

Analyse von Protein-Protein Interaktionen
im Typ IV Sekretionssystem von
Agrobacterium tumefaciens

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Lilian Krall

München

21. April 2004

1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Christian Baron
2. Gutachter: Prof. Jürgen Soll

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2004

1. EINLEITUNG	1
1.1. Gentransfer aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> in Pflanzen	1
1.1.1. Ti-Plasmid	1
1.1.2. T-DNA	2
1.1.3. Onkogene	3
1.1.3.1. <i>ipt</i> und <i>tzs</i>	3
1.1.3.2. Cytokinin-Biosynthese	4
1.1.3.3. Isoprenoid-Biosynthese	5
1.1.4. Transferierte Protein-Substrate	7
1.1.5. VirB/D4-Transmembrankomplex	9
1.2. Protein-Sekretionssysteme (Typ I-V)	15
1.3. Typ IV-Sekretionssysteme	15
1.3.1. Bakterielle Konjugation	16
1.3.2. Typ IV-Sekretionssysteme pathogener Mikroorganismen	17
1.4. Aufgabenstellung	18
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1. Verwendete Organismen und Plasmide	19
2.1.1. Bakterien	19
2.1.2. Hefe	19
2.1.3. Plasmide	20
2.2. Nährmedien, Supplemente und Antibiotika	20
2.3. Anzuchtbedingungen	21
2.3.1. Bestimmung der optischen Dichte	21
2.3.2. Anzucht und Induktion von Agrobakterien	21
2.3.3. Anzucht von <i>E. coli</i> und Überproduktion von Vir-Proteinen	22
2.3.4. Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.4. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	23
2.4.1. <i>E. coli</i> / <i>A. tumefaciens</i>	23
2.4.2. <i>S. cerevisiae</i>	23
2.5. Molekularbiologische Methoden	24
2.5.1. Oligonukleotide	24
2.5.2. PCR	24

2.5.3. Sequenzierung	25
2.5.4. Isolierung von Nukleinsäuren	25
2.5.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA	25
2.5.4.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	25
2.5.5. <i>in vitro</i> -Modifikation von Nukleinsäuren	25
2.5.5.1. Restriktion / Dephosphorylierung	25
2.5.5.2. Ligation	26
2.6. Elektrophoretische Methoden	26
2.6.1. Auftrennung von DNA in Agarosegelen	26
2.6.2. Auftrennung von Proteinen	26
2.6.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.6.2.2. Blaue nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)	27
2.6.2.3. 2D-Gelelektrophorese	27
2.6.3. Elektrotransfer von Proteinen	28
2.6.4. Elektroelution von Proteinen	28
2.7. Immunologische Methoden	28
2.7.1. Herstellung polyklonaler Antiseren	28
2.7.2. Anreicherung spezifischer Antikörper	29
2.7.2.1. Präabsorption	29
2.7.2.2. Affinitätsreinigung	29
2.7.3. „Western blot“ zum Nachweis von Proteinen	29
2.8. Proteinbiochemische Methoden	30
2.8.1. Überproduktion und Aufreinigung von Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> GJ1158	30
2.8.2. Überproduktion und Aufreinigung von Tzs aus <i>E. coli</i> GJ1158 pT7-7 _{NcoI} -Tzs	31
2.8.3. Isolierung von Einschlusskörpern	32
2.8.4. Fällung von Proteinen	32
2.8.5. Bestimmung der Proteinkonzentration	32
2.9. Isolierung subzellulärer Fraktionen	32
2.9.1. Isolierung von T-Pili	32
2.9.2. Isolierung von Membranen	33
2.9.3. Solubilisierung von Membranproteinen	33
2.10. Chromatographische Methoden	34
2.10.1. Gelfiltrations-Chromatographie	34
2.11. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen	34

2.11.1. Gelüberschichtungstest	34
2.11.2. Präzipitation mit Affinitätsmatrizes	35
2.11.3. Quervernetzungsversuche	36
2.11.4. Immunpräzipitation	36
2.11.5. Hefe-zwei-Hybridsystem	37
2.12. Bildbearbeitung	37
3. ERGEBNISSE	38
3.1. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen im Typ IV-Sekretionssystem von <i>A. tumefaciens</i> C58	38
3.1.1. Solubilisierung der Proteine des VirB/D4-Transmembrankomplexes unter Verwendung des Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	39
3.1.2. Auftrennung der DDM-solubilierten Proteine mittels Blauer nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)	41
3.1.3. Separation der mittels BN-PAGE aufgetrennten Proteinkomplexe unter denaturierenden Bedingungen (2. Dimension)	45
3.1.4. Auftrennung der DDM-solubilierten Proteine mittels Gelfiltrations-Chromatographie	47
3.1.5. Coimmunpräzipitation DDM-solubiliierter Proteine	51
3.1.6. Quervernetzung von C58-Zellen mit Formaldehyd	52
3.1.7. Quervernetzung von T-Pili mit Formaldehyd	56
3.2. Identifizierung eines mit VirB5 interagierenden Proteins	58
3.2.1. Gelüberschichtungstest von Zelllysaten mit VirB5	58
3.2.2. Aufreinigung und Identifizierung eines VirB5-interagierenden Proteins <i>(in Zusammenarbeit mit Prof. Lottspeich, MPI Martinsried im Rahmen des SFB 369)</i>	61
3.2.3. Klonierung von <i>tzs</i> und <i>ipt</i> und Expression	63
3.2.3.1. Klonierung von <i>tzs</i> in pT7-7 _{NcoI} , Expression und Aufreinigung	63
3.2.3.2. Klonierung von <i>tzs</i> in pT7-StrepII, Expression und Aufreinigung	64
3.2.3.3. Klonierung von <i>ipt</i> in pT7-7 _{NcoI} bzw. pT7-StrepII, Expression und Aufreinigung	65

3.3. Analyse der enzymatischen Aktivität von Tzs	65
<i>(in Zusammenarbeit mit Prof. Zenk, Universität Halle im Rahmen des SFB 369)</i>	
3.3.1. iPMP-unabhängige Cytokininbiosynthese	65
3.3.2. Tzs-abhängige Umsetzung von AMP mit HMBPP zu ZMP	60
3.4. Untersuchung eines möglichen Transfers von Tzs in die Pflanzenzelle	67
<i>(in Zusammenarbeit mit Dr. Vergunst, Arbeitsgruppe Prof. Hooykaas, Universität Leiden, Niederlande)</i>	
3.5. Analyse der Protein-Protein-Interaktion zwischen VirB5 und Tzs	68
3.5.1. Vergleich der Proteinmenge von Virulenzproteinen in C58 und CB1005	69
3.5.2. Quervernetzung von Tzs	71
3.5.3. Analyse der Lokalisierung von Tzs in C58 und CB1005	72
3.5.4. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels „pulldown-assay“	73
3.5.5. Analyse der VirB5 - Tzs Interaktion mit dem Hefe-2-Hybridsystem	75
4. DISKUSSION	79
4.1. Protein-Protein-Interaktionen im VirB/D4-Transmembrankomplex von <i>A. tumefaciens</i>	79
4.2. Identifikation von Vir-Protein-Komplexen nach Solubilisierung der Membranen von <i>A. tumefaciens</i> mit n-Dodecyl-β-D-maltosid	80
4.2.1. Lokalisierung der Vir-Proteine in der Zelle	80
4.2.2. Solubilisierungs-Effizienz der Vir-Proteine	81
4.2.3. Analyse der DDM-solubilierten Vir-Proteine	82
4.3. Modell der T-Pilus Assemblierung	84
4.4. Detektion von VirB1 in isolierten T-Pili	87
4.5. Analyse eines mit VirB5 interagierenden Proteins (Tzs)	87
4.5.1. Analyse der von Tzs katalysierten enzymatischen Reaktion	88
4.5.2. Bestätigung der VirB5-Tzs Interaktion	90
4.5.3. Analyse eines möglichen Transfers von Tzs in die pflanzliche Zelle	91
5. ZUSAMMENFASSUNG	93
6. LITERATURVERZEICHNISS	95

ACA	ϵ -Amino-n-capronsäure
AS	Acetosyringon (3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenon)
AMP, ADP, ATP	Adenosinmono-/di-/tri-phosphat
Bis-Tris	2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
BN-PAGE	blaue-native-Polyacrylamidgelelektrophorese
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin („bovine serum albumin“)
C-	Carboxy-
carb ^r	resistent gegen Carbenicillin
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltosid
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP, NTP	2'-Deoxyribonukleotid-5'-triphosphat, Nukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FA	Formaldehyd
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His ₆ -/H ₆ -	Hexahistidyl-
HMBPP	4-Hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyldiphosphat
iPMP	iso-Pentenyladenosin-5'-monophosphat
iPA	iso-Pentenyladenosin
iP	iso-Pentenyladenin
kan ^r	resistent gegen Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molar
MES	Morpholinethansulfonsäure
min	Minute
N-	Amino-
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pi, P _{Pi}	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
psi	„Pounds per square inch“
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp ^r	resistent gegen Spectinomycin
ss-	Einzelstrang-
str ^r	resistent gegen Streptomycin
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
T-DNA	„Transferred“-DNA
Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid von <i>A. tumefaciens</i>
Tricin	N-(2-Hydroxy-1,1-bis [hydroxymethyl] ethyl)glycin
Tris	N,N,N-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
upm	Umdrehungen pro Minute
Vir, <i>vir</i>	Virulenzprotein, Virulenzgen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galaktopyranosid
ZMP	Zeatinribosid-5'-monophosphat
ZR	Zeatinribosid
Z	<i>trans</i> -Zeatin

Nukleotidbasen:

A	Adenin	C	Cytosin
G	Guanin	T	Thymidin

Aminosäuren:

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Aspartat	P	Prolin
E	Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Publikationen aus der Arbeit

Krall, L., Wiedemann, U., Unsin, G., Weiss, S., Domke, N., Baron, C. (2002) Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11405-11410

Krall, L., Raschke, M., Zenk, M.H., Baron, C. (2002) The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl-diphosphate and AMP. *FEBS Lett.* 527: 315-318

Kooperationen

Dr. Friedrich Lottspeich

Max-Planck-Institut für Biochemie
Protein-Analytics
Am Klopferspitz
D-82152 Martinsried
Germany

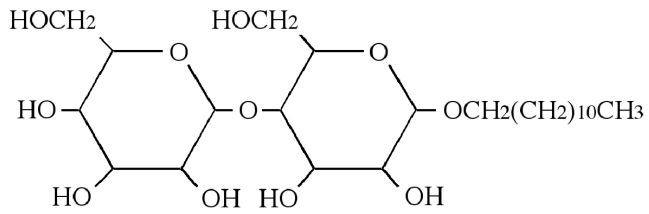
Prof. Dr. Meinhard H. Zenk

Biozentrum – Pharmazie
Universität Halle
Weinbergweg 22
06120 Halle / Saale
Germany

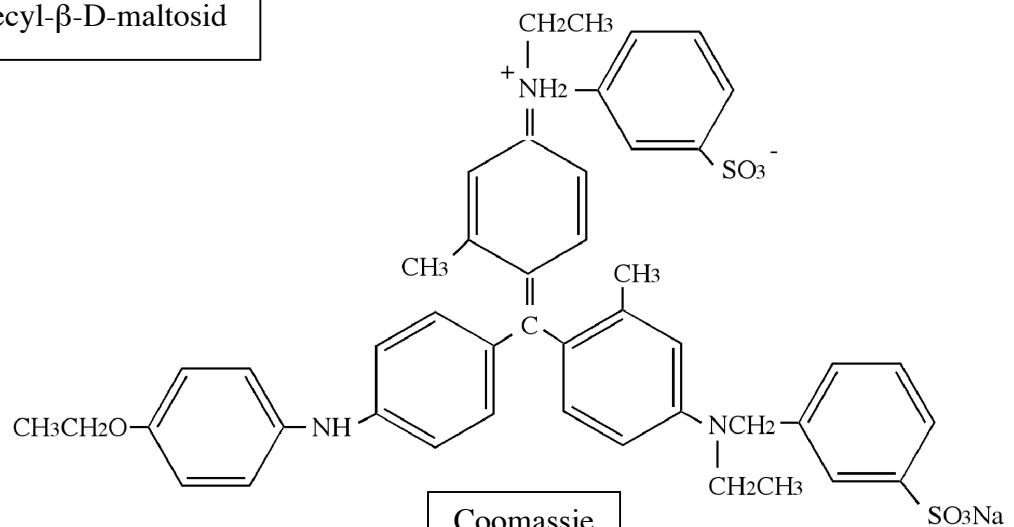
Dr. Annette C. Vergunst

Ag. Prof. Dr. P.J.J. Hooykaas
Institute of Molecular Plant Sciences
Leiden University
Wassenaarseweg 64
2333 AL Leiden
The Netherlands

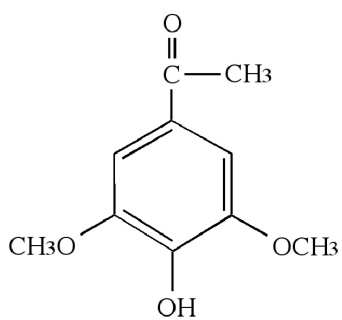
Strukturformeln



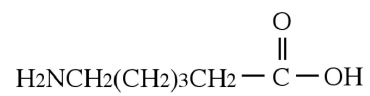
n-Dodecyl-β-D-maltosid



Coomassie



Acetosyringon



ε-Amino-n-capronsäure

1. EINLEITUNG

1.1. Gentransfer aus *Agrobacterium tumefaciens* in Pflanzen

Agrobacterium tumefaciens ist ein Gram-negatives, fakultativ phytopathogenes Bodenbakterium, das bevorzugt dikotyle Pflanzen infiziert. Mechanische Beschädigungen des Pflanzenkörpers sind Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion, in deren Verlauf ein Teil der bakteriellen DNA in die pflanzliche Zelle transferiert und dort in das Genom integriert wird (Zhu *et al.* 2000). Durch Expression der auf der transferierten DNA kodierten Onkogene wird der Phytohormonhaushalt der Pflanzenzelle gestört. Es entstehen charakteristische, meist im Übergangsbereich von Wurzelstock zu Trieb auftretende, Gewebewucherungen („Wurzelhalsgallenkrankheit“). Diese setzen den Nährstofffluss in der Pflanze herab und führen unter anderem im Nuss-, Obst- und Weinbau zu erheblichen Ernteaussfällen. Der Transfer der T-DNA erfolgt über ein Typ IV-Sekretionssystem. Er ist der bakteriellen Konjugation sehr ähnlich und der bislang einzige bekannte Fall einer Genübertragung von einem Prokaryonten auf einen Eukaryonten (Christie 2001, Stachel und Zambryski 1989).

1.1.1. Ti-Plasmid („tumor inducing plasmid“)

Die zu transferierende DNA (T-DNA) ist ein Teil des 200 kb großen Ti-Plasmids (Winans 1992). Auf diesem Plasmid liegen auch die für Prozessierung und Transfer der T-DNA benötigten Virulenzgene in 8 Operonen (VirA-H), die im Vir-Regulon zusammengefasst werden. Die Genprodukte der Vir-Operone VirA, VirB, VirD und VirG sind essentiell für die Tumorbildung, während VirC und VirE die Effizienz und VirF und VirH das Wirtsspektrum beeinflussen (Hooykaas und Beijersbergen 1994, Kalogeraki und Winans 1998). Die Expression der Virulenzgene wird durch ein 2-Komponentensystem (VirA/VirG) kontrolliert (Stachel und Zambryski 1986 a). Als Induktoren des Vir-Systems dienen im pflanzlichen Wundsekret auftretende phenolische Substanzen (zB. Acetosyringon), Monosaccharide und ein niedriger pH-Wert (Stachel *et al.* 1985, Winans 1992). Sie werden von der in der inneren Membran lokalisierten Sensor kinase VirA mit Unterstützung des Monosaccharid-bindenden ChvE (Cangelosi *et al.* 1990) detektiert. VirA autophosphoryliert (Jin *et al.* 1990 a) und überträgt die Phosphatgruppe auf den zytoplasmatischen Transkriptionsaktivator VirG (Jin *et*

al. 1990 b), der seinerseits durch Bindung an die den Vir-Operonen vorgeschalteten *vir*-Boxen (12 bp) die Transkription der Virulenzgene induziert (Jin *et al.* 1990 c).

1.1.2. T-DNA („transferred DNA“)

Die zu transferierende DNA (T-DNA) wird von spezifischen 25 bp-Sequenzen flankiert (Wang *et al.* 1987). Bei Induktion des Vir-Systems bindet ein aus VirD1 (Topoisomerase) und VirD2 (Relaxase) (Scheffele *et al.* 1995) bestehender Komplex mit Unterstützung von VirC1 (Toro *et al.* 1989) an diese „border“-Sequenzen und setzt mittels Strangbruch den dazwischen liegenden DNA-Abschnitt in Form eines Einzelstranges frei (Stachel *et al.* 1986 b). VirD2 bleibt dabei kovalent mit dem 5'-Ende der freigesetzten DNA verbunden (T-Komplex) und wird anschließend gemeinsam mit dieser in die Pflanzenzelle transferiert (Ward und Barnes 1988). Im Zytoplasma der Pflanzenzelle lagert sich das unabhängig von der T-DNA transferierte Einzelstrang-DNA-bindende VirE2 an den T-Komplex an (Gelvin 1998, Christie *et al.* 1988). Eukaryontische Kernlokalisierungssequenzen in VirE2 und VirD2 vermitteln dann den Transfer der T-DNA in den Nukleus (Citovsky *et al.* 1992, Howard *et al.* 1992), wo mittels illegitimer Rekombination die Integration ins Genom erfolgt (Gheysen *et al.* 1991, Mayerhofer *et al.* 1991). Mit der T-DNA werden Gene übertragen, die für Enzyme der Auxin- und Cytokinin-Biosynthese kodieren. Die Transkription dieser Onkogene führt zu Veränderungen des Phytohormonhaushalts und zu unkontrollierten Zellteilungen. Das entstehende Tumorgewebe sekretiert Opine (Konjugate aus Aminosäuren und α -Ketosäuren), die *A. tumefaciens* als C- und N-Quelle dienen und von den meisten anderen Bodenorganismen nicht verwertet werden können. Die Gene der Opin-Synthese werden ebenfalls mit der T-DNA transferiert, während die Gene für Opin-Aufnahme und Verwertung auf dem nicht transferierten Teil des Ti-Plasmids liegen. Je nach sekretiertem Opin unterteilt man die Ti-Plasmide in verschiedene Gruppen, wie zum Beispiel in den Nopalin- (Arginin + α -Ketoglutarat) und Octopin- (Arginin + Pyruvat) Typ (Hooykaas und Beijersbergen 1994).

Jede beliebige DNA-Sequenz, die von den entsprechenden 25 bp Sequenzen flankiert wird, kann vom Vir-System prozessiert und transferiert werden (Miranda *et al.* 1992, Hamilton *et al.* 1996). Der Austausch der Onkogene durch Fremd-DNA ermöglichte damit die gezielte Transformation agrarökonomisch relevanter Pflanzensorten und bildete den Grundstein für die Entwicklung der heutigen Pflanzenbiotechnologie (Binns 2002). Inzwischen konnten sowohl dikotyle wie monokotyle Pflanzen (Ishida *et al.* 1996, Potrykus

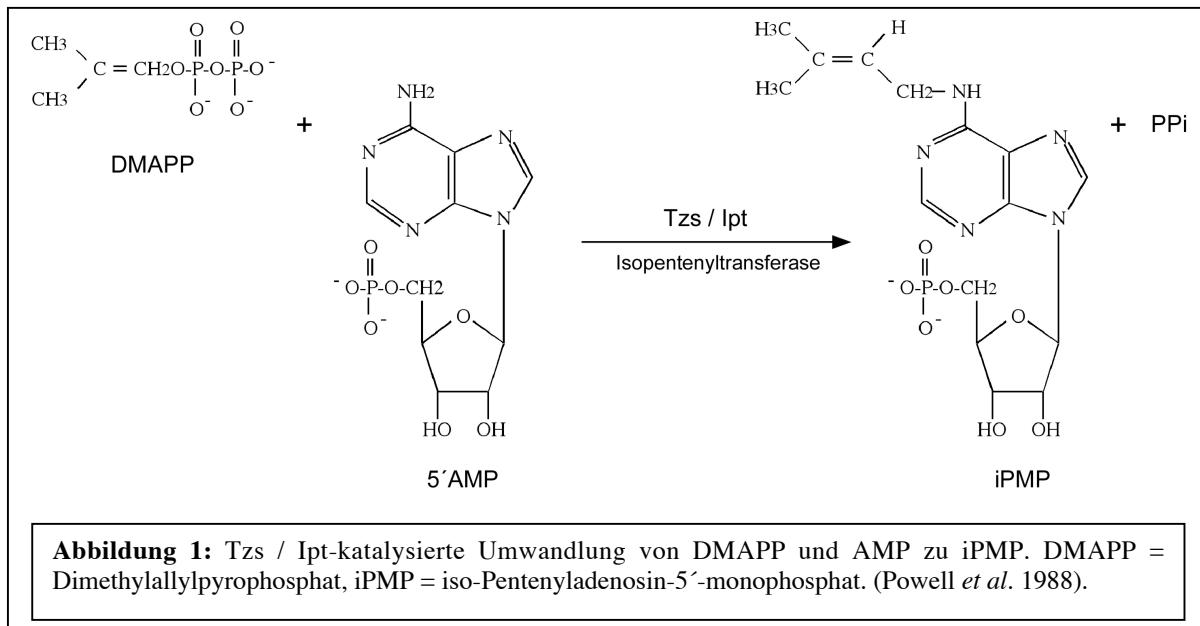
2001), als auch *Saccharomyces cerevisiae* (Bundock *et al.* 1995, Bundock und Hooykaas 1996), filamentöse Pilze (de Groot *et al.* 1998) und möglicherweise auch humane Zellen (Kunik *et al.* 2001) unter Verwendung von *A. tumefaciens* transformiert werden.

1.1.3. Onkogene

Zu den mit der T-DNA in die Pflanzenzelle transferierten Onkogenen zählen *iaaM*, *iaaH*, *Gen5*, *Gen6b* und *ipt (tmr)* (Ziemienowicz 2001). Sie tragen eukaryontische Merkmale wie TATA und CAAT Boxen, transkriptions-aktivierende Sequenzen und Polyadenylierungs-Sequenzen und können dadurch in der Pflanzenzelle transkribiert werden. Die Genprodukte von *iaaM* und *iaaH* katalysieren die Umformung von Tryptophan über Indolacetamid zu Indolacetat (Auxin). Das *Gen5*-Produkt katalysiert die Synthese des Auxin-Antagonisten Indol-3-Laktat und das *Gen6b*-Produkt erhöht durch einen unbekanntem Mechanismus die Sensitivität der Pflanzenzelle gegenüber Phytohormonen.

1.1.3.1. *ipt* und *tzs*

Das Onkogen *ipt* ist ebenfalls Bestandteil der T-DNA und befindet sich auf allen bekannten Ti-Plasmiden. Zu *ipt* existiert jedoch ein homologes Gen, *tzs*, welches nur in Ti-Plasmiden des Nopalin-Typs auftritt und dort außerhalb der T-DNA in der Vir-Region liegt (Regier und Morris 1982). Während *ipt* erst nach Transfer in der Pflanzenzelle transkribiert wird und dort maßgeblich an der Entstehung der Tumore beteiligt ist, untersteht *tzs* der Kontrolle von VirA/VirG und wird bei Virulenzgen-Induktion in der bakteriellen Zelle transkribiert (Powell *et al.* 1988, John und Amasino 1988). Gemäß Literaturangaben besitzen sowohl Ipt, wie auch Tzs eine Isopentenyltransferase-Aktivität und katalysieren die Bildung von isopentenyladenosin-5'-monophosphat (iPMP) aus Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und AMP (Akiyoshi *et al.* 1984, Beaty *et al.* 1986, Powell *et al.* 1988) (Abbildung 1). iPMP dient als Vorstufe in der Biosynthese von Phytohormonen des Cytokinin-Typs, zu denen unter anderem *trans*-Zeatin zählt.



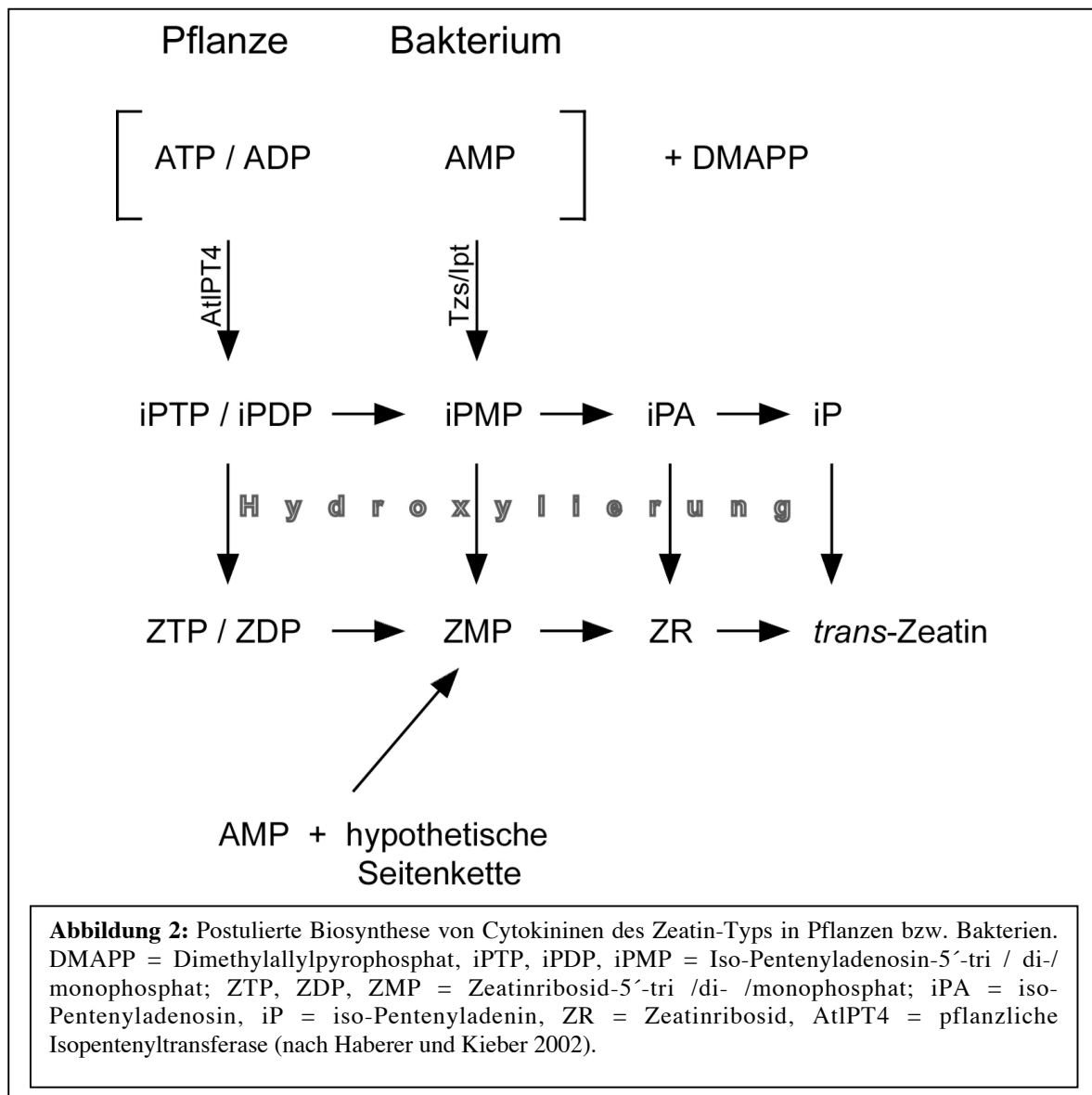
Untersuchungen zeigten, dass die Expression von Tzs mit der Sekretion von *trans*-Zeatin (Z) und Zeatinribosid (ZR) einhergeht, wohingegen nur geringe Mengen der iPMP-Derivate iso-Pentenyladenosin (iPA) und iso-Pentenyladenin (iP) in den Kulturüberständen virulenzgen-induzierter *A. tumefaciens* (Nopalalin-Typ) detektiert werden konnten (Regier und Morris 1982, Powell *et al.* 1988, Akiyoshi *et al.* 1985 und 1987). Für die Umwandlung von iPMP zu Zeatinribosid-5'-monophosphat (ZMP), Zeatinribosid (ZR) und *trans*-Zeatin (Z) wurden unspezifische Hydroxylierungs-Reaktionen verantwortlich gemacht (Powell *et al.* 1988) (Abbildung 2).

Die Funktion von Tzs ist unklar, da auch Plasmide, die das korrespondierende Gen nicht tragen, über alle notwendigen Informationen für einen erfolgreichen Gentransfer verfügen. Es wurde daher vermutet, dass Tzs eine unterstützende Rolle im Infektionsprozess einnimmt und durch die Synthese und Sekretion des Phytohormons *trans*-Zeatin die Pflanzenzellen zur Teilung anregt. Schnell teilende Pflanzenzellen weisen die höchste Effizienz bei Transformation mit *A. tumefaciens* auf (An 1985).

1.1.3.2. Cytokinin-Biosynthese

iPMP, iPA, iP sowie ZMP, ZR und *trans*-Zeatin gehören zur Klasse der Cytokinine. Cytokinine sind N⁶-substituierte Adenin-Derivate, deren Aminogruppe in Position 6 oft eine isoprenoide Seitenkette trägt (Haberer und Kieber 2002). Sie beeinflussen die Zellteilung,

Differenzierung, und Seneszenz pflanzlicher Zellen. Eine Erhöhung der Cytokinin-Konzentration führt zu einer vermehrten Zellteilung und zu verzögerter Seneszenz. Pflanzliche Isopentenyltransferasen setzen DMAPP bevorzugt mit ATP oder ADP zu iPMP um. In Pflanzen wird die Bildung von iPMP als der die Cytokinin-Biosynthese limitierende Schritt angesehen (iPMP-abhängige Cytokinin-Biosynthese). Eine Gegenüberstellung der postulierten pflanzlichen und bakteriellen Cytokinin-Biosynthese ist in Abbildung 2 gezeigt.



1.1.3.3. Isoprenoid-Biosynthese

Das für die Biosynthese von Phytohormonen des Cytokinin-Typs benötigte DMAPP leitet sich aus der Isoprenoid-Biosynthese ab (Abbildung 3).

Zusätzlich zum klassischen Mevalonat-Weg der Isoprenoid-Biosynthese existiert auch ein alternativer, Mevalonat-unabhängiger Synthese-Weg. Dieser wird als Deoxyxylulose-Phosphat (DXP)-Weg bezeichnet und ist in Gram-negativen Bakterien und Chloroplasten zu finden (Eisenreich *et al.* 1998, Rohdich *et al.* 2001). Der Mevalonat-Weg hingegen tritt in Gram-positiven Bakterien und Eukaryonten auf. Beide Biosynthese-Wege sind in Abbildung 3 gegenübergestellt (**A**: Deoxyxylulose-Phosphat (DXP)-Weg, nach Rohdich *et al.* 2001, modifiziert; **B**: Mevalonat-Weg, nach „Biochemie der Pflanzen“, Gerhard Richter, Thieme Verlag). Die Analyse des Gesamtgenoms zeigt, dass *A. tumefaciens* C58 als Gram-negativer Mikroorganismus über die Enzyme des DXP-Weges, nicht jedoch die des Mevalonat-Weges verfügt (Wood *et al.* 2001).

1.1.4. Transferierte Protein-Substrate

Zusätzlich zur T-DNA werden die Vir-Proteine VirD2, VirE2, VirE3 und VirF in die Pflanzenzelle transferiert. Ein konserviertes C-terminales Arg-Pro-Arg Motiv dient dabei vermutlich der Erkennung durch den VirB/D4-Transporter (Schrammeijer *et al.* 2003, Vergunst *et al.* 2000). VirD2 ist kovalent mit der T-DNA verbunden und wird gemeinsam mit dieser transferiert. Der Transfer der Virulenzproteine VirE2, VirE3 und VirF erfolgt jedoch unabhängig von dem der T-DNA (Otten *et al.* 1984, Citovsky *et al.* 1992).

Da jede beliebige DNA-Sequenz transferiert werden kann, müssen die für den Transfer des T-Komplexes benötigten Informationen in **VirD2** (56 kDa) vorliegen. VirD2 besitzt zudem zwei Kernlokalisierungssequenzen (NLS) die dem Transfer der T-DNA in den Nukleus dienen (Howard *et al.* 1992). AtKAP α (*Arabidopsis thaliana* Karyopherin α) interagiert mit der C-terminalen NLS von VirD2. Es vermittelt den Import der T-DNA durch die Kernporen des Zellkerns (Ballas und Citovsky 1997). VirD2 kann mit sich selbst und mit VirD1 interagieren. Inwieweit diese Interaktion von physiologischer Bedeutung ist, ist jedoch unklar (Relic *et al.* 1998).

Das sequenz-unspezifische, Einzelstrang-DNA-bindende **VirE2** (60 kDa) lagert sich erst im Zytoplasma der Pflanzenzelle an die T-DNA an und schützt sie vor Abbau durch Nukleasen (Christie *et al.* 1988, Citovsky *et al.* 1989). Für den Transfer von VirE2 in die Pflanzenzelle ist VirE1 von Nöten. VirE1 stabilisiert VirE2 und verhindert als Chaperon dessen Aggregation zu unfunktionellen Komplexen (Sundberg *et al.* 1996). Jeweils zwei VirE1

Moleküle binden dabei ein VirE2-Molekül (Sundberg und Ream 1999). Die Bindedomäne entspricht gleichzeitig der ss-DNA-Binde-Domäne von VirE2, so dass durch die VirE1-VirE2 Interaktion vermutlich auch eine vorzeitige Bindung der T-DNA in der bakteriellen Zelle verhindert wird (Sundberg *et al.* 1999, Zhao *et al.* 2001). VirE2-ssDNA Komplexe haben einen Durchmesser von weniger als 2 nm und sind unter physiologischen Bedingungen stabil (Citovsky *et al.* 1989, Ruvola *et al.* 1991). Die Interaktion mit VirE2 streckt die ss-DNA, verdeckt negative Ladungen und verhindert die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die einen Transport durch die Kernporen in den Nukleus der Empfängerzelle stören könnten. VirE2 wird ebenso wie VirD2 für den Import der T-DNA in den pflanzlichen Zellkern benötigt. Inwieweit NLS-Sequenzen von VirE2 dabei von Bedeutung sind ist unklar, da das ss-DNA-bindende Protein RecA VirE2 im nuklären Import ersetzen kann (Ziemienowicz *et al.* 2001). RecA besitzt keine NLS-Sequenzen. Tzfira *et al.* (2001) konnten zeigen, dass VirE2 spezifisch mit dem *Arabidopsis* VIP1-Protein interagiert. VIP1 ist vermutlich an der Transkription chromosomaler DNA beteiligt. Es könnte VirE2 an eine günstige Stelle für die Integration des T-Komplexes ins Genom führen. Der Transfer des T-Komplexes aus der bakteriellen Zelle heraus findet auch in Abwesenheit von VirE2 statt (Ottens *et al.* 1984, Citovsky *et al.* 1992). VirE2 könnte jedoch durch Insertion in die Membran und Ausbildung von Poren am Transfer der T-DNA über die Barriere der pflanzlichen Zellmembran hinweg beteiligt sein (Dumas *et al.* 2001). Die von Dumas *et al.* (2001) beschriebenen anionen-spezifischen VirE2-Kanäle erlauben den Transfer von ss-DNA, nicht aber den von ds-DNA und sind bei dem in pflanzlichen Zellen vorherrschenden Membranpotential von 100-250 mV geschlossen. Es ist jedoch unklar, inwieweit die beschriebenen VirE2-Kanäle für den Infektionsprozess von Bedeutung sind.

VirF (22 kDa) ist spezifisch für Octopin-Typ Ti-Plasmide (Melchers *et al.* 1990, Jarchow *et al.* 1991). Es ist hydrophil und interagiert über eine „F-Box“ mit dem pflanzlichen Homologen des Hefe Skp1 Proteins (Schrammeijer *et al.* 2001). Skp1 und F-Box Proteine sind Untereinheiten der SCF-Komplexe, die Proteine für die von Ubiquitin vermittelte Proteolyse markieren (Skowyra *et al.* 1997). VirF könnte die Proteolyse eines bestimmten Pflanzenproteins verursachen und somit den T-DNA Transfer erleichtern. Eine Deletion von *virF* führt bei einigen Wirtspflanzen zu einem attenuierten Phänotyp, der durch eine gleichzeitige Deletion von *virE3* verstärkt wird. Über die Funktion von **VirE3** (75 kDa) ist ansonsten nichts bekannt (Schrammeijer *et al.* 2003).

1.1.5. VirB/D4-Transmembrankomplex

Um den Transfer des VirD2-T-DNA-Komplexes und der Virulenzproteine VirE2, VirE3 und VirF in das Zytoplasma der Pflanzenzelle gewährleisten zu können, müssen die im *virB*-Operon kodierten 12 Vir-Proteine VirB1-B11 und VirD4 zu einem die innere und äußere Zellmembran durchspannenden Proteinkomplex und einem Pilus (T-Pilus) assemblieren. Ein Schema des VirB/D4-Transmembrankomplexes ist in Abbildung 4 gezeigt.

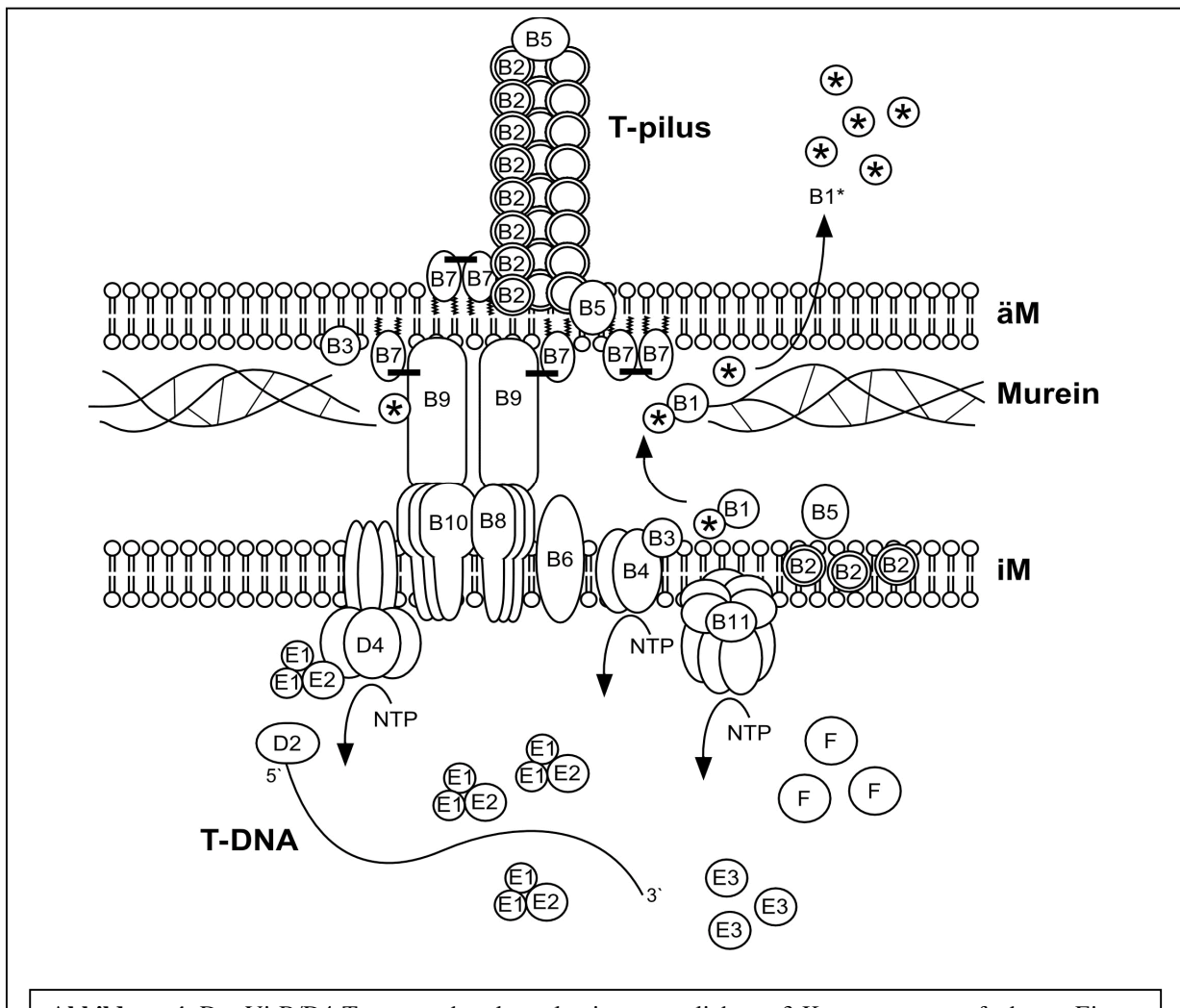


Abbildung 4: Der VirB/D4-Transmembrankomplex ist vermutlich aus 3 Komponenten aufgebaut: Einem die innere und äußere Membran durchspannenden Kernkomplex (VirB7-VirB9, VirB8, VirB10), dem T-Pilus (VirB2, VirB5, VirB7-VirB7) und den energieliefernden NTPasen (VirB4, VirB11, VirD4). VirB1 erleichtert vermutlich durch lokale Lyse des Mureins die Assemblierung der Transporterstruktur. Der VirB/D4-Komplex transferiert die Substrat-Proteine VirE2, VirE3, VirF und den T-Komplex (kovalent mit der T-DNA verbundenes VirD2) ins Zytoplasma der pflanzlichen Zielzelle. äM = äußere Membran, iM = innere Membran.

VirB1 (26 kDa) ist als einziges VirB-Protein nicht essentiell für den Transfer der T-DNA. Eine Abwesenheit führt aber zu einer um das 100 bis 1000-fachen reduzierten Virulenz. VirB1 wird Sec-abhängig ins Periplasma transferiert, wo C-terminal 73 Aminosäuren abgespalten und als VirB1* ins umgebende Medium sekretiert werden. VirB1* interagiert mit VirB9 und könnte durch seine lockere Assoziation mit der äußeren Zellhülle am Kontakt mit der Pflanzenzelle beteiligt sein (Baron *et al.* 1997 a). Bakterielle Zellen werden von einem Peptidoglykan-Netzwerk stabilisiert, das die Diffusion von Molekülen bis zu 50 kDa zulässt (Dijkstra und Keck 1996). Für die Assemblierung membran-durchspannender Strukturen werden daher oft lytische Transglykosylasen für eine zeitlich und räumlich begrenzte Lyse des Peptidoglykans benötigt (Mushegian *et al.* 1996). Im agrobakteriellen VirB/D4-System wird diese Funktion vermutlich von VirB1 ausgefüllt, da die N-terminalen 172 Aminosäuren von VirB1 Sequenzähnlichkeiten zu lytischen Transglykosylasen aufweisen. Sie sind nach erfolgter Prozessierung nicht mehr detektierbar und werden vermutlich rasch abgebaut (Llosa *et al.* 2000). Lytische Transglykosylasen spalten die β -1,4 glykosidische Bindung zwischen N-Acetyl-Muraminsäure und N-Acetyl-Glucosamin unter Bildung einer 1,6 Anhydridbindung in N-Acetyl-Muraminsäure (Höltje *et al.* 1975). VirB1 interagiert mit VirB8, VirB4, VirB10 und VirB11 (Ward *et al.* 2002). Da VirB8 vermutlich als Nukleationszentrum während der Assemblierung des VirB/D4-Transmembrankomplexes dient, könnte durch die VirB1-VirB8 Interaktion die von VirB1 katalysierte Lyse des Peptidoglykans auf den von der entstehenden Multiproteinstruktur benötigten Raum begrenzt werden.

VirB7, VirB8, VirB9 und **VirB10** sind die **Kernkomponenten** des VirB/D4-Transmembrankomplexes und bilden vermutlich eine Pore für den Durchtritt von Makromolekülen. **VirB8** (26 kDa) und **VirB10** (48 kDa) durchspannen mit einem Transmembransegment die innere Membran und besitzen eine kleine zytoplasmatische und eine große periplasmatische Domäne (Thorstenson und Zambryski 1994, Ward *et al.* 1990). **VirB9** (32 kDa) ist ein hydrophiles, periplasmatisch lokalisiertes Protein, das über eine Disulfidbrückenbindung mit dem Lipoprotein VirB7 in der äußeren Membran verankert ist (Anderson *et al.* 1996). VirB8 akkumuliert an wenigen lokal begrenzten Stellen der Zellmembran und dient vermutlich als Nukleationszentrum für die Assemblierung von VirB7-VirB9 und VirB10 zu einem Proteinkomplex (Kumar *et al.* 2000, Kumar und Das 2001). Pro *A. tumefaciens*-Zelle wurden dabei im Durchschnitt 3-8, oft in der Nähe des Zellpols auftretende VirB8-Foci beobachtet (Kumar *et al.* 2000). VirB8, VirB9, und VirB10 interagieren paarweise miteinander, wobei

die Interaktionen über die periplasmatischen Domänen der Proteine erfolgen. Alle drei bilden auch höhermolekulare Oligomere (Ward *et al.* 1990, Das und Xie 2000, Kumar *et al.* 2000, Kumar und Das 2001). VirB7 interagiert mit VirB9, jedoch nicht mit VirB8 oder VirB10. Durch die kovalente Verknüpfung mit VirB9 ist VirB7 dennoch höchst wahrscheinlich ebenfalls ein fester Bestandteil der Kernpore (Das und Xie 2000). VirB7 stabilisiert VirB9 (Fernandez *et al.* 1996 b), VirB9 wiederum stabilisiert VirB10 und unterstützt die Bildung von VirB10 Oligomeren (Beaupre *et al.* 1997). VirB8 wird weder für die Bildung von VirB7-VirB9 noch der VirB10 Oligomere benötigt (Beaupre *et al.* 1997).

VirB6 (32 kDa) ist das am stärksten hydrophobe VirB-Protein und durchspannt vermutlich mit 6 Transmembransegmenten die innere Membran. Es wurde angenommen, dass VirB6 eine Pore in der inneren Membran für den Durchlass der zu transferierenden Substrate bildet. Neueren Erkenntnissen zu Folge wird diese Funktion jedoch wahrscheinlich von VirD4 erfüllt (Atmakuri *et al.* 2003). VirB6 stabilisiert VirB5 und VirB3 und ist für die Bildung von VirB7-VirB7-Homodimeren nötig (Hapfelmeier *et al.* 2000). Es könnte durch die Interaktionen mit den Pilus-Komponenten VirB5 und VirB7 an der T-Pilus-Biosynthese beteiligt sein (Hapfelmeier *et al.* 2000). Jakubowski *et al.* (2003) fanden zusätzlich Hinweise für eine Interaktion von VirB6 mit VirB7-VirB9.

Der **T-Pilus** wird von **VirB2**, **VirB5** und **VirB7** gebildet. VirB2 ist die Hauptkomponente, während VirB5 und VirB7 Nebenkomponten darstellen (Lai und Kado 1998, Schmidt-Eisenlohr *et al.* 1999 b, Sagulenko *et al.* 2001 a). T-Pili treten meist an einem der beiden Zellpole auf. Sie bilden Filamente mit einem äußeren Durchmesser von 10 nm. Harrington und Rogerson (1990) postulierten den Transfer von DNA durch den F-Pilus des konjugativen F-Plasmids. Hinweise für einen Transfer der T-DNA durch den T-Pilus fehlen. Da *A. tumefaciens* oft in polarer Weise an Pflanzenzellen bindet, ist aber zumindest eine Beteiligung der T-Pili an der Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle sehr wahrscheinlich (Matthysse 1987, Lai und Kado 2000 a). **VirB2** wird als 12,3 kDa-Propilin Sec-abhängig über die innere Membran transferiert. Signalpeptidase I spaltet dabei ein N-terminales Signalpeptid von 47 Aminosäuren ab. Zwei Transmembranbereiche verankern das hydrophobe Protein in der inneren Membran, wobei C- und N-Terminus vermutlich der periplasmatischen Seite zugewandt sind. Ein chromosomal kodiertes Enzym zirkularisiert VirB2 durch Einbringung einer Peptidbindung zwischen Gln48 und Gly121 (Eisenbrandt *et al.* 1999). Die Zirkularisierung des VirB2-Pilins schützt den T-Pilus vor Abbau durch Proteasen und erhöht

die Widerstandsfähigkeit gegenüber denaturierenden Faktoren im extrazellulären Milieu (Lai und Kado 2000 a, Eisenbrandt *et al.* 1999). Das zirkuläre VirB2-Pilin (7,2 kDa) akkumuliert bis zur Assemblierung in den T-Pilus vermutlich in der inneren Membran (Shirasu und Kado 1993). VirB2 bildet mittels Disulfidbrückenbindung VirB2-VirB2 Dimere und interagiert mit VirB7 (Sagulenko *et al.* 2001 a). Über Interaktionen mit anderen Vir-Proteinen ist nichts bekannt. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass Protein-Protein-Interaktionen am Transfer von VirB2 aus der inneren zur äußeren Membran und der Assemblierung in den T-Pilus beteiligt sind. Da VirB2 zusammen mit VirB5 und VirB7 in den T-Pili detektiert wird, ist zumindest eine Interaktion dieser drei Proteine wahrscheinlich. **VirB5** (23,5 kDa) wird über ein N-terminales Signalpeptid ins Periplasma transferiert. Es ist hydrophil, assoziiert jedoch größtenteils mit der Membran, vermutlich auf Grund von Protein-Protein-Interaktionen mit anderen membran-gebundenen Vir-Proteinen oder periplasmatischen Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes (Schmidt-Eisenlohr *et al.* 1999 b). Kristallstrukturanalysen des VirB5-homologen TraC (IncN-Plasmid, pKM101) zeigten ein Bündel aus drei langen α -Helices mit einer flexiblen globulären Domäne aus 4 kurzen α -Helices (Yeo *et al.* 2003). VirB5 könnte aufgrund von Sequenzähnlichkeiten eine ähnliche Struktur besitzen. Da dieses Strukturmotiv jedoch weit verbreitet ist, lassen sich daraus keine Rückschlüsse auf seine Funktion ableiten. VirB5 könnte eine integrale Komponente des T-Pilus sein, als Adhäsion der Erkennung von Wirtszellen dienen, oder den T-Pilus im VirB/D4-Transmembrankomplex verankern. Ebenso wäre es möglich, dass VirB5 als Chaperon oder „Usher“ den Einbau der VirB2-Piline in den T-Pilus unterstützt und aufgrund der nur transienten Bindung trotz periplasmatischer Lokalisierung zusammen mit diesem isoliert wird (Sauer *et al.* 2000). „Usher“ bilden Poren, die den Transfer von Pilus-Untereinheiten über die äußere Membran hinweg, sowie deren anschließende Assemblierung in Pili erlauben. **VirB7** (4,5 kDa) ist ein periplasmatisch lokalisiertes Lipoprotein. Es wird von Signalpeptidase II prozessiert und über Lipidmodifikationen in der äußeren Membran verankert. VirB7 hat 2 Cysteine, von denen Cys 15 der Lipidmodifikation und Cys 24 der Bildung von VirB7-VirB7-Homodimeren (9 kDa) bzw. VirB7-VirB9-Heterodimeren (36 kDa) mittels Disulfidbrücken dient (Baron *et al.* 1997 b, Fernandez *et al.* 1996 a, Spudich *et al.* 1996). VirB7 und VirB7-VirB7 werden sowohl in der Zelle als auch zusammen mit VirB2 und VirB5 in den T-Pili detektiert (Sagulenko *et al.* 2001 a), während VirB7-VirB9 im Periplasma lokalisiert und dort andere Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes stabilisiert (Fernandez *et al.* 1996 b, Beaupre *et al.* 1997). Eine Deletion von *virB7* führt zu stark

reduzierten Mengen von VirB9 und zu einer Reduktion von VirB4, VirB10 und VirB11 (Berger und Christie 1994). VirB7-VirB7 ist kein Zwischenprodukt in der Biosynthese des VirB7-VirB9-Heterodimers und hat im Gegensatz zu diesem auch keinen stabilisierenden Einfluss auf die Akkumulation anderer VirB-Proteine (Sagulenko *et al.* 2001 a). VirB7-VirB7 könnte der Verankerung des T-Pilus im VirB/D4-Transmembrankomplex dienen.

Die **ATPasen VirB4, VirB11 und VirD4** liefern vermutlich die für die Assemblierung des VirB/D4-Transmembrankomplexes und den Substrat-Transfer benötigte Energie. **VirB4** (87 kDa) ist das größte VirB-Protein. Es verfügt über zwei periplasmatische und drei zytoplasmatische Domänen, sowie ein Walker A NTP-bindungs-Motiv (Berger und Christie 1993). Vier hydrophobe Bereiche verankern es in der inneren Membran, jeweils unterbrochen von einer oder mehreren geladenen Aminosäuren, die durch die Ausbildung von Ionen-Paaren zu einer Interaktion mit anderen integralen Membranproteinen beitragen könnten (Fullner *et al.* 1994, Dang und Christie 1997). VirB4 bildet Dimere, eventuell auch Homooligomere und besitzt eine schwache ATPase-Aktivität (Shirasu *et al.* 1994). Ward *et al.* (2002) fanden Interaktionen von VirB4 mit VirB8, VirB10 und VirB11. VirB4 stabilisiert zudem **VirB3** (11 kDa) und unterstützt dessen Assoziation mit der äußeren Membran (Jones *et al.* 1994). Die Funktion von VirB3 ist unbekannt. Seine Lokalisation in der äußeren Membran legt jedoch nahe, dass es an der Assemblierung des T-Pilus beteiligt sein könnte. **VirB11** (38 kDa) verfügt über ein Walker A- und ein Walker B-Motiv (NTP-bindungs-Stellen). Es weist keine durchgehend hydrophoben Bereiche auf, die lang genug für eine die Membran durchspannende α -Helix wären, assoziiert aber dennoch mit der inneren Membran (Rashkova *et al.* 1997). Analysen von HP0525 (*H. pylori*), TrwD (R388-Plasmid) und TrbB (RP4-Plasmid) ergaben, dass die drei VirB11-homologen Proteine hexamere Ringe ausbilden, die durch die Bindung von ATP stabilisiert werden. Vermutlich bildet VirB11 ähnliche hexamere Ringe aus. Die Bindung von ATP erhöht die Membran-Affinität von VirB11, während die NTPase-Aktivität vermutlich der beschleunigten Freisetzung von ATP, der Destabilisierung des Hexamers und der Regeneration eines NTP-freien und für einen neuen Zyklus zur Verfügung stehenden VirB11 Monomers dient (Savvides *et al.* 2003). Die NTPase-Aktivität von VirB11 lässt sich durch Zugabe von Phospholipiden erhöhen (Krause *et al.* 2000, Savvides *et al.* 2003), nicht aber durch die Zugabe von ss-DNA. Es wird daher angenommen, dass VirB11 nicht am Transfer der T-DNA beteiligt ist (Krause *et al.* 2000). VirB11 interagiert mit VirB7 und VirB9 (Ward *et al.* 2002), ist aber vermutlich nicht an der

Prozessierung des Lipoproteins VirB7, der Bildung des VirB7-VirB9-Heterodimers und dessen Transfer zur äußeren Membran, sowie an der Interaktion von VirB7-VirB9 mit VirB8 und VirB10 beteiligt (Fernandez *et al.* 1996 a). Eine Beteiligung von VirB11 an dem Transfer von VirB7-Monomeren und VirB7-VirB7-Homodimeren von der inneren zur äußeren Membran wurde postuliert (Sagulenko *et al.* 2001 b). VirB11 könnte somit eine Rolle bei der Assemblierung der T-Pili spielen. **VirD4** (73,5 kDa) verbindet als „coupling“-Protein die DNA-prozessierenden, zytoplasmatischen Komponenten des Vir-Systems (Relaxosom) mit dem T-DNA-transferierenden, VirB/D4-Transmembrankomplex. Die Assemblierung des T-Pilus findet auch ohne VirD4 statt, für den Transfer der Substrate ist VirD4 jedoch absolut essentiell. Atmakuri *et al.* (2003) konnten zeigen, dass VirD4 mit dem Substratprotein VirE2 interagiert, während Lanka *et al.* eine Interaktion zwischen TraG und TraI, den VirD4- bzw. VirD2-Homologen des RP4-Plasmids postulierten (zitiert in Baron *et al.* 2002). Zusätzlich gibt es Hinweise für eine VirD4-VirB10 Interaktion (Gilmour *et al.* 2003, Llosa *et al.* 2003). VirD4 ist an den Zellpolen lokalisiert (Kumar und Das 2002) und wird über zwei, durch einen kurzen periplasmatischen Bereich miteinander verbundene Transmembransegmente in der inneren Membran verankert. Auf seiner großen zytoplasmatischen Domäne befindet sich je ein Walker A- und Walker B-Motiv. Die Inaktivierung des Walker A-Motivs durch Substitution einzelner Aminosäuren hebt die polare Lokalisation von VirD4 auf und verhindert den Transfer von T-DNA. Das gleiche Phänomen wurde bei Deletion des periplasmatischen Bereiches zwischen den beiden Transmembransegmenten beobachtet (Kumar und Das 2002). Kristallstrukturanalysen des VirD4-homologen TrwB (IncW-Plasmid R388) zeigten, dass TrwB ringförmige, homohexamere Komplexe mit einem zentralen Kanal von 20 Å Durchmesser bildet, der auf der zytoplasmatischen Seite durch einen Kreis aus Asparagin-Resten verschlossen wird (Gomis-Rüth *et al.* 2001). Die VirD4-homologen Proteine TrwB (IncW-Plasmid), TraG (IncP-Plasmid), TraD (F-Plasmid) und HP0524 (*H. pylori*) binden ATP und sequenz-unspezifisch DNA (Moncalian *et al.* 1999, Schröder *et al.* 2002). VirD4 könnte durch ATP-Hydrolyse den Transfer der T-DNA katalysieren und diese dabei ähnlich wie DNA-Helikasen durch die von dem Hexamer gebildete Pore leiten (Singleton *et al.* 2000, Egelman 2001, Yu *et al.* 1996, Raney und Benkovic 1995).

1.2. Protein-Sekretionssysteme (Typ I-V)

Gram-negative Bakterien werden durch zwei Membranen von dem sie umgebenden Milieu abgegrenzt. Die Abgrenzung ist einerseits für die Funktionalität der Zelle unerlässlich, stellt jedoch andererseits eine Barriere für den Transfer höhermolekularer Biomoleküle dar. Um die Sekretion von Proteinen (z.B. Enzyme und Virulenzfaktoren) über die innere und äußere Membran und teilweise auch über die Membranen anderer Zellen hinweg gewährleisten zu können, entwickelten sich im Laufe der Zeit verschiedene Proteinsekretionsmaschinerien. Diese werden anhand von Sequenzähnlichkeiten ihrer Proteinkomponenten in 5 Typen eingeteilt (Salmond 1994). Ein Überblick über die 5 Typen (I-V) ist in Tabelle 1 gegeben.

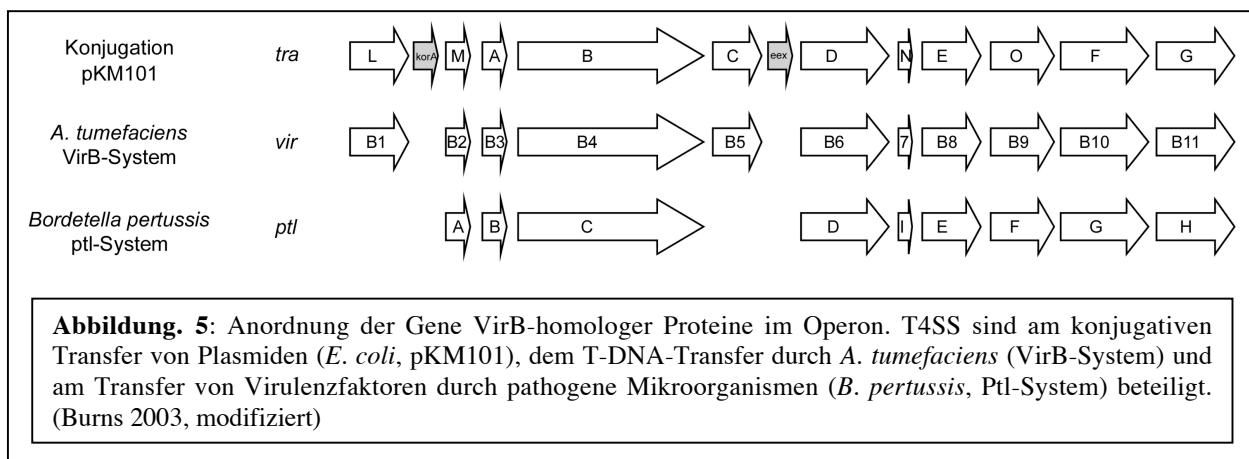
Tabelle 1: Sekretionssysteme Gram-negativer Bakterien (Lai und Kado 2000 a, modifiziert)

Sekretions-System	Transport-Mechanismus	Beispiele
Typ I	ABC-Transporter. <i>Sec</i> -unabhängiger Transfer aus dem Zytoplasma der Bakterienzelle ins umgebende Medium, 3-4 akzessorische Proteine.	Hämolyisin-Sekretion (<i>E. coli</i>)
Typ II	<i>Sec</i> -abhängiger Transfer ins Periplasma und Typ II-vermittelter Transfer über die äußere Membran, ca. 16 Proteine beteiligt.	Pullulanase-Sekretion (<i>Klebsiella oxytoca</i>)
Typ III	<i>Sec</i> -unabhängiger Transfer aus dem bakteriellen Zytoplasma in das Zytoplasma einer eukaryontischen Wirtszelle, Zell-Zell-Kontakt abhängig, > 20 Proteine bilden einen membran-durchspannenden Multiprotein-Komplex mit Pilus.	Yop-Sekretion (<i>Yersinia pestis</i>)
Typ IV	<i>Sec</i> -unabhängig, Transfer über zwei bakterielle Membranen und vermutlich auch über die der Zielzelle. Zell-Zell-Kontakt abhängig. 9-12 Proteine, membran-durchspannender Multiprotein-Komplex, in einigen Systemen Pilus nachgewiesen.	Transfer von Protein/ Protein-DNA-Komplexen (<i>A. tumefaciens</i> , bakterielle Konjugation), sowie Virulenzfaktoren (<i>Brucella suis</i> , u.A.)
Typ V	Autotransporter	IgA Proteasen

1.3. Typ IV-Sekretionssysteme

Zu den Typ IV Sekretionssystemen (T4SS) zählen der VirB/D4-Transporter von *A. tumefaciens*, die Systeme des konjugativen Transfers von bakteriellen Plasmiden mit

weitem Wirtsbereich (IncN, IncW, IncP und F-Plasmid), sowie die in human- und tierpathogenen Mikroorganismen (*Brucella* spp., *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Rickettsia prowazekii*) entdeckten T4SS (Cascales und Christie 2003). Neuen Studien zufolge könnten T4SS auch an der Aufnahme von DNA durch bakterielle Zellen beteiligt sein (Hofreuter *et al.* 2001). T4SS stellen verwandte Systeme dar, die sich aus einem gemeinsamen, vermutlich konjugativen System heraus entwickelt haben (Stachel und Zambryski 1986 c, Lessl und Lanka 1994, Winans *et al.* 1996). Die Verwandtschaft zeigt sich in Sequenzähnlichkeiten auf DNA und Proteinebene, der kollektiven Anordnung der beteiligten Gene in den Operonen (siehe Abbildung 5) und der Assemblierung membran-durchspannender Multiproteinkomplexe. T4SS transferieren Zell-Zell-Kontakt abhängig Proteine und / oder DNA-Protein-Komplexe in unterschiedlichste Rezipientenzellen (Bakterien, Pilze, Pflanzen, tierische Zellen). Trotz großer Unterschiede bezüglich der transferierten Substrate und Zielzellen, lässt die allgemeine Konservierung der beteiligten Komponenten auf Ähnlichkeiten in Transporterstruktur und Transfermechanismus schließen (Zupan *et al.* 2000).



1.3.1. Bakterielle Konjugation

Die bakterielle Konjugation dient dem Austausch genetischer Informationen und erfolgt durch die Übertragung eines Plasmids von einer Donor- auf eine Rezipientenzelle. Sie erleichtert die Adaptation an wechselnde Umweltbedingungen und ist unter Anderem für die rasche Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen innerhalb von Bakterienpopulationen verantwortlich (Waters 1999, Ochman und Jones 2000).

Der agrobakterielle T-DNA Transfer ist dem konjugativen Transfer von Plasmiden mit weitem Wirtsspektrum (IncP, IncN, IncW, F-Plasmid) sehr ähnlich. In beiden Fällen wird einzelsträngige DNA transferiert. Während es sich bei der bakteriellen Konjugation jedoch um eine Kopie des kompletten Plasmids handelt, die in der Empfängerzelle rezirkularisiert, wird im Fall von *A. tumefaciens* nur ein Teilstück des Ti-Plasmids transferiert, das anschließend in das Genom der Pflanzenzelle integriert. Die Ähnlichkeiten zwischen den an der bakterieller Konjugation bzw. dem T-DNA Transfer beteiligten Komponenten zeigen sich auf Ebene von DNA- und Aminosäuresequenz, sowie in der konservierten Anordnung der Gene in den Operonen (Lessl *et al.* 1992 a und b, Pohlman *et al.* 1994). Weitere Übereinstimmungen sind in der Prozessierung der DNA (Waters *et al.* 1991, Pansegrau *et al.* 1990 und 1993), sowie in Prozessierung und Struktur der Transporterkomponenten zu finden. Die Pili konjugativer IncP-Plasmide werden beispielsweise ebenso wie die T-Pili des VirB/D4-Systems aus zyklischen Untereinheiten aufgebaut (Eisenbrandt *et al.* 1999). Die funktionelle Konservierung der Systeme ist so hoch, dass Beijersbergen *et al.* (1992) der VirB/D4-vermittelte, konjugative Transfer des nicht selbst mobilisierbaren IncQ-Plasmids RSF1010 von *A. tumefaciens* in bakterielle Rezipientenzellen gelang. Zudem ist es möglich, DNA sowohl mittels bakterieller Konjugation als auch VirB/D4-abhängig in *Saccharomyces* spp. und tierische Zellen zu transferieren (Heinemann und Sprague 1989, Waters 2001).

1.3.2. Typ IV-Sekretionssysteme pathogener Mikroorganismen

In den letzten 10 Jahren wurden Typ IV-Sekretionssysteme auch in human- und tierpathogenen Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Brucella suis* (O'Callaghan *et al.* 1999), *H. pylori* (Odenbreit *et al.* 2000, Covacci *et al.* 1999), *L. pneumophila* (Segal *et al.* 1998, Vogel *et al.* 1998), *B. pertussis* (Weiss *et al.* 1993, Covacci und Rappuoli 1993), *Bartonella henselae* (Schmiederer und Anderson 2000, Schmiederer *et al.* 2001) und *R. prowazekii* (Anderson *et al.* 1998) beschrieben. Sie sind an der Sekretion von Virulenzfaktoren beteiligt und ermöglichen es den Pathogenen, die Abwehrmechanismen der Wirtszellen zu manipulieren. Bei den bisher identifizierten Virulenzfaktoren handelt es sich ausschließlich um Proteine. Ein Transfer von DNA konnte noch nicht nachgewiesen werden. Dennoch sind auch die in human- und tierpathogenen Bakterien gefundenen T4SS mit den Typ IV-Systemen der bakteriellen Konjugation verwandt. Im Fall des icm/dot-Systems (*L. pneumophila*, Legionärskrankheit) erlaubte die funktionelle Konservierung ebenso wie in *A. tumefaciens* den Transfer des nicht selbst mobilisierbaren IncQ-Plasmids RSF1010 (Vogel

et al. 1998). Es ist trotzdem unwahrscheinlich, dass es sich bei dem durch das icm/dot-System transferierten Virulenzfaktor um DNA handelt, da *L. pneumophila* schon innerhalb von Minuten nach Phagozytose in den Metabolismus der Wirtszelle eingreift.

1.4. Aufgabenstellung

Mit fortschreitender Genom-Sequenzierung wächst die Zahl der entdeckten T4SS. Oftmals tritt sogar mehr als ein Typ IV-Sekretionssystem pro Organismus auf. T4SS sind an der bakteriellen Konjugation beteiligt, an der Sekretion von Virulenzfaktoren durch Human- und Tierpathogene, der „genetischen Kolonisierung“ von Pflanzenzellen durch *A. tumefaciens* und eventuell auch an der Aufnahme von DNA durch bakterielle Zellen. Trotz großer Unterschiede bezüglich der transferierten Substrate (DNA-Proteinkomplexe / Proteine) und Zielzellen (Prokaryonten / Eukaryonten), lässt die allgemeine Konservierung der beteiligten Komponenten auf Ähnlichkeiten in Transporterstruktur und Transfermechanismus schließen.

A. tumefaciens dient als Modellorganismus für das Studium von Typ IV-Sekretionssystemen. Erkenntnisse aus der Analyse des agrobakteriellen Typ IV-Transporters lassen sich aufgrund der bestehenden Ähnlichkeiten auch auf verwandte T4SS übertragen.

Die Aufgabe dieser Arbeit war die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen im VirB/D4-Transmembrankomplex von *A. tumefaciens*, mit dem Ziel, Einblicke in die Assemblierung der Transporterstruktur, sowie Erkennung und Transfer der Substrate zu gewinnen. Beide Prozesse beruhen auf Protein-Protein-Interaktionen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verwendete Organismen und Plasmide

2.1.1. Bakterien

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp und Eigenschaften	Referenz / Quelle
C58	<i>A. tumefaciens</i> A136, pTiC58, virulenter Wildtypstamm (Nopalín-Typ)	van Larebeke <i>et al.</i> (1974)
A348	<i>A. tumefaciens</i> A136, pTiA6NC, virulenter Wildtypstamm (Octopín-Typ)	Garfinkel <i>et al.</i> (1981)
CB1001	<i>A. tumefaciens</i> , pTiC58 Δ virB1, (<i>attenuiert</i>)	Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> (1999 b)
CB1005	<i>A. tumefaciens</i> , pTiC58 Δ virB5, (<i>avirulent</i>)	Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> (1999 a)
CB1006	<i>A. tumefaciens</i> , pTiC58 Δ virB6, (<i>avirulent</i>)	Hapfelmeier <i>et al.</i> (2000)
Ach5	<i>A. tumefaciens</i> , <i>Achillea millefolium</i> Isolat, (Octopín-Typ Ti-Plasmid)	Pueppke, S.
Chry 5	<i>A. tumefaciens</i> , <i>Chrysanthemum morifolium</i> Isolat, (Succinamopín-Typ Ti-Plasmid)	Pueppke, S.
A208	<i>A. tumefaciens</i> A136, pTiT37, virulenter Wildtypstamm (Nopalín-Typ)	Pueppke, S.
JM109	<i>E. coli</i> , F'(traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZ Δ M15) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 relA1 supE44 Δ (lac-proAB) λ ⁻	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
GJ1158	<i>E. coli</i> , T7-RNA-Polymerasegen im Chromosom hinter dem proU-Promotor	Bhandari und Gowrishankar (1997)

2.1.2. Hefe

Tabelle 3: Hefe

Stamm	Genotyp	Referenz / Quelle
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y153	MATa leu2-3,112, ura3-52, trp1-901, his3- Δ 200, ade2-101, LYS2::GAL-HIS3, gal4 Δ gal80 Δ URA3::GAL-lacZ	Durfee <i>et al.</i> (1993)

2.1.3. Plasmide

Tabelle 4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp und Eigenschaften	Referenz / Quelle
pPZP300	str ^r , spe ^r , 1.1 kB <i>virG</i> -PCR-Fragment von pTiC58 in pPZP200 (verstärkte Expression der Vir-Proteine)	Krall <i>et al.</i> (2002 a)
pT7-7 _{NcoI}	Carb ^r , Expressionsvektor, Expression unter Kontrolle des T7-Promotors, <i>NdeI</i> -Schnittstelle des Ursprungsvektors pT7-7 durch <i>NcoI</i> ersetzt	Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> (2001)
pT7-7 _{NcoI} Tzs	Carb ^r , <i>tzs</i> unter Kontrolle des T7-Promotors	diese Arbeit
pT7-7 _{NcoI} Ipt	Carb ^r , <i>ipt</i> unter Kontrolle des T7-Promotors	diese Arbeit
pT7-H ₆ -TrxFus	Carb ^r , His ₆ - <i>trxA</i> (Thioredoxin)-Fusionsplasmid für T7-Promotor-kontrollierte Überexpression	Kromayer <i>et al.</i> (1993)
pT7-H ₆ Trx-VirB5 _{agro}	Carb ^r , <i>trxA::virB5_{agro}</i> -Genfusion hinter T7-Promotor	Domke, N.
pT7-H ₆ Trx-VirB5 _{suis}	Carb ^r , <i>trxA::virB5_{suis}</i> -Genfusion hinter T7-Promotor	Domke, N.
pT7-StrepII	Carb ^r , <i>strepII</i> -Fusionsplasmid für T7-Promotor-kontrollierte Überexpression	Domke, N.
pT7-StrepII-Tzs	Carb ^r , <i>strepII::tzs</i> -Genfusion hinter T7-Promotor	diese Arbeit
pT7-StrepII-Ipt	Carb ^r , <i>strepII::ipt</i> -Genfusion hinter T7-Promotor	diese Arbeit
pT7-StrepII-VirB5 _{agro}	Carb ^r , <i>strepII::virB5_{agro}</i> -Genfusion hinter T7-Promotor	Domke, N.
pT7-StrepII-VirB5 _{suis}	Carb ^r , <i>strepII::virB5_{suis}</i> -Genfusion hinter T7-Promotor	Domke, N.
pAS2	Carb ^r , für Fusionen mit GAL4-DBD	Durfee <i>et al.</i> (1993)
pACTII	Carb ^r , für Fusionen mit GAL4-AD	Elledge, S.
pAS2-VirB5 _{agro}	Carb ^r , <i>virB5_{agro}</i> in pAS2	Baron, C.
pAS2-VirE2 _{agro}	Carb ^r , <i>virE2_{agro}</i> in pAS2	Baron <i>et al.</i> (1997 b)
pAS2-Tzs	Carb ^r , <i>tzs</i> in pAS2	diese Arbeit
pACTII-VirB5 _{agro}	Carb ^r , <i>virB5_{agro}</i> in pACTII	Baron, C.
pACTII-VirE2 _{agro}	Carb ^r , <i>virE2_{agro}</i> in pACTII	Baron <i>et al.</i> (1997 b)
pACTII-Tzs	Carb ^r , <i>tzs</i> in pACTII	diese Arbeit

2.2. Nährmedien, Supplemente und Antibiotika

LB (Miller, 1972) 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl
 LBON (Bhandari, 1997) 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt

YEB	(Baron, 1997 a)	0,5 % Rinderextrakt; 1 % Hefeextrakt; 0,5 % Pepton; 0,5 % Saccharose; 0,002 M MgCl ₂
AB	(Winans, 1988)	1 % Glucose; 0,39 % MES; 1 mM K-Na-Phosphat; 1 x AB-Salze; pH 5,5 (20x AB-Salze: 20 g NH ₄ Cl; 6 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 3 g KCl; 0,2 g CaCl ₂ ; 0,05 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O pro 1 Liter; pH 5,5)
YEPD	(Durfee 1993)	2 % Trypton; 1 % Hefeextrakt; 2 % Glucose; pH 7,0
SD	(Durfee 1993)	6,7 g Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren; 0,87 g „Dropout“; 20 g Glucose; pH 7,0 „Dropout“: 0,8 g Adenin; 0,8 g Arginin; 4 g Aspartat; 0,8 g Histidin; (2,4 g Leucin); 1,2 g Lysin; 0,8 g Methionin; 2 g Phenylalanin; 8 g Threonin; (0,8 g Tryptophan); 1,2g Tyrosin; 0,8 g Uracil. (siehe 2.11.5.)

Alle Medien wurden mit Seradest-Wasser angesetzt. Für feste Nährmedien wurde 1,5 bzw. 2 % Agar (AB-MM, SD) zugegeben, sowie zur Selektion plasmid-tragender Stämme steril-filtrierte Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen:

Carbenicillin	100 µg/ml (<i>E. coli</i>)
Streptomycin	100 µg/ml (<i>A. tumefaciens</i> , pPZP300)
Spectinomycin	300 µg/ml (<i>A. tumefaciens</i> , pPZP300)

2.3. Anzuchtbedingungen

2.3.1. Bestimmung der optischen Dichte

Die Optische Dichte von Bakterienkulturen wurde durch Messung bei 600 nm an einem Hitachi-Spectrophotometer (Modell U-1500) bestimmt.

2.3.2. Anzucht und Induktion von Agrobakterien

Übernachtskulturen von *A. tumefaciens* wurden aerob bei 26°C in einem Rollodrum angezogen. Die Inkubation erfolgte in 20 ml-Reagenzgläsern mit 2 ml YEB-Medium.

Tageskulturen wurden in 10 ml AB-Medium zu einer Anfangs-OD₆₀₀ von 0,1 angesetzt und im Wasserbadschüttler (New Brunswick, Modell G76) bei 20°C für 4-5 Stunden geschüttelt. Je 1 ml Tageskultur wurde auf AB-Agarplatten (Ø 15 cm) mit bzw. ohne Acetosyringon ad 200 µM (Stammlösung: 200 mM in DMSO) plattiert und 4 Tage bei 20°C bebrütet. Der Zusatz von Acetosyringon (AS), der niedrige pH-Wert des AB-Minimalmediums, sowie der Zusatz des Monosaccharids Glucose diente der Induktion der Virulenzgene. Die Zellen wurden mit 10 ml Na-K-Phosphatpuffer (50 mM; pH 5,5) abgeschwemmt, in Na-K-Phosphatpuffer gewaschen und bei 12.000 upm für 45 min sedimentiert.

2.3.3. Anzucht von *E. coli* und Überproduktion von Vir-Proteinen

Übernachtulturen von *E. coli* wurden aerob (180 upm) bei 37°C in einem Laborschüttler (Modell Kühner, B. Braun) angezogen. Je nach Stamm erfolgte dies in 20 ml Reagenzgläsern mit 2 ml LB (*E. coli* JM109) bzw. LBON (*E. coli* GJ1158), gegebenenfalls unter Zusatz von Antibiotika. Tageskulturen wurden zu einer Anfangs-OD₆₀₀ von 0,05 in Erlenmeyerkolben angesetzt, die zu einem Zehntel ihres Volumens mit Medium gefüllt waren. Die Inkubation erfolgte aerob (180 upm) bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8. *E. coli* GJ1158 verfügt über eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerasegens, das unter der Kontrolle des NaCl-induzierbaren *proU*-Promotors steht. Zur Induktion der Expression von Vir-Proteinen wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 NaCl ad 0,3M zugesetzt (Bandhari und Gowrishankar 1997). Die weitere Inkubation erfolgte je nach Versuchsansatz bei 20°C, 26°C oder 37°C. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Kultivierung durch 30-minütige Sedimentation bei 6.000 upm mit anschließendem Waschen der Zellen in PBS-Puffer (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄ pro Liter; pH 7) beendet. Die optimalen Anzuchtbedingungen für die Synthese eines größtmöglichen Anteils der Proteine in löslicher Form sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Optimale Bedingungen für die Expression von Proteinen in löslicher Form.

Protein	Optimale Anzuchtbedingung
His ₆ -TrxA-VirB5	1.5 h, 37°C
StrepII-VirB5	48 h, 20 °C
Tzs	18 h, 26°C
StrepII-Tzs	18 h, 26°C
His ₆ -TrxA-VirB5 _{suis}	4 h, 37°C
StrepII-VirB5 _{suis}	1.5 h, 37°C

2.3.4. Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae Y153 wurde aerob bei 30°C in Erlenmeyerkolben kultiviert, die zu einem Zehntel ihres Volumens mit YEPD-Medium gefüllt waren. Wahlweise erfolgte die Anzucht auf YEPD-Agarplatten bzw. zur Selektion von Transformanten auf SD-Agarplatten, die mit entsprechenden Aminosäuren versetzt waren.

2.4. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

2.4.1. *E. coli* / *A. tumefaciens*

Für die Gewinnung elektrokompenter Zellen wurden Bakterienkulturen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 kultiviert, geerntet und durch sukzessives Waschen mit 1 Volumen und 0,5 Volumen sterilem H₂O_{seradest} (4°C), sowie $\frac{1}{10}$ Volumen 10 % Glycerin (4°C) von Ionen und Kulturrückständen befreit. Das gewaschene Zellsediment wurde in 1 ml 10 % Glycerin aufgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Plasmid-DNA und Ligationsansätze wurde mittels Elektroporation nach Fiedler und Wirth (1988) bei 2000 Volt, 800 Ω und 25 µF in die Zielzellen eingebracht.

2.4.2. *S. cerevisiae*

Die Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* Y153-Zellen, sowie die Transformation mit Plasmid-DNA erfolgte nach Standardprotokollen des „Matchmaker Two-Hybrid Systems“ von Clontech (Yeast Protocols Handbook, PT3024-1).

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Oligonukleotide

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide (bezogen von MWG, Ebersberg). Die Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz
pT7-7 5'	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'
pT7-7 3'	5'-AATTCTCATGTTTGACAGGTTATC-3'
tzs 5' <i>Bsp</i> I	5'-GGAGGCT <u>CATGATA</u> CTCCATCTCATCTACGGACC-3'
tzs 3' <i>Hind</i> III	5'-GGAGGCA <u>AAGCTT</u> CACCGAATTCGCGTCAGCGTG-3'
tzs 5' <i>Acc</i> 651	5'-CGCGCGGT <u>TACCCATGTTACT</u> CCATCTCATCTACG-3'
tzs 3' <i>Bam</i> HI	5'-GACGGGGAT <u>CCTCACCGAATTCGCGTCAGCGTG</u> -3'
tzs 3' <i>Pst</i> I	5'-CGCGC <u>CTGCAGT</u> CACCGAATTCGCGTCAGC-3'
ipt 5' <i>Nco</i> I	5'-CGCCGCCATGGATCTGCGTCTAATTTTCG-3'
ipt 5' <i>Acc</i> 651	5'-CGCGCGGT <u>TACCCATGGATCTGCGTCTAATTTTCG</u> -3'
ipt 3' <i>Hind</i> III	5'-CGCCGA <u>AAGCTT</u> CTAATACATTCCGAATGGATGAC-3'

2.5.2. PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

DNA-Fragmente wurden unter Verwendung von Taq-Polymerase (gereinigt im Labor von S. Preithner) und der in Tabelle 5 aufgelisteten Oligonukleotide amplifiziert. Der Reaktionsansatz (Σ 100 μ l) enthielt 10 μ l Taq-Puffer (MBI Fermentas), je 200 μ M der dNTPs, 10 pmol der Oligonukleotide, sowie 1 mM MgCl₂ und wurde in einem „Gradient Thermocycler“ (Biometra) nach folgendem PCR-Programm inkubiert:

Denaturierung	<u>2 min</u>	<u>95°C</u>	
Anlagerung der Primer	2 min	44°C	
Extension (Taq Polymerase)	2 min (1000 bp)	72°C	x 35 Zyklen
Denaturierung	<u>30 sec</u>	<u>95°C</u>	
	4°C		

Die für die Polymerisationsreaktion benötigte Zeit wurde entsprechend der Länge des erwarteten Fragments berechnet (2 min pro 1000 bp). Als Matrize diente gereinigte Plasmid-DNA oder Zellmaterial in geringer Menge.

2.5.3. Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruch-Verfahren von Sanger *et al.* (1977) unter Verwendung fluoreszierender Desoxyribonukleotide (AmpliTaq® FS BigDyeTerminator, Applied Biosystems) und 10 pmol Oligonukleotid. Als Matrize diente isolierte Plasmid-DNA. PCR und Probenaufbereitung erfolgten nach Angaben des Herstellers, die Auswertung der Sequenzen wurde an einem Kapillar-Sequenzierapparat (ABI Prism R310, Applied Biosystems) durchgeführt.

2.5.4. Isolierung von Nukleinsäuren

2.5.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus 4,5 ml Übernachtskultur plasmid-tragender Bakterienstämme mittels „JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit“ (Genomed) nach Anleitung des Herstellers isoliert.

2.5.4.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

In Agarosegelen aufgetrennte DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht durch Vergleich mit einem DNA-Längenstandard („GeneRuler™ 1 kb DNA ladder“, MBI Fermentas) lokalisiert, ausgeschnitten und unter Verwendung des „JETQUICK Gel Extraction Spin Kit“ (Genomed) nach Anleitung des Herstellers aus dem Trägermaterial eluiert.

2.5.5. *in vitro*-Modifikation von Nukleinsäuren

2.5.5.1. Restriktion / Dephosphorylierung

Die Restriktion von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen nach Angaben der Hersteller (New England Biolabs, MBI Fermentas) durchgeführt. Zur Vermeidung unerwünschter Religationsprodukte wurde die Vektor-DNA nach erfolgter Restriktion zusätzlich einer 30-minütigen Dephosphorylierung mit CIAP („Calf Intestine Alkaline Phosphatase“, MBI Fermentas) unterzogen.

2.5.5.2. Ligation

Vektor-DNA und PCR-Fragmente wurden mittels T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) bei 20°C über Nacht ligiert. Die Ligationsansätze wurden anschließend mit H₂O ad 100 µl versetzt und unter Zugabe von 10 µl Na-Azetat (3 M) und 200 µl Ethanol_{abs} gefällt. Das Präzipitat wurde bei RT getrocknet und in 10 µl sterilem H₂O aufgenommen.

2.6. Elektrophoretische Methoden

2.6.1 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte bei 100 Volt in Agarosegelen (1 % Agarose in TAE-Puffer mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid) mit TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 7,8) als Laufpuffer. Zur Beschwerung wurden die Proben vor dem Auftrag mit $\frac{1}{10}$ Volumen DNA-Auftragspuffer (50 % Glycerin; 0,05 % Bromphenolblau) versetzt. Gewünschte Fragmente wurden durch Vergleich mit einem DNA-Längenstandard („GeneRuler™ 1 kb DNA ladder“, MBI Fermentas) unter UV-Licht identifiziert.

2.6.2 Auftrennung von Proteinen

2.6.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Separation von niedermolekularen Proteinen (< 14 kDa) erfolgte bei 90 Volt mittels Tricin-SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) nach Schägger und v. Jagow (1987), die Separation von höhermolekularen Proteinen bei 150 Volt mittels Glycin-SDS-PAGE (7-12,5 % Polyacrylamid) nach Lämmli (1970). Zellsedimente wurden vor dem Auftrag entsprechend ihrer OD₆₀₀-Werte in SB-Probenauftragspuffer (125 mM Tris/HCl; 20 % Glycerin; 10 % β-Mercaptoethanol; 4,6 % SDS; 0,01 % Bromphenolblau; pH 6,8) aufgenommen und für 5 min bei 100°C inkubiert. Zellsedimente, die zur Detektion der Vir-Proteine VirB6 und VirD4 dienen sollten, wurden zur Vermeidung hochmolekularer Aggregate dieser Proteine zur Hälfte des Endvolumens mit Lösung I (50 mM Glucose; 25 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 8; 1 mg/ml Lysozym) versetzt, für 30 min auf Eis inkubiert, bis

zum Endvolumen in SB-Probenauftragspuffer resuspendiert und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Referenzproteine (1 µg/Spur) dienen zur Bestimmung der molekularen Massen der separierten Proteine: T7-RNA-Polymerase (97 kDa), Glutamat-Dehydrogenase (55 kDa), Aldolase (39 kDa), Laktat-Dehydrogenase (33 kDa), Triosephosphat-Isomerase (27 kDa), Trypsin-Inhibitor (20 kDa), Lysozym (14 kDa), Aprotinin (6.5 kDa).

Die SDS-Gele wurden nach erfolgter Elektrophorese für „western blot“-Analysen verwendet, oder mittels Coomassie-Lösung (30 % Methanol; 10 % Essigsäure; 0,1 % Serva Blue RC I:42660 / Entfärbelösung: 40 % Methanol; 10 % Essigsäure) bzw. Silberfärbung nach Bloom *et al.* (1987) gefärbt.

2.6.2.2 Blaue nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die Separation von mit n-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM) solubilisierten Membranproteinen erfolgte mittels BN-PAGE nach Schägger und v. Jagow (1991) in Gradientengelen (7-14 % bzw. 7-20 % Polyacrylamid, 12 x 14 cm Glasplatten). In Abwandlung vom Ursprungsprotokoll wurden Kathoden- und Anodenpuffer in doppelten Konzentrationen verwendet und dem Kathodenpuffer kein Coomassie zugesetzt. Um den Proteinen eine negative Ladung zu verleihen, wurden die Proben vor dem Auftrag mit BN-Probenauftragspuffer (5 % Coomassie Brilliant Blau G-250; 500 mM ε-Amino-n-capronsäure) in einem Verhältnis Detergenz : Coomassie von 4:1 versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5 mM bzw. maximal 150 Volt und 4°C. Die Größe der separierten Proteinkomplexe wurde anhand von Referenzproteinen („HMW-Calibration Kit for native electrophoresis“, Amersham Pharmacia Biotech) ermittelt.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele mittels „semidry blot“ auf PVDF-Membranen übertragen und einer immunologischen Detektion mit spezifischen Antisera unterzogen. Alternativ wurden 2D-Gele angefertigt.

2.6.2.3. 2D-Gelelektrophorese

Für die Anfertigung von 2D-Gelen wurden 0,5 cm der Laufspur eines BN-Geles ausgeschnitten, für 30 min in SB-Probenauftragspuffer ohne Farbstoff- und Glycerinzusatz (125 mM Tris/HCl; 9,6 % SDS; 10 % β-Mercaptoethanol; pH 6,8) geschüttelt, 3 x 5 min mit H₂O gewaschen und senkrecht zur Laufrichtung in eine Tricin-SDS-PAGE (12,5 %

Polyacrylamid, 12 x 14 cm Glasplatten) einpolymerisiert. Durch Elektrophorese bei 90 Volt und 4°C wurden die mittels BN-PAGE unter nativen Bedingungen separierten Proteinkomplexe unter denaturierenden Bedingungen in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt. Die im 2D-Gel separierten Proteine wurden anschließend einer Silberfärbung nach Bloom *et al.* (1987) unterzogen, oder im „semidry blot“-Verfahren auf PVDF-Membranen übertragen und für „western blot“-Analysen verwendet.

2.6.3. Elektrotransfer von Proteinen

Die mittels SDS-PAGE und BN-PAGE separierten Proteine wurden bei 4°C im „Tank blot“-Verfahren (Trans Blot Cell, Biorad / Blot-Puffer: 192 mM Glycin; 25 mM Tris; 20 % Methanol) für 1 h bei 90 Volt, bzw. im „semidry blot“-Verfahren für 30 min bei 12 Volt („Fast-Blot“-Apparatur, Biometra / Blot-Puffer: 25 mM Tris; 150 mM Glycin; 10 % Methanol; pH 8,3) auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore) übertragen. Zur Markierung des Molekulargewicht-Standards wurden die Membranen mit Amidoschwarz-Lösung (0,1 % Amidoschwarz; 45 % Methanol; 10 % Essigsäure) gefärbt. Um die Referenzproteine der transferierten BN-Gele sichtbar zu machen, musste überschüssiges Coomassie durch Schütteln in Entfärbelösung (25 % Methanol; 10 % Essigsäure) von den PVDF-Membranen entfernt werden.

2.6.4. Elektroelution von Proteinen

Die Elution von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen erfolgte unter Verwendung eines Biotrap-Elektroseparationssystems (Schleicher & Schüll) nach Angaben des Herstellers.

2.7. Immunologische Methoden

2.7.1. Herstellung polyklonaler Antisera

Zur Herstellung des Tzs-spezifischen polyklonalen Antiserums wurde *E. coli* GJ1158 pT7-7_{Ncol}-Tzs wie unter 2.3.3. beschrieben kultiviert und durch Zugabe von NaCl ad 0,3 M induziert. Nach 1,5-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen sedimentiert und das in ihnen in unlöslicher Form angehäufte Tzs-Protein mittels „inclusion body“-Präparation

aufgereinigt. Die gewonnenen Einschlußkörper wurden mittels präparativer Glycin-SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid, 12 x 14 cm Glasplatten) von anderen Proteinen abgetrennt, durch Elektroelution aus der Gelmatrix isoliert und mit Azeton gefällt. 700 µg des gereinigten Tzs-Proteins wurden zur Gewinnung polyklonalen Antiserums in Kaninchen injiziert (Firma BioGenes GmbH, Berlin).

2.7.2. Anreicherung spezifischer Antikörper

2.7.2.1. Präabsorption

Zur Reduktion unspezifischer Kreuzreaktionen wurde Rohserum für 1 h bei 26°C in 1 ml TBS-T-Puffer (20 mM Tris/HCl; 137 mM NaCl; 0,1 % Tween-20; pH 8) mit PVDF-Membranen inkubiert, auf denen Zellysate nicht-induzierter *E. coli* bzw. *A. tumefaciens* Zellen immobilisiert war. Nicht an Virulenzproteine bindende Antikörper blieben auf der Membran haften, während die im Überstand verbleibenden Antikörper zur Detektion im „western blot“ eingesetzt wurden.

2.7.2.2. Affinitätsreinigung

Für die Herstellung affinitätsgereinigter Antiseren wurde 400 µl Rohserum in 5 ml TBS-T zusammen mit PVDF-Membran inkubiert, auf der eine Probe des Antigens immobilisiert war. Die Inkubation erfolgte bei 26°C für 2 h unter leichtem Schütteln. Nicht bindende Antikörper wurden durch Waschen mit TBS-T entfernt. Die auf der Membran haftenden spezifischen Antikörper wurden mit Tris / Glycin pH 2,3 eluiert, durch Zugabe von Tris (1 M; pH 9) neutralisiert (Harlow und Lane 1988) und zur immunologischen Detektion verwendet.

2.7.3. „Western blot“ zum Nachweis von Proteinen

Die Detektion von Proteinen erfolgte nach Harlow und Lane (1988) unter Verwendung von „Goat Anti-Rabbit IgG-HRP Conjugate“ (Bio-Rad) und eines Chemoluminiszenz-Detektionssystems (Perkin Elmer Life Sciences Inc.) nach Angaben der Hersteller. Zur Reduktion unspezifischer Kreuzreaktionen wurden die primären Antiseren gegebenenfalls einer Präabsorption oder Affinitätsreinigung unterzogen.

2.8. Proteinbiochemische Methoden

2.8.1. Überproduktion und Aufreinigung von Fusionsproteinen aus *E. coli* GJ1158

Die Expression von His₆- bzw. StrepII-markierten Fusionsproteinen erfolgte in plasmidtragenden *E. coli* GJ1158-Zellen. In Vorversuchen wurden Zeitdauer und Inkubationstemperatur für eine optimale Ausbeute an löslichem Protein ermittelt (siehe Tabelle 5). Zur Aufreinigung der Fusionsproteine wurden die Zellsedimente in „Basis-Puffer“ resuspendiert, mit PMSF ad 0,5 mM versetzt und durch 2-malige Passage bei 20.000 psi in einer French-Press-Zelle (Aminco) aufgebrochen („Basis-Puffer“ für His₆-markierte Fusionsproteine: 50 mM Hepes; 1 M NaCl; pH 7,5 / „Basis-Puffer“ für StrepII-markierte Fusionsproteine: 100 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 8). Zellbruchstücke und unlösliche Proteine wurden durch Zentrifugation für 45 min bei 12.000 upm sedimentiert.

Für die Aufreinigung His₆-markierter Fusionsproteine wurde der Überstand auf eine Ni-NTA-Superflow-Säule (3 ml Ni-NTA-Agarose, Firma Qiagen) aufgetragen. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. His₆-markierte Fusionsproteine adsorbierten an die im Säulenmaterial immobilisierten Ni²⁺-Ionen, während nicht gebundenes Protein durch Waschen entfernt wurde. Proteine, die über oberflächen-exponierte Histidin-Reste unspezifisch mit dem Säulenmaterial interagierten, wurden mit 30 mM Imidazol (in „Basis-Puffer“) eluiert. Die Elution der His₆-markierten Fusionsproteine erfolgte unter Anlegung eines linearen Gradienten von 30 mM - 200 mM Imidazol (in „Basis-Puffer“) über das 10-fache Säulenvolumen.

Die Aufreinigung von StrepII-markierten Fusionsproteinen erfolgte mit Hilfe des „Strep-tag® Purification System“ (Firma IBA) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von 2 ml-StrepTactin-Sepharose-Säulen. Fusionsproteine mit dem Streptavidin-bindenden Peptid StrepII (Sequenz: WSHPQFEK) wurden mit 2,5 mM Desthiobiotin (in „Basis-Puffer“) vom Säulenmaterial eluiert.

Im Fall des Vorliegens unerwünschter Proteine nach der Affinitätsreinigung wurden die Proben über Nacht gegen „Basis-Puffer“ (50 mM NaCl) dialysiert und mittels Gelfiltrations-Chromatographie (siehe 2.10.1) separiert. Zur weiteren Abtrennung unerwünschter Proteine

wurden die resultierenden Eluate vereint und bei einer Flussrate von 0,5 ml/min auf eine Q-Sepharose-Säule (Anionen-Austauscher, Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte durch einen linearen Gradienten von 50 mM NaCl zu 1 M NaCl (in „Basis-Puffer“) über das 10-fache Säulenvolumen. Die Probennahme erfolgte mit einem ÄKTApurifier 10 (Amersham Pharmacia Biotech).

Die gereinigten Fusionsproteine wurden zur Entfernung hoher Konzentrationen von Ionen über Nacht gegen Dialyse-Puffer („Basis-Puffer“; 150 mM NaCl) dialysiert, durch eine zweite Dialyse in Glycerin-Puffer („Basis-Puffer“; 150 mM NaCl; 50 % Glycerin; 0,5 mM DTT) überführt und bei -20°C gelagert. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C .

2.8.2. Überproduktion und Aufreinigung von Tzs aus *E. coli* GJ1158-pT7-7_{Ncol}-Tzs

Tzs wurde ohne His₆- bzw. StrepII-Fusionierung in *E. coli* GJ1158-pT7-7_{Ncol}-Tzs exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte wie in Krall *et al.* (2002 b) beschrieben. Für eine hohe Ausbeute an löslichem Tzs-Protein wurden die Zellen für 18 h bei 26°C induziert. Nach dem Aufbrechen des Zellsediments in der French-Press-Zelle (2 x 20.000 psi) wurden Zelltrümmer und Membranbruchstücke durch Zentrifugation bei 12.000 upm (SS-34 Rotor, Sorvall RC 5B, 45 min), sowie Ultrazentrifugation bei 40.000 upm (Ti50.2 Rotor, Sorvall OTD-50B Ultrazentrifuge, 2 h) entfernt. Tzs wurde mittels fraktionierter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung und einer maximalen Ausbeute bei 30-40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aus dem Überstand der löslichen Proteine angereichert. Die gefällten Proteine wurden in 1 ml Puffer A (50 mM Hepes; 50 mM NaCl; pH 7) resuspendiert, auf eine XK 16/70 Superdex 75-Säule (Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen und bei einer Flussrate von 0,5 ml/min entsprechend ihrer Größen separiert. Die eluierten Proteine wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen, die neben Tzs die geringsten Anteile an anderen Proteinen aufwiesen, wurden vereint, auf eine Q-Sepharose-Säule (Anionen-Austauscher, Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen und durch Anlegung eines linearen Gradienten von Puffer A zu Puffer B (Puffer A; 1 M NaCl) über das 10-fache Säulenvolumen eluiert. Das gereinigte Tzs-Protein wurde nach Dialyse gegen Puffer A in Glycerin-Puffer (Puffer A; 50 % Glycerin) überführt und bei -20°C gelagert.

2.8.3. Isolierung von Einschlusskörpern („inclusion bodies“)

Proteine die sich bei Expression in unlöslicher Form in den Zellen anreicherten, wurden mittels „inclusion body“-Präparation isoliert. Dazu wurden die Zellsedimente in Puffer L (20 mM Tris/HCl; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 % Glycerin; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF; pH 7,5) resuspendiert und mittels 2-maliger Passage bei 20.000 psi in der French-Press-Zelle aufgebrochen. Durch Scherung unter Verwendung einer 26-„gauge“-Nadel wurde freigesetzte DNA fragmentiert. 3-maliges Waschen in Puffer H (Puffer L; 1 M NaCl) mit anschließender Zentrifugation trennte die „inclusion bodies“ von Zelltrümmern und löslichen Proteinen ab.

2.8.4. Fällung von Proteinen

Die Fällung von Proteinen erfolgte unter Zusatz von 3 Volumen Aceton oder Trichlor-essigsäure ad 5 % über Nacht auf Eis. Die präzipitierten Proteine wurden mittels Zentrifugation sedimentiert, in 80 % EtOH (-20°C) gewaschen und in Probenauftragspuffer oder 0,1 % SDS aufgenommen. Alternativ kam die fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung nach Murray P. Deutscher („Methods in Enzymology“) zur Anwendung.

2.8.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976) unter Verwendung eines Farbstoffkonzentrates („Protein Assay Dye Reagent Concentrate“, BioRad) gemäß den Angaben des Herstellers. 1-10 µl BSA (Konzentration: 1 mg/ml in 0,1 % SDS bzw. PBS (pH 7) diente als Referenz. Gemessen wurde bei 595 nm an einem Hitachi-Spectrophotometer (Modell U-1500).

2.9. Isolierung subzellulärer Fraktionen

2.9.1. Isolierung von T-Pili

Zur Isolierung von T-Pili wurde *A. tumefaciens* C58 wie unter 2.3.2. beschrieben kultiviert. Zum Ausgleich des unter virulenzgen-induzierenden Bedingungen reduzierten Wachstums

wurden 2 AB-Agarplatten (-AS) und 4 AB-Agarplatten (+AS) angesetzt und die Menge des geernteten Zellmaterials gemäß der ermittelten OD₆₀₀ Werte abgeglichen. Die Zellen wurden mit je 10 ml Na-K-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 5,5) von den Platten abgeschwemmt, sedimentiert und in $\frac{1}{10}$ des Volumens in Na-K-Phosphat-Puffer resuspendiert. Exponierte Oberflächenstrukturen wurden mittels 10-maliger Scherung durch eine 26-„gauge“-Nadel abgelöst. Die Zellen wurden durch 1-stündige Zentrifugation bei 12.000 upm abgetrennt und die im Überstand vorhandenen hochmolekularen Strukturen (T-Pili) mittels Ultrazentrifugation (Ti70.1 Rotor, Sorvall OTD-50B Ultrazentrifuge, 2 h) bei 40.000 upm sedimentiert.

2.9.2. Isolierung von Membranen

Für die Präparation von Membranen wurden *A. tumefaciens*-Stämme auf 16 AB-Agarplatten mit bzw. 8 AB-Platten ohne 200 µM Acetosyringon bei 20°C für 4 Tage inkubiert. Das Zellmaterial wurde mit je 10 ml Na-K-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 5,5) von den Platten ab gespült, gewaschen, sedimentiert und in Σ 20 ml Na-K-Phosphat-Puffer resuspendiert. Nach Abgleich der OD₆₀₀ Werte und Zusatz von 0,5 mM PMSF wurden die Zellen durch 3-malige Passage bei 20.000 psi in einer French-Press-Zelle aufgebrochen. Eine 1-stündige Zentrifugation bei 12.000 upm (SS-34 Rotor, Sorvall RC 5B) entfernte Zelltrümmer. Der resultierende Überstand („T“, Totalzelllysat) wurde durch 2-stündige Ultrazentrifugation (Ti50.2 Rotor, Sorvall OTD-50B Ultrazentrifuge) bei 40.000 upm in lösliche Proteine („S“, Überstand) und Membranen („M“, Sediment) getrennt. Die sedimentierten Membranen wurden in 1 ml ACA-Puffer (750 mM ε-Amino-n-capronsäure; 50 mM BisTris; pH 7) aufgenommen und mittels Ultraschall (Branson Sonifier Cell Disruptor) resuspendiert. Alle Präparationsschritte erfolgten bei 4°C.

2.9.3. Solubilisierung von Membranproteinen

Die Solubilisierung von Membranproteinen erfolgte in Anlehnung an Schägger und v. Jagow (1991) in 1 ml-Ansätzen, die mit 10 mg/ml Membranprotein, 0 – 2 % des nicht-ionischen Detergenz n-Dodecyl-β-D-maltosid (Calbiochem, Stammlösung: 10 % in ACA-Puffer, pH 7) und ACA-Puffer ad 1 ml versetzt waren. Durch leichtes Schwenken bei 4°C für 2 h wurden die Membranproteine in Lösung gebracht. Eine 2-stündige Ultrazentrifugation (Ti70.1 Rotor,

Sorvall OTD-50B Ultrazentrifuge) bei 40.000 upm trennte die solubilisierten Proteine („Ü“, Überstand solubilisierter Membranproteine) von der Fraktion der unlöslichen Proteine („P“, Sediment nicht-solubilisierbarer Membranproteine). Die n-Dodecyl- β -D-maltosid-(DDM)-solubilisierten Proteine wurden anschließend elektrophoretisch mittels BN-PAGE oder chromatographisch unter Verwendung einer XK 16/100 Superdex™ 200-Gelfiltrations-Säule separiert.

2.10. Chromatographische Methoden

2.10.1. Gelfiltrations-Chromatographie

Zur gelfiltrations-chromatographischen Separation wurden Proteinproben auf eine XK 16/70 Superdex™ 75-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Trennbereich: 3 kDa - 70 kDa) oder eine XK 16/100 Superdex™ 200-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Trennbereich: 10 kDa - 600 kDa) aufgetragen, die zuvor mit Laufpuffer äquilibriert wurden. Die Probennahme erfolgte an einem ÄKTApurifier 10 (Amersham Pharmacia Biotech) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min und 4°C. Eichproteine („Gelfiltration Calibration Kit“: Thyroglobulin, 669 kDa; Ferritin, 440 kDa; Katalase, 232 kDa; Aldolase 158 kDa; Albumin, 67 kDa; Ovalalbumin, 43 kDa; Chymotrypsinogen A 25 kDa; Amersham Pharmacia Biotech) dienten zur Kalibrierung der Säulenläufe. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Eluate in 1 ml-Fractionen gesammelt. DDM-(2%)-solubilierte Membranproteine wurden unter Verwendung der XK 16/100 Superdex™ 200-Säule mit ACA-Puffer (pH 7; + 0,03 % DDM) als Laufpuffer separiert. Die eluierten Proteine wurden in 1 ml Fractionen gesammelt, mit TCA ad 5 % gefällt und in $\frac{1}{10}$ des Volumens in SB-Puffer resuspendiert.

2.11. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen

2.11.1. Gelüberschichtungstest

Die Detektion von Protein-Protein-Interaktionen anhand des Gelüberschichtungstests („overlay assay“) erfolgte nach Homann *et al.* (1991). Mittels SDS-PAGE separierte Zellysate wurden auf PVDF-Membran transferiert und über Nacht bei 4°C in Renaturierungspuffer (10 mM HEPES; 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM

DTT; 10 % Glycerin; pH 7,5) geschüttelt. Dies diente der Entfernung von SDS und unterstützte die Rückfaltung der auf der Membran immobilisierten Proteine in ihre native Konformation. Nach 3-maligem Waschen mit TBS-T (20 mM Tris/HCl; 137 mM NaCl; 0,1 % Tween 20; pH 8) und 1-stündigem Absättigen in TBS-T mit 5 % Magermilch wurden die Membranen mit nativ aufgereinigtem Vir-Protein (1-2 µg/ml, in TBS-T mit 5 % Magermilch) überschichtet und für 4-5 h bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. 3-maliges Waschen für jeweils 10 min mit TBS-T entfernte überschüssiges und nicht gebundenes Protein. Der Teil des zugegebenen Proteins, der durch Interaktion mit potentiellen Interaktionspartnern an der Membran haften blieb, wurde im Anschluss mittels „western blot“ unter Verwendung spezifischer Antiseren detektiert.

2.11.2. Präzipitation mit Affinitätsmatrizes

Die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit dem Strep-tag® MagnetStrep Kit (IBA, Göttingen) erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die auf Interaktion zu testenden Proteine wurden dazu in nativer Form aufgereinigt, wobei eines der beiden in Form eines StrepII-Fusionsproteins vorliegen musste. Je 50 pmol der Proteine wurden in 200 µl Reaktionspuffer (50 mM Na-K-Phosphat; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; pH 7) gemischt, bei RT für 15 min inkubiert und nach Zugabe von 1 mg StreptactinII-bedeckter Magnetkugeln für weitere 15 min bei RT inkubiert. Das StrepII-Fusionsprotein adsorbierte dabei an die StreptactinII-bedeckten Magnetkugeln. Interagierten die beiden zu analysierenden Proteine miteinander, so konnte das nicht-markierte Protein nach Waschen mit Reaktionspuffer (3 x 200 µl, jeweils 5 min) unter Zugabe von Biotin (2,5 mM; in Reaktionspuffer) zusammen mit dem StrepII-Fusionprotein eluiert werden. Die eluierten Proteine wurden 1:1 in SB-Puffer aufgenommen, mittels SDS-PAGE separiert und unter Verwendung spezifischer Antiseren immunologisch detektiert.

Das gleiche Protokoll wurde in abgewandelter Form auch zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen unter Verwendung anderer Affinitätsmatrizes eingesetzt. Unter anderem wurden dazu His₆-markierte Fusionsproteine an Ni-NTA-Agarose (1 mg, Qiagen) gebunden und mit 200 mM Imidazol (in Reaktionspuffer) eluiert. Ansätze mit StrepII-Sepharose (1 mg, IBA) und TalonTM-Metal-Affinity-Resin (1 mg, Clontech) führten zu unspezifischer Bindung der Proteine an das Trägermaterial und sind daher nicht weiter ausgeführt.

2.11.3. Quervernetzungsversuche

Für Quervernetzungsversuche wurde *A. tumefaciens* unter virulenzgen-induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen kultiviert, in PBS-Puffer (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄ pro 1 Liter; pH 5,5) gewaschen und die Zelldichte mit dem gleichen Puffer auf einen OD₆₀₀-Wert von 1,0 eingestellt. 2 ml der Zellsuspension wurden mit Formaldehyd (37 % Formalin-Lösung, Sigma) ad 0-2 % versetzt. Formaldehyd ist ein kleines und wasserlösliches Quervernetzungsreagenz, das auch Membranen durchdringen kann. Es verknüpft bevorzugt Lysin-, Cystein- und Tyrosin-Reste, sowie in geringerem Umfang Tryptophan, Histidin, Aspartat und Arginin. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl Tris (1 M; pH 5,5) gestoppt. Die Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen, in 50 µl Lösung I für 30 min auf Eis und nach Zugabe von 50 µl SB-Puffer für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Zur Quervernetzung von T-Pili wurden diese wie unter 2.9.1. beschrieben isoliert und in 20 µl PBS-Puffer mit 1 % Formaldehyd resuspendiert. Als Ausgangsmaterial dienten Zellen vom Stamm C58 von 4 AB-Agarplatten mit AS und 8 AB-Agarplatten ohne AS. Nach 30 min bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl SB-Auftragspuffer beendet und die Proben für 30 min bei 37°C im temperierten Wasserbad inkubiert.

2.11.4. Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationen wurden 30 µl DDM-(2%)-solubilisierter Membranproteine („Ü“, siehe 2.9.3.) mit 10 µl Antiserum und ACA-Puffer ad 1 ml versetzt und für 2 h unter leichtem Schwenken inkubiert. Dem Ansatz wurde 2 mg Protein-A-Sepharose (Sigma) hinzugefügt, die über Nacht in ACA-Puffer (+ 2,0 % DDM; pH 7) äquilibriert und 5 x mit ACA-Puffer gewaschen worden war. Nach weiterer 2-stündiger Inkubation unter leichtem Schwenken wurden ungebundene Proteine durch 3-maliges Waschen mit 500 µl ACA-Puffer entfernt. Protein-A bindet den Fc-Teil von Antikörpern. Die Kopplung von Protein-A an eine Sepharose-Matrix erlaubte die Präzipitation von Proteinen bzw. Proteinkomplexen, wenn diese zuvor mit spezifischen Antikörpern markiert worden waren. Alle Präzipitations- und Waschschrte erfolgten bei 4°C mit vorgekühlten Lösungen. Das gewaschene Protein-A-

Sepharose-Sediment wurde in 40 µl SB-Puffer (ohne β-Mercaptoethanol) resuspendiert und zur Elution der gebundenen Proteine für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

2.11.5. Hefe-zwei-Hybridsystem (X-Gal Kolonie-Filter-Test)

Die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit dem Hefe-2-Hybridsystem erfolgte nach Durfee *et al.* (1993). Die Selektion der Plasmide erfolgte über die Synthese von Leucin (pACTII: LEU2) bzw. Tryptophan (pAS2: TRP1) auf SD-Agarplatten, denen der entsprechende Aminosäurezusatz fehlte. Die kodierenden Gene der zu untersuchenden Proteine wurden in die Vektoren pAS2 und pACTII kloniert und diese in jeweils pAS2 / pACTII Kombination in *S. cerevisiae* Y153 eingebracht. Transformanten wurden für 2 Tage bei 30°C auf SD-Agarplatten (- Leucin; - Tryptophan) selektiert. Jeweils 6 Transformanten eines Versuchsansatzes wurden direkt nebeneinander auf eine Agarplatte mit identischer Zusammensetzung strichförmig aufgebracht, nach 2 Tagen bei 30 °C auf Rundfilter (Ø 82 mm, Schleicher & Schuell) übertragen und diese für einen weiteren Tag bei 30°C auf SD-Medium bebrütet. Durch Eintauchen der Filterpapiere in flüssigen Stickstoff wurden die Zellen aufgebrochen. Die Filter wurden anschließend mit den Zellen nach oben auf Gel-Blotting Papier (Ø 82 mm, Schleicher & Schuell) aufgelegt, das mit 3 ml Z-Puffer (16,1 g Na₂HPO₄; 5,5 g NaH₂PO₄; 0,75 g KCl; 0,25 g MgCl₂; 2,7 ml β-Mercaptoethanol pro Liter; pH 7) + 1 mg/ml X-Gal (Roth; Stammlösung: 100 mg/ml in N,N'-Dimethylformamid) getränkt war und bis zur Entwicklung einer blauen Färbung (β-Galaktosidase-Test) bei 30°C inkubiert.

2.12. Bildbearbeitung

Chemoluminogramme und Coomassie- bzw. silbergefärbte Polyacrylamidgele wurden mit einem Flachbrettscanner (UMAX UTC6400) mit einer Auflösung von 300 dpi eingelesen, mit Adobe Photoshop 6,0 graphisch bearbeitet und unter Verwendung von CanvasTM 7 beschriftet.

3. ERGEBNISSE

A. tumefaciens wurde 1907 (Smith und Townsend 1907) entdeckt und als Verursacher der Wurzelhalsgallenkrankheit von Pflanzen beschrieben. White und Braun (1942) konnten zeigen, dass im Verlauf des Infektionsprozesses ein „Tumor-induzierendes Prinzip“ an die Pflanzenzelle weitergegeben wird und diese zu autonomem Wachstum auf Medium ohne Hormonzusatz befähigt. Weiterführende Studien zur Temperatursensitivität des Infektionsprozesses (Braun 1950) führten zu der Hypothese, dass ein Proteinkomplex an diesem Transfer beteiligt ist. Erst 1974 konnte jedoch gezeigt werden, dass *A. tumefaciens* über ein für die Virulenz essentielles Plasmid (Ti-Plasmid) verfügt (Zaenen *et al.* 1974) und dass es sich bei dem transferierten „Tumor-induzierenden Prinzip“ um DNA bzw. einen Teil dieses Plasmids handelte (Chilton *et al.* 1977). Genetische Modifikationen des Ti-Plasmids ermöglichten den Transfer und Einbau von Fremd-DNA in pflanzliche Zellen und damit die Herstellung transgener Pflanzen (Binns 2002). Trotz des heutzutage weit verbreiteten Einsatzes von *A. tumefaciens* in der pflanzlichen Biotechnologie ist der dem T-DNA Transfer zu Grunde liegende Mechanismus noch immer nicht vollständig geklärt. Frühe Studien bemühten sich um die Identifizierung der am T-DNA-Transferprozess beteiligten Proteine und deren Lokalisation in der Zelle (Kuldau *et al.* 1990, Beijersbergen *et al.* 1994). Aufgrund der Summe der zur Verfügung stehenden Informationen wird inzwischen davon ausgegangen, dass die Vir-Proteine VirB1-B11 und VirD4 einen die innere und äußere Membranen der bakteriellen Zelle durchspannenden Komplex, sowie einen exozellulären Pilus bilden. Einigen der Proteine konnten mögliche Funktionen zugewiesen werden, wie zum Beispiel VirB1 eine Beteiligung an der partiellen Lyse der Mureinschicht und den ATPasen VirB4, VirB11 und VirD4 eine Funktion als Energielieferanten (Zupan *et al.* 2000). Ausschlaggebend ist jedoch das Zusammenspiel dieser Komponenten, aus dem sich Struktur und Funktionsweise des VirB/D4-Transporters ergeben. Für beide Prozesse sind Protein-Protein-Interaktionen von entscheidender Wichtigkeit.

3.1. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen im Typ IV-Sekretionssystem von *A. tumefaciens* C58

Bei der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen im VirB/D4-Transmembrankomplex muss berücksichtigt werden, dass es sich bei den involvierten Komponenten vorwiegend um

integrale Membranproteine und membran-assoziierte Proteine handelt. Dieser Umstand verhindert in einigen Fällen die Aufreinigung der Proteine, welche aber für die Durchführung von *in vitro*-Interaktionsstudien nötig wäre. Durch Aufreinigung hydrophiler Teilbereiche der Proteine kann das Löslichkeitsproblem umgangen werden. Dabei entfallen allerdings Interaktionen, die über membran-gebundene Anteile eingegangen werden könnten. Um auch diese Interaktionen in die Analysen mit einbeziehen zu können, wurde im Folgenden der Versuch unternommen, den VirB/D4-Transmembrankomplexes von *A. tumefaciens* C58 bzw. Teile davon unter Verwendung des milden, nicht-ionischen Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) aus der Membran zu isolieren und in weitergehenden Untersuchungen auf Proteinbestandteile hin zu analysieren.

3.1.1. Solubilisierung der Proteine des VirB/D4-Transmembrankomplexes unter Verwendung des Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)

Die Solubilisierung des VirB/D4-Transmembrankomplexes wurde in Anlehnung an die von Schägger und v. Jagow (1991) durchgeführten Experimente zur Analyse der membran-gebundenen Proteinkomplexe der mitochondrialen Atmungskette durchgeführt.

Membranproteine lassen sich mit Detergenzien aus Membranen extrahieren und in Lösung bringen. Abhängig vom verwendeten Detergenz und der eingesetzten Konzentration bleiben dabei auch Protein-Protein-Interaktionen erhalten. Da die Extrahierbarkeit eines Proteins oder Proteinkomplexes stark von Struktur und Zusammensetzung der hydrophoben Anteile abhängt, muss in Vorversuchen die Eignung des Detergenz, sowie eine optimale Detergenz-Konzentration ermittelt werden. Letztere sollte über der kritischen mizellären Konzentration (CMC-Wert) liegen, um die Bildung von Detergenz-Micellen zu erlauben. Sie sollte aber gleichzeitig so niedrig wie möglich gehalten werden, um ein Zerfallen der Multiprotein-komplexe zu vermeiden. Studien zum Extraktionsverhalten der Vir-Proteine wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Urs Wiedemann durchgeführt (Wiedemann 2000) und zeigten, dass sich das milde, nicht-ionische Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid (CMC-Wert: ca. 0,17 mM in H₂O; 0,12 mM in 0,2 M NaCl) zur Solubilisierung höhermolekularer Multiprotein-komplexe aus *A. tumefaciens* C58 eignete.

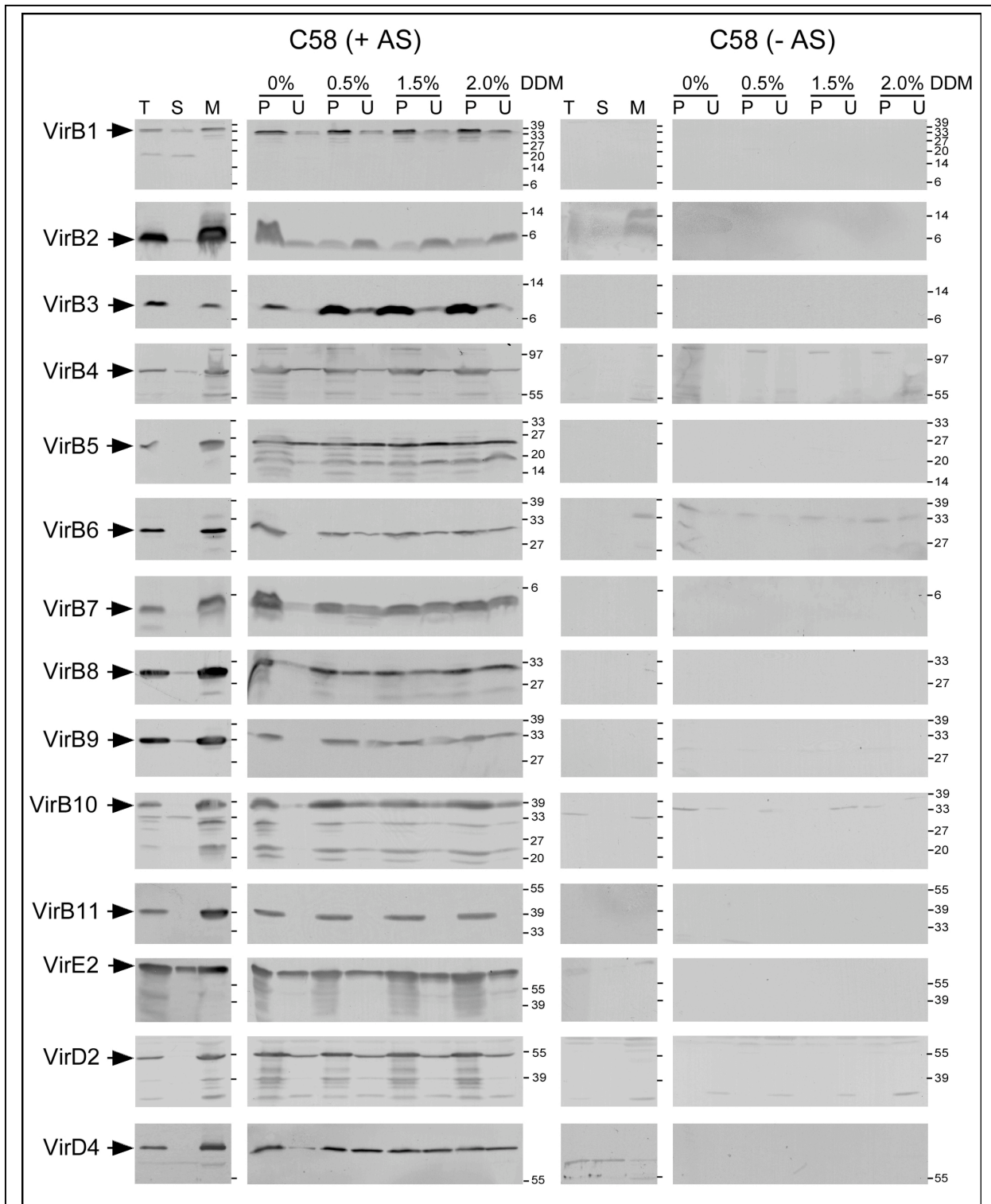


Abbildung 6: Solubilisierungs-Effizienz der Vir-Proteine. Virulenzgen-induzierte (+AS) und nicht-induzierte (-AS) *A. tumefaciens* C58-Zellen wurden einer Membranpräparation unterzogen („T“ = Totalzellysate, „S“ = lösliche Proteine, „M“ = Membransediment). Die Membranen wurden zur Extraktion der Vir-Proteine auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt, mit 0 - 2% n-Dodecyl-β-D-Maltosid (DDM) versetzt und mittels Ultrazentrifugation in DDM-solubilisierbare („U“) und nicht-solubilisierbare („P“) Membranproteine getrennt. Nach Separation der Proben mittels SDS-PAGE und Transfer auf PVDF-Membran wurde die Solubilisierungs-Effizienz der Vir-Proteine unter Verwendung spezifischer Antiseren analysiert.

Abbildung 6 zeigt den Verlauf einer Membranpräparation von *A. tumefaciens* C58 mit Auftrennung des nach Aufbruch der Zellen erhaltenen Totalzellysates mittels Ultrazentrifugation in lösliche Proteine („S“) und Membransediment („M“). In Einklang mit früheren Studien lagen die Vir-Proteine, mit Ausnahme von VirB1 und VirE2, fast ausschließlich in membran-assoziiierter Form vor.

Zur Abschätzung des Solubilisierungsverhaltens der Vir-Proteine wurde das Membransediment in ACA-Puffer resuspendiert, auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt und mit DDM in verschiedenen Konzentrationen (0 - 2 %) versetzt. Nach erfolgter Extraktion wurde der Anteil DDM-unlöslicher Membranproteine („P“) durch Ultrazentrifugation von den DDM-löslichen Membranproteinen („U“) abgetrennt. Von beiden Fraktionen wurden Proben genommen, mittels SDS-PAGE separiert und im „western blot“-Verfahren unter Verwendung spezifischer Antiseren analysiert. Wie in Abbildung 6 zu sehen, ließen sich die Vir-Proteine VirB1, VirB2, VirB4, VirB5, VirE2, VirD2 leicht und auch ohne Zugabe von DDM („0 % P U“-Spur) in Lösung bringen. Die Solubilisierung bei 0 % DDM wurde vermutlich durch die schwache Detergenzwirkung der ebenfalls im Puffer vorhandenen ϵ -Amino-n-capronsäure hervorgerufen. Für die Solubilisierung der Vir-Proteine VirB3, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9, VirB10 und VirD4 war zumindest eine DDM-Konzentration von 0,5 % notwendig, während VirB11 auch bei hohen DDM-Konzentrationen (2 %) nicht, oder nur in sehr geringen Mengen in Lösung zu bringen war. Rashkova *et al.* (1997) hatten bereits in früheren Studien beobachtet, dass VirB11 der Extraktion mit nicht-ionischen Detergenzien kaum zugänglich ist. Der Grund hierfür ist unbekannt.

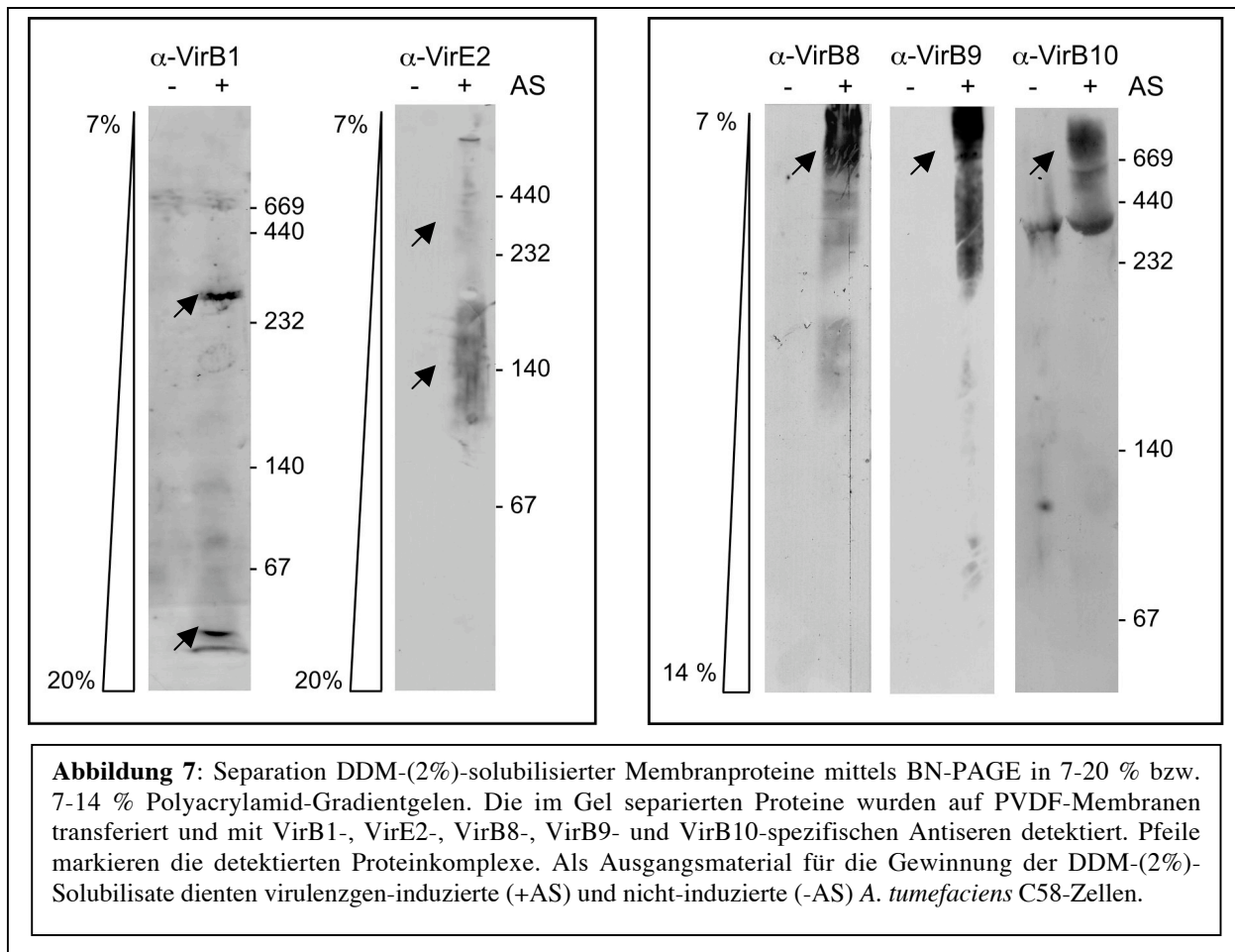
Für alle weiteren Experimente wurden die Vir-Proteine bei einer DDM-Konzentration von 2,0 % solubilisiert. Damit sollte gewährleistet werden, dass der Grossteil der Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes in solubilisierter Form für weitere Analysen zur Verfügung stand.

3.1.2. Auftrennung der DDM-solubilierten Proteine mittels Blauer nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Solubilierte Membranproteine können unter schonenden Bedingungen mittels BN-PAGE separiert werden. Die Auftrennung erfolgt dabei in Polyacrylamid-Gradientengelen, in denen

die Proteinkomplexe soweit wandern, bis ihnen das Polyacrylamid-Netzwerk eine weitere Passage verwehrt (Schägger und v. Jagow 1991, Schägger *et al.* 1994). Um die native Konformation der Proteine und Proteinkomplexe während der elektrophoretischen Separation zu gewährleisten, wird auf SDS-haltige Lösungen verzichtet. Das für die denaturierende SDS-PAGE verwendete SDS (Natriumdodecylsulfat) lagert sich an Proteine an, entfaltet sie und zerstört Interaktionen. Gleichzeitig verleiht es den Proteinen aber die für die elektrophoretische Auftrennung notwendige negative Ladung. Für die BN-PAGE wurden die Proben statt dessen mit Coomassie versetzt. Dieser negativ geladene Farbstoff lagert sich ebenfalls an Proteine an, ohne jedoch die native Konformation in dem Ausmaß wie SDS zu zerstören.

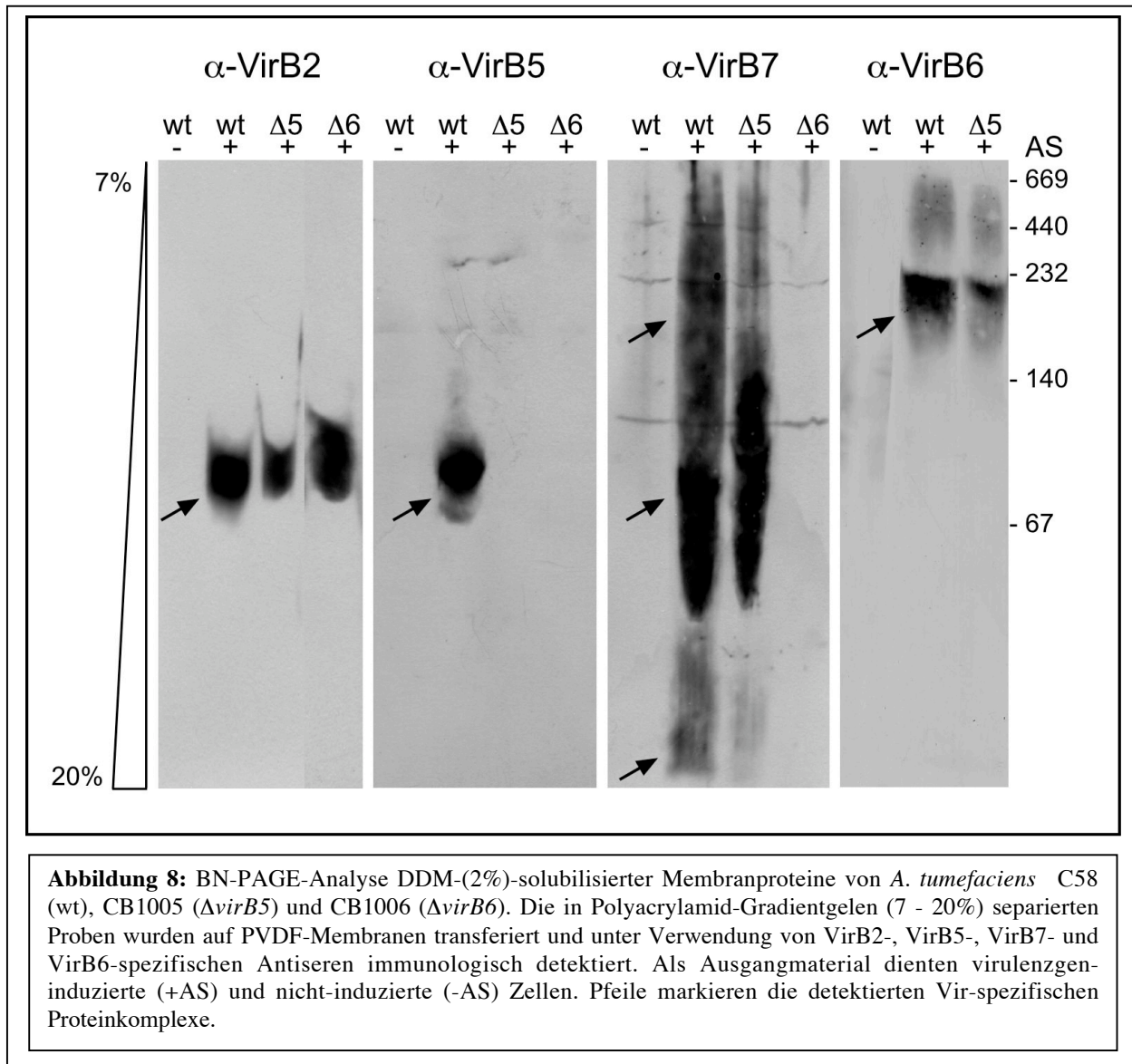
Für die Analyse des VirB/D4-Transmembrankomplexes wurden die Membranen virulenzgen-induzierter (+AS) und nicht-induzierter (-AS) *A. tumefaciens* C58-Zellen isoliert und einer Extraktion mit 2 % DDM unterzogen. 15 µl der solubilisierten Proteinkomplexe wurden mittels BN-PAGE in Polyacrylamid-Gradientgelen (7 - 14 % bzw. 7 - 20 %) separiert und nach Transfer auf PVDF-Membran mit Vir-Protein-spezifischen Antisera auf ihre Komponenten hin analysiert. Wie in Abbildung 7 zu sehen, konnten die Vir-Proteine VirB1, VirE2, VirB8, VirB9 und VirB10 dabei in Komplexen unterschiedlicher molekularer Massen detektiert werden. Die Analyse mit VirB1-spezifischem Antiserum ergab zwei Signale, von denen eines (< 67 kDa) vermutlich das VirB1-Monomer (26 kDa) darstellte. Das zweite Signal entsprach einem Proteinkomplex von > 232 kDa, der jedoch keine signifikanten Übereinstimmungen zu Proteinkomplexen zeigte, die von anderen Vir-Protein-spezifischen Antisera detektiert wurden. VirE2 konnte in Komplexen mit molekularen Massen von < 140 kDa bis > 440 kDa nachgewiesen werden. Da VirE2 ca. 60 kDa groß ist, handelte es sich hierbei um VirE2-Dimere, VirE2-Multimere oder Verbindungen von VirE2 mit anderen Vir-Proteinen. Die Vir-Proteine VirB8, VirB9 und VirB10 kofraktionierten in Komplexen der gleichen molekularen Masse (> 232 kDa). In Übereinstimmung mit Studien von Das und Xie (2000) und Kumar *et al.* (2000) spricht dies für eine Assemblierung von VirB8, VirB9 und VirB10 zu einem Multiproteinkomplex mit hoher molekularer Masse.



Die Analyse mit VirB3-, VirB4-, VirB11-, VirD2- und VirD4-spezifischen Antisera erbrachte keine verwertbaren Resultate. Im Fall von VirB3, VirB4, VirD2 und VirD4 wurden eventuelle Signale von unspezifischen Kreuzreaktionen überlagert. Im Fall von VirB11 war kein Signal detektierbar, was vermutlich an der geringen Solubilisierbarkeit des Proteins lag.

Die Analyse mit VirB2-, VirB5- und VirB7-spezifischen Antisera hingegen ergab eine auffallende Übereinstimmung der Signalmuster, die anhand von DDM-(2%)-Solubilisaten der *A. tumefaciens*-Stämme CB1005 ($\Delta virB5$) und CB1006 ($\Delta virB6$) näher untersucht wurde. Sowohl VirB2, als auch VirB5 und VirB7 kofraktionierten im Bereich von Komplexen der molekularen Massen von ca. 100 kDa. VirB7 fraktionierte zudem auch in Komplexen höherer und niedrigerer molekularer Masse (siehe Abbildung 8). Sowohl VirB2, als auch VirB5 und VirB7 sind Bestandteile des T-Pilus (Lai und Kado 1998, Schmidt-Eisenlohr *et al.* 1999 b, Sagulenko *et al.* 2001 a). Da dieser im Verlauf von Membranpräparation und DDM-

Extraktion jedoch höchstwahrscheinlich zerstört wird, könnte es sich bei dem detektierten 100 kDa Proteinkomplex um eine Assemblierungs-Vorstufe des T-Pilus handeln.



Während VirB2 bei Analyse der DDM-(2%)-Solubilisate von *A. tumefaciens* CB1005 und CB1006 ein identisches Fraktionierungsverhalten wie in C58 (wt) zeigte, waren die VirB7-spezifischen Signale in CB1005 leicht reduziert und wurden in Proben von CB1006 nicht detektiert. VirB5 konnte weder in CB1005 noch in CB1006 detektiert werden. Bei Detektion mit VirB8-, VirB9- und VirB10-spezifischen Antiseren konnten keine Unterschiede zu C58 (wt) festgestellt werden (nicht gezeigt). Frühere Analysen belegten, dass die Menge an VirB5 in CB1006-Zellen erniedrigt ist (Hapfelmeier *et al.* 2000). VirB6 stabilisiert offenbar VirB5, während die VirB6-Menge in CB1005-Zellen dem wt-Level entspricht. Wie in Abbildung 8 zu sehen, ist VirB6 jedoch keine Komponente des VirB2-, VirB5- und VirB7-spezifischen

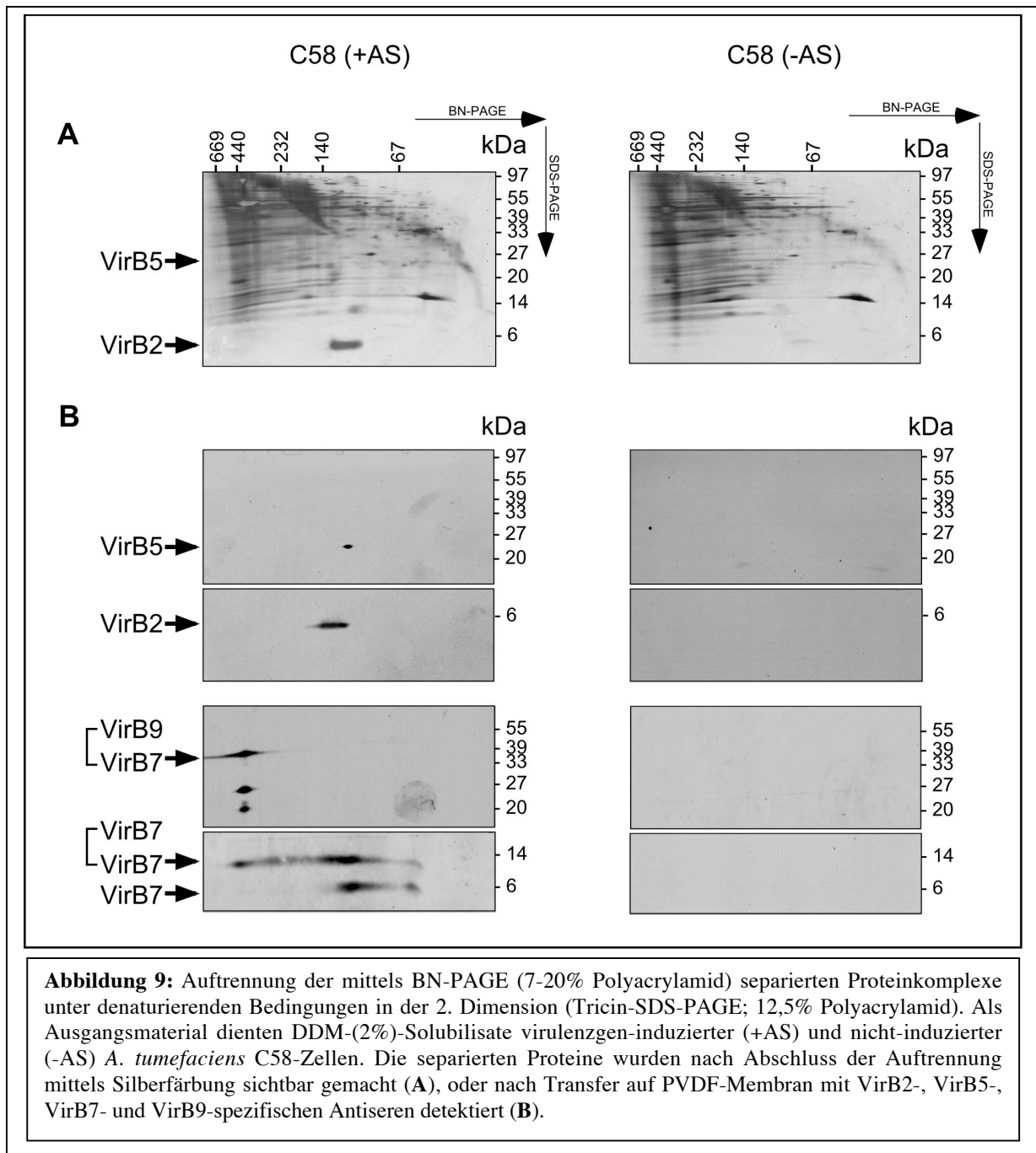
100 kDa Proteinkomplexes. Die Stabilisierung von VirB5 durch VirB6 erfolgt somit transient oder indirekt und unter Beteiligung anderer Vir-Proteine. Im höher molekularen Bereich (< 232 kDa) zeigten sich Überlappungen der VirB6- und VirB7-spezifischen Signalmuster. Dies sprach für eine Kofraktionierung und eventuelle Interaktion der beiden Proteine. VirB6 könnte somit über VirB7 einen stabilisierenden Einfluss auf VirB5 ausüben.

Die fehlende Bildung von VirB7-VirB7-Homodimeren in CB1006 wurde bereits in früheren Studien gezeigt (Hapfelmeier *et al.* 2002). Die Resultate der BN-PAGE-Analyse legen zudem nahe, dass in CB1006 generell auch die Assemblierung von VirB7 und VirB5 zu membran-assoziierten Proteinkomplexen gestört ist. Letzteres könnte der Grund für die in CB1006 beobachtete erniedrigte Menge von VirB5 sein, da VirB5 vermutlich erst durch Interaktion mit Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes vor dem Abbau durch periplasmatische Proteasen geschützt wird (Schmidt-Eisenlohr *et al.* 1999 b).

3.1.3. Separation der mittels BN-PAGE aufgetrennten Proteinkomplexe unter denaturierenden Bedingungen (2. Dimension)

Die mittels BN-PAGE separierten Proteinkomplexe konnten durch Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) in ihre Einzelkomponenten zerlegt werden.

Abbildung 9 zeigt die Resultate einer 2D-Gelelektrophorese-Analyse der VirB2-, VirB5- und VirB7-spezifischen Proteinkomplexe. DDM-(2%)-Solubilisate von *A. tumefaciens* C58 wurden in der 1. Dimension unter nativen Bedingungen separiert (BN-PAGE; 7-20 % Polyacrylamid) und die separierten Proteinkomplexe in einer 2. Dimension (Tricin-SDS-PAGE; 12,5 % Polyacrylamid) in ihre Einzelkomponenten zerlegt. Bereits bei Silberfärbung der 2D-Gele ließen sich Unterschiede im Muster der separierten Proteine erkennen (Abbildung 9 A), wobei ein auffallend starkes Signal bei ca. 4 kDa (C58, +AS) vermutlich VirB2 entsprach. Die eindeutige Identifizierung der Vir-Proteine erfolgte nach Transfer auf PVDF-Membran unter Verwendung VirB2-, VirB5-, VirB7- und VirB9-spezifischer Antiseren und ist in Abbildung 9 B gezeigt.



Wie in Abbildung 9 B zu sehen, konnten VirB2, VirB5, VirB7-Monomere und VirB7-VirB7-Homodimere als Komponenten des unter nativen Bedingungen isolierten 100 kDa Proteinkomplexes ermittelt werden. VirB7-VirB7-Homodimere traten zudem auch in Proteinkomplexen höherer molekularer Masse und insbesondere im Bereich von VirB7-VirB9-Heterodimeren auf.

3.1.4. Auftrennung der DDM-solubilisierten Proteine mittels Gelfiltrations-Chromatographie

Da einige der Vir-Proteine (VirB3, VirB4, VirB11, VirD2 und VirD4) im Rahmen der BN-PAGE nicht analysiert werden konnten, wurden alternativ 500 µl der DDM-(2%)-Solubilisate mittels Gelfiltrations-Chromatographie aufgetrennt. Das Auflösungsvermögen (10 kDa - 600 kDa) der verwendeten XK 16/70 Superdex 200-Säule entsprach dem Auflösungsvermögen der BN-PAGE. Die Verwendung der Gelfiltrations-Säule hatte aber den Vorteil, dass die Ladung der Proteine für eine Separation unwesentlich war. Dadurch konnten auch Proteine und Multiproteinkomplexe separiert werden, die trotz Beladung mit Coomassie eine neutrale oder positive Nettoladung beibehielten und im elektrischen Feld der BN-PAGE nicht bzw. in die entgegen gesetzte Richtung wanderten. Um auch Proteine erfassen zu können, die sich aufgrund geringer Solubilisierbarkeit oder schwacher Antiseren einer Detektion nach Extraktion aus C58 entzogen, wurde der Versuch mit *A. tumefaciens* C58-pPZP300 und CB1005-pPZP300 durchgeführt. Das Plasmid pPZP300 trägt eine Kopie des für den Transkriptionsaktivator VirG kodierenden Gens von pTiC58 und sorgte für eine 2-3 fach verstärkte Expression der Vir-Proteine. Die Eluate der Gelfiltrations-Chromatographie wurden zusätzlich durch TCA-Fällung aufkonzentriert. Die Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE erlaubte zudem eine bessere Fokussierung der Signale als es mittels BN-PAGE möglich war.

In Abbildung 10 und 11 sind die Resultate einer Gelfiltrations-Chromatographie mit DDM-(2%)-Solubilisaten von C58-pPZP300 (Abbildung 10) und CB1005-pPZP300 (Abbildung 11) gezeigt. Die eluierten Proteine wurden nach SDS-PAGE auf PVDF-Membran transferiert und mit Vir-Protein-spezifischen Antiseren analysiert. Wie im Rahmen der BN-PAGE-Analyse wurde auch mittels Gelfiltrations-Chromatographie die Separation eines hochmolekularen Proteinkomplexes (> 669 bis ca. 440 kDa) von einem niedrigmolekularen Proteinkomplex (ca. 100-67 kDa) erzielt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der BN-PAGE war zudem eine Analyse des Fraktionierungsverhaltens der Vir-Proteine VirB3, VirB4, VirB11, VirD2 und VirD4 möglich.

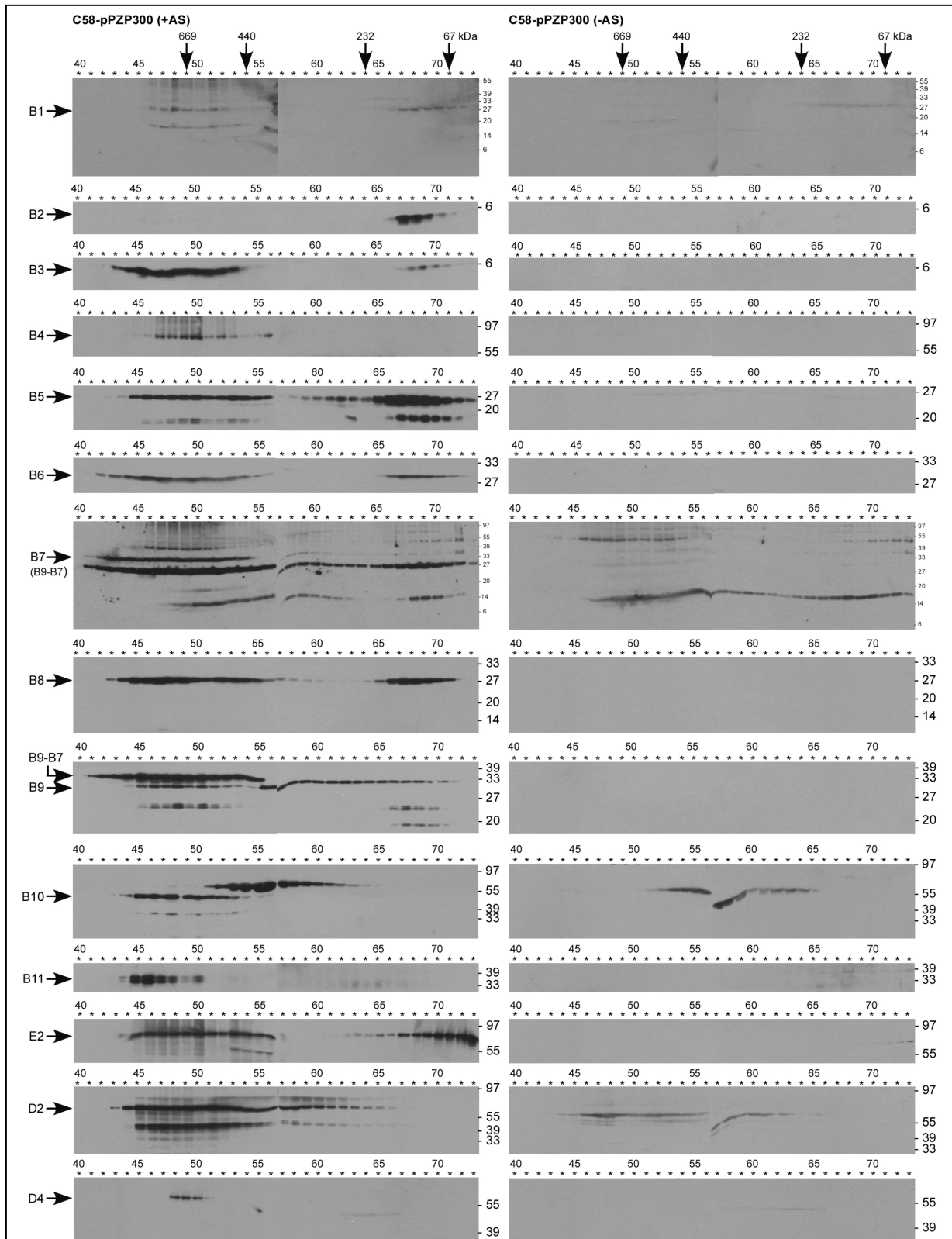
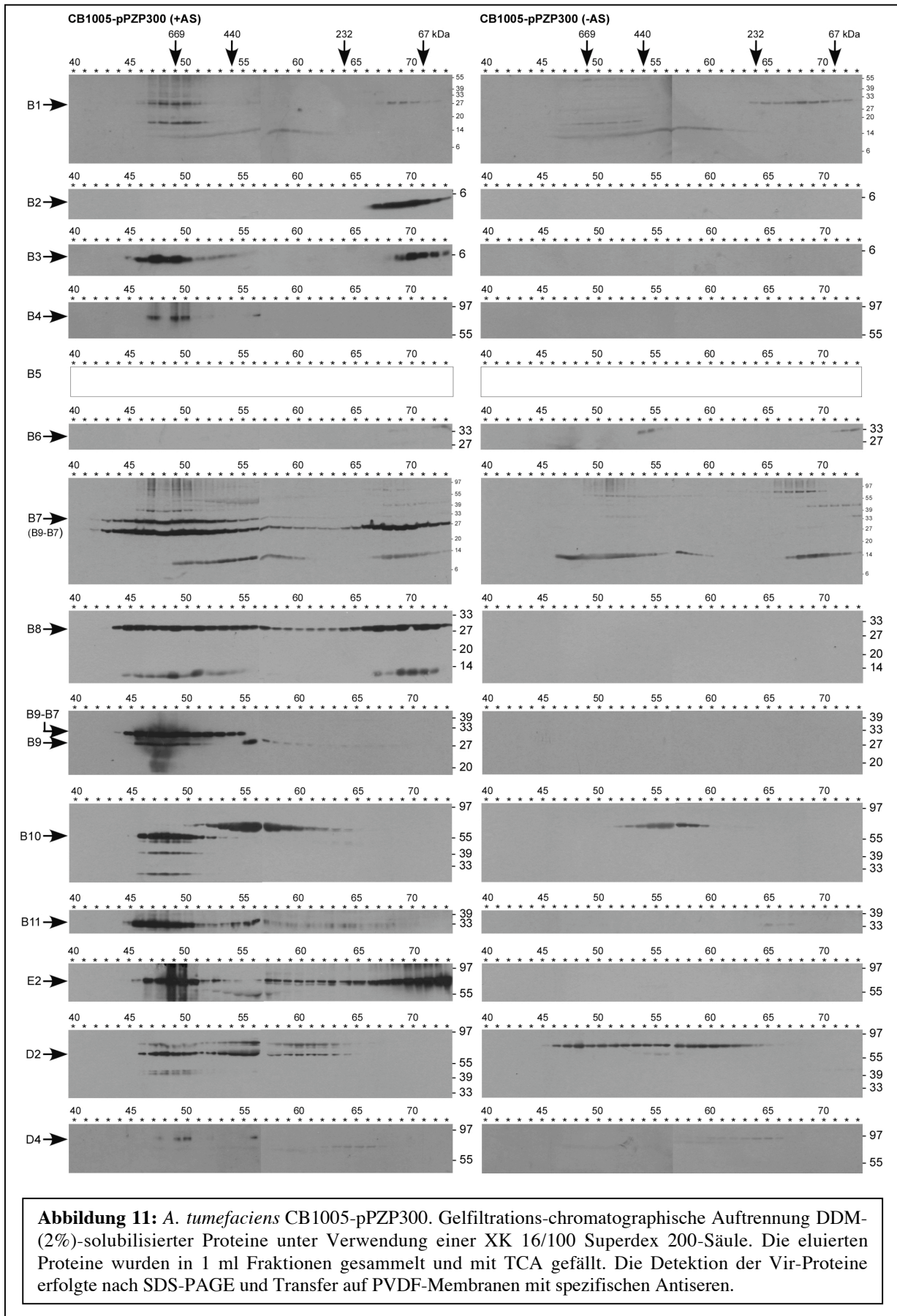


Abbildung 10: *A. tumefaciens* C58-pPZP300. Gelfiltrations-chromatographische Auftrennung DDM-(2%)-solubilisierter Proteine unter Verwendung einer XK 16/100 Superdex 200-Säule. Die eluierten Proteine wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt und mit TCA gefällt. Die Detektion der Vir-Proteine erfolgte nach SDS-PAGE und Transfer auf PVDF-Membranen mit spezifischen Antisern.

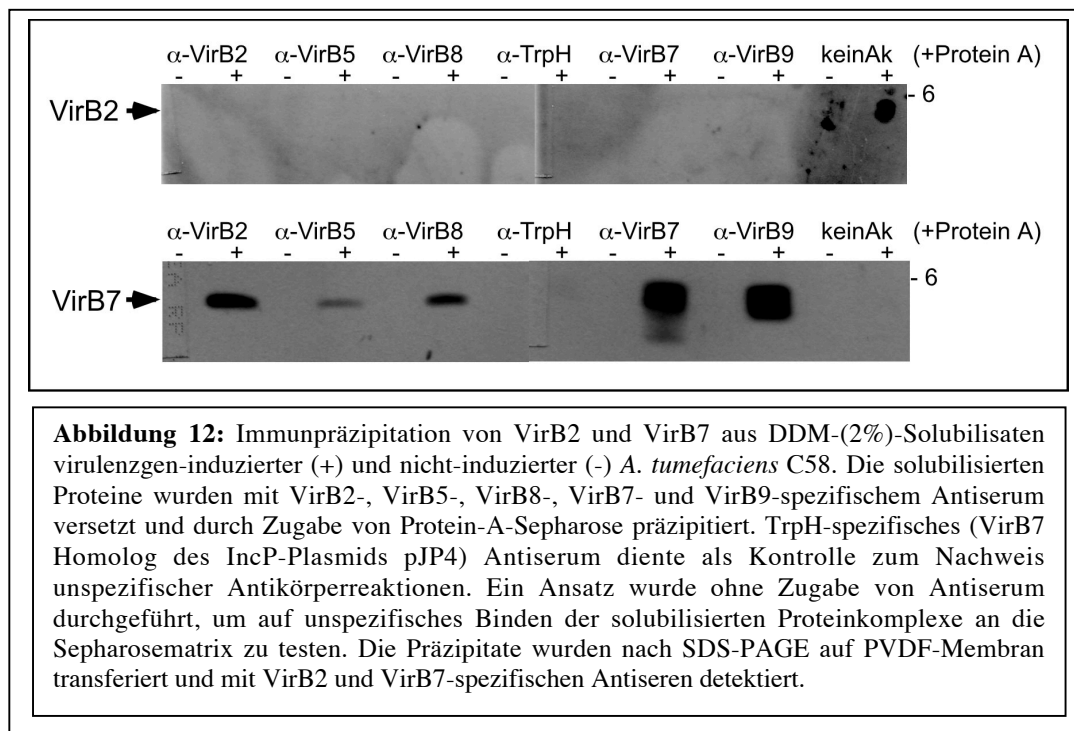


Durch Vergleich der Resultate für C58-pPZP300 und CB1005-pPZP300 sollte festgestellt werden, inwieweit das Fehlen von VirB5 die Assemblierung der restlichen Vir-Proteine und damit die des VirB/D4-Transmembrankomplexes beeinflusst. Da allerdings kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte, musste davon ausgegangen werden, dass das Auflösungsvermögen der XK 16/100 Superdex 200-Säule nicht ausreichend war, um die eintretenden Änderungen zu detektieren. Eine alternative Interpretation ist, dass VirB5 keine essentielle Komponente für die Struktur des VirB/D4-Transmembrankomplexes darstellt und dieser deshalb auch in Abwesenheit von VirB5 seine Integrität beibehält. Dies passt gut zu der Annahme, dass die Funktion von VirB5 vorrangig mit der Assemblierung des T-Pilus verknüpft ist.

Sowohl bei gelfiltrations-chromatographischer Separation der DDM-(2%)-Solubilisate von C58-pPZP300, als auch von CB1005-pPZP300 wurde eine Auftrennung der Vir-Proteine in zwei Hauptfraktionen von $> 669 - 440$ kDa und ca. $100 - 67$ kDa beobachtet. Die Fraktion der Proteinkomplexe mit hoher molekularer Masse ($> 669 - 440$ kDa) beinhaltete VirB1, VirB3, VirB4, VirB5, VirB6, VirB7-VirB9, VirB8, VirB9, VirB10, VirB11, VirE2, VirD2 und VirD4 und repräsentiert vermutlich den in einem Stück solubilisierten VirB/D4-Transmembrankomplex. Die Vir-Proteine VirB1, VirB4, VirB7-VirB9, VirB10, VirB11, VirD2 und VirD4 waren ausschließlich in der hoch molekularen Fraktion zu finden und sind daher vermutlich besonders eng mit dem VirB/D4-Transmembrankomplex verbunden. VirB2, VirB3, VirB5, VirB6, VirB8, VirB9 und VirE2 wurden zusätzlich auch in Proteinkomplexen niedrigerer molekularer Masse (ca. 100 kDa – 67 kDa) detektiert. Bei letzteren könnte es sich um locker mit der Transporter-Struktur verbundene Komponenten handeln, um unvollständig assemblierte VirB/D4-Transmembrankomplexe, bzw. Vorstufen die zur Assemblierung der Gesamtstruktur oder des T-Pilus benötigt werden. Aussagen betreffend des Einflusses von VirB5 auf die Fraktionierung von VirB7-VirB7-Homodimeren und VirB7-Monomeren konnten nicht getroffen werden, da unspezifische Kreuzreaktionen des verwendeten Antiserums nur die eindeutige Identifizierung des VirB7-VirB9-Heterodimers erlaubten. Wiederholungen des Experiments zeigten, dass es im Gegensatz zu den in Abbildung 11 dargestellten Resultaten keinen Einfluss von VirB5 auf die zelluläre Konzentration, Solubilisierungs-Effizienz oder das Fraktionierungsverhalten VirB6-spezifischer Proteinkomplexe bei gelfiltrations-chromatographischer Separation gab.

3.1.5. Coimmunpräzipitation DDM-solubilisierter Proteine

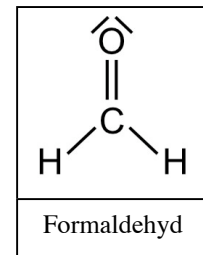
Durch Coimmunpräzipitation sollten die Interaktionen zwischen den T-Pilus-Komponenten VirB2, VirB5 und VirB7 bestätigt werden. Dazu wurden DDM-(2%)-solubilierte Proteine von *A. tumefaciens* C58 mit spezifischen Antiseren versetzt und die so markierten Proteinkomplexe unter Zugabe von Protein-A-Sepharose präzipitiert.



VirB7 konnte mit Antiseren präzipitiert werden, die gegen VirB2, VirB5, VirB8 und VirB9 gerichtet waren, nicht jedoch mit Antiseren gegen VirB10 und VirB11 (nicht gezeigt). VirB2 hingegen konnte mit keinem der in Abbildung 12 gezeigten Antiseren präzipitiert werden. Möglicherweise waren die präzipitierten Mengen nicht ausreichend für eine immunologische Detektion. Eine Analyse der Coimmunpräzipitate mit VirB5-spezifischem Antiserum war nicht möglich, da die VirB5-spezifischen Signale durch unspezifische Kreuzreaktion der leichten Kette der mit Protein-A präzipitierten Antikörper überlagert wurden.

3.1.6. Quervernetzung von C58-Zellen mit Formaldehyd

Zur Detektion von *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen wurden *A. tumefaciens* Zellen mit dem Quervernetzungsreagenz Formaldehyd behandelt. Formaldehyd (FA) ist ein kleines wasserlösliches Molekül, das auch Membranen durchdringen kann. Durch kovalente Verknüpfung von Lysin-, Cystein- und Tyrosin-Resten, sowie in geringerem Umfang Tryptophan, Histidin, Aspartat und Arginin vernetzt es Proteine, die sich in



unmittelbarer Nachbarschaft befinden und daher vermutlich auch funktionelle Partner sind. Die kovalente Verknüpfung stabilisiert auch schwache Interaktionen und verhindert, dass die verknüpften Proteinkomplexe bei einer anschließenden Analyse auseinander fallen. Die Identifikation der gebildeten Proteinkomplexe erfolgt anhand ihrer Molekülgrößen. Es muss dabei berücksichtigt werden, dass auch nicht miteinander interagierende, in enger Nachbarschaft stehende Proteine vernetzt werden können. Die Quervernetzung mit Formaldehyd kann daher nur als ein Hinweis auf mögliche Protein-Protein-Interaktionen gewertet werden und muss durch zusätzliche Analysen bestätigt werden.

Für die *in vivo* Quervernetzung der Vir-Proteine wurden Suspensionen Virulenzgen-induzierter (+AS) und nicht-induzierter (-AS) *A. tumefaciens* C58-Zellen auf einen einheitlichen OD₆₀₀-Wert von 1,0 eingestellt und mit Formaldehyd in verschiedenen Konzentrationen (0 – 1 %) versetzt. Nach der Vernetzung wurden die Zellen in SDS-haltigem Probenpuffer lysiert, die Zelllysate mittels SDS-PAGE separiert und nach Transfer auf PVDF-Membran unter Verwendung spezifischer Antiseren detektiert.

Wie in Abbildung 13 zu sehen, konnten für alle Vir-Proteine bis auf VirB2 und VirB3 Quervernetzungsprodukte nachgewiesen werden. Das Fehlen von **VirB2**- und **VirB3**-spezifischen Quervernetzungsprodukten lag vermutlich zum Teil an der geringen Größe der Proteine, wodurch die Anzahl der für eine Vernetzung zur Verfügung stehenden Gruppen beschränkt war. Zudem könnten diese Gruppen durch die Tertiärstruktur der Proteine vor einer Vernetzung geschützt gewesen sein.

VirB4, **VirB11**, **VirD2** und **VirD4** wurden mit FA effizient quervernetzt. Die gebildeten Komplexe waren sehr groß und wanderten aus den Auftragstaschen nicht oder nur wenig in die Gelmatrix ein. Bei 0,1 % FA lag jeweils ca. die Hälfte des vorhandenen Proteins in vernetzter Form vor, bei 0,5 % FA betrug der Anteil fast 100 %. Damit unterschieden sich VirB4, VirB11, VirD2 und VirD4 von anderen Vir-Proteinen, die selbst bei 1 % FA noch in

unvernetzter Form detektierbar waren. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass VirB4, VirB11, VirD2 und VirD4 besonders eng in den VirB/D4-Transmembrankomplex oder andere oligomere Strukturen eingebunden sind und kaum als freie Monomere auftreten. **VirE2** zeigte ein ähnliches Vernetzungsverhalten wie VirB4, VirB11, VirD2 und VirD4. Die gebildeten Komplexe waren jedoch kleiner und ein Teil des VirE2 wurde bei 1 % FA auch in unvernetzter Form detektiert. Voneinander abgrenzbare Signale konnten nicht erzielt werden.

Bei **VirB1** mussten zwei Formen unterschieden werden, die eine Vernetzung mit anderen Vir-Proteinen eingehen konnten: Das Holoprotein VirB1 (28 kDa) und das Prozessierungsprodukt VirB1* (ca. 12 kDa). Bei VirB1-Vernetzungsprodukten mit einer molekularen Masse > 28 kDa war eine Unterscheidung zwischen VirB1- bzw. VirB1*-abhängigen Komplexen nicht möglich. Das bei Analyse mit VirB1-spezifischem Antiserum detektierte 27 kDa-Produkt musste jedoch durch Vernetzung von VirB1* entstanden sein. Es könnte sich dabei um ein VirB1*-VirB1* Dimer handeln, oder um eine Kombination VirB1*-VirB7. Sowohl für VirB7 wie VirB5 wurden Vernetzungsprodukte einer molekularen Masse von ca. 27 kDa gefunden.

Da **VirB5** jedoch ca. 25 kDa groß ist, musste das VirB5-spezifische 27 kDa Produkt aus der Vernetzung von VirB5 mit einem wesentlich kleinerem Protein als VirB1* resultieren. Für VirB5 konnten zudem Vernetzungsprodukte mit molekularen Massen von ca. 35 kDa, 55 kDa, 60 kDa und 80 kDa detektiert werden, sowie Vernetzungsprodukte mit einer molekularen Masse von > 97 kDa, die jedoch nicht separiert werden konnten. Werden die VirB5-spezifischen Signale mit denen anderer Vir-Proteine verglichen, so wäre eine Interaktion von VirB5 mit VirB1/VirB1*, VirB7, VirB8, VirB9 und VirB10 denkbar.

VirB6 bildete vier Vernetzungsprodukte mit molekularen Massen von > 97 kDa. Da die Vernetzungsprodukte der anderen Vir-Proteine in diesem Bereich meist keine klare Auflösung lieferten, konnte keine eindeutige Zuordnung getroffen werden. Zudem wäre es möglich, dass eines oder mehrere der Signale auf Kreuzreaktionen des Antiserums mit den Vernetzungsprodukten eines ca. 97 kDa großen, unspezifisch detektierten Proteins zurückzuführen sind.

Der Nachweis **VirB7**-spezifischer Vernetzungsprodukte wurde ebenfalls durch unspezifische Kreuzreaktionen des Antiserums erschwert. Mit Sicherheit ließen sich aber Produkte mit molekularen Massen von 10 kDa, 12 kDa, 17 kDa, 26 kDa und 35 kDa detektieren. Bei dem 10 kDa Produkt handelte es sich vermutlich um das vernetzte VirB7-VirB7-Homodimer, bei dem 35 kDa Produkt um VirB7-VirB9. Ein 35 kDa Vernetzungsprodukt war auch bei Analyse mit VirB9-spezifischem Antiserum zu sehen. Die

12 kDa- und 17 kDa-Produkte konnten keinem potentiellen Interaktionspartner zugeordnet werden, da aufgrund der geringen Größe nur VirB2 oder VirB3 in Frage kamen, diese aber offensichtlich nicht effizient vernetzt werden können. Das 26 kDa-Produkt zeigte Übereinstimmungen mit einem VirB1-Produkt ähnlicher Größe und könnte für eine Vernetzung von VirB7-VirB7 mit VirB1* sprechen.

VirB8 bildete zwei besonders ausgeprägte Vernetzungsprodukte von ca. 60 kDa und 80 kDa, sowie eines mit einer molekularen Masse > 97 kDa. Komplexe ähnlicher molekularer Massen wurden auch bei Detektion mit VirB1-, VirB5-, VirB9- und VirB10-spezifischen Antiseren beobachtet. Da es bereits Hinweise für Interaktionen zwischen VirB8 (ca. 30 kDa), VirB9 (32 kDa) und VirB10 (ca. 55 kDa) gibt (Kumar *et al.* 2000, Das und Xie 2000), könnte es sich bei den detektierten Produkten um paarweise vernetztes VirB8-VirB9 (Σ ca. 62 kDa) oder VirB8-VirB10 (Σ ca. 85 kDa) handeln. Eine Interaktion VirB8-VirB5 bzw. VirB8-VirB1 wäre ebenfalls nicht auszuschließen. Der > 97 kDa große Komplex könnte durch Verknüpfung eines VirB8-VirB9 bzw. VirB8-VirB10 Dimers mit einem zusätzlichen VirB9- oder VirB10-Molekül verursacht worden sein.

Bei dem mit **VirB9**-spezifischem Antiserum detektierten 35 kDa Produkt handelte es sich vermutlich um das vernetzte VirB9-VirB7-Heterodimer. Die höhermolekularen Vernetzungsprodukte könnten auf bereits bekannten Interaktionen von VirB9 mit VirB1* (Baron *et al.* 1997 a), sowie VirB8 und VirB10 (Kumar *et al.* 2000, Das und Xie 2000) beruhen.

Für **VirB10** konnte ein besonders ausgeprägtes Vernetzungsprodukt von ca. 80 kDa, sowie einige schwächer ausgeprägte Signale bei > 97 kDa nachgewiesen werden. Das ca. 80 kDa Produkt könnte für quervernetztes VirB8-VirB10 (Σ ca. 85 kDa) stehen.

Bei Quervernetzung von *A. tumefaciens* CB1005 mit Formaldehyd (1 %) konnte kein signifikanter Unterschied zu den in C58 (1 % FA) gebildeten Vernetzungsprodukten detektiert werden (nicht gezeigt).

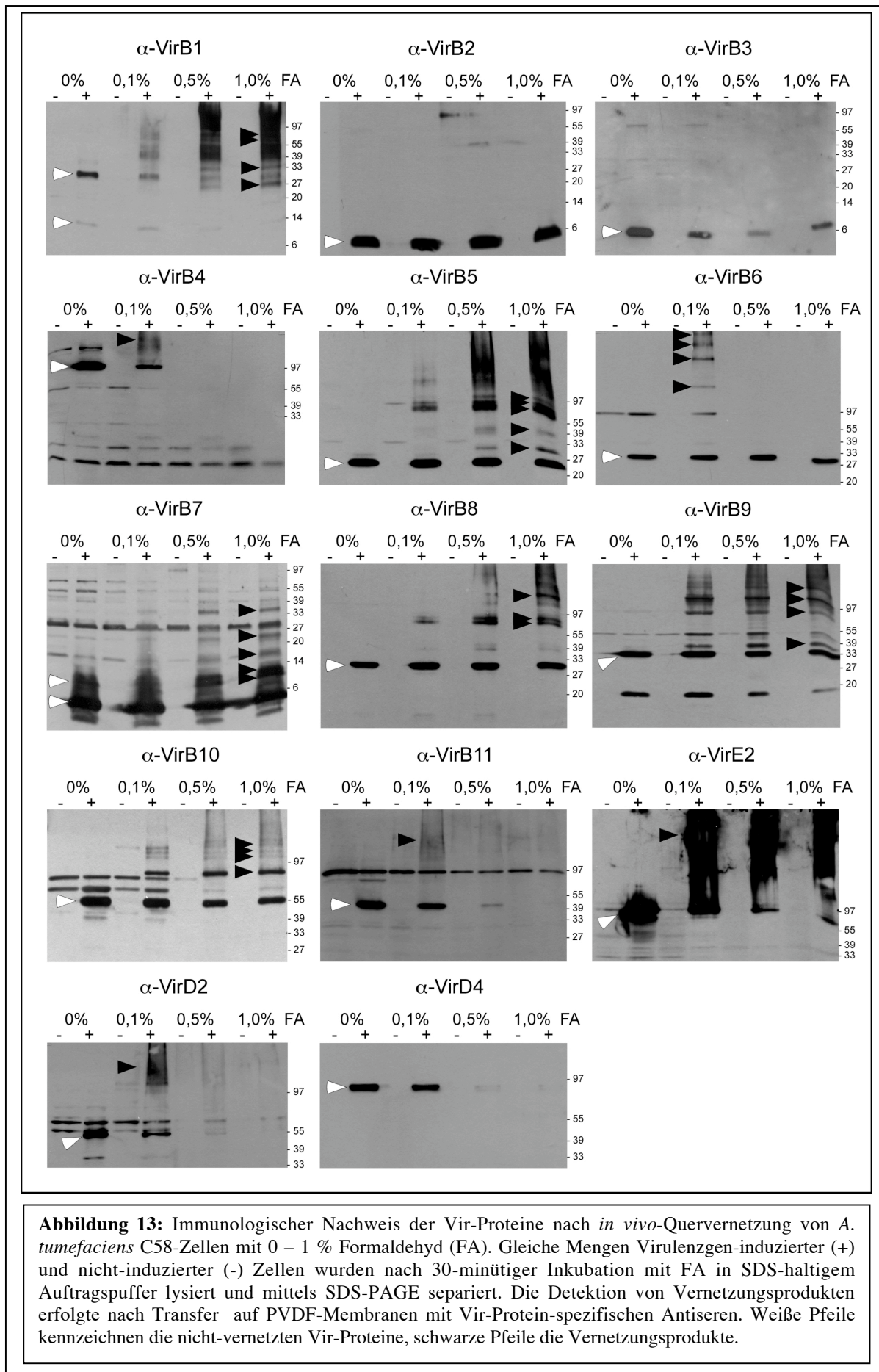


Abbildung 13: Immunologischer Nachweis der Vir-Proteine nach *in vivo*-Quervernetzung von *A. tumefaciens* C58-Zellen mit 0 – 1 % Formaldehyd (FA). Gleiche Mengen Virulenzgen-induzierter (+) und nicht-induzierter (-) Zellen wurden nach 30-minütiger Inkubation mit FA in SDS-haltigem Auftragspuffer lysiert und mittels SDS-PAGE separiert. Die Detektion von Vernetzungsprodukten erfolgte nach Transfer auf PVDF-Membranen mit Vir-Protein-spezifischen Antisera. Weiße Pfeile kennzeichnen die nicht-vernetzten Vir-Proteine, schwarze Pfeile die Vernetzungsprodukte.

3.1.7. Quervernetzung von T-Pili mit Formaldehyd

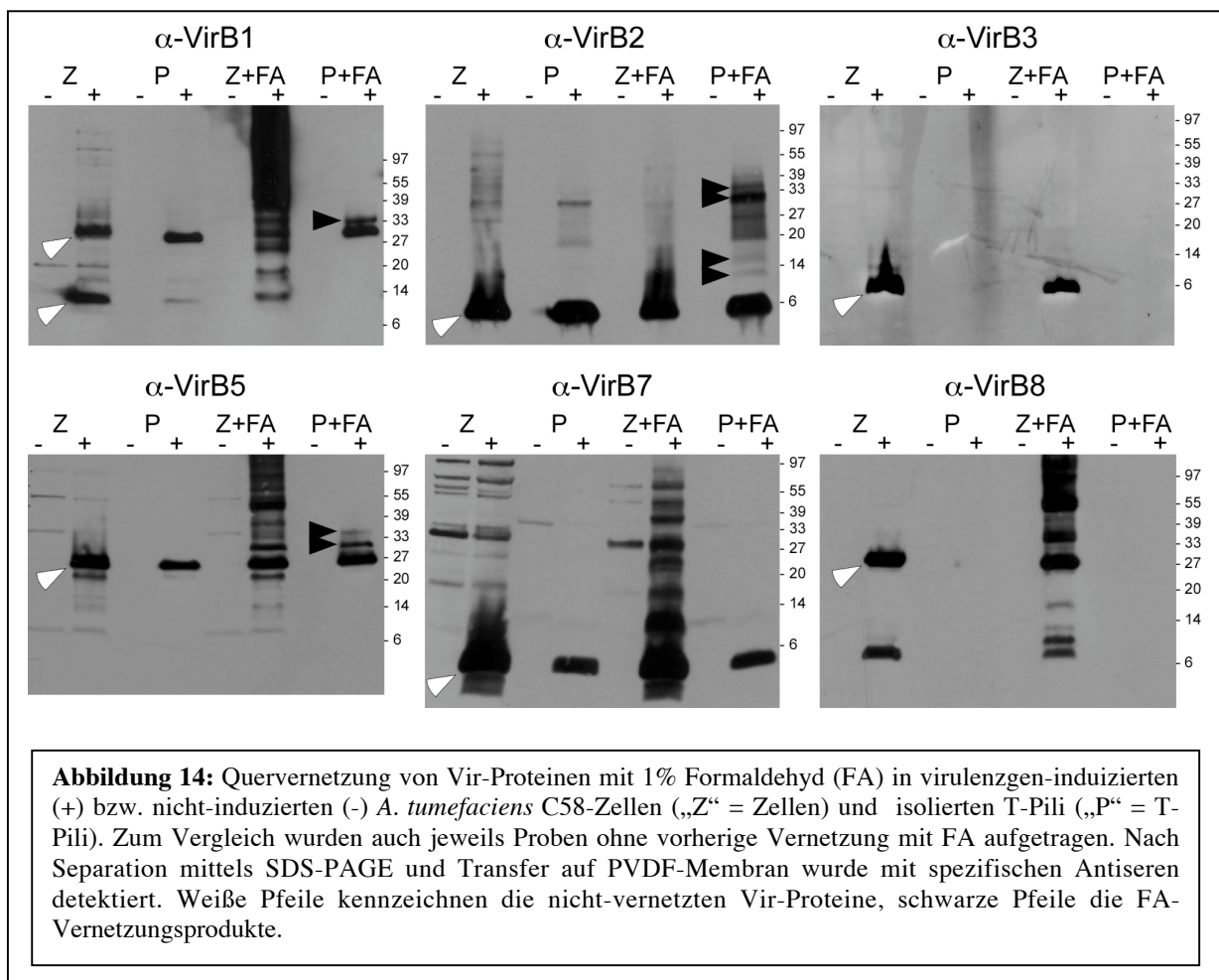
Für eine gezieltere Analyse von Protein-Protein-Interaktionen zwischen den T-Pilus Komponenten VirB2, VirB5 und VirB7 wurden die T-Pili virulenzgen-induzierter *A. tumefaciens* C58 Zellen isoliert und mit 1 % Formaldehyd vernetzt. Zur Kontrolle wurde die gleiche Prozedur auch mit nicht-induzierten *A. tumefaciens* C58-Zellen durchgeführt. Um auch schwache Signale zu detektieren, wurden die resultierenden Proben relativ in doppelter Menge aufgetragen, mittels Tricin-SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Die Ergebnisse der immunologischen Detektion sind in Abbildung 14 gezeigt.

Die immunologische Detektion mit **VirB8**-spezifischem Antiserum diente dazu, die Reinheit der Piluspräparation zu überprüfen. VirB8 lokalisiert in der inneren Membran von *A. tumefaciens*. Das VirB8-spezifische Antiserum gehört zu den stärksten der verfügbaren Antisera und hätte bei Verunreinigung der isolierten T-Pili mit Zellmaterial ein Signal ergeben müssen. Gleichzeitig wurde auch auf **VirB3** getestet. VirB3 lokalisiert im Gegensatz zu VirB8 in der äußeren Membran und könnte daher an der Assemblierung des T-Pilus beteiligt sein. Wie jedoch in Abbildung 14 zu sehen, konnte VirB3 ebenfalls nicht in den isolierten T-Pili nachgewiesen werden.

Durch die Anreicherung von VirB2, VirB5 und VirB7 in der T-Pilus-Fraktion konnten vor allem im Fall von VirB2 Vernetzungsprodukte sichtbar gemacht werden, die bei FA-(1 %)-Vernetzung intakter *A. tumefaciens*-Zellen nicht nachgewiesen werden konnten. **VirB2** bildete bei Behandlung mit 1 % FA Vernetzungsprodukte mit molekularen Massen von 10 kDa, 16 kDa, 30 kDa und 34 kDa (Abbildung 14). Bei dem 10 kDa-Produkt könnte es sich um ein VirB2-VirB2 Dimer (Σ 9 kDa) handeln. Eine VirB2-VirB2 Dimerisierung wurde bereits von Sagulenko *et al.* (2001 a) postuliert. Das 16 kDa Produkt könnte ein VirB2-Multimer darstellen. VirB7 ist das einzige Vir-Protein, das aufgrund seiner geringen Größe ebenfalls ein ähnlich großes Vernetzungsprodukt mit VirB2 ergeben könnte. Ein 16 kDa Vernetzungsprodukt konnte mit VirB7-spezifischem Antiserum jedoch nicht detektiert werden. Da das zu Verfügung stehende **VirB7**-Antiserum allerdings viele unspezifische Kreuzreaktionen und einen niedrigen α -VirB7-Titer aufwies, kann eine VirB2-VirB7 Interaktion nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Bei Detektion mit **VirB5**-spezifischem Antiserum wurden ebenso wie bei Detektion mit VirB2-spezifischem Antiserum

Vernetzungsprodukte mit molekularen Massen von 30 kDa und 34 kDa beobachtet. Es könnte sich hierbei daher um VirB5-VirB2 bzw. um mit VirB2-VirB2 vernetztes VirB5 handeln.

Überraschenderweise konnte auch **VirB1** (Holoprotein) in den isolierten T-Pili nachgewiesen werden. Eine Lokalisierung von VirB1 in den T-Pili wurde bis jetzt noch nicht beschrieben. Es gibt jedoch Untersuchungen, die zeigen, dass die Menge an zellulärem VirB2-Pilin in einer *virB1*-Deletionsmutante erniedrigt ist, nicht jedoch bei Abwesenheit der Vir-Proteine VirB3-VirB11 (Lai *et al.* 2000 b). Da weder VirB8 noch VirB3 in der T-Pilus-Fraktion detektiert werden konnten, ist es unwahrscheinlich, dass das VirB1-spezifische Signal auf Verunreinigungen der Probe mit Zellmaterial zurückzuführen ist. Das VirB1-spezifische 34 kDa FA-Vernetzungsprodukt könnte auf eine Interaktion von VirB1 mit VirB2 hinweisen. Ein Vernetzungsprodukt der selben Größe war auch bei Detektion mit VirB2-spezifischem Antiserum zu sehen.



3.2. Identifizierung eines mit VirB5 interagierenden Proteins

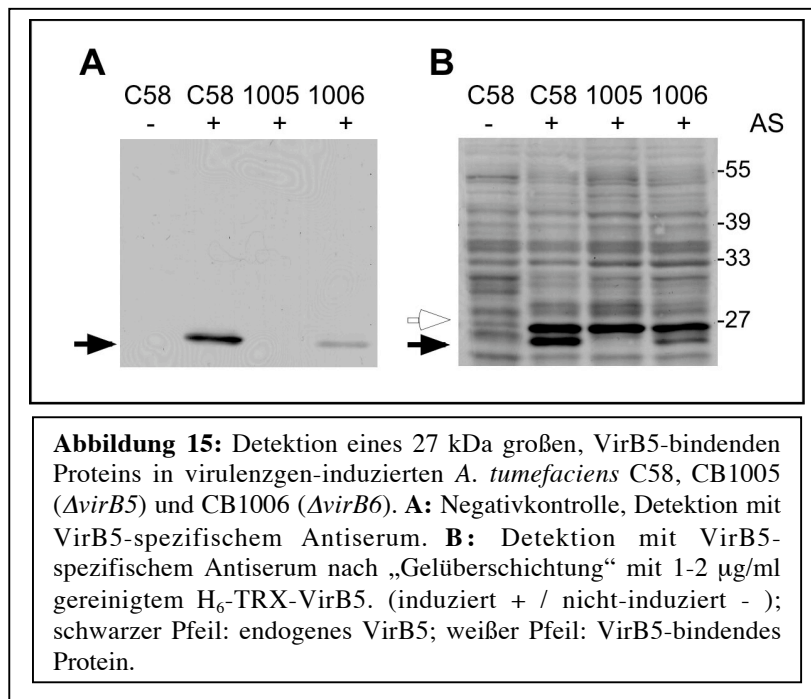
VirB2 ist die Hauptkomponente des T-Pilus, während VirB5 und VirB7 Nebenkomponten darstellen. Das Lipoprotein VirB7 dient vermutlich der Verankerung des T-Pilus in der äußeren Membran, die Funktion von VirB5 ist jedoch unklar. VirB5 könnte als Chaperon oder „Usher“ für VirB2 dienen. „Usher“ bilden Poren, die den Transfer von Pilus-Untereinheiten über die äußere Membran hinweg, sowie deren anschließende Assemblierung in Pili erlauben. VirB5 könnte auch an der Basis der T-Pili lokalisiert sein und zusätzlich zu VirB7 der Verankerung dienen, oder aber ein rein struktureller Bestandteil des Pilus sein. Ebenso wäre es möglich, dass VirB5 in Analogie zu PapG (P-Pili uropathogener *E. coli*) als Adhesin an der Spitze der T-Pili für die Anheftung von *A. tumefaciens* an die pflanzliche Zelle sorgt (Sauer *et al.* 2000). Um einen Hinweis auf die mögliche Funktion von VirB5 zu gewinnen, sollten dessen Interaktionen mit VirB2 und anderen Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes untersucht werden.

3.2.1. Gelüberschichtungstest von Zelllysaten mit VirB5

Beim „Gelüberschichtungstest“ (Homann *et al.* 1990) handelt es sich um eine modifizierte Form der „western blot“-Analyse, die der Detektion von Protein-Protein-Interaktionen dient. Für die Durchführung des Tests werden Zelllysate mittels SDS-PAGE separiert und auf PVDF-Membran transferiert. SDS wird durch Waschen in Renaturierungs-Puffer entfernt, wodurch die Rückfaltung der auf der Membran immobilisierten Proteine in ihre native Konformation unterstützt wird. Nach Absättigung mit 5 % Magermilch werden die Membranen mit 1-2 µg/ml eines gereinigten Proteins überschichtet. Unter diesen Bedingungen bindet das hinzugefügte Protein möglicherweise an einen oder mehrere auf der Membran immobilisierte Interaktionspartner. Nicht gebundenes Protein wird durch Waschen entfernt. Unter Verwendung von spezifischem Antiserum kann anschließend der Anteil des hinzugefügten Proteins, der an einen Interaktionspartner gebunden hat, detektiert werden.

Für die Durchführung der Untersuchung wurde VirB5 in *E. coli* GJ1158 pT7-H₆Trx-VirB5 exprimiert und unter Verwendung einer Ni-NTA-Agarose-Säule aufgereinigt. VirB5-Gelüberschichtungstests mit den Zelllysaten virulenzgen-induzierter und nicht-induzierter *A. tumefaciens* C58 (wt), CB1005 (*ΔvirB5*) und CB1006 (*ΔvirB6*) führten zu der Detektion

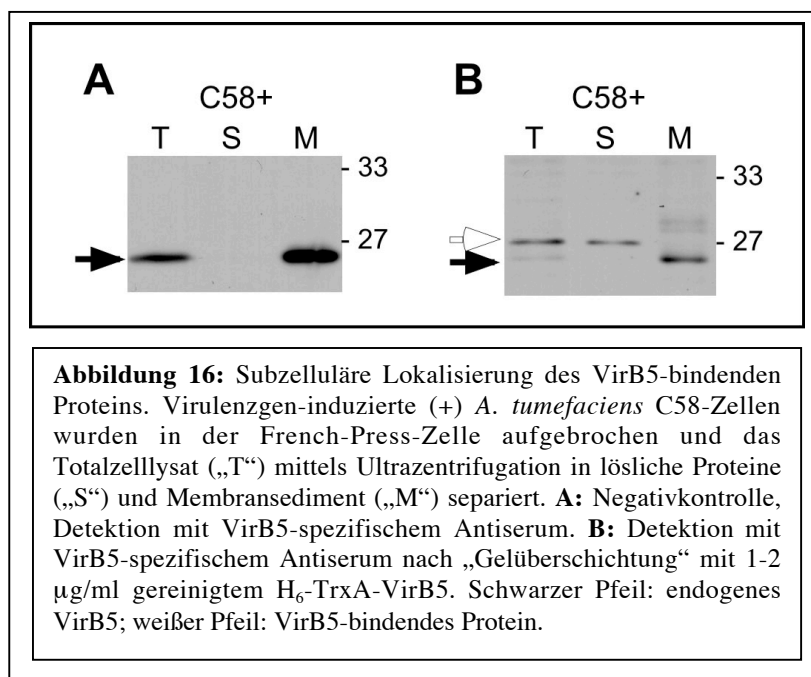
eines 27 kDa großen, VirB5-bindenden Proteins, das nur in virulenzgen-induzierten Zellen nachzuweisen war (siehe Abbildung 15).



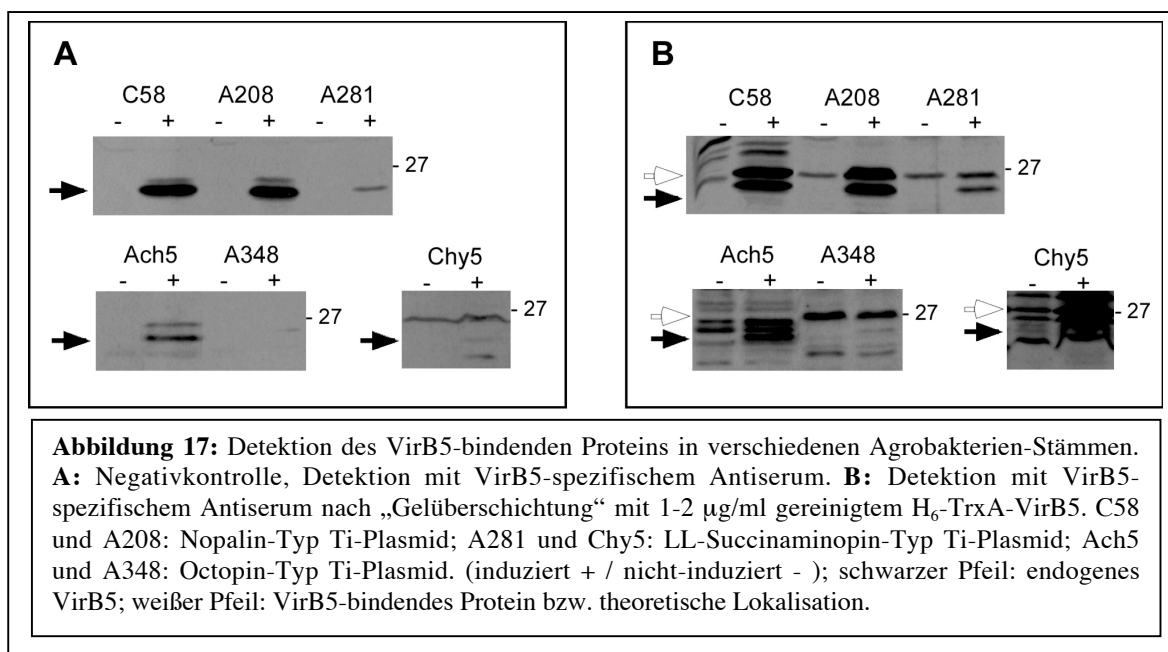
VirB2, VirB3, VirB4, VirB5, VirB7, VirB10, VirB11, VirE2, VirD2 und VirD4 kamen aufgrund ihrer stark von 27 kDa abweichenden molekularen Massen nicht als VirB5-Interaktionspartner in Betracht. VirB1 (26 kDa) und VirB6 (32 kDa) konnten ausgeschlossen werden, da das VirB5-bindende Protein auch in CB1001 (nicht gezeigt) und CB1006 (siehe Abbildung 15) zu detektieren war. Für VirB8 (26 kDa) bzw. VirB9 (32 kDa) standen keine Deletions-Stämme zur Verfügung. Da jedoch mittels hochauflösender SDS-PAGE (12 x 14 cm Glasplatten) ebenfalls keine Übereinstimmungen zwischen VirB8, VirB9 und dem gesuchten 27 kDa Protein gefunden wurden, handelte es sich bei dem VirB5-bindenden Protein um keines der am VirB/D4-Transmembrankomplex beteiligten Vir-Proteine (Krall 1999).

Zur Lokalisierung des VirB5-interagierenden Proteins in der Zelle wurden virulenzgen-induzierte und nicht-induzierte *A. tumefaciens* C58-Zellen in der French-Press-Zelle aufgebrochen und das von Zelltrümmern befreite Totalzelllysat („T“) mittels Ultrazentrifugation in Membransediment („M“) und lösliche Proteine („S“) getrennt. Die Analyse der Proben im VirB5-Gelüberschichtungstest zeigte, dass es sich bei dem VirB5-

bindenden Protein im Gegensatz zu den membran-assoziierten Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes um ein lösliches Protein handelte (siehe Abbildung 16).



VirB5-Gelüberschichtungstests mit den Zelllysaten verschiedener Agrobakterien-Stämme (Octopin-, Nopalinn- und LL-Succinaminopin-Typ Ti-Plasmid) ließen vermuten, dass das VirB5-bindende Protein nur in Stämmen des Nopalinn-Typs (*A. tumefaciens* C58 und A208) auftritt (Abbildung 17).



3.2.2. Aufreinigung und Identifizierung eines mit VirB5 interagierenden Proteins

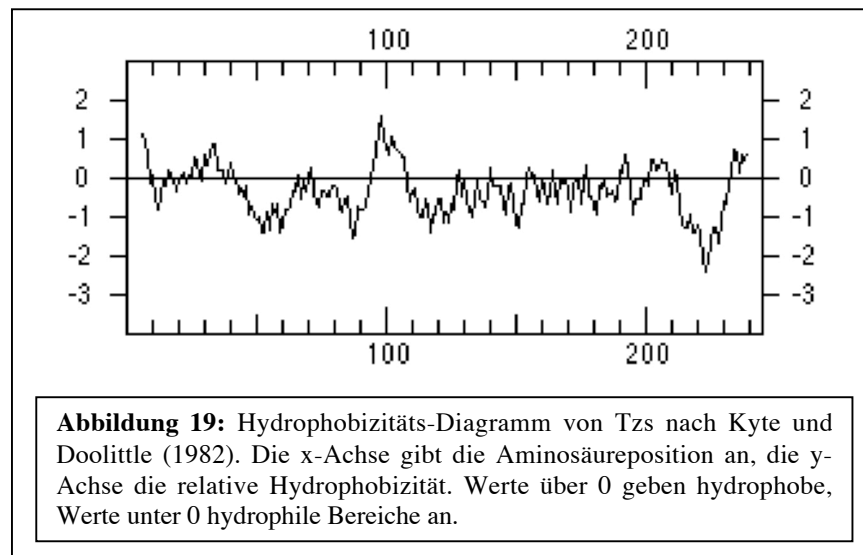
Zum Zweck der Identifizierung wurde das VirB5-bindende Protein aus *A. tumefaciens* C58-pZP300 aufgereinigt. Die Effizienz der Aufreinigungsschritte wurde mittels VirB5-Gelüberschichtungstest überprüft. Unter virulenzgen-induzierenden Bedingungen kultivierte Zellen wurden in der French-Press-Zelle aufgebrochen und das Totalzelllysat nach Entfernung von Zellrückständen mittels Ultrazentrifugation in Membranen (Sediment) und lösliche Proteine (Überstand) getrennt. Das VirB5-bindende Protein wurde durch schrittweise Zugabe von Ammoniumsulfat (0 – 70 %) aus dem Überstand gefällt. Der maximale Anteil des Proteins präzipitierte bei 40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Das Präzipitat wurde in 1 ml HEPES-Puffer (50 mM; pH 7) resuspendiert und in 2 L des selben Puffers dialysiert. Die dialysierte Probe wurde bei auf eine Q-Sepharose-Säule (Anionenaustauscher) aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden durch Spülen entfernt, die gebundenen in einem linearen Gradient von 50 mM – 1 M NaCl (in 50 mM HEPES-Puffer; pH 7) über das 10-fache Säulenvolumen eluiert und mit TCA gefällt. Die Präzipitate wurden in SB-Auftragspuffer resuspendiert, über SDS-PAGE separiert und mittels VirB5-Gelüberschichtungstest und Silberfärbung analysiert. Ein Teil des VirB5-bindenden Proteins adsorbierte nicht an das Säulenmaterial und wurde im Durchlauf detektiert, während der Rest schon bei niedriger NaCl-Konzentration eluierte. Das im Durchlauf detektierte VirB5-bindende Protein zeigte den höchsten Grad an Reinheit. Es wurde in hochauflösender SDS-PAGE (12 x 14 cm Glasplatten) von verbleibenden Proteinen abgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert, mittels VirB5-Gelüberschichtungstest lokalisiert und mit der Membran ausgeschnitten.

Mittels N-terminaler Sequenzierung durch Ag. Prof. Lottspeich (MPI für Biochemie, Martinsried) konnte das VirB5-bindende Protein als „*trans*-Zeatin-produzierendes Protein“ (Tzs) identifiziert werden (Beaty *et al.* 1986) (siehe Abbildung 18).

MLLHLIYGPTCSGKTDMAIQIAQETGWPVVALDRVQCCPQIATGSGRPLESEL
 QSTRRIYLDSRPLTEGILDAESAHRRLIFEVDWRKSEGLILEGGSISLLNCMAK
 SPFWRSGFQWHVKRLRLGDSDAFLTRAKQRVAEMFAIREDRPSLLEELAEW
 NYPAARPILEDIDGYRCAIRFARKHDLAISQLPNIDAGRHVELIEAIANEYLEHAL
 SQERDFPQWPEDGAGQPVCPVTLTRIR

Abbildung 18: Identifizierung des mit VirB5 interagierenden Proteins als „*trans*-Zeatin-produzierendes Protein“ (Tzs). Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von Tzs, wobei die mittels N-terminaler Sequenzierung ermittelte Aminosäuresequenz hervorgehoben ist.

Tzs ist ein 244 Aminosäuren großes, hydrophiles Protein, das bei Induktion der Virulenzgene im Zytoplasma von *A. tumefaciens* C58 angehäuft wird. Es wird nur von *A. tumefaciens*-Stämmen mit Ti-Plasmiden des Nopalin-Typs exprimiert. Der hydrophile Charakter von Tzs wird im Kyte-Doolittle Diagramm veranschaulicht (Abbildung 19). Geringe Mengen Tzs konnten auch in nicht-induzierten *A. tumefaciens* Zellen detektiert werden (Powell *et al.* 1988).



Wie in Abbildung 20 zu sehen, weist Tzs auf Ebene der Aminosäuresequenz einen hohen Grad an Ähnlichkeit zu Ipt auf. Beide Enzyme verfügen über ein konserviertes ATP/GTP-bindungs-Motiv („P-loop“).

Tzs	1	MLLHLIYGPTCSGKTDMAIQIAQETGWPVVALDRVQCCPQIATGSGRPLESELOSTRRIYLDNRPLTEGILDAESAHRRL	80
Ipt	1	MDLRLIFGPTCTGKTSVAVALAQQTGLPVLSLDRVQCCPOLSTGSGRPTVEELKGTSRLYLDDRPLVKGIIAAKQAHREL	80
		20 40 60 80	
	81	IFEVDWRKSEEGLEGGISILLNCKMAKSPFWRSGFQWHVKRLRLGDSDAFLTRAKQVAEMFAIREDRPSLLEELAEWL	160
		+ EV ++ GLILEGGSISLL CMA+S +W + F+WH+ R L D + F+ AK RV +M S+++EL +LW	
	81	MGEVYNVEAHGGLILEGGSISLLKCKMAQSSYSADFRWHIIRHELADEETFMMVAKARVKQMLRPAAGL=SIIQELVDLW	159
		100 120 140	
	161	NYPAAARPILEDIDGYRCAIRFARKHDLAISQLPNIDAGRHVLEIEAIAEYLEHALSQERDFQWPEDGAGQPVCFVTLT	240
		P RPIL++IDGYR A+ FA ++ + L +DA +LI IA EYL HA QE+ FP+	
	160	KEPRLRPILKEIDGYRYAMLFASQNTSDMLLQLDADMEDKLIHGIAQEYLIHARRQEQKFRVNAAYDGFEGHPFGM	239
		180 200 220	
	241	RIR*	
	240	Y*==	

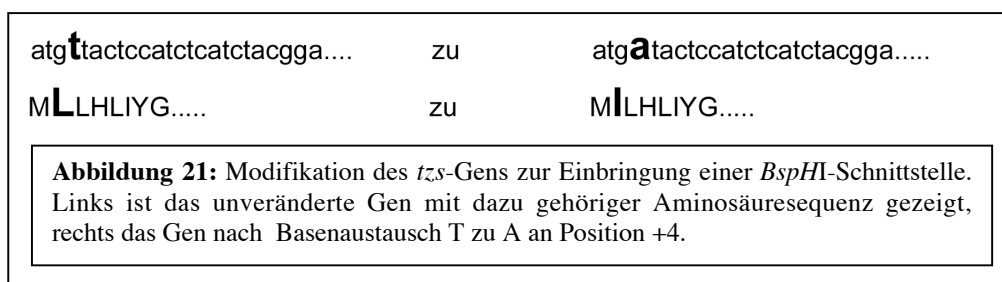
Abbildung 20: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Proteine Tzs und Ipt. Das in beiden Proteinen konservierte ATP/GTP-bindungs-Motiv („P-loop“) wird durch Einrahmung markiert.

Da das Tzs-ähnliche Ipt seine Funktion in der Pflanzenzelle ausübt, führte die Tzs-VirB5 Interaktion zu der Hypothese, dass Tzs nach seiner Expression in *A. tumefaciens* ebenso wie VirD2, VirE2 oder VirF als Virulenzprotein in die Pflanzenzelle transferiert werden könnte. In weiteren Experimenten sollte daher die Spezifität der VirB5-Tzs Interaktion bestätigt und Tzs auf einen möglichen Transfer in die Pflanzenzelle hin untersucht werden.

3.2.3. Klonierung von *tzs* und *ipt* und Expression

3.2.3.1. Klonierung von *tzs* in pT7-7_{NcoI} und Expression

Vorversuche zeigten, dass der VirB5-Gelüberschichtungstest nicht sensitiv genug war, um Tzs in nachfolgenden Interaktionsstudien zu detektieren. Daher wurde das *tzs*-Gen mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide *tzs* 5' (*BspHI*) und *tzs* 3' (*HindIII*) aus *A. tumefaciens* C58 amplifiziert. Das 747 bp PCR-Produkt wurde mit *BspHI* und *HindIII* geschnitten und in den mit *NcoI* und *HindIII* geschnittenen Expressionsvektor pT7-7_{NcoI} ligiert. Um *tzs* in die *NcoI*-Schnittstelle des Vektors einfügen zu können, wurde durch Basenaustausch (T zu A an Position +4) eine *BspHI*-Schnittstelle generiert, die bei Restriktion kompatible überhängende Enden ergab. Der Austausch der vierten Base im *tzs*-Gen hatte im Protein einen Aminosäureaustausch L (Leucin) → I (Isoleucin) zur Folge, der sich jedoch nicht nachteilig auf Expression und Löslichkeit von Tzs auswirken sollte (Abbildung 21).



Die Expression von Tzs erfolgte in pT7-7_{NcoI}-Tzs tragenden *E. coli* GJ1158-Zellen für 1,5 h bei 37°C bzw. 18 h bei 26°C. Bei 37°C wurde Tzs in unlöslicher Form in den Zellen angehäuft und konnte mittels „inclusion-body“-Präparation und präparativer SDS-PAGE aufgereinigt werden. 700 µg des gereinigten Proteins wurden zur Herstellung eines Tzs-spezifischen Antiserums eingesetzt. Unter Verwendung des resultierenden Antiserums konnte bestätigt werden, dass Tzs nur in *A. tumefaciens*-Stämmen mit Ti-Plasmiden des Nopalintyps auftritt (Abbildung 22).

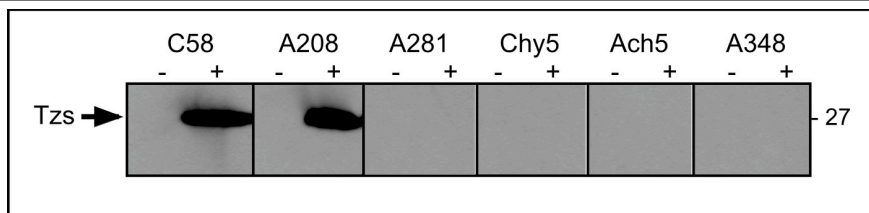


Abbildung 22: Detektion von Tzs mit spezifischem Antiserum nach Separation der Zelllysate verschiedener *A. tumefaciens*-Stämme mittels Glycin-(12,5%)-SDS-PAGE und Transfer auf PVDF-Membran. Nopalin-Typ Ti-Plasmid: C58, A208; LL-Succinaminopin-Typ Ti-Plasmid: A281, Chy5; Octopin-Typ Ti-Plasmid: Ach5, A348; (+ virulenzgen-induziert / - nicht-induziert)

Wurde die Expression bei 26°C durchgeführt, so reicherten sich circa 50 % des synthetisierten Tzs-Proteins in löslicher Form an. Die Zellen wurden in der French-Press-Zelle aufgebrochen, Zelltrümmer und Membranen sedimentiert und Tzs wie unter 2.8.2. beschrieben mittels fraktionierter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung, Gelfiltration-Chromatographie (Superdex 75-Säule) und Anionenaustausch-Chromatographie (Q-Sepharose-Säule) aus der Fraktion der löslichen Proteine aufgereinigt. Der Verlauf der Aufreinigung ist in Abbildung 23 wiedergegeben.

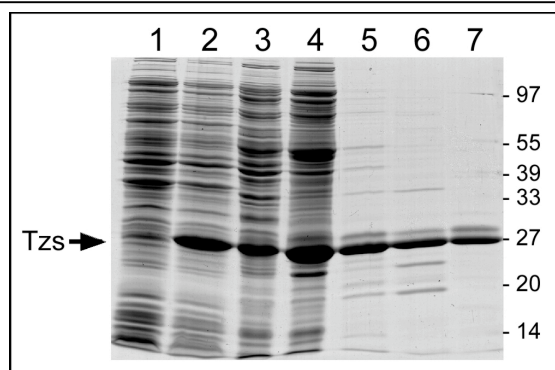


Abbildung 23: Aufreinigung von Tzs aus *E. coli* GJ1158 pT7-7_{NcoI}-Tzs. Gezeigt sind Proben nach Separation mittels Glycin-(12,5%)-SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Zelllysat vor Induktion (1), Zelllysat nach 18 h Induktion bei 26°C (2), Fraktion löslicher Proteine nach Aufbruch mittels French-Press-Zelle und Ultrazentrifugation (3), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung 30 – 40 % (4), Fraktion nach Gelfiltration mittels Superdex 75-Säule (5), vereinigte Fraktionen der vorderen bzw. hinteren Hälfte des Elutionsmaximums nach Anionenaustausch-Chromatographie mittels Q-Sepharose-Säule (6/7).

3.2.3.2. Klonierung von *tzs* in pT7-StrepII und Expression

Tzs wurde für Interaktionsstudien auch als StrepII-markiertes Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt. Dazu wurde *tzs* mit den Oligonukleotiden *tzs* 5' (*Acc65I*) und *tzs* 3' (*PstI*) aus *A. tumefaciens* C58 amplifiziert, das resultierende PCR-Produkt mit *Acc65I* und *PstI* geschnitten und in den ebenso geschnittenen pT7-StrepII-Vektor ligiert. Zur Klonierung von

tzs in den pT7-7StrepII-Vektor mussten keine Modifikationen der Basenpaarabfolge vorgenommen werden. Die Expression des StrepII-markierten Tzs erfolgte für 18 h bei 26°C, die Aufreinigung unter Verwendung des „Strep-tag® Purification System“ der Firma IBA. Eine Probe des gereinigten StrepII-Tzs-Fusionsproteins ist in Abbildung 32 gezeigt.

3.2.3.3. Klonierung von *ipt* in pT7-7_{NcoI} bzw. pT7-StrepII und Expression

Um das Tzs-ähnliche Ipt in die Analysen mit einzubeziehen, wurde *ipt* mit den Oligonukleotiden *ipt* 5' (*NcoI*) und *ipt* 3' (*HindIII*) bzw. *ipt* 5' (*Acc65I*) und *ipt* 3' (*HindIII*) amplifiziert, geschnitten und in ebenso geschnittene Vektoren pT7-7_{NcoI} bzw. pT7-StrepII eingebracht. Nachfolgende Analysen zeigten aber, dass Ipt auch bei Variation von Inkubations-Temperatur und Induktions-Dauer nur in unzureichenden Mengen in löslicher Form exprimierbar war. Ipt konnte daher nicht in nativer Form aufgereinigt und weiter untersucht werden.

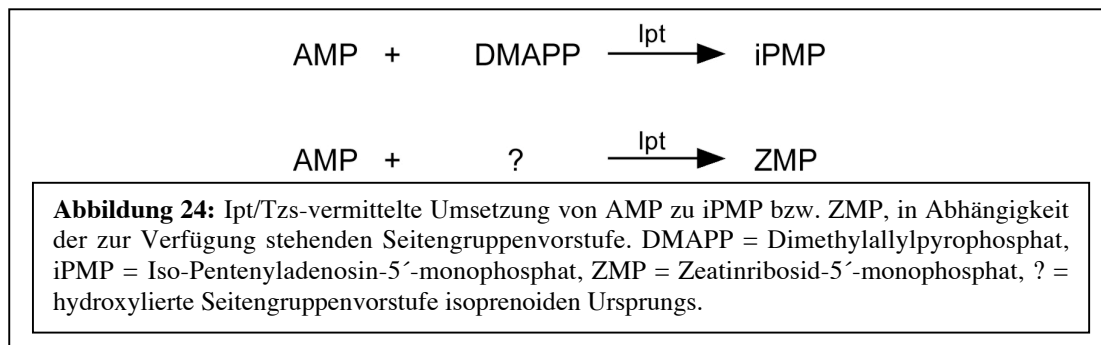
3.3. Analyse der enzymatischen Aktivität von Tzs

(durchgeführt von Ag. Prof. Dr. M. H. Zenk, Biozentrum, Universität Halle im Rahmen des SFB 369)

3.3.1. iPMP-unabhängige Cytokininbiosynthese

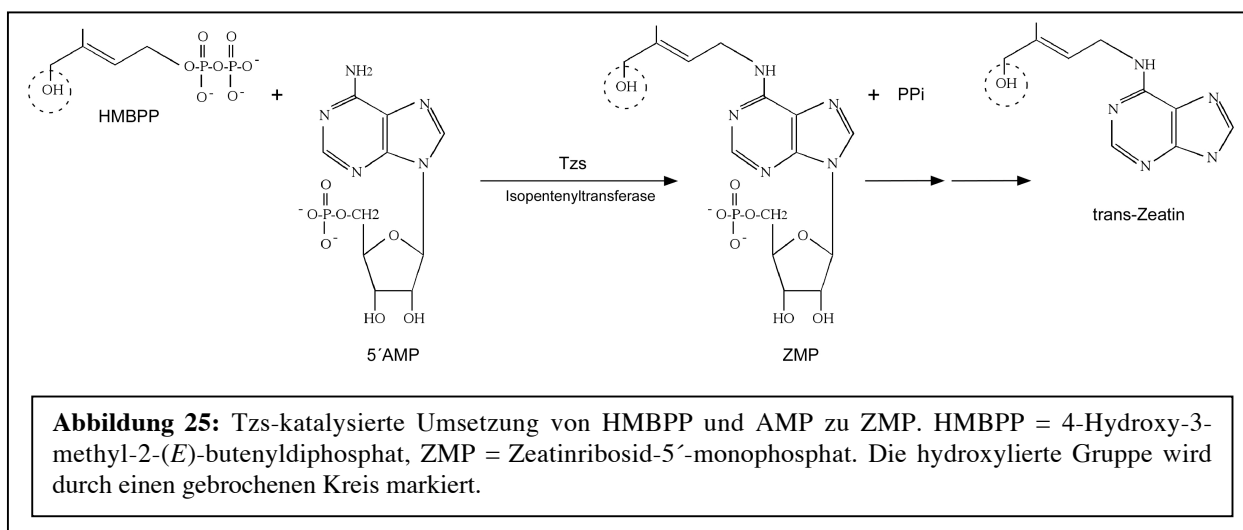
Bislang wurde angenommen, dass Tzs die Synthese von iPMP aus DMAPP und AMP katalysiert (Powell *et al.* 1988). Unspezifische Hydroxylierungs-Reaktionen wurden für die Bildung von *trans*-Zeatin aus iPMP verantwortlich gemacht. Einen wissenschaftlichen Beweis für diese Reaktionen gab es allerdings nicht. Untersuchungen von Astot *et al.* (2000) zeigten, dass die Expression von Ipt in Pflanzenzellen keinen Einfluss auf die endogene iPMP-Menge hatte, aber dafür zu erhöhten Mengen an Zeatinribosid-5'-monophosphat (ZMP) und Zeatinribosid (ZR) führte. Dieses Phänomen wurde ursprünglich mit einer schnellen Umsetzung von iPMP zu ZMP, ZR und Z (*trans*-Zeatin) durch Hydrolasen begründet (Akiyoshi *et al.* 1984). Die von Astot *et al.* mit radioaktiv markierten Vorstufen durchgeführten Studien zeigten jedoch, dass ZMP direkt synthetisiert wird und nicht über die Hydroxylierung von iPMP entsteht. Astot *et al.* (2000) schlugen daher für Cytokinine des Zeatin-Typs eine iPMP-unabhängige Synthese vor, die auf Inkorporation einer bereits

hydroxylierten Seitengruppenvorstufe isoprenoiden Ursprungs beruht (siehe Abbildung 24 und 2).

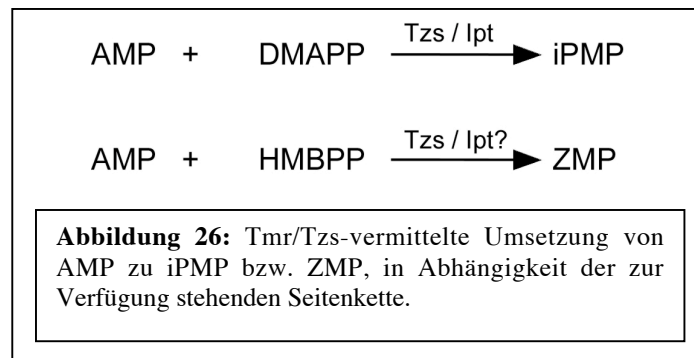


3.3.2. Tzs-abhängige Umsetzung von AMP mit HMBPP zu ZMP

Als eines der Zwischenprodukte des DXP-Weges wurde 4-Hydroxy-3-methyl-2-(*E*)-butenyldiphosphat (HMBPP) postuliert (Gao *et al.* 2002). Die Umsetzung von HMBPP mit AMP würde in direkter Folge und ohne Notwendigkeit zusätzlicher Hydroxylierungsreaktionen Zeatinribosid-5'-monophosphat (ZMP) ergeben. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Zenk im Rahmen des SFB 369 konnte gezeigt werden, dass Tzs HMBPP mit AMP zu ZMP umsetzt (siehe Abbildung 25). Tzs ist auch in der Lage, DMAPP mit AMP zu iPMP umzusetzen. Da *A. tumefaciens* C58 jedoch vor allem die hydroxylierten Produkte Zeatinribosid und *trans*-Zeatin sekretiert, ist HMBPP vermutlich das eigentlich umgesetzte Substrat. Die Beschreibung der Analysen und die Auswertung der Resultate sind unter „Krall, L., Raschke, M., Zenk, M.H., Baron, C. (2002) The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(*E*)-butenyl-diphosphate and AMP. FEBS Lett. 527: 315-318“ publiziert.



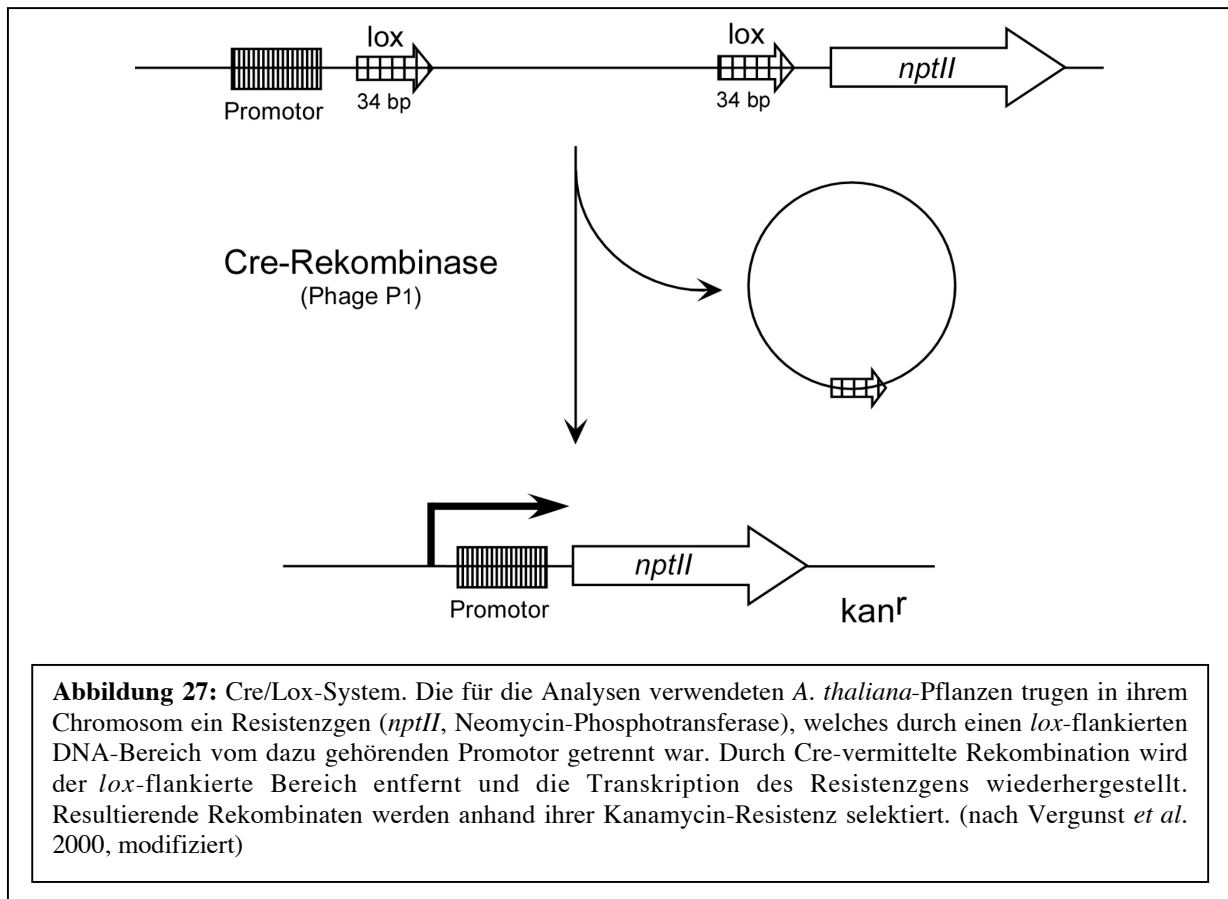
Die Tzs-abhängige Umsetzung von HMBPP mit AMP zu ZMP steht in Einklang mit der von Astot *et al.* (2000) für Ipt postulierten iPMP-unabhängigen Cytokinin-Biosynthese unter Inkorporation einer bereits hydroxylierten Seitengruppenvorstufe isoprenoiden Ursprungs. Aufgrund der weitreichenden Ähnlichkeiten wäre es denkbar, dass Ipt ebenfalls das Substrat HMBPP akzeptiert (Abbildung 26). Da sich Ipt jedoch nicht in löslicher Form aufzureinigen ließ, konnte diese Hypothese nicht überprüft werden.



3.4. Untersuchung eines möglichen Transfers von Tzs in die Pflanzenzelle

(in Kooperation mit Ag. Prof. Dr. P.J.J. Hooykaas, durchgeführt von Annette C. Vergunst / Institut of Molecular Plant Sciences, Universität Leiden, Niederlande)

Tzs wurde mit Hilfe des „Cre/Lox-Systems“ auf Transfer in *Arabidopsis thaliana* (nach Vergunst *et al.* 2000) bzw. auf Transfer in *Saccharomyces cerevisiae* (nach Schrammeijer *et al.* 2003) untersucht. Dazu wurden Fusionen der 50 C-terminalen Aminosäuren bzw. des kompletten Tzs-Proteins mit der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 hergestellt. Frühere Studien hatten gezeigt, dass die 50 C-terminalen Aminosäuren von VirE2 und VirF für einen Transfer in die Rezipientenzellen ausreichen. Wird Cre mit dem „Trägerprotein“ in die Empfängerzelle transferiert, so vermittelt es dort durch spezifische Rekombination die Entfernung eines von *lox*-Sequenzen flankierten DNA-Bereichs. Im Fall des verwendeten *A. thaliana*-Stammes wird dadurch die Transkription eines Resistenzgens (*nptII*, Neomycin-Phosphotransferase, Kan^r) wieder hergestellt. Die resultierenden Rekombinanten können auf Kanamycin-haltigem Medium selektiert werden. Das Prinzip des Cre/Lox-Systems ist exemplarisch für *A. thaliana* 3043 in Abbildung 27 dargestellt.



Die Analyse des Tzs-Transfers wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P.J.J. Hooykaas (Universität Leiden, Niederlande) von Dr. Annette C. Vergunst durchgeführt. Zusätzlich zu den in den Versuchsprotokollen (Vergunst *et al.* 2000, Schrammeijer *et al.* 2003) angegebenen *A. tumefaciens* (Octopin-Typ) wurde auch *A. tumefaciens* (Nopaline-Typ) als Donor verwendet. Ein Transfer von Tzs konnte mit dieser Methode jedoch weder in *A. thaliana* noch in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden.

3.5. Analyse der Protein-Protein-Interaktion zwischen Tzs und VirB5

Die Interaktion von Tzs mit der Piluskomponente VirB5 würde die Hypothese des Transfers von Tzs in die pflanzliche Zelle unterstützen. Auch das transferierte Vir-Protein VirE2 interagiert mit VirD4 und damit einer Komponente des VirB/D4-Transmembrankomplexes (Atmakuri *et al.* 2003). Lanka *et al.* wiederum postulierten eine Interaktion zwischen TraG und TraI, den VirD4- bzw. VirD2-Homologen des RP4-Plasmids (zitiert in Baron *et al.* 2002). Da jedoch auch die Möglichkeit bestand, dass unter den Bedingungen des

Gelüberschichtungstests eine unspezifische Protein-Protein-Interaktion detektiert wurde, sollte die Spezifität der VirB5-Tzs Interaktion durch weitere Analysen untersucht werden.

3.5.1. Vergleich der Proteinmenge von Virulenzproteinen in C58 und CB1005

Interagierende Proteine stabilisieren sich oft gegenseitig *in vivo*. Die Deletion des Gens eines Partners kann somit zu einer Reduktion der Proteinmenge des Interaktionspartners führen (Berger und Christie 1993). Um die Auswirkung der Deletion von VirB5 auf Tzs und andere Vir-Proteine zu studieren, wurden C58 und CB1005 ($\Delta virB5$) unter gleichen Bedingungen auf AB-Agarplatten mit und ohne Zusatz von Acetosyringon kultiviert. Gleiche Mengen der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE separiert, auf PVDF-Membran transferiert und die zelluläre Menge der Vir-Proteine mit spezifischen Antiseren detektiert.

Wie in Abbildung 28 zu sehen, konnte abgesehen von einer geringen Reduktion der VirB3-Menge in CB1005 kein Unterschied in den zellulären Mengen der Vir-Proteine zwischen C58 und CB1005 festgestellt werden. VirB5 hatte somit keinen stabilisierenden Effekt auf Tzs. Im Gegensatz zu VirB7 oder VirB9, bei deren Abwesenheit die Menge anderer Vir-Proteine deutlich reduziert ist (Berger und Christie 1994, Fernandez *et al.* 1996 b), hatte VirB5 auch keinen Einfluss auf die Akkumulation der restlichen Vir-Proteine. Es kann daher mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass VirB5 keine essentielle Strukturkomponente des VirB/D4-Transmembrankomplexes ist.

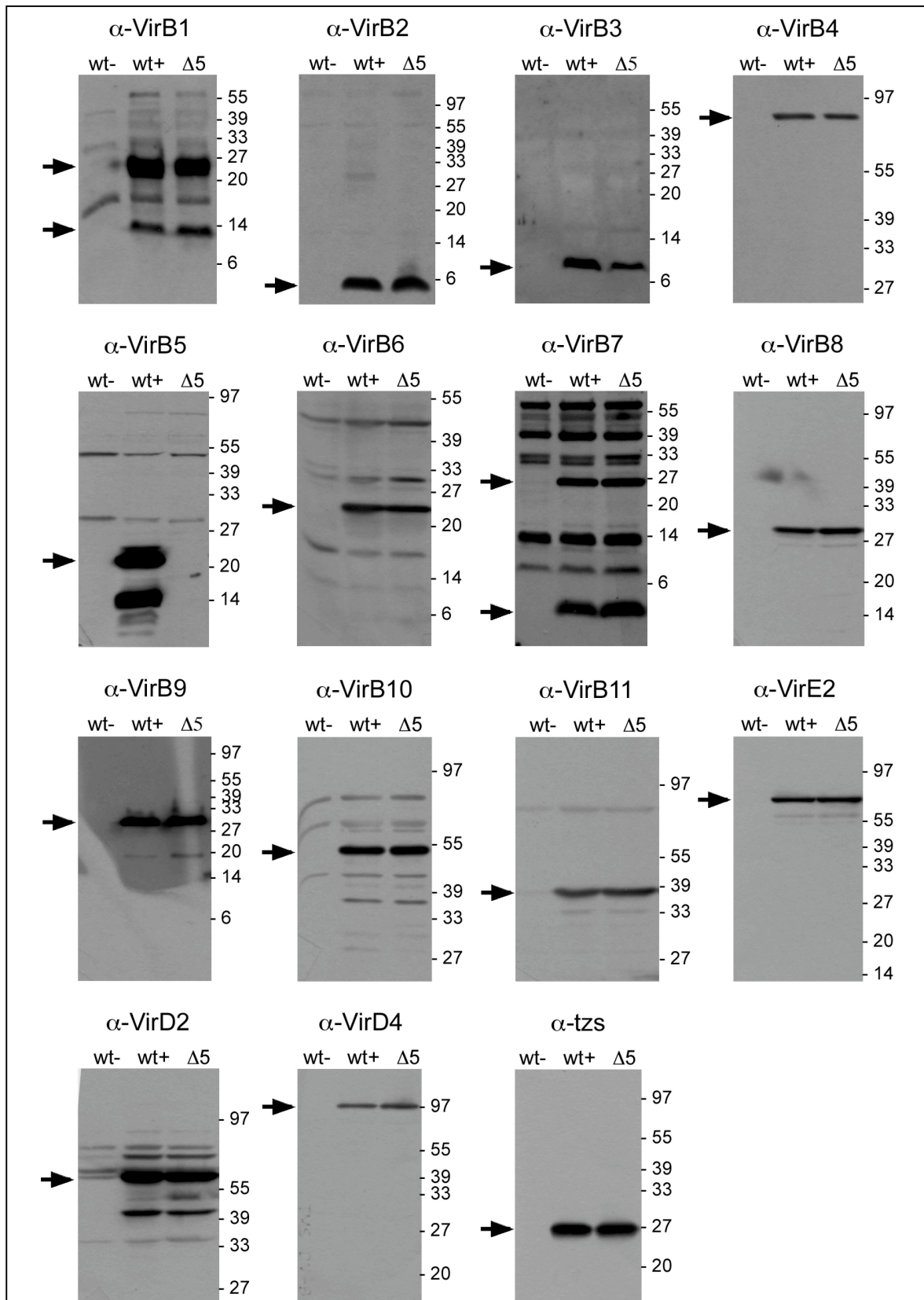
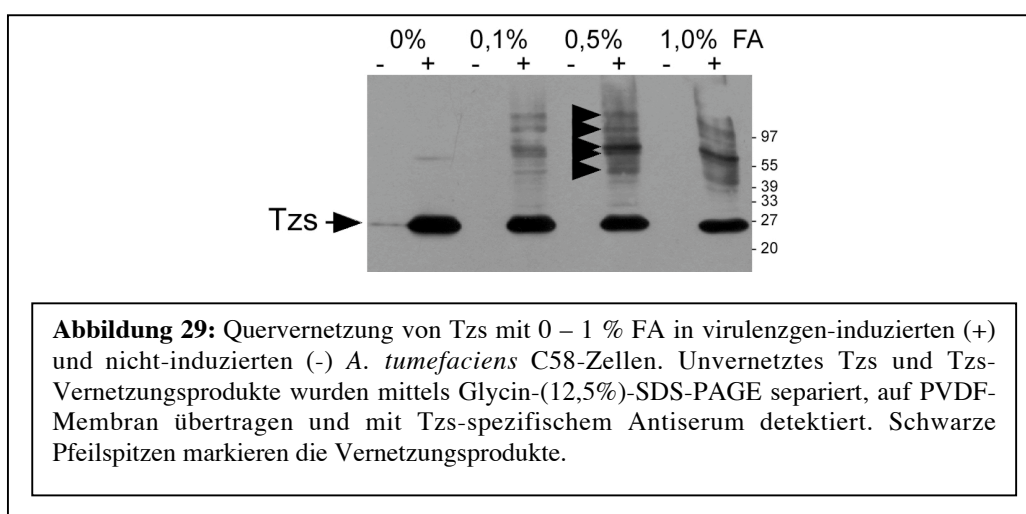


Abbildung 28: Vergleich der zellulären Menge der Vir-Proteine in *A. tumefaciens* C58 und CB1005 ($\Delta virB5$). Äquivalente Mengen Zellysate wurden mittels SDS-PAGE separiert und nach Transfer auf PVDF-Membranen mit spezifischen Antisera detektiert. Pfeile markieren die Vir-Proteine. (+ virulenzgen-induziert / - nicht-induziert)

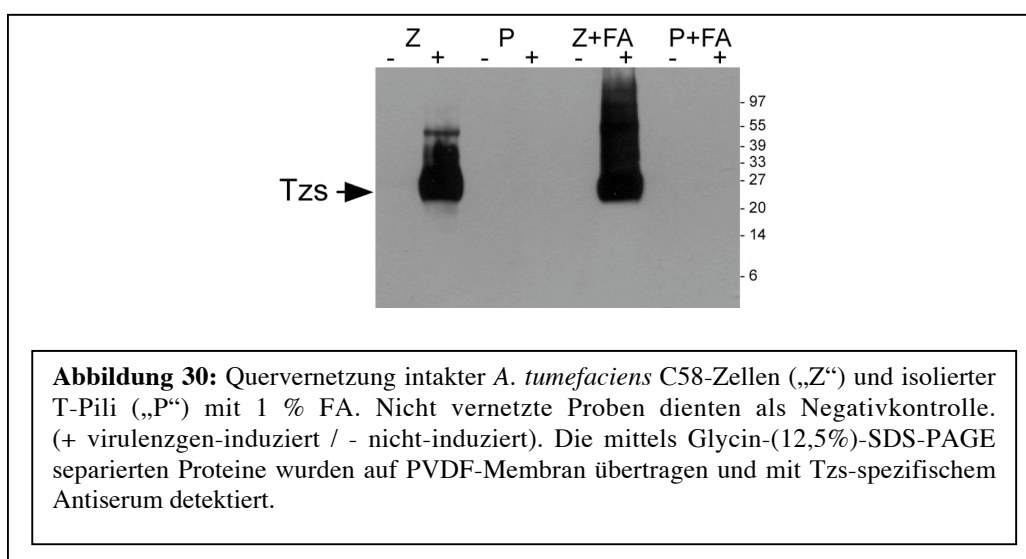
3.5.2. Quervernetzung von Tzs

Um Tzs auf Interaktion mit anderen Vir-Proteinen zu testen, wurden virulenzgen-induzierte und nicht-induzierte C58-Zellen, sowie isolierte T-Pili einer Vernetzung mit Formaldehyd unterzogen.

Bei Quervernetzung von *A. tumefaciens* C58 mit 0 - 1 % Formaldehyd konnten 5 Tzs-spezifische Vernetzungsprodukte detektiert werden (siehe Abbildung 29). Da die selben Vernetzungsprodukte auch in CB1005 mit 0 - 1 % FA detektiert wurden (nicht gezeigt), konnte keines davon auf eine Interaktion von VirB5 mit Tzs zurückgeführt werden.

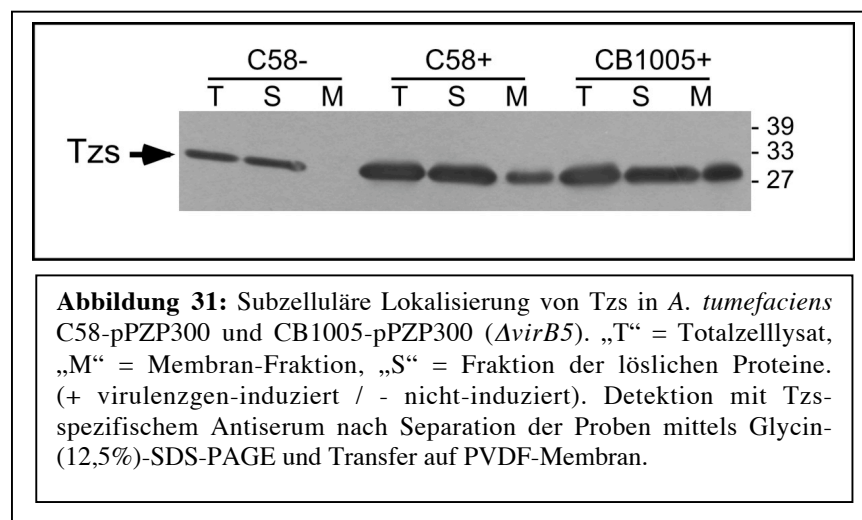


Tzs konnte nicht im Kulturüberstand unter virulenzgen-induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen in AB-Flüssigmedium angezogenen *A. tumefaciens* C58-Zellen detektiert werden (nicht gezeigt). Wie in Abbildung 30 zu sehen, konnte Tzs ebenso wenig in isolierten T-Pili detektiert werden.



3.5.3. Analyse der Lokalisierung von Tzs in C58 und CB1005

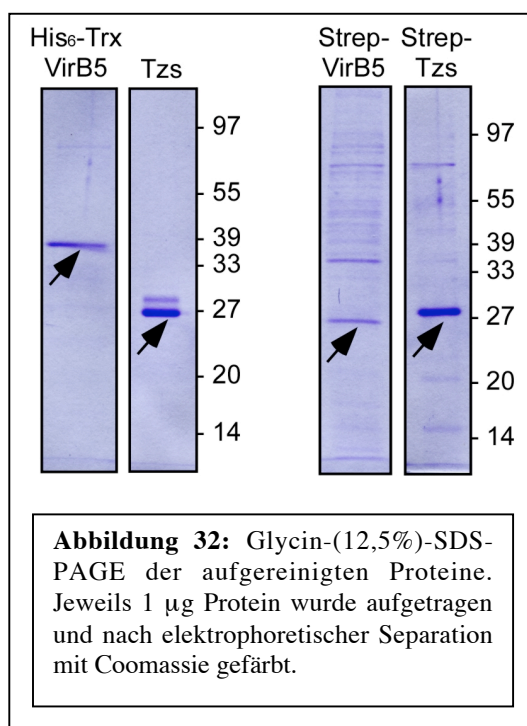
Virulenzgen-induzierte und nicht-induzierte *A. tumefaciens* C58-pPZP300 und CB1005-pPZP300 wurden in der French-Press-Zelle aufgebrochen, Zelltrümmer sedimentiert und das Totalzelllysate („T“) mittels Ultrazentrifugation in Membransediment („M“) und lösliche Proteine („S“) getrennt. Proben einer jeden Fraktion wurden mittels SDS-PAGE separiert. Die aufgetragenen Proteinmengen der „S“- und „M“-Fraktion entsprachen dabei zusammen der für die „T“-Fraktion aufgetragenen Proteinmenge. Um den Einfluss des Vorliegens (C58) bzw. der Abwesenheit von VirB5 (CB1005) auf die zelluläre Lokalisierung von Tzs zu untersuchen, wurde Tzs nach Transfer auf PVDF-Membran mit einem spezifischen Antiserum detektiert (siehe Abbildung 31).



Wie in Abbildung 31 zu sehen, wurde Tzs in geringeren Mengen auch in der „T“- und „S“-Fraktion nicht-induzierter *A. tumefaciens* C58-pPZP300-Zellen detektiert. Die Detektion von Tzs unter den nicht-induzierenden Bedingungen beruhte dabei vermutlich auf der auf pPZP300 zusätzlich kodierten und exprimierten Kopie des Transkriptionsaktivators VirG. In virulenzgen-induzierten C58-pPZP300 und CB1005-pPZP300 wurde Tzs zusätzlich zur „T“- und „S“-Fraktion auch in der Membran-Fraktion nachgewiesen. VirB5 hatte keinen Einfluss auf die Lokalisierung von Tzs in der Zelle, da dieses sowohl bei Anwesenheit wie auch Abwesenheit von VirB5 die gleiche Fraktionierung zeigte. Der Umstand, dass das eigentlich hydrophile Protein Tzs in virulenzgen-induzierten Zellen in der Membran-Fraktion detektiert wurde, sprach aber für eine Interaktion von Tzs mit Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes.

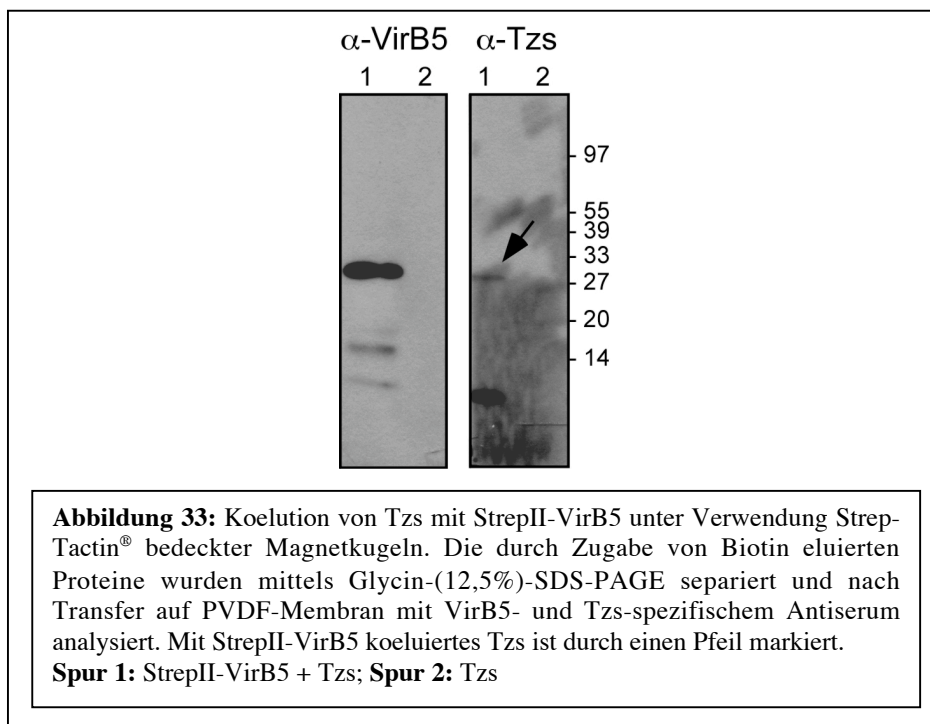
3.5.4. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels „pull-down assay“

Ähnlich zur Protein-A-Sepharose-vermittelten Immunpräzipitation können Proteine auch mit spezifischen Affinitätsmatrizes präzipitiert werden. Dazu ist es jedoch erforderlich, dass einer der potentiellen Interaktionspartner in Fusion mit einem Affinitätspeptid vorliegt. Hierzu eignen sich zB. Hexahistidin (His_6 -), das eine hohe Affinität für chelatierte Nickel-Ionen aufweist, oder das 8 Aminosäuren lange StrepII-Peptid (WSHPQFEK), das an Strep-Tactin[®] (Streptavidin)-Matrix bindet. Für die Durchführung von „pull-down-assays“ wurde His_6 -Thioredoxin A (TrxA)-markiertes VirB5 unter Verwendung von NiNTA-Agarose aufgereinigt. Die Aufreinigung von unmarkiertem Tzs erfolgte wie unter 2.8.2. angegeben und die Aufreinigung von StrepII-VirB5 und StrepII-Tzs mit einem „Strep-tag[®] Purification System“ der Firma IBA. In Abbildung 32 sind jeweils 1 μg der gereinigten Proteine nach Separation mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung gezeigt.



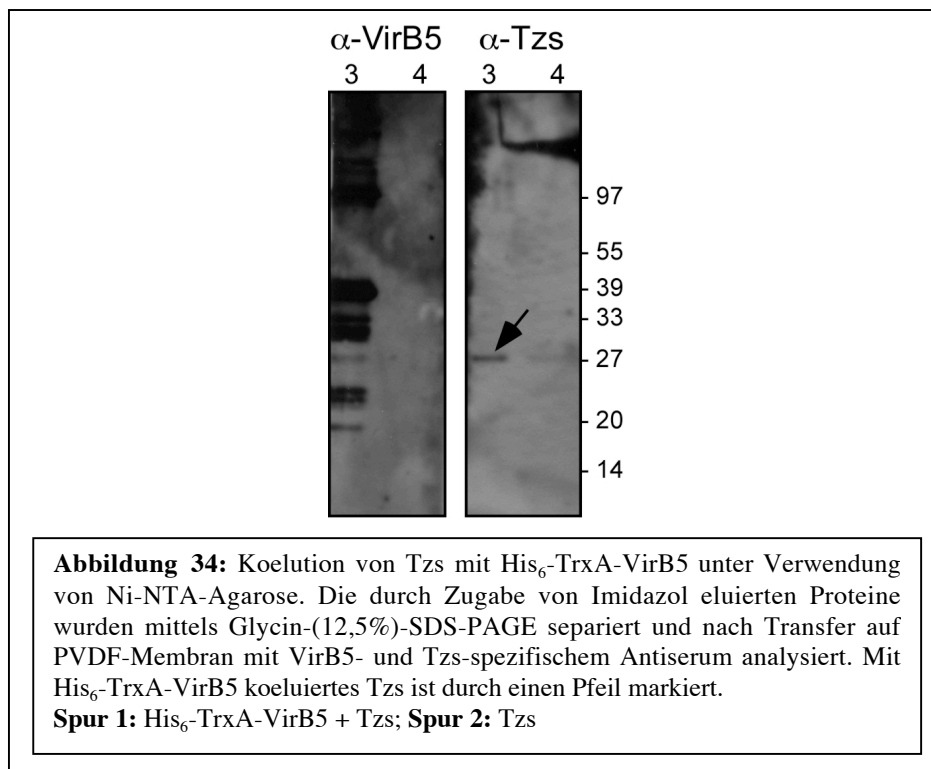
Zur Analyse der VirB5-Tzs Interaktion wurden je 50 pmol StrepII-VirB5 mit Tzs bzw. StrepII-Tzs mit His_6 -TrxA-VirB5 gemischt und nach Inkubation mit 1 mg Strep-Tactin[®] bedeckten Magnetkugeln versetzt. Das StrepII-markierte Protein adsorbierte an das immobilisierte Strep-Tactin[®] und wurde nach mehreren Waschschritten durch Zugabe von Biotin wieder gelöst. Mit dem StrepII-markierten Protein interagierendes Protein wird dabei

koeluiert. Die Resultate eines „pulldown-assays“ unter Verwendung von StrepII-VirB5, Tzs und Strep-Tactin[®] bedeckter Magnetkugeln sind in Abbildung 33 gezeigt.



Tzs konnte mit StrepII-VirB5 koeluiert werden. Eine unspezifische Interaktion von Tzs mit den Strep-Tactin[®] bedeckten Magnetkugeln wurde nicht beobachtet. Umgekehrt konnte jedoch keine Koelution von His₆-TrxA-VirB5 mit StrepII-Tzs erzielt werden (nicht gezeigt). Es wäre möglich, dass die N-terminale Fusion von StrepII an Tzs oder die von His₆-TrxA an VirB5 die Interaktion der beiden Proteine beeinflusste.

Da StrepII-VirB5 nicht in zufrieden stellender Reinheit aufgereinigt werden konnte (siehe Abbildung 32), bestand die Möglichkeit einer Koelution von Tzs mit einem unspezifisch an die Magnetkugeln bindenden Protein. In einem alternativen Ansatz wurde daher 50 pmol His₆-TrxA-VirB5 mit 50 pmol Tzs gemischt und mit 1 mg Ni-NTA-Agarose versetzt. His₆-TrxA-markiertes VirB5 band an die in der Agarose-Matrix immobilisierten Ni²⁺-Ionen und wurde nach mehrmaligem Waschen durch Zugabe von Imidazol eluiert. Wie in Abbildung 34 zu sehen, konnte dabei auch eine Koelution von Tzs beobachtet werden.



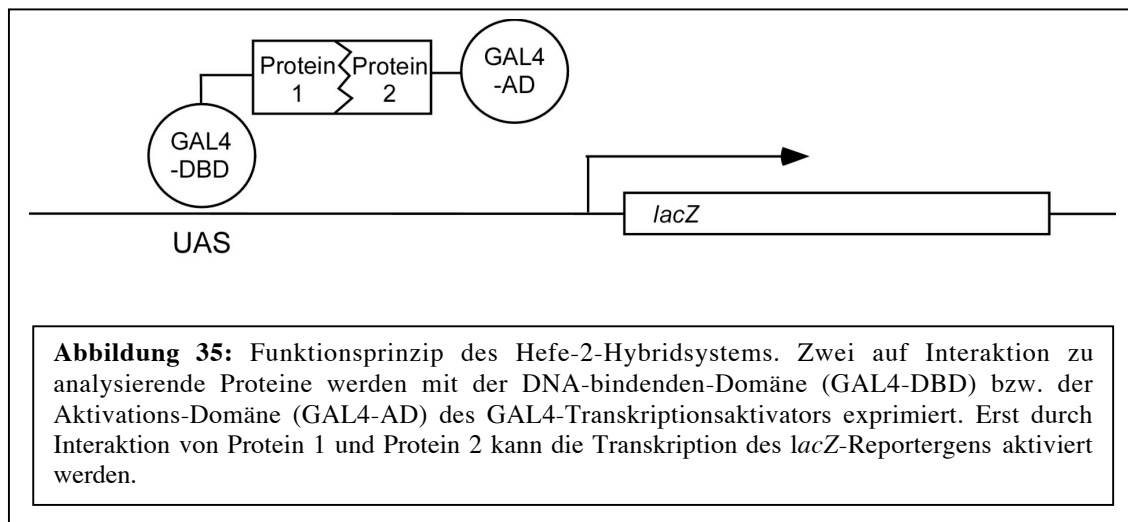
„Pulldown-assays“ unter Verwendung von StrepII-VirB5_{suis} / Tzs und His₆-TrxA-VirB5_{suis} / Tzs dienten als Negativkontrollen. Sie zeigten keine Koelution von Tzs mit dem VirB5-homologen Protein von *B. suis* (nicht gezeigt).

3.5.5. Analyse der VirB5-Tzs Interaktion mit dem Hefe-2-Hybridsystem

Die regulatorischen Proteine GAL4 und GAL80 kontrollieren den Galactose-Metabolismus in Hefe. Ist Galactose im Medium vorhanden, bindet GAL4 an spezifische Sequenzen („upstream-activating sequences“ = UAS) und aktiviert die Transkription der dahinter liegenden, für die Metabolisierung von Galactose notwendigen Gene. Ist keine Galactose im Medium vorhanden, bindet GAL80 an GAL4 und verhindert die Transkription. GAL4 besteht aus einer DNA-bindenden Domäne und einer Aktivierungs-Domäne. Beide Domänen sind auch getrennt voneinander funktionell.

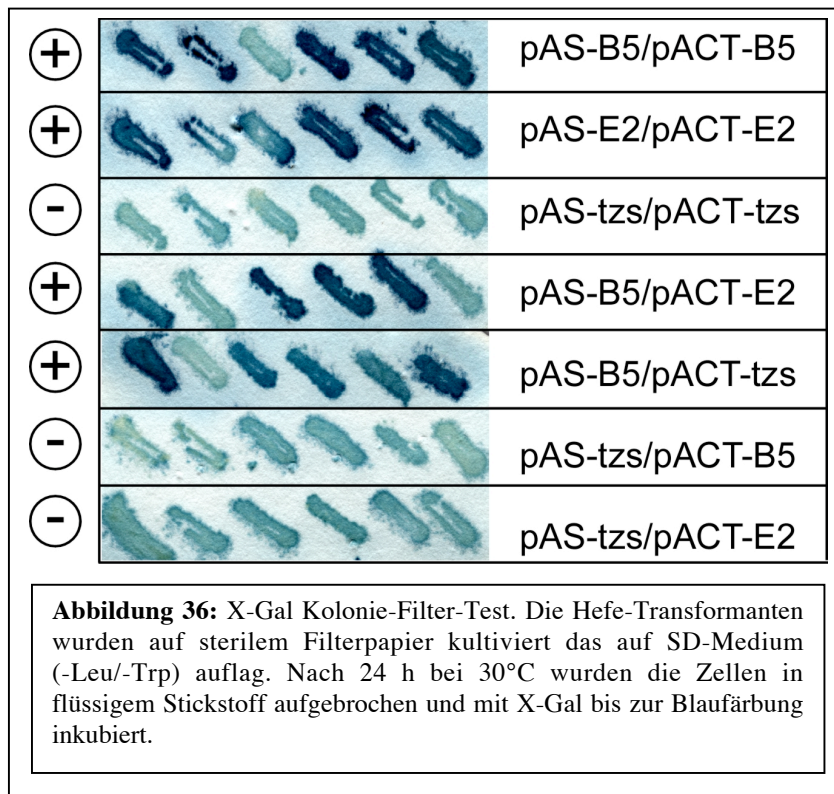
Für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen unter Verwendung des Hefe-2-Hybridsystems werden zu analysierende Proteine mit der GAL4-DNA-bindenden Domäne (GAL4-DBD) bzw. der Aktivierungs-Domäne (GAL4-AD) fusioniert. Das GAL4-DBD-Fusionsprotein bindet an die dafür vorgesehene UAS, kann jedoch nur dann die Transkription aktivieren, wenn GAL4-DBD und GAL4-AD über die Interaktion der mit ihnen fusionierten

Proteine zusammen gebracht werden (Fields und Song 1989, Durfee *et al.* 1993). Die für GAL4 spezifischen UAS und der GAL4-Promotor sind in den verwendeten Hefe-Stämmen einem chromosomalen *lacZ*-Reporter gen vorgeschaltet, so dass die Transkriptionsaktivierung anhand von β -Galactosidase-Aktivität nachgewiesen werden kann. Um Interferenzen zu vermeiden, fehlen den verwendeten Hefe-Stämmen (zB. Y153), das endogene GAL4/GAL80-System. Das Funktionsprinzip des Hefe-2-Hybridsystems ist in Abbildung 35 dargestellt.



Für die Durchführung der Analysen wurde *tzs* unter Verwendung der Oligonukleotide *tzs* 5' (*BspHI*) und *tzs* 3' (*BamHI*) amplifiziert, mit *BspHI* / *BamHI* geschnitten und in *NcoI* / *BamHI* geschnittenen pAS2- bzw. pACTII-Vektor eingebracht. Vektor pAS2 trägt die für GAL4-DBD kodierende DNA-Sequenz, gefolgt von mehreren Restriktionsschnittstellen (u.A. *NcoI* und *BamHI*) und einer Terminatorsequenz. Durch Einbringung des *tzs*-Gens in die *NcoI*-Schnittstelle entstand ohne Verschiebung des Leserasters das Fusionsprotein GAL4-DBD-Tzs. Vektor pACTII trägt die für GAL4-AD kodierende DNA-Sequenz, ebenfalls gefolgt von einer *NcoI*- und *BamHI*-Schnittstelle und einer Terminatorsequenz. Durch Einbringung des *tzs*-Gens entstand nach dem gleichen Prinzip das Fusionsprotein GAL4-AD-Tzs. Beide Vektoren besitzen einen *E. coli*-Replikationsursprung, sowie einen für die Replikation in Hefe. Die Selektion in *E. coli* erfolgte anhand einer *Carb^r*-Kassette, die Selektion in Hefe über die Synthese von Leucin (pACTII, LEU2) bzw. Tryptophan (pAS2, TRP1). Die Vektoren pAS2-GAL4-DBD-VirB5 bzw. -VirE2 und pACTII-GAL4-AD-VirB5 bzw. -VirE2 standen aus früheren Arbeiten zur Verfügung.

Die Vektoren wurden in pAS2 / pACTII Kombination in Y153 transformiert und mittels X-Gal Kolonie-Filter-Test auf β -Galaktosidase-Aktivität hin untersucht (siehe Abbildung 36).



Vorversuche zeigten, dass die Vektoren pAS2, pACTII in Hefe zu einer Selbstaktivierung führten. Dies beruht vermutlich auf der Transkriptions-aktivierenden Wirkung des auf den verwendeten Vektoren kodierten Hämagglutinin-Epitops (Van Crieking und Beyaert 1999). Von den konstruierten Vektoren hatte pAS2-VirE2 (Fusion von VirE2 an die DNA-bindende Domäne von GAL4) ebenfalls eine Transkriptions-aktivierende Wirkung. Für die restlichen Vektoren wurde keine Selbstaktivierung detektiert.

Von jedem Transformationsexperiment wurden 6 Kolonien mittels X-Gal Kolonie-Filter-Test analysiert. Wie in Abbildung 36 zu sehen, blieben auch im Falle eindeutig interagierender Proteine einige der Transformanten weiß. Dies könnte auf Verunreinigungen des Hefe-Stammes mit Revertanten beruhen, die auch ohne einen der beiden Vektoren pAS2 und pACTII auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan wachsen konnten. Alternativ wäre es möglich, dass die Expression der β -Galaktosidase in den betreffenden Transformanten noch nicht weit genug fortgeschritten war, um bei Zusatz von X-Gal eine Blaufärbung zu ergeben.

Für eine genauere Auswertung sind in Tabelle 7 die positiv getesteten Transformanten der Gesamtzahl der getesteten Transformanten gegenüber gestellt.

Tabelle 7: Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit dem Hefe-2-Hybridsystem in Y153 (Zusammenfassung der Ergebnisse von 6 unabhängigen Transformationsansätzen. Pro Vektorkombination wurden dabei jeweils 6 Transformanten getestet).

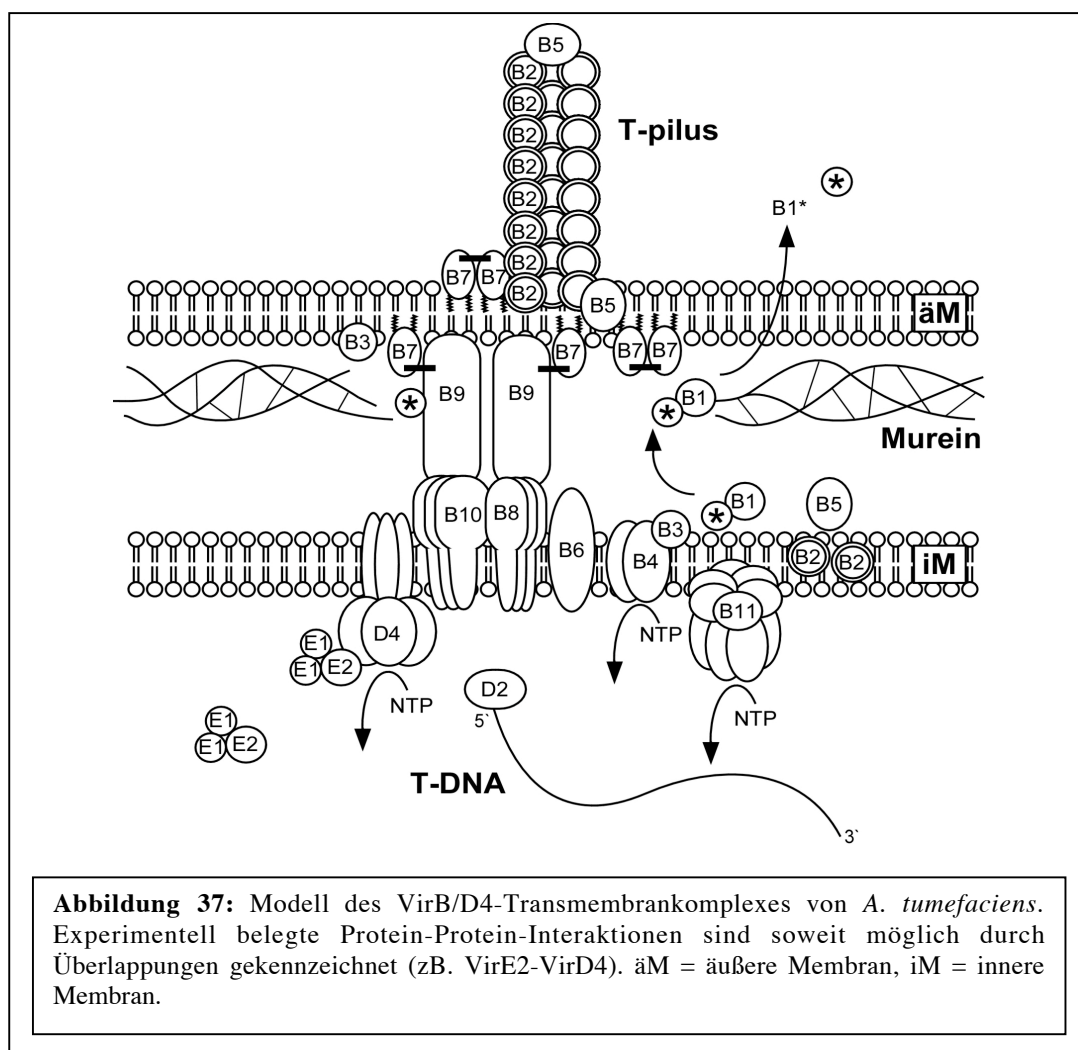
Vektor-Kombination	blaue Transformaten / \sum Transformanten in %
pAS-B5 / pACTII-B5	69,4 %
pAS-E2 / pACTII-E2	88,8 %
pAS-Tzs / pACTII-Tzs	0 %
pAS-B5 / pACTII-E2	72,2 %
pAS-B5 / pACTII-Tzs	61,1 %
pAS-Tzs / pACTII-B5	0 %
pAS-Tzs / pACTII-E2	0 %

Bei der Analyse mittels des Hefe-2-Hybridsystems wurde eine Interaktion von VirE2 mit VirE2, sowie Interaktionen von VirB5 mit VirB5, VirE2 und Tzs beobachtet. Hefezellen, die eine Fusion von VirB5 mit der DNA-bindenden Domäne von GAL4 (pAS2-VirB5) und eine Fusion von Tzs mit der Transkriptions-aktivierenden Domäne von GAL4 (pACTII-Tzs) trugen, zeigten eine deutliche Blaufärbung. Die umgekehrte Kombination (pAS2-Tzs + pACTII-VirB5) lieferte hingegen keine Blaufärbung.

4. DISKUSSION

4.1. Protein-Protein-Interaktionen im VirB/D4-Transmembrankomplex von *A. tumefaciens*

Berger und Christie (1994) identifizierten VirB2-VirB11 und VirD4 als die essentiellen Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes von *A. tumefaciens*. Seitdem wurden im Rahmen weiterführender Studien verschiedene Protein-Protein-Interaktionen zwischen diesen Komponenten nachgewiesen, von denen einige der Assemblierung und Stabilität der Transporterstruktur, andere vermutlich der Erkennung der zu transferierenden Substrate dienen. Die bereits bekannten Protein-Protein-Interaktionen der Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes werden in Abbildung 37 veranschaulicht.



4.2. Identifikation von Vir-Protein-Komplexen nach Solubilisierung der Membranen von *A. tumefaciens* mit n-Dodecyl- β -D-maltosid

Die bislang bekannten Protein-Protein-Interaktionen wurden vorwiegend unter Verwendung genetischer und klassischer proteinbiochemischer Analysemethoden (z.B. Coimmunpräzipitation, Hefe-2-Hybridsystem) erzielt. Ein Nachteil dieser Methoden besteht darin, dass die Proteine dafür aus ihrem ursprünglichen Umfeld (VirB/D4-Transmembrankomplex) entfernt werden müssen und die Untersuchungen unter artifiziellen Bedingungen erfolgen. Es ist dabei nicht auszuschließen, dass sich einige der Protein-Protein-Interaktionen einer Detektion entziehen. Dies gilt vor allem, für Interaktionen, die über membran-assoziierte Bereiche der Proteine aufgebaut werden, oder für solche, die erst im Verbund des assemblierten Transporters auftreten. Mit dem Ziel auch diese Interaktionen zu analysieren, wurde der VirB/D4-Transmembrankomplex einer Extraktion mit dem milden nicht-ionischen Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) unterzogen und die solubilisierten Teilkomplexe nach Separation mittels BN-PAGE und Gelfiltrations-Chromatographie mit spezifischen Antisera auf ihre Einzelkomponenten hin untersucht. Da DDM Protein-Protein-Interaktionen in vielen Fällen nicht zerstört (Schägger und v. Jagow 1991, Schägger *et al.* 1994) kann man davon ausgehen, dass es sich bei den isolierten Teilkomplexen um funktionelle Einheiten handelt.

4.2.1. Lokalisierung der Vir-Proteine in der Zelle

VirB1-VirB11 und VirD4 bilden einen die innere und äußere Membran durchspannenden Multiproteinkomplex (VirB/D4-Transmembrankomplex). Die hier durchgeführte Analyse der subzellulären Lokalisierung der Vir-Proteine bestätigte die Resultate früherer Studien, denen zufolge die Vir-Proteine fast ausschließlich in membran-assoziiierter Form vorliegen. Ausnahmen bildeten VirB1 und VirE2, die sowohl in membran-assoziiierter wie auch in löslicher Form detektiert wurden (Abbildung 6). Die vorrangige Funktion von VirB1 liegt vermutlich in der Lyse des Peptidoglykans. Es ist als einziges der VirB-Proteine nicht absolut essentiell für den Transfer der T-DNA. Bei VirE2 hingegen handelt es sich ebenso wie bei VirD2 um Vir-Proteine, die im Zuge einer Infektion in die pflanzliche Zelle transferiert werden. Beide wurden als zytoplasmatische Proteine beschrieben, weshalb die beobachtete Membranlokalisierung umso überraschender war. VirE2 könnte über seine Interaktion mit

VirD4 mit dem VirB/D4-Transmembrankomplex verbunden sein (Atmakuri *et al.* 2003). Es besitzt zwar auch die Fähigkeit, sich in Membranen einzulagern und Poren zu bilden (Dumas *et al.* 2001), vermutlich wird dies in der bakteriellen Zelle jedoch durch die Interaktion mit dem Chaperon VirE1 unterdrückt (Sundberg *et al.* 1999, Zhao *et al.* 2001). VirD2 ist an der Prozessierung der T-DNA beteiligt. Es bleibt mit dem 5'-Ende des generierten Einzelstranges verbunden und trägt vermutlich die für den Transfer der T-DNA in die pflanzliche Zelle benötigten Signale. VirD2 weist keine ausgeprägten hydrophoben Sequenzen auf, wurde bei der subzellulären Analyse aber ebenso wie die membran-gebundenen Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes ausschließlich in der Fraktion der sedimentierten Membranen detektiert. Interaktionen von VirD2 mit anderen Vir-Proteinen sind nicht bekannt. Lanka *et al.* postulierten aber eine Interaktion zwischen TraG und TraI, den VirD4- bzw. VirD2-Homologen des RP4-Plasmids (zitiert in Baron *et al.* 2002), so dass auch analog eine VirD2-VirD4 Interaktion im agrobakteriellen VirB/D4-System existieren könnte. Den Resultaten der Lokalisierung zufolge könnte ein Großteil des zellulären VirD2-Proteins in assoziierter Form mit dem VirB/D4-Transmembrankomplex vorliegen.

4.2.2. Solubilisierungs-Effizienz der Vir-Proteine

Die Vir-Proteine wiesen eine unterschiedliche Solubilisierungs-Effizienz bei Inkubation der Membranen mit 0 - 2 % n-Dodecyl- β -D-maltosid auf (Abbildung 6). VirB11 ließ sich selbst mit 2 % DDM nicht bzw. nur in sehr geringen Mengen in Lösung bringen. Die geringe Solubilisierbarkeit von VirB11 mit nicht-ionischen Detergenzien wurde bereits von Rashkova *et al.* (1997) beobachtet. Der Grund für dieses Phänomen ist unbekannt. VirB11 könnte durch besonders starke Protein-Protein-Interaktionen im VirB/D4-Transmembrankomplex verankert sein, oder aber bei Herauslösung aus dem Gesamtverbund seine strukturelle Integrität verlieren, denaturieren und in hochmolekularen Aggregaten präzipitieren.

Die Vir-Proteine VirB1, VirB2, VirB4, VirB5, VirE2 und VirD2 hingegen konnten bereits bei 0 % DDM solubilisiert werden. Die Solubilisierung beruhte vermutlich auf der Detergenzwirkung der ebenfalls im Reaktionsansatz vorhandenen ϵ -Amino-n-capronsäure. Die leichte Solubilisierbarkeit dieser Vir-Proteine spricht für eine geringe Membranaffinität, sowie vermutlich nur schwach ausgeprägte Interaktionen mit den restlichen Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes. Das hydrophile Protein VirB1 nimmt nur eine akzessorische Funktion während der Assemblierung des VirB/D4-Transmembrankomplexes

ein und ist daher vermutlich nur locker mit diesem verbunden. Selbiges gilt vermutlich auch für das hydrophile Protein VirB5, das über Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Vir-Proteinen in der Membran verankert wird. VirE2 und VirD2 werden als Virulenzfaktoren in die pflanzliche Zelle transferiert. Sie sind keine integralen Bestandteile des VirB/D4-Transmembrankomplexe und interagieren vermutlich vorrangig über Protein-Protein-Interaktionen mit Komponenten desselben. Es wäre möglich, dass durch die hohe Konzentration an ϵ -Amino-n-capronsäure (750 mM) schwache Protein-Protein-Interaktionen aufgehoben wurden. VirB2 und VirB4 hingegen sind über Transmembransegmente in der inneren Membran verankert. Es wäre aber denkbar, dass diese Proteine nur geringe Wechselwirkungen mit anderen Komponenten des VirB/D4-Transporters eingehen und deshalb besonders leicht solubilisiert werden konnten.

Die Vir-Proteine VirB3, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9, VirB10 und VirD4 benötigten eine DDM-Konzentration von 0,5 % DDM um effizient solubilisiert zu werden. Dies könnte auf eine höhere Membranaffinität oder eine engere Verbindung mit dem VirB/D4-Transmembrankomplex hinweisen, als es für VirB1, VirB2, VirB4, VirB5, VirE2 und VirD2 der Fall ist. VirB7, VirB8, VirB9 und VirB10 sind die postulierten Kernkomponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes. Sie bilden vermutlich eine die innere und äußere Membran durchspannende Pore. Ausgeprägte Protein-Protein-Interaktionen und die Oligomerisierung zu einem hochmolekularen Komplex könnten die Solubilisierung erschwert haben. VirD4 könnte über Interaktion mit VirB10 ein Teil dieses Komplexes sein. Die Solubilisierung von VirB6 bei einer DDM-Konzentration von 0,5 % lag vermutlich vorrangig an der hohen Hydrophobizität des Proteins. VirB3 hingegen könnte aufgrund seiner Lokalisierung in der äußeren Membran teilweise vor einer Solubilisierung durch DDM geschützt gewesen sein. Es besteht die Möglichkeit, dass die äußere Membran Gram-negativer Bakterien einer Solubilisierung durch nicht-ionische Detergenzien weniger zugänglich ist als die innere Membran (Rashkova *et al.* 1997).

4.2.3. Analyse der DDM-solubilierten Vir-Proteine

DDM-(2%)-solubilierte Membranproteine wurden mittels BN-PAGE und Gelfiltrations-Chromatographie entsprechend ihrer Größen separiert und mit spezifischen Antiseren detektiert. Beide Separationsverfahren zeichnen sich dadurch aus, dass die Auftrennung unter nativen Bedingungen erfolgt und dass Protein-Protein-Interaktionen dabei erhalten bleiben

können (Schägger und v. Jagow 1991, Schägger *et al.* 1994). Proteine, die bei diesem Analyseverfahren eine Kofraktionierung aufweisen, interagieren aller Wahrscheinlichkeit nach.

Die Analyse der mittels **BN-PAGE** separierten DDM-(2%)-Solubilisate ergab, dass die Vir-Proteine VirB8, VirB9 und VirB10 in einem Proteinkomplex hoher molekularer Masse (> 669 kDa – 440 kDa) kofraktionierten (Abbildung 7). Im Gegensatz dazu wurde VirB2 zusammen mit VirB5 und VirB7 in einem Proteinkomplex von ca. 100 kDa gefunden, wobei VirB7 zusätzlich auch in Komplexen höherer und niedrigerer molekularer Massen auftrat (Abbildung 8). Bei Separation unter denaturierenden Bedingungen in der 2. Dimension zeigte sich, dass VirB7 in den höhermolekularen Komplexen als VirB7-VirB9-Heterodimer und VirB7-VirB7-Homodimer, vorlag, während im ca. 100 kDa großen Proteinkomplex das VirB7-VirB7-Homodimer und das VirB7-Monomer detektiert wurde (Abbildung 9). VirB2, VirB5 und VirB7 sind die Komponenten des T-Pilus (Lai und Kado 1998, Schmidt-Eisenlohr *et al.* 1999 b, Sagulenko *et al.* 2001 a). Die fragile Pilus-Struktur wird im Verlauf der Membranpräparation (2-fache Passage durch eine French-Press-Zelle, 20.000 psi) und Membransolubilisierung (Ultraschallbehandlung) jedoch mit ziemlicher Sicherheit zerstört, so dass es sich bei dem detektierten ca. 100 kDa großen Proteinkomplex um eine Assemblierungsvorstufe des T-Pilus handeln könnte. Das VirB7-VirB7-Homodimer, welches auch in Komplexen höherer molekularer Masse detektiert wurde, könnte dabei als Anker fungieren, der den T-Pilus nach seiner Assemblierung mit dem VirB/D4-Transmembrankomplex verbindet.

Vergleichende Analysen der DDM-(2%)-Solubilisate von *A. tumefaciens* C58 (wt), CB1005 ($\Delta virB5$) und CB1006 ($\Delta virB6$) zeigten, dass in CB1006 sowohl die Assemblierung von VirB5, als auch die von VirB7 in membran-assoziierte Proteinkomplexe gestört war (Abbildung 8). Bereits frühere Studien berichteten von einer Reduktion der VirB5-Menge und der fehlenden Bildung von VirB7-VirB7-Homodimeren bei Deletion von *virB6* (Hapfelmeier *et al.* 2000). VirB6 könnte daher eine entscheidende Rolle bei der Assemblierung der T-Pili spielen.

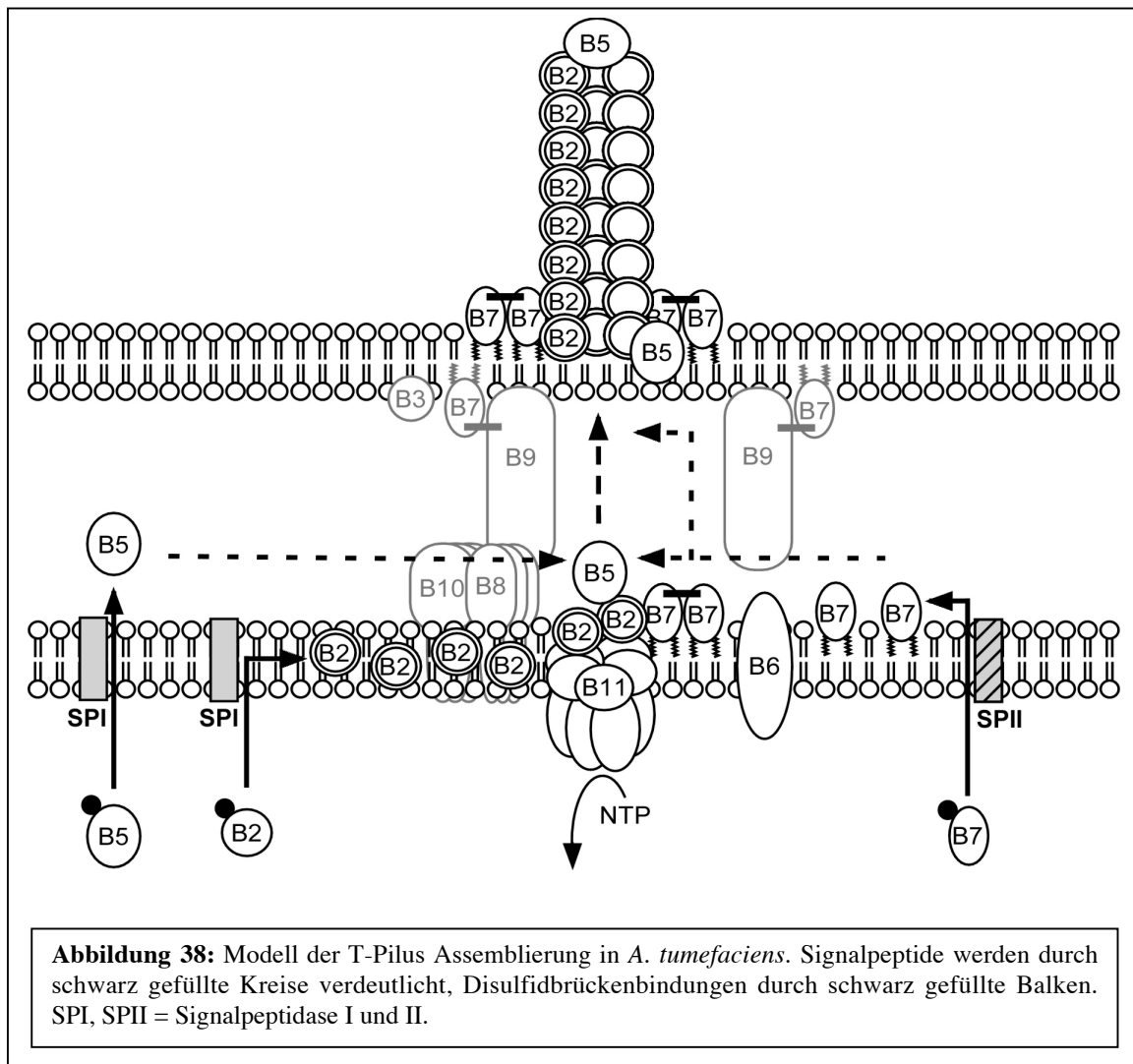
Bei Analyse der DDM-(2%)-Solubilisate mittels **Gelfiltrations-Chromatographie** wurde ebenso wie bei Separation mittels BN-PAGE eine Auftrennung der Vir-Proteine in zwei Fraktionen unterschiedlicher molekularer Masse beobachtet (Abbildung 10). VirB8, VirB9

und VirB10 kofraktionierten mit den restlichen VirB-Proteinen (mit Ausnahme von VirB2), sowie mit VirE2, VirD2 und VirD4 in einem Proteinkomplex hoher molekularer Masse (> 669 - 440 kDa). Es wäre möglich, dass es sich dabei, ebenso wie bei dem mittels BN-PAGE detektierten VirB8-VirB9-VirB10 Komplex, um den als Ganzes solubilisierten VirB/D4-Transporter handelte. Eine unterschiedliche Beladung der Proteine mit DDM und Lipidmolekülen könnte für die Elution in Fraktionen unterschiedlicher molekularer Masse verantwortlich gewesen sein. Einige der assoziierten Proteine (VirB3, VirB5, VirB6, VirB8 und in geringeren Mengen VirB9) schienen eine schwächere Bindung zum VirB/D4-Transmembrankomplex aufzuweisen. Sie konnten zusammen mit VirB2 auch in Proteinkomplexen niedrigerer molekularer Masse (ca. 100 kDa) detektiert werden. Unspezifische Kreuzreaktionen des verwendeten VirB7-Antiserums verhinderten Aussagen bezüglich der Fraktionierung von VirB7-VirB7 und VirB7. Aufgrund der Resultate der früher durchgeführten BN-PAGE Analysen, die mit einem spezifischeren VirB7-Antiserum detektiert wurden, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass VirB7-VirB7 und VirB7 ebenfalls Bestandteile des 100 kDa- Proteinkomplexes waren. Aufgrund der Kofraktionierung der T-Pilus Komponenten VirB2, VirB5 und VirB7, könnte es sich bei dem isolierten ca. 100 kDa großen Proteinkomplex um eine Assemblierungsvorstufe des T-Pilus handeln. Die gleichzeitige Detektion von VirB3, VirB6 und VirB8 könnte für eine Beteiligung dieser Proteine an der Assemblierung des T-Pilus sprechen.

Für VirE2 wurden ebenfalls Proteinkomplexe niedrigerer molekularer Masse detektiert. Da diese mit ca. 60 kDa jedoch deutlich unter denen für VirB2, VirB3, VirB5, VirB6, VirB8 und VirB9 detektierten Komplexen lagen, handelte es sich hierbei vermutlich um monomeres VirE2.

4.3. Modell der T-Pilus Assemblierung

In Zusammenfassung der oben aufgeführten Resultate, und unter Einbeziehung der Ergebnisse anderer Arbeiten, wurde ein Modell für die Assemblierung des T-Pilus aufgestellt (siehe Abbildung 38).



VirB2, VirB5 und VirB7 werden unter Abspaltung von Signalpeptiden durch Signalpeptidase I (VirB2, VirB5) bzw. Signalpeptidase II (VirB7) über die innere Membran hinweg transferiert. Das Lipoprotein VirB7 wird anschließend über eine Lipidmodifikation in der Membran verankert, während VirB2 in zyklisierter Form in der inneren Membran akkumuliert (Shirasu und Kado 1993). VirB2 interagiert mit VirB7 (Sagulenko *et al.* 2001 a) und bei Quervernetzung isolierter T-Pili wurden Hinweise auf eine Interaktion von VirB5 mit VirB2 gefunden (Abbildung 14).

VirB5 könnte aufgrund seiner Hydrophilität als Chaperon oder Trägerprotein fungieren, das den Transfer von VirB2 und eventuell VirB7 von der inneren zur äußeren Membran katalysiert. Alternativ könnte es eine integrale Piluskomponente darstellen und als solche möglicherweise im fertig assemblierten Pilus auch die Rolle eines Adhäsins übernehmen. **VirB6** ist vermutlich ebenfalls an der Assemblierung der T-Pili beteiligt, da die Deletion von *virB6* zu einer reduzierten VirB5 Menge und einer fehlenden Bildung von

VirB7-VirB7-Homodimeren führte (Hapfelmeier *et al.* 2000). Das Fehlen von VirB7-VirB7 könnte für die in CB1006 beobachtete Destabilisierung von VirB5 verantwortlich sein. **VirB7** dient vermutlich der Verankerung des T-Pilus im VirB/D4-Transmembrankomplex. Da VirB6 jedoch an der Bildung der VirB7-VirB7-Homodimere beteiligt ist, wäre es möglich, dass VirB7 zumindest zeitweilig in Assoziation mit der inneren Membran vorliegt und dort zusammen mit VirB2 und VirB5 einen Komplex bildet. VirB7 könnte jedoch auch unabhängig zur äußeren Membran transferiert werden und dort als Rezeptor für VirB2 -VirB5 dienen.

Interaktionen von VirB5 mit Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes könnten den Transfer von VirB2 zur äußeren Membran unterstützen. Tatsächlich wurde bei Gelfiltrations-chromatographischer Separation DDM-(2%)-solubilisierter Membranproteine eine Kofraktionierung von **VirB8** und **VirB9** mit VirB2, VirB5 und VirB7 in einem 100 kDa großen Proteinkomplex beobachtet. Die Quervernetzung intakter *A. tumefaciens* Zellen mit Formaldehyd ergab sowohl für VirB5, wie auch VirB8, VirB9 und VirB10 ähnlich große Quervernetzungsprodukte, was ebenfalls als Hinweis für eine Interaktion von VirB5 mit einem oder mehreren dieser Proteine gewertet werden kann. Im Rahmen der Diplomarbeit (Krall 1999) wurde eine Interaktion von VirB5 mit VirB11 detektiert.

Die ATPase **VirB11** könnte eine sukzessive Freisetzung von VirB2 aus der inneren Membran katalysieren (Sagulenko *et al.* 2001 b), oder mittels Membranfusionierung den Transfer von VirB2 von der inneren zur äußeren Membran erleichtern (Machón *et al.* 2002). Eine Beteiligung von VirB11 an dem Transfer von VirB7 und VirB7-VirB7-Homodimeren zur äußeren Membran wurde ebenfalls postuliert (Sagulenko *et al.* 2001 b).

VirB3 ist vermutlich ebenfalls an der Assemblierung des T-Pilus beteiligt. Es kofraktionierte mit VirB2, VirB5 und VirB7 bei Gelfiltrations-chromatographischer Separation DDM-(2%)-solubilisierter Membranproteine. Die zellulären Mengen von VirB3 sind bei Deletion von *virB6* reduziert (Hapfelmeier *et al.* 2000).

VirB3 zeigte als einziges Vir-Protein auch eine leichte Reduktion bei Deletion von *virB5* (Abbildung 28). Da VirB3 in der äußeren Membran lokalisiert, könnte es als Akzeptor oder Nukleationspunkt für die Assemblierung von VirB2, VirB5 und VirB7 zum T-Pilus dienen.

4.4. Detektion von VirB1 in isolierten T-Pili

Bei Analyse FA-quervernetzter T-Pili wurden deutliche Mengen an VirB1 detektiert (Abbildung 14). Eine unspezifische Detektion von VirB1 aufgrund von Verunreinigung der T-Pilus Fraktion mit Zellmaterial kann ausgeschlossen werden, da die Detektion mit dem hochsensitiven VirB8-spezifischen Antiserum keine Signale lieferte. Die Analyse mit VirB2-spezifischem Antiserum ergab zwei prominente VirB2-Vernetzungsprodukte von ca. 30 kDa und 34 kDa, bei denen es sich um vernetztes VirB2-VirB5 ($4,5 \text{ kDa} + 26 \text{ kDa} = 30,5 \text{ kDa}$) und vernetztes VirB2-VirB1 ($4,5 \text{ kDa} + 28 \text{ kDa} = 32,5 \text{ kDa}$) handeln könnte. Signale im Bereich von Proteinen gleicher molekularer Massen wurden bei Detektion mit VirB1- bzw. VirB5-spezifischen Antiseren beobachtet.

Nach dem heutigem Kenntnisstand ist nicht auszuschließen, dass es sich bei dem T-Pilus um eine Struktur handelt, die sowohl in der inneren wie äußeren Membran verankert ist und den periplasmatischen Raum durchspannt. In diesem Fall wäre die Interaktion einer der Pilus-Komponenten mit VirB1 insofern von Vorteil, als dass dadurch die Assemblierung oder auch die Integrität der bereits assemblierten T-Pili durch eine räumlich begrenzte Lyse der Peptidoglykanschicht gewährleistet werden könnte.

4.5. Analyse eines mit VirB5 interagierenden Proteins (Tzs)

Im Rahmen der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen unter Verwendung des Gelüberschichtungstests wurde ein 27 kDa großes, unter virulenzgen-induzierenden Bedingungen produziertes Protein detektiert, das mit VirB5 interagiert. Das VirB5-interagierende Protein wurde aus *A. tumefaciens* C58 aufgereinigt und mittels N-terminaler Sequenzierung als „*trans*-Zeatin produzierendes Protein“ (Tzs) identifiziert (Beaty *et al.* 1986). *Tzs* kommt nur auf Ti-Plasmiden des Nopalins-Typs vor. Es liegt dort außerhalb der T-DNA in der Vir-Region und wird durch VirA/VirG kontrolliert. *A. tumefaciens* Stämme, die Ti-Plasmide des Nopalins-Typs tragen, sekretieren Zeatinribosid (ZR) und *trans*-Zeatin (Z) ins umgebende Medium (Beaty *et al.* 1986, Powell *et al.* 1988). Die Funktion von Tzs im Verlauf des Infektionsprozesses ist unklar, da auch Ti-Plasmide, die dieses Gen nicht tragen, über alle für den Gentransfer nötigen Informationen verfügen (Akiyoshi *et al.* 1987).

Zu *tzs* existiert ein Homolog, *ipt*, das als Onkogen auf der T-DNA aller Ti-Plasmide zu finden ist. *Ipt* zeigt auf Ebene der Aminosäuresequenz 47,1 % Identität zu Tzs und katalysiert

ebenso wie dieses über eine Isopentenyltransferaseaktivität die Umsetzung von AMP mit Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) zu iso-Pentenyladenosin-5'-monophosphat (iPMP) (Powell *et al.* 1988). iPMP ist ein Cytokinin und stellt die Vorstufe für die Synthese von Cytokinin des Zeatin-Typs dar. Eine Erhöhung der Cytokinin-Konzentration führt in pflanzlichen Zellen zu einer erhöhten Zellteilung und verzögert die Seneszenz. Die Transkription von *ipt* in der Pflanzenzelle wird durch eukaryontische Signalsequenzen ermöglicht und hat die Ausbildung der charakteristischen Wurzelhalsgallen zur Folge.

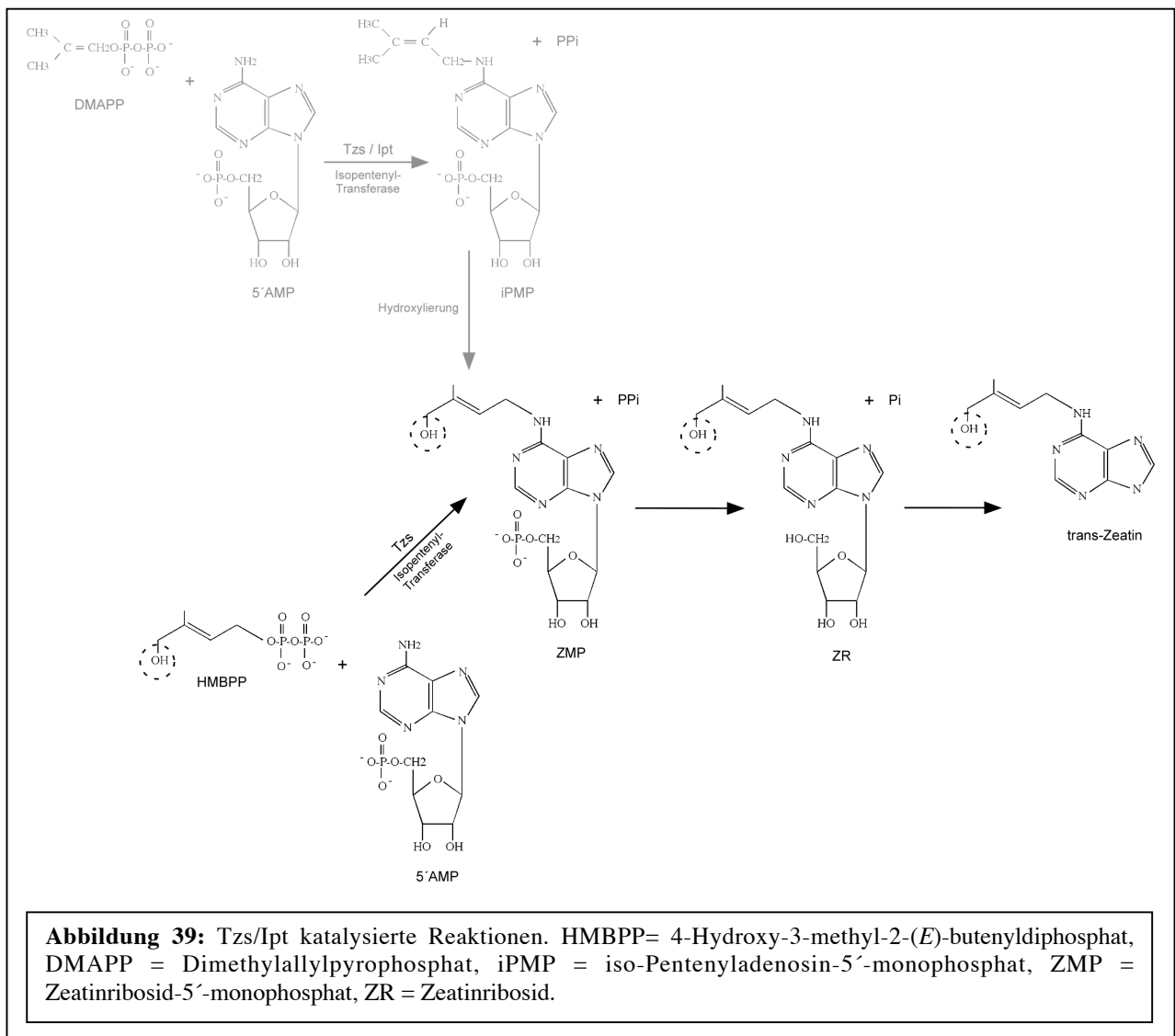
4.5.1. Analyse der von Tzs katalysierten enzymatischen Reaktion

(in Zusammenarbeit mit Ag. Prof. Dr. M. H. Zenk, Biozentrum, Universität Halle)

Die virulenzgen-induzierte Expression von Tzs in *A. tumefaciens* geht mit der Synthese und Sekretion von Zeatinribosid (ZR) und *trans*-Zeatin (Z) statt des zu erwarteten Reaktionsproduktes iso-Pentenyladenosin-5'-monophosphat (iPMP) einher. Für die Bildung von Zeatinribosid-5'-monophosphat (ZMP), ZR und Z aus iPMP und dessen Folgeprodukten iso-Pentenyladenosin (iPA) und iso-Pentenyladenin (iP) wurden ursprünglich unspezifische Hydroxylierungsreaktionen verantwortlich gemacht (Akiyoshi *et al.* 1984, Powell *et al.* 1988). Untersuchungen von Astot *et al.* (2000) legten allerdings die Vermutung nahe, dass ZMP nicht über unspezifische Hydroxylierung aus iPMP, sondern durch die direkte Verknüpfung von AMP mit einer bereits hydroxylierten Seitenkettenvorstufe isoprenoiden Ursprungs gebildet wird. 4-Hydroxy-3-methyl-2-(*E*)-butenyldiphosphat (HMBPP), ein Zwischenprodukt des vor kurzem entdeckten alternativen Isoprenoid-Biosynthese-Weges (DXP-Weg), kam als das betreffende Substrat in Frage. Es verfügt über die erforderliche Hydroxylierung, um bei Umsetzung mit AMP in direkter Folge ZMP zu ergeben. Der Deoxyxylulose-Phosphat-(DXP)-Weg tritt in Gram-negativen Bakterien und Chloroplasten auf (Eisenreich *et al.* 1998, Rohdich *et al.* 2001), während die Isoprenoid-Biosynthese in Gram-positiven Bakterien und Eukaryonten nach dem klassischen Mevalonat-Weg erfolgt. Die Analyse des Gesamtgenoms zeigte, dass *A. tumefaciens* als Gram-negativer Organismus über die Enzyme des DXP-Weges, nicht jedoch die des Mevalonat-Weges verfügt (Wood *et al.* 2001).

Tzs wurde zum Zweck der Durchführung enzymatischer Tests in nativer Form aufgereinigt. Bei der Aufreinigung wurde auch ein ca. 28 kDa großes, vermutlich *E. coli*-spezifisches Protein mitisoliert, dass mit keiner der angewandten Methoden abgetrennt werden konnte. Da *E. coli* kein *trans*-Zeatin bildet (Akiyoshi *et al.* 1984), konnte jedoch

davon ausgegangen werden, dass die Isopentenyltransferaseaktivität auf Tzs und nicht auf Verunreinigungen durch *E. coli*-spezifische Proteine zurückzuführen war. Die Analyse der Tzs-katalysierten Umsetzung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Zenk im Rahmen des SFB 369. Es wurde dabei gezeigt, dass Tzs radioaktiv markiertes HMBPP mit AMP zu ZMP umsetzt (Krall *et al.* 2002 b). Da *A. tumefaciens* vor allem die hydroxylierten Produkte Zeatinribosid und *trans*-Zeatin sekretiert, handelt es sich bei dem primär von Tzs umgesetzten Substrat aller Wahrscheinlichkeit nach um HMBPP statt DMAPP (siehe Abbildung 39).



Aufgrund der Ähnlichkeit zu Tzs setzt Ipt möglicherweise ebenfalls überwiegend HMBPP um. Da sich Ipt jedoch kaum in löslicher Form aufreinigen ließ, war eine Analyse der enzymatischen Reaktion nicht möglich.

4.5.2. Bestätigung der VirB5-Tzs Interaktion

Der VirB/D4-abhängige Transfer setzt eine Interaktion des zu transferierenden Proteins mit Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes voraus, wie es zum Beispiel für VirE2-VirD4 belegt wurde (Atmakuri *et al.* 2003). Die mittels Gelübersichtungstest detektierte VirB5-Tzs Interaktion konnte daher als Hinweis für einen Transfer von Tzs in die pflanzliche Zelle gewertet werden. Da aber auch die Möglichkeit einer unspezifischen Interaktion der beiden Proteine unter den Bedingungen des Gelübersichtungstests bestand, musste die VirB5-Tzs Interaktion durch zusätzliche Analysen bestätigt werden.

Bei Analyse der subzellulären Lokalisierung wurde Tzs in nicht-induzierten C58-pPZP300 Zellen nur in löslicher Form, in virulenzgen-induzierten C58-pPZP300 und CB1005-pPZP300 Zellen aber zusätzlich auch in membran-assoziiierter Form vorgefunden (Abbildung 31). Die Membranlokalisierung des hydrophilen Tzs-Proteins könnte durch eine Interaktionen mit Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes verursacht worden sein. Da Tzs jedoch auch in CB1005 in Assoziation mit den Membranen vorlag, war VirB5 für die Membranassoziiierung von Tzs nicht essentiell. VirB5 übte auch keinen stabilisierenden Einfluss auf Tzs aus, da dieses sowohl in C58 wie auch in CB1005 in vergleichbaren zellulären Mengen detektiert wurde (Abbildung 28). Weitere Analysen zeigten, dass Tzs nicht mit dem T-Pilus assoziierte (Abbildung 30) und nicht ins extrazelluläre Milieu sekretiert wurde.

In Coimmunpräzipitations-Analysen unter Verwendung von aufgereinigtem StrepII-VirB5 und Tzs sowie H₆-TrxA-VirB5 und Tzs konnte eine Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 33 und 34). Die Spezifität der Interaktion wurde dadurch weiter belegt, dass eine Coimmunpräzipitation von Tzs mit dem VirB5-homologen aus *B. suis* nicht möglich war.

Eine VirB5-Tzs Interaktion wurde ebenfalls mit Hilfe des Hefe-2-Hybridsystems nachgewiesen. Hefezellen, die eine Fusion von VirB5 mit der DNA-bindenden Domäne von GAL4 (pAS2-VirB5) und eine Fusion von Tzs mit der Transkriptions-aktivierenden Domäne von GAL4 (pACTII-Tzs) trugen, zeigten eine deutliche Blaufärbung im X-Gal Kolonie-Filter-Test. Die umgekehrte Kombination (pAS2-Tzs + pACTII-VirB5) lieferte keine Blaufärbung. Die fehlende Transkriptionsaktivierung könnte hier auf Konformations-

änderungen eines der beiden Proteine durch die Fusion mit GAL4-DBD bzw. GAL4-AD zurückzuführen sein, die eine erfolgreiche Interaktion verhinderten. Eine Dimerisierung von Tzs konnte mittels Hefe-2-Hybridsystem nicht festgestellt werden, dafür jedoch die Dimerisierung von VirB5 und eine Interaktion von VirB5 mit VirE2. Eine Dimerisierung wurde auch für das VirB5-homologe TraC des IncN-Plasmids pKM101 postuliert (Schmidt-Eisenlohr *et al.* 1999 a).

4.5.3. Analyse eines möglichen Transfers von Tzs in die pflanzliche Zelle

(in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P.J.J. Hooykaas, durchgeführt von Dr. Annette C. Vergunst, Institut of Molecular Plant Sciences, Universität Leiden, Niederlande)

Der Umstand, dass Tzs durch VirA/VirG kontrolliert und bei Induktion des agrobakteriellen Virulenzsystems verstärkt exprimiert wird, lässt auf eine Beteiligung am Infektionsprozess schließen. Genauer über diese Beteiligung war jedoch nicht bekannt. Es wurde bislang angenommen, dass das sekretierte *trans*-Zeatin Pflanzenzellen zur Zellteilung anregen und dadurch die Integration der T-DNA ins pflanzliche Genom erleichtern könnte, oder aber das Wirtsspektrum von *A. tumefaciens* beeinflusst (Powell *et al.* 1988). Aufgrund der detektierten Tzs-VirB5-Interaktion wurde als dritte Alternative der Transfer von Tzs als Virulenzfaktor in die pflanzliche Zelle in Erwägung gezogen und diese Möglichkeit direkt untersucht.

Tzs wurde mit Hilfe des „Cre/Lox-Systems“ auf Transfer in *A. thaliana* (nach Vergunst *et al.* 2000) bzw. auf Transfer in *S. cerevisiae* (nach Schrammeijer *et al.* 2003) untersucht. Für die Analyse wurden die 50 C-terminalen Aminosäuren, sowie das komplette Tzs-Protein mit der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 fusioniert. Als Donor diente *A. tumefaciens* (Octopin-Typ) und *A. tumefaciens* (Nopalin-Typ). Wird Cre mit dem „Trägerprotein“ in die Rezipientenzelle transferiert, so entfernt es dort mittels spezifischer Rekombination einen von zwei *lox*-Sequenzen flankierten DNA-Bereich. Rekombinanten können anschließend auf geeignetem Medium selektiert werden.

Ein Transfer war auch bei dreimaliger Wiederholung des Tests weder mit den 50 C-terminalen Aminosäuren, noch mit dem vollständigen Tzs-Protein nachweisbar. Tzs wird daher höchst wahrscheinlich nicht in die Pflanzenzelle transferiert. Gegen einen Transfer von Tzs spricht auch die atypische Lokalisation des für einen Transfer benötigten C-terminalen

RXR-Motivs. Dieses liegt bei den transferierten Vir-Proteinen VirD2, VirE2 und VirF ca. 10 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt, während es bei Tzs auf den letzten drei Aminosäuren des Proteins zu finden ist. Das RXR-Motiv dient vermutlich der Erkennung der Substrate durch Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes (Schrammeijer *et al.* 2003, Vergunst *et al.* 2000).

Obwohl die Interaktion von Tzs mit VirB5 in unterschiedlichen Versuchsansätzen beobachtet wurde, konnte die Hypothese eines Transfers von Tzs in die pflanzliche Zelle nicht bestätigt werden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass es sich bei der beobachteten VirB5-Tzs Interaktion um ein Artefakt handelt. Alternativ wäre es möglich, dass der Transfer von Tzs nur in Kombination mit anderen Substraten erfolgt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen im VirB/D4-Transmembrankomplex von *A. tumefaciens* C58. Die erhaltenen Resultate sollten einem näheren Einblick in Aufbau und Assemblierung des T4SS-Transporters dienen.

Unter Verwendung des milden, nicht-ionischen Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid gelang die Solubilisierung eines hochmolekularen Proteinkomplexes, in dem alle Vir-Proteine außer VirB2 nachgewiesen werden konnten. Aller Wahrscheinlichkeit nach handelte es sich dabei um den im Ganzen solubilisierten VirB/D4-Transmembrankomplex. Zusätzlich wurde ein ca. 100 kDa großer Proteinkomplex solubilisiert, in dem die Vir-Proteine VirB2, VirB3, VirB5, VirB6, VirB7, VirB8 und in geringen Mengen VirB9 detektiert wurden. Da vor allem VirB2, VirB5 und VirB7 auch bei Analyse mittels BN-PAGE und bei Separation unter denaturierenden Bedingungen in der 2. Dimension eine auffallende Kofraktionierung aufwiesen, könnte es sich bei dem isolierten 100 kDa Proteinkomplex um eine Vorstufe der T-Pilus-Assemblierung handeln. Unter Berücksichtigung bereits bekannter Fakten wurde ein Modell der T-Pilus-Assemblierung erstellt.

Bei dem Versuch, eine Interaktion zwischen VirB5 und anderen Komponenten des VirB/D4-Transmembrankomplexes mittels Gelüberschichtungstest nachzuweisen, wurde ein 27 kDa großes, mit VirB5 interagierendes Protein entdeckt. Durch Aufreinigung und N-terminale Sequenzierung wurde dieses Protein als „*trans*-Zeatin produzierendes Protein“ (Tzs) identifiziert. Die Spezifität der VirB5-Tzs Interaktion wurde im Hefe-2-Hybridsystem und durch Affinitätspräzipitation der gereinigten Proteine bestätigt.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. M.H. Zenk (Universität Halle) konnte gezeigt werden, dass Tzs 4-Hydroxy-3-methyl-2-(*E*)-butenyldiphosphat (HMBPP) mit AMP zum Zeatinribosid-5'-monophosphat (ZMP) umsetzt. HMBPP ist ein Zwischenprodukt des in Gram-negativen Bakterien entdeckten, alternativen Isoprenoid-Biosynthese Weges (DXP-Weg). Tzs katalysiert nach Literaturangaben auch die Umsetzung von Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) mit AMP zu iso-Pentenyladenosin-5'-monophosphat (iPMP). Da Tzs-exprimierende *A. tumefaciens*-Zellen jedoch vor allem die hydroxylierten Produkte Zeatinribosid (ZR) und *trans*-Zeatin sekretieren und bis dato kein Nachweis einer

Hydroxylierungsreaktionen erbracht werden konnte, handelt es sich bei dem primär von Tzs umgesetzten Substrat aller Wahrscheinlichkeit nach um HMBPP.

Tzs zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu Ipt, einem mit der T-DNA transferierten onkogenen Protein. Ipt verwendet vermutlich ebenfalls HMBPP als Substrat. Da dieses Protein jedoch nicht in ausreichenden Mengen in löslicher Form aufgereinigt werden konnte, war eine Analyse der enzymatischen Reaktion nicht möglich.

Untersuchungen mit dem Cre/Lox-System (Schrammeijer *et al.* 2003, Vergunst *et al.* 2000) in Kooperation mit Dr. Annette C. Vergunst (Universität Leiden) konnten den Transfer von Tzs in die pflanzliche Zelle nicht belegen. Tzs ist dementsprechend vermutlich kein transferierter Virulenzfaktor und übt seine Funktion in der bakteriellen Zelle aus. Die physiologische Relevanz der VirB5-Tzs Interaktion ist unklar.

Zusätzlich zur VirB5-Tzs Interaktion wurde auch eine Interaktion von VirB5 mit VirE2 und eine VirB5-VirB5 Interaktion detektiert. Die Deletion von *virB5* zeigte bis auf eine geringe Reduktion von VirB3 keine Auswirkungen auf die zellulären Mengen und die Assemblierung der restlichen Vir-Proteine zu höhermolekularen, membran-assoziierten Proteinkomplexen. VirB5 ist daher vermutlich keine integrale Strukturkomponente des VirB/D4-Transmembrankomplexes und könnte allein der Assemblierung des T-Pilus dienen.

Im Rahmen der Analysen wurde neben VirB2, VirB5 und VirB7 auch VirB1 in isolierten T-Pili detektiert. Eine unspezifische Detektion von VirB1 aufgrund von Verunreinigungen der präparierten Proben mit Zellmaterial konnte ausgeschlossen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Akiyoshi, D.E.**, Klee, H., Amasino, R.M., Nester, E.W., Gordon, M.P. (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5994-5998
- Akiyoshi, D.E.**, Regier, D.A., Jen, G., Gordon, M.P. (1985) Cloning and nucleotide sequence of the *tzs* gene from *Agrobacterium tumefaciens* strain T37. *Nucleic Acid Res.* 13: 2773-2788
- Akiyoshi, D.E.**, Regier, D.A., Gordon, M.P. (1987) Cytokinin production by *Agrobacterium* and *Pseudomonas* spp. *J. Bacteriol.* 169: 4242-4248
- Albright, L.M.**, Yanofsky, M.F., Leroux, B., Ma, D., Nester, E.W. (1987) Processing of the T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* generates border nicks and linear, single-stranded T-DNA. *J. Bacteriol.* 169: 1046-1055
- An, G.** (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 79: 568-570
- Anderson, L.B.**, Hertzell, A.V., Das, A. (1996) *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 and VirB9 form a disulfid-linked protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8889-8894
- Anderson, S.G.E.**, Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C.M., Podowski, R.M. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133-140
- Astot, C.**, Dolezal, K., Nordström, A., Wang, Q., Kunkel, T., Moritz, T., Chua, N.H., Sandberg, G. (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 14778-14783
- Atmakuri, K.**, Ding, Z., Christie, P.J. (2003) VirE2, a Type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Microbiol.* 49: 1699-1713
- Ballas, N.**, Citovsky, V. (1997) Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10723-10728
- Baron, C.**, Llosa, M., Zhou, S., Zambryski, P. (1997 a) VirB1, a component of the T-complex transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*, is processed to a C-terminal secreted product, VirB1*. *J. Bacteriol.* 179: 1203-1210
- Baron, C.**, Thorstenson, Y.R., Zambryski, P.C. (1997 b) The lipoprotein VirB7 interacts with VirB9 in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 179: 1211-1218
- Baron, C.**, O'Callaghan, D., Lanka, E. (2002) Bacterial secrets of secretion: EuroConference on the biology of type IV secretion processes. *Mol. Microbiol.* 43: 1359-1365
- Beaty, J.S.**, Powell, G.K., Lica, L., Regier, A.D., MacDonald, E.M.S., Hommes, N.G., Morris, R.O. (1986) *Tzs*, a nopaline Ti plasmid gene from *Agrobacterium tumefaciens* associated with *trans*-zeatin biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 203: 274-280
- Beaupré, C.E.**, Bohne, J., Dale, E.M., Binns, A.N. (1997) Interactions between VirB9 and VirB10 membrane proteins involved in the movement of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J. Bacteriol.* 179: 78-89

- Beijersbergen, A.**, den Dulk-Ras, A., Schilperoort, R.A., Hooykaas, P.J. (1992) Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science*: 256: 1324-1327
- Beijersbergen, A.**, Smith, S.J., Hooykaas, P.J.J. (1994) Localization and topology of VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 32: 121-218
- Berger, B.**, Christie, P.J. (1993) The *Agrobacterium tumefaciens* *virB4* gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *J. Bacteriol.* 175: 1723-1734
- Berger, B.R.**, Christie, P.J. (1994) Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* *virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *J. Bacteriol.* 176: 3646-3660
- Bhandari, P.**, Gowrishankar, J. (1997) An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *J. Bacteriol.* 179: 4403-4406
- Binns, A.N.**, Beaupre, C.F., Dale, E.M. (1995) Inhibition of VirB mediated transfer of diverse substrates from *Agrobacterium tumefaciens* by the IncQ plasmid RSF1010. *J. Bacteriol.* 177: 4890-4899
- Binns, A.N.** (2002) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens*: 25 years and counting. *Trends Plant Sci.* 7: 231-233
- Bloom, H.**, Beier, H., Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99
- Bohne, J.**, Yim, A., Binns, A.N. (1998) The Ti plasmid increases the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens* as a recipient in *virB*-mediated conjugal transfer of an IncQ plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7057-7062
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Braun, A.C.** (1950) Thermal inactivation studies on the tumor-inducing principle in crown gall. *Phytopathol.* 40: 3
- Bundock, P.**, den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., Hooykaas, P.J. (1995) Trans-kingdom DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 3206-3214
- Bundock, P.**, Hooykaas, P.J. (1996) Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15272-15275
- Burns, D.L.** (2003) Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 29-34
- Cabezón, E.**, Lanka, E., de la Cruz, F. (1994) Requirements for mobilization of plasmids RSF1010 and ColE1 by the IncW plasmid R388: *trwB* and RP4 *traG* are interchangeable. *J. Bacteriol.* 176:4455-4458
- Cangelosi, G.A.**, Ankenbauer, R.G., Nester, E.W. (1990) Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6708-6712

- Cascales, E.**, Christie, P.J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature Rev.* 1: 137-149
- Chilton, M.D.**, Drummond, M.H., Merlo, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P., Nester, E.W. (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263-271
- Christie, P.J.**, Ward, J.E., Winans, S.C., Nester, E.W. (1988) The *Agrobacterium tumefaciens* *virE2* gene product is a single-stranded-DNA-binding protein that associates with T-DNA. *J. Bacteriol.* 170: 2659-2667
- Christie, P.J.** (1997) *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J. Bacteriol.* 179: 3085-3094
- Christie, P.J.** (2001) Type IV secretion: Intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally-related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* 40: 294-305
- Citovsky, V.**, Guralnick, B., Simon, M.N., Wall, J.S. (1997) The molecular structure of *Agrobacterium* VirE2-single-stranded DNA complexes involved in nuclear import. *J. Mol. Biol.* 271: 718-727
- Citovsky, V.**, Warnick, D., Zambryski, P. (1994) Nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 and VirE2 proteins in maize and tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3210-3214
- Citovsky, V.**, Wong, M.L., Zambryski, P. (1989) Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1193-1197
- Citovsky, V.**, Zupan, J., Warnick, D., Zambryski, P. (1992) Nuclear localization of VirE2 protein in plant cells. *Science* 256: 1802-1805.
- Covacci, A.**, Rappuoli, R. (1993) Pertussis toxin export requires accessory genes located downstream from the pertussis toxin operon. *Mol. Microbiol.* 8: 429-434
- Covacci, A.**, Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., Rappuoli, R. (1999) *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284: 1328-1333
- 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: 453-462
- Dang, T.A.**, Zhou, X.R., Graf, B., Christie, P.J. (1999) Dimerization of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB4 ATPase and the effect of ATP-binding cassette mutations on the assembly and function of the T-DNA transporter. *Mol. Microbiol.* 32: 1239-1253
- Das, A.** (1988) *Agrobacterium tumefaciens* *virE* operon encodes a single-stranded DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2909-2913
- Das, A.**, Xie, Y.H. (2000) The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *J. Bacteriol.* 182: 758-763
- de Groot, M.J.**, Bundock, P., Hooykaas, P.J., Beijersbergen, A.G. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.* 16: 839-842

- Deng, W.**, Chen, L., Peng, W.T., Liang, X., Sekiguchi, S., Gordon, M.P., Nester, E.W. (1999) VirE1 is a specific molecular chaperone for the exported single-stranded DNA-binding protein VirE2 in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol.* 31: 1795-1807
- Deutscher, M.P.** „Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification“ Volume 182, Academic Press
- Dijkstra, A.J.**, Keck, W. (1996) Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J. Bacteriol.* 178: 5555-5562
- Disque-Kochem, C.**, Dreiseikelmann, B. (1997) The cytoplasmatic DNA-binding protein TraM binds to the inner membrane protein TraD *in vitro*. *J. Bacteriol.* 179: 6133-6137
- Dumas, F.**, Duckley, M., Pelczar, P., Van Gelder, P., Hohn, B. (2001) An *Agrobacterium* VirE2 channel for transferred DNA transport into plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 485-490
- Durfee, T.**, Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H., Elledge, S.J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* 7: 555-569
- Egelman, E.** (2001) Pumping DNA. *Nature* 409:573-575
- Eisenbrandt, R.**, Kalkum, M., Lai, E.M., Lurz, R., Kado, C.I., Lanka, E. (1999) Conjugative pili of IncP plasmids and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J. Biol. Chem.* 274: 22548-22555
- Eisenreich, W.**, Schwarz, M., Cartayrade, A., Arigoni, D., Zenk, M., Bacher, A. (1998) The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem. Biol.* 5: R221-R233
- Fernandez, D.**, Dang, T.A.T., Spudich, G.M., Zhou, X.R., Berger, B.R., Christie, P.J. (1996 a) The *Agrobacterium tumefaciens* virB7 gene product, a proposed component of the T-complex transport apparatus, is a membrane-associated lipoprotein exposed at the periplasmic surface. *J. Bacteriol.* 178: 3156-3167
- Fernandez, D.**, Spudich, G.M., Zhou, X.R., Christie, P.J. (1996 b) The *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 lipoprotein is required for stabilization of VirB proteins during assembly of the T-complex transport apparatus. *J. Bacteriol.* 3168-3176
- Fiedler, S.** und Wirth, R. (1988) Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal. Biochem.* 170: 38-44
- Fields, S.**, Song, O.K. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein-interactions. *Nature* 340: 245-246
- Finlay, B.B.**, Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 136-169
- Fullner, K.J.** (1998) Role of *Agrobacterium* virB genes in transfer of T-complexes and RSF1010. *J. Bacteriol.* 180: 430-434
- Fullner, K.J.**, Lara, J.C., Nester, E.W. (1996) Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science* 273: 1107-1109

- Fullner, K.J.**, Stephens, K.M., Nester, E.W. (1994) An essential virulence protein of *Agrobacterium tumefaciens*, VirB4, requires an intact mononucleotide binding domain to function in transfer of T-DNA. *Mol. Gen. Genet.* 245: 704-715
- Gao, W.**, Loeser, R., Raschke, M., Dessoy, M.A., Fulhorst, M., Alpermann, H., Wessjohann, L.A., Zenk, M.H. (2002) (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl Diphosphate: An intermediate in the formation of terpenoids in plant chromoplasts. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41: 2604-2607
- Garfinkel, D.J.**, Simpson, R.B., Ream, L.W., White, F.F., Gordon, M.P., Nester, E.W. (1981) Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell* 27: 143-153
- Gelvin, S.B.** (1998) *Agrobacterium* VirE2 protein can form a complex with T strands in the plant cytoplasm. *J. Bacteriol.* 180: 4300-4302.
- Ghai, J.**, Das, A. (1989) The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti Plasmid encodes a DNA-relaxing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3109-3113
- Gheysen, G.**, Villarroel, R., Van Montagu, M. (1991) Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Dev.* 5: 287-297
- Gilmour, M.**, Gunton, J.E., Lawley, T.D., Taylor, D.E. (2003) Interaction between the IncHI1 plasmid R27 coupling protein and type IV secretion system: TraG associates with the coiled-coil mating pair formation protein TrhB. *Mol. Microbiol.* 49: 105-116
- Gomis-Rüth, F.X.**, Moncalián, G., Pérez-Luque, R., González, A., Cabezón, E., de la Cruz, F., Coll, M. (2001) The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* 409:637-641
- Guralnick, B.**, Thomsen, G., Citovsky, V. (1996) Transport of DNA into the nuclei of *Xenopus* oocytes by a modified VirE2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell* 8: 363-373
- Haberer, G.**, Kieber, J.J. (2002) Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiol.* 128: 354-362
- Hamilton, C.M.**, Frary, A., Lewis, C., Tanksley, S. (1996) Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9975-9979
- Hamilton, C.M.**, Lee, H., Li, P., Cook, D.M., Piper, K.R., Beck von Bodman, S., Lanka, E., Ream, W., Farrand, S. (2000) TraG from RP4 and TraG and VirD4 from Ti plasmids confer relaxosome specificity to the conjugal transfer system of pTiC58. *J. Bacteriol.* 182: 1541-1548
- Hapfelmeier, S.**, Domke, N., Zambryski, P.C., Baron, C. (2000) VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and Formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 182: 4505-4511
- Harlow, E.**, Lane, D. (1988) In: *Antibodies, A Laboratorial Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Harrington, L.C.**, Rogerson, A.C. (1990) The F pilus of *Escherichia coli* appears to support stable DNA transfer in the absence of wall-to-wall contact between cells. *J. Bacteriol.* 172: 7263-7264
- Heinemann, J.A.**, Sprague, G.F. (1989) Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* 340: 205-209

- Hofreuter, D.**, Odenbreit, S., Haas, R. (2001) Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 41: 379-391
- Höltje, J.V.**, Mirelman, D., Sharon, N., Schwarz, U. (1975) Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 124: 1067-1076
- Homann, H.E.**, Willenbrink, W., Buchholz, C.J., Neubert, W.J. (1991) Sendai virus protein-protein interactions studied by a protein-blotting protein-overlay technique: mapping of domains on NP protein required for binding to P protein. *J. Virol.* 65: 1304-1309
- Hormaeche, I.**, Alkorta, I., Moro, F., Valpuesta, J.M., Goni, F.M., de la Cruz, F. (2002) Purification and properties of TrwB, a hexameric, ATP-binding integral membrane protein essential for R388 plasmid conjugation. *J. Biol. Chem.* 277: 464546-46462
- Howard, E.A.**, Zupan, J.R., Citovsky, V., Zambryski, P. (1992) The VirD2 protein of *A. tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. *Cell* 68: 109-118
- Hooykaas, P.J.J.**, Beijersbergen, A.G.M. (1994) The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 157-179
- Ishida, Y.**, Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T., Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays L.*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat. Biotechnol.* 14: 745-750
- Jackson, M.W.**, Day, J.B., Plano, G.V. (1998) YscB of *Yersinia pestis* functions as a specific chaperone for YopN. *J. Bacteriol.* 180: 4912-4921
- Jakubowski, S.J.**, Krishnamoorthy, V., Christie, P.J. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 protein participates in formation of VirB7 and VirB9 complexes required for type IV secretion. *J. Bacteriol.* 185: 2867-2878
- Jarchow, E.**, Grimsley, N.H., Hohn, B. (1991) *virF*, the host-range-determining virulence gene of *Agrobacterium tumefaciens*, affects T-DNA transfer to *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10426-10430
- Jin, S.**, Roitsch, T., Ankenbauer, R.G., Gordon, M.P., Nester, E.W. (1990 a) The VirA Protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for *vir* gene regulation. *J. Bacteriol.* 172: 525-530
- Jin, S.G.**, Prusti, R.K., Roitsch, T., Ankenbauer, R.G., Nester, E.W. (1990 b) Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. *J. Bacteriol.* 172: 4945-4950
- Jin, S.**, Roitsch, T., Christie, P.J., Nester, E.W. (1990 c) The regulatory VirG protein specifically binds to a *cis*-acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. *J. Bacteriol.* 172: 531-537
- John, M.C.**, Amasino, R.M. (1988) Expression of an Ti plasmid gene involved in cytokinin biosynthesis is regulated by virulence loci and induced by plant phenolic compounds. *J. Bacteriol.* 170: 790-795
- Jones, A.L.**, Shirasu, K., Kado, C.I. (1994) The product of the *virB4* gene of *Agrobacterium tumefaciens* promotes accumulation of VirB3 protein. *J. Bacteriol.* 176: 5255-5261

- Jones, A.L.**, Lai, E.M., Shirasu, K., Kado, C.I. (1996) VirB2 is a processed pilin-like protein encoded by the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J. Bacteriol.* 178: 5706-5711
- Kalogeraki, V.S.**, Winans, S.C. (1998) Wound-released chemical signals may elicit multiple responses from an *Agrobacterium tumefaciens* strain containing an octopine-type Ti plasmid. *J. Bacteriol.* 180: 5660-5667
- Krall, L.** (1999) Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, LMU München.
- Krall, L.**, Wiedemann, U., Unsin, G., Weiss, S., Domke, N., Baron, C. (2002 a) Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11405-11410
- Krall, L.**, Raschke, M., Zenk, M.H., Baron, C. (2002 b) The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl-diphosphate and AMP. *FEBS Lett.* 527: 315-318
- Krause, S.**, Pansegrau, W., Lurz, R., de la Cruz, F., Lanka, E. (2000) Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *J. Bacteriol.* 182: 2761-2770
- Kromayer, M.**, Wilting, R., Tormay, P. und Böck, A. (1996) Domain structure of the prokaryotic selenocystein-specific elongation factor SelB. *J. Mol. Biol.* 262: 413-420
- Kuldau, G.A.**, de Vos, G., Owen, J., McCaffrey, G., Zambryski, P.C. (1990) The *virB* operon of *Agrobacterium tumefaciens* pTiC58 encodes 11 open reading frames. *Mol. Gen. Genet.* 221: 256-266
- Kumar, R.B.**, Xie, Y.H., Das, A. (2000) Subcellular localization of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore proteins: VirB8 is essential for the assembly of the transport pore. *Mol. Microbiol.* 36: 608-617
- Kumar, R.B.**, Das, A. (2001) Functional analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore protein VirB8. *J. Bacteriol.* 183: 3636-3641
- Kumar, R.B.**, Das, A. (2002) Polar location and functional domains of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirD4. *Mol. Microbiol.* 43: 1523-1532
- Kunik, T.**, Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C., Citovsky, V. (2001) Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 1871-1876
- Kyte, J.**, Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132
- Lai, E.M.**, Kado, C.I. (2000 a) The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends Microbiol.* 8: 361-369
- Lai, E.M.**, Chesnokova, O., Banta, L.M., Kado, C.I. (2000 b) Genetic and environmental factors affecting T-pilin export and T-Pilus biogenesis in relation to flagellation of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 182: 3705-3716
- Lai, E.M.**, Kado, C.I. (1998) Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 180: 2711-2717

- Lai, E.M.**, Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lanka, E., Kado, C.I. (2002) Biogenesis of T pili in *Agrobacterium tumefaciens* requires precise VirB2 propilin cleavage and cyclization. *J. Bacteriol.* 184: 327-330
- Lämmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lawley, T.D.**, Gilmour, M.W., Gunton, J.E., Standeven, L.J., Taylor, D.E. (2002) Functional and mutational analysis of conjugative transfer region 1 (Tra1) from the IncHI1 plasmid R27. *J. Bacteriol.* 184: 2173-2180
- Lessl, M.**, Balzer, W., Pansegrau, W., Lanka, E. (1992 a) Sequence similarities between the RP4 Tra2 and the Ti VirB region strongly support the conjugation model for T-DNA transfer. *J. Biol. Chem.* 267: 20471-20480
- Lessl, M.**, Pansegrau, W., Lanka, E. (1992 b) Relationship of DNA-transfer-systems: essential transfer factors of plasmids RP4, Ti and F share common sequences. *Nucleic Acids Res.* 20:6099-6100
- Lessl, M.**, Lanka, E. (1994) Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* 77: 321-324
- 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: 3437-3445
- Llosa, M.**, Zunzunegui, S., de la Cruz, F. (2003) Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10465-10470
- Machón, C.**, Rivas, S., Albert, A., Goni, F.M., de la Cruz, F. (2002). TrwD, the hexameric traffic ATPase encoded by Plasmid R388 induces membrane destabilization and hemifusion of lipid vesicles. *J. Bacteriol.* 184: 1661-1668
- Matthyse, A.G.** (1987) Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium*. *J. Bacteriol.* 169: 313-323
- Mayerhofer, R.**, Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Cramer, A., Angelis, K., Redei, G.P., Schell, J., Hohn, B., Koncz, C. (1991) T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO J.* 10: 697-704
- Melchers, L.S.**, Maroney, M.J., den Dulk-Ras, A., Thompson, D.V., van Vuuren, H.A., Schilperoort, R.A., Hooykaas, P.J. (1990) Octopine and nopaline strains of *Agrobacterium tumefaciens* differ in virulence; molecular characterization of the *virF* locus. *Plant Mol. Biol.* 14: 249-259
- Miller, J. H.** (1972). Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Miranda, A.**, Janssen, G., Hodges, E., Peralta, E.G., Ream, W. (1992) *Agrobacterium tumefaciens* transfers extremely long T-DNAs by a unidirectional mechanism. *J. Bacteriol.* 174: 2288-2297
- Moncalian, G.**, Cabezon, E., Alkorta, I., Valle, M., Moro, F., Valpuesta, J.M. (1999) Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the coupling protein essential in plasmid R388 conjugation. *J. Biol. Chem.* 274: 36117-36124

- 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: 7321-7326
- Mysore, K.S.**, Bassuner, B., Deng, X.B., Darbinian, N.S., Motchoulski, A., Ream, W. Gelvin, S.B. (1998) Role for the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 protein in T-DNA transfer and integration. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 668-683
- O'Callaghan, D.**, Cazevielle, C., Allardet-Servent, A., Boschiroli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., Ramuz, M. (1999) A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.* 33: 1210-1220
- Ochman, H.**, Jones, I.B. (2000) Evolutionary dynamics of full genome content in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 19: 6637-6643
- Odenbreit, S.**, Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., Haas, R. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287: 1497-1500
- Otten, L.**, De Greve, H., Leemans, J., Hain, R., Hooykaas, P., Schell, J. (1984) Restoration of virulence of *vir* region mutants of *Agrobacterium tumefaciens* strain B6S3 by coinfection with normal and mutant *Agrobacterium* strains. *Mol. Gen. Genet.* 195: 159-163
- Pansegrau, W.**, Ziegelin, G., Lanka, E. (1990) Covalent association of the *traI* gene product of plasmid RP4 with the 5'-terminal nucleotide at the relaxation nick site. *J. Biol. Chem.* 265: 10637-10644
- Pansegrau, W.**, Schoumacher, F., Hohn, B., Lanka, E. (1993) Site-specific cleavage and joining of single-stranded DNA by VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids: Analogy to bacterial conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11538-11542
- Peralta, E.G.**, Ream, L.W. (1985) T-DNA border sequences required for crown gall tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5112-5116
- Pohlman, R.F.**, Genetti, H.D., Winans, S.C. (1994) Common ancestry between IncN conjugal transfer genes and macromolecular export systems of plant and animal pathogens. *Mol. Microbiol.* 14: 655-668
- Potrykus, I.** (2001) Golden rice and beyond. *Plant Physiol.* 125: 1157-1161
- Powell, G.K.**, Hommes, N.G., Kuo, J., Castle, L.A., Morris, R.O. (1988) Inducible expression of cytokinin biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens* by plant phenolics. *Mol. Plant. Microb. Interact.* 6: 235-242
- Raney, K.D.**, Benkovic, S.J. (1995) Bacteriophage T7 DNA helicase translocates in an unidirectional fashion on single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* 270: 22236-22242
- Rashkova, S.**, Spudich, G.M., Christie, P.J. (1997) Characterization of membrane and protein interaction determinants of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 ATPase. *J. Bacteriol.* 179: 583-591
- Regier, D.A.**, Morris, R.O. (1982) Secretion of *trans*-zeatin by *Agrobacterium tumefaciens*: a function determined by the nopaline Ti plasmid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104: 1560-1566

- Relic, B.**, Andjelkovic, M., Rossi, L., Nagamine, Y., Hohn, B. (1998) Interaction of the DNA modifying proteins VirD1 and VirD2 of *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of subcellular localization in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9105-9110
- Richter, G.** (1996) „Biochemie der Pflanzen“, Thieme Verlag
- Rohdich, F.**, Kis, K., Bacher, A., Eisenreich, W. (2001) The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5: 535-540
- Ruvola, P.P.**, Keating, K.M., Williams, K.R., Chase, J.W. (1991) Single-stranded DNA-binding proteins (SSBs) from prokaryotic transmissible plasmids. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 9: 120-134
- Sagulenko, V.**, Sagulenko, E., Jakubowski, S., Spudich, E., Christie, P.J. (2001 a) VirB7 lipoprotein is exocellular and associates with the *Agrobacterium tumefaciens* T pilus. *J. Bacteriol.* 183: 3642-3651
- Sagulenko, E.**, Sagulenko, V., Chen, J., Christie, P.J. (2001 b) Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. *J. Bacteriol.* 183: 5813-5825
- Salmond, G.P.C.** (1994) Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 181-200
- Sanger, F.**, Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Sauer, F.G.**, Barnhart, M., Choudhury, D., Knight, S.D., Waksman, G., Hultgren, S.J. (2000) Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 548-556
- Savvides, S.N.**, Yeo, H.-J., Beck, M.R., Blaesing, F., Lurz, R., Lanka, E., Buhrdorf, R., Fischer, W., Haas, R., Waksman, G. (2003) VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion *EMBO* 22: 1-12
- Schägger, H.**, von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379
- Schägger, H.**, von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for the isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199: 223-231
- Schägger, H.**, Cramer, W., von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217: 220-230
- Scheiffele, P.**, Pansegrau, W., Lanka, E. (1995) Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA processing. Purified VirD1 and VirD2 catalyze site- and strand-specific cleavage of superhelical T-border DNA in vitro. *J. Biol. Chem.* 270: 1269-1276
- Schmidt-Eisenlohr, H.**, Domke, N., Baron, C. (1999 a) TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high-molecular-weight structures in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 5563-5571
- Schmidt-Eisenlohr, H.**, Domke, N., Angerer, C., Wanner, G., Zambryski, P.C., Baron, C. (1999 b) Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 181:7485-7492

- Schmidt-Eisenlohr, H.**, Rittig, H., Preithner, S., Baron, C. (2001) Biomonitoring of pJP4-carrying *Pseudomonas chlororaphis* with Trb protein-specific antisera. *Environ. Microbiol.* 3: 720-730
- Schmiederer, M.**, Anderson, B. (2000) Cloning, sequencing, and expression of three *Bartonella henselae* genes homologous to the *Agrobacterium tumefaciens* VirB region. *DNA Cell Biol.* 19: 141-147
- Schmiederer, M.**, Arcenas, R., Widen, R., Valkov, N., Anderson, B. (2001) Intracellular induction of the *Bartonella henselae* virB Operon by human endothelial cells. *Infect. Immun.* 69: 6495-6502
- Schrammeijer, B.**, Dulk-Ras, A., Vergunst, A., Jácome, E.J., Hooykaas, P.J. (2003) Analysis of Vir protein translocation from *Agrobacterium tumefaciens* using *Saccharomyces cerevisiae* as a model: evidence for transport of a novel effector protein VirE3. *Nucleic Acids Res.* 31:860-969
- Schrammeijer, B.**, Risseeuw, E., Pansegrau, W., Regensburg-Tuink, T.J., Crosby, W.L., Hooykaas, P.J. (2001) Interaction of the virulence protein VirF of *Agrobacterium tumefaciens* with plant homologs of the yeast Skp1 protein. *Curr. Biol.* 11: 258-262
- Schroder, G.**, Krause, S., Zechner, E.L., Traxler, B., Yeo, H.J., Lurz, R. (2002) TraG-like proteins of DNA transfer systems and the *Helicobacter pylori* type IV secretion system: inner membrane gate for exported substrates? *J. Bacteriol.* 184: 2767-2779
- Segal, G.**, Purcell, M., Shuman, H.A. (1998) Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1669-1674
- Shimoda, N.**, Toyoda-Yamamoto, A., Nagamine, J., Usami, S., Katayama, M., Sakagami, Y., Machida, Y. (1990) Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6684-6688
- Shirasu, K.**, Kado, C.I. (1993) Membrane localization of the Ti plasmid proteins involved in biogenesis of a pilin-like conjugative structure on *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 111: 287-294
- Shirasu, K.**, Koukolikova-Nicola, Z., Hohn, B., Kado, C.I. (1994) An inner-membrane-associated virulence protein essential for T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants exhibits ATPase activity and similarities to conjugative transfer genes. *Mol. Microbiol.* 11: 581-588.
- Singleton, M.R.**, Sawaya, M.R., Ellenberger, T., Wigley, D.B. (2000) Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides. *Cell*: 101: 589-600
- Skowyra, D.**, Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., Harper, J.W. (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91: 209-219
- Smith, E.F.**, Townsend, C.O. (1907) A plant tumor of bacterial origin. *Science* 25: 671-673
- Spudich, G.M.**, Fernandez, D., Zhou, X.R., Christie, P.J. (1996) Intermolecular disulfide bonds stabilize VirB7 homodimers and VirB7/VirB9 heterodimers during biogenesis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7512-7515
- Stachel, S.E.**, Messens, E., Van Montagu, M., Zambryski, P.C. (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cell that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624-629

- Stachel, S.E.,** Zambryski, P.C. (1986 a) *virA* and *virG* control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *Agrobacterium tumefaciens*. *Cell* 46: 325-333
- Stachel, S.E.,** Timmerman, B., Zambryski, P. (1986 b) Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature* 322: 706-712
- Stachel, S.E.,** Zambryski, P.C. (1986 c) *Agrobacterium tumefaciens* and the susceptible plant cell: a novel adaptation of extracellular recognition and DNA conjugation. *Cell* 47: 155-157
- Stachel, S.E.,** Zambryski, P.C. (1989) Generic trans-kingdom sex? *Nature* 340: 190-191
- Sundberg, C.D.,** Meek, L., Carroll, K., Das, A., Ream, W. (1996) VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J. Bacteriol.* 178: 1207-1212
- Sundberg, C.,** Ream, W. (1999) The *Agrobacterium tumefaciens* chaperone-like protein, VirE1, interacts with VirE2 at domains required for single-stranded DNA binding and cooperative interaction. *J. Bacteriol.* 181: 6850-6855
- Thompson, D.V.,** Melchers, L.S., Idler, K.B., Schilperoort, R.A., Hooykaas, P.J. (1988) Analysis of the complete nucleotide sequence of the *Agrobacterium tumefaciens virB* operon. *Nucleic Acids Res.* 16: 4621-4636
- Thorstenson, Y.R.,** Zambryski, P.C. (1994) The essential virulence protein VirB8 localizes to the inner membrane of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 176: 1711-1717
- Tinland, B.,** Hohn, B. (1995) Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. *Genet. Eng.* 17: 209-229
- Toro, N.,** Datta, A., Carmi, O.A., Young, C., Prusti, R.K., Nester, E.W. (1989) The *Agrobacterium tumefaciens virC1* gene product binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer. *J. Bacteriol.* 171: 6845-6849
- Tzfira, T.,** Vaidya, M., Citovsky, V. (2001) VIP1, an Arabidopsis protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. *EMBO J.* 20:3596-3607
- Van Criekinge, W.,** Beyaert, R. (1999) Yeast Two-Hybrid: State of the art. *Biol. Proc. Online* 2: 1-38
- Van Larebeke, N.,** Engler, G., Holsters, M., van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A., Schell, J. (1974) Large plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252: 169-170
- Vergunst, A.C.,** Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., de Vlaam, C.M.T., Regensburg-Tuink, T.J., Hooykaas, P.J.J. (2000) VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* 290: 979-982
- Vogel, J.P.,** Andrews, H.L., Wong, S.K., Isberg, R.R. (1998) Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* 279: 873-876
- Wang, K.,** Stachel, S.E., Timmerman, B., Van Montagu, M., Zambryski, P.C. (1987) Site-specific nick occurs within the 25 bp transfer promoting border sequence following induction of *vir* gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* 235: 587-591

- Ward, J.E.**, Dale, E.M., Nester, E.W., Binns, A.N. (1990) Identification of a VirB10 aggregate in the inner membrane of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 172: 5200-5210
- Ward, E.R.**, Barnes, W.M. (1988) VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T-strand DNA. *Science* 242: 927-930
- 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: 11493-11500
- Waters, V.L.**, Hirata, K.H., Pansegrau, W., Lanka, E., Guiney, D.G. (1991) Sequence identity in the nick regions of IncP plasmid transfer origins and T-DNA borders of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1456-1460
- Waters, V.L.** (1999) Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Front. Biosci.* 4: D433-D456
- Waters, V.L.** (2001) Conjugation between bacterial and mammalian cells. *Nat. Genet.* 29: 375-376
- Weiss, A.A.**, Johnson, F.D., Burns, D.L. (1993) Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2970-2974
- White, P.R.**, Braun, A.C. (1942) A cancerous neoplasm of plants: autonomous bacteria-free crown gall tissue. *Cancer Res.* 2: 597-617
- Wiedemann, U.** (2000) Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, LMU München.
- Winans, S.C.**, Kerstetter, R.A., Nester, E.W. (1988) Transcriptional regulation of the *virA* and *virG* genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 170: 4047-4054
- Winans, S.C.** (1992) Two-way chemical signalling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Rev.* 56: 12-31
- Winans, S.C.**, Burns, D.L., Christie, P.J. (1996) Adaptation of conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol.* 4: 64-68
- Wood, D.W. et al.** (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2317-2323
- Yanisch-Perron, C.**, Vieira, J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC18 vectors. *Gene* 33: 103-119
- 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: 471-477
- Yeo, H.J.**, Yuan, Q., Beck, M.R., Baron, C., Waksman, G. (2003) Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM1010. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15947-15952
- Yu, X.**, Hingorani, M.M., Patel, S.S., Engelman, E.H. (1996) DNA is bound within the central hole to one or two of the six subunits of the T7 helicase. *Nature Struct. Biol.* 3: 740-743
- Zaenen, I.**, Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M., Schell, J. and S. (1974) Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* 86: 109-127

- Zhao, Z.**, Sagulenko, E., Ding, Z., Christie, P.J. (2001) Activities of *virE1* and the VirE1 secretion chaperone in export of the multifunctional VirE2 effector via an *Agrobacterium* type IV secretion pathway. *J. Bacteriol.* 183: 3885-3865
- Zhou, X.**, Christie, P.J. (1999) Mutagenesis of the *Agrobacterium* VirE2 single-stranded DNA-binding protein identifies regions required for self-association and interaction with VirE1 and a permissive site for hybrid protein construction. *J. Bacteriol.* 181: 4342-4352
- Zhu, J.**, Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J.J., Farrand, S.K., Winans, S.C. (2000) Minireview: The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.* 182: 3885-3895
- Ziemienowicz, A.**, Merkle, T., Schoumacher, F., Hohn, B., Rossi, L. (2001) Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins. *Plant Cell* 13: 369-383
- Ziemienowicz, A.** (2001) Odyssey of *Agrobacterium* T-DNA. *Acta. Biochim. Polonica* 48: 623-635
- Zupan, J.R.**, Citovsky, V., Zambryski, P. (1996) *Agrobacterium* VirE2 protein mediates nuclear uptake of single-stranded DNA in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2392-2397
- Zupan, J.**, Muth, T.R., Draper, O., Zambryski, P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* 23: 11-28

meinen Dank...

Herrn Dr. Christian Baron für die intensive fachliche Betreuung dieser Doktorarbeit, für Ideen und Anregungen, Freiheiten und Förderung und das in mich gesetzte Vertrauen.

Herrn Prof. August Böck für eine gute Ausbildung und die Integration der nach Umzug der Ag. Baron nach Kanada in München verbliebenen Doktoranden in seine Arbeitsgruppe.

Herrn Dr. Friedrich Lottspeich (MPI, Martinsried) für die N-terminale Sequenzierung des isolierten Tzs-Proteins.

Herrn Prof. Dr. Meinhard H. Zenk (Universität Halle) für die fruchtbare Kooperation und die Analyse der enzymatischen Aktivität von Tzs.

Frau Dr. Annette C. Vergunst (Universität Leiden) für die Untersuchung des Transfers von Tzs in Pflanzen- und Hefezellen.

Herrn Dr. David O`Callaghan (INSERM, Nîmes) für die herzliche Aufnahme in sein Labor.

Den netten Herren der Werkstatt für`s Reparieren.

Herrn Haid für seine geduldige Hilfe in Computer-Notfällen.

Frau Lüben, Frau Silvestre und Frau Meister für kompetenten Beistand in allen administrativen Angelegenheiten.

„Meinen“ Diplomanden/innen Urs, Gabi, Sabine und Hanna für die gute Zusammenarbeit, für überraschende Fragen, heitere Stunden ...und Süßigkeiten. Sowie allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Labors und Institutes für eine unvergessliche Zeit.

Meinen Freunden für eine langjährige und treue Freundschaft.

Meiner Familie für Liebe und Unterstützung.

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Lilian Sylvia Krall
Geburtstag: 14. Januar 1973
Geburtsort: München
Familienstand: ledig
Eltern: Dittmar Krall, Dipl. Ing. Elektrotechnik
Edith Krall, geb. Sturm, Fremdsprachensekretärin

Ausbildung:

1979 – 1983 Grundschule in Wolfratshausen
1984 – 1992 Gymnasium Icking, Abitur.
1992 – 1999 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München, Diplom.
1995 – 1996 Integriertes Auslandsstudium, Universidad de Concepción, Chile (DAAD-Stipendium).
1999 – 2004 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der LMU München, unter Leitung von Privatdozent Dr. Christian Baron.
November 2000 Forschungsaufenthalt im Labor von Dr. David O`Callaghan, INSERM, Nîmes, Frankreich.