht richtig abgrenzt, Optimierung nötig

Screens wurden bei 4 °C und 18 °C angesetzt. Kristallwachstum war nur bei 18 °C, bei den Komplexen aus Spa15 mit OspD1-Peptid 122.2 und 122.3 zu beobachten (Tabelle 38). Die entstandenen Kristalle wurden mit dem *Izit crystal dye* (Farbstoff, der sich blau färbt bei Aufnahme in Proteinkristalle, siehe Hampton Research Manual) positiv getestet. Die Kristallisationsbedingung 0,1 M Tris pH 8,0; 20 % (w/v) PEG 6000; 0,2 M NaCl führte in beiden Fällen zu kleinen Kristallnadeln, deren Entstehen reproduzierbar waren. Bei den Bedingungen, die reproduzierbar waren, konnte die Optimierung der Bedingungen aus Zeitgründen nicht mehr innerhalb dieser Doktorarbeit stattfinden.

5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit gelang die Erzeugung reiner, trunkierter OspD1-Varianten in ausreichenden Mengen, um damit durch Kristallisationsversuche reproduzierbare Kristalle zu erzeugen sowie einen nativen Datensatz. Leider konnte dieser nicht durch *Molecular Replacement* gelöst werden und auch alle anderen angewandten Methoden wie die Produktion eines SeMet-Proteins, der Versuch Schwermetalle und Xenogas einzubringen und die Ko-Kristallisation mit Spa15 brachten innerhalb es Zeitrahmens dieser Dissseration keine Strukturlösung. Allerdings war es gelungen Spa15, reproduzierbar mit OspD1-Peptiden zu kristallisieren, jedoch konnte die Optimierung dieser Kristalle innerhalb dieser Arbeit nicht mehr stattfinden.

Eine Möglichkeit, Schwermetallderviate zu generieren, wäre OspD1-Mutanten herzustellen, die mehr Bindestellen (z.B. Cysteine) aufweisen, an denen die Schwermetalle besser koordinieren können.

Die Interaktion von OspD1 mit Spa15 hinsichtlich der Bindungsstärke wurde erneut vermessen, ebenso wurden die Bildungsstärken von OspD1-Peptiden mit Spa15 und Peptide des Transkriptionsregulators MxiE mit OspD1 in Interaktionsstudien bestimmt. Um weitere Einblicke in die Stöchiometrie der Interaktion zwischen OspD1 und Spa15 und auch ggf. MxiE zu bekommen, kann ein natives ESI-MS-Experiment (Elektrospray-Ionisation gekoppelt mit Massenspekrometrie) helfen, um die Quartärstruktur beider Proteine (vor allem für OspD1) sowie die Quartärstruktur des Komplexes Spa15-OspD1 zu bestimmen. Für Spa15 ist bekannt, dass es in der Kristallstruktur als Homodimer vorliegt. Eine Kristallstruktur der Bindestelle ist essentiell.

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Klaus Reuter für die Überlassung des interessanten Themas, sowie für die Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit bedanken. Prof. Dr. Gerhard Klebe möchte ich ebenso herzlich danken, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Übernahme des Zweitgutachtens und die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für pharmazeutische Chemie zu absolvieren.

Prof. Torsten Steinmetzer und Jenny Kouretova gilt der Dank für die Hilfe und Unterstützung bei der Peptidsynthese. Prof. Culmsee und Prof. Kockskämper danke ich für die bereitwillige Übernahme des Prüfungsvorsitzes und der Nebenfachprüfungen.

Ich danke auch Lydia Hartleben für die Unterstützung, Geduld bei allen administrativen Angelegenheiten und so manches offene Ohr. Vielen Dank an Prof. Andreas Heine für Hilfe und Unterstüzung in kristallografischen Belangen sowie Christian Sohn für die Wartung und Hilfe am Röntgengerät.

Vielen Dank auch an meine Vorgänger, vor allem an Christian Hasewinkel für seine Hilfe, Ratschläge und Vorarbeit auf diesem Thema. Auch bei meinen Praktikanten (3mal Katharina, Henry, Sven, Janick, Simon, Tim, Meltem, Hafize) möchte ich mich bedanken und hoffe, dass ich ihnen Neues auf ihrem beruflichen Weg mitgeben konnte. Danke an alle Kollegen der AG Klebe sowie dem Team der Praktikumsbetreuung des 2. Fachsemesters. Ich möchte mich auch bei den Computer-Administratoren der AG Klebe insbesondere bei Felix Gut, Michael Betz, Timo Krotzky, Felix Terwesten und Phong Nguyen bedanken.

Für weitergehende fachliche Diskussionen, Eure Hilfe und Unterstützung in allen Lebenslagen während meiner Promotionszeit und nicht zuletzt für so manche erholsame Zeit auch außerhalb der Uni möchte ich mich insbesondere bei Maren Kuhnert, Steffi Dörr, Helena Rimmer, Frithjof Scheer, Nina Klee, Christina Behrens, Janis Müller, Christof Siefker, Ricarda und Manuel Kanitz bedanken.

Ich danke den Wissenschaftlern der Beamline BESSY II (Berlin) für die Betreuung der Beamline und dem Helmholtz-Zentrum für Materialien und Energie (Berlin) für die freundliche Übernahme der Reisekosten.

Auch ein herzliches Dankeschön an alle, deren Abbildungen sich in dieser Arbeit wieder finden. Danke auch an alle Korrekturleser/innen (Martin, Maren, Anja, Markus und Armin) dieser Arbeit für Tipps und Kritik, sowie Lob.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen phantastischen Freunden Julie, Leander, Dixi, Marc, Michael, Wiebke, FloW, Silke, FloN, Johanna, Christian, Anika, Jakub, Heike, Katrin, Kathrin, Markus, René sowie Thomas G. bedanken für schöne Abende, Wochenenden und Urlaube. Speziellen Dank an die beste Mitbewohnerin der Welt – Stina.

Ein großes Dankeschön an meine Rollenspielrunden für die Entführung in andere Welten, Geschichten und Zeiten: Maxx, Pit, Wiebke I, Wiebke II, Felix, Ananda, Rune, Jowiss, Niels, Philipp, Jassy, Pierre, Dennis, Heike, Michael, FloN, Julie, Lena, Olga, Anja, Armin, Benni, Deniz und alle L.I.‘ler. Weiterhin danke auch an Lysmine und Linnea für die schöne Zeit, die ich mit Ihnen verbracht habe.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie bedanken für ihre Unterstützung in der Zeit des Studiums, insbesondere in arbeitsintensiven Zeiten. Im Speziellen meinen Eltern, ohne die diese Promotion nie möglich gewesen wäre.

7 Curriculum Vitae

8 Anhang

DNA-Sequenz *ospD1* mit GST-*tag* :

```
   1 ATGTCCCCTA TACTAGGTTA TTGGAAAATT AAGGGCCTTG TGCAACCCAC
  51 TCGACTTCTT TTGGAATATC TTGAAGAAAA ATATGAAGAG CATTTGTATG
 101 AGCGCGATGA AGGTGATAAA TGGCGAAACA AAAAGTTTGA ATTGGGTTTG
 151 GAGTTTCCCA ATCTTCCTTA TTATATTGAT GGTGATGTTA AATTAACACA
 201 GTCTATGGCC ATCATACGTT ATATAGCTGA CAAGCACAAC ATGTTGGGTG
 251 GTTGTCCAAA AGAGCGTGCA GAGATTTCAA TGCTTGAAGG AGCGGTTTTG
 301 GATATTAGAT ACGGTGTTTC GAGAATTGCA TATAGTAAAG ACTTTGAAAC
 351 TCTCAAAGTT GATTTTCTTA GCAAGCTACC TGAAATGCTG AAAATGTTCG
 401 AAGATCGTTT ATGTCATAAA ACATATTTAA ATGGTGATCA TGTAACCCAT
 451 CCTGACTTCA TGTTGTATGA CGCTCTTGAT GTTGTTTTAT ACATGGACCC
 501 AATGTGCCTG GATGCGTTCC CAAAATTAGT TTGTTTTAAA AAACGTATTG
 551 AAGCTATCCC ACAAATTGAT AAGTACTTGA AATCCAGCAA GTATATAGCA
 601 TGGCCTTTGC AGGGCTGGCA AGCCACGTTT GGTGGTGGCG ACCATCCTCC
 651 AAAATCGGAT CTGGAAGTTC TGTTCCAGGG GCCCCATATG TCAATAAATA
 701 ACTATGGATT ACATCCAGCA AACAACAAAA ATATGCACCT AATAATAGGC
 751 AGCAATACTG CTAATGAAAA TAAAGGAATG AAAAATAATA TCATTAACGT
 801 GACAAATACC GCTATATCCC ACGCCATCAA TGAAGAAAAA TCAGGGGGGG
 851 GATATAGTGG TGTTTCTTTC AGAAAATTGG CCAAAATACA GAACATATCC
 901 ATTCCGACAA AGAATAATAA GGAGTATAAC CGCCATAATT TGTTTTCATT
 951 GATTTGGCAT GGAAATGCCG ATGCAGCGCG TAAATACAGT GAATCGCTGT
1001 TGGCAGCCGA AATACCCAAA GAGGAAAAAC TAGAAGTTCT TGCAGCACGA
1051 AATAATGCTG GGGAATCTGC TTTGTTCATA GCTCTTCAAG AAGGTCATTC
1101 CGCTGCGATT CAAGCTTATG GAGATTTTAT TAAAACTTTT GATTTATCAC
1151 CAAAAGAAAC GATTAAACTA TTGGATGTAA GAGATAATGA GGGGTTACCA
1201 GGATTATTTC TGGCCGCAGG GAAAGGGAAT ATCGAGGCTA TGATGGCATA
1251 TATAAATATA TGCCATCATA GTGGGATAAA ACTTACAGAA ATAGCAGACA
1301 GACTTAACAA TAATGAACAA GACATGTTTA ATATTATTTC TGACAAAATA
1351 CAAGAGTTGT TTTAA
```

Aminosäuresequenz OspD1Δ1-15/Δ222-225 mit MBP-und His-*tag* :

```
  1 MSPILGKLMH KIEEGKLVIW INGDKGYNGL AEVGKKFEKD TGIKVTVEHP
 51 DKLEEKFPQV AATGDGPDII FWAHDRFGGY AQSGLLAEIT PDKAFQDKLY
101 PFTWDAVRYN GKLIAYPIAV EALSLIYNKD LLPNPPKTWE EIPALDKELK
151 AKGKSALMFN LQEPYFTWPL IAADGGYAFK YENGKYDIKD VGVDNAGAKA
```

201 GLTFLVDLIK NKHMNADTDY SIAEAAFNKG ETAMTINGPW AWSNIDTSKV
251 NYGVTVLPTF KGQPSKPFVG VLSAGINAAS PNKELAKEFL ENYLLTDEGL
301 EAVNKDKPLG AVALKSYEEE LVKDPRIAAT MENAQKGEIM PNIPQMSAFW
351 YAVRTAVINA ASGRQTVDEA LKDAQTEFIA WPLQGWQATF GGGDHPPNSH
401 MYPRGMHLII GSNTANENKG MKNNIINVTN TAISHAINEE KSGGGYSGVS
451 FRKLAKIQNI SIPTKNNKEY NRHNLFSLIW HGNADAARKY SESLLAAEIP
501 KEEKLEVLAA RNNAGESALF IALQEGHSAA IQAYGDFIKT FDLSPKETIK
551 LLDVRDNEGL PGLFLAAGKG NIEAMMAYIN ICHHSGIKLT EIADRLNNNE
601 QDMFNIISDK IYPRGLEAAA HHHHHHHH

Aminosäurenanzahl: 628

Molekulargewicht: 69241, 5 Da

Extinktionskoeffizent: 93280 M^{-1} cm^{-1}, bei 280 nm (1 g/l => 1,347)

Abb. 51: Gensequenz des ospD1Δ1-15/Δ222-225 mit MBP-und His-*tag* (MBP- und His-*tag* unterstrichen) und Aminosäuresequenz

DNA-Sequenz *ospD1Δ1-15/Δ222-225*:

1 CACCTAATAA TAGGCAGCAA TACTGCTAAT GAAAATAAAG GAATGAAAAA
51 TAATATCATT AACGTGACAA ATACCGCTAT ATCCCACGCC ATCAATGAAG
101 AAAAATCAGG GGGGGGATAT AGTGGTGTTT CTTTCAGAAA ATTGGCCAAA
151 ATACAGAACA TATCCATTCC GACAAAGAAT AATAAGGAGT ATAACCGCCA
201 TAATTTGTTT TCATTGATTT GGCATGGAAA TGCCGATGCA GCGCGTAAAT
251 ACAGTGAATC GCTGTTGGCA GCCGAAATAC CCAAAGAGGA AAAACTAGAA
301 GTTCTTGCAG CACGAAATAA TGCTGGGGAA TCTGCTTTGT TCATAGCTCT
351 TCAAGAAGGT CATTCCGCTG CGATTCAAGC TTATGGAGAT TTTATTAAAA
401 CTTTTGATTT ATCACCAAAA GAAACGATTA AACTATTGGA TGTAAGAGAT
451 AATGAGGGGT TACCAGGATT ATTTCTGGCC GCAGGGAAAG GGAATATCGA
501 GGCTATGATG GCATATATAA ATATATGCCA TCATAGTGGG ATAAAACTTA
551 CAGAAATAGC AGACAGACTT AACAATAATG AACAAGACAT GTTTAATATT
601 ATTTCTGACA AAATACAA

Aminosäurensequenz OspD1Δ1-15/Δ222-225:

1 MHLIIGSNTA NENKGMKNNI INVTNTAISH AINEEKSGGG YSGVSFRKLA
51 KIQNISIPTK NNKEYNRHNL FSLIWHGNAD AARKYSESLL AAEIPKEEKL

```
101 EVLAARNNAG ESALFIALQE GHSAAIQAYG DFIKTFDLSP KETIKLLDVR
151 DNEGLPGLFL AAGKGNIEAM MAYINICHHS GIKLTEIADR LNNNEQDMFN
201 IISDKI
```

Aminosäurenanzahl: 206

Molekulargewicht: 22651,6 Da

Extinktionskoeffizent: 12950M^{-1} cm^{-1}, bei 280 nm (1 g/l => 0,572)

Abb. 52: Gensequenz und Aminosäuresequenz des *ospD1Δ1-15/Δ222-225*

DNA-Sequenz *ospD1Δ1-32/Δ222-225*:

```
  1 AATATCATTA ACGTGACAAA TACCGCTATA TCCCACGCCA TCAATGAAGA
 51 AAAATCAGGG GGGGGATATA GTGGTGTTTC TTTCAGAAAA TTGGCCAAAA
101 TACAGAACAT ATCCATTCCG ACAAAGAATA ATAAGGAGTA TAACCGCCAT
151 AATTTGTTTT CATTGATTTG GCATGGAAAT GCCGATGCAG CGCGTAAATA
201 CAGTGAATCG CTGTTGGCAG CCGAAATACC CAAAGAGGAA AAACTAGAAG
251 TTCTTGCAGC ACGAAATAAT GCTGGGGAAT CTGCTTTGTT CATAGCTCTT
301 CAAGAAGGTC ATTCCGCTGC GATTCAAGCT TATGGAGATT TTATTAAAAC
351 TTTTGATTTA TCACCAAAAG AAACGATTAA ACTATTGGAT GTAAGAGATA
401 ATGAGGGGTT ACCAGGATTA TTTCTGGCCG CAGGGAAAGG GAATATCGAG
451 GCTATGATGG CATATATAAA TATATGCCAT CATAGTGGGA TAAAACTTAC
501 AGAAATAGCA GACAGACTTA ACAATAATGA ACAAGACATG TTTAATATTA
551 TTTCTGACAA AATACAA
```

Aminosäurensequenz OspD1Δ1-32/Δ222-225:

```
  1 NNIINVTNTA ISHAINEEKS GGGYSGVSFR KLAKIQNISI PTKNNKEYNR
 51 HNLFSLIWHG NADAARKYSE SLLAAEIPKE EKLEVLAARN NAGESALFIA
101 LQEGHSAAIQ AYGDFIKTFD LSPKETIKLL DVRDNEGLPG LFLAAGKGNI
151 EAMMAYINIC HHSGIKLTEI ADRLNNNEQD MFNIISDKI
```

Aminosäurenanzahl: 189

Molekulargewicht: 20811, 5 Da

Extinktionskoeffizent: 12950M^{-1} cm^{-1}, bei 280 nm (1 g/l => 0,622)

Abb.53: Gensequenz und Aminosäuresequenz des *ospD1 Δ1-32/Δ222-225*

DNA-Sequenz *ospD1Δ1-80/Δ222-225*:

```
  1 GGAGTATAAC CGCCATAATT TGTTTTCATT GATTTGGCAT GGAAATGCCG
 51 ATGCAGCGCG TAAATACAGT GAATCGCTGT TGGCAGCCGA AATACCCAAA
301 GAGGAAAAAC TAGAAGTTCT TGCAGCACGA AATAATGCTG GGGAATCTGC
351 TTTGTTCATA GCTCTTCAAG AAGGTCATTC CGCTGCGATT CAAGCTTATG
401 GAGATTTTAT TAAAACTTTT GATTTATCAC CAAAAGAAAC GATTAAACTA
451 TTGGATGTAA GAGATAATGA GGGGTTACCA GGATTATTTC TGGCCGCAGG
501 GAAAGGGAAT ATCGAGGCTA TGATGGCATA TATAAATATA TGCCATCATA
551 GTGGGATAAA ACTTACAGAA ATAGCAGACA GACTTAACAA TAATGAACAA
```

Aminosäurensequenz OspD1Δ1-80/Δ222-225:

```
  1 NRHNLFSLIW HGNADAARKY SESLLAAEIP KEEKLEVLAA RNNAGESALF
 51 IALQEGHSAA IQAYGDFIKT FDLSPKETIK LLDVRDNEGL PGLFLAAGKG
101 NIEAMMAYIN ICHHSGIKLT EIADRLNNNE QDMFNIISDK I
```

Aminosäurenanzahl: 141

Molekulargewicht: 15594,7Da

Extinktionskoeffizent: 9970M^{-1} cm-^{1}, bei 280 nm (1 g/l => 0,639)

Abb. 54: Gensequenz und Aminosäuresequenz des *ospD1Δ1-80/Δ222-225*

DNA-Sequenz *spa15*:

```
  1 ATGAGTAACA TTAATTTAGT TCAATTAGTT AGAGATAGTC TTTTCACGAT
 51 TGGTTGTCCT CCATCAATTA TTACAGATTT AGACAGCCAT TCAGCGATTA
101 CCATTTCTTT GGATAGTATG CCTGCTATTA ATATAGCTCT TGTCAATGAG
151 CAGGTTATGT TATGGGCTAA TTTTGATGCA CCAAGTGATG TAAAACTTCA
201 GTCATCTGCT TATAACATAT TAAATTTAAT GTTAATGAAC TTTAGTTATA
251 GCATTAATGA GCTGGTAGAG CTTCATCGTT CTGATGAGTA CTTACAGTTA
301 AGAGTTGTTA TTAAAGATGA CTACGTTCAC GATGGGATTG TTTTTGCAGA
351 GATTCTGCAT GAGTTTTATC AGAGGATGGA AATCTTAAAT GGGGTCTTAT
401 AA
```

Aminosäuresequenz Spa15:

```
  1 MSNINLVQLV RDSLFTIGCP PSIITDLDSH SAITISLDSM PAINIALVNE
 51 QVMLWANFDA PSDVKLQSSA YNILNLMLMN FSYSINELVE LHRSDEYLQL
101 RVVIKDDYVH DGIVFAEILH EFYQRMEILN GVL
```

Aminosäurenanzahl: 133

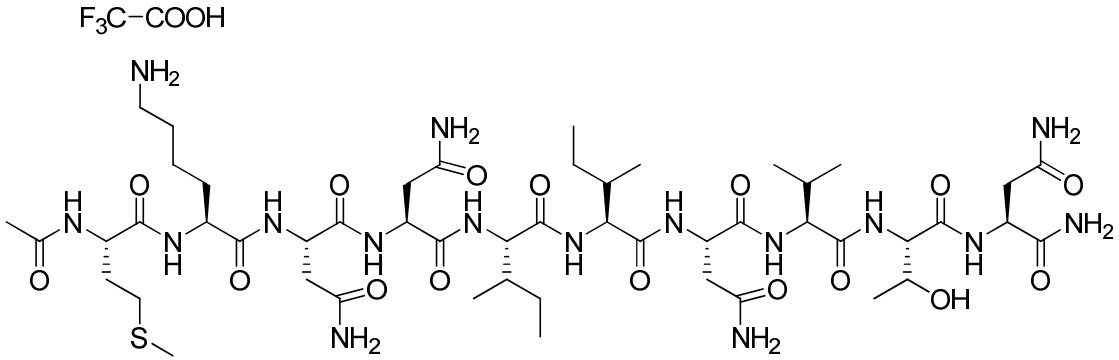
Molekulargewicht: 15116,4 Da

Extinktionskoeffizent: 12950 $M^{-1}cm^{-1}$, bei 280 nm (1 g/l => 0,857)

Abb. 55 : Gensequenz und Aminosäuresequenz des *spa15*

JK-01-122.1

Ac-MKNNIINVTN-NH_2



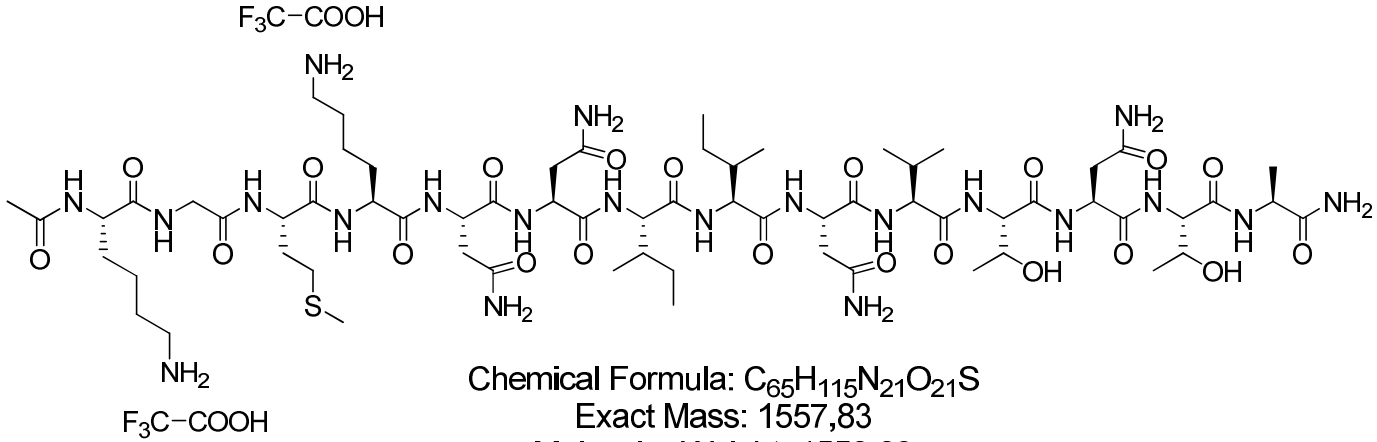
Chemical Formula: $C_{50}H_{88}N_{16}O_{16}S$
Exact Mass: 1200,63
Molecular Weight: 1201,40

TFA-Salz: Chemical Formula: $C_{52}H_{89}F_3N_{16}O_{18}S$
Exact Mass: 1314,62
Molecular Weight: 1315,42

Abb.56: Chemische Formel und Masse des Peptids JK-01-122.1

JK-01-122.2

Ac-KGMKNNIINVTNTA-NH_2



Chemical Formula: $C_{65}H_{115}N_{21}O_{21}S$
Exact Mass: 1557,83
Molecular Weight: 1558,80

TFA-Salz: Chemical Formula: $C_{69}H_{117}F_6N_{21}O_{25}S$
Exact Mass: 1785,82
Molecular Weight: 1786,85

Abb. 57: Chemische Formel und Masse des Peptids JK-01-122.2

JK-01-122.3

Ac-NENKGMKNNIINVTNTAISH-NH_2

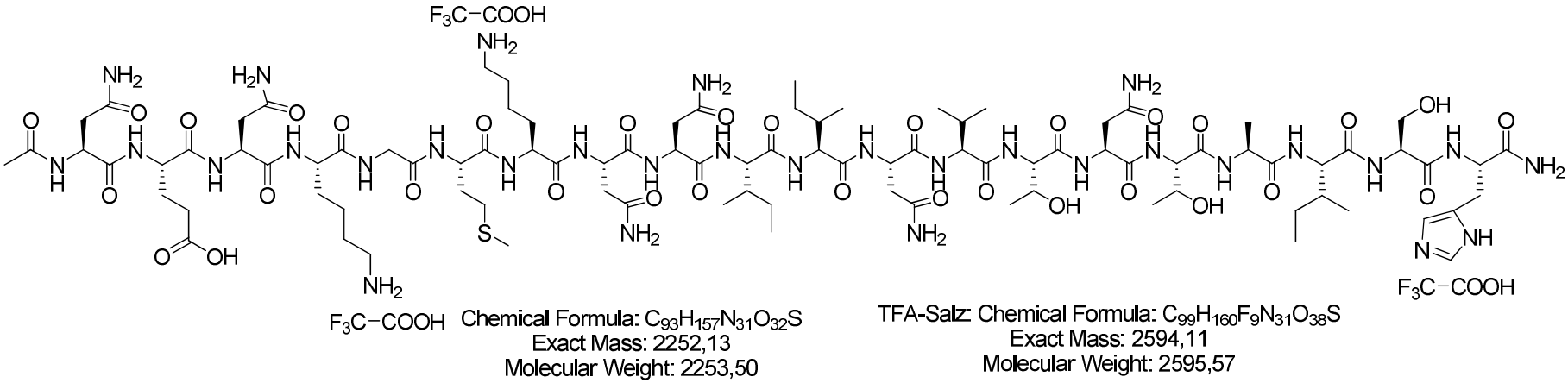
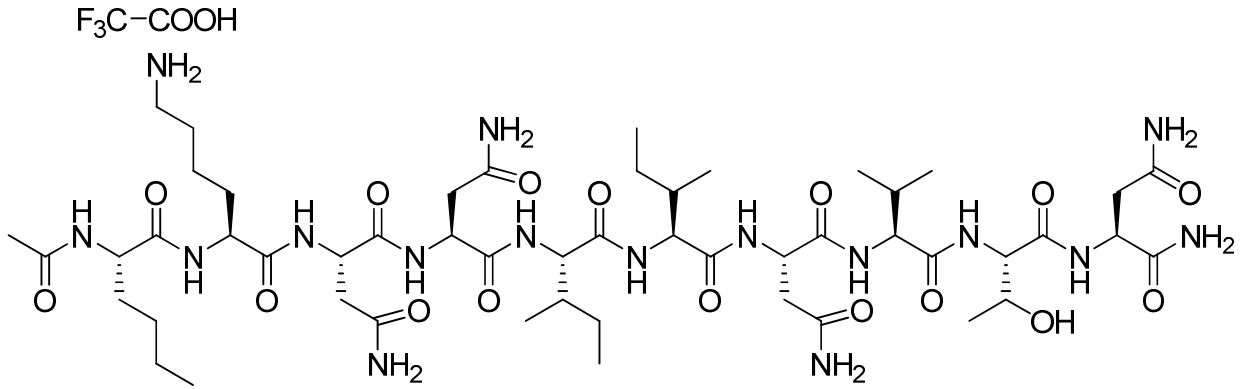


Abb. 58: Chemische Formel und Masse des Peptids JK-01-122.3

JK-01-122.4

Ac-Nle-KNNIINVTN-NH_2



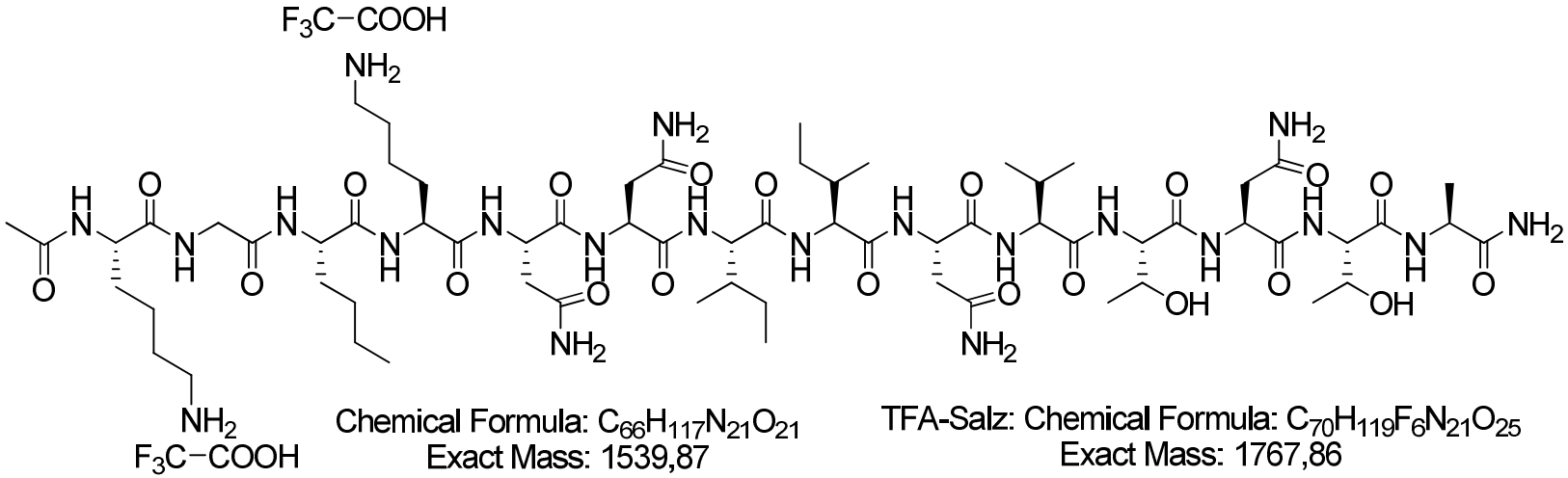
Chemical Formula: $C_{51}H_{90}N_{16}O_{16}$
Exact Mass: 1182,67
Molecular Weight: 1183,36

TFA-Salz: Chemical Formula: $C_{53}H_{91}F_3N_{16}O_{18}$
Exact Mass: 1296,66
Molecular Weight: 1297,38

Abb. 59: Chemische Formel und Masse des Peptids JK-01-122.4

JK-01-122.5

Ac-KG-Nle-KNNIINVTNTA-NH_2



Chemical Formula: $C_{66}H_{117}N_{21}O_{21}$
Exact Mass: 1539,87
Molecular Weight: 1540,76

TFA-Salz: Chemical Formula: $C_{70}H_{119}F_6N_{21}O_{25}$
Exact Mass: 1767,86
Molecular Weight: 1768,81

Abb. 60: Chemische Formel und Masse des Peptids JK-01-122.5

JK-01-122.6

Ac-NENKG-Nle-KNNIINVTNTAISH-NH_2

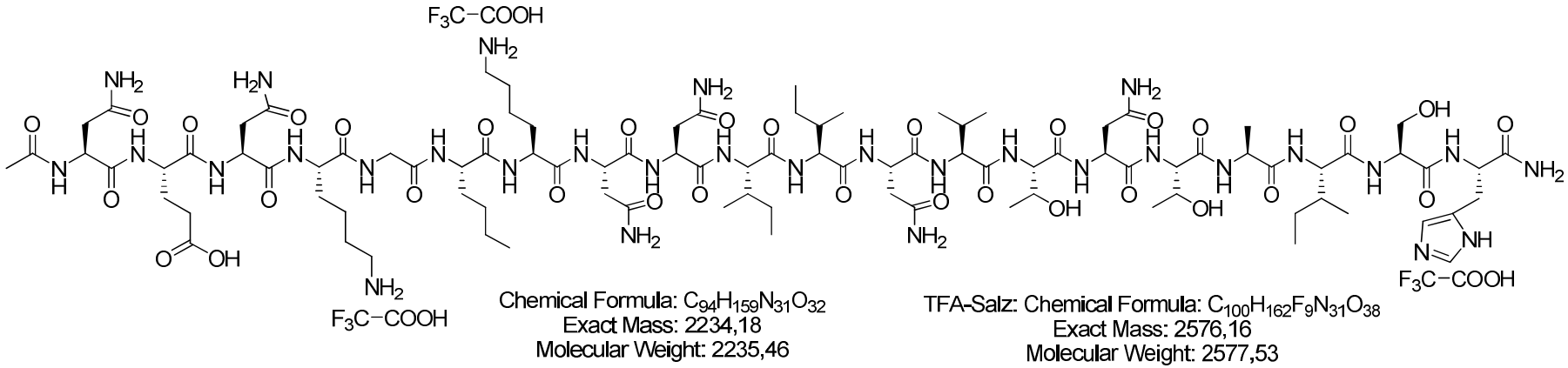


Abb. 61: Chemische Formel und Masse des Peptids JK-01-122.6

Literaturverzeichnis

Adam, T.; Arpin, M.; Prevost, M. C.; Gounon, P.; Sansonetti, P. J. (1995): Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of Shigella flexneri into HeLa cells. In: *J Cell Biol* 129 (2), S. 367–381.

Aizawa, S. I. (2001): Bacterial flagella and type III secretion systems. In: *FEMS microbiology letters* 202 (2), S. 157–164.

Allaoui, A.; Menard, R.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. (1993a): Characterization of the Shigella flexneri ipgD and ipgF genes, which are located in the proximal part of the mxi locus. In: *Infect Immun* 61 (5), S. 1707–1714.

Allaoui, A.; Mounier, J.; Prevost, M. C.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. (1992a): icsB. a Shigella flexneri virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread. In: *Mol Microbiol* 6 (12), S. 1605–1616.

Allaoui, A.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. (1992b): MxiJ, a lipoprotein involved in secretion of Shigella Ipa invasins, is homologous to YscJ, a secretion factor of the Yersinia Yop proteins. In: *J Bacteriol* 174 (23), S. 7661–7669.

Allaoui, A.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. (1993b): MxiD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the Shigella flexneri lpa invasins. In: *Mol Microbiol* 7 (1), S. 59–68.

Andrews, G. P.; Hromockyj, A. E.; Coker, C.; Maurelli, A. T. (1991): Two novel virulence loci, mxiA and mxiB, in Shigella flexneri 2a facilitate excretion of invasion plasmid antigens. In: *Infect Immun* 59 (6), S. 1997–2005.

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. In: *Infect Immun* 60 (8), S. 3287–3295.

Bahrani, F. K.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. (1997): Secretion of Ipa proteins by Shigella flexneri. inducer molecules and kinetics of activation. In: *Infect Immun* 65 (10), S. 4005–4010.

Barth, H. G.; Boyes, B. E.; Jackson, C. (1994): Size exclusion chromatography. In: *Analytical chemistry* 66 (12), S. 595R–620.

Bergfors, Terese (2003): Seeds to crystals. In: *Journal of structural biology* 142 (1), S. 66–76.

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 intercellular spread through interaction with F-actin. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (10), S. 3867–3871.

Bieger, B.; Essen, L. O. (2001a): Crystal structure of the catalytic core component of the alkylhydroperoxide reductase AhpF from Escherichia coli. In: *Journal of molecular biology* 307 (1), S. 1–8. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4441.

Bieger, B.; Essen, L. O. (2001b): Structural analysis of adenylate cyclases from Trypanosoma brucei in their monomeric state. In: *The EMBO journal* 20 (3), S. 433–445. DOI: 10.1093/emboj/20.3.433.

Bieger, Boris; Essen, Lars-Oliver; Oesterhelt, Dieter (2003): Crystal structure of halophilic dodecin: a novel, dodecameric flavin binding protein from Halobacterium salinarum. In: *Structure (London, England : 1993)* 11 (4), S. 375–385.

Binet R1; Létoffé S; Ghigo JM; Delepelaire P; Wandersman C (1997): Protein secretion by gram-negative bacterial ABC exporters. In: *Folia Microbiol (Praha)* 42 (3), S. 179–183.

Birket, S. E.; Harrington, A. T.; Espina, M.; Smith, N. D.; Terry, C. M.; Darboe, N. et al. (2007): Preparation and characterization of translocator/chaperone complexes and their component proteins from Shigella flexneri. In: *Biochemistry* 27 (46), S. 8128–8137.

Black, R. A.; Kronheim, S. R.; Cantrell, M.; Deeley, M. C.; March, C. J.; Prickett, K. S. et al. (1988): Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (19), S. 9437–9442.

Blocker, A.; Gounon, P.; Larquet, E.; Niebuhr, K.; Cabiaux, V.; Parsot, C.; Sansonetti, P. (1999): The tripartite type III secreton of Shigella flexneri inserts IpaB and IpaC into host membranes. In: *J Cell Biol* 147 (3), S. 683–693.

Boggon, T. J.; Shapiro, L. (2000): Screening for phasing atoms in protein crystallography. In: *Structure (London, England : 1993)* 8 (7), S. R143-9.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical biochemistry* 72, S. 248–254.

Brown, J. E.; Rothman, S. W.; Doctor, B. P. (1980): Inhibition of protein synthesis in intact HeLa cells by Shigella dysenteriae 1 toxin. In: *Infect Immun* 29 (1), S. 98–107.

Buchrieser, C.; Glaser, P.; Rusniok, C.; Nedjari, H.; d'Hauteville, H.; Kunst, F. et al. (2000): The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of Shigella flexneri. In: *Mol Microbiol* 38 (4), S. 760–771.

Büttner, Daniela; Bonas, Ulla (2002): Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. In: *The EMBO journal* 21 (20), S. 5313–5322.

Carolin Berger (2005): Molekulare Charakterisierung des Typ III-Sekretionssystems von Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. Dissertation. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät.

Carter, C. W. (1979): Protein crystallization using incomplete factorial experiments. In: *The Journal of biological chemistry* 254 (23), S. 12219–12223.

Cha, Sun-Shin; An, Young Jun; Jeong, Chang-Sook; Kim, Min-Kyu; Lee, Sung-Gyu; Lee, Kwang-Hoon; Oh, Byung-Ha (2012): Experimental phasing using zinc anomalous scattering. In: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 68 (Pt 9), S. 1253–1258. DOI: 10.1107/S0907444912024420.

Clerc, P.; Sansonetti, P. J. (1987): Entry of Shigella flexneri into HeLa cells. evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization and myosin accumulation. In: *Infect Immun* 55 (11), S. 2681–2688.

Cordes, F. S.; Komoriya, K.; Larquet, E.; Yang, S.; Egelman, E. H.; Blocker, A.; Lea, S. M. (2003): Helical structure of the needle of the type III secretion system of Shigella flexneri. In: *J Biol Chem* 278 (19), S. 17103–17107.

Cornelis, G. R.; van Gijsegem, F. (2000): Assembly and function of type III secretory systems. In: *Annual review of microbiology* 54, S. 735–774. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.735.

Costa, Sonia C. P.; Schmitz, Alexa M.; Jahufar, Fathima F.; Boyd, Justin D.; Cho, Min Y.; Glicksman, Marcie A.; Lesser, Cammie F. (2012): A new means to identify type 3 secreted effectors: functionally interchangeable class IB chaperones recognize a conserved sequence. In: *mBio* 3 (1). DOI: 10.1128/mBio.00243-11.

Cudney, R.; Patel, S.; Weisgraber, K.; Newhouse, Y.; McPherson, A. (1994): Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. In: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 50 (Pt 4), S. 414–423. DOI: 10.1107/S0907444994002660.

D'Arcy, A. (1994): Crystallizing proteins - a rational approach? In: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 50 (Pt 4), S. 469–471. DOI: 10.1107/S0907444993014362.

Davis, Ben J.; Erlanson, Daniel A. (2013): Learning from our mistakes: the 'unknown knowns' in fragment screening. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 23 (10), S. 2844–2852. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.03.028.

Day, W. A., Jr.; Maurelli, A. T. (2001): Shigella flexneri LuxS quorum-sensing system modulates virB expression but is not essential for virulence. In: *Infect Immun* 69 (1), S. 15–23.

Driessen, A. J.; Fekkes, P.; van der Wolk, J P (1998): The Sec system. In: *Current opinion in microbiology* 1 (2), S. 216–222.

DuPont, H. L.; Levine, M. M.; Hornick, R. B.; Formal, S. B. (1989): Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. In: *J Infect Dis* 159 (6), S. 1126–1128.

Ericsson, U. B.; Hallberg, B. M.; Detitta, G. T.; Dekker, N.; Nordlund, P. (2006): Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. In: *Anal Biochem* 357 (2), S. 289–298.

Espina, M.; Olive, A. J.; Kenjale, R.; Moore, D. S.; Ausar, S. F.; Kaminski, R. W. et al. (2006): IpaD localizes to the tip of the type III secretion system needle of Shigella flexneri. In: *Infect Immun* 74 (8), S. 4391–4400.

Garman, Elspeth; Murray, James W. (2003): Heavy-atom derivatization. In: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 59 (Pt 11), S. 1903–1913.

Geyter, C. de; 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 epithelial cells and characterization of its interaction with lipid membranes. In: *FEBS letters* 400 (2), S. 149–154.

Geyter, C. de; Wattiez, R.; Sansonetti, 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. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 267 (18), S. 5769–5776.

Goldberg, M. B.; Barzu, O.; Parsot, C.; Sansonetti, P. J. (1993): Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a Shigella flexneri protein involved in intracellular movement. In: *Infect Agents Dis* 2 (4), S. 210–211.

Goren, A.; Freier, S.; Passwell, J. H. (1992): Lethal toxic encephalopathy due to childhood shigellosis in a developed country. In: *Pediatrics* 89 (6 Pt 2), S. 1189–1193.

Greener, A.; Callahan, M.; Jerpseth, B. (1997): An efficient random mutagenesis technique using an E. coli mutator strain. In: *Mol Biotechnol* 7 (2), S. 189–195.

Grimm, Clemens (2001): Röntgenkristallographische Studien an Nukleotidkofaktorbindenden Enzymen. In: *Disseration*.

Haglund, Cat M.; Welch, Matthew D. (2011): Pathogens and polymers: microbe-host interactions illuminate the cytoskeleton. In: *The Journal of cell biology* 195 (1), S. 7–17. DOI: 10.1083/jcb.201103148.

Harjes, Stefan; Scheidig, Axel; Bayer, Peter (2004): Expression, purification and crystallization of human 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate synthetase 1. In: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 60 (Pt 2), S. 350–352. DOI: 10.1107/S0907444903027628.

Hasewinkel, C. (2006): Klonierung und Expression der Shigella-Pathogenitätsgene ipgE, ipgB2, ospD1 und ipaA mit Vinculin oder spa15. Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg, Marburg. Fachbereich Pharmazie.

Hasewinkel, C. (2012a): Klonierung und Expression von Shigella-Pathogenitätsgenen sowie Interaktionsstudien mit ihren Produkten. Dissertation. Philipps-Universität Marburg, Marburg. Fachbereich Pharmazie.

Hasewinkel, C. (2012b): Klonierung und Expression von Shigella-Pathogenitätsgenen sowie Interaktionsstudien mit ihren Produkten. Dissertation. Philipps-Universität Marburg, Marburg. Fachbereich Pharmazie.

Hayward, R. D.; Cain, R. J.; McGhie, E. J.; Phillips, N.; Garner, M. J.; Koronakis, V. (2005): Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. In: *Mol Microbiol* 56 (3), S. 590–603.

He, S. Y. (1998): Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. In: *Annual review of phytopathology* 36, S. 363–392. DOI: 10.1146/annurev.phyto.36.1.363.

Hefti, F. (1982): High-performance size-exclusion chromatography: a buffer for the reliable determination of molecular weights of proteins. In: *Analytical biochemistry* 121 (2), S. 378–381.

Henderson, I. R.; Navarro-Garcia, F.; Nataro, J. P. (1998): The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. In: *Trends in microbiology* 6 (9), S. 370–378.

Hendrickson, W. A.; Ogata, C. M. (1997): Phase Determination from Multiwavelength Anomalous Diffraction Measurements. In: *Methods Enzymol.* (276), S. 494–523.

High, N.; Mounier, J.; Prevost, M. C.; Sansonetti, P. J. (1992): IpaB of Shigella flexneri causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. In: *Embo J* 11 (5), S. 1991–1999.

Hodgkinson, J. L.; Horsley, A.; Stabat, D.; Simon, M.; Johnson, S.; da Fonseca, P. C. et al. (2009): Three-dimensional reconstruction of the Shigella T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. In: *Nat Struct Mol Biol.* 16 (5), S. 477–485.

Hong, Paula; Koza, Stephan; Bouvier, Edouard S. P. (2012): Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. In: *Journal of liquid chromatography & related technologies* 35 (20), S. 2923–2950. DOI: 10.1080/10826076.2012.743724.

Hromockyj, A. E.; Maurelli, A. T. (1989): Identification of Shigella invasion genes by isolation of temperature-regulated inv. :lacZ operon fusions. In: *Infect Immun* 57 (10), S. 2963–2970.

Hromockyj, A. E.; Tucker, S. C.; Maurelli, A. T. (1992): Temperature regulation of Shigella virulence. identification of the repressor gene virR, an analogue of hns, and partial complementation by tyrosyl transfer RNA (tRNA1(Tyr)). In: *Mol Microbiol* 6 (15), S. 2113–2124.

Hueck, C. J. (1998): Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 62 (2), S. 379–433.

Jancarik, J.; Scott, W. G.; Milligan, D. L.; Koshland, D. E.; Kim, S. H. (1991): Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the ligand-binding domain of the bacterial chemotaxis-mediating aspartate receptor of Salmonella typhimurium. In: *Journal of molecular biology* 221 (1), S. 31–34.

Jung, H. C.; Eckmann, L.; Yang, S. K.; Panja, A.; Fierer, J.; Morzycka-Wroblewska, E.; Kagnoff, M. F. (1995): A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. In: *J Clin Invest* 95 (1), S. 55–65.

Jüngel, J. (2010): Rekombinante Produktion, Aufreinigung undKristallisationsversuche mit Shigella PathogenitätsfaktorenSpa15 und OspD1. Masterarbeit. Philipps-Universität Marburg, Marburg. Institut für pharmazeutische Chemie.

Kadurugamuwa, J. L.; Rohde, M.; Wehland, J.; Timmis, K. N. (1991): Intercellular spread of Shigella flexneri through a monolayer mediated by membranous protrusions and associated with reorganization of the cytoskeletal protein vinculin. In: *Infect Immun* 59 (10), S. 3463–3471.

Kayser, F. et al.H. (1998): Medizinische Mikrobiolgie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Khan, M. U.; Roy, N. C.; Islam, R.; Huq, I.; Stoll, B. (1985): Fourteen years of shigellosis in Dhaka. an epidemiological analysis. In: *Int J Epidemiol* 14 (4), S. 607–613.

Kiefersauer, R.; Than, M. E.; Dobbek, H. (2000): A novel free-mounting system for protein crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes. In: *J. Appl. Crystallogr.* 33, S. 1223–1230.

Kosarewicz, A.; Königsmaier, L.; Marlovits, T. C. (2012): The blueprint of the type-3 injectisome. In: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367 (1592), S. 1140–1154.

Koster, F.; Levin, J.; Walker, L.; Tung, K. S.; Gilman, R. H.; Rahaman, M. M. et al. (1978): Hemolytic-uremic syndrome after shigellosis. Relation to endotoxemia and circulating immune complexes. In: *N Engl J Med* 298 (17), S. 927–933.

Köster, Helene; Craan, Tobias; Brass, Sascha; Herhaus, Christian; Zentgraf, Matthias; Neumann, Lars et al. (2011): A small nonrule of 3 compatible fragment library provides high hit rate of endothiapepsin crystal structures with various fragment chemotypes. In: *Journal of medicinal chemistry* 54 (22), S. 7784–7796. DOI: 10.1021/jm200642w.

Kostura, M. J.; Tocci, M. J.; Limjuco, G.; Chin, J.; Cameron, P.; Hillman, A. G. et al. (1989): Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (14), S. 5227–5231.

Kreppel, L. K.; Blomberg, M. A.; Hart, G. W. (1997): Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (14), S. 9308–9315.

Krug, Michael; Weiss, Manfred S.; Heinemann, Udo; Mueller, Uwe (2012): XDSAPP. A graphical user interface for the convenient processing of diffraction data using XDS. In: *J Appl Crystallogr* 45 (3), S. 568–572. DOI: 10.1107/S0021889812011715.

Kuhnert, Maren; Köster, Helene; Bartholomäus, Ruben; Park, Ah Young; Shahim, Amir; Heine, Andreas et al. (2015): Tracing binding modes in hit-to-lead optimization: chameleon-like poses of aspartic protease inhibitors. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 54 (9), S. 2849–2853. DOI: 10.1002/anie.201411206.

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. In: *J Bacteriol* 88 (5), S. 1503–1518.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.

Le Gall, T.; Mavris, M.; Martino, M. C.; Bernardini, M. L.; Denamur, E.; Parsot, C. (2005): Analysis of virulence plasmid gene expression defines three classes of effectors in the type III secretion system of Shigella flexneri. In: *Microbiology* 151 (Pt 3), S. 951–962.

Leahy, D. J.; Hendrickson, W. A.; Aukhil, I.; Erickson, H. P. (1992): Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. In: *Science (New York, N.Y.)* 258 (5084), S. 987–991.

Lee, Cheng-Chung; Maestre-Reyna, Manuel; Hsu, Kai-Cheng; Wang, Hao-Ching; Liu, Chia-I; Jeng, Wen-Yih et al. (2014): Crowning proteins: modulating the protein surface properties using crown ethers. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 53 (48), S. 13054–13058. DOI: 10.1002/anie.201405664.

Leslie A.G.W. (1992): Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data.

Lo, Mei-Chu; Aulabaugh, Ann; Jin, Guixian; Cowling, Rebecca; Bard, Jonathan; Malamas, Michael; Ellestad, George (2004): Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. In: *Analytical biochemistry* 332 (1), S. 153–159. DOI: 10.1016/j.ab.2004.04.031.

Lunelli, M.; Lokareddy, R. K.; Zychlinsky, A.; Kolbe, M. (2009): IpaB-IpgC interaction defines binding motif for type III secretion translocator. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (24), S. 9661–9666.

Macnab, R. M. (1999): The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. In: *Journal of bacteriology* 181 (23), S. 7149–7153.

Madigan, Michael; Martinko, John; Stahl, David (2013): Brock Mikrobiologie. 13. Aufl.: Pearson Studium.

Matthews BW (1968): Solvent content of protein crystals. In: *J Mol Biol* (33), S. 491–497.

Maurelli, A. T.; Blackmon, B.; Curtiss, R., 3rd (1984): Temperature-dependent expression of virulence genes in Shigella species. In: *Infect Immun* 43 (1), S. 195–201.

Mavris, M.; Page, A. L.; Tournebize, R.; Demers, B.; Sansonetti, P.; Parsot, C. (2002): Regulation of transcription by the activity of the Shigella flexneri type III secretion apparatus. In: *Mol Microbiol* 43 (6), S. 1543–1553.

McPherson, A. (1982): Preparation and Analysis of Protein Crystals. New York: John Wiley & Sons Inc.

Menard, R.; Prevost, M. C.; Gounon, P.; Sansonetti, P.; Dehio, C. (1996): The secreted Ipa complex of Shigella flexneri promotes entry into mammalian cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (3), S. 1254–1258.

Menard, R.; Sansonetti, P.; Parsot, C. (1994a): The secretion of the Shigella flexneri Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. In: *Embo J* 13 (22), S. 5293–5302.

Menard, R.; Sansonetti, P.; Parsot, C.; Vasselon, T. (1994b): Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of S. flexneri. In: *Cell* 79 (3), S. 515–525.

Menard, 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. In: *J Bacteriol* 175 (18), S. 5899–5906.

Meyer, Arne; Dierks, Karsten; Hussein, Rana; Brillet, Karl; Brognaro, Hevila; Betzel, Christian (2015): Systematic analysis of protein-detergent complexes applying dynamic light scattering to optimize solutions for crystallization trials. In: *Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications* 71 (Pt 1), S. 75–81. DOI: 10.1107/S2053230X14027149.

Mhalu, F. S.; Moshi, W. K.; Mbaga, I. (1984): A bacillary dysentery epidemic in Dar es Salaam, Tanzania. In: *J Diarrhoeal Dis Res* 2 (4), S. 217–222.

Michiels, T.; Wattiau, P.; Brasseur, R.; Ruysschaert, J. M.; Cornelis, G. (1990): Secretion of Yop proteins by Yersiniae. In: *Infection and immunity* 58 (9), S. 2840–2849.

Middlebrook, J. L.; Dorland, R. B. (1984): Bacterial toxins. cellular mechanisms of action. In: *Microbiol Rev* 48 (3), S. 199–221.

Miller, J. H. (1992): A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria. In: *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.*

Mounier, J.; Vasselon, T.; Hellio, R.; Lesourd, M.; Sansonetti, P. J. (1992): Shigella flexneri enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole. In: *Infect Immun* 60 (1), S. 237–248.

Murphy, E. R.; Payne, S. M. (2007): RyhB, an iron-responsive small RNA molecule, regulates Shigella dysenteriae virulence. In: *Infect Immun* 75 (7), S. 3470–3477.

Nallamsetty, Sreedevi; Waugh, David S. (2007): Mutations that alter the equilibrium between open and closed conformations of Escherichia coli maltose-binding protein impede its ability to enhance the solubility of passenger proteins. In: *Biochemical and biophysical research communications* 364 (3), S. 639–644. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.10.060.

Neutra, M. R.; Frey, A.; Kraehenbuhl, J. P. (1996): Epithelial M cells. gateways for mucosal infection and immunization. In: *Cell* 86 (3), S. 345–348.

Niesen, Frank H.; Berglund, Helena; Vedadi, Masoud (2007): The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. In: *Nature protocols* 2 (9), S. 2212–2221. DOI: 10.1038/nprot.2007.321.

Nunn, D. (1999): Bacterial type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies? In: *Trends in cell biology* 9 (10), S. 402–408.

Nutten, S.; Sansonetti, P.; Huet, G.; Bourdon-Bisiaux, C.; Meresse, B.; Colombel, J. F.; Desreumaux, P. (2002): Epithelial inflammation response induced by Shigella flexneri depends on mucin gene expression. In: *Microbes Infect* 4 (11), S. 1121–1124.

Otwinowski, Zbyszek; Minor, Wladek (1997): [20] Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In: Macromolecular Crystallography Part A, Bd. 276: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 307–326.

Page, A. L.; Sansonetti, P.; Parsot, C. (2002): Spa15 of Shigella flexneri, a third type of chaperone in the type III secretion pathway. In: *Mol Microbiol* 43 (6), S. 1533–1542.

Pantoliano, M. W.; Petrella, E. C.; Kwasnoski, J. D.; Lobanov, V. S.; Myslik, J.; Graf, E. et al. (2001): High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. In: *J Biomol Screen* 6 (6), S. 429–440.

Parsot, C.; Ageron, E.; Penno, C.; Mavris, M.; Jamoussi, K.; d'Hauteville, H. et al. (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. In: *Mol Microbiol* 56 (6), S. 1627–1635.

Parsot, Claude; Hamiaux, Cyril; Page, Anne-Laure (2003): The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. In: *Current opinion in microbiology* 6 (1), S. 7–14.

Perdomo, O. 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. In: *J Exp Med* 180 (4), S. 1307–1319.

Perkel, J. M. (2012): A Better Disulfide Reducing AgentProtein Biochemistry: Dithiobutylamine is a fast reducing agent for breaking cysteine-cysteine sulfur linkages. In: *Chemical & Engineering News*, S. ISSN 0009–2347.

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. In: *Infect Immun* 73 (3), S. 1432–1440.

Pilonieta, M. Carolina; Munson, George P. (2008): The chaperone IpgC copurifies with the virulence regulator MxiE. In: *Journal of bacteriology* 190 (6), S. 2249–2251. DOI: 10.1128/JB.01824-07.

Prevost, M. C.; Lesourd, M.; Arpin, M.; Vernel, F.; Mounier, J.; Hellio, R.;

Sansonetti, P. J. (1992): Unipolar reorganization of F-actin layer at bacterial division and bundling of actin filaments by plastin correlate with movement of Shigella flexneri within HeLa cells. In: *Infect Immun* 60 (10), S. 4088–4099.

Prosseda, G.; Falconi, M.; Giangrossi, M.; Gualerzi, C. O.; Micheli, G.; Colonna, B. (2004): The virF promoter in Shigella. more than just a curved DNA stretch. In: *Mol Microbiol* 51 (2), S. 523–537.

Pupo, A. S.; Jurkiewicz, N. H.; Jurkiewicz, A. (1997a): Functional change of the balance between alpha 1A and alpha 1B adrenoceptor populations after transplantation of the vas deferens to the intestine. In: *Ann N Y Acad Sci* 812, S. 193–195.

Pupo, G. M.; Karaolis, D. K.; Lan, R.; Reeves, P. R. (1997b): Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic Escherichia coli strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. In: *Infect Immun* 65 (7), S. 2685–2692.

Raghupathy, P.; Date, A.; Shastry, J. C.; Sudarsanam, A.; Jadhav, M. (1978): Haemolytic-uraemic syndrome complicating shigella dystentery in south Indian children. In: *Br Med J* 1 (6126), S. 1518–1521.

Rehm, H.; Letzel, T. (2009): Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Rhodes, G. (2006): Crystallography Made Crystal Clear, 3rd EditionA Guide for Users of Macromolecular Models. 3rd Ed.: Academic Press.

Robert, M. C.; Provost, K.; Lefaucheux, F. (1992): Crystallization of Nucleic Acids and Protein. A Practical Approach. In: *Oxford Univ Press*, S. 127–143.

Sambrook, J.; Fritschi, E. F.; Maniatis T (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandkvist, M. (2001a): Biology of type II secretion. In: *Molecular microbiology* 40 (2), S. 271–283.

Sandkvist, M. (2001b): Type II secretion and pathogenesis. In: *Infection and immunity* 69 (6), S. 3523–3535. DOI: 10.1128/IAI.69.6.3523-3535.2001.

Sansonetti, P. J.; Arondel, J.; Cantey, J. R.; Prevost, M. C.; Huerre, M. (1996):

Infection of rabbit Peyer's patches by Shigella flexneri. effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. In: *Infect Immun* 64 (7), S. 2752–2764.

Sansonetti, P. J.; Arondel, J.; Cavaillon, J. M.; Huerre, M. (1995): Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis. In: *J Clin Invest* 96 (2), S. 884–892.

Sansonetti, P. J.; Kopecko, D. J.; Formal, S. B. (1982): Involvement of a plasmid in the invasive ability of Shigella flexneri. In: *Infect Immun* 35 (3), S. 852–860.

Sansonetti, P. J.; Phalipon, A. (1999): M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens. mechanisms of interaction, consequences for the disease process. In: *Semin Immunol* 11 (3), S. 193–203.

Sasakawa, C.; Komatsu, K.; Tobe, T.; Suzuki, T.; Yoshikawa, M. (1993): Eight genes in region 5 that form an operon are essential for invasion of epithelial cells by Shigella flexneri 2a. In: *Journal of bacteriology* 175 (8), S. 2334–2346.

Sauer, O.; Schmidt, A.; Kratky, C. (1997): Freeze-Trapping Isomorphous Xenon Derivatives of Protein Crystals. In: *J. Appl. Crystallogr.* (30), S. 476–486.

Schroeder, G. N.; Hilbi, H. (2008): Molecular pathogenesis of Shigella spp. controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. In: *Clin Microbiol Rev* 21 (1), S. 134–156.

Skoudy, A.; Mounier, J.; Aruffo, A.; Ohayon, H.; Gounon, P.; Sansonetti, P.; van Tran Nhieu, G. (2000): CD44 binds to the Shigella IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. In: *Cell Microbiol* 2 (1), S. 19–33.

Skoudy, A.; Nhieu, G. T.; Mantis, N.; Arpin, M.; Mounier, J.; Gounon, P.; Sansonetti, P. (1999): A functional role for ezrin during Shigella flexneri entry into epithelial cells. In: *J Cell Sci* 112 (Pt 13), S. 2059–2068.

Smith, J. L.; Thompson, A. (1998): Reactivity of selenomethionine--dents in the magic bullet? In: *Structure (London, England : 1993)* 6 (7), S. 815–819.

Studier, F. W.; Moffatt, B. A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to

direct selective high-level expression of cloned genes. In: *J Mol Biol* 189 (1), S. 113–130.

Sun, Peter D.; Radaev, Sergei; Kattah, Michael (2002): Generating isomorphous heavy-atom derivatives by a quick-soak method. Part I: test cases. In: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 58 (Pt 7), S. 1092–1098.

Tamano, K.; Aizawa, S.; Katayama, E.; Nonaka, T.; Imajoh-Ohmi, S.; Kuwae, A. et al. (2000): Supramolecular structure of the Shigella type III secretion machinery. the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. In: *Embo J* 19 (15), S. 3876–3887.

Thanassi, D. G.; Hultgren, S. J. (2000): Assembly of complex organelles: pilus biogenesis in gram-negative bacteria as a model system. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 20 (1), S. 111–126. DOI: 10.1006/meth.1999.0910.

Thanassi DG.; Saulino ET.; Hultgren SJ (1998): The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. In: *Curr Opin Microbiol.* 2, S. 223–231.

Tobe, T.; Nagai, S.; Okada, N.; Adler, B.; Yoshikawa, M.; Sasakawa, C. (1991): Temperature-regulated expression of invasion genes in Shigella flexneri is controlled through the transcriptional activation of the virB gene on the large plasmid. In: *Mol Microbiol* 5 (4), S. 887–893.

Toyotome, T.; Suzuki, T.; Kuwae, A.; Nonaka, T.; Fukuda, H.; Imajoh-Ohmi, S. et al. (2001): Shigella protein IpaH(9.8) is secreted from bacteria within mammalian cells and transported to the nucleus. In: *J Biol Chem* 276 (34), S. 32071–32079.

van Eerde, André; Hamiaux, Cyril; Pérez, Javier; Parsot, Claude; Dijkstra, Bauke W. (2004): Structure of Spa15, a type III secretion chaperone from Shigella flexneri with broad specificity. In: *EMBO reports* 5 (5), S. 477–483. DOI: 10.1038/sj.embor.7400144.

Vasselon, T.; Mounier, J.; Prevost, M. C.; Hellio, R.; Sansonetti, P. J. (1991): Stress fiber-based movement of Shigella flexneri within cells. In: *Infect Immun* 59 (5), S. 1723–1732.

Venkatesan, M. M.; Alexander, W. A.; Fernandez-Prada, C. (1996): A Shigella flexneri invasion plasmid gene, ipgH, with homology to IS629 and sequences encoding bacterial sugar phosphate transport proteins. In: *Gene* 175 (1-2), S. 23–27.

Watanabe, H.; Arakawa, E.; Ito, K.; Kato, J.; Nakamura, A. (1990): Genetic analysis of an invasion region by use of a Tn3-lac transposon and identification of a second positive regulator gene, invE, for cell invasion of Shigella sonnei. significant homology of invE with ParB of plasmid P1. In: *J Bacteriol* 172 (2), S. 619–629.

Weiner, M. P., Anderson, C., Jerpseth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B. et al. (1994): Studier pET system vectors and hosts. In: *Strategies 7*, S. 41–43.

Wienken, Christoph J.; Baaske, P.; Rothbauer, U.; Braun, D. & Duhr, S. (2010): Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. In: *Nature Communications 1*.

Wilkinson, D. L.; Harrison, R. G. (1991): Predicting the solubility of recombinant proteins in Escherichia coli. In: *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 9 (5), S. 443–448.

Winn, Martyn D.; Ballard, Charles C.; Cowtan, Kevin D.; Dodson, Eleanor J.; Emsley, Paul; Evans, Phil R. et al. (2011): Overview of the CCP4 suite and current developments. In: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 67 (Pt 4), S. 235–242. DOI: 10.1107/S0907444910045749.

Wood, W. B. (1966): Host specificity of DNA produced by Escherichia coli: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. In: *J Mol Biol.* 1 (16), S. 118–133.

Young, Briana M.; Young, Glenn M. (2002): YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of Yersinia enterocolitica. In: *Journal of bacteriology* 184 (5), S. 1324–1334.

Zipper, H.; Brunner, H.; Bernhagen, J.; Vitzthum, F. (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. In: *Nucleic Acids Res* 32 (12), S. e103.

Zychlinsky, A.; Kenny, B.; Menard, R.; Prevost, M. C.; Holland, I. B.; Sansonetti, P. J. (1994): IpaB mediates macrophage apoptosis induced by Shigella flexneri. In: *Mol Microbiol* 11 (4), S. 619–627.

Zychlinsky, A.; Prevost, M. C.; Sansonetti, P. J. (1992): Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages. In: *Nature* 358 (6382), S. 167–169.

Erklärung

Hiermit versichere ich, Jessica Jüngel, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe bisher an keiner anderen Universität die Anfertigung einer Dissertation versucht.

Marburg/Lahn, November 2016 _____

Einverständniserklärung

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die vorliegende Arbeit

„Rekombinante Produktion, Aufreinigung und Kristallisation der *Shigella*-Pathogenitätsfaktoren Spa15, IpgC und OspD1“

in Bibliotheken allgemein zugänglich gemacht wird. Dazu gehört, dass sie

- von der Bibliothek der Einrichtung, in der ich meine Arbeit angefertigt habe, zur Benutzung in ihren Räumen bereitgehalten wird;

- in konventionellen und maschinenlesbaren Katalogen, Verzeichnissen und Datenbanken verzeichnet wird;

- der UB für die lokale Nutzung und für Fernleihzwecke zur Verfügung steht;

- im Rahmen der urheberrechtlichen Bestimmungen für Kopierzwecke genutzt werden kann.

Marburg, den ……..

(Unterschrift der Autorin)	(Unterschrift des betreuenden Hochschullehrers)