

**Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zum
Typ IV Sekretion-ähnlichen System (T4SLS) des konjugativen
Antibiotikaresistenzplasmids pIP501 in *Enterococcus faecalis***

Vorgelegt von
Mohammad Yaser Abajy

Von der Fakultät III Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rotard

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Szewzyk

2. Gutachter: PD Dr. Elisabeth Grohmann

3. Gutachter: Prof. Dr. Walter Keller (Karl-Franzens-Universität, Graz, Österreich)

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 16. 07. 2007

Berlin 2007

D-83

„Zu Ihrer Arbeit gratuliere ich Ihnen herzlich. Endlich beginnt sich das Dunkel über der Gram+ Konjugation zu lichten. Mit Hilfe einer modernen und eleganten Technologie ist es Ihnen gelungen, ein plausibles Modell zu entwickeln. Besonders spannend finde ich als alter ehemaliger Zellwandmikrobiologe Ihre Beobachtung, dass in der Tat das ORF7 Produkt offensichtlich Peptidoglykan spalten kann. Endlich ein biochemischer Ansatzpunkt des Puzzles und ich bin gespannt auf den Fortgang Ihrer Arbeiten.“

Michael Teuber

Professor emeritus für Lebensmittelmikrobiologie der ETH Zürich

17.01. 2007

Veröffentlichungen der Dissertation

Publikationen:

Abajy, M. Y., Kopeć, J., Schiwon, K., Burzynski, M., Döring, M., Bohn, C. and Grohmann, E. (2007). A type IV-secretion-like system is required for conjugative DNA transport of broad-host-range plasmid pIP501 in Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 189: 2487-2496.

Kurenbach, B., Kopeć, J., Mägdefrau, M., Andreas, K., Keller, W., Bohn, C., **Abajy, M. Y.** and Grohmann, E. (2006). The TraA relaxase autoregulates the putative type IV secretion-like system encoded by the broad-host-range *Streptococcus agalactiae* plasmid pIP501. *Microbiol.* 152:637-645.

Fortina, M. G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P. L., Arends, K., Schiwon, K., **Abajy, M. Y.** and Grohmann, E. A survey on biotechnological potential and safety on the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. italicus* (submitted).

Poster:

Abajy, M. Y., Salih, R., Saleh, M., Schiwon, K., Hanssen, A.-M., Keller, W. and Grohmann, E. The conjugative plasmid pIP501 from *Streptococcus agalactiae* encodes two putative ATPases, ORF5 and ORF10 with similarities to type IV secretion system components. 4th Conference on Functional Genomics of Gram-Positive Microorganisms, in Tirrenia, Pisa, Italy, 24.-28.6.2007.

Arends, K., Söllü, C., Çelik, E.-K., Kopeć, J., Schiwon, K., **Abajy, M. Y.** and Grohmann, E. ORF7-a specialized lytic transglycosylase (SLT) from gram-positive bacteria, encoded by the type IV secretion like system from the broad-host-range plasmid pIP501. International Symposium on Plasmid Biology at Fallen Leaf Lake, South Lake Tahoe, California, USA, 23.-27.9. 2006.

Abajy, M. Y., Burzynski, M., Chmielinska, K., Arends, K. and Grohmann, E. Protein-protein interaction map of the type IV secretion-like system encoded by the broad-host-range enterococcal plasmid pIP501. Gemeinsamer Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Universität Göttingen, 25.-28.9.2005.

Abajy, M. Y., Burzynski, M., Chmielinska, K., Arends, K. and Grohmann, E. Protein-protein interaction map of the type IV secretion-like system encoded by the broad-host-range enterococcal plasmid pIP501. 2nd ASM-FEMS Conference on Enterococci, in Helsingor, Denmark, 28.-31.8.2005.

Abajy, M. Y., Kopeć, J., Kurenbach, B., Rolle, F. and Grohmann, E. A new type IV secretion-like system encoded by the broad-host-range streptococcal plasmid pIP501. 13th International Conference of Women Engineers and Scientists, Seoul, Korea, 26.-29.8.2005.

Abajy, M. Y., Kurenbach, B., Kopeć, J. and Grohmann, E. A new type IV secretion-like system encoded by the broad-host-range plasmid pIP501. Plasmid Biology 2004 Symposium, Kanoni, Corfu, Greece, 15.-21.9.2004. Abstract published in *Plasmid* 53:32 (2005).

Abajy, M. Y. and Grohmann, E. Analysis of the first putative type IV secretion system from Gram-positive bacteria by protein-protein interaction studies. VAAM 2004, Technische Universität Braunschweig, 28.-31.3.2004.

DANKSAGUNG

Frau PD Dr. Elisabeth Grohmann, ihr gilt mein ganz besonderer Dank für die Bereitstellung des Themas, ihre hervorragende theoretische und praktische Betreuung, ihre großzügige Hilfsbereitschaft bei allen Problemen und ihre Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Dem Leiter des Fachgebiets Umweltmikrobiologie der Technischen Universität Berlin, an dem diese Arbeit durchgeführt wurde, Herrn Prof. Dr. Ulrich Szewzyk, danke ich herzlich für die Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Walter Keller vom Institut für Chemie/Strukturbiologie an der Karl-Franzens-Universität Graz und seinem Arbeitsteam besonders Frau Dr. Jolanta Kopeć, möchte ich mich für die Proteinreinigungen herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Erich Wanker vom Max-Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin (MDC) in Berlin, danke ich sehr für die *Yeast Two-Hybrid* Plasmide und für die Durchführung des automatisierten Tests mit den humanen Proteinen.

Sehr dankbar bin ich ebenfalls der Universität Aleppo und dem syrischen Hochschulministerium für die Finanzierung meines Aufenthalts in Deutschland während der Doktorarbeit.

Danken möchte ich auch Frau Dipl.-Ing. Christine Bohn, Herrn Dipl.-Ing. Michal Burzynski, Frau Dipl.-Biochem. Katarzyna Schiwon, Herrn Dipl.-Chem. Karsten Arends, Herrn Dipl.-Biochem. Ertuğrul-Kaan Çelik, Herrn Dipl.-Biochem. Cem Şöllü, Herrn Dipl.-Ing. Raschid Salih und Herrn Dipl.-Biochem. Malek Saleh für die Klonierungen bzw. Reinigungen einiger Tra-Proteine.

Ein ausgesprochen herzliches Dankeschön geht an meine Frau Ream für ihr Verständnis für die vielen Arbeitsstunden im Labor und ihre aufmunternden Worte. Auch meinen Sohn Nabil möchte ich nicht vergessen. Leider kann er noch nicht verstehen, warum man den ganzen Tag im Labor verbringen muss, um eine Doktorarbeit zu schreiben. Vielen Dank.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für die moralische Unterstützung und die guten Gebete ganz herzlich bedanken.

ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren hat die Resistenz von Bakterien gegenüber Antibiotika so massiv zugenommen, dass die Bakterien immer resistenter und lebensgefährlicher geworden sind. Der konjugative Plasmidtransfer stellt einen der wichtigsten Mechanismen für die Ausbreitung der Antibiotikaresistenzen in den Bakterien dar. Während die Konjugation in Gram-negativen (G-) Bakterien sehr intensiv untersucht worden ist, weiss man sehr wenig über die Mechanismen des konjugativen Plasmidtransfers in Gram-positiven (G+) Bakterien.

Die Konjugation in G+ Bakterien wurde in dieser Arbeit am Beispiel des Multiresistenzplasmids pIP501 aus *Streptococcus agalactiae* untersucht. Am Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass pIP501 für drei Proteine kodiert (ORF5, ORF7 und ORF10), die sehr große Ähnlichkeit mit Typ IV Sekretionskomponenten aus dem G- Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* zeigen. In dieser Arbeit wurden die Protein-Protein Wechselwirkungen der pIP501-Transferproteine (ORF1-ORF15) *in vivo* und *in vitro* untersucht. Für die *in vivo* Studien wurden die 15 Gene der pIP501-Transferregion in die *Yeast Two-Hybrid* Plasmide pBTM117c und pGAD426 kloniert und in *Saccharomyces cerevisiae* L40ccU Hefezellen transformiert. Die Protein-Protein Wechselwirkungen wurden mit dem *Yeast Two-Hybrid* System untersucht. Die *Yeast Two-Hybrid* Studie ergab 18 Protein-Protein Wechselwirkungen. Die Intensitäten der *in vivo* Interaktionen wurden mit einem quantitativen β -Galaktosidase Assay gemessen. Für die *in vitro* Protein-Protein Wechselwirkungsstudien wurden die 15 *tra*-Gene in die Expressionsplasmide pQTEV, pGEX-6P-2 oder pMAL-c2x kloniert. Die für die *in vitro* Studie benötigten Tra-Proteine wurden als His-, GST- oder MBP-Fusionsproteine in *E. coli* Zellen exprimiert und solubilisiert. Protein-Protein Bindungsstudien zwischen den solubilisierten Proteinen wurden durchgeführt und die entsprechenden Proteinkomplexe wurden mittels Affinitätschromatographie isoliert und immunologisch mit Western Blot nachgewiesen. Anhand der *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse und der Computervorhersagen für die Lokalisierung der Tra-Proteine wurde eine Protein-Protein Interaktionskarte für die pIP501 Transferproteine erstellt.

Für die Proteine ORF5 und ORF10 wurden ATP-Bindung-/Hydrolyse Studien durchgeführt. ORF5 und ORF10 konnten ATP *in vitro* binden und hydrolysieren. Mittels einer modifizierten Zymogramm Methode wurde lytische Transglykosylase Aktivität für ORF7 und die ORF7 Domänen SLT und CHAP nachgewiesen.

Zusätzlich zum Hauptthema „Konjugativer Transfer in G+ Bakterien“ wurden Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen ausgewählten Virulenzproteinen des pathogenen Bakteriums *Enterococcus faecalis* V583 und humanen Proteinen mittels eines automatisierten *Yeast-Two-Hybrid* Systems untersucht. Es konnten keine Interaktionen zwischen den Virulenzproteinen und den humanen Proteinen festgestellt werden.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Acc. No.	Accession Number
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
BD	Bindungsdomäne
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Cam	Chloramphenicol
CAN1	<i>S. cerevisiae</i> CAN1 Gen
CP	<i>Coupling protein</i>
CPRG	Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
CYH2 ^R	Resistenz gegen Cycloheximid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ddNTP(s)	Didesoxyribonukleosidtriphosphat(e)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
dsDNA	doppelsträngige DNA
Dtr	<i>DNA transfer and replication</i>
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
fw	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung
Gal	Galaktose
GST	Glutathion S-Transferase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
hfr	<i>high frequency of recombination</i>
His	Histidin
<i>HIS3</i>	Reportergen für Histidin Synthese
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
Inc	Inkompatibilitätsgruppe
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IS	Insertionssequenz
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton

<i>LacZ</i>	Reportergen für β -Galaktosidase
LB	<i>Luria Bertani broth</i>
Leu	Leucin
LM	<i>low-melting</i>
M	Molar
MBP	Maltosebindeprotein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MLS ^R	Resistenz gegen Antibiotika der Makrolid-Linkosamid-Strepto gramin B-Gruppe
Mpf	<i>mating pair formation</i>
MRSA	<u>M</u> ethicillin <u>r</u> esistenter <i>S</i> taphylococcus <i>a</i> ureus
<i>nick</i>	Schnittstelle innerhalb des <i>oriT</i>
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
<i>orf</i>	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
<i>orf7ΔTMH</i>	<i>orf7</i> ohne putative Transmembranhelix
<i>oriT</i>	Transferursprung (<i>origin of transfer</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PG	Peptidoglykan
Raff	Raffinose
rev	<i>reverse</i>
Rif	Rifampicin
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLT	spezialisierte lytische Transglykosylase
ssDNA	einzelsträngige DNA
T4SLS	Typ IV Sekretion-ähnliches System
T4SS	Typ IV Sekretionssystem
TAE	TRIS / Acetat / EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	TRIS <i>buffered saline</i>
T-DNA	Transfer-DNA
TE	TRIS / EDTA
TELT	TRIS / EDTA / LiCl / Triton X-100-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TMH	Transmembranhelix
<i>tra</i>	Transfer
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan

Tryp	Tryptophan
U	<i>Unit</i>
UV	ultraviolettes Licht
<i>vir</i>	<i>Virulence</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
Y-2H	<i>Yeast Two-Hybrid</i>

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1.1** Angriffspunkte verschiedener Antibiotika bei G+ und G– Bakterien
- Abb. 1.2** Bakterielle Zellwand in G+/ G– Bakterien
- Abb. 1.3** Struktur des Peptidoglycans bei *E. faecalis*
- Abb. 1.4** Vereinfachter Mechanismus des konjugativen DNA-Transfers bei F- und hfr-Plasmiden
- Abb. 1.5** Genorganisation des T4SSs bei verschiedenen Mikroorganismen
- Abb. 1.6** Funktionen des Typ IV Sekretionssystems
- Abb. 1.7** Modell des T4SS aus *A. tumefaciens*
- Abb. 1.8** DNA-Transfer von *A. tumefaciens* in Pflanzenzellen
- Abb. 1.9** Vergleich der *tra*-Regionen der Plasmide pIP501, pRE25, pGO1, pSK41 und pMRC01
- Abb. 1.10** Schematische Darstellung von pIP501
- Abb. 2.1** Das Quantifizierungsprogramm *EasyWin 32*
- Abb. 2.2** Prinzip der Sequenzier-PCR
- Abb. 2.3** Prinzip des *Yeast Two-Hybrid* Assays
- Abb. 2.4** Entstehung der blauen Farbe bei der Spaltung von X-Gal
- Abb. 2.5** Kolonie-Lift Filter Assay
- Abb. 2.6** Entstehung der roten Farbe bei der Spaltung von CPRG
- Abb. 2.7** Prinzip des *cross-linking* Assays
- Abb. 3.1** Amplifizierung der DNA-Fragmente über PCR
- Abb. 3.2** Identifizierung rekombinanter Plasmide anhand der Größen der TELT Plasmid-DNA
- Abb. 3.3** Verifizierung rekombinanter Plasmide mittels Restriktion
- Abb. 3.4** Identifizierung rekombinanter Plasmide mittels Sequenzier-PCR
- Abb. 3.5** Erzeugte Expressionsplasmide für die *tra*-Gene des Plasmids pIP501
- Abb. 3.6** Expression und Reinigung des MBP-ORF4-Fusionsproteins
- Abb. 3.7** Expression und Reinigung des MBP-ORF5-Fusionsproteins
- Abb. 3.8** Expression und Reinigung des 7xHis-ORF7-Fusionsproteins
- Abb. 3.9** Expression und Reinigung des MBP-ORF7 Δ TMH-Fusionsproteins
- Abb. 3.10** Expression und Reinigung von 7xHis-ORF8
- Abb. 3.11** Expression und Reinigung des MBP-ORF10-Fusionsproteins
- Abb. 3.12** Expression und Reinigung des 7xHis-ORF12-Fusionsproteins
- Abb. 3.13** Expression und Reinigung des GST-ORF14-Fusionsproteins
- Abb. 3.14** Reinigung der 7xHis-ORF5 und 7xHis-ORF10 Fusionsproteine
- Abb. 3.15** An der Rekrutierung der Tra-Proteine zum Proteinkomplex beteiligte Wechselwirkungen
- Abb. 3.16** Wechselwirkungen zwischen den Komponenten des Kerntransferkomplexes
- Abb. 3.17** Wechselwirkungen des Kopplungsproteins ORF10 mit der Relaxase ORF1
- Abb. 3.18** Wechselwirkungen der putativen ATPase ORF5
- Abb. 3.19** *In vitro* Interaktion von ORF7 mit sich selbst

- Abb. 3.20** Glutaraldehyd *cross-linking* des MBP-ORF7 Δ TMH-Fusionsproteins
- Abb. 3.21** Glutaraldehyd *cross-linking* des 7xHis-ORF10-Fusionsproteins
- Abb. 3.22** Glutaraldehyd *cross-linking* des GST-ORF14-Fusionsproteins
- Abb. 3.23** Nachweis der ATP-Bindung über Fluoreszenzmessung der TNP-ATP-Proteinkomplexe
- Abb. 4.1** Prinzip und Nachteile der Koimmunopräzipitation
- Abb. 4.2** Prinzip des Polymerase III-basierten *Yeast Two-Hybrid* Systems
- Abb. 4.3** Arbeitsmodell für den konjugativen Transfer von pIP501 in *E. faecalis*
- Abb. 4.4** Analyse der Proteinsequenzen der Tra-Proteine ORF8, ORF9 und ORF15 mit der SignalP 3.0 Software
- Abb. 4.5** Schematische Darstellung der ORF7-Domänenstruktur
- Abb. 4.6** Messung der Radioaktivität im löslichen Peptidoglykan Spaltprodukt mit dem Flüssigszintillationszähler
- Abb. 4.7** Modifizierte Zymogramm-Methode zum Nachweis der LT-Aktivität von ORF7 und seinen Domänen
- Abb. 4.8** Topologie des Proteins VirB4 und seine Interaktionen mit den anderen Komponenten des T4SS
- Abb. 5.1** Darstellung der T-DNA-Transferoute durch den VirB/D4-Komplex in *A. tumefaciens*

TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1.1** Vergleich zwischen G+ und G- Pili
- Tab. 1.2** Ausgewählte Vir-Proteine des *E. faecalis* V583 Stammes
- Tab. 2.1** Verwendete Bakterien und Hefe Stämme
- Tab. 2.2** Verwendete Plasmide
- Tab. 2.3** Verwendete Oligonukleotide
- Tab. 2.4** Die Pipettierschemen und die verwendeten Programme für die einzelnen *tra-vir*-Fragmente
- Tab. 2.5** Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele
- Tab. 3.1** Darstellung der Größen der *tra*- und *vir*-Gene
- Tab. 3.2** Mittels Y-2H detektierte Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen den pIP501-Tra Proteinen
- Tab. 3.3** Ergebnisse des quantitativen β -Galaktosidase Assays
- Tab. 3.4** Darstellung der *in vitro* durchgeführten Protein-Protein Wechselwirkungen
- Tab. 4.1** Ergebnisse der Vorhersagen für die pIP501 Tra-Proteine mit verschiedenen Computerprogrammen
- Tab. 4.2** Topologische Vorhersagen der Tra-Proteine

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Problem der Antibiotikaresistenzen	1
1.2 Der Gentransfer	3
1.3 Bakterielle Zellwand	6
1.4 Mechanismen der Konjugation in Gram-negativen Bakterien.....	7
1.4.1 Donor-Rezipient Kontakt	8
1.4.2 DNA Prozessierung.....	8
1.4.3 Das mpf-System (<i>mating-pair formation</i>)	10
1.5 Das Typ IV Sekretionssystem (T4SS)	10
1.5.1 Definition und Funktionen	10
1.5.2 Das <i>virB/virD</i> T4SS von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
1.6 Mechanismen der Konjugation in Gram-positiven Bakterien.....	16
1.6.1 Pili in Gram-positiven Bakterien	16
1.6.2 Die konjugativen Sex-Pheromonplasmide in <i>Enterococcus faecalis</i>	18
1.6.3 Pheromon-unabhängige konjugative Plasmide	19
1.6.4 Konjugativer Transfer von Plasmiden mit breitem Wirtsbereich	19
1.7 <i>E. faecalis</i> als Modell zur Untersuchung der Konjugation in G+ Bakterien.....	20
1.7.1 Der Stamm <i>E. faecalis</i> V583 und seine Virulenzproteine	21
1.8 pIP501 als Modellplasmid zur Untersuchung der Konjugation in Gram-positiven Bakterien.....	22
1.9 Zielsetzung	25
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 Material	26
2.1.1 Chemikalien	26
2.1.2 <i>Kits</i> und Hilfsmittel	27
2.1.3 Enzyme.....	28
2.1.4 Antikörper und Standards	28
2.1.5 Geräte	29
2.1.6 Mikroorganismen	29
2.1.7 Plasmide	30
2.1.8 Nährmedien	31
2.1.9 Synthetische Oligonukleotide	33

2.1.10 PCR-Programme	35
2.1.11 Puffer und Lösungen	37
2.1.11.1 Allgemeine Lösungen.....	37
2.1.11.2 Puffer und Lösungen für das <i>Yeast Two-Hybrid</i> System	38
2.1.11.3 Puffer und Lösungen für Proteinanalysen	39
2.1.11.4 Puffer für die Solubilisierung von Proteinen unter nativen Bedingungen	40
2.1.11.5 Puffer für die Reinigung der His-Tag-Fusionsproteine über Ni ²⁺ -NTA	40
2.1.11.6 Puffer für die Reinigung der MBP-Fusionsproteine mittels <i>Amylose magnetic beads</i>	41
2.1.11.8 Puffer und Lösungen für immunologische Reaktionen.....	42
2.1.11.9 Puffer für die ATP-Bindung.....	43
2.2 Methoden.....	44
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	44
2.2.1.1 Plasmid-DNA Transformation in <i>E. coli</i> mit Hitzeschock.....	44
2.2.1.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus-RIL Zellen.....	44
2.2.1.3 Transformation der Hefezellen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L40ccU.....	45
2.2.1.4 Anzucht von <i>E. coli</i> in Flüssigmedium	45
2.2.1.5 Kultivierung für die Stammsammlung.....	46
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	46
2.2.2.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	46
2.2.2.2 Agarosegelelektrophorese	47
2.2.2.3 DNA-Reinigung mittels <i>Low-melting</i> Agarosegelen (LM).....	47
2.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA	48
2.2.2.5 Herstellung von Zelllysaten als Matrize für die PCR.....	48
2.2.2.6 Konzentrierung der DNA durch Ethanol-Fällung.....	49
2.2.2.7 Konzentrierung der DNA mit Hilfe der Speed vac	49
2.2.2.8 Amplifizierung der <i>tra</i> - und <i>vir</i> -Gene mittels Polymerasekettenreaktion.....	49
2.2.2.9 Klonierung der DNA-Fragmente in die Plasmide pBTM117c, pGAD426, pQTEV und pGEX-6P-2	50
2.2.2.10 Klonierung der <i>tra</i> -Gene in das Plasmid pMAL-c2x.....	51
2.2.2.11 Identifizierung der rekombinanten Plasmide	51
2.2.2.12 Das Hefe Zwei-Hybrid System (<i>Yeast Two-Hybrid</i> System).....	54
2.2.2.13 Qualitativer X-Gal Test (Kolonie-Lift Filter Assay).....	55
2.2.2.14 Qualitativer X-Gal Test (flüssiges SD-Medium)	56

2.2.2.15 Quantitativer β -Galaktosidase Assay	56
2.2.2.16 Das automatisierte <i>Yeast-Two-Hybrid</i> System.....	57
2.2.3 Biochemische Methoden	58
2.2.3.1 Ermittlung optimaler Proteinexpressionsbedingungen	58
2.2.3.2 Denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	59
2.2.3.3 Überexpression der Tra-Fusionsproteine	60
2.2.3.4 Solubilisierung der Tra-Fusionsproteine unter nativen Bedingungen.....	60
2.2.3.5 Expression und Reinigung der 6xHis-ORF1- und 6xHis-ORF1N ₂₄₆	60
2.2.3.6 Expression und Reinigung von 7xHis-ORF7 unter nativen Bedingungen.....	61
2.2.3.7 Expression und Reinigung der 7xHis-ORF5- und 7xHis-ORF10-Fusionsproteine unter denaturierenden Bedingungen mit anschließender Renaturierung	61
2.2.3.8 Pufferwechsel der Proteinlösungen über Dialyse.....	62
2.2.3.9 <i>In vitro</i> Protein-Protein Interaktionsstudien (<i>pull-down assay</i>)	63
2.2.3.10 Reinigung der MBP-Fusionsproteine und der Proteinkomplexe mit Hilfe der <i>Amylose Magnetic Beads</i>	63
2.2.3.11 Reinigung der GST-Fusionsproteine mit dem <i>Kit Bulk GST Purification Modul</i>	63
2.2.3.12 Reinigung der 6x/7xHis-Fusionsproteine und der Proteinkomplexe über Ni ²⁺ - NTA <i>spin columns</i>	64
2.2.3.13 Aufkonzentrieren der Elutionsfraktion.....	64
2.2.3.14 Proteinfällung	64
2.2.3.15 Quantifizierung von Proteinen	64
2.2.3.16 Western Blot.....	65
2.2.3.17 Ermittlung des oligomeren Zustandes eines Proteins mittels <i>cross-linking</i>	65
2.2.3.18 Nukleotid-Bindungs Assay.....	66
3. ERGEBNISSE	68
3.1 Klonierung der DNA-Fragmente in die Plasmide pBTM117c, pGAD426, pQTEV, pGEX-6P-2 und pMAL-c2x	68
3.1.1 PCR-Amplifizierung der <i>tra</i> - und <i>vir</i> -Gene.....	68
3.1.2 Identifizierung rekombinanter Plasmide	70
3.1.2.1 Mittels Plasmidisolierung und Restriktion	70
3.1.2.2 Mittels Sequenzier-PCR	72
3.1.2.3 Mittels zyklischer Sequenzierung	72
3.2 <i>In vivo</i> detektierte Protein-Protein Wechselwirkungen.....	75

3.2.1 Qualitative Studie (X-Gal Test)	75
3.2.2 Quantitative Studie (β -Galaktosidase Assay).....	76
3.2.3 Ergebnisse des automatisierten <i>Yeast-Two-Hybrid</i> Systems	77
3.3 Expression, Solubilisierung und Reinigung der Tra-Proteine.....	77
3.3.1 Expression, Solubilisierung und Reinigung von MBP-ORF4	77
3.3.2 Expression, Solubilisierung und Reinigung von MBP-ORF5	78
3.3.3 Expression, Solubilisierung und Reinigung von 7xHis-ORF7	79
3.3.4 Expression, Solubilisierung und Reinigung von MBP-ORF7 Δ TMH.....	80
3.3.5 Expression, Solubilisierung und Reinigung von 7xHis-ORF8	81
3.3.6 Expression, Solubilisierung und Reinigung von MBP-ORF10	82
3.3.7 Expression, Solubilisierung und Reinigung von 7xHis-ORF12	83
3.3.8 Expression, Solubilisierung und Reinigung von GST-ORF14	84
3.3.9 Expression und Reinigung der 7xHis-ORF5 und 7xHis-ORF10.....	85
3.4 <i>Pull-down</i> Studien zur Verifizierung der <i>in vivo</i> identifizierten Protein-Protein Wechselwirkungen	86
3.4.1 Wechselwirkungen, die an der Rekrutierung der Tra-Proteine zum T4SLS- Komplex beteiligt sind.....	87
3.4.2 Wechselwirkungen der Komponenten des Transferkomplexes	88
3.4.3 Wechselwirkungen des putativen Kopplungsproteins ORF10	89
3.4.4 Wechselwirkungen der putativen ATPase ORF5	89
3.4.5 Die lytische Transglykosylase ORF7 bildet Oligomere.....	91
3.5 Ergebnisse der <i>cross-linking</i> -Studien.....	92
3.5.1 Der oligomere Zustand von ORF7	92
3.5.2 Der oligomere Zustand von ORF10.....	92
3.5.3 Der oligomere Zustand von ORF14	93
3.6 ATP-Bindungs-Assay mit 7xHis-ORF5 und 7xHis-ORF10.....	94
4. DISKUSSION	96
4.1 <i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> Protein-Protein Wechselwirkungsstudien: Vorteile und Nachteile	96
4.2 Das <i>coupling</i> Protein ORF10 zeigt Autoaktivierung der Y-2H Reportergene.....	97
4.3 Die Virulenzgene des <i>E. faecalis</i> V583 Stammes.....	99
4.4 Solubilisierung der Tra-Fusionsproteine	100
4.5 Protein-Protein Interaktionskarte für die pIP501 Transferproteine.....	101
4.6 Funktionelle Charakterisierung einzelner Komponenten des T4SLS	107
4.6.1 Das Protein ORF7 ist eine lytische Transglykosylase	107

4.6.2 ORF5 zeigt <i>in vitro</i> ATPase Aktivität.....	109
4.6.3 ORF10 ist ein Kopplungsprotein mit <i>in vitro</i> ATPase Aktivität.....	110
5. AUSBLICK	111
5.1 Bestimmung der Lokalisierung der Tra-Proteine in der Zellwand	111
5.2 <i>In vivo</i> Bestimmung der DNA-Transferoute mittels TrIP Assays	111
5.3 <i>In vitro</i> Untersuchung der ssDNA-Protein Wechselwirkungen	112
5.4 Verifizierung der Protein-Protein Interaktionen mit biophysikalischen Methoden	113
5.5 Kristallisationsversuche einiger T4SLS-Proteine	113
5.6 T4SLS-Proteine als mögliche Ziele für neuartige antibakterielle Stoffe	113
6. LITERATUR	115
7. ANHANG	125
A. Komplette Nukleotidsequenz des Plasmids pBTM117c	125
B. Komplette Nukleotidsequenz des Plasmids pGAD426	127
C. DNA- und Proteinstandards.....	130

1. EINLEITUNG

1.1 Das Problem der Antibiotikaresistenzen

Die Entdeckung des Penicillins durch Sir Alexander Fleming 1928 war von großer Bedeutung für die Medizin und hat vor allem in den 40er Jahren zu einer rasanten Entwicklung neuer Antibiotika beigetragen (Amyes, 2000). Hierzu zählen Streptomycin (1944), Chloramphenicol (1947), Chlortetracyclin (1948) und Erythromycin (1952). Aber der Einsatz der Antibiotika zur Bekämpfung bakterieller Infektionen hat, außer zu seinem Ziel, auch zur Entstehung neuer Antibiotikaresistenter Bakterien geführt. Bereits kurz nach der Entdeckung des Penicillins tauchten erste resistente Bakterien auf. Aber in den letzten Jahren hat die Resistenz von Bakterien gegenüber Antibiotika so stark zugenommen, dass die Bakterien, die sich jahrelang mit Antibiotika gut besiegen ließen, immer resistenter und lebensgefährlicher werden. Die Entstehung neuer resistenter Krankheitserreger ist unter anderem auf Gentransfer zwischen Bakterien zurückzuführen. Viele der von Bakterien entwickelten Resistenzstrategien können durch Genaustausch von Bakterium zu Bakterium weitergegeben werden. Krankenhäuser und Seniorenheime stellen eine ideale Umgebung für den genetischen Austausch zwischen Bakterien dar. Hier kommen besonders viele unterschiedliche Bakterienstämme miteinander in Kontakt. Die durch Antibiose entstehenden Multiresistenten Bakterien können dann über Patienten, Pflegepersonal und Besucher in der Umgebung weiter verbreitet werden. Zu den häufigsten multiresistenten Krankheitserregern zählen das G-Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* und G+ Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium* und das Methicillin-resistente Bakterium *Staphylococcus aureus* (MRSA). Besonders gefährlich sind Vancomycin-resistente Enterokokken-Stämme (VRE), gegen die kein kommerziell erhältliches Antibiotikum mehr helfen kann (Witte und Klare, 1999).

Viele Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen, weil sie den Selektionsdruck auf die Bakterien erheblich erhöhen, u.a. der unnötige Einsatz von Antibiotika zur Prophylaxe bei bakteriellen oder sogar viralen Infektionen, der vorzeitige Abbruch der Behandlung, die rezeptfreie Abgabe von Antibiotika in einigen Ländern und der intensive Antibiotikaeinsatz in der Landwirtschaft zur Behandlung von Tieren, die für den menschlichen Verzehr bestimmt sind.

Um die Antibiotika-Resistenzen zu bekämpfen und bakterielle Infektionen weiterhin therapieren und heilen zu können, muss der falsche Umgang mit Antibiotika beendet werden.

Es muss auch mehr in die Erforschung und Entwicklung neuer Antibiotika investiert werden. Neben der Erforschung neuer antibiotischer Substanzen, muss man verstehen, wie die Antibiotika auf die bakteriellen Zellen wirken und welche Strategien die Bakterien entwickelt haben, um sich gegen die Antibiotika zu wehren. Anhand ihrer zellulären Angriffspunkte (Abb.1.1) können die Antibiotika in drei Gruppen eingeteilt werden (Hof, 2002):

- I. Antibiotika, die die Zellwandsynthese verhindern, somit verliert die bakterielle Zelle ihre Stabilität. Zu dieser Gruppe zählen Glykopeptide (Vancomycin) und β -Lactam-Antibiotika (Penicilline und Cephalosporine).
- II. Antibiotika, die die Proteinsynthese hemmen und damit zu Wachstumshemmung der Bakterien führen wie Aminoglykoside, Tetracycline und Chloramphenicol.
- III. Antibiotika, die die DNA-Synthese und Replikation unterdrücken, wie Sulfonamide, und Fluorochinolone.

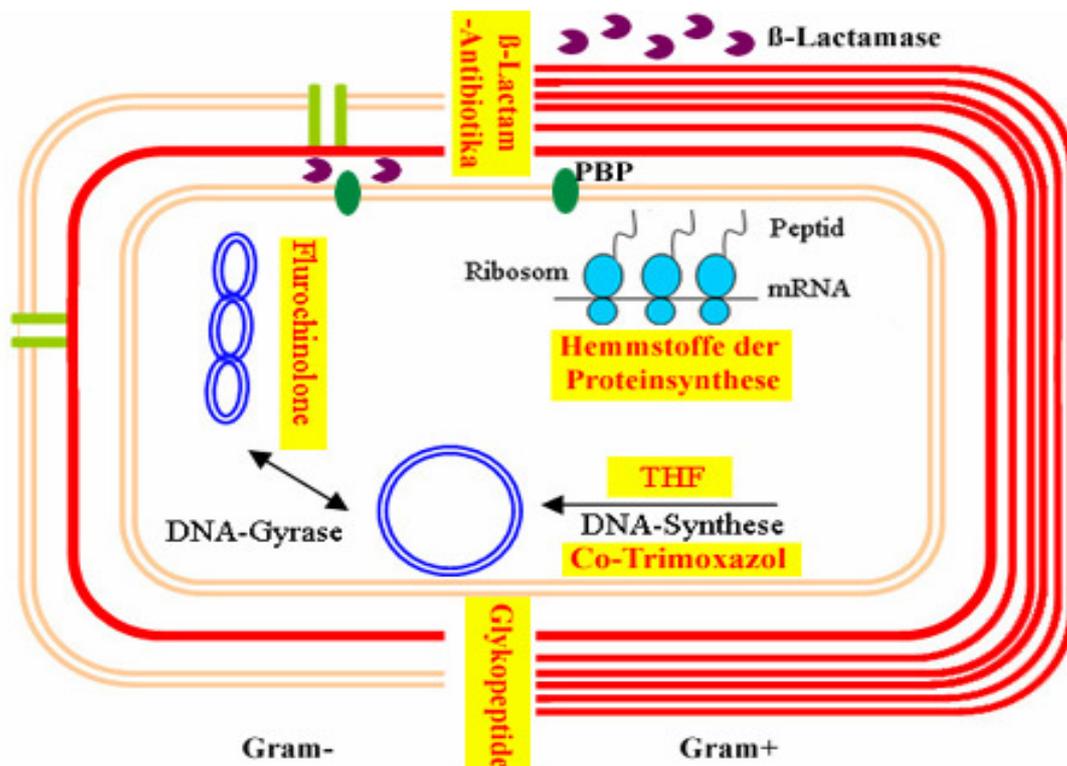


Abb. 1.1: Angriffspunkte verschiedener Antibiotika bei G+ und G- Bakterien (modifiziert nach Hof, 2002). G+ Bakterien besitzen ein dickes Mureingerüst außerhalb der Zytoplasmamembran, sie können große Mengen an β -Lactamasen ins Medium abgeben. G- Erreger haben nur ein dünnes Mureingerüst, das aber von einer zusätzlichen äußeren Membran umgeben ist; dies stellt für die meisten Antibiotika ein Diffusionshindernis dar. Während β -Lactam-Antibiotika und Glykopeptide außerhalb der eigentlichen Zellmembran, im periplasmatischen Raum wirken, müssen Co-Trimoxazol, Fluorochinolone und Proteinsynthese-Hemmstoffe ausreichend hohe intrazelluläre Konzentration erreichen. PBP = Penicillinbindende Proteine, THF = Tetrahydrofolsäure.

Die Bakterien verfügen über verschiedene Mechanismen, um sich gegen die Antibiotika zu schützen (Davies *et al.*, 1994):

- I. Synthese von Enzymen, die Antibiotika inaktivieren oder abbauen können, Beispiel: β -Lactamasen können den β -Lactamring des Penicillins aufspalten. Andere Antibiotika können durch Phosphorylierung bzw. Acetylierung inaktiviert werden.
- II. Modifizierung der Zellmembran, so dass die Aufnahme von Antibiotika verhindert oder reduziert wird, Beispiel: Mycobakterien haben einen hohen Gehalt an Mycolsäuren in der LPS-Schicht der Außenmembran, dadurch wird die Passage der Penicilline verhindert.
- III. Aktiver Transport des Antibiotikums aus der Zelle heraus, dadurch wird die Konzentration des Antibiotikums unter den therapeutischen Bereich gesenkt, Beispiel: G+ Bakterien können Aminoglykoside aus der Zelle mittels Plasmamembran-Translokasen pumpen.
- IV. Änderung der Affinität des Antibiotikums für das Substrat. Bakterien können modifizierte Enzyme bilden, die stoffwechselaktiv aber nicht mehr von dem Antibiotikum angreifbar sind, Beispiel: Einige G+ Bakterien können sich gegen Antibiotika der MLS (Makrolid-Linkosamid-Streptogramin B)-Gruppe durch die Synthese einer spezifischen Methylase schützen. Diese Methylase kann die Adeninreste der 23S rRNA spezifisch dimethylieren. Somit können Ribosomen nicht mehr von den Antibiotika angegriffen werden.

Es ist unklar, woher die Antibiotikaresistenzgene ursprünglich stammen. Der Zeitraum vom Entdecken der Antibiotika bis zum Auftreten der ersten antibiotikaresistenten Bakteriengenerationen ist so kurz, dass die Entwicklung von Resistenzfaktoren durch spontane Mutationen und Selektion eher unwahrscheinlich ist. Eins steht aber fest: Alle Resistenzmechanismen, die in pathogenen Bakterien heute bekannt sind, wurden in den Produzenten der Antibiotika (wie Pilze und Actinomyceten) bereits nachgewiesen und können über horizontalen Gentransfer übertragen werden (Grohmann *et al.*, 2003).

1.2 Der Gentransfer

In der Gentechnik wird die Übertragung genetischer Informationen von einem Spender- auf einen Empfängerorganismus als Gentransfer bezeichnet. Dabei sind der horizontale und der vertikale Gentransfer zu unterscheiden. Der horizontale Gentransfer (HGT) ist die Weitergabe bzw. Aufnahme genetischen Materials zwischen verschiedenen vegetativen Zellen unabhängig von den Speziesgrenzen. Während beim vertikalen Gentransfer (VGT) die Weitergabe von Erbmaterial auf die Nachkommen der gleichen Art beschränkt ist.

Der HGT kann über verschiedene Mechanismen erfolgen, u.a. Transformation, Transduktion, Transposition und Konjugation.

I. Transformation

Die Transformation ist die Aufnahme genetischen Materials in Form von freier DNA (aus der Umgebung) und in vielen Fällen deren anschließende Integration ins bakterielle Chromosom. Manche Bakterien sind natürlicherweise transformierbar (kompetent), u.a. *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae* und *Neisseria gonorrhoeae*. Bei diesen Bakterien sind die Zellen unter bestimmten (physiologischen) Bedingungen oder in bestimmten Wachstumsphasen kompetent. Die Kompetenz wird durch bestimmte Gene (*com*-Gene) kontrolliert, und befähigt. Viele Bakterienarten (darunter die meisten G-) können unter normalen Kultivierungsbedingungen keine DNA aufnehmen, Sie müssen artifiziell kompetent gemacht werden (durch Ca^{2+} -Behandlung oder Elektroschock) (z.B. Chen und Dubnau, 2004).

II. Transduktion

Als Transduktion bezeichnet man die Übertragung von DNA-Fragmenten zwischen zwei Bakterien, die durch eine Infektion mit Bakteriophagen vermittelt wird. Die DNA Fragmente können in das Empfänger-genom eingebaut und danach mit dem eigentlichen Genom repliziert und an die Nachkommen weitergegeben werden. Man unterscheidet zwischen genereller und spezieller Transduktion. Bei der generellen Transduktion können beliebige bakterielle Gene transferiert werden. Im Gegensatz dazu werden bei der speziellen Transduktion nur Gene übertragen, die sich in der Nähe der Prophagenintegrationsstelle befinden (Davison, 1999). Bakteriophagen spielen eine sehr wichtige Rolle für die Evolution von pathogenen Bakterien durch die Übertragung von Virulenzfaktoren oder Toxin-kodierende Gene. Bakteriophage β z.B. kodiert für das Diphtherie Toxin (ursprünglich aus dem G+ Bakterium *Corynebacterium diphtheria*).

III. Transposition

Transposition ist der Transfer eines DNA-Fragments von einer Stelle zu einer anderen Stelle auf dem gleichen Genom oder auf dem Genom einer anderen Bakterienzelle. Diese mobilen DNA-Elemente nennt man Transposons. Sie können sogar auf extrachromosomale Plasmide übertragen werden („springende Gene“). Durch die Transposition können Bakterien neue genetische Informationen wie Antibiotikaresistenzen und Virulenzgene gewinnen. Transposition kann durch replikative oder nichtreplikative Mechanismen stattfinden. Bei den

nichtreplikativen Transposons werden beide Stränge des Transposons an beiden Enden gespalten, somit wird das Element befreit und kann zu einer anderen Stelle im Genom wandern, im ursprünglichen Locus kann dann eine andere Sequenz integriert werden (Hallet and Sherratt, 1997). Im Gegensatz dazu werden die replikativen Transposons nur am 3'-Ende geschnitten, repliziert und dann in eine zweite Stelle integriert, somit entstehen zwei Kopien des gleichen Elements (Stellwagen and Craig, 1998).

IV. Konjugation

Bei der Konjugation handelt es sich um den Transfer eines ringförmigen extrachromosomalen DNA-Moleküls (Plasmid) von einer Donorzelle in eine Rezipientenzelle über direkten Zell-Zell Kontakt. Dieses Phänomen wurde erstmals von Lederberg und Tatum (1946) bei *E. coli* nachgewiesen. Der übertragbare DNA-Faktor wurde als F-Faktor (*fertility*) bezeichnet und später als zytoplasmatische Satelliten-DNA (heute: Plasmid) charakterisiert (Marmur *et al.*, 1963). Zellen mit F-Faktor werden als F⁺, Zellen ohne den Faktor als F⁻ gekennzeichnet. Der für den Gentransfer erforderliche Kontakt wird über den so genannten Sex-Pilus hergestellt, die Gene, die für den Aufbau des Pilus verantwortlich sind, werden vom F-Plasmid kodiert. In den späten 50er und frühen 60er Jahren wurden in Japan neue Resistenz-Transferfaktoren entdeckt und später als R-Plasmide benannt. Diese Plasmide spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung der Antibiotikaresistenzen, weil sie bis zu acht verschiedene Antibiotikaresistenzgene kodieren und konjugativ übertragen werden können (Davison, 1999). Die große Zahl der R-Plasmide erfordert eine einheitliche Taxonomie. Die Plasmide wurden in verschiedene Inkompatibilitätsgruppen (Inc) eingeteilt. Plasmide aus derselben Inc-Gruppe haben ähnliche Replikationsmechanismen, Kopiezahlkontrollen oder die gleichen Partitionsmechanismen und können innerhalb einer Wirtszelle nicht koexistieren. Zu den Inkompatibilitätsgruppen der konjugativen Plasmide aus G- Bakterien zählen IncF (F, R1, R100), IncH (R27), IncI (ColIb, R144, R64), IncN (pKM101), IncP (RP4, R751) und IncW(R388) (Übersichtsartikel Zechner *et al.*, 2000; Grohmann *et al.*, 2003). Die Gruppe der konjugativen Plasmide aus G+ Bakterien stellen u.a. pAMβ1, pIP501 (das Modellplasmid dieser Arbeit), und pRE25 dar, die der Inkompatibilitätsgruppe 18 angehören (Grohmann *et al.*, 2003). Aufgrund der unterschiedlichen Zellwandstrukturen von G+ und G- Bakterien ist es wahrscheinlich, dass sich die Transfer-Systeme voneinander unterscheiden.

1.3 Bakterielle Zellwand

Die bakterielle Zellwand ist die Hülle, die das Zytoplasma von der Umgebung trennt. Die Zellwände von G⁺ und G⁻ Bakterien unterscheiden sich erheblich voneinander (Abb. 1.2). G⁺ Bakterien haben eine dicke, weitgehend homogene Zellwand, die aus einem hochgradig vernetzten Mischpolymer, das Murein heißt, besteht. Murein besteht aus Kohlenhydraten und Peptiden, nämlich N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, die β -1,4-glycosidisch miteinander verbunden sind und lange unverzweigte Polymere bilden. Diese Polymere sind über kurze Peptid-Seitenketten quervernetzt.

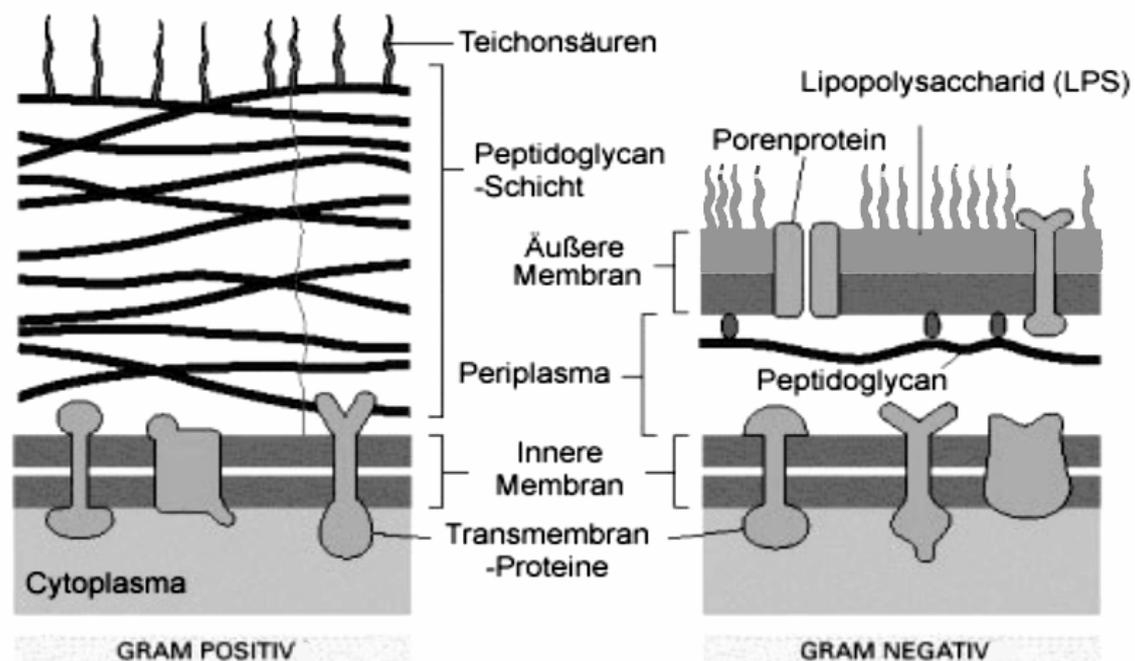


Abb. 1.2: Bakterielle Zellwand in G⁺/ G⁻ Bakterien.
(www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mboc4.figgrp.4620).

Der Aufbau der Seitenketten unterscheidet sich je nach Bakterienstamm (Schleifer and Kandler, 1972). Bei den meisten G⁺ Bakterien besteht die Peptid-Seitenkette aus L-Alanin, D-Alanin, D-Glutaminsäure und Lysin. Die Aminogruppe des Lysins geht mit der Carboxylgruppe des terminalen D-Alanins einer benachbarten Seitenkette eine Peptidbindung ein und vernetzt somit die Polysaccharidketten (Abb. 1.3). Die Mureinschicht liegt unmittelbar der Zytoplasmamembran auf und bildet einen riesigen Mureinsacculus, der die Zelle umhüllt. An diese Peptidoglycan-Schicht sind zusätzlich Teichonsäuren angeheftet, die aus Polyribitol- und Polyglycerin-Phosphaten bestehen. Teichonsäuren kommen ausschließlich bei G⁺ Bakterien vor.

G- Bakterien haben noch kompliziertere Zellwände: Sie haben eine zweite Membran nach außen (Außenmembran). Die Peptidoglycan-Schicht hier ist viel dünner und hängt nicht fest an der Zytoplasmamembran sondern „schwebt“ darüber. Zwischen den beiden Membranen liegt der so genannte periplasmatische Raum. In diesem Raum befinden sich zahlreiche Proteine für die Aufnahme verschiedener Stoffe in das Zytoplasma, Enzyme für die Synthese der Peptidoglycan-Schicht und Enzyme für die Entgiftung unerwünschter Substanzen.

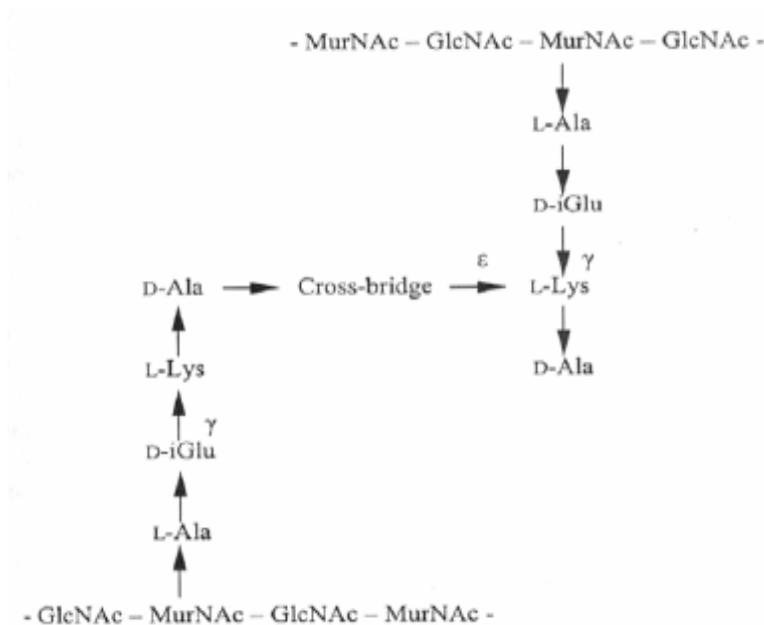


Abb. 1.3: Struktur des Peptidoglycans bei *E. faecalis* (Coyette and Hancock, 2002).

1.4 Mechanismen der Konjugation in Gram-negativen Bakterien

Die konjugativen Plasmide verschiedener Inc-Gruppen zeigen untereinander sehr große Ähnlichkeiten in der Genorganisation und der Sequenz der essentiellen Transferkomponenten (Lessl und Lanka, 1994). Das ermöglichte, die Kenntnisse über den Mechanismus des konjugativen Gentransfers durch Untersuchungen an den verschiedenen Plasmiden zu erweitern. Zunächst wurde ein Modell für den konjugativen Gentransfer in G- Bakterien anhand der detaillierten Daten des F-Faktors (IncF) vorgestellt. Alle für den Gentransfer benötigten Informationen sind auf dem F-Plasmid selbst kodiert, u.a. Gene für den Aufbau des Sex-Pilus und IS-Stellen für die Integration des Plasmids in das Bakterienchromosom. Bakterielle Konjugation ist ein hoch komplizierter Prozess, an dem zwei Proteinsysteme beteiligt sind, nämlich das *dtr*-System (*DNA-transfer and replication*), und das *mpf*-System (*mating-pair formation*). Beide beteiligten Proteinsysteme sind über das so genannte *coupling protein* verknüpft.

1.4.1 Donor-Rezipient Kontakt

Zunächst wird ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen Donor und Rezipient hergestellt. Bei G⁻ Bakterien entsteht dieser Kontakt durch extrazelluläre Filamente (Sex-Pili), die von der Donorzelle ausgehen. Es wird vermutet, dass dieser Sex-Pilus sich nach der Bindung an die Rezipientenzelle verkürzt und zu einem stabilen Kanal zwischen den beiden Zellen wird. In diesem Kanal kommt es nun zur Bildung des mpf-Komplexes, worüber das prozessierte einzelsträngige F-Plasmid zur Rezipientenzelle transportiert wird (Abb. 1.4).

In G⁻ Bakterien wurden zwei morphologisch unterschiedliche Arten der Sex-Pili beobachtet. Plasmide aus den IncF, -H, -J und -T Gruppen kodieren für dicke, stark gebundene und flexible Pili. Im Gegensatz dazu kodieren Plasmide aus den IncP, -I, -N und -W Gruppen für starre Pili, die sehr selten an dem Bakterium hängen bleiben (schwach gebunden). Konjugation in flüssigen Medien findet über flexible Pili statt, während starre Pili nur auf festen Medien effektive Konjugation vermitteln können (Lawley *et al.*, 2004).

1.4.2 DNA Prozessierung

Die Prozessierung (Replikation und Transfer) der Plasmid-DNA wird von den *dtr*-Proteinen durchgeführt. Die konjugative Replikation beginnt im Gegensatz zur normalen Replikation nicht am *oriV* (*origin of vegetative replication*), sondern an einem zweiten speziell für die Konjugation vorgesehenen Ursprung, dem *oriT* (*origin of transfer*). Am *oriT* befinden sich eine Bindestelle für die Relaxase und die *nick site* (die Erkennungs- und Schnittstelle der Relaxase). Ein Strang der Plasmid-DNA wird an der *nick site* im *oriT* spezifisch von der Relaxase geschnitten, die über einen bestimmten Tyrosin-Rest an das 5'-Ende der Einzelstrang DNA gebunden bleibt. Der DNA-Relaxase-Komplex (Relaxosom) wird anschließend über das *coupling protein* zum mpf-Komplex geleitet und mit 5'→3'-Polarität in die Rezipientenzelle transportiert (Cascales und Christie, 2004, Llosa *et al.*, 2005). Dort wird gleichzeitig mit dem Eintritt der Einzelstrang DNA in die Zelle der komplementäre Strang synthetisiert. Eine mögliche Rezirkularisierung der Doppelstrang-DNA durch Ligation über die Relaxase wurde in Lanka and Wilkins (1995) diskutiert.

Bei der Konjugation kann es aber auch zur Übertragung von chromosomalem Genmaterial kommen (Abb. 1.4). Der konjugative chromosomale Gentransfer wurde bei den so genannten *hfr*-Zellen (*high frequency of recombination*) entdeckt, wo das F-Plasmid an einer bestimmten Stelle im Genom integriert ist. Die Integration erfolgt über homologe Sequenzen, die sowohl im F-Plasmid als auch im Bakterienchromosom vorkommen (so genannte

Insertionssequenzen, IS). Der Gentransfer bei einer hfr-Zelle erfolgt nach dem gleichen Mechanismus wie bei einer normalen F-Zelle: Ausgehend vom *oriT* wird ein Strang des F-Plasmids repliziert, die Replikation erstreckt sich aber dann in die benachbarte chromosomale Region, die dann mit übertragen wird. Die übertragene DNA kann in der Rezipientenzelle nur nach einer homologen Rekombination mit der chromosomalen DNA stabil ausgeprägt und weitervererbt werden.

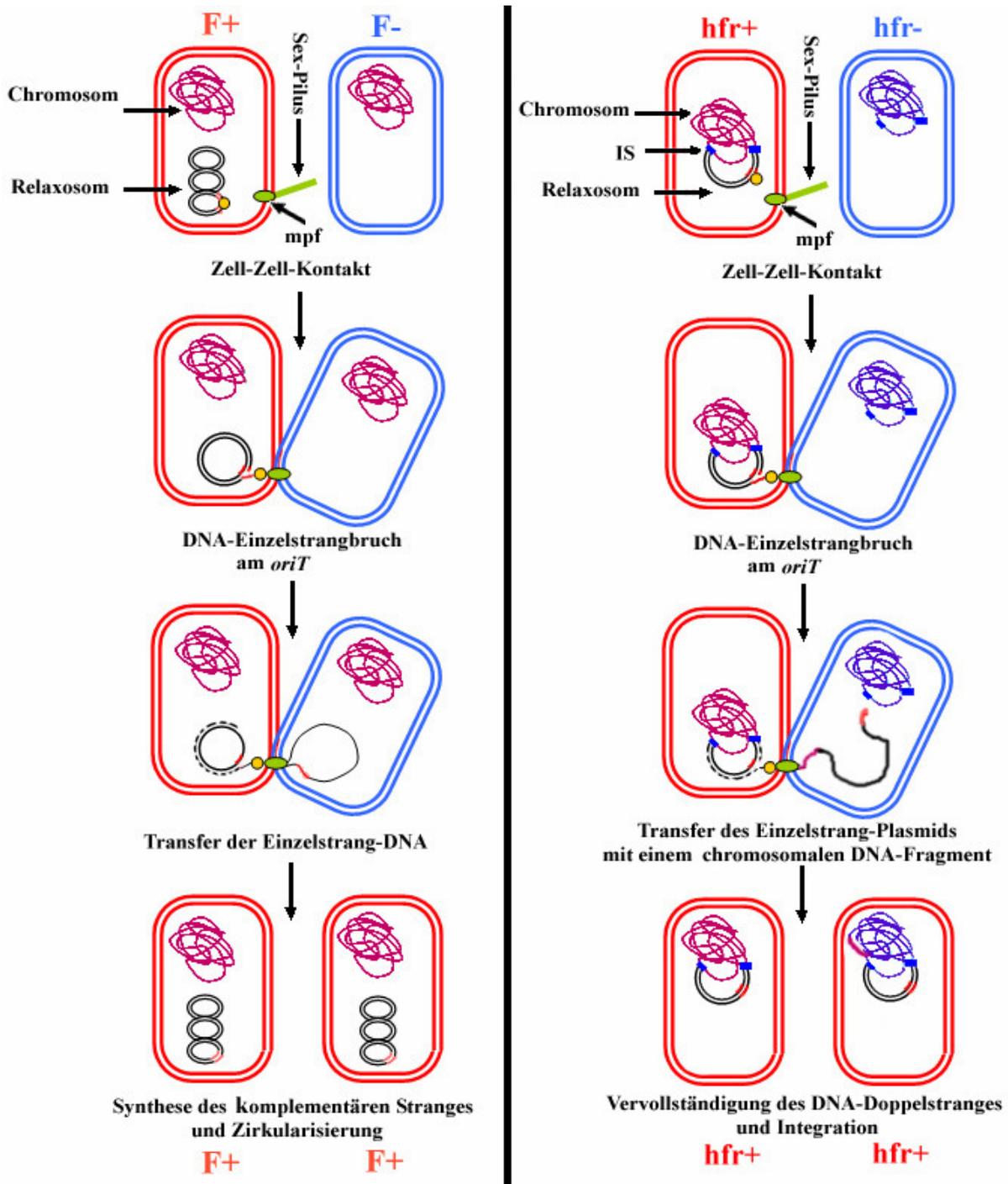


Abb. 1.4: Vereinfachter Mechanismus des konjugativen DNA-Transfers bei F- und hfr-Plasmiden.

1.4.3 Das mpf-System (*mating-pair formation*)

Das mpf-System ist ein Multiprotein Transmembrankomplex, welcher von konjugativen Plasmiden kodiert wird und als Transportapparat zum Export des DNA-/Proteinsubstrats von der Donor- in die Rezipientenzelle funktioniert. Viele der mpf-System Proteine (besonders aus Plasmiden mit bereitem Wirtsbereich der IncP, -N und -W Gruppen) zeigen große strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu den Komponenten eines gut charakterisierten Transportsystems, nämlich des Typ IV Sekretionssystems (T4SS) (z.B. Llosa *et al.*, 2005) (Abb. 1.5).

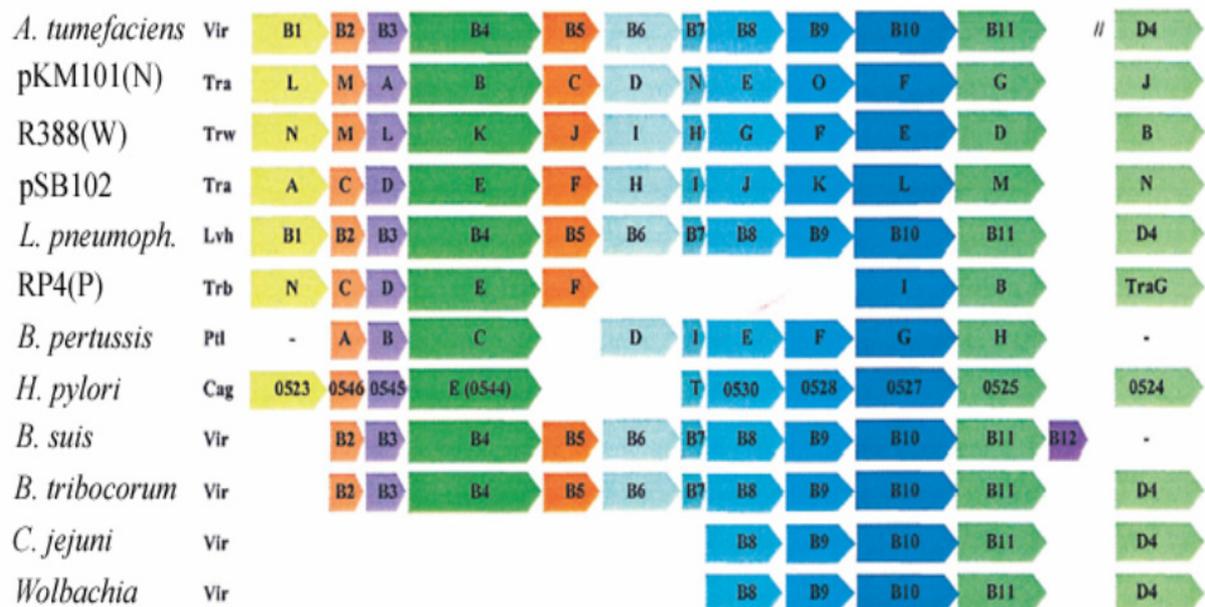


Abb. 1.5: Genorganisation des T4SSs bei verschiedenen Mikroorganismen (aus Yeo und Waksman, 2004). Lytische Transglykosylasen sind in gelb, Pilus-Proteine sind in orange, ATPasen sind in dunkelgrün, Kopplungsproteine sind in hellgrün, Kernkomplex-Komponenten sind in blau und Proteine mit unbekanntem Funktionen sind in violett gezeigt.

1.5 Das Typ IV Sekretionssystem (T4SS)

1.5.1 Definition und Funktionen

Das T4SS ist ein bakterielles Transportsystem, mit dem Makromoleküle durch die Zellwand aus der Bakterienzelle transportiert werden können. Verschiedene Arten von Makromolekülen zählen zu den Substraten der T4SS: DNA-Relaxase-Komplexe, Proteine bei pathogenen Bakterien wie CagA von *Helicobacter pylori*, Toxine wie z.B. das Pertussis Toxin PT von *Bordetella pertussis* und Virulenz-Faktoren wie VirE2, VirE3 und VirF von *Agrobacterium tumefaciens*. Als Rezipienten für die transportierten Moleküle fungieren Bakterienzellen (Konjugation), Pflanzenzellen (Pflanzentumor durch Infektion mit *Agrobacterium*

tumefaciens) oder tierische und menschliche Zellen (Darminfektion mit *Helicobacter pylori*) (Cascales und Christie, 2004). Ein direkter Zell-Zell-Kontakt ist aber nicht immer für den Transport mittels T4SS erforderlich, es gibt auch Beispiele für Kontakt-unabhängigen Protein- bzw. DNA-Export, z.B. bei *Bordetella pertussis* wird das Pertussis Toxin in den Überstand freigesetzt. Auch die Sekretion bzw. die Aufnahme eines Einzelstrang DNA Fragments funktioniert ohne direkten Zell-Zell Kontakt. Die von den Bakterien sekretierten Makromoleküle spielen mehrfache Rollen für den bakteriellen Stoffwechsel und die Adaptation an die Umgebung (Pallen *et al.*, 2003), z.B. viele sekretierten Enzyme, u.a. Cellulasen, DNasen, Pektinasen und Proteasen bauen die Wirtsmakromoleküle zu kleinen Produkten ab, die von den Bakterien einfacher verstoffwechselt werden können. Manche sekretierte Proteine (Anthrax Toxin, Cholera Toxin und Pertussis Toxin) treten in die Wirtszelle ein und modifizieren ihren Stoffwechsel, um den Lebensstil des pathogenen Bakteriums zu unterstützen. Andere sekretierte Proteine haften an der Zelloberfläche, um die Bakterien gegen Umweltfaktoren zu schützen oder das Immunsystem des Wirts zu manipulieren (Abb. 1.6).

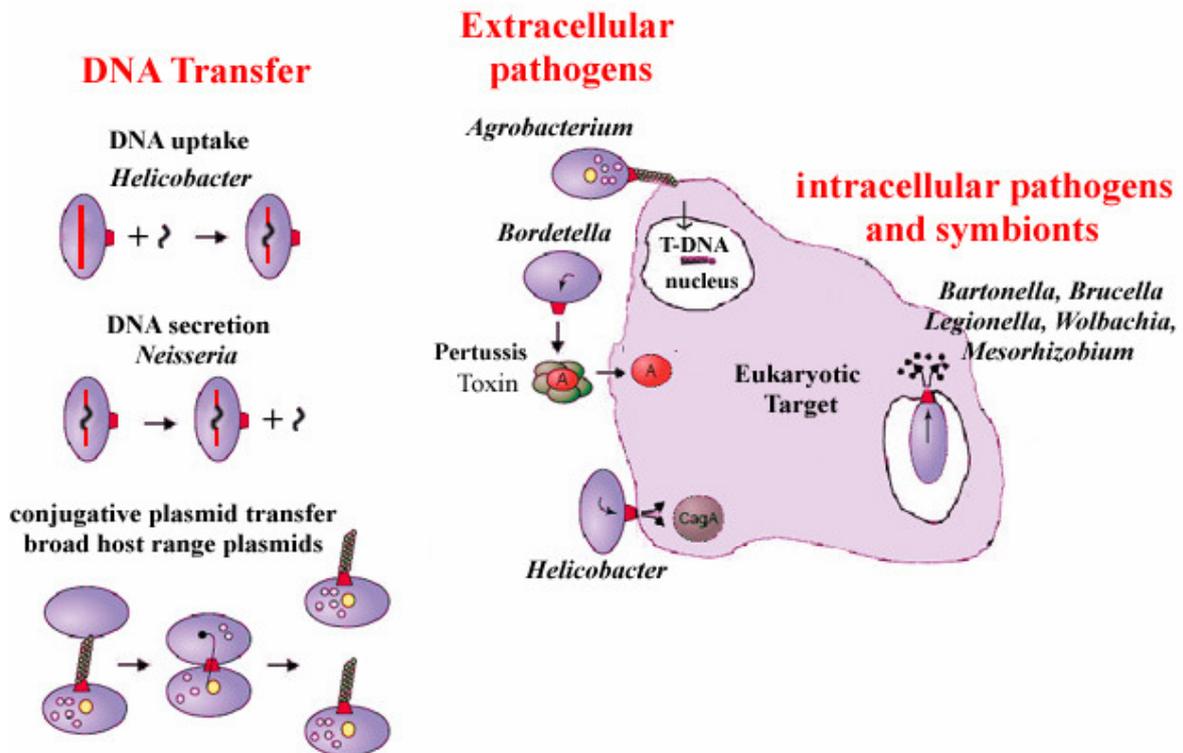


Abb. 1.6: Funktionen des Typ IV Sekretionssystems (aus Baron, 2006).

Bakterielle DNA-Sekretion/Aufnahme Prozesse funktionieren mittels T4SS. Extrazelluläre, intrazelluläre und symbiotische Bakterien benutzen auch T4SS. Intrazelluläre Bakterien können innerhalb von Vesikeln in den Wirtszellen leben und sich vermehren. Das T4SS-Substrat vieler intrazellulärer Bakterien wurde noch nicht identifiziert, aber es könnte direkt in das Wirtszytoplasma abgegeben werden, wo es den Wirtstoffwechsel modifiziert, um den Lebensstil der Bakterien zu unterstützen.

1.5.2 Das *virB/virD* T4SS von *Agrobacterium tumefaciens*

Es wurde in den letzten Jahren intensiv geforscht, um den Mechanismus der T4SS in G-Bakterien aufzuklären. Das auf dem Ti-Plasmid (*tumor inducing*) kodierte *virB/virD4*-System des G-Bodenbakteriums *A. tumefaciens* ist bis heute das am besten untersuchte T4SS. (Übersichtsartikel z.B. Christie, 2004). *A. tumefaciens* ist ein pflanzenpathogenes G-Bakterium, das in der Natur verletzte Pflanzen infizieren und Tumorstadium induzieren kann, indem über ein T4SS mehrere auf dem Ti-Plasmid kodierte Komponenten direkt in das Zytoplasma der Pflanzenzelle exportiert werden. Das Ti-Plasmid ist ca. 200 kb groß, auf ihm befinden sich Transferegene (*tra*-Gene), Virulenzgene (*vir*-Gene) und Tumorgene (*onc*-Gene). Der DNA-Transfer wird von ca. 20 Virulenzproteinen (Vir) reguliert, von denen 11 am Aufbau des Transportsystems beteiligt sind. Die Vir-Proteine sind auf zwei Operons kodiert: Das *virB*-Operon kodiert für 11 Virulenzproteine (VirB1-VirB11), und das *virD*-Operon kodiert für 5 Virulenzproteine (VirD1-VirD5) (Ward *et al.*, 2002). Die VirB-Proteine werden auch als mpf-Komplex bezeichnet, ihre Aufgabe ist eine stabile Membranpore für den Substrattransfer und den Sex-Pilus zu bilden (Abb. 1.7).

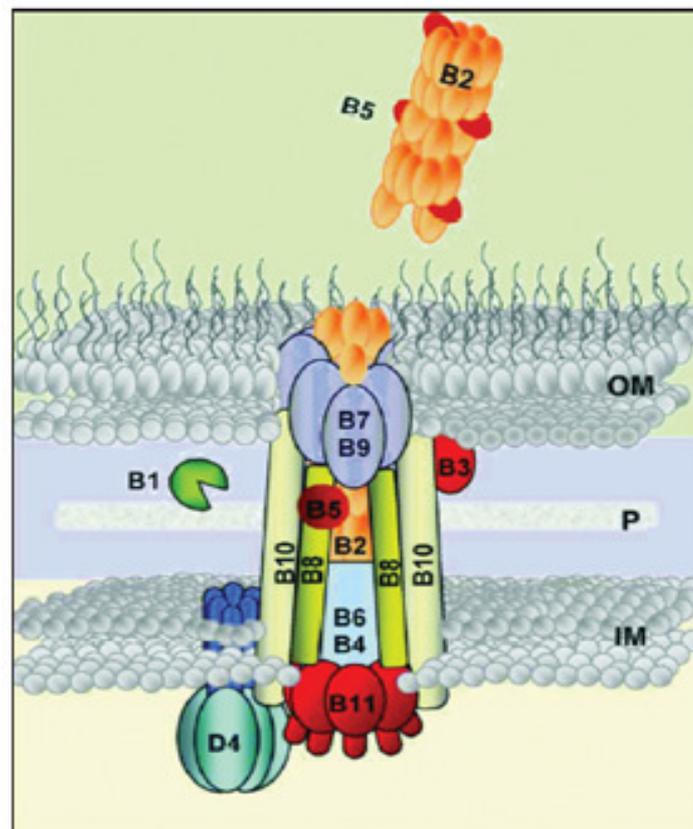


Abb. 1.7: Modell des T4SS aus *A. tumefaciens* (aus Christie, 2004).

Dieses Modell stellt den schematischen Aufbau der Zellwand bei G-Bakterien, bestehend aus Zytoplasmamembran (*inner membrane*, IM), Periplasma (P) und Außenmembran (*outer membrane*, OM) dar. In der Zellwand sind die verschiedenen Vir-Proteine des Ti-Plasmids aus *A. tumefaciens* verankert, B1 steht hierbei

für das Protein VirB1 usw., D4 für das Protein VirD4. Die lytische Transglykosylase VirB1 weitet vermutlich die Peptidoglykan-Schicht im Periplasma, um die Ausbildung des Proteinkomplexes und den nachfolgenden Transfer zu erleichtern. Ein Kanal, der die Innen- und Außenmembran verbindet, wird durch die VirB-Proteine sowie VirD4 gebildet. Über diesen Kanal kann der T-Komplex aus VirD2-ssDNA (Relaxosom) transportiert werden. VirD4 hat die Rolle des Kopplungsproteins und vielleicht auch die Funktion der DNA-Helicase, um die T-DNA vom Ti-Plasmid zu trennen.

Der gesamte DNA-Transfer von einer *A. tumefaciens* Zelle in eine Pflanzenzelle kann in die folgenden Schritte eingeteilt werden (Abb. 1.8, nach McCullen and Binns 2006):

I. Die Erkennung der Wirtszelle

Der Export der T-DNA ist ein komplizierter Prozess, an dem viele Proteine beteiligt sind und viel Energie investiert werden muss, deswegen ist dieser Prozess in der Natur sehr gut reguliert und findet nur statt, wenn ein Wirt verfügbar ist und erkannt wird. Die Analyse der *vir*-Gene enthüllte, dass sie außer *virA* und *virG* nicht exprimiert werden, solange sie nicht von einer Wirtszelle aktiviert werden (Stachel and Nester, 1986). Die *virA* und *virG* Gene sind auf dem Chromosom kodiert und werden konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert, bis sie von Wirtssignalen hoch reguliert werden (Winans *et al.*, 1988). Die Wirtssignale sind Phenole, Monosaccharide, niedriger pH-Wert und niedrige Phosphatkonzentration. Während Phenole für die Induktion der *vir*-Gene absolut erforderlich sind, machen die anderen Faktoren die Bakterienzellen empfindlicher für die Phenole (Brencic and Winans, 2005). VirA und VirG bilden gemeinsam ein Zwei-Komponenten Regulationssystem, welches die Wirtssignale bindet und die *vir*-Gene induziert. VirA ist eine Membransensorkinase, die die Wirtssignale bindet, ATP spaltet und die freigesetzte Phosphatgruppe an einen zytoplasmatischen Regulator VirG liefert. Dabei entsteht ein VirG-PO₄ Molekül, das spezifisch an eine 12 bp Sequenz in dem *vir*-Promotor bindet und die *vir*-Gene induziert (Brencic and Winans, 2005) (Abb. 1.8).

II. Zell-Zell-Kontakt zwischen Bakterien- und Wirtszellen

Der Zell-Zell Kontakt ist nicht notwendig für die Erkennung der Wirtszellen und für die Aktivierung der *vir*-Gene, dafür reichen die Wirtssignale aus. Ein direkter Kontakt ist aber für den DNA-Transfer erforderlich. Eine mikroskopische Untersuchung der Rezipienten-Donor Bindung zeigte, dass die Bakterienzellen mit ihrer Polregion an die Pflanzenzellen haften (Smith and Hindley, 1978). Douglas *et al.* (1982) und Neff and Binns (1985) zeigten, dass eine stabile Bindung der *A. tumefaciens* Zellen an die Pflanzenzellen unabhängig vom Ti-Plasmid und vom Sex-Pilus ist. Eine Serie von Genen wurde vor kurzem auf einer 29 kb

III. Produktion der Transfersubstrate und des Transportapparates

Die Proteine VirD1 und VirD2 sind für die DNA-Prozessierung und den Transport zuständig und werden dtr-Proteine bezeichnet (1.4.2). Dabei ist VirD2 eine Relaxase, die am *oriT* des Plasmids binden und die DNA an der *nick-site* spalten kann. Die Proteine VirD3 und VirD5 sind nicht essentiell für den Transfer und die Prozessierung.

Die VirB/D4 Proteine bilden gemeinsam den Transportapparat, welcher die T-DNA aus der Bakterienzelle exportiert. Mehrere VirB-Proteinkomplexe wie z.B. VirB2-VirB5-VirB7, VirB7-VirB9 und VirB7-VirB9-VirB10 konnten aus der Membran isoliert werden (Krall *et al.*, 2002). Andere Studien haben festgestellt, dass alle VirB-Proteine außer VirB1 (die lytische Transglykosylase) für den DNA-Transfer essentiell sind (Berger and Christie, 1994). Das VirD4-Protein ist das Kopplungsprotein (*coupling protein*, CP), das zwischen dem dtr-System, also dem Relaxosom, und dem mpf-System vermittelt (Zhu *et al.*, 2000). Die Rollen der Vir-Proteine des *A. tumefaciens* T4SS sind in Christie and Cascales (2005) und Schröder and Lanka (2005) detailliert beschrieben. VirB1 hat zwei Funktionen: Es ist eine lytische Transglykosylase, die die Peptidoglykan-Schichten für den Aufbau des Transmembrankomplexes öffnet. VirB1 sorgt auch durch seine freigesetzte C-terminale Domäne VirB1* für Interaktionen mit den Pflanzenzellen. VirB2 Proteine sind die Hauptpilinuntereinheiten, gemeinsam mit VirB5 Proteinen (kleine Pilinuntereinheiten) bilden sie den Sex-Pilus. VirB3 könnte wegen seiner Lokalisierung in der Außenmembran und seiner Interaktion mit VirB5 ein Pilus-assoziiertes Protein sein (Shamaei-Tousi *et al.*, 2004). VirB6 kann durch die Knüpfung von Disulfidbrücken andere Proteinkomplexe wie das VirB7/VirB9 Heterodimer und das VirB7 Homodimer stabilisieren (Jakubowski *et al.*, 2003). VirB7 ist ein Lipoprotein, es kann den Pilus in der Außenmembran verankern (Draper *et al.*, 2006). VirB8 sorgt für eine polare Lokalisierung der T4SS-Proteine in den *A. tumefaciens* Zellen (Judd *et al.*, 2005). Die Aminosäuresequenz von VirB9 zeigt Ähnlichkeit mit den *pore-forming* Domänen von Sekretionsproteinen, das bedeutet VirB9 könnte die äußere Struktur des Transferkanals bilden, durch die die DNA/Proteine transportiert werden (Christie, 2004). VirB10 ist ein ATP Energiesensor für die ATPasen VirD4 und VirB11 (Cascales and Christie, 2004).

Die drei Vir-Proteine VirB4, VirB11 und VirD4 haben Nukleotidbindedomänen, sie können mit einander interagieren und bilden in Lösung Hexamere, welche ein charakteristisches Merkmal für die ATPasen sind (Draper *et al.*, 2006). Der Nachweis einer ATP-Hydrolyse gelang bis jetzt für VirB11 und seine Homologe und für VirD4-Homologe (Schröder and Lanka, 2003).

IV. Transfer des Substrats in die Wirtszellen

Zusätzlich zu dem T-DNA-VirD2 Substrat werden auch die Virulenzproteine VirE2, VirE3 und VirF in die Wirtszellen transportiert. VirE2 ist ein Einzelstrang DNA-Bindeprotein, es ummantelt den ganzen T-DNA-Strang im Wirtszytoplasma und spielt auch eine Rolle beim Eintritt in den Nukleus und bei der Integration der T-DNA in die chromosomale DNA des Wirts (Gelvin, 2003). VirE3 könnte eine nukleare Lokalisierung des VirE2-Proteins in der Wirtszelle unterstützen (Lacroix *et al.*, 2005). Die Funktion von VirF ist nicht gut charakterisiert, aber es gibt Vermutungen, dass VirF Wirtsfaktoren während der Infektion degradiert (Tzfira *et al.*, 2004).

V. Integration der T-DNA in die chromosomale DNA des Wirts

Die T-DNA wird in die chromosomale DNA der Wirtszellen (Pflanzenzellen) integriert und kodiert für Enzyme, die die Biosynthese neuer Aminosäure-Zucker Konjugate (Opine) katalysieren. Opine dienen als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle für die infizierenden Bakterien aber nicht für andere Bakterien. Zusätzlich zur Manipulation des Wirtsstoffwechsels beeinflusst die T-DNA die Expression der Wirtsgene, somit werden die antibakteriellen Verteidigungsprozesse des Wirts inhibiert (Ditt *et al.*, 2005), während Gene für Zellteilung und Wachstum aktiviert werden (Veena *et al.*, 2003).

1.6 Mechanismen der Konjugation in Gram-positiven Bakterien

Im Gegensatz zu G⁻ Bakterien ist die Konjugation in G⁺ Bakterien nicht gut erforscht. G⁺ Bakterien weisen Unterschiede zu G⁻ Bakterien in der Zellwandmorphologie auf. Sie besitzen nur eine Zytoplasmamembran (keine Außenmembran) und mehrere Peptidoglykan-Schichten, aus diesen Gründen wurde spekuliert, dass das mpf-System in G⁺ Bakterien einfacher aufgebaut sein könnte und dass die G⁺ Konjugationssysteme vielleicht effektivere lytische Transglykosylasen produzieren. Außerdem weiss man nicht genau, wie der Zell-Zell-Kontakt als Voraussetzung des konjugativen Transfers entsteht, allerdings wurden Pilus-ähnliche Strukturen auch bei G⁺ Bakterien beobachtet.

1.6.1 Pili in Gram-positiven Bakterien

Pilus-ähnliche Strukturen wurden 1968 auf den Oberflächen G⁺ pathogener Bakterien mittels Elektronenmikroskopie zum ersten Mal in *Corynebacterium renale* entdeckt (Yanagawa *et al.*, 1968). Später wurden Pili auch in *Actinomyces naeslundii* (Yeung *et al.*, 1998) und *Corynebacterium diphtheriae* (Gaspar and Ton-That, 2006) beobachtet. In den letzten zwei

Jahren konnten Pili in drei pathogenen Streptokokken nachgewiesen werden, die invasive Infektionen beim Menschen verursachen, u.a. in *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* und *Streptococcus pneumoniae* (Mora et al., 2005; Barocchi et al., 2006; Rosini et al., 2006). Die Pili in G+ Bakterien spielen eine sehr wichtige Rolle beim Anhaften der pathogenen Bakterien an die Wirtszellen und beim Bilden von Biofilmen (Yamaguchi und Matsunoshita, 2004). Im Allgemeinen sehen die Pili in G+ Bakterien unter dem Elektronenmikroskop wie kurze dünne Stäbchen aus. Ton-That und Schneewind (2003) waren die ersten, die G+ Pili in *Corynebacterium diphtheriae* genau charakterisierten, sie fanden heraus, dass die Pili in G+ Bakterien aus drei kovalent verbundenen Pilinuntereinheiten bestehen, im Gegensatz zu Pili in G- Bakterien, wo die Pilineinheiten nicht kovalent miteinander verknüpft sind. In allen drei Pilinuntereinheiten des G+ Pilus wurde ein LPXTG-Motiv gefunden, welches ein Ziel für Sortasen ist. Während der Pilusbildung katalysiert eine spezifische Sortase die Verbindung der Pilinuntereinheiten miteinander und mit dem Peptidoglykan in der Zellwand. Ein Vergleich zwischen G+ und G- Pili ist in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

	Pili in Gram-negativen Bakterien	Pili in Gram-positiven Bakterien
Spezies z.B.	<i>E. coli</i> , <i>Neisseria</i> und <i>Pseudomonas</i>	<i>Corynebacterium</i> und <i>Streptokokken</i>
Morphologie	Lange starre Stäbchen mit flexiblen Spitzen	Kurze dünne Stäbchen
Pilineinheiten	4-5	2-3
Biogenese	Pilineinheiten werden einzeln in den periplasmatischen Raum sekretiert, Chaperone verhindern ihre Faltung, bis sie die Außenmembran erreichen	Pilineinheiten werden mittels einer spezifischen Sortase kovalent miteinander und mit dem Peptidoglykan verbunden
Genorganisation	in einem Operon organisiert	auf der Pathogenitätsinsel kodiert
Funktion	Adhäsion, Co-Aggregation, Immunmodulation, Biofilmbildung und DNA-Transfer (nur in Typ IV Pilus)	Adhäsion, Co-Aggregation, Immunmodulation und Biofilmbildung

Tab. 1.1: Vergleich zwischen G+ und G- Pili.

Die Mechanismen des Transfers durch die Zellwand sind für kein G+ Bakterium bekannt, nur z.B. die Zellerkennung und das Auslösen des Transfers bei Sex-Pheromonplasmiden:

1.6.2 Die konjugativen Sex-Pheromonplasmide in *Enterococcus faecalis*

Sex-Pheromone sind kleine extrazelluläre Botenstoffe, die schon in sehr geringen Konzentrationen als Signale zwischen Angehörigen einer Art dienen. Bei den so genannten Sex-Pheromonen handelt es sich um kleine (7-8 AS lange) lineare Peptide, die von den Rezipienten in die Umgebung freigesetzt werden. Wenn diese Signale auf Donorzellen treffen, wird ein Plasmid-kodiertes Adhäsion induziert und auf der Zelloberfläche gebildet, was zur Donor-Rezipienten-Aggregation und somit zum hoch effizienten Transfer der Pheromonplasmide führt. Zu den Sex-Pheromonplasmiden gehören die Plasmide pAD1, pCF10 und pPD1. Bei pCF10 wird das von dem Rezipienten produzierte Sex-Pheromon cCF10 auf der Donoroberfläche von einem Plasmid-kodierten Lipoprotein PrgZ detektiert (Ruhfel *et al.*, 1993). Anschließend wird cCF10 durch die Chromosom-kodierte Oligopeptid Permease (Opp) in das Donorzytoplasma importiert (Leonard *et al.*, 1996). Dort bindet cCF10 an ein pCF10-kodiertes zytoplasmatisches Protein PrgX. In Abwesenheit des Sex-Pheromons reprimiert PrgX die Transkription des pCF10-Promotors (Bae and Dunny, 2001; Bae *et al.*, 2004). Durch die Interaktion mit dem Sex-Pheromon (Shi *et al.*, 2005) wird PrgX gehemmt, als Folge wird die Expression des pCF10-Operons induziert. Expression des *prgB* Gens führt zur Bildung des Aggregationsproteins Asc10 auf der Donoroberfläche, welches die Aggregation mit den Rezipientenzellen vermittelt und somit zum hoch effektiven Transfer von pCF10 führt. Die Wirkung des Sex-Pheromons cCF10 auf das Protein PrgX kann in der Donorzelle durch den Inhibitor iCF10 negativ reguliert werden (Kozlowicz *et al.*, 2006). Nach der Aufnahme des Plasmids, stoppen die Rezipientenzellen die Synthese des entsprechenden Sex-Pheromons, aber sie können weiter spezifische Pheromone für andere Plasmidgruppen produzieren (Clewell, 1993). Es ist noch unklar, wie die Sex-Pheromonplasmide in die Rezipientenzelle transportiert werden, aber es gibt Hinweise, dass das über ein dem T4SS-ähnliches System stattfinden könnte. Zur Aufklärung der DNA-Prozessierung bei den Sex-Pheromonplasmiden wurden noch nicht viele Studien durchgeführt. Auf mehreren Pheromonplasmiden wurden *oriT*s gefunden, nämlich auf pAD1, pAM373 und pCF10. pAD1 hat zwei Transferursprünge, *oriT1* und *oriT2* und kodiert für eine Relaxase TraX, die spezifisch in *oriT2* spaltet. ORF53 von pAD1 ist wichtig für den Plasmid-Transfer und zeigt strukturelle Ähnlichkeiten mit TraG (*coupling protein*) (Francia and Clewell, 2002). pCF10 kodiert für eine Relaxase PcfG und seine *oriT*-Sequenz wurde auch lokalisiert (Staddon *et al.*,

2006). Außerdem kann das konjugative Plasmid pCF10 andere Plasmide wie pRS01 aus *Lactococcus lactis* mobilisieren (Chen *et al.*, 2007).

1.6.3 Pheromon-unabhängige konjugative Plasmide

Enterokokken besitzen auch konjugative Plasmide, die von Sex-Pheromonen unabhängig sind, wie das *E. faecium* Plasmid pMG1. Untersuchungen zu diesem Plasmid zeigten keine Ähnlichkeiten mit dem Sexpheromon-System (Ike *et al.*, 1998). In Milchsäurebakterien wie *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus casei* wurde ein aggregationsvermittelter Transfer von Plasmiden beschrieben, die Laktosestoffwechselfgene tragen. Die Aggregation in diesem System ist von chromosomal-kodierten *agg*-Genen und von Plasmid-kodierten *clu*-Genen abhängig. Beide Gengruppen kodieren für Oberflächenfaktoren. Wenn *Agg*- und *Clu*-Faktoren vorhanden sind, aggregieren Rezipient- und Donorzellen miteinander und es findet ein Plasmid-Transfer statt (Van der Lelie *et al.*, 1991). Im Gegensatz zu *Lactococcus lactis*, produzieren *Bacillus thuringiensis* Zellen keine Aggregation Induktionsfaktoren. In *B. thuringiensis* wurden große Plasmide wie pXO16 identifiziert, die selbst-übertragbar sind und kleine Plasmide (ohne *oriT* und *mob*-Gen) mobilisieren können. Die Mobilisierung kleiner Plasmide zwischen den *B. thuringiensis* Stämmen ist immer von einer Aggregation zwischen Aggregation positiven Donorzellen (Agr^+) und Aggregation negativen Rezipientenzellen (Agr^-) begleitet. Die Übertragung der kleinen Plasmide erfolgt immer in einer Richtung von Agr^+ in Agr^- Zellen (Andrup *et al.*, 1993; 1996). Weitere Beispiele für Pheromon-unabhängige Transfersysteme in G+ Bakterien wurden in Grohmann *et al.* (2003) diskutiert.

1.6.4 Konjugativer Transfer von Plasmiden mit breitem Wirtsbereich

Plasmide mit breitem Wirtsbereich können in einer Vielzahl G+ Bakterien, z.B. in *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Listeria* etc. vorkommen. Die meisten aus *Enterococcus* und *Streptococcus* bekannten konjugativen Plasmide haben einen breiten Wirtsbereich, während diejenigen, die in *Staphylococcus* entdeckt wurden, auf diesen Genus beschränkt zu sein scheinen. Ein Vergleich der DNA Sequenzen der *tra*-Regionen aus verschiedenen G+ Plasmiden, u.a. pGO1 und pSK41 aus *Staphylococcus*, pIP501 aus *Streptococcus*, pMRC01 aus *Lactococcus* und pRE25 aus *Enterococcus* zeigte interessante Ähnlichkeiten (Abb. 1.9).

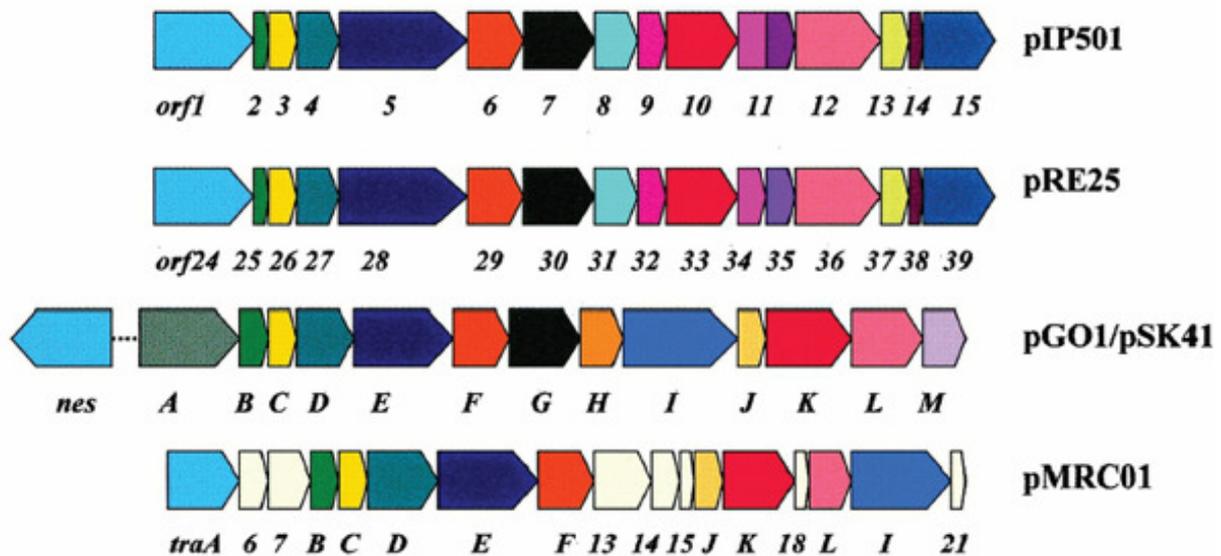


Abb. 1.9: Vergleich der *tra*-Regionen der Plasmide pIP501, pRE25, pGO1, pSK41 und pMRC01 (aus Grohmann *et al.*, 2003).

Die ersten sieben Gene der verglichenen *tra*-Regionen sind konserviert, mit Ausnahme von pMRC01, wo zwei zusätzliche Gene unbekannter Funktion vorhanden sind. Außerdem sind *traG*- und *traK*-Homologe, die für die lytische Transglykosylase bzw. das „coupling protein“ kodieren, in allen Plasmiden außer pMRC01 vorhanden. Das letzte Plasmid hat nur ein *traK*-Homolog (*coupling protein*). VirB4-Homologe (*TraE*) sind in allen fünf Plasmiden vorhanden (Grohmann *et al.*, 2003).

1.7 *Enterococcus faecalis* als Modell zur Untersuchung der Konjugation in G+ Bakterien

Aus mehreren Gründen wurde für diese Arbeit das G+ Bakterium *Enterococcus faecalis* gewählt, um den Mechanismus des konjugativen DNA-Transfers des Plasmids pIP501 zu untersuchen gewählt: 1) Es ist ein natürlicher Bewohner des Mund-, Darm- und Vaginarraumes beim Menschen. 2) *E. faecalis* ist ein Teil der Mikroflora verschiedener fermentierter Lebensmittelprodukte. 3) *E. faecalis* ist ein opportunistisch pathogenes Bakterium, das schwere Infektionen bei Patienten besonders in Krankenhäusern auslösen kann. Mögliche Krankheiten, die durch eine Infektion mit *E. faecalis* ausgelöst werden können, sind Sepsis, Endokarditis, Meningitis, Harnwegsinfektionen, Peritonitis, Weichteilinfektionen, Wundinfektionen und katheterassoziierte Infektionen (Huycke *et al.*, 1998). Die Resistenzen des Bakteriums gegen viele Antibiotika machen seine Infektionen sehr schwer heilbar. 4) Neben den Antibiotikaresistenzgenen verfügt *E. faecalis* über

Dutzende von Virulenzfaktoren (Kayaoglu and Orstavik, 2004). Einige Virulenzfaktoren konnten bereits identifiziert werden (Eaton and Gasson, 2001), doch viele putative Virulenzfaktoren wurden bisher nicht funktionell charakterisiert. In nur vier Jahren (1989-1993) stieg die Anzahl der Enterokokken Infektionen in den USA von 0,3% auf 7,9% an, das zeigt die Dringlichkeit der Aufklärung der Pathogenität von Enterokokken und des horizontalen Gentransfers zwischen den verschiedenen Stämmen.

1.7.1 Der Stamm *E. faecalis* V583 und seine Virulenzproteine

Paulsen *et al.* sequenzierten das klinische Isolat *Enterococcus faecalis* V583, dem die erste gegen Vancomycin resistente nosokomiale Enterokokken Infektion in den USA zugeschrieben wird (Paulsen *et al.*, 2003). Die Genomsequenz steht in der Datenbank des *Institute for Genomic Research* (TIGR) zur Verfügung. Bei der Analyse des Genoms von *E. faecalis* V583 fanden sich unter zahlreichen mobilen DNA-Elementen auch Pathogenitätsinseln. So bezeichnet werden Ansammlungen von dicht beieinander liegenden Virulenzgenen, die entweder in Gruppen auf dem Bakterienchromosom oder auf extrachromosomalen Virulenzplasmiden liegen (Lee, 1996). Daneben entdeckte man auf anderen mobilen DNA-Abschnitten z.B. ein Transposon mit Resistenzgenen für Vancomycin. Die Bedeutung der mobilen DNA kann besser eingeschätzt werden, wenn man beachtet, dass sie im *Enterococcus faecalis* V583 Genom rund ein Viertel des Gesamtgenoms ausmacht.

In *E. faecalis* V583 konnten ca. 130 Gene identifiziert werden, die möglicherweise für Virulenzproteine kodieren. Man nahm an, dass diese Proteine als Oberflächenproteine exprimiert werden und dass sie bei der Infektion mit bestimmten Wirtsproteinen (z.B. aus Darm und Leber) interagieren können und somit eine wichtige Rolle bei der Pathogenität des Bakteriums spielen können (Paulsen *et al.*, 2003). Wissenschaftliche Studien zeigten deutlich, dass die Oberflächenproteine und sekretierten Proteine immunologische Reaktionen im menschlichen Körper auslösen können (Xu *et al.*, 1997).

In dieser Arbeit haben wir sechs Virulenzproteine ausgewählt, um ihre möglichen Interaktionen mit humanen Proteinen zu untersuchen (Tab. 1.2)

Virulenzprotein	Beschreibung	Accession Number auf <i>E. faecalis</i> V583 Genom
Cbp	<i>choline binding protein</i>	EF2662

CylB	<i>cytolysin B transport protein</i>	EF0528
Fbp	<i>fibronectin/fibrinogen-binding protein</i>	EF1249
Hemolysin	<i>hymolysin</i>	EF0700
Orfde11	<i>putative ABC transporter permease</i>	AAC35925
ScrB-2	<i>sucrose-6-phosphate hydrolase</i>	EFA0069

Tab. 1.2: Ausgewählte Vir-Proteine des *E. faecalis* V583 Stammes.

1.8 pIP501 als Modellplasmid zur Untersuchung der Konjugation in Gram-positiven Bakterien

Während die Konjugation in G⁻ Bakterien in den letzten 20 Jahren sehr intensiv von vielen Arbeitsgruppen untersucht worden ist, hat man erst vor wenigen Jahren damit begonnen, die Mechanismen des konjugativen Transfers bei G⁺ Bakterien zu erforschen (Übersichtsartikel Grohmann *et al.*, 2003; Grohmann, 2006). Das Interesse an der Konjugation in G⁺ Bakterien nahm in den letzten Jahren wegen ihrer vermutlichen Rolle in der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in diesen Mikroorganismen stark zu.

In dieser Arbeit wurde das Plasmid pIP501 als Modell zur Aufklärung des Konjugationsmechanismus in G⁺ Bakterien verwendet. pIP501 ist ein Plasmid mit breitem Wirtsbereich. Ursprünglich wurde pIP501 aus *Streptococcus agalactiae* isoliert, aber es kann in einer Vielzahl von G⁺ Bakterien, wie z.B. in *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* und *Bacillus subtilis* vorkommen. pIP501 konnte sogar in das G⁻ Bakterium *E. coli* mit Hilfe von konjugativem Transfer übertragen werden (Kurenbach *et al.*, 2003). pIP501 ist ein Multiresistenzträger, auf dem Plasmid befinden sich Resistenzgene gegen Chloramphenicol (*cat*) und gegen Makrolid-Linkosamid-Streptogramin B-Antibiotika (*ermB*). pIP501 konnte bereits vollständig sequenziert werden (Abb. 1.10). Die ersten Untersuchungen zum konjugativen Transfer von pIP501 wurden 1989 von Krahn und Marcina durchgeführt (Krahn und Marcina, 1989). Sie entdeckten eine für die Konjugation essentielle Region, die später als Transfer-Region (*tra*) bezeichnet wurde. Diese *tra*-Region besteht aus 15 offenen Leserahmen (*open reading frame, orf*) Abgekürzt *orf*. Die ersten sechs *orfs* wurden 1995 identifiziert und sequenziert (Wang und Macrina, 1995; GenBank Acc. No. L39769). Die restlichen *orfs* (*orf7-orf15*) wurden später sequenziert (Kurenbach *et al.*, 2003; Thompson and Collins, 2003; *orf7-orf15*: GenBank Acc. No. AJ505823). Weitere Untersuchungen haben

zeigt, dass es sich bei den *tra*-Genen *orf1-orf15* um eine transkriptionelle Einheit (Operon) handelt (Kurenbach *et al.*, 2006).

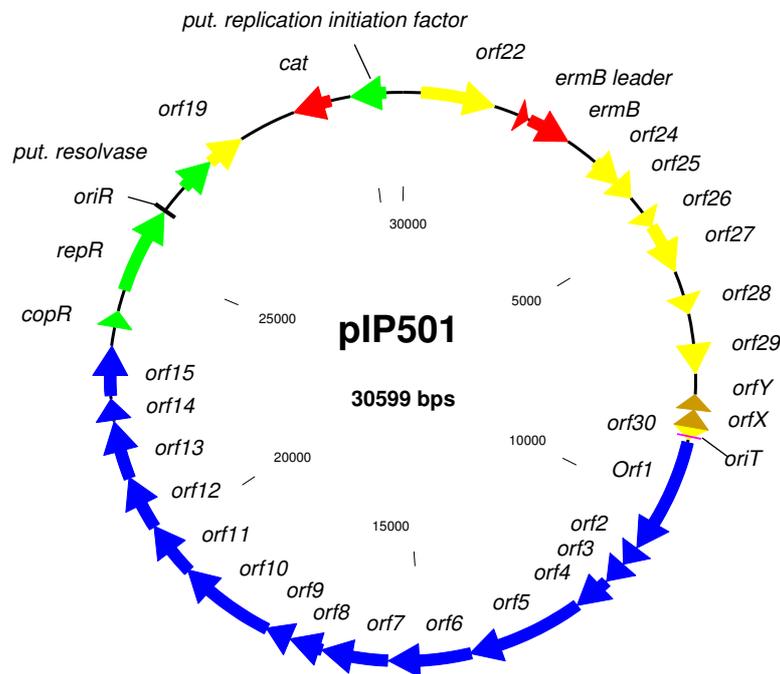


Abb. 1.10: Schematische Darstellung von pIP501 (aus Kurenbach, 2004).

Die Antibiotikaresistenzgene sind rot, Replikationsgene, *copy number*-Kontrollgene und Gene mit Resolvase-Aktivität grün dargestellt. *orfs* mit unbekannter Funktion sind gelb gezeichnet. Die Gene der *tra*-Region sind blau dargestellt. *orfX* und *orfY* kodieren möglicherweise für Transferkomponenten und sind braun unterlegt. *oriT* ist rosa markiert.

pIP501 wurde aus verschiedenen Gründen für diese Arbeit gewählt: Es ist ein ziemlich kleines konjugatives Plasmid (ca. 30,6 kb) und seine komplette DNA Sequenz ist bekannt. Seine Multiresistenzgene stellen ein interessantes Merkmal zur Untersuchung des Antibiotikaproblems dar. pIP501 ist ein konjugatives Plasmid, das andere Plasmide wie pMV158 mobilisieren kann. Seine Replikation- und „*copy number*“-Kontrollsysteme sind gut untersucht (z.B. Brantl and Wagner, 1997). Drei der von pIP501 kodierten *Tra*-Proteine zeigen Homologien zu T4SS-Komponenten. ORF5 ist homolog zu VirB4, ORF7 ist homolog zu VirB1 und ORF10 weist Ähnlichkeiten mit dem Kopplungsprotein VirD4 auf (Kurenbach *et al.*, 2003; Grohmann *et al.*, 2003; Grohmann, 2006). Außerdem konnte für ORF1 bereits Relaxaseaktivität nachgewiesen werden (Kurenbach *et al.*, 2002). Die Relaxaseaktivität ist in dem N-terminalen Ende von ORF1 lokalisiert, das vollständige ORF1 Protein und seine N-terminale Domäne ORF1_{N246} konnten die superhelikale pIP501-DNA *in vitro* spalten. *Small-angle X-ray scattering* (SAXS) und Glutaraldehyd *cross-linking* Studien zeigten, dass ORF1

und ORF1N₂₄₆ Dimere in Lösung bilden (Kopeć *et al.*, 2005). Weitere Studien wiesen nach, dass die Transkription der pIP501 *tra*-Region durch ORF1 negativ reguliert wird (Kurenbach *et al.*, 2006).

1.9 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die folgenden Schwerpunkte bearbeitet werden:

- I. Der Mechanismus des konjugativen Gentransfers in G+ Bakterien soll am Beispiel des Plasmids pIP501 aus *Streptococcus agalactiae* untersucht werden. Um dieses Ziel zu erreichen, sind die folgenden Experimente geplant:
 - Die 15 *tra*-Gene des konjugativen Plasmids pIP501, die vermutlich das Gentransfersystem kodieren, sollen mit PCR amplifiziert und in die Y-2H Plasmide pBTM117c und pGAD426 kloniert werden. Anschließend sollen die rekombinanten Plasmide (pBTM117c-*orfX*/pGAD426-*orfY*) in die Hefezellen des Stammes *S. cerevisiae* L40ccU transformiert werden. Ein *in vivo screening* für alle möglichen Protein-Protein Interaktionen soll durchgeführt werden.
 - Die Stärke der mit dem qualitativen *Yeast Two-Hybrid* System festgestellten Interaktionen soll mit einem quantitativem Y-2H Test gemessen werden.
 - Um die *in vivo* nachgewiesenen Protein-Protein Wechselwirkungen *in vitro* zu verifizieren, werden die Gene, die für die interagierenden Tra-Proteine kodieren, in die Expressionsplasmide pQTEV, pGEX-6P-2 oder pMAL-c2x kloniert und die entsprechenden His-, GST- bzw. MBP-Fusionsproteine exprimiert und solubilisiert.
 - *In vitro* Protein-Protein Bindungsstudien zwischen den solubilisierten Fusionsproteinen sollen mit *pull-down* Assays durchgeführt werden. Die entstehenden Proteinkomplexe werden mittels Affinitätschromatografie isoliert und mit spezifischen Antikörpern detektiert.
 - Anhand der *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse und der Computervorhersagen für die Lokalisierung der Tra-Proteine soll eine Protein-Protein Interaktionskarte für die pIP501 Transferproteine erstellt werden.
 - Einzelne Tra-Proteine des Plasmids pIP501, die Homologien zu T4SS-Komponenten zeigten, wie ORF5 und ORF10, sollen auf ihre Funktion mit biochemischen Tests untersucht werden.
- II. Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen ausgewählten Proteinen des pathogenen Bakteriums *E. faecalis* V583, z.B. von Cbp, CylB, Fbp, Hemolysin, Orfde11 und ScrB-2 sollen mit humanen Proteinen aus Intestinalzellen mittels eines automatisierten *Yeast-Two-Hybrid* Systems untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Agar Agar	Roth
Agarose	Roth
Ampicillin	Merck
APS (Ammoniumpersulfat)	BioRad
Bicin	Sigma
BugBuster® HT (Lysepuffer)	Novagen
β-Mercaptoethanol	Merck
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	Promega
Bromphenolblau	Merck
Chloramphenicol	Sigma
<i>Coomassie brilliant blue</i>	Serva
DMF	Roth
DMSO	Sigma
CPRG	Sigma
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Roth
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Biomol
dNTPs	Roche Diagnostics
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Merck
Galaktose	Roth
Glukose	Merck
Glutaraldehyd	Roth
Glyzin	Roth
Glyzerin	Roth
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	Serva
HEPES	Serva
<i>Herring Testes Carrier DNA</i>	Beckton Dickinson
Histidin	Sigma
Imidazol	Qiagen

IPTG (Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid)	Merck
Kaliumchlorid	Roth
L-Aspartat	Merck
Lithiumacetat	Roth
<i>Low melting</i> Agarose	AppliChem
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Roth
Maltose	Sigma
Methanol	Roth
Minisart Sterilfilter	Sartorius
Natriumchlorid	Sigma
Natriumcitrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
PEG 4000	Roth
Ponceau S	Merck
Raffinose	Sigma
Sorbitol	Merck
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth
TNP-ATP (2'(oder-3')-o-Trinitrophenyl-ATP)	Molecular Probes
Tris-(Hydroxymethyl-)aminomethan	Roth
Triton X-100	BioRad
Trypton	Serva
Tween 20	Sigma
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid)	Sigma
<i>Yeast nitrogen base without amino acids</i>	Difco

2.1.2 Kits und Hilfsmittel

Accutran [®] <i>replica plater</i>	Schleicher & Schuell
Amicon [®] <i>Ultra-4 Centrifugal Filter Device</i>	Millipore
<i>Amylose Magnetic Beads</i>	New England Biolabs
<i>Bulk GST Purification Module</i>	Amersham
Computerprogramm <i>EasyWin 32</i>	Herolab
Dialyseschlauch 1-8/32"	Medical International LTD
<i>ECL-Western blotting substrate</i>	Pierce
Elektroporation Cuvettes PLUS [™]	BioRad
Filme für Videodokumentationssystem	Mitsubishi
<i>GeneElute[™] Plasmid Miniprep Kit</i>	Sigma
HiTrap Heparin <i>column</i>	Amersham Biosciences
Ni ²⁺ -NTA <i>Spin Columns</i>	Qiagen

Nitrocellulosemembran (0,45 µM)	BioRad
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen
Wizard SV Gel and PCR Clean-up System	Promega

2.1.3 Enzyme

<i>Gentherm</i> TM DNA Polymerase [5 U/µL]	Rapidozym
<i>Genscript Taq</i> DNA Polymerase [5 U/µL]	GenScript Corporation
Lysozym	Merck
T4-DNA-Ligase [1 U/µL]	Roche Diagnostics

Die Restriktionsendonukleasen [10 - 12 U/µL] wurden von der Firma Promega bezogen.

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Ursprungsorganismus
<i>EcoRI</i>	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	<i>Escherichia coli</i> RY 13
<i>NotI</i>	5'-GCGGCCGC-3' 3'-CGCCGGCG-5'	<i>Nocardia otitidis caviarum</i>
<i>SaII</i>	5'-GTCGAC-3' 3'-CAGCTG-5'	<i>Streptomyces albus</i> G

2.1.4 Antikörper und Standards

1 kb DNA ladder	New England Biolabs
1 kbp Plus DNA ladder	Invitrogen
100 bp DNA ladder	Promega
Anti-GST HRP Konjugat	Roche Diagnostics
Anti-MBP HRP Konjugat	New England Biolabs
Anti-Penta-His HRP Konjugat	Qiagen
Low range molecular weight Standard für Proteingele	BioRad
Seeblue [®] plus2 prestained Proteinstandard	Invitrogen

Größenangaben und Abbildungen der DNA- und Protein-Standards sind im Anhang C beigefügt.

2.1.5 Geräte

Centrifuge 5714	Eppendorf
Fluoreszenzphotometer RF-5001 PC	Shimadzu
DU 64 Spektralphotometer	Beckman
Electrophoresis Power Supply	BIOTEC-FISCHER
Geltrockner 443 Slab dryer	BioRad
Genpulser [®] II	BioRad
Hybridisierungsöfen OV 3	Biometra
Inkubator 30°C	Memmert
Inkubator 37°C	Heraeus
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand
Microfuge [®] Centrifuge	Beckman
Mini Protean [®] 3	BioRad
Mini Protean [®] II	BioRad
pH Meter HI 931400	HANNA instruments
RC-5B Refrigerated Centrifuge	SORVALL
Küvetten-Test [®] Photometer	Dr. Lange
Speed Vac Concentrator	SAVANT
Sterilbank Herasafe (HS12)	SORVALL
Sub [™] DNA Cell	BioRad
T _B 1 Thermoblock	Biometra
Thermocycler Primus 96 Plus	MWG Biotech
Thermocycler Primus	MWG Biotech
Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultraschallbad Transsonic 820/H	Elma [®]
UV-Bildschirm TI 1	Biometra
UV-Kamera	Herolab
Video Dokumentationssystem ICU-1/SU-1	Herolab
Voltage Power Pack PP 4000	Biometra
Vortexgerät Reax 2000	Heidolph
Wasserbad Ecoline RE 106	LAUDA

2.1.6 Mikroorganismen

Spezies und Stamm	Genotyp, Beschreibung	Quelle/Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
XL 10	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ <i>173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96</i>	Stratagene

	<i>relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15</i> Tn10(Tet ^R) Amy Cam ^R]	
BL21-CodonPlus-RIL	F' <i>ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^R gal</i> <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW</i> Cam ^R]	Stratagene
JM 109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44</i> <i>relA1 Δ(lac-proAB)/F'</i> [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q</i> <i>lacZΔM15</i>]	Promega
XL1 Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17,</i> <i>supE44, relA1, lac</i> [F- <i>proAB lacI^qZΔM15</i> Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene
<i>Enterococcus faecalis</i>		
JH 2-2	Rif ^R , Fus ^R	Jacob and Hobbs (1974)
V583	<i>vanB</i> , Kan ^R , Sm ^R , β-Laktam-AB ^R Plasmide: pTEF1, pTEF2 und pTEF3	P. Courvalin, Institut Pasteur, Paris, Frankreich
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
L40ccU	Derivat von L40c (Wanker <i>et al.</i> , 1997) Uracil Prototrophie	E. Wanker, MDC, Berlin

Tab. 2.1: Verwendete Bakterien und Hefe Stämme.

2.1.7 Plasmide

Plasmid	Replikon	Größe [kb]	Beschreibung, Selektionsmarker	Quelle/Referenz
pIP501	pIP501	30,6	<i>tra⁺</i> , Cam ^R , MLS ^R	Evans und Macrina (1983)
pBTM117c	ColE1/2μ	9,3	P _{ADH1} , <i>LexA</i> , <i>TRP1</i> , Amp ^R , CAN1	E. Wanker, MDC, Berlin
pGAD426	ColE1/2μ	7,8	P _{ADH1} , <i>GAL4</i> , <i>LEU2</i> , CYH2 ^R , Amp ^R	E. Wanker, MDC, Berlin

pQTEV	pMB1/ColE1	4,8	P_{T4} , <i>lacI^q</i> , <i>his7</i> , Amp ^R	Scheich <i>et al.</i> (2004)
pGEX-6P-2	pBR322	4,9	P_{tac} , <i>lacI^q</i> , <i>gst</i> , Amp ^R	Amersham BioSciences
pMAL-c2x	pMB1/M13	6,7	P_{tac} , <i>lacI^q</i> , <i>malE</i> , Amp ^R	New England Biolabs

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide.

2.1.8 Nährmedien

Die verwendeten Medien wurden 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Für die Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium 1,5% Agar zugesetzt. Die Zugabe der entsprechenden Selektionsmarker, Ampicillin [100 µg/mL], Chloramphenicol [50 µg/mL] oder Tetracyclin [50 µg/mL] erfolgte nach Abkühlung der autoklavierten Medien auf 50°C unter sterilen Bedingungen.

Luria -Bertani (LB) Medium

Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L

SOB-Medium

Trypton	20 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	0,5 g/L

Vor der Verwendung wurden pro Liter SOB-Medium 10 mL steriles 2 M MgCl₂ und 10 mL steriles 1 M MgSO₄ hinzugefügt.

NZY-Medium

Caseinhydrolysat	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L

pH 7,5 mit HCl eingestellt

NZY⁺-Medium

NZY – Medium	1 L
1 M MgCl ₂	12,5 mL
1 M MgSO ₄	12,5 mL
2 M Glukose	10,0 mL

2 x YT-Medium

Trypton	18 g/L
Hefeextrakt	8 g/L
NaCl	5 g/L

Flüssiges YPD-Medium

Pepton	20 g/L
Hefeextrakt	10 g/L
Aqua bidest.	950 mL

pH 5,8 mit HCl eingestellt

Vor Verwendung wurden pro Liter YPD-Medium 50 ml 40% sterile Glukose zugegeben.

SD-Medium (*Synthetic Drop out*)

<i>Yeast nitrogen base without amino acids</i>	6,7 g/L
Agar-Agar	20 g/L
Aqua bidest.	850 mL

pH 5,8 mit NaOH eingestellt

Nach Abkühlung des Mediums auf 55°C, wurden 50 ml 40% sterile Glukose und 100 ml sterilfiltrierte 10 x *Drop out* (DO) Lösung zugegeben und in Petrischalen gegossen. Bei SD-Leu-Tryp-His/Gal/Raff Medium wurde die Glukose durch 2% Galaktose und 1% Raffinose ersetzt.

10 x *Drop out* (DO) Lösung

L-Isoleucin	0,3 g/L
L-Valin	1,5 g/L
L-Adenin Hemisulfat Salz	0,2 g/L
L-Arginin HCl	0,2 g/L
L-Histidin HCl Monohydrat	0,2 g/L

L-Leucin	1,0 g/L
L-Lysin HCl	0,3 g/L
L-Methionin	0,2 g/L
L-Phenylalanin	0,5 g/L
L-Threonin	2,0 g/L
L-Tryptophan	0,2 g/L
L-Tyrosin	0,3 g/L
L-Uracil	0,2 g/L

2.1.9 Synthetische Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech, Sigma und Operon bezogen.

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Position
I. Für die Klonierung in pBTM117c, pGAD426, pQTEV und pGEX-6P-2			
a) Für die pIP501 <i>tra</i>-Gene			
1.	orf1-SalI-fw	CTCGGGTCGACAAGAGAGGTGATACAATTGG	1378-1397 ^a
2.	orf1-NotI-rev	CGCTCGGGCCGCTTTATACACCTCTTGTTT	3385-3402 ^a
3.	orf2-SalI-fw	GGCGTCGACAGAGGTGTATAAAATGA	3390-3406 ^a
4.	orf2-NotI-rev	CCTGCGGCCGCTTCTCTATTAAGCAA	3728-3743 ^a
5.	orf3-SalI-fw	GCGGTCGACGAGAAGGGAGTTAGTTATG	3738-3756 ^a
6.	orf3-NotI-rev	TGGCGCGGCCGCACAATTAATCACCAC	4142-4157 ^a
7.	orf4-SalI-fw	GCGGTCGACAAGCGATACGATGAAAGA	4201-4218 ^a
8.	orf4-NotI-rev	CTTGCGGCCGCTCCTAACTATTCAAAAC	4769-4785 ^a
9.	orf5-SalI-fw	GCCTCGTCGACAATAGTTAGGAGCGTTAAA	4775-4793 ^a
10.	orf5-NotI-rev	TGCTCGCGGCCGCTCTCCCTTCTATTGAATTT	6745-6763 ^a
11.	orf6-SalI-fw	GGCGTCGACATTCAATAGAAGGGAGAAA	6747-6765 ^a
12.	orf6-NotI-rev	TTCGCGGCCGCAATCACCAACCTTCCTA	8119-8135 ^a
13.	orf7-SalI-fw	CCGTCGACATTTTCATATCA	33-43 ^b
14.	orf7-NotI-rev	CTCGCGGCCGCAACTCCATTTCTT	1160-1172 ^b
15.	orf8-SalI-fw	GCGGTCGACGGAAGAAATGGAGTTTGA	1158-1175 ^b
16.	orf8-NotI-rev	GGCGCGGCCGCTTCTACTCCTCCTCCTA	1703-1718 ^b
17.	orf9-SalI-fw	GGCGGTCGACAAGCATGGCGAAGAAGA	1717-1733 ^b
18.	orf9-NotI-rev	GCTTGCGGCCGCTAATAAACTAGTCA	2146-2160 ^b
19.	orf10-SalI-fw	GGCCTGTCGACGGGAAAATGACTAGTTTATTAGC	2138-2161 ^b
20.	orf10-NotI-rev	TGCTTGCGGCCGCCATTTGATTTCCCTCCGATCT	3801-3820 ^b
21.	orf11-SalI-fw	GGCGTCGACCGGAGGAAATCAAATGAA	3805-3822 ^b
22.	orf11-NotI-rev	GCTTGCGGCCGCTAAATCCATTAGTAAA	4734-4749 ^b
23.	orf12-SalI-fw	GCTTGTCGACGAGGTGTTACTAATGG	4728-4744 ^b
24.	orf12-NotI-rev	GCTTGCGGCCGCTCTCTTATTTTCTGA	5663-5678 ^b

25.	orf13-SalI-fw	GGCCGTCGACATTGTCTTATTATTTG	5689-5705 ^b
26.	orf13-NotI-rev	CCGGCGGCCGCTTTAGCGTATTTTCAGTT	6653-6669 ^b
27.	orf14-SalI-fw	GCGGTCGACGAGTGCTGAAACAATGGGA	6674-6692 ^b
28.	orf14-NotI-rev	GGCGCGGCCGCAATATGCTTTATCTGA	7048-7063 ^b
29.	orf15-SalI-fw	GCGGTCGACAGGAGAGAAGAAAATGAAA	7102-7120 ^b
30.	orf15-NotI-rev	GCTGCGGCCGCTTAATTAGATTCTCTT	7951-7968 ^b

b) Für die Klonierung der *vir*-Gene des *E. faecalis* V583 Stammes in pBTM117c

31.	cbp-SalI-fw	GCGGTCGACCACTTAACTGATAGAGAGGAAT	138817-138829 ^c
32.	cbp-NotI-rev	CGCGGCCGCAATTAATTATTAAGTTTCC	137672-137693 ^c
33.	cylB-SalI-fw	GCCGTCGACTATAAGAGGTGTAATTATGAA	161715-161735 ^c
34.	cylB-NotI-rev	GGCGCGGCCGCTTACACAATTATACGGACT	162532-162551 ^c
35.	fbp-SalI-fw	GCGGTCGACAAACGAGGGATTATTATG	1219437-1219455 ^c
36.	fbp-NotI-rev	CTGGCGGCCGCGTTTAATACAATTAGGAAGCAGA	1217716-1217738 ^c
37.	hemolysin-SalI-fw	GCGGTCGACTAAGGAGAGAGAGAACATTAT	653593-653613 ^c
38.	hemolysin-NotI-rev	CTGGCGGCCGCACTGATGTCACAGGTTATTT	654991-655011 ^c
39.	orfde11-SalI-fw	GCGGTCGACCGGAAGGAATAAGTATATGTT	11502-11522 ^c
40.	orfde11-NotI-rev	CTGGCGGCCGCTTCTCTCCTTATAGTACATCTG	12299-12320 ^c
41.	scrB-2-SalI-fw	GCGGTCGACGAGTAAAATATGGAATTATCT	55912-55933 ^c
42.	scrB-2-NotI-rev	CTGGCGGCCGCTATTAATATTCCAATTCAAAGTA	57341-57363 ^c

II. Für die Klonierung in pMAL-c2x

43.	orf4-EcoRI-fw	GCCGAATTCAGCGATACGAGGAAAGA	4202-4218 ^a
44.	orf4-SalI-rev	GCCGTCGACCTCCTAACTATTCAAAC	4769-4786 ^a
45.	orf5-EcoRI-fw	GCGGAATTCGTTAAA ACG GAG AAG ATA	4788-4805 ^a
46.	orf5-SalI-rev	GGCGTCGACTCCCTTCTATTGAAT TT	6745-6760 ^a
47.	orf7-EcoRI-fw	TCCGAATTCCTTCATATCATGGGA	34-48 ^b
48.	orf7-SalI-rev	CTCGTCGACAACTCCATTTCTTCCT	1157-1172 ^b
49.	orf7 Δ TMH-EcoRI-fw	TCCGAATTCCTAGCAACAGAA	178-189 ^b
50.	orf10-EcoRI-fw	GCGGAATTCATGACTAGTTTA	2145-2156 ^b
51.	orf10-SalI-rev	GCGGTCGACTTAAAATGGTAA	3789-3800 ^b

III. Für Sequenzierungen verwendete Primer

52.	pBTM-seq-fw	GTCGTTGACCTTCGTCAGCAG	956-976 ^d
53.	pBTM-seq-rev	AGCAACCTGACCTACAGG	1201-1218 ^d
54.	pGAD-seq-fw	TACCACTACAATGGATGATGT	758-778 ^c
55.	pGAD-seq-rev	GCACAGTTGAACTGAACTTGC	899-919 ^c
56.	pQTEV-seq-fw	CCCGAAAAGTGCCACCTG	4712-4729 ^f

57.	pQTEV-seq-rev	GTTCTGAGGTCATTACTGG	277-295 ^f
58.	pGEX-seq-fw	GGTCTGGCAAGCCACGTTTG	869-888 ^g
59.	pGEX-seq-rev	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	1035-1057 ^g
60.	pMAL-seq-fw	ACGCGCAGACTAATTCGAGC	2618-2637 ^h
61.	pMAL-seq-rev	AAGGCGATTAAGTTGGGTAACG	2778-2799 ^h
62.	orf1-550-seq-fw	TGTTTCTGAAATTCGTAAAG	1960-1979 ^a
63.	orf1-1125-seq-fw	AAGTTAGAGCAATGGTTAAT	2541-2560 ^a
64.	orf5-center-seq-fw	GCTGTTGAGGTATGCTAAAT	5236-5282 ^a
65.	orf5-center-seq-rev	CACGTTGTATCGCAAGTGGA	6241-6260 ^a
66.	orf10-center-seq-fw	ATCCACGCTATAACGAAGAAG	2650-2670 ^b
67.	orf10-center-seq-rev	GCTTTCTGACTTACTTCCGCT	3318-3338 ^b

Tab. 2.3: Verwendete Oligonukleotide.

Ausgetauschte Nukleotide oder eingefügte Schnittstellen am 5'-Ende sind fett gedruckt. ^a: Accession Number L39769, ^b: Accession Number AJ505823, ^c: *Enterococcus faecalis* V583 complete genome, Accession Number AE016830 oder NC 004668, ^d: pBTM117c-Sequenz (siehe Anhang A), ^e: pGAD426-Sequenz (siehe Anhang B), ^f: Accession Number AY243506, ^g: Accession Number U78873, ^h: Accession Number AX377531.

2.1.10 PCR-Programme

P1	94°C	2 min	
	94°C	1 min	} 15 x
	50°C	1,5 min	
	72°C	2 min	
	94°C	1 min	} 10 x
	55°C	1,5 min	
	72°C	2 min	
	94°C	1 min	
	55°C	1,5 min	
	72°C	7 min	
P2	94°C	1,5 min	} 30 x
	55°C	1,5 min	
	72°C	1,5 min	
	72°C	7 min	
P3	94°C	1,5 min	} 30 x
	54,5°C	2 min	
	72°C	2 min	
	72°C	10 min	

P4	94°C	1,5 min	} 30 x
	62°C	2 min	
	72°C	2 min	
	72°C	10 min	
P5	95°C	3 min	} 15 x
	95°C	0,5 min	
	54°C	0,5 min	
	72°C	1 min	
	95°C	0,5 min	} 20 x
	57°C	0,5 min	
	72°C	1 min	
	72°C	5 min	
P6	94°C	1,5 min	} 30 x
	58°C	2 min	
	72°C	2 min	
	72°C	10 min	
P7	94°C	1,5 min	} 30 x
	62°C	2,5 min	
	72°C	2,5 min	
	72°C	10 min	
Fun.cyc	95°C	2 min	} 35 x
	94°C	0,5 min	
	52°C	1,5 min	
	72°C	1,75 min	
	72°C	10 min	

2.1.11 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden in bidest. Wasser angesetzt und wenn erforderlich sterilisiert.

2.1.11.1 Allgemeine Lösungen

TE 10/0,1 Puffer

10 mM TRIS/Cl pH 8,0

0,1 mM EDTA pH 8,0

50 x TAE Puffer

2 M TRIS/Cl

50 mM EDTA pH 8,0

1 M Essigsäure

Als Gelpuffer für die Agarosegelelektrophorese wurde 1 x TAE und für den Laufpuffer $1/2$ x TAE eingesetzt.

6 x Loading Dye

0,25% (w/v) Bromphenolblau

30% (v/v) Glyzerin

Lysozymlösung

0,1 g Lysozym

10 mL TE 10/0,1

Lysepuffer (zur Vorbereitung des pIP501-Lysates)

50 mM NaOH

0,25% (v/v) SDS

TELT-Puffer

50 mM TRIS/Cl pH 7,5

2,5 mM EDTA pH 8,0

2,5 M LiCl
0,4% (v/v) Triton X-100

2.1.11.2 Puffer und Lösungen für das *Yeast Two-Hybrid* System

10 x TE Puffer

0,1 M TRIS/Cl
10 mM EDTA
pH 7,5

Mix 1

0,5 mL 10 x TE Puffer (pH 7,5)
5,0 mL 2 M Sorbitol
1,0 mL 1 M Lithium Acetat
3,5 mL Aqua bidest.

Mix 2

1,5 mL 10 x TE Puffer (pH 7,5)
1,5 mL 1 M Lithium Acetat
10 mL 50% PEG 4000

Z-Puffer

16,1 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{x H}_2\text{O}$
5,5 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 7\text{x H}_2\text{O}$
0,75 g/L KCl
0,246 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{x H}_2\text{O}$
pH 7,0

X-Gal Lösung

50 mg/mL X-Gal in N, N-Dimethylformamid (DMF)

Z-Puffer/X-Gal Mischung

100 mL	Z-Puffer
0,275% (v/v)	β -Mercaptoethanol
0,67% (v/v)	X-Gal Lösung

Die Mischung wird erst kurz vor Gebrauch hergestellt.

Puffer 1

2,38%	HEPES
0,9%	NaCl
0,065%	L-Aspartat
1%	BSA
0,05% (v/v)	Tween 20

Puffer 2

2,23 mM CPRG in Puffer 1

2.1.11.3 Puffer und Lösungen für Proteinanalysen**Cracking Puffer**

50 mM	TRIS/Cl pH 6,8
2 mM	EDTA pH 8,0
143 mM	β -Mercaptoethanol
2% (v/v)	SDS
10% (v/v)	Glyzerin
0,1% (w/v)	Bromphenolblau

5 x SDS Laufpuffer

125 mM	TRIS/Cl
1,25 M	Glyzin
0,5% (v/v)	SDS

Coomassie Färbelösung

7,5% (v/v)	Eisessig
50% (v/v)	Methanol
0,25% (w/v)	<i>Coomassie brilliant blue</i>

Entfärbelösung für SDS-PAGE

100 mL	Eisessig
300 mL	Methanol
600 mL	Aqua dest.

2.1.11.4 Puffer für die Solubilisierung von Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen**Puffer 1**

10 mM	TRIS/Cl pH 8,5
100 mM	NaCl
1 mM	EDTA

Puffer 5

100 mM	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄
50 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
1% (v/v)	Triton X-100
	pH 7,0

2.1.11.5 Puffer für die Reinigung der His-Tag-Fusionsproteine über Ni²⁺-NTA *spin columns* unter nativen Bedingungen**Lysepuffer**

50 mM	NaH ₂ PO ₄
300 mM	NaCl
10 mM	Imidazol
	pH 8,0

Waschpuffer

50 mM	NaH ₂ PO ₄
300 mM	NaCl
20 mM	Imidazol
	pH 8,0

Elutionspuffer

50 mM	NaH ₂ PO ₄
300 mM	NaCl
250 mM	Imidazol
	pH 8,0

2.1.11.6 Puffer für die Reinigung der MBP-Fusionsproteine mittels *Amylose magnetic beads***MBP Bindepuffer**

200 mM	NaCl
20 mM	TRIS/Cl pH 7,4
1 mM	EDTA
1 mM	DTT

MBP Elutionspuffer

10 mM Maltose in MBP Bindepuffer

2.1.11.7 Puffer für die Reinigung der GST-Fusionsproteine unter nativen Bedingungen**10 x PBS**

1,4 M	NaCl
27 mM	KCl
101 mM	Na ₂ HPO ₄
18 mM	KH ₂ PO ₄
	pH 7,3

GST Elutionspuffer

50 mM TRIS/Cl pH 8,0

10 mM Glutathion

2.1.11.8 Puffer und Lösungen für immunologische Reaktionen**10 x Blot Puffer Stammlösung**

140 g/L Glyzin

30 g/L TRIS/Cl

1 x Blot Puffer

100 mL 10 x Blot Puffer

200 mL Methanol

1 mL 10% SDS

ad 1 L Aqua dest.

10 x Ponceau Färbelösung

2% (w/v) Ponceau S

30% (w/v) Trichloressigsäure

30% (w/v) Sulfosalicylsäure

ad 100% Aqua dest.

TBS (TRIS buffered Saline)

10 mM TRIS/Cl pH 7,5

150 mM NaCl

TBS/Tween/Triton Puffer

20 mM TRIS/Cl pH 7,5

500 mM NaCl

0,05% (v/v) Tween 20

0,2% (v/v) Triton X-100

***Blocking* Puffer**

3% (w/v) BSA

0,1% (v/v) Tween 20

in TBS Puffer

Antikörper Lösung

Die Antikörper wurden 1:1000-1:5000 in 5 mL *Blocking* Puffer verdünnt.

2.1.11.9 Puffer für die ATP-Bindung

Puffer H

40 mM Tris/Cl pH 8,7

20 mM NaCl

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Plasmid-DNA Transformation in *E. coli* mit Hitzeschock

Die Stämme *E. coli* XL 10 und *E. coli* JM 109 sind bereits vom Hersteller kompetent erhalten worden. Bei den XL 10 Zellen handelt es sich um speziell für die Transformation großer DNA Moleküle entwickelte ultrakompetente *E. coli*-Zellen. Die Transformation der Ligationsprodukte in die *E. coli*-Stämme XL 10 und JM 109 erfolgte nach Angaben des Herstellers. 200 µl des Transformationsansatzes wurden anschließend pro selektive LB-Agar-Platte mit Ampicillin [100 µg/mL] als Selektionsmarker plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.2 Herstellung kompetenter *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL Zellen und Elektroporation von Plasmid-DNA

Dieser Stamm wurde für die Expression der Tra-Proteine benutzt, die in *E. coli* XL 10 nicht oder nur schwach exprimiert werden konnten. *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL weist eine effiziente Expression für Proteine aus G+ Bakterien auf. Zu diesem Zweck wurden kompetente Zellen von *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL hergestellt, welche mittels Elektroporation transformiert werden konnten. 250 mL selektives LB-Medium wurden mit 0,5 mL einer Übernachtskultur beimpft und bei 200 rpm und 37°C geschüttelt, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht hatte. Die darauf folgenden Arbeitsschritte wurden alle auf Eis bzw. bei 4°C unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zentrifugiert wurde stets bei 5000 rpm für 10 Minuten. Zuerst wurde die Kultur 30 Minuten lang auf Eis abgekühlt, dann zentrifugiert und das Pellet in 200 mL bidest. Wasser resuspendiert. Dann wurde zentrifugiert, das Pellet in 100 mL Aqua bidest. resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 4 mL 10% Glycerin resuspendiert, zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und das erhaltene Pellet in 500 µL 10% Glycerin resuspendiert und in je 50 µl Aliquots in 1,5 mL Eppendorfgefäße verteilt. Die kompetenten Zellen können bei -80°C für ein paar Monate gelagert oder direkt benützt werden (eine über Nacht Lagerung der kompetenten Zellen bei 4°C kann die Effizienz der Elektroporation erhöhen).

Für die Transformation wurden 50 µL der kompetenten Zellen mit 3 µL der zu transformierenden DNA luftblasenfrei in eine 1 mm Elektroporationsküvette überführt. Am Elektroporationsgerät wurden folgende Prozessparameter eingestellt: 16 kV/cm, 25 µF und

200-400 Ω . Direkt nach dem elektrischen Puls erfolgte die Zugabe von 1 mL 37°C warmem SOC Medium in die Kuvette (Eine einminütige Verzögerung kann hier die Effizienz der Transformation um 90% reduzieren). Danach kam der gesamte Ansatz in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß und wurde für 30 Minuten bei 200 rpm und 37°C geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die transformierten Zellen auf selektive LB-Agar-Platten mit Ampicillin [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] und Chloramphenicol [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$] als Selektionsmarker ausplattiert (200 $\mu\text{L}/\text{Platte}$) und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.3 Transformation der Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae* L40ccU

Zur Herstellung von kompetenten Hefezellen wurden 5 ml YPD-Medium mit einer Hefekolonie von *S. cerevisiae* L40ccU beimpft und bei 200 rpm und 30°C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurden frische 30 mL YPD-Medium mit 1,5 mL der Übernachtskultur beimpft und bei 200 rpm und 30°C geschüttelt, bis die Kultur eine OD_{600} von 0,6 erreicht hatte. Die Kultur wurde in Eppendorfgefäße verteilt (1,5 mL/Gefäß) und bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und das Pellet mit 400 μl 1 x TE Puffer (pH 7,5) gewaschen. Zum Entfernen des Waschpuffers wurde der Ansatz unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in 60 μl Mix 1 resuspendiert und bei RT für 10 Minuten inkubiert. Während der Wartezeit wurde die folgende Mischung in einem neuen Eppendorfgefäß vorbereitet: 200 ng Plasmid-DNA, 20 μl *herring testes carrier*-DNA und 250 μl Mix 2. Als die 10 Minuten um waren, wurden die Zellen in der vorbereiteten Mischung resuspendiert und bei 30°C für 30 Minuten geschüttelt. Anschließend wurden 35 μl DMSO pro Gefäß zugegeben und bei 42°C für 15 Minuten im Wasserbad inkubiert. Schließlich wurden die Hefezellen für 30 Minuten auf Eis gestellt. Zum Selektieren für Hefezellen, die die beiden Plasmide pBTM117c und pGAD426 enthalten, wurden die Transformanten auf SD-Leu-Tryp Platten plattiert (200 $\mu\text{L}/\text{Platte}$). Nach einer Inkubation für 2-3 Tage bei 30°C wurden die gewachsenen Kolonien mit dem Accutran[®] *replica plater* auf SD-Leu-Tryp-His/Gal/Raff Platten überstempelt und 3-10 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.1.4 Anzucht von *E. coli* in Flüssigmedium

Einzelne *E. coli* Kolonien wurden mit einer sterilen Impföse in 5 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C unter Rotation (200 rpm).

2.2.1.5 Kultivierung für die Stammsammlung

Zum Konservieren von *E. coli* Stämmen, die rekombinante Plasmide enthalten, wurden 5 mL frisches LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit 1% einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,3 – 0,4 inkubiert. Die Kultur wurde mit sterilem Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 20% versetzt und erneut bei 37°C und 200 rpm für 10 Minuten geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde in 1,5 mL Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die tiefgefrorenen Bakterienkulturen bei –80°C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

a. Für präparative Zwecke und Sequenzreaktionen

Für Sequenzierungen oder für Anwendungen, wo nicht sehr große Mengen von Plasmid-DNA erforderlich sind, wurde das *Kit GeneEluteTM Plasmid Miniprep* von Sigma verwendet. Die Bakterienzellen wurden einer alkalischen Lyse unterzogen. Anschließend wurde die DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Silikat-Matrix gebunden. Schließlich wurde die Plasmid-DNA mit 50 µL sterilem, bidest. Wasser eluiert (die Isolation ergab ca. 5-10 µg Plasmid-DNA). Für größere Ansätze wurde das Qiagen Plasmid Maxi *Kit* verwendet, die DNA-Ausbeute war hier ca. 100 µg.

b. Für analytische Zwecke

Für den Nachweis von rekombinanten Plasmiden wurde die Microquick TELT-Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA verwendet. Zuerst wurden die Kandidaten mit einer sterilen Impföse auf in 8-10 Sektoren unterteilte selektive LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der über Nacht gebildete Bakterienrasen wurde mit einem sterilen Spatel abgetragen und in einer sterilen 0,9% NaCl-Lösung (500 µl) suspendiert. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei 2000 rpm pelletiert und das Pellet anschließend in 200 µL TELT-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µL Lysozym (10 mg/mL) erfolgte eine Inkubation bei 95°C für 3 Minuten, anschließend wurden die Proben 5 Minuten auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 4°C, 15000 rpm) wurde die Plasmid-DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 100 µL Isopropanol gefällt (30 Minuten, 4°C, 13 000 rpm). Das DNA-Pellet wurde mit Ethanol (70%) gewaschen und bei RT für 15 Minuten getrocknet. Schließlich wurde die Plasmid-DNA in 50 µL sterilem bidest. Wasser gelöst.

2.2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Agarose ist das wichtigste Trägermaterial für die Elektrophorese von Nukleinsäuren. Es handelt sich um ein Polymer, das aus verknüpften Galaktoseeinheiten besteht.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle wird dabei von mehreren Faktoren beeinflusst: Der Form der DNA (superhelikal, offen-zirkulär, linear doppelsträngig, einzelsträngig), der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung sowie der Wahl des Laufpuffers. DNA in ihrer superhelikalen Form wandert hierbei schneller als in ihrer zirkulären oder linearen Form. In dieser Arbeit wurden Agaroseflachbettgele mit einer Agarosekonzentration von 0,7%-1,5% eingesetzt. Als Gelpuffer diente 1 x TAE, als Laufpuffer ½ x TAE. Zum Beladen des Gels wurden die Proben mit 6 x *loading dye* versetzt. Plasmide oder große DNA-Fragmente wurden auf 0,7%ige Agarosegele aufgetragen und bei 90 V für 90 Minuten laufen gelassen. Kleine DNA-Fragmente (<1 kb) wurden auf höherprozentigen Gelen (1-1,5%) bei 120 V für 60 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion wurden die Gele nach der Elektrophorese für 20 Minuten in Ethidiumbromid Lösung (Endkonzentration 2,5 µg/mL) gefärbt. Das fluoreszierende Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäuren, die dann im UV-Licht sichtbar gemacht werden können. Die Geldokumentation erfolgte mit einem Geldokumentationssystem von Herolab.

2.2.2.3 DNA-Reinigung mittels *Low-melting* Agarosegelen (LM)

Zur Reinigung von PCR-Fragmenten von unspezifischen PCR-Produkten oder von linearisierten Plasmiden wurde standardmäßig LM Agarose eingesetzt. Im Gegensatz zu Standardagarosegelen, die erst bei 90°C schmelzen können, verflüssigen LM-Agarosegele bereits bei ca. 60°C, einer nicht denaturierenden Temperatur für die DNA. Es ist somit möglich, die Reinigung der empfindlichen DNA über Agarose-Gelelektrophorese unter relativ milden Bedingungen durchzuführen.

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung der zu reinigenden DNA auf 0,7%iger LM-Agarose bei 60 V für 3 Stunden, wurde die gewünschte Bande aus dem LM-Agarosegel herausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 5 Minuten bei 60°C zum Schmelzen inkubiert. Die Elution der DNA erfolgte anschließend mit dem *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 50 µL DNase-freiem Wasser eluiert.

2.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Es ist sehr wichtig für eine erfolgreiche Ligation, dass die Ligationspartner in einem bestimmten molaren Verhältnis eingesetzt werden. Deswegen müssen die gereinigten Plasmide und PCR-Produkte vor der Ligation genau quantifiziert werden. Dafür wurde eine definierte Menge eines DNA-Standards sowie die zu bestimmende DNA-Probe auf ein Agarosegel aufgetragen und der Größe nach aufgetrennt. Das Agarosegel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Licht fotografiert und als TIF-Datei gespeichert. Die Konzentration der DNA wurde mit Hilfe des Computerprogramms *EasyWin 32* der Firma Herolab durch den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Banden bestimmt (Abb. 2.1)

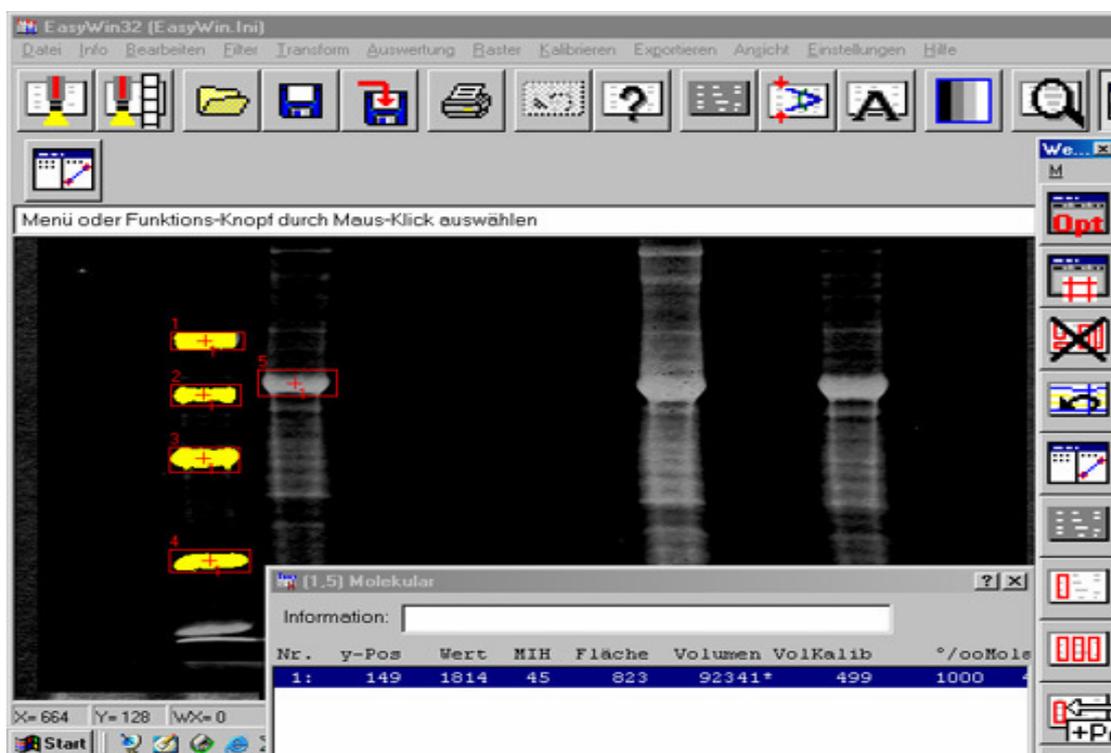


Abb. 2.1: Das Quantifizierungsprogramm *EasyWin 32*. DNA-Standard in gelb, zu bestimmende Bande in Spur daneben, rot umrahmt.

2.2.2.5 Herstellung von Zelllysaten als Matrize für die PCR

Eine Bakterienkolonie von *Enterococcus faecalis* JH 2-2 mit dem Plasmid pIP501 (zur Amplifizierung der *tra*-Gene) oder von *E. faecalis* V583 (zur Amplifizierung der *vir*-Gene) wurde in 20 μ L Lysepuffer transferiert und für 15 Minuten bei 95°C inkubiert. 2 μ L einer 1:10-Verdünnung des Lysats wurden dann als Matrize pro 50 μ l Ansatz verwendet.

2.2.2.6 Konzentrierung der DNA durch Ethanol-Fällung

Im Falle einer geringen Konzentration an DNA-Produkt, welche für die Ligation nicht ausreichend ist oder wenn der Puffer, in dem die DNA gelöst war, für eine bestimmte enzymatische Reaktion nicht geeignet war, wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt.

Zur Fällung wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumenanteil einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 4 Volumina absolutem Ethanol versetzt, durchmischt und über Nacht bei -20°C gehalten. Durch 30 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm ließ sich die DNA als Pellet gewinnen. Der ethanolische Überstand wurde verworfen und die DNA mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA, je nach weiterer Verwendung, in TE-Puffer oder DNase freiem Wasser gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.7 Konzentrierung der DNA mit Hilfe der Speed vac

Bei dieser Methode wurde die DNA in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und unter Vakuum (0,040 mbar) bei niedrigen Temperaturen (-55°C) im Lyophilisator bis zur Trockne einrotiert. Die getrocknete DNA wurde im Anschluss in weniger bidest. Wasser als zu Beginn des Prozesses resuspendiert und dadurch aufkonzentriert. Im Gegensatz zur Ethanol-Fällung wird die DNA hier nicht gereinigt.

2.2.2.8 Amplifizierung der *tra*- und *vir*-Gene mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) stellt eine Möglichkeit dar, kleinste Mengen eines DNA-Abschnitts zu vervielfältigen. Zuerst wird die doppelsträngige DNA (die Matrize) bei 94°C-96°C denaturiert. Dann hybridisieren ca 20-30 Basen lange Oligonukleotidprimer (Tab. 2.3) bei einer für jedes Primer-Paar charakteristischen Annealingtemperatur spezifisch an die Matrize. Im Elongationsschritt wird über die hitzestabile *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eine Kopie der Matrize synthetisiert, ausgehend vom 3'-OH-Ende des Primers (*Taq*-Polymerase funktioniert am besten bei ca. 72°C). Für die Amplifizierung der einzelnen *tra*-Gene von pIP501 wurden Polymerasekettenreaktionen, sofern nicht anders erwähnt, in 50 µL-Ansätzen durchgeführt. Standardansätze enthielten 40 pmol je Primer, 10 pmol dNTPs, 2–4 mM MgCl₂, 2,5 U *Taq*-Polymerase sowie 2 µL des entsprechenden Lysats als Matrize. Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte, sofern notwendig, mit dem *Kit Wizard PCR Preps DNA Purification System*. Die Pipettierschemen und die verwendeten Programme für die einzelnen *tra*-Fragmente sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst:

Gen	Bidest. H ₂ O	Puffer (10X)	MgCl ₂ (50 mM)	dNTPs (10 mM)	Fw- Primer (20 µM)	Rev- Primer (20 µM)	DNA	Taq- Polymerase (5 Units/µl)	Programm
I. Die <i>tra</i>-Gene des Plasmids pIP501									
<i>orf1</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P1
<i>orf2</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P2
<i>orf3</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P2
<i>orf4</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P2
<i>orf5</i>	33,5 µl	5 µl	4 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P3
<i>orf6</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P2
<i>orf7</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P2
<i>orf8</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P2
<i>orf9</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P2
<i>orf10</i>	37,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	1 µl	1 µl	2 µl	0,5 µl	P4
<i>orf11</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P2
<i>orf12</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P2
<i>orf13</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P2
<i>orf14</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P2
<i>orf15</i>	36,5 µl	5 µl	3 µl	1 µl	1 µl	1 µl	2 µl	0,5 µl	P5
II. Die <i>vir</i>-Gene des <i>E. faecalis</i> V583 Stammes									
<i>cbp</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P7
<i>cylB</i>	33,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P6
<i>fbp</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P6
<i>hemolysin</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P6
<i>orfde11</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P6
<i>scrB-2</i>	35,5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	P6

Tab. 2.4: Die Pipettierschemen und die verwendeten Programme für die einzelnen *tra*-/*vir*-Fragmente.

2.2.2.9 Klonierung der DNA-Fragmente in die Plasmide pBTM117c, pGAD426, pQTEV und pGEX-6P-2

Die DNA-Fragmente wurden mittels PCR mit Primern, die die Schnittstellen *SalI* am 5'-Ende und *NotI* am 3'-Ende anfügten, amplifiziert und mit dem *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* gereinigt. Dann wurden ca. 5 µg PCR-Fragment bzw. Plasmid mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *NotI* nach Angaben des Herstellers (Promega) für 3 Stunden bei 37°C geschnitten und mit dem selben *Kit* gereinigt (bei geringen Konzentrationen wurde zusätzlich eine Ethanol-Fällung gemacht). Die Y-2H bzw. die Expressionsplasmide wurden über Nacht bei 37°C mit *SalI* und *NotI* linearisiert und über ein LM Agarosegel zum Entfernen der ungeschnittenen Plasmidanteile gereinigt. Für die geschnittenen DNA-

Fragmente und die linearisierten Plasmide wurde vor der Ligation eine Konzentrationsbestimmung, wie im Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben, durchgeführt. ca. 100-200 ng Plasmid-DNA wurden mit 5 x molaren Überschuss von dem DNA-Fragment zusammengemischt und für 1 Minute bei 70°C denaturiert und dann für 10 Minuten auf RT gehalten. Nach Zugabe von 1 µL 10 x Ligationspuffer (1/10 des Gesamtvolumens) und 1 Einheit T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics), wurde der Ligationsansatz bei 14°C über Nacht inkubiert. 2 µl des Ligationsproduktes wurden in kompetente *E. coli* der Stämme XL 10 Gold (Stratagene) oder JM 109 (Promega) nach Angaben der Hersteller transformiert. Schließlich wurden die Zellen auf selektive LB-Platten mit Ampicillin [100 µg/mL] plattiert. Die rekombinanten Plasmide wurden mit Restriktion, PCR und Sequenzierung überprüft.

2.2.2.10 Klonierung der *tra*-Gene in das Plasmid pMAL-c2x

Für die Herstellung der Konstrukte pMAL-c2x-*tra* wurden die *tra*-Fragmente mit Primern, die die Schnittstellen *EcoRI* am 5'-Ende und *SalI* am 3'-Ende anfügten, amplifiziert. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit dem *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* gereinigt und mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SalI* (Promega) für 3 Stunden bei 37°C geschnitten und mit dem selben System gereinigt. pMAL-c2x wurde über Nacht bei 37°C mit *EcoRI* und *SalI* geschnitten und anschließend über ein LM Agarosegel gereinigt. Nach Quantifizierung des geschnittenen PCR-Produktes und des linearisierten Plasmids, wurden ca. 100-200 ng von pMAL-c2x/*EcoRI/SalI* mit 5 x Überschuss des DNA-Fragmentes, wie im Abschnitt 2.2.2.9 beschrieben, ligiert und transformiert.

2.2.2.11 Identifizierung der rekombinanten Plasmide

a. Mittels Plasmidisolierung und Restriktion

Zur Identifizierung der Transformanten, die das gewünschte Konstrukt tragen, wurden ca. 20 µL Plasmid-DNA aus der TELT-Präparation (Abschnitt 2.2.2.1) mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Restriktion erfolgte über die Schnittstellen, über die das DNA-Fragment in das Plasmid inseriert worden war. Standardmäßig wurden pro Ansatz 5 U je Enzym eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend über Agarosegelelektrophorese analysiert. Rekombinante Plasmide konnten über das Bandenmuster identifiziert werden. Plasmide mit Insert erschienen im Gel mit 2 Banden (Insert sowie linearisierter Vektor), im Gegensatz dazu ergaben Plasmide ohne Insert nur eine Bande im Gel. Für die kleinen DNA-Fragmente (<500 bp) wurde der Restriktion zusätzlich

RNase A zugegeben, RNase A degradiert die RNA und macht die kleinen DNA-Fragmente auf dem Agarosegel sichtbar.

b. Mittels α -Komplementierung

Bei einer α -Komplementierung ist das Gen der β -Galaktosidase in zwei Fragmente getrennt: Der N-Terminus (α -Fragment) ist auf dem Plasmidvektor codiert, der C-terminale Anteil (ω -Fragment) befindet sich auf dem Bakterienchromosom. Die Expression des α -Fragmentes wird unter die Kontrolle des *lac*-Repressors gestellt. Bei gleichzeitigem Vorhandensein von X-Gal und IPTG kann die β -Galaktosidase X-Gal spalten und eine tiefblaue Indigo-Verbindung entsteht (Abb. 2.4). Befindet sich die *multiple cloning site* (MCS) innerhalb des plasmidcodierten N-Terminus des *lacZ*-Gens wird durch die Insertion eines DNA-Fragmentes in die MCS das Leseraster des α -Fragmentes unterbrochen. Es findet keine α -Komplementierung statt, die Kolonien sind weiss gefärbt (*blue/white Screening*). Transformanten wurden mit sterilen Impfösen auf LB-Selektionsplatten mit Ampicillin, X-Gal und IPTG ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Weiß gefärbte Kolonien wurden anschließend über PCR bzw. Plasmidisolierung und Restriktion auf ein Insert untersucht.

c. Mittels Sequenzier-PCR

Für die Identifizierung von rekombinanten Plasmiden über PCR wurde der folgende PCR-*Mastermix* zusammenpipettiert:

PCR- *Mastermix* für 20 Kolonien

150 μ L	bidest. Wasser
20 μ L	10 x PCR-Puffer
8 μ L	[50 mM] MgCl ₂
4 μ L	[10 mM] dNTPs
8 μ L	[20 pmol/ μ L] Sequenzprimer-fw
8 μ L	[20 pmol/ μ L] Sequenzprimer-rev
2 μ L	[5 U/ μ L] <i>Taq</i> -Polymerase

Der *Mastermix* wurde dann zu je 10 μ L in PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Mit einer sterilen Impföse wurden die Reaktionsgefäße mit Zellen der zu untersuchenden Transformanten beimpft oder es wurde 0,5 μ l der TELT-DNA als Vorlage zugegeben. Die dazu verwendeten

Sequenzierprimer sind in der Tab. 2.3 gezeigt. Für die PCR wurde das PCR-Programm Fun.cyc gewählt (Abschnitt 2.1.10). Beim ersten Denaturierungsschritt lysieren die Zellen, die Plasmid-DNA liegt nun frei vor und kann amplifiziert werden. Zur Auswertung der PCR wurde der gesamte PCR-Ansatz auf ein Agarosegel geladen. Rekombinante Plasmide zeigten sich in einer Bande, die der Größe des Inserts + 300 bp entsprach, Plasmide ohne Insert ergaben eine ca. 300 bp große Bande.

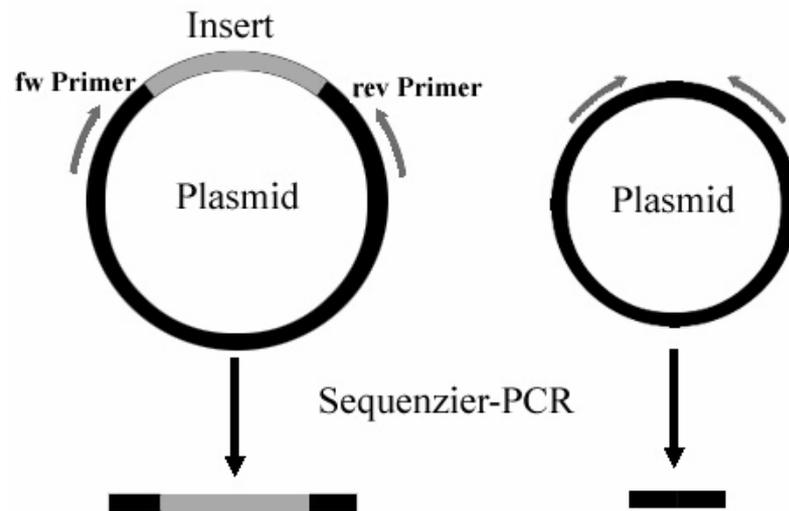


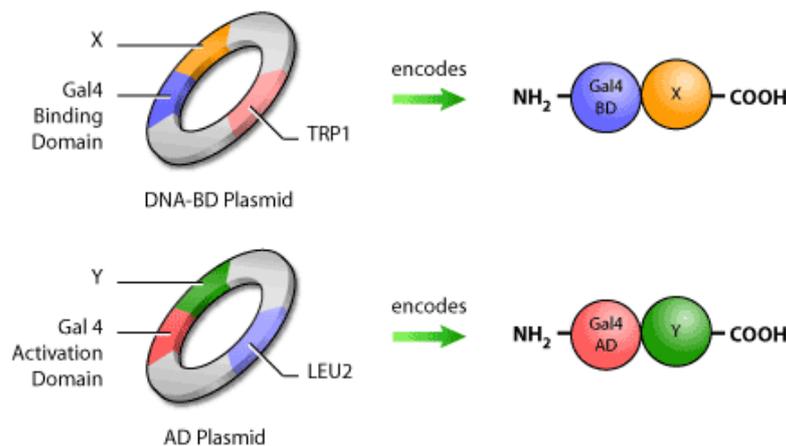
Abb. 2.2: Prinzip der Sequenzier-PCR.

d. Mittels zyklischer Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten nach dem *Cycle Sequencing* Prinzip, einer modifizierten Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Hierbei wird die zu sequenzierende DNA mit PCR amplifiziert. Zusätzlich zu dNTPs werden Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) in der PCR angeboten. Die vier ddNTPs, die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, führen nach Einbau in die DNA zu einem Kettenabbruch an der Einbaustelle. Die Sequenzier-PCR wurde mit dem *Big Dye Kit* der Firma Applied Biosystems nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit Ethanol gefällt. Das getrocknete Pellet wurde im Dunklen bei -20°C gelagert oder sofort zur Analyse an ein Sequenzierservice (SMB, Berlin) geschickt. Dort wurden die amplifizierten Bruchstücke über eine Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit entsprechender Software (ABI Prism 310 Data Collection Software, ABI Prism 310 DNA Sequencing Analysis Software, Gene Scan Analysis Software) analysiert.

2.2.2.12 Das Hefe Zwei-Hybrid System (*Yeast Two-Hybrid System*)

Beim Y-2H System handelt es sich um einen *in vivo* Test für den Nachweis von Protein-Protein Interaktionen. Man setzt einen transkriptionellen Aktivator ein, der aus zwei voneinander getrennten Domänen aufgebaut ist. Die erste heißt Aktivierungsdomäne (AD), die in räumlicher Nähe der zweiten Domäne sein muss, um aktiv zu sein. Die zweite Domäne heißt DNA Bindungsdomäne (BD), die an den Promotor für die zu untersuchenden Reportergene binden kann. Beide zusammen (BD und AD) ergeben den aktiven Transkriptionsfaktor, der die Transkription der Reportergene von einem Promotor auf *S. cerevisiae* L40ccU startet. Im Y-2H System benutzen wir 2 Plasmidvektoren: Das 1. Plasmid (pBTM117c-X in dieser Arbeit) kodiert für eine Fusion der BD mit einem der beiden zu testenden Proteine z.B. X. Das 2. Plasmid (pGAD426-Y) kodiert für eine Fusion der AD mit dem zweiten zu testenden Protein z.B. Y. Wenn X und Y interagieren, wird ein transkriptioneller Aktivator BD-X-Y-AD rekonstituiert, der die Reportergene *HIS3* und *LacZ* auf *S. cerevisiae* aktiviert (Abb. 2.3). Die Aktivierung von *LacZ* führt zur Biosynthese des Enzyms β -Galaktosidase, das X-Gal in 2 Moleküle, Galaktose und Hydroxyindol, spalten kann. Danach können sich 2 Hydroxyindol Moleküle miteinander zum Indigo Molekül verbinden, das blau ist, und somit werden die Hefezellen, die β -Galaktosidase bilden, blau (Abb. 2.4), während die Aktivierung von *HIS3* zur Biosynthese der Aminosäure Histidin führt, und somit können die Transformanten auf Histidin-freiem Medium wachsen.



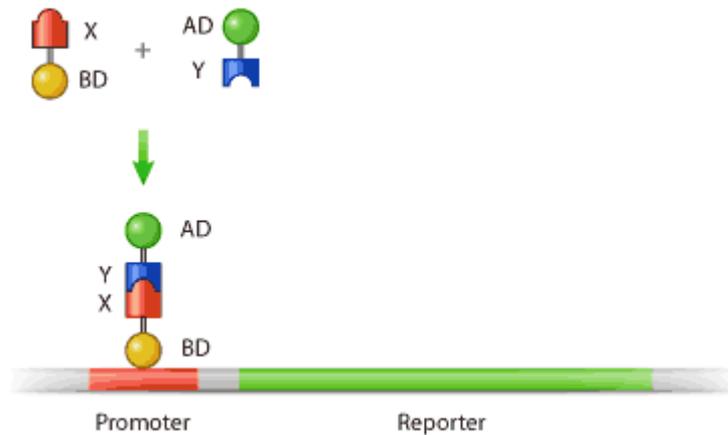


Abb. 2.3: Prinzip des *Yeast Two-Hybrid* Assays.

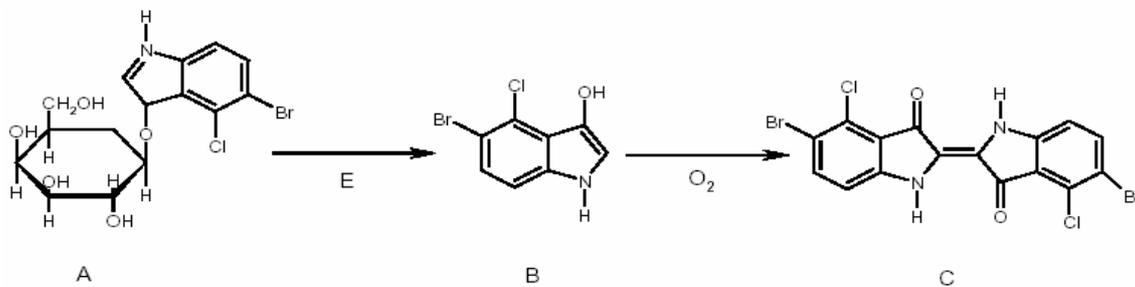


Abb. 2.4: Entstehung der blauen Farbe bei der Spaltung von X-Gal. 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (A) wird mit β -Galaktosidase (E) zu Galaktose und 5-Brom-4-chlorindoxyl (B) gespalten. Durch spontane Oxidation an der Luft entsteht das blaue 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo (C).

2.2.2.13 Qualitativer X-Gal Test (Kolonie-Lift Filter Assay)

Die entsprechenden Konstrukte der beiden zu testenden Proteine (pBTM117c-X/pGAD426-Y) wurden in die Hefezellen *S. cerevisiae* L40ccU, wie im Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, kotransformiert und anschließend auf SD-Leu-Tryp Medium zum Selektieren der Transformanten, die die beiden Plasmide enthalten, ausplattiert. Als positive Kontrolle wurden Hefezellen mit pBTM117c-*Sim1* und pGAD426-*Arnt* transformiert, während leere Plasmide ohne Inserts als negative Kontrolle dienten. Nach 2-3 tägiger Inkubation bei 30°C wurden die noch kleinen Kolonien mit einem Accutran[®] replica plater auf SD-Leu-Tryp-His/Gal/Raff Platten überstempelt und 3-10 Tage bei 30°C inkubiert.

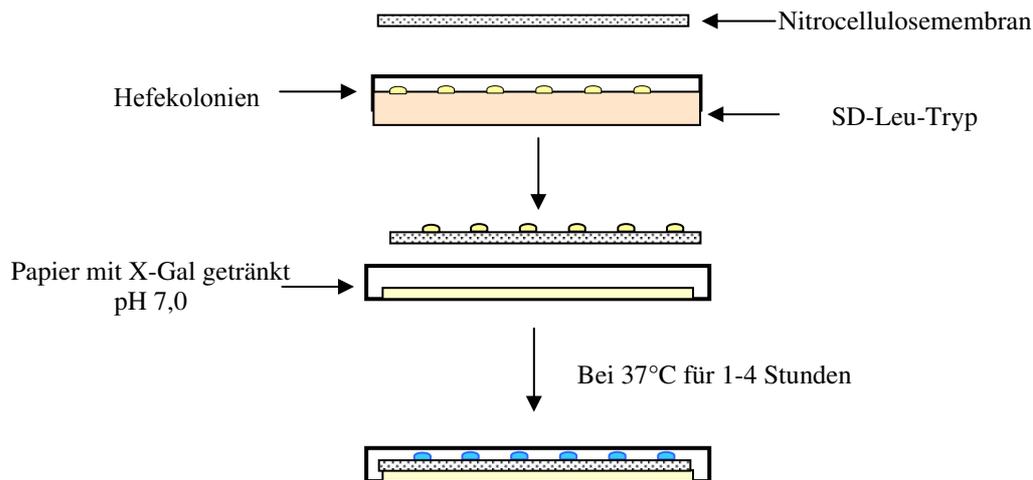


Abb. 2.5: Kolonie-Lift Filter Assay.

Von den SD-Leu-Tryp Platten wurden Replikafilter mit einer Nitrocellulosemembran (0,45 μM) gemacht. Anschließend wurden die dran haftenden Kolonien mit flüssigem Stickstoff für 10 Sekunden aufgeschlossen und bei RT zum Wiederauftauen inkubiert. Die Nitrocellulosemembran wurde mit den Kolonien nach oben auf mit Z Puffer/X-Gal getränktes Whatman Papier gelegt und bei 37°C inkubiert. Blaue Farbe der Kolonien zeigt Produktion von β -Galaktosidase und somit eine Interaktion zwischen den getesteten Proteinen an (Abb. 2.5).

2.2.2.14 Qualitativer X-Gal Test (flüssiges SD-Medium)

Die wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschriebenen transformierten Hefezellen wurden in 5 mL flüssigem SD-Leu-Tryp Medium angeimpft und bei 30°C für 2-3 Tage geschüttelt. 5 mL neues frisches SD-Leu-Tryp-His/Gal/Raff Medium wurde mit 50 μL der SD-Leu-Tryp-Kultur beimpft und bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 0,8-1,0 geschüttelt. Aus dieser Kultur wurden 1,5 mL Hefezellen entnommen und in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß bei 14000 \times g für 30 Sekunden zentrifugiert. Um das Pellet aufzuschließen, wurde das Eppendorfgefäß in flüssigem Stickstoff für 10 Sekunden schockgefroren und bei RT für 5 Minuten zum Auftauen inkubiert. Schließlich wurde das Pellet in 0,5 mL Z Puffer/X-Gal Lösung resuspendiert und bei 37°C geschüttelt. Bei Protein-Protein Interaktion wird das Pellet blau.

2.2.2.15 Quantitativer β -Galaktosidase Assay

Bei dem quantitativen β -Galaktosidase Test wird CPRG (Chlorphenol Rot- β -D-galactopyranosid) als Substrat statt X-Gal verwendet. Es handelt sich um eine gelbe Lösung, die durch die Spaltung mit β -Galaktosidase eine blutrote Farbe (Chlorphenol Rot) ergibt, die

bei $\lambda=578$ nm gemessen werden kann (Abb. 2.6). CPRG ist außerdem zehnmal empfindlicher als X-Gal zur Bestimmung der gebildeten β -Galaktosidase.

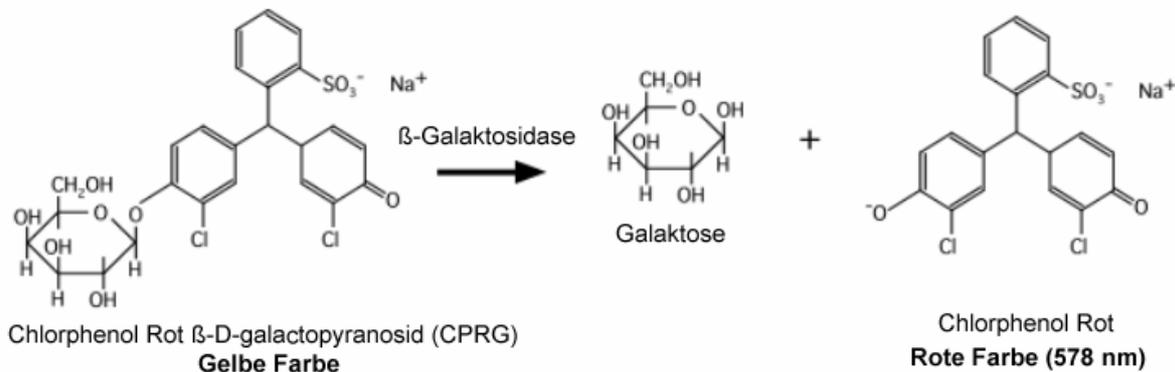


Abb. 2.6: Entstehung der roten Farbe bei der Spaltung von CPRG.

Der Test wurde so durchgeführt: Die transformierten Hefezellen wurden in 5 mL flüssigem SD-Leu-Tryp Medium angeimpft und bei 30°C für 2-3 Tage geschüttelt. 5 mL frisches SD-Leu-Tryp-His/Gal/Raff Medium wurden mit 50 μ L der SD-Leu-Tryp-Kultur beimpft und bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 0,8-1,0 geschüttelt. Aus dieser Kultur wurden 1,5 mL Hefezellen entnommen und bei 14000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,3 ml Puffer 1 resuspendiert. Zum Aufschließen wurde 0,1 ml der Suspension zweimal mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Die aufgeschlossenen Hefezellen wurden mit 0,7 ml Puffer 2 versetzt und zum Entwickeln der roten Farbe bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 0,5 ml 3 mM $ZnCl_2$ zugegeben. Zum Entfernen der *cell debris* wurde der Ansatz bei 14000 x g für 1 Minute zentrifugiert und der Überstand in eine Meßküvette überführt. Schließlich wurde die Extinktion bei 578 nm gemessen und die β -Galaktosidase Einheiten folgendermaßen berechnet:

$$\beta\text{-Galaktosidase Einheiten} = 1000 \times A_{578} / (t \times V \times A_{600})$$

t: Dauer der Inkubation in Minuten

V: 0,1 ml \times 5 (Verdünnungsfaktor)

A_{600} : Absorption der Kultur bei 600 nm

A_{578} : Absorption nach der Enzymreaktion bei 578 nm

2.2.2.16 Das automatisierte *Yeast-Two-Hybrid* System

Die ausgewählten *vir*-Gene (*cbp*, *cylB*, *fbp*, *hemolysin*, *orfde11* und *scrB-2*) wurden in den *binding domain* Vektor pBTM117c, wie in Abschnitt 2.2.2.9 beschrieben, eingebracht und in *E. coli* XL-10 Zellen vermehrt. Die Plasmid DNA des Konstruktes pBTM117c-*vir* wurde mittels *GeneElute Plasmid Miniprep Kit* aus *E. coli* isoliert, gereinigt (2.2.2.1) und an das

Max-Delbrück-Centre für Molekulare Medizin (MDC), Neuroproteomics, AG Professor Erich Wanker, Berlin-Buch übergeben. Dort wurde ein automatisiertes *Yeast-Two-Hybrid* System entwickelt, welches bereits erfolgreich zur Erstellung vollständiger Interaktionskarten von Protein-Protein-Wechselwirkungen bei der neurodegenerativen Erbkrankheit Chorea Huntington eingesetzt worden war. Die aufgereinigten Plasmide pBTM117c-*vir* wurden zunächst einzeln mit einem leeren AD-Vektor in *Saccharomyces cerevisiae* L40ccU transformiert, um den so entstandenen Klon auf Autoaktivierung der Reportergene zu testen. Autoaktivität zeigende Klone konnten nicht in den anschließenden cDNA-Bibliothek-Screen übernommen werden. Im automatisierten *Two-Hybrid-Screening* wurden mittels 384-well Mikrotiterplatten Protein-Protein-Interaktionen zwischen jedem der Vir-Proteine, dessen Gen in den Bindedomäne-Vektor pBTM117c eingebaut worden war, und einer cDNA-Bibliothek von ca. 8000 humanen Proteinen aus Gehirn-, Leber- und Nervenzellen im AD-Vektor (pGAD426) analysiert.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Ermittlung optimaler Proteinexpressionsbedingungen

Zur Optimierung der Expressionsbedingungen der verschiedenen Tra-Proteine, wurden *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL oder *E. coli* XL 10 Zellen mit dem entsprechenden Plasmid (pQTEV-*insert*, pMAL-c2x-*insert* bzw. pGEX-6P-2-*insert*) in 5 mL LB-Medium mit Ampicillin [100 µg/mL] (für beide Stämme) und Chloramphenicol [50 µg/mL] (zusätzlich für BL21-CodonPlus-RIL) inokuliert und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 ml frisches LB-Medium (mit den o.g. Antibiotika) mit 5% der Übernachtskultur beimpft und bei 30°C bzw. 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 (frühe exponentielle Wachstumsphase) bzw. 0,6-1,0 (späte exponentielle Wachstumsphase) inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG (0,3-2 mM Endkonzentration) induziert. Der Ansatz wurde anschließend für 4 Stunden oder über Nacht bei 30°C oder 37°C inkubiert. Nach jeweils 60 Minuten erfolgte eine Probenentnahme von 200 µL. Diese Proben wurden anschließend bei 5000 rpm, 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µL *Cracking* Puffer resuspendiert und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Als negative Kontrolle wurden *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL oder *E. coli* XL 10 Zellen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid (ohne Insert) demselben Verfahren unterzogen und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.2.3.2 Denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der denaturierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde die Proteinexpression analysiert. Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel betrug in allen Fällen 5%, für die Trenngele wurden Acrylamidkonzentrationen von 8-12% verwendet. Die Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele ist in der Tab. 2.5 dargestellt. Es wurden jeweils, falls nicht anders vermerkt, 25 μ L Probe geladen. Vom Proteinstandard *low range molecular weight* (BioRad) wurden immer 10 μ L (ca. 6 μ g Proteinmenge) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde zunächst für 10 Minuten mit 100 V betrieben, anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 180 V für 60 Minuten. Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in *Coomassie blue*-Färbelösung angefärbt und danach in Entfärbelösung entfärbt. Durch kurzzeitiges Erhitzen der Gele in der Färb-/Entfärbelösung mit der Mikrowelle, konnte die Färb- bzw. Entfärbzeit erheblich reduziert werden. Nach 60 Minuten war eine Auswertung der SDS- PAGE möglich.

Für 2 Trenngele	8%	10%	12%
H ₂ O dest.	4,7 mL	4,0 mL	3,3 mL
Acrylamid/ Bisacrylamid (29,2% / 0,8%)	2,6 mL	3,3 mL	4,0 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
SDS 10%	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
APS 10%	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
TEMED	0,005 mL	0,005 mL	0,005 mL
Für 2 Sammelgele		5%	
H ₂ O dest.		3,4 mL	
Acrylamid/ Bisacrylamid (29,2% / 0,8%)		0,83 mL	
1 M Tris-HCl (pH 6,8)		0,63 mL	
SDS 10%		0,05 mL	
APS 10%		0,05 mL	
TEMED		0,005 mL	

Tab. 2.5: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.3.3 Überexpression der Tra-Fusionsproteine

Nachdem die optimalen Proteinexpressionsbedingungen für die einzelnen Tra-Proteine mit dem in 2.2.3.1 beschriebenen Verfahren ermittelt worden waren, wurden *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL oder *E. coli* XL 10 Zellen mit entsprechendem Plasmid (pQTEV-*insert*, pMAL-c2x-*insert* bzw. pGEX-6P-2-*insert*) in 10 ml LB-Medium mit Ampicillin [100 µg/mL] (für beide Stämme) und Chloramphenicol [50 µg/mL] (zusätzlich für BL21-CodonPlus-RIL) inokuliert und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. 200 mL frisches LB-Medium mit denselben Antibiotika wurden mit 5% der Übernachtskultur beimpft und bei 30°C oder 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 (7xHis-ORF8), 0,6 (MBP-ORF7 Δ TMH, 6xHis-ORF1 und 6xHis-ORF1N₂₄₆), 0,8 (MBP-ORF4, 7xHis-ORF5, 7xHis-ORF7, 7xHis-ORF10, 7xHis-ORF12 und GST-ORF14) oder 1,0 (MBP-ORF5 und MBP-ORF10) inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. (MBP-ORF7 Δ TMH wurde durch 0,5 mM IPTG induziert). Der Ansatz wurde anschließend für 4 Stunden (ORF7-Fusionen) oder über Nacht (alle anderen Klone) bei 30°C (7xHis ORF8) oder bei 37°C (alle anderen Klone) inkubiert. Das Zellpellet wurde nach der Induktion bei 5000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und für die Proteinsolubilisierung verwendet.

2.2.3.4 Solubilisierung der Tra-Fusionsproteine unter nativen Bedingungen

Die Fusionsproteine 7xHis-ORF6, 7xHis-ORF8, 7xHis-ORF12, 7xHis-ORF15, MBP-ORF4, MBP-ORF5, MBP-ORF7 Δ TMH, MBP-ORF10 und GST-ORF14 wurden unter folgenden Bedingungen solubilisiert: Das Pellet aus 2.2.3.3 wurde mit 10 mL Puffer 1 resuspendiert. Jeweils 1 mL der Lösung wurden auf 1,5 mL Eppendorfgefäße verteilt und erneut bei 5000 rpm, 4°C, 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in jeweils 1 mL Puffer 5 resuspendiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Lysozym [1 mg/mL Endkonzentration] inkubiert. Es folgte eine konstante Ultraschallbehandlung für 15 Minuten in einem Ultraschallbad (Transsonic 820/H, Elma). Die Suspension wurde bei 13000 rpm, 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Das Proteinlysate wurde vorsichtig vom Pellet getrennt und sofort mittels SDS-PAGE analysiert oder bei -20°C gelagert.

2.2.3.5 Expression und Reinigung der 6xHis-ORF1- und 6xHis-ORF1N₂₄₆-Fusionsproteine

6xHis-ORF1 und 6xHis-ORF1N₂₄₆ wurden nach Kopeć *et al.* (2005) exprimiert und gereinigt. 5 ml LB-Medium mit Ampicillin [100 µg/mL] und Tetracyclin [40 µg/mL] wurden mit *E. coli* XL1 Blue (pQE30-*orf1*) oder *E. coli* XL1 Blue (pQE30-*orf1*₂₄₆) inokuliert und über

Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur 100 x mit dem gleichen Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 geschüttelt. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und der Ansatz wurde für weitere 4 Stunden bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend bei 6000 x g, 4°C für 15 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde mit dem Puffer BugBuster® HT (Novagen) nach Angaben des Herstellers resuspendiert. Das klare Lysat wurde auf 5 mM Imidazol, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, and 0,5 M NaCl eingestellt und auf eine Ni²⁺-charged HiTrap Chelating Säule (Amersham Biosciences) aufgetragen. Die Säule wurde mit einem Puffer bestehend aus 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,5 M NaCl, 5 mM Imidazol gewaschen. ORF1 bzw. ORF1N₂₄₆ wurden mit einem Imidazol Gradienten (50 mM Tris/HCl, pH 6,0, 0,5 M NaCl, 250 mM Imidazol) eluiert. Das Eluat wurde anschließend gegen einen Puffer bestehend aus 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA und 0,5 mM Dithiothreitol dialysiert. Eine zweite Reinigung erfolgte mit einer HiTrap Heparin Säule (Amersham Biosciences). Schließlich wurde das reine Protein mit einem NaCl Gradienten (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 M NaCl, 1 mM EDTA und 0,5 mM Dithiothreitol) eluiert.

2.2.3.6 Expression und Reinigung von 7xHis-ORF7 unter nativen Bedingungen

2 x YT-Medium (100 mL) mit 0,5% Glukose und Ampicillin [100 µg/mL] wurde mit 5% einer Übernachtskultur von *E. coli* XL 10 (pQTEV-*orf7*) inokuliert und unter Schütteln bei 200 rpm und 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG und einer Inkubationszeit von nur 2 Stunden bei 37°C und 200 rpm (Längere Inkubationszeiten lysierten die Zellen). Die Zellen konnten anschließend durch Zentrifugation (5000 rpm, 4°C, 10 Minuten) geerntet werden. Das Pellet wurde in 5 mL Puffer 5 resuspendiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Lysozym [1 mg/mL Endkonzentration] inkubiert. Es folgte eine konstante Ultraschallbehandlung für 15 Minuten in einem Ultraschallbad (Transsonic 820/H, Elma). Die Suspension wurde dann bei 13000 rpm und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Das Proteinlysate wurde vorsichtig vom Pellet getrennt und auf einer Ni²⁺-NTA *spin column* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.2.3.7 Expression und Reinigung der 7xHis-ORF5- und 7xHis-ORF10-Fusionsproteine unter denaturierenden Bedingungen mit anschließender Renaturierung

Beide Proteine wurden von Frau Kopeć im Rahmen ihrer Doktorarbeit an der Karl-Franzens-Universität in Graz gereinigt und an das Labor von Frau Dr. Grohmann geschickt. Die

Reinigung erfolgte nach folgendem Protokoll: *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit den Expressionsplasmiden pQTEV-*orf5* bzw. pQTEV-*orf10* wurden in 5 mL LB-Medium mit Ampicillin [100 µg/mL] und Chloramphenicol [50 µg/mL] inokuliert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C mit einer Schüttelfrequenz von 200 rpm. 100 mL frisches LB-Medium mit Ampicillin [100 µg/mL] und Chloramphenicol [50 µg/mL] wurden mit 5 mL der Übernachtskultur beimpft und bei 37°C, 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8–0,9 inkubiert. Die Proteinexpression erfolgte durch Inkubation mit IPTG [1 mM] über Nacht. Die Zellen wurden bei 5000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 mL 20 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym [1 mg/mL], Inkubation auf Eis für 20 Minuten und einer konstanten Ultraschallbehandlung von 15 Minuten, wurden die Zellen bei 16000 x g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 50 mM EDTA, pH 8,0 gewaschen und anschließend erneut bei 16000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 8 M Harnstoff, 20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,5 (Puffer A) gelöst und bei 30 000 x g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Ni²⁺-charged HiTrap Chelating Säule (Amersham Biosciences), äquilibriert mit Puffer A, geladen. Die Elution erfolgte durch einen Imidazolgradienten mit 10 Säulenvolumina von Puffer B (8 M Harnstoff, 20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,5). Die Proteinfractionen wurden vereinigt und über Amicon *centrifugal filter* (30 kDa cut off) (Millipore) konzentriert. Zum Renaturieren der gereinigten Proteine 7xHis-ORF5 bzw. 7xHis-ORF10 wurden die Konzentrate über Dialyseschläuche, wie in 2.2.3.8 beschrieben, entsalzt.

2.2.3.8 Pufferwechsel der Proteinlösungen über Dialyse

Der Dialyseschlauch (1-8/32") wurde 2 x 10 Minuten in 2% Natriumbicarbonat und 1 mM EDTA gekocht, dazwischen und danach mit destilliertem Wasser gespült, um Schwermetalle und Sulfide zu entfernen. Eine der beiden Seiten des Schlauchs wurde mit einer Verschlussklammer dicht verschlossen, die Proteinlösung wurde durch das offene Ende des Schlauchs hineingefüllt, die Luft herausgedrückt und der Schlauch mit einer zweiten Verschlussklammer verschlossen. Anschließend wurde der Dialyseschlauch in einem Becherglas mit 500 mL Dialysepuffer auf einem Magnetrührer mit niedriger Rotationstufe für 2 Stunden geschüttelt. Nach 2 Stunden wurde der Dialysepuffer gewechselt und die Dialyse wurde über Nacht fortgesetzt. Am nächsten Tag wurde der Schlauch entfernt, von einer Seite geöffnet und die Probe wurde entnommen.

2.2.3.9 *In vitro* Protein-Protein Interaktionsstudien (*pull-down assay*)

Das Lysat von *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL oder *E. coli* XL 10 mit dem Plasmid, das für das erste Protein TraX kodiert (pQTEV-/pQE30-, pGEX-6P-2- oder pMAL-c2x-*traX*), wurde mit dem putativen Interaktionspartner, dem Lysat von *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL oder *E. coli* XL 10 mit pQTEV/pQE30-, pGEX-6P-2- oder pMAL-c2x-*traY* oder dem teilgereinigten TraY im gleichen molaren Verhältnis gemischt und bei RT für 30-60 Minuten oder bei 4°C über Nacht zur Komplexbildung inkubiert.

Parallel dazu wurde eine negative Kontrolle gemacht, wo als Interaktionspartner das Lysat von *E. coli* mit dem Expressionsplasmid ohne Insert (pQTEV/pQE30, pGEX-6P-2 oder pMAL-c2x) statt TraY eingesetzt wurde. Anschließend wurden die gebildeten Proteinkomplexe mit Ni²⁺-NTA *spin* Säulen oder *Amylose Magnetic Beads* gereinigt. Die eluierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.2.3.10 Reinigung der MBP-Fusionsproteine und der Proteinkomplexe mit Hilfe der *Amylose Magnetic Beads*

Die Reinigung der MBP-Fusionsproteine und der MBP-TraX/7xHis-TraY Komplexe wurde mit Hilfe der *Amylose Magnetic Beads* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden 100 µL der *Beads*-Suspension in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µL MBP Bindepuffer. Das Eppendorfgefäß wurde nach jedem Waschschrte an den Magneten gehalten, so dass die *Beads* sich in Richtung des Magneten ausrichteten und der Puffer problemlos entfernt werden konnte. Nach Zugabe von 500 µL des Proteinlysats oder des Proteinkomplexes zu den *Beads* wurde bei 7°C unter Schütteln (125 rpm) für eine Stunde inkubiert. Die Probe wurde an den Magneten angelegt und der Überstand konnte abdekantiert werden. Es folgten drei Waschschrte mit jeweils 500 µL MBP Bindepuffer. Durch Zugabe von 50 µL MBP Elutionspuffer zu den *Beads* und Inkubation für 15 Minuten bei 7°C unter Schütteln, konnte das MBP-Fusionsprotein oder der MBP-TraX/7xHis-TraY Komplex eluiert werden. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und die Elutions-Fraktionen vereinigt. Dies ergab eine Menge von 100 µL Eluat. Die gesammelten Proben wurden bei -20°C gelagert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.2.3.11 Reinigung der GST-Fusionsproteine mit dem Kit *Bulk GST Purification Modul*

Die Aufreinigung des GST-Orf5-Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe des *Bulk GST Purification Module* (Amersham Bioscience) nach der *Bulk pack column* Methode des Herstellers. Die Elutions-Fraktionen wurden vereinigt und für die SDS-PAGE bei -20°C gelagert.

2.2.3.12 Reinigung der 6x/7xHis-Fusionsproteine und der Proteinkomplexe über Ni²⁺-NTA *spin columns*

Für die His-Tag-Fusionsproteine wurde die Metallchelataffinitätschromatographie mit Ni²⁺-NTA Agarose als Reinigungsmethode in dieser Arbeit benützt. Alle benötigten Puffer sind in (2.1.11.5) beschrieben. Durchgeführt wurde die Reinigung mit den Ni²⁺-NTA *spin columns* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Eine Ni²⁺-NTA Säule wurde mit 600 µl Lysepuffer äquilibriert und für 2 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Auf die äquilibrierte Säule wurden 600 µl Proteinlysate oder Proteinkomplex geladen und bei 2000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Die unspezifisch gebundenen Proteine wurden durch Waschen mit 600 µl Waschpuffer und Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen entfernt. Der Waschschritt wurde einmal wiederholt. Schließlich wurden die Proteine mit 100 µl Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.2.3.13 Aufkonzentrieren der Elutionsfraktion

Zum Aufkonzentrieren der Elutionsfraktion wurden Amicon[®] *Ultra-4 Centrifugal Filter Devices* (Millipore) oder Minisart Sterilfilter (Sartorius) nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei wurde 1 ml der Elutionsfraktion auf das Filter aufgetragen. Nach der Zentrifugation bei 5000 × g für 10 Minuten wurde ein Probenvolumen (aufkonzentrierte Proteine) von ca. 150 µL erhalten.

2.2.3.14 Proteinfällung

Die Proteinlösung wurde mit dem gleichen Volumenanteil einer 10% Trichloressigsäure vermischt und bei 4°C für 30 Minuten gehalten. Anschließend wurde die eiskalte Proteinlösung bei 15000 rpm und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde bei RT getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in *cracking* Puffer gelöst.

2.2.3.15 Quantifizierung von Proteinen

Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleichen der Intensitäten der einzelnen Banden im SDS-Gel mit Hilfe des Computerprogramms *EasyWin 32* der Firma Herolab (Abschnitt 2.2.2.4). Anhand des eingesetzten Proteinstandards (*low range molecular weight* Standard) konnte die Konzentration der zu untersuchenden Proteinprobe ermittelt werden.

2.2.3.16 Western Blot

His-Tag-Fusionsproteine lassen sich spezifisch mit einem Anti-His-HRP-Antikörper, Glutathion S-Transferase-Fusionsproteine mit Anti-GST-HRP-Antikörper und Maltosebindenprotein-Fusionsproteine mit Anti-MBP-HRP-Antikörper detektieren. Bei der Immunoblot- oder Western-Blot-Technik werden die zu detektierenden Proteine zunächst durch SDS-Gelelektrophorese getrennt, dann durch einen Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran immobilisiert und anschließend mit Antikörpern detektiert. Die Inkubation der Membran erfolgte mit einem Antikörperkonjugat, bestehend aus einem Anti-His-, Anti-GST- oder Anti-MBP-Antikörper und einer Meerrettich-Peroxidase (HRP: *horseradish peroxidase*). Dabei findet eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen dem im Proteinlysat vorhandenen 7xHis-, GST- oder MBP-Epitop und dem Anti-His-, Anti-GST- oder Anti-MBP-Antikörper statt. Die Detektion des Fusionsproteins erfolgte dann durch Inkubation mit Luminol, das in Gegenwart von H_2O_2 , das durch die Peroxidase gebildet wird, oxidiert wird. Die freiwerdende Energie wird in Form von Licht abgegeben, mit dem sich ein Röntgenfilm schwärzen lässt. Die Durchführung des Blots erfolgte so:

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE der Größe nach getrennt und anschließend mit der *Mini Protean Blot* Apparatur (BioRad) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Für diesen Schritt wurden zuvor die Membran sowie das benötigte Filterpapier für 10 Minuten in 1 x Blot-Puffer äquilibriert. Die Übertragung erfolgte für 1,5 Stunden bei 50 Volt. Anschließend wurde die Membran in 1 x Ponceau-Rot angefärbt und die Lauffront, die Taschen und die Markerbanden auf der Membran markiert. Die Membran wurde mit bidest. Wasser wieder entfärbt und zweimal für 10 Minuten in TBS gewaschen. Die Membran wurde über Nacht bei 7°C in 20 mL *Blocking* Puffer gehalten. Nach zwei Waschschritten für je 10 Minuten in TBS/Tween 20/Triton X-100 und einem Waschschriff in TBS für 10 Minuten erfolgte die Antikörper-Antigenreaktion. Dafür wurde die Membran in 5 mL Antikörperlösung für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für je 10 Minuten in TBS/Tween 20/Triton X-100 und einmal in TBS gewaschen. Die Detektion wurde mit dem *Kit ECL-Western blotting* (Pierce) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.17 Ermittlung des oligomeren Zustandes eines Proteins mittels *cross-linking*

Um den oligomeren Zustand eines Proteins zu ermitteln, setzt man *cross-linker* ein. Diese erzeugen kovalente Brückenbindungen, die verschiedene Moleküle bzw. verschiedene Einheiten eines Komplexes zusammenhalten. Somit bleiben die Proteinkomplexe fixiert und

können auf denaturierenden SDS-Gelen visualisiert werden. Ein wichtiger Faktor dabei ist die Länge dieser *cross-linker*, sie entscheiden über die Stärke der Wechselwirkung zwischen den beiden interagierenden Molekülen. Je stärker die Interaktion zwischen den Molekülen ist, desto kürzer und stabiler sind die entstehenden *cross-linker*. Die Größe des Komplexes und damit die Zahl seiner Einheiten können schließlich mittels SDS-PAGE bestimmt werden. Es gibt verschiedene Substanzen, die als *cross-linker* dienen. Am häufigsten wird Glutaraldehyd dafür eingesetzt, es ist billig und stört die 3D-Struktur der Proteine nicht (Abb. 2.7). Der Test wurde wie in Kopeć *et al.* (2005) beschrieben mit kleinen Änderungen durchgeführt. Es wurden 50 µl Reaktionen angesetzt, die aus 0,5 mg/mL Protein, 100 mM Bicin pH 7,5, 300 mM NaCl, 1 mM Dithiothreitol und unterschiedlichen Konzentrationen von Glutaraldehyd (0,001-0,1%) bestanden. Um die Reaktion zu stoppen, wurde nach 15 Minuten 1 M Glyzin, pH 8,0 zu einer Endkonzentration von 140 mM zugegeben und die Reaktion wurde für 5 Minuten bei RT inkubiert. Zum Fällen der Proteine wurden 400 µl Aceton zugefügt und das Gemisch wurde für 2 Stunden bei -20°C gehalten. Dann folgte eine Zentrifugation bei 15000 x g für 15 Minuten. Das Pellet wurde in 25 µl *cracking* Puffer aufgenommen, für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und auf einem 10% (w/v) Polyacrylamidgel analysiert.

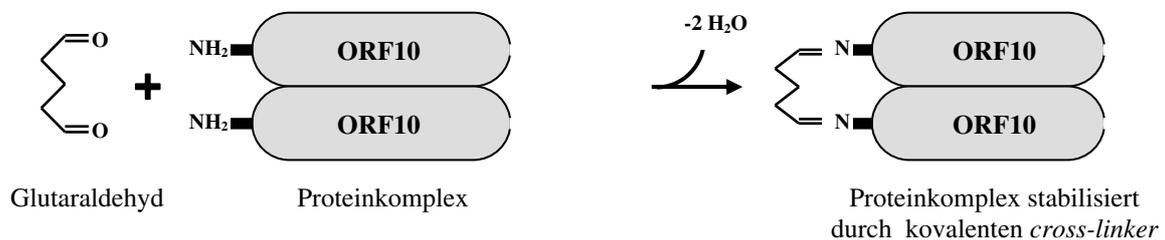


Abb. 2.7: Prinzip des *cross-linking* Assays.

2.2.3.18 Nukleotid-Bindungs Assay

Die Nukleotid-Bindungsfähigkeit von 7xHis-Orf5 und 7xHis-Orf10 wurde mit einem Fluoreszenz-Analogon von ATP, dem 2'(oder-3')-o-Trinitrophenyl-ATP (TNP-ATP) (Molecular Probes) durchgeführt. Beim ATP-Binden wird die Fluoreszenz von TNP-ATP durch den Polaritätswechsel in der Umgebung von TNP-ATP gesteigert. Die Messung wurde bei Raumtemperatur mit dem Fluoreszenzphotometer RF-5001 PC Shimadzu in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Mathias F. Melzig, Institut für Pharmazie, FU-Berlin, durchgeführt. Die Proteinproben wurden auf 1 mL mit Puffer H (2.1.11.9) aufgefüllt (Endkonzentration 1,5 µM), für 20 Sekunden mit 15 µM TNP-ATP inkubiert und in 1 mL Quarzküvetten gefüllt. Das Spektrum wurde mit einer Anregungswellenlänge von 410 nm

aufgenommen und die Emission wurde im Bereich von 470-600 nm gemessen. Als negative Kontrollen dienten Puffer H und 15 μ M TNP-ATP in Puffer H. TraB, eine ATPase aus dem konjugativen Plasmid pSVH1 von *Streptomyces venezuelae*, diente als positive Kontrolle (Reuther *et al.*, 2006). Dieses Protein wurde von Herrn Dr. Günther Muth von der Abteilung Mikrobiologie/Biotechnologie an der Eberhard Karls Universität, Tübingen, in gereinigter Form zur Verfügung gestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Klonierung der DNA-Fragmente in die Plasmide pBTM117c, pGAD426, pQTEV, pGEX-6P-2 und pMAL-c2x

Um die Protein-Protein Wechselwirkungsstudien *in vivo* durchzuführen, wurden die *tra*-Gene des Plasmids pIP501 in die Y-2H Vektoren, pBTM117c und pGAD426 kloniert. Zum Testen auf mögliche Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen den ausgewählten *vir*-Genen des *E. faecalis* V583 Stammes und den humanen Proteinen der cDNA-Bibliothek, wurden die *vir*-Gene in den BD-Vektor pBTM117c eingebaut.

Um die Expression der Tra-Proteine als 7xHis-Fusionsproteine zu erreichen, wurden die *tra*-Gene in das Expressionsplasmid pQTEV kloniert. Um die Tra-Proteine als MBP-Fusionsproteine (Maltosebindeprotein) isolieren zu können, wurden die entsprechenden Gene (*orf4*, *orf5*, *orf7ΔTMH*, *orf9*, *orf10*) in das Expressionsplasmid pMAL-c2x kloniert. Bei unlöslichen 7xHis- bzw. MBP-Fusionsproteinen wurden die Gene in das Expressionsplasmid pGEX-6P-2 kloniert, um sie als GST-Fusionsproteine (Glutathion S-Transferase) zu gewinnen, die bessere Löslichkeit zeigen können (*orf5*, *orf7*, *orf10*, *orf14*, *orf15*). Alle Klonierungen wurden wie in den Abschnitten 2.2.2.9 und 2.2.2.10 beschrieben durchgeführt.

Die Konstrukte in pBTM117c und pGAD426 wurden von mir erstellt. Klonierungen in pQTEV, pGEX-6P-2 und pMAL-c2x wurden von Frau Dipl.-Ing. Christine Bohn oder von Studenten im Rahmen ihrer Diplom- oder Studienarbeit am FG Umweltmikrobiologie der TU-Berlin durchgeführt, u.a. von Karsten Arends, Katarzyna Schiwon, Mike Döring und Michal Burzynski.

3.1.1 PCR-Amplifizierung der *tra*- und *vir*-Gene

Die *tra*- bzw. *vir*-Gene des Plasmids pIP501 wurden über PCR, wie im Abschnitt 2.2.2.8 beschrieben, amplifiziert (Abb. 3.1). Die für die PCR benötigten Primer (Tab. 2.3) wurden so gewählt, dass die entstehenden PCR-Fragmente in Phase mit dem entsprechenden Fusions-Tag ligiert werden konnten. Für die Klonierung in pMAL-c2x wurden Primer eingesetzt, die die Restriktionsstellen *EcoRI/SalI* anfügten. Für alle anderen Plasmide wurden die DNA-Fragmente mit den Schnittstellen *SalI/NotI* amplifiziert. Die Größen der verschiedenen Gene sind in Basenpaaren in der Tab. 3.1 dargestellt.

Für manche Klonierungen wurden die *tra*-Gene nicht mit PCR amplifiziert, sondern aus anderen bereits vorhandenen Klonen ausgeschnitten und in das gewünschte Plasmid inseriert: *orf5* z.B. wurde aus dem Konstrukt pGAD426-*orf5* mit *SalI/EcoRI* ausgeschnitten, über ein LM Agarosegel gereinigt und in das Plasmid pQTEV ligiert.

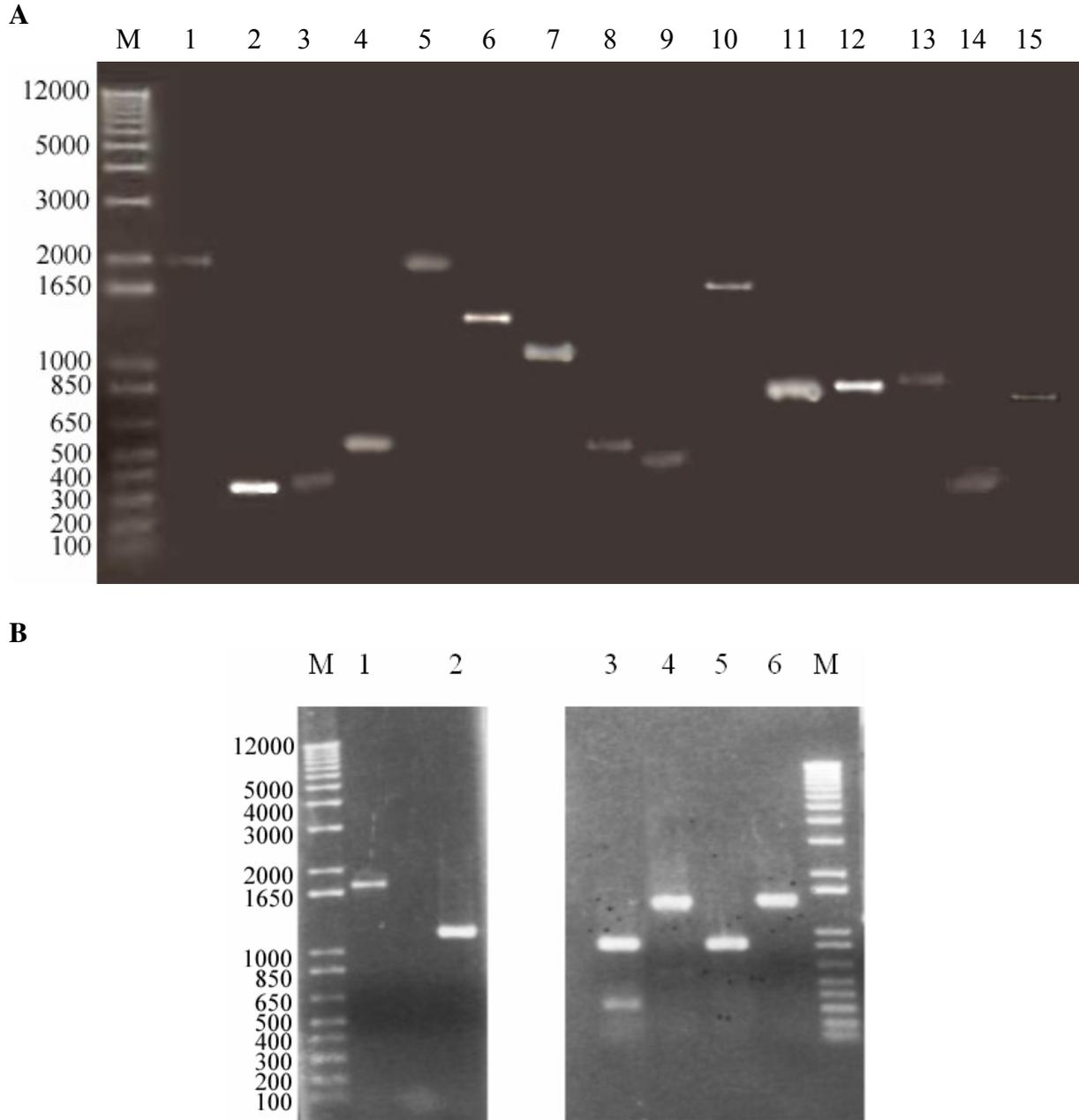


Abb. 3.1: Amplifizierung der DNA-Fragmente über PCR. A. *tra*-Gene des Plasmids pIP501, ein 1% Agarosegel wurde für 1 Stunde bei 120 Volt laufen gelassen. M: 1 μ L (500 ng) des DNA-Größenstandards 1 kbp Plus DNA ladder, Spuren 1-15: *orf1-orf15* mit *SalI/NotI*-Schnittstellen, jeweils 15 μ l der PCR-Amplifikate wurden geladen. **B.** Die *vir*-Gene des *E. faecalis* V583 Stammes, ein 1% Agarosegel wurde für 1 Stunde bei 120 Volt laufen gelassen. M: 1 μ L (500 ng) des DNA-Größenstandards 1 kbp Plus DNA ladder, Spur 1: *fbp*, Spur 2: *cbp*, Spur 3: *cylB*, Spur 4: *hemolysin*, Spur 5: *orfde11*, Spur 6: *scrB-2*.

Die <i>tra</i> -Gene des Plasmids pIP501															
Gen	<i>orf1</i>	<i>orf2</i>	<i>orf3</i>	<i>orf4</i>	<i>orf5</i>	<i>orf6</i>	<i>orf7</i>	<i>orf8</i>	<i>orf9</i>	<i>orf10</i>	<i>orf11</i>	<i>orf12</i>	<i>orf13</i>	<i>orf14</i>	<i>orf15</i>
Größen in bp	1965	333	384	573	1962	1353	1110	552	432	1656	924	933	969	369	849

Die <i>vir</i> -Gene des <i>E. faecalis</i> V583 Stammes						
Gen	<i>cbp</i>	<i>cylB</i>	<i>fbp</i>	<i>hemolysin</i>	<i>orfde11</i>	<i>scrB-2</i>
Größen in bp	1121	812	1712	1379	794	1439

Tab. 3.1: Darstellung der Größen der *tra*- und *vir*-Gene. Die Größe der Fragmente ist vom Startkodon bis zum Stopkodon angegeben.

Die in dieser Arbeit ausgewählten Primer und optimierten PCR-Programme für die Amplifizierung der *vir*-Gene von *E. faecalis* V583 wurden im Rahmen einer Kooperation mit dem *Department of Food Science and Technology, Industrial Microbiology Section, University of Milan*, Italien zur Untersuchung der Pathogenität verschiedener *Enterococcus italicus* Stämme verwendet. Diese Stämme wurden aus italienischem Landkäse isoliert (Fortina *et al.*, 2004). Die Präsenz von ausgewählten Virulenzgenen (unter ihnen die in dieser Arbeit beschriebenen Virulenzgene *cbp*, *cylB*, *fbp* und *hemolysin*) wurde mittels PCR in den *E. italicus* Stämmen untersucht. Keines der Virulenzgene konnte in den *E. italicus* Stämmen nachgewiesen werden (Fortina *et al.*, Manuskript eingereicht).

3.1.2 Identifizierung rekombinanter Plasmide

3.1.2.1 Mittels Plasmidisolierung und Restriktion

Die Identifizierung der rekombinanten Plasmide mit dem entsprechenden Insert erfolgte über TELT-Plasmidisolierung (2.2.2.1.b). Dabei wurden die Plasmide von mehreren Kandidaten mittels TELT-Verfahrens isoliert und auf einem 0,7% Agarosegel analysiert, auf dem gleichen Gel wurde auch das Plasmid ohne Insert aufgetragen. Die Banden der rekombinanten Plasmide wandern auf dem Gel langsamer als die ohne Insert (Abb. 3.2). Für die kleinen DNA-Fragmente (≤ 500 bp) wie z.B. *orf2* (ca. 330 bp) kann man anhand der DNA-Größe schwer auf dem Gel zwischen Plasmid und Plasmid + Insert unterscheiden. Für solche kleinen Gene war die Identifizierung mittels PCR besser geeignet.

Eine anschließende Restriktion mit den zur Ligation verwendeten Restriktionsendonukleasen zeigte bei den rekombinanten Plasmiden zwei Banden, eine für das Plasmid und eine für das eingebaute Fragment (Abb. 3.3). Bei den kleinen DNA-Fragmenten (≤ 500 bp) wurden dem

Restriktionsansatz zusätzlich 10 µg RNase A zugegeben, um die RNA zu entfernen und die dadurch überdeckten DNA-Fragmente sichtbar zu machen.

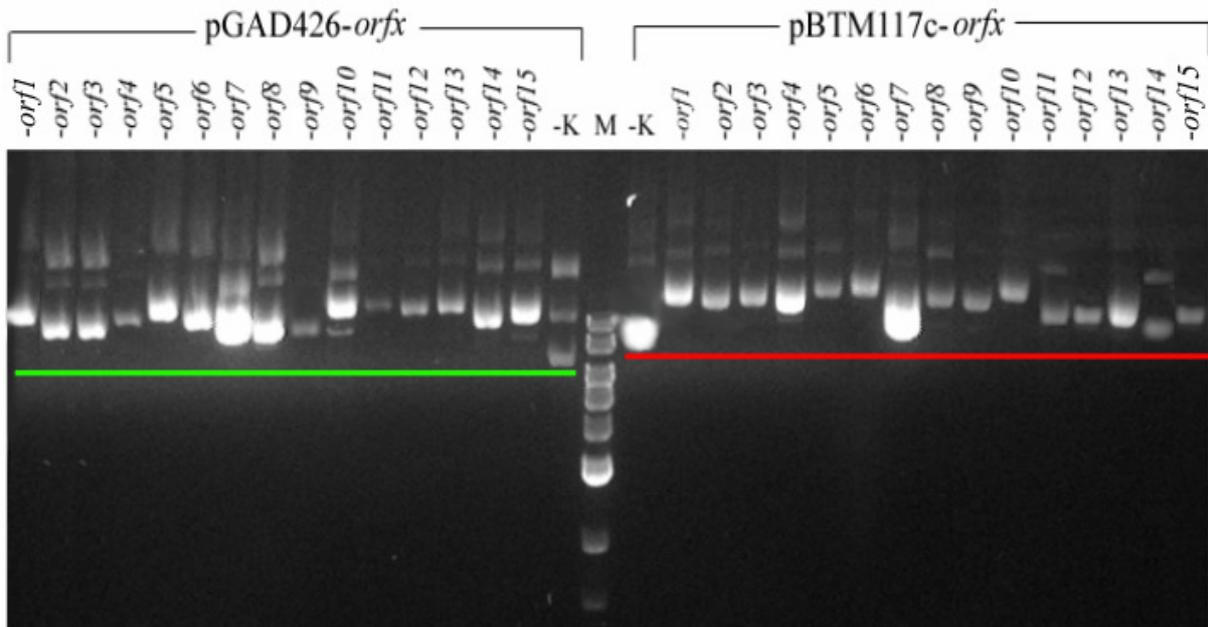


Abb. 3.2: Identifizierung rekombinanter Plasmide anhand der Größen der TELT Plasmid-DNA.

Ein 0,7% Agarosegel wurde für 90 Minuten bei 90 Volt laufen gelassen. M: 1 µL (500 ng) des DNA-Größenstandards 1 kb DNA ladder (im Gelbild sind die Banden 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500 bp zu sehen). Links: Die rekombinanten Plasmide pGAD426-orfx, -K ist pGAD426 ohne Insert als negative Kontrolle, die grüne Lauffront zeigt, dass die pGAD426-orfx Plasmide größer als pGAD426 ohne Insert sind. Rechts: Die rekombinanten Plasmide pBTM117c-orfx, -K ist pBTM117c ohne Insert als negative Kontrolle, die rote Lauffront zeigt, dass die pBTM117c-orfx Plasmide größer als pBTM117c ohne Insert sind.

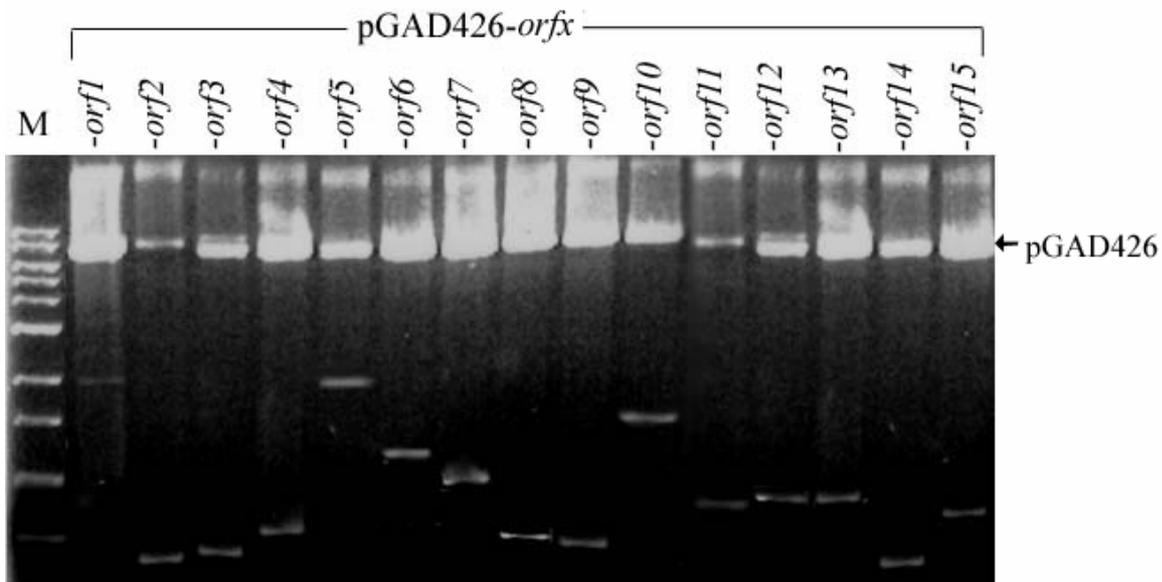


Abb. 3.3: Verifizierung rekombinanter Plasmide mittels Restriktion.

Ein 0,7% Agarosegel wurde für 90 Minuten bei 90 Volt laufen gelassen. M: 1 µL (500 ng) des DNA-Größenstandards 1 kb DNA ladder (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500 bp). Spuren 1-15: pGAD426-orfx1-15 geschnitten mit *SalI* und *NotI*. Bei ca. 7870 bp liegt die pGAD426-Bande. Bei unterschiedlichen Größen sind die ausgeschnittenen *tra*-Gene zu erkennen.

3.1.2.2 Mittels Sequenzier-PCR

Die Plasmide, die mit Restriktion Inserts der erwarteten Größe zeigten, wurden weiter mit Sequenzier-PCR, wie im Abschnitt 2.2.2.11.c beschrieben, überprüft. 0,5 µl der TELT-DNA wurde als Vorlage für die Amplifizierung verwendet. Als Primer wurden die Sequenzierprimer des entsprechenden Plasmids benützt. Im Falle eines Klons ergab die PCR ein Produkt, dessen Größe der des Inserts plus 300 bp entspricht (Teile des Plasmids werden mit amplifiziert) (Abb. 3.4).

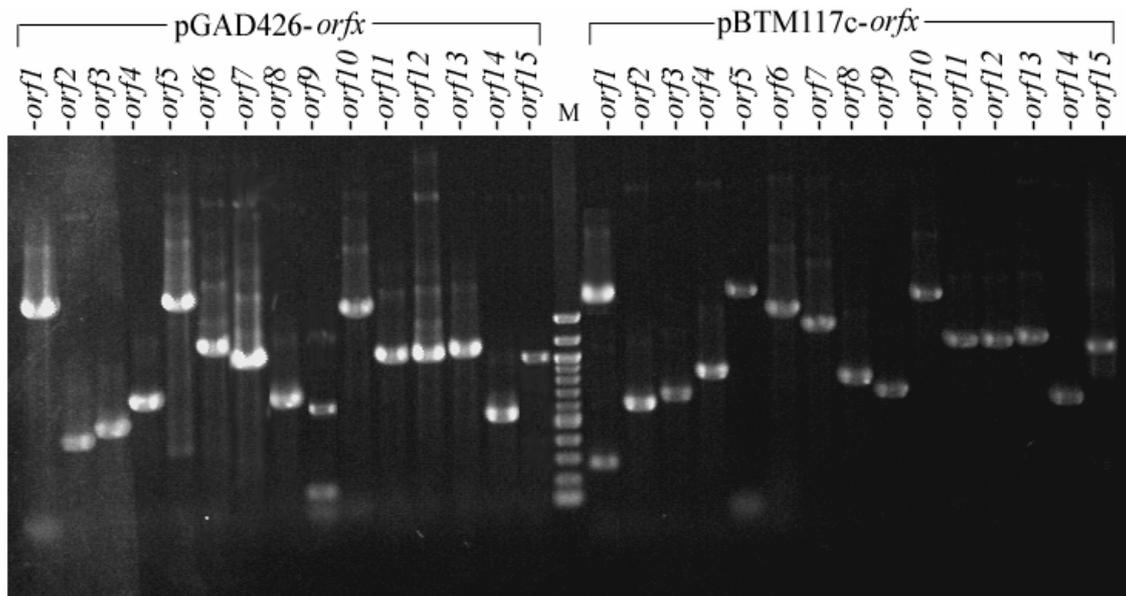
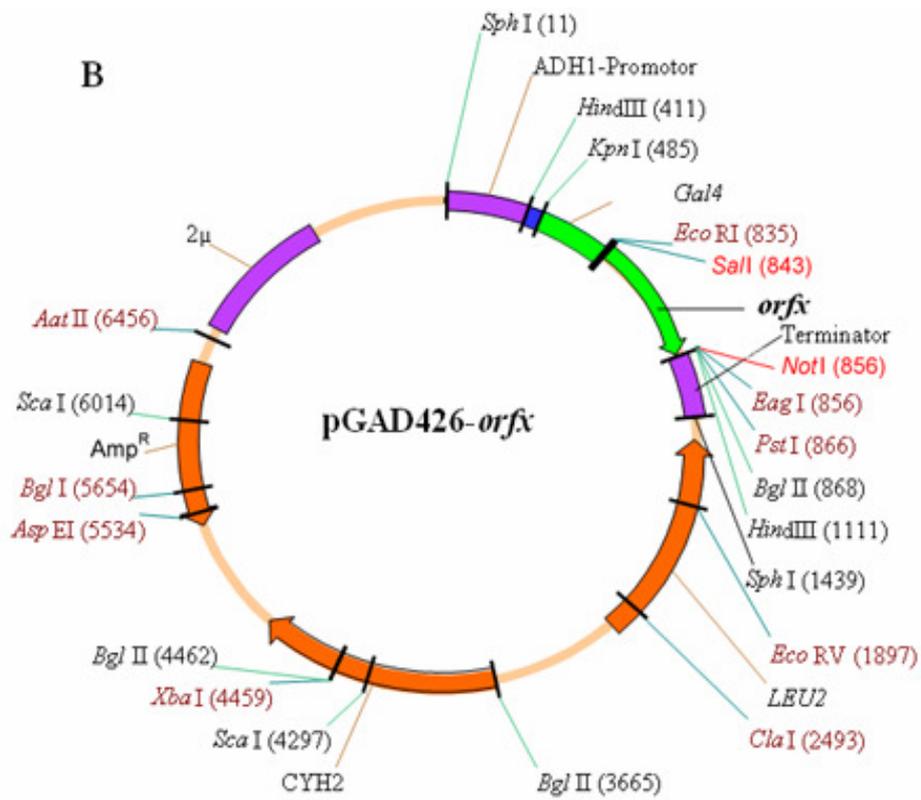
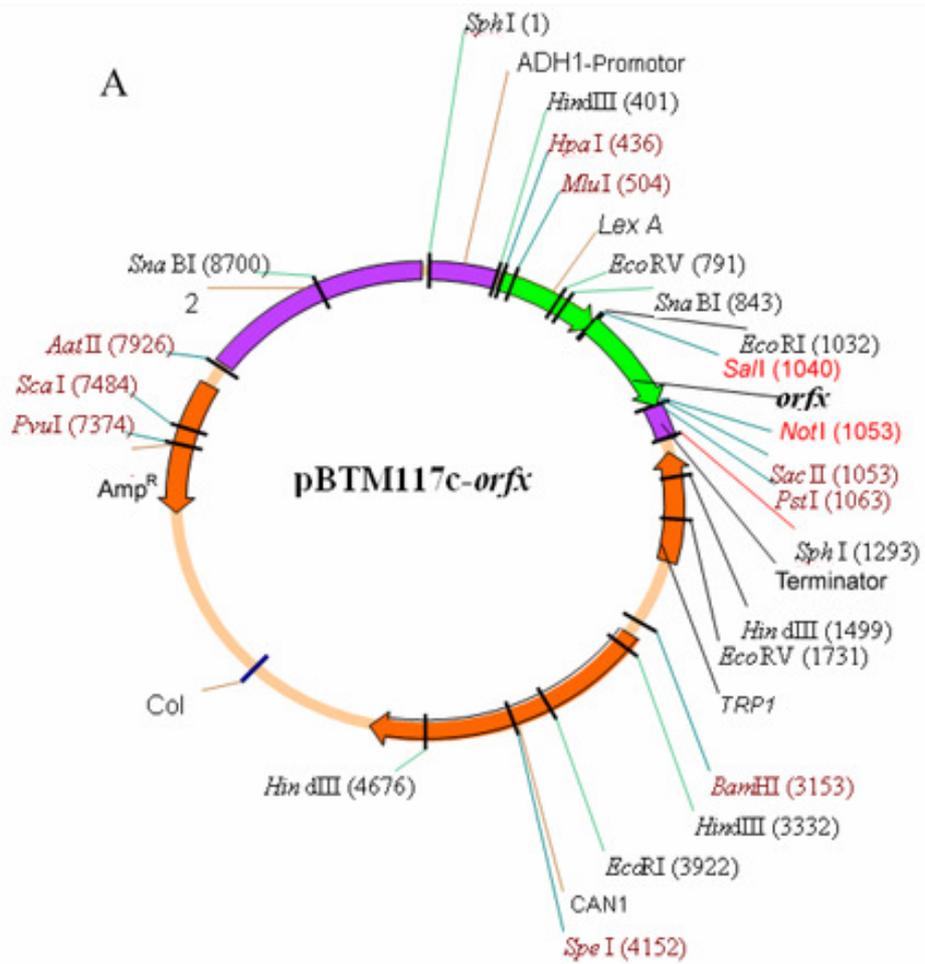


Abb. 3.4: Identifizierung rekombinanter Plasmide mittels Sequenzier-PCR.

Ein 1% Agarosegel wurde für 60 Minuten bei 120 Volt laufen gelassen. M: 1 µL (500 ng) des DNA-Größenstandards 100 bp DNA ladder (1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp). Links: Seq.-PCR der pGAD426-Klone. Rechts: Seq.-PCR der pBTM117c-Klone.

3.1.2.3 Mittels zyklischer Sequenzierung

Zur Überprüfung der DNA-Sequenz wurde eine Sequenzierung nach dem *Cycle Sequencing* Prinzip (eine modifizierte Methode nach Sanger *et al.*, 1977) wie im Abschnitt 2.2.2.11.d beschrieben, durchgeführt. Die Sequenz-Daten wurden mit den in GenBank gespeicherten Sequenzen für die *tra*-Gene des Plasmids pIP501 (Accession Number L39769 und AJ505823) mit Hilfe des Programms *blast2 seq* der NCBI Webseite verglichen: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi. Die Plasmidkarten der konstruierten Klone sind in Abbildung 3.5 dargestellt.



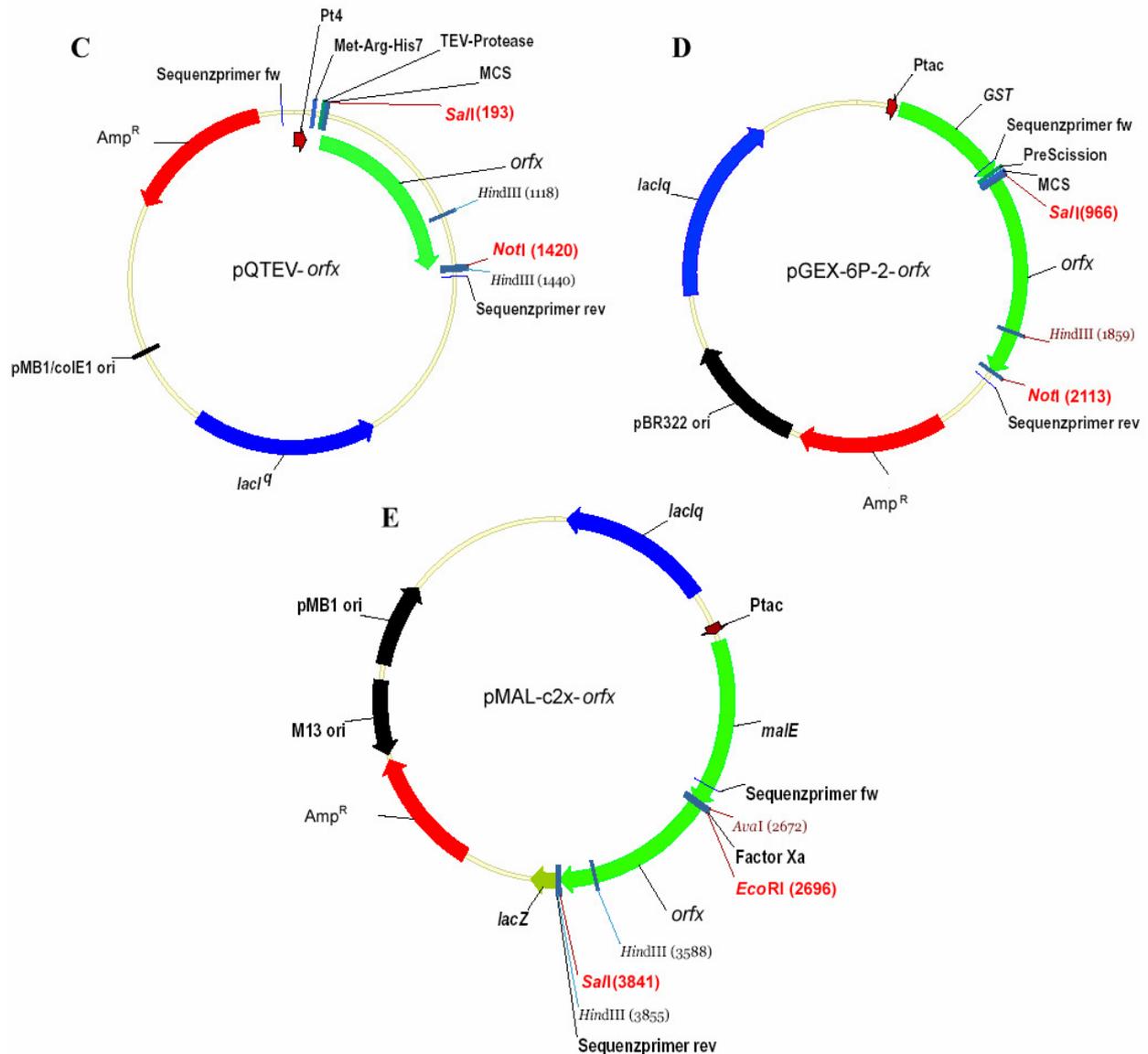


Abb. 3.5: Erzeugte Expressionsplasmide für die *tra*-Gene des Plasmids pIP501.

A. Bei pBTM117c wurden die *tra*-Gene (*orfX*) des Plasmids pIP501 über *SalI/NotI*-Schnittstellen in Phase mit *LexA* ligiert. Ihre Expression wurde durch den konstitutiven Promotor der Alkohol-Dehydrogenase (ADH1-Promotor) gewährleistet. In den Hefezellen werden *LexA* und *orfX* als eine Fusion exprimiert, die als Bindungsdomäne wirkt. *TRP1* kodiert für die Tryptophan-Prototrophie. 2 μ ist der Hefe-Replikationsursprung.

B. Die *tra*-Gene wurden in pGAD426 über *SalI/NotI*-Schnittstellen in Phase mit *Gal4* kloniert. Wie bei pBTM117c kontrolliert der ADH1-Promotor das Gen *Gal4-orfx*, was in den Hefezellen als Aktivierungsdomäne exprimiert wird. *LEU2* kodiert für die Leucin-Prototrophie. 2 μ ist der Hefe-Replikationsursprung.

C. Die *tra*-Gene wurden über *SalI/NotI*-Schnittstellen in den pQTEV-Vektor ligiert. Die Expression des entsprechenden Proteins steht unter Kontrolle des Pt4-Promotors, der über das *lacI^q*-Gen reguliert wird. Nach Induktion mit IPTG wird ein 7xHis-Fusionsprotein exprimiert. Über die TEV-Protease (*tobacco etch virus*) kann anschließend der his-Tag entfernt werden.

D. Bei dem pGEX-6P-2-Vektor erfolgt die Expression des über *SalI/NotI* ligierten *tra*-Gens in N-terminaler Glutathion S-Transferase (GST)-Fusion. Dem *GST* vorgeschaltet ist ein Ptac-Promotor, der durch das Regulationsgen *lacI^q* zunächst reprimiert wird. Erst nach Zugabe von IPTG findet eine Transkription statt. Der Fusionsanteil im Protein kann über eine *PreScission*-Protease abgetrennt werden.

E. In den mit *EcoRI* und *SalI* linearisierten Vektor pMAL-c2x wurden die *tra*-Gene in Phase mit *malE* ligiert. Es liegt wiederum ein Ptac/*lacI^q*-Expressionssystem vor, die Expression erfolgt nach Zugabe von IPTG in N-terminaler Fusion mit einem Maltosebindeprotein (MBP). Der Fusionsanteil kann über „Factor Xa“ abgespalten werden.

Weiterhin dargestellt: Selektionsmarker Amp^R, für eine Resistenz gegen Ampicillin, der Ursprung der Replikation *ori*, Restriktionsstellen, das *lacZ*-Gen für den N-terminalen Anteil der β -Galaktosidase (α -Komplementation).

3.2 *In vivo* detektierte Protein-Protein Wechselwirkungen

3.2.1 Qualitative Studie (X-Gal Test)

Zum Durchführen der Y-2H Studien wurden die 15 pBTM117c-*tra* Plasmide einzeln in die Hefezellen nach dem Protokoll 2.2.1.3 transformiert und auf Autoaktivierung der Reportergene *lacZ* und *HIS3* getestet. Überraschenderweise zeigte ORF10 eine Autoaktivierung, *Saccharomyces cerevisiae* L40 ccU Zellen mit pBTM117c-*orf10* konnten auf SD-Tryp-His Platten wachsen und entwickelten mit dem X-Gal Test eine blaue Farbe. Deswegen konnten die pBTM117c-*orf10*/pGAD426-*tra* Versuche nicht durchgeführt werden. Dann wurden die 15 Tra-Proteine (jeweils in pGAD426 und pBTM117c, außer *orf10*) gegen alle anderen Tra-Proteine mittels Y-2H Systems auf mögliche Protein-Protein Wechselwirkungen untersucht. Die bereits nachgewiesene Interaktion pBTM117c-*sim1*/pGAD426-*arnt* (Probst *et al.*, 1997) wurde als positive Kontrolle zu jedem Test durchgeführt, während ein Test mit den beiden Plasmiden ohne Insert (pBTM117c/pGAD426) als negative Kontrolle diente. Die Y-2H Studien ergaben 18 Protein-Protein Wechselwirkungen (Tab. 3.2), die zur Verifizierung dreimal wiederholt wurden. Die Interaktionen wurden nach dem Wachstum der Hefezellen auf den SD-Leu-Tryp-His/Gal/Raff Platten bzw. in flüssigem SD-Leu-Tryp-His/Gal/Raff Medium bewertet. Die Interaktionen, bei denen es Wachstum nach 3 Tagen gab, wurden stark genannt und mit +++ bezeichnet, ++ bezeichnen Interaktionen mittlerer Stärke (Wachstum nach 4-7 Tagen) und + steht für die schwachen Interaktionen (Wachstum nach 7 Tagen).

<i>bait</i>	<i>prey</i>	Wachstum ^a
ORF1	ORF1	+
ORF1	ORF10	+
ORF4	ORF5	++
ORF5	ORF5	+++
ORF5	ORF7	++
ORF6	ORF3	+
ORF6	ORF10	+++
ORF7	ORF2	+
ORF7	ORF5	+
ORF7	ORF7	++
ORF7	ORF10	++

ORF7	ORF14	+
ORF9	ORF3	+++
ORF14	ORF5	++
ORF14	ORF8	++
ORF14	ORF12	++
ORF14	ORF14	++
ORF15	ORF12	+

Tab. 3.2: Mittels Y-2H detektierte Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen den pIP501-Tra Proteinen. ^a: Hefekolonien wuchsen auf den SD-Leu-Tryp-His/Gal/Raff Platten bzw. in flüssigem Medium nach 3 Tagen (+++), nach 4-7 Tagen (++) oder nach mehr als 7 Tagen gewachsen.

3.2.2 Quantitative Studie (β-Galaktosidase Assay)

Die Intensitäten der mit dem Y-2H System detektierten Protein-Protein Wechselwirkungen wurden mittels quantitativer β-Galaktosidase Assays, wie im Abschnitt 2.2.2.15 beschrieben, gemessen. Die Quantifizierung wurde für jede Wechselwirkung dreimal wiederholt und der Durchschnitt davon wurde gerechnet. Die Intensität der Wechselwirkungen wurde in β-Galaktosidase Einheiten angegeben. Als negative Kontrolle dienten die *bait/prey* Plasmide ohne Insert. Die gebildeten β-Galaktosidase Einheiten jeder Interaktion wurden mit denen der negativen Kontrolle verglichen. Nach dieser Quantifizierungsstudie zeigten 5 Interaktionen, nämlich die ORF1-ORF10, ORF6-ORF3, ORF7-ORF5, ORF14-ORF14 und ORF15-ORF12 sehr schwache Intensität (≤ 1 β-Galaktosidase Einheit). Die übrigen 13 Interaktionen waren deutlich stärker als die negative Kontrolle (≥ 5 β-Galaktosidase Einheiten). Besonders stark waren die folgenden 3 Interaktionen, ORF4-ORF5, ORF5-ORF5 und ORF6-ORF10 (≥ 90 Einheiten).

<i>Bait</i>	<i>Prey</i>	β-Galaktosidase Einheiten				Erhöhung der β-Galaktosidase Aktivität*
		V1	V2	V3	Mw.	
ORF1	ORF1	6,8	10,3	11,1	9,4	39,1
ORF1	ORF10	0,8	1,3	1,2	1,1	4,5
ORF4	ORF5	65,2	88,6	120	91,2	380
ORF5	ORF5	98,3	111,2	126	111,8	465,8
ORF5	ORF7	7,2	9,4	1,1	5,9	24,5
ORF6	ORF3	1,3	1,4	0,6	1,1	4,5
ORF6	ORF10	105,5	130,6	75	95,3	397
ORF7	ORF2	17,3	25,5	15	19,2	80
ORF7	ORF5	0,9	0,6	0,75	0,75	3,1
ORF7	ORF7	30,2	40,1	25,2	31,8	132,5
ORF7	ORF10	38,7	49	15	34	141,6
ORF7	ORF14	10,7	15,9	15	13,8	57,5
ORF9	ORF3	40,3	60,7	2,3	34,4	143,3
ORF14	ORF5	5,3	9,2	9	7,8	32,5

ORF14	ORF8	22,6	29,5	55	35,7	148,7
ORF14	ORF12	5,4	6,1	10,1	7,2	30
ORF14	ORF14	1	0,7	0,7	0,8	3,3
ORF15	ORF12	0,95	0,8	1,04	0,93	3,8

Tab. 3.3: Ergebnisse des quantitativen β -Galaktosidase Assays.

^b Erhöhung der β -Galaktosidase Aktivität im Vergleich zum Versuch mit pBTM117c/pGAD426 ohne *tra*-Insert (ca. 0,24 β -Galaktosidase Einheiten). V1-V3 bezeichnen die drei durchgeführten Versuche.

3.2.3 Ergebnisse des automatisierten *Yeast-Two-Hybrid* Systems

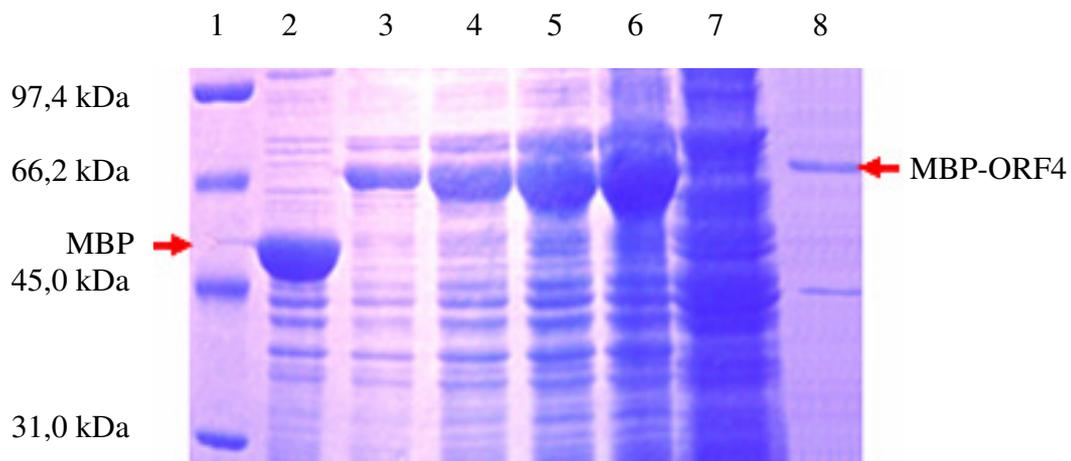
Isolierte Plasmid-DNA der Plasmide pBTM117c-*vir* (-*cbp*, -*cylB*, -*fbp*, -*hemolysin*, -*orfde11* und -*scrB-2*) wurde an das Max-Delbrück-Centre für Molekulare Medizin (MDC), AG Professor Erich Wanker übergeben. Dort wurden die entsprechenden Virulenzproteine zuerst auf Autoaktivierung der Reportergene *LacZ* und *HIS3* untersucht. Die ausgewählten Virulenzproteine zeigten keine Autoaktivierung und konnten somit gegen eine cDNA-Bibliothek von ca. 8000 humanen Proteinen aus Gehirn-, Leber- und Nervenzellen im AD-Vektor (pGAD426) getestet werden. Leider ergab der Test keine Interaktionen mit den untersuchten humanen Proteinen.

3.3 Expression, Solubilisierung und Reinigung der Tra-Proteine

3.3.1 Expression, Solubilisierung und Reinigung von MBP-ORF4

Die Expression von MBP-ORF4 erfolgte mit *E. coli* XL 10 Zellen in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin [100 μ g/mL]. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 geschüttelt. Dann folgte eine Induktion der Proteinexpression durch Zugabe einer sterilen 100 mM IPTG-Lösung auf eine Endkonzentration von 1 mM und anschließende über Nacht Inkubation bei 37°C. Das MBP-ORF4 Protein konnte aus dem Pellet mit dem Puffer 5, wie im Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben, solubilisiert werden. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe der *Amylose Magnetic Beads* wie im Abschnitt 2.2.3.10 gezeigt. Proben aus allen Fraktionen der Expression, der Solubilisierung und der Reinigung wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 3.6.A). Eine Bande von 65,5 kDa, die dem berechneten Molekulargewicht von MBP-ORF4 entspricht, ließ sich nach t_1 , t_2 , t_3 , t_{in} , im Lysat und im Eluat deutlich erkennen. Die Präsenz von MBP-ORF4 in den Proben konnte auch immunologisch durch Western Blot mit Anti-MBP-Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 3.6.B).

A



B

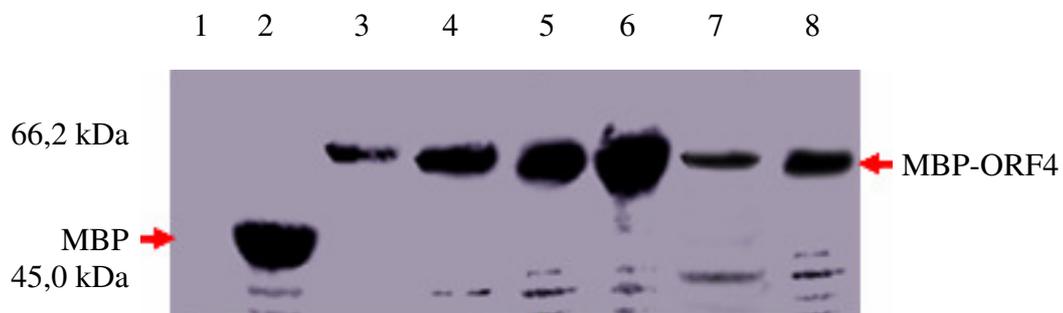


Abb. 3.6: Expression und Reinigung des MBP-ORF4-Fusionsproteins.

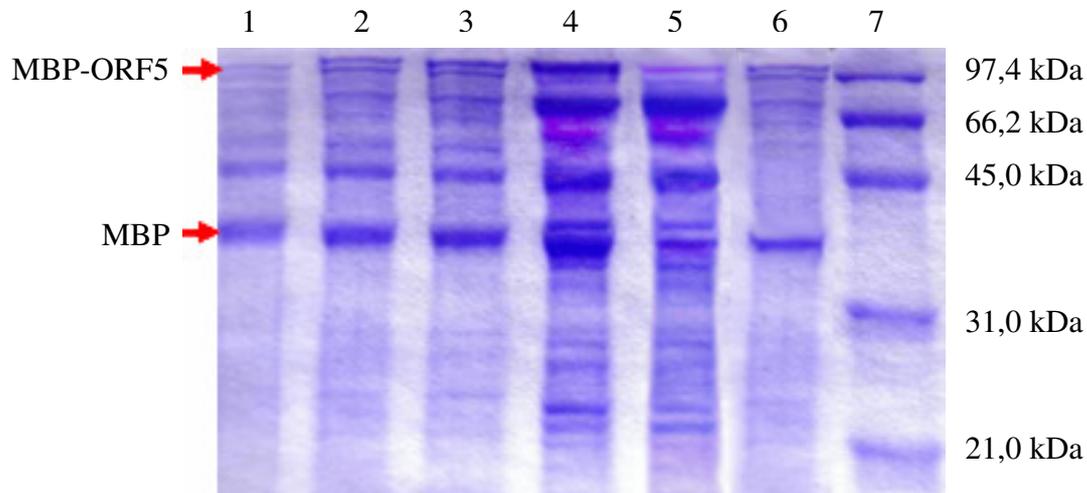
A. 10% SDS-PAGE. Spur 1, Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 2, negative Kontrolle *E. coli* XL 10 mit pMAL-c2x nach über Nacht Induktion mit 1 mM IPTG, Spur 3: *E. coli* XL 10 mit pMAL-c2x-*orf4* nach 1 Stunde Induktionszeit (t_1), Spur 4: *E. coli* XL 10 mit pMAL-c2x-*orf4* nach 2 Stunden Induktionszeit (t_2), Spur 5: *E. coli* XL 10 mit pMAL-c2x-*orf4* nach 3 Stunden Induktionszeit (t_3), Spur 6: *E. coli* XL 10 mit pMAL-c2x-*orf4* nach über Nacht Induktion (t_{in}), Spur 7: Lysat MBP-ORF4 in Puffer 5, Spur 8: Eluat MBP-ORF4 **B.** Entsprechender Western Blot mit Anti-MBP-Antikörpern.

3.3.2 Expression, Solubilisierung und Reinigung von MBP-ORF5

Zum Gewinnen des MBP-ORF5-Fusionsproteins wurden 200 ml LB-Medium mit Ampicillin [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] und Chloramphenicol [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$] mit *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL (pMAL-c2x-*orf5*) beimpft und bei 37°C geschüttelt. Die Expression wurde erst bei einer OD_{600} von 1 durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur wurde über Nacht bei den gleichen Bedingungen weiter geschüttelt. Das MBP-ORF5-Fusionsprotein zeigte Probleme bei der Solubilisierung, Dipl.-Ing. (FH) Raschid Salih hat im Rahmen seiner Diplomarbeit (Salih, 2006) verschiedene native Puffer (Lindwall *et al.*, 2000) probiert, um das Protein zu solubilisieren. MBP-ORF5 ließ sich zum Teil in Puffer 5 lösen. Die Reinigung wurde mit Hilfe der *Amylose Magnetic Beads* durchgeführt (2.2.3.10). Proben aus allen Fraktionen der Expression, der Solubilisierung und die Reinigung wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 3.7.A). Das Fusionsprotein MBP-ORF5 hat ein

berechnetes Molekulargewicht von 119,2 kDa. Eine Bande größer als die 94,7 kDa Bande ist bei t_1 , t_2 , $t_{\text{ün}}$, im Lysat und im Eluat zu sehen. Mittels Western Blot konnte MBP-ORF5 in den Proben immunologisch mit Anti-MBP-Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 3.7.B).

A



B

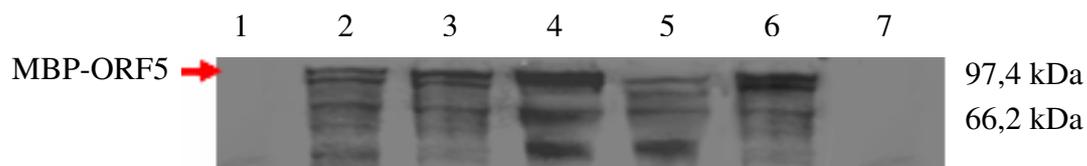


Abb. 3.7: Expression und Reinigung des MBP-ORF5-Fusionsproteins.

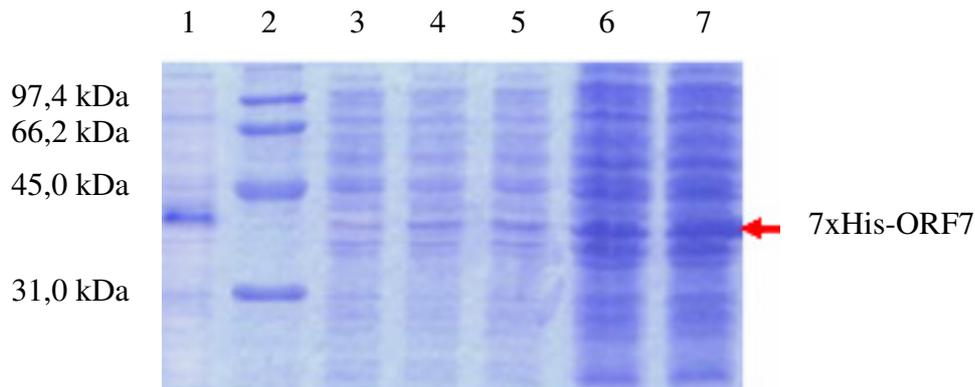
A. 10% SDS-PAGE. Spur 1: Negative Kontrolle *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pMAL-c2x nach über Nacht Induktion mit 1 mM IPTG, Spur 2: *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pMAL-c2X-*orf5* nach 1 Stunde Induktionszeit (t_1), Spur 3: Nach 2 Stunden Induktionszeit (t_2), Spur 4: *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pMAL-c2x-*orf5* nach über Nacht Induktion ($t_{\text{ün}}$), Spur 5: Lysat MBP-ORF5 in Puffer 5, Spur 6: Eluat MBP-ORF5, Spur 7: Proteinstandard *low range molecular weight*. **B.** Entsprechender Western Blot mit Anti-MBP-Antikörpern.

3.3.3 Expression, Solubilisierung und Reinigung von 7xHis-ORF7

Es war schwer, das 7xHis-ORF7-Fusionsprotein zu exprimieren und zu reinigen, weil die induzierten *E. coli* Zellen zum Teil lysierten, bevor man das Zellpellet ernten konnte (ORF7 ist eine lytische Transglykosylase). Dieses Problem konnte Frau Dr. Jolanta Kopeć im Rahmen ihrer Doktorarbeit lösen (Kopeć, 2006). Für die Expression wurden *E. coli* XL 10 Zellen (pQTEV-*orf7*) in 200 mL 2 x YT-Medium mit 0,5% Glukose und Ampicillin [100 µg/mL] als Selektionsmarker inokuliert und bei 37°C in einem gut belüfteten Kolben bei 200 rpm geschüttelt. Als die OD_{600} einen Wert von 0,8 erreichte, wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und es wurde für nur weitere 2 Stunden bei 37°C geschüttelt. Bevor die Zellen zu lysieren begannen, wurde der Prozess gestoppt und das Pellet im Puffer P5 aufgenommen (Abschnitt 2.2.3.6). Die Reinigung wurde auf Ni^{2+} -NTA *spin*

Säulen durchgeführt (2.2.3.12). Proben aus allen Fraktionen der Expression, der Solubilisierung und der Reinigung wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 3.8.A). Das berechnete Molekulargewicht für 7xHis-ORF7 beträgt 44,1 kDa. Eine entsprechend große Bande war auf dem SDS-Gel bei t_1 , t_2 , im Lysat und im Eluat zu sehen und konnte immunologisch durch Western Blot mit Anti-His-Antikörpern nachgewiesen werden.

A



B

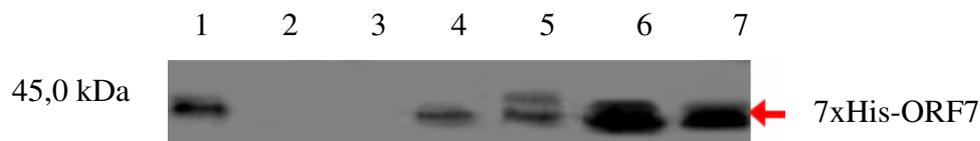


Abb. 3.8: Expression und Reinigung des 7xHis-ORF7-Fusionsproteins.

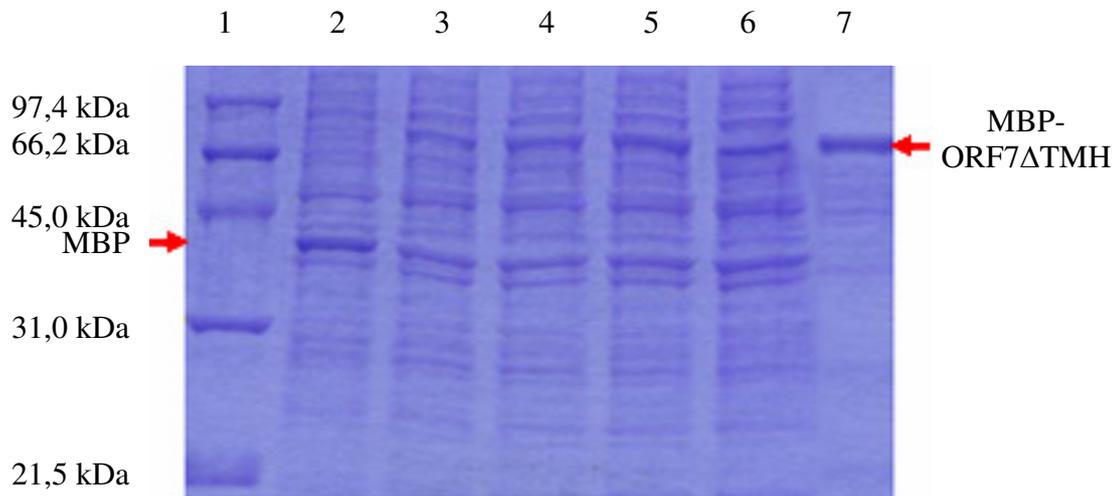
A. 10% SDS-PAGE. Spur 1: Eluat 7xHis-ORF7, Spur 2: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 3: Negative Kontrolle *E. coli* XL 10 mit pQTEV nach über Nacht Induktion mit 1 mM IPTG, Spur 4: *E. coli* XL 10 mit pQTEV-*orf7* nach 1 Stunde Induktionszeit (t_1), Spur 5: Nach 2 Stunden Induktionszeit (t_2), Spur 6: Pellet *E. coli* XL 10 mit pQTEV-*orf7* nach 2 Stunden Induktion, Spur 7: Lysat 7xHis-ORF7.

3.3.4 Expression, Solubilisierung und Reinigung von MBP-ORF7 Δ TMH

Zur Expression von ORF7 Δ TMH wurden bei der Klonierung über PCR die Basenpaare, die für die ersten 45 Aminosäuren von ORF7 (die Transmembranhelix) kodieren, deletiert (Arends, 2005). Zum Gewinnen des entsprechenden MBP-ORF7 Δ TMH-Fusionsproteins wurden 200 ml LB-Medium mit Ampicillin [100 μ g/mL] als Selektionsmarker mit *E. coli* XL 10 (pMAL-c2x-*orf7* Δ TMH) beimpft und bei 37°C geschüttelt. Die Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6 durch Zugabe von IPTG auf 0,5 mM Endkonzentration induziert, die Kultur wurde unter den gleichen Bedingungen für 3 Stunden weiter geschüttelt. Das MBP-ORF7 Δ TMH-Fusionsprotein konnte aus dem Pellet mit dem Puffer 5, wie im Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben, extrahiert werden. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe der *Amylose Magnetic Beads* (2.2.3.10). Proben aus allen Fraktionen der Expression, der Solubilisierung und der Reinigung wurden auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 3.9.A).

Das Fusionsprotein MBP-ORF7 Δ TMH hat ein berechnetes Molekulargewicht von 78,5 kDa, eine entsprechende Bande ist bei t₁, t₂, t₃, im Lysat und Eluat gut zu sehen. Mittels Western Blot konnte MBP-ORF7 Δ TMH in den Proben immunologisch mit Anti-MBP-Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 3.9.B)

A



B

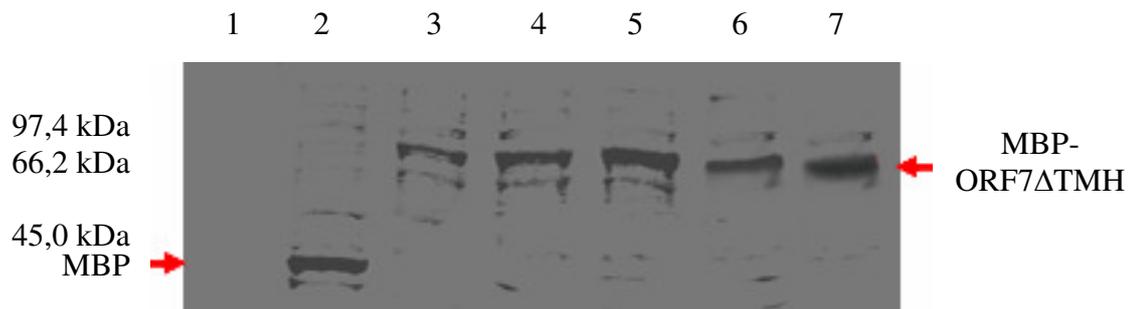


Abb. 3.9: Expression und Reinigung des MBP-ORF7 Δ TMH-Fusionsproteins.

A. 12% SDS-PAGE. Spur 1, Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 2, negative Kontrolle *E. coli* XL 10 mit pMAL-c2x nach 3 Stunden Induktion mit 0,5 mM IPTG (t₃), Spur 3: *E. coli* XL 10 mit pMAL-c2x-*orf7* Δ TMH nach 1 Stunde Induktionszeit (t₁), Spur 4: Nach 2 Stunden Induktionszeit (t₂), Spur 5: Nach 3 Stunden Induktionszeit (t₃), Spur 6: Lysat MBP-ORF7 Δ TMH in Puffer 5, Spur 7: Eluat MBP-ORF7 Δ TMH **B.** Entsprechender Western Blot mit Anti-MBP-Antikörpern.

3.3.5 Expression, Solubilisierung und Reinigung von 7xHis-ORF8

Das 7xHis-ORF8-Fusionsprotein wurde wie in Döring (2006) beschrieben exprimiert und gereinigt. *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL (pQTEV-*orf8*) wurden in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin [100 μ g/mL], Chloramphenicol [50 μ g/mL] und 1% Glukose bei 30°C inkubiert. Die Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,3 durch Zugabe von IPTG auf 1 mM Endkonzentration induziert, die Kultur wurde über Nacht unter den gleichen Bedingungen weiter geschüttelt. Das 7xHis-ORF8-Fusionsprotein wurde in Puffer 5 aufgenommen (Abschnitt 2.2.3.4). Anschließend wurde das Protein auf Ni²⁺-NTA Säulen, wie in Abschnitt

2.2.3.12 beschrieben, gereinigt. Proben aus allen Fraktionen der Expression, der Solubilisierung und der Reinigung wurden auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 3.10.A). Das berechnete Molekulargewicht für 7xHis-ORF8 beträgt 22,4 kDa. Eine Proteinbande mit etwas größerem Molekulargewicht war auf dem Gel bei t_1 , t_2 , t_3 , t_4 , $t_{\text{ün}}$, im Lysat und im Eluat zu sehen. Die Präsenz des 7xHis-ORF8-Fusionsproteins konnte auch immunologisch durch Western Blot mit Anti-His-Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 3.10.B). Der Western Blot bestätigte außerdem, dass 7xHis-ORF8 etwas langsamer als seinem berechneten Molekulargewicht entspräche, im 12% SDS-Polyacrylamidgel wandert.

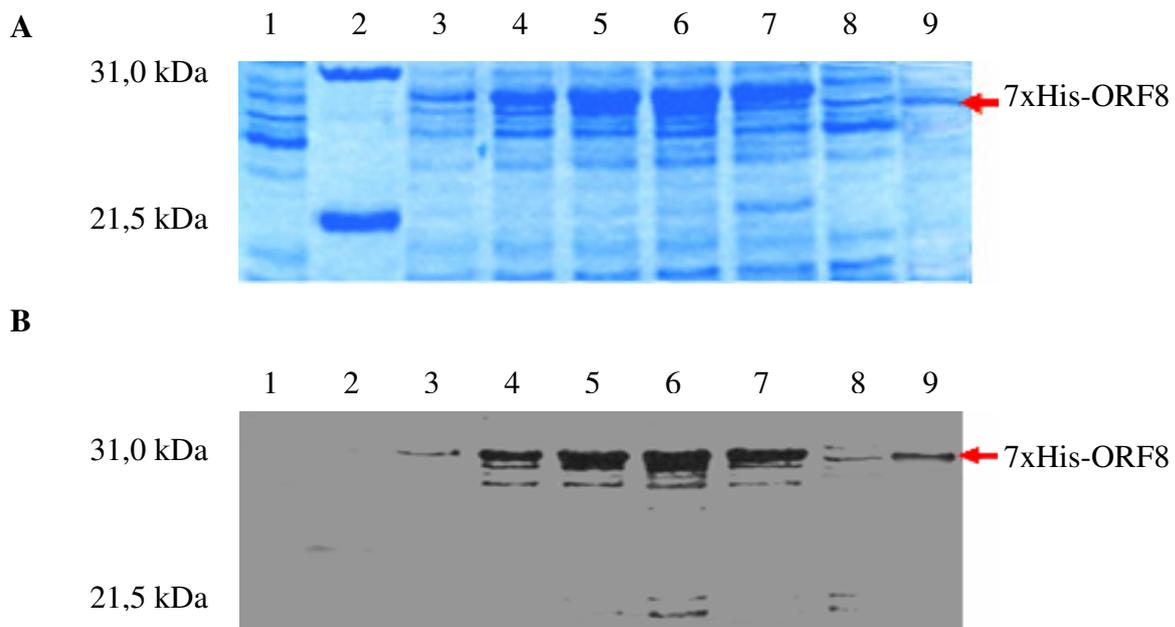


Abb. 3.10: Expression und Reinigung von 7xHis-ORF8.

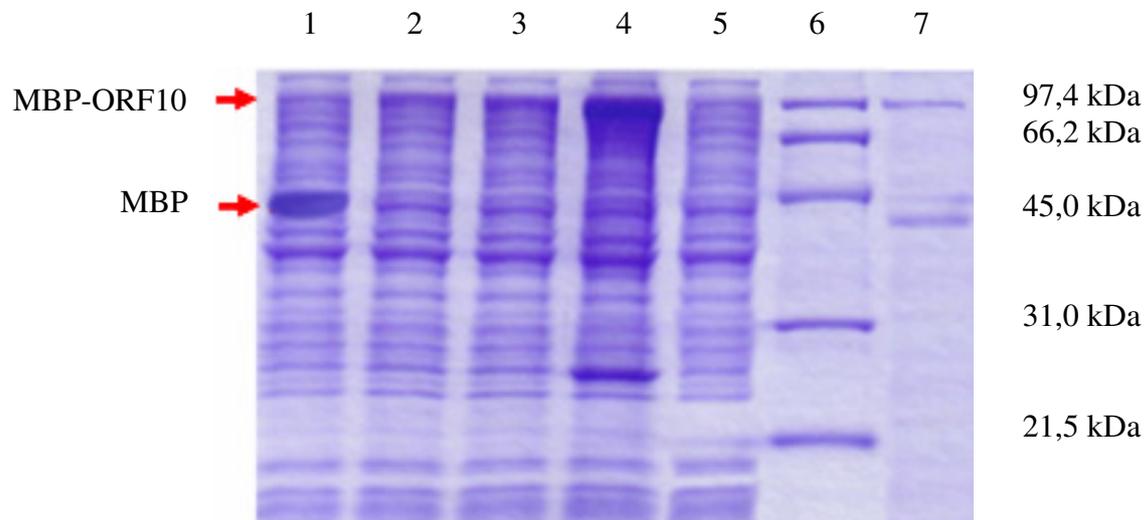
A. 12% SDS-PAGE. Spur 1: Negative Kontrolle *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pQTEV nach über Nacht Induktion mit 1 mM IPTG ($t_{\text{ün}}$), Spur 2: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 3: *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pQTEV-*orf8* nach 1 Stunde Induktionszeit (t_1), Spur 4: Nach 2 Stunden Induktionszeit (t_2), Spur 5: Nach 3 Stunden Induktionszeit (t_3), Spur 6: Nach 4 Stunden Induktionszeit (t_4), Spur 7: *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pQTEV-*orf8* nach über Nacht Induktion ($t_{\text{ün}}$), Spur 8: Lysat 7xHis-ORF8 in Puffer 5, Spur 9: Eluat 7xHis-ORF8 **B.** Entsprechender Western Blot mit Anti-His-Antikörpern.

3.3.6 Expression, Solubilisierung und Reinigung von MBP-ORF10

Zum Gewinnen des MBP-ORF10-Proteins wurden 200 ml LB-Medium mit Ampicillin [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] und Chloramphenicol [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$] als Selektionsmarker mit *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL (pMAL-c2x-*orf10*) beimpft und bei 37°C geschüttelt. Die Expression wurde bei einer OD_{600} von 1 durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert, die Kultur wurde über Nacht unter den gleichen Bedingungen weiter geschüttelt. Das MBP-ORF10-Protein konnte aus dem Pellet mit dem Puffer 5 solubilisiert und mit *Amylose Magnetic Beads* gereinigt werden. Proben aus allen Fraktionen der Expression, der Solubilisierung und der Reinigung wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 3.11.A). Das

Fusionsprotein MBP-ORF10 hat ein berechnetes Molekulargewicht von 106,4 kDa, eine Bande größer als 94,7 kDa ist bei t_1 , t_2 , $t_{\text{ün}}$, im Lysat und im Eluat zu sehen. Mittels Western Blot konnte MBP-ORF10 immunologisch mit Anti-MBP-Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 3.11.B).

A



B

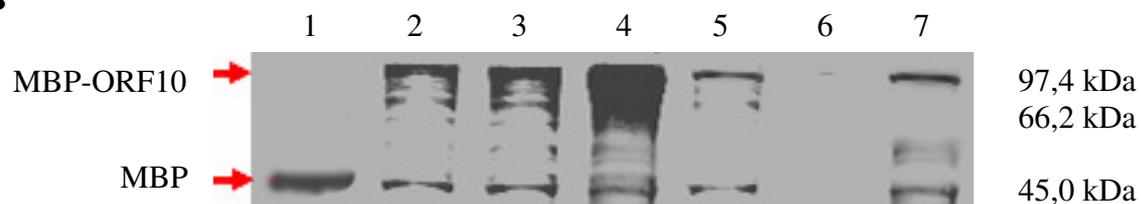


Abb. 3.11: Expression und Reinigung des MBP-ORF10-Fusionsproteins.

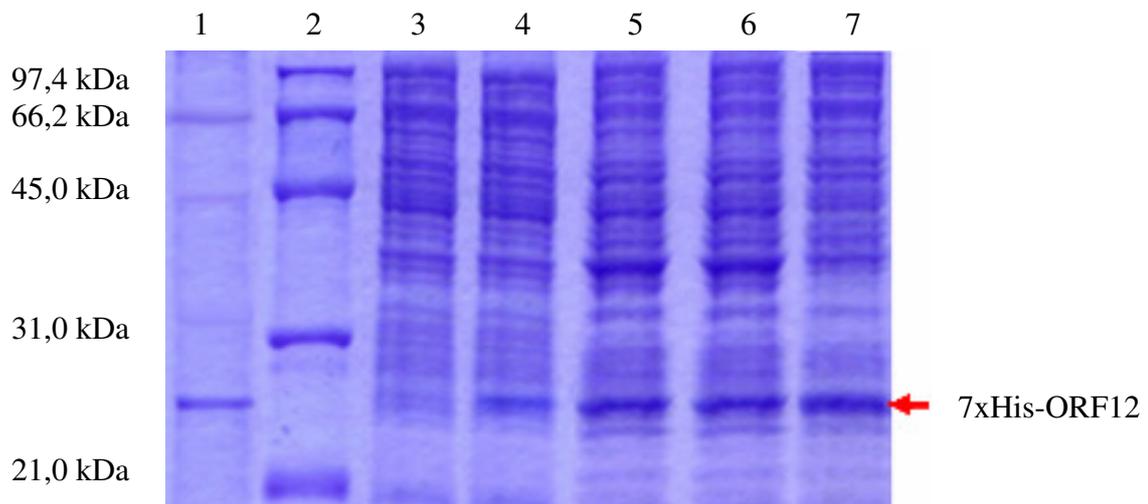
A. 10% SDS-PAGE. Spur 1: Negative Kontrolle *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pMAL-c2x nach über Nacht Induktion mit 1 mM IPTG, Spur 2: *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pMAL-c2x-orf10 nach 1 Stunde Induktionszeit (t_1), Spur 3: Nach 2 Stunden Induktionszeit (t_2), Spur 4: *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pMAL-c2x-orf10 nach über Nacht Induktion ($t_{\text{ün}}$), Spur 5: Lysat MBP-ORF10 in Puffer P5, Spur 6: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 7: Eluat MBP-ORF10 **B.** Entsprechender Western Blot mit Anti-MBP-Antikörpern.

3.3.7 Expression, Solubilisierung und Reinigung von 7xHis-ORF12

Zur Expression des 7xHis-ORF12-Fusionsproteins wurden 200 mL LB-Medium mit Ampicillin [100 µg/mL] und Chloramphenicol [50 µg/mL] als Selektionsmarker mit *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL (pQTEV-orf12) beimpft und bei 37°C geschüttelt. Die Expression wurde bei einer OD_{600} von 0,8 durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert, die Kultur wurde über Nacht unter den gleichen Bedingungen weiter geschüttelt. Das 7xHis-ORF12-Fusionsprotein wurde in Puffer 5 wie in Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben, solubilisiert. Die Reinigung erfolgte auf Ni^{2+} -NTA Säulen (2.2.3.12). Proben aus allen Fraktionen der Expression, der Solubilisierung und der Reinigung wurden auf einem 12% SDS-

Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 3.12.A). Das berechnete Molekulargewicht für 7xHis-ORF12 beträgt 36,1 kDa, aber auf dem SDS-Polyacrylamidgel konnte man nur eine kleinere Bande (<31 kDa) erkennen, die im Laufe der Induktionszeit (t_1 , t_2 , t_{in}) zunahm. Eine gleich große Bande war auch im Lysat und im Eluat zu erkennen und konnte im Western Blot die Anti-His-Antikörper binden (Abb. 3.12.B).

A



B



Abb. 3.12: Expression und Reinigung des 7xHis-ORF12-Fusionsproteins.

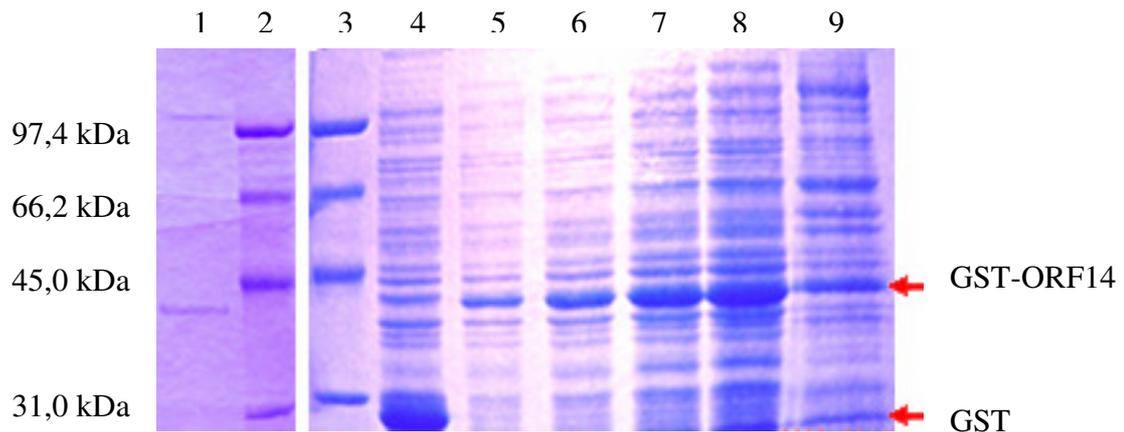
A. 12% SDS-PAGE. Spur 1: Eluat 7xHis-ORF12, Spur 2: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 3: Negative Kontrolle *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pQTEV nach über Nacht Induktion mit 1 mM IPTG, Spur 4: *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pQTEV-*orf12* nach 1 Stunde Induktion mit 1 mM IPTG, Spur 5: *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pQTEV-*orf12* nach 2 Stunden Induktion, Spur 6: *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pQTEV-*orf12* nach einer über Nacht Induktion mit 1 mM IPTG, Spur 7: Lysat 7xHis-ORF12 in Puffer 5. **B.** Entsprechender Western Blot mit Anti-His-Antikörpern.

3.3.8 Expression, Solubilisierung und Reinigung von GST-ORF14

Die Expression von GST-ORF14 erfolgte mit *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin [100 µg/mL] und Chloramphenicol [50 µg/mL] als Selektionsmarker. Die Expression wurde bei einer OD_{600} von 0,8 durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Kultur wurde anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Das GST-ORF14-Fusionsprotein wurde in Puffer 5 aufgenommen (2.2.3.4) und mit dem *Kit Bulk GST Purification Module* (Amersham), wie im Abschnitt 2.2.3.11 beschrieben,

gereinigt. Proben aus allen Fraktionen der Expression, der Solubilisierung und der Reinigung wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 3.13.A). Das GST-ORF14-Fusionsprotein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 42,2 kDa, eine Proteinbande dieser Größe konnte auf dem Gel bei t_1 , t_2 , t_3 , t_{in} , im Lysat und im Eluat deutlich erkannt werden. Die Präsenz des GST-ORF14-Fusionsproteins in den Proben konnte auch immunologisch durch Western Blot mit Anti-GST-Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 3.13.B).

A



B

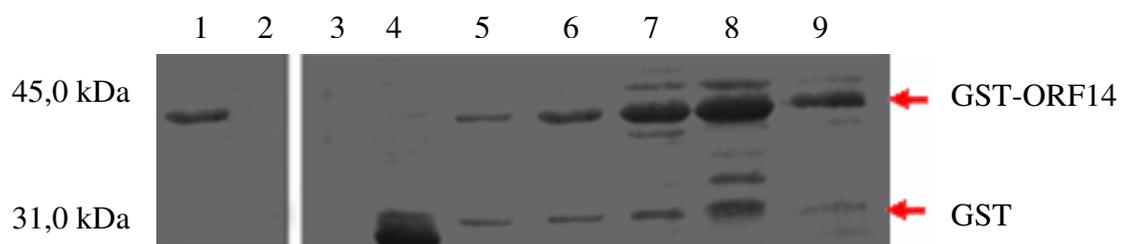


Abb. 3.13: Expression und Reinigung des GST-ORF14-Fusionsproteins.

A. 10% SDS- PAGE. Spur 1: Eluat GST-ORF14, Spuren 2 und 3: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 4: negative Kontrolle *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pGEX-6P-2 nach über Nacht Induktion mit 1 mM IPTG, Spur 5: *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pGEX-6P-2- *orf14* nach 1 Stunde Induktionszeit (t_1), Spur 6: Nach 2 Stunden Induktionszeit (t_2), Spur 7: Nach 3 Stunden Induktionszeit (t_3), Spur 8: *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL mit pGEX-6P-2-*orf14* nach über Nacht Induktion, Spur 9: Lysat GST-ORF14 in Puffer 5. **B.** Entsprechender Western Blot mit Anti-GST-Antikörpern.

3.3.9 Expression und Reinigung der 7xHis-ORF5 und 7xHis-ORF10 Fusionsproteine

Die Fusionsproteine 7xHis-ORF5 und 7xHis-ORF10 wurden von Frau Kopeć an der Karl-Franzens-Universität in Graz, wie im Abschnitt 2.2.3.7 beschrieben, gereinigt und uns zur Verfügung gestellt (Abb. 3.14). 7xHis-ORF5 und 7xHis-ORF10 waren bei 4°C nur für ca. 2-3 Wochen stabil, danach waren sie fast komplett ausgefallen, und konnten nicht mehr für die Enzymreaktionen oder die *pull-down* Studien benützt werden.

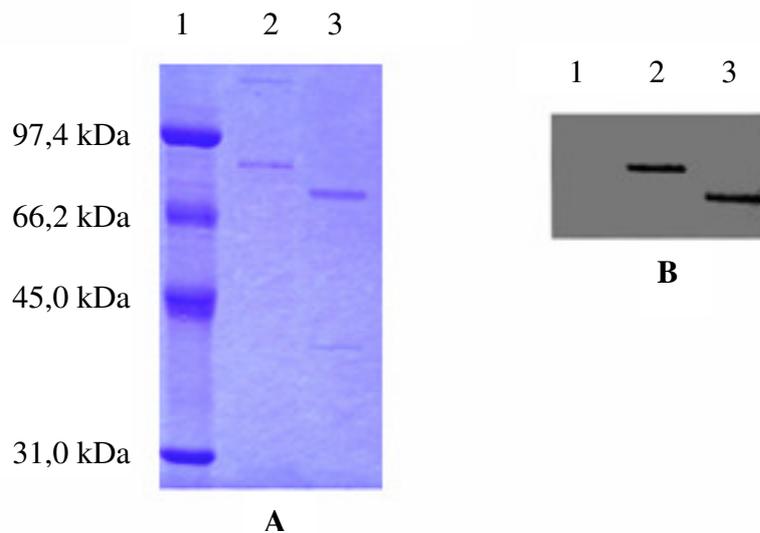


Abb. 3.14: Reinigung der 7xHis-ORF5 und 7xHis-ORF10 Fusionsproteine.

A. 10% SDS- PAGE. Spur 1: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 2: 7xHis-ORF5, Spur 3: 7xHis-ORF10. B. Entsprechender Western Blot mit Anti-His-Antikörpern.

3.4 Pull-down Studien zur Verifizierung der *in vivo* identifizierten Protein-Protein Wechselwirkungen

Die meisten Interaktionen, die mittels Y-2H Systems festgestellt wurden, konnten außerdem *in vitro* durch *pull-down* Studien bestätigt werden. (Tab. 3.4). Die *pull-down* Studien wurden, wie im Abschnitt 2.2.3.9 beschrieben, durchgeführt. Die Interaktionen ORF6-ORF10, ORF7-ORF2 und ORF9-ORF3 wurden von Frau Dr. Hanssen im Zuge ihres Postdoktoranden Aufenthaltes im Labor von Frau Dr. Grohmann nachgewiesen (Hanssen and Grohmann, nicht publizierte Daten). Die noch fehlenden *in vitro* Versuche werden auch von Frau. Dr. Hanssen durchgeführt.

Interaktion	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
ORF1-ORF1	✓	✓
ORF1-ORF10	✓	✓
ORF4-ORF5	✓	✓
ORF5-ORF5	✓	✓
ORF3-ORF6	✓	?
ORF6-ORF10	✓	✓
ORF7-ORF2	✓	✓
ORF7-ORF5	✓	✓
ORF7-ORF7	✓	✓
ORF7-ORF10	✓	✓
ORF7-ORF14	✓	✓
ORF9-ORF3	✓	✓
ORF14-ORF5	✓	✓
ORF14-ORF8	✓	✓
ORF14-ORF12	✓	✓

ORF14-ORF14	✓	✓
ORF15-ORF12	✓	?

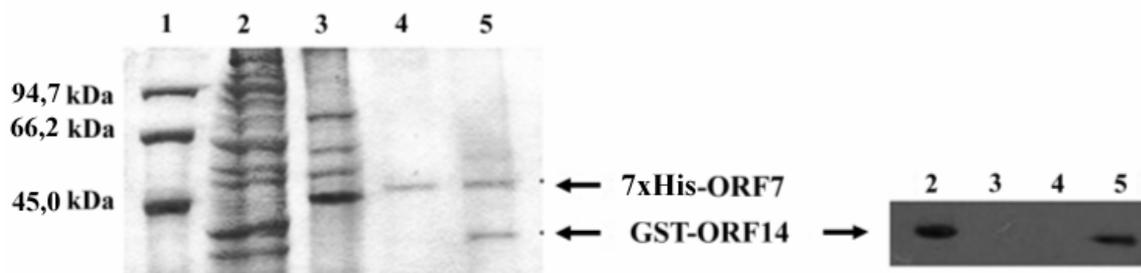
Tab. 3.4: Darstellung der *in vitro* durchgeführten Protein-Protein Wechselwirkungen.

✓ : Zeigt die *in vivo* bzw. *in vitro* nachgewiesenen Protein-Protein Wechselwirkungen. ? : steht für die noch fehlenden *in vitro* Versuche.

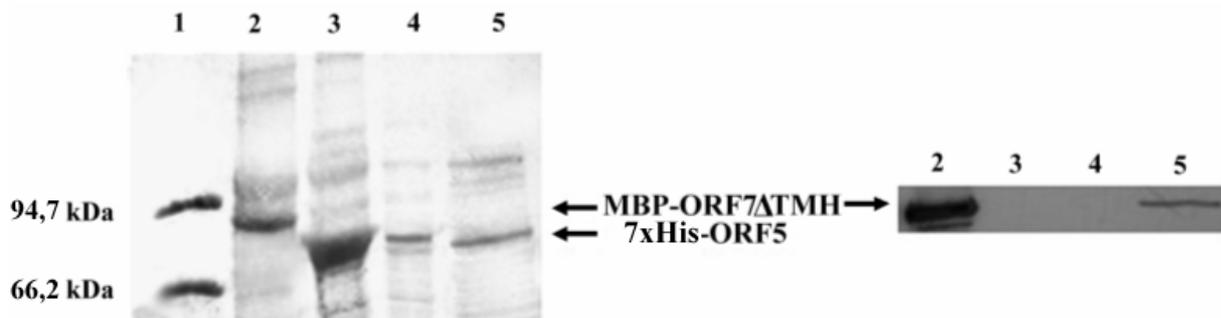
3.4.1 Wechselwirkungen, die an der Rekrutierung der Tra-Proteine zum T4SLS-Komplex beteiligt sind

Möglicherweise spielt ORF7 durch seine Interaktionen mit ORF5, ORF10 und ORF14 eine wichtige Rolle in der Entstehung des T4SLS-Kernkomplexes. Die entsprechenden Proteinkomplexe 7xHis-ORF7-GST-ORF14, MBP-ORF7ΔTMH-7xHis-ORF5 und MBP-ORF7ΔTMH-7xHis-ORF10 konnten mittels *pull-down* isoliert werden (Abb. 3.15).

A



B



C

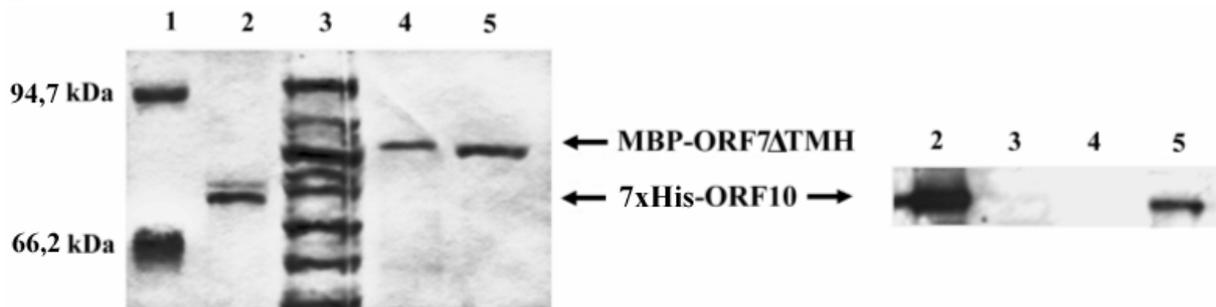


Abb. 3.15: An der Rekrutierung der Tra-Proteine zum Proteinkomplex beteiligte Wechselwirkungen.

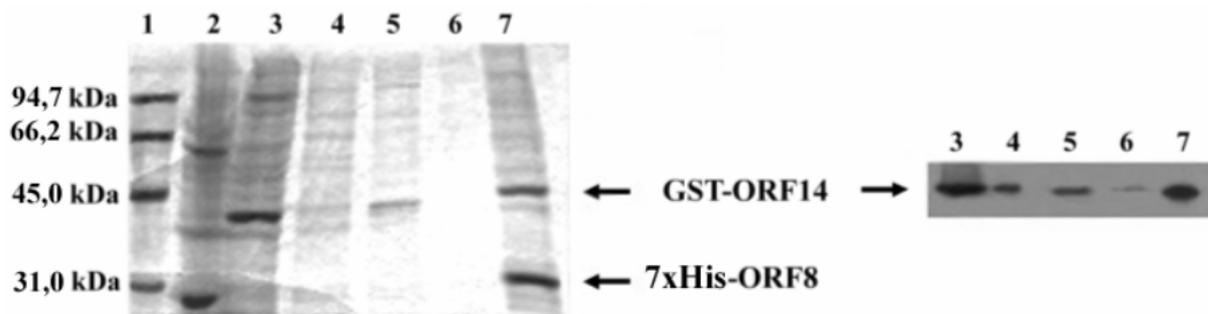
A. 12% SDS-PAGE. Spur 1: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 2: Lysat GST-ORF14; Spur 3: Lysat 7xHis-ORF7, Spur 4: Negative Kontrolle 7xHis-ORF7/GST, Spur 5: Eluat des GST-ORF14-7xHis-ORF7-

Proteinkomplexes. Entsprechender Western Blot mit Anti-GST-Antikörpern. -: Bezeichnet die entstandenen Protein-Protein Komplexe, /: Keine Komplexbildung. **B.** 6% SDS-PAGE. Spur 1: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 2: Lysat MBP-ORF7ΔTMH, Spur 3: Lysat 7xHis-ORF5, Spur 4: Negative Kontrolle 7xHis-ORF5/MBP, Spur 5: Eluat des 7xHis-ORF5-MBP-ORF7ΔTMH-Proteinkomplexes. Entsprechender Western Blot mit Anti-MBP-Antikörpern. **C.** 8% SDS-PAGE. Spur 1: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 2: 7xHis-ORF10, Spur 3: Lysat MBP-ORF7ΔTMH, Spur 4: Negative Kontrolle MBP-ORF7ΔTMH/Lysat pQTEV, Spur 5: Eluat des MBP-ORF7ΔTMH-7xHis-ORF10-Proteinkomplexes. Entsprechender Western Blot mit Anti-Penta-His-Antikörpern.

3.4.2 Wechselwirkungen der Komponenten des Transferkomplexes

Der Transfer-Kernkomplex, der in der Zytoplasmamembran liegt, könnte aus den Proteinen ORF14, ORF8 und ORF12 bestehen. Diese Vermutung ließ sich *in vitro* durch die Isolierung zweier Proteinkomplexe, nämlich von ORF8-ORF14 und ORF12-ORF14 bekräftigen. Wie in Abb. 3.16 dargestellt, wurden die Proteinkomplexe 7xHis-ORF8-GST-ORF14 und 7xHis-ORF12-GST-ORF14 auf Ni²⁺-NTA Säulen isoliert und mittels SDS-PAGE und Anti-GST-Antikörpern nachgewiesen.

A



B

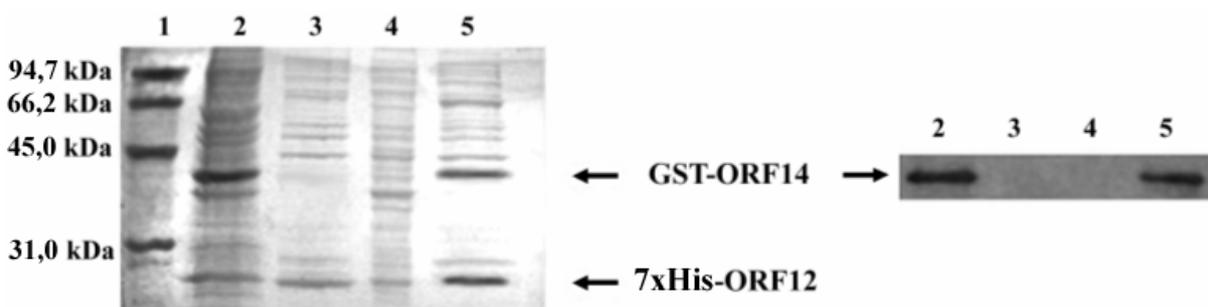


Abb. 3.16: Wechselwirkungen zwischen den Komponenten des Kerntransferkomplexes.

A. 12% SDS-PAGE. Spur 1: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 2: Lysat 7xHis-ORF8, Spur 3: Lysat GST-ORF14, Spur 4: Ungebundene Proteine, Spuren 5-6: Waschschrte zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine, Spur 7: Eluat des 7xHis-ORF8-GST-ORF14-Proteinkomplexes. Entsprechender Western Blot mit Anti-GST-Antikörpern. **B.** 12% SDS-PAGE. Spur 1: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 2: Lysat GST-ORF14, Spur 3: Lysat 7xHis-ORF12, Spur 4: negative Kontrolle 7xHis-ORF12/GST, Spur 5: Eluat des 7xHis-ORF12/GST-ORF14-Proteinkomplexes. Entsprechender Western Blot mit Anti-GST-Antikörpern.

3.4.3 Wechselwirkungen des putativen Kopplungsproteins ORF10

Mittels *pull-down* Assays wurde die bereits mit dem Y-2H festgestellte Interaktion zwischen dem vermutlichen Kopplungsprotein ORF10 und der Relaxase ORF1 bestätigt. Ein Proteinkomplex zwischen 6xHis-ORF1 und MBP-ORF10 konnte *in vitro* entstehen und ließ sich auf Amylose *magnetic beads* isolieren und mit Anti-MBP-Antikörpern nachweisen (Abb. 3.17). Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass ORF10 ein Kopplungsprotein ist und, dass es den Komplex aus Einzelstrang pIP501 DNA und ORF1 (Relaxosom) binden kann. Für die Relaxasedomäne ORF1_{N246}, die aus den ersten 246 N-terminalen Aminosäuren von ORF1 besteht, konnte keine Bindung zu dem Kopplungsprotein ORF10 *in vitro* nachgewiesen werden. Wie in der Abb. 3.17 deutlich zu erkennen ist, konnte kein Proteinkomplex von MBP-ORF10-6xHis-ORF1_{N246} isoliert werden. Außerdem interagiert ORF10 mit der lytischen Transglykosylase ORF7, wie im Abschnitt 3.3.1 beschrieben, und kann Oligomere bilden, die mindestens die Größe von Dimeren haben (3.5.2).

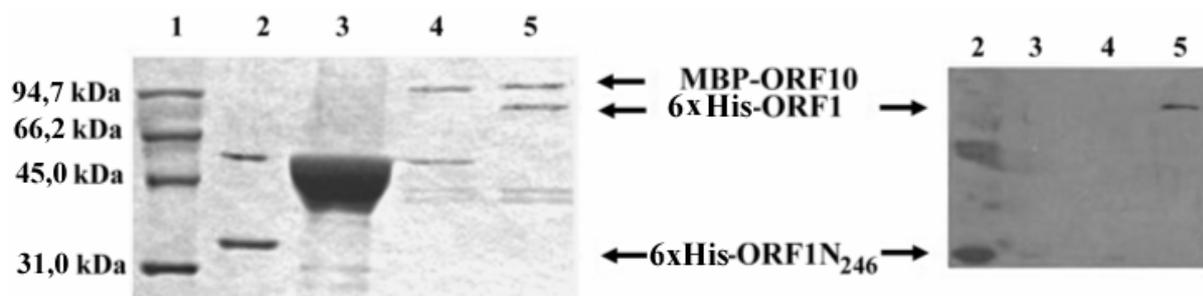


Abb. 3.17: Wechselwirkungen des Kopplungsproteins ORF10 mit der Relaxase ORF1.

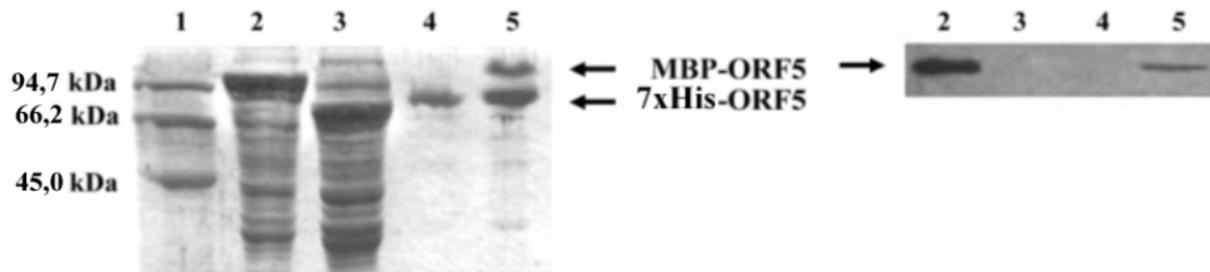
12% SDS-PAGE. Spur 1: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 2: 6xHis-ORF1_{N246}, Spur 3: Negative Kontrolle MBP/6xHis-ORF1_{N246}; Spur 4: Eluat des MBP-ORF10-6xHis-ORF1_{N246}-Bindungsversuches, Spur 5: Eluat des MBP-ORF10-6xHis-ORF1-Proteinkomplexes. Entsprechender Western Blot mit Anti-Penta-His- Antikörpern.

3.4.4 Wechselwirkungen der putativen ATPase ORF5

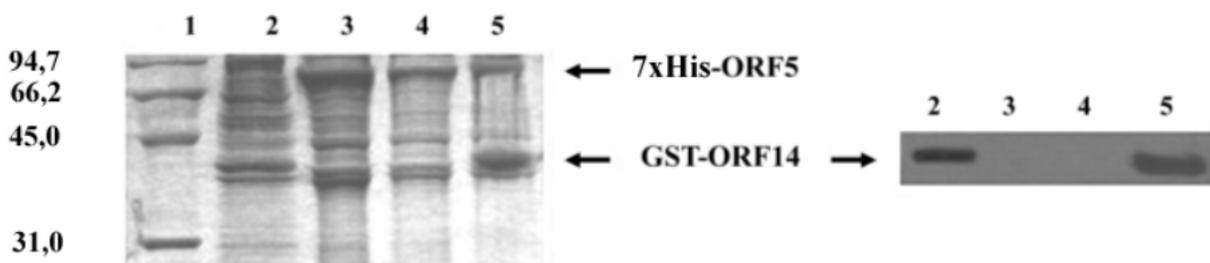
Mittels Y-2H Systems wurde nachgewiesen, dass ORF5 mit sich selbst, mit dem zytoplasmatischen Protein ORF4, mit der Kernkomplexkomponente ORF14 und mit der lytischen Transglykosylase interagieren kann. Die Bindungsversuche zwischen 7xHis-ORF5 und den anderen Proteinpartnern wurden wie im Abschnitt 2.2.3.9 beschrieben angesetzt. Die entstehenden Proteinkomplexe 7xHis-ORF5-MBP-ORF5, 7xHis-ORF5-MBP-ORF4 und 7xHis-ORF5-GST-ORF14 konnten auf Ni²⁺-NTA Säulen isoliert und auf SDS-Polyacrylamidgelen analysiert werden. Anschließend wurde die Anwesenheit des Bindungspartners mittels Western Blot mit Anti-MBP- bzw. Anti-GST-Antikörpern nachgewiesen (Abb. 3.18).

Während es noch unklar ist, welche Rolle die Interaktion zwischen ORF5 und ORF4 in dem Gentransferprozess spielt, könnte die Bindung an das Transferkomplex Protein ORF14 wichtig für die Energielieferung der ATPase zu dem Transportkernkomplex sein. Der *in vitro* Nachweis des ORF5-ORF5-Proteinkomplexes und die Ergebnisse der Y-2H Studie (Tab. 3.2) bestätigen die Vermutung, dass sich ORF5 als Dimer oder Multimer in der Zelle befinden könnte.

A



B



C

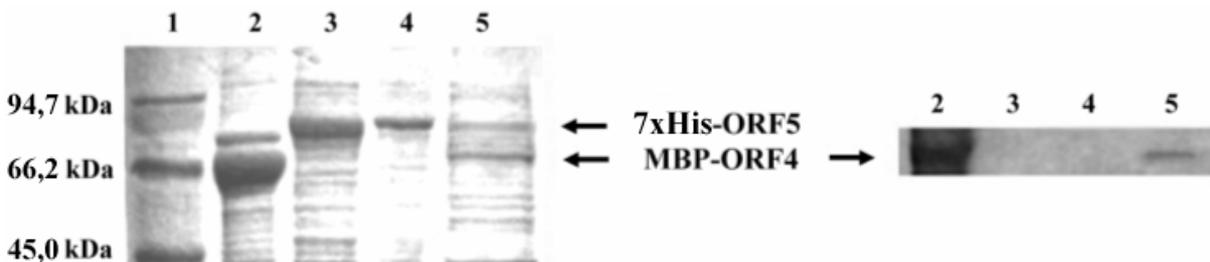


Abb. 3.18: Wechselwirkungen der putativen ATPase ORF5.

A. 12% SDS-PAGE. Spur 1: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 2: Lysat MBP-ORF5, Spur 3: Lysat 7xHis-ORF5, Spur 4: Negative Kontrolle 7xHis-ORF5/MBP, Spur 5: Eluat des Proteinkomplexes 7xHis-ORF5-MBP-ORF5. Entsprechender Western Blot mit Anti-MBP-Antikörpern. **B.** 12% SDS-PAGE. Spur 1: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 2: Lysat GST-ORF14, Spur 3: Lysat 7xHis-ORF5, Spur 4: Negative Kontrolle 7xHis-ORF5/GST, Spur 5: Eluat des Proteinkomplexes 7xHis-ORF5-GST-ORF14. Entsprechender Western Blot mit Anti-GST-Antikörpern. **C.** 10% SDS-PAGE. Spur 1: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 2: Lysat MBP-ORF4, Spur 3: Lysat 7xHis-ORF5, Spur 4: Negative Kontrolle 7xHis-ORF5/MBP, Spur 5: Eluat des Proteinkomplexes 7xHis-ORF5-MBP-ORF4. Entsprechender Western Blot mit Anti-MBP-Antikörpern.

3.4.5 Die lytische Transglykosylase ORF7 bildet Oligomere

Die Komplexbildung zwischen 7xHis-ORF7 und MBP-ORF7 Δ TMH wurde, wie im Abschnitt 2.2.3.9 beschrieben, durchgeführt und anschließend wurde der Komplex auf einer Ni²⁺-NTA Säule gereinigt. Der entstehende Proteinkomplex 7xHis-ORF7-MBP-ORF7 Δ TMH konnte auch mittels Western Blot mit Anti-MBP-Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 3.19). Dieses Ergebnis entspricht sowohl den Y-2H -Daten als auch den Ergebnissen der *cross-linking* Studien von ORF7 (3.5.1).

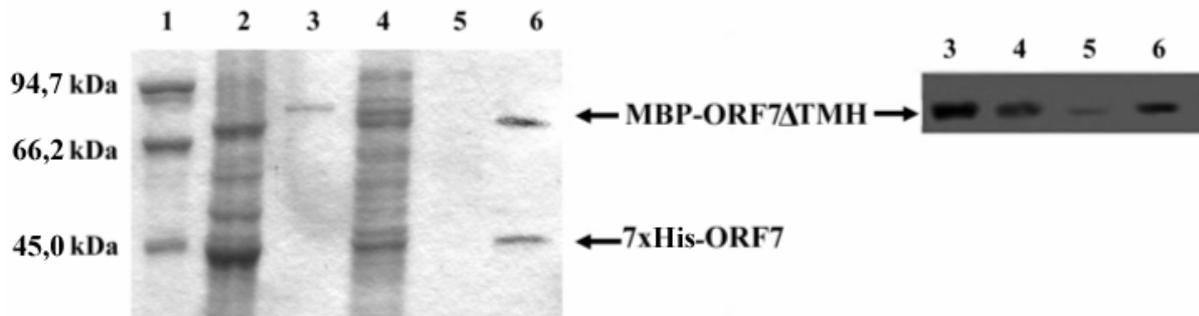


Abb. 3.19: *In vitro* Interaktion von ORF7 mit sich selbst.

12% SDS-PAGE. Spur 1: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 2: 7xHis-ORF7, Spur 3: Gereinigtes MBP-ORF7 Δ TMH, Spur 4: Nicht gebundene Proteine, Spur 5: Waschschrte zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine, Spur 6: Eluat des Proteinkomplexes 7xHis-ORF7/MBP-ORF7 Δ TMH. Entsprechender Western Blot mit Anti-MBP-Antikörpern.

3.5 Ergebnisse der *cross-linking*-Studien

3.5.1 Der oligomere Zustand von ORF7

Das Y-2H System und die *in vitro pull-down* Studien für ORF7 ergaben, dass zwei Moleküle von ORF7 miteinander interagieren können. Das bedeutet: ORF7 kann Dimere bilden, das stellt aber auch die Frage: Kann ORF7 auch Multimere bilden? Um diese Frage zu beantworten, wurde ein *cross-linking* für ORF7 durchgeführt. Der Test wurde mit MBP-ORF7 Δ TMH mit Glutaraldehyd als *cross-linker*, wie im Abschnitt 2.2.3.17 beschrieben, durchgeführt und der Proteinkomplex wurde auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 3.20).

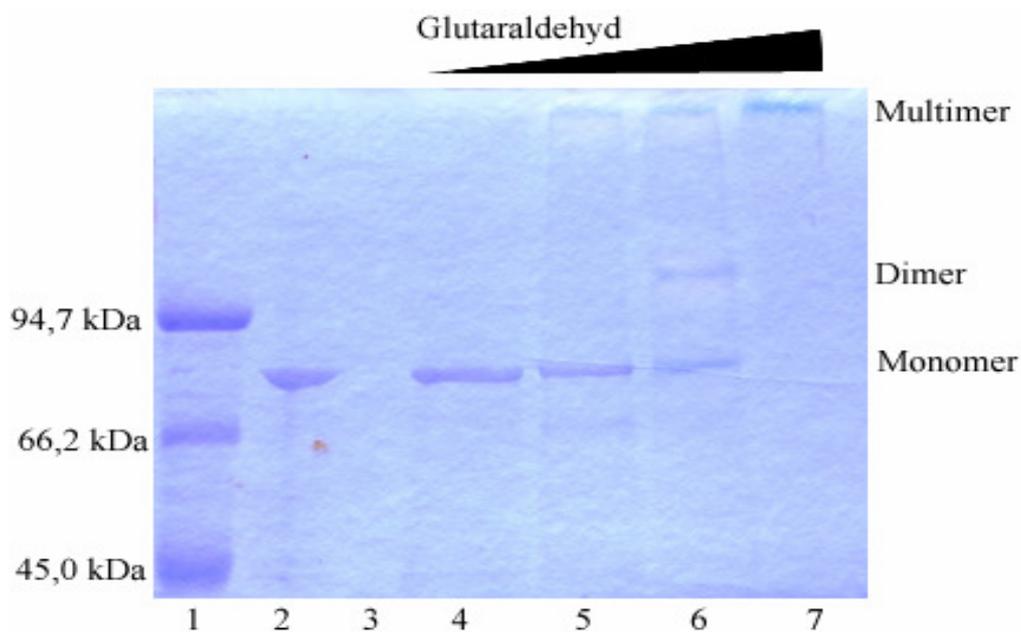


Abb. 3.20: Glutaraldehyd *cross-linking* des MBP-ORF7 Δ TMH-Fusionsproteins.

Proben von 0,5 mg/ml MBP-ORF7 Δ TMH (78,5kDa) wurden mit zunehmenden Konzentrationen von Glutaraldehyd behandelt und auf einem 10% SDS- Polyacrylamidgel analysiert. Spur 1: Proteinstandard *low range molecular weight*, Spur 2: MBP-ORF7 Δ TMH ohne Zugabe von Glutaraldehyd, Spur 3: leer, Spur 4: mit 0,001% Glutaraldehyd, Spur 5: mit 0,01%, Spur 6: mit 0,05%, Spur 7: mit 0,1% Glutaraldehyd.

3.5.2 Der oligomere Zustand von ORF10

Die Interaktion zwischen ORF10 und ORF10 konnte nicht *in vivo* mittels Y-2H analysiert werden, weil ORF10 in den Hefezellen die Synthese von β -Galaktosidase und Histidin allein ohne Bindungspartner aktivieren konnte, was man als Autoaktivierung der Reportergene *LacZ* und *HIS3* bezeichnet. Die *pull-down* Methode zum Nachweis der Interaktion zwischen ORF10 und ORF10 war auch auf Grund der unterschiedlichen Solubilisierungsbedingungen der MBP- und 7xHis-ORF10-Fusionsproteine nicht erfolgreich. Mittels Glutaraldehyd *cross-*

linker konnte der oligomere Zustand von ORF10 untersucht werden. Der Test wurde mit 7xHis-ORF10, wie im Abschnitt 2.2.3.17 beschrieben, durchgeführt. Das Ergebnis des Tests wurde auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 3.21) analysiert. ORF10 kann Dimere oder möglicherweise Multimere in Lösung bilden. Bei Glutaraldehyd Konzentrationen von 0,003-0,005% sieht man auf dem SDS-Gel zunehmende Konzentrationen von Dimeren, mit der Erhöhung der Konzentration sieht man immer mehr Multimere. Bei einer Konzentration von 0,01% sind fast nur Multimere auf dem Gel zu sehen.

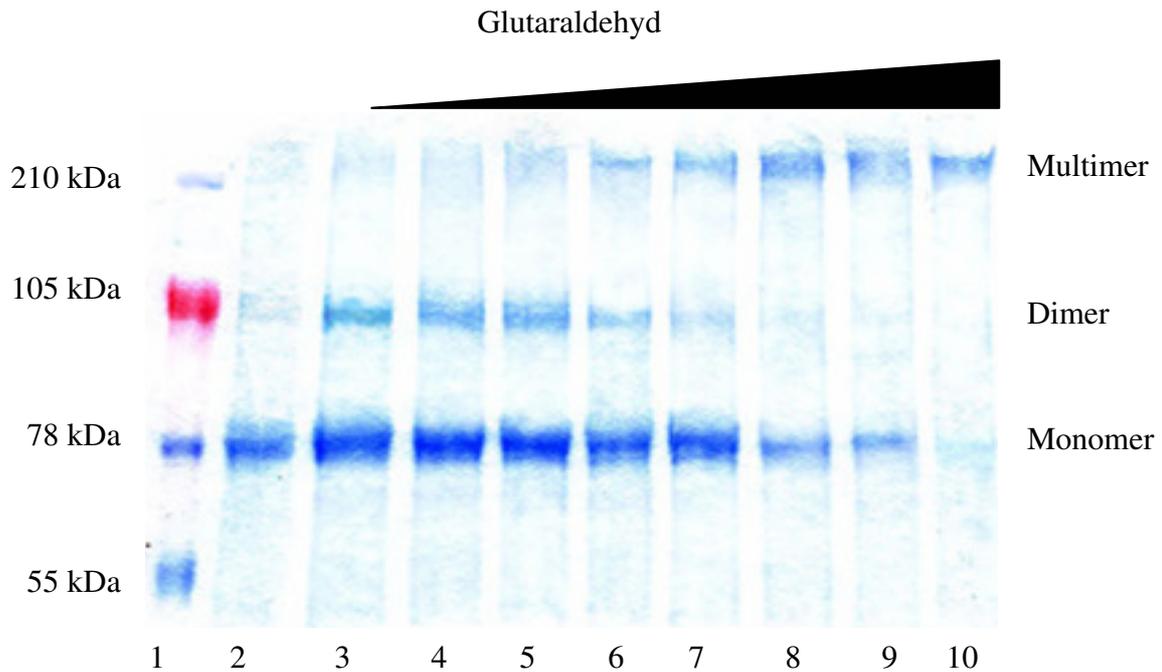


Abb. 3.21: Glutaraldehyd cross-linking des 7xHis-ORF10-Fusionsproteins.

Proben von 0,5 mg/ml 7xHis-ORF10 wurden mit zunehmenden Konzentrationen von Glutaraldehyd behandelt und auf einem 10% SDS- Polyacrylamidgel analysiert. Spur 1: Proteinstandard *SeeBlue® plus2 prestained* (Invitrogen), Spur 2: 7xHis-ORF10 ohne Zugabe von Glutaraldehyd, Spur 3: 0,002% Glutaraldehyd, Spur 4: 0,003%, Spur 5: 0,004%, Spur 6: 0,005%, Spur 7: 0,006%, Spur 8: 0,007%, Spur 9: 0,008%, Spur 10: 0,01% Glutaraldehyd.

3.5.3 Der oligomere Zustand von ORF14

Die Untersuchung auf eine Interaktion für ORF14 mit sich selbst ergab eine sehr schwache Interaktion mittels Y-2H (Tab. 3.3). Zur Verifizierung dieser Interaktion wurde das gereinigte GST-ORF14-Fusionsprotein *in vitro* mit Glutaraldehyd als *cross-linker* nach dem beschriebenen Protokoll (2.2.3.17) behandelt und anschließend auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 3.22) analysiert. ORF14 kann Dimere oder möglicherweise auch Multimere in Lösung bilden. Bei Glutaraldehyd Konzentrationen von 0,001-0,01% kann man auf dem SDS-Gel nur Monomere und Dimere von ORF14 sehen. Bei 0,02% Glutaraldehyd

sind alle drei Formen von ORF14 vorhanden. Ab 0,03% Glutaraldehyd ist ORF14 nur als Multimer zu sehen.

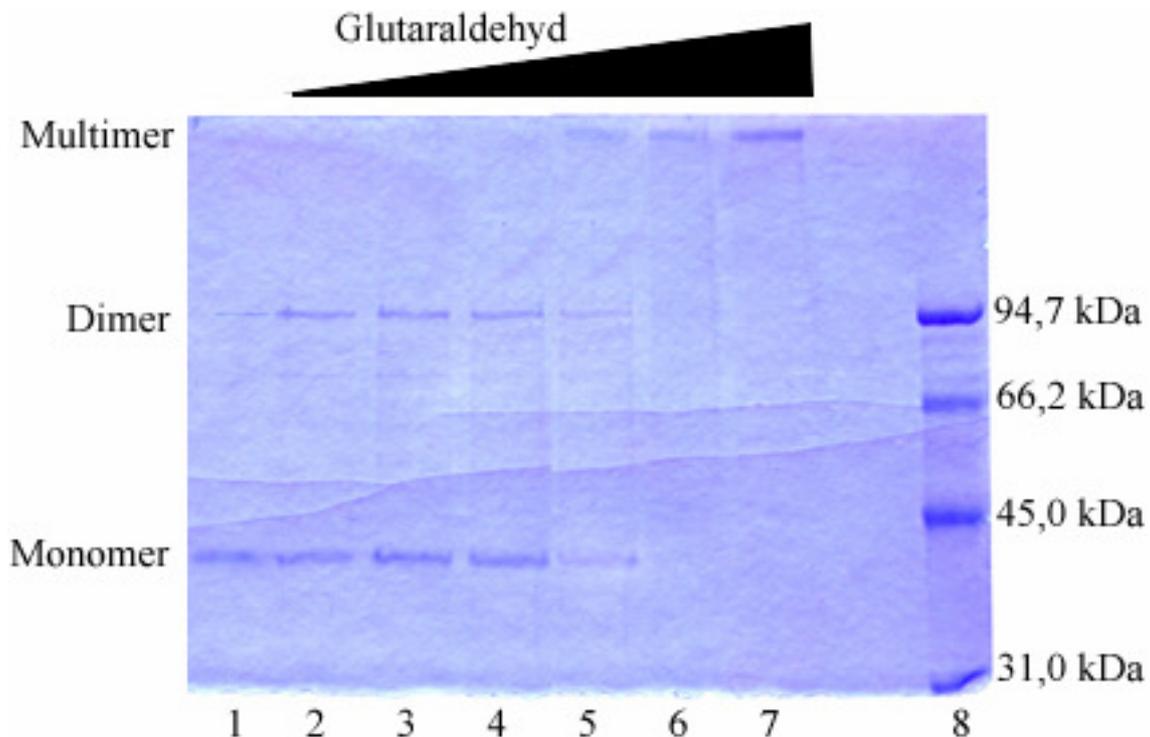


Abb. 3.22: Glutaraldehyd cross-linking des GST-ORF14-Fusionsproteins.

Proben von 0,5 mg/ml GST-ORF14 wurden mit zunehmenden Konzentrationen von Glutaraldehyd behandelt und auf einem 10% SDS- Polyacrylamidgel analysiert. Spur 1: GST-ORF14 ohne Zugabe von Glutaraldehyd, Spur 2: 0,001% Glutaraldehyd, Spur 3: 0,005%, Spur 4: 0,01%, Spur 5: 0,02%, Spur 6: 0,03%, Spur 7: 0,04%, Spur 8: Proteinstandard *low range molecular weight*.

3.6 ATP-Bindungs-Assay mit 7xHis-ORF5 und 7xHis-ORF10

Als putative ATPasen sollen ORF5 und ORF10 ATP binden können. Mit dem ATP-Bindungs-Assay wurde nachgewiesen, dass beide Proteine ATP binden. Der ATP-Bindungstest wurde mit dem Fluoreszenz-markierten Substratanalogon von ATP, TNP-ATP, durchgeführt. Eingesetzt wurden äquimolare Mengen des 7xHis-ORF5- und des 7xHis-ORF10-Proteins (Abb. 3.23). Das Ergebnis der Fluoreszenzmessung zeigt, dass eine Bindung von TNP-ATP an die Proteine 7xHis-ORF5 und 7xHis-ORF10 stattgefunden hat. Der Test zeigt auch, dass die Bindung der Proteine an TNP-ATP unterschiedlich stark ist, 7xHis-ORF5 kann eine stärkere Bindung als 7xHis-ORF10 leisten. Als negative Kontrolle wurde der Reaktionspuffer H eingesetzt. Als positive Kontrolle wurde die ATPase TraB aus dem konjugativen Plasmid pSVH1 von *Streptomyces venezuelae* verwendet (Daten sind nicht gezeigt).

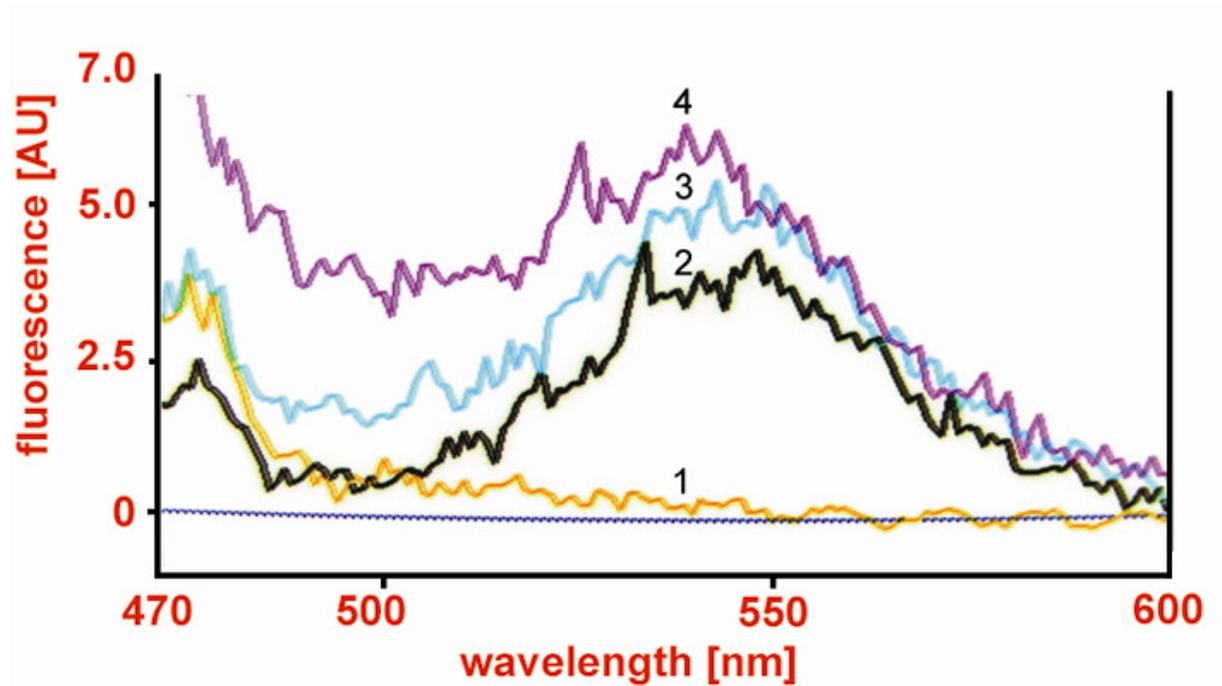


Abb. 3.23: Nachweis der ATP-Bindung über Fluoreszenzmessung der TNP-ATP-Proteinkomplexe.

Ein Spektrum wurde aufgenommen und die Emission im Bereich von 470-600 nm mit einer Anregungswellenlänge von 410 nm gemessen. Die Fluoreszenzspektren 1-4 zeigen die folgenden Proben: Spektrum 1: Puffer H, Spektrum 2: TNP-ATP (15 μM), Spektrum 3: 7xHis-ORF10 (1,5 μM) mit TNP-ATP (15 μM), Spektrum 4: 7xHis-ORF5 (1,5 μM) mit TNP-ATP (15 μM). AU: *Arbitrary units*.

4. DISKUSSION

4.1 *In vivo* und *in vitro* Protein-Protein Wechselwirkungsstudien: Vorteile und Nachteile

Zur *in vivo* Untersuchung der Protein-Protein Interaktionen der pIP501 Tra-Proteine, wurde in dieser Arbeit das Y-2H System verwendet. Das Y-2H System ist eine effektive Methode, um die Protein-Protein Interaktionen eines biologischen Systems *in vivo* zu untersuchen. Leider kann man mit dem Y-2H System zwischen physiologisch bedeutenden Interaktionen und falsch positiven Interaktionen nicht unterscheiden. Falsch positive Interaktionen zeigen unspezifische Bindungen der Proteindomänen außerhalb ihres natürlichen Kontexts (Serebriiskii and Joung, 2002).

Eine alternative *in vivo* Methode, mit welcher Protein-Protein Interaktionen in bakteriellen Zellen untersucht werden könnten, ist die Koimmunopräzipitationsmethode. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass die meisten Proteinkomplexe nach einer nicht denaturierenden Solubilisierung der Zellen erhalten bleiben. In unserem Fall müssten *E. faecalis* Zellen mit dem Plasmid pIP501 unter nicht denaturierenden Bedingungen solubilisiert werden. Die Proteinkomplexe werden im Lysat mit spezifischen Antikörpern gegen einen Interaktionspartner (z.B. X) präzipitiert, das Präzipitat wird dann von unspezifischen Proteinen durch Waschschriffe befreit, anschließend wird der Proteinkomplex auf einem SDS-Gel analysiert und die Präsenz des zweiten Interaktionspartners (z.B. Y) wird mittels Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Koimmunopräzipitationsmethode hat aber auch Nachteile: Die Antikörper können unspezifisch andere Proteine in dem Zell-Lysat präzipitieren. Noch ein Problem ist, dass nach der Solubilisierung der Zellen im Lysat unphysiologische Interaktionen (z.B. X mit B) stattfinden können, weil es zum Kontakt zwischen Proteinen kommt, die in den Bakterienzellen nicht im selben Kompartiment vorkommen (Abb. 4.1). Deswegen ist es ganz wichtig bei der Koimmunopräzipitation, die richtigen negativen Kontrollen zu wählen, um nur die physiologisch bedeutenden Protein-Protein Interaktionen (in diesem Fall X-Y) identifizieren zu können (Adams *et al.*, 2002). Zum Verhindern, dass der Antikörper unspezifische Proteine bindet, wird das Zell-Lysat zuerst mit einem Überschuss von einem Kontroll-Antikörper derselben Unterklasse behandelt und filtriert, dann folgt die Koimmunopräzipitation mit dem spezifischen Antikörper. Die Menge des spezifischen Antikörpers kann auch so optimiert werden, dass er möglichst nur an

die Zielproteine bindet. Zum Überprüfen ob eine Interaktion vor oder nach der Solubilisierung stattfindet, wird eines der interagierenden Proteine radioaktiv markiert (z.B. X*) und zum Lysepuffer zugegeben. Nach der Koimmunopräzipitation und den Waschschritten, wenn hauptsächlich nicht radioaktives Präzipitat entsteht, hat die Interaktion in der Zelle stattgefunden.

Egal welche *in vivo* Methode angewendet wird, um die falsch positiven bzw. die unspezifischen Interaktionen auszuschließen, müssen die identifizierten Protein-Protein Interaktionen noch mit einer *in vitro* Methode wie dem *pull-down* Assay oder über chemisches *cross-linking* verifiziert werden. Die Untersuchung der Protein-Protein Interaktion ausschließlich *in vitro* ist jedoch auch nicht ausreichend und liefert keine Informationen, ob die Proteine wirklich in der Zelle interagieren können.

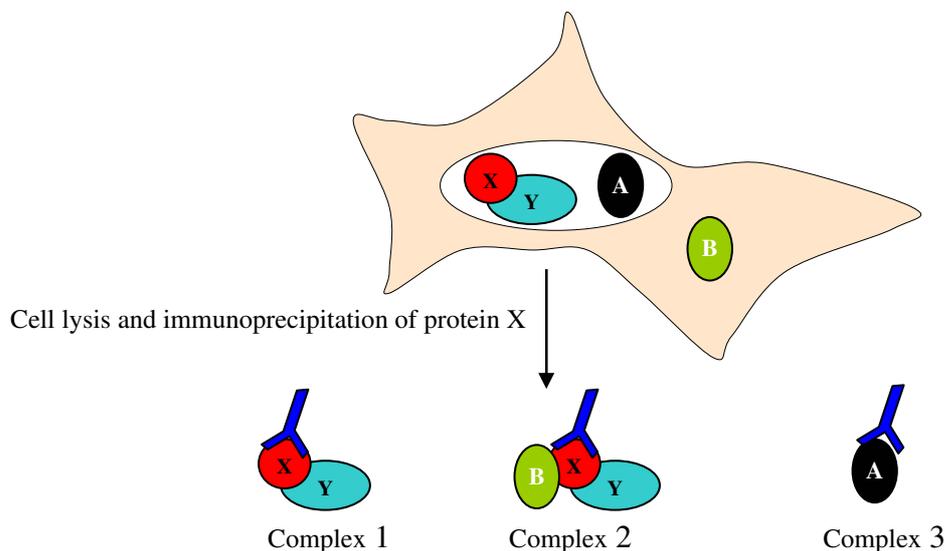


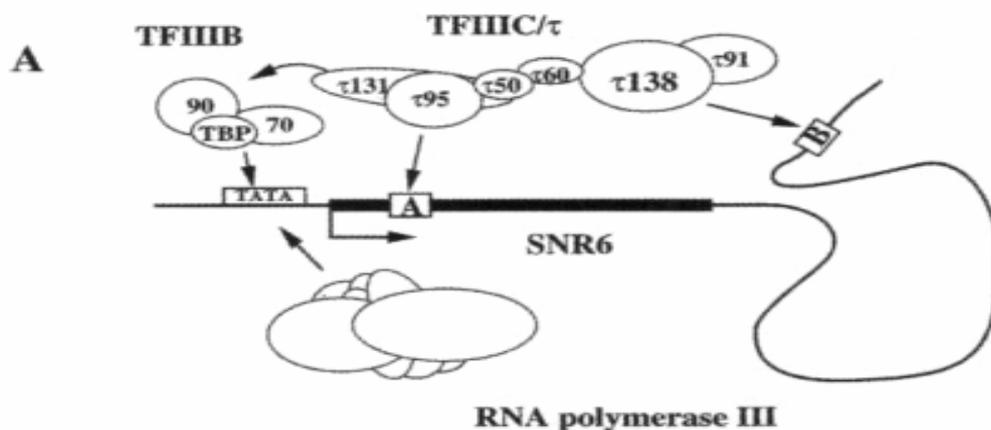
Abb. 4.1: Prinzip und Nachteile der Koimmunopräzipitation (aus Adams *et al.*, 2002).

Die Proteine X und Y bilden in der Zelle einen Proteinkomplex (*complex 1*), welcher nach der Solubilisierung stabil bleibt und mit Anti-X-Antikörpern präzipitiert werden kann. Die Proteine B und X sind nicht in demselben Kompartiment in der Zelle vorhanden, nach der Solubilisierung interagieren X und B in dem Lysat und bilden einen unphysiologischen Proteinkomplex (*complex 2*). Die Anti-X-Antikörper können auch unspezifisch das Protein A präzipitieren (*complex 3*).

4.2 Das *coupling* Protein ORF10 zeigt Autoaktivierung der Y-2H Reportergene

Wie in Abschnitt 3.2.1 erwähnt, zeigte ORF10 eine Autoaktivierung der Y-2H Reportergene *LacZ* und *HIS3*. *Saccharomyces cerevisiae* Zellen mit pBTM117c-*orf10* konnten auf SD-Leu-Tryp-His Medium wachsen und entwickelten mit dem X-Gal Test eine blaue Farbe. Es ist unklar, warum ORF10 eine Autoaktivierung zeigt, aber das Problem ist bekannt für

transkriptionelle Aktivatoren, Repressoren und für Proteine, die versteckte Transkriptionssequenzen besitzen. Zur Untersuchung solcher Proteine ist das klassische Y-2H System (beruht auf der Aktivierung von Polymerase II Reportergenen) nicht geeignet (Ruden *et al.*, 1991; Ruden, 1992). Man kann aber das zu testende Protein durch Mutationen so modifizieren, dass es nicht zur Autoaktivierung kommt, die Mutationen können aber die Interaktionen des Proteins ausschalten. Die beste Variante wäre die Verwendung des RNA-Polymerase III-basierten Y-2H Systems (Marsolier *et al.*, 1997). Bei diesem System werden die Polymerase III-Gene wie *SNR6* durch zwei Transkriptionsfaktoren TFIIB und TFIIC aktiviert. TFIIC ist ein großes Molekül bestehend aus mehreren Untereinheiten, es erkennt die Promotorelemente A und B (Abb. 4.2) und kann den zweiten Faktor TFIIB stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts rekrutieren. Das B Element stromabwärts vom *SNR6*-Gen wurde durch eine Gal4-Bindestelle (UAS_G) ersetzt. Zum Testen ob ein Protein X mit einem Protein Y interagieren kann, wird das Protein X mit der Gal4-Bindedomäne fusioniert, während das Protein Y mit der Untereinheit τ_{138} des TFIIC-Faktors fusioniert wird. Das *SNR6*-Gen wird nur aktiviert, wenn X und Y interagieren können, also eine Autoaktivierung durch X oder Y gibt es bei diesem System nicht. Wir haben das RNA-Polymerase III-basierte Y-2H System in dieser Arbeit nicht benutzt, weil es uns möglich war, das Konstrukt pGAD-*orf10* zur Untersuchung der ORF10-Interaktionen mit allen anderen Tra-Proteinen außer ORF10 selbst einzusetzen (Die restlichen Tra-Proteine zeigten zum Glück keine Autoaktivierung der Reportergene). Die Interaktion von ORF10 mit sich selbst konnte mit einer einfachen Methode, wie dem chemischen *cross-linking* nachgewiesen werden. Gäbe es mehrere Tra-Proteine mit Autoaktivierung, wäre das Polymerase III-basierte Y-2H System zum Einsatz gekommen.



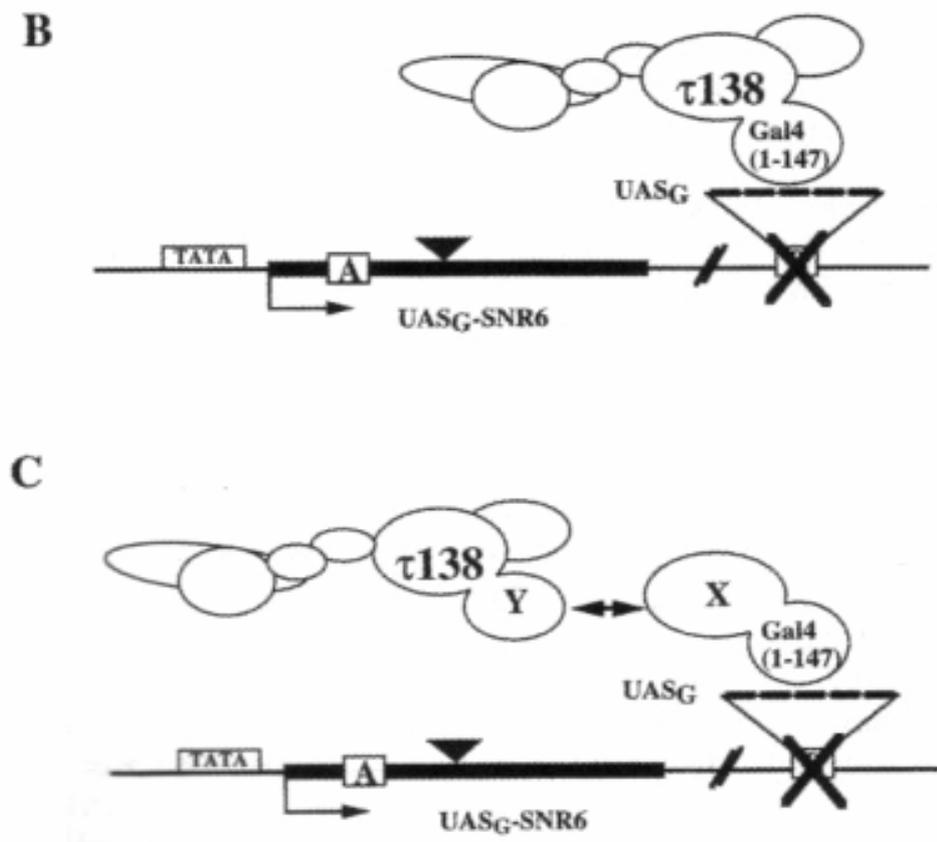


Abb. 4.2: Prinzip des Polymerase III-basierten Y-2H Systems (aus Louvet and Marsolier, 2000).

A. Modell der transkriptionellen Aktivierung des *SNR6*-Gens (Wildtyp). **B.** Die Untereinheit $\tau 138$ des TFIIC-Faktors wird direkt zum UASG- *SNR6*-Gen durch die Gal4-Bindedomäne rekrutiert. **C.** Die Untereinheit $\tau 138$ des TFIIC-Faktors wird durch eine Protein-Protein Interaktion von X und Y zum UASG- *SNR6*-Gen rekrutiert.

4.3 Die Virulenzgene des *E. faecalis* V583 Stammes

Enterokokken sind die umstrittensten Milchsäurebakterien, die sich in Lebensmitteln befinden. Sie bilden einen Teil der natürlichen Mikroflora in vielen Molkereiprodukten wie in bestimmten Sorten von Mittelmeerkäse, wo sie den Geschmack, die Farbe und die Struktur des vollreifen Käses positiv beeinflussen (Oumer *et al.*, 2001). Verschiedene *E. italicus* Stämme wurden aus italienischem Landkäse isoliert (Fortina *et al.*, 2004). Aufgrund der Pathogenität einiger Enterokokkenspezies, wie *E. faecalis* und *E. faecium*, und der Fähigkeit der Enterokokken, genetische Information untereinander effizient auszutauschen, besteht die Gefahr, dass nicht pathogene Enterokokkenspezies sich Antibiotikaresistenzgene oder Virulenzfaktoren über Konjugation aneignen können. Wie in 3.1.1 erwähnt, wurden keine Virulenzfaktoren in den *E. italicus* Stämmen gefunden. Die Präsenz der *E. italicus* Stämme in den Molkereiprodukten stellt keine Gefahr für die Gesundheit der Menschen dar, im Gegenteil diese Stämme könnten neue und sichere Kulturen für die Molkereindustrie darstellen (Fortina *et al.*, Manuskript eingereicht).

4.4 Solubilisierung der Tra-Fusionsproteine

Einige der pIP501 Tra-Proteine sind Membranproteine (nach den Computervorhersagen Tab. 4.2) und haben eine oder mehrere Transmembranhelices. Um die Löslichkeit der Proteine zu verbessern, wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Strategien angewendet:

- I. Die *tra*-Gene des Plasmids pIP501 wurden in unterschiedliche Expressionsplasmide pQTEV (*orf1-orf15*), pGEX-6P-2 (*orf5, orf7, orf10, orf14* und *orf15*) und pMAL-c2x (*orf4, orf5, orf7 Δ TMH, orf9* und *orf10*) kloniert. Die Proteine ORF1, ORF4, ORF5, ORF7, ORF8, ORF10, ORF12 und ORF14 wurden mit dem jeweiligen Tag, 7xHis, GST oder MBP exprimiert und gereinigt (Ergebnisteil). Manche Proteine sind als GST- oder MBP-Fusionsproteine besser löslich, weil es sich bei den MBP- und GST-Tags um sehr lösliche Polypeptide handelt, z.B. ORF5 und ORF10 waren in 7xHis-Fusion nur unter denaturierenden Bedingungen löslich (2.2.3.7), während ihre MBP-Fusionsproteine zumindest zum Teil unter nativen Bedingungen solubilisiert werden konnten (3.3.2 und 3.3.6). In Terradot *et al.* (2004) wurden 31 Gene des *Helicobacter pylori* T4SS in die Expressionsplasmide pROEXHT-B/C (6xHis) und pMAL-BE/G (MBP) kloniert. Von den 31 Proteinen waren 30 MBP-Fusionsproteine löslich, während nur 11 der 31 6xHis-Fusionsproteine solubilisiert werden konnten, die restlichen 20 6xHis-Fusionsproteine waren entweder unlöslich, nicht exprimierbar oder toxisch. Es wurde vermutet, dass der MBP-Tag als Chaperon funktioniert, welches für optimale Faltung der Fusionsproteine während der Expression sorgt und somit die Aggregation der Proteine verhindert (Kapust and Waugh, 1999; Bach *et al.*, 2001). Diese Studien zeigten, dass der MBP-Tag ein effizienter Tag zur Expression und Solubilisierung von Fusionsproteinen ist.
- II. Die N-terminalen Transmembranhelices einiger Membranproteine wurden bei der Klonierung über PCR deletiert (ORF7 Δ TMH, ORF8del, ORF9del, ORF11del, ORF13del und ORF15del). Auf diese Weise ließ sich das MBP-ORF7 Δ TMH-Fusionsprotein sehr gut solubilisieren und in großer Menge reinigen (3.3.4).
- III. Die unter nicht denaturierenden Bedingungen unlöslichen Proteine wurden mit denaturierenden Puffern mit Harnstoff solubilisiert, auf den entsprechenden Säulen gereinigt und wieder durch Dialyse zurückgefaltet, z.B. die Reinigung der 7xHis-ORF5- und 7xHis-ORF10-Fusionsproteine (2.2.3.7).
- IV. Die Stärke der Expression und die Löslichkeit der Fusionsproteine kann auch durch Klonierung der *tra*-Gene in die pET-His-Expressionssysteme unter der Kontrolle der

T7 Polymerase verbessert werden. Zurzeit werden *orf10* und zwei C-terminale Deletionsmutanten (*orf10N₄₄₂* und *orf10N₄₇₅*) in das Plasmid pET-26b(+) kloniert (Saleh, 2007).

4.5 Protein-Protein Interaktionskarte für die pIP501 Transferproteine

Anhand der Ergebnisse der Y-2H Studien (3.2), der *pull-down* Assays (3.4), der *cross-linking* Versuche (3.5), der Computer Vorhersagen für die Lokalisierung der pIP501 Tra-Proteine (Tab. 4.2) und der funktionellen Charakterisierung einiger Tra-Proteine z.B. von ORF7 (Çelik, 2006; Söllü, 2006), ORF5 und ORF10 (Salih, 2006) wurde eine Protein-Protein Interaktionskarte für die pIP501 T4SLS-Proteine und ein Modell für das erste T4SLS aus G+ Bakterien erstellt (Abb. 4.3).

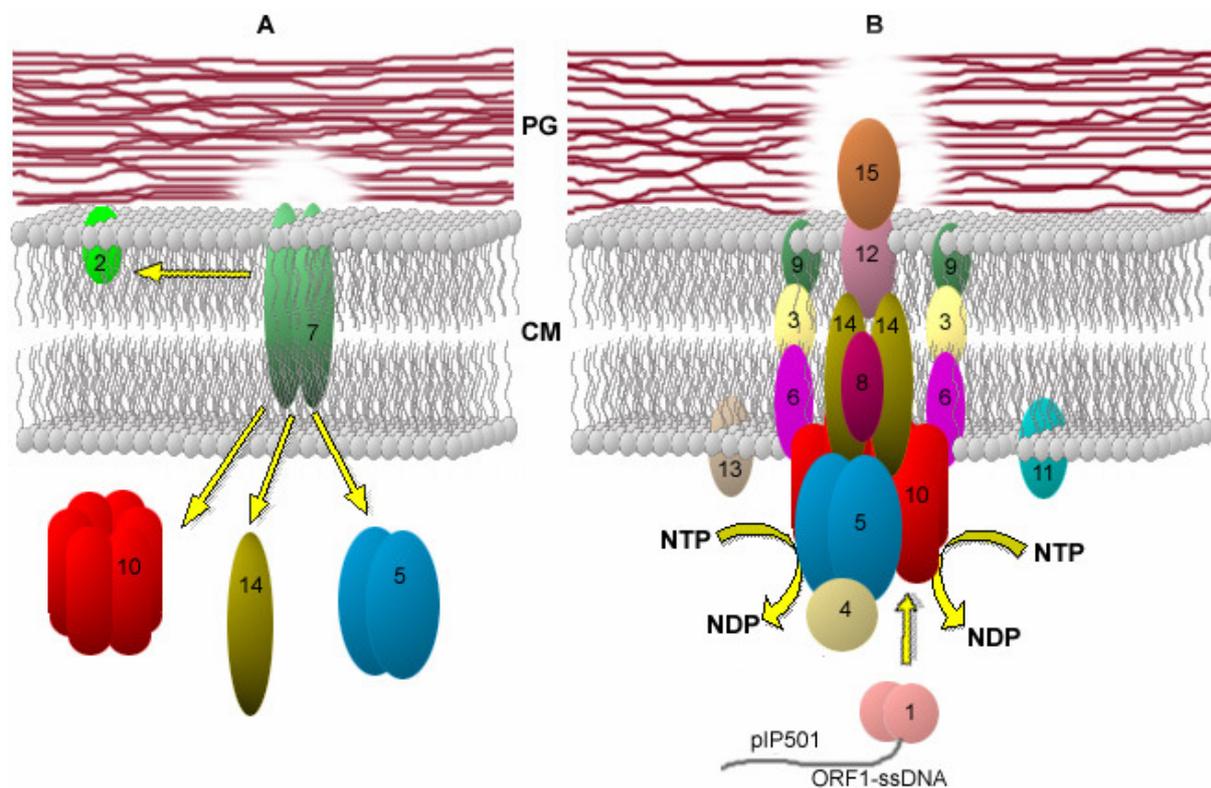


Abb. 4.3: Arbeitsmodell für den konjugativen Transfer von pIP501 in *E. faecalis*.

A. Die detektierten Interaktionen für ORF7 sind durch gerade Pfeile gezeigt. Die helle Zone des Peptidoglykans (PG) symbolisiert die Wirkung der lytischen Transglykosylase ORF7 auf die Peptidoglykan-Schichten in der Zellwand. B. Der Aufbau des pIP501-Transportkomplexes. Die Nummer bezeichnen die pIP501 Tra-Proteine (ORF1-ORF15). Gebogene Pfeile markieren die NTP-Hydrolyse der putativen ATPasen. Zytoplasmamembran (CM), *single-strand* DNA (ssDNA), Nucleosidtriphosphat (NTP), Nucleosiddiphosphat (NDP).

Nach unseren Vorstellungen könnte das neue T4SLS so funktionieren:

I. Die lytische Transglykosylase ORF7

Für ORF7 wurde eine Spaltungsaktivität des Mureinsubstrats unterschiedlichen Ursprungs, nämlich von *E. coli* und von *E. faecalis*, bereits nachgewiesen (Söllü, 2006). ORF7 könnte eine entscheidende Rolle bei der lokalen Öffnung der Peptidoglykan-Schichten spielen, wodurch der Zusammenbau des Transmembrankomplexes vereinfacht werden könnte. ORF7 könnte eine wichtigere Rolle als die von G⁻ Bakterien kodierten lytischen Transglykosylasen spielen, weil das Peptidoglykan in G⁺ Bakterien dicker ist und aus mehreren Schichten besteht. Bei den T4SS von G⁻ Bakterien wie z.B. dem *Agrobacterium* DNA-Transfersystem (Mushegian *et al.*, 1996) und dem RSF1010 Transfersystem (Bohne *et al.*, 1998), nahm die Transferfrequenz ca. zehnfach in Mutanten von *virB1* bzw. *virB1*-Homologen ab. Bei keiner Mutante in einem *VirB1*-Homologen Protein konnte der DNA Transfer komplett ausgeschaltet werden. Anhand dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass das Genom G⁻ Bakterien Enzyme kodiert, die die Plasmid-kodierten lytischen Transglykosylasen ersetzen können. In *E. faecalis* kodiert das Genom aber nur für wenige Muramidasen, die die Funktion von ORF7 ersetzen könnten. Diese Vermutung wird zurzeit von Dipl.-Chem. Karsten Arends im Rahmen seiner Doktorarbeit an der TU-Berlin mit einer pIP501 *orf7* knockout-Mutante untersucht. Außerdem bildet ORF7 Dimere in Lösung und interagiert mit der putativen ATPase ORF5 und mit dem *coupling* Protein ORF10. Die Interaktion zwischen ORF7 und ORF10 ist scheinbar spezifisch für das T4SLS, eine solche Interaktion wurde bei den T4SS von G⁻ Bakterien nicht beobachtet. ORF7 kann auch mit dem Membranprotein ORF2 interagieren, für ORF2 ist das die einzige Interaktion, die wir nachweisen konnten. Eine weitere Interaktion für ORF7 besteht mit dem ORF14 Protein. Durch seine Interaktionen mit den Proteinen ORF5, ORF10 und ORF14 könnte ORF7 die Bildung des Transportkomplexes fördern, indem es diese Proteine an ihren Ort in der Zellwand rekrutiert

II. Das putative *coupling* Protein ORF10

ORF10 kann mit der Relaxase ORF1 interagieren, somit kann es das Relaxosom (ORF1 mit der Einzelstrang pIP501 DNA) binden und an den Transportapparat weiterleiten. Die Relaxase ORF1 bildet selbst Dimere, die den *oriT*_{pIP501} binden können (Kopeć *et al.*, 2005; Kurenbach *et al.*, 2006). Mit Hilfe von Glutaraldehyd *cross-linking* (3.5.2) und Gelfiltration (Saleh, 2007) konnte nachgewiesen werden, dass ORF10 mit sich selbst interagiert. Die Vorhersagen der dreidimensionalen Struktur von ORF10 (Kopeć, Keller und Grohmann, nicht

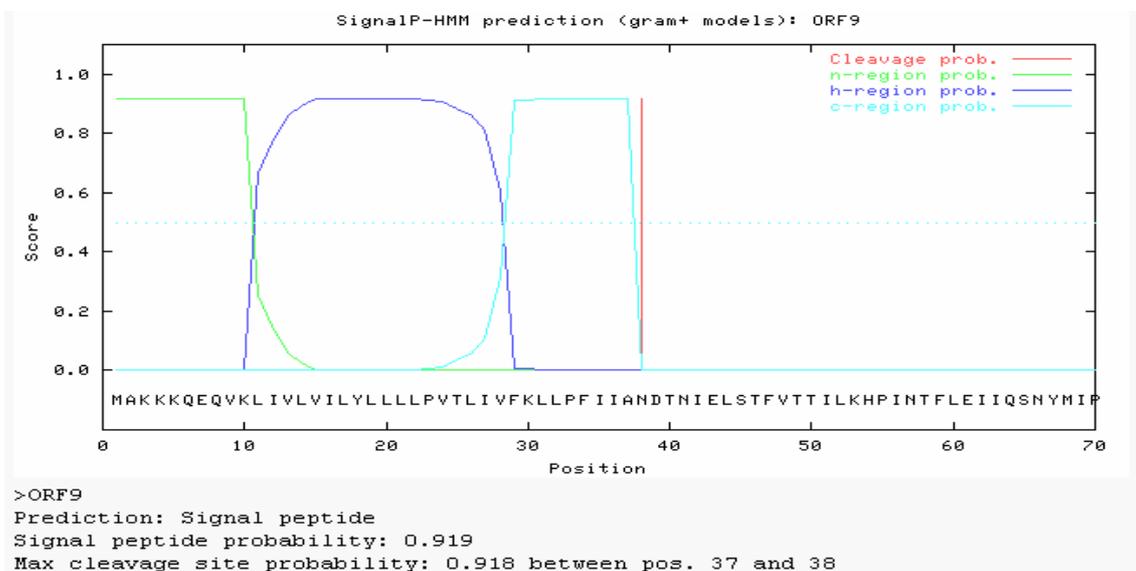
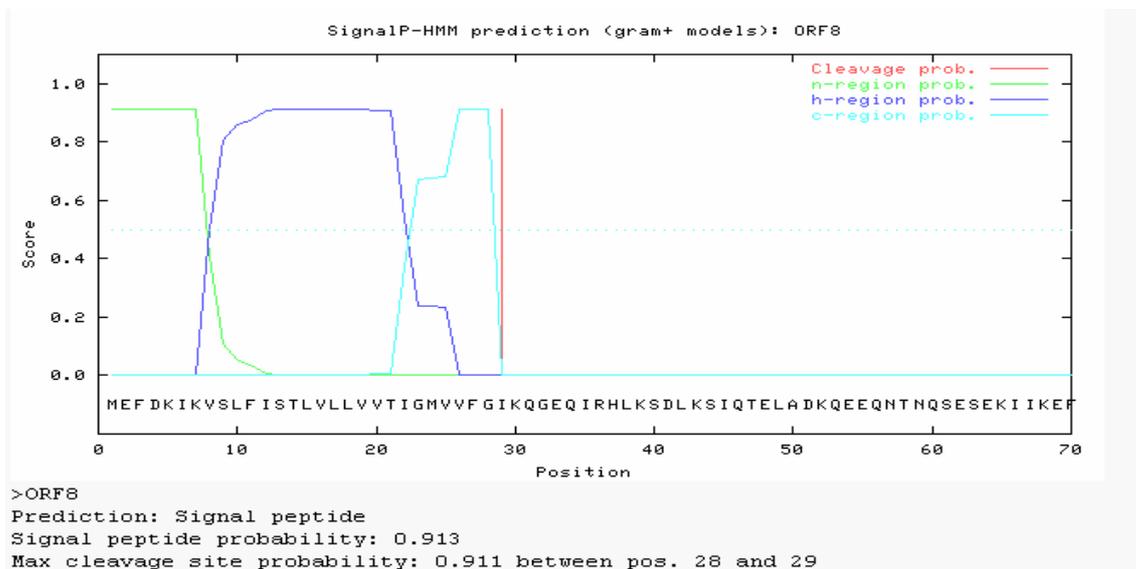
veröffentlichte Daten) zeigen große Ähnlichkeiten mit der von TrwB (das *coupling* Protein des Plasmids R388) (Gomis-Ruth and Coll, 2001; Gomis-Ruth *et al.*, 2001).

III. Die VirB4-ähnliche ATPase ORF5

ORF5 ist ein möglicher Kandidat für die Lieferung der nötigen Energie für den Aufbau des Transportapparats und für die DNA-Transferprozesse. Eine alternative ATPase könnte auch das *coupling* Protein ORF10 darstellen. Für beide Proteine ORF5 und ORF10 wurden bereits ATP-Bindung und -Hydrolyse Aktivität nachgewiesen (Salih, 2006).

IV. Komponenten des Transmembrankomplexes

Durch ihre Interaktionen miteinander könnten die Proteine ORF8, ORF12, ORF14 und ORF15 gemeinsam einen Transmembrankomplex bilden. Für ORF8 und ORF15 wurden mit Hilfe der SignalP 3.0 Software N-terminale Signalpeptide vorhergesagt (Abb. 4.4).



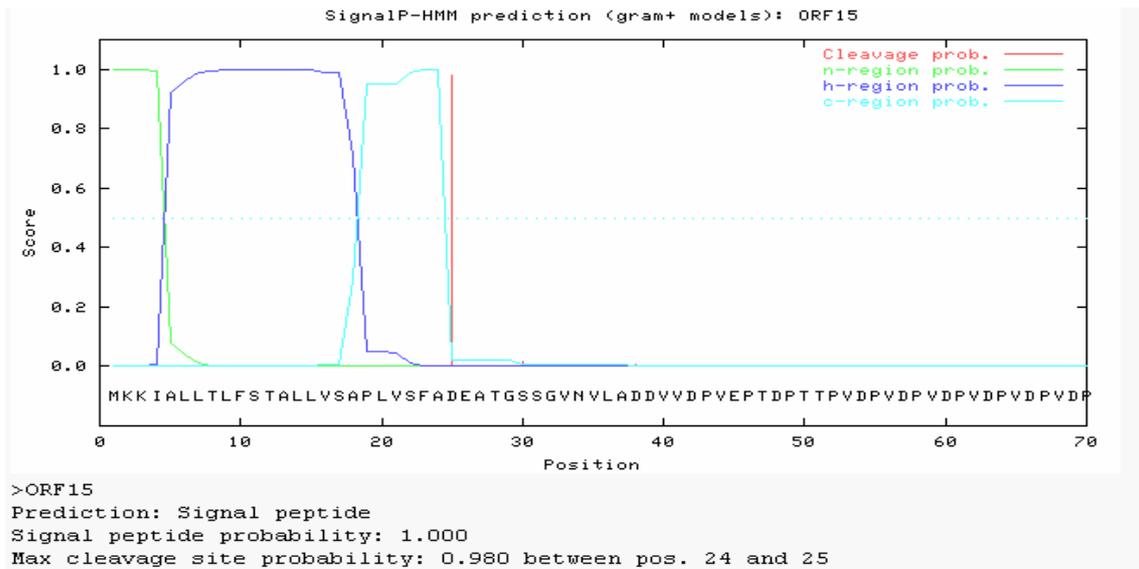


Abb. 4.4: Analyse der Proteinsequenzen der Tra-Proteine ORF8, ORF9 und ORF15 mit der SignalP 3.0 Software.

Nach den topologischen Vorhersagen mittels unterschiedlicher Algorithmen (Tab. 4.2), besitzt das Protein ORF15 zwei Transmembranhelices, eine befindet sich am N-Terminus und die zweite ist am C-Terminus. Außerdem befindet sich das Protein ORF15 nach dem PSORTb Programm in der Zellwand, deshalb könnte ORF15 möglicherweise der äußerste Teil des Transportkomplexes sein. Die Aminosäuresequenzen der Proteine ORF12 und ORF14 wurden mit dem Programm Secretome 2.0 www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP-2.0/ analysiert. Beide Proteine wurden als nicht klassische Sekretionsproteine (ohne Signalpeptid) klassifiziert. Die Proteine ORF3, ORF6 und ORF9 besitzen Transmembranhelices (Tab. 4.1), somit könnten sie einen Teil des Gerüsts des Transportapparats bilden. Für ORF9 wurde auch ein Signalpeptid mit hoher Wahrscheinlichkeit (0,919) vorhergesagt (Abb. 4.4).

Tra-Proteine	Homologien	TMH	Signalpeptide	Motive
ORF1	Relaxase	-	-	
ORF2	-	+	+	
ORF3	-	+	-	
ORF4	-	-	-	
ORF5	VirB4	-	-	Walker A und B
ORF6	-	+	-	
ORF7	VirB1	+	+	CHAP und SLT
ORF8	-	+	+	
ORF9	-	+	+	

ORF10	VirD4	-	-	Walker A und B
ORF11	-	+	-	
ORF12	-	+	-	
ORF13	-	+	-	
ORF14	-	-	-	
ORF15	-	+	+	

Tab. 4.1: Ergebnisse der Vorhersagen für die pIP501 Tra-Proteine mit verschiedenen Computerprogrammen.

V. Proteine mit unbekanntem Funktionen

Für die beiden Proteine ORF11 und ORF13, die über Transmembranhelices verfügen, wurden weder Interaktionen mit den anderen T4SLS-Komponenten noch Homologien zu Proteinen in der Datenbank festgestellt, ihre Rolle und Funktionen im T4SLS bleiben also unbekannt. Das lösliche Protein ORF4, welches keine Ähnlichkeiten zu Proteinen in der Datenbank zeigte, hat eine starke Affinität zu der ATPase ORF5 (91,2 β -Galaktosidase Einheiten mit dem Y-2H, Tab. 3.3). Die physiologische Bedeutung dieser Interaktion (ORF4-ORF5) sollte weiter untersucht werden.

Tra-Proteine	PHDhtm	HMMTOP	PSORTb	TMPred	TMAP	TopPred	SOSUI	DAS
ORF2	48-65 89-106	12-31 48-66 85-103	Zytoplasmamembran	10-30 47-66 88-104	10-29 40-68 80-107	12-32 46-66 84-104	11-33 48-70 85-107	16-24 47-62 87-102
ORF3	49-73 78-95	47-66 71-90	nicht bekannt	70-88	59-87	67-87	56-78	48-86 (2 TMH mit kurzem Linker)
ORF4	löslich	löslich	nicht bekannt	löslich	löslich	löslich	löslich	löslich
ORF5	löslich	löslich	Zytoplasma	löslich	löslich	löslich	löslich	löslich
ORF6	216-233	löslich	nicht bekannt	218-235	210-236	217-237	216-238	Non-TM-prot. 223-227
ORF7	18-35	19-35	nicht bekannt	19-35	10-37	16-36	14-36	19-35
ORF8	11-28	8-27	nicht bekannt	10-29	8-36	9-29	7-29	9-27, potentielles Signalpeptid
ORF9	16-35 65-83	12-36 67-86	Zytoplasmamembran	12-29 68-86	10-38 65-92	11-31 67-87	18-39 67-89	10-36 67-88
ORF10	löslich	löslich	Zytoplasma	löslich	löslich	löslich	löslich	löslich
ORF11	45-62	47-64	nicht bekannt	46-64	37-65	45-65	42-63	46-60
ORF12	42-59 72-95 120-141 177-201 206-223 239-258 266-283	71-93 118-136 167-191 198-222 241-259 286-308	Zytoplasmamembran	77-93 114-136 177-194 196-222 243-259 262-284	68-96 113-141 169-189 196-216 235-261 266-289	73-93 117-137 174-194 203-223 240-260	75-97 115-136 173-195 201-223 237-259 263-285	76-93 176-220 (2 TMH mit kurzem Linker) 241-258 268-277
ORF13	168-185	168-186	nicht bekannt	168-186	164-188	166-186	167-189	168-185
ORF14	löslich	löslich	nicht bekannt	löslich	löslich	löslich	löslich	löslich
ORF15	261-278	4-21 261-278	Zellwand	4-24 260-278	1-23	4-24 259-279	löslich	8-23 potentielles Signalpeptid 262-274

Tab. 4.2: Topologische Vorhersagen der Tra-Proteine (aus Kopeć, 2006).

Die Zahlen in der Tabelle, z.B. ORF2, PHDhtm: 48-65, zeigen die Aminosäuren der jeweiligen Proteine in den postulierten Transmembranhelices. Die Lokalisierung der Tra-Proteine wurde mittels unterschiedlicher Algorithmen vorhergesagt: PHDhtm (Rost *et al.*, 1996), HMMTOP (Tusnady and Simon, 2001), PSORTb (Gardy *et al.*, 2005), TMPred (Hofmann and Stoffel, 1993), TMAP (Milpetz *et al.*, 1995; Persson and Argos, 1996; Persson and Argos, 1997), TopPred (von Heijne, 1992; Claros and von Heijne, 1994), SOSUI (Scholz *et al.*, 1989) and DAS (Cserzo *et al.*, 1997). Non-TM-Prot., kein Transmembranprotein.

4.6 Funktionelle Charakterisierung einzelner Komponenten des T4SLS

4.6.1 Das Protein ORF7 ist eine lytische Transglykosylase

ORF7 ist ein VirB1-Homolog, das bedeutet ORF7 kann die β -1,4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetyl-Muraminsäure im Murein der Zellwand spalten und somit die Zellwand lokal öffnen. Der Vergleich seiner Proteinsequenz mit der Proteinfamilien Datenbank (Bateman *et al.*, 2004) zeigte, dass ORF7 aus zwei Proteindomänen besteht, einer N-terminalen SLT-Domäne (spezialisierte lytische Transglykosylase) und einer C-terminalen CHAP-Domäne (Cystein-Histidin-abhängige Amidase) (Abb. 4.5).

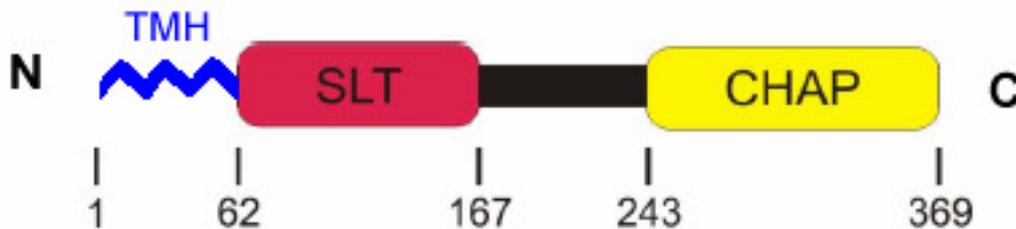


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der ORF7-Domänenstruktur (aus Kopeć, 2006). Die Zahlen markieren die entsprechenden ORF7 Aminosäuren

Für ORF7 (Söllü, 2006) und seine Domänen SLT und CHAP (Çelik, 2006) wurde bereits lytische Transglykosylase-Aktivität mittels Muramidase Assays und Zymogrammen nachgewiesen. Die Gene *orf7Δtmh*, *slt* und *chap* wurden in das Expressionsplasmid pMAL-c2x kloniert und als MBP-Fusionsproteine exprimiert, gereinigt und auf ihre Aktivität getestet. Bei dem Muramidase Assay konnten ORF7, SLT und CHAP ein [3 H]-L-Lysin markiertes Peptidoglykan aus *E. faecalis* JH2-2 unterschiedlich stark spalten (Abb. 4.6).



Abb. 4.6: Messung der Radioaktivität im löslichen Peptidoglykan Spaltprodukt mit dem Flüssigszintillationszähler (aus Çelik, 2006). Als negative Kontrolle wurde das MBP-Polypeptid verwendet. Lysozym diente als positive Kontrolle. cpm: counts per minute.

Die CHAP-Domäne soll nach der Analyse der Aminosäuresequenz eine Amidase sein, die die Amidbindungen im Peptidoglykan spaltet. Ein Amidase Assay soll mit dem gereinigten CHAP Protein durchgeführt werden, um seine Funktion zu analysieren.

Für die Zymogramme wurde eine modifizierte Methode in dieser Arbeit entwickelt, die Herr Dipl.-Biochem. Ertuğrul-Kaan Çelik in seiner Diplomarbeit (2006) verwendet hat. Bei einem klassischen Zymogramm wird ein SDS-Polyacrylamidgel mit Peptidoglykan versetzt, auf dieses Gel werden die zu testenden lytischen Transglykosylasen geladen. Nach der Färbung mit Methyleneblau und der Entfärbung mit Wasser entstehen auf dem Gel da hellblaue Banden, wo das Enzym Peptidoglykan gespalten hat. Für ORF7 und seine Domänen war diese Methode nicht erfolgreich, weil die Proteine durch das SDS denaturiert wurden und danach nicht vollkommen zurück gefaltet werden konnten. Um das Problem zu lösen, habe ich 10 μL Enzym (ca. 2-5 μg von MBP-ORF7, MBP-SLT bzw. MBP-CHAP) mit 7,8 μL MBP-Elutionspuffer und 2 μL Peptidoglykan (Präparation nach Söllü, 2006) in einem Eppendorfgefäß gemischt und bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden 0,8 μL Acrylamid 30%, 0,8 μL APS 10% und 0,3 μL TEMED zugegeben und die Ansätze in einer Mikrotiterplatte gegossen. Nach dem Festwerden wurden die Gelstückchen mit einer Pinzette von der Mikrotiterplatte in Eppendorfgefäße überführt (zur leichteren Färbung und Entfärbung der Ansätze) und mit Methyleneblau für 30 Minuten gefärbt. Anschließend wurden die Ansätze mit Wasser für 30 Minuten entfärbt. Die Gelstückchen, wo das Peptidoglykan zum Teil abgebaut worden war, verloren nach der Entfärbung zum Teil ihre blaue Farbe, sie wurden heller, im Gegensatz zur negativen Kontrolle, wo die Gelstückchen dunkelblau blieben (Abb. 4.7).

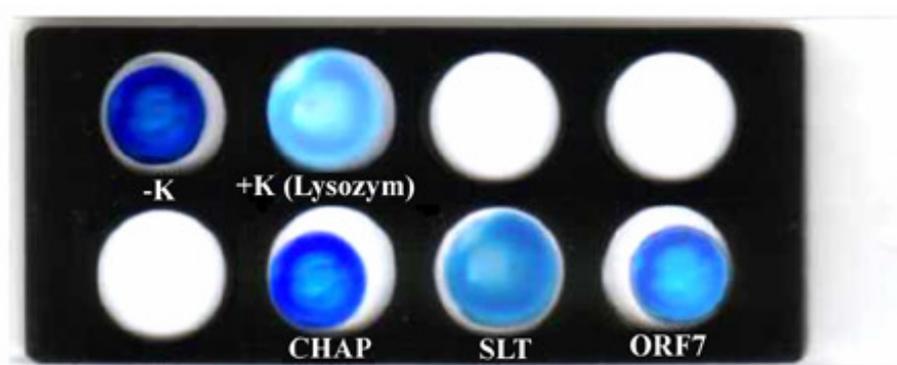


Abb. 4.7: Modifizierte Zymogramm-Methode zum Nachweis der lytischen Transglykosylase Aktivität von ORF7 und seinen Domänen.

Diese modifizierte Methode ist schneller und einfacher als die Zymogrammanalyse, wenn gereinigte Enzyme zur Verfügung stehen.

4.6.2 ORF5 zeigt *in vitro* ATPase Aktivität

Das von pIP501 kodierte Protein ORF5 gehört der VirB4-Proteinfamilie an, Proteine aus dieser Familie sind intrazelluläre Transport- und Sekretionsproteine (COG3451, Score: 71,2 und E-value: $3e^{-13}$). VirB4-Homologe sind in der Regel die größten Proteine des T4SS (ORF5 mit ca. 74,5 kDa ist das größte Protein des pIP501-kodierten T4SLS). Neben dem VirB4 besitzt das T4SS von *A. tumefaciens* noch zwei ATPasen (VirB11 und das *coupling* Protein VirD4). Ein VirB11-homologes Protein konnte in unserem T4SLS nicht gefunden werden, VirB11-Homologe sind nicht in allen T4SS vorhanden, z.B. Plasmide aus den IncF oder IncH1 Gruppen kodieren auch keine VirB11-homologen Proteine (Lawley *et al.*, 2004; Middleton *et al.*, 2005). Ein charakteristisches Merkmal für die ATPasen ist die Bildung von ringförmigen Oligomeren (Hexamere) in Lösung. Für ORF5 konnten wir in dieser Arbeit mittels Y-2H Studien (3.2.1) und *in vitro pull-down* Assays (3.4.4) eine Interaktion mit sich selbst nachweisen, welches die wichtigste Voraussetzung zur Bildung von Multimeren darstellt. Für ORF5 konnten wir ATP-Bindungsaktivität (3.6) und ATP-Hydrolyse nachweisen (Salih, 2006). In *A. tumefaciens* wurde mittels Y-2H, Zellfraktionierung und Western Blot nachgewiesen, dass sich VirB4 im Periplasma befindet und dort mit den periplasmatischen Domänen anderer Proteine wie VirB1, VirB8 und VirB10 interagiert. In unserem T4SLS interagiert ORF5 (VirB4-Homolog) mit ORF7 (VirB1-Homolog). VirB4 interagiert auch mit den anderen ATPasen VirB11 und VirD4 (Abb. 4.8, Draper *et al.*, 2006). Eine entsprechende Interaktion zwischen ORF5 und ORF10 konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

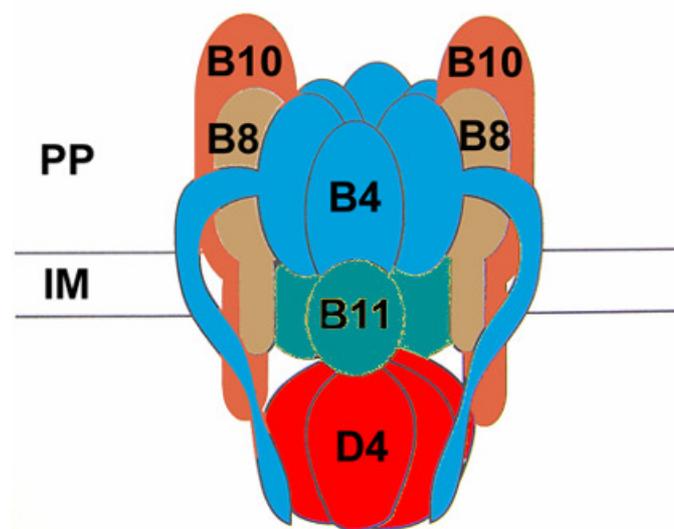


Abb. 4.8: Topologie des Proteins VirB4 und seine Interaktionen mit den anderen Komponenten des T4SS (aus Draper *et al.*, 2006). Alle drei ATPasen, VirB4, VirB11 und VirD4 haben eine hexamere Struktur und interagieren miteinander. IM: Innenmembran. PP: Periplasma.

4.6.3 ORF10 ist ein Kopplungsprotein mit *in vitro* ATPase Aktivität

ORF10 gehört der pfam02534 TraG/TraD Kopplungsprotein-Familie an (score: 291, E-value: $1e^{-79}$). Proteine dieser Familie können das Relaxosom (Komplex aus Einzelstrang DNA und Relaxase) binden. Eine Kopplungsaktivität mit der Relaxase konnte für ORF10 *in vivo* mittels Y-2H (3.2.1) und *in vitro* durch *pull-down* Assay (3.4.3) bestätigt werden. ORF10 konnte *in vitro* das vollständige Relaxase Protein ORF1 binden aber nicht seine N-terminale Domäne ORF1N₂₄₆, welche Relaxaseaktivität besitzt (Kopeć *et al.*, 2005). Das weist darauf hin, dass die C-terminale Domäne von ORF1 eine Proteinbindedomäne, z.B. für ORF10 sein könnte. Auch für ORF10 wurden ATP-Bindungsaktivität (3.6) und ATP-Hydrolyse nachgewiesen (Salih, 2006), allerdings schwächer als für die ATPase ORF5.

5. AUSBLICK

Um das in dieser Dissertation erstellte Modell des T4SLS zu verifizieren, sollen in den nachfolgenden Arbeiten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

5.1 Bestimmung der Lokalisierung der Tra-Proteine in der Zellwand

Die Lokalisierung der Tra-Proteine wurde nur virtuell mit Hilfe von Computerprogrammen vorhergesagt (Tab. 4.2). Die Lokalisierung der Tra-Proteine soll jedoch auch *in vivo* im Modellwirt *E. faecalis* untersucht werden. Dafür werden die *tra*-Gene mit 7xHis-Tag in das *shuttle* Plasmid pMSP3535VA kloniert. Kompetente *E. faecalis* Zellen werden mit den konstruierten Expressionsplasmiden pMSP3535VA-7*xhis-tra* transformiert. Danach soll die Proteinexpression der Tra-Proteine in *E. faecalis* optimiert werden. Induzierte *E. faecalis* (pMSP3535VA-7*xhis-tra*) Zellen werden in Zytoplasma, Zytoplasmamembran und Peptidoglykan, wie in Buttaro *et al.* (2000) beschrieben, fraktioniert. Die drei Fraktionen sollen mittels SDS-PAGE analysiert werden. Anschließend können die Tra-Proteine in den Zellfraktionen mittels Western Blot mit Anti-His-Antikörpern detektiert werden. Auf diese Weise kann die Lokalisierung der Tra-Proteine im T4SL-Modell bei Bedarf modifiziert werden.

5.2 *In vivo* Bestimmung der DNA-Transferoute mittels TrIP Assays

In dieser Arbeit konnten die Interaktionen zwischen den T4SLS-Komponenten bestimmt werden, anhand dieser Interaktionen wurde das erste Modell des konjugativen Gentransfers in *E. faecalis* entworfen. Dieses Modell liefert aber keine Informationen über die Interaktionen der ssDNA mit Tra-Proteinen und über die DNA-Transferoute über die verschiedenen T4SLS-Komponenten bis zur Rezipientenzelle. Die DNA-Transferoute kann durch den TrIP Assay (*transferred-DNA immunoprecipitation*) untersucht werden. TrIP ist ein *in vivo* Test, er wurde von Cascales und Christie (2004) entwickelt und zur Untersuchung des T-DNA-Transfers über die VirB-Proteine in *A. tumefaciens* eingesetzt. *A. tumefaciens* Zellen wurden zum Aufbau des VirB/D4-Komplexes und des VirD2-T-DNA Komplexes durch Zugabe von 200 µM Acetosyringone induziert. Anschließend wurden die induzierten Zellen mit Formaldehyd behandelt, um die entstandenen DNA-Protein Komplexe *in vivo*

querzuvernetzen. Dann wurden die *A. tumefaciens* Zellen mit Detergenzien solubilisiert. Die verschiedenen VirB/D4 Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern präzipitiert. Der Nachweis der DNA Kopräzipitation erfolgte über PCR mit 2 Primerpaaren. Ein Primerpaar wurde zur Amplifizierung eines bestimmten Bereichs der Transferregion des Ti-Plasmids eingesetzt. Das zweite Primerpaar ist spezifisch für eine nicht transportierte DNA-Region des Ti-Plasmids. Diese Studie ergab, dass die Proteine VirD4, VirB11, VirB6, VirB8, VirB9 und VirB2 in dieser Reihenfolge die Einzelstrang T-DNA binden können (Abb. 5.1).

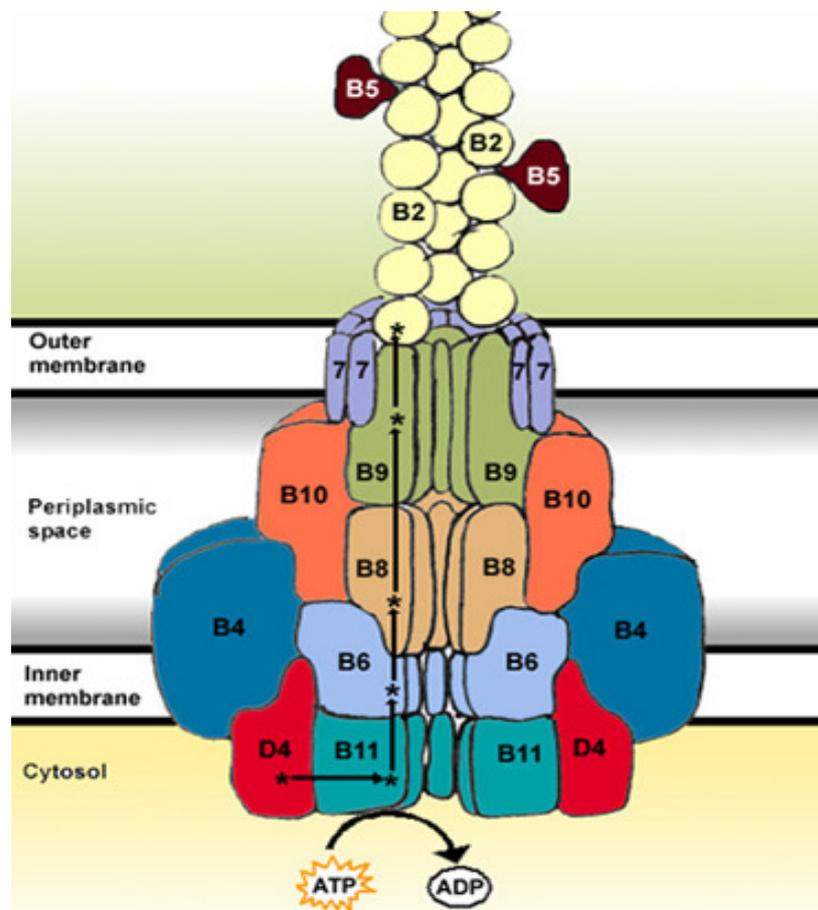


Abb. 5.1: Darstellung der T-DNA-Transferoute durch den VirB/D4-Komplex in *A. tumefaciens* (aus McCullen and Binns, 2006). In der Abbildung sind die Lokalisierung und die Interaktionen der Komplexkomponenten dargestellt. Sternchen markieren die Proteine, die mit der transportierten Einzelstrang T-DNA interagieren können. Pfeile zeigen die Reihenfolge des T-DNA-Transfers. Die ATPase Funktion von VirB11 ist auch dargestellt.

5.3 *In vitro* Untersuchung der ssDNA-Protein Wechselwirkungen

Die Fähigkeit einiger T4SLS-Proteine (z.B. ORF5, ORF8, ORF10, ORF12, ORF14, ORF15) Einzelstrang pIP501 DNA zu binden, kann auch *in vitro* mittels EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) untersucht werden. Mit EMSA wurde bereits nachgewiesen, dass die

Relaxase ORF1 und ihre N-terminale Domäne ORF1N₂₄₆ *oriT*_{pIP501} binden können (Kopeć *et al.*, 2005). Radioaktiv markierte einzelsträngige pIP501 DNA könnte mit unterschiedlichen Konzentrationen der zu untersuchenden T4SLS-Proteine in einem geeigneten Puffer gemischt und zum Binden inkubiert werden (Puffer, Inkubationstemperatur und Inkubationsdauer müssen für jedes Protein optimiert werden).

5.4 Verifizierung der Protein-Protein Interaktionen mit biophysikalischen Methoden

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Protein-Protein Wechselwirkungen sollen mit biophysikalischen Methoden verifiziert und quantifiziert werden. Die Bindungskstärken der Proteinkomplexe (ORF4-ORF5, ORF5-ORF5, ORF10-ORF10, des Transferkomplexes ORF8-ORF12-ORF14-ORF15 oder Teile des Komplexes) sollen mittels Fluoreszenzspektroskopie und Isothermischer Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmt werden.

5.5 Kristallisationsversuche einiger T4SLS-Proteine

Es sollen Kristallisationsversuche von den wichtigsten Komponenten des T4SLS durchgeführt werden, besonders von den T4SS-Homologen (ORF5, ORF7 und ORF10) und von den Proteinen, die an dem Aufbau des Transferkomplexes beteiligt sind (ORF8, ORF12, ORF14 und ORF15). Dafür sollen die Proteine in großem Maßstab und löslicher Form exprimiert und gereinigt werden. Proteine, die Löslichkeitsprobleme aufweisen, können durch Deletions- oder Punktmutationen löslicher gemacht werden. Die löslichen Proteine sollen einem initialen Kristallisationsscreening unterzogen werden. Wenn die Qualität der entstehenden Kristalle nicht genug gut sein sollten, müssen in diesem Fall die Proteine durch Mutationsstrategien verändert werden. Aminosäuren, die sich laut Computervorhersagen auf der Oberfläche des Proteins befinden sollten und lange flexible Seitenketten aufweisen, wie z.B. Lysin und Glutamine, sollen durch kleinere Aminosäuren ersetzt werden. Diese Strategie erweist sich sehr oft als nützlich, um Kristalle besserer Qualität zu erzielen.

5.6 T4SLS-Proteine als mögliche Ziele für neuartige antibakterielle Stoffe

Bisher wurden hauptsächlich Antibiotika im Kampf gegen Krankheitserreger verwendet, aber der Einsatz mancher Antibiotika bereitete in den letzten Jahren große Probleme. Die Probleme bestehen erstens darin, dass die Krankheitserreger durch den enormen Selektionsdruck viele

multiresistente Varianten entwickelt haben und zweitens darin, dass der Antibiotikakonsum sich negativ auf die native Darmflora auswirken kann. Anhand der gewonnenen Informationen über die Struktur, die Funktionen und die Interaktionen der verschiedenen T4SLS-Komponenten, könnten neue antibakterielle Mittel entwickelt werden, die spezifisch die Transportsysteme und die Virulenzfaktoren der pathogenen Bakterien hemmen könnten, ohne die natürliche Darmflora zu stören (Baron and Coombes, 2006). Zur Isolierung oder Synthese solcher antibakterieller Mittel muss als erstes eines der T4SLS-Proteine ausgewählt werden z.B. ORF10, welches für den DNA-Transfer essentiell sein sollte, dann könnte ein T4SLS-Inhibitor mit 3 verschiedenen Strategien hergestellt werden:

1. Durch das Messen von Änderungen der Polarisierung eines Fluoreszenz-markierten ORF10 Proteins beim Interagieren mit einem Interaktionspartner, könnten kleine Moleküle entworfen werden, die die Interaktionsstellen auf ORF10 blockieren (Eggeling *et al.*, 2003; Baron, 2006).
2. Durch *Phage Display* Studien könnten ORF10-bindende Peptide entwickelt werden, welche die Bindestellen auf ORF10 für einen oder mehrere Interaktionspartner (z.B. für ORF1) blockieren (Kehoe and Kay, 2005).
3. Durch Röntgenstrukturanalyse von ORF10 Kristallen könnten ORF10-Peptidderivate hergestellt werden, welche die ORF10-Bindestellen umfassen. Somit könnten diese Derivate mit ORF10 um die Bindestellen seiner Interaktionspartner konkurrieren (Baron, 2006).

Anhand der in dieser Arbeit nachgewiesenen Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen den Tra Proteinen des konjugativen Plasmids pIP501 und der gewonnenen Informationen über die Funktion dreier seiner Sekretionsproteine, nämlich über ORF5, ORF7 und ORF10 konnte ein Modell des ersten T4SLS in G+ Bakterien erstellt werden. Die Aufklärung des Mechanismus des konjugativen DNA Transfers in G+ Bakterien kann zukünftig helfen, die Verbreitung der Antibiotikaresistenzen in den G+ pathogenen Bakterien zu verringern und neue Strategien zur Bekämpfung von G+ Krankheitserregern zu entwickeln.

6. LITERATUR

Adams, P. D., Seeholzer, S. and Ohh, M. (2002). Identification of associated proteins by coimmunoprecipitation. In Protein-Protein Interactions (Hrsg.: Golemis, E.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 59-74. ISBN: 0-87969-604-4.

Amyes, S. G. (2000). The rise in bacterial resistance is partly because there have been no new classes of antibiotics since the 1960s. *BMJ* 320: 199 - 200.

Andrup, L., Jorgensen, O., Wilcks, A., Smidt, L. and Jensen, G. B. (1996). Mobilization of "nonmobilizable" plasmids by the aggregation-mediated conjugation system of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 36: 75-85.

Andrup, L., Damgaard, J. and Wassermann, K. (1993). Mobilization of small plasmids in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is accompanied by specific aggregation. *J. Bacteriol.* 175: 6530-6536.

Arends, K. (2005). Klonierung, Expression und Charakterisierung der von *orf7* des konjugativen Plasmids pIP501 codierten putativen lytischen Transglykosylase. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin, Berlin, Deutschland.

Bach, H., Mazor, Y., Shaky, S., Shoham-Lev, A., Berdichevsky, Y., Gutnick, D. L., Benhar, I. (2001). *Escherichia coli* maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies. *J. Mol. Biol.* 312: 79 - 93.

Bae, T., Kozlowicz, B. K. and Dunny, G. M. (2004). Characterization of cis-acting prgQ mutants: evidence for two distinct repression mechanisms by Qa RNA and PrgX protein in pheromone-inducible enterococcal plasmid pCF10. *Mol. Microbiol.* 5: 271-281.

Bae, T. and Dunny, G. M. (2001). Dominant-negative mutants of prgX: evidence for a role for PrgX dimerization in negative regulation of pheromone-inducible conjugation. *Mol. Microbiol.* 39: 1307-1320.

Barocchi, M. A., Ries, J., Zogaj, X., Hemsley, C., Albiger, B., Kanth, A., Dahlberg, S., Fernebro, J., Moschioni, M., Massignani, V., Hultenby, K., Taddei, A. R., Beiter, K., Wartha, F., von Euler, A., Covacci, A., Holden, D. W., Normark, S., Rappuoli, R., and Henriques-Normark, B. (2006). A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 2857-2862.

Baron, C. and Coombes, B. (2007). Targeting bacterial secretion systems: Benefits of disarmament in the microcosm. *Drug Targets - Infectious Disorders* 7:19-27.

Baron, C. (2006). VirB8: A conserved type IV secretion system assembly factor and drug target. *Biochem. Cell Biol.* 84: 890-899.

Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E. L., Studholme, D. J., Yeats, C. and Eddy, S. R. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 32: D138-141.

- Berger, B. R., Christie, P. J.** (1994). Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* *virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *J. Bacteriol.* 176:3646-3660.
- Bohne, J., Yim, A. and Binns, A. N.** (1998). The Ti plasmid increases the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens* as a recipient in *virB*-mediated conjugal transfer of an IncQ plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7057-7062.
- Brantl, S., Wagner, G. H.** (1997). Dual function of the *copR* gene product of plasmid pIP501. *J. Bacteriol.* 179: 7016-7024.
- Brencic, A. and Winans, S. C.** (2005). Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 69: 155-194.
- Buttaro, B. A., Antiporta, M. H., and Dunny, G. M.** (2000). Cell-Associated Pheromone Peptide (cCF10) Production and Pheromone Inhibition in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 182: 4926-4933.
- Cascales, E., Christie, P. J.** (2004a). *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 17228-17233.
- Cascales, E., Christie, P. J.** (2004b). Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* 304: 1170 – 1173.
- Çelik, E.-K.** (2006). Klonierung, Expression, Reinigung und enzymatische Charakterisierung der Proteindomänen der lytischen Transglykosylase ORF7 des Antibiotikaresistenzplasmids pIP501 aus *Streptococcus agalactiae*. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin, Berlin, Deutschland
- Chen, I. and Dubnau, D.** (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 241-249.
- Chen, Y., Staddon, J. H. and Dunny, G. M.** (2007). Specificity determinants of conjugative DNA processing in the *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10 and the *Lactococcus lactis* plasmid pRS01. *Mol. Microbiol.* 63: 1549-1564.
- Christie, P. J., and Cascales, E.** (2005). Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol. Membr. Biol.* 22:51–61.
- Christie, P. J.** (2004). Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim. Biophys. Acta. Rev.* 1694: 219-234.
- Christie, P. J.** (2001). Type IV secretion: intracellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Mikrobiol. Rev.* 40: 294-305.
- Claros, M. G. and Von Heijne, G.** (1994). TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput. Appl. Biosci.* 10: 685-586.
- Clewell, D. B.** (1993). Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell.* 73:9-12 Rev.

- Gomis-Ruth, F. X. and Coll, M.** (2001). Structure of TrwB, a gatekeeper in bacterial conjugation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33:839–843.
- Gomis-Ruth, F. X., Moncalian, G., Perez-Luque, R., Gonzalez, A., Cabezon, E., de la Cruz, F. and Coll, M.** (2001). The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* 409:637–641.
- Coyette, J. and Hancock, L. E.** (2002). Enterococcal cell wall *In* M.S. Glimore (ed.), *The Enterococci Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*, ASM Press, Washington, D.C., U.S.A.: 177-218.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., Von Heijne, G. and Elofsson, A.** (1997). Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng.* 10: 673-676.
- Davies, J., Nikaido, H., Spratt, B. G.** (1994). Resistance to antibiotics (special issue). *Science* 264: 375 - 393.
- Davison, J.** (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42:73-91.
- Ditt, R. F., Nester, E. and Comai, L.** (2005). The plant cell defense and *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 247:207-13.
- Döring, M.** (2005). Klonierung und Expression der putativen Gentransferproteine ORF8 und ORF15 des Multiresistenzplasmides pIP501 in den His-Tag Vektor pQTEV mit anschließender Reinigung der Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie. Diplomarbeit, Technische Fachhochschule (TFH), Berlin, Deutschland.
- Douglas, C. J., Halperin, W. and Nester, E. W.** (1982). *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachment to plant cells. *J. Bacteriol.* 152: 1265-1275.
- Draper, O., Middleton, R., Doucleff, M. and Zambryski, P. C.** (2006). Topology of the VirB4 C terminus in the *Agrobacterium tumefaciens* VirB/D4 type IV secretion system. *J. Biol. Chem.* 281:37628-37635.
- Eaton, T. J., Gasson, M. J.** (2001). Molecular Scening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potetial for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1628-1635.
- Eggeling, C., Brand, L., Ullmann, D. and Jager, S.** (2003). Highly sensitive fluorescence detection technology currently available for HTS. *Drug Discov. Today* 8: 632-641. Rev.
- Fortina, M. G., Ricci, G., Mora, D. and Manachini, P. L.** (2004). Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1717-1721.
- Francia, M. V. and Clewell, D. B.** (2002). Transfer origins in the conjugative *Enterococcus faecalis* plasmids pAD1 and pAM373: Identification of the pAD1 nic site, a specific relaxase and a possible TraG-like protein. *Mol. Microbiol.* 45:375-395.

- Gardy, J. L., Laird, M. R., Chen, F., Rey, S., Walsh, C. J., Ester, M. and Brinkman, F. S.** (2005). PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics* 21: 617-623.
- Gaspar, A. H. and Ton-That, H.** (2006). Assembly of distinct pilus structures on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* 188:1526-1533.
- Gelvin, S. B.** (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:16-37.
- Gomis-Ruth, F. X. and Coll, M.** (2001). Structure of TrwB, a gatekeeper in bacterial conjugation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33:839-843.
- Gomis-Ruth, F. X., Moncalian, G., Perez-Luque, R., Gonzalez, A., Cabezon, E., de la Cruz, F. and Coll, M.** (2001). The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* 409:637-641.
- Grohmann, E.** (2006). Mating cell-cell channels in conjugating bacteria. In *Cell-Cell Channels* (Hrsg.: Baluska, F., Volkmann, D. and Barlow, P. W.), Landes Biosciences, Georgetown, Texas, pp. 21-38. ISBN:1-58706-065-5.
- Grohmann, E., Muth, G. and Espinosa, M.** (2003). Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 277 - 301.
- Hallet, B. and Sherratt, D.J.** (1997). Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. *FEMS Microbiol. Rev.* 21:157-178.
- Hof, H., Mertgen, C. P. and Witte, K.** (2002). *Antibiotika in der Geriatrie*; 1. Auflage, Germany, Socio-medico Verlag GmbH Wessobrunn, S.71.
- Hofmann, K. and Stoffel, W.** (1993). TMBASE-A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374: 166.
- Huycke M.M., Sahn D.F., Gilmore M.S.** (1998) Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.*; 4:239-249.
- Ike, Y., Tanimoto, K. and Tomita, H.** (1998). Efficient transfer of the pheromone-independent *Enterococcus faecium* plasmid pMG1 (Gm^r) (65.1 kilobases) to *Enterococcus* strains during broth matings. *J. Bacteriol.* 180:4886-4892.
- Jakubowski, S. J., Krishnamoorthy, V. and Christie, P. J.** (2003). *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 protein participates in formation of VirB7 and VirB9 complexes required for type IV secretion. *J. Bacteriol.* 185: 2867-2878.
- Judd, P. K., Kumar, R. B. and Das, A.** (2005). Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type secretion apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11498-11503.

- Kapust, R. B. and Waugh, D. S.** (1999). *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 8: 1668–1674.
- Kayaoglu, G. and Orstavik, D.** (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 15:308-20.
- Kehoe, J. W. and Kay, B. K.** (2005). Filamentous phage display in the new millennium. *Chem. Rev.* 105:4056-4072.
- Kopeć, J.** (2006). Structure analysis of DNA relaxases, the key enzymes of bacterial conjugation: TraA and its N-terminal relaxase domain of the Gram-positive plasmid pIP501 show specific *oriT* binding and behave as dimers in solution. Doktorarbeit, Technische Universität Berlin, Berlin, Deutschland.
- Kopeć, J., Bergmann, A., Fritz, G., Grohmann, E. and Keller, W.** (2005). TraA and its N-terminal relaxase domain of the Gram-positive plasmid pIP501 show specific *oriT* binding and behave as dimers in solution. *Biochem. J.* 387:401–409.
- Kozłowicz, B. K., Shi, K., Gu, Z. Y., Ohlendorf, D. H., Earhart, C. A. and Dunny, G. M.** (2006). Molecular basis for control of conjugation by bacterial pheromone and inhibitor peptides. *Mol. Microbiol.* 62: 958-969.
- Krah, E. R., 3rd and Macrina, F. L.** (1989). Genetic analysis of the conjugal transfer determinants encoded by the streptococcal broad-host-range plasmid pIP501. *J. Bacteriol.* 171: 6005-6012.
- Krall, L., Wiedemann U. and Unsin, G.** (2002). Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:11405-11410.
- Kurenbach, B., Kopeć, J., Mägdefrau, M., Andreas, K., Keller, W., Bohn, C., Abajy, M. Y. and Grohmann, E.** (2006). The TraA relaxase autoregulates the putative type IV secretion-like system encoded by the broad-host-range *Streptococcus agalactiae* plasmid pIP501. *Microbiol.* 152:637–645.
- Kurenbach, B.** (2004). Konjugativer DNA-Transfer zwischen gram-positiven und gram-negativen Bakterien: Transferkomponenten des Multiresistenzplasmids pIP501 aus *Streptococcus agalactiae*. Doktorarbeit, Technische Universität Berlin, Berlin, Deutschland.
- Kurenbach, B., Bohn, C., Prabhu, J., Abudukerim, M., Szewzyk, U., Grohmann, E.** (2003). Intergeneric transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pIP501 to *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* and sequence analysis of its *tra* region. *Plasmid* 50: 86-93.
- Kurenbach, B., Grothe, D., Farias, M. E., Szewzyk, U. and Grohmann, E.** (2002). The *tra* region of the conjugative plasmid pIP501 is organized in an operon with the first gene encoding the relaxase. *J. Bacteriol.* 184: 1801-1805.

- Lacroix, B., Vaidya, M., Tzfira, T. and Citovsky, V.** (2005). The VirE3 protein of *Agrobacterium* mimics a host cell function required for plant genetic transformation. *EMBO J.* 24: 428-437.
- Lanka, E., Wilkins, B. M.** (1995). DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 114-169.
- Lawley, T., Wilkins, B. M., and Forst, L. S.** (2004). Bacterial conjugation in Gram-negative bacteria . In *Plasmid Biology* (Hrsg.: Funnell, B. E. and Phillips, G. J.), ASM Press, Washington D. C., pp. 203-226.
- Lee, C. A.** (1996). Pathogenicity Islands and the Evolution of Bacterial Pathogens-Mini Review. *Infect. Agents Dis.* 5:1-7
- Leonard, B. A, Podbielski, A. and Hedberg, P. J.** (1996). *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:260-264.
- Lessl, M. and Lanka, E.** (1994). Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* 77: 321 - 324.
- Llosa, M. and de la Cruz, F.** (2005). Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Res. Microbiol.* 165: 1-6.
- Louvet, O. and Marsolier, M. C.** (2000). A RNA polymerase III-based two-hybrid system. In *Yeast hybrid technologies* (Hrsg: Zhu, L. Hannon, G. J.), Eaton Publishing, Natick, USA, pp. 145-163, ISBN: 1-881299-15-5.
- Marmur, J., Falkow, S. and Mandel, M.** (1963). New approaches to bacterial taxonomy. *Ann. Rev. Microbiol.* 17: 329-372.
- Marsolier, M. C., Prioleau, M. N and Sentenac, A.** (1997). A RNA polymerase III-based two-hybrid system to study RNA polymerase II transcriptional regulators. *J. Mol. Biol.* 268:243-249
- Matthysse, A. G., Yarnall, H., Boles, S. B. and McMahan, S.** (2000). A region of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome containing genes required for virulence and attachment to host cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1490:208-212.
- McCullen, C. A., Binns, A. N.** (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:101-127.
- Middleton, R., Sjolander, K., Krishnamurthy, N., Foley, J. and Zambryski, P.** (2005). Predicted hexameric structure of the *Agrobacterium* VirB4 C terminus suggests VirB4 acts as a docking site during type IV secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:1685-1690.
- Milpetz, F., Argos, P. and Persson, B.** (1995). TMAP: a new email and www service for membrane-protein structural predictions. *Trends Biochem. Sci.* 20: 204-205.

- Mora, M., Bensi, G., Capo, S., Falugi, F., Zingaretti, C., Manetti, A.G., Maggi, T., Taddei, A. R., Grandi, G. and Telford, J. L.** (2005). Group A Streptococcus produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:15641-15646.
- Mushegian, A. R., Fullner, K. J., Koonin, E. V. and Nester, E. W.** (1996). A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7321-7326.
- Neff, N. T. and Binns, A. N.** (1985). *Agrobacterium tumefaciens* Interaction with Suspension-Cultured Tomato Cells. *Plant Physiol.* 77:35-42.
- Oumer, B. A., Gaya, P., Fernandez-Garcia, E., Marciaca, R., Garde, S., Medina, M. and Nunez, M.** (2001). Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *J. Dairy Research* 68: 117-129.
- Paulsen, I. T., Banerjee, L., Myers, G. S., Nelson, K. E., Seshadri, R. and Read, T. D.** (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299:2071-2074, Supplementary Material, Table S7.
- Persson, B. and Argos, P.** (1997). Prediction of membrane protein topology utilizing multiple sequence alignments. *J. Protein Chem.* 16: 453-457.
- Persson, B. and Argos, P.** (1996). Topology prediction of membrane proteins. *Protein Sci.* 5: 363-571.
- Probst, M. R., Fan, C. M., Tessier-Lavigne, M. and Hankinson, O.** (1997). Two murine homologs of the Drosophila single-minded protein that interact with the mouse aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein. *J. Biol. Chem.* 272: 4451-4457.
- Reuther, J., Gekeler, C., Tiffert, Y., Wohleben, W. and Muth, G.** (2006). Unique conjugation mechanism in mycelial streptomycetes: a DNA-binding ATPase translocates unprocessed plasmid DNA at the hyphal tip. *Mol. Microbiol.* 61:436-446.
- Rosini, R., Rinaudo, C. D., Soriani, M., Lauer, P., Mora, M., Maione, D., Taddei, A., Santi, I., Ghezzi, C., Brettoni, C., Buccato, S., Margarit, I., Grandi, G. and Telford, J. L.** (2006). Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*. *Mol. Microbiol.* 61: 126-141.
- Rost, B., Fariselli, P. and Casadio, R.** (1996). Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci.* 5: 1704-18.
- Ruden, D. M.** (1992). Activating regions of yeast transcription factors must have both acidic and hydrophobic amino acids. *Chromosoma* 10: 342-348.
- Ruden, D. M., Ma J., Li, Y., Wood, K. and Ptashne, M.** (1991). Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences. *Nature* 350: 250-252.

- Ruhfel, R. E., Manias, D. A. and Dunny, G. M.** (1993). Cloning and characterization of a region of the *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pCF10, encoding a sex pheromone-binding function. *J. Bacteriol.* 175: 5253-5259.
- Saleh, M.** (2007). Klonierung, Expression, Reinigung und enzymatische Charakterisierung des Transferproteins ORF10 aus dem Plasmid pIP501. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin, Berlin, Deutschland.
- Salih, R.** (2006). Expression, Reinigung und enzymatische Charakterisierung der Transferproteine ORF5 und ORF10 des konjugativen Resistenzplasmid pIP501. Diplomarbeit, Technische Fachhochschule (TFH), Berlin, Deutschland.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbour press, Cold Spring Harbour, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Serebriiskii, I. and Joung, J. K.** (2002). Yeast and bacterial two-hybrid selection systems for studying protein-protein interactions. In *Protein-Protein Interactions* (Hrsg.: Golemis, E.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 93-142. ISBN: 0-87969-604-4.
- Schleifer, K. H. and Kandler, O.** (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36: 407-477.
- Scholz, P., Haring, V., Wittmann-Liebold, B., Ashman, K., Bagdasarian, M. and Scherzinger, E.** (1989). Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* 75: 271-288.
- Schröder, G. and Lanka, E.** (2005). The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid* 54:1-25.
- Schröder, G. and Lanka, E.** (2003): TraG-like proteins of type IV secretion systems: functional dissection of the multiple activities of TraG (RP4) and TrwB (R388). *J. Bacteriol.* 185: 4371-4381.
- Shamaei-Tousi, A., Cahill, R. and Frankel, G.** (2004). Interaction between protein subunits of the type IV secretion system of *Bartonella henselae*. *J. Bacteriol.* 186: 4796-4801.
- Shi, K., Brown, C. K., Gu, Z.Y., Kozlowski, B. K., Dunny, G. M., Ohlendorf, D. H. and Earhart, C. A.** (2005). Structure of peptide sex pheromone receptor PrgX and PrgX/pheromone complexes and regulation of conjugation in *Enterococcus faecalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 18596-18601.
- Smith, V. A. and Hindley, J.** (1978). Effect of argocin 84 on attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to cultured tobacco cells. *Nature* 276: 498-500.
- Şöllü, C.** (2006). Untersuchung des Gentransfers in Gram-positiven Bakterien anhand des konjugativen Antibiotikaresistenzplasmids pIP501: Nachweis der lytischen

Transglykosylaseaktivität des ORF7 Proteins mit radioaktiv und Fluoreszenz-markiertem Peptidoglykan. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin, Berlin, Deutschland.

Staddon, J. H., Bryan, E. M., Manias, D. A., Chen, Y. and Dunny, G. M. (2006). Genetic characterization of the conjugative DNA processing system of enterococcal plasmid pCF10. *Plasmid* 56:102-111.

Stachel, S. E. and Nester, E. W. (1986). The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 5:1445-1454.

Stellwagen, A. E. and Craig, N. L. (1998). Mobile DNA elements: controlling transposition with ATP-dependent molecular switches. *Trends Biochem. Sci. Rev.* 23: 486-490.

Terradot, L., Durnell, N., Li, M., Li, D., Ory, J., Labigne, A., Legrain, P., Colland, F. and Waksman, G. (2004). Biochemical characterization of protein complexes from the *Helicobacter pylori* protein interaction map: strategies for complex formation and evidence for novel interactions within type IV secretion systems. *Mol. Cell. Proteomics* 3:809–819.

Ton-That, H. and Schneewind, O. (2003). Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol. Microbiol.* 50:1429-1438.

Tusnady, G. E. and Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17: 849-850.

Tzfira, T., Vaidya, M. and Citovsky, V. (2004). Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*. *Nature* 431:87-92.

Veena, Jiang, H., Doerge, R. W. and Gelvin, S. B. (2003). Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *Plant J.* 35: 219-236.

Von Heijne, G. (1992). Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* 225: 487-494.

Wanker, E. E., Rovira, C., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Walter, S., Tait, D., Colicelli, J., Lehrach, H. (1997). HIP-1: A Huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Hum. Mol. Genet.* 6: 487-495.

Ward, D. V., Draper, O., Zupan, J. R. and Zambryski, P. C. (2002). Peptide linkage mapping of the *Agrobacterium tumefaciens* vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11493-11500.

Winans, S. C., Kerstetter, R. A. and Nester, E. W. (1988). Transcriptional regulation of the virA and virG genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 170:4047-4054.

Witte, W. und Klare, I. (1999). Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 1: 8-16.

- Xu, Y., Jiang, L., Murray, B. E. and Weinstock, G.M.** (1997). *Enterococcus faecalis* Antigens in Human Infections. *Infect. Immun.* 65:4207-4215.
- Yamaguchi, T. and Matsunoshita, N.** (2004). Isolation and some properties of fimbriae of oral *Streptococcus intermedius*. *Curr. Microbiol.* 49:59-65.
- Yanagawa, R., Otsuki, K. and Tokui, T.** (1968). Electron microscopy of fine structure of *Corynebacterium renale* with special reference to pili. *Jpn. J. Vet. Res.* 16:31-37.
- Yeo, H.-J. and Waksman, G.** (2004). Unveiling Molecular Scaffolds of the Type IV Secretion System. *Journal of Bacteriology* 186: 1919-1926.
- Yeung, M. K., Donkersloot, J. A., Cisar, J. O. and Ragsdale P. A.** (1998). Identification of a gene involved in assembly of *Actinomyces naeslundii* T14V type 2 fimbriae. *Infect. Immun.* 66:1482-1491.
- Zechner, E., de la Cruz, F., Eisenbrandt, R., Grahn, A. M., Koraimann, G., Lanka, E., Muth, G., Pansegrau, W., Thomas, C. M., Wilkins, B. M., Zatyka, M.** (2000). Bacterial plasmids and gene spread. In *The horizontal gene pool* (Editor: Thomas, C. M.), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Zhu, J., Oger, P. M. and Schrammeijer, B.** (2000). The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.* 182: 3885-3895.
- Zhu, L. Hannon, G. J.** (Hrsg.) (2000). *Yeast hybrid technologies*. Eaton Publishing, Natick, USA ISBN: 1-881299-15-5.

7. ANHANG

A. Komplette Nukleotidsequenz des Plasmids pBTM117c

```

1 caacttcttt tctttttttt tctttttctt ctcccccggt gttgtctcac catatccgca
61 atgacaaaaa aaatgatgga agacactaaa ggaaaaaatt aacgacaaaag acagcaccaa
121 cagatgtcgt tgttccagag ctgatgaggg gtatcttcga acacacgaaa ctttttcctt
181 ccttcattca cgcacactac tctctaataga gcaacgggat acggccttcc ttccagttac
241 ttgaatttga aataaaaaaa gtttgccgct ttgctatcaa gtataaatag acctgcaatt
301 attaatcttt tgtttcctcg tcattgttct cgttcccttt cttccttggt tctttttctg
361 cacaatattt caagctatac caagcataca atcaactcca agcttgaagc aagcctcctg
421 aaagatgaaa gcgttaacgg ccaggcaaca agagggtggt gatctcatcc gtgatcacat
481 cagccagaca ggtatgccgc cgacgcgtgc ggaaatcgcg cagcgtttgg ggttccggtc
541 cccaaacgcg gctgaagaac atctgaaggc gctggcacgc aaaggcggtt ttgaaattgt
601 ttccggcgca tcacgcggga ttcgtctggt gcaggaagag gaagaagggt tgccgctggt
661 aggtcgtgtg gctgccgggt aaccacttct ggcgcaacag catattgaag gtcatatca
721 ggtcगतcct tctttattca agccgaatgc tgatttctcg ctgcgcgca gcgggatgct
781 gatgaaagat atcggcatta tggatggtga cttgctggca gtgcataaaa ctcaggatgt
841 acgtaacggt caggctggtg tcgcacgtat tgatgacgaa gttaccggtt agcgctgaa
901 aaaacagggc aataaagtgc aactggtgcc agaaaatagc gagtttaaac caattgtcgt pBTM-
961 tgaccttctg cagcagagct tcaccattga agggctggcg gttgggggtt ttcgcaacgg seq-fw
1021 cgactggctg gaattcatgt cgacggtacc gcggccgctg cagccaagct aattccgggc
1081 gaatttctta tgatttatga tttttattat taataagtt ataaaaaaaa taagtgtata
1141 caaattttaa agtgactctt aggtttttaa acgaaaattc ttgttcttga gtaactcttt
1201 cctgtaggtc aggttgcttt ctcaggtagg tcaggttgct ttctcaggta tagcatgagg pBTM-
1261 tcgctcttat tgaccacacc tctaccggca tgccggcaag tgcacaaaaa atacttaaat seq-rev
1321 aaatactact cagtaataac ctatttctta gcatttttga cgaaatttgc tattttgtta
1381 gagtctttta caccatttgt ctccacacct ccgcttacat caacaccaat aacgccattt
1441 aatctaagcg catcaccaac attttctggc gtcagtccac cagctaacat aaaatgtaag
1501 ctttcggggc tctcttgctt tccaaccag tcagaaatcg agttccaatc caaaagttca
1561 cctgtcccac ctgcttctga atcaaaacag ggaataaacg aatgaggttt ctgtgaagct
1621 gcaactgagta gtatggtgca gtcttttggg aatacagagtc ttttaataac tggcaaacgg
1681 aggaactctt ggtattcttg ccacgactca tctccatgca gttggacgat atcaatcccg
1741 taatcattga ccagagccaa aacatcctcc ttaggttgat tacgaaacac gccaaccaag
1801 tatttcggag tgcctgaact atttttatat gcttttacia gacttgaaat tttccttgca
1861 ataaccgggt caattggtct ctttctattg ggcacacata taatacccag caagttagca
1921 tcggaatcta gagcacatct tgcggcctct gtgctctgca agccgcaaac tttcaccaat
1981 ggaccagaac tacctgtgaa attaataaca gacatactcc aagctgcctt tgtgtgctta
2041 atcacgtata ctacgtgct caatagtcac caatgccctc cctcttggcc ctctcctttt
2101 cttttttcga ccgaattaat tcgtaatcat ggtcatagct gtttctctgt tgaaattggt
2161 atccgctcac aattccacac aacatacagc ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg
2221 cctaattgagt gaggttaact acattaattg cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg
2281 gaaacctgtc gtgccagagc ttagcatttg ccgttggcct gatgatctga ccattccctt
2341 tagtagagaa agaaagtgcg tcaagctaa cccagttttc ttttttttta tcaactatca
2401 gtcctattcg gagatacagg caacaagtga tagagggccc attatgaata cgcacctcta
2461 tgtatttccg agatacgatt actccagttc ctcttacaag aatgcataa aaatagttac
2521 aattaattag aacaagaact tatttagaac acgttcacac tgagtaagaa ctcttgtccc
2581 ttattagcct tgatagtgtc gaaaaaaaga aaaaaaaca aaaaaagaaa taaaataacg
2641 gcaaacagca aaggccacag aaccgtattc atgttacttc tgcaatatca atcacttact
2701 ggcaagtgcg tataaattaa acctatttct ttatcatcat atttactat atctttaaca
2761 gattccaaac cctaaagtgt ccgaattttc aatagggcga acttgaagaa taaccaaggt
2821 caataatata tcttttagta taacctgaa atttgcccta tagaaatcta gggtttctgt
2881 gtggtttccg ggtgagtcac acggcttttt tgaatttctt tttttgcagt tgtctctatc
2941 aatgaaaatt tcgaggaaga cgataagggt aagataagta gataagagaa tgatacagaa
3001 taaagcacia attagcagaa agaagagtgg ttgcgaacag agtaaaccca atcagggaaat
3061 ccctttttgc aaaaacatca attatccttt tctttttttt actgtatata tctggaacag
3121 aatatatata gttactatta tacttatagt tggatccagt ttttaaatctg tcgtcaatcg
3181 aaagtttatt tcagagttct tcagacttct taactcctgt aaaaacaaaa aaaaaaaaag

```

3241 gcatagcaat gacaaattca aaagaagacg cgcacataga ggagaagcat atgtacaatg
3301 agccgggtcac aaccctcttt cacgacgttg aagcttcaca aacacaccac agacgtgggt
3361 caataccatt gaaagatgag aaaagtaaag aattgtatcc attgcgctct tccccgacga
3421 gagtaaatgg cgaggatacg ttctctatgg aggatggcat aggtgatgaa gatgaaggag
3481 aagtacagaa cgctgaagtg aagagagagc ttaagcaaag acatattggg atgattgccc
3541 ttggtggtac tattggtaca ggtcttttca ttggtttatc cacacctctg accaacgccg
3601 gccagtgagg cgctcttata tcatatttat ttatgggttc ttggcatat tctgtcacgc
3661 agtccttggg tgaaatggct acattcatcc ctgttacatc ctctttcaca gttttctcac
3721 aaagattcct ttctccagca tttgggtgcg ccaatggta catgtattgg ttttcttggg
3781 caatcacctt tgccctggaa cttagtgtag ttggccaagt cattcaattt tggacgtaca
3841 aagttccact ggcggcatgg attagtattt tttgggtaat tatcacaata atgaacttgt
3901 tccctgtcaa atattacggg gaattcagat tctgggtcgc ttccatcaaa gttttagcca
3961 ttatcgggtt tctaataatac tgtttttgta tggtttggg tgctgggggt accggcccag
4021 ttggattccg ttattggaga aaccagggtg cctgggggtcc aggtataata tctaaggata
4081 aaaacgaagg gaggttctta ggttgggttt cctctttgat taacgctgcc ttcacatttc
4141 aaggtactga actagtggg atcactgctg gtgaagctgc aaaccccaga aaatccgttc
4201 caagagccat caaaaaagtt gttttccgta tcttaacctt ctacattggc tctctattat
4261 tcattggact tttagttcca tacaatgacc ctaaactaac acaatctact tctactgitt
4321 ctacttctcc ctttattatt gctattgaga actctggtac aaaggttttg ccacatatct
4381 tcaacgctgt tatcttaaca accattattt ctgccgcaa ttcaaatatt tacgttgggt
4441 cccgtatttt atttgggtcta tcaaagaaca agttgggtcc taaattcctg tcaaggacca
4501 ccaaagggtg tgttccatac attgcagttt tcggtactgc tgcatattggc gctttggctt
4561 acatggagac atctactggt ggtgacaaaag ttttcgaatg gctattaaat atcactggtg
4621 ttgcaggctt ttttgcattg ttatttatct caatctcgca catcagattt atgcaagctt
4681 tgaataaccg tggcatctct cgtgacgagt taccatttaa agctaaatta atgcccggct
4741 tggcttatta tgcggccaca tttatgacga tcattatcat tattcaaggt ttcacggctt
4801 ttgcacaaa atccaatggg gttagctttg ctgccgcta tatctctatt ttctgttct
4861 tagctgtttg gatcttattt caatgcatat tcagatgcag atttatttgg aagattggag
4921 atgcactgat tccgatagaa gagacattga ggcaattgta tgggaagatc atgaacaaa
4981 gactttttgg gacaaatttt ggaatggtgt agcatagata tgacgtttta ttacctttga
5041 tcacatttcc acgccatttc gcattctcac cctcataagt catacaccga aaagaaagt
5101 taagggatca atgagcttac tataatctca gtatatttat ttttatcgat gattcaccac
5161 aacaatcttg ctcccgaaaa gaaagcagac ggagtagaag cattedgaaac tcttcagac
5221 cttcaagtat atatatatat atatatatat gtatatgtgt acattttcac gctaatacta
5281 atgtataatt agaagataat ttttactcat ttttcggtat cttcacgtca cccgaacct
5341 gaaccaaagc tcattttcac gatatgtaa tagtgaaata ggcaaaaacg ccaaaaagta
5401 gtaagcgaac catacactaa accattaaag aatatctcga ccagaatcta acagataatac
5461 atgttccgat aatgtctgag ttagggtgag attctaaatt agaaaaacaaa gagcttagaa
5521 cggagtttga attgacaaat tttccttttc caggcacaac tgataacgac tccgatgacg
5581 gaagccaagg gcagaactct ttgaatatca ttactcctga catggatgat actctggtta
5641 atgatgtact tcgagaaaac gataaaaagt ctagtatgag aatggctttt atgaatctag
5701 caaactctat tcttgggtgoc ggaataatta ctcagccgtt cgcgatcaaa aatgctggt
5761 tattaggcgg gctattatca tactgtagcc ctccgattta tagttgattg gacgttaaga
5821 cttattgtca ttaacttgac tcttgcctgg aagagaacat accagggtac ggtcgaacat
5881 gtaatgggta aaaaagggaa attgctgatt ctatttaca acgggttatt tgcactggat
5941 taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggg ggtttgcgta ttgggcgctc tcccgcttc
6001 tcgctcactg actcgctgoc ctcggctggt cggctgcggc gagcgggatc agctcactca
6061 aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca
6121 aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgctg tgctggcgtt tttccatagg
6181 ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggt gcgaaacccg
6241 acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgctgc ctctcctgtt
6301 ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgtt
6361 tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcgggttagg tcggtcgtc caagctggg
6421 tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccagc cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt
6481 gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg cactggcag cagccactgg taacaggatt
6541 agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc
6601 tacactagaa ggacagtatt tggatctgct gctctgctga agccagttac cttcggaaaa
6661 agagtgggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg tttttttgtt
6721 tgcaagcagc agattacgoc cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct
6781 acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggg catgagatta
6841 tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaat gaagttttaa atcaatctaa

```

6901 agtatatatg agtaaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc
6961 tcagcgatct gtctatctcg ttcattccata gttgcctgac tccccgctcg gtagataact
7021 acgatacggg agggccttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcy agaccaacgc
7081 tcaccggctc cagattttatc agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt
7141 ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta
7201 agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttggttgca ttgctacagc catcgtggtg
7261 tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccgggt cccaacgatc aaggcgagtt
7321 acatgatccc ccatggtgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc gatcgtttgc
7381 agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt
7441 actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggcg agtactcaac caagtcatc
7501 tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc
7561 gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc gggcgaaaaa
7621 ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgc tgcacccaac
7681 tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaaa aggaaggcaa
7741 aatgcccga aaaaggggat aaggcgaca cggaaatgt gaatactcat actcttctt
7801 tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa
7861 tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgacat ttccccgaaa agtgccacct
7921 gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg
7981 ccctttcgtc tcgcgctgtt cgggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg
8041 gagacggcca cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcy
8101 tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta
8161 ctgagagtgc accataacgc atttaagcat aaacacgcac tatgccgttc ttctcatgta
8221 tatatatata caggcaacac gcagatatag gtgcgacgtg aacagtgagc tgtatgtgcy
8281 cagctcgcgt tgcattttcg gaagcgcctc ttttcggaaa cgctttgaag ttctatttcc
8341 gaagttccta ttctctagct agaaaagata ggaacttcag agcgcttttg aaaacaaaaa
8401 gcgctctgaa gacgcacttt caaaaaacca aaaacgcacc ggactgtaac gagtactaa
8461 aatattgcga ataccgcttc cacaaacatt gctcaaaagt atctctttgc tatatatctc
8521 ttgtctatat ccctatataa cctaccatc cacctttcgc tctttgaact tgcactaaa
8581 ctcgacctct acatttttta tgtttatctc tagtattact cttagacaaa aaaaattgta
8641 gtaagaacta ttcataagat gaatcgaaaa caatacgaaa atgtaaacat ttctatacgc
8701 tagtatatag agacaaaata gaagaaaccg ttcataattt tctgaccaat gaagaatcat
8761 caacgctatc actttctggt cacaaagtat gcgcaatcca catcggataa gaataaatc
8821 ggggatgcct ttatcttgaa aaaatgcacc cgcagcttcg ctagtaatca gtaaacgcgg
8881 gaagtggagt caggcttttt ttatggaaga gaaaatagac accaaagtag cttcttcta
8941 acctaacgga acctacagtg caaaaagtta tcaagagact gcattataga gcgcacaaag
9001 gagaaaaaaaa gtaatctaag atgctttggt agaaaaatag cgctctcggg atgcattttt
9061 gtagaacaaa aaagaagtat agattctttg ttggtaaaat agcgctctcg cgttgcatct
9121 ctgttctgta aaaatgcagc tcagattctt tgtttgaaaa attagcgcctc tcgcyttgca
9181 tttttgtttt acaaaaatga agcacagatt ctctggtggt aaaaatagcgc tttcgcgttg
9241 catttctggt ctgtaaaaaat gcagctcaga ttctttgttt gaaaaattag cgctctcgcg
9301 ttgcattttt gttctacaaa atgaagcaca gatgcttctg tgcttgcattg

```

B. Komplette Nukleotidsequenz des Plasmids pGAD426

```

1  tgcttgcattg caacttcttt tctttttttt tcttttctct ctcccccggt gttgtctcac
61  catatccgca atgacaaaaa aatgatgga agacactaaa ggaaaaaatt aacgacaaag
121 acagcaccaa cagatgtcgt tgttccagag ctgatgaggg gtatcttcga acacacgaaa
181 ctttttctct ccttcattca cgcacactac tctctaatag gcaacggtat acggccttcc
241 ttccagttac ttgaatttga aataaaaaaa gtttgccgct ttgctatcaa gtataaatag
301 acctgcaatt attaatcttt tgtttcctcg tcattggtct cgttcccttt ctctctgtt
361 tctttttctg cacaatattt caagctatac caagcataca atcaactcca agctttgcaa
421 agatggataa agcgggaatta attcccagc ctccaaaaaa gaagagaaaag gtcgaattgg
481 gtaccgcccgc caattttaaa caaagtggga atattgctga tagctcattg tcttctactt
541 tcaactaacag tagcaacggg ccgaacctca taacaactca acaaaattct caagcgcttt
601 cacaaccaat tgctctctct aacgctcatg ataacttcat gaataatgaa atcacggcta
661 gtaaaattga tgatggaat aattcaaaac cactgtcacc tggttggagc gaccaaactg
721 cgtataacgc gtttggaaac actacagggg tgtttaaata cactacaatg gatgatgat
781 ataactatct attcgatgat gaagataccc caccaaaccc aaaaaagag atcgaattca
841 tgtcgacggg accgcyggcg ctgcagagat ctatgaatcg tagatactga aaaaccccgc
901 aagttcactt caactgtgca tcgtgcacca tctcaatttc tttcatttat acatcgtttt
961 gccttctttt atgtaactat actcctctaa gtttcaatct tggccatgta acctctgatc

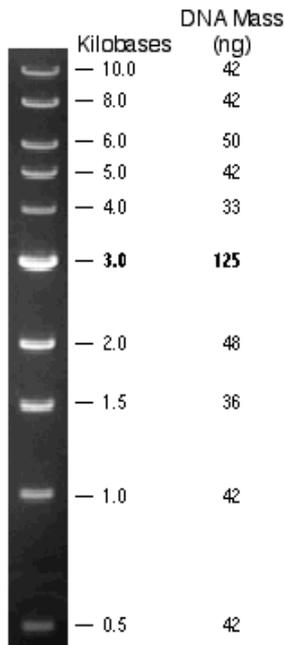
```

pGAD-
seq-fwpGAD-
seq-rev

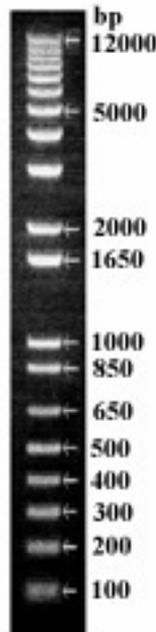
1021 tatagaat tttaaatgac tagaattaat gcccatcttt tttttggacc taaattcttc
1081 atgaaaatat attacgaggg cttattcaga agctttggac ttcttcgcca gaggtttggt
1141 caagtctcca atcaagggtg tgggcttgtc taccttgcca gaaatctacg aaaagatgga
1201 aaagggtaaa atcggttggt gatacggtgt tgacacttct aaataagcga atttcttatg
1261 atttatgatt tttattatta aataagttat aaaaaaata agtgatataca aattttaaag
1321 tgactcttag gttttaaaac gaaaattctt gttcttgagt aactctttcc tgtaggtcag
1381 gttgctttct caggtatagc atgaggtcgc tcttattgac cacacctcta ccggcatgcc
1441 cgaaattccc ctaccctatg aacatattcc attttgtaat ttctgtgctg ttctattatg
1501 aatttcattt ataaagtta tgtacaaata tcataaaaaa agagaatctt ttttaagcaag
1561 gattttctta acttcttcgg cgacagcatc accgacttcc gtggtagctt tggaccacc
1621 taaatcacca gttctgatac ctgcatccaa aaccttttta actgcatctt caatggcctt
1681 accttcttca ggcaagttca atgacaat tcaacatcatt gcagcagaca agatagtggt
1741 gatagggta accttattct ttggcaaatc tggagcagaa ccgtggcatg gttctgataca
1801 accaaatgcg gtgttcttgt ctggcaaga ggccaaggac gcagatggca acaaacccaa
1861 ggaacctggg ataacggagg ctctatcgga gatgatataca ccaaacatgt tgctggtgat
1921 tataatacca tttaggtggg ttgggttctt aactaggatc atggcggcag aatcaatcaa
1981 ttgatgttga accttcaatg taggaaattc gttcttgatg gtttctcca cagttttctt
2041 ccataatctt gaagaggcca aacattagc tttatccaag gaccaaatag gcaatggtgg
2101 ctcatgttgt agggccatga aagcggccat tcttgtgatt ctttgcactt ctggaacggt
2161 gtattgttca ctatcccaag cgacaccatc accatcgtct tcctttctct taccaaagt
2221 aatacctccc actaattctc tgacaacaac gaagtcagta ctttttagcaa atgtgtgctt
2281 gattggagat aagtctaaaa gagagtcgga tgcaaagtta catggctctta agttggcgt
2341 caattgaagt tctttacgga ttttttagta accttgttca ggtctaacac tacctgtacc
2401 ccatttagga ccaccacag cacctaaca aacggcatca accttcttgg aggttccag
2461 cgctcatctt ggaagtggga cacctgtagc atcgatagca gcaccaccaa ttaaatgatt
2521 ttcgaaatcg aacttgacat tggaaacga atcagaaata gctttaagaa ctttaattggc
2581 ttcggcttgg atttcttgac caacgtggc acctggcaaa acgacgatct ttaatggggc
2641 agacattaga atggtatata cttgaaatat atatatatat tgctgaaatg taaaaggtaa
2701 gaaaagttag aaagtaagac gattgctaac cacctattgg aaaaaacaat aggtccttaa
2761 ataataattg caacttcaag tattgtgatg caagcattta gtcataacg cttctctatt
2821 ctatatgaaa agcgggttcc ggctctcac ctttctttt tctcccaatt tttcagttga
2881 aaaaggtata tgcgtcaggg gacctctgaa attaacaaaa aatttccagt catcgaattt
2941 gattctgtgc gatagcgccc ctgtgtgttc tcgttatggt gaggaaaaaa ataatggttg
3001 ctaagagatt cgaactcttg catcttacga tacctgagta tcccacagt tgggatctc
3061 gactctagct agaggatcaa ttcgtaataca tggatcatagc tgtttctgt gtgaaattgt
3121 tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctgggg
3181 gcctaagtga tgaggtaact cacattaatt gcgttgccgt cactgcccgc tttccagtcc
3241 ggaaacctgt cgtgccagat cgacaaagga aaaggggcct gtttactcac aggtttttt
3301 caagtaggta attaagtcgt ttctgtcttt ttcttcttc aaccaccaa aggcctctt
3361 ggtacttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
3421 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
3481 gatgttgaat tagattaaac tgaagatata taatttattg gaaaatacat agagcttttt
3541 gttgatgccc ttaagcgate aattcaaca caccaccagc agctctgatt ttttcttcag
3601 ccaacttggg gacgaatcta gcttgacga taactggaac atttgggatt ctacccttac
3661 ccaagatctt accgtaaccg gctgccaag tgtcaataac tggagcagtt tctttagaag
3721 cagatttcaa gtattggtct ctctgtctt ctgggatcaa tgtccacaat ttgtccaagt
3781 tcaagactgg cttccagaaa tgagcttgtt gcttgggaa gtatctcata ccaaccttac
3841 cgaaataacc tggatggtat ttatccatgt taattctgtg gtgatgttga ccaccggcca
3901 tacctctacc accgggtgct tttctgtgct taccgatac acccttaccg gctgagacgt
3961 gacctctgtg ctttctagtc ttagtgaatc tggaggcat tcttgattag ttggatgatt
4021 gttctgggat ttaatgcaaa aaaatcacta agaaggaaaa aatcaacgg agaaagcaaa
4081 cgccatctta aatatacggg atacagatga aaggtttgaa cctatctggg aaaatacga
4141 ttaacaagc gaaaaactgc gaggaaaatt gtttgcgtct ctgocggcta ttcacgcgcc
4201 agaggaaaaat aggaaaaata acagggcatt agaaaaataa ttttgatttt ggtaatgtgt
4261 ggggtccctgg tgtacagatg ttacattggt tacagtactc ttgtttttgc tgtgtttttc
4321 gatgaatctc caaatgggt gtttagcat ggaagagtca ccgatgctaa gttatctcta
4381 tgaagctac gtggcgtgac ttttgatgaa gccgcacaag agatacagga ttggcaactg
4441 caaatagaat ctggggatct agatctggat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc
4501 ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgtcgc ctccgtcgtt
4561 cggctgcggc gagcggatc agctcactca aagcgggtaa tacggttatc cacagaatca
4621 ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa

4681 aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat
4741 cgacgctcaa gtcagagggt gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc
4801 cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc
4861 gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt
4921 tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccg tccagcccagc
4981 cgctgcgect tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg
5041 ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca
5101 gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatctcgc
5161 gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggtg gctcttgatc cggcaaaaa
5221 accaccgctg gtagecgtgg ttttttgggt tgcaagcagc agattacgcy cagaaaaaaa
5281 ggatctcaag aagatccttt gatctttctt acggggctcg acgctcagtg gaacgaaaa
5341 tcacgttaag ggattttgggt catgagatta tcaaaaagga tcttcacctg gatcctttta
5401 aattaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaaactg gtctgacagt
5461 tacciaatgct taatcagtgga ggcacctatc tcagcgatct gtctatctcg ttcacccata
5521 gttgcctgac tccccgctgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc
5581 agtgctgcaa tgataccgcy agaccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac
5641 cagccagccg gaagggccga ggcgagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag
5701 tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac
5761 gttgttgcca ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttgggat ggcttcattc
5821 agctccgggt cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatggtgtg caaaaaagcy
5881 gttagctcct tcggctcctc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc
5941 atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct
6001 gtgactggtg agtaactcaac caagtcatctc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc
6061 tcttgccccg cgtcaatacgy ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgctc
6121 atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc
6181 agttcagatgt aaccactcgy tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc
6241 gtttctgggt gagcaaaaaa aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggatc agggcgaca
6301 cggaaatggt gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt
6361 tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt
6421 ccgcgcacat tccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca
6481 ttaacctata aaaataggcy tatcacgagg ccctttcgtc tcgcygcttt cggtgatgac
6541 ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca cagcttgtct gtaagcggat
6601 gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggctgg
6661 cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accataacgc atttaagcat
6721 aaacacgcac tatgccgttc ttctcatgta tatatatata caggcaacac gcagatatag
6781 gtgcgacgtg aacagtgagc tgtatgtgcy cagctcgcgt tgcattttcg gaagcgtcgy
6841 ttttcggaaa cgttttgaag ttctattcc gaagttccta ttctctagct agaaaagata
6901 ggaacttcag agcgtttttg aaaaccaaaa gcgctctgaa gacgcacttt caaaaaacca
6961 aaaacgcacc ggactgtaac gagctactaa aatattgcga ataccgcttc cacaaacatt
7021 gctcaaaagt atctctttgc tatatatctc tgtgctatat ccctatataa cctacccatc
7081 cacctttcgc tcttgaact tgcactaaa ctgcacctct acatttttta tgtttatctc
7141 tagtattact cttagacaa aaaaattgta gtaagaacta ttcataagagt gaatcgaaaa
7201 caatacgaaa atgtaaacat ttctatacgy tagtatatag agacaaaata gaagaaaccg
7261 ttcataatth tctgaccaat gaagaatcat caacgctatc actttctggt cacaaagtat
7321 gcgcaatcca catcgggtata gaatataatc ggggatgcct ttatctttaa aaaatgcacc
7381 cgcagcttcg ctagtaatca gtaaaccgcy gaagtggagt caggcttttt ttatggaaga
7441 gaaaatagac accaaagtag ccttcttcta acctaacgy acctacagtg caaaaagtta
7501 tcaagagact gcattataga gcgcacaaag gagaaaaaaa gtaatctaag atgctttggt
7561 agaaaaatag cgtctcgggy atgcattttt gtagaacaaa aaagaagtat agattctttg
7621 ttggtaaaaat agcgtctcgy cgttgcattt ctgttctgta aaaatgcagc tcagattctt
7681 tgtttgaaaa attagcgtc tcgcgttgca tttttgtttt acaaaaatga agcacagatt
7741 ctctggtgggt aaaatagcgy tttcgcgttg catttctggt ctgtaaaaaat gcagctcaga
7801 ttctttggtt gaaaaattag cgtctcgcgy ttgcattttt gttctacaaa atgaagcaca
7861 gatgcttctg

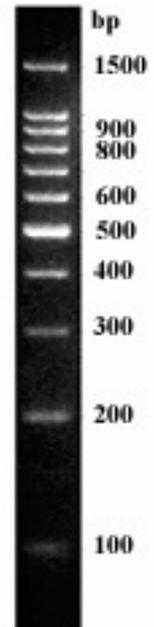
C. DNA- und Proteinstandards



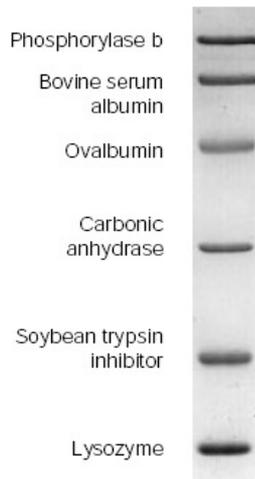
1 kb DNA ladder auf 1% Agarose (New England Biolab)



1 kb plus DNA ladder auf 0,9% Agarose (Invitrogen)



100 bp DNA ladder auf 2% Agarose (Promega)



Protein Molecular Weights (daltons)

Protein	Molecular Weight	Broad Range	Low Range	High Range
Myosin	200,000	X		X
β-galactosidase	116,250	X		X
Phosphorylase b	97,400	X	X	X
Serum albumin	66,200	X	X	X
Ovalbumin	45,000	X	X	X
Carbonic anhydrase	31,000	X	X	
Trypsin inhibitor	21,500	X	X	
Lysozyme	14,400	X	X	
Aprotinin	6,500	X		

Low range molecular weight Proteinstandard in 12% SDS-PAGE (BioRad)

Protein	Approximate Molecular Weights (kDa)				
	Tris-Glycine	Tricine	NuPAGE MES	NuPAGE MOPS	NuPAGE Tris-Acet.
 Myosin	250	210	188	191	210
 Phosphorylase	148	105	98	97	111
 BSA	98	78	62	64	71
 Glytamic Dehydrogenase	64	55	49	51	55
 Alcohol Dehydrogenase	50	45	38	39	41
 Carbonic Anhydrase	36	34	28	28	n/a
 Myoglobin Red	22	17	17	19	n/a
 Lysozym	16	16	14	14	n/a
 Aprotinin	6	7	6	n/a	n/a
 Insulin, B Chain	4	4	3	n/a	n/a

Seeblue[®] plus2 prestained Proteinstandard, 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen)