

**Entwicklung von *gfp*-basierten Monitoring Tools zur
Verfolgung von horizontalem Gentransfer und
Studien zum T4SLS des konjugativen Plasmids pIP501
aus *Enterococcus faecalis***

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Karsten Arends

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

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 20.12.2010

Berlin 2011
D 83

Während der Dissertation entstandene Publikationen

Veröffentlichungen

Fortina, M. G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P. L., **Arends, K.**, Schiwon, K., Abajy, M. Y., Grohmann, E. (2008) A survey on biotechnological potential and safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. italicus*. Int. J. Food. Microbiol. 123: 204 – 211.

Borgo, F., Ricci, G., **Arends, K.**, Schiwon, K., Grohmann, E., Fortina, M.G. (2009) Evaluation of plasmid content and tetracycline conjugative transfer in *Enterococcus italicus* strains of dairy origin. Curr. Microbiol. 56: 261 – 266.

Grohmann, E., **Arends, K.** Molecular detection of resistance and transfer genes in environmental samples. In Environmental Protection Strategies for Sustainable Development. Abdul Malik and Elisabeth Grohmann (eds.): Springer press, New York (akzeptiert).

Rangrez, A.Y., Pavkov, T., Charan, S., **Arends, K.**, Çelik, E.-K., Chandode, R., Shouche, Y., Keller, W., Grohmann, E. Functional and molecular characterization of *Aeromonas veronii* relaxase functional domain revealed non-specific nuclease activity (in Vorbereitung).

Arends, K., Schiwon, K., Grohmann, E. Design of fluorescent monitoring tools to visualize conjugative plasmid transfer in biofilms of Gram-positive bacteria (in Vorbereitung).

Schiwon, K., **Arends, K.**, Preschan, K., Hahn, S., Grohmann, E. Evaluation of antibiotic resistance, biofilm formation and conjugative transfer of *Staphylococcus* and *Enterococcus* isolates from ISS and Antarctic base Concordia (in Vorbereitung).

Celik, E.-K., Söllü, C., **Arends, K.**, Kopec, J., Schiwon, K., Keller, W., Koraimann, G., Grohmann, E. The pIP501 type IV secretion-like system encodes a specialized lytic transglycosylase: purification and functional characterization of the enzyme (in Vorbereitung).

Celik, E.-K., Abajy, M. Y., **Arends, K.**, Saleh, M., Salih, R., Keller, W., Grohmann, E. pIP501-encoded Orf10 is a VirD4-like type IV secretion system ATPase with ss DNA binding activity (in Vorbereitung).

Tagungsbeiträge

a. Vorträge

The type IV secretion like system (T4SLS) from the broad host range plasmid pIP501 encodes an active lytic transglycosylase. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Universität Jena, Deutschland, 19. – 22. März 2006.

A simplified type IV secretion like system from Gram positive bacteria: intracellular localization of transfer proteins using cell fractionation and immunogold transmission electron microscopy. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Universität Frankfurt, Deutschland, 9. – 11. März 2008.

b. Poster

Arends, K., Kopec, J., Keller, W., and Grohmann, E. The type IV secretion-like system from *Enterococcus faecalis* encodes a lytic transglycosylase involved in plasmid transfer. 2. Gemeinsamer Kongress der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Göttingen, Deutschland, 25. – 28. September 2005.

Arends, K., Söllü, C., Kopec, J., Schiwon, K., Keller, W. 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. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Universität Jena, Deutschland, 19. – 22. März 2006.

Arends, K., Söllü, C., Ertugrul, K.C., Kopec, J., Schiwon, K., Keller, W. 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. Plasmid Biology 2006, Fallen Leaf Lake, South Lake Tahoe, CA, USA, 23. – 27. September 2006.

Arends, K., Ott, S., Söllü, C., Celik, E.-K., Schiwon, K. and Grohmann, E. A specialized lytic transglycosylase (SLT) from Gram positive broad host range plasmid pIP501- enzymatic characterization and binding studies. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Universität Osnabrück, Deutschland, 1. – 4. April 2007.

Arends, K., Ott, S., Söllü, C., Celik, E.-K., Abajy, M. Y. and Grohmann, E. A specialized lytic transglycosylase (SLT) from Gram positive broad host range plasmid pIP501- enzymatic characterization and binding studies. 4th Conference on Functional Genomics of Gram-positive Microorganisms. Green Park Resort, Tirrenia, Pisa, Italien, 24. – 28. Juni 2007.

Arends, K., Hannssen, A.M., Abajy, M.Y., Celik, E.K., Schernke, S., Schiwon, K., Keller, W., Grohmann, E. A simplified type IV secretion-like system (T4SLS) from Gram-positive Bacteria: Intracellular localization of transfer proteins using cell fractionation. Plasmid Biology 2008, Gdansk, Polen, 30. August – 04. September 2008.

DANKSAGUNG

Dem Fachgebietsleiter der Umweltmikrobiologie an der Technischen Universität Berlin, Prof. Dr. Ulrich Szewzyk, sowie allen Mitarbeitern des Fachgebietes danke ich für ihre Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Elisabeth Grohmann für die Bereitstellung des Themas, für ihre exzellente Betreuung und ihr vorbildliches Engagement, für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und den vielen hilfreichen Anregungen und für die Möglichkeit, selbständig arbeiten und eigene Ideen umsetzen zu können.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Kolleginnen im Labor, Frau Dipl.-Ing. Christine Bohn und Frau Dipl.-Biochem. Katarzyna Schiwon, bedanken. Die fachlichen wie auch die nicht-fachlichen Gespräche, Aufmunterungen, wenn es mal wieder nicht funktioniert hat, und die Freude, wenn es funktioniert hat, bleiben unvergesslich. Ebenso danke ich den zahlreichen studentischen Mitarbeitern für ihre Hilfe.

Herrn Prof. Dr. Walter Keller vom Institut für Chemie / Strukturbiologie der Karl-Franzens Universität Graz, Österreich, danke ich herzlich für die Übernahme des Gutachters. Bei ihm und seinen Mitarbeitern, insbesondere Herrn Dr. Mouhammad Yaser Abajy, Herrn Dipl.-Biochem. Ertuğrul-Kaan Çelic und Herrn Dipl.-Ing. Nikolaus Gössweiner-Mohr, möchte ich mich für die Proteinaufreinigungen bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Johanna U. Ericson Sollid und den Mitarbeitern der medizinischen Mikrobiologie der Universität Tromsø, Norwegen, insbesondere bei Frau Dr. Anne-Merethe Hanssen und Randi Olsen, bedanke ich mich herzlich für ihre Hilfe und ihre Gastfreundschaft.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Herrn Dipl.-Biol. Till Andlauer aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Stephan Sigris an der FU Berlin für die STED-Aufnahmen.

Meiner Oma Hanne Arends und meiner Schwester und ihrer Familie danke ich von Herzen für ihre Unterstützung.

Ein besonders herzlicher Dank gilt Benjamin Jean-Paul Baillaud für sein Interesse an der Wissenschaft, für sein Verständnis und seinen Optimismus und dafür, da zu sein.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung während meines gesamten Studiums herzlich danken.

Für meine Oma
Hilke Meyer
**01.03.1918 †13.04.2010*

ZUSAMMENFASSUNG

Die Entstehung multi-resistenter Bakterien stellt eine immer größer werdende Gefahr für den Menschen dar. Hauptsächlich über bakterielle Konjugation findet ein horizontaler Austausch von Antibiotikaresistenz- und Virulenzgenen statt. Während aber der Mechanismus der Konjugation in Gram negativen Bakterien intensiv untersucht worden ist, sind Erkenntnisse zur Konjugation in Gram positiven Bakterien erst in den letzten Jahren entstanden. Als Modell für den konjugativen Transfer in G+ Bakterien diente in dieser Studie das konjugative, multi-resistente Plasmid pIP501 aus *Streptococcus agalactiae*, das einen ausgesprochen weiten Wirtsbereich hat.

Zur Detektion und Verfolgung von horizontalem Gentransfer wurden auf Basis der pIP501 *tra* Region GFP-markierte, mobilisierbare und konjugative Plasmide konstruiert. Hierfür wurden die *oriT*_{pIP501} Region und die *oriT*-spezifische Relaxase bzw. die gesamte *tra*_{pIP501} Region sowie ein optimiertes *gfp* Gen in die *shuttle* Vektoren pMSP3535 und pMSP3535VA unter Kontrolle des durch Nisin induzierbaren Promotors *nisA* kloniert. Für ein *proof of principle* wurde das mobilisierbare, GFP-markierte Plasmid pVA-GFP in bi- und triparentalen Kreuzungen mit pIP501 als konjugativem Plasmid von *Enterococcus faecalis* in verschiedene Bakterienstämme mobilisiert.

Für eine molekulare Analyse des Mobiloms G+ Bakterien wurden PCR Assays zum Nachweis von pSK41/pGO1- und pIP501-ähnlichen Transfergenen sowie verschiedener MOB_V, MOB_Q und MOB_P Relaxasen erstellt. In dem klinischen Isolat *E. faecalis* T9 wurden pSK41-ähnliche Transfergene nachgewiesen. Es konnte eine Retromobilisierung des Plasmids pVA-GFP von *E. faecalis* OG1X nach *E. faecalis* T9 und eine Mobilisierung des Plasmids pVA-GFP von *E. faecalis* T9 nach *Bacillus subtilis* gezeigt werden.

Im zweiten Teil der Dissertation konnten 9 der 15 pIP501 Tra Proteine über Zellfraktionierungen von *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) *in vivo* lokalisiert werden. Bis auf Orf14, das zytoplasmatisch vorlag, lokalisierten alle weiteren untersuchten Tra Proteine in der Zellhülle von *E. faecalis*. Für Orf8 und Orf11 konnte eine Lokalisierung *in vivo* über STED Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgen. Orf8 bildete Foci in der Zellhülle von *E. faecalis*, während Orf11 zufällig verteilt in der gesamten Zellhülle vorlag. Die DNA-Bindung der Tra Proteine Orf8, Orf10, Orf11 und Orf14 wurde mit Gelshiftexperimenten untersucht. Orf10 zeigte spezifische Bindung an einzelsträngige DNA, während Orf14 bevorzugt mit doppelsträngige DNA interagiert. Bindungen von Orf11 an doppel- und einzelsträngige DNA konnten nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die VirB1-ähnliche lytische Transglykosylase Orf7 essentiell für den konjugativen Transfer von pIP501 ist. Mit den erhaltenen Daten wurde das T4SLS Arbeitsmodell für pIP501 modifiziert.

ABSTRACT

The emergence of multiple antibiotic-resistant bacteria is an increasing threat for the human health. The dissemination of antibiotic resistance and virulence genes mainly occurs horizontally by bacterial conjugation. But whereas the conjugation mechanisms have been studied intensively for Gram negative species, the knowledge of horizontal gene transfer through conjugation is still limited for Gram positive bacteria. In this study the conjugative broad host-range plasmid pIP501 originally isolated from *Streptococcus agalactiae* was used as a model for conjugative plasmid transfer in Gram positive bacteria.

Based on the pIP501 *tra* region GFP-tagged mobilizable and conjugative plasmids were constructed using *E. coli* shuttle vectors. The gene for the green fluorescent protein (GFP) and the pIP501 *oriT* region as well as the *oriT* specific relaxase gene *orfI* and the whole *tra* region, respectively, were cloned into the *E. coli* shuttle vectors pMSP3535 and pMSP3535VA under control of a Nisin inducible *nisA* promoter. For a proof of principle bi- and triparental matings were performed from *Enterococcus faecalis* to different species (*Enterococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*) as recipient using the mobilizable plasmid pVA-GFP and the conjugative plasmid pIP501.

PCR based assays were established for the molecular detection of pSK41/pGO1- and pIP501-like transfer genes and MOB_V, MOB_Q and MOB_P relaxase genes in Gram positive bacteria. Mobilome analysis revealed the presence of pSK41/pGO1-like genes (*nes*, *traE/G/K*) in the clinical strain *E. faecalis* T9. The strain was used to retromobilize the plasmid pVA-GFP from *E. faecalis* OG1X to *E. faecalis* T9. Subsequently the obtained transconjugant *E. faecalis* T9 (pVA-GFP) was used to mobilize the plasmid pVA-GFP to *Bacillus subtilis*.

In the second part of this thesis 9 of 15 pIP501 Tra proteins were localized *in vivo* by fractionation of *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) cell compartments. Except for Orf14, which was exclusively found in the cytoplasm of *E. faecalis* JH2-2, the Tra proteins localized in the cell envelope of *E. faecalis*. The spatial distribution of the Tra proteins Orf8 and Orf11 was analysed by STED immuno-fluorescence microscopy. Orf8 formed punctate foci whereas Orf11 was distributed uniformly in the cell envelope of *E. faecalis*. Gel-shift experiments revealed DNA binding for the Tra proteins Orf10, Orf11 and Orf14, but no protein-DNA interaction was observed for Orf8. Orf10 bound preferably to single-stranded DNA, Orf14 showed a strong binding to double-stranded DNA and Orf11 bound to double- and single-stranded DNA without any preferences. The VirB1-like Orf7 was demonstrated to be essential for the pIP501 conjugative transfer. The obtained data was used to modify the pIP501 T4SLS working model.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Antibiotikaresistenzen in pathogenen Bakterien.....	1
1.2 Horizontaler Gentransfer (HGT).....	2
1.3 Aufbau der Zellhülle in G- und G+ Bakterien.....	4
1.4 Konjugation bei G- Bakterien.....	6
1.5 Typ IV Sekretionssysteme (T4SS).....	8
1.6 Konjugation bei G+ Bakterien.....	11
1.7 pIP501 als Modellplasmid für Konjugation in G+ Bakterien.....	12
1.8 Gene in Bewegung - das Mobilom.....	14
1.9 Klassifizierung des Mobiloms basierend auf Transfergenen.....	16
1.10 Induzierbare Genexpression in G+ Bakterien mit dem <i>nisA</i> Promotor.....	17
1.11 Zielsetzung.....	19
2. MATERIAL.....	20
2.1 Chemikalien, <i>Kits</i> und Hilfsmittel.....	20
2.2 Geräte.....	22
2.3 Enzyme, Antikörper und Standards.....	23
2.4 Mikroorganismen.....	24
2.5 Plasmide.....	25
2.6 Nährmedien.....	26
2.7 Synthetische Oligonukleotide.....	27
2.8 PCR-Programme.....	31
2.9 Puffer und Lösungen.....	32
2.9.1 Allgemeine Lösungen.....	32
2.9.2 Puffer und Lösungen für Proteinanalysen.....	33
2.9.3 Puffer und Lösungen für den Western Blot.....	33
2.9.4 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenzmikroskopie.....	34
2.9.5 Puffer und Lösungen für Fraktionierungen.....	34
3. METHODEN.....	35
3.1 Mikrobiologische Methoden.....	35
3.1.1 Anzucht von Mikroorganismen.....	35
3.1.2 Kultivierung für die Stammsammlung.....	35
3.1.3 Herstellen kompetenter Zellen und Transformation kompetenter Zellen.....	35
3.1.4 Konjugation / Kreuzung auf halbfesten Oberflächen.....	37
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	37
3.2.1 Plasmidisolierungen aus <i>E. coli</i>	37
3.2.2 Agarosegelelektrophorese.....	38
3.2.3 Elution von DNA aus <i>low-melting</i> (LM)-Agarosegelen.....	38
3.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	39
3.2.5 Restriktion.....	39
3.2.6 Dephosphorylierung.....	39
3.2.7 Ligation.....	39
3.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	40
3.2.9 Herstellung von Zelllysaten als Matrize für die PCR.....	41
3.2.10 Identifizierung von Transformanten.....	41
3.2.11 Klonierung der <i>his7</i> -tag Expressionsvektoren für <i>E. faecalis</i>	42
3.2.12 Klonierung der up- und downstream Regionen von <i>orf7</i> , <i>orf10</i> und <i>orf15</i> sowie des <i>aacA-aphD</i> Gens in den Vektor pCJK47.....	43

3.2.13 Herstellen von <i>cross over</i> Mutanten über homologe Rekombination...	44
3.2.14 Oligonukleotid-Markierung mit γ - ³² P-ATP.....	45
3.2.15 Induktion des <i>nisA</i> Promotors.....	45
3.3 Biochemische Methoden.....	46
3.3.1 Denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
3.3.2 Fraktionierung von <i>Enterococcus</i> Zellkompartimenten mittels sequentieller Zentrifugation.....	46
3.3.3 Modifizierte Fraktionierung von <i>Enterococcus</i> Zellkompartimenten mittels sequentieller Zentrifugation.....	47
3.3.4 Proteinfällung.....	48
3.3.5 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	48
3.4 Immunologische Methoden.....	49
3.4.1 Western Blot.....	49
3.4.2 Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM).....	50
4. ERGEBNISSE.....	51
4.1 Entwicklung von monitoring tools zur Verfolgung horizontaler Gentransferereignisse.....	51
4.1.1 Konstruktion von mobilisierbaren, konjugativen und nicht-transferierbaren Plasmiden.....	51
4.1.2 Untersuchungen zu den fluoreszierenden Eigenschaften der konstruierten Plasmide in <i>Enterococcus faecalis</i>	54
4.1.3 Untersuchungen zu den mobilisierbaren und konjugativen Eigenschaften der konstruierten <i>monitoring tools</i>	57
4.2 Entwicklung von PCR-basierten Assays zur Detektion mobiler genetischer Elemente G+ Bakterien.....	61
4.2.1 PCR basierte Assays zur Detektion von T4SS Schlüsselgenen der bakteriellen Konjugation.....	61
4.2.2 Nachweis von Transfergenen und horizontalem Gentransfer in dem klinischen Isolat <i>E. faecalis</i> T9 und Isolaten der ISS.....	64
4.3 Untersuchungen zum Typ IV Sekretionssystem des broad host range Plasmids pIP501 aus <i>S. agalactiae</i>.....	66
4.3.1 Die pIP501 kodierten Tra-Proteine lokalisieren hauptsächlich in der Zellhülle.....	68
4.3.2 Das Transferprotein Orf8 lokalisiert in Foci in der Zellhülle von <i>E. faecalis</i>	70
4.3.3 Das Transferprotein Orf11 lokalisiert in der Zellhülle von <i>E. faecalis</i>	71
4.3.4 Das putative <i>coupling</i> Protein Orf10 bindet einzelsträngige, nicht aber doppelsträngige DNA.....	72
4.3.5 Das zytoplasmatische Tra Protein Orf14 bindet doppelsträngige DNA mit höherer Affinität als einzelsträngige DNA.....	74
4.3.6 Das Tra Protein Orf11 bindet einzel- und doppelsträngige DNA, während das Tra-Protein Orf8 keine DNA-Bindung zeigt.....	76
4.3.7 Das VirB1 homologe Orf7 ist essentiell für den konjugativen Transfer von pIP501.....	78
5. DISKUSSION.....	83
5.1 Studien zum horizontalen intra- und interspezies Gentransfer mittels fluoreszierender Proteine.....	84
5.1.1 Entwicklung <i>gfp</i> -markierter mobilisierbarer Plasmide zum Nachweis von horizontalem Gentransfer.....	85

5.1.2 Funktionelle Untersuchungen zur Fluoreszenz in verschiedenen Bakterienarten.....	87
5.1.3 Detektion fluoreszierender <i>E. faecalis</i> über <i>fluorescence activated cell sorting</i> (FACS).....	90
5.1.4 Anwendung der mobilisierbaren <i>monitoring tools</i>	93
5.1.5 Entwicklung konjugativer, GFP-markierter <i>shuttle</i> Plasmide.....	95
5.1.6 Molekulare Detektion von Transferschlüsselgenen.....	97
5.2 Studien zum T4SLS des broad host range Plasmids pIP501.....	103
5.2.1 Die pIP501 Tra Proteine lokalisieren überwiegend in der Zellhülle von <i>E. faecalis</i>	103
5.2.2 Die Tra Proteine Orf10, Orf11 und Orf14 zeigen DNA-Bindung <i>in vitro</i>	111
5.2.3 Die lytische Transglykosylase Orf7 ist essentiell für den konjugativen Transfer von pIP501.....	115
5.2.4 Modifiziertes T4SLS Modell des konjugativen Transfers von pIP501 in G+ Bakterien.....	118
6. AUSBLICK.....	123
7. LITERATUR.....	129
ANHANG.....	146

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Schematischer Aufbau der Zellhülle von G- und G+ Bakterien
Abb. 1.2	Quervernetzung des Peptidoglykans in <i>E. faecalis</i>
Abb. 1.3	Schematisches Modell zur Konjugation in G- Bakterien am Beispiel des Plasmids RP4
Abb. 1.4	Genetische Organisation verschiedener T4SS aus G- und G+ Bakterien
Abb. 1.5	Transferroute der T-DNA durch das T4SS in <i>A. tumefaciens</i> und kryo-EM Struktur des T4SS Kernkomplexes vom konjugativen Plasmid pKM101
Abb. 1.6	Vergleich der <i>tra</i> Regionen der Plasmide pIP501, pRE25, pSK41, pGO1 und pMRC01 aus G+ Bakterien
Abb. 1.7	Schematische Darstellung von pIP501
Abb. 1.8	Arbeitsmodell des konjugativen Plasmids pIP501 aus <i>S. agalactiae</i>
Abb. 1.9	Schematische Darstellung von bi- und triparentalen Kreuzungen
Abb. 1.10	Sequenzalignment von Relaxasen der MOB _Q Familie
Abb. 1.11	Schematische Darstellung der <i>nisA</i> Regulation
Abb. 3.1	Fließschema zur Fraktionierung von <i>E. faecalis</i>
Abb. 4.1	Teilausschnitt des Plasmids pJP _{rel} GFP und Vektorkarten der mobilisierbaren Plasmide pVA-GFP und pMSP-GFP
Abb. 4.2	Vektorkarte des mobilisierbaren Plasmids pMSP- <i>orf1</i> -P _{<i>nisA</i>} -GFP
Abb. 4.3	Vektorkarte des konjugativen Plasmids pMSP178-P _{<i>nisA</i>} -GFP
Abb. 4.4	Vektorkarte des nicht-mobilisierbaren und nicht-konjugativen Plasmids pVA-RFP
Abb. 4.5	Qualitativer Nachweis der grünen bzw. roten Fluoreszenz, exemplarisch gezeigt für pVA-GFP in <i>E. faecalis</i> OG1X und pVA-RFP in <i>E. faecalis</i> OG1X
Abb. 4.6	Qualitativer Nachweis der grünen und roten Fluoreszenz innerhalb einer <i>E. faecalis</i> -Zelle
Abb. 4.7	Quantitativer Fluoreszenznachweis der konstruierten GFP und RFP Plasmide mittels FACS
Abb. 4.8	Nachweis der Mobilisierung des Plasmids pVA-GFP von <i>E. faecalis</i> T9 (pVA-GFP) nach <i>B. subtilis</i> DSM 4451
Abb. 4.9	Vektorkarte des His ₇ -Expressionsvektors für <i>E. faecalis</i>
Abb. 4.10	Lokalisierung von pIP501 Transferproteinen mittels Western Blot in Zellfraktionen von <i>E. faecalis</i>
Abb. 4.11	Analyse des Orf11-Leserahmens auf weitere putative Startcodons und ribosomale Bindestellen
Abb. 4.12	Lokalisierung des Transferproteins Orf8 <i>in vivo</i> mittels STED-Mikroskopie (STED - stimulated emission depletion)
Abb. 4.13	Lokalisierung des Transferproteins Orf11 <i>in vivo</i> mittels STED-Mikroskopie (STED - stimulated emission depletion)
Abb. 4.14	Untersuchungen zu den DNA-Bindeeigenschaften des putativen coupling Proteins His ₇ -Orf10 mittels EMSA
Abb. 4.15	Untersuchungen zu den DNA-Bindeeigenschaften des pIP501 Tra-Proteins His ₇ -Orf14 mittels EMSA

Abb. 4.16	Untersuchungen zu den DNA-Bindeeigenschaften des pIP501 Tra-Proteins His ₇ -Orf11del mittels EMSA
Abb. 4.17	Konstruktion von Suicide-Vektoren zur Deletion verschiedener <i>tra</i> Gene von pIP501
Abb. 4. 18	Integration des Suicide-Vektors pKAAΔ7 up- oder downstream von <i>orf7</i> und Identifizierung homologer Rekombinanten mittels PCR
Abb. 4. 19	Downstream Integration des Suicide-Vektors und Deletion des <i>orf7</i> -Gens
Abb. 4.20	Merodiploider Zustand durch Intergration des Suicide-Vektors in pIP501 und Segregation des Suicide-Vektors über homologe Rekombination
Abb. 5.1	Sekundärstruktur der mRNA im Bereich der <i>Xma</i> I Schnittstelle des Plasmids pMSP- <i>orf1</i> -GFP
Abb. 5.2	Expression der pIP501 Tra Proteine durch konjugative <i>monitoring tools</i> und Sequenzvergleich des Übergangs von <i>orf6</i> nach <i>orf7</i>
Abb. 5.3	DNA Sequenzalignment von Relaxasegenen der MOB _V und MOB _Q Relaxasefamilie
Abb. 5.4	DNA-Sequenz von pIP501, Acc. Nr. AJ505823, im Bereich zwischen <i>orf9</i> und <i>orf10</i>
Abb. 5.5	Konfokale immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Orf11 in <i>E. faecalis</i> JH2-2 (pIP501) mit polyklonalen Anti-Orf11 Antikörpern
Abb. 5.6	Lokalisierung von PcfC und PrgB in <i>E. faecalis</i> mit Immunfluoreszenz-mikroskopie
Abb. 5.7	Über das Program mfold berechnete Sekundärstruktur des 42-mer Oligonukleotids
Abb. 5.8	Modularer Aufbau von Orf7 (Acc. Nr. CAD44387) aus pIP501
Abb. 5.9	Modifiziertes Arbeitsmodell des T4SLS von pIP501 aus <i>E. faecalis</i>
Abb. 5.10	Interaktionen der pIP501 Tra Proteine
Abb. 5.11	Draufsicht auf eine schematisch dargestellte PPII Helix
Abb. 6.1	Mikrograph der immunologischen Lokalisierung von Orf13 und Orf10 mittels immun-TEM.

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1	Verwendete Bakterienstämme
Tab. 2.2	Verwendete Plasmide
Tab. 2.3	Für Klonierungen verwendete Oligonukleotide
Tab. 2.4	Für Screenings und EMSAs verwendete Oligonukleotide
Tab. 2.5	Für Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide
Tab. 3.1	PCR-Bedingungen der für die Klonierungen verwendeten PCR-Produkte
Tab. 3.2	PCR-Produktgrößen bei Integration des Suicidevektors up- oder downstream des betreffenden Gens
Tab. 3.3	PCR-Bedingungen für die Screenings nach cross over Mutanten
Tab. 3.4	Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele für SDS-PAGE-Analysen
Tab. 3.5	Für DNA / Protein Bindungsstudien verwendete Puffer und Inkubationstemperaturen
Tab. 4.1	Mobilisierungsraten der entwickelten mobilisierbaren, <i>gfp</i> -markierten Plasmide
Tab. 4.2	Übersicht der Primer und der von ihnen erfassten Relaxasegene verschiedener Plasmide
Tab. 4.3	Übersicht der Transferprimer und der von ihnen erfassten <i>virB1</i> , <i>virB4</i> und <i>virD4</i> homologen Gene verschiedener Plasmide
Tab. 4.4	Vergleich der Transferraten von dem <i>orf7</i> deletierten pIP501 Δ 7 in <i>E. faecalis</i> OG1RF mit einem isogenen <i>E. faecalis</i> OG1RF (pIP501), Transfer in den Rezipienten <i>E. faecalis</i> OG1X
Tab. 5.1	Vergleich verschiedener rot fluoreszierender Proteine
Tab. 5.2	<i>In silico</i> Vorhersagen von Signalpeptiden, Transmembranhelices sowie Lokalisierung der pIP501 Tra Proteine in G ⁺ Bakterien und Vergleich mit experimentellen Ergebnissen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Acc. Nr.	Accession Nummer
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bp(s)	Basenpaar(e)
Cm	Chloramphenicol
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
dsDNA	doppelsträngige DNA
dtr	<i>DNA transfer and replication</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Erythromycin
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fus	Fusidinsäure
fw	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung
G+	Gram-positiv
G-	Gram-negativ
Gent	Gentamicin
GFP / <i>gfp</i>	grün fluoreszierendes Protein
HGT	Horizontaler Gentransfer
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradisch peroxidase</i>)
Inc	Inkompatibilitätsgruppe
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilo Dalton
LB	<i>Luria Bertani broth</i>

M	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MGE	mobile genetische Elemente
MLS	Makrolid-Linkosamid-Streptogramin B-Gruppe
mob	mobilisierbar
mpf	Kreuzungskanal (<i>mating pair formation</i>)
MRSA	<u>M</u> ethicillin resistente <i>S</i> taphylococcus <u>a</u> ureus
<i>nick</i>	Schnittstelle innerhalb des <i>oriT</i>
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
NZY	<i>NZ-amine (caseinhydrolysate)-Yeast extract</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
<i>orf</i>	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>re</i>	<i>revers</i>
RFP / <i>rfp</i>	rot fluoreszierendes Protein
Rif	Rifampicin
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLT	spezialisierte lytische Transglykosylase
Sm	Streptomycin
Spec	Spectinomycin
ssDNA	einzelsträngige DNA
STED	<i>Stimulated Emission Depletion</i>
T4SLS	Typ IV Sekretions- ähnliches System
T4SS	Typ IV Sekretionssystem
TAE	TRIS / Acetat / EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	TRIS <i>Buffered Saline</i>
TCM	TRIS / Calciumchlorid / Magnesiumchlorid
T-DNA	Transfer-DNA
TE	TRIS / EDTA

TELT	TRIS / EDTA / LiCl / Triton X-100
Tet	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tra / <i>tra</i>	Transfer
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
VRE	Vancomycin resistente Enterokokken
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid

1. EINLEITUNG

1.1 Antibiotikaresistenzen in pathogenen Bakterien

Infektionskrankheiten mit Antibiotika-resistenten Bakterien stellen ein immer stärker zunehmendes Gefahrenpotential für den Menschen dar. Waren bis vor wenigen Jahren multi-resistente Erreger hauptsächlich an nosokomialen Infektionen beteiligt, so wurde spätestens mit der Entdeckung des *community-acquired* Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) deutlich, dass multi-resistente Bakterien nicht mehr nur ein Problem der Krankenhäuser sind. Im Gegensatz aber zu nosokomialen MRSA (HA-MRSA, *hospital acquired*), die eine ausgeprägte Antibiotika-Multiresistenz mit geringer Virulenz aufweisen, zeigen die bisher identifizierten CA-MRSA nur selten Resistenzen gegen mehr als zwei unterschiedliche Antibiotikaklassen. Dagegen ist ihre Virulenz weit ausgeprägter als bei HA-MRSA. So sind in den USA bereits epidemische Infektionen mit dem CA-MRSA USA300 zu verzeichnen. Es ist vermutlich nur eine Frage der Zeit, bis Infektionen mit hochvirulenten CA-MRSA kaum noch mit Antibiotika therapierbar sein werden. Erste multi-resistente CA-MRSA USA300 konnten bereits nachgewiesen werden, die sich auch mit Mupirocin, einem bei MRSA-Infektionen üblicherweise wirksamen Antibiotikum, nicht behandeln ließen (Kobayashi und DeLeo, 2009; Li *et al.*, 2009; Diep *et al.*, 2008).

Neben multi-resistenten *S. aureus* zählen das G- Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* und die G+ Bakterien *Streptococcus pneumoniae* und *Enterococcus faecium* zu den am häufigsten auftretenden, multi-resistenten Krankheitserregern. Hier spielen vor allem Vancomycin-resistente Enterokokken-Stämme (VRE) eine besondere Rolle, weil sie mit keinem kommerziell erhältlichen Antibiotikum mehr therapierbar sind (Witte *et al.*, 2008). Kürzlich für Aufsehen gesorgt hat die Entdeckung eines neuen Metallo- β -Lactam-Resistenzgens *bla*_{NDM-1} (New Delhi metallo- β -lactamase) in multi-resistenten *Klebsiella pneumoniae*, die gegen sämtliche Antibiotika, auch gegen sonst wirksame Reserveantibiotika wie Carbapeneme, resistent waren (Yong *et al.*, 2009). *K. pneumoniae* selber ist kein pathogenes Bakterium, spielt aber in nosokomialen Infektionen vor allem bei immunsupprimierten Patienten eine Rolle. Es kann zur Ausbildung von Pneumonien führen, die dann auf Grund der multiplen Antibiotikaresistenzen letal sein können.

Antibiotika üben auf das Wachstum von Bakterien eine hemmende oder abtötende Wirkung aus. Für einen Einsatz zu therapeutischen Zwecken müssen Antibiotika spezifisch auf Strukturen prokaryontischer Organismen wirken. Hier sind drei mögliche Angriffspunkte von Antibiotika auf Bakterien bekannt (Hof *et al.*, 2002):

1. Blockierung der Zellwandsynthese und Destabilisierung der Zelle, z.B. Glykopeptide (Vancomycin) und β -Lactam Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme).
2. Hemmung der Proteinbiosynthese, z.B. Polyketide (Tetrazykline, Makrolide, Linkosamide), Mupirocin, Aminoglykoside.
3. Hemmung von DNA-Synthese und –replikation, z.B. Sulfonamide und Fluorochinolone.

Die Faktoren zur Entstehung und Verbreitung multi-resistenter Bakterien sind vielfältig. Der übermäßige Einsatz von Antibiotika in der Medizin, übermäßiger Gebrauch von Antibiotika in der Massentierhaltung, unvollständiger Abbau der Antibiotika *in vivo* und Einschleppung in Kläranlagen und Grundwasser sind nur einige Beispiele, die die Entstehung Antibiotika-resistenter Bakterien gefördert haben. Es gibt hierbei verschiedene Mechanismen, die eine Resistenz gegen Antibiotika bewirken:

1. Modifikation an der Zielbindestelle des Antibiotikums, z.B. Änderungen am Penicillin-bindenden Protein in MRSA (Utsui und Yokota, 1985).
2. Aktiver Transport des Antibiotikums aus dem Zellinneren heraus mit Verringerung der Antibiotikakonzentration im Zellinneren oder Veränderung der Membran-permeabilität (Poole, 2007).
3. Inaktivierung des Antibiotikums über Modifikationen an der Struktur oder Abbau *in vivo*, z.B. Hydrolyse des β -Lactamrings durch β -Lactamasen (Poole, 2004).
4. Änderung des Metabolismus, z.B. Ausbildung einer dickeren Zellwand bei Vancomycin-resistenten MRSA (Cui *et al.*, 2003).

Die Verteilung der Antibiotikaresistenzgene erfolgt überwiegend durch horizontalen Gentransfer. Für viele Resistenzmechanismen, bei denen verschiedene Proteine beteiligt sind, ist eine *de novo* Synthese über Mutation und Selektion unwahrscheinlich. Vielmehr sind die Resistenzmechanismen in den Produzenten der Antibiotika (überwiegend Actinomyceten) und Bodenbakterien bereits vorhanden und können über horizontalen Gentransfer in verschiedene Bakterien übertragen werden. Die in pathogenen Bakterien nachgewiesenen Resistenzgene sind ortholog mit den in Bodenbakterien entdeckten Resistenzgenen (D'Costa *et al.*, 2006; Grohmann *et al.*, 2003).

1.2 Horizontaler Gentransfer (HGT)

Der horizontale oder auch laterale Gentransfer bezeichnet den Transfer von DNA zwischen einem Donor und einem Rezipienten innerhalb einer Art oder auch über Artgrenzen hinweg,

unabhängig von einer sexuellen oder vegetativen Fortpflanzung. Der HGT kann hierbei über Transformation, Transduktion oder Konjugation erfolgen.

- a. Die Transformation bezeichnet eine Aufnahme freier DNA durch eine Bakterienzelle. Sie wurde erstmals von Griffith (1928) nachgewiesen. Er konnte zeigen, dass die Virulenz von S-Stamm-Pneumokokken (*smooth*, kapselbildend) auf avirulente R-Stamm-Pneumokokken (*rough*, nicht-kapselbildend) übertragen werden kann, wenn letztere in Gegenwart von zellfreiem DNA-Extrakt der S-Stamm-Bakterien wachsen.
- b. Bei der Transduktion können chromosomale DNA-Fragmente zwischen zwei Bakterienzellen über Bakteriophagen ausgetauscht werden. Das Prinzip wurde 1952 von Zinder und Lederberg beim Phagen P22 aus *Salmonella typhimurium* entdeckt.
- c. Die Konjugation bezeichnet die Übertragung von DNA während eines direkten Zellkontaktes zwischen einem Donor und einem Rezipienten. Konjugation konnte erstmals von Tatum und Lederberg (1946) in *E. coli* K12 nachgewiesen werden. Sie mischten zwei verschieden auxotrophe Mutanten von *E. coli* K12 auf Minimalmedium und erhielten mit einer Häufigkeit von $10^{-7} - 10^{-6}$ prototrophe Transkonjuganten. Der als F (*fertility*) bezeichnete DNA-Faktor wurde später als Satelliten-DNA charakterisiert (Marmur *et al.*, 1963) und wird heute als Plasmid bezeichnet. Demnach sind Plasmide extrachromosomale, meist ringförmige dsDNA-Elemente, die unabhängig vom Bakterienchromosom repliziert werden. Eine Sonderform konjugativer Plasmide stellen konjugative Transposons dar, die integriert im Bakterienchromosom vorliegen, aber intermediär ebenfalls als autonom replizierende Plasmide in der Bakterienzelle auftreten können (Lee *et al.*, 2010).

Die Entstehung multi-resistenter Bakterien ist hauptsächlich auf Konjugation zurückzuführen. Während die Transduktion nur einen engen Wirtsbereich hat und die Transformation auf wenige Bakteriengattungen beschränkt ist, die eine natürliche Kompetenz aufweisen wie z.B. Pneumokokken, zeigen viele Plasmide einen breiten Wirtsbereich (*broad host range*). So kann z.B. das konjugative Plasmid RK2 in verschiedene G- Bakterien wie *E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens* und *Pseudomonas aeruginosa* übertragen werden.

Seit der Entdeckung des F-Plasmids sind eine Vielzahl weiterer konjugativer Plasmide detektiert worden, für die ein eigenes Klassifizierungssystem basierend auf Inkompatibilitäten eingeführt wurde. Plasmide derselben Inkompatibilitätsgruppe (Inc) können nicht innerhalb einer Bakterienzelle koexistieren. Die Inkompatibilität zweier Plasmide beruht auf einem gleichen oder nahe verwandten Replikon. Die Replikation von Plasmiden ist ein negativ regulierter Prozess, durch den die Kopienzahl des Plasmids in der Zelle gesteuert wird. Die

Regulation kann entweder über einen für das Replikationssystem spezifischen Inhibitor (Antisense RNA) erfolgen, über den ab bestimmten Konzentrationen der Antisense RNA die Replikation runterreguliert wird, oder über spezifische, repetitive Sequenzen (Iterons) auf dem Plasmid, an die das Replikationsprotein binden kann. Liegt das Plasmid in geringer Kopienzahl vor, wirkt die Bindung des Replikationsproteins an das Iteron aktivierend auf die Replikation, steigt die Kopienzahl, können über Protein-Protein-Interaktionen und DNA-Bindungen mehrere Iterons pro Replikationsprotein gebunden werden, so dass eine Replikation sterisch gehindert ist (*handcuffing* Mechanismus) (Park *et al.*, 2001; Chattoraj, 2000; del Solar *et al.*, 1998). Wird nun ein Plasmid in eine Bakterienzelle mit einem Plasmid derselben Inc-Gruppe transferiert, ist die Replikation des transferierten Plasmids von Anfang an inhibiert und das Plasmid wird segregiert.

Die wichtigsten und bisher am besten untersuchten Plasmide für G- Bakterien gehören zu den Inkompatibilitätsgruppen IncP (RP4, R751, RK2), IncW (R388), IncN (pKM101), IncRh-1 (Ti Plasmid) und IncF (F, R1). Die aus G+ Bakterien isolierten konjugativen Plasmide pIP501, pRE25 und pAM β 1 bilden zusammen die Inkompatibilitätsgruppe Inc18 (Zechner *et al.*, 2000; Grohmann *et al.*, 2003).

1.3 Aufbau der Zellhülle in G- und G+ Bakterien

Die von dem dänischen Mediziner Hans Christian Gram 1884 entwickelte Gram-Färbemethode ermöglicht eine Unterscheidung von Prokaryonten, die sich im Aufbau der Zellhülle unterscheiden (Abb. 1.1).

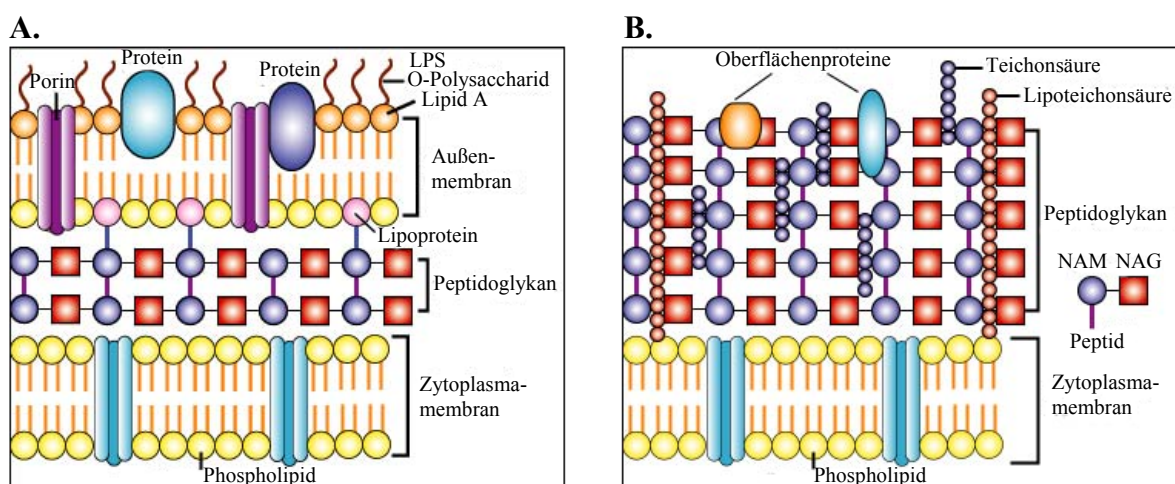


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau der Zellhülle von G- (A) und G+ (B) Bakterien (modifiziert nach <http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/u1fig9b.html>).

NAM – N-Acetylmuraminsäure; NAG – N-Acetylglucosamin

Bei G- Bakterien ist die Zellhülle aus einer zytoplasmatischen Membran, die aus einer Phospholipiddoppelschicht besteht, einem periplasmatischen Raum mit einer überwiegend

einschichtigen Peptidoglykankette und einer Außenmembran aufgebaut, die aus Lipopolysacchariden (LPS) besteht.

Der Aufbau der zytoplasmatischen Membran bei G⁺ Bakterien entspricht dem Aufbau bei G⁻ Bakterien. An die Zytoplasmamembran schließt sich eine dicke, vielschichtige Peptidoglykankette an. Das Peptidoglykan wird aus N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin aufgebaut, die alternierend über β -1,4-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind, vergleichbar dem Aufbau des Peptidoglykans in G⁻ Bakterien. Darüber hinaus sind Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren am Aufbau der Peptidoglykanschicht in G⁺ Bakterien beteiligt.

An die Pyruvatgruppe der N-Acetylmuraminsäure im Peptidoglykan sind kurze Polypeptidketten gebunden, über die eine Quervernetzung stattfindet. Bei G⁻ Bakterien besteht die Polypeptidkette meist aus L-Ala-D-Glu-meso-Diaminopimelinsäure-D-Ala, wobei die Quervernetzung direkt durch eine Peptidbindung zwischen meso-Diaminopimelinsäure und D-Ala einer benachbarten Peptidkette gebildet wird. Bei G⁺ Bakterien besteht die an die Pyruvatgruppe gebundene Peptidkette aus L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala. Die Quervernetzung einzelner Peptidoglykanstränge erfolgt bei G⁺ Bakterien nicht direkt zwischen den Polypeptidketten, sondern wird durch ein verbrückendes Polypeptid bewirkt, dessen Zusammensetzung abhängig von der Bakteriengattung ist. Bei *E. faecalis* erfolgt die Vernetzung über eine L-Ala-L-Ala-Brücke (Abb. 1.2) (Arbeloa *et al.*, 2004; Schleifer und Kandler, 1972).

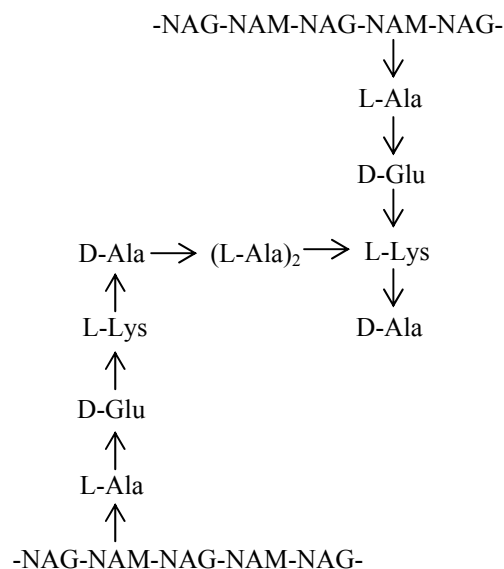


Abb. 1.2: Quervernetzung des Peptidoglykans in *E. faecalis* (nach Coyette und Hancock, 2002).

Die einzelnen Glykanstränge werden durch Peptidbindungen zwischen (L-Ala)₂ mit D-Ala und L-Lys verbunden. NAM – N-Acetylmuraminsäure; NAG – N-Acetylglucosamin

1.4 Konjugation bei G- Bakterien

Die ersten Untersuchungen zum konjugativen DNA-Transfer in G- Bakterien wurden am F- Plasmid durchgeführt. Die Organisation der Transferregionen verschiedener konjugativer Plasmide unterschiedlicher Inkompatibilitätsgruppen weist untereinander eine hohe funktionelle Konservierung auf, so dass Erkenntnisse zur Konjugation in G- Bakterien durch Studien mit anderen konjugativen Plasmiden, wie RP4, RK2, pKM101 und R388 aus *E. coli*, erweitert wurden (zusammengefasst in Alvarez-Martinez und Christie, 2009).

Alle Faktoren, die für die bakterielle Konjugation benötigt werden, sind auf der DNA konjugativer Plasmide, wie dem F-Plasmid, kodiert. Darüber hinaus können Resistenzgene gegen Antibiotika enthalten sein, die über die Konjugation übertragen werden.

An dem Transferprozess sind zwei Proteinkomplexe beteiligt, die den Transfer von DNA vermitteln: das Relaxosom, auch als *dtr*-System (*DNA transfer and replication*) bezeichnet, und der *mpf*-Komplex (*mating-pair formation*), ein Typ IV Sekretionssystem. Beide Komplexe sind über ein sogenanntes *coupling* Protein verbunden. Der Kontakt zu Rezipienten kann in G- Bakterien über filamentöse Pili erfolgen, während in G⁺ Bakterien der Kontakt zum Rezipienten vermutlich über Oberflächenproteine vermittelt wird. Eine Beteiligung Pilus-ähnlicher Strukturen an der Adhäsion und Biofilmbildung wird für G⁺ Bakterien diskutiert (Mandlik *et al.*, 2008).

Der Transferprozess bei G- Bakterien wird vermutlich durch Bindung des Pilus an einen Rezipienten initiiert (Abb. 1.3). Es findet eine Pilusrückbildung statt, durch die die Donor- und Rezipientenzelle in räumliche Nähe zueinander geführt werden.

Der *dtr*-Komplex wird durch Bindung der Relaxase an eine streng konservierte Region innerhalb der Plasmid-DNA, den Startpunkt des Transfers *oriT*, gebildet. Hierbei spaltet die Relaxase, bei einigen konjugativen Systemen durch 1 – 2 Proteine unterstützt, eine Phosphodiesterbindung in der *nick*-Stelle innerhalb des *oriTs*, so dass ein Einzelstrangbruch der dsDNA entsteht. Anschließend wird die Relaxase über einen Tyrosinrest an das 5'-Ende der genickten ssDNA gebunden (Llosa und de la Cruz, 2005).

Der *mpf*-Komplex in der Zellhülle wird aus 10 bis maximal 15 unterschiedlichen Proteinen aufgebaut und überbrückt sowohl die zytoplasmatische Membran, das Periplasma als auch die Außenmembran. Der Aufbau und die Organisation des *mpf*-Komplexes verschiedener konjugativer Plasmide zeigen untereinander große strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten (Llosa und de la Cruz, 2005; Yeo und Waksman, 2004).

Das *coupling* Protein vermittelt nun zwischen dem Relaxosom und dem mpf-Transmembrankomplex, indem es sowohl mit der Relaxase als auch mit Proteinen des mpf-

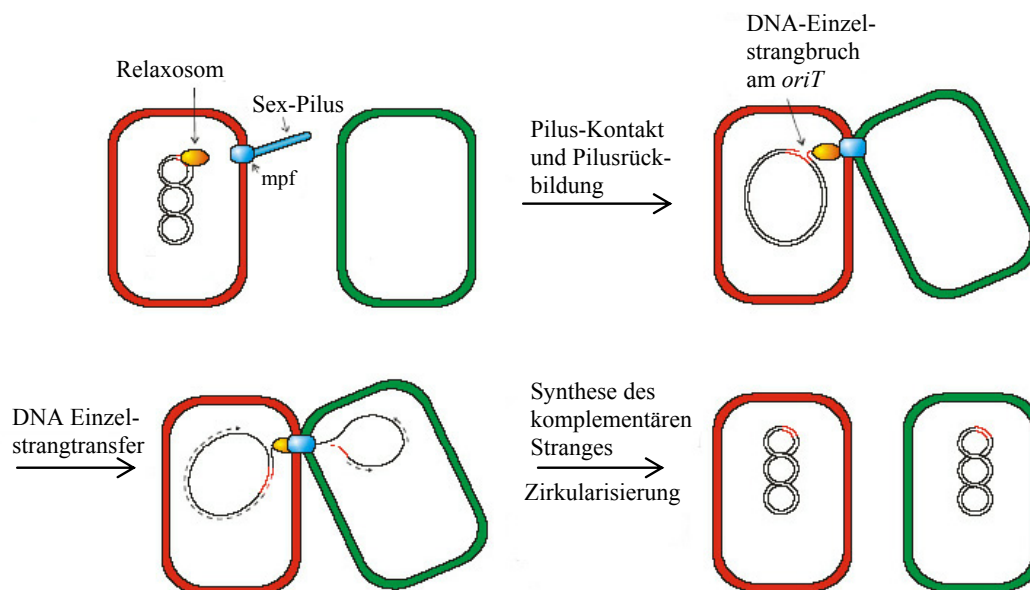


Abb. 1.3: Schematisches Modell zur Konjugation in G- Bakterien am Beispiel des Plasmids RP4 (aus Pansegrau und Lanka, 1996).

Komplexes interagiert. Kürzlich konnte für das konjugative Plasmid R1 gezeigt werden, dass die Prozessierung der Relaxosom-DNA durch das *coupling* Protein reguliert sein könnte, so dass genickte ssDNA nur vorliegt, wenn das Relaxosom mit dem *coupling* Protein interagiert (Mihajlovic *et al.*, 2009). Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit DNA-Transportern wird eine aktive Beteiligung des *coupling* Proteins am Transport der DNA durch den Transmembrankomplex unter ATP-Verbrauch vermutet (Llosa *et al.*, 2002). Für einige *coupling* Proteine konnte eine ATP-Bindung und -hydrolyse *in vitro* gezeigt werden, z.B. für TrwB_{R388} und TraK_{pAC3249A} (Arechaga *et al.*, 2008; Rangrez *et al.*, 2010). Ebenso konnte bereits eine DNA-Bindung *in vitro* und *in vivo* für einige *coupling* Proteine nachgewiesen werden (zusammengefasst in Alvarez-Martinez und Christie, 2009).

Der DNA-Relaxase-Komplex wird über das *coupling* Protein zum mpf-Komplex geleitet und in 5'→3' Polarität in den Rezipienten transportiert und dort rezirkularisiert, möglicherweise ebenfalls durch die Relaxase katalysiert (Draper *et al.*, 2005; Lanka und Wilkins, 1995). Sowohl in der Donor- als auch in der Rezipientenzelle findet anschließend die Replikation des komplementären DNA-Stranges nach *rolling circle* Mechanismus statt, so dass in beiden Zellen nach dem Transfer doppelsträngige, superhelikale Plasmid-DNA vorliegt.

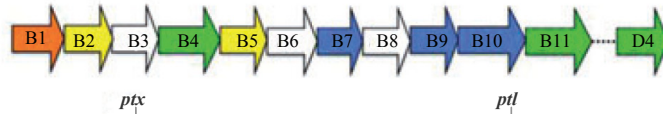
1.5 Typ IV Sekretionssysteme (T4SS)

Transferregionen konjugativer Plasmide stellen einen Subtyp eines T4SS dar, durch das Makromoleküle durch die Zellhülle transportiert werden können. Bisher sind drei unterschiedliche Typen eines T4SS beschrieben worden: (I) bakterielle Konjugationssysteme, durch die DNA über direkten Zellkontakt in einen Rezipienten transportiert werden kann, (II) Effektor-Transportsysteme, über die Proteine z.B. Virulenzfaktoren in eukaryontische Zellen transportiert werden und zum Ausbruch von Krankheiten wie Keuchhusten führen können, z.B. bei *Bordetella pertussis*, (III) T4SS zur Aufnahme von DNA aus dem Medium oder zur Abgabe von DNA in das Medium, z.B. bei *Helicobacter pylori* und *Neisseria gonorrhoeae*.

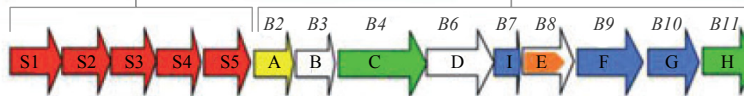
Basierend auf Sequenzähnlichkeiten der Tra-Proteine wurden T4SS in Untergruppen aufgeteilt. T4SS mit hoher Ähnlichkeit zu dem VirB / VirD4 System aus *A. tumefaciens* werden zur Gruppe IVA gezählt, während T4SS mit geringer Ähnlichkeit zum VirB / VirD4 System die Gruppe IVB bilden. Daneben gibt es die Gruppe der T4SS aus G+ Bakterien, wie das Typ IV Sekretions-ähnliche System (T4SLS, Abjay *et al.*, 2007) von pIP501 aus *Streptococcus agalactiae* (Abb. 1.4).

Typ IVA

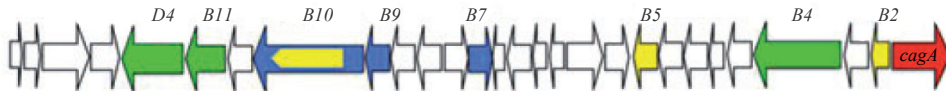
A. tumefaciens
Ti-Plasmid
virB / *virD4*



B. pertussis
ptx-ptl

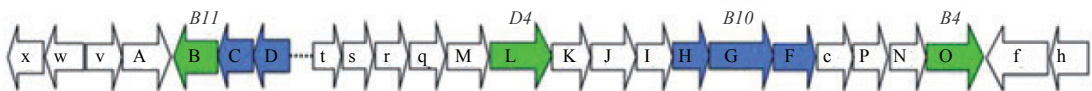


H. pylori
cagPAI



Typ IVB

L. pneumophila
dot / *licm*



G+

pIP501
orf1-orf15



Abb. 1.4: Genetische Organisation verschiedener T4SS aus G- und G+ Bakterien (aus Wallden *et al.*, 2010).

Leserahmen in grün markieren putative ATPasen, in gelb putative Oberflächenproteine, in orange putative lytische Transglykosylasen, in rot Effektorproteine und in blau putative Proteine des Transmembran-Komplexes. Ähnlichkeiten zu dem VirB / VirD4 System aus *A. tumefaciens* sind oberhalb des Leserahmens angegeben.

Das VirB / VirD4 System aus dem Bodenbakterium *A. tumefaciens* ist das bisher am besten untersuchte T4SS. Die Transferregion des Ti Plasmids ist in zwei Operonen organisiert, wobei das *virB* Operon für die Proteine VirB1-VirB11 kodiert und das *virD* Operon für das *coupling* Protein VirD4, die Relaxase VirD2 sowie für drei weitere Proteine (VirD1, VirD3,

VirD5). VirD1 ist an der DNA-Prozessierung und der Bildung des *dtr*-Komplexes beteiligt, während VirD3 und VirD5 nicht essentiell für den T-DNA-Transfer sind. Insgesamt sind an dem Transferprozess ca. 20 verschiedene Proteine beteiligt (Ward *et al.*, 2002; Vogel und Das, 1992; Yanofsky *et al.*, 1986).

Die Energie für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle wird vermutlich über ATP-Spaltung durch VirB4, VirB11 und VirD4 geliefert. Für VirB4, VirB11 und VirD4 sowie für orthologe Proteine anderer Systeme wird eine für ATPasen typische hexamere Struktur vorhergesagt, zudem zeigen diese Proteine typische Walker A / B Nukleosidtriphosphat-(NTP)-Bindemotive (Draper *et al.*, 2006). ATP-Bindung und -hydrolyse wurde für VirB11 sowie für VirD4-orthologe Proteine *in vitro* nachgewiesen (zusammengefasst in Alvarez-Martinez und Christie, 2009).

Das VirB1 Protein ist das einzige der 11 VirB Proteine, das nicht essentiell für einen Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle ist. Auch orthologe VirB1 Proteine anderer G- Systeme haben keinen essentiellen Einfluß auf einen konjugativen Transfer des Plasmids. VirB1 und orthologe Proteine zeigen Homologien zu lytischen Transglykosylasen, die das Peptidoglykan durch Spaltung der β -1,4-glykosidischen Bindung hydrolysieren und somit durch Hydrolyse des Peptidoglykans die Assemblierung des T4SS Komplex erleichtern können. Einige VirB1 Proteine aus G- T4SS sind bereits funktionell charakterisiert (Zahrl *et al.*, 2005). In *A. tumefaciens* ist VirB1 für den Transfer zwar nicht essentiell, es ist aber an der Ausbildung des T-Pilus beteiligt. Der C-Terminus von VirB1 wird proteolytisch gespalten und vermutlich sekretiert. Die Funktion des sekretierten VirB1 C-Terminus ist unklar (Zupan *et al.*, 2007).

VirB3, VirB6, VirB8 und VirB10 lokalisieren in der Innenmembran G- Bakterien und bilden das Gerüst des Transmembrankomplexes. VirB10 stellt hierbei einen Energiesensor für VirD4 und VirB11 dar. Nach ATP-Bindung durch VirD4 und VirB11 ändert sich die Konformation von VirB10, die notwendig für eine stabile Ausbildung eines Transportkanals in der Innenmembran und für einen T-DNA Transfer ist (Jakubowski *et al.*, 2009; Cascales und Christie, 2004).

Der Transmembrankomplex im Periplasma und in der Außenmembran G- Bakterien wird durch VirB7 und VirB9 ausgebildet, der T-Pilus besteht aus VirB2 und VirB5 Einheiten. Eine Beteiligung von VirB2 und VirB5 bei der Adhäsion und Immunevasion wird diskutiert (Alvarez-Martinez und Christie, 2009; Backert *et al.*, 2008).

Die Transferroute der T-DNA konnte *in vivo* über einen TriP Assay (*transferred DNA immunoprecipitation*) ermittelt werden, bei dem die T-DNA und die Tra Proteine durch Formaldehyd fixiert wurden (Abb. 1.5 A; Cascales und Christie, 2004).

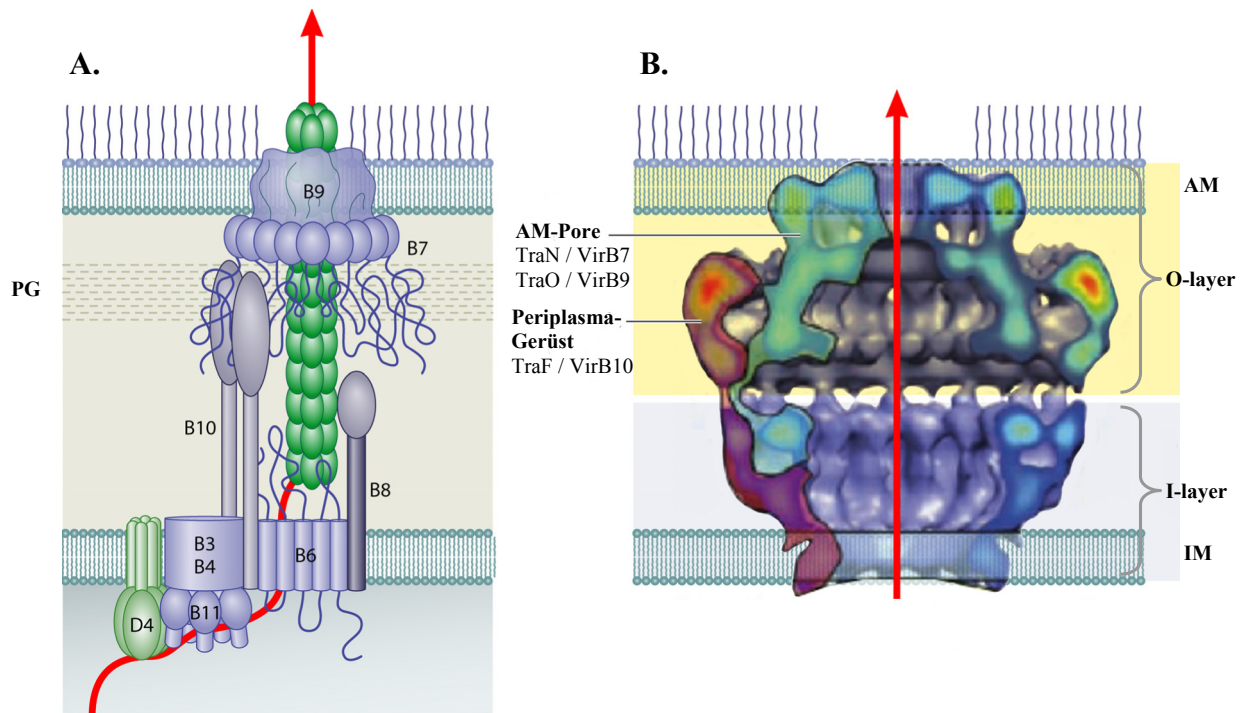


Abb. 1.5: Transferroute der T-DNA durch das T4SS in *A. tumefaciens* (A) und kryo-EM Struktur des T4SS Kernkomplexes vom konjugativen Plasmid pKM101 (B) (aus Alvarez-Martinez und Christie, 2009).

A. Die T-DNA liegt *in vivo* nach Fixierung mit Formaldehyd gebunden an das *coupling* Protein VirD4, VirB11, VirB6, VirB8, VirB2 und VirB9 vor. Der Sekretionskanal wird daher vermutlich aus diesen Proteinen aufgebaut, während die Proteine VirB3, VirB4, VirB5, VirB7 und VirB10 die Kanalausbildung unterstützen und / oder als Gerüst wirken.

B. Der T4SS Kernkomplex wird aus den Proteinen TraN (VirB7 ortholog), TraO (VirB9 ortholog) und TraF (VirB10 ortholog) aufgebaut. 14 Kopien jeder Einheit formen zusammen eine doppelwandige Kammer, die vermutlich die gesamte G- Zellhülle überbrückt. Die Höhe und der Durchmesser des Komplexes betragen 185 Å. Die Transferoute der DNA ist als roter Pfeil dargestellt. AM – Außenmembran; IM – Innenmembran; PG – Peptidoglykan; O-layer – T4SS Teilkomplex im Außenmembranbereich; I-layer – T4SS Teilkomplex im Innenmembranbereich.

Die Struktur des putativen T4SS Transmembran-Kernkomplexes des Plasmids pKM101 konnte kürzlich über kryo-Elektronenmikroskopie (EM) aufgeklärt werden (Abb. 1.5 B) (Chandran *et al.*, 2009; Fronzens *et al.*, 2009). Der Komplex wird aus den Proteinen TraF, TraN und TraO ausgebildet und besteht aus einem mehrschichtigen Ring aus je 14 Proteineinheiten der beteiligten Proteine. Hierbei bildet TraF ein Gerüst im Periplasma, das den Transmembrankanal vermutlich stabilisiert. Der Komplex wird aus zwei Untereinheiten (I-layer und O-layer) zusammengesetzt. Der O-layer besteht aus einer doppelwandigen Struktur, die mit einer „Haube“ abschließt. Diese Haube überbrückt vermutlich die Außenmembran und besitzt in der Mitte eine 10 – 20 Å Pore. Eine vergleichbare Struktur mit einer Pore befindet sich ebenfalls in der Innenmembran (I-layer). Der T-DNA Transfer findet vermutlich über diese Pore durch die Membranen statt.

1.6 Konjugation bei G+ Bakterien

Während beim konjugativen DNA-Transfer in G- Bakterien sowohl die Innen- als auch die Außenmembran als Barriere durchquert werden müssen, gibt es bei G+ Bakterien nur eine zytoplasmatische Membran. Dagegen stellt vermutlich das vielschichtige, stärker quervernetzte Peptidoglykan bei G+ Bakterien eine zusätzliche Barriere für den DNA-Transfer dar.

Bis heute sind die Erkenntnisse zum konjugativen Transfer und T4SS in G+ Bakterien nicht so weit fortgeschritten wie für G- Bakterien. Es wird jedoch angenommen, dass auf Grund eines einfacheren Aufbaus der Zellhülle bei G+ Bakterien der mpf-Komplex einen nicht so komplexen Aufbau zeigt wie bei G- Bakterien. Dementsprechend zeigen Tra Proteine G+ Bakterien weniger Ähnlichkeiten zum VirB / VirD4 System aus *A. tumefaciens*. So konnten bisher nur VirB1-, VirB4- und VirD4-ähnliche Proteine in G+ Bakterien ermittelt werden. Das *dtr*-System mit Relaxase und *oriT* zeigt ebenso in G+ und G- Systemen Ähnlichkeiten (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009; Francia *et al.*, 2004). Kürzlich wurde für das pIP501 Tra Protein Orf12 eine Ähnlichkeit mit VirB6 des VirB / VirD4 Systems aus *A. tumefaciens* postuliert (Alvarez-Martinez und Christie, 2009). Dagegen sind VirB11-ähnliche Proteine, die vermutlich die Energie für die Pilus-Assemblierung liefern, in G+ Bakterien kaum bekannt. Für VirB1-ähnliche lytische Transglykosylasen wird auf Grund einer komplexeren Peptidoglykanschicht bei G+ Bakterien eine essentielle Funktion für den Transfer der T-DNA vermutet.

Unklar ist bis heute, auf welche Weise bei G+ Bakterien der Kontakt zu Rezipientenzellen vollzogen wird. Bis jetzt wird eine durch Oberflächenproteine vermittelte Adhäsion favorisiert, wenngleich seit wenigen Jahren Pilus-ähnliche Strukturen in verschiedenen G+ Bakterien bekannt sind, die im Gegensatz zu Pili bei G- Bakterien kovalent über den Zellwandanker LPxTG an das Peptidoglykan gebunden sind (Alvarez-Martinez und Christie, 2009; Mandlik *et al.*, 2008).

Eine Besonderheit bei G+ Bakterien stellen die Sex-Pheromon-abhängigen konjugativen Plasmide in *E. faecalis*, wie pCF10 und pAD1, dar. Der konjugative Transfer wird hierbei durch ein kurzkettiges, von dem Rezipienten sekretiertes Peptid induziert. Der Wirtsbereich dieser Plasmide ist dementsprechend eng, der Transfer findet fast überwiegend nur zwischen *E. faecalis* Stämmen statt. Eine detailliertere Beschreibung findet sich in Palmer *et al.* (2010). Neben den Sex-Pheromon abhängigen konjugativen Plasmiden gibt es in *E. faecalis* konjugative Plasmide mit einem breiten Wirtsspektrum, die in der Organisation der *tra*

Region Ähnlichkeiten mit Plasmiden aus G+ *Staphylococcus*, *Lactococcus* und *Streptococcus* aufweisen (Abb. 1.6).

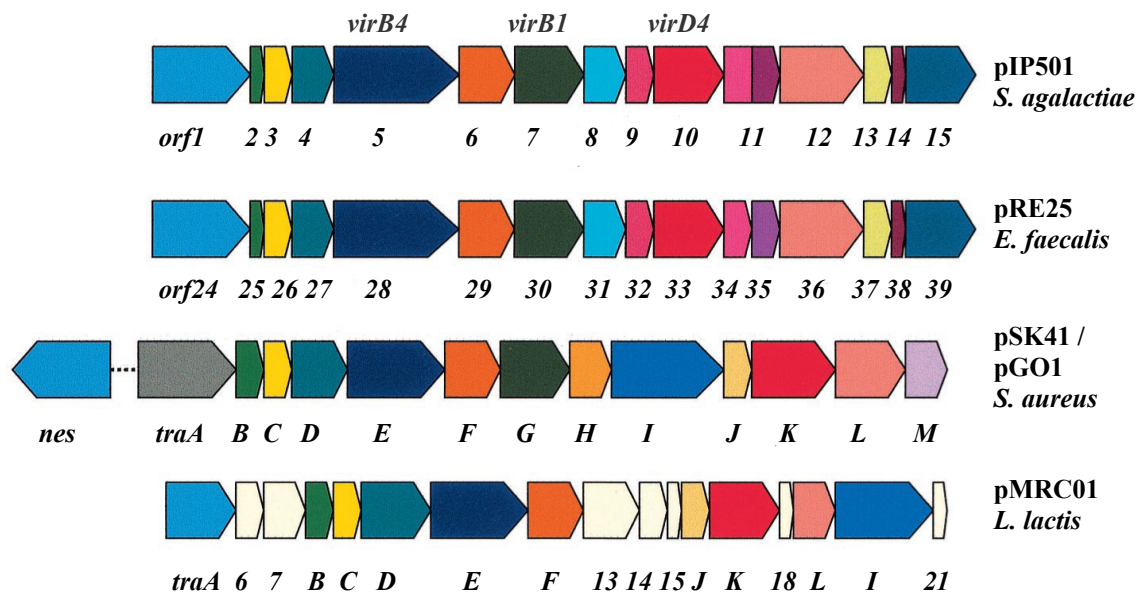


Abb. 1.6: Vergleich der *tra* Regionen der Plasmide pIP501, pRE25, pSK41, pGO1 und pMRC01 aus G+ Bakterien (modifiziert nach Grohmann *et al.*, 2003).

Leserahmen in gleicher Farbe deuten Homologien an. Mögliche Orthologien zum *virB* / *virD4* System aus *A. tumefaciens* sind in grau im oberen Bildausschnitt gezeigt.

Für die konjugativen Plasmide pIP501, pRE25, pSK41 / pGO1 und pMRC01 sind Ähnlichkeiten mit VirB4 (Orf5, Orf28, TraE, TraE) und VirD4 (Orf10, Orf33, TraK, TraK) wahrscheinlich. Ähnlichkeiten mit VirB1 sind für pIP501 (Orf7), pRE25 (Orf30) und pSK41 / pGO1 (TraG) vorhanden, während in der *tra* Region von pMRC01 keine lytische Transglykosylase kodiert ist.

Plasmide mit pIP501- und pSK41-vergleichbaren Transferregionen konnten in G+ nosokomialen, multiresistenten Bakterien isoliert werden. Es gibt heute erste Hinweise dafür, dass diese oder ähnlich organisierte Plasmide einen Einfluss auf die Entstehung Vancomycin-resistenter Enterokokken und Staphylokokken sowie MRSA haben könnten (Zhu *et al.*, 2010; Rosvoll *et al.*, 2010; Hegstad *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2008).

1.7 pIP501 als Modellplasmid für Konjugation in G+ Bakterien

Das konjugative Plasmid pIP501 der Inkompatibilitätsgruppe Inc18 wurde erstmals aus *S. agalactiae* isoliert und kodiert Resistenzen gegen Chloramphenicol und Makrolid-Linkosamid-Streptogramin B-Antibiotika (Horodniceanu *et al.*, 1976). Das Plasmid pIP501 hat einen ausgesprochen weiten Wirtsbereich, u.a. G+ *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptomyces lividans* und G- *E. coli* (Kurenbach *et al.*, 2003).

Die *tra* Region umfasst mit ca. 15 kb fast die Hälfte des 30,6 kb großen Plasmids und besteht aus 15 *orfs* (Abb. 1.7), von denen drei Ähnlichkeiten mit dem VirB / VirD4 System zeigen (s. Abb. 1.6) (Grohmann *et al.*, 2003; Grohmann, 2006). Die *tra* Region von pIP501 ist als ein Operon organisiert, wobei die 15 *orfs* unabhängig von der Wachstumsphase kotranskribiert werden. Das Operon wird über das Protein Orf1, für das eine Relaxase-Aktivität nachgewiesen werden konnte und das somit homolog zu VirD2 aus *A. tumefaciens* ist, negativ reguliert (Kurenbach *et al.*, 2006; Kopeć *et al.*, 2005).

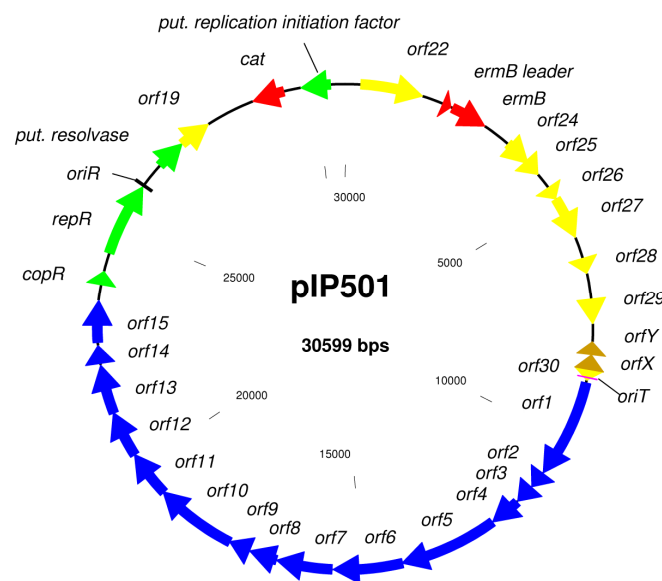


Abb. 1.7: Schematische Darstellung von pIP501 (aus Kurenbach, 2004).

Die Antibiotikaresistenzgene sind rot, Replikationsgene, *copy number*-Kontrollgene und Gene mit Resolvase-Aktivität grün dargestellt. Für *orfs* in gelb ist eine genaue Funktion unbekannt, *orf24*, *orf26* und *orf27* zeigen jedoch Ähnlichkeiten mit dem Toxin/Antitoxin-System des Plasmids pSM19035 (Meinhart *et al.*, 2003). Gene der *tra*-Region sind blau dargestellt. *orfX* und *orfY* kodieren möglicherweise für Transferkomponenten und sind braun unterlegt.

Basierend auf *in vitro* und *in vivo* Proteininteraktionen der 15 pIP501 Tra Proteine und *in silico* Vorhersagen zur Proteintopologie wurde ein erstes Modell eines T4SLS aus G⁺ Bakterien erstellt (Abb. 1.8) (Abajy *et al.*, 2007).

Der Transferprozess wird demnach vermutlich durch das VirB1 orthologe Orf7 initiiert, indem das Peptidoglykan in der Zellwand partiell hydrolysiert wird. Vermutlich über Proteininteraktionen werden die Tra Proteine Orf2, Orf5, Orf10 und Orf14 rekrutiert (Abb. 1.8 A). Die Assemblierung des T4SLS Komplexes findet nachfolgend über weitere Interaktionen der bereits rekrutierten Proteine mit den verbleibenden Tra Proteinen statt. Nur für Orf11 und Orf13 sind bisher keine Interaktionen bekannt. Das Relaxosom wird vermutlich über eine Interaktion mit dem putativen *coupling* Protein Orf10 (VirD4-ähnlich) zum T4SLS dirigiert. Der Transfer der an die Relaxase gebundenen ssDNA kann dann unter

Energieverbrauch durch einen putativen T4SLS Kernkomplex (Orf8, Orf12, Orf14, Orf15) stattfinden. Die Energie könnte über ATP-Spaltung durch Orf5 und Orf10 erbracht werden (Abb. 1.8 B).

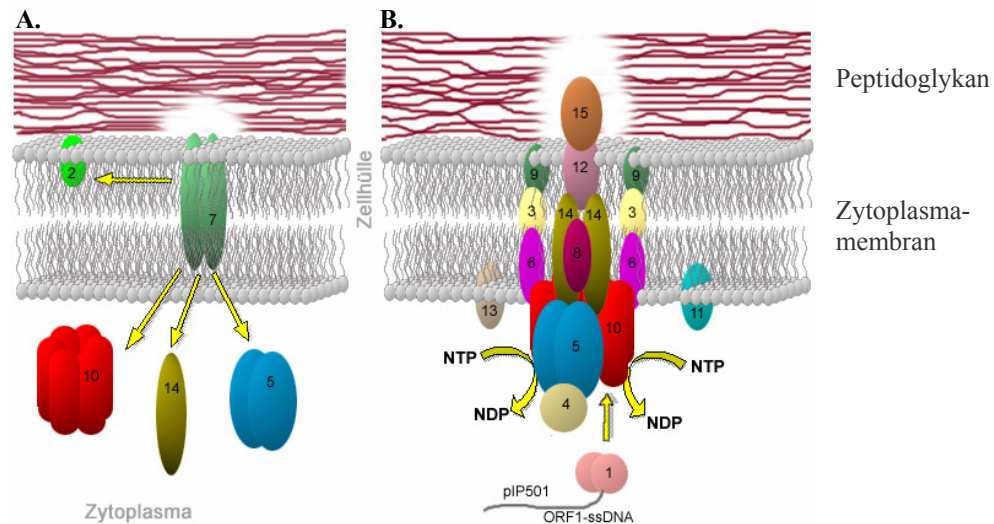


Abb. 1.8: T4SLS Arbeitsmodell des konjugativen Plasmids pIP501 aus *S. agalactiae* (aus Abajy, 2007). Die Ziffern in den schematisch dargestellten Proteinen beziehen sich auf das jeweilige OrfX Protein von pIP501.

1.8 Gene in Bewegung - das Mobilom

Mobile genetische Elemente (MGE), wie Phagen, Transposons und Plasmide, sind in mikrobiellen Gemeinschaften allgegenwärtig. Unter dem Begriff Mobilom (Frost *et al.*, 2005) werden diese MGE zusammengefasst, durch deren Austausch untereinander die evolutionären Anpassungsmöglichkeiten der einzelnen Spezies vergrößert werden. Hierbei können Antibiotika- oder Schwermetallresistenzgene untereinander ausgetauscht werden, Virulenzfaktoren, die eine Pathogenität in sonst kaum pathogenen Bakterien vermitteln können, Bakteriozide oder neue katabolische Stoffwechselwege zum Abbau von z.B. halogenierten Kohlenwasserstoffen im Boden (Heuer und Smalla, 2007; Smets und Barkay, 2005).

Die Untersuchung des Mobiloms ist besonders im Hinblick auf geschlossene Systeme interessant, in denen Menschen mit unterschiedlich zusammengesetzten bakteriellen Populationen zusammenleben, da hier der zeitliche Verlauf evolutionärer Anpassungen durch HGT verfolgt werden kann. Solche Systeme können Intensivstationen in Krankenhäusern sein, Forschungsstationen wie der Antarktisforschungsstation CONCORDIA oder der Internationale Raumstation ISS, in denen Wissenschaftler über viele Monate auf engem Raum isoliert unter extremen Umwelteinflüssen wie Permafrost oder Mikrogravitation

zusammenleben. Die Analyse des Mobiloms durch direkten Nachweis von Transfergenen oder durch Nachweis von horizontalem Gentransfer kann zusammen mit der Analyse der Biodiversität und den im Habitat vorhandenen Resistenz- und Virulenzgenen zu einer Risikoeinschätzung für die Entstehung multiresistenter Bakterien führen. Erste Untersuchungen zum HGT unter Mikrogravitation zeigten, dass Konjugation generell unter Mikrogravitation stattfinden kann (De Boever *et al.*, 2007) und dass die Expression von Transfergenen sowie die Virulenz unter Mikrogravitation im Weltall hochreguliert ist (Wilson *et al.*, 2007). Dies könnte ein Indiz für ein erhöhtes Potential der Entstehung multi-resistenter Bakterien im Weltraum oder auch anderen abgeschlossenen Systemen mit extremen Umweltbedingungen sein.

Der Nachweis von HGT kann *in vitro* erfolgen, indem Kreuzungen mit bakteriellen Isolaten von z.B. der ISS oder CONCORDIA durchgeführt werden. Es sind hier zwei unterschiedliche Ansätze möglich. Zum einen kann eine molekulare Charakterisierung der Isolate bezüglich bekannter, weit verbreiteter Transfer- und Antibiotikagene erfolgen. Über biparentale Kreuzungen mit einem plasmidfreien Rezipienten kann dann *in vitro* versucht werden, die Transfer- und Antibiotikaresistenzgene in den Rezipienten zu transferieren (Abb. 1.9). Eine alternative Möglichkeit stellt eine triparentale Kreuzung dar, bei der das Isolat mit einem putativen konjugativen Element mit einem zweiten Donor gekreuzt wird, der ein bekanntes mobilisierbares Plasmid besitzt. Kann das mobilisierbare Plasmid von dem Donor mit dem putativen konjugativen Element in einen Rezipienten mobilisiert werden, ist dies ein indirekter Nachweis eines konjugativen Elementes.

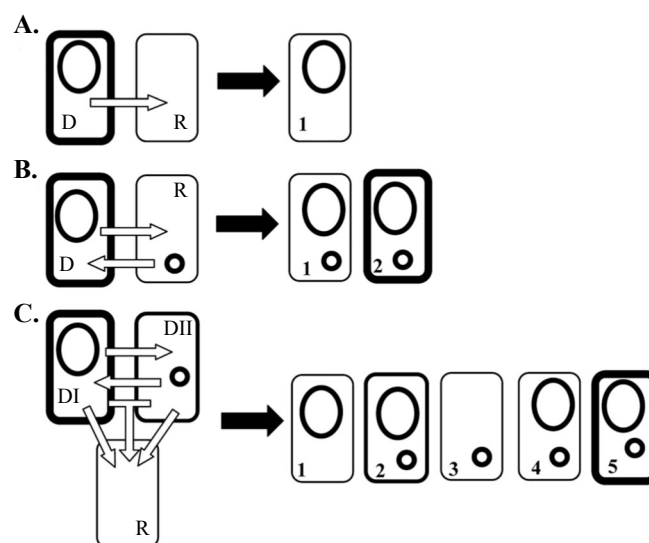


Abb. 1.9: Schematische Darstellung von bi- und triparentalen Kreuzungen (nach Timmerly *et al.*, 2009).

A. Biparentale Kreuzung, ein konjugatives Plasmid wird in einen Rezipienten übertragen.

B. Biparentale Retromobilisierung, ein konjugatives Plasmid wird in einen Rezipienten mit einem mobilisierbaren Plasmid übertragen (1), von dort kann eine Mobilisierung des mobilisierbaren Plasmids in den Donor erfolgen (2).

C. Triparentale Kreuzung, bei der fünf verschiedene Transkonjuganten erhalten werden können. (1) – biparentaler Transfer des konjugativen Plasmids von Donor DI in den Rezipienten R; (2) – biparentaler Transfer des konjugativen Plasmids in einen Donor DII mit einem mobilisierbaren Plasmid; (3) – Mobilisierung des mobilisierbaren Plasmids von der Transkonjugante (2) in den Rezipienten; (4) Transfer des konjugativen Plasmids in die Transkonjugante (3); 5 – Retromobilisierung des mobilisierbaren Plasmids von (2) oder (4) in den Donor DI.

Oval – konjugatives Plasmid; kleiner Kreis – mobilisierbares Plasmid.

1.9 Klassifizierung des Mobiloms basierend auf Transfergenen

Das klassische Klassifizierungssystem von Plasmiden beruht auf Inkompatibilitäten. Plasmide mit ähnlichem oder identischem Replikon werden in einer Inkompatibilitätsgruppe zusammengefasst. Ein Replikon-basiertes Klassifizierungssystem ist in vielen Fällen jedoch nicht eindeutig anwendbar, weil Plasmide mehrere Replikationssysteme besitzen können, wie z.B. das F-Plasmid. Zudem ist für die Erstellung eines Klassifizierungssystems die Auswahl von Prototypen notwendig. Für die Erstellung des Inc-Klassifizierungssystems wurden fast ausschließlich Plasmide aus *Enterobacteriales* gewählt, da diese Ordnung historisch gesehen in Bezug auf Plasmide am interessantesten war (F-Plasmid aus *E. coli*). Plasmide aus Bakterien anderer Ordnungen lassen sich häufig nicht nach den klassisch entworfenen Inkompatibilitätsgruppen einsortieren, so dass eine Vielzahl neuer Inc-Gruppen definiert werden mussten (z.B. Inc18 für pIP501). Ein weiterer Grund, der eine Eingruppierung von Plasmiden in Inc-Gruppen erschwert, ist die große Anzahl verschiedener Replikationssysteme, so dass es selbst bei vollständig sequenzierten Plasmiden schwierig sein kann, das Replikationssystem innerhalb der Sequenz zu identifizieren (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009; Francia *et al.*, 2004).

Kürzlich wurde ein neues Klassifizierungssystem entworfen, das auf Transferschlüsselgenen wie Relaxase- und *virD4*-orthologen Genen beruht. Relaxasegene kommen ubiquitär in allen konjugativen Plasmiden und in einem Großteil mobilisierbarer Plasmide vor. Basierend auf Aminosäurevergleichen wurden 6 MOB-Gruppen definiert, in die alle bis heute bekannten Relaxasen verschiedenster *Phyla* eingruppiert werden können. Eine einzige Ausnahme stellt die Relaxase des konjugativen Transposons Tn916 dar, das eine eigenständige MOB-Gruppe bildet. Die meisten bis heute identifizierten mobilen Plasmide kodieren ausschließlich für eine Relaxase, so dass eine eindeutige Eingruppierung in eine MOB-Gruppe möglich ist (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009; Francia *et al.*, 2004).

Relaxasen zeigen somit eine hohe Konservierung der für sie charakteristischen Motive (Abb. 1.10). Es sind drei Relaxase-Motive bekannt. Das Motiv I beinhaltet ein katalytisch aktives Tyr, über das der *nick* der dsDNA und die Bindung der Relaxase an das 5'-Ende der ssDNA stattfindet. Das Motiv II zeigt keine stringente Konservierung, charakteristisch sind Ser, Glu

oder Asp, über die eine Interaktion mit dem 3'-Ende der genickten ssDNA vermittelt wird. Das Motiv III (3H-Motiv) besteht aus einer His-Triade, über die der Kofaktor Mg^{2+} komplexiert wird, so dass ein nukleophiler Angriff einer Hydroxylgruppe des Tyr aus Motiv I auf ein positiv polarisiertes Phosphor in der DNA ermöglicht wird (Boer *et al.*, 2006; Francia *et al.*, 2004).

	Motiv I	Motiv II	Motiv III
	(1) 1 10 28	95 100 115	134 140 150 162
RSF1010	(1) MAIYHLTAKTGSRSQGSARAKADYIQ-	(71) LFKVEVEFALPVELTLDQOKAL	(108) TLAIH-----AGGGENPHCHLMISERIND
pAB6	(1) MAIYHLNVRYSKSKGQSAQAKNDYIN-	(72) VCTETEFALPRELTLEQQOKL	(111) SFAIHTDKN-----NHNPHCHLIFSERQLD
pP	(1) MASVHCTVKTGAKG---SALKHADYIS-	(71) AYREIETIALPRELTREORIEL	(107) QYAIHNPPGAIDGKEQPHAHIMFCERIND
pSC101	(1) MASYHLSVKTGGKG---SASPHADYIA-	(70) TYREIETIALPRELKPQRLEL	(106) QFAIHNPKAAIAGGQPHAHIMFSERIND
pDOJH10S	(1) MAIYSLNIS-----SASSAVAALSYITS	(79) AAKKIMVALPRELDEGQRLA	(116) TYAIHLDRG-----RNPFAHILVANRRID
pKJ36	(1) MAIYHLSVSNVSRASGRATATLSYITG	(84) PAKKIVVALPREFTPRQVQA	(121) TYAIHEDREG-----NPNFAHILVANRQID
pGO1	(1) MAMYHFONKFVSKANGQSATAKSAYNNSA	(83) VAREIITGLPNEFDPSNIEL	(119) DLNIHKIN-----EENPHAHLLCTLRGLD
pMRC01	(1) MAIEHMFNSNISAGKGRSAVASASYRSG	(83) YAKFNFVALPIELSEDEQKEL	(120) DVAIHRDHD-----ENPHAHVMTLRPFN
pNGR234	(1) MAVPHFSVSVVARGSGRSVLSAAYRHC	(94) LAKDVTIALPIELTEQNIVL	(131) DWVYHDAPG-----NPHVHMLTLRPLT
pXF5823	(1) MAIYHLSAKTISRATGRSATGAAAYRAG	(84) LARELEVALPTELTDPQOREL	(121) DIAIHAKS-----ENPHAHLLTMRDIG
pTiC58	(1) MAIYHLSKTPVSRSGRSVAVASAAAYRCA	(85) VAREFEIALPHELSPGRLKA	(122) DFAIHSPSEHG-DIRNHHAHVLMITRQVG
pRA2	(1) MLAKVPFKRADGKT---SFKSLAKYACE	(71) VYHFTVSWPAHEKPTDAQVFE	(108) LAAVHRDT-----DNVHGHFMVNRVNPE
RP4	(1) MIAKHVPMRSTKKS---DFAEVLVKYIT-	(68) TYHLVSVFRAGEKPDATETIRA	(105) VSAVHDT-----DNLHIHIAINKIHPT
Consensus	(1) MAIYHLSVK VSKS G SA A AAYI	(95) VAKEI IALP ELT EQQI L	(134) FAIH ENPHAHIMVT R ID

Abb. 1.10: Sequenzalignment von Relaxasen der MOB_Q Familie (aus Francia *et al.*, 2004).

Die Relaxase Orf1 des Plasmids pIP501 gehört zur MOB_Q Familie. Die Relaxasen der Plasmide pRA2 und RP4 sind MOB_P Relaxasen und wurden zum Vergleich der Sequenzkonservierung aufgeführt.

1.10 Induzierbare Genexpression in G⁺ Bakterien mit dem *nisA* Promotor

Für eine induzierbare Genexpression in G⁺ Bakterien ist eine Vielzahl an molekularbiologischen Werkzeugen vorhanden. Häufig verwendete Systeme zur Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* basieren auf dem *lac* Operon, bei dem das konstitutiv exprimierte LacI in Abwesenheit von Laktose oder nicht-metabolisierbarer Analoga wie IPTG an den *lac* Operator bindet und die Transkription reprimiert. Die Expression wird induziert, indem Laktose oder IPTG an den Repressor bindet, so dass dieser nicht mehr mit dem Operator interagieren kann.

Das *lac* Operon ist in G⁺ Bakterien unzureichend reguliert. Eine Alternative stellt der Nisin induzierbare *nisA* Promotor dar. Nisin ist ein antibiotisch wirksames Peptid aus *L. lactis*, das in roher Milch vorkommt und zur Konservierung verschiedener Milchprodukte verwendet wird. Die Expression von Nisin in *L. lactis* wird über einen Cluster aus 11 Genen reguliert.

Nisin wird in der Zelle als Precursor exprimiert und ins umgebende Medium exportiert. Dort nimmt es seine eigentliche Struktur an. An der Zelloberfläche befindet sich der NisK Rezeptor, der konstitutiv exprimiert wird und Nisin binden kann. Ebenfalls konstitutiv exprimiert wird NisR, das im Zytoplasma vorliegt und durch NisK phosphoryliert wird, wenn Nisin an NisK bindet. Das aktivierte NisR bindet an den *nisA* Promotor und induziert die Expression des Nisin-Precursors (Abb. 1.11) (Mierau und Kleerebezem, 2005).

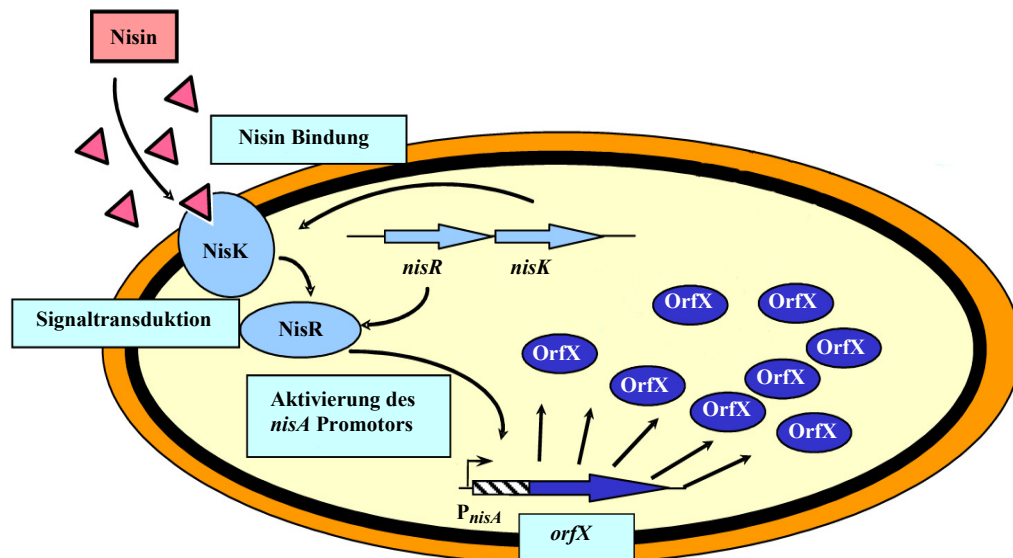


Abb. 1.11: Schematische Darstellung der *nisA* Regulation (aus Mierau und Kleerebezem, 2005).

Für G⁺ Bakterien wie *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus* und *Bacillus* sind zwei *E. coli shuttle* Plasmide entwickelt worden, bei denen eine rekombinante Proteinexpression in G⁺ Bakterien über den *nisA* Promotor reguliert wird (pMSP3535, pMSP3535VA, Bryan *et al.*, 2000). Beiden Plasmiden gemeinsam sind der *nisA* Promotor mit einer *multiple cloning site* sowie die Gene für die regulatorischen Proteine NisR und NisK. Das Replikon in pMSP3535 basiert auf pAM β 1, in pMSP3535VA liegt das Replikon pVA380-1 vor.

Die Entwicklung der durch Nisin induzierbaren *shuttle* Vektoren für G⁺ Bakterien ermöglicht die Herstellung von molekularbiologischen Werkzeugen für z.B. rekombinante Proteinexpression in G⁺ Bakterien oder für die Erzeugung von Plasmiden, über die horizontaler Gentransfer durch fluoreszierende Proteine in G⁺ Bakterien verfolgt werden kann.

1.11 Zielsetzung

Die Zielsetzungen dieser Arbeit können thematisch in zwei Schwerpunkte unterteilt werden:

a. Entwicklung von Nachweisverfahren für horizontalen Gentransfer

- Zur Verfolgung von horizontalem Gentransfer sollen mobilisierbare, GFP-markierte *shuttle* Plasmide konstruiert werden. Hierfür werden die *oriT*_{pIP501} Region, das *oriT* spezifische Relaxasegen und ein *gfp* Gen in die *shuttle* Vektoren pMSP3535 und pMSP3535VA kloniert
- Ein konjugatives, GFP-markiertes *shuttle* Plasmid soll hergestellt werden, indem die *tra* Region von pIP501 zusammen mit einem *gfp* Gen in den Vektor pMSP3535 kloniert werden soll
- Mit den Konstrukten sollen Mobilisierungen und Transferversuche durchgeführt werden. Der Gentransfer soll anhand der grünen Fluoreszenz verfolgt werden
- Molekulare Assays zum Nachweis von Transfergenen in nosokomialen und pathogenen Bakterien (*Staphylococcus*, *Enterococcus*) sollen entwickelt werden

b. Studien zum T4SLS des konjugativen Plasmids pIP501

- Lokalisierung der pIP501 Tra Proteine *in vivo* über Fraktionierung der Zellkompartimente von *E. faecalis* (pIP501) in Zellwand, Zellmembran und Zytoplasma sowie über Immunfluoreszenzmikroskopie
- Untersuchungen zu DNA-Bindeeigenschaften ausgewählter pIP501 Tra Proteine (Orf8, Orf10, Orf11, Orf14)
- Konstruktion einer *orf7 knock out* Mutante von pIP501 und Untersuchungen zum Einfluß des VirB1 orthologen Orf7 auf den konjugativen Transfer in *E. faecalis*

2. MATERIAL

2.1 Chemikalien, Kits und Hilfsmittel

Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Acrylamid / Bisacrylamid (30 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Amicon [®] Ultra-4 Centrifugal Filter Device	Millipore GmbH, Schwalbach
Ampicillin	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Ammoniumpersulfat	Merck KGaA, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Brain-Heart Infusion</i> (BHI)	Conda, Madrid, Spanien
<i>Blocking Buffer</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
BSA	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Caseinhydrolysat	Merck KGaA, Darmstadt
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Coomassie [®] Brilliant Blue R 250	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<i>CrossDown Buffer</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt
DABCO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
dNTPs	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Entwicklerlösung (Roentogen Liquid)	Tetenal AG & Co. KG, Norderstedt
Erythromycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fixierlösung (Roentogen Superfix)	Tetenal AG & Co. KG, Norderstedt
Fusidinsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (110 TBq/mmol)	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
Gentamicin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
Glyzerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glyzin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
IPTG (Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Immersionsöl	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Lysing Matrix E</i>	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Nisin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Nitrocellulosemembran (Trans-Blot® Transfer Medium)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
p-Chlor-DL-phenylalanin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
peqGold Gel Extraction Kit	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGold Cycle-Pure Kit	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pierce® ECL Western Blot Detektionskit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Ponceau S	Merck KGaA, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
QIAEX® II Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit (50)	QIAGEN GmbH, Hilden
Roti® Block	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Röntgenfilme (Amersham Hyperfilm ECL)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
SDS	Merck KGaA, Darmstadt
Sephadex G-50	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Spectinomycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Streptomycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sulfosalicylsäure	Merck KGaA, Darmstadt
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trichloressigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Triton X-100	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trypton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Todd-Hewitt Broth (THB)	Conda, Madrid, Spanien
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

2.2 Geräte

Zentrifugen

<i>Centrifuge 5714C</i>	Eppendorf AG, Hamburg
MIKRO 200R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
OTD Combi Ultracentrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich

Photometer

Küvetten-Test® Photometer	HACH LANGE GmbH, Berlin
---------------------------	-------------------------

pH-Meter

HI 931400 MICROPROCESSOR pH-Meter	HANNA Instruments GmbH, Kehl am Rhein
-----------------------------------	---------------------------------------

PCR-Cycler

Primus 96 ^{plus}	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Primus	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
peqSTAR 96 Universal	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

SDS-PAGE-Apparatur

Mini Protean® II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
------------------	------------------------------------

Western Blot Apparatur

<i>Mini Protean Blot</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
--------------------------	------------------------------------

Geltrockner

Geltrockner 443 Slab Dryer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
----------------------------	------------------------------------

Kontaminationszähler

Kontaminations-Monitor LB 122	Berthold Technologies GmbH & Co. KG
-------------------------------	-------------------------------------

Mikroskop

Axioskop Fluorescence Microscope	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
----------------------------------	---

FastPrep

FastPrep®-24

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Geldokumentation

Multi Image™ Light Cabinet

Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf

2.3 Enzyme, Antikörper und Standards

Zu den Enzymen gehörige Puffer (Ligasepuffer, Phosphatase-Puffer, PCR-Puffer bzw. Puffer für Restriktionsendonukleasen) wurden jeweils von der gleichen Firma nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Enzyme

Alkalische Phosphatase ($1 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4 Polynukleotid Kinase ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
T4 DNA Ligase ($1 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNaseA ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
RNaseA ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Lysozym ($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Lysostaphin ($1,5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Mutanolysin ($1 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<i>Gentherm</i> ™ DNA Polymerase ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und DNA Diagnostika mbH, Berlin
<i>Paq5000</i> DNA Polymerase ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
<i>GoTaq</i> ® HotStart Polymerase ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Promega GmbH, Mannheim
<i>Pfu</i> DNA Polymerase ($2\text{-}3 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Promega GmbH, Mannheim
<i>Phusion</i> DNA Polymerase ($2 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
<i>Long PCR Enzyme Mix</i> ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Precissor</i> High-fidelity DNA Polymerase ($2 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	BioCat GmbH, Heidelberg
<i>Bam</i> HI ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
<i>Bgl</i> II ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
<i>Eco</i> RI ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
<i>Hind</i> III ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
<i>Not</i> I ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
<i>Sal</i> I ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
<i>Xma</i> I ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
<i>Xba</i> I ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
<i>Xho</i> I ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.

Antikörper/Antiseren

Anti-OrfX (X = 5,7,8,10,11,13,14)	BioGenes GmbH, Berlin
Anti-His ₆ HRP Konjugat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Anti-rabbit IgG (H+L), HRP Konjugat	Promega GmbH, Mannheim
Atto 647N, goat anti-rabbit IgG	ATTO-TEC GmbH, Siegen
Alexa Fluor [®] 488 F(ab') ₂ , goat anti-rabbit IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Standards

1 kb DNA <i>Ladder</i>	MolekularBiologisches & Biochemisches Labor Dr. Bartling GmbH, Bielefeld
100 bp DNA <i>Ladder</i>	MolekularBiologisches & Biochemisches Labor Dr. Bartling GmbH, Bielefeld
λ <i>EcoRI-HindIII</i> DNA Marker	MolekularBiologisches & Biochemisches Labor Dr. Bartling GmbH, Bielefeld
peqGOLD Protein-Marker I	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

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

2.4 Mikroorganismen**Tab. 2.1: Verwendete Bakterienstämme.**

Spezies und Stamm	Charakteristika	Quelle / Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
XL10	Tet ^R Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44</i> <i>thi-1 recA1 gyrA96</i> <i>relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB</i> <i>lacI^qZΔM15</i> Tn10(Tet ^R) Amy Cam ^R]	Agilent Technologies GmbH, Böblingen (ehemals Stratagene)
BL21 Codon plus RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^R <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU</i> <i>ileY leuW</i> Cam ^R]	Agilent Technologies GmbH, Böblingen (ehemals Stratagene)
EC1000	<i>repA</i> ⁺ MC1000, Km ^R , trägt einzelne Kopie von pWV01 <i>repA</i> im <i>glgB</i> - Gen	Leenhouts <i>et al.</i> (1996)

DH5 α	F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1, hsrR17 (r_k^- m_k^-) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (ehemals GIBCO- BRL Life Technologies)
<i>Enterococcus faecalis</i>		
JH2-2	Rif ^R Fus ^R	Jacob und Hobbs (1974)
OG1X	Sm ^R	Ike <i>et al.</i> (1983)
OG1RF	Rif ^R Fus ^R	Dunny <i>et al.</i> (1978)
CK111	upp4::P ₂₃ repA4, Spec ^R	Kristich <i>et al.</i> (2007)
T9	tetM	Hufnagel <i>et al.</i> (2004)

2.5 Plasmide

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Größe [kb]	Beschreibung, Selektionsmarker	Quelle / Referenz
pMSP3535	8,4	pAM β 1 und ColE1 Replikon, <i>nisR</i> , <i>nisK</i> , <i>PnisA</i> , Em ^R	Bryan <i>et al.</i> (2000)
pMSP3535VA	8,9	pVA380-1 Replikon, <i>nisR</i> , <i>nisK</i> , <i>PnisA</i> , Kan ^R	Bryan <i>et al.</i> (2000)
pIP501	30,6	<i>tra</i> ⁺ , Cm ^R , MLS ^R	Evans und Macrina (1983)
pQTEV	4,8	P _{t4} , <i>lacI</i> ^q , <i>his</i> ₇ , Amp ^R	Scheich <i>et al.</i> (2004)
pSK ⁻	3,0	pUC <i>ori</i> , Amp ^R	Agilent Technologies GmbH, Böblingen (ehemals Stratagene)
pCJK47	6,7	<i>oriT</i> _{pCF10} , P- <i>pheS</i> [*] , pORI280 Derivat, Em ^R	Kristich <i>et al.</i> (2007)
pCF10-101	67,5	pCF10 Δ <i>oriT2</i>	Kristich <i>et al.</i> (2007)
pJP _{rel} /GFP	8,1	P _{rel} , <i>gfp</i>	Nieto <i>et al.</i> (2006)
pRHN1	7,7	<i>DsRed express</i> , Amp ^R	Janus <i>et al.</i> (2007)

pRI1	6,0	<i>mob</i> ⁺	Garcia-Migura <i>et al.</i> (2009)
pJS42	4,1	<i>mob</i> ⁺	J. H. Park, Kyungwon Universität, Gyounggi, Südkorea
pT181	4,4	<i>mob</i> ⁺	Khan <i>et al.</i> (1981)
pSK41	46,4	Bm ^R , Gent ^R , Kan ^R , Nm ^R , <i>tra</i> ⁺	Firth <i>et al.</i> (1993)
RSF1010	8,7	Sm ^R , <i>mob</i> ⁺	Scherzinger <i>et al.</i> (1992)
pSMA23	3,5	<i>mob</i> ⁺	Sudhamani <i>et al.</i> (2008)
pK214	29,9	<i>tet</i> (S), <i>cat</i> -LM, <i>mdt</i> (A), <i>str</i>	Perreten <i>et al.</i> (2001)
plca36	36,5	<i>tra</i> ⁺	Zhang <i>et al.</i> (2008)

pheS^{*} - durch eine Punktmutation an Position 294 der Phenylalanyl-tRNA Synthase verringert sich die Substratspezifität für Phe, so dass halogenierte Phe-Derivate bei der Proteinbiosynthese verwertet werden können (Kast *et al.*, 1991).

2.6 Nährmedien

Die verwendeten Medien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 1,5 % Agar zugesetzt. Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen bzw. chromosomale Marker wurden dem maximal 60 °C warmen Agar bzw. Flüssigmedium die entsprechenden Zusätze wie Ampicillin (100 µg · mL⁻¹), Chloramphenicol (20 µg · mL⁻¹), Erythromycin (500 µg · mL⁻¹), Fusidinsäure (50 µg · mL⁻¹), Gentamicin (20 µg · mL⁻¹), Tetracyclin (10 µg · mL⁻¹), Streptomycin (1000 µg · mL⁻¹), Spectinomycin (1000 µg · mL⁻¹) oder Kanamycin (2000 µg · mL⁻¹) zugesetzt. Abweichende Endkonzentrationen der Antibiotika sind an entsprechenden Stellen im Text vermerkt.

LB-Medium (1 L)	10 g 5 g 5 g	Trypton Hefeextrakt Natriumchlorid
BHI-Medium (1 L)	37 g	BHI
THB-Medium (1 L)	30 g	THB

SOB-Medium	20 g	Trypton
(1 L)	5 g	Hefeextrakt
	0,5 g	Natriumchlorid

Nach dem Autoklavieren wurden 10 mL sterilfiltriertes 1 M MgCl_2 und 10 mL sterilfiltriertes 1 M MgSO_4 je Liter SOB-Medium zugegeben.

SOC-Medium	99 mL	SOB-Medium
(100 mL)	1 mL	Glukose (40 %)

NZY-Medium	10 g	Caseinhydrolysat
(1 L)	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
		mit NaOH auf pH 7,5 einstellen

NZY⁺-Medium	1 L	NZY-Medium
	12,5 mL	MgCl_2 (1 M)
	12,5 mL	MgSO_4 (1 M)
	10 mL	Glukose (2 M)

MM9YEG	10 mL	10x M9
	250 mg	Hefeextrakt
		Mit ddH ₂ O auf 99 mL auffüllen
		autoklavieren
	0,5 mL	Glukose 50 %

10x M9	60 g	Na_2HPO_4
(1 L)	30 g	KH_2PO_4
	5 g	NaCl
	10 g	NH_4Cl

2.7 Synthetische Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München bzw. Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

Tab. 2.3: Für Klonierungen verwendete Oligonukleotide.

Nr.	Name	Nukleotidsequenz (5'→3')	Position
a. monitoring tool			
1.	<i>orf1_BamHI</i> fw	ACTGGATCCGAGAGGTGATACAATT	1380 – 1395 ^a
2.	<i>orf6_XmaI</i> re	AACCCCGGGCACCAACCTTCCTAAT	8117 – 8132 ^a
3.	<i>orf7_XmaI</i> fw	GTGCCC GG GATTAGGAAGGTTGGTGATT	17 – 35 ^b
4.	<i>orf7_neu_XmaI</i> fw	GTGCCC GG GTATCATGGGAGCAAC	39 – 53 ^b
5.	<i>orf7_XmaI</i> re	TCACCCGGGCAATATTTGCAATAGAAG	1118 – 1135 ^b
6.	<i>orf8_XmaI</i> fw	GCACCCGGGGTTATGTTGAATAAGG	1139 – 1154 ^b
7.	<i>orf15_Xba</i> re	GCATCTAGAGCTAGTGAACTTGCGAC	7985 – 8002 ^b
8.	<i>orf1_Xma</i> re	TATCCCGGGTTATTTTATCGCAAAGG	3368 – 3384 ^a
9.	<i>oriT_HindIII</i> fw	CGGAAGCTTTGTCAGGTTAAACATATT	1180 – 1197 ^a
10.	<i>oriT_HindIII</i> rev	CGGAAGCTTTAGCGAATTTTAACAAAC	1342 – 1359 ^a
11.	<i>P_{rel}_GFP_XmaI</i> fw	ATACCCGGGAGAGATGGATCAATTCTG	366 – 383 ^h
12.	<i>oriT_XbaI_komp_re</i>	CGGTCTAGAGTCAGGTTAAACATATT	1181 – 1197 ^a
13.	<i>P_{nis}_Xho</i> fw	CTGCTCGAGAGTCTTATAACTATAC	8338 – 8353 ^c
14.	<i>oriT_XhoI_komp_re</i>	CGGCTCGAGGTCAGGTTAAACATATT	1181 – 1197 ^a
15.	<i>RFP_SalI</i> fw	AGAGTCGACCACCATGGCCTCC	2909 – 2921 ^d
16.	<i>RFP_NotI</i> rev	TATGCGGCCGCTACAGGAAC	3581 – 3597 ^d
17.	<i>pMSP_His_Xma</i> fw	TCACCCGGGAATTCATTAAAGAG	89 – 102 ^e
18.	<i>pMSP_His_Xba</i> re	GCATCTAGACAACGGTGGTATATC	417 – 431 ^e
19.	<i>T0_Term_XbaI</i> fw	GATTCTAGATCGACCTGCAGCCAAG	226 – 241 ^e
20.	<i>T0_Term_XhoI</i> re	CGTCTCGAGCTTAGCTCCTGAAAATC	371 – 388 ^e
21.	<i>rrnB_XhoI</i> re	TAGCTCGAGGGCGGATTTGTC	1202 – 1213 ^e
b. knock out Mutanten			
22.	<i>Gent_BglII</i> fw	TATAGATCTGGACCTACATGATGAATGG	41998 – 42016 ^f
23.	<i>Gent_BglII</i> rev	CTAAGATCTCTGGACTTGACTCACTTC	44018 – 44035 ^f
24.	<i>UPS7_Xba</i> fw	CGCTCTAGATTGCCTTACTCAACT	7141 – 7155 ^a
25.	<i>UPS7_BamHI</i> re	ATAGGATCCAGCTGTTGCTCCCAT	43 – 57 ^b
26.	<i>DWS7_BamHI</i> fw	CTCGGATCCGCAAGTTATGTTGA	1135 – 1148 ^b
27.	<i>DWS7_EcoRI</i> rev	TATGAATTCCCGTCTGATTCTGC	2160 – 2173 ^b
28.	<i>UPS10_XbaI</i> fw	GCGTCTAGAATTGCAAGTTATGTTG	1132 – 1147 ^b
29.	<i>UPS10_BamHI</i> rev	AGAGGATCCTGCTAATAAACTAGTC	2147 – 2162 ^b
30.	<i>DWS10_BamHI</i> fw	TCTGGATCCGACAACAGCGAATTAC	3777 – 3792 ^b
31.	<i>DWS10_EcoRI</i> rev	TACGAATTCCCTGAAACTGTATCTG	4796 – 4811 ^b
32.	<i>UPS15_XbaI</i> fw	AGTTCTAGAGAATCACTATCAGAATC	6143 – 6159 ^b
33.	<i>UPS15_BamHI</i> re	ACTGGATCCTGTAAAAGGGCAAT	7124 – 7138 ^b
34.	<i>DWS15_BamHI</i> fw	CTCGGATCCAGAATCTAATTAAGTAT	7955 – 7971 ^b
35.	<i>DWS15_EcoRI</i> re	TCAGAATTCCGTCATGAAGCACAG	646 – 660 ^g
a – pIP501 Acc. No. L39769		e – pQTEV Acc. No. AY243506	
b – pIP501 Acc. No. AJ505823		f – pSK41 Acc. No. AF051917	
c – pMSP3535 Acc. No. AY303239		g – pIP501 Acc. No. X72021	
d – pRHN1 (Anhang)		h – P_{rel}-gfp (Anhang)	

Tab. 2.4: Für Screenings und EMSAs verwendete Oligonukleotide.

Nr.	Name	Nukleotidsequenz (5'→3')	Position
a. Screening der <i>cross over</i> Mutanten			
36.	delta7_A fw	AATGCGTTTGCTTAACCCAGG	6662 – 6682 ^a
37.	delta7_B re	GATCCTGGACCACCTACTAC	2253 – 2272 ^b
38.	delta7_C fw	TTCATATCATGGGAGCAACAGC	35 – 56 ^b
39.	delta7_D re	TCCTTATTCAACATAACTTGC	1135 – 1155 ^b
40.	delta10_A fw	AGTTATCGAGTAGTGCCAGC	1099 – 1118 ^b
41.	delta10_B re	CCTAACAAGCTATCGATTGG	4855 – 4877 ^b
42.	delta10_C fw	CGCAAATGACTAGTTTATTAGC	2143 – 2161 ^b
43.	delta10_D re	AATGGTAATTCGCTGTTGTC	3777 – 3796 ^b
b. Screening für <i>virB1</i>, <i>virB4</i>, <i>virD4</i> ähnliche Gene und Relaxase-Gene			
44.	<i>orf5</i> _pIP501 fw	GTTTTATTTGATCCCGAAGATGAAC	5640 – 5664 ^a
45.	<i>orf5</i> _pIP501 re	GCGGATTGTTGGTTATTTCTTCAA	6274 – 6297 ^a
46.	<i>orf7</i> _pIP501 fw	CAATGGGCTACAATTACCGC	605 – 624 ^b
47.	<i>orf7</i> _pIP501 re	ACAAGAAGCGTACCGTCTGC	1039 – 1058 ^b
48.	<i>orf10</i> _pIP501 fw	TGATTCGATCGGTTGTTTCAGGTAG	3660 – 3683 ^b
49.	<i>orf10</i> _pIP501 re	CCATTAGATCGAACTTGGGACGGCT	2907 – 2931 ^b
50.	<i>traE</i> _pSK41 fw	TATCATTGATCC(T/C)GAA(A/G)ATGAAT	27456 – 27478 ^c
51.	<i>traE</i> _pSK41 re	TCTTTTGT(T/G)ATTTCGTCCCATAA	28060 – 28082 ^c
52.	<i>traG</i> _pSK41 fw	GTGTTGACGGTTCGGGTATC	30132 – 30151 ^c
53.	<i>traG</i> _pSK41 re	TTTTCCGTCTGAACCTCCAC	30570 – 30589 ^c
54.	<i>traK</i> _pSK41 fw	TTATCTAAAGACCACCCAGCTAGAG	34636 – 34660 ^c
55.	<i>traK</i> _pSK41 re	TACTTGTTTCAAACCTCTACAGTAGC	35185 – 35209
56.	pRI1 <i>mob</i> fw	TAATCGCTCTAAACGCTGGC	4756 – 4775 ^d
57.	pRI1 <i>mob</i> re	ATGAGCGAGAAAAGGCTCTG	5140 – 5159 ^d
58.	pSK41 <i>pre</i> fw	CTGGACTAAAAGGCATGCAA	20674 – 20693 ^c
59.	pSK41 <i>pre</i> re	GCAGTTTTCCATCACGCATA	20298 – 20317 ^c
60.	pSK41 <i>nes</i> fw	AGCGCTAGTAGGATTAAAG	10016 – 10034 ^c
61.	pSK41 <i>nes</i> re	CATAATAAATGTGCGTGAGG	9706 – 9725 ^c
62.	pT181 fw	TCGAACAGAATTATACAGGCAA	231 – 252 ^e
63.	pT181 re	CTGACTTATTTGCTCATGTTTAGC	605 – 628 ^e
64.	RSF1010 <i>mobA</i> fw	GCCAAGGCCGACTACATCCAGC	3310 – 3331 ^f
65.	RSF1010 <i>mobA</i> re	GGTGGCAGTGCGGGTTCTCG	3597 – 3616 ^f
66.	pIP501 <i>orf1</i> fw	TCGAAGTGGTGAAAAATTGTATAG	1471 – 1494 ^a
67.	pIP501 <i>orf1</i> re	AGCATAATGTGAGCATGAGG	1790 – 1809 ^a
68.	pSMA23 <i>mob</i> fw	GGTGGGCTTGGGTAATCAT	670 – 688 ^g
69.	pSMA23 <i>mob</i> re	TG(T/G)GGAGTACTCTCATCAAGA	1000 – 1020 ^g
70.	pK214 <i>nel</i> fw	GAATTTAACGTTGCTTTGCC	7138 – 7157 ^h
71.	pK214 <i>nel</i> re	AATTCAGCACGTTTCATCACG	7588 – 7607 ^h
72.	pRS01 <i>ltrB</i> fw	ACGCCAGGCAAAAGACTATGT	6786 – 6806 ⁱ
73.	pRS01 <i>ltrB</i> re	AATTCATATTCGCCACCTGT	7162 – 7181 ⁱ
74.	plca36 <i>mob</i> fw	AAGA(A/G)TTTAACGTGGCT(T/C)TACC	3597 – 3618 ^j
75.	plca36 <i>mob</i> re	TTTGTTTCGCTATCGGTTTCC	4471 – 4490 ^j
c. EMSA			
76.	random	AGAATGTTGAACGACGAACTAAAAATA GACTAGCGGTTGAAT	2179 – 2220 ^k

77.	random compl.	ATTCAACCGCTAGTCTATTTTTAGTTC GTCGTTCAACATTCT	2179 – 2220 ^k
78.	42mer	CTAAGGGCGCACTTATACGCAGTAACT TCGTTACTTCGTATT	1256 – 1297 ^a
79.	42mer compl.	AATACGAAGTAACGAAGTTACTGCGTA TAAGTGCGCCCTTAG	1256 – 1297 ^a

a – pIP501 Acc. No. L39769
b – pIP501 Acc. No. AJ505823
c – pSK41 Acc. No. AF051917
d – pRI1 Acc. No. EU327398
e – pT181 Acc. No. CP001783
f – RSF1010 Acc. No. M28829

g – pSMA23 Acc. No. DQ116709
h – pK214 Acc. No. X92946
i – pRS01 Acc. No. U50902
j – plca36 Acc. No. CP000935
k – pIP501 Acc. No. AJ301605

Tab. 2.5: Für Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide.

Nr.	Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Position
80.	1-15932 fw	CCACTTCGATAAGAAGCCATTG	1458-1479 ^a
81.	<i>orf1</i> 550 seq fw	TGTTTCTGAAATTCGTAAAG	1960 - 1979 ^a
82.	<i>orf1</i> 1125 seq fw	AAGTTAGAGCAATGGTTAAT	2541 - 2560 ^a
83.	<i>orf1</i> mitte rev	CTATGACTGAATCTATTGAAA	2850 - 2870 ^a
84.	<i>orf1</i> 3110 fw	GTTGTTAATCGCAATGCT	3110 - 3127 ^a
85.	1-14220 re	TCCCAAGAATTGGATAAAGACG	3191-3212 ^a
86.	1-13889 fw	GCTTGAACATAATTCGCTTGTGG	3502-3524 ^a
87.	<i>orf3</i> 4201 fw	AAGCGATACGATGAAAG	4201 - 4217 ^a
88.	<i>orf4</i> 4745 fw	TGTACGATTGGCGAGATG	4745 - 4762 ^a
89.	1-12672 re	AATGTGTACGATTGGCGAGATG	4741-4762 ^a
90.	1-12262 fw	GCGTTTGAGCAATTTTCATTTT	5130-5151 ^a
91.	1-11390 re	CCGATTTTCCAACATTTTCAGAC	6025-6047 ^a
92.	1-11108 fw	GTTACAATTTGCGGATTGTTGG	6286-6307 ^a
93.	<i>orf5</i> 6688 fw	ATGAAGATATTTACGGCGTT	6688 - 6707 ^a
94.	1-10137 re	TGTAGAAGCAGTTGAAAGCTTGG	7278-7300 ^a
95.	<i>orf6</i> 7234 fw	CGTATTGAGGTTCTAACA	7234 - 7251 ^a
96.	1-9769 fw	TGGTATAATCACCAAGTTTCACG	7626-7649 ^a
97.	1-9483 re	TCGATCCTAAACGTCAAATCAG	7934-7955 ^a
98.	18-6982 re	CATATAGCCCACAACAAAACACG	1493-1515 ^b
99.	18-6452r	CTGTTTCATGGATCGGCTTATTG	2025-2046 ^b
100.	18-5558 re	ACTTGGGACGGCTTAGTGAATC	2919-2940 ^b
101.	18-5475 fw	CAATTTTGCGTTGTGCTTATCC	2980-3002 ^b
102.	18-4790 fw	CTTCTGATTTCGATCGGTTGTTT	3666-3687 ^b
103.	18-4907 re	CAGCACAAACAACGAAAAGTGC	3570-3591 ^b
104.	18-4106 re	TTCAATCCAGTCATTGTTGACG	4373-4394 ^b
105.	18-3921 fw	TTCATCATGTTGTCCTTTGTTCC	4536-4558 ^b
106.	18-3298 re	GATTCAACAAGTCGCCAATGAC	5181-5202 ^b
107.	18-3209 fw	ACGCCACCATTAAAGAAATTGG	5249-5270 ^b
108.	18-2436 re	TACCGCAGACAGAAATTCCAAC	6045-6066 ^b
109.	18-2348 fw	ATTCGTTTGTGTTTGGTTT	6112-6133 ^b
110.	18-282 rev	AACGGCTTCTTGTGACAACCTC	6605-6625 ^b
111.	18-1717 re	ATCCCAAGCTTACCGTAACAAC	6764-6786 ^b
112.	18-1586 fw	TTCTTTCCTAACAACCTGGCTTGC	6891-6913 ^b
113.	18-325 fw	CTTCGTCCGCAAACTAACAAG	7172-7193 ^b
114.	18- 919 re	GAACCAACGGAACCAACAGAG	7346-7366 ^b

115.	18-813 fw	CTTGGTTCTGTTGGCTCTGTTG	7647-7668 ^b
116.	pMSP_MCS_fw	GTTAGATACAATGATTTTCGTTTCG	8194 – 8216 ^c
117.	pMSP_MCS_rev	CCTTTGAGTGAGCTGATACCGC	7785 – 7706 ^c
118.	pJP _{rel_gfp} fw	TCCACACAATCTGCCCTTTC	1013 – 1032 ^d
119.	pJP _{rel_gfp} rev	TGCATCACCTTCACCTCTC	501 – 520 ^d
120.	1-9040 fw	ACCGTATTACCGCCTTTGAGTG	7773 – 7794 ^c
121.	1-9412 rev	GCTTGGATTTGGTATCTGTTTC	8116 – 8137 ^c

a – pIP501 Accession Nummer L39769

c – pMSP3535 Accession Nummer AY303239

b – pIP501 Accession Nummer AJ505823

d – P_{rel-gfp} (Anhang)

2.8 PCR-Programme

P1	95 °C	90 s	} 30 x	P6	95 °C	1 min	} 30 x
	53 °C	90 s			55 °C	1 min	
	72 °C	60 s			72 °C	1 min	
	72 °C	5 min			72 °C	5 min	
P2	95 °C	90 s	} 30 x	P7	98 °C	2 min	} 30 x
	54 °C	90 s			98 °C	30 s	
	72 °C	60 s			56 °C	30 s	
	72 °C	5 min			72 °C	150 s	
					72 °C	10 min	
P3	95 °C	2 min	} 32 x	P8	95 °C	2 min	} 30 x
	95 °C	90 s			95 °C	30 s	
	52,5 °C	90 s			55 °C	45 s	
	68 °C	5 min			72 °C	90 s	
	68 °C	10 min			72 °C	7 min	
P4	95 °C	2 min	} 30 x	P9	98 °C	2 min	} 30 x
	95 °C	60 s			98 °C	20 s	
	55 °C	45 s			53 °C	30 s	
	72 °C	330 s			72 °C	90 s	
	72 °C	10 min			72 °C	5 min	
P5	95 °C	2 min	} 15 x	P10	95 °C	2 min	} 30 x
	95 °C	60 s			95 °C	30 s	
	50 °C	90 s			55 °C	30 s	
	72 °C	2 min			72 °C	120 s	
	95 °C	60 s	} 10 x		72 °C	5 min	
	52 °C	90 s					
	72 °C	2 min					
	72 °C	7 min					

P11	95 °C	1 min	} 35 x
	56 °C	1 min	
	72 °C	1 min	
	72 °C	5 min	

2.9 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt und, falls erforderlich, sterilisiert.

2.9.1 Allgemeine Lösungen

TE 10/0,1	10 mM	TRIS/Cl
	0,1 mM	EDTA pH 8

50 x TAE	2 M	TRIS/Cl
	50 mM	EDTA pH 8
	1M	Essigsäure

Als Gelpuffer für die Agarosegelelektrophorese wurde 1 x TAE, als Laufpuffer ½ x TAE eingesetzt.

6 x Loading dye	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	30 % (v/v)	Glyzerin

5 x TBE	89 mM	Tris Base
	89 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA (pH 8)

Lysepuffer für PCR-Lysate	50 mM	NaOH
	0,25 % (v/v)	SDS

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 einstellen

TELT - Puffer	50 mM	TRIS / Cl (pH 7,5)
	2,5 mM	EDTA (pH 8)
	2,5 M	LiCl
	0,4 % (v/v)	Triton X -100

Lysozym	0,1 g	Lysozym
	100 mL	TE 10/0,1

2.9.2 Puffer und Lösungen für Proteinanalysen

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

SDS - Sample Buffer 3x	0,1875 M	TRIS / Cl (pH 6,8)
	6 % (v/v)	SDS
	30 % (v/v)	Glyzerin
	0,006 % (w/v)	Bromphenolblau

5 x SDS - Laufpuffer	125 mM	TRIS / Cl
	1,25 M	Glyzin
	0,5 % (v/v)	SDS
		pH 8,5 mit HCl einstellen

Coomassie - Färbelösung für SDS-PAGE	7,5 % (v/v)	Eisessig
	50 % (v/v)	Methanol
	0,25 % (w/v)	Coomassie Brilliantblau

Entfärbelösung für SDS-PAGE	30 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Eisessig

2.9.3 Puffer und Lösungen für den Western Blot

Blocking - Puffer	27 mL	Aqua bidest.
	3 mL	Roti® Block

10 x Blot-Puffer Stammlösung (1 L)	140 g	Glyzin
	30 g	TRIS / Cl
1 x Blot-Puffer (1 L)	100 mL	10 x Blot-Puffer
	200 mL	Methanol
	1 mL	SDS (10 %)
10 x Ponceau S - Färbelösung	2 % (w/v)	Ponceau S
	30 % (w/v)	Trichloressigsäure
	30 % (w/v)	Sulfosalicylsäure
TBS	10 mM	TRIS / Cl (pH 7,5)
	150 mM	NaCl
TBS / Tween-20 / Triton X-100	20 mM	TRIS / Cl (pH 7,5)
	500 mM	NaCl
	0,05 % (v/v)	Tween 20
	0,2 % (v/v)	Triton X-100

2.9.4 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenzmikroskopie

Fixierlösung	37,5 %	Essigsäure
	12,5 %	Methanol
Lysis - Puffer	10 mM	TRIS pH 8
	50 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	20 % (w/v)	Saccharose
	15 mg · mL ⁻¹	Lysozym

2.9.5 Puffer und Lösungen für Fraktionierungen

Lysis - Puffer	50 mM	KH ₂ PO ₄ / K ₂ HPO ₄ pH 7
	1 mM	EDTA
	1 mM	MgCl ₂
	100 µg · mL ⁻¹	RNase
	100 µg · mL ⁻¹	DNase

3. METHODEN

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Anzucht von Mikroorganismen

E. coli wurde standardmäßig, falls nicht anders erwähnt, in LB Medium, *E. faecalis* in BHI bei 37°, 200 rpm angezogen. Bakterien der Gattung *Bacillus* wurden in LB bei 30°C, 200 rpm und Bakterien der Gattung *Staphylococcus* in BHI bei 37°C, 200 rpm angezogen.

3.1.2 Kultivierung für die Stammsammlung

Frisches Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurde mit 1% einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C, 200 rpm kultiviert bis zur optischen Dichte (OD₆₀₀) 0,3 – 0,7. Der Suspension wurde 30 % steriles Glyzerin zugemischt. Nach erneuter Inkubation bei 37°C, 200 rpm für 10 Minuten wurde die Bakteriensuspension aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die tiefgefrorenen Bakterienkulturen bei -80°C gelagert.

3.1.3 Herstellen kompetenter Zellen und Transformation kompetenter Zellen

a. *E. coli* EC1000 nach CaCl₂-Methode

Eine auf LB Agar vereinzelt Kolonie von *E. coli* EC1000 wurde in 50 mL LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C, 200 rpm inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden 300 µL in 50 mL frisches LB-Medium überimpft und bei 37°C, 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ 0,4 – 0,6 inkubiert. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei 0°C durchgeführt und sämtliche Materialien wurden auf 0°C vorgekühlt. Nach Zentrifugation (0°C, 5000 rpm, 5 min) wurde das Pellet in 20 mL CaCl₂-Lösung [50 mM] resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (0°C, 5000 rpm, 5 min) wurde das Pellet in 1 mL CaCl₂-Lösung suspendiert und über Nacht auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 mL 40%iges Glyzerin (in 50 mM CaCl₂) hinzugegeben und die kompetenten *E. coli* EC1000 wurden in 500 µL Aliquots in flüssigem N₂ schockgefroren. Für die Transformation der kompetenten *E. coli* EC1000 wurden 10 µL des Ligationsansatzes zusammen mit 50 µL H₂O und 20 µL TCM-Puffer (100 mM CaCl₂, 100 mM MgCl₂, 100 mM Tris pH 7,5) für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µL der kompetenten *E. coli* EC1000 hinzugegeben und der Ansatz wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde bei 42°C für 90 s durchgeführt mit anschließender Inkubation auf Eis für 2 min. Es wurde 1 mL auf 30°C vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben. Nach Inkubation des Ansatzes bei 37°C, 200 rpm für 1 h wurden

Aliquots á 200 µL auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

b. *E. faecalis* nach Lysozym-Methode

5 mL einer *E. faecalis* Übernachtskultur wurden in 95 mL BHI mit 0,25% Glyzin überführt und bis zu einer OD₆₀₀ 0,5 – 1,0 bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend zentrifugiert (6000 rpm, 4°C, 15 min). Das Pellet wurde in 2 mL eiskaltem 10%igen Glyzerin resuspendiert und auf zwei 1,5 mL Eppendorftubes aufgeteilt. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 1 min) wurde das Pellet in 500 µL Lysozymlösung (10 mM Tris pH8, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 20% Saccharose, 25 µg · mL⁻¹ Lysozym) resuspendiert und 20 bis 40 min, abhängig vom jeweiligen Stamm, bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Pellet dreimal mit 1 mL eiskaltem Elektroporationspuffer (0,5 M Saccharose, 10% Glyzerin) gewaschen. Schließlich wurde das Pellet in 250 µL Elektroporationspuffer aufgenommen und in 50 µL Aliquots bei -80°C gelagert. Für die Transformation der Enterokokken wurde ca. 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt, die Elektroporation erfolgte bei 1,6 kV, 25 µF, 200 Ω in einer 1 mm Elektroporationsküvette. Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen in 200 µL SBHI (0,5 M Saccharose, BHI) resuspendiert und 2h bei 37°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde schließlich auf BHI Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und 2 Tage bei 37°C inkubiert.

c. *E. faecalis* nach Glyzin-Methode

1 mL einer *E. faecalis* Übernachtskultur wurde mit 2 mL SBHI (s. 3.1.3. b) vermischt und 4 h bei 37°C inkubiert. 20 mL SBHI mit Glyzin (3% - 7%) wurden mit 100 µL der Vorkultur inokuliert und 2 Tage bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (6500 rpm, 4°C, 10 min) und zunächst mit 10 mL, anschließend mit 1 mL eiskaltem Elektroporationspuffer (s. 3.1.3. b) gewaschen. Das Pellet wurde in 200 µL Elektroporationspuffer resuspendiert und die Zellen á 50 µL aliquotiert. Die Elektroporation erfolgte in 2 mm Elektroporationsküvetten bei 2,0 kV, 25 µF, 200 Ω. Das Pellet wurde resuspendiert in 200 µL SBHI und 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf BHI Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und 2 Tage bei 37°C gelagert.

3.1.4 Konjugation / Kreuzung auf halbfesten Oberflächen

Kreuzungen (bi-/triparental, Retromobilisierungen) auf halbfesten Oberflächen fanden entweder direkt aus Übernachtskulturen (z.B. bei pIP501) oder aus exponentiell wachsenden Kulturen (z.B. bei Pheromon-induzierten Plasmiden wie pCF10-101) statt.

Bei Kreuzungen mit Übernachtskulturen wurden die jeweiligen Stämme im Verhältnis 1:10 bei biparentalen und 1:1:10 bei triparentalen Matings zusammengemischt. Anschließend wurde der Ansatz über eine Vakuumpumpe auf einen Nitrozellulosefilter (Porengröße < 0,45 µm) übertragen und über Nacht auf einer BHI Agarplatte bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 1 mL PBS resuspendiert und auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion der Transkonjuganten ausplattiert. Die Transferrate berechnet sich als Quotient aus der Anzahl der Transkonjuganten durch die Anzahl der Rezipienten.

Bei Kreuzungen mit exponentiell wachsenden Kulturen wurden aus den jeweiligen Übernachtskulturen je 500 µL abgenommen und zweimal mit je 500 µL frischem Medium gewaschen. Das jeweilige Pellet wurde anschließend 10-fach mit frischem Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ 0,5 inkubiert. Die Kreuzungspartner wurden dann in dem jeweiligen Verhältnis (1:10 bzw. 1:1:10) gemischt. Nach Zentrifugation (1 min, 8000 rpm) wurde das Pellet in 50 µL Überstand resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend auf einen Nitrozellulosefilter pipettiert und über Nacht auf einer BHI Agarplatte bei 37°C inkubiert. Der Kreuzungsansatz wurde in 1 mL PBS resuspendiert und auf BHI Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion der Transkonjuganten ausplattiert. Die Transferrate berechnet sich als Quotient aus der Anzahl der Transkonjuganten durch die Anzahl der Rezipienten.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Plasmidisolierungen aus *E. coli*

a. Für präparative Zwecke / Sequenzreaktionen

Plasmidisolierungen erfolgten mit dem *Kit Qiagen Plasmid Miniprep* von Qiagen. Die Bakterienzellen wurden einer alkalischen Lyse unterzogen. Anschließend wurde die DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Silikat-Matrix gebunden. Die Elution der reinen Plasmid-DNA erfolgte mit 50 µL 65°C warmem, bidestilliertem Wasser.

b. Für analytische Zwecke

Zur Isolierung von Plasmid-DNA für den Nachweis von Transformanten wurde von einer Übernachtskultur auf Agar der Bakterienrasen mit einem sterilen Spatel abgetragen und in

einer Kochsalzlösung (0,9 %) suspendiert. Die Suspension wurde für 30 s, 10 000 rpm pelletiert und anschließend in 200 µL TELT-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µL Lysozym ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) erfolgte eine Inkubation bei 95°C für 3 min, anschließend wurden die Proben 5 min auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation (15 min, 4°C, 13 000 rpm) wurde die Plasmid-DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 100 µL Isopropanol gefällt (30 min, 4°C, 13 000 rpm). Nach einem Waschschrift mit Ethanol (70 %) wurde die Plasmid-DNA in 50 µL bidestilliertem Wasser gelöst.

3.2.2 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, linear doppelsträngig, einzelsträngig), der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung sowie der Wahl des Laufpuffers. Superhelikale DNA wandert hierbei schneller als lineare, die offene Form der DNA wandert wesentlich langsamer als die lineare und die superhelikale DNA.

Für die analytische Auftrennung oder Reinigung von DNA-Fragmenten im Bereich von 0,5 kb – 20 kb wurden Agaroseflachbettgele mit einer Agarosekonzentration von 0,7 % - 1,5 % eingesetzt. Als Gelpuffer diente 1 x TAE, als Laufpuffer $\frac{1}{2}$ x TAE. Zum Beladen des Gels wurden die Proben mit 6 x *loading dye* versetzt. Für 0,7 %ige Agarosegele wurde die Elektrophorese standardmäßig bei 90 V für 90 Minuten durchgeführt. DNA-Fragmente in höherprozentigen Gelen wurden bei 120 V für 60 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurden die Gele nach der Elektrophorese für 20 Minuten in bidest. Wasser, dem $2,5 \text{ µg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Ethidiumbromid zugesetzt wurde, 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.

3.2.3 Elution von DNA aus *low-melting* (LM)-Agarosegelen

Für präparative Agarosegele zur Reinigung von DNA-Fragmenten wurde standardmäßig *low melting* Agarose eingesetzt. Im Gegensatz zu normalen Agarosegelen schmelzen LM-Agarosegele bereits bei ca. 60°C. Es ist somit möglich, DNA-Reinigungen über Agarosegelelektrophorese unter relativ milden Bedingungen durchzuführen.

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung der zu reinigenden DNA in 0,7 % LM-Agarose bei 60 V wurde die gewünschte Bande aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgte anschließend mit dem *peqGold gel extraction Kit* der Firma peqlab entsprechend den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 50 µL auf 65°C erhitztem bidestilliertem Wasser eluiert.

3.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Eine definierte Menge eines DNA-Standards sowie die zu bestimmende DNA-Probe wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und der Größe nach aufgetrennt. Die Konzentration der DNA wurde mit Hilfe des Computerprogramms *EasyWin 32* der Firma Herolab durch den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Banden bestimmt.

3.2.5 Restriktion

Restriktionsendonukleasen hydrolysieren sequenzspezifisch Phosphorsäurediesterbindungen in Doppelstrang-DNA. Die Spaltung kann entweder symmetrisch in glatten Enden oder versetzt unter Bildung eines 3'- oder 5'-Überhanges erfolgen.

DNA-Fragmente zur Klonierung wurden mit Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers in dem entsprechenden Puffer für 3 – 4 Stunden für PCR-Fragmente bzw. über Nacht für Plasmide mit 10 – 20 U je Enzym im Gesamtvolumen von 100 µL erzeugt.

3.2.6 Dephosphorylierung

Um eine Religation eines linearisierten Vektors bei einer Ligation zu vermeiden, wurde nach einer Restriktion der Ansatz 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert und eine Dephosphorylierung mit der Shrimp alkalischen Phosphatase (SAP) durchgeführt. Hierbei wird die DNA am 5'-Ende katalytisch dephosphoryliert. Der Ansatz wurde anschließend mit dem *Kit QiaEx®II* aufgereinigt und konnte dann für folgende Ligationsreaktionen verwendet werden.

3.2.7 Ligation

T4-DNA-Ligase zusammen mit dem Cofaktor ATP verknüpft doppelsträngige DNA unter Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-OH- und dem 5'-P-Terminus.

Linearisierter Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:6 eingesetzt. Der Reaktionsansatz (8 µL) ohne T4-DNA-Ligase und ohne Ligasepuffer wurde bei 70°C für 1 Minute denaturiert, 5 Minuten bei Raumtemperatur sowie 5 Minuten auf Eis

gelagert. Anschließend wurde der Ansatz mit Enzym (1 U) und entsprechendem Puffer für 12 – 24 Stunden bei 14°C inkubiert.

3.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion stellt eine Möglichkeit dar, gering konzentrierte DNA-Fragmente *in vitro* zu amplifizieren. Hierbei wird doppelsträngige DNA (die Matrix) bei 94°C – 96°C denaturiert. Im Folgeschritt hybridisieren Oligonukleotidprimer bei einer für jedes Primer-Paar charakteristischen Annealingtemperatur spezifisch an die Matrix. Im Elongationsschritt schließlich wird über die hitzestabile *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eine Kopie der Matrix synthetisiert, ausgehend vom 3'-OH-Ende des Primers.

Polymerasekettenreaktionen wurden, sofern nicht anders erwähnt, in 50 µL-Ansätzen durchgeführt. Standardansätze enthielten 40 pmol je Primer, 10 pmol dNTP's, 2 – 6 mM MgCl₂, 2,5 U *Taq*-Polymerase sowie 1 µL des entsprechenden Lysats als Matrix.

Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte, sofern notwendig, mit dem *Kit peqGold Cycle-Pure* der Firma peqlab.

Die PCR-Bedingungen für Klonierungen verwendeter PCR-Produkte sind in Tab. 3.1 zusammengefasst.

Tab. 3.1: PCR-Bedingungen der für die Klonierungen verwendeten PCR-Produkte.

DNA-Fragment	Primer 5'-3'	Primer 3'-5'	<i>taq</i> - Polymerase	MgCl ₂ [mM]	PCR- Programm	Größe [bps]
<i>oriT</i> _{pIP501}	<i>oriT_HindIII</i> fw	<i>oriT_HindIII</i> re	<i>Gentherm</i>	2	P1	179
<i>Gfp-oriT</i>	<i>P_{rel}_GFP_XmaI</i> fw	<i>oriT_XbaI_komp_re</i>	<i>Gentherm</i>	4	P2	1142
<i>T₀</i>	<i>T0_Term_XbaI</i> fw	<i>T0_Term_XhoI</i> re	<i>Gentherm</i>	6	P6	162
<i>Orf1</i>	<i>orf1_BamHI</i> fw	<i>orf1_Xma</i> re	<i>GoTaq / Pfu</i>	3	P5	2004
<i>Orf1-orf6</i>	<i>orf1_BamHI</i> fw	<i>orf6_XmaI</i> re	<i>Long PCR</i>	2	P3	6752
<i>Orf8-orf15</i>	<i>orf8_XmaI</i> fw	<i>orf15_Xba</i> re	<i>GoTaq / Pfu</i>	4	P4	6863
<i>P_{nis}-gfp-oriT-t₀</i>	<i>P_{nis}_Xho</i> fw	<i>T0_Term_XhoI</i> re	<i>Phusion</i>	1,5	P7	1739
<i>Orf7</i>	<i>orf7_XmaI</i> fw	<i>orf7_XmaI</i> re	<i>GoTaq / Pfu</i>	2	P8	1118
<i>rfp</i>	<i>RFP_SalI</i> fw	<i>RFP_NotI</i> re	<i>Gentherm</i>	2	P6	688
<i>His₇-rfp</i>	<i>pMSP_His_Xma</i> fw	<i>pMSP_His_Xba</i> re	<i>Gentherm</i>	2	P6	1011
<i>His₇-orf7</i>	<i>pMSP_His_Xma</i> fw	<i>pMSP_His_Xba</i> re	<i>Gentherm</i>	2	P11	1462
<i>UPS7</i>	<i>UPS7_Xba</i> fw	<i>UPS7_BamHI</i> re	<i>Phusion</i>	1,5	P9	1017
<i>DWS7</i>	<i>DWS7_BamHI</i> fw	<i>DWS7_EcoRI</i> rev	<i>Precisor</i>	2	P9	1038
<i>UPS10</i>	<i>UPS10_XbaI</i> fw	<i>UPS10_BamHI</i> rev	<i>Phusion</i>	3,5	P9	1030
<i>DWS10</i>	<i>DWS10_BamHI</i> fw	<i>DWS10_EcoRI</i> rev	<i>Precisor</i>	2	P9	1034
<i>UPS15</i>	<i>UPS15_XbaI</i> fw	<i>UPS15_BamHI</i> re	<i>Phusion</i>	1,5	P9	995
<i>DWS15</i>	<i>DWS15_BamHI</i> fw	<i>DWS15_EcoRI</i> re	<i>Phusion</i>	1,5	P9	1028
<i>aacA-aphD</i>	<i>Gent_Bg/II</i> fw	<i>Gent_Bg/II</i> re	<i>Phusion</i>	1,5	P7	2037

3.2.9 Herstellung von Zelllysaten als Matrizie für die PCR

Von einer Übernachtskultur wurden 100 μL abgenommen und zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Der Überstand wurde abgetrennt, das Pellet in 20 μL Lysis-Puffer resuspendiert und 20 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden 180 μL bidestilliertes Wasser hinzugegeben. Hiervon wurde standardmäßig 1 μL als Matrizie in der PCR eingesetzt.

3.2.10 Identifizierung von Transformanten

a. Mittels Plasmidisolierung und Restriktion

15 μL Plasmid-DNA aus der TELT-Präparation (s. 2.2.2.1 b) wurden für die Identifizierung von Transformanten eingesetzt. Die Restriktion erfolgte über die Schnittstellen, über die das DNA-Fragment in den Vektor inseriert wurde. Standardmäßig wurden pro Ansatz 0,5 U je Enzym eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend über Agarosegelelektrophorese analysiert. Transformanten mit Insert erschienen im Gel mit 2 Banden (Insert sowie linearisierter Vektor), Transformanten ohne Insert dagegen ergaben nur eine Bande im Gel.

b. Mittels PCR

Für die Identifizierung von Transformanten über PCR wurde in PCR-Reaktionsgefäßen 5 μL steriles bidestilliertes Wasser vorgelegt, das dann über eine sterile Impföse mit Zellen des zu untersuchenden Transformanten beimpft wurde. In die Reaktionsgefäße wurde anschließend 5 μL eines PCR-Mastermixes pipettiert.

PCR-Mastermix (2 x):	40 μL	Gentherm-Puffer 10 x
(für 40 Ansätze)	16 μL	dNTP's [10mM]
	16 μL	Sequenzprimer fw [20 pmol $\cdot$ μL^{-1}]
	16 μL	Sequenzprimer rev [20 pmol $\cdot$ μL^{-1}]
	24 μL	MgCl ₂ [50 mM]
	86 μL	H ₂ O
	2 μL	Taq-Polymerase [5U $\cdot$ μL^{-1}]

Beim ersten Denaturierungsschritt lysierten die Zellen, die Plasmid-DNA lag nun frei vor und konnte amplifiziert werden.

Zur Auswertung der PCR wurde der gesamte PCR-Ansatz auf ein Agarosegel geladen. Transformanten mit Insert zeigten eine Bande, die der Größe des Inserts + 300 bp entsprach, Transformanten ohne Insert ergaben eine ca. 300 bp große Bande.

c. Mittels zyklischer Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten nach der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Hierbei wird die zu sequenzierende DNA in einer PCR amplifiziert. Zusätzlich zu dNTP's werden Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP's) in der PCR angeboten. Die vier ddNTP's, die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, führen nach Einbau in die DNA zu einem Kettenabbruch an der Einbaustelle. Nach einer Auftrennung der Bruchstücke über eine Kapillarelektrophorese kann die Sequenz mit entsprechender Software (ABI Prism 310 Data Collection Software, ABI Prism 310 DNA Sequencing Analysis Software, Gene Scan Analysis Software) ausgewertet werden.

Die zyklischen Sequenzierungen von Transformanten wurden entweder von einem Sequenzierservice der Humboldt-Universität Berlin, Institut für Genetik, oder von der Firma GATC Biotech, Konstanz, durchgeführt.

3.2.11 Klonierung der *his7*-tag Expressionsvektoren für *E. faecalis*

Ausgehend von dem *E. coli* Expressionsvektor pQTEV-*orfX* ($X = 1, 3, 6, 7, 9, 15$) wurde die ribosomale Bindestelle, die *his7*-Region zusammen mit dem Transfergen *orfX* sowie eine Terminationssequenz (t_0 aus dem λ -Phagen) über eine PCR mit dem Primerpaar pMSP_His_*Xma* fw und pMSP_His_*Xba* re amplifiziert (s. Tab. 3.1). Das Amplifikat wurde mit dem Kit CyclePure (PeqLab) entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend einer Restriktion mit *Xma*I und *Xba*I unterzogen. Die Aufreinigung des geschnittenen PCR-Produkts erfolgte mit dem Kit QiaExII (Qiagen). Das *E. coli* / *E. faecalis* Shuttleplasmid pMSP3535VA wurde ebenfalls mit den Enzymen *Xma*I und *Xba*I linearisiert. Es folgte eine Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme bei 65°C für 20 min mit anschließender Dephosphorylierung entsprechend der Angaben des Herstellers. Das Plasmid wurde schließlich mit dem Kit QiaExII (Qiagen) aufgereinigt. Die Ligation wurde standardmäßig in einem molaren Verhältnis Plasmid:Insert = 1:3 angesetzt. *E. coli* XL10 Gold wurde mit 2 μ L des Ligationsansatzes nach Angaben des Herstellers transformiert und auf LB Agarplatten, denen 50 μ g $\cdot$ mL⁻¹ Kanamycin zugesetzt wurde, ausplattiert.

3.2.12 Klonierung der up- und downstream Regionen von *orf7*, *orf10* und *orf15* sowie des *aacA-aphD* Gens in den Vektor pCJK47

Die up- und downstream Regionen von *orf7*, *orf10* und *orf15* wurden mit PCR ausgehend vom Plasmid pIP501 amplifiziert (s. Tab 3.1). Die Primer wurden so gewählt, dass die für die ersten N-terminalen und letzten C-terminalen Aminosäuren kodierenden Basen des entsprechenden Gens amplifiziert wurden, um das Leseraster nicht zu unterbrechen. Die Amplifikate (UPS7, UPS10, UPS15, DWS7, DWS10, DWS15) wurden mit dem Kit CyclePure (PeqLab) entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend einer Restriktion mit *XbaI* / *BamHI* (UPS7, UPS10, UPS15) bzw. *BamHI* / *EcoRI* (DWS7, DWS10, DWS15) unterzogen. Die Aufreinigung der geschnittenen PCR-Produkte erfolgte mit dem Kit QiaExII (Qiagen). Der Vektor pSK⁻ wurde mit den Enzymen *XbaI* / *BamHI* linearisiert. Es folgte eine Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme bei 65°C für 20 min mit anschließender Dephosphorylierung entsprechend der Angaben des Herstellers. Das Plasmid wurde schließlich mit dem Kit QiaExII (Qiagen) aufgereinigt. Die Ligation des Vektors mit den Fragmenten UPS7, UPS10 und UPS15 wurde in einem molaren Verhältnis Plasmid:Insert = 1:3 angesetzt. *E. coli* XL10 Gold wurde mit 2 µL des Ligationsansatzes nach Angaben des Herstellers transformiert und auf LB Agarplatten, denen 100 µg · mL⁻¹ Ampicilin zugesetzt wurde, ausplattiert. Nach Identifizierung von Transformanten, die das Insert eingebaut hatten, und Überprüfung der Sequenz wurde das Plasmid mit *BamHI* und *EcoRI* linearisiert, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung der Enzyme sowie Dephosphorylierung des geschnittenen Plasmids. Anschließend folgte die Aufreinigung des Plasmids mit dem Kit QiaExII (Qiagen). Die Ligation des Vektors mit den Fragmenten DWS7, DWS10 und DWS15 wurde in einem molaren Verhältnis Plasmid:Insert = 1:3 angesetzt. *E. coli* XL10 Gold wurde mit 2 µL des Ligationsansatzes nach Angaben des Herstellers transformiert und auf LB Agarplatten, denen 100 µg · mL⁻¹ Ampicilin zugesetzt wurde, ausplattiert. Transformanten wurden mittels Sequenzierung auf ein intaktes Insert verifiziert. Die so erhaltenen Konstrukte wurden mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten und das Insert (up- und downstream Region) in den Suicidevektor pCJK47::*EcoRI/XbaI* ligiert (molares Verhältnis Vektor:Insert=1:3). *E. coli* EC1000 wurde mit dem kompletten Ligationsansatz transformiert (3.1.3 a) und auf BHI Agarplatten mit 500 µg · mL⁻¹ Erythromycin ausplattiert.

Schließlich wurde in die konstruierten Plasmide noch eine Gentamicinresistenz kloniert. Hierfür wurde das Gen *aacA-aphD* von pSK41 zusammen mit Promotor und Terminator (Rouch *et al.*, 1987) in einer PCR amplifiziert (Tab 3.1), aufgereinigt mit dem Kit CyclePure (PeqLab) entsprechend den Angaben des Herstellers und mit dem Enzym *Bgl/II* geschnitten.

Die Aufreinigung des geschnittenen PCR-Produkts erfolgte mit dem Kit QiaExII (Qiagen). Der Vektor (pCJK47ΔX, X=7, 10, 15) wurde mit dem Enzym *Bgl*II linearisiert, das Enzym hitzeinaktiviert und das lineare Plasmid dephosphoryliert. Das Plasmid wurde schließlich mit dem Kit QiaExII (Qiagen) aufgereinigt. Die Ligation erfolgte im molaren Verhältnis Vektor:Insert=1:3. *E. coli* EC1000 wurde mit dem kompletten Ligationsansatz transformiert (3.1.3 a) und auf BHI Agarplatten mit 20 µg · mL⁻¹ Gentamicin ausplattiert. Die erhaltenen Plasmide wurden vereinfachend pKAΔ7, pKAΔ10 und pKAΔ15 genannt.

3.2.13 Herstellen von *cross over* Mutanten über homologe Rekombination

Die Herstellung der *cross over* Mutanten erfolgte in Anlehnung an Kristich *et al.* (2007) mit Modifikationen. *E. faecalis* CK111 (pCF10-101) wurde mit den in 3.2.12 erzeugten Konstrukten transformiert (s. 3.1.3 b, Selektion auf BHI Agarplatten mit 20 µg · mL⁻¹ Erythromycin und 200 µg · mL⁻¹ XGal). Der Suicidevektor pKAΔX (X=7, 10, 15) wurde über ein biparentales Mating in *E. faecalis* OG1RF (pIP501) überführt (Selektion auf BHI Agarplatten mit 50 µg · mL⁻¹ Fusidinsäure, 20 µg · mL⁻¹ Chloramphenicol, 20 µg · mL⁻¹ Erythromycin, 100 µg · mL⁻¹ Gentamicin und 200 µg · mL⁻¹ XGal). Kolonien, die durch Integration des Suicidevektors in das Chromosom oder pIP501 blau erschienen, wurden über Vereinzelungsausstriche gereinigt und dann auf Integration des Plasmids up- oder downstream des entsprechenden Gens per PCR untersucht. Hierfür wurden Lysate der Kolonien mit den Primerpaaren deltaX_A fw / deltaX_D re und deltaX_C fw / deltaX_B re (X=7, 10, 15) untersucht (Tab. 3.2 + Tab. 3.3). Kolonien, bei denen der Suicidevektor up- oder downstream des betreffenden Gens integriert war, wurden ohne Antibiotika drei mal bis zur stationären Phase inkubiert und anschließend auf MM9YEG Agarplatten mit 50 µg · mL⁻¹ Fusidinsäure, 20 µg · mL⁻¹ Chloramphenicol, 200 µg · mL⁻¹ XGal und 10 mM p-Chlor-Phenylalanin ausplattiert. Weiße Kolonien wurden zweimal vereinzelt und mit dem in Tab. 3.2 und Tab. 3.3 angegebenen PCR Screens auf Deletion des entsprechenden Gens hin untersucht.

Tab. 3.2: PCR-Produktgrößen bei Integration des Suicidevektors up- oder downstream des betreffenden Gens.

Primerpaar	<i>orf7</i>		<i>orf10</i>		<i>orf15</i>	
	UPS	DWS	UPS	DWS	UPS	DWS
deltaX_A fw	1523 bp	2594 bp	1089 bp	2697 bp	1237 bp	2047 bp
deltaX_D re						
deltaX_C fw	2238 bp	1167 bp	2731 bp	1123 bp	2763 bp	1953 bp
deltaX_B re						

UPS – Integration des Suicidevektors upstream des betreffenden Gens

DWS – Integration des Suicidevektors downstream des betreffenden Gens

Tab. 3.3: PCR-Bedingungen für die Screenings nach cross over Mutanten.

Name	Primer 5'-3'	Primer 3'-5'	<i>taq</i> - Polymerase	MgCl ₂ [mM]	PCR- Programm	Größe* [bps]
AD_delta7	delta7_A fw	delta7_D re	<i>Gentherm</i>	2	P10	2594
BC_delta7	delta7_C fw	delta7_B re	<i>Gentherm</i>	2	P10	2238
AD_delta10	delta10_A fw	delta10_D re	<i>Gentherm</i>	2	P10	2697
BC_delta10	delta10_C fw	delta10_B re	<i>Gentherm</i>	4	P10	2731
AD_delta15	delta15_A fw	delta15_D re	<i>Gentherm</i>	2	P10	2047
BC_delta15	delta15_C fw	delta15_B re	<i>Gentherm</i>	2	P10	2763

* – bezogen auf pIP501 als Template.

3.2.14 Oligonukleotid-Markierung mit γ -³²P-ATP

Die Markierung von HPLC-gereinigten Oligonukleotiden erfolgte mit der T4 Polynukleotid-Kinase über eine Phosphorylierung der DNA am 5'-Ende.

Für die Markierung wurden 50 pmol des Oligonukleotids zusammen mit 2 μ L γ -³²P-ATP [110 TBq · mmol⁻¹] und 10 U T4-Polynukleotid-Kinase in einem 20 μ L Ansatz für 90 min bei 37°C inkubiert. Es erfolgte eine Inaktivierung der Kinase bei 95°C für 5 min. Um nicht-gebundenes γ -³²P-ATP zu entfernen, wurde der Reaktionsansatz über eine Sephadex G-50 Säule aufgereinigt. Die Elution erfolgte durch Waschen mit 5 x 200 μ L TE 10/1. Die Fraktion mit der höchsten Aktivität wurde für die nachfolgenden Experimente verwendet.

3.2.15 Induktion des *nisA* Promotors

Zur Induktion des *nisA* Promotors wurde entweder zu einer exponentiell wachsenden Kultur (OD₆₀₀ 0,5) 100 ng · mL⁻¹ Nisin hinzugegeben und der Ansatz wurde für mindestens vier Stunden weiter inkubiert oder der entsprechende Stamm wurde auf Agarmedium, dem 100 ng · mL⁻¹ Nisin hinzugegeben worden war, ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C (bei *B. subtilis* 30°C) inkubiert.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für Proteinanalysen wurden denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen durchgeführt. Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel betrug in allen Fällen 5 %, für die Trenngele wurden Acrylamidkonzentrationen von 10 % - 15 % verwendet (Tab. 3.4).

Es wurden jeweils, falls nicht anders vermerkt, 25 µL Proteinprobe geladen. Vom Proteinstandard peqGOLD Protein-Marker I, peqlab, wurden jeweils 10 µL verwendet.

Die Elektrophorese wurde zunächst für 10 Minuten mit 100 V betrieben, anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 180 V für 50 – 60 Minuten.

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde nach elektrophoretischer Auftrennung in *Coomassieblue*-Färbelösung angefärbt und anschließend über Nacht entfärbt im Entfärber für SDS-PAGE (30 % Methanol, 10 % Eisessig). Die Gele wurden getrocknet und zur Dokumentation am PC eingescannt.

Tab. 3.4: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele für SDS-PAGE-Analysen (Sambroock *et al.*, 1989).

Trenngel	10 %	12 %	15 %
H ₂ O dest.	4 mL	3,3 mL	2,3 mL
Acrylamid 30 %	3,3 mL	4 mL	5 mL
Tris-HCl pH 8,8 [1,5 M]	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	5 µL	5 µL	5 µL
Sammelgel	5 %		
H ₂ O dest.	3,4 mL		
Acrylamid 30 %	830 µL		
Tris-HCl pH 8,8 [1,5 M]	630 µL		
SDS 10 %	50 µL		
APS 10 %	5 µL		
TEMED	5 µL		

3.3.2 Fraktionierung von *Enterococcus* Zellkompartimenten mittels sequentieller Zentrifugation

Fraktionierungen der *E. faecalis* Zellkompartimente erfolgten nach Buttaro *et al.* (2000) mit Modifikationen. *E. faecalis* (pIP501) wurde in 50 mL BHI bis zu einer OD₆₀₀ 0,5 angezogen. Die Kultur wurde 15 min auf Eis abgekühlt und zweimal mit 40 mL kaltem Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 50 mM) gewaschen (Zentrifugation bei 6000 rpm, 15 min,

4°C). Das Pellet wurde in 750 µL Lysis-Puffer (50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 7, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 100 µg · mL⁻¹ DNase, 100 µg · mL⁻¹ RNase) resuspendiert und mit der *Lysing Matrix E* (1,4 mm Keramikkugeln, 0,1 mm Silicakugeln, 4 mm Glaskugeln) zweimal 60 s, 5,5 m · s⁻¹ in der FastPrep®-24 aufgeschlossen. Unlysiertes Material sowie Kugeln wurden abgetrennt (1500 rpm, 20 min, 4°C). Nach Zentrifugation des Überstandes (13000 rpm, 20 min, 4°C) wurde das Pellet (entspricht der Zellwandfraktion) in Kaliumphosphatpuffer resuspendiert, um Verunreinigungen mit cytoplasmatischen und Membranproteinen herauszuwaschen. Das so erhaltene Pellet wurde in Kaliumphosphatpuffer resuspendiert (Zellwandfraktion). Nach Ultrazentrifugation des Überstandes (Membran + Cytoplasma) (45000 rpm, 2h, 4°C) wurde das erhaltene Pellet in Kaliumphosphatpuffer, 1 % Triton X-100 gelöst (Membranfraktion). Der Überstand nach Ultrazentrifugation wurde aufkonzentriert und enthielt die löslichen, cytoplasmatischen Proteine (Cytoplasmafraktion) (Abb. 3.1).

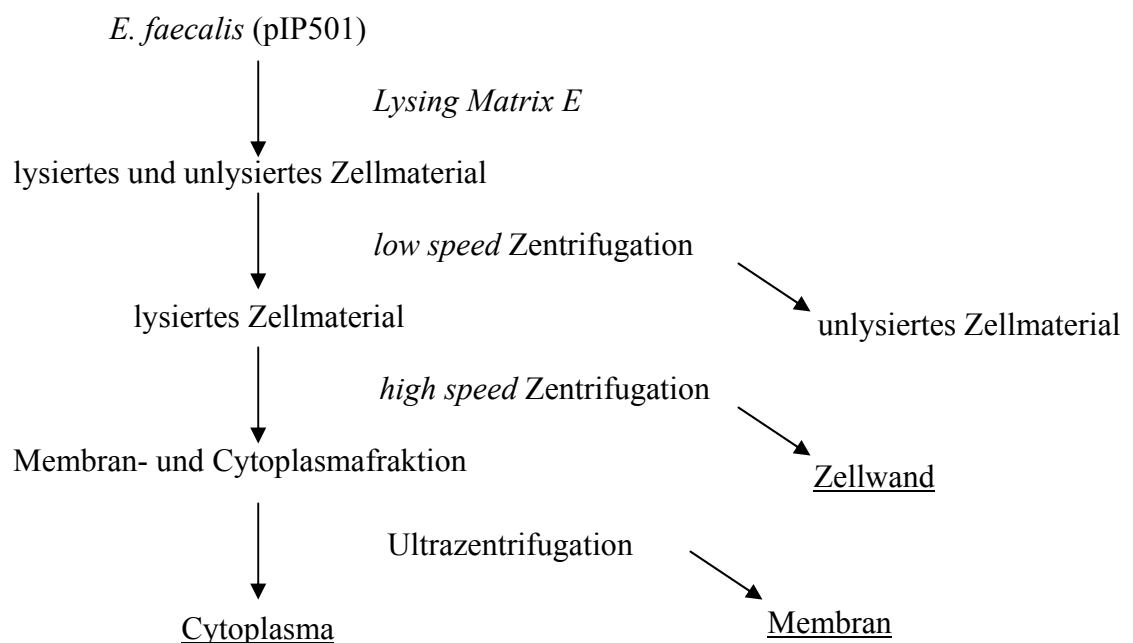


Abb. 3.1: Fließschema zur Fraktionierung von *E. faecalis*.

3.3.3 Modifizierte Fraktionierung von *Enterococcus* Zellkompartimenten mittels sequentieller Zentrifugation

E. faecalis (pIP501) wurde in 50 mL BHI bis zu einer OD₆₀₀ 0,5 angezogen. Die Kultur wurde 15 min auf Eis abgekühlt und zweimal mit 40 mL kaltem Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 50 mM) gewaschen (Zentrifugation bei 6000 rpm, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde in 1 mL TES Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 25 % Saccharose, 1 mg · mL⁻¹ Lysozym, 6,25 U · mL⁻¹

Mutanolysin, 0,1 mg · mL⁻¹ RNase) resuspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand nach Zentrifugation (13000 rpm, 20 min, 4°C) wurde über einen Filter (Porengröße 0,45 µm) gereinigt und enthielt die Zellwandfraktion. Das Pellet wurde zweimal in Kaliumphosphatpuffer gewaschen, in 750 µL Lysis-Puffer (50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 7, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 100 µg · mL⁻¹ DNase, 100 µg · mL⁻¹ RNase) resuspendiert und mit der *Lysing Matrix E* (1,4 mm Keramikkugeln, 0,1 mm Silicakugeln, 4 mm Glaskugeln) zweimal 60 s, 5,5 m · s⁻¹ in der FastPrep®-24 aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 15 min, 4°C) wurde der Überstand ultrazentrifugiert (45000 rpm, 2h, 4°C). Das Pellet nach der Ultrazentrifugation enthielt die Membranfraktion, der Überstand die zytoplasmatischen Proteine.

3.3.4 Proteinfällung

Zur Präzipitation der Proteine im Medienüberstand wurde der Überstand mit einem gleichen Volumenanteil kaltem Aceton vermischt. Der Ansatz wurde über Nacht bei -20°C gelagert und anschließend 30 min bei 7000 rpm, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde für 5 min bei 50°C getrocknet und in SDS *Sample Buffer* resuspendiert.

3.3.5 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der EMSA dient zum Nachweis von Protein / DNA Wechselwirkungen. Hierbei wird radioaktiv markierte DNA zusammen mit der Proteinprobe einer nativen Acrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Eine Protein / DNA Bindung zeigt sich in einem retardierten Laufverhalten der DNA.

In der vorliegenden Arbeit wurden einzelsträngige (ss) ³²P markierte Oligonukleotide für die DNA-Bindungsstudien verwendet. Zur Herstellung doppelsträngiger (ds) Oligonukleotide wurden äquimolare Mengen des radioaktiv markierten Oligonukleotids mit dem komplementären Strang in TE 10/1 Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) gemischt, im Wasserbad bei 95°C für 5 min denaturiert und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die Bindungsstudien wurden standardmäßig in 20 µL Gesamtvolumen durchgeführt und enthielten 10 fmol des markierten Oligos (ss bzw. ds) sowie ansteigende Konzentrationen des zu untersuchenden Proteins (His₇-Orf10, His₇-Orf11del, His₇-Orf14). Zur Stabilisierung der Proteine wurde dem Reaktionsansatz standardmäßig 1 mg · mL⁻¹ BSA hinzugegeben.

Tab. 3.5: Für DNA / Protein Bindungsstudien verwendete Puffer und Inkubationstemperaturen.

	His₇-Orf10		His₇-Orf11del		His₇-Orf14	
theoretischer pI	5,23		5,23		9,5	
Puffer 5x	200 mM	Tris	200 mM	Tris	100 mM	HCO ₃ ⁻ /CO ₃ ²⁻
		pH 8,5		pH 8,5		pH 10,0
	3,25 M	NaCl	200 mM	NaCl	125 mM	NaCl
	100 mM	MgCl ₂	5 mM	EDTA	5 mM	EDTA
	5 mM	EDTA	25 %	Glyzerin	25 %	Glyzerin
	50 %	Glyzerin				
Temperatur	4°C		ss: RT / ds: 4°C		RT	

Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei der empirisch ermittelten Optimumtemperatur im Optimumpuffer (Tab. 3.5) inkubiert und anschließend in einem 10%igen nativen Polyacrylamidgel für 90 min bei 80 V in 0,25 x TBE einer Elektrophorese unterzogen. Das Gel wurde getrocknet und für 24 h – 48 h mit einem Röntgenfilm in einer Exponierkassette gelagert. Anschließend wurde der Film entwickelt und fixiert nach Angaben des Herstellers.

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 Western Blot

Der Western Blot ermöglicht die Detektion eines Proteins in einem Proteinlysate mittels spezifischer, gegen das Protein gerichteter Antikörper. Hierbei kann sich die Spezifität des Antikörpers entweder gegen einen *tag* des Proteins (Fusionsproteine, z.B. monoklonale Anti-His-Antikörper) oder gegen das gesamte Antigen (polyklonale Antikörper aus Antiserum nach einer Immunisierung) richten. Das Proteinlysate wird hierbei zunächst in einer SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und anschließend über einen Elektrottransfer auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Die Detektion des Antigens erfolgt bei Fusionsproteinen über eine an den Antikörper konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP), während bei den polyklonalen Antikörpern aus Antiserum ein sekundärer, HRP-konjugierter Antikörper verwendet wird, der gegen die Fc-Region des primären Antikörpers gerichtet ist. Luminol, das in Gegenwart von H₂O₂, katalysiert durch die Peroxidase, oxidiert wird, emittiert die frei werdende Reaktionsenergie in Form von Licht, über das ein Röntgenfilm geschwärzt wird.

Die über SDS-PAGE (s. 3.3.1) der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden mit der *Mini Protean Blot* Apparatur (BioRad) auf eine zuvor in 1x Blotpuffer äquilibrierte Nitrozellulosemembran elektrophoretisch immobilisiert. Nach der Elektrophorese (1,5 h,

55 V) in 1x Blotpuffer wurde die Membran in 1x Ponceau angefärbt, mit dest. Wasser entfärbt und die Markerbanden, die Taschen sowie die Lauffront wurden mit einem Bleistift markiert. Die Nitrozellulosemembran wurde zweimal für 10 min in TBS gewaschen und anschließend 1 h bei Raumtemperatur, über Nacht bei 4°C und 1 h bei Raumtemperatur in 30 mL Blockpuffer (Roti®-Block) inkubiert. Anschließend erfolgte die Antikörperreaktion in 15 mL Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde zweimal je 15 min in TBS / Tween-20 / Triton X-100 und einmal 15 min in TBS gewaschen. Falls erforderlich erfolgte dann die Inkubation mit dem sek. Antikörper in 15 mL Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur sowie zwei Waschschritten in TBS / Tween-20 / Triton X-100 und ein Waschschriff in TBS á je 15 min. Die anschließende Detektion erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem Pierce® ECL Western Blot Detektionskit.

3.4.2 Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM)

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Visualisierung und Lokalisierung eines Antigens mittels fluoreszenz-markierter Antikörper *in vivo*. Immunfluoreszenzmarkierungen wurden nach Chen *et al.* (2008) mit Modifikationen durchgeführt.

Von einer exponentiell wachsenden (OD₆₀₀ 0,5 – 0,8) Kultur *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) wurden 100 µL abgenommen, zentrifugiert (5000 rpm, 5 min, 4°C) und dreimal mit je 500 µL PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 300 µL PBS resuspendiert. Hiervon wurden 20 µL auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen pipettiert und 90 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen über Nacht (12,5 % Methanol, 37,5 % Eisessig). Die Deckgläschen wurden dreimal je 20 Minuten in PBS, 0,05 % Tween-20 gewaschen und anschließend 30 min in Lysispuffer gelagert (10 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, 20% Saccharose, 15 mg · mL⁻¹ Lysozym). Nach einem Waschriff in PBS erfolgte die Inkubation im *Blocking Buffer I* (Applichem) über Nacht bei 4°C. Der primäre Antikörper wurde im *CrossDown Buffer* (Applichem) in Verdünnungen von 1:50 bis 1:200 eingesetzt, die Inkubation der Deckgläschen erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschriffen á je 10 min in PBS wurden die Gläschen mit dem sek. Antikörper (1:500 bis 1:1000 verdünnt in *CrossDown Buffer*) für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach drei Waschschriffen in PBS wurden die Deckgläschen auf Objektträgern fixiert und mikroskopisch analysiert.

4. ERGEBNISSE

4.1 Entwicklung von *monitoring tools* zur Verfolgung horizontaler Gentransferereignisse

Horizontaler Gentransfer stellt einen wichtigen Mechanismus in der Evolution bakterieller Genome dar. Seit dem Zeitalter der Genomsequenzierungen ist bekannt, dass selbst in phylogenetisch kaum verwandten Bakterien einige Gene eine auffallend hohe Ähnlichkeit zeigen, die sich nur durch horizontalen Gentransfer erklären lässt (Jain *et al.*, 2002). Besondere Bedeutung liegt hierbei auf dem Transfer von Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzgenen, deren Verbreitung vor allem bei pathogenen und opportunistisch pathogenen Bakterien ein erhebliches gesundheitliches Gefahrenpotential darstellt.

Die Analyse horizontaler Gentransferereignisse, vor allem unter natürlichen Bedingungen in bakteriellen Biofilmen, stellt eine große Herausforderung an die Wissenschaft dar. Für die Analyse des Gentransfers zwischen verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien gibt es nur wenige molekularbiologische Werkzeuge, mit deren Hilfe sich ein Gentransfer *in situ* nachweisen lässt. Basierend auf dem konjugativen Plasmid pIP501, das sich durch ein breites Wirtsspektrum (u. a. konjugativer Transfer von *Enterococcus* nach *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia* und *Streptomyces*) auszeichnet, sollten mobilisierbare und konjugative, mit *gfp* markierte *shuttle* Plasmide konstruiert werden, mit deren Hilfe sich ein Gentransferereignis durch die Übertragung einer grünen Fluoreszenz nachweisen lässt.

4.1.1 Konstruktion von mobilisierbaren, konjugativen und nicht-transferierbaren Plasmiden

Zur Konstruktion der mobilisierbaren Plasmide wurde zunächst in die *E. coli* / *E. faecalis* Shuttlevektoren pMSP3535 und pMSP3535VA (Bryan *et al.*, 2000) eine transkriptionale Terminationssequenz (t_0) über die Schnittstellen *Xba*I und *Xho*I eingebaut (für die genauen Bedingungen zur Amplifikation der t_0 -Sequenz und aller nachfolgenden Gene siehe Tab. 3.1). Der $oriT_{pIP501}$ wurde über eine *Hind*III-Schnittstelle in den Vektor pJP_{rel}GFP (Nieto *et al.*, 2006) subkloniert, anschließend wurde, ausgehend von dem Plasmid pJP_{rel}GFP- $oriT_{pIP501}$, ein translationaler *Enhancer* (TIR), die Shine-Dalgarno (SD) Sequenz, das *gfp*-Gen sowie der $oriT_{pIP501}$ in einer PCR amplifiziert und über die Schnittstellen *Xma*I und *Xba*I in die Plasmide pMSP3535- t_0 und pMSP3535VA- t_0 unter Kontrolle des durch Nisin induzierbaren Promotors P_{nisA} kloniert (pVA-GFP, pMSP-GFP, Abb. 4.1).

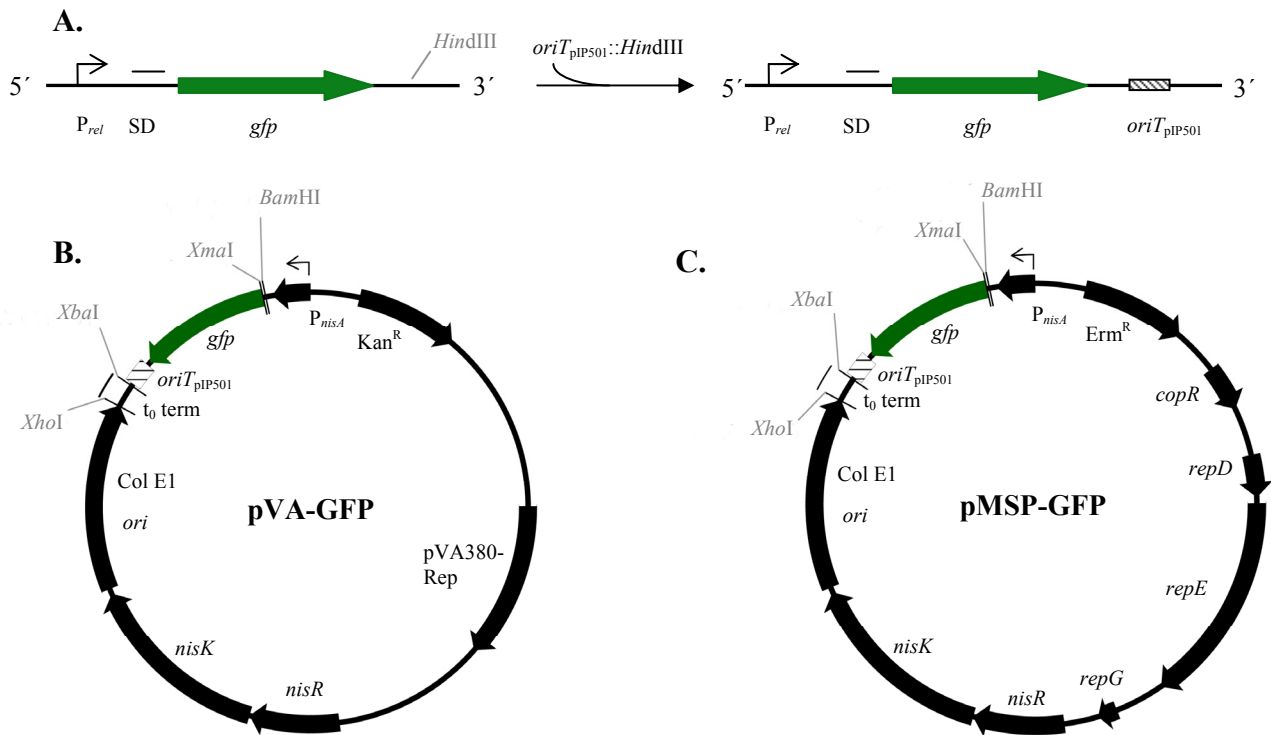


Abb. 4.1: Teilausschnitt des Plasmids $pJP_{rel}GFP$ (A) und Vektorkarten der mobilisierbaren Plasmide $pVA-GFP$ (B) und $pMSP-GFP$ (C). (Erläuterungen s. Text).

Für die Konstruktion eines mobilisierbaren Plasmids, das zusätzlich zum $oriT_{pIP501}$ auch die Relaxase *OrfI* von $pIP501$ exprimiert, wurde zunächst das *orfI* Gen von $pIP501$ in einer PCR amplifiziert und über die Schnittstellen *BamHI* und *XmaI* unter Kontrolle des *nisA*-Promotors in das Plasmid $pMSP3535$ kloniert. Anschließend wurde das bereits konstruierte Plasmid $pMSP3535-gfp-oriT_{pIP501}-t_0$ als Vorlage benutzt, um den *nisA*-Promotor, das *gfp*-Gen, den $oriT_{pIP501}$ sowie den t_0 -Terminator in einer PCR zu amplifizieren und über eine *XhoI*-Schnittstelle in das Plasmid $pMSP3535-orfI$ zu klonieren ($pMSP-orfI-P_{nisA}-GFP$, Abb 4.2).

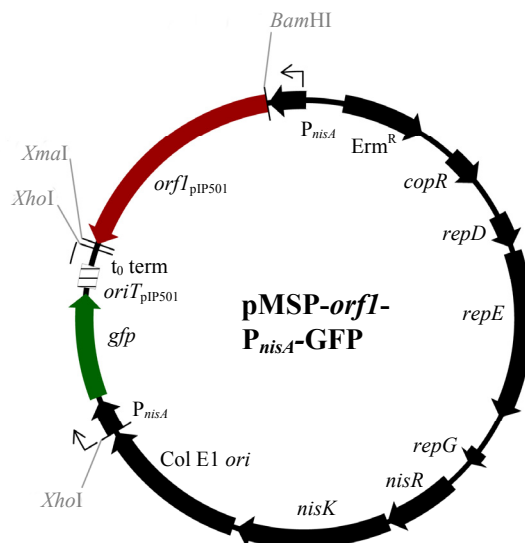


Abb. 4.2: Vektorkarte des mobilisierbaren Plasmids $pMSP-orfI-P_{nisA}-GFP$. (Erläuterungen s. Text).

Ein konjugatives, *gfp*-markiertes Plasmid wurde in vier aufeinanderfolgenden Klonierungsschritten aufgebaut. Für die Klonierung der Transferregion (*tra*, 15 *orfs*, 15,5 kb) wurden sequentiell die Regionen *orf1-orf6* über die Schnittstellen *Bam*HI und *Xma*I und *orf8-orf15* über die Schnittstellen *Xma*I und *Xba*I in den Shuttlevektor pMSP3535 eingefügt. Das *virB1* homologe *orf7* wurde über die Schnittstelle *Xma*I zwischen *orf6* und *orf8* eingebaut (pMSP178). Über diese Klonierungsstrategie sollte gleichzeitig eine *orf7* knock out Mutante erzeugt werden, über die Rückschlüsse auf die Notwendigkeit der lytischen Transglykosylase (SLT) für einen erfolgreichen konjugativen Transfer in Gram-positiven Bakterien gezogen werden sollten. Abschließend wurde aus dem bereits konstruierten Plasmid pMSP3535-*gfp-oriT_{pIP501}-t₀* der *nisA*-Promotor, *gfp*, *oriT_{pIP501}* und der *t₀*-Terminator über PCR amplifiziert und über die Schnittstelle *Xho*I in das Plasmid pMSP178 eingebaut (pMSP178-P_{*nisA*}-GFP).

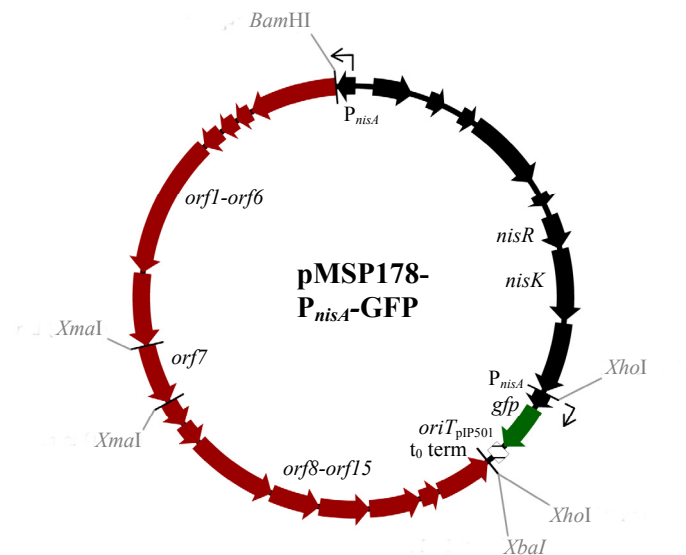


Abb. 4.3: Vektorkarte des konjugativen Plasmids pMSP178-P_{*nisA*}-GFP. (Erläuterungen s. Text).

Für die Verfolgung des horizontalen Gentransfers mit *gfp*-markierten mobilisierbaren und konjugativen Plasmiden ist eine Markierung des Donors notwendig, um potentielle Transkonjuganten von Donoren *in situ* unterscheiden zu können. Aus diesem Grund wurde zu Beginn der Studie die Strategie verfolgt, mit zwei unterschiedlichen fluoreszierenden Proteinen den Donor zu markieren. Der Donor sollte zusätzlich zu dem *gfp*-markierten, transferierbaren Plasmid ein weiteres *rfp*-markiertes Plasmid beinhalten, das nicht über horizontalen Gentransfer übertragen werden kann. Hierfür wurde zunächst das *rfp_{express}* aus pRHN1 (Janus *et al.*, 2007) in den Expressionsvektor pQTEV subkloniert, da in dem eukaryotischen Vektor pRHN1 keine für Prokaryoten optimal geeignete Shine-Dalgarno Sequenz vorhanden ist. Das *rfp_{express}* wurde anschließend zusammen mit der Shine-Dalgarno Sequenz, einem *his₇* tag und dem *t₀*-Terminator mit einer PCR aus pQTEV-*rfp* amplifiziert

und über die Schnittstellen *Xma*I und *Xba*I in den Shuttlevektor pMSP3535VA kloniert (pVA-RFP, Abb. 4.4).

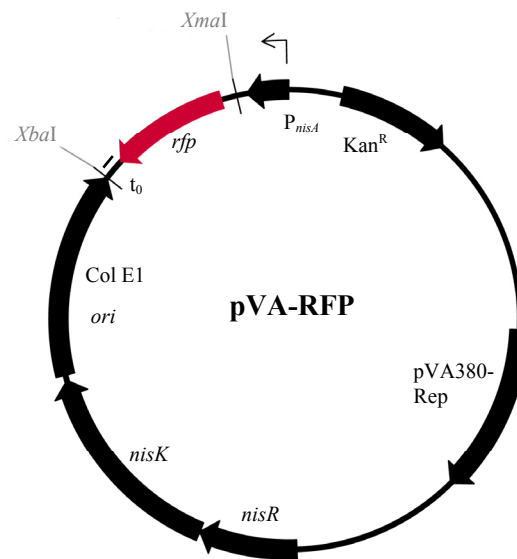


Abb. 4.4: Vektorkarte des nicht-mobilisierbaren und nicht-konjugativen Plasmids pVA-RFP. (Erläuterungen s. Text).

Sämtliche Klonierungsschritte wurden über Sequenzierungen (Sanger *et al.*, 1977) verifiziert.

4.1.2 Untersuchungen zu den fluoreszierenden Eigenschaften der konstruierten Plasmide in *Enterococcus faecalis*

Für eine qualitative Abschätzung der fluoreszierenden Eigenschaften der *monitoring tools* wurde *E. faecalis* OG1X mit den konstruierten Plasmiden (s. 4.1.1) transformiert (s. 3.1.3. c). Die Induktion des *nisA*-Promotors erfolgte entweder durch Zugabe von Nisin ($100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) in eine exponentiell wachsende Kultur ($\text{OD}_{600} 0,5$) oder durch Zugabe von Nisin ($100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) in Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion Plasmid-beinhalten der Enterokokken (für *E. faecalis* OG1X: Kanamycin $2000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ für pVA-Derivate bzw. Erythromycin $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ für pMSP-Derivate). Für Flüssigkulturen war eine schwache Fluoreszenz bereits 4 h nach Induktion des *nisA*-Promotors detektierbar, während die Induktion auf Festmedien zu einer deutlich intensiveren Fluoreszenz im Vergleich zu einer Flüssigkultur nach einer Übernachtinkubation führte (Abb 4.5).

Für das konjugative Konstrukt und für das mobilisierbare Plasmid, das zusätzlich die *Orf1*-Relaxase kodiert, wurde in ersten Versuchen die *gfp-oriT_{pIP501}-t₀*-Kassette ohne zusätzlichen *nisA*-Promotor über die *Xba*I / *Xho*I-Schnittstellen downstream des bereits klonierten *orf1*-Gens bzw. der klonierten *tra*-Gene (Abb. 4.2 und 4.3) eingebaut. In diesem Fall war keine Fluoreszenz nach Induktion des *nisA*-Promotors detektierbar (Daten nicht gezeigt).

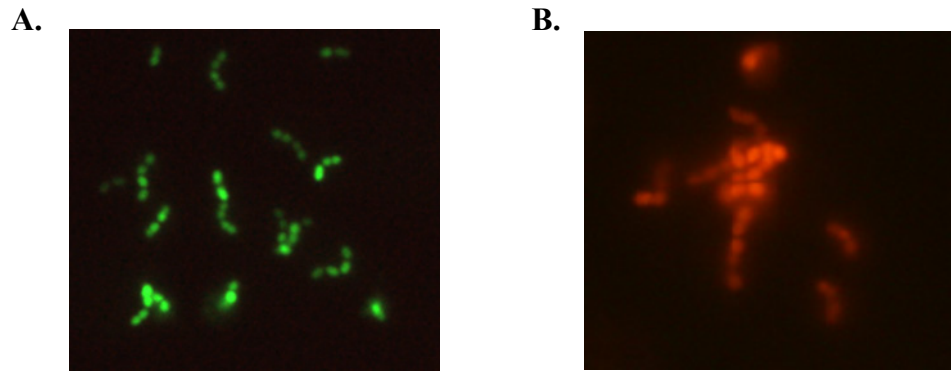


Abb. 4.5: Qualitativer Nachweis der grünen bzw. roten Fluoreszenz, exemplarisch gezeigt für pVA-GFP in *E. faecalis* OG1X und pVA-RFP in *E. faecalis* OG1X.

A. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *E. faecalis* OG1X (pVA-GFP) nach Induktion mit Nisin, Anregung bei 450-490 nm.

B. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *E. faecalis* OG1X (pVA-RFP) nach Induktion mit Nisin, Anregung bei 535-550 nm.

Nachfolgend wurde untersucht, ob sich die grüne und die rote Fluoreszenz innerhalb einer Enterococcus-Zelle gleichzeitig nachweisen lassen. Hierfür wurde *E. faecalis* OG1X sukzessive mit dem Plasmid pMSP-GFP bzw. pMSP-*orf1*-P_{nlsA}-GFP und pVA-RFP transformiert und die Expression der fluoreszierenden Proteine durch Zugabe von Nisin induziert. Sowohl die grüne als auch die rote Fluoreszenz konnten nachgewiesen werden, die Intensität der roten Fluoreszenz ist jedoch bereits in einer qualitativen Betrachtung schwächer als die grüne (Abb. 4.6).

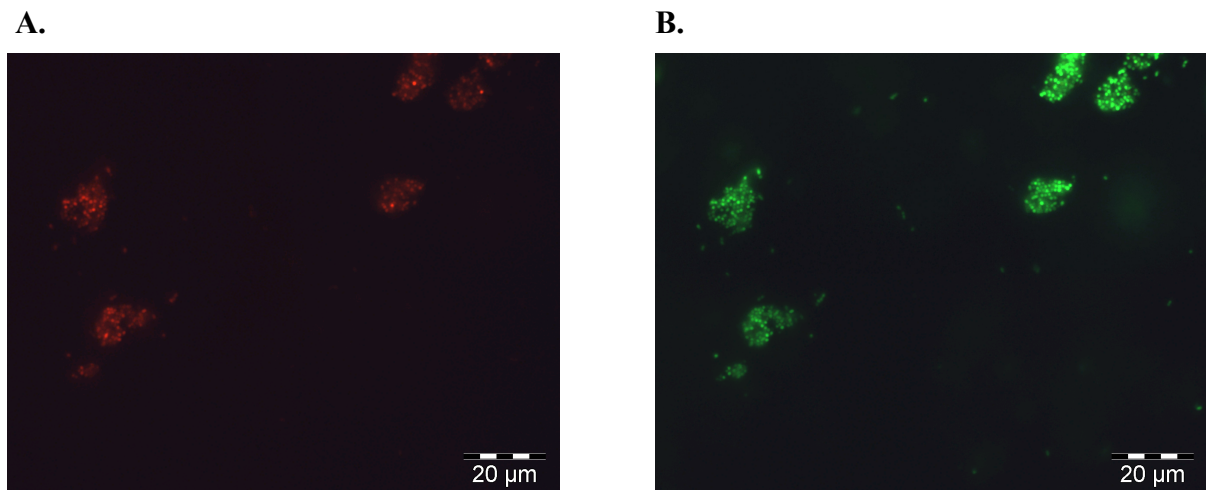


Abb. 4.6: Qualitativer Nachweis der grünen und roten Fluoreszenz innerhalb einer *E. faecalis*-Zelle.

A. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *E. faecalis* OG1X (pMSP-GFP / pVA-RFP) nach Induktion mit Nisin, Anregung bei 535-550 nm.

B. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *E. faecalis* OG1X (pMSP-GFP / pVA-RFP) nach Induktion mit Nisin, Anregung bei 450-490 nm.

Für die Entwicklung eines Assays zur Quantifizierung horizontalen Gentransfers *in situ* ist es notwendig zu wissen, wieviele der mit den *monitoring tools* transformierten *E. faecalis*-Zellen

nach Induktion des *nisA*-Promotors tatsächlich das grün-fluoreszierende, das rot-fluoreszierende sowie das grün- und das rot-fluoreszierende Protein gemeinsam exprimieren. Ein quantitativer Nachweis der fluoreszierenden Eigenschaften der entwickelten *monitoring tools* erfolgte mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*, Abb. 4.7).

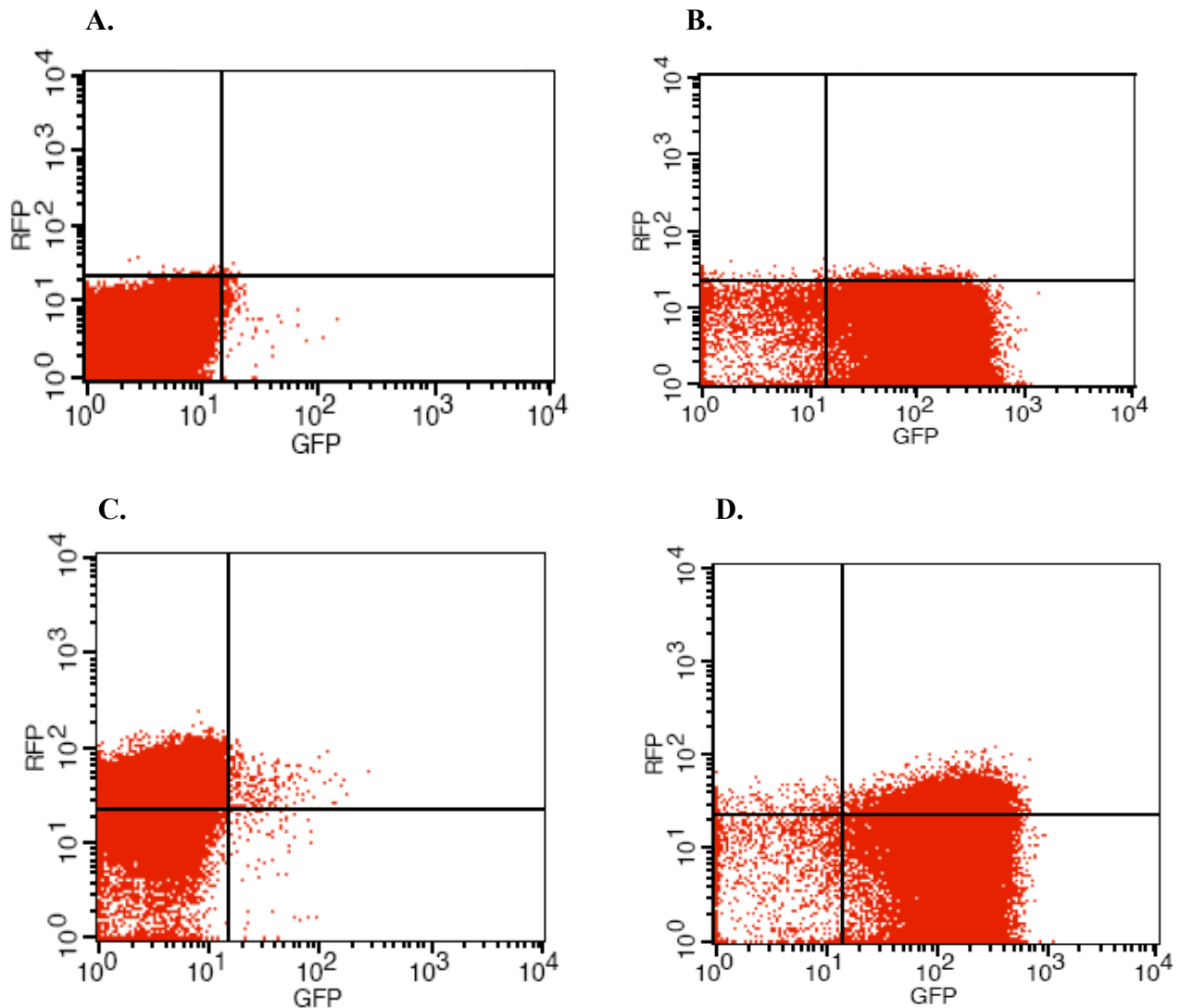


Abb. 4.7: Quantitativer Fluoreszenznachweis der konstruierten GFP und RFP Plasmide mittels FACS.

In der x-Achse ist die relative Intensität der grünen Fluoreszenz, in der y-Achse die relative Intensität der roten Fluoreszenz dargestellt. Es wurden jeweils 100000 Ereignisse vermessen.

A. *E. faecalis* OG1X, 99,4% der vermessenen Zellen zeigen keine bis kaum vorhandene Fluoreszenz (Autofluoreszenz).

B. *E. faecalis* OG1X (pMSP-*orfI*-P_{*nisA*}-GFP), 92,4% der vermessenen Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz.

C. *E. faecalis* OG1X (pVA-RFP), 74,5% der vermessenen Zellen zeigen einen Shift zur roten Fluoreszenz.

D. *E. faecalis* OG1X (pMSP-*orfI*-P_{*nisA*}-GFP, pVA-RFP), 18,5% der vermessenen Zellen zeigen einen Shift zur roten und grünen Fluoreszenz. Insgesamt leuchten 96,2% der Zellen grün.

Nahezu alle Zellen, die das mobilisierbare Plasmid pMSP-*orfI*-P_{*nisA*}-GFP enthalten, konnten mittels FACS in einem zur grünen Fluoreszenz geshifteten Bereich detektiert werden. Dagegen ließen sich nur ca. 75% der Zellen, die das *rfp*-markierte Plasmid tragen, in einem zur roten Fluoreszenz geshifteten Bereich detektieren. Trugen die Enterokokken beide

Plasmide (pMSP-*orfI*-P_{*nisA*}-GFP und pVA-RFP), so ließ sich nach Induktion der Expression nur bei 18,5% der Zellen gleichzeitig eine rote und eine grüne Fluoreszenz nachweisen. Von diesen Zellen zeigten allerdings 96,2% eine grüne Fluoreszenz.

Aus den Ergebnissen der quantitativen Fluoreszenzanalyse kann zusammenfassend geschlossen werden, dass die zu Beginn der Studie verfolgte Strategie, Donoren über eine rote Fluoreszenz zu markieren und damit von putativen Rezipienten unterscheidbar zu machen, über das konstruierte nicht-mobilisierbare, *rfp*-markierte Plasmid pVA-RFP nicht durchführbar ist.

4.1.3 Untersuchungen zu den mobilisierbaren und konjugativen Eigenschaften der konstruierten *monitoring tools*

Die entwickelten *gfp*-markierten, mobilisierbaren Plasmide sollten im Rahmen des MISSEX-Projekts (*microbial ISS gene exchange*) benutzt werden, um in den Isolaten von der ISS und der Antarktis-Forschungsstation CONCORDIA konjugative Elemente detektieren zu können. Erste Mobilisierungsexperimente wurden von *E. faecalis* nach *E. faecalis* und *B. subtilis* in bi- und triparentalen Kreuzungen mit pIP501 auf halbfesten Oberflächen (s. 3.1.4) durchgeführt. Der Nachweis einer Mobilisierung wurde verifiziert über:

- a. Selektion auf Antibiotikaresistenzen. Der Kreuzungsansatz wurde nach Inkubation auf dem Filter auf Selektivplatten ausgestrichen. Die Antibiotikazusammensetzung in den Agarfestmedien wurde so gewählt, dass der Rezipient nur nach Aufnahme des mobilisierbaren Plasmids auf den Platten wachsen konnte (chromosomaler Marker des Rezipienten + plasmidkodierter Marker).
- b. Nachweis der grünen Fluoreszenz. Kolonien, die auf den selektiven Antibiotikaplatten wuchsen, wurden auf selektivem Festmedium, dem zusätzlich Nisin (100 ng · mL⁻¹) beigelegt wurde, vereinzelt und nach einer Übernachtinkubation am Mikroskop auf eine grüne Fluoreszenz untersucht. Vorversuche zeigten, dass das direkte Ausplattieren der Transkonjuganten auf selektiven Festmedien mit Nisin zu einer Wachstumshemmung der Transkonjuganten führt (nicht gezeigt).
- c. Nachweis des *gfp*-Gens. Um eine mögliche Autofluoreszenz der Transkonjuganten auszuschließen, wurden Lysate der grün fluoreszierenden Transkonjuganten hergestellt (s. 3.2.9) und das *gfp*-Gen über eine PCR-Amplifikation (*gfp-oriT*, Tab 3.1) nachgewiesen.
- d. Antibiotikaresistenzprofil. Um auszuschließen, dass es sich bei den Transkonjuganten nicht um einen *gfp*-Donor handelt, wurden die putativen Transkonjuganten auf Selektivplatten ausgestrichen, denen Antibiotika für chromosomale Marker des

Donors beigefügt wurden. Transkonjuganten sollten auf diesen Selektivplatten nicht wachsen.

Die Mobilisierung von pMSP-*orf1*-P_{*nisA*}-GFP von *E. faecalis* CK111 über *E. faecalis* OG1X (pIP501) nach *E. faecalis* OG1RF konnte nicht direkt nachgewiesen werden. Der Kreuzungsansatz wurde auf selektivem Festmedium ausplattiert (BHI Fus 50, Em 20). Zur Verifizierung der Mobilisierung des GFP-Plasmids wurden 50 Kolonien auf eine grüne Fluoreszenz hin untersucht. Keine der untersuchten Transkonjuganten zeigte nach Induktion des *nisA*-Promotors eine grüne Fluoreszenz. Ein biparentaler Transfer des Plasmids pIP501 von *E. faecalis* OG1RF nach *E. faecalis* OG1X (pMSP-*orf1*-P_{*nisA*}-GFP) mit Selektion der Transkonjuganten auf BHI-Agar (Strep 1000 µg · mL⁻¹, Cm 20 µg · mL⁻¹ und Em 20 µg · mL⁻¹) konnte ebenso wie ein triparentaler Transfer des mobilisierbaren Plasmids von *E. faecalis* OG1X (pMSP-*orf1*-P_{*nisA*}-GFP) über *E. faecalis* OG1RF (pIP501) nach *B. subtilis* DSM 4451 nicht nachgewiesen werden.

Da der Selektionsmarker für pIP501 und pMSP-*orf1*-P_{*nisA*}-GFP identisch ist (Em^R), konnten Transkonjuganten, die das mobilisierbare Plasmid aufgenommen hatten, nicht direkt selektiert werden. Zudem sind die Replikationssysteme bei pIP501 und pMSP-*orf1*-P_{*nisA*}-GFP nahezu identisch. Das RepR-Protein von pIP501 und das RepE-Protein von pMSP-*orf1*-P_{*nisA*}-GFP (aus pAMβ1) sind zu 97% identisch, berücksichtigt man konservierte und semi-konservierte Substitutionen liegt die Identität zwischen RepR und RepE bei 98% (ein Alignment beider Proteinsequenzen ist dem Anhang beigefügt). Der Replikationsursprung *ori* von pIP501 und pAMβ1 zeigt ebenfalls eine hohe Ähnlichkeit (Bruand *et al.*, 1993, Wilcks *et al.*, 1999). Aufgrund des gleichen Selektionsmarkers sowie einer naheliegenden Inkompatibilität zwischen pIP501 und pMSP-*orf1*-P_{*nisA*}-GFP konnte eine Mobilisierung von pMSP-*orf1*-P_{*nisA*}-GFP über pIP501 nicht gezeigt werden. Die Inkompatibilität beider Plasmide führt vermutlich zu einer Eliminierung des mobilisierbaren Plasmids pMSP-*orf1*-P_{*nisA*}-GFP (Taylor *et al.*, 2004). Eine Eliminierung von pIP501 ist aufgrund eines auf pIP501 kodierten PSK-Systems (postsegregational killing) (ε-Protein Orf5 AJ301605, CAC70736.1; ζ-Protein Orf6 AJ301605, CAC70737.1; Meinhart *et al.*, 2003) unwahrscheinlich (Cooper *et al.*, 2000).

Das Plasmid pVA-GFP nutzt im Unterschied zu den pMSP-Derivaten das pVA380-Replikationssystem und besitzt einen Kanamycin-Selektionsmarker. In diesem Fall konnte eine Mobilisierung des Plasmids pVA-GFP von *E. faecalis* OG1X (pIP501, pVA-GFP) nach *E. faecalis* JH2-2 über eine biparentale Kreuzung nachgewiesen werden (Mobilisierungsrate $1,4 \cdot 10^{-5} \pm 3,1 \cdot 10^{-6}$).

Eine Retromobilisierung des Plasmids pVA-GFP zwischen *E. faecalis* OG1X und dem klinischen Isolat *E. faecalis* T9 konnte erfolgreich gezeigt werden (Mobilisierungsrate $1,62 \cdot 10^{-5} \pm 1,04 \cdot 10^{-5}$). Die Transkonjugante *E. faecalis* T9 (pVA-GFP) wurde anschließend als Donor eingesetzt, um das Plasmid pVA-GFP nach *B. subtilis* DSM 4451 zu mobilisieren (Mobilisierungsrate $3,1 \cdot 10^{-7} \pm 3,32 \cdot 10^{-8}$). Ebenso konnte eine Mobilisierung des Plasmids pVA-GFP von *E. faecalis* JH2-2 über *E. faecalis* OG1RF (pIP501) nach *B. subtilis* DSM 4451 nachgewiesen werden (Mobilisierungsrate $4,1 \cdot 10^{-6} \pm 4,74 \cdot 10^{-7}$).

Tab. 4.1: Mobilisierungsraten der entwickelten mobilisierbaren, *gfp*-markierten Plasmide.

Donor I	Donor II	Rezipient	Mobilisierungs- und Transferraten	Selektionsmarker [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]
<i>E. faecalis</i> OG1X (pIP501) ⁺	<i>E. faecalis</i> CK111 (pMSP- <i>orfI</i> - P _{nisA} -GFP) ⁺	<i>E. faecalis</i> OG1RF ⁺	$3,82 \cdot 10^{-5}$ $\pm 1,95 \cdot 10^{-5}$	Fus 50, Em 20
<i>E. faecalis</i> OG1X (pIP501, pVA-GFP)		<i>E. faecalis</i> JH2-2	$1,42 \cdot 10^{-5}$ $\pm 3,11 \cdot 10^{-6}$	Fus 50, Kan 400
<i>E. faecalis</i> OG1RF (pIP501)	<i>E. faecalis</i> JH2-2 (pVA-GFP)	<i>B. subtilis</i> DSM 4451	$4,10 \cdot 10^{-6}$ $\pm 4,74 \cdot 10^{-7}$	Sm 1000, Kan 20
<i>E. faecalis</i> T9*	<i>E. faecalis</i> OG1X (pVA-GFP)		$1,62 \cdot 10^{-5}$ $\pm 1,04 \cdot 10^{-5}$	Tet 10, Kan 500
<i>E. faecalis</i> T9 (pVA-GFP)		<i>B. subtilis</i> DSM 4451	$3,10 \cdot 10^{-7}$ $\pm 3,32 \cdot 10^{-8}$	Sm 1000, Kan 20
<i>E. faecalis</i> OG1RF (pIP501)	<i>E. faecalis</i> OG1X (pVA-GFP)	<i>E. coli</i> XL10	$2,33 \cdot 10^{-8}$ $\pm 2,07 \cdot 10^{-8}$	Tet10 Kan50

Die Mobilisierungs- und Transferraten sind als Anzahl der Transkonjuganten pro Rezipientenzelle angegeben und wurden als Mittelwert aus drei unabhängig durchgeführten Kreuzungen mit Standardabweichungen angegeben.

Fus: Fusidinsäure, Em: Erythromycin, Cm: Chloramphenicol, Kan: Kanamycin, Tet: Tetracyclin, Sm: Streptomycin.

⁺ - keine Mobilisierung von pMSP-*orfI*-P_{nisA}-GFP nach *E. faecalis* OG1RF beobachtet

* - Retromobilisierung, s. auch Abschnitt 4.2

Der *nisA*-Promotor ist in *B. subtilis* nach Induktion mit Nisin funktionell, eine grüne Fluoreszenz konnte jedoch nur in < 5% der induzierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.8). Eine Erhöhung des Selektionsdruckes (Erhöhung der Kanamycin-Konzentration von

20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ auf 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) sowie Erhöhung der Nisin-Konzentration (von 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ auf 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) führte zu keiner deutlichen Erhöhung an grün fluoreszierenden *B. subtilis* DSM 4451.

Der Mobilisierung des Plasmids pVA-GFP zwischen Bakterien verschiedenen Gram-Verhaltens konnten ebenso erfolgreich gezeigt werden. So konnte das Plasmid pVA-GFP von *E. faecalis* OG1X über *E. faecalis* OG1RF (pIP501) in das G- *E. coli* XL10 übertragen werden (Mobilisierungsrate $2,33 \cdot 10^{-8} \pm 2,07 \cdot 10^{-8}$).

Biparentale Kreuzungen mit dem konjugativen, *gfp*-markierten Konstrukt pMSP178- P_{nisA} -GFP sind mit verschiedenen *E. faecalis* Stämmen durchgeführt worden. Es wurde versucht,

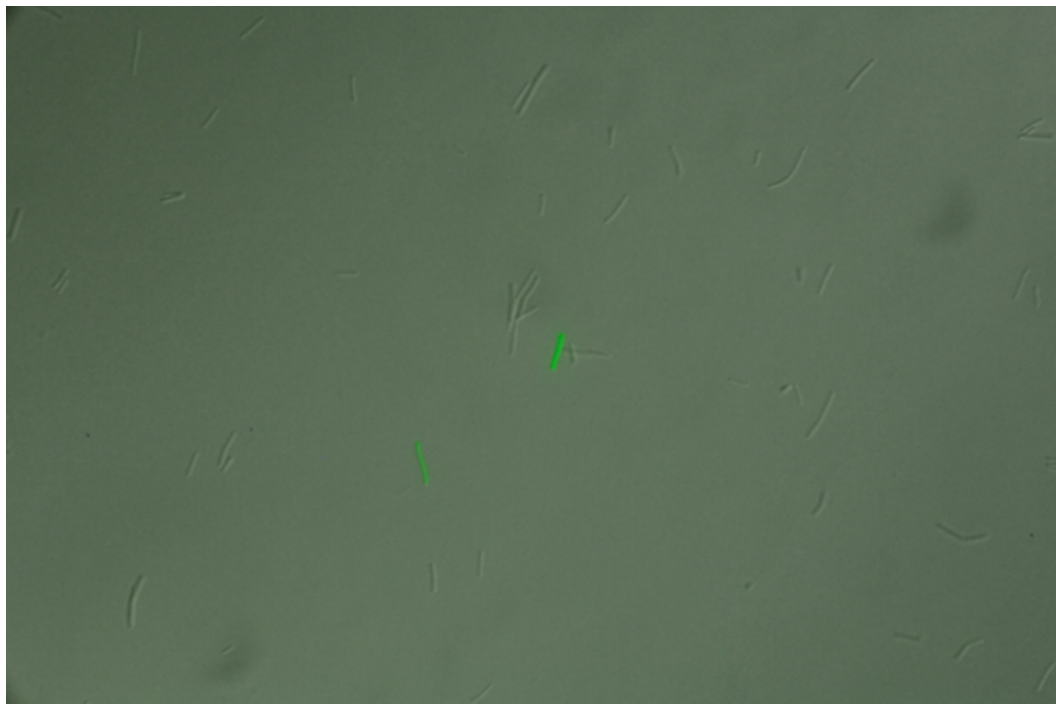


Abb. 4.8: Nachweis der Mobilisierung des Plasmids pVA-GFP von *E. faecalis* T9 (pVA-GFP) nach *B. subtilis* DSM 4451.

Gezeigt ist eine Überlagerung des lichtmikroskopischen und des fluoreszenzmikroskopischen Bildes der *B. subtilis* DSM 4451 Transkonjuganten nach Induktion mit Nisin, Anregungswellenlänge 450-490 nm.

das Plasmid pMSP178- P_{nisA} -GFP von *E. faecalis* OG1X bzw. *E. faecalis* CK111 durch Induktion des *nisA*-Promotors über Konjugation nach *E. faecalis* OG1RF und *E. faecalis* JH2-2 zu transferieren. Bei keinem der durchgeführten Kreuzungsexperimente konnte der Transfer des Plasmids in die Rezipienten verifiziert werden.

4.2 Entwicklung von PCR-basierten Assays zur Detektion mobiler genetischer Elemente G+ Bakterien

Der horizontale Gentransfer (HGT) zwischen verschiedenen Prokaryoten sowie zwischen Prokaryoten und Eukaryoten findet größtenteils über mobile genetische Elemente (MGE) statt, die in ihrer Gesamtheit als horizontaler Genpool bezeichnet werden (Thomas, 2000). Zu diesen MGE zählen konjugative und mobilisierbare Plasmide, (konjugative) Transposons, Integrons, genomische Inseln und Phagen. Allen gemeinsam ist ihre Fähigkeit, sich sowohl innerhalb eines Genoms als auch zwischen verschiedenen Genomen zu bewegen. Über den horizontalen Genaustausch wird es den Rezipienten möglich, Selektionsvorteile auf Umwelteinflüsse zu erhalten. Das können Antibiotikaresistenzgene sein, die vor allem im medizinischen Bereich zum Auftreten multiresistenter Krankheitserreger führen, aber auch Resistenzen gegen Xenobiotika, die den Abbau von z.B. halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen bewirken (Top *et al.*, 2003). Über HGT kann also eine rasche Adaption an Umwelteinflüsse stattfinden, die ohne geeignete Resistenzmechanismen letal für die Bakterienpopulation sind.

Die Charakterisierung von MGE auf molekularer Ebene umgeht eine Kultivierung der Mikroorganismen, die sich in vielen Fällen im Labor als schwierig erweist. In bisher durchgeführten Studien zur molekularen Analyse mobiler genetischer Elemente wurden größtenteils Replikon-spezifische PCR-Assays entwickelt. Der Fokus in den durchgeführten Studien lag überwiegend auf Plasmiden der IncP-1 α bis IncP-1 ϵ Gruppe, die größtenteils konjugativ mit breitem Wirtsspektrum sind (Bahl *et al.*, 2009, Ansari *et al.*, 2008, Smalla *et al.*, 2002), sowie Plasmiden der Inkompatibilitätsgruppen IncW, IncN und IncQ (Moura *et al.*, 2010, Malik *et al.*, 2008, Smalla *et al.*, 2002). Nur wenige Studien haben die Charakterisierung von MGE auf Basis von T4SS Transfergenen durchgeführt (Disqué-Kochem *et al.*, 2001).

4.2.1 PCR basierte Assays zur Detektion von T4SS Schlüsselgenen der bakteriellen Konjugation

Die bakterielle Konjugation spielt eine Schlüsselrolle für den Genaustausch zwischen verschiedenen Bakterien und kann als „Motor der bakteriellen Evolution“ bezeichnet werden. Der Transferprozeß wird hierbei über eine einzelsträngige Spaltung der DNA im *oriT* durch eine Relaxase initiiert, die ubiquitär in allen (selbst-)transferierbaren Plasmiden vorkommt. Aufgrund dieses streng konservierten Initiierungsprozesses wurde schon früh vermutet, dass die DNA-Relaxierung in allen bekannten Systemen einem ähnlichen Mechanismus

unterliegen muss. So konnte durch Aminosäuresequenzvergleiche verschiedener Relaxasen gezeigt werden, dass es drei konservierte Motive innerhalb der Relaxasen gibt (Pansegrau *et al.*, 1991, Zechner *et al.*, 2000). Basierend auf den Aminosäuresequenzen wurde eine systematische Klassifizierung erstellt, die die Relaxasen mobilisierbarer und konjugativer Plasmide in Familien zusammenfasst (Francia *et al.*, 2004, Garcillan-Barcia *et al.*, 2009).

Für die Entwicklung eines PCR-Screening Assays zur Detektion mobiler genetischer Elemente in bakteriellen Isolaten wurden konjugative und mobilisierbare Plasmide G⁺ nosokomialer und opportunistisch pathogener Bakterien verschiedener Relaxase Familien (MOB_V-Superfamilie, MOB_Q- und MOB_P-Familie) gewählt. Der Fokus lag hierbei auf konjugativen Plasmiden der Gattungen *Staphylococcus*, *Enterococcus* / *Streptococcus* und *Lactococcus* / *Lactobacillus*, die sich durch einen breiten Wirtsbereich (hier v. a. *Enterococcus* / *Streptococcus*), den Transfer verschiedener Antibiotikaresistenzgene und ihrer Fähigkeit, mobilisierbare Plasmide in Rezipienten verschiedener Gattungen zu übertragen, auszeichnen (Grohmann *et al.*, 2003). Außerdem wurden mobilisierbare Plasmide vor allem aus der Mob_V-Superfamilie ausgewählt, von denen bekannt ist, dass sie von einer Vielzahl konjugativer Plasmide G⁺ Bakterien (pIP501, pAMβ1, pAD1, pLS20, pXO11, pXO12), konjugativer Plasmide G⁻ Bakterien (IncW, IncF, IncP) und konjugativen Transposons (Tn916, Tn925, Tn1545) in verschiedene Rezipienten mobilisiert werden können (Francia *et al.*, 2004, und Referenzen ebenda). Schließlich wurden auch solche mobilisierbaren Plasmide gewählt, die auf Grund ihres breiten Wirtsbereiches und einer damit möglicherweise einhergehenden weiten Verbreitung interessant sind, hier v. a. RSF1010 aus der MOB_Q-Familie, das in >30 G⁻ und zwei G⁺ Bakterien (*Mycobacterium smegmatis*, *Brevibacterium methylicum*) vorkommt (Geibel *et al.*, 2009, Meyer, 2009, Rawlings *et al.*, 2001).

Die DNA-Sequenzen der verschiedenen Relaxasen wurden basierend auf den drei konservierten Relaxase-Motiven verglichen und die Primer so gewählt, dass sie nach Möglichkeit innerhalb eines dieser Motive binden und mindestens drei Relaxasegene verschiedener Plasmide erfassen (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Übersicht der Primer und der von ihnen erfassten Relaxasegene verschiedener Plasmide.

Primerpaar	Plasmide (Name, Genbank Accession No., Bakterienstamm)	
<u>MOB_V-Superfamilie</u>		
pJS42 404 bp*	pRI1, EU327398, <i>Enterococcus faecium</i> pJS42, NC_010291, <i>E. faecium</i>	
pSK41 ^{pre} 396 bp	pUB110, NC_001384, <i>Staphylococcus aureus</i> pSK41, NC_005024, <i>S. aureus</i> pAMalpha1, AF503772, <i>Enterococcus faecalis</i> SCCmec Typ IV Element, AM943017, <i>S. aureus</i> pTB19, M63891, <i>Bacillus stearothermophilus</i> pIP1714, AF015628, <i>S. cohnii</i>	SAP014A, GQ900379, <i>S. aureus</i> SAP016A, GQ900381, <i>S. epidermidis</i> pTB53, D14852, <i>B. sp.</i> pBC16, U32369, <i>Bacillus cereus</i> pGR71, X15503, <i>B. subtilis</i> pKKS2817, FM207105, <i>S. aureus</i>
pMV158 330 bp*	pMV158, X15669, <i>Streptococcus agalactiae</i> pSMQ172, AF295100, <i>S. thermophilus</i> pER13, NC_002776, <i>S. thermophilus</i>	
pT181 400 bp*	pT181, NC_001393, <i>S. aureus</i> pSTE2, AJ888003, <i>S. lentus</i> pUSA02, CP000257, <i>S. aureus</i> pSE-12228-01, AE015930, <i>S. epidermidis</i> pKH1, U38656, <i>S. aureus</i> pKH6, U38428, <i>S. aureus</i> pKH7, U38429, <i>S. aureus</i> pKH16, EU365621, <i>S. aureus</i> pSK101, GQ900499, <i>S. epidermidis</i>	pWBG753, GQ900395, <i>S. aureus</i> SAP103A, GQ900497, <i>S. aureus</i> SAP095B, GQ900445, <i>S. aureus</i> SAP094A, GQ900443, <i>S. aureus</i> SAP093A, GQ900441, <i>S. aureus</i> SAP085A, GQ900437, <i>S. aureus</i> SAP060B, GQ900417, <i>S. aureus</i> SAP014A, GQ900379, <i>S. aureus</i>
pSMA23 348 bp*	pSMA23, DQ116709, <i>Lactobacillus casei</i> p141, AB517606, <i>L. plantarum</i>	pRS4, AJ968953, <i>Pediococcus pentosaceus</i> pLC88, U31333, <i>L. casei</i>
pK214 470 bp*	pK214, X92646, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> pMRC01, AE001272, <i>L. lactis</i>	
<u>MOB_Q-Familie</u>		
pSK41 ^{nes} 328 bp*	pSK41, NC_005024, <i>S. aureus</i> pGO1, NC_012547, <i>S. aureus</i> pUSA03, CP000258, <i>S. aureus</i> USA300 pLW043, NC_005054, <i>S. aureus</i> pPR9, GU237136, <i>S. aureus</i> SAP082A, GQ900434, <i>S. aureus</i>	SAP080A, GQ900433, <i>S. aureus</i> SAP079A, GQ900432, <i>S. aureus</i> SAP069A, GQ900422, <i>S. aureus</i> SAP068A, GQ900421, <i>S. aureus</i> SAP014A, GQ900379, <i>S. aureus</i> SAP015B, GQ900501, <i>S. aureus</i>
pIP501 339 bp*	pRE25, X92945, <i>E. faecalis</i> RE25 pIP501, X65462, <i>S. agalactiae</i> pWZ1668, GQ484956, <i>E. faecalis</i>	pWZ7140, GQ484955, <i>E. faecalis</i> pWZ909, GQ484954, <i>E. faecalis</i>
RSF1010 307 bp*	RSF1010, NC_001740, <i>E. coli</i> C660 pSRC15, GQ379901, <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> pCCK1900, NC_011378, <i>Pasteurella multocida</i>	
plca36 893 bp*	plca36, CP000935, <i>L. casei</i> pLgLA39, AB436615, <i>L. gasseri</i> pLTK13, AB450918, <i>L. plantarum</i>	pLR002, CP001156, <i>L. rhamnosus</i> Plasmid1, CP000424, <i>L. casei</i> ATCC 334
<u>MOB_P-Familie</u>		
pRS01 396 bp*	pRS01, U50902, <i>L. lactis</i> chromosomales T4SS, AM406671, <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	

*Größe des PCR-Amplifikats

Neben den Relaxasen gehören die Energie lieferenden Proteine vom VirB4-, VirD4- und in manchen T4SS VirB11-Typ zu den Proteinen, die in den verschiedenen T4SS die strengste Konservierung aufweisen. Die Energielieferung wird über eine ATPase Aktivität dieser Proteine erreicht. Die VirD4-ähnlichen Proteine werden generell als *coupling* Proteine bezeichnet, die zwischen dem Relaxosom und dem mpf-Komplex in der Zellhülle vermittelnd wirken und vermutlich über eine ATPase Aktivität an dem DNA / Protein Transport aktiv beteiligt sind (Llosa *et al.*, 2002).

Die lytische Transglykosylase vom VirB1-Typ stellt ein weiteres konserviertes Protein dar, das nahezu in allen untersuchten T4SS vorkommt, aber in den meisten untersuchten Studien nicht essentiell für einen erfolgreichen Substrattransport über das T4SS ist.

Für die konjugativen Plasmide pIP501 und pSK41 aus G⁺ Bakterien sind Primerpaare entwickelt worden, mit deren Hilfe sich die T4SS Transferegene *orf7* / *traG* (*virB1*-ähnlich), *orf5* / *traE* (*virB4*-ähnlich) und *orf10* / *traK* (*virD4*-ähnlich) dieser Plasmide und enger Verwandter in Bakterienisolaten detektieren lassen (Tab. 4.3).

Die entwickelten PCR Assays wurden im Rahmen des MISSEX-, COMICS- und STC Milchsäureprojekts in mehreren Studien-, Bachelor- und Diplomarbeiten angewendet, um in den bakteriellen Isolaten nach mobilen genetischen Elementen zu screenen (Studienarbeiten von Frau Linda Mende, Frau B. Sc. Julia Rosenlöcher, Frau Katja Rogowski, Frau Isabel Knittel, Frau B. Sc. Anita Püngel, Bachelorarbeiten von Frau B. Sc. Katja Rogowski, Frau B. Sc. Isabel Knittel und Diplomarbeiten von Frau Dipl.-Biotech. (FH) Svea Fürch und Frau Dipl.-Biol. Katrin Prescha). Die Primerpaare pMV158 und pSK41 *pre* sind bereits publiziert (Borgo *et al.*, 2009).

4.2.2 Nachweis von Transferegenen und horizontalem Gentransfer in dem klinischen Isolat *E. faecalis* T9 und Isolaten der ISS

Die entwickelten PCR Assays wurden verwendet, um in klinischen Bakterienisolaten und bakteriellen Isolaten der Antarktisforschungsstation CONCORDIA und der Internationalen Raumstation ISS Transferegene zu detektieren. Isolate, in denen Transferegene nachgewiesen werden konnten, wurden anschließend in triparentalen Kreuzungen mit den GFP-markierten, mobilisierbaren Plasmiden pVA-GFP und pMSP-*orf1*-P_{*nisA*}-GFP zum Nachweis putativer konjugativer Elemente eingesetzt.

Das klinische Enterokokken-Isolat *E. faecalis* T9 (s. 4.1.3) zeigte ein Signal für die T4SS Transferegene *traE*, *traG* und *traK* und für das Relaxasegen *nes*_{pSK41}. Wie schon in Abschnitt

Tab. 4.3: Übersicht der Transferprimer und der von ihnen erfassten *virB1*, *virB4* und *virD4* homologen Gene verschiedener Plasmide.

Primer	Plasmide (Name, Genbank Accession No., Stamm)	Primer	Plasmide (Name, Genbank Accession No., Stamm)
pSK41 <i>traE</i> 626 bp*	pSK41, NC_005024, <i>S. aureus</i> pGO1, NC_012547, <i>S. aureus</i> pUSA03, CP000258, <i>S. aureus</i> USA300 pLW043, NC_005054, <i>S. aureus</i> pPR9, GU237136, <i>S. aureus</i> pMRC01, AE001272, <i>L. lactis</i> pV030-8, NC_010279, <i>S. aureus</i> SAP082A, GQ900434, <i>S. aureus</i> SAP080A, GQ900433, <i>S. aureus</i> SAP079A, GQ900432, <i>S. aureus</i> SAP069A, GQ900422, <i>S. aureus</i> SAP068A, GQ900421, <i>S. aureus</i> SAP014A, GQ900379, <i>S. aureus</i> SAP015B, GQ900501, <i>S. aureus</i>	pSK41 <i>traG</i> 457 bp*	pSK41, NC_005024, <i>S. aureus</i> pGO1, NC_012547, <i>S. aureus</i> pUSA03, CP000258, <i>S. aureus</i> USA300 pLW043, NC_005054, <i>S. aureus</i> pPR9, GU237136, <i>S. aureus</i> SAP082A, GQ900434, <i>S. aureus</i> SAP080A, GQ900433, <i>S. aureus</i> SAP079A, GQ900432, <i>S. aureus</i> SAP069A, GQ900422, <i>S. aureus</i> SAP068A, GQ900421, <i>S. aureus</i> SAP014A, GQ900379, <i>S. aureus</i> SAP015B, GQ900501, <i>S. aureus</i>
pSK41 <i>traK</i> 573 bp*	pSK41, NC_005024, <i>S. aureus</i> pGO1, NC_012547, <i>S. aureus</i> pUSA03, CP000258, <i>S. aureus</i> USA300 pLW043, NC_005054, <i>S. aureus</i> SAP082A, GQ900434, <i>S. aureus</i> SAP080A, GQ900433, <i>S. aureus</i> SAP079A, GQ900432, <i>S. aureus</i> SAP069A, GQ900422, <i>S. aureus</i> SAP068A, GQ900421, <i>S. aureus</i> SAP014A, GQ900379, <i>S. aureus</i> SAP015B, GQ900501, <i>S. aureus</i> pMUP8 ⁺ , DQ232636, <i>S. aureus</i> pMUP7 ⁺ , DQ232635, <i>S. aureus</i> pMUP6 ⁺ , DQ232634, <i>S. aureus</i> pMUP5 ⁺ , DQ232633, <i>S. aureus</i> pMUP4 ⁺ , DQ232632, <i>S. aureus</i> pMUP3 ⁺ , DQ232631, <i>S. aureus</i> pMUP2 ⁺ , DQ232630, <i>S. aureus</i>	pip501 <i>orf5</i> 654 bp*	pRE25, X92945, <i>E. faecalis</i> RE25 pip501, X65462, <i>S. agalactiae</i> pAMbeta1, GU128949, <i>E. faecalis</i> <i>trsE</i> , NZ_ABSC01000205, <i>E. faecium</i> pWZ1668, GQ484956, <i>E. faecalis</i> pWZ7140, GQ484955, <i>E. faecalis</i> pWZ909, GQ484954, <i>E. faecalis</i>
		pip501 <i>orf7</i> 434 bp*	pRE25, X92945, <i>E. faecalis</i> RE25 pip501, X65462, <i>S. agalactiae</i> pSM19035, AY357120, <i>S. pyogenes</i> <i>trsG</i> , NZ_ABSC01000205, <i>E. faecium</i> pWZ1668, GQ484956, <i>E. faecalis</i> pWZ7140, GQ484955, <i>E. faecalis</i> pWZ909, GQ484954, <i>E. faecalis</i>
		pip501 <i>orf10</i> 729 bp*	pRE25, X92945, <i>E. faecalis</i> RE25 pip501, X65462, <i>S. agalactiae</i> pSM19035, AY357120, <i>S. pyogenes</i> pAMbeta1, GU128949, <i>E. faecalis</i> <i>trsK</i> , NZ_ABSC01000205, <i>E. faecium</i> pWZ1668, GQ484956, <i>E. faecalis</i> pWZ7140, GQ484955, <i>E. faecalis</i> pWZ909, GQ484954, <i>E. faecalis</i>

*Größe des PCR-Amplifikats

⁺Die komplette Sequenz dieser Plasmide ist nicht bestimmt, nur die *traK* Region wurde sequenziert.

4.1.3 erwähnt, konnte das mobilisierbare Plasmid pVA-GFP von *E. faecalis* OG1X nach *E. faecalis* T9 über eine biparentale Kreuzung retromobilisiert werden. Die *E. faecalis* T9 Transkonjugante konnte anschließend erfolgreich benutzt werden, um das mobilisierbare Plasmid nach *B. subtilis* DSM 4451 zu mobilisieren. Eine Charakterisierung des Stammes hinsichtlich Plasmidgehalts und Transferegene ist detaillierter in der Dissertation von Frau Dipl.-Biochem. Katarzyna Schiwon beschrieben. Die Ergebnisse sind in einer gemeinsamen Publikation zusammengefasst (Arends *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Zwei MISSEX-Isolate zeigten ebenfalls in einer PCR ein positives Signal für *traE*, *traG*, *traK* und die *nes_{pSK41}*-Relaxase (*S. saprophyticus* R13) bzw. für *traE*, *traG*, *traK*, *nes_{pSK41}* und die pT181-Relaxase (*S. hominis* subsp. *hominis* 7IL-2). Mit beiden Stämmen wurden triparentale Kreuzungen durchgeführt (MISSEX-Isolat als Donor I, *E. faecalis* CK111 (pMSP-*orf1*-P_{*nisA*}-GFP) als Donor II, *E. faecalis* OG1RF als Rezipient). Die Transkonjuganten wurden in beiden Fällen auf BHI-Festmedium mit Fusidinsäure (50 µg · mL⁻¹) und Erythromycin (100 µg · mL⁻¹) selektiert. Aufgrund der geringen Transferrate (1 · 10⁻⁸ für *S. saprophyticus* R13; 1,7 · 10⁻⁸ für *S. hominis* subsp. *hominis* 7IL-2) wurden die Transkonjuganten auf Spectinomycin-Sensitivität untersucht, um auszuschließen, dass es sich bei den Kolonien nicht um Fusidinsäure-resistente *E. faecalis* CK111 (pMSP-*orf1*-P_{*nisA*}-GFP) handelt. 80% der *S. saprophyticus* R13-Transkonjuganten und 91% der *S. hominis* subsp. *hominis* 7IL-2-Transkonjuganten waren Spectinomycin-sensitiv und *gfp*-positiv. Nur die Anzahl dieser Kolonien wurden für die Berechnung der Transferraten berücksichtigt.

4.3 Untersuchungen zum Typ IV Sekretionssystem des broad host range Plasmids pIP501 aus *S. agalactiae*

Während T4SS aus G⁻ Organismen bereits gut charakterisiert sind (zusammengefasst in Alvarez-Martinez und Christie, 2009), werden T4SS G⁺ Bakterien erst seit wenigen Jahren detaillierter analysiert. Im Hinblick auf nosokomiale Infektionen mit multi-resistenten Erregern, bei denen es sich überwiegend um G⁺ Bakterien der Gattungen *Staphylococcus* und *Enterococcus* handelt, wird die Bedeutsamkeit dieser Untersuchungen erkennbar. Die Antibiotikaresistenzen sind auf Plasmiden kodiert, die sich horizontal über Konjugation auf verschiedene Bakterienarten und -gattungen übertragen können. Als Prototypen konjugativer Plasmide mit breitem Wirtsbereich aus G⁺ Bakterien gelten pSK41/pGO1 aus *S. aureus* und pIP501/pRE25 aus *Streptococcus/Enterococcus*.

Die Transferregion von pIP501 konnte komplett sequenziert werden, sie umfasst 15 *open reading frames* (*orfs*) und zeigt Homologien zum T4SS aus *A. tumefaciens* (*orf5* / *virB4*, *orf7* / *virB1*, *orf10* / *virD4*). Die *tra*-Region ist als ein Operon organisiert, das durch das erste Genprodukt Orf1 reguliert wird. Orf1 zeigt *in vitro* Relaxaseaktivität und bindet an den *oriT* von pIP501 (Kurenbach *et al.*, 2002; Kurenbach *et al.*, 2003; Kopec *et al.*, 2005; Kurenbach *et al.*, 2006). Für die putativen ATPasen Orf5 und Orf10 konnte *in vitro* eine ATP-Bindung und -hydrolyse nachgewiesen werden (Abajy und Grohmann, unveröffentlichte Daten). Für die putative lytische Transglykosylase Orf7 konnte eine Peptidoglykan-Hydrolyse *in vitro* gezeigt werden (Celic *et al.*, in Vorbereitung). Ein erstes Modell des T4SLS Proteinkomplexes aus

einem G⁺ T4SS konnte basierend auf Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* mittels Yeast two-hybrid, *in vitro* über pull-down Assays und über *in silico* Vorhersagen zur Topologie der Proteine erstellt werden (Abajy *et al.*, 2007).

In dem von Abajy *et al.* (2007) postulierten Modell des T4SLS Proteinkomplexes basiert die Anordnung der Proteine auf *in silico* Berechnungen mittels verschiedener Programme zur Vorhersage von Proteintopologien (u.a. PSORTb, Gardy *et al.*, 2005; HMMTOP, Tusnady *et al.*, 2001; SOSUI, Hirokawa *et al.*, 1998). Über die tatsächliche Lokalisierung der Proteine (Zellwand, Membran, Zytoplasma) liegen keine experimentellen Daten vor, die die Vorhersagen bestätigen können. Über eine Fraktionierung von *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) in die Zellkompartimente Zellwand, Membran und Zytoplasma mit anschließendem immunologischen Nachweis der einzelnen Proteine in den Kompartimenten können die topologischen Vorhersagen in dem postulierten Modell verifiziert und gegebenenfalls korrigiert werden.

Ein weiterer Aspekt, der in vorhergehenden Arbeiten nicht untersucht wurde, betrifft die Anzahl der pIP501 kodierten T4SLS Komplexe innerhalb einer Zelle. Basierend auf Arbeiten zur Lokalisierung von T4SS anderer Modellsysteme wie pCW3 aus *Clostridium perfringens*, bei dem wahrscheinlich zwei Komplexe an den Zellpolen innerhalb einer Zelle gebildet werden, oder pCF10 in *E. faecalis* und R27 in *E. coli*, bei denen verschiedene T4SS Proteine (u.a. das *coupling* Protein) mehrere Foci ausbilden, kann man auch für pIP501 vermuten, dass mehrere T4SLS Komplexe in einer Zelle vorliegen (Chen *et al.*, 2008; Teng *et al.*, 2008; Gunton *et al.*, 2005; Gilmour *et al.*, 2001). Über eine Lokalisierung von Tra-Proteinen *in vivo* mittels Immunfluoreszenz soll eine erste Abschätzung zur Anzahl der Proteinkomplexe erhalten werden.

Die relaxierte einzelsträngige Plasmid-DNA wird von der Relaxase Orf1 gebunden. Über den weiteren Transport der Plasmid-DNA gibt es für das T4SLS von pIP501 keine Informationen. Es liegt die Vermutung nahe, dass einige der pIP501 Tra Proteine DNA-bindende Eigenschaften besitzen und somit zu einem effizienten Transfer der relaxierten DNA beitragen könnten. Über EMSA (electrophoretic mobility shift assay) sollen einige ausgewählte Proteine (Orf8, Orf10, Orf11, Orf14) auf DNA-Bindung hin untersucht werden.

Der Zellaufbau zwischen G⁺ und G⁻ Bakterien unterscheidet sich wesentlich im Aufbau der Zellhülle. G⁻ Bakterien besitzen zwei Membranen (Plasmamembran und äußere Membran) und nur eine dünne Zellwand aus einschichtigem Peptidoglykan, während G⁺ Bakterien eine Plasmamembran gefolgt von einer dicken Zellwand aus mehrschichtigem Peptidoglykan haben. Ein in den meisten T4SS konserviertes Protein, die lytische Transglykosylase (SLT),

spaltet spezifisch Peptidoglykan. In knock out Experimenten konnte gezeigt werden, dass die SLT Aktivität in G- Bakterien nicht essentiell ist, da die Funktion vermutlich von auf dem Chromosom kodierten lytischen Transglykosylasen übernommen werden kann (z.B. SLT P19 des konjugativen Plasmids R1, Bayer *et al.*, 2001). Bei G+ Bakterien sind nur wenige lytische Transglykosylasen bekannt, zudem stellt die PG-Schicht eine undurchlässige Barriere dar. Über eine *orf7* knock out Mutante von pIP501 soll abgeschätzt werden, ob der SLT in G+ Systemen eine essentielle Rolle beim konjugativen Transfer zukommen könnte.

4.3.1 Die pIP501 kodierten Tra-Proteine lokalisieren hauptsächlich in der Zellhülle

Die Lokalisierung der von pIP501 kodierten Transferproteine erfolgte nach Buttaro *et al.* (2000) mit Modifikationen (s. 3.3.2). Für den immunologischen Nachweis der Tra-Proteine in den Zellkompartimenten von *E. faecalis* wurden zwei Ansätze gewählt: Klonierung der einzelnen *orfs* zusammen mit einer 5' *his7*-Region in den *E. coli* / *E. faecalis* Shuttlevektor pMSP3535VA (Abb. 4.9, s. 3.2.11) mit anschließender Lokalisierung des His₇-Orf mit Anti-His Antikörpern in den Zellkompartimenten sowie Fraktionierung von *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) und Detektion der einzelnen Tra-Proteine mittels polyklonaler Anti-Tra Antikörper.

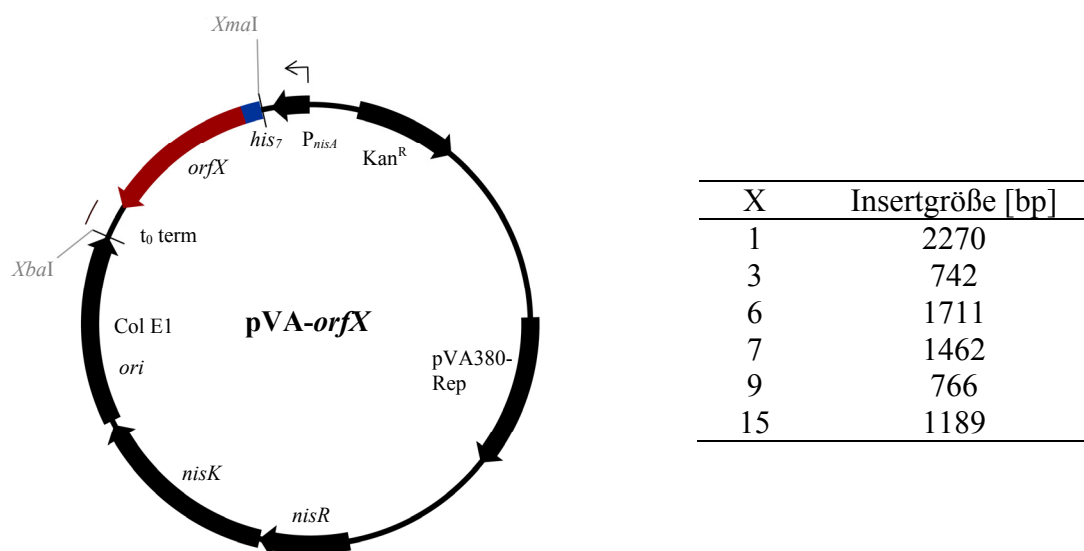


Abb. 4.9: Vektorkarte des His₇-Expressionsvektors für *E. faecalis*.

Die Transfgene der pIP501 *tra*-Region wurden ausgehend von den *E. coli* Expressionsvektoren pQTEV-*orfX* zusammen mit einer 5' *his7*-Region in einer PCR amplifiziert und über die Schnittstellen *Xma*I und *Xba*I in den *E. coli* / *E. faecalis* Shuttlevektor pMSP3535VA kloniert. Das Tra-Protein kann nach Induktion des *nisA*-Promotors mit Nisin über einen Anti-His Antikörper immunologisch nachgewiesen werden.

Zur Herstellung und Aufreinigung der polyklonalen Antikörper erfolgten Proteinexpressionen und –aufreinigungen (Orf5, Orf7, Orf8, Orf10, Orf11, Orf13, Orf14) in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Walter Keller, Karl-Franzens Universität Graz. Die

Immunisierung erfolgte im Kaninchen und wurde, wie auch die Gewinnung und Aufreinigung der Antiseren, von der Firma BioGenes, Berlin, durchgeführt.

Die Lokalisierung der Transferproteine mittels Fraktionierung konnte für 9 der 15 Proteine erfolgreich durchgeführt werden. Für Orf6 und Orf9 erfolgte der immunologische Nachweis der Proteine in den Fraktionen mittels Anti-His Antikörpern (durchgeführt unter meiner Anleitung in der Studienarbeit von Frau Dipl.-Biotech. Anna Woloszyk und der Diplomarbeit von Frau Dipl.-Biotech. (FH) Sonja Schernke), während für die verbleibenden 7 Proteine Fraktionen von *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) und polyklonale Antikörper verwendet wurden (Abb. 4.10 A). Für Orf3 wurden mehrere erfolglose Versuche unternommen, das Protein über einen Anti-His Antikörper in Fraktionen von *E. faecalis* OGIX (pMSP3535VA-*orf3*) nachzuweisen.

Sieben der neun untersuchten Proteine lokalisieren ausschließlich in der Zellhülle (Zellwand und Membran) von *E. faecalis*, nur Orf14 wurde im Zytoplasma detektiert, entsprechend der *in silico* Vorhersage für Orf14 (Abajy *et al.*, 2007). Eine Sonderrolle nimmt das Orf11 ein, das in allen drei Fraktionen als Dublett detektiert werden konnte.

Um eine mögliche Zellwandlokalisierung zu verifizieren, wurde die Zellwand einer exponentiell wachsenden *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) Kultur mit Lysozym und Mutanolysin behandelt und der Überstand auf Anwesenheit verschiedener pIP501 Tra-Proteine untersucht (s. 3.3.3, Abb. 4.10 B).

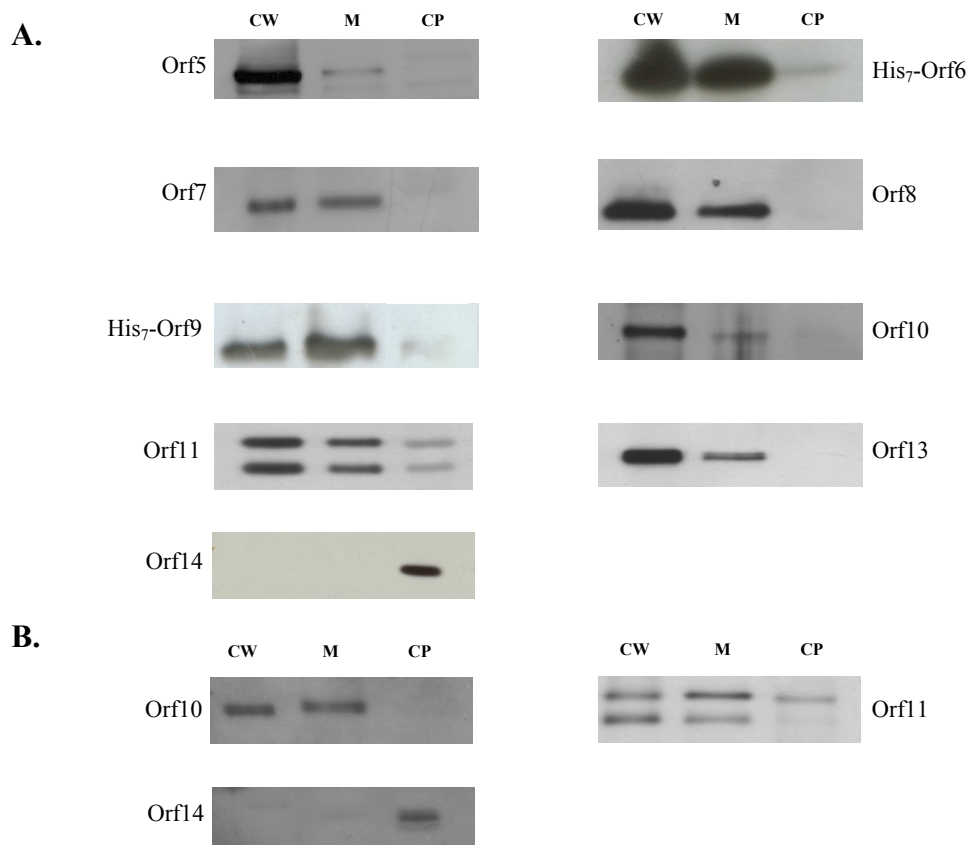


Abb. 4.10: Lokalisierung von pIP501 Transferproteinen mittels Western Blot in Zellfraktionen von *E. faecalis*. Abkürzungen: CW – Zellwand, M – Membran, CP – Zytoplasma

A. Exponentiell wachsende (OD₆₀₀ 0,5) *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) wurden, wie in 3.3.2 beschrieben, über sequentielle Zentrifugationsschritte in Zellwand, -membran und Zytoplasma aufgetrennt. Die Tra-Proteine wurden mit Western Blot über polyklonale Anti-Tra Antikörper und Anti-His-Antikörper (Orf6 und Orf9) in den Zellfraktionen nachgewiesen.

B. In den hier dargestellten Western Blots wurde die Zellwandfraktion aus einer exponentiell wachsenden (OD₆₀₀ 0,5) *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) Kultur durch Behandlung mit Lysozym und Mutanolysin freigesetzt und als Zellwandfraktion im Western Blot eingesetzt. Die Protoplasten wurden mittels Fastprep aufgebrochen und größerer Zellbestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde ultrazentrifugiert, das erhaltene Pellet wurde als Membranfraktion, der Überstand nach Ultrazentrifugation als Zytoplasmafraktion im Western Blot eingesetzt. Die Tra-Proteine wurden mit Western Blot über polyklonale Anti-Tra Antikörper nachgewiesen.

Das Orf11 Protein konnte in den Lokalisierungsstudien immer nur als Dublett detektiert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein weiteres, bis jetzt unentdecktes Startcodon mit eigener ribosomaler Bindestelle (RBS) innerhalb des Orf11-Leserahmens sein. Ein mögliches Startcodon könnte an Position 3923 (GenBank AJ5058232) liegen mit einer RBS von 3908 – 3912 (Abb. 4.11). Das Orf11 Dublett konnte in der Membran nachgewiesen werden. Daher entfällt das putative Startcodon an Position 4031, da in diesem Fall die für Orf11 vorhergesagte Transmembranhelix deletiert werden würde. Upstream des in GenBank für Orf11 angegebenen Startcodons gibt es keine, im selben Leseraster liegenden Startcodons. Somit ist ein zweites Startcodon innerhalb des Orf11-Leserahmens an Position 3923 wahrscheinlich.

```

3801 agatcggagg aaatcaaatg aatggactga aagaattttt tgggaatatc
3851 ccaatgtttc aaaagcaagt agaacgagaa atcgaagaaa aaggaattga
3901 accaagtgag ggcattaaaa aaatggaatt tagccgtcaa gtgatccgta
3951 acgtagtgat tggcgtttta gttgtcggta ttcttgcttt tgtgggcatt
4001 tcttattttta acaataaagaa tcaaccacca gtgacaccaa cagccaccac

```

Abb. 4.11: Analyse des Orf11-Leserahmens auf weitere putative Startcodons und ribosomale Bindestellen.

Dargestellt ist ein Teilausschnitt der einzelsträngigen DNA-Sequenz der pIP501 *tra*-Region (Acc. No. AJ505823). Das in GenBank angegebene Orf11-Startcodon liegt an Position 3818 (blau markiert), die zugehörige RBS umfasst die Basenpaare 3806 – 3811 (unterstrichen, blau markiert). Downstream im selben Leseraster gibt es weitere putative Startcodons (rot markiert), an denen die Translation starten könnte. Geeignete RBS (unterstrichen) finden sich für das Startcodon an Position 3923 und 4031. Die Massendifferenzen zwischen dem in GenBank angegebenen Protein und aus dem zusätzlichen Leseraster resultierenden Protein betragen Δ_{3923} 4,1 kDa bzw. Δ_{4031} 8,1 kDa. Die Codons an Position 3827 (Δ_{3827} 0,3 kDa) und Position 3854 (Δ_{3854} 1,4 kDa) entfallen aufgrund der nur geringen Massendifferenzen der Proteine.

4.3.2 Das Transferprotein Orf8 lokalisiert in Foci in der Zellhülle von *E. faecalis*

Das Transferprotein Orf8 wurde über sequentielle Fraktionierung der Zellkompartimente von *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) in der Zellwand und Zellmembran lokalisiert (s. 4.3.1). Die räumliche Verteilung von Orf8 *in vivo* in *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) wurde über Immunfluoreszenz und STED-Mikroskopie (Klar *et al.*, 2001) untersucht. Hierfür wurden exponentiell wachsende *E. faecalis* JH2-2 Zellen auf Deckgläschen mit Poly-L-Lysin

immobilisiert (s. 3.4.2) und das Orf8-Antigen über einen affinitätschromatographisch aufgereinigten polyklonalen Anti-Orf8 Antikörper markiert. Die Anfärbung des Antigens erfolgte über einen Fluoreszenz-markierten, gegen die Fc-Region des primären Antikörpers gerichteten Antikörper (Abb. 4.12). Die STED-Aufnahmen sind von Dipl.-Biol. Till Andlauer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan Sigrist (FU Berlin) in einer Kooperation entstanden.

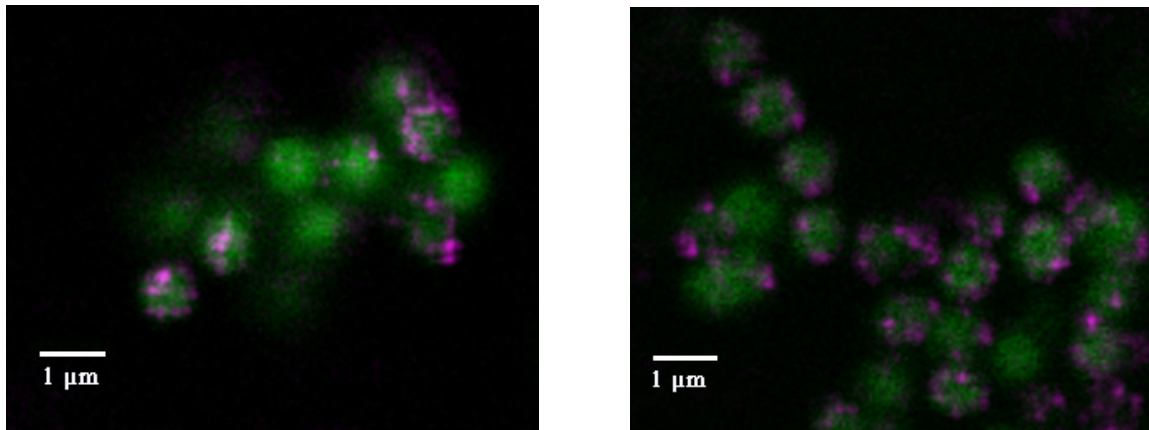


Abb. 4.12: Lokalisierung des Transferproteins Orf8 *in vivo* mittels STED-Mikroskopie (STED - stimulated emission depletion).

Die *E. faecalis* Zellen wurden mit Propidiumiodid angefärbt (Anregung bei 488 nm, grün dargestellt), die Detektion des polyklonalen Anti-Orf8-Antikörpers erfolgte über den fluoreszenzmarkierten Antikörper Atto 647N Goat Anti-Rabbit (violett). Anregung des fluoreszenz-markierten Antikörpers bei 635 nm, STED Laser 725 nm – 850 nm. Gezeigt ist eine Überlagerung der Aufnahmen bei 488 nm und 635 nm.

Nahezu alle *E. faecalis* Zellen zeigen eine Anfärbung mit dem fluoreszenz-markierten Antikörper. Orf8 lokalisiert dabei in mehreren Foci innerhalb einer Zelle. Die Untersuchungen zur Lokalisierung mittels Immunfluoreszenz Mikroskopie legen die Vermutung nahe, dass innerhalb einer Enterokokken-Zelle mehrere T4SS-Komplexe in der Zellhülle gleichzeitig existieren.

4.3.3 Das Transferprotein Orf11 lokalisiert in der Zellhülle von *E. faecalis*

Über sequentielle Fraktionierungen der Zellkompartimente von *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) wurde das Tra Protein Orf11 in der Zellwand, Zellmembran und im Zytoplasma nachgewiesen (s. 4.3.1). Die räumliche Verteilung von Orf11 *in vivo* in *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) wurde über Immunfluoreszenz und STED-Mikroskopie, wie bereits unter 4.3.2 beschrieben, untersucht. Die STED-Aufnahmen zur Lokalisierung von Orf11 sind von Dipl.-Biol. Till Andlauer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan Sigrist (FU Berlin) in einer Kooperation entstanden.

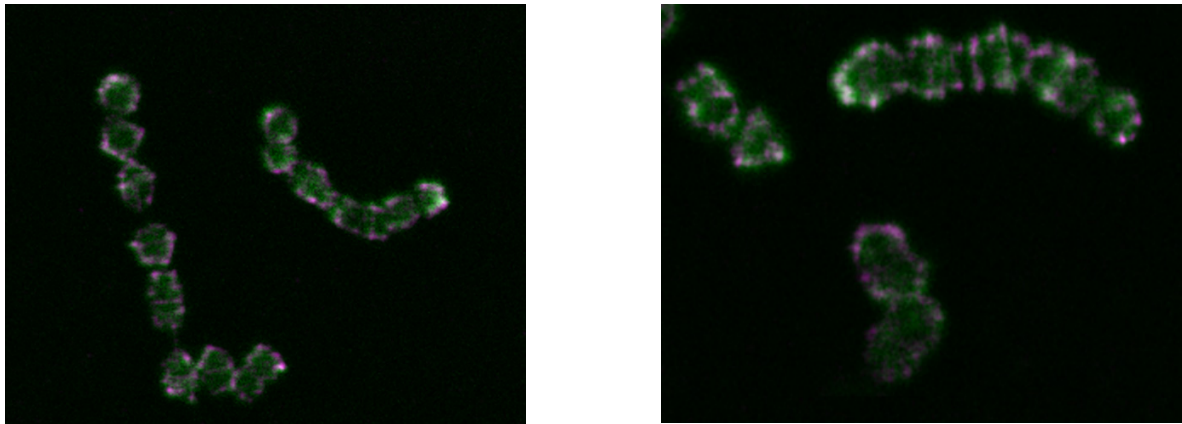


Abb. 4.13: Lokalisierung des Transferproteins Orf11 *in vivo* mittels STED-Mikroskopie.

Die *E. faecalis* Zellen wurden mit Propidiumiodid angefärbt (Anregung bei 488 nm, grün dargestellt), die Detektion des polyklonalen Anti-Orf11-Antikörpers erfolgte über den fluoreszenzmarkierten Antikörper Atto 647N Goat Anti-Rabbit (violett). Anregung des fluoreszenz-markierten Antikörpers bei 635 nm, STED Laser 725 nm – 850 nm. Gezeigt ist eine Überlagerung der Aufnahmen bei 488 nm und 635 nm.

Im Gegensatz zum Tra Protein Orf8, das als Foci in der Zellhülle lokalisiert, liegt Orf11 in der gesamten Zellhülle vor (s. auch konfokale Aufnahmen zur Lokalisierung von Orf11 in der Diskussion, Abb. 5.5). Es sind bisher keine Protein-Protein Interaktionen von Orf11 mit anderen pIP501 Tra Proteinen bekannt. Vermutlich erfolgt die Lokalisierung von Orf11 daher unabhängig von Interaktionen mit anderen Tra Proteinen.

4.3.4 Das putative *coupling* Protein Orf10 bindet einzelsträngige, nicht aber doppelsträngige DNA

Für den erfolgreichen Transfer von DNA über ein T4SS ist eine vermittelnde Funktion zwischen dem Relaxosom und dem mpf-Komplex notwendig, die über das VirD4, das sogenannte *coupling* Protein, bewirkt wird. Es dirigiert die durch eine Relaxase einzelsträngig am *oriT* geschnittene Plasmid-DNA zusammen mit der gebundenen Relaxase über Protein-Interaktionen zum mpf-Komplex in der Zellhülle. Llosa *et al.* (2002) postulierten, dass der Transfer der einzelsträngigen DNA in den Rezipienten aktiv über die das *coupling* Protein erfolgt. Die für diesen Prozeß notwendige Energie könnte durch die Spaltung von ATP durch die ATPase Aktivität des *coupling* Proteins zur Verfügung gestellt werden.

Für das VirD4 homologe Orf10 konnte *in vitro* eine ATP-Bindung und -Hydrolyse nachgewiesen werden (Abajy *et al.*, unveröffentlichte Daten). Zum Nachweis einer DNA-Bindung wurden EMSA mit einzel- und doppelsträngigen Oligonukleotiden durchgeführt (s. 3.3.5). Hierbei wurde ein Oligonukleotid so gewählt, dass es die minimale *oriT*_{pIP501}-Region umfasst (42-mer), während das andere Oligonukleotid eine zufällig gewählte pIP501-Sequenz ohne Sekundärstruktur darstellt (random) (Kopeck *et al.*, 2005).

Sowohl das einzelsträngige 42-mer Oligonukleotid als auch das einzelsträngige random Oligonukleotid zeigten eine Bindung an das His₇-Orf10 (N-terminaler His₇-tag), wobei die Affinität von His₇-Orf10 im direkten Vergleich für das random Oligonukleotid stärker zu sein scheint als für das 42-mer (Abb. 4.14 A, Spur 1 und 8). Für das 42-mer konnten bei niedrigen His₇-Orf10-Konzentrationen zwei Shifts nachgewiesen werden (Abb. 4.14 A, Spur 3-5), während bei ansteigenden His₇-Orf10-Konzentrationen (> 3,3 µM) nur der Komplex II detektierbar war. Möglicherweise finden durch die Bindung von DNA konformationelle Änderungen statt (Patel *et al.*, 1990, Weiss *et al.*, 1990), die stabilisierend auf die Struktur von His₇-Orf10 wirken. Aufgrund einer geringeren Affinität für das 42-mer könnte mehr Protein notwendig sein, um diese stabilisierende Wirkung zu erreichen, so dass bei geringen His₇-Orf10-Konzentrationen Komplexe mit geringerer Mobilität vorliegen.

Das putative *coupling* Protein His₇-Orf10 bindet weder an doppelsträngige random (Abb. 4.14 C) noch an doppelsträngige 42-mer DNA (nicht gezeigt).

Frau B.Sc. Anita Püngel hat unter meiner Anleitung in ihrer Bachelorarbeit untersucht, ob die Walker AB Domäne von Orf10 ausreichend ist, um DNA zu binden. Hierfür wurde die Walker AB Domäne in N-terminaler Fusion mit einem His₇-tag exprimiert und das Protein His₇-Orf10-Walker(AB) über Ni-NTA chromatographisch aufgereinigt (durchgeführt von Dr. Mohammad Yaser Abajy an der Karl-Franzens Universität Graz, Österreich). Weder für einzelsträngige noch für doppelsträngige DNA konnte eine Bindung an die Walker AB Domäne von Orf10 nachgewiesen werden.

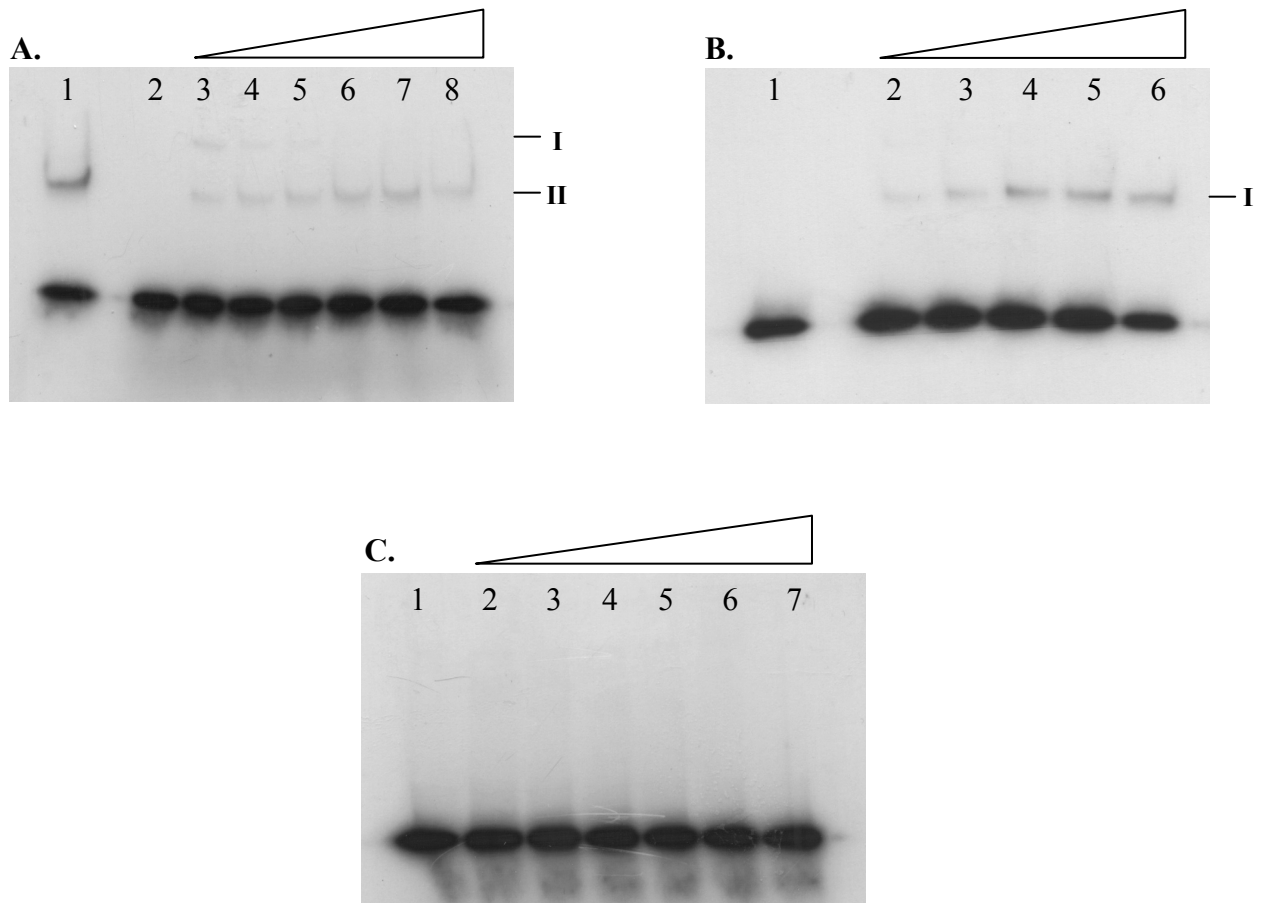


Abb. 4.14: Untersuchungen zu den DNA-Bindeeigenschaften des putativen *coupling* Proteins His₇-Orf10 mittels EMSA.

A. Bindeeigenschaften von His₇-Orf10 an das einzelsträngige 42-mer Oligonukleotid. 1 – 7,2 µM His₇-Orf10, random; 2 – kein Protein; 3 – 1,1 µM His₇-Orf10; 4 – 2,2 µM His₇-Orf10; 5 – 3,3 µM His₇-Orf10; 6 – 4,4 µM His₇-Orf10; 7 – 5,5 µM His₇-Orf10; 8 – 7,2 µM His₇-Orf10. Zum direkten Vergleich zwischen dem 42-mer und dem random Oligonukleotid wurde in Tasche 1 eine Bindereaktion des random Oligonukleotids in der maximal einsetzbaren Konzentration aufgetragen.

B. Bindeeigenschaften von His₇-Orf10 an das einzelsträngige random Oligonukleotid. 1 – kein Protein; 2 – 1,1 µM His₇-Orf10; 3 – 2,2 µM His₇-Orf10; 4 – 3,3 µM His₇-Orf10; 5 – 4,4 µM His₇-Orf10; 6 – 7,2 µM His₇-Orf10.

C. Bindeeigenschaften von His₇-Orf10 an das doppelsträngige random Oligonukleotid. 1 – kein Protein; 2 – 1,1 µM His₇-Orf10; 3 – 2,2 µM His₇-Orf10; 4 – 3,3 µM His₇-Orf10; 5 – 4,4 µM His₇-Orf10; 6 – 5,5 µM His₇-Orf10; 7 – 7,2 µM His₇-Orf10.

Für die EMSAs wurde standardmäßig pro Ansatz 10 fmol ³²P-markiertes Oligonukleotid eingesetzt.

4.3.5 Das zytoplasmatische Tra Protein Orf14 bindet doppelsträngige DNA mit höherer Affinität als einzelsträngige DNA

Über die Funktion des Tra Proteins Orf14 sind keine Informationen vorhanden, es zeigt keine bekannten Homologien oder konservierten Domänen. Bei der Expression und Aufreinigung des His₇-Orf14 wurde bereits von Herrn Dipl.-Ing. Nikolaus Gösweiner Mohr eine DNA-Bindung des His₇-Orf14 Proteins spektroskopisch festgestellt. Erste Versuche mit diesem Protein zeigten nur eine geringe DNA-bindende Fähigkeit. Erst nach einer Behandlung des Proteinlysats mit DNase konnte das His₇-Orf14 für die EMSAs eingesetzt werden.

Die Lokalisierungsstudien *in vivo* (s. 4.3.1) zeigen, dass Orf14 als bisher einziges der 9 untersuchten Tra-Proteine zytoplasmatisch vorliegt.

Für eine mögliche DNA-Bindung von Orf14 wurden EMSA-Analysen mit dem 42-mer und random Oligonukleotid durchgeführt (s. 3.3.5).

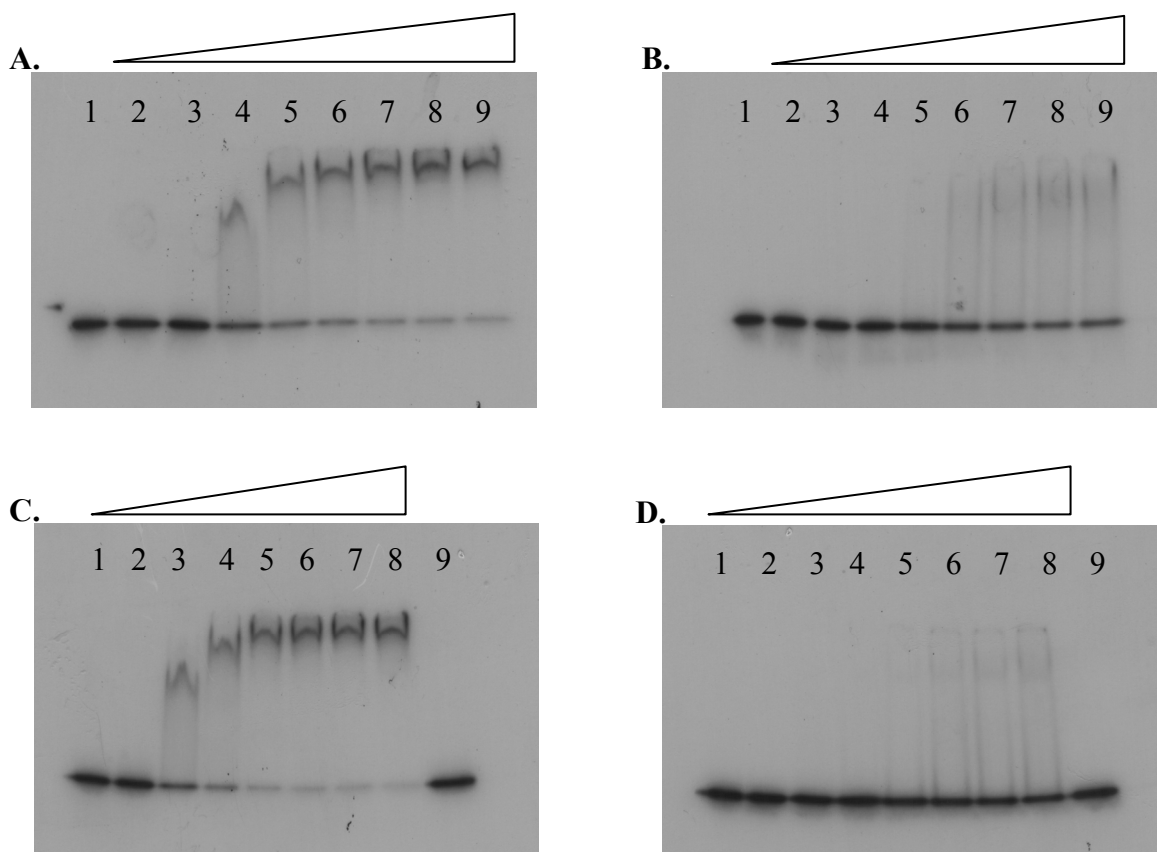


Abb. 4.15: Untersuchungen zu den DNA-Bindeeigenschaften des pIP501 Tra-Proteins His₇-Orf14 mittels EMSA.

A. Bindeeigenschaften von His₇-Orf14 an das doppelsträngige 42-mer Oligonukleotid. 1 – kein Protein; 2 – 10 nM His₇-Orf14; 3 – 100 nM His₇-Orf14; 4 – 1 µM His₇-Orf14; 5 – 2 µM His₇-Orf14; 6 – 4 µM His₇-Orf14; 7 – 6 µM His₇-Orf14; 8 – 8 µM His₇-Orf14; 9 – 10 µM His₇-Orf14.

B. Bindeeigenschaften von His₇-Orf14 an das einzelsträngige 42-mer Oligonukleotid. 1 – kein Protein; 2 – 10 nM His₇-Orf14; 3 – 100 nM His₇-Orf14; 4 – 1 µM His₇-Orf14; 5 – 2 µM His₇-Orf14; 6 – 4 µM His₇-Orf14; 7 – 6 µM His₇-Orf14; 8 – 8 µM His₇-Orf14; 9 – 10 µM His₇-Orf14.

C. Bindeeigenschaften von His₇-Orf14 an das doppelsträngige random Oligonukleotid. 1 – 10 nM His₇-Orf14; 2 – 100 nM His₇-Orf14; 3 – 1 µM His₇-Orf14; 4 – 2 µM His₇-Orf14; 5 – 4 µM His₇-Orf14; 6 – 6 µM His₇-Orf14; 7 – 8 µM His₇-Orf14; 8 – 10 µM His₇-Orf14; 9 – kein Protein.

D. Bindeeigenschaften von His₇-Orf14 an das einzelsträngige random Oligonukleotid. 1 – 10 nM His₇-Orf14; 2 – 100 nM His₇-Orf14; 3 – 1 µM His₇-Orf14; 4 – 2 µM His₇-Orf14; 5 – 4 µM His₇-Orf14; 6 – 6 µM His₇-Orf14; 7 – 8 µM His₇-Orf14; 8 – 10 µM His₇-Orf14; 9 – kein Protein.

Für die EMSAs wurde standardmäßig pro Ansatz 10 fmol ³²P-markiertes Oligonukleotid eingesetzt.

His₇-Orf14 bindet gleichermassen gut an das doppelsträngige random- und 42-mer-Oligonukleotid (Abb. 4.15 A + C). Für His₇-Orf14 Konzentrationen ≤ 100 nM ist keine DNA-Bindung mehr nachweisbar. Für ansteigende Konzentrationen von His₇-Orf14 von 1 µM – 10 µM nimmt die Intensität der Bindung sukzessive zu, erkennbar an der stetigen Abnahme

des nicht-gebundenen Oligonukleotids im unteren Teil des Gels. Die Affinität für das random-Oligonukleotid scheint etwas stärker zu sein als für das 42-mer, die Intensität der nicht-gebundenen DNA nimmt für das random-Oligonukleotid deutlich stärker ab als für das 42-mer. Bei 10 μM Proteinkonzentrationen ist die Bande der nicht-gebundenen DNA für das random Oligonukleotid kaum noch sichtbar, während die Bande nicht-gebundener DNA für das 42-mer noch erkennbar ist.

Die Bindung von His₇-Orf14 an einzelsträngige DNA ist für beide verwendeten Oligonukleotide deutlich schwächer als für doppelsträngige DNA. Definierte, retardierte Banden sind kaum erkennbar, die Intensität nicht-gebundenen Oligonukleotids nimmt aber auch hier mit steigender Konzentration an His₇-Orf14 ab. Hier bindet einzelsträngiges 42-mer Oligonukleotid etwas besser an das Protein als das random-Oligonukleotid (einsetzender Shift ab 2 μM Protein für das 42-mer, 4 μM für das random-Oligonukleotid, Abb. 4.15 B + D).

4.3.6 Das Tra Protein Orf11 bindet einzel- und doppelsträngige DNA, während das Tra-Protein Orf8 keine DNA-Bindung zeigt

Das Tra Protein Orf11 wurde in Lokalisierungsstudien in den Zellkompartimenten Zellwand, Zellmembran und Zytoplasma als Dublett nachgewiesen (s. 4.3.1). Über eine mögliche Funktion des Proteins liegen keine experimentellen Daten vor, Alvarez-Martinez und Christie (2009) zeigen Ähnlichkeiten von Orf11 mit PrgL von pCF10 basierend auf Proteingröße und vorhergesagter -topologie auf. Um eine eventuelle DNA-Bindefähigkeit des Orf11 zu untersuchen, wurden EMSA mit aufgereinigtem His₇-Orf11del durchgeführt, bei dem die N-terminale Transmembranhelix deletiert ist (s. 3.3.5).

Das Tra Protein His₇-Orf11del bindet sowohl an doppelsträngige als auch an einzelsträngige DNA (Abb. 4.16). Die Bindung an einzelsträngige DNA ist im Vergleich zum Doppelstrang etwas stärker, für das random-Oligonukleotid setzt ein Shift ab 1 μM Protein ein, für das 42-mer-Oligonukleotid ab Proteinkonzentrationen > 4 μM (Abb. 4.16 A + C). Für das His₇-Orf11del Protein werden mit dem random-Oligonukleotid zwei Komplexe gebildet (mit I und II in Abb. 4.16 C bezeichnet). Komplex I zeigt ein langsames Wanderungsverhalten als Komplex II und liegt in deutlich höherer Konzentration vor. Die Affinität von His₇-Orf11del an doppelsträngige DNA zu binden, ist für das random-Oligonukleotid größer (Shift ab 2 μM Protein, Abb. 4.16 D) als für das 42-mer Oligo (Shift ab Konzentration > 4 μM , Abb. 4.16 B). Für das doppelsträngige random-Oligo treten mit zunehmender Proteinkonzentrationen (> 4 μM) 2 Komplexe auf (mit III und IV in Abb. 4.16 D bezeichnet). Komplex III zeigt ein wesentlich geringere Mobilität als Komplex IV.

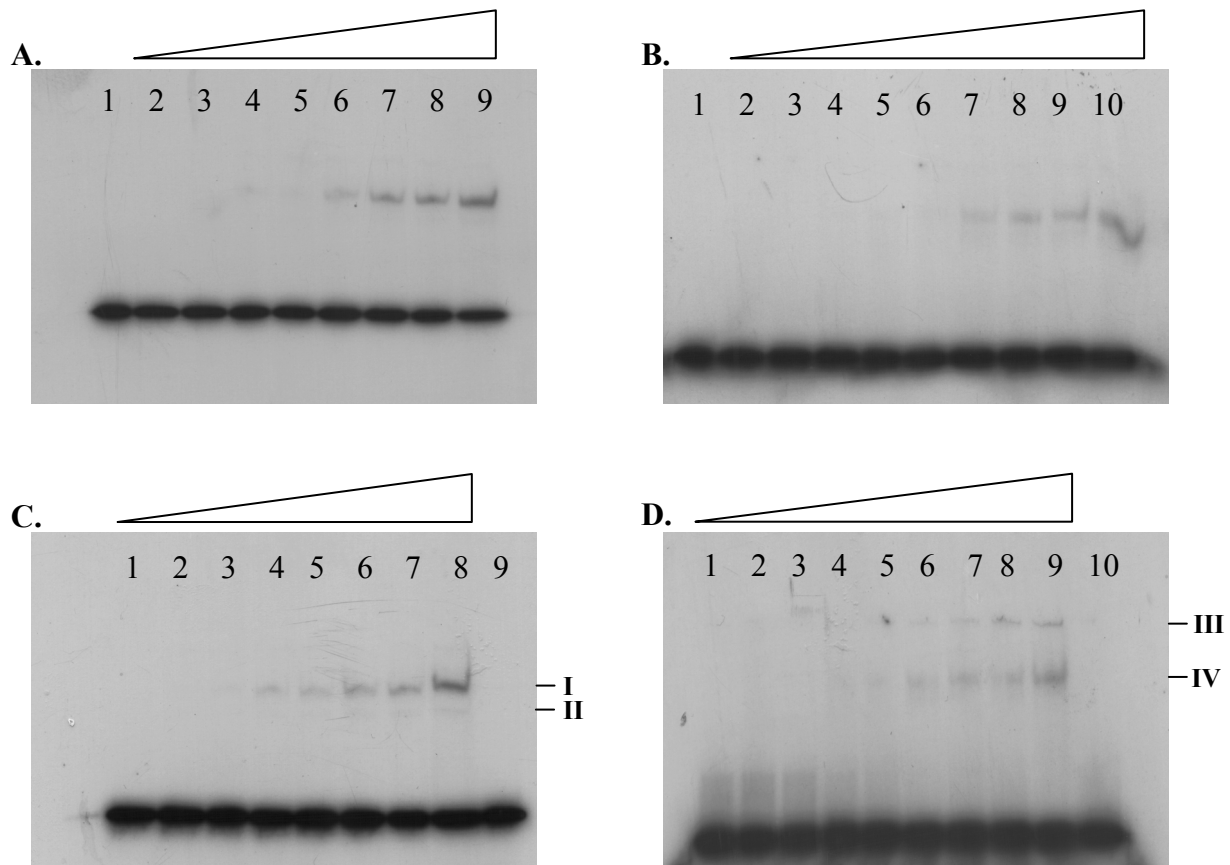


Abb. 4.16: Untersuchungen zu den DNA-Bindeeigenschaften des pIP501 Tra-Proteins His₇-Orf11del mittels EMSA.

A. Bindeeigenschaften von His₇-Orf11del an das einzelsträngige 42-mer Oligonukleotid. 1 – kein Protein; 2 – 100 nM His₇-Orf11del; 3 – 1 µM His₇-Orf11del; 4 – 2 µM His₇-Orf11del; 5 – 4 µM His₇-Orf11del; 6 – 6 µM His₇-Orf11del; 7 – 8 µM His₇-Orf11del; 8 – 10 µM His₇-Orf11del; 9 – 20 µM His₇-Orf11del.

B. Bindeeigenschaften von His₇-Orf11del an das doppelsträngige 42-mer Oligonukleotid. 1 – kein Protein; 2 – 10 nM His₇-Orf11del; 3 – 100 nM His₇-Orf11del; 4 – 1 µM His₇-Orf11del; 5 – 2 µM His₇-Orf11del; 6 – 4 µM His₇-Orf11del; 7 – 6 µM His₇-Orf11del; 8 – 8 µM His₇-Orf11del; 9 – 10 µM His₇-Orf11del; 10 – 20 µM His₇-Orf11del.

C. Bindeeigenschaften von His₇-Orf11del an das einzelsträngige random Oligonukleotid. 1 – 100 nM His₇-Orf11del; 2 – 1 µM His₇-Orf11del; 3 – 2 µM His₇-Orf11del; 4 – 4 µM His₇-Orf11del; 5 – 6 µM His₇-Orf11del; 6 – 8 µM His₇-Orf11del; 7 – 10 µM His₇-Orf11del; 8 – 20 µM His₇-Orf11del; 9 – kein Protein.

D. Bindeeigenschaften von His₇-Orf11del an das doppelsträngige random Oligonukleotid. 1 – 10 nM His₇-Orf11del; 2 – 100 nM His₇-Orf11del; 3 – 1 µM His₇-Orf11del; 4 – 2 µM His₇-Orf11del; 5 – 4 µM His₇-Orf11del; 6 – 6 µM His₇-Orf11del; 7 – 8 µM His₇-Orf11del; 8 – 10 µM His₇-Orf11del; 9 – 20 µM His₇-Orf11del; 10 – kein Protein.

Für die EMSA wurde standardmäßig pro Ansatz 10 fmol ³²P-markiertes Oligonukleotid eingesetzt.

Frau B.Sc. Anita Püngel hat unter meiner Anleitung in ihrer Bachelorarbeit untersucht, ob das Tra Protein His₇-Orf8 DNA bindende Eigenschaften besitzt. Eine Bindung von His₇-Orf8 an das einzel- und doppelsträngige random und 42-mer Oligonukleotid konnte in keinem untersuchten Fall nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

4.3.7 Das VirB1 homologe Orf7 ist essentiell für den konjugativen Transfer von pIP501

In vorhergehenden Studien konnte eine lytische Transglykosylase-Aktivität von Orf7 *in vitro* nachgewiesen werden (Celic *et al.*, unveröffentlichte Daten). Für VirB1 homologe Proteine aus G⁻ T4SS konnte gezeigt werden, dass eine lytische Transglykosylase für den erfolgreichen konjugativen Transfer nicht essentiell ist (Berger *et al.*, 1994, Zahrl *et al.*, 2005), die Transferraten sind bei deletiertem VirB1 um den Faktor 10 bis 100 reduziert. Für T4SS aus G⁺ Systemen liegen hierzu keine Daten vor. Aufgrund eines unterschiedlichen Zellwandaufbaus bei G⁺ (Plasmamembran und mehrschichtiges Peptidoglykan) und G⁻ Bakterien (Plasmamembran und Außenmembran, einschichtiges Peptidoglykan) (Beveridge *et al.*, 1991) ist eine essentielle Rolle des VirB1 homologen Proteins bei G⁺ Bakterien jedoch wahrscheinlich.

Um den Einfluß von Orf7 auf den konjugativen Transfer von pIP501 zu untersuchen, wurde eine *orf7* knock-out Mutante von pIP501 erzeugt. Hierfür wurden die upstream- und downstream-Region des *orf7*-Gens per PCR amplifiziert (jeweils ca. 1000 bp) und in den Suicide-Vektor pCJK47 kloniert (Kristich *et al.*, 2007) (s. 3.2.12). Um das Leseraster nicht zu unterbrechen, wurden die Primer so gewählt, dass die 5 ersten N-terminalen und die 6 letzten C-terminalen Aminosäuren von Orf7 erhalten bleiben. Zwischen dem N-Terminus und dem C-Terminus des deletierten Orf7 sind zwei weitere Aminosäuren vorhanden, die sich aus der in Phase mit dem *orf7* atg-Startcodon befindlichen Restriktionsstelle *Bam*HI ergeben (Gly + Ser). 97% des für Orf7 kodierenden Bereiches sind somit deletiert.

Nach Klonierung der up- und downstream Regionen wurde eine Gentamicin-Resistenz (*aacA-aphD*) in den Suicide-Vektor eingebaut. Für die Replikation des Suicide-Vektors in *E. faecalis* sind Replikationsgene *in trans* notwendig (z.B. *E. faecalis* CK111, P₂₃*repA4*). Wird der Suicide-Vektor nach *E. faecalis* OG1RF (pIP501) als Wirt übertragen, kann das Plasmid nicht mehr replizieren und geht entweder über Segregation verloren oder integriert über homologe Rekombination in das Chromosom bzw. Plasmid (merodiploider Zustand). Der merodiploide Zustand ist instabil und muss durch Antibiotika-Selektion aufrechterhalten werden. Da pIP501 bereits eine Erythromycin-Resistenz kodiert, ist das *ermC* Gen auf pCJK47 zur Selektion des merodiploiden Zustands nicht geeignet. Deshalb wurde das *aacA-aphD* Gen kloniert, um den merodiploiden Zustand von pIP501 mit Gentamicin selektieren zu können (pKAΔ7, Abb. 4.17, s. 3.2.12).

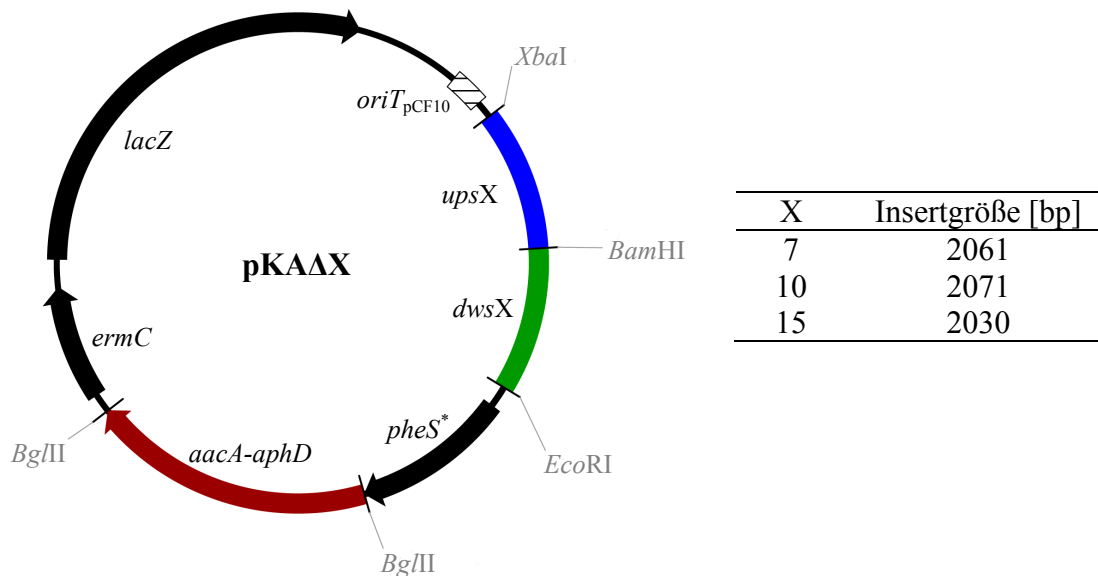


Abb. 4.17: Konstruktion von Suicide-Vektoren zur Deletion verschiedener *tra* Gene von pIP501.

Basierend auf dem Plasmid pCJK47 (Kristich *et al.*, 2007) wurden Modifikationen vorgenommen, um pIP501 *knock out* Mutanten zu erzeugen. Eine Gentamicinresistenz (*aacA-aphD*) wurde über die Schnittstelle *Bgl*II eingebaut. Die upstream- (*ups*) und downstream- (*dws*) Regionen verschiedener *tra* Gene (*orf7*, *orf10*, *orf15*) wurden parallel in den Suicide-Vektor über die Schnittstellen *Eco*RI und *Xba*I kloniert. Für *orf10* und *orf15* konnte keine Integration des Suicide-Vektors upstream oder downstream von *orf10* bzw. *orf15* nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

E. faecalis CK111 (pCF10-101) wurde mit dem erhaltenen Konstrukt pKAΔ7 transformiert (s. 3.1.3 b) und über ein biparentales Mating wurde das Plasmid pKAΔ7 nach *E. faecalis* OG1RF (pIP501) übertragen. Der Vektor integrierte über homologe Rekombination up- bzw. downstream von *orf7* in das Plasmid pIP501. Der merodiploide Zustand wurde durch Selektion auf Gentamicin ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) aufrechterhalten. Um den Einbau des Suicide-Vektors über homologe Rekombination in pIP501 zu verifizieren, wurde ein PCR-Assay entwickelt (s. 3.2.13, Abb. 4.18).

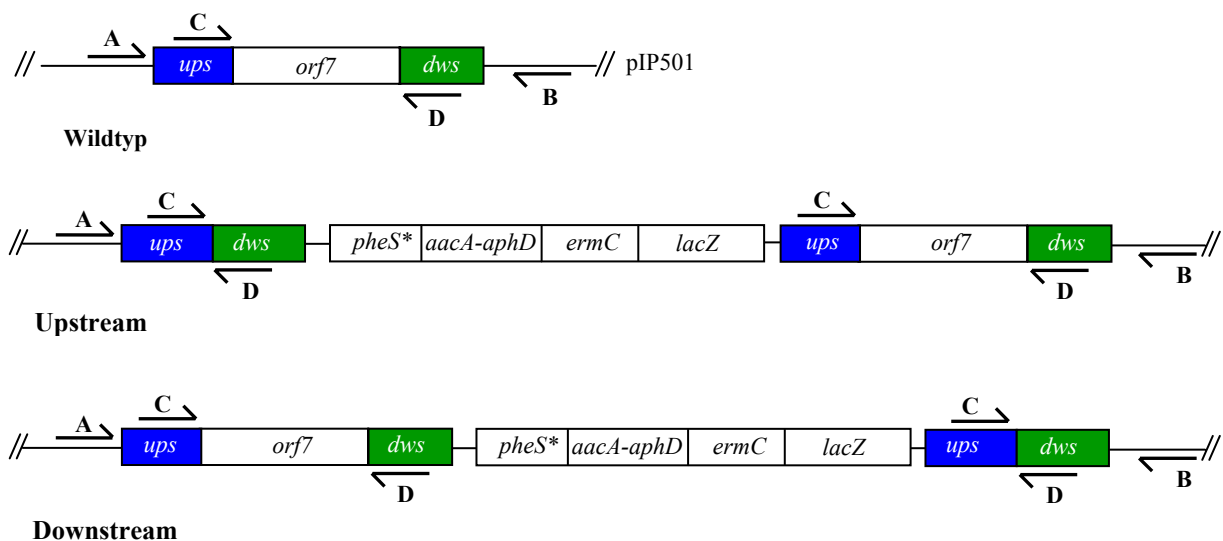


Abb. 4.18: Integration des Suicide-Vektors pKAΔ7 up- oder downstream von *orf7* und Identifizierung homologer Rekombinanten mittels PCR.

Um die Integration des Vektors pKAΔ7 in up- oder downstream Regionen von *orf7* identifizieren zu können, wurde ein PCR Assay entwickelt, bestehend aus 2 Primerpaaren (AD, BC). Für den Wildtyp pIP501 ergeben sich Produktgrößen AD = 2594 bp und BC = 2238 bp. Bei Integration des Suicide-Vektors upstream von *orf7* beträgt die Größe des Produkts AD = 1523 bp, während das Produkt BC unverändert bleibt. Integriert der Vektor downstream von *orf7* hat das Produkt BC eine Größe von 1167 bp, während das Produkt AD unverändert bleibt. Beim *knock out* von *orf7* betragen die Größen AD = 1523 bp und BC = 1167 bp.

Mit dem flankierenden Primerpaar AB beträgt das PCR-Produkt 3711 bp für den Wildtyp und 2640 bp für die *orf7* k.o. Mutante. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

Der Suicide-Vektor pKAΔ7 integrierte downstream von *orf7* (Abb. 4.19, Spur 1 und 2). Der merodiploide Zustand ist instabil und wird bei Abwesenheit des Gentamicin-Selektionsdruckes behoben, indem das integrierte Plasmid über Rekombination wieder aus pIP501 herausgeschnitten wird. Hierbei gibt es zwei mögliche Wege, die jeweils mit 50%iger Wahrscheinlichkeit auftreten: Excision des Wildtypallels unter Bildung eines *orf7* deletierten pIP501 oder Excision des mutierten Allels unter Bildung des Wildtyp pIP501 (Abb. 4.20). Das ausgeschnittene Plasmid kann nicht eigenständig im Wirt *E. faecalis* OG1RF replizieren und wird über Segregation verloren. Die Segregation wird über eine Counterselektion durch das *pheS*^{*} Gen verstärkt, das in dem Wirt eine geringere Spezifität für die Aminosäure Phenylalanin bewirkt. Durch p-Chlor-Phenylalanin im Medium sterben Zellen ab, die das *pheS*^{*} Gen besitzen.

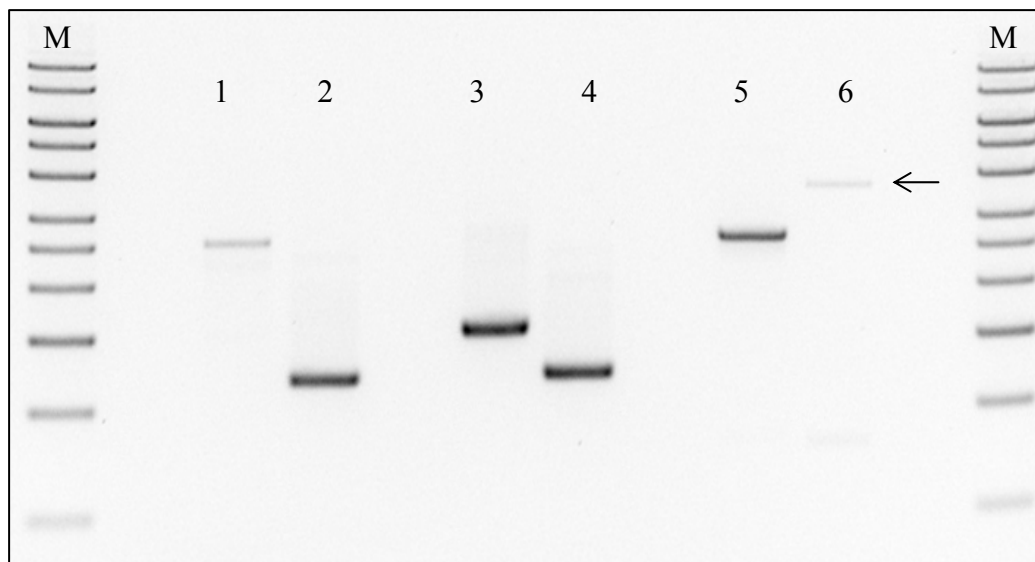


Abb. 4.19: Downstream Integration des Suicide-Vektors und Deletion des *orf7*-Gens.

Der Suicide-Vektor integrierte downstream von *orf7*, Spur 1: AD-PCR; Spur 2: BC-PCR des merodiploiden Plasmids pIP501. Nach Excision des Suicide-Vektors und Counterselektion konnte eine *orf7* k.o. Mutante isoliert werden, Spur 3: AD-PCR; Spur 4: BC-PCR der *orf7* k.o. Mutante. Spur 5: AB-PCR des *orf7* k.o.; Spur 6: AB-PCR des Wildtyps (AB – flankierende Primer ausserhalb der klonierten Region).

Markerbanden, 1 kb DNA Ladder (MBBL): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 500 bp.

Durch die Counterselektion konnte ein *orf7* deletiertes Plasmid pIP501 Δ 7 erhalten werden (Abb. 4.19, Spur 3 und 4). Der *orf7* k.o. wurde über PCR mit flankierenden Primern (Abb. 4.19, Spur 5 und 6) und Sequenzierung des PCR Produktes verifiziert.

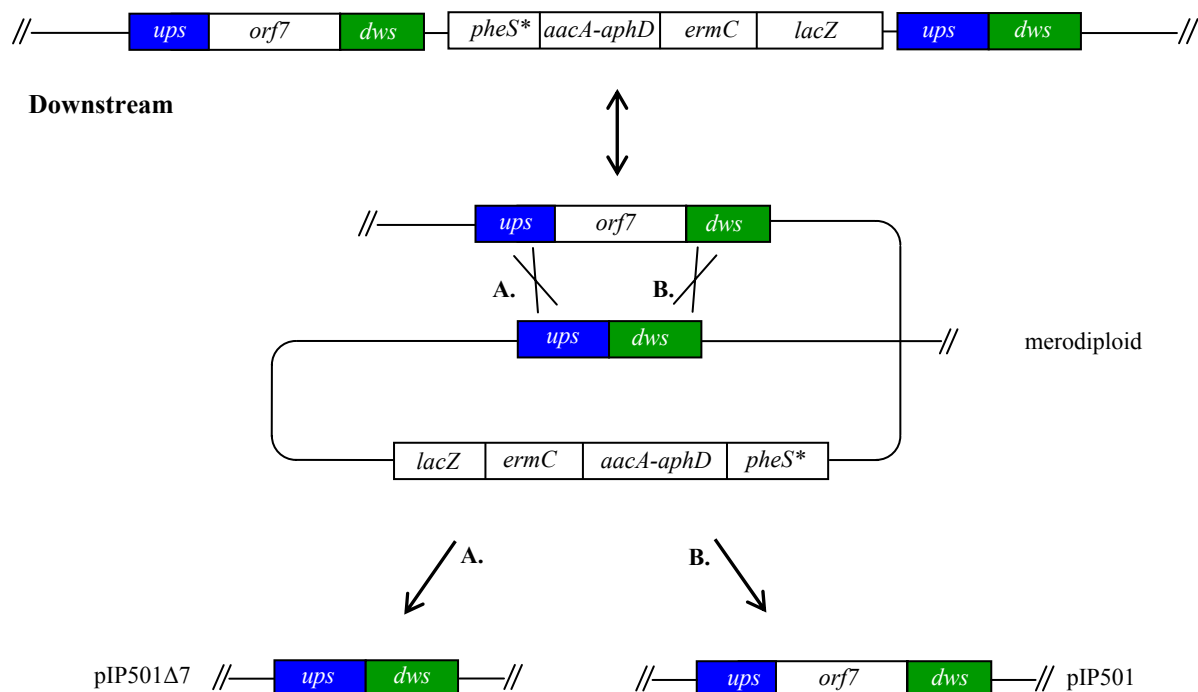


Abb. 4.20: Merodiploider Zustand durch Integration des Suicide-Vektors in pIP501 und Segregation des Suicide-Vektors über homologe Rekombination.

Der Suicide-Vektor pKA Δ 7 integrierte *downstream* von *orf7* in das Plasmid pIP501, aufrechterhalten durch Selektion mit Gentamicin. Ohne Selektionsdruck findet an den *direct repeats* im Anschluß eine homologe Rekombination statt, die zur Excision des Plasmids führt. Hierbei sind zwei Wege möglich: homologe Rekombination in der *ups* Region unter Bildung einer *orf7* k.o. Mutante (A) oder homologe Rekombination in der *dws* Region unter Rückbildung des Wildtyps pIP501 (B). Das herausgeschnittene Plasmid geht über Segregation und *counter* Selektion mit p-Cl-Phenylalanin verloren. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

Um den Einfluß der lytischen Transglykosylase auf den Transfer von pIP501 zu untersuchen, wurden biparentale Matings mit pIP501 Δ 7 in *E. faecalis* OG1RF und einem isogenen *E. faecalis* OG1RF (pIP501), erhalten beim Screening nach der *orf7* k.o. Mutante, durchgeführt. Als Rezipient wurde *E. faecalis* OG1X gewählt, die Transkonjuganten wurden auf BHI Agar, Sm 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ und Cm 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ selektiert. Während der Wildtyp für pIP501 typische Transferraten zeigte ($7,6 \cdot 10^{-5} \pm 5,7 \cdot 10^{-5}$), konnte für den *orf7* k.o. kein Transfer nachgewiesen werden.

Eine Komplementierung des *orf7* k.o. wurde mit dem Vektor pVA-*orf7* (s. Abb. 4.9) versucht. Es sollte untersucht werden, ob sich durch *orf7* in *trans* die Transfereigenschaften von pIP501 Δ 7 wiederherstellen lassen. Die Herstellung kompetenter *E. faecalis* OG1RF (pIP501 Δ 7) erfolgte nach verschiedenen Protokollen (s. 3.1.3), die bereits in vorangegangenen Experimenten erfolgreich eingesetzt werden konnten. Der Stamm *E.*

faecalis OG1RF (pIP501Δ7) konnte nicht mit dem Komplementierungsvektor pVA-*orf7* transformiert werden. Eine Inkompatibilität beider Vektoren kann ausgeschlossen werden (s. Tab 4.1). Vielmehr scheint die Transformationseffizienz durch das in *E. faecalis* OG1RF bereits vorliegende Plasmid pIP501Δ7 stark reduziert zu sein.

Tab. 4.4: Vergleich der Transferraten* von dem *orf7* deletierten pIP501Δ7 in *E. faecalis* OG1RF mit einem isogenen *E. faecalis* OG1RF (pIP501), Transfer in den Rezipienten *E. faecalis* OG1X.

<i>E. faecalis</i> OG1RF (pIP501)	<i>E. faecalis</i> OG1RF (pIP501Δ7)
x <i>E. faecalis</i> OG1X	x <i>E. faecalis</i> OG1X
$1,45 \cdot 10^{-4}$	$< 1,5 \cdot 10^{-9}$
$7,5 \cdot 10^{-5}$	$< 6,1 \cdot 10^{-9}$
$6,4 \cdot 10^{-6}$	$< 2,9 \cdot 10^{-9}$

*die Transferrate ist als Zahl der Transkonjuganten pro Rezipient angegeben

Wie bereits erwähnt konnte für die Suicide-Vektoren pKAΔ10 und pKAΔ15 bisher keine Integration up- bzw. downstream der pIP501 *tra* Gene *orf10* und *orf15* nachgewiesen werden. Die up- und downstream Regionen von *orf10* und *orf15* wurden daher über die Schnittstellen *EcoRI* und *XbaI* in einen weiteren Suicide-Vektor kloniert, der ein Temperatur-sensitives Replikon aus pWVO1 besitzt (pCASPER, Callegan *et al.*, 1999). Der Vektor repliziert bei Temperaturen bis 37°C autonom in *E. faecalis*, bei Temperaturerhöhung auf 42°C findet keine Replikation mehr statt und der Vektor integriert in homologe Stellen im Chromosom / Plasmid. Zurzeit wird in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Elisabeth Grohmann, Uniklinikum Freiburg, mit den in dieser Arbeit erzeugten Suicide-Vektoren nach *orf10* und *orf15* k.o. Mutanten gescreent.

5. DISKUSSION

Horizontaler Gentransfer über mobile genetische Elemente wie Plasmide, Transposons und Bakteriophagen ermöglicht eine rasche Adaption von Bakterien an neue Umwelteinflüsse. Der horizontale Gentransfer kann hierbei nicht nur innerhalb einer Art, sondern auch übergreifend zwischen verschiedenen, kaum verwandten Gattungen stattfinden. Die evolutionären Anpassungsmöglichkeiten von Prokaryonten hängen daher nicht nur von spontanen Mutationen ab, sondern sind auch an die Beschaffenheit und die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft gekoppelt, zusammengefasst unter dem Begriff „bakterielles Supergenom“, das sich aus dem prokaryontischen Chromosom und Genen zusammensetzt, die auf mobilen genetischen Elementen kodiert sind (Norman *et al.*, 2009).

Die Entstehung multi-resistenter pathogener Bakterien ist auf den übermäßigen Gebrauch von Antibiotika in der Medizin und in der Masttierhaltung zurückzuführen. Antibiotikaresistenzgene sind in der Umwelt allgegenwärtig, selbst in unbelasteten Systemen, wie Flussquellen oder Böden, konnten resistente Mikroorganismen nachgewiesen werden. Für Kläranlagen konnte in Modellversuchen gezeigt werden, dass Antibiotikaresistenzgene horizontal ausgetauscht werden können, der Selektionsdruck durch Antibiotika innerhalb der Kläranlagen jedoch nicht ausreichend ist, um die Entstehung resistenter Bakterien zu fördern. Vielmehr führt vermutlich ein übermäßiger Einsatz von Antibiotika z.B. in der Landwirtschaft dazu, dass resistente Bakterien im Boden angereichert werden. Durch den hohen Selektionsdruck können die Resistenzmechanismen auf Bakterien übertragen werden, die ubiquitär in aquatischen und terrestrischen Systemen vorkommen wie z.B. der Gattung *Bacillus* und über die die Resistenzmechanismen horizontal in pathogene Bakterien übertragen werden können (Kümmerer, 2009; Aminov und Mackie, 2007; Khachatourians, 1998).

Die Analyse des mobilen genetischen Pools (Mobilom, Frost *et al.*, 2005) ist daher zur Bewertung und Gefahreneinschätzung der bakteriellen Gemeinschaft entscheidend. Untersuchungen zum Mobilom werden erst seit wenigen Jahren detaillierter durchgeführt. Eine besondere Herausforderung stellt hierbei der Nachweis des horizontalen Gentransfers dar. Ohne geeignete Selektionsmarker ist das Auffinden mobiler genetischer Elemente mühsam und zeitaufwendig (Hegstad *et al.*, 2010; Ochmann *et al.*, 2000). Molekularbiologische Werkzeuge wie mobilisierbare und konjugative Plasmide, die mit fluoreszierenden Proteinen markiert sind, könnten zum direkten Nachweis von horizontalem Gentransfer *in situ* beitragen.

5.1 Studien zum horizontalen intra- und interspezies Gentransfer mittels fluoreszierender Proteine

Fluoreszierende Proteine wurden bereits in mehreren Studien zum horizontalen Gentransfer eingesetzt. So konnten Babic *et al.* (2008) mittels eines gelb-fluoreszierenden Proteins (YFP) konjugativen Transfer des F-Plasmids in *E. coli* in Echtzeit verfolgen. Mittels des GFP-markierten TOL Plasmids konnte ein konjugativer Transfer *in situ* auf Alfalfasprossen von *Pseudomonas putida* in verschiedene *Pseudomonas*- und *Erwinia*-Arten über eine grüne Fluoreszenz nachgewiesen werden. Hierbei wurde die Expression des GFP durch einen *lacI* reprimierbaren Promotor reguliert. Der *lacI^q* Repressor ebenso wie das Gen für das rot fluoreszierende Protein DsRed wurden in das Chromosom des Donors eingebaut. Durch einen Transfer des *gfp* markierten TOL Plasmids konnte in den Transkonjuganten eine grüne Fluoreszenz durch den dort fehlenden *lacI^q* Repressor ausgebildet werden. Die Quantifizierung des konjugativen Transfers unter natürlichen Bedingungen konnte direkt am Mikroskop erfolgen (Mølbak *et al.*, 2003).

Eine Quantifizierung von horizontalem Gentransfer zwischen verschiedenen *E. coli* Stämmen sowie verschiedenen *P. putida* Stämmen konnte über fluoreszierende Proteine mit *fluorescence activated cell sorting* (FACS) erfolgreich gezeigt werden. Sørensen *et al.* (2003) nutzten ein konjugatives Plasmid (pKJK10), bei dem ein *gfp* Gen unter Kontrolle eines *lac* Promotors stand. Als Donorstämme wurden *E. coli* und *P. putida* benutzt, die den *lacI^q* Repressor auf dem Chromosom kodierten. Über den Transfer des konjugativen, *gfp* markierten Plasmids in die Rezipienten (*E. coli* bzw. *P. putida*) wurde der *lac* Promotor aktiviert. Die Transkonjuganten konnten anhand der grünen Fluoreszenz mit FACS detektiert und quantifiziert werden. Über die direkte Quantifizierung des Gentransfers konnte gezeigt werden, dass die Standardmethoden zur Ermittlung von Transferraten über Kultivierung im Labor nur ein ungenaues Bild zum horizontalen Gentransfer liefern. Zellen können sich in einem „viable, but non-culturable“ Zustand (Sørensen *et al.*, 2005) befinden, d.h. ein gewisser Anteil an Transkonjuganten nimmt die DNA auf, lässt sich aber unter Laborbedingungen nicht kultivieren.

Im Gegensatz zu *Pseudomonas* und *E. coli*, deren Genetik gut charakterisiert ist und für die es eine Vielzahl an molekularbiologischen Werkzeugen für genetische Manipulationen gibt, steht für die meisten G⁺ Bakterien, vor allem aber für pathogene G⁺ Bakterien, nur eine limitierte Zahl an molekularbiologischen Werkzeugen zur Verfügung. Darüber hinaus sind Regulationsmechanismen aus *E. coli* und Pseudomonaden wie z.B. das *lac*-Operon nicht auf G⁺ Bakterien wie *Enterococcus* übertragbar.

Ein Ziel dieser Studie war die Konstruktion mobilisierbarer und konjugativer Plasmide, die mit dem grün fluoreszierenden Protein markiert sind, zum Nachweis horizontalen Gentransfers zwischen verschiedenen G⁺ Bakterien (*Enterococcus*, *Bacillus*) und zwischen *E. faecalis* und *E. coli* durch die Übertragung einer grünen Fluoreszenz.

5.1.1 Entwicklung *gfp*-markierter mobilisierbarer Plasmide zum Nachweis von horizontalem Gentransfer

In dieser Arbeit wurden auf dem Inc18 Plasmid pIP501 basierende, mobilisierbare und *gfp*-markierte *shuttle* Plasmide konstruiert. Für die Herstellung der mobilisierbaren Plasmide wurden zwei verschiedene *shuttle* Vektoren gewählt, die beide einen NisR und NisK regulierten, durch Nisin induzierbaren *nisA* Promotor (NICE-System, Kuipers *et al.*, 1998) sowie einen ColE1 Replikationsursprung für die Replikation in G⁻ *E. coli* besitzen (pMSP3535 und pMSP3535VA). Die Replikation des Plasmids pMSP3535 in G⁺ Bakterien beruht auf dem pAM β 1-Replikon, während in pMSP3535VA das Replikationssystem aus pVA380-1 vorliegt. In beide Plasmide wurde eine *gfp-oriT*_{pIP501} Kasse sowie ein transkriptioneller Terminator aus dem λ -Phagen (*t*₀) eingebaut.

Nachfolgend wurden die Mobilisierungseigenschaften der GFP-markierten, mobilisierbaren Plasmide untersucht. Hier wurden zunächst für ein *proof of principle* bi- und triparentale Kreuzungen mit pIP501 als konjugatives Helferplasmid in *E. faecalis* durchgeführt. In dieser Arbeit konnte für das mobilisierbare Plasmid pVA-GFP eine Mobilisierung von *E. faecalis* nach *E. faecalis*, *B. subtilis* subsp. *natto* und *E. coli* XL10 gezeigt werden.

Die Mobilisierungsrate des Plasmids pVA-GFP von *E. faecalis* OGIX nach *E. faecalis* JH2-2 lag im Mittel bei $1,4 \cdot 10^{-5} \pm 3,1 \cdot 10^{-6}$ Transkonjuganten pro Rezipient und beträgt damit ca. 1/3 der Intraspezies-Transferrate von pIP501 zwischen zwei verschiedenen *E. faecalis* Stämmen ($3,82 \cdot 10^{-5} \pm 1,95 \cdot 10^{-5}$). Die in dieser Arbeit erhaltenen Werte für den konjugativen Transfer zwischen zwei *E. faecalis* Stämmen liegen in dem erwarteten Bereich, der in der Literatur angegeben wird (Transferraten im Bereich 10^{-6} bis 10^{-2} , Marcinek *et al.*, 1998; Langella *et al.*, 1993).

Typischerweise sind Mobilisierungsraten von nicht selbsttransferierbaren Plasmiden kleiner als die Transferraten der konjugativen Plasmide, über die die Mobilisierung stattfindet (Timmerly *et al.*, 2009; van der Lelie *et al.*, 1990). Entscheidend hierbei ist ebenfalls, ob die zur *oriT* Sequenz spezifische Relaxase in der Zelle vorhanden ist und den Einzelstrangbruch der mobilisierbaren DNA katalysieren kann. Die Mobilisierungseffizienz ist höher, wenn die zur *oriT* Sequenz spezifische Relaxase vorhanden ist. Ohne spezifische Relaxase katalysiert

vermutlich die auf dem konjugativen Plasmid kodierte Relaxase den Einzelstrangbruch der mobilisierbaren DNA, wenn auch weniger effizient. Timmerly *et al.* (2009) fanden für die mobilisierbaren Plasmide pUB110 und pE194, die jeweils eine *oriT* Region besitzen und für eine dazu gehörende Relaxase kodieren, eine um den Faktor 10 verringerte Mobilisierungsrate im Vergleich zur Transferrate des konjugativen Helferplasmids pXO16 in *B. thuringiensis*. Lag auf dem mobilisierbaren Plasmid keine Relaxase vor, war die Mobilisierungsrate ca. um den Faktor 10^4 reduziert. Van der Lelie *et al.* (1990) untersuchten Mobilisierungen von pMV158 mit den Helferplasmiden pAM β 1 und pIP501 von *E. faecalis* nach *L. lactis* subsp. *lactis*. Hier war die Mobilisierungsrate im Vergleich zur Transferrate um den Faktor $5 \cdot 10^2$ reduziert.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Werte für den konjugativen Transfer von pIP501 und für die Mobilisierung des Plasmids pVA-GFP zwischen zwei *E. faecalis* Stämmen liegen demnach in dem erwarteten Bereich. Das Plasmid pVA-GFP kodiert nicht für die *oriT* spezifische Relaxase Orf1_{pIP501}, sie wird jedoch *trans* durch pIP501 exprimiert, so dass der Einzelstrangbruch der DNA stattfinden kann. Da es sich um die pIP501 spezifische *oriT* Region in pVA-GFP handelt, ist die Mobilisierungsrate des Plasmids pVA-GFP im Vergleich zur Transferrate von pIP501 nur um den Faktor 3 erniedrigt. Das Verhältnis Transferrate / Mobilisierungsrate ist daher erwartungsgemäß höher als in anderen Studien.

Interspezies-Mobilisierungen konnten mit dem Konstrukt pVA-GFP von *E. faecalis* nach *B. subtilis* subsp. *natto* über das Helferplasmid pIP501 in *E. faecalis* gezeigt werden. Der Mittelwert der Mobilisierungsrate lag bei $4,1 \cdot 10^{-6} \pm 4,7 \cdot 10^{-7}$. Kurenbach *et al.* (2003) zeigten einen Kotransfer von pIP501 und pMV158 von *E. faecalis* und *B. subtilis* MB46 SL601 in gleicher Größenordnung.

Inter-Gram Mobilisierungen von *E. coli* nach *E. faecalis* konnten erstmals von Trieu-Cuot *et al.* (1987) und inter-Gram Transfer von *E. faecalis* nach *E. coli* von Trieu-Cuot *et al.* (1988) gezeigt werden. Die Mobilisierung beruhte auf *shuttle* Vektoren mit Replikationsursprüngen aus pBR322 und pAM β 1 sowie dem *oriT* des IncP Plasmids RK2 (pAT187) bzw. der *tra* Region von pAM β 1 (pAT191). Die Mobilisierungsrate für pAT187 von *E. coli* nach *E. faecalis* lag im Bereich $10^{-8} - 10^{-7}$, die Transferraten für pAT191 von *E. faecalis* nach *E. coli* im Bereich 10^{-9} . Kurenbach *et al.* (2003) zeigten einen konjugativen Transfer für pIP501 von *E. coli* nach *E. faecalis* ($\sim 10^{-3}$) und von *E. faecalis* nach *E. coli* ($\sim 10^{-6}$). In dieser Arbeit konnte das Plasmid pVA-GFP von *E. faecalis* nach *E. coli* mobilisiert werden ($2,3 \cdot 10^{-8} \pm 2,1 \cdot 10^{-8}$). Die Transferraten liegen in der dergleichen Größenordnung wie bei Trieu-Cuot *et al.* (1988).

Eine triparentale Mobilisierung von pVA-GFP von *E. coli* nach *E. faecalis* mit pIP501 als Helferplasmid in *E. faecalis* konnte nicht gezeigt werden. Für die triparentale Mobilisierung von pVA-GFP aus *E. coli* nach *E. faecalis* muss pIP501 zunächst konjugativ nach *E. coli* transferiert werden. Hier kommt es vermutlich auf Grund nicht optimaler Regulationsmechanismen zu einer fehlregulierten und reduzierten Translation der Tra Proteine in *E. coli*, durch die eine Mobilisierung von pVA-GFP von *E. coli* nach *E. faecalis* stark reduziert ist. Zudem ist die Kopienzahl von pIP501 in *E. coli* im Vergleich zu *E. faecalis* verringert (Kurenbach, 2004), so dass vermutlich die Anzahl der Transferkomplexe in *E. coli* ebenfalls reduziert ist. Die Kreuzungen wurden standardmäßig immer ohne antibiotische Selektion durchgeführt, so dass eine direkte Eliminierung von pIP501 aus *E. coli*, verstärkt durch ein nicht optimal reguliertes pIP501 Toxin-Antitoxin System, nicht ausgeschlossen werden kann (Courvalin, 1994). Über eine verlängerte Inkubation des Kreuzungsansatzes mit geringen Mengen Antibiotika zur Stabilisierung von pIP501 in *E. coli* könnte der Nachweis einer triparentalen Mobilisierung von pVA-GFP aus *E. coli* nach *E. faecalis* möglich sein.

Wie bereits unter 4.1.3 im Ergebnisteil dargestellt konnten für die auf dem Plasmid pMSP3535 basierenden, mobilisierbaren Konstrukte keine Mobilisierungen durch pIP501 nachgewiesen werden. Eine direkte Selektion der Mobilisierung war auf Grund dergleichen Antibiotikaresistenz von pIP501 und den pMSP3535-Derivaten nicht möglich. Zudem sind die Replikationssysteme in pIP501 und pMSP3535 zu 98 % identisch, so dass vermutlich eine Mobilisierung von pMSP-*orfI*-P_{*nisA*}-GFP durch pIP501 auf Grund einer Inkompatibilität stark reduziert ist.

5.1.2 Funktionelle Untersuchungen zur Fluoreszenz in verschiedenen Bakterienarten

Neben der Mobilisierung der erzeugten *monitoring tools* wurde die Expression des GFP in verschiedenen Bakterienarten über die Ausbildung eines grün fluoreszierenden Phänotyps untersucht. Das in dieser Studie verwendete *gfp* Gen ist eine optimierte Variante des *gfp* Wildtyp-Gens aus *Aequorea victoria*, in dem durch zwei gerichtete Punktmutationen, einer für Prokaryonten optimierten RBS und einem translationalen Enhancer die Expression und die Fluoreszenzintensität des GFP in Prokaryonten optimiert wurde (Miller und Lindow, 1997; Nieto *et al.*, 2000). Eine grüne Fluoreszenz konnte für das Plasmid pVA-GFP nach Induktion des *nisA* Promotors mit Nisin in verschiedenen Bakterienarten wie *E. faecalis*, *B. subtilis* subsp. *natto*, *Lactococcus lactis* (Bachelorarbeit von Frau Isabel Knittel, Dissertation von Frau Dipl.-Biochem. Katarzyna Schiwon) sowie *E. coli* gezeigt werden. Für das Konstrukt pMSP-GFP konnte eine grüne Fluoreszenz für *E. coli* sowie *E. faecalis* detektiert werden,

Untersuchungen zur grünen Fluoreszenz in *B. subtilis* und *L. lactis* wurden mit diesem Konstrukt nicht durchgeführt. Die Funktionalität des *nisA* Promotors in verschiedenen G⁺ Bakterien wurde bereits in mehreren Studien gezeigt (Miereau und Kleerebezem, 2005; Eichenbaum *et al.*, 1998). Der *nisA* Promotor ist zudem, wie in dieser Studie ebenfalls gezeigt werden konnte, in G⁻ *E. coli* durch Nisin induzierbar und führt durch Expression des GFP zu einem grün fluoreszierenden Phänotyp. Das Nisin-induzierte Expressionssystem (NICE) eignet sich somit zum Nachweis des horizontalen Gentransfers durch die Übertragung einer grünen Fluoreszenz in Rezipienten verschiedener Gattungen.

Während die Expression des GFP nach Induktion mit Nisin in *E. faecalis*, *L. lactis* und *E. coli* in nahezu allen induzierten Zellen zu einem grünen Phänotyp führte, war für *B. subtilis* subsp. *natto* nur in ~5 % der induzierten Zellen eine grüne Fluoreszenz detektierbar (Abb. 4.8). Eine Erhöhung des Selektionsdruckes (Erhöhung der Kanamycin-Konzentration von 20 µg · mL⁻¹ auf 100 µg · mL⁻¹) sowie eine Erhöhung der Induktorkonzentration (Nisin von 100 ng · mL⁻¹ auf 1 µg · mL⁻¹) führten zu keinem nennenswerten Anstieg des grün fluoreszierenden Phänotyps. Ein vergleichbares Ergebnis erhielten Hirt *et al.* (2000), die eine heterologe Expression von PrgB über das Plasmid pMSP3535 in *L. lactis* und *E. faecalis* nachweisen konnten. Dagegen war eine Expression von PrgB in *B. subtilis* kaum detektierbar. Eichenbaum *et al.* (1998) zeigten zwar mit dem NICE-System in *B. subtilis* eine effektive heterologe Expression, allerdings wurde in dieser Studie ein anderes Plasmidsystem benutzt, bei dem die regulatorischen Elemente NisR und NisK *trans* kodiert sind. Es liegen keine weiteren Arbeiten zur heterologen Proteinexpression in *B. subtilis* mit den Plasmiden pMSP3535 und pMSP3535VA vor. Eine heterologe Expression mit den *cis* regulierten Plasmiden pMSP3535 und pMSP3535VA erfolgt vermutlich in *B. subtilis* deutlich schwächer als in *E. faecalis*. Mögliche Ursachen könnten eine geringere Kopienzahl dieser Plasmide in *B. subtilis* oder für *B. subtilis* nicht optimale RBS sein. Die Ausbildung einer grünen Fluoreszenz *in vivo* ist abhängig von einem GFP-Schwellenwert (Geoffroy *et al.*, 2000). Vermutlich führen daher eine geringe Kopienzahl und eine nicht-optimale Expression des GFP in *B. subtilis* dazu, dass ein grüner Phänotyp nur in ca. 5 % der Bakterien ausgebildet werden kann.

Für das mobilisierbare Konstrukt, das neben der *oriT*_{PIP501} Sequenz das Gen für die *oriT* spezifische Relaxase Orf1 enthält, musste das *gfp* Gen unter Kontrolle eines eigenen *nisA* Promotors gestellt werden (pMSP-*orf1*-P_{*nisA*}-GFP, Abb 4.2). In einem ersten Ansatz wurde das *orf1* Gen über die Schnittstellen *Bam*HI und *Xma*I *upstream* des *gfp* in den Vektor pMSP-GFP kloniert (pMSP-*orf1*-GFP, s. Abb. 4.1 C). Möglicherweise findet durch die Insertion des

orf1 Gens die Ausbildung eines stem-loops in der mRNA im Bereich zwischen *orf1* und *gfp* statt, die zur Termination der Transkription führt (Abb. 5.1). Das *gfp* würde in diesem Fall nicht transkribiert werden und der Phänotyp keine grüne Fluoreszenz zeigen. Über einen Western Blot mit anti-GFP Antikörpern könnte geklärt werden, ob die Transkription und Translation des *gfp* stattfindet. Bei positivem Befund im Western Blot ist vermutlich die Expressionsrate des GFP zu gering, um einen grünen Phänotyp bewirken zu können. Zeigt der Western Blot keine GFP-Expression, liegt vermutlich auf transkriptioneller Ebene ein Terminationssignal vor, dass die Bildung der *gfp* mRNA unterbindet.

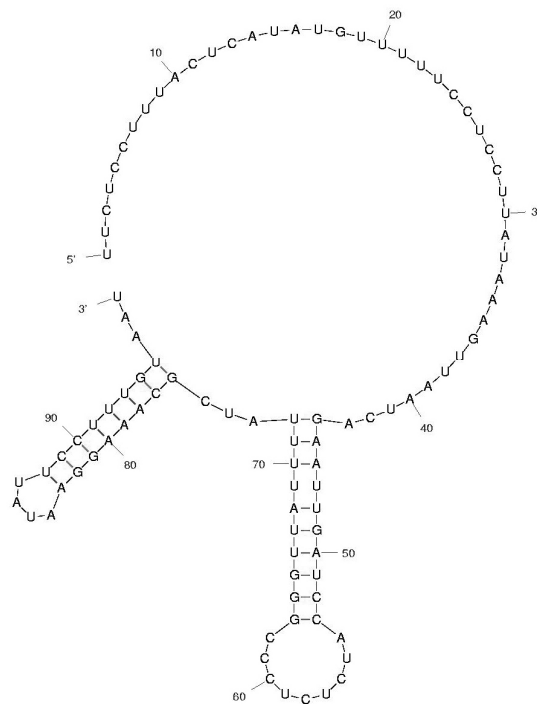


Abb. 5.1: Sekundärstruktur der mRNA im Bereich der *XmaI* Schnittstelle des Plasmids pMSP-*orf1*-GFP.

Gezeigt ist ein Sequenzausschnitt im Bereich des Übergangs *orf1*-*XmaI*-*gfp*, die *XmaI*-Schnittstelle liegt im Bereich 60 – 65. Im Übergang von *orf1* nach *gfp* könnten stem-loops ausgebildet werden, durch die eine Transkription des *gfp* terminiert wird, $\Delta G = -14,5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (berechnet mit mfold, Zucker, 2003).

Unter Kontrolle eines eigenen *nisA* Promotors konnte das *gfp* transkribiert und translatiert werden, eine deutliche grüne Fluoreszenz in *E. faecalis* OGIX (pMSP-*orf1*-P_{*nisA*}-GFP) ließ sich nach Induktion des Promotors beobachten.

Während für G- Bakterien bereits eine Vielzahl mobilisierbarer und konjugativer Plasmide konstruiert worden sind, die mit fluoreszierenden Proteinen markiert wurden, sind für G+ Bakterien wie *E. faecalis* bisher nur wenige Publikationen erschienen, die eine GFP-Expression über ein mobilisierbares Plasmid zeigen konnten. So konnte für das mobilisierbare Plasmid pMV158 aus *S. pneumoniae* ein GFP-markiertes Derivat konstruiert werden (pMV158GFP). Die Induktion des *gfp* wird durch einen Maltose-induzierbaren Promotor reguliert. Die Mobilisierungsraten von pMV158GFP lagen im Bereich 10^{-5} bis 10^{-4} pro Donor

und waren vergleichbar mit dem Wildtyp pMV158. Eine grüne Fluoreszenz durch pMV158GFP war in *S. pneumoniae*, *L. lactis* und *E. faecalis* nachweisbar (Nieto und Espinosa, 2003).

5.1.3 Detektion fluoreszierender *E. faecalis* über *fluorescence activated cell sorting* (FACS)

Aufbauend auf den Ergebnissen zu den Mobilisierungen und der Expression von GFP in verschiedenen Bakterienarten sollte ein Assay entwickelt werden, mit dem ein horizontaler Gentransfer mittels FACS über den Transfer von GFP in die Rezipienten *in situ* detektiert werden kann. Hierbei waren folgende Punkte zu beachten:

- a. sowohl der Donor mit dem mobilisierbaren Plasmid als auch Transkonjuganten entwickeln nach Induktion des *nisA* Promotors einen grün fluoreszierenden Phänotyp. Für eine Intraspezies-Mobilisierung, z.B. von *E. faecalis* nach *E. faecalis*, muss entweder der Donor oder der Rezipient einen zusätzlichen Marker besitzen, über den eine Unterscheidung getroffen werden kann. Dies kann ein weiteres fluoreszierendes Protein sein, das während der Mobilisierung nicht übertragen werden kann und das unterscheidbar von der grünen Fluoreszenz des GFP ist.
- b. die Induktion des *nisA* Promotors sollte *in situ* während der Kreuzung erfolgen, um den fluoreszierenden Phänotyp zu erhalten. Die Reifung der fluoreszierenden Proteine sollte zeitgleich innerhalb weniger Stunden erfolgen und beide fluoreszierenden Proteine sollten nebeneinander in einer Zelle detektierbar sein.
- c. (nahezu) alle Zellen, die ein Plasmid mit einem fluoreszierenden Protein tragen, müssen dieses Protein exprimieren können und eine Fluoreszenz zeigen. Liegt die Expression nicht bei ~95 – 100 %, kann eine Quantifizierung des horizontalen Gentransfers durch eine relativ hohe Fehlerrate nur bedingt erfolgen.

Nancharaiah *et al.* (2003) entwickelten für G- Bakterien einen Assay, bei dem GFP und RFP zum Nachweis von horizontalem Gentransfer benutzt wurden. Sie markierten den Donor *P. putida* auf dem Chromosom mit einem rot fluoreszierenden Protein. Für die Gentransferstudien wurde das TOL-Plasmid verwendet, bei dem *gfp* unter Kontrolle des *lac* Promotors stand. Konjugativer Transfer des GFP markierten TOL Plasmids konnte anhand der Fluoreszenz verfolgt werden, Transkonjuganten zeigten einen grünen Phänotyp, während Donorzellen sowol rot als auch grün fluoreszierten.

In dieser Studie wurde, entsprechend dem Ansatz von Nancharaiah *et al.* (2003), für die Markierung des Donors das schnell reifende, rot-fluoreszierende DsRed-Express verwendet.

Das DsRed-Express wurde über zufällige und gerichtete Mutagenese aus DsRed abgeleitet und zeichnet sich durch eine im Vergleich zum Wildtyp 15-fach beschleunigte Reifung aus. Die Reifungszeit von DsRed-Express ist vergleichbar mit GFP und beträgt 3-4 Stunden. Zudem konnte bei DsRed-Express eine grüne Hintergrundfluoreszenz reduziert werden, so dass sich DsRed-Express und GFP für 2-Farben-Studien eignen, simultane Detektionen von GFP und DsRed-Derivaten über FACS wurden in *E. coli* bereits erfolgreich durchgeführt (Bevis *et al.*, 2002; Choe *et al.*, 2005; Maksimow *et al.*, 2002).

Das Gen für DsRed-Express aus dem eukaryontischen Vektor pRHN1 (Janus *et al.*, 2007) wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pQTEV subkloniert, da in pRHN1 keine für Prokaryonten geeignete RBS vorhanden war. Anschließend wurde das *DsRed-Express* zusammen mit der RBS unter Kontrolle des *nisA* Promotors in den *shuttle* Vektor pMSP3535VA kloniert (pVA-RFP) und in *E. faecalis* durch Transformation übertragen. Schließlich wurde dieser *E. faecalis* Stamm zusätzlich mit dem GFP-markierten mobilisierbaren Konstrukt pMSP-*orfI*-P_{*nisA*}-GFP transformiert, um sowohl das RFP als auch das GFP innerhalb einer Zelle exprimieren zu können.

Für die Entwicklung des Assays zur Detektion von horizontalem Gentransfer war es wichtig zu wissen, in wievielen Zellen eine grüne und rote Fluoreszenz gleichzeitig detektiert werden kann. Die Methode der Wahl stellt hier die automatisierte Zählung von Zellen anhand ihrer fluoreszierenden Eigenschaften mittels FACS dar. Über entsprechende Untersuchungen mittels FACS konnte ermittelt werden, dass $9,6 \cdot 10^4$ (96 %) von insgesamt 10^5 analysierten *E. faecalis* Zellen eine grüne Fluoreszenz zeigten, während nur $1,9 \cdot 10^4$ (19 %) Zellen rot fluoreszierten, wenn das GFP und RFP innerhalb einer Zelle exprimiert werden (s. Abb. 4.7). Der Nachweis eines horizontalen Gentransfers *in situ* ohne Kultivierung auf antibiotikahaltigen Medien ist somit mit den entwickelten fluoreszierenden Plasmiden nicht möglich. Nur ca. 20 % der Zellen zeigten einen roten Phänotyp, wenn GFP und RFP gleichzeitig in der Zelle vorlagen. Somit könnten putative Transkonjuganten und Donoren in 80 % nicht unterschieden werden, da die rote Fluoreszenz des Donors phänotypisch nicht sichtbar ist und sie damit auf Grund der grünen Fluoreszenz als Transkonjuganten interpretiert werden würden.

Das DsRed-Express zeigt im Vergleich zum Wildtyp zwar eine deutlich schnellere Reifung, allerdings ist bekannt, dass die Intensität der Fluoreszenz von DsRed-Express im Vergleich zu DsRed deutlich reduziert ist. Die relative Helligkeit von DsRed-Express im Vergleich zu DsRed liegt bei 0,36 (DsRed = 1) und im Vergleich zu eGFP bei 0,59-0,61 (eGFP = 1) (Shcherbo *et al.*, 2007; Bevis *et al.*, 2002). Zudem liegen sowohl DsRed als auch DsRed-

Express in aktiver Form als Tetramer vor, die innerhalb der Zelle aggregieren können, so dass das Fluoreszenzsignal zusätzlich reduziert wird (Müller-Taubenberger und Anderson, 2007; Bevis *et al.*, 2002). DsRed-Express ist bisher nicht in *E. faecalis* eingesetzt worden. Möglicherweise ist die Expressionsrate durch eine nicht ganz für *E. faecalis* optimalen *E. coli* RBS reduziert. In *S. aureus* konnte gezeigt werden, dass die Expression fluoreszierender Proteine stark von einer optimalen RBS abhängt (Malone *et al.*, 2009). Eine generell schwächere Helligkeit von DsRed-Express und die Bildung von Aggregaten könnten zudem die Fluoreszenz von DsRed-Express in *E. faecalis* reduzieren. Das DsRed-Express hat sich somit in dieser Studie als ungeeignet für eine Markierung des Donors erwiesen.

In den letzten Jahren ist eine Vielzahl an Publikationen zu optimierten rot fluoreszierenden Proteinen erschienen. Die lange Reifungszeit des DsRed Wildtyps, die nur schwache Helligkeit für das DsRed-Express und die tetramere Struktur von DsRed und DsRed-Express haben zur Entwicklung neuer, vielversprechender Derivate wie mCherry, tdTomato (Shaner *et al.*, 2008), mKate2 sowie tdKatushka2 (Shcherbo *et al.*, 2009) geführt (Tab. 5.1). Das tdTomato zeichnet sich hier durch eine stark verbesserte Helligkeit im Vergleich zu DsRed und eGFP mit einer relativ kurzen Reifungszeit für das Protein aus. In Studien mit *E. coli* und *S. aureus* konnte das mCherry und in Studien mit *E. coli* das tdTomato bereits angewendet werden (Pereira *et al.*, 2010; Lagendijk *et al.*, 2010; Lakins *et al.*, 2009).

Tab 5.1: Vergleich verschiedener rot fluoreszierender Proteine.

(aus: Strack *et al.*, 2009; Shcherbo *et al.*, 2009; Shaner *et al.*, 2008; Shaner *et al.*, 2004; Bevis *et al.*, 2002)

fluoreszierendes Protein	relative Helligkeit (eGFP = 1)	relative Helligkeit (DsRed = 1)	Quanten- ausbeute	t _{1/2} zur Reifung des Proteins [min]	λ _{ex} [nm]	λ _{em} [nm]
DsRed-Express	0,59-0,61	0,36	0,42	40	554	586
mCherry	0,47	0,27	0,22	15	587	610
mKate2	0,74	0,43	0,4	50	588	633
tdTomato	2,78	1,60	0,69	60	554	581
tdKatushka2	1,46	0,83	0,37	15	588	633

λ_{ex} – Anregungsmaximum

λ_{em} – Emissionsmaximum

λ_{ex} / λ_{em} (DsRed) = 558 / 583 nm

Eine Quantifizierung des horizontalen Gentransfers mittels FACS könnte durch den Einsatz der optimierten rot fluoreszierenden Proteine, wie tdTomato oder mCherry, möglich sein und somit Studien zum Gentransfer *in situ* ohne Laborkultivierung ermöglichen. Alternativ sind auch andere fluoreszierende Proteine wie das cyan fluoreszierende Protein (eCFP) oder das gelb fluoreszierende Protein (eYFP) als Marker für den Donor denkbar. Das eCFP zeigt aber

im Vergleich zu eGFP nur eine Helligkeit von 0,33 (Rizzo *et al.*, 2004) und hat damit eine schwächere Leuchtkraft als das in dieser Studie verwendete DsRed-Express.

Das eYFP ist im Mikroskop nur relativ schwierig von eGFP zu unterscheiden, es eignet sich daher für eine Markierung des Donors kaum, zumal der Donor sowohl das eGFP als auch das eYFP gleichzeitig exprimieren soll.

5.1.4 Anwendung der mobilisierbaren *monitoring tools*

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass über *E. faecalis* T9 das mobilisierbare Plasmid pVA-GFP von *E. faecalis* OG1X nach *E. faecalis* T9 retromobilisiert werden kann. Die Transkonjugante *E. faecalis* T9 (pVA-GFP) konnte anschließend benutzt werden, um das mobilisierbare Plasmid pVA-GFP nach *B. subtilis* subsp. *natto* zu mobilisieren. *E. faecalis* T9 ist plasmidfrei und kodiert für das *tetM* Tetrazyklin-Resistenzgen. Mit Hilfe der entwickelten PCR Assays (s. 4.2) konnten die Transferegene *nes*, *traE*, *traG* und *traK* über PCR und Southern- bzw. Dotblot in *E. faecalis* T9 nachgewiesen werden (Arends *et al.*, in Vorbereitung). Eine Retromobilisierung des Plasmids pMSP-*orfI*-P_{*nisA*}-GFP von *E. faecalis* OG1X nach *E. faecalis* T9 konnte nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigte Daten).

In *E. faecalis* T9 könnte demnach ein konjugatives Transposon (ICE - *integrative and conjugative element*) vorliegen, das nicht für die *tetM*-Resistenz kodiert. Bei den Kreuzungsversuchen mit dem Konstrukt pMSP-*orfI*-P_{*nisA*}-GFP in *E. faecalis* OG1X konnte kein Wachstum auf den Transkonjugantenplatten detektiert werden, während bei Kreuzungen mit dem Konstrukt pVA-GFP in *E. faecalis* OG1X die Transkonjuganten nachgewiesen werden konnten. Falls es sich in *E. faecalis* T9 um eine transponierbare *tetM* Resistenz handeln würde, wäre in beiden Fällen ein Wachstum wahrscheinlich gewesen (Selektion jeweils auf Tet und den Selektionsmarker für das mobilisierbare Plasmid). Das *tetM* Gen kann demnach vermutlich nicht horizontal übertragen werden.

Vielmehr liegt in *E. faecalis* T9 vermutlich ein konjugatives Transposon vor, über das das Plasmid pVA-GFP von *E. faecalis* OG1X nach *E. faecalis* T9 retromobilisiert werden kann. Die Retromobilisierung erfolgt hierbei vermutlich über 2 Stufen: zunächst findet ein Transfer des konjugativen Transposons von dem Donor in den Rezipienten statt gefolgt von einer Mobilisierung des mobilisierbaren Plasmids aus dem Rezipienten in den Donor (Timmery *et al.*, 2009).

Für ICEs werden seit kurzem autonom-replizierende Intermediate innerhalb der Wirtszelle diskutiert (Lee *et al.*, 2010). Da für die Replikation dieser Intermediate vergleichbare Mechanismen wie für die Replikation von Plasmiden angenommen werden können, sind auch

hier Inkompatibilitäten möglich. So ist es denkbar, dass durch eine autonom-replizierende Zwischenstufe des ICE in T9 und im Rezipienten *E. faecalis* OG1X eine Inkompatibilität mit den pMSP3535-Derivaten auftritt, durch die eine (Retro-)Mobilisierung der pMSP3535-Derivate nicht stattfinden kann.

Über PCR und Southern Blot konnten verschiedene T4SS Schlüsselgene in *E. faecalis* T9 nachgewiesen werden (*nes*, *traE*, *traG*, *traK*), die charakteristisch für T4SS von konjugativen Plasmiden nosokomialer *S. aureus* sind (pUSA03, pLW03, pBR9). Zu diesem Zeitpunkt sind keine Transposons bekannt, die für diese Gene kodieren. Da *E. faecalis* T9 ein klinisches Isolat ist, könnten diese Gene im Krankenhaus horizontal von *S. aureus* nach *E. faecalis* T9 übertragen und in das Chromosom von *E. faecalis* T9 integriert worden sein.

Diese Ergebnisse sind im Hinblick auf nosokomiale Infektionen mit Antibiotika-resistenten Bakterien interessant und sind der erste Nachweis einer Retromobilisierung zwischen verschiedenen Enterokokken. In einem klinischen Hintergrund, in dem verschiedene pathogene Organismen und unterschiedliche Antibiotikaresistenzgene zusammenkommen, kann die Retromobilisierung eine Anpassung von Bakterien an neue Umwelteinflüsse durch ein „gene capture“ ermöglichen. Die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzgenen ist damit nicht limitiert auf Transfer und Mobilisierung von Resistenzgenen in einen Rezipienten, sondern kann wie im Fall von *E. faecalis* T9 in den Donor des konjugativen Systems selber erfolgen. Verstärkend auf Retromobilisierung und „gene capture“ kann hierbei die für *E. faecalis* T9 bereits nachgewiesene, für Enterokokken ungewöhnlich starke Biofilmbildung wirken (Hufnagel *et al.*, 2004). Es gibt mittlerweile Anzeichen dafür, dass T4SS kodierte Oberflächenproteine Biofilmbildung auf biotischen und abiotischen Oberflächen ermöglichen können (Alvarez-Martinez und Christie, 2009). So könnte bei *E. faecalis* T9 das ICE, das bis jetzt keine nachgewiesene Antibiotikaresistenz überträgt, einen Beitrag zur Ausbildung von Biofilmen leisten. Der durch *E. faecalis* T9 ausgebildete Biofilm könnte als „hot spot“ für horizontalen Gentransfer dienen und den Transfer von Genen des „Supergenoms“ ermöglichen, unterstützt durch das ICE in *E. faecalis* T9.

Konjugative Transposons haben vermutlich bei der Entstehung multi-resistenter Enterokokken einen entscheidenden Einfluss (Hegstad *et al.*, 2010). Das in dieser Arbeit erzeugte *monitoring tool* konnte benutzt werden, um ein konjugatives Element in *E. faecalis* T9 nachzuweisen, und könnte ein nützliches molekulares Werkzeug für die Detektion konjugativer Transposons in *E. faecalis* sein.

5.1.5 Entwicklung konjugativer, GFP-markierter *shuttle* Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ebenfalls ein konjugatives, mit dem grün fluoreszierenden Protein markiertes *shuttle* Plasmid *de novo* synthetisiert werden. Die 15 *orfs* der pIP501 *tra* Region und das *gfp*-Gen unter Kontrolle des *nisA* Promotors sowie die *oriT*_{pIP501} Region sollten in den *shuttle* Vektor pMSP3535 eingebaut werden. Für die Klonierung des konjugativen *monitoring tools* wurden zwei unterschiedliche Ansätze parallel durchgeführt:

- I. Klonierung der Gene *orf1-orf6* und *orf7-orf15* in zwei aufeinanderfolgenden Schritten gefolgt von der P_{*nisA*}-*gfp-oriT*_{pIP501}-t₀ Kassette (pMSP17-P_{*nisA*}-GFP, nicht gezeigt im Ergebnisteil)
 - II. Klonierung der Gene *orf1-orf6*, *orf8-orf15* sowie *orf7* in drei aufeinanderfolgenden Schritten gefolgt von der P_{*nisA*}-*gfp-oriT*_{pIP501}-t₀ Kassette (pMSP178-P_{*nisA*}-GFP, Abb. 4.3)
- Mit dieser gewählten Strategie sollte gleichzeitig eine *knock-out* Mutante erzeugt werden, bei der die VirB1-orthologe lytische Transglykosylase Orf7 nicht exprimiert wird. Dieser Ansatz sollte Aufschluss über die Notwendigkeit der lytischen Transglykosylase für den konjugativen Transfer in G⁺ Bakterien liefern.

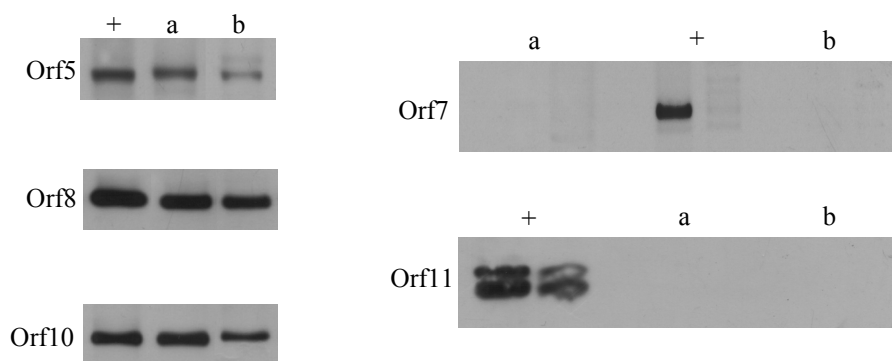
Das Konstrukt aus Ansatz I zeigte nach Sequenzierung der *tra* Region eine *frame-shift* Mutation im *orf15* Gen (Adenin an Position 7766, GenBank AJ505823, deletiert), durch die ein konserviertes LPxTG-Motiv deletiert wird. Über dieses auch als Zellwandanker bezeichnete Motiv wird Orf15 vermutlich kovalent an das Peptidoglykan gebunden und lokalisiert dadurch vermutlich an der Zelloberfläche (Navarre und Schneewind, 1999).

Bei dem Konstrukt aus Ansatz II konnte nach einer Sequenzierung der *tra* Region eine *frame-shift* Mutation im *orf11* Gen (Adenin an Position 4212, GenBank AJ505823, deletiert) festgestellt werden. Durch den *frame-shift* wird die Translation von Orf11 durch dann direkt folgende Stoppcodons abgebrochen, hierdurch werden 56 % des Orf11 deletiert. Es konnten für Orf11 noch keine Interaktionen mit anderen pIP501 Tra Proteinen detektiert werden (Abajy *et al.*, 2007). Eine DNA-Bindung von Orf11 konnte *in vitro* gezeigt werden (s. 4.3.6). Über weitere Funktionen des Orf11 Proteins liegen bis jetzt keine weiteren Informationen vor. Weder für das Konstrukt aus Ansatz I noch für das Konstrukt aus Ansatz II konnte ein konjugativer Intraspezies-Transfer in *E. faecalis* gezeigt werden. Eine Expressionsanalyse der Tra Proteine mittels polyklonaler Anti-Tra Antikörper und Western Blot ergab, dass weder für das Konstrukt I (nicht gezeigt) noch für das Konstrukt II eine Expression des Orf7 Proteins nachgewiesen werden konnte, während eine Expression der pIP501 Tra Proteine Orf5, Orf8 und Orf10 mittels Western Blot gezeigt werden konnte. Eine Orf11-Expression für das

Konstrukt b, in dem eine *frame-shift* Mutation in *orf11* vorhanden ist, konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Abb. 5.2 A).

Die zu *orf7* gehörende RBS liegt *upstream* innerhalb des für Orf6 kodierenden Bereiches und überlappt mit dem *orf6* TAG-Stopcodon. In einem ersten Ansatz wurde der Primer für die Klonierung von *orf7* so gewählt, dass der Primer an Position 17 – 35 von AJ505823 bindet und damit mit dem 3'-Primer für die Klonierung des Fragments *orf1-orf6* überlappt. Hierdurch wiederholt sich ein Teil der Sequenz, die RBS in dem klonierten Konstrukt liegt doppelt vor (Abb. 5.2 B, pMSP187-P_{*nisA*}-GFP). In einem weiteren Versuch wurde der 5'-Primer für die Klonierung von *orf7* so gewählt, dass keine repetitiven Sequenzen entstehen und durch den Einbau der Restriktionsschnittstelle der Abstand zwischen RBS und dem *orf7* Startcodon nicht verändert wird (Abb. 5.2 C, pMSP178-P_{*nisA*}-GFP). In beiden Fällen konnte keine Expression des Orf7 über Western Blot mit polyklonalen anti-Orf7 Antikörpern nachgewiesen werden.

A.



(+) - Positivkontrolle pIP501, (a) - pMSP187-P_{*nisA*}-GFP, (b) - pMSP178-P_{*nisA*}-GFP

B. pMSP187-P_{*nisA*}-GFP

AAAAAGATATAGGAAGGTTGGTGCCCGGGATATAGGAAGGTTGGTGATTATTTCATATCATGGG

C. pMSP178-P_{*nisA*}-GFP

3' Primer ATAGGAAGGTTGGTGCCCGGG
 AJ505823 7 GCTGAAAAAGATATAGGAAGGTTGGTGATTTCATATCATGGGAGCAACAGCTGCTAAACT 65
 5' Primer CCCGGGTATCATGGGAGCAAC

Abb. 5.2: Expression der pIP501 Tra Proteine durch konjugative *monitoring tools* (A) und Sequenzvergleich des Übergangs von *orf6* nach *orf7* (B + C).

A. Die pIP501 Tra Proteine Orf5, Orf8 und Orf10 ließen sich nach Induktion des *nisA* Promotors mit Nisin über Western Blot mit polyklonalen anti-Tra Antikörpern nachweisen, eine Expression von Orf7 und Orf11 konnte nicht gezeigt werden. + - Positivkontrolle pIP501, a - pMSP187-P_{*nisA*}-GFP, b - pMSP178-P_{*nisA*}-GFP. Für Orf7 und Orf11 wurde neben der Zellwandfraktion auch die cytoplasmatische Fraktion aufgetragen.

B. Klonierungsstelle des Übergangs von *orf6* nach *orf7* für das Konstrukt pMSP187-P_{*nisA*}-GFP, das *orf6* TAG-Stopcodon ist rot und das *orf7* ATG-Startcodon blau unterlegt. Die Restriktionsschnittstelle *Xma*I ist in grün gezeigt, die RBS ist unterstrichen. Fett unterlegt ist der Teil der Sequenz, der sich durch die Klonierung wiederholt.

C. Gezeigt ist ein Ausschnitt der pIP501 *tra* Region (Basenpaare 7 – 65, AJ505823) sowie der für die Klonierung von *orf1-orf6* verwendete 3'-Primer und der für die Klonierung von *orf7* verwendete 5'-Primer. Für das Konstrukt pMSP178-P_{*nisA*}-GFP wurden die Primer für die Klonierung so gewählt, dass keine zusätzlichen Basenpaare durch die Klonierung eingefügt werden. Die Sequenz ATTTCA ist in pMSP178-P_{*nisA*}-GFP durch die Restriktionsschnittstelle *Xma*I ersetzt. Die Farbkodierung entspricht der im Unterpunkt B.

Zusammenfassend konnte ein GFP-markiertes konjugatives *shuttle* Plasmid zur Verfolgung von horizontalem Gentransfer z.B. in Biofilmen nicht erfolgreich konstruiert werden. Durch eine *frame-shift* Mutation ist das Orf11 zu 56 % deletiert. Das Orf7 wurde auch nach einer Optimierung der Klonierungsstrategie nicht exprimiert. Studien innerhalb dieser Arbeit haben gezeigt, dass ein *orf7 knock out* in pIP501 zu drastisch reduzierten Transferraten führt (s. 4.3.7). Ein Komplementierungsexperiment mit pMSP178-P_{*nisA*}-GFP und pVA-*orf7* in *E. faecalis* wurde durchgeführt, ein Transfer des GFP-markierten Plasmids konnte nicht beobachtet werden. Vermutlich hat das ebenfalls zu 56 % deletierte Orf11 einen bisher nicht identifizierten Einfluss auf den erfolgreichen konjugativen Transfer von pIP501.

5.1.6 Molekulare Detektion von Transferschlüsselgenen

In dieser Studie wurden Assays auf molekularer Ebene entwickelt, die eine Charakterisierung des Mobiloms hinsichtlich verschiedener *tra* Gene ermöglichen. Der Fokus lag hierbei auf mobilen genetischen Elementen G⁺ humanpathogener Organismen (*Staphylococcus*, *Enterococcus*).

Transferregionen konjugativer Plasmide bestehen aus 15 – 30 Tra Proteinen, die in vier Familien untergliedert werden können: die *dtr*-Familie (DNA Transfer und Replikation), die *mpf*-Familie (*mating pore formation*, Transferkanal), die energieliefernde ATPase Familie (VirB4-, VirD4-, VirB11-Orthologe) sowie die Familie der Adhäsine und Oberflächenproteine. Zu den am stärksten konservierten Proteinen verschiedener T4SS gehören Proteine der *dtr*-Familie, zu denen die Relaxasen gezählt werden, die sequenzspezifisch an den *oriT* binden und den Einzelstrangbruch der dsDNA katalysieren. Relaxasen werden auf Grund konservierter Sequenzmotive in 6 Proteinfamilien zusammengefasst (Francia *et al.*, 2004; Garcillan-Barcilla *et al.*, 2009). Daneben weisen die energieliefernden VirB4-, VirD4- und VirB11-orthologen Proteine untereinander ebenfalls eine hohe Konservierung auf. Während aber VirB4- und VirD4-ähnliche Proteine in nahezu allen bekannten T4SS enthalten sind, kommen die VirB11-ähnlichen Proteine hauptsächlich in G⁻ T4SS vor, z.B. im Ti-Plasmid des Bodenbakteriums *A. tumefaciens*. Eine Sonderrolle in T4SS nehmen die VirB1-

orthologen lytischen Transglykosylasen ein, die nahezu in allen bekannten T4SS enthalten sind und eine hohe Konservierung aufweisen, aber zumindest in G⁻ Systemen nachweislich keinen essentiellen Einfluss auf den Transfer haben (Alvarez-Martinez und Christie, 2009; Grohmann *et al.*, 2003; Grohmann und Arends, 2010, *accepted*).

Für eine Charakterisierung mobiler genetischer Elemente G⁺ Bakterien wurden Sequenzalignments verschiedener Relaxasegene und *virB1*-, *virB4*- und *virD4*-orthologer Gene erstellt. Die Primerbindestellen wurden so gewählt, dass die Primer innerhalb konservierter Motive und in Regionen hoher Sequenzidentität binden (Abb. 5.3, exemplarisch gezeigt für das *pre*-Relaxasegen von pSK41 und verwandter Relaxasegene sowie für das Relaxasegen von pLgLA39 und verwandter Gene). Die Spezifität der Primerpaare wurde über Blast-Analysen gegen die Nukleotidkollektion (nr/nt) ermittelt.

Mit den in dieser Arbeit entwickelten PCR Assays sind Relaxasegene von 64 verschiedenen Plasmiden mit 11 Primerpaaren detektierbar (s. Tab 4.2), wobei ein großer Anteil (62,5 %) bereits von nur drei Primerpaaren (pSK41 *pre*, pT181 und pSK41 *nes*) erfasst wird. Die DNA Sequenzen der Gruppen pSK41 *pre*, pT181 und pSK41 *nes* zeigen untereinander innerhalb des für die Relaxase kodierenden Bereiches eine nahezu 100 %ige Konservierung, im Gegensatz z.B. zur Gruppe plca36, bei denen die Konservierung bereits innerhalb des für die Relaxase kodierenden Bereiches stärkere Abweichungen von einer Konsensus-Sequenz zeigt. Ausserhalb des für die Relaxasedomäne kodierenden Bereiches können Abweichungen von einer gemeinsamen Konsensus-Sequenz auftreten, so zeigen z.B. in der *pre*-Gruppe die aus thermophilen *Bacillus* isolierten Plasmide pTB19 und pTB53 und das aus *B. subtilis* isolierte Plasmid pGR71 ausserhalb des für die Relaxasedomäne kodierenden Bereiches innerhalb des Relaxase-Leserahmens Abweichungen von den in Abb. 5.3 A gezeigten Plasmiden.

Für die Gruppen pT181 und pSK41 *nes* gibt es vermutlich jeweils einen Plasmid-Prototyp, aus dem evolutionär durch Integration von Transposons und mobilisierbaren Plasmiden verschiedene konjugative bzw. mobilisierbare Plasmide hervorgegangen sind. Sie alle teilen ein gleiches Grundgerüst wie Replikations- und Transfersysteme, besitzen darüber hinaus aber jeweils weitere für das betreffende Plasmid charakteristische Eigenschaften (Pérez-Roth *et al.*, 2010). Die Plasmide der *nes* Gruppe (z.B. pPR9, pLW043, pUSA03) zeigen, dass diese genetische Variabilität im Hinblick auf nosokomiale Infektionen mit multi-resistenten *S. aureus* eine entscheidende Rolle spielt. pPR9 wurde erstmals aus Mupirocin-resistenten MRSA isoliert, pLW043 kodiert neben Resistenzen gegen Trimethoprim, β -Lactamasen und Gentamicin eine Vancomycin-Resistenz und wurde in Vancomycin-resistenten *S. aureus*

A.

pAMalpha1_AF503772	3263	ATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTGAAATCAGCTGGACTAAAAGGCATGCAA	3204
pBC16_U32369	1074	ATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTGAAATCAGCTGGACTAAAAGGCATGCAA	1015
pUB110_M19465	1074	ATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTGAAATCAGCTGGACTAAAAGGCATGCAA	1015
pGO1_FM207042	20733	ATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTGAAATCAGCTGGACTAAAAGGCATGCAA	20674
pSK41_AF051917	20733	ATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTGAAATCAGCTGGACTAAAAGGCATGCAA	20674
pKKS2187_FM207105	4680	ATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTGAAATCAGCTGGACTAAAAGGCATGCAA	4739
SAP016A_GQ900381	37987	ATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTGAAATCAGCTGGACTAAAAGGCATGCAA	37928
pIP1714_AF015628	2463	ATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTGAAATCAGCTGGACTAAAAGGCATGCAA	2522
pGR71_X15503	112	ATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTGAAATCAGCTGGACTAAAAGGCATGCAA	171
pTB19_M63891	3622	ATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTGAAATCAGCTGGACTAAAAGGCATGCAA	3681
pTB53_D14852	506	ATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTGAAATCAGCTGGACTAAAAGGCATGCAA	565

(...)

pAMalpha1_AF503772	2903	TATGCAACAGTTCATAATGATGAGCAAACCCCTCACATGCATTTAGGTGTTGTGCC	2844
pBC16_U32369	714	TATGCAACAGTTCATAATGATGAGCAAACCCCTCACATGCATTTAGGTGTTGTGCC	655
pUB110_M19465	714	TATGCAACAGTTCATAATGATGAGCAAACCCCTCACATGCATTTAGGTGTTGTGCC	655
pGO1_FM207042	20373	TATGCAACAGTTCATAATGATGAGCAAACCCCTCACATGCATTTAGGTGTTGTGCC	20314
pSK41_AF051917	20373	TATGCAACAGTTCATAATGATGAGCAAACCCCTCACATGCATTTAGGTGTTGTGCC	20314
pKKS2187_FM207105	5040	TATGCAACAGTTCATAATGATGAGCAAACCCCTCACATGCATTTAGGTGTTGTGCC	5099
SAP016A_GQ900381	37627	TATGCAACAGTTCATAATGATGAGCAAACCCCTCACATGCATTTAGGTGTTGTGCC	37568
pIP1714_AF015628	2823	TATGCAACAGTTCATAATGATGAGCAAACCCCTCACATGCATTTAGGTGTTGTGCC	2882
pGR71_X15503	472	TATGCAACAGTTCATAATGATGAGCAAACCCCTCACATGCATTTAGGTGTTGTGCC	531
pTB19_M63891	3982	TATGCAACAGTTCATAATGATGAGCAAACCCCTCACATGCATTTAGGTGTTGTGCC	4041
pTB53_D14852	866	TATGCAACAGTTCATAATGATGAGCAAACCCCTCACATGCATTTAGGTGTTGTGCC	925

pAMalpha1_AF503772	2843	CGTGATGGAAAACCTGCAAGGAAAAAATGTGTTTAATCGTCAAGAACTGTTATGGCTACAA	2784
pBC16_U32369	654	CGTGATGGAAAACCTGCAAGGAAAAAATGTGTTTAATCGTCAAGAACTGTTATGGCTACAA	595
pUB110_M19465	654	CGTGATGGAAAACCTGCAAGGAAAAAATGTGTTTAATCGTCAAGAACTGTTATGGCTACAA	595
pGO1_FM207042	20313	CGTGATGGAAAACCTGCAAGGAAAAAATGTGTTTAATCGTCAAGAACTGTTATGGCTACAA	20254
pSK41_AF051917	20313	CGTGATGGAAAACCTGCAAGGAAAAAATGTGTTTAATCGTCAAGAACTGTTATGGCTACAA	20254
pKKS2187_FM207105	5100	CGTGATGGAAAACCTGCAAGGAAAAAATGTGTTTAATCGTCAAGAACTGTTATGGCTACAA	5159
SAP016A_GQ900381	37567	CGTGATGGAAAACCTGCAAGGAAAAAATGTGTTTAATCGTCAAGAACTGTTATGGCTACAA	37508
pIP1714_AF015628	2883	CGTGATGGAAAACCTGCAAGGAAAAAATGTGTTTAATCGTCAAGAACTGTTATGGCTACAA	2942
pGR71_X15503	532	CGTGATGGAAAACCTGCAAGGAAAAAATGTGTTTAATCGTCAAGAACTGTTATGGCTACAA	591
pTB19_M63891	4042	CGTGATGGAAAACCTGCAAGGAAAAAATGTGTTTAATCGTCAAGAACTGTTATGGCTACAA	4101
pTB53_D14852	926	CGTGATGGAAAACCTGCAAGGAAAAAATGTGTTTAATCGTCAAGAACTGTTATGGCTACAA	985

B.

pLgLA39_AB436615	16174	CGTAGAGCAAATTCACGCTATGCA-----AAAGAGTTTAACTGGCTTTACCAGTTGA	16226
Plasmid1_CP000424	19698	CGTCGAGCAAATTCACGCTACGCT-----AAAGAGTTTAACTGGCTCTACCAGTTGA	19646
plca36_CP000935	3572	CGTAGAGCAAATTCACGCTATGCA-----AAAGAGTTTAACTGGCTTTACCAGTTGA	3624
pLTK13_AB450918	12572	CGTAAATCAAATTCACGGTATGCAATATGCAAAAGAATTTAACTGGCTTTACCAGTTGA	12513
pLR002_CP001156	17884	CGTAAATCAAATTCACGGTATGCA-----AAAGAGTTTAACTGGCTTTACCAGTTGA	17936

*** * **** * * * * **** * * * *

AGARTTTAACTGGCTYTACC

(...)

pLgLA39_AB436615	17067	AATTAAAGGAAACCGATAGCGAACAAACGATTTTCAAAGGTAGTGAATTAAACGAACGTTT	17126
Plasmid1_CP000424	18805	AATTAAAGGAAACCGATAGCGAACAAACGATTTTCAAAGGTAGTGAATTAAACGAACGTTT	18746
plca36_CP000935	4465	AATTAAAGGAAACCGATAGCGAACAAACGATTTTCAAAGGTAGTGAATTAAACGAACGTTT	4524
pLTK13_AB450918	11675	AATTAAAGGAAACCGATAGCGAACAAACGATTTTCAAAGGTAGTGAATTAAACGAACGTTT	11616
pLR002_CP001156	18774	AATTAAAGGAAACCGATAGCGAACAAACGATTTTCAAAGGTAGTGAATTAAACGAACGTTT	18803

***** * * * *

Abb. 5.3: DNA Sequenzalignment von Relaxasegenen der MOB_V (A) und MOB_Q (B) Relaxasefamilie.

Das Sequenzalignment wurde mit ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) erstellt. Die Primer wurden mit Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) analysiert und die Primerspezifität wurde über eine BLAST Suche gegen die Nukleotidkollektion (nr/nt) ermittelt.

A. pre-ähnliche Relaxasegene GenBank Acc. Nr. AF503772 – *Enterococcus faecalis* pAMalpha1, *mobB*; U32369 – *Bacillus cereus* pBC16, *mob*; M19465 – *Staphylococcus aureus* pUB110, beta Protein Gen; FM207042 – *S. aureus* pGO1, *pre*; AF051917 – *S. aureus* pSK41, *pre*; FM207105 – *S. aureus* pKKS2187, *pre*; GQ900381 – *S. epidermidis* Plasmid SAP016A, SAP016A_047; AF015628 – *S. cohnii* pIP1714, *pre*; X15503 – *B. subtilis* pGR71, K1 delta1 Gen; M63891 – *B. stearothermophilus* pTB19, *mob*; D14852 – *Bacillus* sp. pTB53, *preT*.

B. plca36-ähnliche Relaxasegene AB436615 – *Lactobacillus gasseri* pLgLA39, *orf26*; CP000424 – *Lactobacillus casei* Plasmid1, *LSEI_A13*; CP000935 – *L. casei* plca36, *LCAZH_p007*; AB450918 – *L. plantarum* 137 pLTK13, putative Nickase; CP001156 – *L. rhamnosus* HN001 pLR002, *LRH_03877*.

Die 3' und 5' Primerbindestellen sind fett unterlegt. Teile des Sequenzalignments wurden zur besseren Darstellung nicht gezeigt, der fehlende Bereich ist durch (. . .) angegeben. Die Konsensus-Sequenz ist durch * markiert. R: A oder G; Y: T oder C.

entdeckt, pUSA03 wurde in *community-acquired* MRSA (CA-MRSA) USA300 nachgewiesen und bewirkt die Multiresistenz des *S. aureus* (Pérez-Roth *et al.*, 2010; Weigel *et al.*, 2003; Diep *et al.*, 2006). Allen gemeinsam ist die pSK41-ähnliche *tra* Region, die das *nes* Relaxasegen, das *virB4*-orthologe *traE*, das *virD4*-orthologe *traK* und das *virB1*-orthologe *traG* beinhaltet. Darüber hinaus integrierten verschiedene Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzgene, die zur Entstehung einer Vielzahl unterschiedlicher konjugativer Plasmide und kaum therapierbarer Infektionen mit den daraus resultierenden multi-resistenten *S. aureus* führten. Die genetische Variabilität dieser Plasmide wurde in kürzlich durchgeführten Studien nachgewiesen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Plasmide pMUP1-pMUP9 alle *traK* positiv, konjugativ und Mupirocin-resistent sind, sie weisen aber kein gemeinsames Restriktionsmuster auf. Hier könnte die Transposition verschiedener Gene zu unterschiedlichen Plasmiden geführt haben, die eine Konservierung der pSK41 *tra* Region als gemeinsames Merkmal aufweisen (Pérez-Roth *et al.*, 2006).

In der Gruppe der pT181-ähnlichen Relaxasen bildet das Plasmid pT181 den Prototyp, alle weiteren mit den Primerpaaren erfassbaren Plasmide sind entweder nahezu 100 % identisch mit pT181 (z.B. pUSA02 aus CA-MRSA, SAP095B) oder haben die pT181-Sequenz integriert in einem größeren Plasmid vorliegen (z.B. SAP014A, pWBG753, SAP103A). Eine Ausnahme stellen pKH7 und pSK101 dar, die nur 70 % bzw. 85 % des pT181 Relaxaseleserahmens umfassen mit einer Sequenzidentität von 89 % bzw. 99 %.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten PCR-Assays lassen sich diese, in humanpathogenen Bakterien verbreiteten mobilen genetischen Elemente anhand der *tra* Gene über PCR und gegebenenfalls Hybridisierung nachweisen. Im Gegensatz zu Antibiotikaresistenz- und Virulenzgenen bilden die pSK41-ähnlichen *tra* Gene und das pT181- und pSK41 *pre* Relaxase-Gen ein immanentes Grundgerüst einer Vielzahl von Plasmiden und stellen somit ein geeignetes Target für die Detektion mobiler genetischer Elemente dar.

Mit den Primerpaaren pIP501 *orf1*, *orf5*, *orf7* und *orf10* (Tab. 4.2 + 4.3) sind die Relaxase-, *virB4*-, *virD4*- und *virB1*-ähnlichen Gene von pIP501 und enger Verwandter der Inc18 Gruppe ebenfalls nachweisbar. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass pIP501 und pRE25 neben pRUM und pHT β ein hohes Vorkommen in klinischen *E. faecium*-Isolaten aufweisen. Die Identifizierung der Plasmide beruhte hierbei auf einem Nachweis der für die Plasmide spezifischen Replikationsgene. Zudem konnte über Cohybridisierungen nachgewiesen werden, dass in VRE Isolaten das *vanA* Gen und das pIP501 / pRE25 Replikon häufig

genetisch miteinander verbunden sind (Rosvoll *et al.*, 2010; Hegstad *et al.*, 2010). Konjugative, Inc18-ähnliche Plasmide, über die eine *vanA* Resistenz übertragen wird, konnten aus VRSA isoliert werden (pWZ909, pWZ7140, pWZ1668). Sie zeigten ein pIP501 ähnliches Grundgerüst, wobei die pIP501 *tra* Region eine hohe Konservierung aufweist (>96 %) (Zhu *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2008). Somit scheinen pIP501 und Derivate der Inc18 Gruppe einen Einfluss auf die Entstehung multi-resistenter Enterokokken und Staphylokokken zu haben, indem Resistenzmechanismen über einen Interspeziestransfer übertragen werden.

Für eine umfassendere Bewertung des Mobiloms in Enterokokken und Staphylokokken sind daher Untersuchungen sowohl bezüglich pSK41-ähnlicher *tra* Gene und pT181- und pSK41 *pre* Relaxase-Gene als auch pIP501-ähnlicher Transferegene sinnvoll. Die in dieser Arbeit entwickelten Primerpaare ermöglichen die Detektion der zurzeit klinisch relevanten multi-resistenten Plasmide G⁺ pathogener Bakterien. Ein Screening nach den mit diesen Primerpaaren detektierbaren Transferegenen kann zu einer Gefahrenabschätzung hinsichtlich multiresistenter Bakterien herangezogen werden.

Während Staphylokokken und Enterokokken auf Grund ihrer Pathogenität schon lange im Hinblick auf Antibiotikaresistenzen und Gentransfer untersucht worden sind, stehen seit einigen Jahren Laktokokken und Laktobazillen als ein mögliches Reservoir für Antibiotikaresistenzgene im Interesse der Forschung. *Lactococcus* und *Lactobacillus* werden allgemein nicht zu pathogenen Organismen gezählt. Sie sind wichtige Starterkulturen zur fermentativen Herstellung verschiedener Milchprodukte wie Joghurt und Quark und können als Probiotika eine auf das menschliche Immunsystem stärkende Wirkung haben. Sie zeigen jedoch häufig eine natürliche Resistenz gegen verschiedene Antibiotika wie z.B. Vancomycin, Kanamycin und Fusidinsäure und besitzen oft mehrere Plasmide. So konnten in den letzten Jahren Antibiotikaresistenzgene auf mobilisierbaren und konjugativen Plasmiden in *Lactococcus* und *Lactobacillus* identifiziert werden. Als Beispiel sei hier das konjugative Plasmid pK214 aus *L. lactis* genannt, das Resistenzen gegen Streptomycin, Tetracyclin und Chloramphenicol kodiert (zusammengefasst in Mathur und Singh, 2005). Durch die Aufnahme dieser mobilen Elemente über Milchsäure-fermentierte Lebensmittel könnte eine Übertragung dieser Resistenzen in pathogene Bakterien wie *Enterococcus* oder auch *Staphylococcus* im menschlichen Körper stattfinden. Ein Transfer von Antibiotikaresistenzkodierenden Plasmiden von *Lactobacillus* nach *Enterococcus* konnte *in vitro* schon gezeigt werden (Gevers *et al.*, 2003). Mit Hilfe der in dieser Arbeit hergestellten Primerpaare lassen sich 16 verschiedene mobilisierbare und konjugative Plasmide aus Milchsäurebakterien durch Amplifizierung von Relaxasegenen detektieren, u.a. auch das bereits erwähnte pK214.

Zusammen mit Antibiotikaresistenz- und Relaxaseprofilen kann eine erste Einschätzung zur Mobilität von Antibiotikaresistenzgenen getroffen werden, die eine Bewertung der Güte der fermentierten Lebensmittel erlaubt.

Die PCR Assays wurden in verschiedenen Studien-, Bachelor- und Diplomarbeiten zur Charakterisierung des Mobiloms von Bakterien der Internationalen Raumstation ISS, der CONCORDIA-Forschungsstation sowie in Bakterienisolaten aus fermentativ hergestellten Lebensmitteln aus der Türkei angewendet. Die Ergebnisse werden zusammen mit Antibiotikaprofilen dieser Isolate ausführlich in der Dissertation von Frau Dipl.-Biochem. Katarzyna Schiwon diskutiert.

Während Replikon-basierte Assays zur Charakterisierung von Plasmiden in G⁺ bakteriellen Isolaten vielfach angewendet worden sind und kürzlich zu einem Klassifizierungssystem von Plasmiden aus G⁺ Bakterien führten (Jensen *et al.*, 2010), gibt es bisher nur wenige Studien, die mobile Plasmide über Detektion von *tra* Genen in bakteriellen Isolaten nachgewiesen haben. Disque-Kochem *et al.* (2001) verwendeten degenerierte Primer zur Detektion von *virD4*- und *virB11*-ähnlichen Genen in Bodenbakterien. Pérez-Roth *et al.* (2006) wiesen in klinischen *S. aureus* Isolaten *virD4*-ähnliche *traK* Gene von pSK41 nach.

Das Replikon-Klassifizierungssystem für Plasmide aus G⁺ Bakterien von Jensen *et al.* (2010) ist teilweise kongruent mit den in dieser Arbeit entwickelten Gruppierungen anhand von Relaxase- und Transfergenen. So bildet die pT181 Gruppe dieser Arbeit ebenfalls eine zusammenhängende Gruppe in dem Replikon-basierten Klassifizierungssystem, in der aber darüberhinaus noch weitere Plasmide zusammengefasst werden. Dagegen spaltet die in dieser Arbeit zusammenhängende pSK41 *pre* Gruppe bei einer Replikon-basierten Klassifizierung auf. Das Rep Protein aus pUB110 ist bisher einzigartig, pUB110 bildet eine eigenständige Replikon-Gruppe. Da die Plasmide der *pre* Gruppe in verschiedenen Gattungen vorkommen (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*) ist es naheliegend, dass die Replikationssysteme sich unterscheiden und daher nicht in einer Gruppe zusammengefasst werden können. Die Relaxase ist dagegen unabhängig von den Gattungen konserviert.

Die pSK41 *nes* und *tra* Gruppen in dieser Arbeit sind mit einer Ausnahme übereinstimmend mit Jensen *et al.* (2010). Über die Replikonprimer ist das Plasmid pPR9 nicht nachweisbar und bildet eine eigenständige Gruppe, während es mit den pSK41 *nes* und *tra* Primern dieser Arbeit zusammen mit den konjugativen pSK41-ähnlichen Plasmiden eine Gruppe bildet. Pérez-Roth *et al.* (2010) gehen auf das von den anderen pSK41-ähnlichen Plasmiden abweichende Rep Protein in pPR9 ein. Während der C-Terminus des Proteins konserviert ist, zeigt der N-Terminus des Rep-Proteins in pPR9 deutliche Ähnlichkeiten mit Rep-Proteinen

aus Phagen, eine Rekombination ist hier im Laufe der Evolution wahrscheinlich. Während also die zum Grundgerüst eines Plasmides gehörenden Replikationssysteme ebenfalls Änderungen unterliegen können z.B. durch Bildung von Chimären, sind die bis jetzt bekannten T4SS in pSK41-ähnlichen Systemen streng konserviert. Änderungen innerhalb der *tra* Regionen verringern hier vermutlich den horizontalen Transfer durch Konjugation, so dass die Weitergabe der Plasmide dann fast ausschließlich nur über Zellteilung erfolgen kann. Schlüsselgene des konjugativen Transfers könnten somit ein universelleres Target für PCR-basierte Screenings nach konjugativen und mobilisierbaren Plasmiden darstellen.

5.2 Studien zum T4SLS des broad host range Plasmids pIP501

5.2.1 Die pIP501 Tra Proteine lokalisieren überwiegend in der Zellhülle von *E. faecalis*

Über Western Blot mit polyklonalen Anti-Tra und Anti-His₆ Antikörpern konnten 9 von 15 pIP501 Tra Proteinen in Zellfraktionen von *E. faecalis* (Zellwand, Zellmembran, Zytoplasma) nachgewiesen werden. Bis auf Orf14, das zytoplasmatisch vorliegt, lokalisieren die 8 weiteren untersuchten Tra Proteine (Orf5, Orf6, Orf7, Orf8, Orf9, Orf10, Orf11, Orf13) in der Zellhülle von *E. faecalis*.

Das Orf14 Protein konnte ausschließlich in der zytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen werden, während die Proteine Orf5, Orf7, Orf8 und Orf13 ausschließlich und Orf10 zum größten Teil in der Zellwand- und Zellmembranfraktion detektiert werden konnten. Dieser Befund deutet an, dass eine Trennung der Proteine der Zellhülle von den zytoplasmatischen Proteinen quantitativ umgesetzt werden konnte. Eine Ausnahme stellt hier das Tra Protein Orf11 dar, das in allen drei Fraktionen als Dublett detektierbar war (Abb. 4.10 und Abb.4.11). Hier ist zum einen eine höhere Sensitivität des eingesetzten polyklonalen Anti-Orf11 Antikörpers denkbar, durch die auch kleinere Spuren des Antigens im Zytoplasma nachweisbar sein könnten. Da in den Lokalisierungsstudien immer gleiche Mengen an Proteinproben im Western Blot eingesetzt wurden, würde man aber dementsprechend für die Zellwand und -membran ein intensiveres Signal im Vergleich zu den anderen Tra Proteinen erwarten. Ein Vergleich der Banden zeigt, dass die Intensität der Banden für Orf11 mit den Banden der anderen Tra Proteine vergleichbar ist. Andererseits könnte das Orf11 eine bisher unbekannte zytoplasmatische Funktion besitzen. Diese Hypothese wird durch die in dieser Arbeit ebenfalls gezeigte Bindung von sowohl einzelsträngiger als auch doppelsträngiger DNA durch Orf11 verstärkt.

Für die Lokalisierung der Proteine Orf6 und Orf9 wurde im Vergleich zu den bisher diskutierten Tra Proteinen eine andere Strategie zur Detektion durchgeführt. Die Proteine

wurden in N-terminaler Fusion mit einem His₇-tag über den *nisA*-Promotor in *E. faecalis* exprimiert, der Nachweis der Proteine erfolgte über einen monoklonalen Anti-His₆ Antikörper. Sowohl His₇-Orf6 als auch His₇-Orf9 konnten in der Zellhülle nachgewiesen werden, mit Spuren der Proteine im Zytoplasma. Die Expression der Proteine scheint über den *nisA* Promotor höher zu sein als in pIP501, angedeutet durch die intensiveren Banden im Western Blot. Dieser Ansatz stellt ein artifizielles System dar, die Lokalisierung der Proteine Orf6 und Orf9 wurde in Abwesenheit der übrigen Tra Proteine durchgeführt. Mögliche Chaperonwirkungen oder Interaktionen, die für eine korrekte Lokalisierung und Stabilisierung notwendig sein könnten, fehlen bei diesen durchgeführten Lokalisierungsstudien (Mossey *et al.*, 2010). Um eine Lokalisierung der Tra Proteine mit dem His₇-Tra Expressionsvektor in *E. faecalis* unter möglichst natürlichen Bedingungen durchzuführen, könnte das Plasmid pIP501 über eine Kreuzung in den *E. faecalis* OG1X mit dem Expressionsvektor übertragen werden. Somit wären die pIP501 Tra Proteine zusammen mit dem über einen Anti-His Antikörper nachweisbaren His₇-Tra Protein innerhalb einer Zelle vorhanden. Allerdings könnte hier das unterschiedliche Expressionsniveau der Proteine durch unterschiedliche Promotorstärke einen Einfluß auf die Proteinlokalisierung haben.

Für das Protein His₇-Orf3 wurden mehrere erfolglose Versuche zur Lokalisierung mit Anti-His₆ Antikörpern in Zellfraktionen von *E. faecalis* unternommen. Bei einer *large scale* Expression von His₇-Orf3 mit pQTEV in *E. coli* konnte das rekombinante Protein kaum bis gar nicht nachgewiesen werden (Gössweiner-Mohr, Karl-Franzens-Universität Graz, pers. Mitteilung). Für das Orf3 Protein wurden über *in silico* Berechnungen 1-2 Transmembranhelices (TMHs) und kein Signalpeptid vorhergesagt (Abajy, 2007). Das Orf3 Protein könnte eine bis jetzt unbekannte toxische Wirkung haben, die zu einer geringen Expression des Proteins in *E. coli* und *E. faecalis* führt. Zudem ist auch ein bis jetzt unbekanntes Signalpeptid möglich, durch das in Folge einer Prozessierung der N-Terminus abgespalten werden könnte. Der für den Nachweis von His₇-Orf3 fusionierte His₇-tag würde hierbei ebenfalls vom Orf3 getrennt werden, so dass ein Nachweis von Orf3 in den Zellfraktionen mit einem Anti-His₆ Antikörper nicht mehr möglich ist. Eine alternative Möglichkeit zur Lokalisierung des Proteins wäre die Verwendung eines C-terminalen tags oder polyklonaler Anti-Orf3 Antikörper.

Das von Abajy *et al.* (2007) aufgestellte Modell des T4SLS von pIP501 basiert auf Protein-Protein Interaktionen mittels eines *yeast two-hybrid* Systems, *in vitro pull-down* Studien und *in silico* Proteintopologievorhersagen. Hierbei wurde für einen Teil der Tra Proteine eine zytoplasmatische Lokalisierung vorhergesagt (Orf1, Orf5, Orf10), während nur Orf15 nach *in*

silico Untersuchungen in der Zellwand lokalisiert. Für 8 der 15 Tra Proteine konnte mit dem Programm PSORTb keine Zuordnung getroffen werden. Eine Analyse mit dem kürzlich veröffentlichten PSORTb v.3.0.2 (Yu *et al.*, 2010) ergibt eine zytoplasmatische Lokalisierung für Orf1, Orf5 und Orf10, eine Zellwandlokalisierung für Orf7 und Orf15 und eine Membranlokalisierung für Orf2, Orf3, Orf9 und Orf12. Für 6 Tra Proteine konnte keine eindeutige Zuordnung getroffen werden (Tab 5.2).

Tab. 5.2: *In silico* Vorhersagen von Signalpeptiden, Transmembranhelices sowie Lokalisierung der pIP501 Tra Proteine in G+ Bakterien (nach Kopec, 2006, modifiziert) und Vergleich mit experimentellen Ergebnissen.

Transmembranhelices (TMH) wurden nach HMMTOP-Algorithmus (Tsunády und Simon, 2001) ermittelt, die Zahlenangaben beziehen sich auf die Aminosäuren des betreffenden Proteins, die die postulierte TMH ausbilden. Signalpeptide wurden über SignalP 3.0 (Bendtsen *et al.*, 2004) vorhergesagt, die Lokalisierung wurde über PSORTb v.3.0.2 (Yu *et al.*, 2010) ermittelt.

Tra Protein	experimentell	PSORTb v.3.0.2	HMMTOP	Signalpeptid
Orf1	nd	Zytoplasma	löslich	
Orf2	nd	Membran	13-32 47-69 82-104	+
Orf3	nicht nachweisbar	Membran	46-63 67-89	
Orf4	nd	unbekannt	löslich	
Orf5	Zellwand Membran	Zytoplasma	löslich	
Orf6	Zellwand Membran	unbekannt	218-235	
Orf7	Zellwand Membran	Zellwand	20-37	+
Orf8	Zellwand Membran	unbekannt	10-29	+
Orf9	Zellwand Membran	Membran	13-35 67-86	+
Orf10	Zellwand Membran	Zytoplasma	löslich	
Orf11	Zellwand Membran Zytoplasma	unbekannt	42-64	
Orf12	nd	Membran	71-93 172-194 204-223 236-258 268-290	
Orf13	Zellwand Membran	unbekannt	168-190	
Orf14	Zytoplasma	unbekannt	löslich	
Orf15	nd	Zellwand	261-278	+

nd – nicht durchgeführt; + – Signalpeptid vorhergesagt

Die *in silico* Ergebnisse decken sich nur teilweise mit den in dieser Arbeit ermittelten Lokalisierungen der Tra Proteine. So stimmen die Vorhersagen für das VirB1-orthologe Orf7 (Zellwand) und Orf14 (löslich) mit den experimentellen Daten überein. Orf7 konnte zudem in

der Membranfraktion nachgewiesen werden. Durch die vorhergesagte TMH und das Signalpeptid für Orf7 ist dieses Ergebnis plausibel. Für das VirB4- und VirD4-orthologe Orf5 und Orf10 wird eine zytoplasmatische Lokalisierung angegeben, nachgewiesen wurden beide Proteine in der Zellwand- und Membranfraktion. Für VirB4-orthologe Proteine anderer T4SS wird mindestens eine TMH vorhergesagt und eine Lokalisierung in der zytoplasmatischen Membran sowie im periplasmatischen Raum konnte nachgewiesen werden (Draper *et al.*, 2006; Rabel *et al.*, 2003; Dang und Christie, 1997). Immunologische Nachweise VirB4-orthologer Proteine in G⁺ Bakterien sind bisher nur über Immunfluoreszenz-Assays durchgeführt worden. Das VirB4-orthologe TcpF des konjugativen Plasmids pCW3 aus *Clostridium perfringens* konnte hierbei ausschließlich an den Zellpolen nachgewiesen werden (Teng *et al.*, 2008).

Für VirD4-orthologe Proteine anderer T4SS wird eine TMH sowie eine periplasmatische Domäne vorausgesagt, sie konnten ebenfalls in der Zytoplasmamembran nachgewiesen werden. Für eine periplasmatische Domäne für VirD4 aus *A. tumefaciens* konnte gezeigt werden, dass sie essentiell für den konjugativen DNA-Transfer ist (Kumar und Das, 2002; Gomis-Rüth *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 1991). VirD4-orthologe Proteine G⁺ T4SS wurden in der Zellmembran nachgewiesen, eine Zellwandanalyse wurde in diesen Studien nicht durchgeführt. So wiesen Chen *et al.* (2008) das VirD4-orthologe Protein des konjugativen Plasmids pCF10 aus *E. faecalis* in der Zellmembran nach.

Neben dem putativen *coupling* Protein Orf10 aus pIP501 gibt es noch weitere VirD4-orthologe Proteine, die keine identifizierbare TMH aufweisen, wie z.B. TraK von pSK41 aus G⁺ *S. aureus* und pSR1 aus G⁻ *P. syringae*. Für Orf10 wird seit kurzem diskutiert, dass *upstream* von *orf10* eine *frame-shift* Mutation den eigentlich zusammengehörenden Leserahmen *orf9-orf10* in zwei unabhängige *orfs* aufgetrennt haben könnte (Alvarez-Martinez und Christie, 2009). Der *frame-shift* fand hierbei vermutlich zwischen den Basenpaaren 2130 – 2144 (Acc. Nr. AJ505823) statt. Wird in diesem Bereich eine Base deletiert, bilden *orf9* und *orf10* einen zusammenhängenden Leserahmen. Deletionen *upstream* von Position 2130 beenden die Translation durch das dann im Leserahmen vorliegende TGA-Stoppocodon (Abb. 5.4).

Parsons *et al.* (2007) konnten für das VirD4-orthologe TcpA des Plasmids pCW3 zeigen, dass eine Transmembranhelix im *coupling* Protein nicht essentiell für die Konjugation ist, die Transferraten waren allerdings im Vergleich zum Wildtyp um ca. 10^3 reduziert. Die Transferraten für pIP501 liegen typischerweise im Bereich 10^5 pro Rezipient und sind damit kleiner als für z.B. pCF10 aus *E. faecalis* und pCW3 aus *C. perfringens*. Eine mögliche

Ursache für diese im Vergleich geringe Transferrate könnte durch die in Orf10 deletierte TMH erklärt werden.

2124 aatcaatgaggagggggaaaaatgactagtttatttagcagaatcagacgggtttaat 2179

Abb. 5.4: DNA-Sequenz von pIP501, Acc. Nr. AJ505823, im Bereich zwischen *orf9* und *orf10*.

Die Deletion einer Base im Bereich 2130 – 2144 (gestrichelter Balken) führt zu einem zusammenhängenden Leserahmen von *orf9* und *orf10*. Eine *frame-shift* Mutation durch den Einbau einer zusätzlichen Base in diesem Bereich könnte im Laufe der Evolution dazu geführt haben, dass die beiden Gene kein zusammenhängendes Leseraster mehr bilden. Dies würde die fehlende, sonst für *coupling* Proteine typische Transmembranhelix erklären. Für das Protein aus dem zusammenhängenden Leserahmen *orf9-orf10* werden 2 TMHs sowie eine Membran-Lokalisierung vorhergesagt.

Unterstrichen ist die ribosomale Bindestelle von *orf10*, das *orf10*-Startcodon ist blau, das *orf9*-Stoppcodon rot unterlegt. Deletion eines Basenpaars *upstream* von Position 2130 führt dazu, dass das ATG-Startcodon von *orf9* in Phase mit einem Stoppcodon an Position 2130 (grün) liegt, nur bei Deletionen im Bereich 2130 – 2144 bilden *orf9* und *orf10* einen Leserahmen.

Die Ergebnisse der Lokalisierung von Orf10 in den Fraktionen sind dementsprechend interessant. Trotz einer vermutlich deletierten TMH und fehlenden Signalpeptids wurde das VirD4-orthologe Orf10 überwiegend in der Zellmembran und –wand detektiert mit geringen Spuren in der zytoplasmatischen Fraktion. Möglicherweise gibt es hier, vergleichbar mit periplasmatischen Domänen von *coupling* Proteinen G- Systeme, eine Peptidoglycan / Zellwand assoziierte Domäne. Der Transportweg in die Zellhülle bleibt unbekannt. Denkbar ist eine bis jetzt nicht nachgewiesene Interaktion von Orf9 mit Orf10.

Untersuchungen im Bereich des Zellwand-Proteoms verschiedener G⁺ Bakterien in den letzten Jahren haben gezeigt, dass die Anzahl Zellmembran- und Zellwand-assoziiierter Proteine weit größer ist als über *in silico* Analysen vorausgesagt wurde. In einer Proteom-Studie in *Lactococcus lactis*, bei der eine Fraktionierung der Proteine in Zellhülle und Zytoplasma durchgeführt wurde und die methodisch vergleichbar mit der in dieser Arbeit durchgeführten Fraktionierung ist, wurden insgesamt 313 Proteine in der Zellhülle detektiert, von denen 28 % ein vorausgesagtes Signalpeptid und 8 % eine vorausgesagte Membranlokalisierung aufwiesen (Beganovic *et al.*, 2010). Die in der vorliegenden Arbeit als Zellwand und Zellmembran bezeichneten Fraktionen entsprechen zusammen der von Beganovic *et al.* (2010) definierten Zellhüll-Fraktion. Ähnliche Ergebnisse wie bei *Lactococcus* bezüglich des Zellwand-Proteoms wurden auch in *Mycobacterium smegmatis* und *M. avium* subsp. *paratuberculosis* sowie *S. aureus* gefunden (He und de Buck, 2010a; He und de Buck, 2010b; Gatlin *et al.*, 2006).

Alle weiteren, bisher nicht diskutierten pIP501 Tra Proteine lokalisieren, unabhängig von Signalpeptiden und Transmembranhelices, in der Zellmembran- und Zellwandfraktion.

Zusammen mit den Ergebnissen der Proteomforschung wird deutlich, dass vermutlich ein größerer Teil Zellwand- und Zellmembran-assoziiierter Domänen und Motive bis heute noch unentdeckt sind, so dass *in silico* Vorhersagen zur Lokalisierung von Proteinen nur bedingt präzise sind.

Bei dem in dieser Studie durchgeführten Ansatz, die Zellwand und die Zellmembran voneinander zu trennen, ist nicht auszuschließen, dass die Zellwandfraktion mit Zellmembrananteilen und die Zellmembranfraktion mit Zellwandanteilen kontaminiert sind. Um eine mögliche Zellwandlokalisierung zu verifizieren, wurde eine modifizierte Zellfraktionierung durchgeführt. Hierbei wurde die Zellwandfraktion erhalten, indem *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) mit Lysozym und Mutanolysin behandelt wurde. Hierdurch wird das Peptidoglykan durch Spaltung der β -1,4-glykosidischen Bindung zwischen der N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin gespalten. Zellwand-assoziierte Proteine sollten dabei aus dem Peptidoglykan herausgelöst werden und löslich im Überstand vorliegen. Die Protoplasten wurden anschließend homogenisiert, größere Zellbestandteile abzentrifugiert und die Membran durch Ultrazentrifugation von den zytoplasmatischen Proteinen getrennt.

Orf14 als bereits nachgewiesenes zytoplasmatisches Protein diente als Kontrolle für die erfolgreiche Trennung der Membran- und Zellwandproteine von zytoplasmatischen Proteinen. Orf14 konnte hierbei nur im Zytoplasma nachgewiesen werden, so dass eine Kontamination der Proteine der Zellhülle mit zytoplasmatischen Proteinen ausgeschlossen werden kann (Abb. 4.10 B). Sowohl Orf10 als auch Orf11 wurden mit der modifizierten Fraktionierung ebenfalls in der Zellwand und in der Zellmembran nachgewiesen (Abb. 4.10 B).

Das putative *coupling* Protein Orf10 liegt somit vermutlich Zellwand-assoziiert vor, aus der es durch Behandlung mit Lysozym und Mutanolysin freigesetzt werden kann. Vermutlich fehlt durch eine mögliche Unterbrechung des Leserahmens zwischen Orf9 und Orf10 eine Verankerung mit der Zellmembran über eine Transmembranhelix. Motive für eine kovalente Bindung an das Peptidoglykan, insbesondere LPxTG-Zellwandanker sind für Orf10 nicht identifizierbar. Wahrscheinlicher ist eine Zellwand-assoziierte Domäne und eine nicht-kovalente Bindung an das Peptidoglykan. Hier sind bereits einige Motive bekannt, wie LysM (pfam PF01476), WxL, SH3b oder SLH (PF00395) (zusammengefasst in Kleerebezem *et al.*, 2010), diese Motive konnten für Orf10 allerdings nicht nachgewiesen werden.

Orf11 wurde ebenfalls durch eine Lysozym- und Mutanolysinbehandlung aus der Zellwand freigesetzt. In der Aminosäuresequenz von Orf11 gibt es das Zellwand-bindende WxL-Motiv, weitere typische WxL-Motive konnten in der Orf11-Sequenz nicht gefunden werden (Y-x(3)-[LIV]-T-W-x-L-x(3)-P; Brinster *et al.*, 2007).

Seit kurzem wird das Motiv NxzTN als ein putativer Zellwandanker diskutiert, das nicht wie bei einem LPxTG-Motiv über die Sortase SrtA, sondern über SrtB kovalent mit dem Peptidoglykan verbunden wird (Pucciarelli *et al.*, 2005). In Orf11 lässt sich das Motiv NxzTN finden. Charakteristisch für NxzTN-Proteine sind ein Signalpeptid und ein positiv geladener C-Terminus (Anhäufung von Lysin, Arginin und Histidin). Für Orf11 findet man einen überwiegend hydrophoben C-Terminus mit einem kleinen Anteil positiv geladener Aminosäuren, ein Signalpeptid wird nicht vorhergesagt. Somit gibt es bis jetzt nur Hinweise auf mögliche Peptidoglykan-assoziierte Motive innerhalb der Orf11-Aminosäuresequenz.

Neben Lokalisierungen der Tra Proteine über Immunblots in Zellfraktionen von *E. faecalis* wurden ausgewählte Tra Proteine *in vivo* über STED Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Orf8 und Orf11 konnten spezifisch in der Zellhülle detektiert werden (Abb. 4.12 und 4.13), während für Orf5, Orf10 und Orf14 die über Antigen-Säulen immunologisch aufgereinigten polyklonalen Antikörper unspezifische Bindungen zeigten.

Zur Lokalisierung der Tra Proteine *in vivo* wurden zunächst Immunfluoreszenz-Aufnahmen mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt, die aber auf Grund der geringen Größe von *E. faecalis* nur ein sehr ungenaues und verschwommenes Bild zur Lokalisierung von Tra Proteinen in *E. faecalis* liefern konnten (Abb. 5.5).

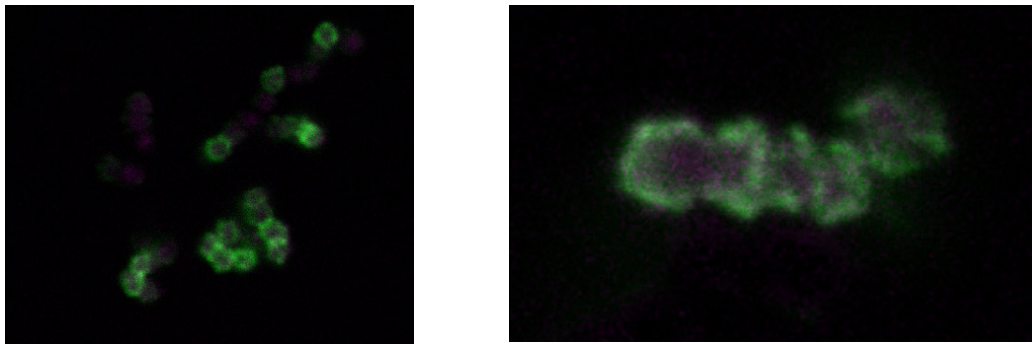


Abb. 5.5: Konfokale immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Orf11 in *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) mit polyklonalen Anti-Orf11 Antikörpern.

Als sekundärer Antikörper wurde Atto 647N Goat Anti-Rabbit verwendet (grün), die Zellen sind mit Propidiumiodid gegengefärbt (violett).

Die Auflösung konventioneller Fluoreszenzmikroskope folgt aus der ABBESchen Formel und ist bei sichtbarem Licht auf ~ 200 nm durch Lichtbeugungen begrenzt. Strukturen < 200 nm lassen sich über konventionelle Lichtmikroskopietechniken nicht auflösen und erscheinen als ein gemeinsamer unscharfer Punkt im Mikroskop. Forschung im Bereich der physikalischen Optik haben in den letzten Jahren zeigen können, dass Auflösungsbegrenzungen von Lichtmikroskopen umgangen werden können und Auflösungen bis in den Bereich von 20 nm

möglich sind. Über eine stimulierte Emissionslöschung angeregter Photonen im Randbereich des Fluoreszenzpunktes wird der Durchmesser dieses Punktes reduziert und die Auflösung des Fluoreszenzbildes steigt (STED – stimulated emission depletion, Klar *et al.*, 2001).

Die Lokalisierung der pIP501 Tra Proteine mittels STED-Mikroskopie belegt die höhere Auflösung im Vergleich zum konfokalen Mikroskop. Während z.B. in der konfokalen Aufnahme Orf11 in der Membran von *E. faecalis* einen zusammenhängenden Ring bildet, wird dieser Ring im STED-Bild zu einzelnen deutlich definierten Punkten aufgelöst (Abb. 4.13).

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Lokalisierung belegen die Ergebnisse der Lokalisierung von Tra Proteinen mit Immunblot in Zellfraktionen von *E. faecalis*. Sowohl Orf8 als auch Orf11 sind ausschließlich in der Zellhülle von *E. faecalis* detektierbar. Orf8 bildet hierbei vornehmlich konzentrierte Foci, während Orf11 in der gesamten Zellhülle vorliegt, ohne eine konzentrierte Anhäufung aufzuzeigen. Nach bisherigem Wissensstand zeigt Orf11 keine Proteininteraktionen mit anderen Tra Proteinen von pIP501, während für Orf8 Interaktionen mit Orf14, das wiederum mit Orf7 interagiert, belegt werden konnten (Abajy *et al.*, 2007). Somit könnte die Verteilung von Orf11 innerhalb der Zellhülle zufällig sein, während Orf8 auf Grund der Interaktionen mit anderen Tra Proteinen ausschließlich an Orten anzutreffen ist, an denen der T4SLS Komplex ausgebildet wird. Um diese Hypothese bestätigen zu können, müssten Koloalisierungen verschiedener Tra-Proteine *in vivo* mit polyklonalen Antikörpern aus verschiedenen Organismen durchgeführt werden. Über den Einsatz von sekundären, mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Antikörpern könnten dann verschiedene Tra Proteine simultan nachgewiesen werden. Aus den bisher erhaltenen Ergebnissen kann nur vermutet werden, dass zumindest für Orf8 ein Fluoreszenzsignal in der Zellhülle jeweils einen T4SLS-Komplex repräsentiert. Somit liegen *in vivo* im Durchschnitt 3 – 4 T4SLS-Komplexe in *E. faecalis* vor. Ähnliche Ergebnisse erhielten Chen *et al.* (2008), die die Relaxase PcfG, das *coupling* Protein PcfC und ein weiteres Tra Protein des konjugativen Plasmids pCF10 *in vivo* über Immunfluoreszenzmikroskopie als Foci in *E. faecalis* nachweisen konnten (Abb. 5.6 A). Die räumliche Verteilung dieser Foci ist vermutlich abhängig vom SecA-YEG-Transportsystem (Pugsley und Buddelmeijer, 2004; Campo *et al.*, 2004).

Das Verteilungsmuster von Orf11 *in vivo* mittels konfokaler Mikroskopie ähnelt dem Muster für PrgB aus pCF10 (Abb. 5.6 B). PrgB ist ein Oberflächenprotein, das an der Aggregation von *E. faecalis* beteiligt ist. Die räumliche Verteilung von PrgB in der Zellhülle von *E. faecalis* ist unabhängig von T4SS Faktoren (Chen *et al.*, 2008). Die Ergebnisse zur

Immunlokalisierung von Orf11 mittels Fluoreszenzmikroskopie eröffnen zusammen mit den Ergebnissen aus den Fraktionierungen die Möglichkeit, dass Orf11 ein oberflächenaktives Protein sein könnte, dessen Verteilung in der Zellhülle unabhängig von anderen T4SLS Proteinen erfolgen könnte.

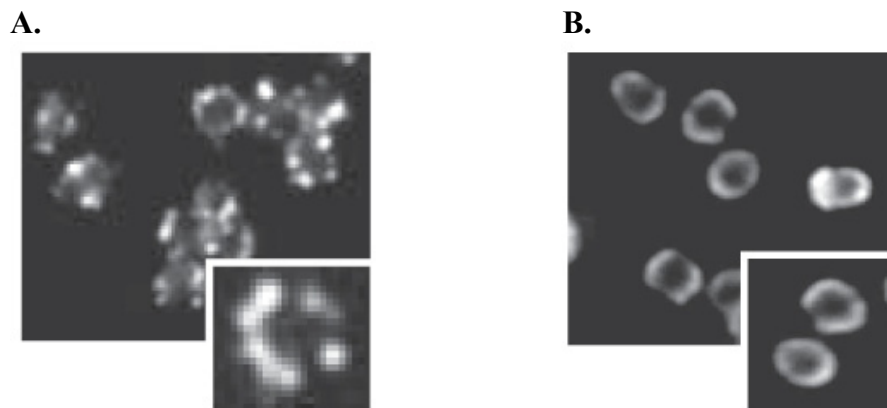


Abb. 5.6: Lokalisierung von PcfC (A) und PrgB (B) in *E. faecalis* mit Immunfluoreszenzmikroskopie (aus Chen *et al.*, 2008).

5.2.2 Die Tra Proteine Orf10, Orf11 und Orf14 zeigen DNA-Bindung *in vitro*

In dieser Arbeit konnte über EMSA Experimente gezeigt werden, dass das putative *coupling* Protein Orf10 ausschließlich an einzelsträngige Oligonukleotide bindet, während das zytoplasmatische Protein Orf14 eine höhere Affinität zu doppelsträngiger DNA aufweist. Orf11 zeigte eine annähernd gleich starke Bindung an einzel- und doppelsträngige DNA.

Für die Gelshiftexperimente wurden zwei verschiedene Oligonukleotide eingesetzt, das 42-mer umfasst hierbei die pIP501 *oriT* Region und bildet durch einen *inverted repeat* eine *hairpin* Struktur aus (Abb. 5.7). Das random Oligonukleotid besteht aus 42 zufällig aus der Sequenz von pIP501 ausgewählten Basenpaaren, die keine Sekundärstruktur aufweisen (Kopec, 2006).

Sowohl für das einzelsträngige 42-mer- als auch für das einzelsträngige random-Oligonukleotid konnte eine Bindung an Orf10 nachgewiesen werden, die Bindung scheint somit sequenzunspezifisch zu sein. In einem direkten Vergleich war die Affinität von Orf10 zum random Oligonukleotid höher als zum 42-mer (Abb. 4.14 A). Vermutlich spielt hier ein partieller pseudo-Doppelstrangcharakter des 42-mers durch Ausbildung eines *hairpins* eine Rolle. Im Vergleich zum random-Oligonukleotid ist der einzelsträngige Bereich beim 42-mer auf wenige Basenpaare beschränkt. Die effektive einzelsträngig Bindungsfläche für Orf10 ist daher beim 42-mer reduziert. Während für das random-Oligonukleotid die Intensität des

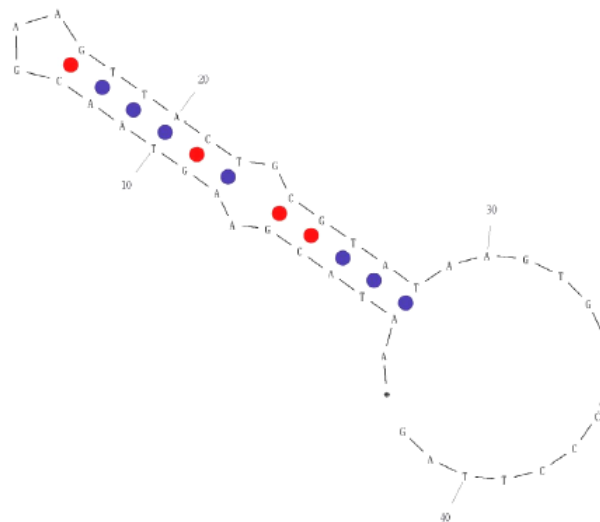


Abb. 5.7: Über das Program *mfold* berechnete Sekundärstruktur des 42-mer Oligonukleotids (aus Kopeck, 2006).

Shifts mit zunehmender Orf10-Konzentration anstieg, konnten für kleine Konzentrationen von Orf10 (bis 3,3 μM) bei dem 42-mer zunächst zwei unterschiedlich weit wandernde Komplexe beobachtet werden (Abb. 4.14). Der höhermolekulare Komplex war bei Orf10-Konzentrationen $\geq 4,4 \mu\text{M}$ nicht mehr nachweisbar. Die Bindung von DNA an Orf10 könnte zu einer konformationellen Änderung und einer Stabilisierung von Orf10 führen, die im Fall des 42-mer auf Grund der geringeren Affinität erst bei höheren Proteinkonzentrationen vollständig einsetzt (Patel *et al.*, 1990, Weiss *et al.*, 1990). Bei kleinen Proteinmengen liegt ein Teil als hochmolekulares Aggregat vor, das kaum in das Gel einläuft.

Coupling Proteine haben eine vermittelnde Aufgabe zwischen dem Relaxosom und dem mpf-Komplex in der Zellhülle. Über Interaktionen des *coupling* Proteins mit der an die Einzelstrang-DNA gebundenen Relaxase und Proteinen des mpf-Komplexes wird das Relaxosom zum T4SS Komplex in der Zellhülle dirigiert, Interaktionen von *coupling* Proteinen verschiedener T4SS mit Relaxasen und weiteren T4SS Proteinen konnten nachgewiesen werden (zusammengefasst in Alvarez-Martinez und Christie, 2009). Der Aufbau von *coupling* Proteinen ist modular und besteht generell aus einer N-terminalen Transmembranhelix (TMH), einer Nukleotid-Bindedomäne (P-loop NTPase Superfamilie mit Walker A und Walker B Motiv) und einer *all- α* -Domäne (AAD, pfam10412), über die wahrscheinlich eine DNA-Bindung stattfindet (de Paz *et al.*, 2010).

Eine Transmembranhelix für Orf10 ist vermutlich deletiert (s. Abb. 5.4), Walker A und Walker B-Motive befinden sich an Position 40 – 46 bzw. 292 – 297 der Aminosäuresequenz von Orf10 (Acc. Nr. CAD44390), zusammengefasst in der P-loop NTPase Superfamilie (E-Wert $1,85 \cdot 10^{-85}$). Eine NTP-Bindung und -Hydrolyse für Orf10 konnte *in vitro* bewiesen

werden (Çelic *et al.*, in preparation). Eine *all-α*-Domäne wird im Bereich 18 – 439, Acc. Nr. CAD44390, vorhergesagt (E-Wert $1,12 \cdot 10^{-7}$, *conserved domain search*, Marchler-Bauer *et al.*, 2009).

Für *coupling* Proteine einer Vielzahl verschiedener T4SS konnte eine DNA-Bindung *in vitro* nachgewiesen werden. Hierbei zeigten einige *coupling* Proteine sequenzunspezifische Bindungen an doppelsträngige DNA (*Helicobacter pylori* HP0524, Schröder *et al.*, 2002), bevorzugt an einzelsträngige DNA (TrwB_{R388}, Moncalian *et al.*, 1999; Hormaeche *et al.*, 2002; TraG_{RP4}, Schröder und Lanka, 2003) oder gleichermaßen an einzel- und doppelsträngige DNA ohne Präferenz (PcfC_{pCF10}, Chen *et al.*, 2008). Für Orf10 als ein putatives *coupling* Protein konnte eine sequenzspezifische Bindung ausschließlich an Einzelstrang-DNA nachgewiesen werden. Die Walker A / B Domäne alleine war nicht ausreichend für eine DNA-Bindung, vermutlich durch eine teilweise deletierte *all-α*-Domäne, deren C-Terminus ausserhalb der Walker A / B Motive liegt. Eine sequenzunspezifische Bindung unabhängig von der *oriT* Region ist sinnvoll, da die Relaxase sequenzspezifisch an den *oriT* bindet und somit eine Interaktion der *oriT* Region mit weiteren DNA-bindenden Proteinen blockiert wird. Die in dieser Studie erhaltenen Ergebnisse stehen somit im Einklang mit der für Orf10 erwarteten Funktion, die Relaxase zusammen mit der genickten einzelsträngigen T-DNA zum T4SLS Komplex in der Zellhülle zu leiten und unter Energieverbrauch durch ATP-Spaltung die einzelsträngige T-DNA in den T4SLS Komplex zu pumpen (Atmakuri *et al.*, 2004; Llosa *et al.*, 2002). Unklar bleibt, auf welche Weise die Interaktion zwischen der vermutlich zytoplasmatischen Relaxase und dem in der Zellmembran- und Zellwandfraktion detektierten *coupling* Protein Orf10 stattfindet. Möglicherweise decken sich die *in silico* Vorhersagen nicht mit der *in vivo* Lokalisierung von Orf1. So konnte die Relaxase PcfG des Plasmids pCF10 nur in der Zellmembran von *E. faecalis* detektiert werden (Chen *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch für Orf1 eine Lokalisierung in der Zellhülle angenommen werden kann, so dass das *coupling* Protein Orf10 und die Relaxase Orf1 sich in räumlicher Nähe zueinander befinden könnten. Eine vermittelnde Rolle von Orf10 zwischen dem Relaxosom und dem mpf-Komplex wäre somit möglich.

Für das Tra Protein Orf14 konnte eine sequenzunspezifische DNA-Bindung mit hoher Affinität für das doppelsträngige random- und 42-mer- Oligonukleotid festgestellt werden. *In silico* Vorhersagen zur Sekundärstruktur von Orf14 zeigen überwiegend α -Helices, für den N-Terminus wird ein helix-turn-helix Motiv mit 25 % Wahrscheinlichkeit berechnet, über das eine DNA-Bindung stattfinden könnte. Ab Orf14-Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ ist sowohl für das doppelsträngige random- als auch für das 42-mer-Oligonukleotid eine DNA-Bindung

erkennbar, wobei zunächst bei 1 μM Protein ein niedermolekularer Komplex gebildet wird. Bei Verdopplung der Proteinkonzentration auf 2 μM wird ein höhermolekularer Komplex gebildet, die Intensität dieses Komplexes nimmt dann mit weiter steigender Konzentration von Orf14 zu, während die Menge nicht-gebundener DNA stetig abnimmt. Die Ergebnisse deuten auf ein Gleichgewicht zwischen zwei verschiedenen Konformationen hin, das bei höheren Proteinkonzentrationen zugunsten des höhermolekularen Komplexes verschoben ist. Eine kooperative Bindung ist denkbar, bei der Orf14 zunächst in einem thermodynamisch stabilen Zustand mit geringer DNA-Affinität vorliegt. Bei einer Orf14 Konzentration $\geq 2 \mu\text{M}$ wird der thermodynamisch nicht begünstigte Zustand mit hoher DNA-Bindefähigkeit angenommen. Es werden dann vermutlich zwei und mehr DNA-Moleküle pro Protein gebunden, so dass der Komplex dann langsamer im Gel wandert. Eine DNA-abhängige Dimerisierung von Orf14 ist ebenfalls denkbar. Eine Interaktion von Orf14 mit Orf14 konnte *in vivo* über einen *yeast two-hybrid* Assay gezeigt werden (Abajy, 2007).

An einzelsträngige DNA konnte nur eine schwache Bindung nachgewiesen werden, klar definierte, retardierte Banden sind kaum zu erkennen. Die Affinität von Orf14 scheint für das einzelsträngige 42-mer Oligonukleotid höher zu sein als für das random Oligonukleotid. Hier bewirkt vermutlich, anders als bei Orf10, der pseudo-Doppelstrangcharakter des 42-mer eine höhere Affinität, an Orf14 zu binden. Insgesamt scheint die Bindung von Orf14 an Einzelstrang-DNA aber zu instabilen Komplexen zu führen, da klar retardierte Banden kaum sichtbar sind.

Orf14 ist, wie bereits nachgewiesen, ein zytoplasmatisches Protein, das eine hohe Affinität zeigt, sequenzunspezifisch an doppelsträngige DNA zu binden. Durch Orf14 könnte somit über Interaktionen mit Tra-Proteinen, wie Orf7, doppelsträngige (Plasmid)-DNA als Substrat für die Relaxase zum T4SLS Komplex in der Zellhülle geliefert werden. Wird die doppelsträngige DNA durch die Relaxase genickt, ist die Affinität von Orf14, diese Einzelstrang-DNA zu binden, gering. Die genickte T-DNA wird freigegeben, bindet an die Relaxase und wird über Interaktionen von Orf1 mit Orf10 sowie über eine Bindung von Orf10 an Einzelstrang-DNA an das *coupling* Protein weitergeleitet. Von dort gelangt die T-DNA dann vermutlich in den T4SLS Kanal.

Für das Tra Protein Orf11 konnte eine schwache DNA-Bindung an doppel- und einzelsträngige DNA nachgewiesen werden, die Affinität für das random Oligonukleotid ist etwas höher als für das 42-mer. Vermutlich führt hier durch den *inverted repeat* beim 42-mer die verzweigte Struktur der DNA zu einer geringeren Affinität als bei dem linearen random Oligonukleotid. Für das random-Oligonukleotid waren sowohl für Einzelstrang- als auch

Doppelstrang-DNA zwei Komplexe unterschiedlicher Mobilität detektierbar. Die Intensität des Komplexes II für einzelsträngige DNA (Abb. 4.16 C) ist sehr gering. Möglicherweise fand eine teilweise proteolytische Abspaltung des His₇-tags statt, so dass kleine Menge von Orf11del ohne His₇-tag vorlagen. Der daraus gebildete Protein-DNA-Komplex würde dementsprechend schneller in der Elektrophorese wandern. Die geringe Intensität des Komplexes II bestätigt diese Hypothese. Für das 42-mer Einzelstrang-Oligonukleotid ist für 20 µM Orf11del ebenfalls eine sehr schwache zweite Bande erkennbar, vermutlich führt hier die geringere Affinität erst bei höheren Orf11del-Konzentrationen zur Bildung eines zweiten Komplexes, bei dem der His₇-tag proteolytisch abgespalten wurde. Für das doppelsträngige random-Oligonukleotid konnten ebenfalls zwei Komplexe beobachtet werden, wobei Komplex IV (Abb. 4.16 D) ein vergleichbares Laufverhalten wie für das einzelsträngige random-Oligonukleotid aufweist, während Komplex III hochmolekular vorliegt. Vermutlich führt die höhere Affinität für das random-Oligonukleotid bei doppelsträngiger DNA zur Bindung mehrere DNA-Moleküle und einer Aggregat-Bildung mit stark reduzierter Mobilität. Über die Funktion von Orf11 liegen bis jetzt keine Informationen vor. Alvarez-Martinez und Christie (2009) vermuten auf Grund ähnlicher Größe und ähnlicher Sekundärstruktur eine Homologie zwischen Orf11 und PrgL aus pCF10. Über eventuelle DNA-Bindeeigenschaften von PrgL liegen keine Daten vor.

5.2.3 Die lytische Transglykosylase Orf7 ist essentiell für den konjugativen Transfer von pIP501

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch einen *orf7 knock out* in pIP501 ein konjugativer Transfer nicht nachweisbar (Transferrate $< 6,1 \cdot 10^{-9}$) stattfindet. Orf7 scheint somit eine essentielle Funktion für den konjugativen Transfer in G⁺ Bakterien zu haben.

Das VirB1-orthologe Orf7 weist einen modularen Aufbau auf: der N-Terminus besteht aus einer SLT-Domäne (pfam 01464.13, spezialisierte lytische Transglykosylase, score 21,7; E-Wert $8,3e^{-5}$), durch die eine β -1,4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin im Peptidoglykan gespalten wird, und aus einer CHAP-Domäne (pfam 05257.9, Cystein-Histidin abhängige Amidase, score 107,6; E-Wert $2,4e^{-31}$) im C-Terminus, über die Amidbindungen im Peptidoglykan gespalten werden können (Abb. 5.8). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um eine N-Acetylmuramoyl-L-alanin Amidase (E-Wert $2,2e^{-42}$). Der C-Terminus zeigt zudem eine hohe Ähnlichkeit mit der COG3942-Familie der Oberflächenantigene (score 108, E-Wert $1e^{-24}$), zu der ebenfalls (putativ) sekretierte Proteine aus *Streptococcus* und *Staphylococcus* gehören.



Abb. 5.8: Modularer Aufbau von Orf7 (Acc. Nr. CAD44387) aus pIP501.

Das VirB1-orthologe Orf7 umfasst 369 Aminosäuren, eine TMH wird am N-Terminus im Bereich 20 – 37 vorhergesagt (s. Tab. 5.2) (grau markierter Balken) ebenso wie ein Signalpeptid für den N-Terminus mit einer Schnittstelle an Position 47 – 48 (SignalP 3.0). Die SLT-Domäne liegt zwischen den Aminosäuren 80 – 165, die CHAP-Domäne im Bereich 243 – 369. Für die SLT-Domäne wird ein Peptidoglykanbindemotiv vorhergesagt (*conserved domain search*, Marchler-Bauer *et al.*, 2009).

Eine Hydrolyse von Peptidoglykan durch Orf7 konnte *in vitro* gezeigt werden (Çelic *et al.*, in preparation). Orf7 könnte somit den Transferprozess über eine partielle Öffnung des Peptidoglykans durch Spaltung des Amino-Zuckerpolymers aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure initiieren. Eine weitere Öffnung des Peptidoglykan-Netzwerkes könnte über die für den C-Terminus vorhergesagte CHAP-Domäne als N-Acetylmuramoyl-L-alanin Amidase erfolgen, indem die über Polypeptide vermittelte Quervernetzung zwischen den einzelnen Glykansträngen gespalten wird (s. Abb. 1.2). Nach einer partiellen Hydrolyse des Peptidoglykan-Netzwerkes könnte anschließend die Assemblierung des T4SLS-Komplexes über bereits nachgewiesene Interaktionen von Orf7 mit Orf2, Orf5, Orf10 und Orf14 sowie über Interaktionen von Orf2, Orf5, Orf10 und Orf14 mit weiteren Tra Proteinen stattfinden (Abajy *et al.*, 2007). Orf7 selbst wird vermutlich über den secA-YEG-Transportweg durch die Membran in die Zellwand transportiert.

In T4SS G- Bakterien führt eine Deletion *virB1*-orthologer Gene nur zu reduzierten Transferraten, VirB1-orthologe Proteine sind somit nicht essentiell für den konjugativen Transfer. So konnte für das Ti-Plasmid aus *A. tumefaciens* für eine *virB1* deletierte Mutante eine reduzierte Tumorbildung festgestellt werden (Mushegian *et al.*, 1996). Das F-ähnliche R1 Plasmid zeigte eine 5–10 fach reduzierte Transferrate, wenn die lytische Transglykosylase P19 deletiert worden war (Bayer *et al.*, 1995; Bayer *et al.*, 2001). In keinem untersuchten System in G- Bakterien war durch eine Deletion von *virB1* ein konjugativer Transfer komplett unterdrückt. Vermutlich übernehmen hier chromosomal kodierte lytische Transglykosylasen eine partielle Hydrolyse der einschichtigen Peptidoglykanschicht, so dass ein konjugativer Transfer trotz deletiertem VirB1 weiterhin stattfinden kann.

In G+ Bakterien ist die Peptidoglykanschicht vielschichtig und weist eine komplexere Quervernetzung über Peptidbrücken als bei G- Bakterien auf (Schleifer und Kandler, 1972). Zudem sind bis jetzt in G+ Bakterien nur wenige lytische Transglykosylasen im Chromosom bekannt, so dass eine Komplementation durch chromosomal kodierte lytische

Transglykosylasen weniger wahrscheinlich ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten an, dass eine Deletion der lytischen Transglykosylase Orf7 zu einer drastischen Reduktion des konjugativen Transfers führt. In den durchgeführten Kreuzungen war kein konjugativer Transfer von pIP501Δ7 nachweisbar, während in den parallel durchgeführten Kreuzungen mit dem isogenen Wildtyp pIP501 typische Transferraten erhalten wurden ($7,6 \cdot 10^{-5} \pm 5,7 \cdot 10^{-5}$). Stentz *et al.* (2009) konnten für das VirB1-orthologe CsiA eines konjugativen Elements im Chromosom von *L. lactis* MG1363 zeigen, dass durch eine Deletion von CsiA ein Transfer des chromosomal kodierten T4SS nicht mehr nachweisbar war, CsiA somit essentiell für den Transfer ist. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit deuten an, dass die lytische Transglykosylase Orf7 essentiell für den konjugativen Transport in G⁺ Bakterien ist. Insgesamt scheint der VirB1-orthologen lytischen Transglykosylase in G⁺ Bakterien eine essentielle Funktion für den konjugativen Transfer zuzukommen. Vermutlich stellt die vielschichtige Glykanschicht in VirB1-orthologen Deletionsmutanten eine unpassierbare Barriere für den DNA Transfer dar, zumal wahrscheinlich keine lytische Transglykosylase im Chromosom die VirB1-Deletion komplementieren kann. Zudem wurde in G⁺ Bakterien festgestellt, dass VirB1-orthologe Proteine *in vitro* Interaktionen mit den korrespondierenden *coupling* Proteinen zeigen (zusammengefasst in Alvarez-Martinez und Christie, 2009). Diese Interaktion ist in G⁻ Bakterien unbekannt und könnte ein weiteres Indiz für eine essentielle Funktion VirB1-orthologer Proteine in konjugativen Plasmiden G⁺ Bakterien sein, indem sie das Peptidoglykan teilweise hydrolysieren und gleichzeitig das *coupling* Protein in die dann teilweise hydrolysierte Zellwand dirigieren.

Durch eine Deletion von *orf7* findet somit wahrscheinlich keine Hydrolyse des Peptidoglykans statt und eine Assemblierung des T4SLS Komplexes ist durch den fehlenden Interaktionspartner Orf7 vermutlich unvollständig.

Neben der Spaltung von Peptidoglykan könnte Orf7 eine weitere Rolle im konjugativen Transfer von pIP501 haben. VirB1 aus *A. tumefaciens* unterliegt vermutlich im Periplasma einer proteolytischen Spaltung, bei der der C-Terminus abgespalten und sekretiert wird (VirB1^{*}). Über die Funktion des sekretierten VirB1^{*} ist kaum etwas bekannt, es könnte aber an der Ausbildung von Pili beteiligt sein (Baron *et al.*, 1997; Llosa *et al.*, 2000; Zupan *et al.*, 2007). Der C-Terminus von Orf7 zeigt Ähnlichkeiten mit der COG3942 Oberflächenantigenfamilie, zu der ebenfalls mehrere (putativ) sekretierte Proteine aus *Streptococcus* und *Staphylococcus* gehören. Der prozessierte C-Terminus von Orf7 könnte somit an der Adhäsion an mögliche Rezipienten beteiligt sein. Ein prozessiertes Orf7^{*} konnte in dieser Arbeit mit polyklonalen Antikörpern gegen Orf7 allerdings in ersten Versuchen

nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise eignen sich die polyklonalen Antikörper nicht für den Nachweis eines prozessierten Orf7* auf Grund einer geänderten Konformation des Orf7*.

Für einen abschließenden Nachweis einer essentiellen Funktion von Orf7 für den konjugativen Transfer muss eine Komplementierung des *orf7 knock outs* durchgeführt werden, bei dem Orf7 in *trans* exprimiert wird. Kann der Transfer von pIP501Δ7 wiederhergestellt werden, ist eine essentielle Funktion von Orf7 bewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Transformation von *E. faecalis* (pIP501Δ7) mit dem Komplementationsvektor pVA-*orf7* nicht erfolgreich umgesetzt werden. Hier wird zurzeit in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Elisabeth Grohmann am Uniklinikum Freiburg an der Konstruktion eines neuen Komplementationsvektors gearbeitet. Nachfolgend könnte über Punktmutationen die SLT Domäne von Orf7 in dem Komplementationsvektor inaktiviert werden. Findet ein Transfer dann immer noch statt, hat Orf7 vermutlich eine essentielle Funktion bei der Assemblierung des T4SLS Komplexes.

5.2.4 Modifiziertes T4SLS Modell des konjugativen Transfers von pIP501 in G+ Bakterien

Basierend auf den Ergebnissen der *in vivo* Lokalisierung der Tra Proteine mittels Immundetektion in *E. faecalis* (pIP501) Fraktionen sowie mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie, den DNA-Binde-Assays über Gelshiftexperimente und neuen *in silico* Analysen wurde das von Abajy *et al.* (2007) postulierte Modell des konjugativen Transfers von pIP501 in G+ Bakterien modifiziert (Abb. 5.9). Der konjugative Transfer von pIP501 in G+ Bakterien könnte demnach folgendermaßen stattfinden:

1. Die lytische Transglykosylase Orf7 wird vermutlich durch das N-terminale Signalpeptid über den secA-YEG-Transportweg in den extrazellulären Bereich sekretiert. Der N-Terminus könnte dabei mit der Membran verankert und über eine Protease von der SLT- und CHAP-Domäne abgespalten werden. Das Protein nimmt dort dann vermutlich seine eigentliche Konformation ein, möglicherweise Chaperon-unterstützt, und bindet als Dimer an das Peptidoglykan in der Zellwand. Im Peptidoglykan werden vermutlich die β-1,4-glykosidischen Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin ebenso wie die Amidbindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure und L-Ala der quervernetzten Glykanstränge durch Orf7 hydrolysiert. Hierdurch könnte sich das Peptidoglykan in der Zellwand porenartig weiten und nachfolgend die Assemblierung des T4SLS Komplexes ermöglichen.

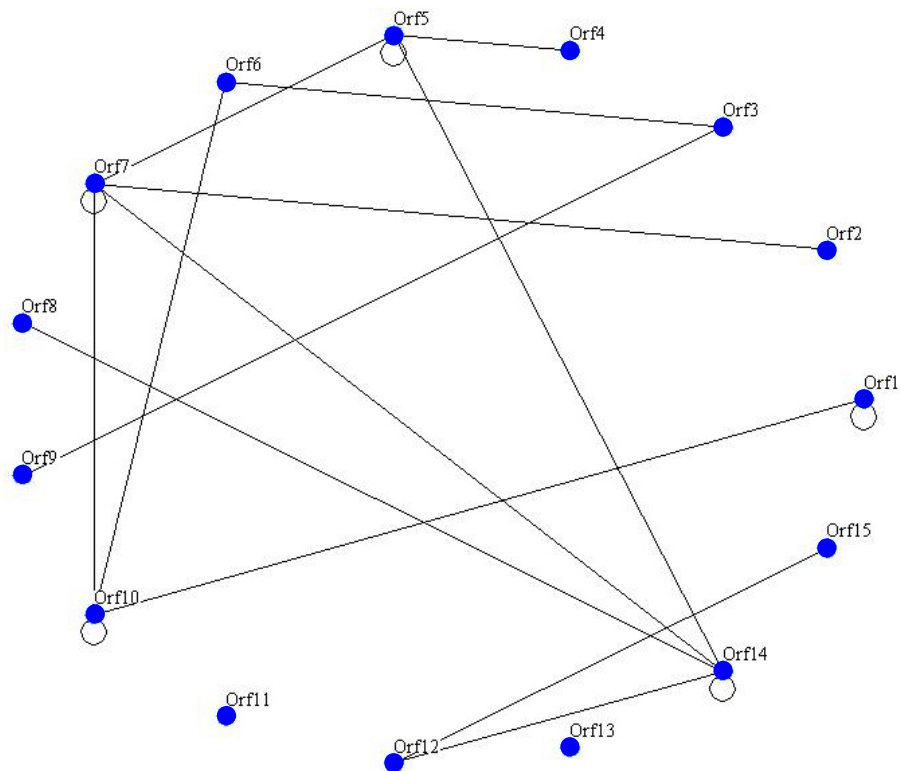


Abb. 5.10: Interaktionen der pIP501 Tra Proteine.

Schematische Darstellung der über *yeast two-hybrid*, *in vitro* pull down Assays und *cross linking* nachgewiesenen Interaktionen, nach Abajy, 2007. Blaue Kreise repräsentieren das jeweilige Tra Protein, Verbindungslinien zwischen zwei Punkten stehen für Interaktionen, Kreise deuten Interaktionen des Proteins mit sich selbst an.

Zytoplasma vorliegende DNA zum Transferkomplex rekrutiert werden kann. Somit könnten auch mobilisierbare Plasmide, die eine von der pIP501 Relaxase Orf1 nicht erkannte *oriT* Region besitzen, ebenfalls zum T4SLS Komplex dirigiert werden. Nach Einzelstrangbruch der DNA durch die zum mobilisierbaren Plasmid gehörende Relaxase könnte die einzelsträngig DNA dann an das *coupling* Protein Orf10 übergeben werden.

4. Der T4SLS Kernkomplex könnte aus dem über ein Signalpeptid transportierten Protein Orf2 und die über Interaktionen rekrutierten Proteine Orf3, Orf6 und Orf12 aufgebaut werden. Alvarez-Martinez und Christie (2009) geben für Orf12 eine VirB6-ähnliche Funktion an, für Orf3 wird eine VirB3-ähnliche Funktion vermutet (Wallden *et al.*, 2010).

5. Das VirB4-orthologe Orf5 zeigte eine ATP-Bindung und -hydrolyse *in vitro* und liegt vermutlich als Oligomer *in vivo* vor. Orf5 könnte somit die Energie für die Assemblierung des T4SLS Komplexes zur Verfügung stellen und aktiv am DNA Transport beteiligt sein. Eine DNA-Bindung von Orf5 konnte *in vitro* über Gelshiftexperimente bestätigt werden (Çelic, Keller und Grohmann).

6. Die als Dimer vorliegende Relaxase Orf1 bindet an den *oriT*_{PIP501} und spaltet spezifisch einen Strang der DNA an der *nick*-Stelle (Kopec, 2006). Die genickte einzelsträngige DNA könnte am 5'-Ende durch ein Orf1-Monomer gebunden werden. Das Relaxosom könnte dann über Interaktionen mit dem *coupling* Protein Orf10 zum T4SLS Komplex geleitet werden, wobei die einzelsträngige DNA ebenfalls vom *coupling* Protein Orf10 gebunden werden könnte.

7. Das *coupling* Protein Orf10 zeigte ebenfalls eine ATP-Bindung und –hydrolyse *in vitro* und liegt *in vivo* vermutlich als Hexamer vor (Çelic *et al.*, in preparation). Das *coupling* Protein könnte die genickte Einzelstrang-DNA zusammen mit der Relaxase binden und dann aktiv in den T4SLS Kernkomplex transportieren (Atmakuri *et al.*, 2004; Llosa *et al.*, 2002).

8. Das Protein Orf15 könnte als Precursor durch ein Signalpeptid über den secA-YEG-Transportweg in den extrazellulären Raum sekretiert werden. Das Signalpeptid wird im Anschluss vermutlich abgespalten. Am C-Terminus von Orf15 liegt der Zellwandanker LPxTG (Aminosäuren 252 – 256, Acc. Nr. CAD44395), gefolgt von einem hydrophoben Bereich sowie positiv-geladenen Aminosäuren. Über die Sortase SrtA, die ebenfalls über den SecA-YEG Transportweg sekretiert wird und mit Orf15 dadurch vermutlich kolokalisiert, könnte der C-Terminus von Orf15 zwischen Thr und Gly im LPxTG-Motiv gespalten und das Thr kovalent mit einer Peptidbrücke im Peptidoglykan verbunden werden (Transpeptidase, Clancy *et al.*, 2010; Hendrickx *et al.*, 2009). Das so kovalent an die Zellwand gebundene Orf15-Protein besitzt eine Domäne, die aus einer repetitiven, Pro-reichen (Asp-Pro-Val)₇-(Glu-Pro-Thr)₃₇-Region besteht. Repetitive Prolin-reiche Regionen kommen häufig in Oberflächenproteinen G⁺ Bakterien wie *S. pyogenes* und *S. aureus* vor (zusammengefasst in Alvarez-Martinez und Christie, 2009). Areschoug *et al.* (2002) konnten zeigen, dass im β Protein aus *Streptococcus* eine repetitive X-Pro-Z-Region (X – ungeladene Aminosäure, Z – geladene Aminosäure) in einer helikalen Poly-Prolin II (PPII) Struktur vorliegt, bei der pro Turn drei Aminosäuren benötigt werden. Die Helix besteht demnach aus einer hydrophoben Seite, zusammengesetzt aus X und Pro, und einer positiv / negativ geladenen Seite, die aus Z gebildet wird. Gleiches könnte für Orf15 gelten, bei dem X jeweils eine negativ geladene Aminosäure (Asp, Glu) und Z eine hydrophobe bzw. polare Aminosäure (Val, Thr) ist (Abb. 5.11).

Dieser amphipatische Aufbau könnte eine Interaktion mit unterschiedlichen Interaktionspartnern erlauben. So konnte für PPII Strukturen DNA-Bindung gezeigt werden (Hicks und Hsu, 2004). Zudem stellt es ein weit verbreitetes Protein-Protein Interaktionsmotiv dar (Kay *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2002).

Orf15 könnte somit ein Oberflächenprotein sein, das über die amphipatische PPII Helix mit weiteren Oberflächenproteinen interagiert und als putatives Adhäsion einen Kontakt zu potentiellen Rezipienten herstellt. Darüber hinaus könnte über Orf15 der Transfer der DNA in den Rezipienten erfolgen.

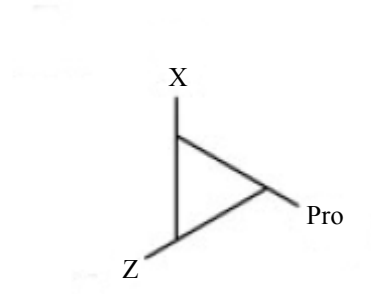


Abb. 5.11: Draufsicht auf eine schematisch dargestellte PPII Helix, modifiziert nach Hicks und Hsu, 2004. In der Pro-reichen repetitiven Region in Orf15 könnte eine PPII Helix ausgebildet werden, bei der pro Helixwindung drei Aminosäuren benötigt werden. Daraus ergibt sich eine negativ-geladene Seite X der Helix (X – Asp, Glu) und eine hydrophobe bzw. polare Seite Z (Z – Val, Thr).

9. Das Tra Protein Orf9 hat wahrscheinlich keinen direkten Beitrag zum T4SLS Komplex. Es ist vermutlich aus einem zusammenhängenden Leserahmen *orf9-orf10* durch Mutation hervorgegangen und stellt somit den N-terminalen TMH-Bereich des *coupling* Proteins dar. Für das Tra Protein Orf4 wird eine zytoplasmatische Funktion vorhergesagt, es interagiert mit Orf5. Möglicherweise hat es eine Chaperon-ähnliche Wirkung. Die Funktion der Proteine Orf11 und Orf13 im T4SLS bleibt unbekannt.

6. AUSBLICK

6.1 Detektion von horizontalem Gentransfer *in situ*

Für eine Detektion und Quantifizierung von horizontalem Gentransfer mittels FACS *in situ* ist eine Optimierung zur Markierung des Donors bzw. Rezipienten notwendig. Das in dieser Studie verwendete DsRed-Express unter Kontrolle des induzierbaren *nisA* Promotors mit dem Plasmid pMSP3535VA konnte auf Grund einer geringen Fluoreszenzintensität nicht zur Markierung des Donors verwendet werden. Der Einsatz optimierter, rot-fluoreszierender Proteine, wie tdTomato oder mKate2, könnte zu einer verbesserten Fluoreszenzintensität führen. Hierbei könnte das Gen für das fluoreszierende Protein unter Kontrolle von P_{nisA} mit dem kürzlich entwickelten *mariner* Transposon-Mutagenesesystem (Kristich *et al.*, 2008) in das Chromosom des Donors (oder auch des Rezipienten) integriert werden. Eine rote Fluoreszenz kann in diesem Fall nur dann ausgebildet werden, wenn das mobilisierbare, GFP-markierte Plasmid, das für die regulatorischen Elemente NisR und NisK kodiert, in der gleichen Zelle vorhanden ist. Dieser Ansatz hätte den Vorteil, dass er sensitiv für eine Instabilität oder einen Verlust des mobilisierbaren Plasmids ist, wenn der Donor mit dem unter Kontrolle des P_{nisA} stehenden rot fluoreszierenden Proteins markiert ist. Alternativ könnte das rot-fluoreszierende Protein auch unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors, wie z.B. *bacA* (Fujimoto und Ike, 2001), in das Chromosom des Donors integriert werden. Das Screening nach einer solchen Integration könnte im *high throughput* Verfahren über FACS und *cell sorting* erfolgen, so dass Mutanten mit hoher Fluoreszenz und unveränderter Wachstumsrate effizient selektiert werden könnten. Generell ist die Markierung des Donors auch über ein Plasmid möglich, wie in dieser Studie durchgeführt. Es besteht hierbei aber die Möglichkeit, dass dieses Markerplasmid sekretiert wird, so dass eine durch das mobilisierbare Plasmid hervorgerufene grüne Fluoreszenz im Donor als falsch-positive Transkonjugante interpretiert werden könnte.

Ebenfalls denkbar wäre die Integration von *nisR* und *nisK* in das Chromosom des Rezipienten. Wird ein Plasmid, bei dem das *gfp* unter Kontrolle des *nisA* Promotors steht und bei dem *nisR* und *nisK* deletiert sind, in den Rezipienten mobilisiert, sollte eine grüne Fluoreszenz nach Induktion mit Nisin nur in Transkonjuganten detektierbar sein. Zur Konstruktion eines solchen mobilisierbaren, GFP-markierten Plasmids könnten die in dieser Studie entwickelten *gfp-oriT*- und *orf1-gfp-oriT*-Kassetten z.B. in das *shuttle*-Plasmid pAM401 (Wirth *et al.*, 1986) kloniert werden. Das Plasmid pAM401 kodiert nicht für NisR und NisK. Wird dieses Plasmid mit der P_{nisA} -*gfp-oriT*-Kassette in einen Rezipienten mobilisiert, der für NisR und NisK kodiert, sollte eine grüne Fluoreszenz nach Induktion mit

Nisin nur in Transkonjuganten detektierbar sein. Als Rezipient könnte z.B. *L. lactis* NZ3900 (de Ruyter *et al.*, 1996) verwendet werden, bei dem NisR und NisK auf dem Chromosom kodiert sind und der selber kein Nisin produziert. Dieser Ansatz umgeht eine Markierung des Donors bzw. Rezipienten mit einem zweiten fluoreszierenden Protein.

Die Entwicklung eines GFP-markierten, konjugativen Plasmids wurde in dieser Studie über eine *de novo* Synthese versucht. Ein konjugativer Transfer dieses Plasmides konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine alternative Möglichkeit zur Herstellung eines konjugativen auf pIP501 basierenden und GFP-markierten Plasmids könnte über homologe Rekombination erfolgen. Hier könnte z.B. ein Antibiotikaresistenzgen wie *ermB* von pIP501 über homologe Rekombination durch das *gfp*-Gen ersetzt werden. Hierzu müssen die *up*- und *downstream* Regionen des *ermB* Resistenzgens in einen Suicidevektor, z.B. das in dieser Studie verwendete pCJK47, kloniert werden. Zwischen beide Regionen wird das *gfp* Gen kloniert. Über homologe Rekombination könnte dann ein Austausch des *ermB* Gens mit dem *gfp* erfolgen. Regulatorische Elemente wie der *ermB* Promotor und die *ermB* RBS könnten bei diesem Ansatz für die Expression des GFP genutzt werden. Alternativ könnte das *gfp*-Gen unter Kontrolle eines eigenen Promotors in einen nicht-kodierenden Bereich von pIP501 über homologe Rekombination eingebaut werden. Zusammen mit einem Donor, der im Chromosom mit einem RFP-Derivat markiert ist, könnte eine Verfolgung des konjugativen Transfers von pIP501 z.B. in Biofilmen *in situ* erfolgen. Das monitoring tool könnte zur Erstellung einer Transfer-Kinetik in Biofilmen angewendet werden. Hierfür könnte ein Biofilm in einem *upflow* Biofilmreaktor (Dissertation K. Schiwon) mit verschiedenen Bakterien (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*) angezogen werden. Das GFP-markierte pIP501 in *E. faecalis* wird anschließend dem Reaktor zugeführt. Zu festgelegten Zeitpunkten erfolgt die Probennahme, die dann anhand der Fluoreszenz mit FACS auf Gentransfer hin untersucht werden kann.

6.2 Immunologische Lokalisierung von Tra Proteinen *in vivo* mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Lokalisierung der Tra Proteine *in vivo* wurde über Fraktionierung von *E. faecalis* in Zellwand, Zellmembran und Zytoplasma mit einem immunologischen Nachweis der Tra Proteine durch polyklonale Antikörper in den Fraktionen durchgeführt. Eine erste Abschätzung zur Anzahl und Lokalisierung des T4SLS Komplexes konnte über STED-Immunfluoreszenz-Mikroskopie erhalten werden. In nachfolgenden Arbeiten werden weitere Tra Proteine über polyklonale Antikörper und Immunfluoreszenz lokalisiert werden. Hierbei

ist vor allem auch die simultane Kolokalisierung von 2 und mehr Tra Proteinen *in vivo* von besonderem Interesse. Hierfür werden polyklonale Antikörper aus verschiedenen Organismen eingesetzt (z.B. Kaninchen, Meerschweinchen, Huhn, Ziege), so dass über den Einsatz verschiedener sekundärer Antikörper, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind, Tra Proteine kolokalisiert werden können. Das weitergehende Ziel ist eine Lokalisierung von Tra Proteinen in ultradünnen kryo-Schnitten von *E. faecalis* (pIP501) über Immun-TEM. Hier sind bereits im Rahmen dieser Arbeit erste Untersuchungen an der Universität Tromsø, Norwegen, zusammen mit Frau Dr. Anne-Merethe Hanssen durchgeführt worden (Abb. 6.1). Eine eindeutige Identifizierung der Transferproteine in ultra-dünnen kryo-Schnitten von *E. faecalis* OG1X (pIP501) sowie *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) konnte jedoch nicht erfolgen. Die für diese Versuche eingesetzten polyklonalen Anti-Orf10 und Anti-Orf13 Antikörper zeigten auch in der als Kontrolle mitgeführten Probe ohne pIP501 Bindungen.

Im Hinblick auf mögliche Oberflächenproteine, wie z.B. Orf15, könnten immunologische Untersuchungen mit SEM (*scanning electron microscope*) in Anlehnung an Olmsted *et al.* (1993) sinnvoll sein. Eine *E. faecalis* (pIP501) Kultur könnte mit polyklonalen Anti-Orf15 Antikörpern (aus Kaninchen) gefolgt von einem sekundären, Gold-konjugierten Anti-Rabbit Antikörper inkubiert werden. Liegt Orf15 als Oberflächenprotein vor, sollten im SEM Goldpartikel an der Oberfläche von *E. faecalis* (pIP501) im SEM erkennbar sein.

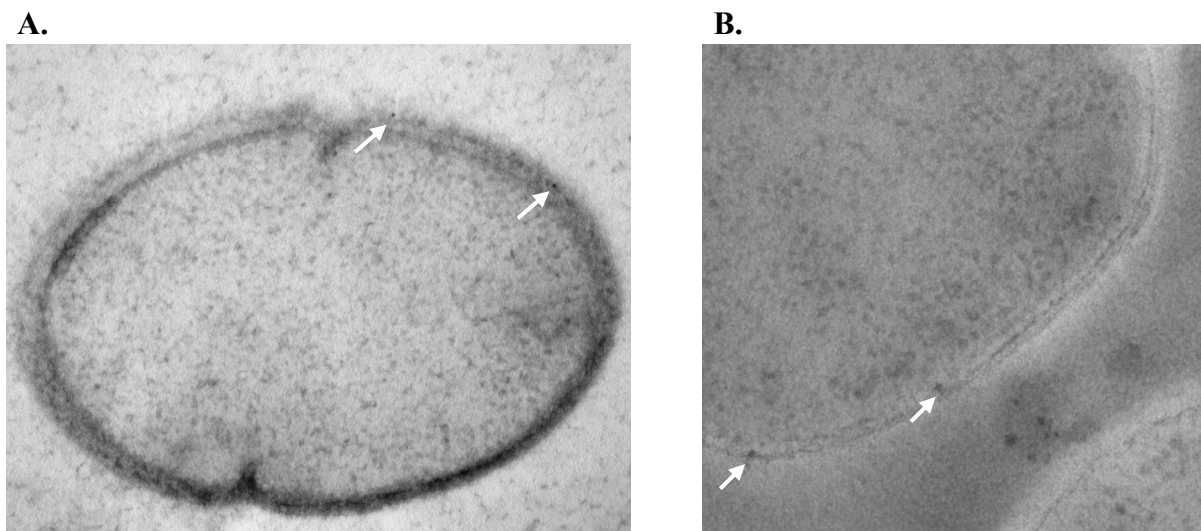


Abb. 6.1: Mikrograph der immunologischen Lokalisierung von Orf13 (A) und Orf10 (B) mittels immun-TEM.

Gezeigt sind kryo-Ultradünnschnitte von *E. faecalis* JH2-2 (pIP501) (A) sowie *E. faecalis* OG1X (pIP501) (B) nach „high pressure freezing“ und Labeling mittels anti-Orf13 bzw. anti-Orf10 Antiserum und ProteinA-Gold-Konjugaten.

6.3 *knock outs* verschiedener Tra Gene in pIP501

Die in dieser Arbeit begonnenen Untersuchungen mit pIP501 *tra knock out* Mutanten werden fortgesetzt werden. Durch den gezielten *knock out* verschiedener *tra* Gene in pIP501, wie *orf5*, *orf10* und *orf15* können Rückschlüsse auf mögliche Funktionen dieser Proteine gezogen werden. Interessant sind in diesem Zusammenhang ebenfalls *knock out* Mutanten von *orf11* und *orf13*, für die bisher keine Interaktionen mit anderen pIP501 Tra Proteinen identifiziert werden konnten. Sollte ein konjugativer Transfer mit einer pIP501 Δ 11 oder pIP501 Δ 13 nicht mehr möglich sein, spricht dies für eine essentielle Funktion beider Proteine. Zur Erzeugung dieser Mutanten kann das in dieser Studie modifizierte System von Kristich *et al.* (2007) verwendet werden. Parallel könnte ebenfalls das Plasmid pCASPER mit einem Temperatursensitiven Replikon benutzt werden (Callegan *et al.*, 1999), um *knock out* Mutanten über homologe Rekombination zu erzeugen. Hier sind im Rahmen dieser Arbeit bereits die Klonierungen für einen *orf10* und *orf15 knock out* durchgeführt worden.

Die *knock out* Mutanten könnten für *in vivo* Lokalisierungen von Tra Proteinen mittels Immunfluoreszenz- und Immunelektronenmikroskopie herangezogen werden. Da die Assemblierung des T4SLS Komplexes vermutlich abhängig von Proteininteraktionen verschiedener Tra Proteine ist, könnte der Einfluß verschiedener Tra Proteine auf die Assemblierung des T4SLS Komplexes untersucht werden.

Über die Mutante pIP501 Δ 10 könnte die Hypothese, dass *orf9* und *orf10* ursprünglich einen zusammenhängenden Leserahmen gebildet haben, überprüft werden. Hierfür müssten *orf9* und *orf10* in Phase in einen Komplementierungsvektor kloniert werden. Ist die Transferrate dann im Vergleich zum Wildtyp erhöht, spricht dies für einen ursprünglich zusammenhängenden Leserahmen von *orf9* und *orf10*.

6.4 Bestimmung von DNA-bindenden Tra Proteinen und Ermittlung der DNA-Transferoute mittels TriP Assay

Eine DNA-Bindung verschiedener Tra Proteine *in vitro* über Gelshiftexperimente konnte bereits gezeigt werden (Orf1, Kopec *et al.*, 2005; Orf5, Celic und Grohmann, unveröffentlichte Daten; Orf10, Orf11, Orf14, diese Studie). Eine DNA Bindung von Orf15 scheint auf Grund der PPII Struktur wahrscheinlich. Ebenso kann für Tra Proteine des T4SLS Kernkomplexes eine DNA-Bindung angenommen werden. Diese Hypothese wird über Gelshiftexperimente mit Orf2, Orf3, Orf6, Orf12 und Orf15 überprüft werden. Hierbei wird zum einen eine zufällig gewählte DNA-Sequenz und zum anderen eine *oriT*-spezifische Sequenz als einzel- und doppelsträngige DNA eingesetzt werden. Über die

Gelshiftexperimente könnte eine direkte Beteiligung verschiedener Tra Protein am Transfer der DNA ermittelt werden.

Zur Verifizierung der DNA-Binde Assays und zur Bestimmung einer möglichen Transferoute der T-DNA *in vivo* wird der TrIP Assay (*transferred DNA immunoprecipitation*, Cascales und Christie, 2004) durchgeführt werden. Hierbei wird eine exponentiell wachsende Kultur aus *E. faecalis* (pIP501) mit Formaldehyd fixiert, wodurch der DNA-T4SLS Komplex quervernetzt wird. Der Komplex wird solubilisiert und die verschiedenen pIP501 Tra Proteine werden mit spezifischen Antikörpern präzipitiert. Koimmunpräzipitierte DNA kann über PCR nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgt über ein Primerpaar spezifisch für die transferierte DNA sowie über ein weiteres Primerpaar spezifisch für das *E. faecalis* Chromosom als Kontrolle. Der TrIP Assay erlaubt somit die Detektion von DNA-Protein Interaktionen *in vivo*. Chen *et al.* (2008) konnten für pCF10 den TrIP Assay bereits erfolgreich in *E. faecalis* anwenden.

6.5 Strukturbestimmung von T4SLS Teilkomplexen mit kryo-Elektronenmikroskopie

Die Strukturaufklärung verschiedener Tra Proteine soll durchgeführt werden. Hierfür sind schon Kristallisationsversuche für verschiedene pIP501 Tra Proteine durchgeführt worden. Besonderes Interesse liegt hierbei auf T4SS-orthologen Proteinen wie Orf5, Orf7 und Orf10 sowie auf Proteinen, die den T4SLS Kernkomplex bilden, wie vermutlich Orf2, Orf3, Orf6, Orf8, Orf12 und Orf15.

Da die räumliche Struktur eines Proteins abhängig von Proteininteraktionspartnern sein kann, werden ausgewählte interagierende Proteine, wie z.B. Orf8, Orf12 und Orf15 zusammen mit Orf14 in Phase in einen Expressionsvektor kloniert und zusammen exprimiert. Über einen N-terminalen oder C-terminalen *tag*, z.B. ein Strep- oder His-Tag, kann der Komplex über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Eine Strukturaufklärung des Komplexes könnte über 3D kryo-Elektronenmikroskopie erfolgen. Der Vorteil im Vergleich zur Röntgenkristallographie liegt in dem geringeren Bedarf an Probenmaterial. Der Komplex wird in flüssigem Ethan in eine dünne vitrifizierte Eisschicht eingebettet und kann dann am kryo-Elektronenmikroskop untersucht werden. Durch Aufnahme von 10 000 – 100 000 Bildern kann dann computergestützt eine 3D-Struktur interpoliert werden (Frank, 2009; Chiu *et al.*, 2008).

Ähnliche Untersuchungen sind für T4SS G- Bakterien bereits erfolgreich durchgeführt worden (Fronzes *et al.*, 2009; Chandran *et al.*, 2009).

Die Ergebnisse dieser Studien werden das Verständnis des horizontalen Gentransfers in G⁺ Bakterien am Beispiel des multiresistenten Plasmids pIP501 mit breitem Wirtsspektrum vervollständigen. In weiterführenden Studien könnte dann nach Möglichkeiten geforscht werden, einen horizontalen Transfer des Plasmids pIP501 und enger Verwandter zu inhibieren. Erste Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass das VirB1-orthologe Orf7 ein geeignetes Target für eine Inhibierung der Konjugation darstellen könnte. Durch Inaktivierung der SLT-Domäne mit z.B. Bulgecin A-Derivaten oder durch eine Blockierung von Interaktionsstellen mit spezifischen Proteinen könnte eine horizontale Verbreitung von pIP501 unterdrückt werden.

7. LITERATUR

Abajy, M. Y. (2007). Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zum Typ IV Sekretion-ähnlichen System (T4SLS) des konjugativen Antibiotikaresistenzplasmids pIP501 in *Enterococcus faecalis*. Doktorarbeit, Technische Universität Berlin, Berlin, Deutschland.

Abajy, M. Y., Kopec, J., Schiwon, K., Burzynski, M., Döring, M., Bohn, C., 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 (6): 2487 – 2496.

Alvarez-Martinez, C. E., Christie, P. J. (2009). Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Bio Rev* 73 (4): 775 – 808.

Aminov, R. I., Mackie, R. I. (2007). Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 271 (2): 147 – 161.

Ansari, M. I., Grohmann, E., Malik, A. (2008). Conjugative plasmids in multi-resistant bacterial isolates from Indian soil. *J Appl Microbiol* 104 (6): 1774 – 1781.

Arbeloa, A., Hugonnet, J.-E., Sentilhes, A.-C., Josseaume, N., Dubost, L., Monsempes, C., Blanot, D., Brouard, J.-P., Arthur, M. (2004). Synthesis of mosaic peptidoglycan cross-bridges by hybrid peptidoglycan assembly pathways in gram-positive bacteria. *J Biol Chem* 279 (40): 41546 – 41556.

Arechaga, I., Peña, A., Zunzunegui, S., del Carmen Fernández-Alonso, M., Rivas, G., de la Cruz, F. (2008). ATPase activity and oligomeric state of TrwK, the VirB4 homologue of the plasmid R388 type IV secretion system. *J Bacteriol* 190 (15): 5472 – 5479.

Areschoug, T., Linse, S., Stålhammar-Carlemalm, M., Hedén, L.-O., Lindahl, G. (2002). A proline-rich region with a highly periodic sequence in Streptococcal beta protein adopts the polyproline II structure and is exposed on the bacterial surface. *J Bacteriol* 184 (22): 6376 – 6383.

Atmakuri, K., Cascales, E., Christie, P. J. (2004). Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol* 54 (5): 1199 – 1211.

Babic, A., Lindner, A. B., Vulic, M., Stewart, E. J., Radman, M. (2008). Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science* 319 (5869): 1533 – 1536.

Backert, S., Fronzes, R., Waksman, G. (2008). VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems? *Trends Microbiol* 16 (9): 409 – 413.

Bahl, M. I., Burmølle, M., Meisner, A., Hansen, L. H., Sørensen, S. J. (2009). All IncP-1 plasmid subgroups, including the novel epsilon subgroup, are prevalent in the influent of a Danish wastewater treatment plant. *Plasmid* 62 (2): 134 – 139.

Baron, C., Llosa, M., Zhou, S., Zambryski, P. C. (1997). VirB1, a component of the T-complex transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*, is processed to a C-terminal secreted product, VirB1. *J Bacteriol* 179 (4): 1203 – 1210.

- Bayer, M., Eferl, R., Zellnig, G., Teferle, K., Dijkstra, A., Koraimann, G., Högenauer, G. (1995). Gene 19 of plasmid R1 is required for both efficient conjugative DNA transfer and bacteriophage R17 infection. *J Bacteriol* 177 (15): 4279 – 4288.
- Bayer, M., Iberer, R., Bischof, K., Rassi, E., Stabentheiner, E., Zellnig, G., Koraimann, G. (2001). Functional and mutational analysis of p19, a DNA transfer protein with muramidase activity. *J Bacteriol* 183 (10): 3176 – 3183.
- Beganovic, J., Guillot, A., van de Guchte, M., Jouan, A., Gitton, C., Loux, V., Roy, K., Huet, S., Monod, H., Monnet, V. (2010). Characterization of the insoluble proteome of *Lactococcus lactis* by SDS-PAGE LC-MS/MS leads to the identification of new markers of adaptation of the bacteria to the mouse digestive tract. *J Proteome Res* 9 (2): 677 – 688.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340 (4): 783 – 795.
- 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 (12): 3646 – 3660.
- Beveridge, T. J., Graham, L. L. (1991). Surface layers of bacteria. *Microbiol Rev* 55 (4): 684 - 705.
- Bevis, B. J., Glick, B. S. (2002). Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* 20 (1): 83 – 87.
- Boer, R., Russi, S., Guasch, A., Lucas, M., Blanco, A. G., Pérez-Luque, R., Coll, M., de la Cruz, F. (2006). Unveiling the molecular mechanism of a conjugative relaxase: The structure of TrwC complexed with a 27-mer DNA comprising the recognition hairpin and the cleavage site. *J Mol Biol* 358 (3): 857 – 869.
- Borgo, F., Ricci, G., Arends, K., Schiwon, K., Grohmann, E., Fortina, M. G. (2009). Evaluation of plasmid content and tetracycline resistance conjugative transfer in *Enterococcus italicus* strains of dairy origin. *Curr Microbiol* 59 (3): 261 – 266.
- Brinster, S., Furlan, S., Serror, P. (2007). C-terminal WxL domain mediates cell wall binding in *Enterococcus faecalis* and other gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 189 (4): 1244 – 1253.
- Bruand, C., Chatelier, E. L., Ehrlich, S. D., Jannière, L. (1993). A fourth class of theta-replicating plasmids: the pAMBeta1 family from gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (24): 11668 – 11672.
- Bryan, E.M., Bae, T., Kleerebezem, M., Dunny, G.M. (2000). Improved vectors for nisin-controlled expression in Gram-positive bacteria. *Plasmid* 44: 183 – 190.
- Buttaro, B.A., Antiporta, M.H., Dunny, G.M. (2000). Cell-associated pheromone peptide (cCF10) production and pheromone inhibitor in *E. faecalis*. *J Bacteriol* 182: 4926 – 4933.
- Callegan, M. C., Jett, B. D., Hancock, L. E., Gilmore, M. S. (1999). Role of hemolysin BL in the pathogenesis of extraintestinal *Bacillus cereus* infection assessed in an endophthalmitis model. *Infect Immun* 67 (7): 3357 – 3366.

- Campo, N., Tjalsma, H., Buist, G., Stepniak, D., Meijer, M., Veenhuis, M., Westermann, M., Müller, J. P., Bron, S., Kok, J., Kuipers, O. P., Jongbloed, J. D. H. (2004). Subcellular sites for bacterial protein export. *Mol Microbiol* 53 (6): 1583 – 1599.
- Cascales, E., Christie, P. J. (2004). *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(49): 17228 – 17233.
- Cascales, E., Christie, P. J. (2004). Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* 304 (5674): 1170 – 1173.
- Chandran, V., Fronzes, R., Duquerroy, S., Cronin, N., Navaza, J., Waksman, G. (2009). Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system', *Nature* 462 (7276): 1011 – 1015.
- Chattoraj, D. K. (2000). Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol Microbiol* 37(3): 467 – 476.
- Chen, Y., Zhang, X., Manias, D., Yeo, H.-J., Dunny, G. M., Christie, P. J. (2008). *Enterococcus faecalis* PcfC, a spatially localized substrate receptor for type IV secretion of the pCF10 transfer intermediate. *J Bacteriol* 190 (10). 3632 – 3645.
- Chiu, W., Chang, J. T., Rixon, F. J. (2008). Cryo-electron microscopy. In: *Desk Encyclopedia of General Virology*. Ed. B. W. J. Mahy and M. H. V. van Regenmortel. Oxford, Elsevier Academic Press 145 – 155.
- Choe, J., Guo, H. H., van den Engh, G. (2005). A dual-fluorescence reporter system for high-throughput clone characterization and selection by cell sorting. *Nucleic Acids Res* 33 (5): e49.
- Clancy, K. W., Melvin, J. A., McCafferty, D. G. (2010). Sortase transpeptidases: insights into mechanism, substrate specificity, and inhibition. *Biopolymers* 94 (4): 385 – 396.
- Cooper, T. F., Heinemann, J. A. (2000). Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (23): 12643 – 12648.
- Courvalin, P. (1994). Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 38 (7): 1447 – 1451.
- Coyette, J., Hancock, L. E. (2002). Enterococcal cell wall. In: *The Enterococci Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, M.S. Glimore (ed.). ASM Press, Washington, D.C., USA: 177 – 218.
- Cui, L., Ma, X., Sato, K., Okuma, K., Tenover, F. C., Mamizuka, E. M., Gemmell, C. G., Kim, M.-N., Ploy, M.-C., El-Solh, N., Ferraz, V., Hiramatsu, K. (2003). Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 41 (1): 5 – 14.
- Dang, T. A., Christie, P. J. (1997). The VirB4 ATPase of *Agrobacterium tumefaciens* is a cytoplasmic membrane protein exposed at the periplasmic surface. *J Bacteriol* 179 (2): 453 – 462.

- De Boever, P., Mergeay, M., Ilyin, V., Forget-Hanus, D., Van der Auwera, G., Mahillon, J. (2007). Conjugation-mediated plasmid exchange between bacteria grown under space flight conditions', *Microgravity Science and Technology* 19 (5): Springer Netherlands, 138 – 144.
- D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., Wright, G. D. (2006). Sampling the Antibiotic Resistome. *Science* 311(5759): 374 – 377.
- de Paz, H. D., Larrea, D., Zunzunegui, S., Dehio, C., de la Cruz, F., Llosa, M. (2010). Functional dissection of the conjugative coupling protein TrwB. *J Bacteriol* 192 (11): 2655 – 2669.
- de Ruyter, P. G., Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., van Alen-Boerrigter, I., de Vos, W. M. (1996). Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 178 (12): 3434 – 3439.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 62 (2): 434 – 464.
- Diep, B. A., Chambers, H. F., Graber, C. J., Szumowski, J. D., Miller, L. G., Han, L. L., Chen, J. H., Lin, F., Lin, J., Phan, T. H., Carleton, H. A., McDougal, L. K., Tenover, F. C., Cohen, D. E., Mayer, K. H., Sensabaugh, G. F., Perdreau-Remington, F. (2008). Emergence of multidrug-resistant, community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in men who have sex with men. *Ann Intern Med* 148 (4): 249 – 257.
- Diep, B. A., Gill, S. R., Chang, R. F., Phan, T. H., Chen, J. H., Davidson, M. G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H. A., Mongodin, E. F., Sensabaugh, G. F., Perdreau-Remington, F. (2006). Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 367 (9512). 731 – 739.
- Disqué-Kocher, C., Battermann, A., Strätz, M., Dreiseikermann, B. (2001). Screening for trbB- and traG-like sequences by PCR for the detection of conjugative plasmids in bacterial soil isolates. *Microbiol Res* 156 (2): 159 – 168.
- Draper, O., César, C. E., Machón, C., de la Cruz, F., Llosa, M. (2005). Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (45): 16385 – 16390.
- Draper, O., Middleton, R., Doucleff, M., Zambryski, P. C. (2006). Topology of the VirB4 C terminus in the *Agrobacterium tumefaciens* VirB/D4 type IV secretion system. *J Biol Chem* 281 (49): 37628 – 37635.
- Dunny, G.M., Brown, B.M., Clewell, D.B. (1978). Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 3479 – 3483.
- Eichenbaum, Z., Federle, M. J., Marra, D., de Vos, W. M., Kuipers, O. P., Kleerebezem, M., Scott, J. R. (1998). Use of the lactococcal nisA promoter to regulate gene expression in gram-positive bacteria: comparison of induction level and promoter strength. *Appl Environ Microbiol* 64 (8): 2763 – 2769.

- Evans, R.P., Macrina, F.L. (1983). Streptococcal R-plasmid pIP501: endonuclease site map, resistance determinant location and construction of novel derivatives. *J Bacteriol* 154: 1347 – 1355.
- Firth, N., Ridgway, K.P., Byrne, M.E., Fink, P.D., Johnson, L., Paulsen, I.T., Skurray, R.A. (1993). Analysis of a transfer region from the staphylococcal conjugative plasmid pSK41. *Gene* 136: 13 – 25.
- Fortina, M. G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P. L., Arends, K., Schiwon, K., Abajy, M. Y., Grohmann, E. (2008). A survey on biotechnological potential and safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. italicus*. *Int J Food Microbiol* 123 (3): 204 – 211.
- Francia, M.V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M.P., Latorre, A., Drainas, C., de la Cruz, F. (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* 28: 79 – 100.
- Frank, J. (2009). Single-particle reconstruction of biological macromolecules in electron microscopy—30 years. *Q Rev Biophys* 42 (3): 139 – 158.
- Fronzes, R., Schäfer, E., Wang, L., Saibil, H. R., Orlova, E. V., Waksman, G. (2009). Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* 323 (5911): 266 – 268.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3 (9): 722 – 732.
- Fujimoto, S., Ike, Y. (2001). pAM401-based shuttle vectors that enable overexpression of promoterless genes and one-step purification of tag fusion proteins directly from *Enterococcus faecalis*. *Appl Environ Microbiol* 67 (3): 1262 – 1267.
- Garcia-Migura, L. Hasman, H., Jensen, L.B. (2009). Presence of pRI1: a small cryptic mobilizable plasmid isolated from *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *Curr Microbiol* 58: 95 – 100.
- Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., de la Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* 33 (3): 657 – 687.
- Gardy, J. L., Laird, M. R., Chen, F., Rey, S., Walsh, C. J., Ester, M., Brinkman, F. S. L. (2005). PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics* 21 (5): 617 – 623.
- Gatlin, C. L., Pieper, R., Huang, S.-T., Mongodin, E., Gebregeorgis, E., Parmar, P. P., Clark, D. J., Alami, H., Papazisi, L., Fleischmann, R. D., Gill, S. R., Peterson, S. N. (2006). Proteomic profiling of cell envelope-associated proteins from *Staphylococcus aureus*. *Proteomics* 6 (5): 1530 – 1549.
- Geibel, S., Banchenko, S., Engel, M., Lanka, E., Saenger, W. (2009). Structure and function of primase RepB' encoded by broad-host-range plasmid RSF1010 that replicates exclusively in leading-strand mode. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (19): 7810 – 7815.

- Geoffroy, M. C., Guyard, C., Quatannens, B., Pavan, S., Lange, M., Mercenier, A. (2000). Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Appl Environ Microbiol* 66 (1): 383 – 391.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J. (2003). In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 225 (1): 125 – 130.
- Gilmour, M. W., Lawley, T. D., Rooker, M. M., Newnham, P. J., Taylor, D. E. (2001). Cellular location and temperature-dependent assembly of IncHI1 plasmid R27-encoded TrhC-associated conjugative transfer protein complexes. *Mol Microbiol* 42 (3): 705 – 715.
- Gomis-Rüth, F. X., Moncalian, G., de la Cruz, F., Coll, M. (2002). Conjugative plasmid protein TrwB, an integral membrane type IV secretion system coupling protein. Detailed structural features and mapping of the active site cleft. *J Biol Chem* 277 (9): 7556 – 7566.
- Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *J Hyg* 27 (2): 113 – 159.
- Grohmann, E. (2006). Mating cell-cell channels in conjugating bacteria. In: *Cell-Cell Channels*. F. Baluska, D. Volkmann and P. W. Barlow (eds.): Georgetown, Texas, Landes Biosciences.
- Grohmann, E., Arends, K. Molecular detection of resistance and transfer genes in environmental samples. In: *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development*. Abdul Malik and Elisabeth Grohmann (eds.): Springer press, New York (accepted).
- Grohmann, E., Muth, G., Espinosa, M. (2003). Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Bio Rev* 67 (2): 277 – 301.
- Gunton, J. E., Gilmour, M. W., Alonso, G., Taylor, D. E. (2005). Subcellular localization and functional domains of the coupling protein, TraG, from IncHI1 plasmid R27. *Microbiology* 151 (11): 3549 – 3561.
- He, Z., Buck, J. D. (2010a). Cell wall proteome analysis of *Mycobacterium smegmatis* strain MC2 155. *BMC Microbiol* 10: 121 – 130.
- He, Z., Buck, J. D. (2010b). Localization of proteins in the cell wall of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K10 by proteomic analysis. *Proteome Sci* 8: 21 – 29.
- Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T. M., Werner, G., Sundsfjord, A. (2010). Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection* 16 (6): 541 – 554.
- Hendrickx, A. P. A., Willems, R. J. L., Bonten, M. J. M., van Schaik, W. (2009). LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends Microbiol* 17 (9): 423 – 430.
- Heuer, H., Smalla, K. (2007). Horizontal gene transfer between bacteria. *Environ Biosafety Res* 6 (1-2): 3 – 13.
- Hicks, J. M., Hsu, V. L. (2004). The extended left-handed helix: a simple nucleic acid-binding motif. *Proteins* 55 (2): 330 – 338.

- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., Mitaku, S. (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14 (4): 378 – 379.
- Hirt, H., Erlandsen, S. L., Dunny, G. M. (2000). Heterologous inducible expression of *Enterococcus faecalis* pCF10 aggregation substance asc10 in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus gordonii* contributes to cell hydrophobicity and adhesion to fibrin. *J Bacteriol* 182 (8): 2299 – 2306.
- Hof, H., Mertgen, C. P. and Witte, K. (2002). Antibiotika in der Geriatrie, 1. Auflage, Germany, Socio-medico Verlag GmbH Wessobrunn, S.71.
- Hormaeche, I., Alkorta, I., Moro, F., Valpuesta, J. M., Goni, F. M., Cruz, F. D. L. (2002). Purification and properties of TrwB, a hexameric, ATP-binding integral membrane protein essential for R388 plasmid conjugation. *J Biol Chem* 277 (48): 46456 – 46462.
- Horodniceanu, T., Bouanchaud, D. H., Bieth, G., Chabbert, Y. A. (1976). R plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Antimicrob Agents Chemother* 10 (5): 795 – 801.
- Hufnagel, M., Koch, S., Creti, R., Baldassarri, L., Huebner, J. (2004). A putative sugar-binding transcriptional regulator in a novel gene locus in *Enterococcus faecalis* contributes to production of biofilm and prolonged bacteremia in mice. *J Infect Dis* 189 (3): 420 – 430.
- Ike, Y., Craig, R.A., White, B.A., Yagi, Y., Clewell, D.B. (1983). Modification of *Streptococcus faecalis* sex pheromones after acquisition of plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5369 – 5373.
- Jacob, A.E., Hobbs, S.J. (1974). Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *S. faecalis* var. *zymogenes*. *J Bacteriol* 117: 360 – 372.
- Jain, R., Rivera, M.C., Moore, J.E., Lake, J.A. (2002). Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. *Theor Popul Biol* 61 (4): 489 – 495.
- Jakubowski, S. J., Kerr, J. E., Garza, I., Krishnamoorthy, V., Bayliss, R., Waksman, G., Christie, P. J. (2009). *Agrobacterium* VirB10 domain requirements for type IV secretion and T pilus biogenesis. *Mol Microbiol* 71 (3): 779 – 794.
- Janus, D., Hoff, B., Hofmann, E., Kück, U. (2007). An efficient fungal RNA-silencing system using the *DsRed* reporter gene. *Appl Environ Microbiol* 73 (3): 962 – 970.
- Jensen, L. B., Garcia-Migura, L., Valenzuela, A. J. S., Løhr, M., Hasman, H., Aarestrup, F. M. (2010). A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J Microbiol Methods* 80 (1). 25 – 43.
- Kast, P., Hennecke, H. (1991). Amino acid substrate specificity of *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetase altered by distinct mutations. *J Mol Biol* 222 (1): 99 – 124.
- Kay, B. K., Williamson, M. P., Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* 14 (2): 231 – 241.

- Kelly, M. A., Chellgren, B. W., Rucker, A. L., Troutman, J. M., Fried, M. G., Miller, A. F., Creamer, T. P. (2001). Host-guest study of left-handed polyproline II helix formation. *Biochemistry* 40 (48): 14376 – 14383.
- Khachatourians, G. G. (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *CMAJ* 159 (9): 1129 – 1136.
- Khan, S.A., Carleton, S.M., Novick, R.P. (1981). Replication of plasmid pT181 DNA *in vitro*: requirement for a plasmid-encoded product. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4902 – 4906.
- Klar, T., Dyba, M., Hell, S. (2001). Stimulated emission depletion microscopy with an offset depleting beam. *Appl Phys Lett* 78 (4): 393 – 395.
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J., Bron, P. A. (2010). The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol Rev* 34 (2): 199 – 230.
- Kline, K. A., Kau, A. L., Chen, S. L., Lim, A., Pinkner, J. S., Rosch, J., Nallapareddy, S. R., Murray, B. E., Henriques-Normark, B., Beatty, W., Caparon, M. G., Hultgren, S. J. (2009). Mechanism for sortase localization and the role of sortase localization in efficient pilus assembly in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 191 (10): 3237 – 3247.
- Kobayashi, S. D., DeLeo, F. R. (2009). An update on community-associated MRSA virulence. *Curr Opin Pharmacol* 9 (5): 545 – 551.
- Kopec, 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.
- Kopec, J., Bergmann, A., Fritz, G., Grohmann, E., 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 (2): 401 – 409.
- Kristich, C. J., Nguyen, V. T., Le, T., Barnes, A. M. T., Grindle, S., Dunny, G. M. (2008). Development and use of an efficient system for random mariner transposon mutagenesis to identify novel genetic determinants of biofilm formation in the core *Enterococcus faecalis* genome. *Appl Environ Microbiol* 74 (11): 3377 – 3386.
- Kristich, C.J., Chandler, J.R., Dunny, G.M. (2007). Development of a host-genotype-independent counterselectable marker and a high-frequency conjugative delivery system and their use in genetic analysis of *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* 57 (2): 131 – 144.
- Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G. G. A., Kleerebezem, M., de Vos, W. M. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J Biotechnol* 64 (1): 15 – 21.
- Kumar, R. B., Das, A. (2002). Polar location and functional domains of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirD4. *Mol Microbiol* 43: 1523 – 1532.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment –a review– part II. *Chemosphere* 75 (4): 435 – 441.

- 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., Fariás, M. E., Szewzyk, U., 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 (6): 1801 – 1805.
- Kurenbach, B., Kopec, J., Mägdefrau, M., Andreas, K., Keller, W., Bohn, C., Abajy, M. Y., Grohmann, E. (2006). The TraA relaxase autoregulates the putative type IV secretion-like system encoded by the broad-host-range *Streptococcus agalactiae* plasmid pIP501. Microbiology 152 (3): 637 – 645.
- Lagendijk, E. L., Validov, S., Lamers, G. E., De Weert, S., Bloemberg, G. V. (2010). Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. FEMS Microbiology Letters 305 (1): 81 – 90.
- Lakins, M., Marrison, J., O' Toole, P., van der Woude, M. W. (2009). Exploiting advances in imaging technology to study biofilms by applying multiphoton laser scanning microscopy as an imaging and manipulation tool. Journal of Microscopy 235 (2): 128 – 137.
- Langella, P., Loir, Y. L., Ehrlich, S. D., Gruss, A. (1993). Efficient plasmid mobilization by pIP501 in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. J Bacteriol 175 (18): 5806 – 5813.
- Lanka, E., Wilkins, B. M. (1995). DNA processing reactions in bacterial conjugation. Annu Rev Biochem 64: 141 – 169.
- Lee, C. A., Babic, A., Grossman, A. D. (2010). Autonomous plasmid-like replication of a conjugative transposon. Mol Microbiol 75 (2): 268 – 279.
- Leenhouts, K., Buist, G., Bolhuis, A., ten Berge, A., Kiel, J., Mierau, I., Dabrowska, M., Venema, G., Kok, J. (1996). A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes. Mol Gen Genet 253: 217 – 224.
- Li, M., Diep, B. A., Villaruz, A. E., Braughton, K. R., Jiang, X., DeLeo, F. R., Chambers, H. F., Lu, Y., Otto, M. (2009). Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci USA 106 (14): 5883 – 5888.
- Llosa, M., de la Cruz, F. (2005). Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. Res Microbiol 156 (1): 1 – 6.
- Llosa, M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M., de la Cruz, F. (2002). Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. Mol Microbiol 45 (1): 1 – 8.
- Llosa, M., Zupan, J., Baron, C., Zambryski, P. (2000). The N- and C-terminal portions of the *Agrobacterium* VirB1 protein independently enhance tumorigenesis. J Bacteriol 182 (12): 3437 – 3445.

- Maksimow, M., Hakkila, K., Karp, M., Virta, M. (2002). Simultaneous detection of bacteria expressing GFP and DsRed genes with a flow cytometer. *Cytometry* 47 (4): 243 – 247.
- Malik, A., Celik, E.-K., Bohn, C., Böckelmann, U., Knobel, K., Grohmann, E. (2008). Detection of conjugative plasmids and antibiotic resistance genes in anthropogenic soils from Germany and India. *FEMS Microbiol Lett* 279 (2): 207 – 216.
- Malone, C. L., Boles, B. R., Lauderdale, K. J., Thoendel, M., Kavanaugh, J. S., Horswill, A. R. (2009). Fluorescent reporters for *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods* 77 (3): 251 – 260.
- Mandlik, A., Swierczynski, A., Das, A., Ton-That, H. (2008). Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol* 16 (1): 33 – 40.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Cherukuri, P. F., DeWeese-Scott, C., Geer, L. Y., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Shoemaker, B. A., Simonyan, V., Song, J. S., Thiessen, P. A., Yamashita, R. A., Yin, J. J., Zhang, D., Bryant, S. H. (2005). CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* 33: D192 – D196.
- Marcinek, H., Wirth, R., Muscholl-Silberhorn, A., Gauer, M. (1998). *Enterococcus faecalis* gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 64 (2): 626 – 632.
- Marmur, J., Falkow, S., Mandel, M. (1963). New approaches to bacterial taxonomy. *Annu Rev Microbiol* 17: 329 – 372.
- Mathur, S., Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *Int J Food Microbiol* 105 (3): 281 – 295.
- Meinhart, A., Alonso, J. C., Sträter, N., Saenger, W. (2003). Crystal structure of the plasmid maintenance system epsilon/zeta: functional mechanism of toxin zeta and inactivation by epsilon 2 zeta 2 complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (4): 1661 – 1666.
- Melderen, L. V., Bast, M. S. D. (2009). Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet* 5 (3): e1000437.
- Meyer, R. (2009): Replication and conjugative mobilization of broad host-range IncQ plasmids. *Plasmid* 62 (2): 57 – 70.
- Mierau, I., Kleerebezem, M. (2005). 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68 (6): 705 – 717.
- Mihajlovic, S., Lang, S., Sut, M. V., Strohmaier, H., Gruber, C. J., Koraimann, G., Cabezón, E., Moncalián, G., de la Cruz, F., Zechner, E. L. (2009). Plasmid R1 conjugative DNA processing is regulated at the coupling protein interface. *J Bacteriol* 191 (22): 6877 – 6887.
- Miller, W. G., Lindow, S. E. (1997). An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene* 191 (2): 149 – 153.

- Mølbak, L., Licht, T. R., Kvist, T., Kroer, N., Andersen, S. R. (2003). Plasmid transfer from *Pseudomonas putida* to the indigenous bacteria on alfalfa sprouts: characterization, direct quantification, and in situ location of transconjugant cells. *Appl Environ Microbiol* 69 (9): 5536 – 5542.
- Moncalián, G., Cabezón, E., Alkorta, I., Valle, M., Moro, F., Valpuesta, J. M., Goñi, F. M., de La Cruz, F. (1999). Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the coupling protein essential in plasmid R388 conjugation. *J Biol Chem* 274 (51): 36117 – 36124.
- Mossey, P., Hudacek, A., Das, A. (2010). *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion protein VirB3 is an inner membrane protein and requires VirB4, VirB7, and VirB8 for stabilization. *J Bacteriol* 192 (11): 2830 – 2838.
- Moura, A., Henriques, I., Smalla, K., Correia, A. (2010). Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res Microbiol* 161 (1): 58 – 66.
- Müller-Taubenberger, A., Anderson, K. I. (2007). Recent advances using green and red fluorescent protein variants. *Appl Microbiol Biotechnol* 77 (1): 1 – 12.
- Mushegian, A. R., Fullner, K. J., Koonin, E. V., Nester, E. W. (1996). A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (14): 7321 – 7326.
- Nancharaiah, Y. V., Wattiau, P., Wuertz, S., Bathe, S., Mohan, S. V., Wilderer, P. A., Hausner, M. (2003). Dual labeling of *Pseudomonas putida* with fluorescent proteins for in situ monitoring of conjugal transfer of the TOL plasmid. *Appl Environ Microb* 69 (8): 4846 – 4852.
- Navarre, W. W., Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63 (1): 174 – 229.
- Nieto, C., de Palencia, P. F., López, P., Espinosa, M. (2000). Construction of a tightly regulated plasmid vector for *Streptococcus pneumoniae*: controlled expression of the green fluorescent protein. *Plasmid* 43 (3): 205 – 213.
- Nieto, C., Espinosa, M. (2003). Construction of the mobilizable plasmid pMV158GFP, a derivative of pMV158 that carries the gene encoding the green fluorescent protein. *Plasmid* 49 (3): 281 – 285.
- Nieto, C., Pellicer, T., Balsa, D., Christensen, S.K., Gerdes, K., Espinosa, M. (2006). The chromosomal *relBE2* toxin-antitoxin locus of *Streptococcus pneumoniae*: characterization and use of a bioluminescence resonance energy transfer assay to detect toxin-antitoxin interaction. *Mol Microbiol* 59 (4): 1280 – 1296.
- Norman, A., Hansen, L. H., Sorensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos T Roy Soc B* 364 (1527): 2275 – 2289.

Ochman, H., Lawrence, J. G., Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405 (6784): 299 – 304.

Okamoto, S., Toyoda-Yamamoto, A., Ito, K., Takebe, I., Machida, Y. (1991). Localization and orientation of the VirD4 protein of *Agrobacterium tumefaciens* in the cell membrane. *Mol Gen Genet* 228 (1-2): 24 – 32.

Olmsted, S. B., Erlandsen, S. L., Dunny, G. M., Wells, C. L. (1993). High-resolution visualization by field emission scanning electron microscopy of *Enterococcus faecalis* surface proteins encoded by the pheromone-inducible conjugative plasmid pCF10. *J Bacteriol* 175 (19): 6229 – 6237.

Palmer, K. L., Kos, V. N., Gilmore, M. S. (2010). Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 13 (5): 632 – 639.

Pansegrau, W., Lanka, E. (1991). Common sequence motifs in DNA relaxases and nick regions from a variety of DNA transfer systems. *Nucleic Acids Res* 19 (12): 3455.

Pansegrau, W., Lanka, E. (1996). Enzymology of DNA transfer by conjugative mechanisms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54: 197 – 251.

Park, K., Han, E., Paulsson, J., Chattoraj, D. K. (2001). Origin pairing ('handcuffing') as a mode of negative control of P1 plasmid copy number. *EMBO J* 20 (24): 7323 – 7332.

Parsons, J. A., Bannam, T. L., Devenish, R. J., Rood, J. I. (2007). TcpA, an FtsK/SpoIIIE Homolog, Is Essential for Transfer of the Conjugative Plasmid pCW3 in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 189 (21): 7782 – 7790.

Patel, L., Abate, C., Curran, T. (1990). Altered protein conformation on DNA binding by Fos and Jun. *Nature* 347 (6293): 572 – 575.

Pereira, P. M., Veiga, H., Jorge, A. M., Pinho, M. G. (2010). Fluorescent reporters for studies of cellular localization of proteins in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 76 (13): 4346 – 4353.

Pérez-Roth, E., Kwong, S. M., Alcoba-Florez, J., Firth, N., Méndez-Alvarez, S. (2010). Complete nucleotide sequence and comparative analysis of pPR9, a 41.7-kilobase conjugative staphylococcal multiresistance plasmid conferring high-level mupirocin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 54 (5): 2252 – 2257.

Pérez-Roth, E., López-Aguilar, C., Alcoba-Florez, J., Méndez-Alvarez, S. (2006). High-level mupirocin resistance within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic lineages. *Antimicrob Agents Chemother* 50 (9): 3207 – 3211.

Perreten, V., Schwarz, F.V., Teuber, M., Levy, S.B. (2001). Mdt(A): a new efflux protein conferring multiple antibiotic resistance in *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Ch* 45: 1109 – 1114.

Poole, K. (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 61 (17): 2200 – 2223.

- Poole, K. (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* 39 (3): 162 – 176.
- Pucciarelli, M. G., Calvo, E., Sabet, C., Bierne, H., Cossart, P., del Portillo, F. G. (2005). Identification of substrates of the *Listeria monocytogenes* sortases A and B by a non-gel proteomic analysis. *Proteomics* 5 (18): 4808 – 4817.
- Pugsley, A. P., Buddelmeijer, N. (2004). Traffic spotting: poles apart. *Mol Microbiol* 53 (6): 1559 – 1562.
- Rabel, C., Grahn, A. M., Lurz, R., Lanka, E. (2003). The VirB4 family of proposed traffic nucleoside triphosphatases: common motifs in plasmid RP4 TrbE are essential for conjugation and phage adsorption. *J Bacteriol* 185 (3): 1045 – 1058.
- Rangrez, A. Y., Abajy, M. Y., Keller, W., Shouche, Y., Grohmann, E. (2010). Biochemical characterization of three putative ATPases from a new type IV secretion system of *Aeromonas veronii* plasmid pAC3249A. *BMC Biochem* 11: 10 – 17.
- Rawlings, D. E., Tietze, E. (2001). Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 65 (4): 481 – 96.
- Rizzo, M. A., Springer, G. H., Granada, B., Piston, D. W. (2004). An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* 22 (4): 445 – 449.
- Rosvoll, T. C. S., Pedersen, T., Sletvold, H., Johnsen, P. J., Sollid, J. E., Simonsen, G. S., Jensen, L. B., Nielsen, K. M., Sundsfjord, A. (2010). PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501- and pHTbeta-related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin-antitoxin systems. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58 (2): 254 – 268.
- Rouch, D. A., Byrne, M. E., Kong, Y. C., Skurray, R. A. (1987). The aacA-aphD gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. *J Gen Microbiol* 133 (11): 3039 – 3052.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (12): 5463 – 5467.
- Scheich, C., Niesen, F.H., Seckler, R., Bussow, K. (2004). An automated *in vitro* protein folding screen applied to a human gynaectin subunit. *Prot Sci* 13: 370 – 380.
- Scherzinger, E., Kruft, V., Otto, S. (1993). Purification of the large mobilization protein of plasmid RSF1010 and characterization of its site-specific DNA-cleaving/DNA-joining activity. *Eur J Biochem* 217 (3): 929 – 938.
- Schleifer, K. H., Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 36 (4): 407 – 477.
- Schröder, G., Krause, S., Zechner, E. L., Traxler, B., Yeo, H.-J., Lurz, R., Waksman, G., Lanka, E. (2002). TraG-like proteins of DNA transfer systems and of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system: inner membrane gate for exported substrates? *J Bacteriol* 184 (10):

2767 – 2779.

Schröder, G., 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 (15): 4371 – 4381.

Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22 (12): 1567 – 1572.

Shaner, N. C., Lin, M. Z., McKeown, M. R., Steinbach, P. A., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W., Tsien, R. Y. (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods* 5 (6): 545 – 551.

Shcherbo, D., Murphy, C. S., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Chepurnykh, T. V., Shcheglov, A. S., Verkhusa, V. V., Pletnev, V. Z., Hazelwood, K. L., Roche, P. M., Lukyanov, S., Zaraisky, A. G., Davidson, M. W., Chudakov, D. M. (2009). Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem J* 418 (3): 567 – 574.

Shcherbo, D., Merzlyak, E. M., Chepurnykh, T. V., Fradkov, A. F., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Lukyanov, K. A., Bogdanova, E. A., Zaraisky, A. G., Lukyanov, S., Chudakov, D. M. (2007). Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods* 4 (9): 741 – 746.

Smalla, K., Sobecky, P. A. (2002). The prevalence and diversity of mobile genetic elements in bacterial communities of different environmental habitats: insights gained from different methodological approaches. *FEMS Microbiol Ecol* 42 (2): 165 – 175.

Smets, B. F., Barkay, T. (2005). Horizontal gene transfer: perspectives at a crossroads of scientific disciplines. *Nat Rev Microbiol* 3(9): 675 – 678.

Sörensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., Wuertz, S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat Rev Micro* 3 (9): 700 – 710.

Sörensen, S. J., Sörensen, A. H., Hansen, L. H., Oregaard, G., Veal, D. (2003). Direct detection and quantification of horizontal gene transfer by using flow cytometry and gfp as a reporter gene. *Curr Microbiol* 47 (2): 129 – 133.

Stentz, R., Wegmann, U., Parker, M., Bongaerts, R., Lesaint, L., Gasson, M., Shearman, C. (2009). CsiA is a bacterial cell wall synthesis inhibitor contributing to DNA translocation through the cell envelope. *Mol Microbiol* 72 (3): 779 – 794.

Strack, R. L., Hein, B., Bhattacharyya, D., Hell, S. W., Keenan, R. J., Glick, B. S. (2009). A rapidly maturing far-red derivative of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *Biochemistry* 48 (35): 8279 – 8281.

Sudhamani, M., Ismaiel, E., Geis, A., Batish, V., Heller, K.J. (2008). Characterisation of pSMA23, a 3.5 kbp plasmid of *Lactobacillus casei*, and application for heterologous expression in *Lactobacillus*. *Plasmid* 59: 11 – 19.

- Tatum, E. L., Lederberg, J. (1947). Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. J Bacteriol 53 (6): 673 – 684.
- Taylor, D. E., Gibreel, A., Lawley, T. D., Tracz, D. M. (2004). Antibiotic Resistance Plasmids. In: Funnell, B. E., Phillips, G. J. (eds): Plasmid Biology. Washington D. C., ASM Press: 473ff.
- Teng, W. L., Bannam, T. L., Parsons, J. A., Rood, J. I. (2008). Functional characterization and localization of the TcpH conjugation protein from *Clostridium perfringens*. J Bacteriol 190 (14): 5075 – 5086.
- Thomas, C. M. (2000). The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread. Ed. C. M. Thomas. Amsterdam, Harwood Academic Publishers.
- Timmerly, S., Modrie, P., Minet, O., Mahillon, J. (2009). Plasmid capture by the *Bacillus thuringiensis* conjugative plasmid pXO16. J Bacteriol 191 (7): 2197 – 2205.
- Top, E. M., Springael, D. (2003). The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. Curr Opin Biotechnol 14 (3): 262 – 269.
- Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Courvalin, P. (1988). Conjugative plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli*. J Bacteriol 170 (9): 4388 – 4391.
- Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Martin, P., Courvalin, P. (1987). Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to Gram-positive bacteria. FEMS Microbiology Letters 48 (1-2): 289 – 294.
- Tusnády, G. E., Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. Bioinformatics 17 (9): 849 – 850.
- Utsui, Y., Yokota, T. (1985). Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 28 (3): 397 – 403.
- van der Lelie, D., Wösten, H. A., Bron, S., Oskam, L., Venema, G. (1990). Conjugal mobilization of streptococcal plasmid pMV158 between strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. J Bacteriol 172 (1): 47 – 52.
- Vogel, A. M., Das, A. (1992). The *Agrobacterium tumefaciens* virD3 gene is not essential for tumorigenicity on plants. J Bacteriol 174 (15): 5161 – 5164.
- Wallden, K., Rivera-Calzada, A., Waksman, G. (2010). Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. Cell Microbiol 12 (9): 1203 – 1212.
- Ward, D. V., Draper, O., Zupan, J. R., 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 (17): 11493 – 11500.
- Weigel, L. M., Clewell, D. B., Gill, S. R., Clark, N. C., McDougal, L. K., Flannagan, S. E., Kolonay, J. F., Shetty, J., Killgore, G. E., Tenover, F. C. (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science 302 (5650): 1569 – 1571.

- Weiss, M. A., Ellenberger, T., Wobbe, C. R., Lee, J. P., Harrison, S. C., Struhl, K. (1990). Folding transition in the DNA-binding domain of GCN4 on specific binding to DNA. *Nature* 347 (6293): 575 – 578.
- Wilcks, A., Smidt, L., Okstad, O. A., Kolsto, A. B., Mahillon, J., Andrup, L. (1999). Replication mechanism and sequence analysis of the replicon of pAW63, a conjugative plasmid from *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* 181 (10): 3193 – 3200.
- Wilson, J. W., Ott, C. M., zu Bentrup, K. H., Ramamurthy, R., Quick, L., Porwollik, S., Cheng, P., McClelland, M., Tsaprailis, G., Radabaugh, T., Hunt, A., Fernandez, D., Richter, E., Shah, M., Kilcoyne, M., Joshi, L., Nelman-Gonzalez, M., Hing, S., Parra, M., Dumars, P., Norwood, K., Bober, R., Devich, J., Ruggles, A., Goulart, C., Rupert, M., Stodieck, L., Stafford, P., Catella, L., Schurr, M. J., Buchanan, K., Morici, L., McCracken, J., Allen, P., Baker-Coleman, C., Hammond, T., Vogel, J., Nelson, R., Pierson, D. L., Stefanyshyn-Piper, H. M., Nickerson, C. A. (2007). Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (41): 16299 – 16304.
- Wirth, R., An, F. Y., Clewell, D. B. (1986). Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*S. faecalis* shuttle vector. *J Bacteriol* 165 (3): 831 – 836.
- Witte, W., Cuny, C., Klare, I., Nübel, U., Strommenger, B., Werner, G. (2008). Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 298 (5-6): 365 – 377.
- Yanofsky, M. F., Porter, S. G., Young, C., Albright, L. M., Gordon, M. P., Nester, E. W. (1986). The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell* 47(3): 471 – 477.
- Yeo, H.-J., Waksman, G. (2004). Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system. *J Bacteriol* 186 (7): 1919 – 1926.
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 53 (12): 5046 – 5054.
- Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S. C., Ester, M., Foster, L. J., Brinkman, F. S. L. (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26 (13): 1608 – 1615.
- Zahrl, D., Wagner, M., Bischof, K., Bayer, M., Zavec, B., Beranek, A., Ruckenstein, C., Zarfel, G. E., Koraimann, G. (2005). Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* 151 (11): 3455 – 3467.
- Zechner, E. L., De La Cruz, F., Eisenbrandt, R., Grahn, A. M., Koraimann, G., Lanka, E., Muth, G., Pansegrau, W., Thomas, C. M., Wilkins, B. M. and Zatyka, M. (2000).

Conjugative-DNA transfer processes. In: The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread. Ed. C. M. Thomas. Amsterdam, Harwood Academic Publishers 87–174.

Zhang, W., Yu, D., Sun, Z., Chen, X., Bao, Q., Meng, H., Zhang, H. (2008). Complete nucleotide sequence of plasmid plca36 isolated from *Lactobacillus casei* Zhang. Plasmid 60: 131 – 135.

Zhu, W., Clark, N. C., McDougal, L. K., Hageman, J., McDonald, L. C., Patel, J. B. (2008). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like *vanA* plasmids in Michigan. Antimicrob Agents Chemother 52 (2): 452 – 457.

Zhu, W., Murray, P. R., Huskins, W. C., Jernigan, J. A., McDonald, L. C., Clark, N. C., Anderson, K. F., McDougal, L. K., Hageman, J. C., Olsen-Rasmussen, M., Frace, M., Alangaden, G. J., Chenoweth, C., Zervos, M. J., Robinson-Dunn, B., Schreckenberger, P. C., Reller, L. B., Rudrik, J. T., Patel, J. B. (2010). Dissemination of an *Enterococcus* Inc18-Like *vanA* plasmid associated with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 54 (10): 4314 – 4320.

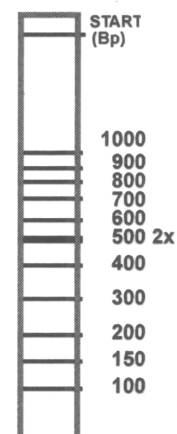
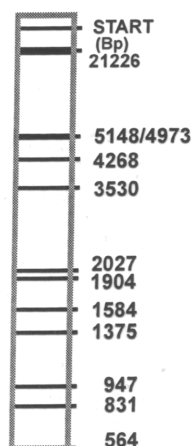
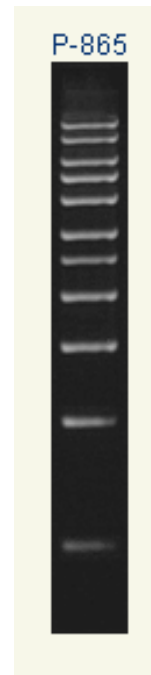
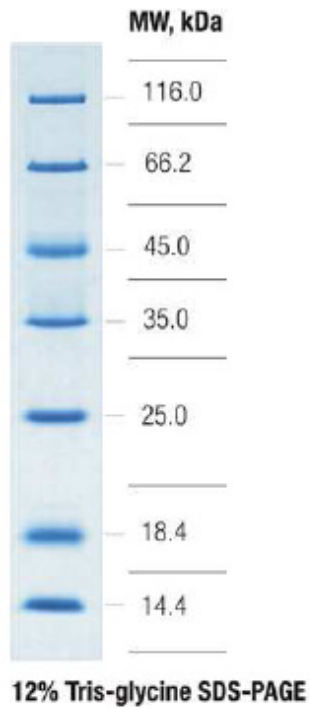
Zinder, N.D., Lederberg, J. (1952). Genetic exchange in *Salmonella*. J Bacteriol 64 (5): 679 – 699.

Zucker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res 31 (13): 3406 – 15.

Zupan, J., Hackworth, C. A., Aguilar, J., Ward, D., Zambryski, P. (2007). VirB1* promotes T-pilus formation in the vir-Type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol 189 (18): 6551 – 6563.

8. ANHANG

A. Protein- und DNA-Standards



B. DsRed-Express-Sequenz aus pRHN1 (Für Klonierungen benutzte Primerbindestellen sind fett unterstrichen)

```

2821 TCCCATCCCT TATTCCTTTG AACCTTTCAG TTCGAGCTTT CCCACTTCAT CGCAGCTTGA
2881 CTAACAGCTA CCCCCTTTGA GCAGACATCA CCATGGCCTC CTCCGAGGAC GTCATCAAGG
2941 AGTTCATGCG CTTCAAGGTG CGCATGGAGG GCTCCGTGAA CGGCCACGAG TTCGAGATCG
3001 AGGGCGAGGG CGAGGGCCGC CCCTACGAGG GCACCCAGAC CGCCAAGCTG AAGGTGACCA
3061 AGGGCGGCCC CCTGCCCTTC GCCTGGGACA TCCTGTCCCC CCAGTTCCAG TACGGCTCCA
3121 AGGTGTACGT GAAGCACCCC GCCGACATCC CCGACTACAA GAAGCTGTCC TTCCCCGAGG
3181 GCTTCAAGTG GGAGCGCGTG ATGAACCTCG AGGACGGCGG CGTGGTGACC GTGACCCAGG
3241 ACTCCTCCCT GCAGGACGGC TCCTTCATCT ACAAGGTGAA GTTCATCGGC GTGAACCTCC
3301 CCTCCGACGG CCCCCTAATG CAGAAGAAGA CTATGGGCTG GGAGGCCTCC ACCGAGCGCC
3361 TGTACCCCCG CGACGGCGTG CTGAAGGGCG AGATCCACAA GGCCCTGAAG CTGAAGGACG
3421 GCGGCCACTA CCTGGTGGAG TTCAAGTCCA TCTACATGGC CAAGAAGCCC GTGCAGCTGC
3481 CCGGCTACTA CTACGTGGAC TCCAAGCTGG ACATCACCTC CCACAACGAG GACTACACCA
3541 TCGTGGAGCA GTACGAGCGC GCCGAGGGCC GCCACCACCT GTTCTGTAG CGGCCGCTCT
3601 AGAACTAGTG GATCCACTTA ACGTTACTGA AATCATCAAA CAGCTTGACG AATCTGGATA
3661 TAAGATCGTT GGTGTCGATG TCAGCTCCGG AGTTGAGACA AATGGTGTTT AGGATCTCGA

```

C. *P_{rel}-gfp* Sequenz aus pJPrel-*gfp*

P_{rel}-Promotor 1-353, TIR (*translational enhancer*) 385-394, RBS 395-402, *gfp* 410-1126

```

1 GAATTCCGAT CAGGTTCTTA CGCTTGGCGA CTCAAACAAC GAATCCTATC TGACCTTGGT
61 CACCTTTCTA ACGAGGACGG TGCTGAAGCT ATGATTTCGA CGCTAGGAAA TCGTACTAAG
121 AAGATTTACC TTGGGCATTT ATCTAAGGAA AACAATATCA AGGAACTGGC TCATATGACC
181 ATGGTCAATC AGCTGGCTCA AGCTGATCTG GGAGTCGGAG TAGACTTTAA GGTTTATGAT
241 ACCTCACCAG ATACCGCAAC ACCATTGACA GAGATATAGA AAGAACGCTG AGAAGGTGTT
301 CTTTTTATAT TGACTGAACA CCTAAAAAGT AATACAATGG TGTTACCATT AAAAAAGGAT
361 CCTCTAGAGA TGGATCAATT CTGATTAACT TTATAAGGAG GAAAAACATA TGAGTAAAGG
421 AGAAGAACTT TTTACTGGAG TTGTCCCAAT TCTTGTTGAA TTAGATGGTG ATGTTAATGG
481 GCACAAATTT TCTGTCAAGT GAGAGGGTGA AGGTGATGCA ACATACGGAA AACTTACCCCT
541 TAAATTTATT TGCACTACTG GAAAACTACC TGTTCCATGG CCAACACTTG TCACTACTTT
601 GACTTATGGT GTTCAATGCT TTTCAAGATA CCCAGATCAT ATGAAACGGC ATGACTTTTTT
661 CAAGAGTGCC ATGCCCAGAG GTTATGTACA GGAAAGAACT ATATTTTTTCA AAGATGACGG
721 GAACTACAAG ACACGTGCTG AAGTCAAGTT TGAAGGTGAT ACCCTTGTTA ATAGAATCGA
781 GTTAAAAGGT ATTGATTTTA AAGAAGATGG AAACATTCTT GGACACAAAT TGGAATACAA
841 CTATAACTCA CACAATGTAT ACATCATGGC AGACAAACAA AAGAATGGAA TCAAAGTTAA
901 CTTCAAATTT AGACACAACA TTGAAGATGG AAGCGTTCAA CTAGCAGACC ATTATCAACA
961 AAATACTCCA ATTGGCGATG GCCCTGTCCT TTTACCAGAC AACCATTACC TGTCCACACA
1021 ATCTGCCCTT TCGAAAGATC CCAACGAAAA GAGAGACCAC ATGGTCCTTC TTGAGTTTGT
1081 AACAGCTGCT GGGATTACAC ATGGCATGGA TGAACATATC AAATAGGAAT TGATCCTCTA
1141 CGCCGGACGC ATCGTGGCCG GCATCACCGG CGCCACAGGT GCGGTTGCTG GCGCCTATAT
1201 CGCCGACATC ACCGATGGGG AAGATCGGGC TCGCCACTTC GGGCTCATGA GCGCTTGTTT
1261 CGGCGTGGGT ATGGTGGCAG GCCCCGTGGC CGGGGGACTG TTGGGCGCCA TCTCCTTGCA
1321 TGCAAGCTTG GCGTAATCAT GGTTCATAGT GTTTCCTGTG TGAAATTGTT ATCCGCTCAC
1381 AATTCCACAC AACATACGAG CCGGAAGCAT AAAGTGTAAG GCCTGGGGTG CCTAATGAGT
1441 GAGCTAACTC ACATTAATTG CGTTGCGCTC ACTGCCCCGCT TTCCAGTCGG GAAACCTGTC
1501 GTGCCAGCTG CATTAATGAA TCGGCCAACG CGCGGGGAGA GGCGGTTTGC GTATTGGAGC
1561 TTGTTGTAA C TGAAAAGGAA AATTATTGTG CCAGGCAGTT GAAAGTCAGC ACCTTTTAA C
1621 GAGTGCTGAA ATGACGGCTA AATGGGAAAC GTATTTAAAA AAAATCGGTA AAAGAGAAGG
1681 CAATCAAGAG AACTTTATTA CGAATATCAA AAAATTCAAT GTCATTTACT GGAAGCTGTA
1741 CCTAACGATA TAGAAAAACT AAATTTTTTT CTGATTACCA GGAACAGGA AAGGAAAAAA
1801 GAAAGCCAG

```

D. Sequenzalignment von RepR aus pIP501 und RepE aus pAMbeta1

```

pAMbeta1_RepE_AAC38603      MNIPFVVETVLHDGLLKYKFKNSKIRSITTKPGKSKGAIFAYRSKSSMIG 50
pIP501_RepR_CAA50899      MNIPFVVETVLHDGLLKYKFKNSKIRSITTKPGKSKGAIFAYRSKSSMIG 50
*****:*****

pAMbeta1_RepE_AAC38603      GRGVVLTSEEAIQENQDTFTHTWTPNVYRYGTYADENRSYTKGHSENNLRQ 100
pIP501_RepR_CAA50899      GRGVVLTSEEAIHENQDTFTHTWTPNVYRYGTYADENRSYTKGHSENNLRQ 100
*****:*****

pAMbeta1_RepE_AAC38603      INTFFIDFDIHTAKETISASDILTTAIDLGFMPMTMIKSDKGYQAYFVLE 150
pIP501_RepR_CAA50899      INTFFIDFDIHTETETISASDILTTAIDLGFMPMTLIKSDKGYQAYFVLE 150
***** *****:*****

pAMbeta1_RepE_AAC38603      TPVYVTSKSEFKSVKAAKIISQNIREYFGKSLPVDLTCNHFGIARIPRTD 200
pIP501_RepR_CAA50899      TPVYVTSKSEFKSVKAAKIISQNIREYFGKSLPVDLTCNHFGIARIPRTD 200
*****

pAMbeta1_RepE_AAC38603      NVEFFDPNYRYSFKEQDWSFKQTDNKGFTRSSLTVLSGTEGKKQVDEPW 250
pIP501_RepR_CAA50899      NVEFFDPNYRYSFKEQDWSFKQTDNKGFTRSSLTVLSGTEGKKQVDEPW 250
*****

pAMbeta1_RepE_AAC38603      FNLLHETKFSGEKGLIGRNNVMFTLSLAYFSSGYSIETCEYNMFEFNRR 300
pIP501_RepR_CAA50899      FNLLHETKFSGEKGLVGRNSVMFTLSLAYFSSGYSIETCEYNMFEFNRR 300
*****:***:*****

pAMbeta1_RepE_AAC38603      LDQPLEEKEVIKIVRSAYSENYQGANREYITILCKAWSSDLTSKDLFVR 350
pIP501_RepR_CAA50899      LDQPLEEKEVIKIVRSAYSENYQGANREYITILCKAWSSDLTSKDLFVR 350
*****

pAMbeta1_RepE_AAC38603      QGWFKFKKKRSEQRVHLSEWKEDLMAYISEKSDVYKPYLVTTKKEIREV 400
pIP501_RepR_CAA50899      QGWFKFKKKRSEQRVHLSEWKEDLMAYISEKSDVYKPYLATTKKEIREV 400
*****:*****

pAMbeta1_RepE_AAC38603      LGIPERTLDKLLKVLKANQEIFFKIKPGRNGGIQLASVKSLLLSIIKVKK 450
pIP501_RepR_CAA50899      LGIPERTLDKLLKVLKANQEIFFKIKPGRNGGIQLASVKSLLLSIIKLKK 450
*****:**

pAMbeta1_RepE_AAC38603      EEKESYIKALTNSFDLEHTFIQETLNKLAERPKTDTQLDLFSYDTG 496
pIP501_RepR_CAA50899      EERESYIKALTASFNLERTFIQETLNKLAERPKTDPQLDLFSYDTG 496
**:*:*****:*****:*****

```