

**Analyse von Protein-Protein-Interaktionen
der potentiellen Piluskomponente VirB5
des Typ IV Sekretionssystems von *Brucella suis***

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

vorgelegt von

Anna Carle

München

im Februar 2005

1. Gutachter: PD Dr. C. Baron
2. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck

Tag der mündlichen Prüfung: 22.März 2005

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1. Typ IV-Sekretionssysteme – adaptierte Konjugationssysteme	1
2. Das Typ IV-Sekretionssystem des Modellorganismus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3
2.1. Der Gentransfer aus <i>A. tumefaciens</i> in Pflanzenzellen	3
2.2. Assemblierung und Struktur des T4SS von <i>A. tumefaciens</i>	3
3. Überblick über Typ IV-Sekretionssysteme weiterer pathogener Organismen	6
4. Tier- und humanpathogene Bakterien der Gattung <i>Brucella</i> ssp.	8
4.1. Vorkommen und Bedeutung als Krankheitserreger	8
4.2. Das Typ IV-Sekretionssystem von <i>Brucella</i> ssp.	9
5. Die Piluskomponente VirB5 der verschiedenen Typ IV-Sekretionssysteme	11
6. Aufgabenstellung	13
Material und Methoden	14
1. Verwendete Organismen und Plasmide	14
1.1. Bakterienstämme	14
1.2. Hefestämme	14
1.3. Plasmide	15
2. Puffer, Nährmedien und Supplemente	18
2.1. Puffer	18
2.2. Nährmedien	18
2.3. Supplemente und Antibiotika	19
3. Anzucht von Organismen	19
3.1. Bestimmung der optischen Dichte	19
3.2. Anzucht und Induktion von <i>A. tumefaciens</i>	19
3.3. Anzucht von <i>E. coli</i>	19
3.4. Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	20
4. Physiologische Methoden	20
4.1. Test auf β -Galaktosidaseaktivität	20
5. Molekularbiologische Methoden	21
5.1. Liste der Oligonukleotide	21
5.2. Isolierung von Nukleinsäuren	22
5.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA	22

5.2.2.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegeln	23
5.3.	Enzymatische Modifikation von DNA	23
5.4.	Polymerase-Kettenreaktion	23
5.4.1.	Direkte PCR	23
5.4.2.	Gerichtete Mutagenese durch inverse PCR	23
5.5.	Transformation	24
5.5.1.	Transformation von Bakterienstämmen	24
5.5.2.	Transformation von Hefe	24
5.6.	Sequenzierung von DNA	24
6.	Elektrophoretische Methoden	24
6.1.	Elektrophorese von DNA in Agarosegeln	24
6.2.	Elektrophorese von Proteinen	24
6.2.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
6.2.2.	Blaue native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)	25
7.	Präparative Methoden	25
7.1.	Isolierung von exponierten Strukturen auf der Zelloberfläche	25
7.2.	Isolierung von Membranen	26
7.3.	Solubilisierung von Membranproteinen	26
8.	Proteinbiochemische und proteinanalytische Methoden	26
8.1.	Überproduktion und Aufreinigung von Fusionsproteinen	26
8.2.	Konzentrierung und Dialyse gereinigter Proteine	27
8.3.	Fällung von Proteinen	27
8.4.	Bestimmung der Proteinkonzentration	27
8.5.	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen	28
8.5.1.	Quervernetzungsversuche (<i>crosslinking</i>)	28
8.5.2.	Koelution mittels Gelfiltrations-Chromatographie	28
8.5.3.	Ko-Adsorption mit StrepTactin-Sepharose	29
8.5.4.	Überlagerung von Peptidmembranen	29
8.5.5.	Kompetitiver Peptid-Bindetest	29
8.5.6.	Hefe Zwei-Hybrid-System	30
9.	Chromatographische Methoden	30
9.1.	Affinitäts-Chromatographie	30
9.2.	Anionenaustausch-Chromatographie	31
9.3.	Gelfiltrations-Chromatographie	31

10. Immunologische Methoden	32
10.1. Herstellung polyklonaler Antiseren	32
10.2. Immunoblot-Analysen (<i>Western Blot</i>)	32
11. Daten- und Bildverarbeitung	32
Ergebnisse	33
1. Analyse der Interaktionen von VirB5 <i>in vitro</i>	33
1.1. Aufreinigung der Virulenzproteine	33
1.1.1. Aufreinigung als StrepII-Fusionsproteine	34
1.1.2. Aufreinigung als His ₆ Trx-Fusionsprotein	35
1.2. Analyse der Ausbildung von Oligomeren	36
1.2.1. Quervernetzung von VirB-Proteinen mit Formaldehyd	37
1.2.2. Analyse mittels Gelfiltrations-Chromatographie	38
1.3. Analyse von Interaktionen mittels Gelfiltrations-Chromatographie	39
1.4. Analyse von Interaktionen durch Ko-Adsorption	40
1.5. Analyse von Interaktionen mittels des Zwei-Hybrid-Systems	43
1.5.1. Konstruktion der Expressionsvektoren	44
1.5.2. Detektion von Interaktionen mittels GAL4-abhängiger Reportergene	45
1.5.3. Quantitative β -Galaktosidase-Messung	47
1.6. Struktur-Funktionsanalyse von StrepII-VirB5	48
1.6.1. Konstruktion der Expressionsvektoren und Reinigung der VirB5-Varianten	50
1.6.2. Analyse der VirB5-Varianten mittels Ko-Adsorption	51
1.6.3. Analyse der veränderten VirB5-Proteine mittels Quervernetzung	51
1.7. Identifizierung der VirB5-Interaktionen mit Peptidmembranen	56
1.8. Konkurrenz der Interaktionen mit Peptiden	62
1.9. Lokalisierung der VirB8/VirB10-Bindestellen in VirB5 mit Hilfe der Struktur des ähnlichen Proteins TraC	66
2. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen <i>in vivo</i>	70
2.1. Heterologe Expression des <i>B. suis virB</i> -Operons in <i>A. tumefaciens</i>	70
2.2. Identifizierung oberflächen-exponierter Proteine in pTrc- <i>virBsuis</i> -tragenden <i>A. tumefaciens</i>	73
2.3. Analyse von <i>B. suis</i> VirB-Protein-Interaktionen in <i>A. tumefaciens</i> mittels Quervernetzung	74
2.4. Lokalisierung der Virulenzproteine von <i>B. suis</i> in <i>A. tumefaciens</i>	77
2.5. Solubilisierung der <i>B. suis</i> -VirB-Proteine aus <i>A. tumefaciens</i> mit n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	79

2.6. Auftrennung der DDM-solubilisierten Proteine mittels blauer nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese	81
2.7. Auftrennung der DDM-solubilisierten Proteine mittels Gelfiltrations-Chromatographie	84
3. Identifizierung möglicher zellulärer Interaktionspartner von VirB5 aus <i>B. suis</i> mittels <i>screening</i> einer HeLa cDNA-Bibliothek	86
3.1. Verwendung einer HeLa cDNA-Bibliothek zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen	87
3.2. Selektion der Interaktionspartner exprimierenden Hefestämme	87
3.3. Analyse der isolierten Klone durch Sequenzierung der entsprechenden cDNA	89
Diskussion	93
1. Analyse der VirB5-Interaktionen	93
1.1. Bestätigung der Interaktion von VirB5 mit VirB8 und VirB10	93
1.2. Lokalisierung der VirB8/VirB10-Bindestellen in VirB5	94
1.3. Überlegungen zu den VirB5-Interaktionen	96
2. Heterologe Expression des <i>virB</i>-Operons von <i>B. suis</i> in <i>A. tumefaciens</i>	98
2.1. Expression der <i>virB</i> -Gene in <i>A. tumefaciens</i>	98
2.2. Lokalisierung und Solubilisierung der VirB-Proteine	99
2.3. Identifizierung von T4SS-Subkomplexen von <i>B. suis</i> in den Membranen von <i>A. tumefaciens</i>	100
2.4. Funktionalität des T4SS von <i>B. suis</i> in <i>A. tumefaciens</i>	102
3. Isolierung zellulärer Interaktionspartner des VirB5-Proteins und ihre Bedeutung für den Infektionsprozess von <i>B. suis</i>	103
3.1. Die Rolle des VirB-Systems für das intrazelluläre Überleben von <i>Brucella</i> ssp.	102
3.2. Mögliche Interaktionspartner von VirB5 in der Zelle und ihre Bedeutung für den Infektionsprozess	104
3.2.1. Der Arp2/3-Komplex	104
3.2.2. Die Protease Calpain 1	107
Zusammenfassung	109
Literaturverzeichnis	111

Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildungen
ACA	ϵ -Amino-n-capronsäure
As	Aminosäure
AS	Acetosyringon
ATP	Adenosintriphosphat
Bis-Tris	2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
BN-PAGE	blaue native Polyacrylamid-Gelelektrophorese
bp	Basenpaare
BS ³	Bis (sulfosuccinimidyl) suberat
BSA	Rinder-Serumalbumin („bovine serum albumin“)
Carb ^r	Resistenz gegen Carbenicillin
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Disuccinimidyl Suberat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erm ^r	Resistenz gegen Erythromycin
FA	Formaldehyd
His ₆ -/H ₆ -	Hexahistidyl-
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktosid
Kan	Resistenz gegen Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Molar
MES	Morpholinethansulfonsäure
OD _x	Optische Dichte bei x nm
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
psi	„pounds per square inch“
PDVF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp ^r	Resistenz gegen Spectinomycin
Str ^r	Resistenz gegen Streptomycin
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
Tris	<i>N,N,N</i> -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

Einleitung

1. Typ IV-Sekretionssysteme – adaptierte Konjugationssysteme

Bakterielle Krankheitserreger von Menschen, Tieren und Pflanzen haben eine große Anzahl von Strategien entwickelt, um eukaryontische Zellen zu infizieren. Dabei hängt die Kolonisation eines Wirts oftmals von der Sekretion von Enzymen, Toxinen und anderen Virulenzfaktoren ab. Bei Gram-negativen Bakterien müssen diese Makromoleküle dabei sowohl über die innere und äußere Membran, als auch über die dazwischen liegende Peptidoglykanschicht transportiert werden. Im Gegensatz zu dem Export über die Zytoplasmamembran, der meist durch das Sec-System (*general secretory pathway*, GSP) bewerkstelligt wird, haben sich für den Transfer durch die gesamte Zellhülle verschiedene Sekretionsmaschinerien entwickelt. Einige der Sekretionssysteme bilden Oberflächenstrukturen aus, die Makromoleküle direkt in die Wirtszelle translozieren. Die gut untersuchten Typ III-Sekretionssysteme injizieren in einem von Zellkontakt abhängigen Mechanismus bakterielle Effektorproteine direkt in das Zytoplasma eukaryontischer Zellen. Die Substrate werden generell Sec-unabhängig direkt aus dem Zytoplasma sekretiert (Hueck, 1998). Im Gegensatz dazu können manche Typ IV-Sekretionssysteme (T4SS) Makromoleküle auch in den extrazellulären Raum freisetzen. Ferner können Typ IV-Substrate sowohl aus dem Zytoplasma, der inneren Membran oder dem Periplasma transferiert werden (Nagai und Roy, 2003).

Typ IV-Sekretionssysteme werden auch als adaptierte Konjugations-Systeme bezeichnet (Winans *et al.*, 1996). Bakterielle Konjugation ermöglicht den Transfer von Plasmid-DNA von einer Bakterienzelle zur anderen. Dieser horizontale Gentransfer ist ein natürlicher Prozess bei vielen Prokaryonten, der genetische Diversität ermöglicht, was Mikroorganismen die Adaption an verschiedene Umweltsituationen erleichtert und somit das Überleben sichert. In den Blickpunkt gerückt ist der Prozess der Konjugation besonders auf Grund seiner Bedeutung bei der Verbreitung von Plasmiden, die Resistenzgene gegen Antibiotika tragen, was in den letzten Jahrzehnten zu einem rasanten Anstieg mehrfach-resistenter pathogener Organismen geführt hat (Walsh, 2003). Die Übertragung genetischen Materials erfordert direkten Zell-Zell-Kontakt, was durch die Ausbildung eines konjugations-spezifischen

Multiprotein-Komplexes ermöglicht wird, der beide Membranen des Bakteriums durchspannt (Christie, 1997). Vergleiche des konjugativen Transfersystems (Tra) des IncN-Plasmids pKM101 aus *E. coli* mit Komponenten makromolekularer Komplexe der pathogenen Organismen *Agrobacterium tumefaciens* (VirB-System) und *Bordetella pertussis* (Ptl-System) ergaben ein hohes Maß an Ähnlichkeiten der Sequenzen (Abb. 1). Basierend auf dieser Entdeckung definiert man T4SS inzwischen als makromolekulare Transfersysteme, deren Komponenten in der Sequenz und vermutlich auch in der Struktur Ähnlichkeiten zu denen konjugativer Transfermaschinen aufweisen (Weiss *et al.*, 1993; Winans *et al.*, 1996).

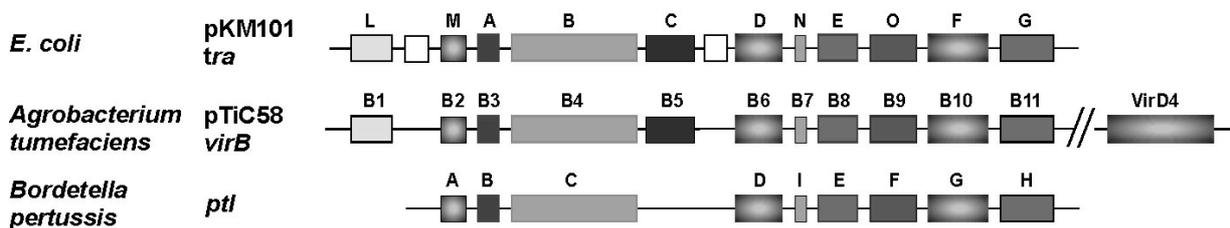


Abbildung 1: Vergleich des *tra*-operons von pKM101, des *virB*-Operons von *Agrobacterium tumefaciens* und der *ptl*-Region von *Bordetella pertussis*. Alle drei Systeme gehören zur Familie der Typ IV-Transporter und sind in bakterielle Konjugation, Transfer von DNA bzw. die Sekretion von Virulenzfaktoren involviert. Gene die ähnliche Proteine kodieren sind in der selben Schattierung markiert.

In den letzten Jahren wurde in der Gruppe der Proteobakterien eine große Anzahl Bakterien identifiziert, die T4SS nutzen, um sich das Überleben in den unterschiedlichsten ökologischen Nischen zu sichern (siehe auch Tabelle 1). Dabei ist sowohl die Variabilität der sekretierten Substrate als auch die Diversität der Zielzellen (Bakterien, Pilze, Pflanzen, Tiere) immens. Das gegenwärtige Modell von Struktur und Funktion der T4SS basiert größtenteils auf Untersuchungen des pflanzenpathogenen Bakteriums *A. tumefaciens*, dessen VirB/D4-Komplex als Prototyp dieser Transporterfamilie gilt.

2. Das Typ IV-Sekretionssystem des Modellorganismus *Agrobacterium tumefaciens*

2.1. Der Gentransfer aus *A. tumefaciens* in Pflanzenzellen

A. tumefaciens ist ein Gram-negatives, fakultativ phytopathogenes Bodenbakterium. Es ist in der Lage, eine Vielzahl von Dikotyledonen zu befallen, was in den infizierten Pflanzen zu unkontrollierten Auswüchsen in Form von Tumoren und Gallen führt (Wurzelhalsgallen-Krankheit / *crown gall disease*). Im Zuge des Infektionsprozesses wird ein spezifisches DNA-Fragment (T-DNA) in die Zellen verwundeten Pflanzengewebes transferiert (Zupan *et al.*, 2000). Das T4SS und andere Virulenzfaktoren kodieren auf *vir*-Genen auf dem 200 kb großen Ti-(*tumor inducing*) Plasmid. Auf diesem befindet sich auch das 23 kb große T-DNA Fragment, welches für mehrere Onkogene kodiert. Nach dem Transfer in die Pflanzenzelle erfolgt die Integration der T-DNA in das Wirtsgenom, in dem eukaryontische Promotoren die Expression der Onkogene antreiben. Die auf der Aktivität der Onkogene beruhende Überproduktion von Pflanzenhormonen führt zu einer unbegrenzten Proliferation der Pflanzenzellen, was das typische Krankheitsbild bedingt. Darüber hinaus erfolgt die Biosynthese von Opinen, die *Agrobacterium* als präferentiell von ihm genutzte Kohlenstoff- und Stickstoffquelle dienen (Kado, 1991).

Der Prozess des T-DNA-Transfers ähnelt stark dem des konjugativen Plasmidtransfers. Die Endonuklease VirD2 setzt die T-DNA mittels Strangbruch aus dem Ti-Plasmid frei (Pansegrau *et al.*, 1993; Scheiffle *et al.*, 1995) und bleibt anschließend kovalent mit dem 5'-Ende des einzelsträngigen DNA-Fragmentes verbunden (T-Komplex). Wahrscheinlich ist VirD2 auch das Substrat, welches durch das T4SS erkannt wird. Unabhängig von der T-DNA werden auch verschiedene Virulenzproteine, z.B. VirE2, VirE3 und VirF, in das Zytoplasma der Pflanzenzelle transloziert (Dumas *et al.*, 2001; Schrammeijer *et al.*, 2001; Schrammeijer *et al.*, 2003).

2.2. Assemblierung und Struktur des T4SS von *A. tumefaciens*

Das größte der sechs *vir*-Operonen des Ti-Plasmids ist das *virB*-Operon. Es kodiert für 11 Proteine, die in dem Transfer der T-DNA involviert sind. Sie assemblieren in einen Komplex, der als Transportkanal die bakterielle Zellhülle durchspannt und einen dem Konjugationsapparat ähnlichen Pilus ausbildet (T-Pilus). Basierend auf Vorhersagen der Lokalisierung dieser Virulenzproteine in der Zelle und den Ergebnissen verschiedenster

genetischer und biochemischer Studien wurde ein Arbeitsmodell der Struktur des T4SS entwickelt (Christie, 2001; Zupan *et al.*, 2000) (Abb. 2).

Mit Ausnahme von **VirB1** sind alle VirB-Proteine (VirB2-VirB11) und zusätzlich VirD4 für den Transfer der T-DNA essentiell. Die Abwesenheit von VirB1 führt allerdings zu einer starken Reduktion der Virulenz um den Faktor 100 (Berger und Christie, 1994; Mushegian *et al.*, 1996). VirB1 wird Sec-abhängig ins Periplasma exportiert, wo ein Teil des C-Terminus, VirB1*, proteolytisch prozessiert und über die äußere Membran freigesetzt wird. VirB1* bleibt lose mit der Zelloberfläche assoziiert (Baron *et al.*, 1997a); seine Funktion ist weiterhin unklar. VirB1 weist Ähnlichkeiten zu lytischen Transglykosylasen auf. Möglicherweise bewirkt das Protein eine lokale Lyse der Peptidoglykanschicht und ermöglicht somit die Assemblierung des T4SS (Koraimann, 2003).

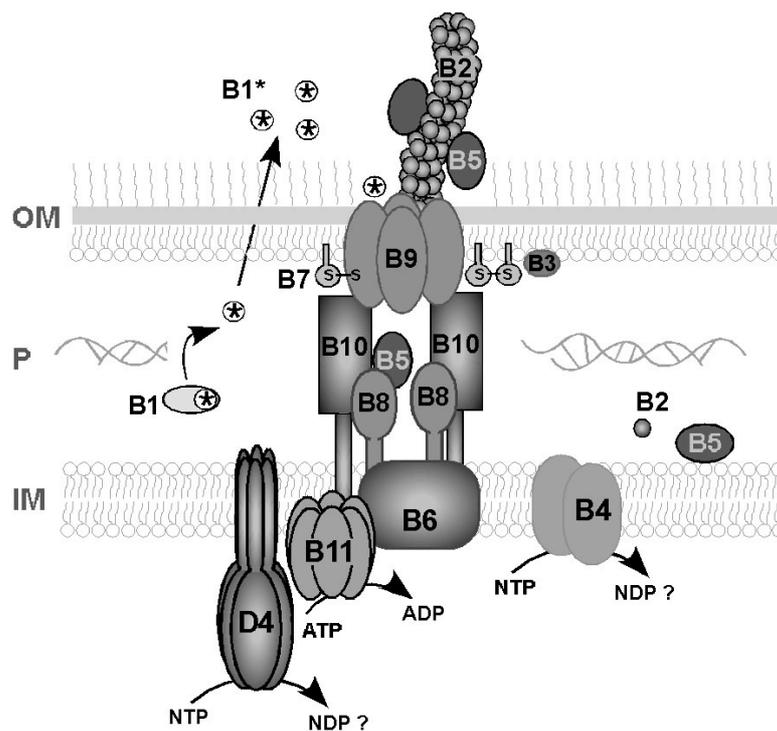


Abbildung 2: Modell des VirB/D4-Transmembrankomplexes in *A. tumefaciens*. Die Proteine mit primärer Lokalisierung in den inneren und äußeren Membranen (VirB6-VirB10) interagieren miteinander und bilden wahrscheinlich den die Membran durchspannenden Kernkomplex. Ob und wie die Substrate durch diesen potentiellen Kanal transferiert werden bedarf weiterer Untersuchungen. VirB2, VirB5 und VirB7 bilden vermutlich die auf der Oberfläche exponierte Pilusstruktur aus. Unklar ist auch die Rolle der mit dem Transporter assoziierten Komponenten VirD4, VirB4 und VirB11, die Nukleotid-bindende Walker A- und B-Motive enthalten.

Die Komponenten des VirB/D4-Komplexes lassen sich in drei Klassen einteilen, welche die Unterstrukturen des Transporters ausbilden. Die erste Klasse umfasst die **NTPasen VirD4, VirB4 und VirB11**, denen energetisierende Funktionen für die Assemblierung und/oder den Substrattransfer zugeschrieben werden. Im Fall der VirB11- und VirD4-Homologen HP0525 von *Helicobacter pylori* bzw. TrwB des Plasmids R388, wurden die Kristallstrukturen aufgeklärt (Gomis-Ruth *et al.*, 2001; Yeo *et al.*, 2000). Beide Proteine bilden vermutlich hexamere Ringe in der inneren Membran aus. VirD4/TrwB zählt zu den so genannten *coupling proteins*, denen man während des Plasmid- bzw. T-DNA Transfers eine Schlüsselrolle für die Bindung der Substrate an den Transporter zuschreibt (Atmakuri *et al.*, 2003; Llosa *et al.*, 2003). Das Protein weist ein Walker A- und B-Motiv auf und könnte durch NTP-Hydrolyse den T-DNA-Transfer katalysieren. VirB11-ähnliche ATPasen bilden eine große Proteinfamilie, die in Transportern Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien weit verbreitet ist (Cascales und Christie, 2003). HP0525 liegt als ein in seiner Struktur dynamischer homohexamerer Ring vor, der, wie auch TrwB/VirD4, einen Kanal ausbilden könnte. VirB4, das größte der VirB-Proteine, liegt ebenfalls in der Zytoplasmamembran vor und bildet Homooligomere aus. Im Fall von *A. tumefaciens* wurde gezeigt, dass die enzymatische NTPase-Aktivität des Proteins für den Substrat-Transfer benötigt wird (Dang *et al.*, 1999).

Die zweite Klasse umfasst die Proteine der inneren (**VirB6, VirB8, VirB10**) und der äußeren Membran (**VirB7, VirB9**), die zum Teil auch in das Periplasma hineinragen. Ihre funktionale Bedeutung wird dadurch offenbar, dass Homologe in fast allen T4SS identifiziert werden konnten. Darüber hinaus ist die Stabilität vieler VirB-Proteine von der Anwesenheit dieser Kernkomponenten abhängig. In den letzten Jahren wurden besonders intensiv potentielle Interaktionen zwischen den Virulenzproteinen VirB7-VirB10 untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen unterstützen die Hypothese, dass durch diese Proteine ein die Zellhülle durchspannender Kern gebildet wird (Baron *et al.*, 1997b; Beaupré *et al.*, 1997; Das und Xie, 2000). Studien von Cascales und Christie (2004), in denen Kontakte des transferierten Nukleoproteinkomplexes mit einigen dieser Komponenten nachgewiesen wurden, zeigen, dass dieser Kernkomplex auch den Substratkanal darstellen könnte. VirB6 ist ein stark hydrophobes Protein, welches in der inneren Membran lokalisiert und offensichtlich am Anfang des Transfers durch den postulierten Kanal steht (Jakubowski *et al.*, 2004). Andererseits wird für VirB6 auch eine Funktion während der Pilusassemblierung diskutiert (Hapfelmeier *et al.*, 2000; Jakubowski *et al.*, 2003).

Zur dritten Klasse der Virulenzproteine zählt man die Komponenten, die den potentiellen T-Pilus ausbilden. Als Haupt-Pilusuntereinheit gilt **VirB2**, welches Sec-abhängig in das Periplasma exportiert wird (Lai und Kado, 2000). Anschließend wird es einer weiteren Prozessierung unterzogen, die zu einem zirkulären VirB2-Pilin führt (Eisenbrandt *et al.*, 1999). Es ist unklar wie diese Pilin-Untereinheiten über die äußere Membran gelangen. **VirB5** und das Lipoprotein **VirB7** werden als pilus-assoziierte Proteine bezeichnet. Für beide wurde eine Ko-Fraktionierung mit VirB2 gezeigt (Krall *et al.*, 2002; Sagulenko *et al.*, 2001). Die Rolle des T-Pilus während des Transportprozesses ist noch unbekannt - bisher existieren beispielsweise keinerlei Hinweise für einen Transfer der T-DNA durch den T-Pilus. Kürzlich wurden Interaktionspartner von VirB2 mittels eines *screens* in einer c-DNA von *Arabidopsis thaliana* identifiziert, was für eine Beteiligung dieser Oberflächenstruktur an der Wirtszell-Interaktion spricht (Hwang und Gelvin, 2004).

Der von Cascales und Christie postulierte Transferweg der T-DNA durch das T4SS stimmt mit vorherigen Experimenten überein. Die Resultate machen deutlich, dass die drei beschriebenen Unterstrukturen koordiniert arbeiten, um die Sekretion der Substrate zu ermöglichen. Dieser Prozess beginnt mit deren Rekrutierung an den Transporter, und führt zum Transfer durch die Zellhülle.

3. Überblick über Typ IV-Sekretionssysteme weiterer pathogener Organismen

Die rasch wachsende Zahl sequenzierter bakterieller Genome führte zur Entdeckung einer Vielzahl von T4SS in Gram-negativen pathogenen Bakterien, wie z.B. *H. pylori* (Gastritis, kann Magenkrebs auslösen), *B. pertussis* (Keuchhusten), *Bartonella* ssp. (Bartonellose), *Brucella* ssp. (Brucellose) oder *Legionella pneumophila* (Legionärs-Krankheit / atypische Pneumonie). Dabei wurde auch die Vielseitigkeit der T4SS deutlich. Die Mitglieder der Familie der T4SS werden mittlerweile in drei Gruppen eingeteilt (Cascales und Christie, 2003; Ding *et al.*, 2003): (i) Konjugationssysteme, die den DNA-Transfer in die Rezipientenzellen vermitteln; (ii) „Effektor Translokations-Systeme“, welche Moleküle während der Infektion in die eukaryontische Wirtszelle transferieren; (iii) „DNA-Aufnahme oder Freisetzungssysteme“, die dem Austausch von DNA mit dem Milieu dienen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Beispiele dieser Gruppen. Die essentielle Bedeutung der identifizierten T4SS für die bakterielle Virulenz wurde in vielen Fällen bereits

bestätigt, aber die genaue Rolle, die sie beim Infektionsprozess spielen, ist häufig noch unklar.

Tabelle 1: Übersicht über verschiedene T4SS-abhängige Mechanismen
(modifiziert nach Cascales and Christie, 2003)

	Bakterium	Sekretions-system	Funktion / Substrat
Konjugation/DNA-Transfer	<i>E. coli</i> F-Plasmid (IncF)	Tra	konjugativer Transfer / DNA
	<i>E. coli</i> R388 (IncW)	Trw	konjugativer Transfer / DNA
	<i>A. tumefaciens</i>	VirB	onkogene Transformation von Pflanzenzellen / T-DNA
Effektor-Translokation	<i>A. tumefaciens</i>	VirB	onkogene Transformation von Pflanzenzellen / VirD2, VirE2, etc
	<i>B. pertussis</i>	Ptl	Interferenz mit Signal-Transduktionsweg der Zielzelle / Pertussis-Toxin
	<i>Brucella</i> ssp.	VirB	intrazelluläres Überleben / unbekannt
	<i>Helicobacter pylori</i>	Cag	Interferenz mit Signal-Transduktionsweg der Zielzelle / CagA
	<i>Bartonella</i> ssp.	VirB, Trw	intrazelluläres Überleben / unbekannt
	<i>Legionella pneumophila</i>	Dot/Icm	intrazelluläres Überleben / DotA, RaIF
DNA Aufnahme/Freisetzung	<i>H. pylori</i>	ComB	DNA-Aufnahme, Kompetenz
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Tra	DNA-Freisetzung

Interessanterweise bestehen in vielen Fällen auffallende Ähnlichkeiten der Anzahl und Anordnung der T4SS-kodierenden Regionen zu den Genen, die für das VirB/D4-System kodieren (z.B. bei *Brucella suis* oder *Bartonella tribocorum*). In einigen Bakterien dagegen scheinen nur einige der homologen Proteine des T4SS von *A. tumefaciens* vorzukommen (Baron *et al.*, 2002; Christie und Vogel, 2000). In *H. pylori* kodieren zum Beispiel nur Homologe für VirB4, VirB7-11 und VirD4 in der *cag-* (*cytotoxin associated gene*) Region. Unter den Organismen, die ein T4SS für ihre Virulenz benötigen, befinden sich Bakterien, die unterschiedlichste ökologische Nischen besiedeln. Viele von ihnen sind fakultativ oder obligat intrazelluläre Pathogene, wie z.B. *Brucella* ssp., *L. pneumophila* oder *Rickettsia* ssp.. Im Fall der intrazellulären Bakterien der Gattung *Bartonella* wurden sogar zwei funktionelle T4SS identifiziert, das VirB- und das Trw- System (Schulein und Dehio, 2002; Seubert *et al.*, 2003). Beide Systeme werden für die Invasion und das Überleben in humanen Epithelzellen benötigt.

In den letzten Jahren lag einer der Forschungsschwerpunkte auf der Identifizierung von Effektoren, die mittels der T4SS sekretiert werden. Da inzwischen davon ausgegangen wird, dass die Signale für den DNA-Transport nicht im DNA-Molekül *per se*, sondern in den mit der DNA assoziierten Proteinen vorliegen, handelt es sich bei den T4SS pathogener Bakterien mit großer Wahrscheinlichkeit um Proteintransporter. Momentan ist die Zahl der identifizierten Effektorproteine aber noch begrenzt. Im Fall von *B. pertussis* beispielsweise dient das gefundene Ptl-System (*pertussis toxin liberation*) der Freisetzung des Pertussis-Toxins (Weiss *et al.*, 1993). Ein weiteres intensiv untersuchtes T4SS ist das Cag-System von *H. pylori*, welches den Transport des 145 kDa großen CagA-Proteins ermöglicht (Odenbreit *et al.*, 2000). CagA wird direkt in die Wirtszelle injiziert und interferiert dort mit dem Signal-Transduktionsweg der Zielzelle (Segal *et al.*, 1999). Die Erkennungssequenzen könnten prinzipiell innerhalb des C-terminalen Teils der Effektorproteine liegen (Vergunst *et al.*, 2003; Fischer, W. zitiert in Llosa and O'Callaghan, 2004).

Es wird immer offensichtlicher, wie vielfältig die Rolle ist, die T4SS für das Überleben pathogener Bakterien in ihrem Habitat spielen. Der biotechnologische Nutzen dieser Systeme könnte deshalb in Zukunft über die Anwendung des *Agrobacterium* Ti-Systems zur Manipulation von eukaryontischen Zellen hinausgehen. T4SS pathogener Bakterien wären zum Beispiel als Ziele für die Entwicklung alternativer Antibiotika denkbar. Ein nicht-funktionelles Sekretionssystem würde den Erreger „entwaffnen“ und ihn sensitiv gegenüber dem wirtseigenen Abwehrsystem machen. Das Unterbinden der Sekretion von Virulenzfaktoren könnte an Stelle des Eingreifens in essentielle metabolische Prozesse der Mikroorganismen eine neue Strategie zur Behandlung von Infektionskrankheiten sein und das Problem der Resistenzbildung umgehen.

4. Tier- und humanpathogene Bakterien der Gattung *Brucella* ssp.

4.1. Vorkommen und Bedeutung als Krankheitserreger

Brucella ssp. sind Gram-negative, fakultativ intrazelluläre Bakterien und Verursacher der Brucellose, einer weltweit verbreiteten Zoonose. Man unterscheidet sechs Spezies, von denen vier auch humanpathogen sind (Winstead, 2002). Alle *Brucella*-Spezies sind aber primär tierpathogen und werden nach ihrer Wirtspräferenz eingeteilt, z.B. *B. abortus* (Rinder), *B. melitensis* (Ziegen) oder *B. suis* (Schweine). Der Haupterreger bei Menschen ist

B. melitensis (Malta-Fieber), der 1887 von Sir David Bruce, einem Arzt der britischen Armee, auf Malta entdeckt wurde. *Brucella* verursacht eine chronische Infektion mit verschiedensten pathologischen Manifestationen (Grippe-ähnlichen Symptome zu Beginn der Infektion, in Wellen verlaufendes Fieber, Gelenkentzündungen, Endocarditis). Als Hauptinfektionsquellen gelten kontaminierte Tierprodukte wie Milch und Fleisch, eine Übertragung ist aber auch durch Aerosole möglich. In domestizierten Tieren, wie Rindern, Ziegen, Schafen und Schweinen sind die charakteristischen Merkmale des Krankheitsverlaufes der Abort bei trächtigen weiblichen und Sterilität bei männlichen Tieren (Corbel, 1997). Trotz des regional begrenzten Auftretens von Brucellose z.B. in mediterranen Gebieten, Teilen Asiens, Afrikas und Lateinamerikas, richtet diese Infektion nach wie vor großen ökonomischen Schaden an (Corbel, 1997). Aufgrund seiner Eigenschaft, lang anhaltende und schwer zu behandelnde Infektionen hervorzurufen, steht *Brucella* auf der Liste von Organismen, die als potentielle Biowaffen / Bioterror-Agentien eingesetzt werden können. *B. suis* wurde bereits in den 50er Jahren vom US-Militär als Biologische Waffe entwickelt (Winstead, 2002). Inzwischen wurden die Genome von *B. suis* (Paulsen *et al.*, 2002) und *B. melitensis* (DelVecchio *et al.*, 2002) vollständig sequenziert. Sie werden der Gruppe der α -Proteobakterien zugeordnet und sind mit anderen intrazellulären Tier/Humanpathogenen wie z.B. *Bartonella* ssp. und mit pflanzen-assoziierten Spezies der *Rhizobium/Agrobacterium*-Gruppe nahe verwandt.

4.2. Das Typ IV-Sekretionssystem von *Brucella* ssp.

In der Arbeitsgruppe um D. O'Callaghan wurde 1999 das *virB*-Operon von *B. suis* identifiziert. Insertionen in Genen dieser Region hatten zu einer starken Reduktion der Virulenz von *Brucella* und der Fähigkeit, intrazellulär in Makrophagen zu überleben, geführt (O'Callaghan *et al.*, 1999). Weitere Analysen zeigten, dass die Organisation der *virB*-Gene eine hohe Ähnlichkeit zu der entsprechenden Region in *A. tumefaciens* aufweist (Abbildung 3).

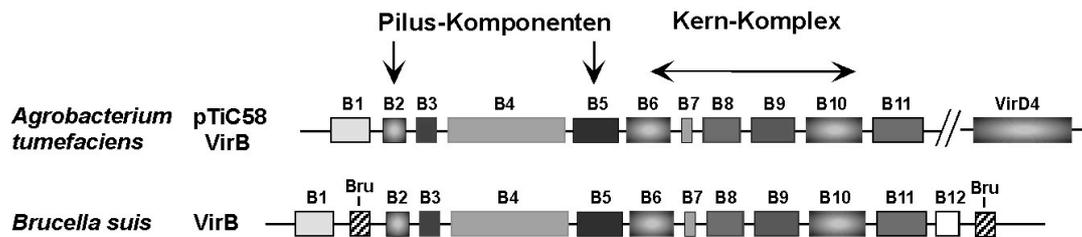


Abbildung 3: Vergleich der *virB*-Region von *B. suis* und des *virB*-Operons von *A. tumefaciens*. Die Gene von *B. suis* enthalten zusätzlich zwei repetitive Sequenzen (Bru), die charakteristisch für intergenische Regionen in *Brucella* sind (Halling und Bricker, 1994). Gene, die ähnliche Proteine kodieren sind in derselben Schattierung markiert.

Homologe aller 11 VirB-Proteine kodieren im *B. suis* *virB*-Operon. Das zusätzliche Protein ORF12 / VirB12 dagegen kommt weder im VirB/D4-System, noch in den anderen bisher identifizierten T4SS vor. Während die genetische Organisation der *virB*-Region große Ähnlichkeit zu der von *A. tumefaciens* aufweist, zeigten Vergleiche der Aminosäuresequenzen, dass die engste Verwandtschaft zu den Ptl-Komponenten von *B. pertussis* besteht (30 - 50% Identität; 50 - 80% Ähnlichkeit). Eine Ausnahme stellt dabei allerdings VirB6 dar, das nur 14,5% identische Aminosäuren mit *B. pertussis* PtlD teilt. Für VirB6 wird postuliert, dass es durch Interaktion mit den Substraten den Transfer durch den Kernkomplex einleitet (Cascales und Christie, 2004; Christie, 1997). Die geringe Ähnlichkeit könnte durch die unterschiedlichen zu transportierenden Substrate und deren Erkennung zu erklären sein. Interessanterweise enthält die *virB*-Region von *Brucella* ebenso wie die *ptl*-Region von *Bordetella* kein Homolog des sogenannten *coupling protein* VirD4 (siehe auch Abb.1). Für das Ptl-System ist inzwischen bekannt, dass die Untereinheiten des Pertussis-Toxins T4SS-unabhängig mittels des *general secretory pathway* (GSP) über die Zytoplasmamembran gelangen und somit die Rekrutierung durch VirD4 umgangen wird (Burns, 2003). Ein ähnlicher Mechanismus für die Substraterkennung und Translokation könnte auch im *Brucella*-System stattfinden.

Das VirB-System wurde außer in *B. suis* auch in anderen *Brucella*-Spezies, wie z.B. in *B. abortus* und *B. melitensis* nachgewiesen (O'Callaghan *et al.*, 1999; Sieira *et al.*, 2000). In allen Fällen wurde die essentielle Bedeutung des VirB-System für das intrazelluläre Überleben der Bakterien gezeigt. Allerdings ist weder bekannt zu welchem Zeitpunkt der Infektion das T4SS eine Rolle spielt ist, noch welche Virulenzfaktoren sekretiert werden. *Brucella* ssp. sind in der Lage, sowohl in professionelle als auch in nicht-professionelle phagozytische Zellen einzudringen, dort zu überleben und sich zu vermehren. Offensichtlich hat *Brucella* eine Strategie entwickelt, um den Prozess der Phagosomen-Reifung zu verändern (Boschioli *et*

al., 2002). Nach der Phagozytose der Bakterien fusioniert das entstandene Phagosom mit Vesikeln des frühen endosomalen Weges, und es kommt zu einer starken Ansäuerung, was in *B. suis* zur Induktion der *virB*-Gene führt (Boschioli *et al.*, 2001; Rouot *et al.*, 2003). Mittels unbekannter Mechanismen werden die Vesikel mit den Bakterien „umgeleitet“ und treten in den autophagocytischen Weg ein (Dorn *et al.*, 2002). Der Eintritt von *Brucella* in Kompartimente des autophagocytischen Weges und die Lokalisierung in Organellen, die dem endoplasmatischen Retikulum ähneln, scheint für das weitere Überleben und die Replikation von *Brucella* entscheidend zu sein (Comerci *et al.*, 2001; Pizarro-Cerda *et al.*, 1998; Sieira *et al.*, 2000). Untersuchungen des obligat intrazellulären Bakteriums *L. pneumophila* zeigen die Wichtigkeit des Aufnahmemechanismus und des intrazellulären Weges des Organismus für einen erfolgreichen Infektionsprozess. Diese Prozesse werden durch die Ausschleusung von Virulenzfaktoren über das T4SS beeinflusst (Watarai *et al.*, 2001; Watarai *et al.*, 2002). Die Effektormoleküle, die mittels des VirB-Systems von *Brucella* sekretiert werden, könnten daran beteiligt sein, den Abbau im Phagosom zu vermeiden oder zur Ausbildung der Replikations-Nische beitragen.

5. Die Piluskomponente VirB5 der verschiedenen Typ IV-Sekretionssysteme

Gegenwärtig liegen die Sequenzen von 15 VirB5-Proteinen in den Datenbanken vor. Die Proteine haben eine charakteristische Länge von ungefähr 220 Aminosäuren und sind sehr hydrophil (Cao und Saier, 2001). Vergleiche der Aminosäure-Sequenzen zeigten, dass die in den Datenbanken gefundenen VirB5-Proteine über die gesamte Länge hinweg eine recht hohe Ähnlichkeit aufweisen (zwischen 45 - 65% Ähnlichkeit). Die N-terminale Signalpeptid-Sequenz kennzeichnet sie als periplasmatische Proteine. VirB5 ist eine für die Virulenz essentielle Komponente der T4SS und wurde sowohl in *A. tumefaciens*, als auch im Konjugationssystem des IncN-Plasmids pKM101 von *E. coli* (TraC) als Nebenkomponekte des Pilus identifiziert (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999a; Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999b). Vor kurzem wurde in *A. tumefaciens* auch eine Ko-Fraktionierung des in der äußeren Membran lokalisierten Lipoproteins VirB7 mit VirB5 gezeigt (Krall *et al.*, 2002; Sagulenko *et al.*, 2001). Möglicherweise bilden diese Komponenten gemeinsam den Pilus oder eine Pilus-Assemblierungsplattform aus. Bisher wurde das Vorhandensein einer solchen T4SS-abhängigen Oberflächenstruktur aber nur in *A. tumefaciens* und *E. coli* bestätigt (Chen *et al.*,

2002; Fullner *et al.*, 1996). Da VirB5 in unterschiedlichen Bereichen der Bakterienzelle (Membran, Periplasma und Pilus) lokalisiert (Schandel *et al.*, 1992; Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999a), ist es nicht unwahrscheinlich, dass es im Gesamtprozess der Sekretion mehrere Aufgaben erfüllen könnte. In diesem Zusammenhang wird beispielsweise eine Rolle während der Pilus-Assemblierung oder eine Aufgabe als Adhäsion diskutiert, welches die Anheftung des Bakteriums an die Wirts- bzw. Rezipientenzelle vermittelt.

Die Veröffentlichung der Kristallstruktur des VirB5-Homologs TraC durch Yeo *et al.* (2003) lieferte eine Vielzahl neuer Informationen und gab Hinweise auf die Funktion dieses Proteins. Es handelt sich um ein „Ein-Domänen“-Protein mit einer hauptsächlich α -helikalen, lang gestreckten Struktur, die einen globulären Anhang aus kurzen Helices trägt (Yeo *et al.*, 2003). Besonders diesem Anhang wird eine große Bedeutung für Protein-Protein-Interaktionen zugeschrieben. Auf Grund der Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen der verschiedenen VirB5-Proteine wird die TraC-Struktur als Prototyp dieser Proteinfamilie angesehen.

Interessanterweise kommt sowohl im Ptl-System von *B. pertussis* als auch im Cag-System von *H. pylori* kein VirB5-Homolog vor. VirB2 hingegen ist in beiden Organismen zu finden (Burns, 1999; Covacci *et al.*, 1999). Für *H. pylori* wurde kürzlich ein völlig neuer Typ von Oberflächenstruktur beschrieben, und die Beteiligung möglicher VirB2-Homologer daran wurde bislang nicht belegt (Rohde *et al.*, 2003). Bei *B. pertussis* dagegen wurden bisher keine pilus-ähnlichen Strukturen detektiert (Burns, 2003). Möglicherweise kann das Fehlen eines Pilus im Ptl-System damit begründet werden, dass für die Sekretion des Toxin-Effektors bei *B. pertussis* ein Zell-Zell-Kontakt nicht nötig ist. Überraschend sind auch die Erkenntnisse, die in jüngster Zeit über die VirB5-ähnlichen Proteine in den VirB- und Trw-T4SS von *Bartonella* gewonnen wurden. Im VirB-System liegt an Stelle von *virB5* ein Gen vor, welches für ein immun-dominantes 17 kDa großes Antigen kodiert, und dieses ist auf der Oberfläche des Bakteriums exponiert (Schmiederer *et al.*, 2001). Die *trw*-Region von *B. tribocorum* hingegen trägt mehrere Duplikate der Gene, deren Produkte Homologe von VirB2, VirB5, VirB6 und VirB7 sind (Seubert *et al.*, 2003). Möglicherweise dienen diese Proteine der Produktion variabler Oberflächenstrukturen, um eine Immunreaktion des Wirtes zu umgehen. Wenige der Komponenten von T4SS zeigen eine solch hohe Variabilität wie die Proteine der VirB5-Familie. In Zukunft wird eine weitere Analyse der Lokalisierung und Funktion dieser Proteine nötig sein. Besonders in den T4SS der intrazellulären Bakterien, die VirB2 und VirB5-Homologe besitzen, ist nicht klar, ob Pili ausgebildet werden.

6. Aufgabenstellung

In einer großen Anzahl pathogener Bakterien wurden T4SS identifiziert, die für den Infektionsprozess eine entscheidende Rolle spielen. Um die Pathogenitätsmechanismen genauer verstehen zu können, ist die Analyse der Proteinsekretion daher von großem Interesse. Hierbei ist es wichtig, ein detailliertes Verständnis über die Struktur des Transportkanals und den Mechanismus der Komplex-Assemblierung zu erlangen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit einer Kombination von *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten die Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Komponenten des T4SS von *B. suis* untersucht werden. Ein Vergleich zwischen den dabei gewonnenen Ergebnissen und den Informationen über Interaktionen in *A. tumefaciens*, sollte Einsichten in den Mechanismus, die Struktur und die Assemblierung von T4SS erbringen. Der Schwerpunkt der *in vitro*-Analysen lag auf Interaktionen der potentiellen Piluskomponente VirB5 von *B. suis*.

Bisher ist sowohl über den Mechanismus des Eintritts von *Brucella* in die Wirtszelle, als auch über den weiteren Verlauf der intrazellulären Infektion nicht viel bekannt. Interaktionen mit Proteinen der Wirtszelle spielen für die Funktion des T4SS und somit das intrazelluläre Überleben vermutlich eine große Rolle. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, mögliche zelluläre Interaktionspartner von VirB5 zu identifizieren.

Material und Methoden

1. Verwendete Organismen und Plasmide

1.1. Bakterienstämme

Der Genotyp und die Herkunft der verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> UIA143	A348 mit Erythromycin-Resistenzgen im Chromosom	(Bohne <i>et al.</i> , 1998)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , (ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$), <i>supE44</i> , <i>relA</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
<i>E. coli</i> JM109	F', [<i>traD36</i> , <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^f , Δ (<i>lacZ</i>) M15], <i>recaA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>) λ	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
<i>E. coli</i> GJ1158	T7-RNA-Polymerasegen im Chromosom unter transkriptioneller Kontrolle des <i>proU</i> -Promotors	(Bhandari und Gowrishankar, 1997)

1.2. Hefestämme

Die verwendeten Hefestämme wurden von BD Bioscience/Clontech (Heidelberg) bezogen.

Tabelle 3: Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH109	MAT α , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4</i> Δ , <i>gal80</i> Δ , LYS2:: <i>GAL1</i> _{UAS} - <i>GAL1</i> _{TATA} -HIS3, <i>GAL2</i> _{UAS} - <i>GAL2</i> _{TATA} -ADE2, URA3:: <i>MEL1</i> _{UAS} - <i>MEL1</i> _{TATA} - <i>lacZ</i>	(James <i>et al.</i> , 1996) <i>Clontech Libraries User Manual</i>
<i>S. cerevisiae</i> Y187	MAT α , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp-1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>gal4</i> Δ , <i>met-</i> , <i>gal80</i> Δ , URA3:: <i>GAL1</i> _{UAS} - <i>GAL1</i> _{TATA} - <i>lacZ</i>	(Harper <i>et al.</i> , 1993) <i>Clontech Libraries User Manual</i>

1.3. Plasmide

Tabelle 4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp	Referenz
pTrc200	Str ^r , Spc ^r , pVS1-Replikon, <i>lacI^q</i> , trc-Promotor	(Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 1999b)
pTrc300	pTrc200 nach Deletion der <i>NcoI</i> - Schnittstelle	(Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2001)
pTrc- <i>virB3-B12</i>	pTrc300 mit dem <i>virB3-virB12</i> Gen des <i>virB</i> -Operons von <i>B. suis</i>	Q. Yuan
pTrc- <i>virB2-B12</i>	pTrc300 mit dem <i>virB2-virB12</i> Gen des <i>virB</i> -Operons von <i>B. suis</i>	C. Höppner, 2004
pTrc- <i>virB1-B12</i>	pTrc300 mit dem <i>virB1-virB12</i> Gen des <i>virB</i> -Operons von <i>B. suis</i>	C. Höppner, 2004
pTrc- <i>virB1+B3-B12</i>	pTrc300 mit dem <i>virB1</i> und <i>virB3-12</i> Gen des <i>virB</i> -Operons von <i>B. suis</i> ; 56 bp Insert nach <i>virB1</i>	C. Höppner, 2004
pUC <i>virB</i>	Amp ^r , pUC18 mit 12211 bp Fragment der <i>virB</i> -Region von <i>B. suis</i>	(O'Callaghan <i>et al.</i> , 1999)
pT7-7NcoI	Carb ^r , Expressionssystem unter der Kontrolle des T7-Promotors; <i>NdeI</i> - Schnittstelle des T7-7 Ursprungsvektor durch <i>NcoI</i> ersetzt	(Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2001)
pT7-7-StrepII	Carb ^r , pT7-7NcoI mit <i>NcoI</i> kloniertem StrepII-Tag und Schnittstelle für Faktor Xa	(Balsiger <i>et al.</i> , 2004)
pT7-7-StrepII- <i>virB5suis</i>	pT7-StrepII mit 666bp <i>virB5</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (221 As periplasmatische Domäne); <i>Acc65I/PstI</i> kloniert	N. Domke
pT7-7-StrepII- <i>virB5suis</i> [R69A]	pT7-StrepII- <i>virB5suis</i> ; Austausch von Arg69 zu Ala	diese Arbeit
pT7-7-StrepII- <i>virB5suis</i> [D73A]	pT7-StrepII- <i>virB5suis</i> ; Austausch von Asp73 zu Ala	diese Arbeit
pT7-StrepII- <i>virB5suis</i> [P85A]	pT7-StrepII- <i>virB5suis</i> ; Austausch von Pro85 zu Ala	diese Arbeit
pT7-7-StrepII- <i>virB5suis</i> [D142A]	pT7-StrepII- <i>virB5suis</i> ; Austausch von Asp142 zu Ala	diese Arbeit

pT7-7-StrepII- <i>virB5suis</i> [L163A]	pT7-StrepII- <i>virB5suis</i> ; Austausch von Leu163 zu Ala	diese Arbeit
pT7-7-StrepII- <i>virB5suis</i> [D172A]	pT7-StrepII- <i>virB5suis</i> ; Austausch von Asp172 zu Ala	diese Arbeit
pT7-7-StrepII- <i>virB8suis</i>	pT7-StrepII mit 429 bp <i>virB8</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (163 As periplasmatische Domäne); <i>Acc65I/PstI</i> kloniert	N. Domke
pT7-7-StrepII- <i>virB9suis</i>	pT7-StrepII mit 813 bp <i>virB9</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (271 As periplasmatische Domäne); <i>Acc65I/PstI</i> kloniert	N. Domke
pT7-7-StrepII- <i>virB10suis</i>	pT7-StrepII mit 1020 bp <i>virB10</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (339 As periplasmatische Domäne); <i>Acc65I/PstI</i> kloniert	N. Domke
pT7-H ₆ TrxFus	Carb ^f , Hexa-Histidin-Thioredoxin- Fusionsplasmid unter Kontrolle des T7- Promotors	(Kromayer <i>et al.</i> , 1996)
pT7-H ₆ Trx- <i>virB5suis</i>	pT7-H ₆ TrxFus mit 666 bp <i>virB5</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (221 As periplasmatische Domäne); <i>Acc65I/PstI</i> kloniert	N. Domke
pT7-H ₆ Trx- <i>virB7suis</i>	pT7-H ₆ TrxFus mit 126 bp <i>virB7</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (codiert für 41 As des Proteins); <i>XbaI/PstI</i> kloniert	diese Arbeit
pT7-H ₆ Trx- <i>virB8suis</i>	pT7-H ₆ TrxFus mit 492 bp <i>virB8</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (163 As periplasmatische Domäne); <i>Acc65I/PstI</i> kloniert	N. Domke
pT7-H ₆ Trx- <i>virB9suis</i>	pT7-H ₆ TrxFus mit 813 bp <i>virB9</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (271 As periplasmatische Domäne); <i>Acc65I/PstI</i> kloniert	N. Domke
pT7-H ₆ Trx- <i>virB10suis</i>	pT7-H ₆ TrxFus mit 1020 bp <i>virB10</i> - Fragment von <i>B. suis</i> (339 As periplasmatische Domäne); <i>Acc65I/PstI</i> kloniert	N. Domke

pT7-H ₆ Trx- <i>virB12suis</i>	pT7-H ₆ TrxFus mit 471 bp <i>virB12</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (kodiert für 156 As des Proteins) <i>Acc65I/PstI</i> kloniert	diese Arbeit
pT7-H ₆ Trx- <i>virB10agro</i>	pT7-H ₆ TrxFus mit <i>virB10</i> -Fragment von <i>A. tumefaciens</i>	N. Domke
pGADT7	Amp ^r , GAL4 AD-Fusionsvektor; LEU2-Marker für Selektion in Hefe	(Chien <i>et al.</i> , 1991); Clontech / <i>Matchmaker Libraries User Manual</i>
pGADT7-Rec	Amp ^r , GAL4 AD-Fusionsvektor zur Konstruktion von cDNA-Bibliotheken; LEU2 für Selektion in Hefe	(Chien <i>et al.</i> , 1991); Clontech / <i>Matchmaker Libraries User Manual</i>
pGADT7-T	pGADT7-Konstrukt; codiert für Fusion zwischen GAL4 AD und SV40 T-Antigen; positiver Kontrollvektor	Clontech / <i>Matchmaker Libraries User Manual</i>
pGBKT7	Kan ^r , GAL4 DNA-BD-Fusionsvektor; TRP1 für Selektion in Hefe	(Chien <i>et al.</i> , 1991); Clontech / <i>Matchmaker Libraries User Manual</i>
pGBKT7-53	pGBKT7-Konstrukt; kodiert für Fusion zwischen GAL4 DNA-BD und p53 der Maus; positiver Kontrollvektor	Clontech / <i>Matchmaker Libraries User Manual</i>
pGADT7- <i>virB5</i>	pGADT7 mit 657 bp <i>virB5</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (218 As periplasmatische Domäne); <i>NdeI/BamHI</i> kloniert	diese Arbeit
pGADT7- <i>virB8</i>	pGADT7 mit 510 bp <i>virB8</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (170 As periplasmatische Domäne); <i>NdeI/BamHI</i> kloniert	diese Arbeit
pGBKT7- <i>virB5</i>	pGBKT7 mit 657 bp <i>virB5</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (218 As periplasmatische Domäne); <i>NdeI/BamHI</i> kloniert	diese Arbeit
pGBKT7- <i>virB8</i>	pGBKT7 mit <i>virB8</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (170 As periplasmatische Domäne); <i>EcoRI/PstI</i> kloniert	diese Arbeit
pGBKT7- <i>virB9</i>	pGBKT7 mit 816 bp <i>virB9</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (272 As periplasmatische Domäne); <i>NcoI/PstI</i> kloniert	diese Arbeit

pGBKT7- <i>virB10</i>	pGBKT7 mit 1020 bp <i>virB10</i> -Fragment von <i>B. suis</i> (339 As periplasmatische Domäne); <i>EcoRI/PstI</i> kloniert	diese Arbeit
-----------------------	---	--------------

2. Puffer, Nährmedien und Supplemente

2.1. Puffer

Na-K-Phosphat-Puffer	0,5 M KH_2PO_4 und 0,5 M Na_2HPO_4 auf pH 5,5 titriert
PBS	pro Liter: 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na_2HPO_4 , 0,24g KH_2PO_4 , pH 6 oder pH 7,2
StrepII-Puffer	0,3 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, pH 8 (als Dialysepuffer und zum Aufbrechen der Zellen wurden zusätzlich 2 mM DTT zugefügt)
His-tag-Puffer	0,3 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 8

2.2. Nährmedien

LB-Medium	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl
LBON-Medium	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt
YEB-Medium	0,5% Rinderextrakt, 1% Hefeextrakt, 0,5% Pepton, 0,5% Saccharose, 2mM MgSO_4
AB-Medium	1% Glukose, 0,39% MES, 1mM Na-K- PO_4 ; 1x AB-Salze, pH5,5 (20 x AB-Salze: 2% NH_4Cl , 0,6% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,3% KCl, 0,02% CaCl_2 , 0,005% $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, pH 5,5)
YPD-Medium	2% Pepton, 1% Hefeextrakt
SD-Minimalmedium	0,67 % <i>yeast nitrogen base without aminoacids</i> , 2% Glukose, 1x <i>Dropout-Aminosäure-Lösung</i> (abhängig von den benötigten Selektionsbedingungen) (10 x Aminosäure-Lösung: nach Angaben des <i>Matchmaker Yeast Protocol Handbook</i> von Clontech)

Zur Herstellung von Platten wurde den Medien 1,5 bis 2% Agar zugesetzt.

2.3. Supplemente und Antibiotika

Je nach Bedarf wurden den Medien zur Anzucht folgende Supplemente zugesetzt:

Tabelle 5: Verwendete Supplemente

Antibiotikum bzw. Supplement	Endkonzentration
Acetosyringon	200 μ M
IPTG	0,5 mM
Carbenicillin	100 μ g/ml
Kanamycin	50 μ g/ml
Spectinomycin	50 μ g/ml (<i>E. coli</i>) bzw. 100 μ g/ml (<i>A. tumefaciens</i>)
Streptomycin	50 μ g/ml (<i>E. coli</i>) bzw. 300 μ g/ml (<i>A. tumefaciens</i>)
Erythromycin	150 μ g/ml

3. Anzucht von Organismen

3.1. Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde durch Messung bei 600 nm (OD_{600}) an einem Hitachi-Spektralphotometer (Modell U-1500) bestimmt.

3.2. Anzucht und Induktion von *A. tumefaciens*

Die Anzucht und Induktion von *A. tumefaciens* C58-Zellen erfolgte wie von Schmidt-Eisenlohr *et al.* beschrieben (1999a).

Für die Anzucht der pTrc-*virB**suis*-tragenden *A. tumefaciens* UIA143-Zellen wurde YEB (Str₁₀₀/Sp_{c300}/Erm₁₅₀)-Medium beimpft und unter aeroben Bedingungen bei 26°C über Nacht inkubiert. Die Anzucht der Tageskulturen erfolgte in AB-Minimalmedium bei 20°C im Wasserbadschüttler (New Brunswick, Modell G76) für 3-5 Stunden. Zur Induktion der Expression des *virB*-Operons von *B. suis* wurde 1 ml Tageskultur auf AB-Agarplatten (\varnothing 15 cm) plattiert, die mit 0,5 mM IPTG versetzt waren, und für 3-4 Tage bei 20°C inkubiert. Die Induktion in flüssigem Medium erfolgte durch Zugabe von 0,5 mM IPTG zur Tageskultur, welche dann für weitere 20-24 Stunden inkubiert wurde.

3.3. Anzucht von *E. coli*

Übernachtskulturen von *E. coli* wurden in Reagenzgläsern aerob bei 37°C in einem Laborschüttler (180 – 200 upm) kultiviert. Je nach Stamm erfolgte die Anzucht in LB-

(*E. coli* DH5 α) oder LBON-Medium (*E. coli* GJ1158), gegebenenfalls unter Zusatz von Antibiotika. Die Anzucht von Tageskulturen erfolgte in Erlenmeyerkolben, die mit 10-20% des Nennvolumens mit entsprechendem Medium befüllt waren.

3.4. Anzucht von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurde in YPD oder YPDA-Medium aerob bei 30°C in einem Laborschüttler kultiviert. Die Inkubation erfolgte dabei in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben, die zu 10-20% des Nennvolumens mit Medium gefüllt waren. Zur Selektion von Transformanten und Reporter-gen-Expression wurden die Hefestämme auf SD-Minimalmedium-Platten kultiviert, denen die zur Selektion nötigen Aminosäuren nicht zugesetzt waren. Die Anzucht der Transformanten für den quantitativen *lacZ*-Nachweis oder für die Isolierung von Plasmiden erfolgte in Flüssigkulturen mit SD-Minimalmedium.

4. Physiologische Methoden

4.1. Test auf β -Galaktosidaseaktivität

Zum Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität in den im Rahmen der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse erhaltenen Transformanten wurde ein X-Gal-Kolonie-Filtertest nach einem Standardprotokoll von Clontech (*Matchmaker Yeast Protocol Handbook*) durchgeführt. Der quantitative Nachweis erfolgte mit ONPG als Substrat. Eingesetzt wurden plasmid-tragende Hefezellen einer bis zu $OD_{600} = 0,5$ gewachsenen Tageskultur. Die Zellen aus Flüssigkulturen wurden nach einem Protokoll von Clontech (*Matchmaker Yeast Protocol Handbook*) behandelt. Abweichend vom Protokoll wurden dabei die Hefezellen durch Zugabe von einem Volumen Glasperlen (*acid-washed*, 425-600 μm ; Sigma) und anschließender starker Durchmischung mittels eines Vortex (8-10x für je 1 Minute; dazwischen auf Eis) aufgeschlossen. Die Qualität der Aufschlussrate wurde im Mikroskop überprüft. Die ermittelten Werte sind in *Miller units* angeben. Eine Einheit β -Galaktosidase ist definiert als die Menge, die 1 μmol ONPG pro Minute und Zelle hydrolysiert (Miller, 1972).

5. Molekularbiologische Methoden

5.1. Liste der Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-BiotechAG (Ebersberg) bezogen und sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die während der PCR-Amplifikation eingefügten Restriktions-Schnittstellen sind durch Fettdruck hervorgehoben. Die Stellen der Aminosäureaustausche im pT7-7-StrepII-*virB5*-Expressionsvektor sind unterstrichen.

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung / Restriktions-Stelle	Sequenz
Konstruktion von Plasmiden zur Überexpression	
B7suis_bp59-5' / <i>Xba</i> I	5'-GGGCCTCTAGAGTGCACACTACAACGGGGCCG-3'
B7suis-3' / <i>Pst</i> I	5'-CCGGCTGCAGTTAGTCCTCGTAAGTGCAACGG-3'
T7orf12suis-5' / <i>Acc</i> 65I	5'-CAGGGTACCCTCCAGCCCGCCGAAGCC-3'
T7orf12suis-3' / <i>Pst</i> I	5'-GAGCTGCAGTTACTTGCGTAAAATTCGATATCCAC-3'
Konstruktion von Plasmiden für das Two-Hybrid-System	
pGBKT7-B5s 5' / <i>Nde</i> I	5'-CGCGCGCATATGCAGCTCCCGGTGACAGATG-3'
pGBKT7-B5s 3'	5'-GCGCGCGGATCCATAGGCGGCTTCCAGTGCTTT-3'
<i>Bam</i> HI	
Oligonukleotide pGBKT7-B5s 5'/3' wurden auch zur Herstellung von PCR-Fragmenten zur Konstruktion des Plasmids pGADT7- <i>virB5</i> verwendet	
pGBKT7-B8s 5'	5'-GCGCGCGAATTCCAACATGTGCCCTACCTGGTG-3'
<i>Eco</i> RI	
pGBKT7-B8s 3' / <i>Pst</i> I	5'-CGCGCGCTGCAGTTGCACCACTCCCATTTCTGGATG-3'
pGBKT7-B9s 5' / <i>Nco</i> I	5'-CGCGCGCCATGGACAAAATCCCGTCCGGCTCA-3'
pGBKT7-B9s 3' / <i>Pst</i> I	5'-CGCGCGCTGCAGTTGCAGTTGCAGTTCTCCCCGGGC-3'
pGBKT7-B10s 5'	5'-GCGCGCGAATTCCACATGAGGGGCAATGCAGAG-3'
<i>Eco</i> RI	
pGBKT7-B10s 3' / <i>Pst</i> I	5'-CGCGCGCTGCAGCTTCGGTTGGACATCATAACACT-3'
pGADT7-B8s 5' / <i>Nde</i> I	5'-CGCGCGCATATGCAACATGTGCCCTACCTGGTG-3'
pGADT7-B8s 3'	5'-GCGCGCGGATCCTTGCACCACTCCCATTTCTGGATG-3'
<i>Bam</i> HI	

pGADT7-B10s 3' 5'-GCGCGCGGATCCCTTCGGTTGGACATCATAACACT-3'

*Bam*HI

pGADT7-B10s 5' 5'-CGCGCGCATATGCACATGAGGGGCAATGCAGAG-3'

*Nde*I

Aminosäuresubstitutionen im pT7-Strep*virB5* Expressionsvektor

R69A inv 5' 5'-GATGCCCTGACCGGCTACGCCGGCCTTGGCGAT-3

R69A inv 3' 5'-GCCGGTCAGGGCATCGAACTGCATTTTCTG-3'

P85A inv 5' 5'-ACGCTGCGTAGCTATCTGGCCCCATAACTGGCGA-3'

P85A inv 3' 5'-ATAGCTACGCAGCGTAGGGTTCGCGGAGATT-3'

D142A inv 5' 5'-GTGGTGAAGCCGGTCCAGGCCAAGGTCATGACG-3

D142A inv 3' 5'-GACCGGCTTCACCACTTTAGCCTCACATGC-3'

L163A inv 5' 5'-CTACAAGAGATCGAGAGCGCTATGCAGGAG-3

L163A inv 3' 5'-CTCGATCTCTTGTAGGCGTTTGTTCAGTGGC-3'

D172A inv 5' 5'-GAGATCAACAAGACGGGAGGCTCCGAAGGCGATT-3'

D172A inv 3' 5'-CGTCTTGTTGATCTCCTGCATCAAGCTCTC-3'

Sequenzierungen

T7-term-rev 5'-CCCCAAGGGGTTATGCTAGTTA-3'

AD-seq 3' 5'-AGATGGTGCACGATGCACAG-3'

pT7-7 5' 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3

pT7-7 3' 5'-AATTCTCATGTTTGACAGGTTATC-3'

5.2. Isolierung von Nukleinsäuren

5.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde aus 1,5–2 ml Übernachtskulturen mittels des *JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit* (Genomed) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Isolierung von Plasmiden aus Hefe erfolgte mittels eines *QIAprep®Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen (Hilden). Dafür wurden zuvor die Zellen aus 3 ml einer Übernachtskultur in 250 µl Puffer P1 (*QIAprep®Spin Miniprep Kit*) suspendiert und mit 200 µl Glasperlen versetzt. Der Aufschluss der Hefezellen erfolgte durch starke Durchmischung mittels eines Vortex (5 Minuten). Nach Abtrennung der Glasperlen wurde die Isolierung der Plasmide aus den Zelllysaten nach Anleitung des Herstellers zu Ende geführt.

5.2.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegeln

Nach Auftrennung der DNA in Agarosegelen wurden die gewünschten Fragmente ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des *Jet Quick Extraction spin Kit* (Genomed) nach Angaben des Herstellers aus der Agarose extrahiert.

5.3. Enzymatische Modifikation von DNA

Modifikationen von DNA wie Restriktionen, Ligationen und Dephosphorylierung erfolgte nach Angaben der Hersteller. Die verwendeten Enzyme wurden von der Firma MBI Fermentas (St.Leon Roth) oder New England Biolabs (Frankfurt/Main) bezogen.

5.4. Polymerase-Kettenreaktion

5.4.1. Direkte PCR

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion nach Standardverfahren eingesetzt. Hierzu wurden zum einen im Labor gereinigte Taq-Polymerase (N. Domke) mit kommerziellem Taq-Puffer (MBI, Fermentas) oder alternativ Pfu-Polymerase (MBI, Fermentas) verwendet. Der PCR-Ansatz enthielt 2 mM jedes Desoxynukleotids, 10 pmol der verwendeten Oligonukleotide sowie $MgCl_2$ in Konzentrationen zwischen 1 mM und 1,75 mM. Plasmid-DNA (z.B. pUC*virB*) diente als Matrize und wurde in Verdünnungen 1:100 bzw. 1:1000 von Plasmid-Miniisolierungen eingesetzt. Die PCR wurde in einem *Gradient Thermocycler* (Biometra) nach folgendem Standardprogramm durchgeführt: Denaturierung bei 94°C für 30 sek, Anlagerung der Oligonukleotide zwischen 45-55°C für 2 min und Kettenverlängerung bei 72°C für 2-4 min (25-30 Zyklen).

5.4.2. Gerichtete Mutagenese durch inverse PCR

Für den gezielten Austausch einzelner Aminosäuren in VirB5 wurden mittels inverser PCR mit überlappenden Oligonukleotiden (siehe Tabelle 5) die erwünschten Basenpaare in dem pT7-7-StrepII-*virB5*-Vektor ausgetauscht (Ansaldi *et al.*, 1996). Hierbei wurde die *Bio-X-ACT DNA-Polymerase* (Bioline) unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen eingesetzt. Das resultierende Fragment wurde anschließend mit *DpnI* behandelt, um methylierte DNA mit Wildtyp-Sequenz abzubauen, gereinigt und direkt in *E. coli* DH5 α transferiert. Um die Identifizierung richtiger Klone zu vereinfachen wurde versucht, parallel zum Aminosäureaustausch eine neue Schnittstelle in den entsprechenden Abschnitt einzubringen. Die Klone mit veränderter Sequenz konnten somit mittels Restriktionsanalyse untersucht werden.

5.5. Transformation

5.5.1. Transformation von Bakterienstämmen

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation bei 200V, 800 Ω und 25 μ F (Fiedler und Wirth, 1988).

5.5.2. Transformation von Hefe

Die Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* AH109-Zellen, sowie die Transformation mit Plasmid-DNA erfolgte nach einem Protokoll von Clontech (*Matchmaker Libraries User Manuel*).

5.6. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach der Methode von Sanger mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden (Sanger *et al.*, 1977). Die Proben wurden nach Angaben des Herstellers (AmpliTaQ®-Protokoll der Firma Applied Biosystems GmbH) vorbereitet und mit einem ABI PRISM 377 DNA Sequenzierapparat (Applied Biosystems GmbH) analysiert.

6. Elektrophoretische Methoden

6.1. Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA erfolgte in 1-2%-igen Agarosegelen denen 0,1 μ g/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde mit TAE als Laufpuffer (40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 7,8). Zur Beschwerung der Proben wurde die DNA mit 1/10 Vol Auftragspuffer (50% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau) versetzt. Parallel wurde ein Längenstandard (*Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder* oder *Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder*, MBI Fermentas) separiert.

6.2. Elektrophorese von Proteinen

6.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurden zwei verschiedene Methoden der SDS-PAGE herangezogen. Proteine mit einer molekularen Masse unter 14 kDa wurden durch Tricin-SDS-PAGE (12,5% Polyacrylamid) nach Schägger und Jagow (Schägger und von Jagow, 1987) aufgetrennt. Die Separation von Proteinen mit höher molekularer Masse erfolgte nach Laemmli (Laemmli, 1970) durch eine Glycin-SDS-PAGE

(10-12,5% Polyacrylamid). Zellsedimente wurden dafür entsprechend ihrer OD₆₀₀-Werte in Probenauftragspuffer (SB-Puffer: 125 mM Tris/HCl, 20% Glycerin, 10% β-Mercaptoethanol, 4,6% SDS, 0,01% Bromthymolblau, pH 6,8) für 5 Minuten auf 100°C erhitzt. Die SDS-Gele wurden nach der Separation entweder in einer Coomassie-Lösung angefärbt oder für *Western Blot*-Analysen verwendet.

6.2.2. Blaue native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die Auftrennung solubilisierter Membranproteine erfolgte mittels BN-PAGE nach Schägger und Jagow (Schägger und von Jagow, 1991). Zu diesem Zweck wurden entweder 16 cm lange Gradientengele (7-20% Polyacrylamid) oder 8 cm lange Gele ohne Gradient (15% Polyacrylamid) verwendet. In Abwandlung vom Ursprungsprotokoll wurden Kathoden- und Anodenpuffer in doppelter Konzentration verwendet und dem Kathodenpuffer wurde kein Coomassie-Farbstoff zugesetzt. Um den Proteinen eine negative Ladung zu verleihen, wurden die Proben mit BN-Auftragspuffer (5% Coomassie Brilliant Blau G-250, 500 mM ε-Amino-n-capronsäure) in einem Verhältnis Detergenz:Coomassie von 4:1 versetzt. Als Referenz zur Bestimmung der molekularen Massen diente der *HMW-Calibration Kit for native electrophoresis* von Amersham Pharmacia Biotech, für die langen BN-Gele wurde der *HMW-Calibration Kit* verwendet, dem aber zusätzlich Ribonuklease A (13 kDa), Chymotrysinogen A (25 kDa) und Ovalbumin (43 kDa) zugesetzt wurden. Zur Verwendung in *Western Blot*-Analysen wurden die Gele mittels *Semidry Blot* auf PDVF-Membranen übertragen.

7. Präparative Methoden

7.1. Isolierung von exponierten Strukturen auf der Zelloberfläche

Oberflächenstrukturen wurden von den Zellen durch Scherung isoliert. Zu diesem Zweck wurde *A. tumefaciens* wie unter 3.2. beschrieben auf 2-4 AB-Agarplatten kultiviert. Die Zellen wurden mit je 10 ml Na-K-Phosphat-Puffer von den Platten abgespült, sedimentiert und in 1/10 Volumen Na-K-Phosphat-Puffer resuspendiert. Um Oberflächenstrukturen zu scheren wurde die Bakterien-Suspension 10 mal durch die Kanüle einer Spritze (Ø 26 Gauge) gezogen. Die Zellen wurden durch anschließende Zentrifugation (1 Stunde, 13.000 Upm, 4°C) abgetrennt. Die im Überstand vorhandenen Strukturen hoher molekularer Masse (z.B. Flagellen und Pili) wurden mittels Ultrazentrifugation (Beckman Ti70.1.-Rotor, Sorvall OTD-

50B Ultrazentrifuge) bei 40.000 Upm und 4°C für 2 h sedimentiert und anschließend in 20 µl SB-Puffer suspendiert.

7.2. Isolierung von Membranen

Für die Isolierung von Membranen wurde *A. tumefaciens* wie unter 3.2. beschrieben auf 10-12 AB-Agarplatten kultiviert. Die Zellen wurden mit je 10 ml Na-K-Phosphat-Puffer von den Platten ab gespült, sedimentiert (1h, 13.000 Upm) und in 10 ml Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 0,5 mM PMSF und 0,2 mM DTT wurden die Zellen mittels dreimaliger Passage durch eine *French-Press-Zelle* (20.000 psi) aufgebrochen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (1h, 13.000 Upm) entfernt. Der Überstand wurde sodann einer 2-stündigen Ultrazentrifugation (Ti50.2-Rotor, Sorvall OTD-50B Ultrazentrifuge) bei 40.000 Upm unterzogen und somit wurden die löslichen Proteine (Periplasma und Zytoplasma) von den Membranen getrennt.

7.3. Solubilisierung von Membranproteinen

Die Solubilisierung von Membranproteinen erfolgte nach Schägger und Jagow (Schägger und von Jagow, 1991). Die sedimentierten Membranen (s. 7.2.) wurden dafür in 1 ml ACA-Puffer (750 mM ε-Amino-n-capronsäure, 50 mM BisTris, pH 7) aufgenommen und mittels Ultraschall (*Branson Sonifier Cell Disrupter*) suspendiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte die Solubilisierung von je 10 mg/ml Membranproteinen in 1 ml Ansätzen (in ACA-Puffer) mit 0-2% des nicht-ionischen Detergenz n-Dodecyl-β-D-maltosid (Calbiochem; Stammlösung: 10% in ACA-Puffer). Um die Proteine in Lösung zu bringen wurden die Proben für 2 Stunden bei 4°C leicht geschwenkt. Die anschließende Trennung der solubilisierten Proteine von der Fraktion der unlöslichen Proteine erfolgte mittels Ultrazentrifugation (Beckman Ti70.1-Rotor) bei 40.000 Upm und 4°C.

8. Proteinbiochemische und proteinanalytische Methoden

8.1. Überproduktion und Aufreinigung von Fusionsproteinen

Die Überproduktion der His₆- bzw. StrepII-markierten Fusionsproteine erfolgte in *E. coli* GJ1158 (Bhandari und Gowrishankar, 1997). Die für die His₆-Fusionen verwendeten Expressionsvektoren führten zusätzlich zu einer Thioredoxin (*trxA*)-Genfusion. Durch die Überproduktion als Thioredoxin-Fusionsprotein sollte die Anhäufung unlöslicher Aggregate verhindert werden (LaVallie *et al.*, 1993). Die Anzucht der Tageskulturen erfolgte wie unter

3.3. beschrieben in mit Carbenicillin versetztem LBON-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6. Zur Induktion der des T7-Promotors wurden 0,3 M NaCl zugesetzt. Die weitere Inkubation erfolgte entweder für 4 Stunden bei 37°C, oder, zur optimalen Ausbeute löslicher Fusionsproteine, für 18 - 20 Stunden bei 26°C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 13.000 Upm für 20 Minuten (4°C) sedimentiert, mit PBS (pH 7,2) gewaschen und anschließend in „StrepII-Puffer“ bzw. „His-tag-Puffer“ resuspendiert. Nach Zugabe von 0,5 mM PMSF wurden die Zellen durch dreimalige Passage in einer *French-Press-Zelle* (20.000 psi) aufgebrochen. Zellbruchstücke und unlösliche Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt (30 Minuten, 13.000 Upm, 4°C) und die weitere Aufreinigung erfolgte mittels Affinitäts- Chromatographie und anschließender Gelfiltrations- oder Anionenaustausch-Chromatographie (siehe Abschnitt 9). Anschließend wurden alle Fraktionen vereint und für 12 Stunden in StrepII-Puffer mit 50% Glycerin dialysiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

8.2. Konzentrierung und Dialyse gereinigter Proteine

Die Konzentrierung gereinigter Proteine erfolgte mit *Amicon Ultra-15 centrifugal filter devices* der Firma Millipore.

Zur Entsalzung, zum Pufferwechsel oder zum Einengen von Proteinlösungen wurden diese über Nacht in entsprechendem Puffer dialysiert. Hierzu wurden Dialysemembranen der Firma Roth (*Visking Typ 27/32*) verwendet.

8.3. Fällung von Proteinen

Die Fällung von Proteinen erfolgte durch Zugabe von 3 Vol Aceton oder 5% TCA und Inkubation über Nacht auf Eis. Die präzipitierten Proteine wurden mittels Zentrifugation sedimentiert, mit auf -20°C gekühlten 80% Ethanol gewaschen und zur weiteren Analyse in SB-Puffer suspendiert.

8.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationen von Proteinlösungen wurden nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) unter Verwendung eines Färbekonzentrats der Firma Bio-Rad (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate*) bestimmt. 1-10 µg BSA dienten als Referenz und die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm mit einem Hitachi-Spektralphotometer bestimmt.

8.5. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen

8.5.1. Quervernetzungsversuche (*crosslinking*)

Für die Quervernetzungsversuche wurde *A. tumefaciens* wie unter 3.2. beschrieben in Flüssigkultur kultiviert. Kulturen mit einer OD₆₀₀ von 1 wurden abzentrifugiert und dreimal mit PBS (pH 6) gewaschen. Die Quervernetzungsreaktion erfolgte durch Zugabe von 1 mM des Quervernetzungs-Reagenz BS³ (Bis(sulfosuccinimidyl)suberat) in PBS zu einem Gesamtvolumen von 1 ml für 30 min bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl 1 M Tris/HCl (pH 6) beendet, die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 50 µl SB-Puffer für 5 min bei 100°C inkubiert.

Für die Quervernetzung von gereinigten Proteinen wurden jeweils 2 µg der Proteine eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in 40 µl PBS (pH 7,2) durch Zugabe von Formaldehyd für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Da die durch Formaldehyd ausgebildeten Quervernetzungen hitzelabil sind, wurden die Proben nach Zugabe von 1 Vol SB-Puffer zur Denaturierung der Proteine für 30 min bei nur 37°C erwärmt. Alternativ wurde ein weiterer Ansatz für die Quervernetzung von Proteingemischen durchgeführt. Hierbei wurden je 50 pmol der Proteine mit „DSS-Reaktionspuffer“ (50 mM MES-KOH, pH 6,5; 150 mM NaCl; 0,1 mM EDTA) *ad* 100 µl versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Quervernetzung der Proteine durch Zugabe des Quervernetzungs-Reagenz DSS (Disuccinimidylsuberat). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 60 Minuten wurde die Reaktion der Proben durch 5 minütige Inkubation in 1 Volumen SB-Puffer bei 100°C beendet. Quervernetzte Proteine oder Zellsysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *Western Blot* analysiert.

8.5.2. Ko-Elution mittels Gelfiltrations-Chromatographie

Als möglicher Nachweis einer Interaktion wurden die Proteine gemischt, mittels Gelfiltration fraktioniert und auf Ko-Elution getestet. Dafür wurden je 50 µg Protein in StrepII-Puffer gemischt und das Proteingemisch wurde zuerst für ungefähr 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Separation der Proben erfolgte sodann über eine XK 16/70 Superdex™ 75-Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia Biotech; Auftrennungsbereich von 3 bis 70 kDa). Der Lauf erfolgte in StrepII-Puffer bei einer Flussrate von 1 ml pro min. Die eluierten Proteine wurden in 1 ml-Fractionen gesammelt, je 40 µl Probe wurde mit 40 µl SB-Puffer versetzt, 5 Minuten bei 100°C inkubiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer *Western Blot*-Analyse unterzogen.

8.5.3. Ko-Adsorption mit StrepTactin-Sepharose

Die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels Ko-Adsorption erfolgte unter Verwendung von StrepTactin (Streptavidin) Sepharose (IBA, Göttingen). Die beiden auf Interaktion zu testenden Proteine wurden so eingesetzt, dass eines der Proteine als StrepII-, das andere als His₆-Fusionsprotein vorlag. Je 50 pmol der Proteine wurden in insgesamt 100 µl Reaktionspuffer (StrepII-Puffer mit 150 – 300 mM NaCl) gemischt und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zu 20 µl in Reaktionspuffer äquilibrierter Sepharose gegeben und für weitere 15 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Sepharose-Ansatzes mit 200 µl Reaktionspuffer, wobei die Proben mit einem Vortex durchmischt wurden, wurde das StrepII-Fusionsprotein mit 50 µl Elutionspuffer (StrepII-Puffer mit 1 mM Biotin) eluiert (zur Sedimentation der Sepharose wurde das Reaktionsgefäß für einige Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert). Der Ansatz wurde mit 1 Volumen SB-Puffer versetzt, die Proben wurden mittels SDS-PAGE separiert und die mögliche Ko-Adsorption wurde unter der Verwendung spezifischer Antiseren analysiert.

8.5.4. Überlagerung von Peptidmembranen

Die zur detaillierten Analyse der VirB5-Interaktionen verwendeten Peptidmembranen wurden von der Firma Jerini (Berlin) hergestellt (SPOT-Syntheseverfahren). Die 70 Peptide waren 13 Aminosäuren lang und waren um je 3 Positionen verschoben, so dass die gesamte Sequenz von VirB5 abgedeckt wurde. Alle Peptide waren am N-Terminus acetyliert und über den C-Terminus kovalent an eine Cellulose-PEG-Membran gebunden. Zur Absättigung der Membranen wurde die *10x conc. blocking solution for Western blots* von Roche (Penzberg) verwendet, die zuvor in TBS-T (50 mM Tris, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,05% Tween, pH 8) verdünnt wurde. Nach Absättigung der Membran erfolgte die Überlagerung mit 2 - 4 µg Protein in *blocking solution* (2 Stunden, RT). Nach dreimaligem Waschen der Membran für je 10 Minuten mit TBS-T erfolgte der Transfer der an die Membran gebundenen Proteine mittels *Semidry Blot* auf PDVF-Membranen. Die Regenerierung der Peptidmembranen für weitere Experimente erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

8.5.5. Kompetitiver Peptid-Bindetest

Um zu untersuchen, welche Aminosäurebereiche des VirB5-Proteins für eine Bindung mit dem Interaktionspartner notwendig sind, wurde ein kompetitiver Peptid-Bindetest durchgeführt. Als Grundlage des Kompetitionsexperiments diente der unter 8.5.1. beschriebene Quervernetzungsversuch von Proteingemischen mit DSS. Hierzu wurde der

Interaktionspartner VirB8 mit VirB5-Peptiden verschiedener Konzentration für 30 Minuten in 100 µl DSS-Reaktionspuffer vor-inkubiert. Anschließend wurde VirB5 zu dem Ansatz gegeben. Im Weiteren wurde wie unter 8.5.1. beschrieben verfahren und der Einfluss der Peptide auf die Effizienz der Quervernetzung untersucht. Die im kompetitiven Bindetest eingesetzten Peptide wurden von der Firma Jerini (Berlin) synthetisiert. Alle Peptide wiesen einen Reinheitsgrad von 90 - 95% auf. Um die Peptide in Lösung zu bringen wurde 1% des Endvolumens an DMSO vorgelegt und die Lösung wurde dann langsam mit StrepII-Puffer aufgefüllt.

8.5.6. Hefe Zwei-Hybrid-System

Die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit dem Hefe Zwei-Hybrid-System erfolgte mit Plasmiden und Hefestämmen der Firma BD Bioscience Clontech (Heidelberg). Dabei wurde ein auf dem Transkriptionsfaktor GAL4 basierendes Zwei-Hybrid-System (*Matchmaker System 3*) verwendet. Die kodierenden Gene der zu untersuchenden Proteine wurden dafür in die entsprechenden Vektoren (pGADT7 bzw. pGBKT7) kloniert. Die Plasmide wurden in verschiedenen Kombinationen in *S. cerevisiae* AH109 mittels der LiAc-Methode transformiert. Die Selektion plasmid-tragender Transformanden erfolgte über deren Wachstum auf SD-Minimalmedium ohne Leucin und Tryptophan (SD/-Leu/-Trp). Zur Selektion der Transformanden, bei denen die Fusionsproteine interagierten, wurde zusätzlich Wachstum auf Medium ohne Histidin und Adenin untersucht (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade). Positive Kolonien wurden zusätzlich auf die Produktion von β -Galaktosidase überprüft.

Zum *screening* einer Hela c-DNA Bibliothek wurde das Matchmaker GAL4 Zwei-Hybrid-System mit einer transformierten c-DNA Bibliothek der Firma BD Bioscience Clontech verwendet. Der *screen* erfolgte dabei nach Angaben des Herstellers.

9. Chromatographische Methoden

9.1. Affinitäts-Chromatographie

Die Aufreinigung von Fusionsproteinen mit dem Strepavidin-bindenden Peptid StrepII (Aminosäuresequenz: WSHPQFEK) erfolgte unter Einsatz des *Strep-Tactin-Purification System* der Firma IBA. Die Säulen wurden dafür mit 2 ml 50% Strep-Tactin-Sepharose gefüllt. Die Reinigung erfolgte nach Anleitung des Herstellers mit StrepII-Puffer, dem je nach

Reinigungsschritt 2,5 mM Desthiobiotin (Elutionspuffer) bzw. 1 mM HABA (2-[4'-hydroxybenzeneazo] benzoic acid) zugesetzt wurde (Regenerierungspuffer).

Für die Aufreinigung His₆-markierter Proteine wurde der Zellextrakt auf eine *Talon Superflow Metal Affinity* –Säule der Firma BD Bioscience Clontech aufgetragen. Die Reinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit His-Tag-Puffer bzw. His-Tag-Puffer mit 250 mM Imidazol.

9.2. Anionenaustausch-Chromatographie

Zur weiteren Aufreinigung des StrepII-VirB5-Proteins und seiner Varianten wurde ein Anionenaustauscher (Q Sepharose HP von Amersham Pharmacia Biosciences, Freiburg) genutzt. Dafür wurden die affinitäts-chromatographisch gewonnenen Proteinlösungen über Nacht zum Pufferaustausch in den Laufpuffer des Anionenaustauschers (20 mM Tris/HCl pH 6,8) dialysiert. Der Säulenlauf wurde nach Anleitung des Herstellers bei einer Flussrate von 1 ml pro Minute durchgeführt. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0 – 100% Elutionspuffer (Laufpuffer mit 1 M NaCl) über das dreifache Säulenvolumen. Zum Entgasen und Entfernen von Schwebeteilchen wurden alle Puffer durch Nitrocellulosefilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert.

9.3. Gelfiltrations-Chromatographie

Zur Bestimmung des Laufverhaltens und der Größe von Proteinen bzw. zur weiteren Aufreinigung der Fusionsproteine wurden die Proben auf einer XK 16/70 Superdex™ 75-Säule oder XK 16/100 Superdex™ 200-Säule (beide von Amersham Pharmacia Biotech) gelfiltrations-chromatographisch bei einer Flussrate von 1 ml pro Minute in StrepII-Puffer separiert. Zur Kalibrierung der Läufe wurden Eichproteine nach Angaben des Herstellers (*Gelfiltrations Calibration Kit, High Molecular Weight* bzw. *Low Molecular Weight* von Amersham) genutzt. Zur Analyse der Oligomerbildung wurden je 100 µg des zu untersuchenden Proteins aufgetragen.

DDM-(1,5%)-solubilisierte Membranproteine wurden unter Verwendung der XK 16/70 Superdex™ 75 –Säule mit ACA-Puffer (mit 0,03% DDM) als Laufpuffer separiert. Die eluierten Proteine wurden in 1 ml-Fraktionen gesammelt, mit TCA *ad* 5% präzipitiert und in 100 µl SB-Puffer suspendiert. Zum Entgasen und Entfernen von Schwebeteilchen wurden alle Puffer durch Nitrocellulosefilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert.

10. Immunologische Methoden

10.1. Herstellung polyklonaler Antiseren

Zur Herstellung von Antiseren für die Detektion von VirB7 und VirB12 wurden die Proteine als His₆Trx-Fusionsproteine wie oben beschrieben aufgereinigt. Die Gewinnung der polyklonalen Antiseren erfolgte durch die Firma BioGenes (Berlin). Da eine Überexpression von pT7-His₆Trx-VirB2 nicht möglich war, erfolgte die Herstellung eines Peptid-Antiserums unter Verwendung eines 15 Aminosäure langen VirB2-Peptids (NGGLDKVNTSMQKVC).

10.2. Immunoblot-Analysen (*Western Blot*)

Proteine wurden zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in vertikalen Puffertanks (*Trans Blot Cell*; Biorad) in *Blot*-Puffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% Methanol) auf PDVF-Membranen („Immobilon P“ von Millipore) transferiert. Die Detektion der Proteine erfolgte nach etablierten Methoden (Harlow und Lane, 1988) mit Hilfe des *Goat Anti-Rabbit IgG-HPR Conjugate* (BioRad) und einem Chemolumineszenz-Detektionssystem (Perkin Elmer Life Science Inc.).

11. Daten- und Bildverarbeitung

Polyacrylamidgele und Chemoluminogramme wurden mit einem UMAX UTC6400 Scanner digitalisiert (Auflösung von 300 dpi) und mit den Bildbearbeitungs-Programmen Adobe Photoshop 7.0 und Canvas 9™ graphisch bearbeitet. Für multiple Sequenzvergleiche wurden ClustalW (Version 1.8.2.)-Algorithmen erstellt (Thompson *et al.*, 1994). Um aus den verglichenen Sequenzen die konservierten Bereiche darzustellen, wurden diese unter Verwendung von Standardparametern in den AMAS-Server (Livingstone und Barton, 1993) transferiert. Strukturdarstellungen wurden mittels DINO 0.9.0. (Philippsen, 2002) erstellt und Sequenzvergleiche wurden mit dem blastn-Programm (NCBI) durchgeführt.

Ergebnisse

1. Analyse der Interaktionen von VirB5 *in vitro*

VirB5-Proteine sind Pilus-assoziierte T4SS-Komponenten. Sie sind für die Typ IV-Sekretion essentiell und spielen eine wichtige Rolle in der T-Pilus-Biogenese. Welche Funktion sie dabei übernehmen ist bis *dato* ungeklärt. Möglich ist eine Beteiligung an der spezifischen Adhäsion an die Wirts- bzw. Rezipientenzelle. Alternativ wird in Anlehnung an den *chaperon/usher-pathway* eine Funktion als *chaperon* (=Faltungshelfer) für die Piluskomponente VirB2 oder als *usher* diskutiert. Usher-Proteine erleichtern die Freisetzung der Pilin-Untereinheiten über die äußere Membran (Sauer *et al.*, 2000). VirB5 ist ein hydrophiles Protein, welches aber primär mit der Membran assoziiert (Cao und Saier, 2001). VirB5 könnte somit auch die Basis des Pilus mit dem Periplasma verbinden, wobei Interaktionen mit den Komponenten des Kernkomplexes eine bedeutende Rolle spielen könnten. Zu den VirB-Proteinen des Kernkomplexes zählt man VirB6 bis VirB10. Es gibt inzwischen viele Hinweise, dass diese Proteine miteinander interagieren und dabei als Kern der Transfermaschinerie sowohl die innere als auch die äußere Membran durchspannen (Beaupré *et al.*, 1997; Das und Xie, 2000; Jakubowski *et al.*, 2003; Krall *et al.*, 2002; Spudich *et al.*, 1996).

Um der Frage nachzugehen, welche Protein-Interaktionen von VirB5 im Verlauf der Pilusbiogenese eine Rolle spielen, oder ob VirB5 die oberflächen-exponierten Virulenzproteine mit dem Kernkomplex verankert, sollten mögliche Interaktionen von VirB5 *in vitro* analysiert werden. Das Vorhandensein solcher Interaktionen würde neue Einblicke in den Assemblierungs-Mechanismus der T4SS-Komplexe ergeben.

1.1. Aufreinigung der Virulenzproteine

Bisher wurden viele Untersuchungen der Struktur des VirB/D4-Sekretionssystems in *A. tumefaciens* durchgeführt, aber detaillierte biochemische Analysen einzelner Komponenten liegen nicht vor. Ein Grund dafür ist die Tatsache, dass die VirB-Proteine in membrangebundene Komplexe assemblieren. Es handelt sich dabei größtenteils um integrale Membranproteine oder membran-assoziierte Proteine, die eine oder mehrere hydrophobe

Domänen aufweisen. Basierend auf *in silico*-Vorhersagen der hydrophoben Bereiche wurden im Rahmen dieser Arbeit nur periplasmatische Regionen der Proteine für die biochemischen Analysen aufgereinigt. Dabei muss natürlich berücksichtigt werden, dass Interaktionen, die durch membrangebundene Anteile eingegangen werden, auf diesem Weg nicht identifiziert werden können. Untersuchungen in anderen Laboren mit genetischen Methoden zeigten allerdings, dass wahrscheinlich die periplasmatischen Domänen die für die Interaktionen relevanten Bereiche enthalten (Das und Xie, 2000; Kumar und Das, 2001).

Vergleichende Analysen der Löslichkeit rekombinant produzierter VirB-Proteine von *A. tumefaciens* und *B. suis* zeigten, dass die Virulenzproteine von *B. suis* nach Überproduktion in *E. coli* eine höhere Löslichkeit aufwiesen und in größeren Mengen aufgereinigt werden konnten. Die *in vitro*-Analysen der VirB5-Interaktionen wurden deshalb mit VirB-Proteinen von *B. suis* durchgeführt.

1.1.1. Aufreinigung als StrepII-Fusionsproteine

Für die Interaktionsstudien wurden sämtliche Proteine als N-terminal StrepII-markierte Fusionsproteine aufgereinigt. Es handelt sich bei StrepII um ein acht Aminosäuren langes, Streptavidin-bindendes Peptid (WSHPQFEK). Der Vorteil des Strep-tagII als Fusionspartner rekombinanter Proteine liegt in der Kürze des Peptids und in seiner Aminosäure-Zusammensetzung. Das nur etwa 1050 Da große Peptid sollte, wenn der N-Terminus des Proteins an der Oberfläche exponiert ist, keinen Effekt auf die Proteinstruktur und damit auf die biologische Aktivität ausüben. Zudem bindet es mit hoher Affinität an Strep-Tactin (ein Streptavidin-Derivat) und lässt sich somit effizient mittels Affinitäts-Chromatographie aufreinigen. Zur Expression der Virulenzgene wurden pT7-7-StrepII-Plasmid-tragende *E. coli*-Stämme (GJ1158) in LBON-Medium kultiviert, mittels NaCl induziert und für 20 Stunden bei 26°C inkubiert. Eine Ausnahme bildeten pT7-7-StrepII-*virB8*-tragende Zellen. Eine Expression von 4 Stunden bei 37°C erwies sich in diesem Fall als ausreichend, um große Mengen löslichen Proteins zu erhalten. Die Zellen wurden mittels Passage durch eine *French-Press*-Zelle aufgebrochen, Zelltrümmer wurden sedimentiert und die Fusionsproteine aus dem Rohextrakt unter Verwendung des *Strep-tag Purification System* der Firma IBA (Göttingen) aufgereinigt. Um sauberes StrepII-VirB8 zu erhalten war diese Affinitäts-Chromatographie ausreichend. Im Fall von StrepII-VirB9 und StrepII-VirB10 wurden die mittels Affinitäts-Chromatographie gewonnenen Proteinlösungen in einem zweiten Schritt gefiltrationschromatographisch aufgetrennt, um die Verunreinigungen durch andere Proteine zu minimieren. Bei der Aufreinigung von StrepII-VirB5 stellte sich eine weitere Auftrennung

mittels Anionenaustausch-Chromatographie als die effektivste Methode heraus (siehe Abb. 6). Abbildung 4 zeigt exemplarisch den Verlauf der Reinigung des StrepII-VirB8-Fusionsproteins. Proben aller durchgeführten Reinigungsschritte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend einer Coomassie-Färbung zur Prüfung der Reinheit unterzogen.

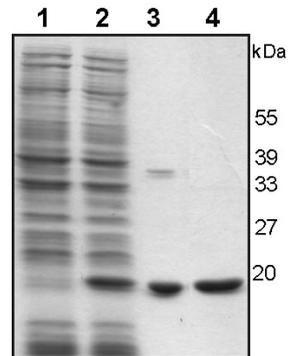


Abbildung 4: Überproduktion und Reinigung des StrepII-VirB8-Fusionsproteins. Proben von Zelllysaten und Säulenfraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel wurde anschließend mit Coomassie angefärbt. **(1)** Zelllysat vor und **(2)** nach der 4-stündigen Induktion, **(3)** Fraktion nach Elution von der Strep-Tactin-Säule, **(4)** 1 µg des StrepII-VirB8-Proteins nach Dialyse in 50% Glycerinpuffer.

1.1.2. Aufreinigung als His₆Trx-Fusionsprotein

Da für die geplanten Ko-Adsorptionsversuche Strep-Tactin-Sepharose als Affinitätsmatrix verwendet werden sollte, durfte einer der zu testenden Interaktionspartner keine StrepII-Fusion aufweisen. Aus diesem Grund wurden sämtliche Proteine zusätzlich als His₆Trx-Fusionen aufgereinigt (VirB5, VirB7 – VirB10). Die Expression erfolgte dabei unter Verwendung des Plasmids pT7-H₆TrxFus, in das das entsprechende Virulenzgen-Fragment kloniert worden war (die Klonierungen wurden von N. Domke durchgeführt). Die Fusion an das 12 kDa große Protein Thioredoxin von *E. coli* diente dabei einer Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins (LaVallie *et al.*, 1993). Auf Grund der N-terminalen Histidin-Reste konnten die Proteine unter Verwendung einer *Talon Superflow Metal Affinity*-Säule affinitäts-chromatographisch aufgereinigt werden. Auch hier erfolgte wie unter 1.1.1. beschrieben ein weiterer Reinigungsschritt unter Verwendung einer Gelfiltrationssäule (VirB7 - VirB10) oder einer Anionenaustausch-Chromatographie-Säule (VirB5). Der Verlauf der Reinigung von His₆Trx-VirB8 ist in Abbildung 5 exemplarisch dargestellt.

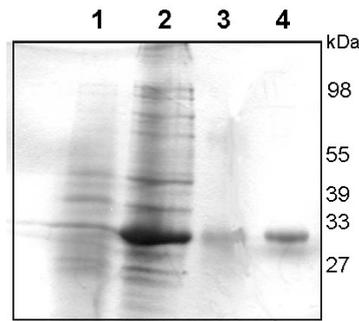


Abbildung 5: Überproduktion und Reinigung des His₆Trx-VirB8-Fusionsproteins. Proben von Zelllysaten und Säulenfraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele anschließend mit Coomassie angefärbt. **(1)** Zelllysate vor und **(2)** nach der 4-stündigen Induktion, **(3)** Fraktion nach Elution von der Talon-Superflow-Säule, **(4)** 1 µg des His₆Trx-VirB8-Proteins nach Dialyse in 50% Glycerinpuffer.

Die Konzentrationen der gereinigten Proteine wurden nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Abbildung 6 zeigt gereinigte StrepII- bzw. His₆Trx- Fusionsproteine nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

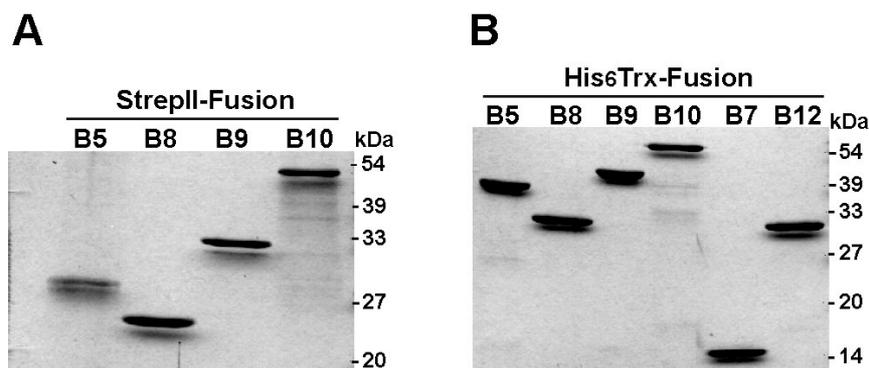


Abbildung 6: SDS-PAGE der gereinigten Virulenzproteine von *B. suis*. Jeweils 1 µg der Proteine wurde aufgetragen und das Gel nach gelelektrophoretischer Separation mit Coomassie gefärbt. **(A)** StrepII-Fusionsproteine; **(B)** His₆Trx-Fusionsproteine

1.2. Analyse der Ausbildung von Oligomeren

Vor der Durchführung verschiedener Interaktionsstudien sollte eine biochemische Charakterisierung der Virulenzproteine von *B. suis* erfolgen. Dazu gehörte sowohl eine Überprüfung der Multimerbildung mittels Quervernetzung der einzelnen Proteine, als auch die Bestimmung des Molekulargewichtes durch Gelfiltrations-Chromatographie.

1.2.1. Quervernetzung von VirB-Proteinen mit Formaldehyd

Um die Multimerbildung der Virulenzproteine zu charakterisieren, wurde Formaldehyd (FA) als Vernetzungsreagenz verwendet. FA ist ein kleines, reaktives und wasserlösliches Molekül, das zur Vernetzung von Proteinen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eingesetzt wird. Durch FA werden primär auf der Oberfläche liegende Lysin-, Cystein- und Tyrosin-Reste der Proteine verknüpft. Zur Quervernetzung wurden je 2 µg der gereinigten Proteine mit StrepII-Fusion (im Fall von VirB7 und VirB12 mit His₆Trx-Fusion) für eine halbe Stunde mit steigenden Konzentrationen FA inkubiert und anschließend mit 1 Volumen SB-Puffer versetzt. Da die durch FA verknüpften Verbrückungen hitzelabil sind, wurden die Proben nach der Zugabe des SB-Puffers zur Denaturierung nur auf 37°C erwärmt. Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE erfolgte eine Detektion der höhermolekularen Komplexe durch *Western Blot* mit spezifischen Antisera (Abb. 7).

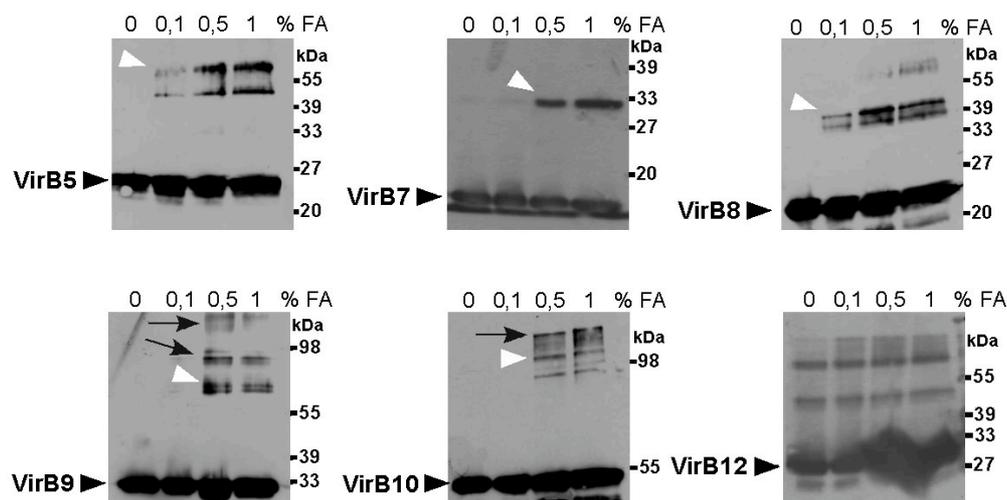


Abbildung 7: Quervernetzung einzelner Virulenzproteine aus *B. suis* mit Formaldehyd. Je 2 µg der gereinigten Proteine wurden mit 0-1% Formaldehyd (FA) versetzt. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE separiert und die Detektion erfolgte mit VirB-Protein-spezifischen Antisera. Die schwarzen Pfeilspitzen markieren die nicht-vernetzten Vir-Proteine, weiße Pfeilspitzen mögliche Homodimere, schwarze Pfeile höhermolekulare Homooligomere.

Mit Ausnahme von VirB12 wurden bei allen untersuchten Virulenzproteinen nach Quervernetzung Signale im Bereich höherer molekularer Massen nachgewiesen. Deutlich war zu erkennen, dass der Einsatz steigender Konzentrationen von FA zu stufenweise ansteigenden Mengen der Homo-Multimere führte. Im Fall von VirB5 wurden bereits ab einer FA-Konzentration von 0,1% neben dem Monomer Signale auf einer Höhe von ungefähr 55 kDa detektiert, was einem Dimer entsprechen könnte. Sehr ähnliche Vernetzungsmuster wurden im Fall von VirB7 (Vernetzungsprodukt ungefähr 33 kDa) und VirB8

(Vernetzungsprodukt ungefähr 40 kDa) beobachtet. Im Versuchsansatz mit VirB8 wurden aber ab einer Konzentration von 1% FA zusätzliche Signale im höhermolekularen Bereich ausgemacht, die einem Trimer entsprechen könnten (ungefähr 65 kDa). Im Fall von VirB9 und VirB10 wiesen die Quervernetzungsprodukte ab einer FA-Konzentration von 0,5% auf eine Dimerisierung (ungefähr 65 kDa bei B9, bzw. 110 kDa bei VirB10) hin. Offensichtlich bilden diese beiden Proteine aber in Lösung auch höhermolekulare Homo-Multimere aus (Trimere oder Tetramere).

Die Multimere der verschiedenen Virulenzproteine wurden beim Einsatz verschiedener FA-Konzentrationen detektiert. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Quervernetzung über das StrepII-Peptid erfolgte, da sich ansonsten ein einheitlicheres Vernetzungsprofil ergeben sollte. Gleiches gilt auch für His₆Trx als Fusionspartner. Falls die Vernetzung durch Thioredoxin erfolgte, würde man auch im Fall von His₆Trx-VirB12 Quervernetzungsprodukte erwarten, so wie sie bei His₆Trx-VirB7 detektiert wurden. Vergleichbare Untersuchungen der Virulenzproteine von *A. tumefaciens* ergaben im Fall von VirB5 und VirB8 - VirB10 ähnliche Resultate (unveröffentlichte Daten), was als ein weiterer Beleg für die Spezifität der gebildeten Komplexe herangezogen werden kann.

1.2.2. Analyse mittels Gelfiltrations-Chromatographie

Zur weiteren Analyse der Ausbildung von Oligomeren wurden die Virulenzproteine mittels Gelfiltrations-Chromatographie untersucht. Zur gelfiltrations-chromatographischen Auftrennung wurde eine Superdex-200 Säule mit einem Auftrennungsbereich von 10 - 600 kDa genutzt. Je 100 µg der gereinigten Proteine wurden über die mit StrepII-Puffer äquilibrierte Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetrennt. Um den Gehalt von Proteinen in den eluierten Fraktionen zu untersuchen, wurden die Proben mit TCA gefällt, in SB-Puffer denaturiert, mittels SDS-PAGE separiert und einer *Western Blot*-Analyse unterzogen (Daten nicht gezeigt). Referenzproteine bekannter molekularer Masse wurden unter denselben Bedingungen aufgetrennt. An Hand der resultierenden Kalibrierungskurve wurde dem Elutionsvolumen der VirB-Proteine eine molekulare Masse zugeordnet. Eine Übersicht über die Fraktionierung der Virulenzproteine ist in Tabelle 7 gegeben.

Alle Proteine bildeten neben Monomeren und Dimeren noch Aggregate, deren molekulare Massen oberhalb des Auftrennungsbereiches der Gelfiltrationssäule lagen. Diese Aggregatbildung konnte auch durch Zugabe von DTT oder Veränderungen der Zusammensetzung des Puffers (z.B. Erhöhung der Salzkonzentration) nicht verringert

werden. Ob es sich hierbei um unspezifische Aggregate oder multimere Komplexe der Proteine handelt, konnte mit dem eingesetzten analytischen System nicht festgestellt werden.

Tabelle 7: Oligomer-Bildung der Virulenzproteine von *B. suis*. Die molekularen Massen der einzelnen Proteine wurden nach Auftrennung mittels einer Superdex-200 Gelfiltrationssäule an Hand einer Kalibrierungskurve errechnet.

Protein	kalkulierte molekulare Masse des Monomers	M^r errechnet mittels Gelfiltrationsanalyse	Oligomerer Zustand
StrepII-VirB5	27 kDa	59 kDa	Dimer
His ₆ Trx-VirB7	16,5 kDa	15 kDa	Monomer
StrepII-VirB8	22 kDa	26 kDa	Monomer
StrepII-VirB9	33 kDa	41 kDa	Monomer
StrepII-VirB10	43 kDa	92 kDa	Dimer
His ₆ Trx -VirB12	29 kDa	32 kDa	Monomer

Die Ergebnisse der Gelfiltrations-Chromatographie unterschieden sich besonders im Fall von StrepII-VirB8 und StrepII-VirB9 von den Resultaten der Quervernetzungsversuche. Nach Auftrennung mittels einer Gelfiltrationssäule wurde keine Bildung von Homomultimeren nachgewiesen, obwohl eine Vernetzung zu Dimeren (StrepII-VirB8 und StrepII-VirB9) oder Komplexen höherer molekularer Massen mittels FA erfolgte (Abb. 7). Dies könnte darauf beruhen, dass durch den Einsatz von Vernetzungs-Reagenzien auch schwache/transiente Interaktionen fixiert wurden. Somit könnten auch Proteine verknüpft werden, die in der Lage sind, eine zumindest vorübergehende Bindung einzugehen. Solche schwachen Bindungen würden bei einer Analyse mittels Gelfiltration, bei der die molekulare Masse der Hauptform des Proteins bestimmt wird, nicht zu detektieren sein.

1.3. Analyse von Interaktionen mittels Gelfiltrations-Chromatographie

Ausgehend von der Annahme, dass die ausgewählten Virulenzproteine innerhalb eines funktionalen T4SS in einen multimeren Komplex assemblieren, sollten die sich dabei ausbildenden Interaktionen genauer untersucht werden. Nachdem das Elutionsvolumen der einzelnen Virulenzproteine bekannt war, sollte versucht werden auch Proteingemische gelfiltrations-chromatographisch aufzutrennen. Falls Proteine nach Mischung eine Interaktion ausbilden, sollte sich das in einem veränderten Elutionsvolumen niederschlagen. Je 50 µg der StrepII-Fusionsproteine (StrepII-VirB5, StrepII-VirB8 - 10) wurden paarweise gemischt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Gemische unter Verwendung einer Superdex-75-Gelfiltrationssäule in StrepII-Puffer und der Proteingehalt der

eluierten Fraktionen wurde mittels *Western Blot*-Analyse untersucht. Gemische aus nur zwei Proteinen und Kombinationen mehrerer Proteine wurden aufgetrennt, jedoch ergab sich in keinem der Ansätze ein signifikant von den Analysen der einzelnen Proteine abweichendes Elutionsvolumen (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise sind die Interaktionen nicht stabil genug, um auch während einer Gelfiltrations-chromatographischen Auftrennung bestehen zu bleiben. Im Folgenden wurden deshalb weitere Ansätze zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen durchgeführt.

1.4. Analyse von Interaktionen durch Ko-Adsorption

Eine wichtige Voraussetzung für die in dieser Arbeit durchgeführten Ko-Adsorptionsversuche war die hohe Affinität der StrepII-Fusionsproteine zur StrepTactin-Sepharose von IBA (Göttingen). StrepII-Proteine wurden mit His₆Trx-fusionierten Proteinen gemischt, mittels Bindung an StrepTactin-Sepharose sedimentiert und gewaschen. Das an die Sepharosematrix gebundene StrepII-Protein wurde anschließend zusammen mit dem interagierenden Protein eluiert. Zur Elution wurde hierbei nicht das von IBA empfohlene Desthiobiotin sondern Biotin verwendet. Damit wurde eine schnellere und effektivere Trennung des StrepII-Fusionsproteins von der Matrix erreicht. Für die Ko-Adsorptionsversuche wurden die Virulenzproteine von *B. suis* sowohl als StrepII-Fusionsproteine, als auch als His₆Trx-Proteine gereinigt. Zur Analyse wurden je 50 pmol der beiden zu untersuchenden Proteine gemischt und nach Inkubation von 30 Minuten zu 20 µl StrepTactin Sepharose-Suspension gegeben. Nach dreimaligem Waschen der Sepharose wurde das an die Matrix gebundene StrepII-Fusionsprotein mit Biotin eluiert. Um festzustellen, ob zusammen mit dem StrepII-Protein ein interagierendes Protein eluierte, wurde die Probe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer *Western Blot*-Analyse mit spezifischen Antisera unterzogen.

Zunächst wurden die Interaktionen der Virulenzproteine His₆Trx-VirB7 - VirB10 mit StrepII-VirB5 analysiert (Abb. 8). Um die Spezifität einer Interaktion zu belegen, wurde bei jedem Versuch parallel ein Ansatz mitgeführt, der nur StrepTactin-Sepharose und das zu analysierende His₆Trx-VirB-Protein enthielt (Abb. 8 A-E, zweite Spure). Somit konnten unspezifische Bindungen an die Sepharosematrix detektiert werden. Als zusätzliche Negativ-Kontrolle diente der Ansatz, in dem His₆Trx-VirB10 von *A. tumefaciens* mit StrepII-VirB5 von *B. suis* gemischt wurde (Abb. 8 E).

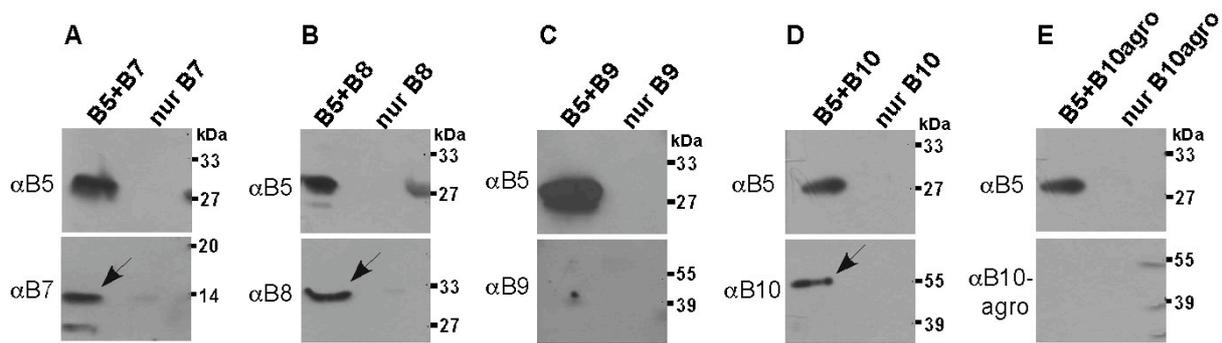


Abbildung 8: Ko-Elution von His₆Trx-VirB-Proteinen mit StrepII-VirB5 nach Bindung an StrepTactin-Sephrose. Die durch Zugabe von Biotin von der Sepharose eluierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mittels spezifischer Antisera (α) detektiert. **(A)** StrepII-VirB5 + His₆Trx-VirB7; **(B)** StrepII-VirB5 + His₆Trx-VirB8; **(C)** StrepII-VirB5 + His₆Trx-VirB9; **(D)** StrepII-VirB5 + His₆Trx-VirB10; **(E)** StrepII-VirB5 + His₆Trx-VirB10 aus *A. tumefaciens* (Kontrolle). Ko-eluierte Proteine sind mit einem schwarzen Pfeil markiert.

His₆Trx-VirB7 (Abb. 8 A), His₆Trx-VirB8 (Abb. 8 B) und His₆Trx-VirB10 (Abb. 8 D) fraktionierten zusammen mit StrepII-VirB5 und wurden gemeinsam von der Matrix eluiert. Im Gegensatz dazu wurde keine Interaktion zwischen StrepII-VirB5 und His₆Trx-VirB9 detektiert. Die unspezifische Bindung von His₆Trx-VirB5 an die Matrix verhinderte den Einsatz dieser Methode zur Analyse der Interaktion mit StrepII-VirB5. Auch eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 500 mM NaCl oder die Zugabe von Detergenzien (Triton X-100, Thesit) verhinderten die unspezifische Bindung nicht (Daten nicht gezeigt). Somit konnte auch die Bindung von His₆Trx-VirB5 an StrepII-VirB8 und StrepII-VirB10 zur Bestätigung obiger Interaktionen nicht untersucht werden. Dennoch zeigten diese Ergebnisse zum ersten Mal, dass VirB5 mit Proteinen des Kernkomplexes interagieren könnte. Die Interaktion zwischen VirB5 und dem Lipoprotein VirB7 unterstützt die Annahme, dass diese beiden Proteine sich gegenseitig stabilisieren und gemeinsam an der Verankerung des T-Pilus mit dem Periplasma beteiligt sein könnten (Krall *et al.*, 2002).

Im Folgenden wurden die Interaktionen der Kernkomponenten VirB8, VirB9 und VirB10 genauer analysiert (Abb. 9 und 10). Die inzwischen in verschiedenen Experimenten belegten Interaktionen zwischen VirB8, VirB9 und VirB10 in *A. tumefaciens* (Beaupré *et al.*, 1997; Das und Xie, 2000; Ward *et al.*, 2002) wurden in dieser Arbeit auch im Fall der Homologen aus *B. suis* nachgewiesen. His₆Trx-VirB8 fraktionierte mit StrepII-VirB8 und StrepII-VirB10 (Abb. 9 A und 9 C). Eine Interaktion von His₆Trx-VirB9 mit StrepII-VirB8 wurde im Gegensatz zu den Resultaten mit den *Agrobacterium*-Proteinen allerdings nicht beobachtet (Abb. 9 B). Möglicherweise interagieren diese Proteine in *B. suis* nicht, aber auch die

Bindung des StrepII-VirB8 Proteins an die Matrix bzw. die Fusion von His₆Trx an VirB9 könnten die Interaktion *in vitro* verhindern.

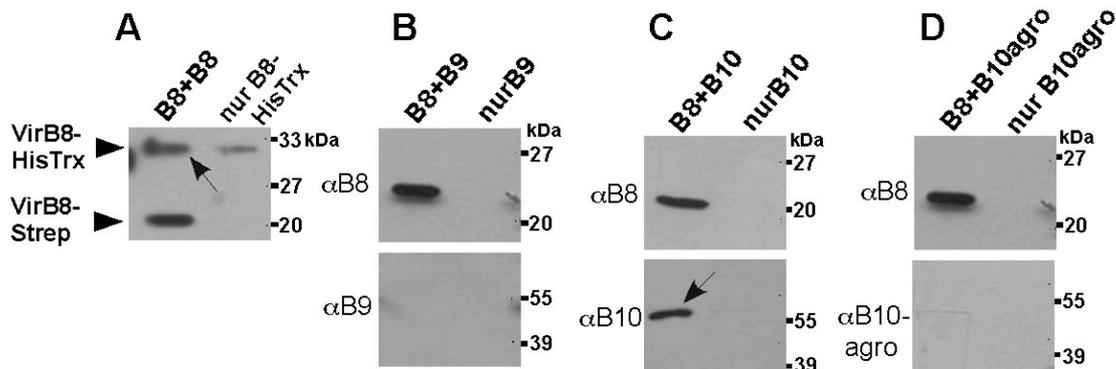


Abbildung 9: Ko-Elution von His₆Trx-VirB-Proteinen mit StrepII-VirB8 nach Bindung an StrepTactin-Sepharose. Die durch Zugabe von Biotin von der Sepharose eluierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mittels spezifischer Antisera (α) detektiert. **(A)** StrepII-VirB8 + His₆Trx-VirB8; **(B)** StrepII-VirB8 + His₆Trx-VirB9; **(C)** StrepII-VirB8 + His₆Trx-VirB10; **(D)** StrepII-VirB8 + His₆Trx-VirB10 aus *A. tumefaciens* (Kontrolle). Ko-eluierte Proteine sind mit einem schwarzen Pfeil markiert.

Der Ansatz mit StrepII-VirB10 als an die Affinitätsmatrix gebundenem Protein zeigte Ko-Fraktionierung mit His₆Trx-VirB8, His₆Trx-VirB9 sowie mit His₆Trx-VirB10 (Abb. 10 A-C).

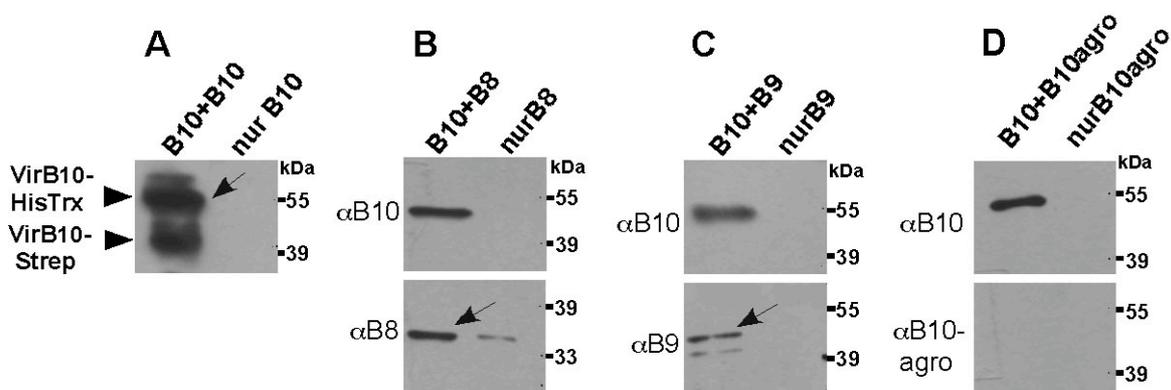


Abbildung 10: Ko-Elution von His₆Trx-VirB-Proteinen mit StrepII-VirB10 nach Bindung an StrepTactin-Sepharose. Die durch Zugabe von Biotin von der Sepharose eluierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mittels spezifischer Antisera (α) detektiert (α). **(A)** StrepII-VirB10 + His₆Trx-VirB10; **(B)** StrepII-VirB10 + His₆Trx-VirB8; **(C)** StrepII-VirB10 + His₆Trx-VirB9; **(D)** StrepII-VirB10 + His₆Trx-VirB10 aus *A. tumefaciens* (Kontrolle). Ko-eluierte Proteine sind mit einem schwarzen Pfeil markiert.

1.5. Analyse von Interaktionen mittels des Zwei-Hybrid-Systems

Neben den biochemischen Ansätzen zur Analyse der VirB5-Interaktionen wurde das Hefe Zwei-Hybrid-System eingesetzt (Fields und Song, 1989). In dieser Arbeit wurden Hefestämme und Vektoren des *Matchmaker Two-Hybrid-Systems 3* (BD Bioscience Clontech) verwendet. Es handelt sich hierbei um ein auf dem Transkriptionsaktivator GAL4 basierendes System und umfasst zwei Fusionsproteine: den „Köder“ (*bait*), bei dem 147 Aminosäuren einer GAL4 DNA-Bindedomäne (DNA-BD) an das zu untersuchende Protein fusioniert werden und zum anderen die „Beute“ (*prey*), bei dem 113 Aminosäuren einer GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) an einen potentiellen Interaktionspartner fusioniert sind (Abb.11). Wenn das Köder- und das Beute-Fusionsprotein interagieren, gelangen DNA-BD und AD so nah aneinander, dass der Aktivator die Transkription von Reportergenen aktiviert, was zu einem leicht selektierbaren Phänotyp führt. Der im *Matchmaker*-System eingesetzte Hefestamm AH109 nutzt drei Reportergene (*ADE2*, *HIS3* und *lacZ*), die unter der Kontrolle nicht identischer GAL4 *upstream activating sequences* (UASs) und TATA-Erkennungssequenzen stehen (James *et al.*, 1996) (s. Abb. 11). Durch den Einsatz mehrerer Selektionsschritte können Klone identifiziert werden, deren Wachstum auf Artefakten beruht.

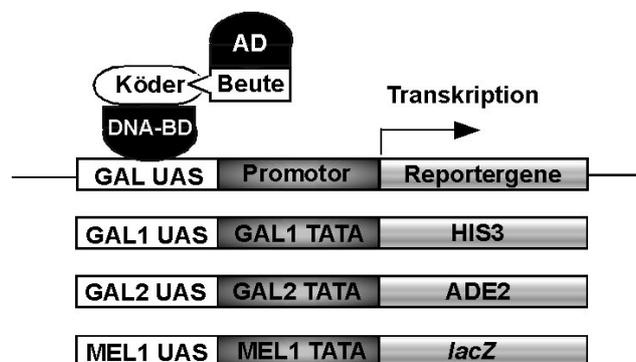


Abbildung 11: Das Prinzip des Hefe Zwei-Hybrid-Systems und die Reportergen-Konstrukte im Hefestamm AH109. Der Transkriptionsaktivator GAL4 bindet an UAS (*upstream activating sequence*) der von ihm kontrollierten Gene und aktiviert deren Transkription. In Stamm AH109 wurden die Gene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ* mit der GAL4-UAS verbunden und das Wildtyp *gal4*-Gen wurde eliminiert. Die Reportergene stehen unter der Kontrolle von drei verschiedenen GAL4-abhängigen UAS und Promotor-Regionen (GAL1, GAL2 und MEL1). Interagiert ein an die GAL4 DNA-Bindedomäne (DNA-BD) fusioniertes Protein mit einem an die Aktivierungsdomäne (AD) fusionierten Protein, wird GAL4 aktiviert und die Transkription der Reportergene erfolgt. Dies hat einen detektierbaren Wechsel im Phänotyp von AH109 zur Folge.

1.5.1. Konstruktion der Expressionsvektoren

Für die Durchführung der Analysen wurden die für die Virulenzproteine kodierenden Gene in die Zwei-Hybrid-Expressionsvektoren pGADT7 und pGBKT7 kloniert. Neben einem T7-Promotor für die Expression der Gene in *E. coli* besitzen beide Vektoren einen konstitutiven ADH1-Promotor, der die Expression in Hefe ermöglicht. Die im Zwei-Hybrid-System eingesetzten Vektoren sind schematisch in Abbildung 12 dargestellt.

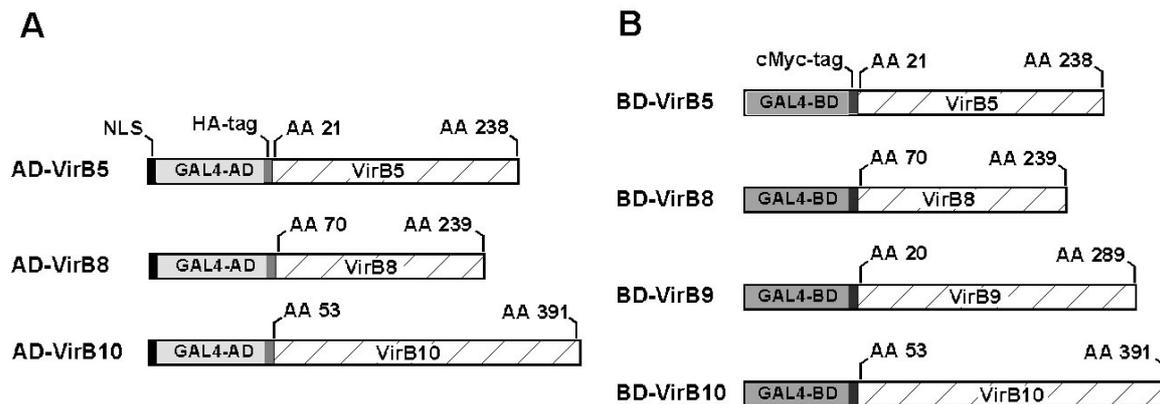


Abbildung 12: Überblick der im Zwei-Hybrid-System eingesetzten Fusionen aus VirB-Proteinen und GAL4-Domänen. Für die Konstruktion der VirB-Fusionsproteine wurden die periplasmatischen Bereiche der jeweiligen Proteine eingebracht. **(A)** Die Fusion mit GAL4 AD führt zusätzlich zu einer Hämagglutinin-Peptid-Markierung. **(B)** Die GAL4 BD-VirB-Fusionsproteine sind zusätzlich an das cMyc-Peptid fusioniert. NLS: *nuclear localization signal*; HA-tag: Hämagglutinin-Markierung

Unter der Verwendung spezifischer Oligonukleotide (Tab. 6) wurden die verschiedenen Genfragmente amplifiziert, mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und in die Vektoren pGADT7 und pGBKT7 eingebracht. Alle konstruierten Plasmide wurden mittels Sequenzanalyse überprüft. Die Selektion auf plasmid-tragende Zellen erfolgte in *E. coli* anhand der Ampicillin-(pGADT7) bzw. Kanamycin-Resistenz (pGBKT7). In Hefe wurden als Selektionsfaktoren die Synthese von Leucin (pGADT7, LEU2) und Tryptophan (pGBKT7, TRP1) genutzt.

Vor der Durchführung der Analyse wurden die konstruierten Plasmide in Vorversuchen auf folgende Kriterien hin überprüft:

- 1) Die Genprodukte dürfen für Hefe nicht toxisch sein. Alle plasmid-tragenden Hefestämme wuchsen sowohl in Minimalmedium als auch in Vollmedium wie der plasmid-freie Stamm AH109.
- 2) Die plasmid-kodierten Gene müssen in der Hefe stabil exprimiert werden. Hierfür wurden die einzelnen Plasmide in Hefe transformiert. Die resultierenden Klone wurden als

Tageskulturen in Vollmedium kultiviert und Zellysate hergestellt. Die Überprüfung der Produktion der VirB-Fusionsproteine erfolgte mittels *Western Blot*-Analyse und spezifischen Antisera. Alle Fusionsproteine wurden in AH109 detektiert (Daten nicht gezeigt).

3) *VirB*-Genfragmente enthaltende Plasmide dürfen nicht von sich aus die Transkription der Reportergene aktivieren. Plasmid-tragende Hefestämme wurden zur Kontrolle auf Minimalmedium ohne Adenin und Histidin (SD -Ade/-His/-Leu bzw. Trp) ausgestrichen und das Wachstum überprüft. Nur im Fall der Vektoren pGBKT7-*virB8* und pGADT7-*virB8* wurde eine Aktivierung des HIS3-Reportergenes beobachtet. Diese konnte aber durch Zugabe von 7,5 mM 3-AT (3-Amino-1, 2, 4-Triazol) zum SD-Medium unterbunden werden. Bei 3-AT handelt es sich um einen kompetitiven Inhibitor des HIS3-Proteins der Hefe und es wird eingesetzt, um „Hintergrundwachstum“ auf SD-Medium ohne Histidin zu unterdrücken.

1.5.2. Detektion von Interaktionen mittels GAL4-abhängiger Reportergene

Die Expressionsvektoren wurden in unterschiedlichen Kombinationen (z.B. pGADT7-*virB5* zusammen mit pGBKT7-*virB8*) mittels einer „Ein-Schritt“-Transformation in den Hefestamm AH109 eingebracht. Als Kontrollvektoren zur Identifizierung einer Interaktion dienten die Plasmide pGADT7-T (Fusion des T-Antigens des Virus SV40 an AD) und pGBKT7-53 (Fusion des p53-Proteins der Maus an DNA-BD), die für interagierende Fusionsproteine kodieren. Als Kontrolle wurde bei jeder Transformation ein Ansatz mitgeführt, bei der der Virulenzgen-enthaltende Vektor zusammen mit dem entsprechenden „Gegenplasmid“ ohne Insertion transferiert wurde (z.B. pGADT7-*virB5* zusammen mit pGBKT7 ohne Insertion). Die hier untersuchten Kombinationen von Plasmiden sind in Abbildung 13 gezeigt. Die Selektion plasmid-tragender Stämme erfolgte auf Minimalmedium (SD -Leu/-Trp), pro Ansatz wurden drei voneinander unabhängige Transformationen durchgeführt, bei denen jeweils sechs Klone überprüft wurden. Die Analyse der möglichen Interaktionen erfolgte zum einen über das Wachstum auf Selektionsmedium (SD -Leu/-Trp/-Ade und SD -Leu/-Trp/-His), zum anderen durch Überprüfung der *lacZ*-Aktivität mittels eines X-Gal Kolonie-Filter-Tests (Abbildung 13).

Vektorkombinationen	<i>lacZ</i> -Aktivität	Wachstum auf	
		SD -Leu/-Trp/-His	SD -Leu/-Trp/-Ade
pGAD-T + pGBK-53 (positiv Kontrolle)		+	+
pGAD-<i>virB5</i> + pGBK		--	--
+ pGBK- <i>virB5</i>	(+)	+	+
+ pGBK- <i>virB8</i>	(+)	+	+
+ pGBK- <i>virB9</i>		--	--
+ pGBK- <i>virB10</i>		+	+
pGAD-<i>virB8</i> + pGBK		--	--
+ pGBK- <i>virB5</i>		--	--
+ pGBK- <i>virB8</i>	(+)	+	+
+ pGBK- <i>virB9</i>		--	+
+ pGBK- <i>virB10</i>	(+)	+	+
pGAD-<i>virB10</i> + pGBK		--	--
+ pGBK- <i>virB5</i>		--	--

Abbildung 13: Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit dem Hefe Zwei-Hybrid-System. Aktivierung der Reportergene *ADE2* (Wachstum auf Minimalmedium ohne Adenin), *HIS3* (Wachstum auf Minimalmedium ohne Histidin) und *lacZ* (X-Gal-Kolonie-Filter-Test) nach der Transformation des Hefestammes AH109 mit den links angegebenen Vektoren.

Bei der Versuchsdurchführung mit VirB5 als Beute-Protein (AD-Fusion) wurden Interaktionen mit VirB5 und VirB8 (BD-Fusion) detektiert und alle drei Reportergene wurden aktiviert (Abb. 13). Dass VirB5 möglicherweise mit sich selbst interagiert, hatte sich schon in den Ergebnissen der Gelfiltrationsanalyse und der Quervernetzungsexperimente angedeutet. Darüber hinaus wurde die Interaktion von VirB5 und VirB8, die bereits in den Ko-Adsorptionsversuchen beobachtet wurde, bestätigt. Der reverse Versuch unter Verwendung von VirB8 als Beute-Protein (AD-Fusion) ergab allerdings keinen Hinweis auf eine VirB5-VirB8-Interaktion. Wie auch in der vorausgegangenen biochemischen Analyse wurde keine Interaktion zwischen VirB5 und VirB9 festgestellt und die im Ko-Adsorptionsversuch beobachtete Interaktion zwischen VirB5 und VirB10 konnte ebenfalls nicht untermauert werden. Ein möglicher Grund für die Diskrepanz zwischen den Resultaten dieser und denen der biochemischen Analyse könnten die Fusionen an die GAL4-Domänen sein, die die Bindestellen blockieren oder zu Konformationsänderungen führen könnten. Dadurch könnten mögliche Bindestellen verändert vorliegen und somit eine Interaktion verhindern. Alternativ

könnten die Bedingungen im Hefe-Zellkern (z.B. Ionen-Zusammensetzung, reduzierendes Milieu) die Interaktionen behindern. Bei Verwendung von VirB8 als Beute-Protein wurden Interaktionen mit VirB8 und VirB10 festgestellt (Abb. 13). Bereits im Ko-Elutionsexperiment zeigte sich, dass VirB8 und VirB9 zumindest nicht paarweise interagieren, und dies stimmt mit dem Resultat der entsprechenden Zwei-Hybrid-Analyse überein.

1.5.3. Quantitative β -Galaktosidase-Messung

Die unter 1.5.2. identifizierten Interaktionen wurden weitergehend mit einer quantitativen Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivitäten untersucht. Dies ermöglichte eine Beurteilung der Stärke der Interaktionen.

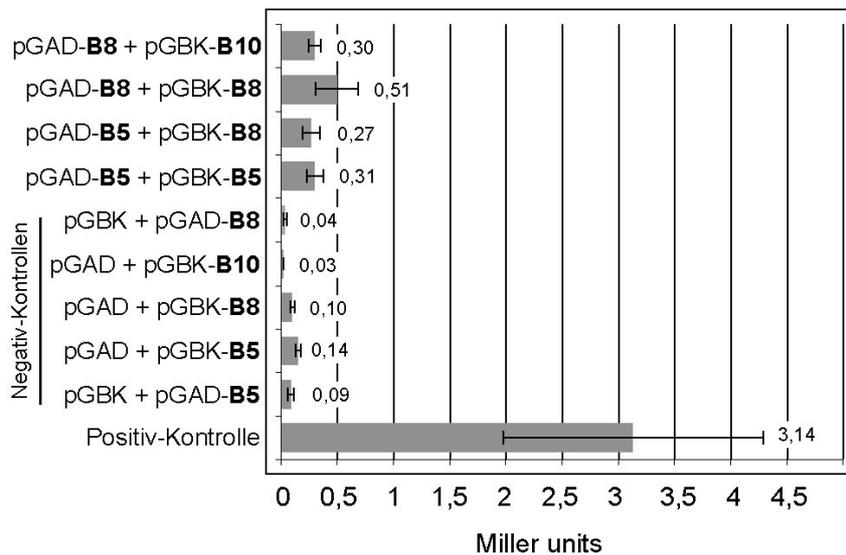


Abbildung 14: Quantifizierung der Protein-Protein-Interaktionen unter Verwendung von ONPG als Substrat. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten wurden in Ko-Transformanden der Expressionsvektoren pGADT7-*virB5* / pGBKKT7-*virB5* bzw. pGBKKT7-*virB8* und Ko-Transformanden der Plasmide pGADT7-*virB8* / pGBKKT7-*virB8* bzw. pGBKKT7-*virB10* quantifiziert. Die β -Galaktosidase-Einheiten (*Miller units*) sind als Mittelwerte von zwei unabhängigen Messungen, in denen je 6 Transformanden getestet wurden, angegeben. Als Positiv-Kontrolle wurde die Interaktion zwischen den Fusionsproteinen BD-p53 und AD-S40 T-Antigen (Clontech / *Matchmaker*-System) verwendet. Als Negativ-Kontrollen dienten die *virB*-Fusionsvektoren mit dem entsprechenden „Gegenplasmid“ ohne Insertion.

Alle unter 1.5.2. identifizierten Interaktionen (VirB5/VirB5, VirB5/VirB8, VirB8/VirB8 und VirB8/VirB10) wurden mittels der β -Galaktosidase-Messung bestätigt. Bei Kombinationen der VirB-Produktion determinierenden Vektoren wurden in AH109 *lacZ*-Aktivitäten von ungefähr 0,3 *Miller units* ermittelt (Abb. 14). Die Stärken der Interaktionen der verschiedenen Fusionsproteine unterscheiden sich somit in den meisten Fällen nicht. Im

Fall der Fusionsproteine AD-VirB8 und BD-VirB8 wurde allerdings eine Enzymaktivität ermittelt, die eine stärkere Bindung der Interaktionspartner vermuten lässt (0,51 *Miller units*). Die Werte der β -Galaktosidase-Aktivitäten waren relativ niedrig aber reproduzierbar und die Unterschiede zu den Resultaten der Kontrollexperimente waren signifikant.

1.6. Struktur-Funktionsanalyse von StrepII-VirB5

In mehreren der oben beschriebenen Experimente wurde eine Interaktion zwischen VirB5 und VirB8 belegt und möglicherweise interagiert VirB5 auch mit VirB10. Durch gerichtete Mutagenese des Gens zur Veränderung einzelner Aminosäuren in VirB5 sollten im Folgenden Bindestellen für VirB8 und VirB10 identifiziert werden. Zur Auswahl der Aminosäuren (As), die ausgetauscht werden sollten, wurde die erst kürzlich aufgeklärte Struktur von TraC genutzt (Yeo *et al.*, 2003) (Abb. 15 B). TraC gehört zur Familie der VirB5-Proteine und wird durch das IncN-Plasmid pKM101 von *E. coli* kodiert. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von TraC mit weiteren VirB5-Homologen unter Berücksichtigung der ermittelten TraC-Struktur ergab, dass die meisten der konservierten Aminosäure-Reste von VirB5-Proteinen verschiedener T4SS in einem hydrophoben „Kern“ des Proteins lokalisieren (Abb. 15 A). Dies legt strukturelle Gemeinsamkeiten nahe. Auch die an Hand der VirB5-Sequenzen getroffenen *in silico* Vorhersagen der Proteinstrukturen wiesen sehr hohe Ähnlichkeiten zur TraC-Struktur auf. Yeo *et al.* (2003) postulierten daher, dass es sich bei TraC um den Prototyp der VirB5-Proteine handelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden strikt konservierte und oberflächen-exponierte Aminosäuren, wie z.B. D73, P85, L163 und D172 verändert, da diese an konservierten Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein könnten (Abb. 15). Zum anderen wurden aber auch Aminosäuren ausgewählt, deren Austausch bei den funktionellen Studien zur TraC-Struktur Effekte auf die biologischen Aktivitäten gezeigt hatten, wie R69 und D142 (Yeo *et al.*, 2003).

1.6.1. Konstruktion der Expressionsvektoren und Reinigung der VirB5-Varianten

Mittels inverser PCR (Oligonukleotide in Tabelle 6) wurden in den Expressionsvektor pT7-7-StrepII-*virB5suis* Mutationen eingebracht, die einen Austausch der jeweiligen Aminosäure zu Alanin bewirkte. Die mutagenisierten und PCR-amplifizierten Plasmide wurden anschließend mit *DpnI* behandelt und in *E. coli* transformiert. Alle Mutationen im *virB5*-Gen wurden durch Restriktions- und Sequenzanalysen bestätigt. Die veränderten Proteine wurden überproduziert und mittels der StrepII-Fusion aufgereinigt, wie unter 1.1.1. für das Wildtyp-Protein beschrieben. Proben der gereinigten VirB5-Varianten wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (Abb. 16).

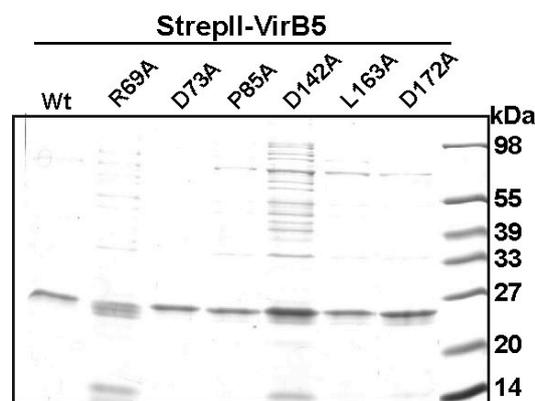


Abbildung 16: SDS-PAGE der angereicherten VirB5-Varianten. Jeweils 1 µg der StrepII-Fusionsproteine wurde aufgetragen und nach gelelektrophoretischer Separation mit Coomassie angefärbt. Wildtyp (Wt): VirB5 aus *B. suis*.

Vergleichende Analysen der Überexpression und Reinigung der verschiedenen VirB5-Varianten zeigten deutliche Unterschiede. Das *virB5/D73A*-Gen wurde als einziges in mit dem Wildtyp vergleichbaren Mengen exprimiert (Daten nicht gezeigt). Besonders auffällig war die reduzierte Überproduktion und Ausbeute bei VirB5/L163A. Ein Grund für dieses Resultat könnte die Lage des Austauschs in der α 2-Helix sein. Die Veränderung einer dort liegenden As könnte sich möglicherweise auf die Stabilität des Proteins auswirken, da die drei α -Helices den Kern des Proteins bilden. Im Fall von VirB5/R69A wurden Abbauprodukte beobachtet, was auf eine Verringerung der Stabilität des Proteins hinweist. Darüber hinaus konnte VirB5/D142A nicht in vergleichbarer Reinheit wie die anderen Proteine gewonnen werden, da die Menge der Überproduktion relativ niedrig war. Alle Fusionsproteine konnten allerdings in den für die nachfolgenden Analysen benötigten Mengen überproduziert und auf das erforderliche Maß gereinigt werden.

1.6.2. Analyse der VirB5-Varianten mittels Ko-Adsorption

Mittels der unter 1.4. beschriebenen Ko-Adsorptionsmethode wurden die Auswirkungen des Austausches einzelner Aminosäuren auf die Interaktionen zwischen VirB5 und VirB8 bzw. VirB5 und VirB10 untersucht. Je 50 pmol der StrepII-VirB5-Varianten wurden mit 50 pmol His₆Trx-VirB8 oder His₆Trx-VirB10 gemischt, mit StrepTactin-Sepharose inkubiert und anschließend wurde die Bindung und gemeinsame Elution untersucht. Die eluierten Proteine wurden mit SB-Puffer versetzt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels *Western Blot*-Analyse untersucht.

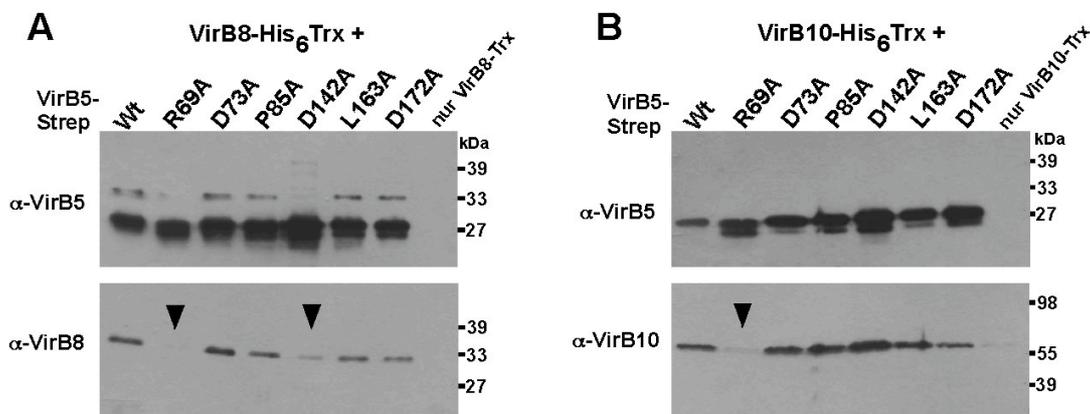


Abbildung 17: Fähigkeit von StrepII-VirB5-Varianten zur Interaktion mit His₆Trx-VirB8 und His₆Trx-VirB10. Die durch Zugabe von Biotin von der Sepharose eluierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mittels spezifischer Antiseren (α) detektiert. Als Positiv-Kontrolle diente StrepII-VirB5 ohne As-Austausch (Wt), als Negativ-Kontrolle das alleine mit der Strep-Tactin-Sepharose inkubierte His₆Trx-Protein. **(A)** Ko-Elutionsversuche der VirB5-Varianten mit VirB8. **(B)** Ko-Elutionsversuche der VirB5-Varianten mit VirB10. Das Fehlen einer Ko-Adsorption der His₆Trx-Proteine ist durch eine schwarze Pfeilspitze markiert.

Wie in Abbildung 17 A zu sehen, binden StrepII-VirB5/R69A und StrepII-VirB5/D142A in mit dem Wt-Protein vergleichbaren Mengen an die StrepTactin-Sepharose. Die Bindung von His₆Trx-VirB8 an die R69A-Variante war jedoch sehr stark, im Fall der D142A-Variante stark verringert. Die Interaktion mit His₆Trx-VirB10 war nur im Fall der R69A-Variante merklich verringert (Abb. 17 B). Die Interaktionen der anderen StrepII-VirB5-Varianten mit His₆Trx-VirB8 und His₆Trx-VirB10 waren von der des Wildtyp-Proteins nicht zu unterscheiden.

1.6.3. Analyse der veränderten VirB5-Proteine mittels Quervernetzung

Zur weiteren Überprüfung dieser Ergebnisse wurden die VirB5-Varianten mit StrepII-VirB8 bzw. StrepII-VirB10 unter Verwendung des *Crosslink*-Reagenz DSS quervernetzt.

DSS ist ein wasserunlösliches homo-bifunktionelles Vernetzungs-Reagenz, das mit primären Aminen reagiert und somit Proteine verknüpft, die interagieren und deren funktionelle Gruppen im geeigneten Abstand voneinander vorliegen. Bei der Bildung stabiler Quervernetzungsprodukte spielen hauptsächlich die ϵ -Amine von Lysinen eine Rolle.

Je 50 pmol der verschiedenen StrepII-VirB5-Proteine wurden mit der gleichen Menge StrepII-VirB8 oder StrepII-VirB10 gemischt, mit Reaktionspuffer versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Die Quervernetzung erfolgte durch Zugabe von DSS, wobei unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt wurden (0, 50 und 100 μ M). Nach 60-minütiger Inkubation wurden die Proben in SB-Puffer für 5 Minuten bei 100°C inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der Quervernetzungsprodukte erfolgte durch *Western Blot*-Analyse mit spezifischen Antiseren. In Abbildung 18 sind die Resultate der Quervernetzungs-Experimente mit StrepII-VirB5-Varianten und StrepII-VirB8 dargestellt. Alle Proben wurden sowohl mit VirB8-spezifischem (Abb. 18), als auch mit VirB5-spezifischem Antiserum (Daten nicht gezeigt) untersucht. Um die Spezifität der Quervernetzung zwischen VirB5 und VirB8 zu überprüfen wurden folgende Kontrollen mitgeführt: Quervernetzung des StrepII-VirB8-Proteins alleine und Quervernetzung der jeweiligen StrepII-VirB5-Variante alleine. Somit konnte klar unterschieden werden, welche der detektierten Signale auf Quervernetzung von VirB8 mit VirB8, auf unspezifischer Reaktion des VirB8-Serums mit den VirB5-Proteinen oder aber auf einer tatsächlichen Verknüpfung von VirB5 und VirB8 beruhte.

Die Zugabe von DSS führte im Fall von StrepII-VirB8 zur Bildung von Homomultimeren (Abb. 18 A-G jeweils zweite und dritte Spur). Es wurden sowohl Dimere identifiziert (ca. 36 kDa), als auch ein Komplex höherer molekularer Masse (ca. 58 kDa). In den Ansätzen, in denen das StrepII-VirB5-Protein (Wt) gemeinsam mit StrepII-VirB8 vorlag, veränderte sich das Quervernetzungs-Muster (Abb. 18 A). Ein neuer Komplex wurde detektiert, der eine molekulare Masse von ungefähr 45 kDa aufwies. Dies weist auf eine Quervernetzung zwischen StrepII-VirB5 und StrepII-VirB8 hin. Auch die Proteine VirB5/D73A, VirB5/P85A, VirB5/L163A und VirB5/D172A wurden nach Zugabe von DSS mit StrepII-VirB8 verknüpft (Abb. 18 C, D, F, G), und die Muster unterschieden sich nicht deutlich von denen des Wt-Proteins. Wie auch in den Ko-Adsorptionsversuchen (1.6.2.) beobachtet, war die Interaktion von VirB8 mit den Varianten VirB5/R69A und VirB5/D142A gestört und es wurden keine Quervernetzungsprodukte zwischen diesen Proteinen identifiziert (Abb. 18 B, E).

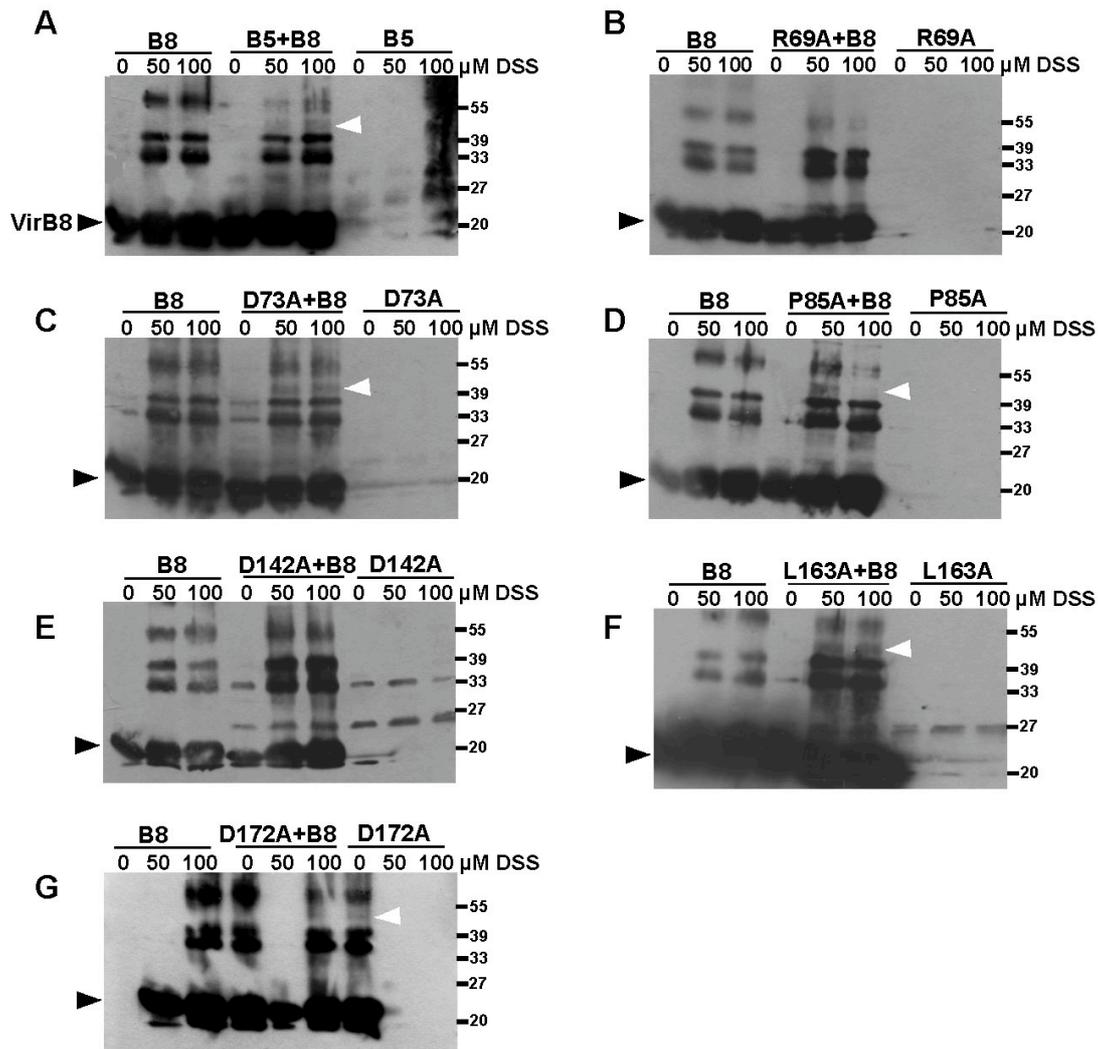


Abbildung 18: Quervernetzung von StrepII-VirB5-Varianten und StrepII-VirB8 mit DSS. Proteine wurden einzeln oder im Gemisch mit 0, 50 und 100 μM DSS quervernetzt und anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt. Mögliche Quervernetzungsprodukte aus VirB5 und VirB8 wurden mit VirB8-spezifischem Antiserum detektiert. **(A)** StrepII-VirB8 und StrepII-VirB5 (Wt); Positiv-Kontrolle, **(B)** StrepII-VirB8 und StrepII-VirB5/R69A, **(C)** StrepII-VirB8 und StrepII-VirB5/D73A, **(D)** StrepII-VirB8 und StrepII-VirB5/P85A, **(E)** StrepII-VirB8 und StrepII-VirB5/D142A, **(F)** StrepII-VirB8 und StrepII-VirB5/L163A, **(G)** StrepII-VirB8 und StrepII-VirB5/D172A. VirB8-Monomere sind mit schwarzen Pfeilspitzen, Quervernetzungsprodukte zwischen VirB5 und VirB8 mit weißen Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Als nächstes wurden die Auswirkungen der Aminosäure-Austausche auf die Interaktion von VirB5 mit VirB10 untersucht. Die Resultate der Quervernetzungs-Experimente der StrepII-VirB5-Varianten mit StrepII-VirB10 sind in Abbildung 19 dargestellt. Wie auch im Fall von StrepII-VirB8 wurde das StrepII-VirB10-Protein durch die Zugabe von DSS zu Dimeren (ca. 90 kDa) und Komplexen höherer molekularer Masse (> 98 kDa) quervernetzt (Abb. 19 A-G jeweils zweite und dritte Spur). Eine Quervernetzung nach Ko-Inkubation von StrepII-VirB5 und StrepII-VirB10 resultierte in einem zusätzlichen Komplex (ca. 75 kDa),

der offensichtlich auf einer Verknüpfung zwischen den beiden Proteinen beruhte (Abb. 19 A). Auch die StrepII-VirB5-Varianten wurden mit dem StrepII-VirB10-Protein zu diesem 75 kDa- Komplex verknüpft (Abb. 19 B – G). Im Gegensatz zu den Resultaten der Ko-Präzipitations-Experimente wurde bei den Quervernetzungs-Experimenten keine Beeinträchtigung der Interaktion zwischen StrepII-VirB10 und der StrepII-VirB5/R69A-Variante beobachtet (Abb. 19 B). Möglicherweise sind die Quervernetzungs-Experimente nicht empfindlich genug, um Veränderungen in der VirB10-Bindestelle von VirB5 zu detektieren.

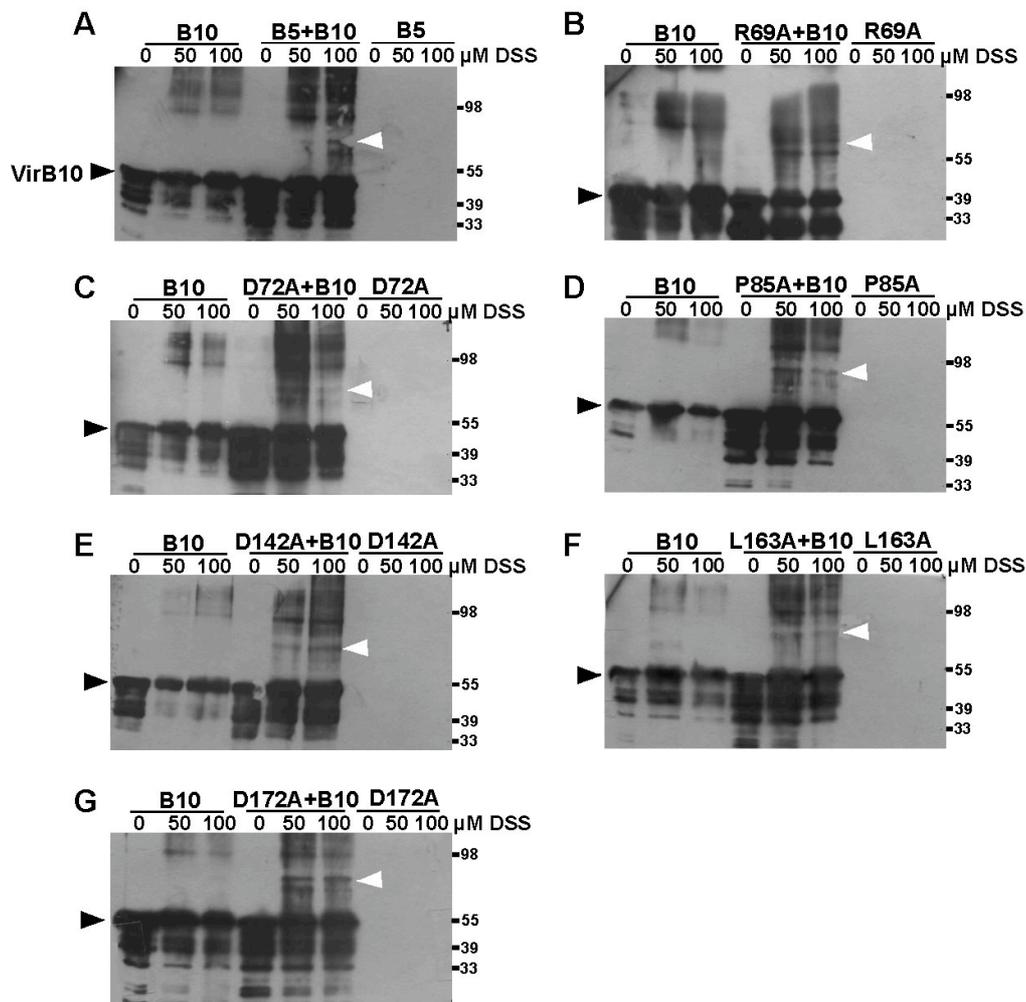


Abbildung 19: Quervernetzung von StrepII-VirB5-Varianten und StrepII-VirB10 mit DSS. Proteine wurden einzeln oder im Gemisch mit 0, 50 und 100 µM DSS quervernetzt und anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt. Mögliche Quervernetzungsprodukte aus VirB5 und VirB10 wurden mit VirB10-spezifischem Antiserum detektiert. (A) StrepII-VirB10 + StrepII-VirB5 (Wt); Positiv-Kontrolle, (B) StrepII-VirB10 + StrepII-VirB5/R69A, (C) StrepII-VirB10 + StrepII-VirB5/D73A, (D) StrepII-VirB10 + StrepII-VirB5/P85A, (E) StrepII-VirB10 + StrepII-VirB5/D142A, (F) StrepII-VirB10 + StrepII-VirB5/L163A, (G) StrepII-VirB10 + StrepII-VirB5/D172A. VirB10-Monomere sind mit schwarzen Pfeilspitzen, Quervernetzungsprodukte zwischen VirB5 und VirB10 mit weißen Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Die gestörten Interaktionen zwischen einigen der VirB5-Varianten und StrepII-VirB8 bzw. StrepII-VirB10 können darauf zurückzuführen sein, dass die Binderegionen für VirB8 und VirB10 in den entsprechenden VirB5-Varianten nicht mehr vollständig vorhanden sind. Allerdings könnte der Austausch von Aminosäuren auch Veränderungen der Konformationen der Proteine zur Folge haben, so dass keine Interaktion mehr möglich ist. Mit den hier durchgeführten Experimenten konnte nicht unterschieden werden, welche dieser beiden Möglichkeiten zutrifft. Veränderungen der Dimerisierung der VirB5-Varianten nach Quervernetzung mit DSS wurden allerdings nicht detektiert. Wie das Wt-Protein wurden alle VirB5-Varianten zu einem Dimer (molekulare Masse von ungefähr 55 kDa) verknüpft (Abb. 20), was gegen umfangreiche Konformationsänderungen spricht. Eine Klärung dieser Fragestellung würde weiterführende Analysen, z.B. durch CD-Spektroskopie des Wt-Proteins und der VirB5-Varianten, erfordern.

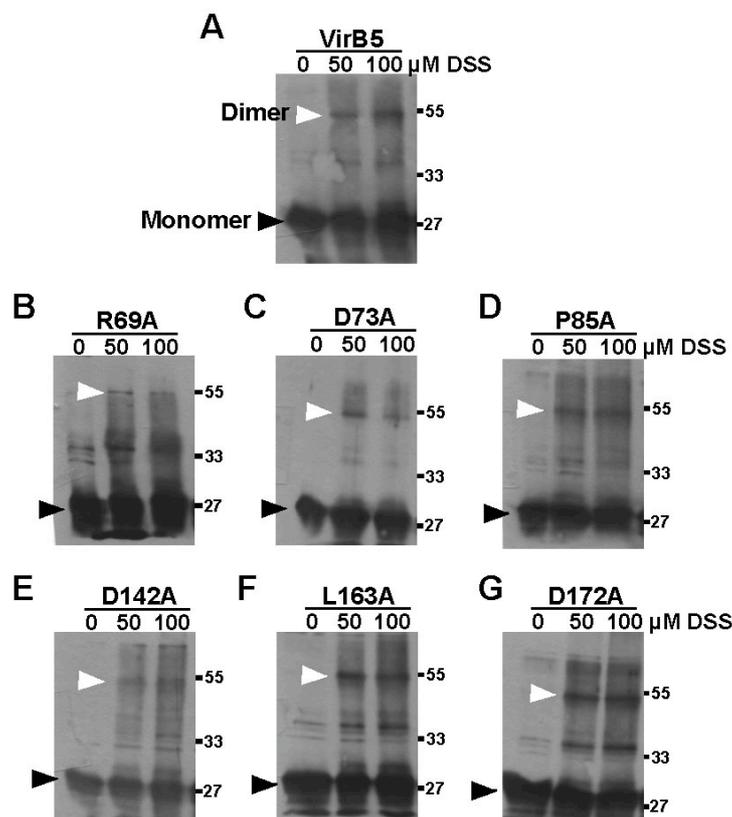


Abbildung 20: Untersuchung der Dimerisierung der StrepII-VirB5-Varianten nach Quervernetzung mit DSS. Die verschiedenen VirB5-Proteine wurden mit steigenden Konzentrationen von DSS inkubiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Quervernetzungsprodukte wurden mittels *Western Blot* mit VirB5-spezifischem Antiserum untersucht. **(A)** StrepII-VirB5 (Wt), **(B)** StrepII-VirB5/R69A, **(C)** StrepII-VirB5/D73A, **(D)** StrepII-VirB5/P85A, **(E)** StrepII-VirB5/D142A, **(F)** StrepII-VirB5/L163A, **(G)** StrepII-VirB5/D172A. VirB5-Monomere sind mit schwarzen Pfeilspitzen, Dimere mit weißen Pfeilspitzen gekennzeichnet.

1.7. Identifizierung der VirB5-Interaktionen mit Peptidmembranen

Mit Hilfe von Cellulosemembranen, an die mittels der SPOT-Synthese Technik (Frank, 1992) synthetische VirB5-Peptide kovalent gebunden wurden (Jerini; Berlin), sollten spezifische Bindestellen für VirB8 und VirB10 identifiziert werden. Die Peptide umfassten die gesamte Aminosäuresequenz von VirB5 (ohne Signalpeptid) und wurden so gewählt, dass sie 13 Aminosäuren lang und um je 3 Positionen verschoben waren. Es ergaben sich somit Membranen mit 70 gebundenen Peptiden, die im Folgenden mit 2 - 4 µg StrepII-VirB8, StrepII-VirB9 oder StrepII-VirB10 überlagert wurden. Um unspezifische Bindung der Proteine an die Cellulosemembranen zu vermeiden, wurden diese vor der Zugabe der Proteine in einem Absättigungs-Reagenz für *Western Blots* (Roche, Penzberg) inkubiert. Auch die Überlagerung mit den Virulenzproteinen erfolgte in dem Absättigungs-Reagenz. Um nur biologisch relevante Bindungen zu detektieren, wurden die StrepII-Proteine in niedrigen Konzentrationen eingesetzt und die Überlagerungszeit wurde auf eine Stunde bei RT beschränkt. Nach dreimaligem Waschen wurden die an die Peptide gebundenen Proteine mittels Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran transferiert, wobei die Peptide aufgrund ihrer kovalenten Bindung auf der Cellulosemembran haften blieben. Die Detektion erfolgte anschließend mittels *Western Blot*-Analyse und spezifischen Antiseren. Um die Versuchsbedingungen konstant zu halten, wurden drei Peptidmembranen in parallelen Ansätzen mit den Virulenzproteinen StrepII-VirB8, StrepII-VirB9 bzw. StrepII-VirB10 überlagert und zeitgleich auf die PVDF-Membranen transferiert. Proteine, die auch nach dem Transfer an den Peptiden hafteten, wurden gemäß des Regenerierungsprotokolls (Jerini, Berlin) von der Peptidmembran gelöst. Zur Identifizierung der gebundenen Bereiche wurden die für jedes der drei VirB-Proteine erhaltenen Chemoluminogramme mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms „Canvas 9“ überlagert. Somit wurden die gebundenen Peptide aller Versuche in der Auswertung erfasst. Die Bindung der Proteine an die Peptide wurde anhand der Signalstärke in den Chemoluminogrammen in drei Intensitäten eingeteilt. Die Beurteilung der Bindungsstärke ist exemplarisch in Abbildung 21 dargestellt.

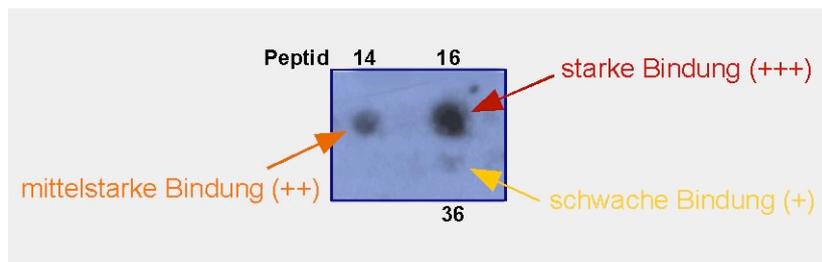


Abbildung 21: Einteilung der Bindungsintensitäten der Proteine an VirB5-Peptide. Die Detektion der von StrepII-VirB8, StrepII-VirB9 bzw. StrepII-VirB10 gebundenen Peptide erfolgte nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran mit VirB-spezifischen Antiseren. Die Bindung der Proteine an die Peptide wurde anhand der beobachteten Signalstärke in den Chemoluminogrammen in „starke“, „mittelstarke“ und „schwache“ Bindungen eingeteilt.

Die Abbildungen 22 bis 24 zeigen die Resultate der Überlagerungsversuche mit StrepII-VirB8, StrepII-VirB9 bzw. StrepII-VirB10.

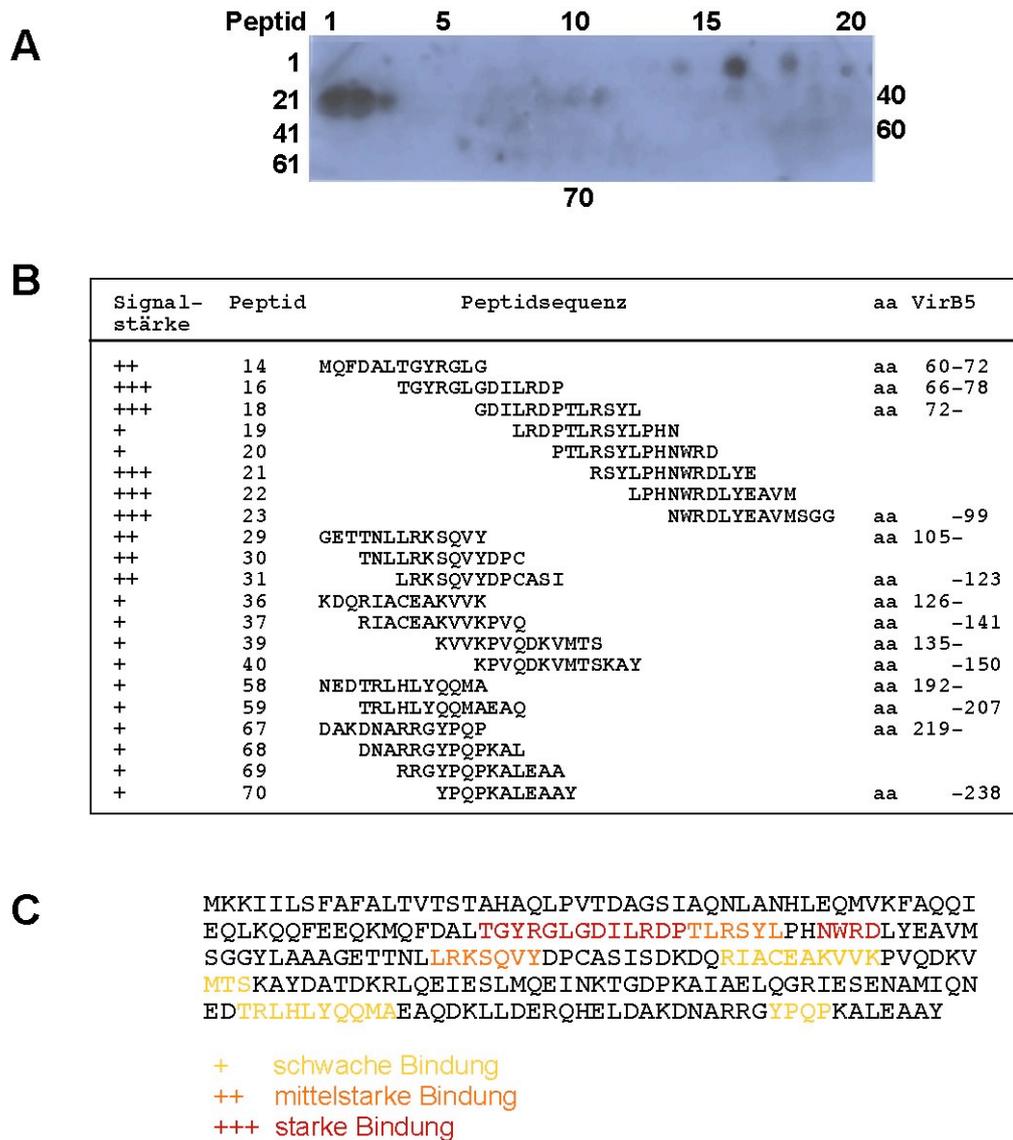


Abbildung 22: Bindung von StrepII-VirB8 an VirB5-Peptide. (A) Die Detektion der von StrepII-VirB8 gebundenen Peptide erfolgte nach dem Transfer des Proteins auf eine PVDF-Membran mit VirB8-spezifischem Antiserum. Die Nummerierung des Chemoluminogramms entspricht der Anordnung der verschiedenen Peptide auf der Cellulosemembran. (B) Zuordnung der von StrepII-VirB8 gebundenen Peptide zur VirB5-Sequenz. Die Stärke der Bindung wurde wie folgt eingestuft: + (schwache Bindung), ++ (mittelstarke Bindung) und +++ (starke Bindung). Hinter den Nummern sind die entsprechenden Peptidsequenzen aufgelistet und ihre Abfolge unter Berücksichtigung der Überlappungsbereiche angegeben. Rechts sind die den Peptiden entsprechenden Positionen in der VirB5-Aminosäuresequenz aufgelistet. (C) Aminosäuresequenz von VirB5 aus *B. suis*. Die mit StrepII-VirB8 interagierenden Bereiche sind farbig dargestellt.

Wie auf dem Chemoluminogramm in Abbildung 22 A zu erkennen band StrepII-VirB8 an mehrere Peptide von VirB5, wobei sich besonders starke Signale im Bereich der Peptide 16, 18 und 21 bis 23 ergaben. Mittelstarke Signale wurden im Fall der Peptide 14 und 29 bis 31 detektiert. An insgesamt 12 weiteren Peptiden wurde eine schwächere Bindung von StrepII-VirB8 beobachtet. Die den gebundenen Peptiden entsprechenden Sequenzen sind unterhalb

des Chemoluminogrammes angegeben (Abb. 22 B). Für eine übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse wurden die Aminosäuren der gebundenen VirB5-Peptide in der Gesamt-Aminosäuresequenz des Proteins farblich hervorgehoben. In dem Fall, dass mehrere aufeinanderfolgende Peptide gebunden worden waren (z.B. Peptide 21 bis 23), wurden nur die Aminosäuren markiert, die all diesen Peptiden gemeinsam waren. Dadurch wird deutlich, dass besonders der Bereich der Aminosäuren 66 bis 90 in VirB5 stark von StrepII-VirB8 erkannt wird (Abb. 22 C). Mittelstarke und schwächere Signale traten im Bereich der Aminosäuren 111 bis 117, 129 bis 138 und 195 bis 204 auf. Auch die C-terminalen Aminosäuren 228 bis 231 interagierten schwach mit StrepII-VirB8.

Parallel zum StrepII-VirB8-Ansatz wurden weitere VirB5-Peptidmembranen mit StrepII-VirB9 bzw. StrepII-VirB10 überlagert und die Ergebnisse wurden wie oben beschrieben ausgewertet (Abb. 23 und 24).

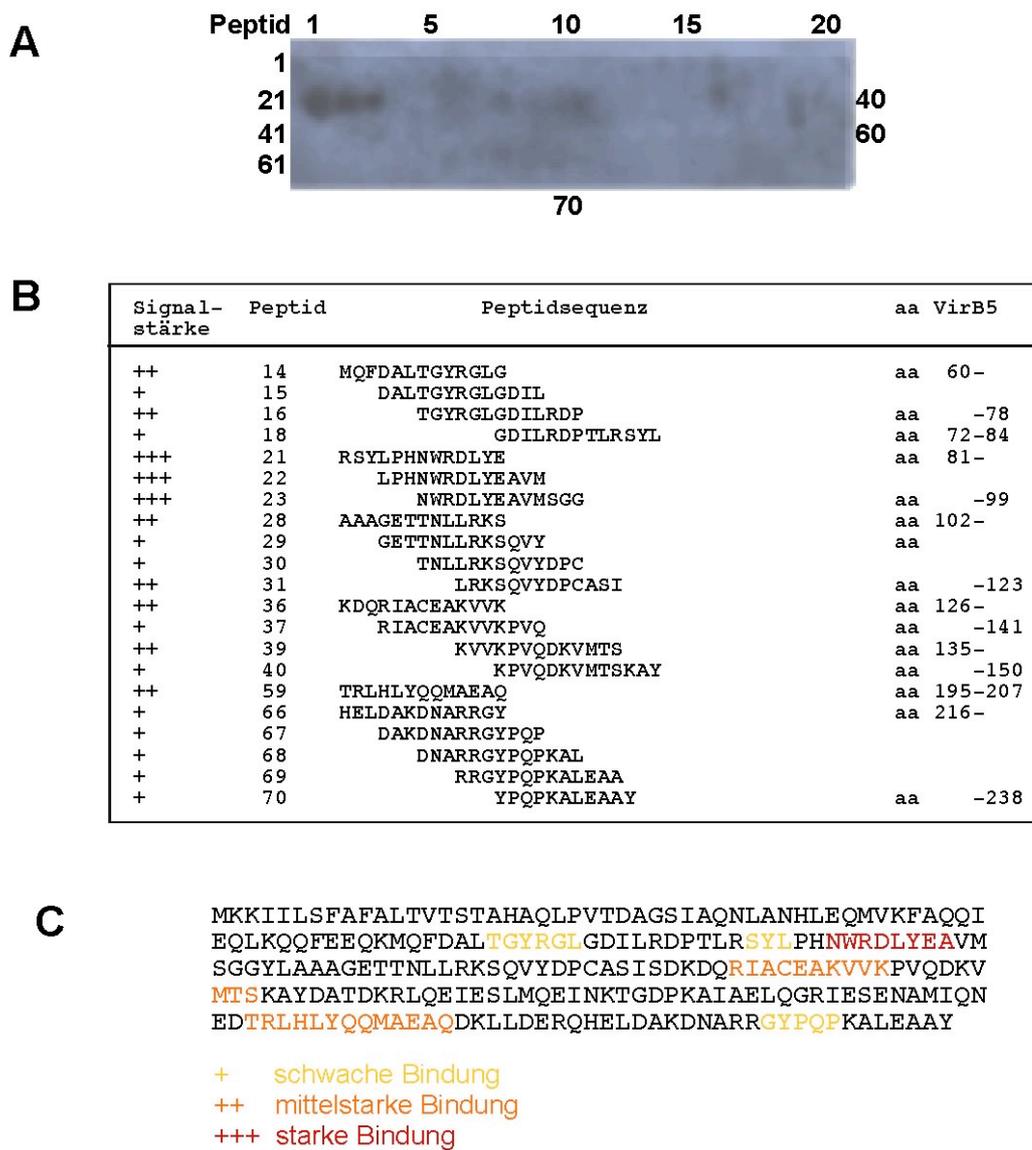


Abbildung 23: Bindung von StrepII-VirB10 an VirB5-Peptide. (A) Die Detektion der von StrepII-VirB10 gebundenen Peptide erfolgte nach dem Transfer des Proteins auf eine PVDF-Membran mit VirB10-spezifischem Antiserum. Die Nummerierung des Chemoluminogramms entspricht der Anordnung der verschiedenen Peptide auf der Cellulosemembran. (B) Zuordnung der von StrepII-VirB10 gebundenen Peptide zur VirB5-Sequenz. Die Stärke der Bindung wurde wie folgt eingestuft: + (schwache Bindung), ++ (mittelstarke Bindung) und +++ (starke Bindung). Hinter den Nummern sind die entsprechenden Peptidsequenzen aufgelistet und ihre Abfolge unter Berücksichtigung der Überlappungsbereiche angegeben. Rechts sind die den Peptiden entsprechenden Positionen in der VirB5-Aminosäuresequenz aufgelistet. (C) Aminosäuresequenz von VirB5 aus *B. suis*. Die mit StrepII-VirB10 interagierenden Bereiche sind farbig dargestellt.

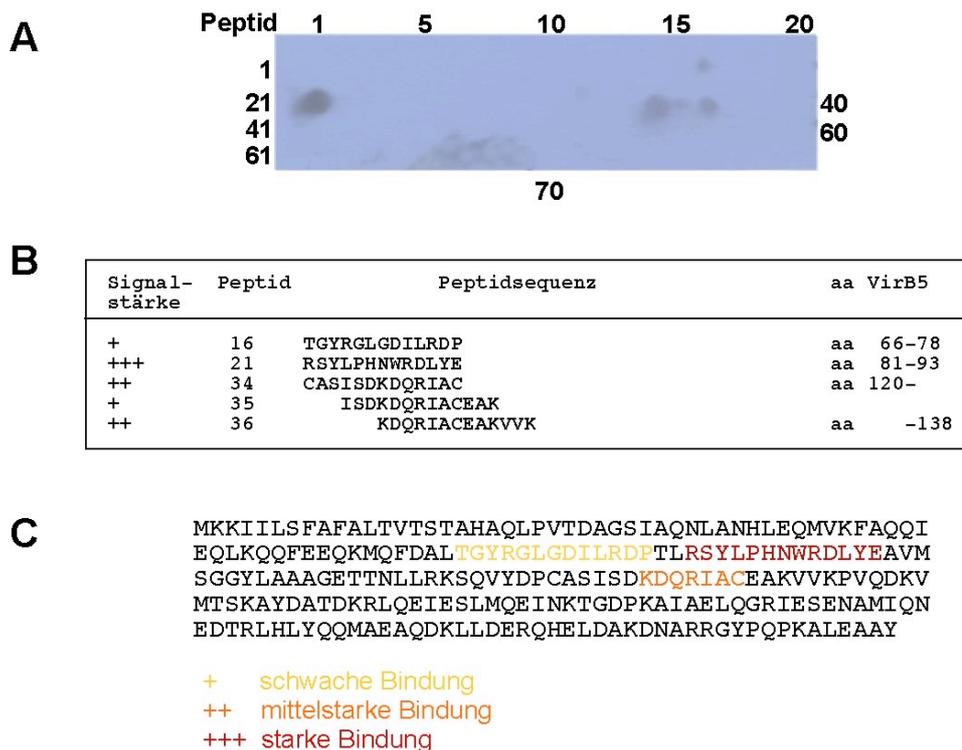


Abbildung 24: Bindung von StrepII-VirB9 an VirB5-Peptide. (A) Die Detektion der von StrepII-VirB9 gebundenen Peptide erfolgte nach dem Transfer des Proteins auf eine PVDF-Membran mit VirB9-spezifischem Antiserum. Die Nummerierung des Chemoluminogramms entspricht der Anordnung der verschiedenen Peptide auf der Cellulosemembran. (B) Zuordnung der von StrepII-VirB9 gebundenen Peptide zur VirB5-Sequenz. Die Stärke der Bindung wurde wie folgt eingestuft: + (schwache Bindung), ++ (mittelstarke Bindung) und +++ (starke Bindung). Hinter den Nummern sind die entsprechenden Peptidsequenzen aufgelistet und ihre Abfolge unter Berücksichtigung der Überlappungsbereiche angegeben. Rechts sind die den Peptiden entsprechenden Positionen in der VirB5-Aminosäuresequenz aufgelistet. (C) Aminosäuresequenz von VirB5 aus *B. suis*. Die mit StrepII-VirB9 interagierenden Bereiche sind farbig dargestellt.

Wie in dem Chemoluminogramm in Abbildung 23 A zu erkennen, wurden nach der Überlagerung mit StrepII-VirB10 besonders starke Signale im Bereich der Peptide 21 bis 23 detektiert. Eine schwache bis mittlere Bindung wurde im Bereich der Peptide 14 bis 18, 28 bis 31, 36 bis 40 und 66 bis 70 beobachtet. In Abbildung 23 C sind die für diese Interaktionen relevanten Aminosäuren in der VirB5-Sequenz hervorgehoben. StrepII-VirB10 band offenbar stark an die Region der Aminosäuren 87 bis 94. Die Regionen der Aminosäuren 66 bis 71, 129 bis 138, 195 bis 207 und 227 bis 231 wurden von StrepII-VirB10 mit mittlerer bis schwacher Stärke gebunden. Ein Vergleich der Regionen, die von StrepII-VirB8 und StrepII-VirB10 gebunden wurden, zeigte, dass sehr ähnliche Bereiche von VirB5 für die Interaktionen mit den beiden Proteinen eine Rolle spielen.

Im Fall von StrepII-VirB9 wurden nur wenige Peptide gebunden. Auffallend war die starke Bindung an Peptid 21 (Abb. 24 A) und darüber hinaus wurden Signale mittlerer Stärke im Bereich der Peptide 34 und 36 und eine sehr schwache Bindung an Peptid 16 detektiert (Abb. 24 C). Eine Bindung an diese Peptide wurde auch bei der Überlagerung mit StrepII-VirB8 und StrepII-VirB10 beobachtet, und besonders das starke Signal im Fall von Peptid 21 fällt auf. Im Gegensatz zu StrepII-VirB9 wurden im Fall der anderen beiden Proteine in diesem Bereich der VirB5-Membranen aber mehrere aufeinander folgende Peptide gebunden, was für eine höhere Spezifität der Bindungen sprechen könnte. Die vier bei der Überlagerung mit StrepII-VirB9 detektierten Peptide liegen im globulären Anhang von VirB5, dem eine große Bedeutung für Protein-Protein-Interaktionen zugeschrieben wird und der viele hydrophobe Aminosäuren enthält. Es ist deshalb möglich, dass einige dieser Peptide in einem artifiziellen System wie den Peptidmembranen nicht spezifische Interaktionen eingehen. Da in keinem der vorangegangenen Versuche eine Interaktion zwischen VirB5 und VirB9 detektiert wurde, ist es fraglich, ob die Bindung dieser Aminosäurebereiche durch StrepII-VirB9 signifikant ist.

Insgesamt war es möglich die Bindung von VirB8 und VirB10 relativ definierten Bereichen in der VirB5-Sequenz zu zuordnen, und die Relevanz dieser Bindestellen wurde in der Folge untersucht.

1.8. Konkurrenz der Interaktionen mit Peptiden

Durch den Einsatz der Peptidmembranen wurden Informationen über die Regionen von VirB5 gewonnen, die an den Interaktionen mit VirB8 und VirB10 beteiligt sein könnten. Die Ergebnisse dieser Versuche sollten durch einen kompetitiven Interaktionstest weitergehend untersucht werden. Da die Interaktion zwischen VirB5 und VirB8 besonders gut belegt worden war, wurde diese für die nachfolgenden Untersuchungen gewählt. Im Rahmen dieser Experimente sollten die für die Interaktion mit VirB5 benötigten Bindestellen von VirB8 durch die Prä-Inkubation mit VirB5-Peptiden besetzt werden, und somit eine Interaktion mit dem vollständigen VirB5-Protein unterbinden. Dieser kompetitive Ansatz sollte die VirB5-VirB8-Interaktion bestätigen und die Bindestelle weiter eingrenzen. Vier der Peptide des VirB5-Proteins, die durch die Überlagerung der *PepSpot*-Membran mit VirB8 identifiziert worden waren, wurden ausgewählt und als Peptide einer Länge von 15 - 16 Aminosäuren synthetisiert (Jerini, Berlin):

Peptid I:	TGYRGLGDILRDPTL	(As 66-80 in der VirB5-Gesamtsequenz)
Peptid II:	YLPHNWRDLYEAVMS	(As 83-97 in der VirB5- Gesamtsequenz)
Peptid III:	EAKVVKPVQDKVMTS	(As 133-146 in der VirB5-Gesamtsequenz)
Peptid IV:	ARRGYPQPKALEAAY	(As 224-237 in der VirB5-Gesamtsequenz)

50 pmol StrepII-VirB8 wurden mit verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Peptide 30 Minuten bei RT prä-inkubiert. Dabei wurde StrepII-VirB8 mit den Peptiden in einem Verhältnis von 1:1, 1:10, 1:100 und 1:500 gemischt. Nach Zugabe von StrepII-VirB5 wurde den Ansätzen nach einer weiteren 30-minütigen Inkubation DSS zur Quervernetzung von VirB5 und VirB8 zugesetzt. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 1.6.2. beschrieben, die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und einer *Western Blot*-Analyse unter Verwendung des VirB8-spezifischen Antiserums unterzogen.

Wie in den vorangegangenen Quervernetzungs-Experimenten mit DSS (s. 1.6.3) wurde StrepII-VirB8 sowohl zu einem Dimer (ca. 36 kDa), als auch zu einem Trimer (ca. 54 kDa) verknüpft (Abb. 25 A – D, jeweils zweite Spur). Die Zugabe von DSS zu einem StrepII-VirB5/StrepII-VirB8-Gemisch resultierte neben den VirB8-Homomultimeren in dem ungefähr 45 kDa großen Quervernetzungsprodukt, welches vermutlich auf die Verknüpfung der beiden Proteine zurückzuführen ist. Als zusätzliche Kontrolle diente quervernetztes StrepII-VirB5, womit ausgeschlossen wurde, dass die beobachteten Signale auf einer Kreuzreaktion des VirB8-Antiserums mit VirB5 beruhen. Nach Prä-Inkubation von StrepII-VirB8 mit Peptid I oder Peptid II war keine Quervernetzung des Proteins mit StrepII-VirB5 durch DSS mehr möglich (Abb. 25 A und 25 B). Dazu musste in beiden Fällen mindestens 5 nmol Peptid in der Prä-Inkubation eingesetzt werden, was einem 100-fachen molaren Überschuss über die Proteine entsprach. Da Peptide III und IV auch in 100-oder 500-fachem Überschuss die Quervernetzung nicht behinderten, kann dieser Effekt nicht auf einem unspezifischen Reaktion von DSS mit den Peptiden beruhen. Darüber hinaus kann ausgeschlossen werden, dass das Ausbleiben der Quervernetzung zwischen StrepII-VirB5 und StrepII-VirB8 durch Absättigung der reaktiven Gruppen des Quervernetzungs-Reagenz DSS verursacht wurde, da Peptide I und II im Gegensatz zu den Peptiden III und IV keine reaktiven Lysine enthalten. Die Prä-Inkubation von StrepII-VirB8 mit Peptid III und Peptid IV dagegen hatte keine Auswirkungen auf die Quervernetzung zwischen StrepII-VirB5 und StrepII-VirB8 (Abb. 25 C und D).

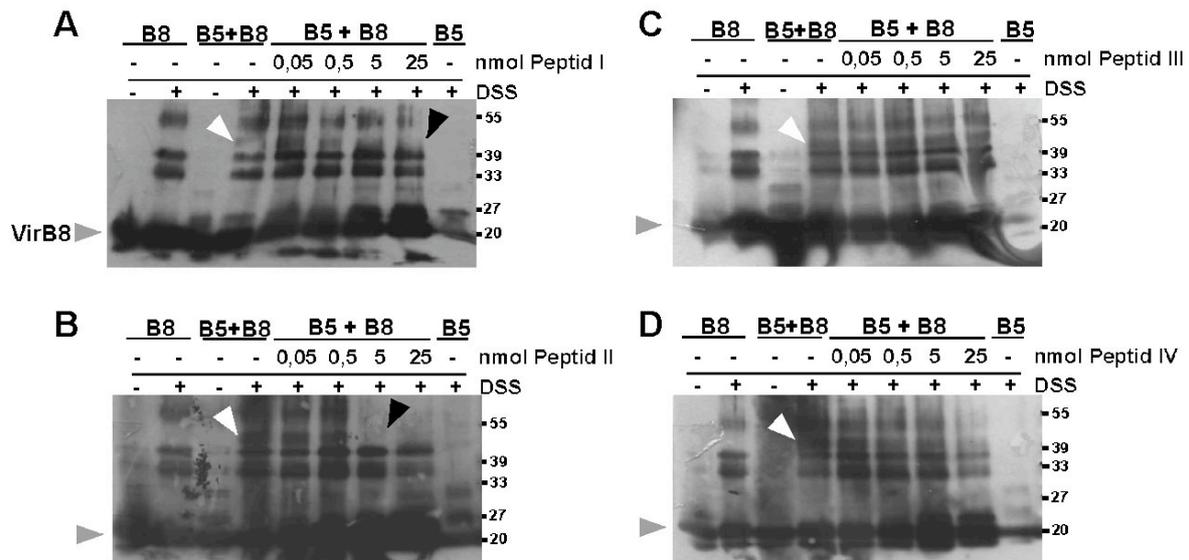


Abbildung 25: Quervernetzung von StrepII-VirB5 und StrepII-VirB8 nach Prä-Inkubation mit Peptiden. Nach Prä-Inkubation von StrepII-VirB8 mit steigender Menge eines Peptids (0,05 / 0,5 / 5 und 25 nmol) wurden dem Ansatz StrepII-VirB5 und 0,1 mM DSS zugesetzt. Die Quervernetzungsprodukte wurden mit VirB8-spezifischem Antiserum detektiert. Folgende Kontrollen wurden in jedem Ansatz mitgeführt: nur StrepII-VirB8, mit und ohne DSS-Behandlung; nicht quervernetztes StrepII-VirB5/StrepII-VirB8-Gemisch; DSS-behandeltes StrepII-VirB5/StrepII-VirB8-Gemisch; DSS-behandeltes StrepII-VirB5 (**A**) Prä-Inkubation mit Peptid I, (**B**) Prä-Inkubation mit Peptid II, (**C**) Prä-Inkubation mit Peptid III, (**D**) Prä-Inkubation mit Peptid IV. Graue Pfeilspitzen kennzeichnen das StrepII-VirB8-Monomer, weiße Pfeilspitzen das Quervernetzungsprodukt von StrepII-VirB5 und StrepII-VirB8. Die schwarze Pfeilspitze markiert Ansätze, in denen keine Quervernetzung mehr beobachtet wurde.

In einem weiteren Experiment wurde die Prä-Inkubation von StrepII-VirB8 mit Peptidgemischen durchgeführt, um festzustellen, ob damit eine Verstärkung des beobachteten Effektes erwirkt werden kann. Sowohl Peptide I und II, als auch Peptide III und IV wurden in gleichem Verhältnis gemischt und verschiedene Mengen der Peptidgemische (0,05 / 0,5 / 5 und 25 nmol) wurden mit StrepII-VirB8 vor der Quervernetzung prä-inkubiert (Abb. 26).

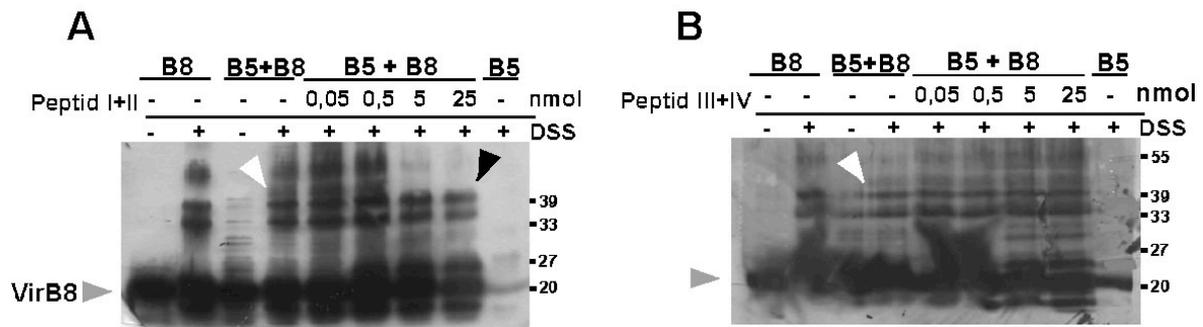


Abbildung 26: Quervernetzung von StrepII-VirB5 und StrepII-VirB8 nach Prä-Inkubation mit Peptid-Gemischen. Nach Prä-Inkubation von StrepII-VirB8 mit steigender Menge der Peptidgemische I+II bzw. III+IV (0,05 / 0,5 / 5 und 25 nmol) wurde dem Ansatz StrepII-VirB5 und 0,1 mM DSS zugesetzt. Die Quervernetzungsprodukte wurden mit VirB8-spezifischem Antiserum detektiert. **(A)** Prä-Inkubation mit einem Gemisch aus Peptid I+II, **(B)** Prä-Inkubation mit einem Gemisch aus Peptid III+IV. Graue Pfeilspitzen kennzeichnen das StrepII-VirB8-Monomer, weiße Pfeilspitzen das Quervernetzungsprodukt von StrepII-VirB5 und StrepII-VirB8. Die schwarze Pfeilspitze markiert Ansätze, in denen keine Quervernetzung mehr beobachtet wurde.

Wie im vorherigen Experiment mit einzeln eingesetzten Peptiden, waren Peptid I und Peptid II auch im Gemisch in der Lage, die Interaktion zwischen StrepII-VirB5 und StrepII-VirB8 zu behindern (Abb. 26 A). Der kompetitive Effekt wurde allerdings durch einen gemeinsamen Einsatz der Peptide nicht verstärkt. Peptide III und IV waren auch als Gemisch nicht in der Lage, die Quervernetzung zwischen StrepII-VirB5 und StrepII-VirB8 zu reduzieren (Abb. 26 B). Im Zusammenhang mit den vorherigen Experimenten hätte man auch bei diesen beiden Peptiden prinzipiell eine Verhinderung der Interaktion erwarten können. Peptid III beispielsweise enthält die Aminosäure D142, deren Austausch eine Störung der Quervernetzung bewirkt hatte (Abb. 18 E). Peptid IV umfasst den C-terminalen Teil des VirB5-Proteins und Aminosäuren dieses Bereiches wurden sowohl von StrepII-VirB8 als auch von StrepII-VirB10 bei der Überlagerung der VirB5-Peptidmembranen gebunden. In beiden Fällen handelte es sich allerdings um eher schwache Bindungen. Der C-Terminus von VirB5 befindet sich innerhalb der Proteinstruktur in räumlicher Nähe zu dem globulären Anhang, der aus den vier kleinen Helices gebildet wird (Abb. 15 B) und könnte an der Interaktion „indirekt“ beteiligt sein. Offensichtlich ist die Bindung an Peptide aus diesem Bereich aber nicht stark genug, um in dem hier durchgeführten kompetitiven Interaktionstest die Quervernetzung von StrepII-VirB5 und StrepII-VirB8 zu reduzieren.

1.9. Lokalisierung der VirB8/VirB10-Bindestellen in VirB5 mit Hilfe der Struktur des ähnlichen Proteins TraC

In den Abbildungen 22 und 23 der *PepSpot*-Versuche kann man erkennen, dass es sich bei den Domänen von VirB5, die in die Interaktion mit VirB8 und VirB10 involviert sind, um diskontinuierliche Epitope handelt. Um festzustellen, ob diese in VirB5 eine zusammenhängende Kontaktstelle bilden, wurden die Bindestellen unter Verwendung der Struktur des ähnlichen Proteins TraC in der Raumstruktur lokalisiert. Um die Primärsequenzen zu vergleichen und die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von VirB5 aus *B. suis* und TraC des pKM101-Plasmids zu ermitteln, wurden ClustalW-Algorithmen erstellt (Thompson *et al.*, 1994) und die Daten in den AMAS-Server (Livingstone und Barton, 1993) transferiert (Abb. 27 A). Mittels des Programms DINO 0.9.0 wurden anschließend die unterschiedlich stark konservierten Bereiche in der TraC-Struktur dargestellt (Abb. 27 C). Das AMAS-Programm kategorisierte die Aminosäuren von VirB5 nach Vergleich mit den entsprechenden Aminosäuren von TraC in identische Aminosäuren („A“) und nicht identische Aminosäuren verschiedener Ähnlichkeiten (Ziffern 7-9). Hierbei werden die Eigenschaften „Ladung“, „Größe“, „Polarität“ und „Natur der Seitenkette“ berücksichtigt. Die eingesetzten Algorithmen zur Definition der Konservierung der Aminosäuren sind im Informationsteil des AMAS-Servers (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/Software/Amas/amas.html>) und in einer Publikation von Livingstone und Barton (1993) beschrieben.

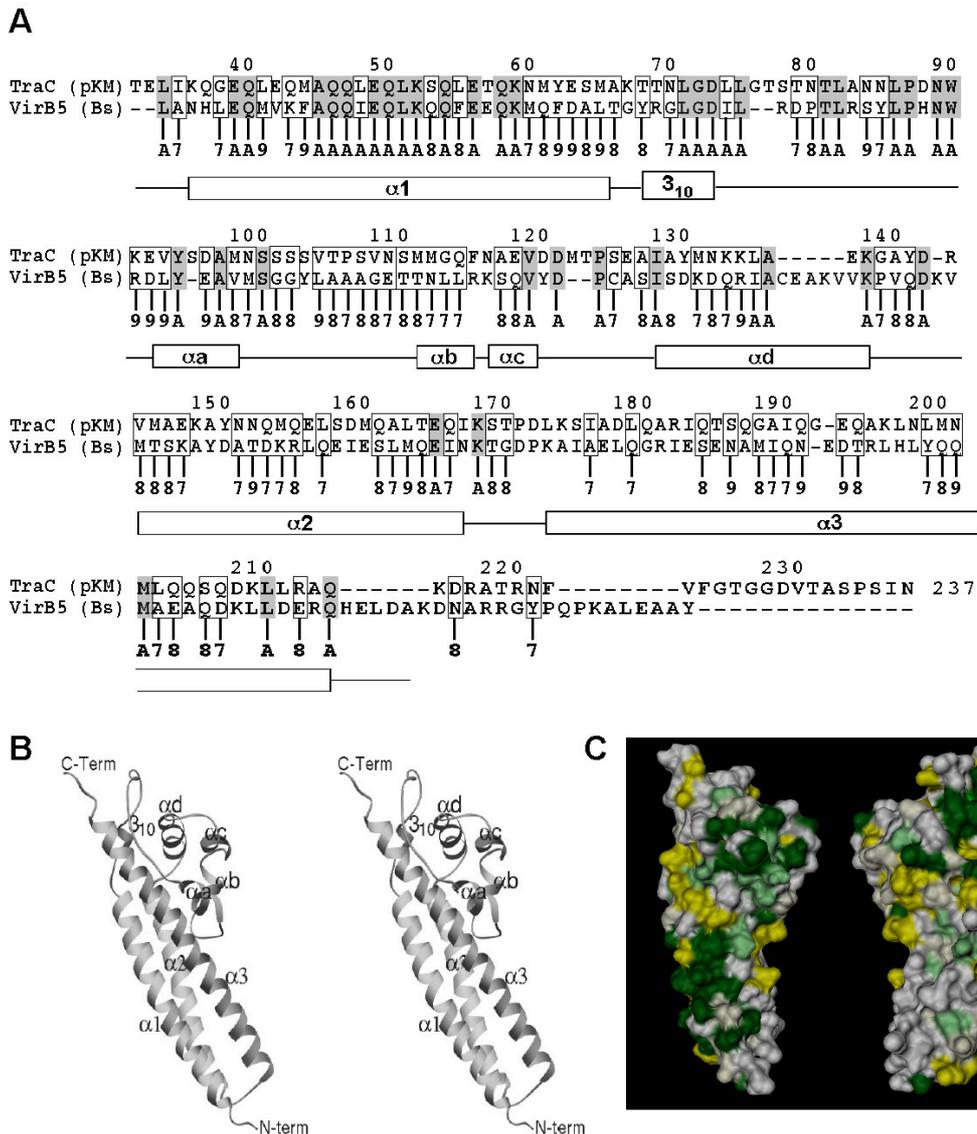


Abbildung 27: Übersicht der konservierten Aminosäuren von VirB5 aus *B. suis* und TraC des pKM101-Plasmids von *E. coli*. (A) Daten eines ClustalW-Vergleichs zwischen VirB5 und TraC wurden in den AMAS-Server übertragen und eine Übersicht über den Grad der Ähnlichkeit der einzelnen Aminosäuren (As) erstellt. Der Grad an Übereinstimmung ist mit den Ziffern „7-9“ gekennzeichnet. Identische As sind mit „A“ bezeichnet und in der Sequenz grau unterlegt. Ebenfalls angegeben sind die Strukturelemente von TraC. (B) *Stereo Ribbon Diagram* der Struktur des TraC-Monomers (Yeo, *et al.*, 2003). (C) As-Reste auf der Oberfläche von TraC, die in VirB5 von *B. suis* konserviert sind. Identische As sind dunkelgrün markiert. Die unterschiedlichen Ähnlichkeitsgrade sind mittels gelb („7“), hellgrün („8“) und grün („9“) dargestellt.

Ein großer Teil der konservierten Reste ist in den Bereichen der drei langen Helices zu finden, die das „Rückgrat“ des Proteins bilden (Abb. 27 A und B). Dies trifft auch für andere Homologe der VirB5-Familie zu und lässt auf eine vergleichbare Struktur dieser Proteine schließen (Yeo *et al.*, 2003). Da sie sich besonders im Inneren der Proteinstruktur befinden, spielen diese As bei möglichen Protein-Protein-Interaktionen wahrscheinlich keine Rolle. In

Abbildung 27 C ist allerdings zu erkennen, dass viele der identischen (dunkelgrüne Bereiche) bzw. ähnlichen Aminosäuren (grün / hellgrün / gelb) auf der Oberfläche des Proteins lokalisieren. Interessanterweise liegen viele davon in dem globulären Anhang der Struktur, der durch vier kurze Helices gebildet wird. Vieles spricht dafür, dass ein hoher Grad an Konservierung eine Bedeutung für die Funktion von Proteinen hat, was diesen Bereich von VirB5 besonders interessant macht. Für Teile dieses Anhangs der TraC-Struktur wurde von Yeo *et al.* ein so genanntes *crystal packing interface* postuliert, welche häufig in Zusammenhang mit Protein-Protein-Interaktionen gebracht werden (Janin und Rodier, 1995).

Die durch Bindung an VirB5-Peptidmembranen identifizierten VirB8- und VirB10-Bindestellen wurden auf die TraC-Struktur übertragen (Abb. 28). Mit Rot wurden die Bereiche von TraC gekennzeichnet, die den im homologen VirB5 von VirB8 und VirB10 gebundenen Regionen entsprechen. Orange und Gelb markieren die schwächer gebundenen Bereiche (s. auch Abb. 22 und 23).

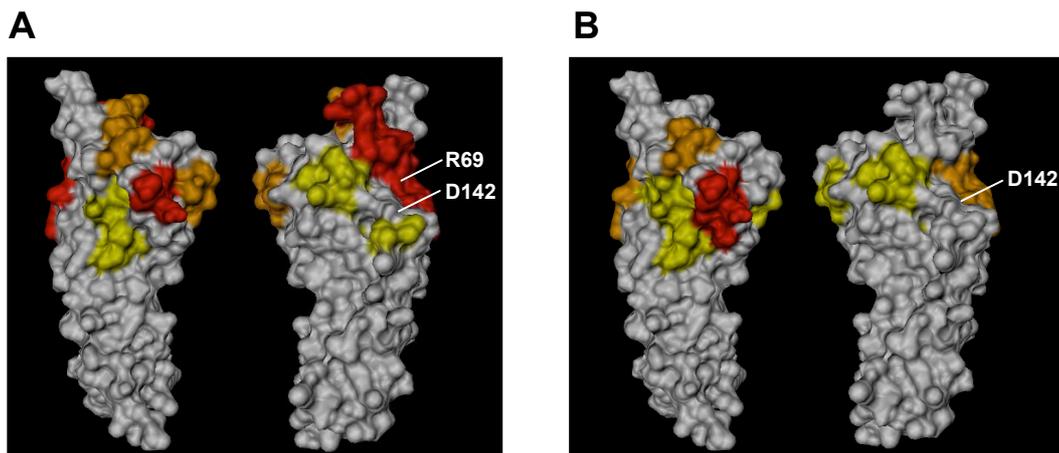


Abbildung 28: Lokalisierung der Bindestellen von VirB8 und VirB10 an VirB5 unter Verwendung der TraC-Struktur. Auf der Oberfläche der TraC-Struktur wurden die Bindestellen von VirB8 (A) bzw. VirB10 (B) dargestellt. Die Stärke der Bindung ist durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet (rot = stark; orange = mittel, gelb = schwach). Zusätzlich sind die As angegeben, nach deren Austausch in VirB5 keine Interaktion mit VirB8 oder VirB10 mehr nachgewiesen werden konnte.

Aminosäuren von VirB5, die basierend auf den in dieser Arbeit erzielten Resultaten an einer Interaktion mit VirB8 bzw. VirB10 beteiligt sind, wurden eindeutig dem helicalen Anhang von Beginn der 3_{10} -Helix bis zum Anfang der α -Helix der TraC-Struktur zugeordnet. Zu den durch VirB8 stark gebundenen Aminosäuren von VirB5 gehören die As 66 bis 78 (rot markiert, Abb. 28 A; rechte Darstellung) und As 87 bis 90 (rot markiert, Abb. 28 A; linke Darstellung). Die starke Bindung durch VirB10 innerhalb dieses helicalen

Anhangs findet im Bereich der As 87 bis 94 statt (rot markiert, Abb. 28 B; linke Darstellung). Mit reduzierter Stärke wurde in den *PepSpot*-Versuchen die Region vom Ende der α b-Helix bis zum Ende der α d-Helix von VirB8 gebunden. Diese Bereiche von VirB5 umfassen die As 111 bis 117 (orange markiert, Abb. 28 A; rechte und linke Darstellung) und As 134 bis 138 (gelb markiert, Abb. 28 A; rechte Darstellung). Im Fall von VirB10 wurden ähnliche Bindestellen identifiziert (Abb. 28 B). Die Annahme, dass es sich hierbei um eine spezifische Interaktion handelt, wird durch die Ergebnisse der kompetitiven Peptid-Inhibitionsversuche unterstützt (Abb. 25). Die Lokalisierung der Peptide I und II in der TraC-Struktur ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Bindung von VirB8 und VirB10 an *PepSpot*-Membran-gebundene Peptide im C-terminalen Bereich von VirB5 (gelb markiert; Abb. 28 A und B linke Darstellungen) konnte in den kompetitiven Peptid-Inhibitionsversuchen nicht bestätigt werden (Peptid IV).

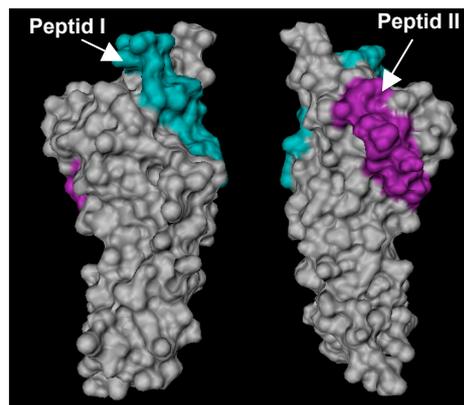


Abbildung 29: Lokalisierung der Peptide I und II unter Verwendung der TraC-Struktur. Die Bereiche, welche die im kompetitiven Inhibitionsversuch eingesetzten Peptide I (As 66-82) und II (As 85-99) an der Oberfläche von TraC einnehmen würden sind in Türkis bzw. Magenta dargestellt.

Im Rahmen dieser *in vitro*-Studien wurden VirB8 und VirB10 als mögliche Interaktionspartner identifiziert. Mit Hilfe der Struktur des Proteins TraC war es möglich die Bindung von VirB8 und VirB10 definierten Bereichen in VirB5 zu zuordnen.

2. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich zu den *in vitro*-Analysen auch *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Komponenten des VirB-Systems von *B. suis* untersucht. Für die Durchführung von biochemischen *in vivo*-Studien, die bereits mit dem *A. tumefaciens* T4SS durchgeführt wurden (Krall *et al.*, 2002), sind große Mengen an Zellmaterial des zu untersuchenden Organismus nötig. Da es sich bei *B. suis* um einen pathogenen Organismus handelt, der in Laboren der biologischen Sicherheitsstufe 3 untersucht wird, wären Anzuchten und die Fraktionierung der Zellen in diesem Maßstab nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus diesem Grund *A. tumefaciens* als Modellorganismus für die Analyse des T4SS von *B. suis* etabliert. Das *virB*-Operon von *B. suis* weist eine hohe Ähnlichkeit zu dem des Ti-Plasmids von *A. tumefaciens* auf, sowohl was die Aminosäuresequenzen der von den Genen dieses Operons kodierten Proteine (45 bis 65% Ähnlichkeit zwischen einzelnen Virulenzproteinen), als auch die Organisation der *virB*-Region betrifft. Zudem gehören beide Organismen zur Gruppe der α 2-Proteobakterien, so dass die für eine vollständige Assemblierung des Sekretionssystems von *B. suis* benötigte Faktoren in *Agrobacterium* vorhanden sein könnten. Die heterologe Expression des *virB*-Operons von *Brucella* in *Agrobacterium* sollte eine Untersuchung der Virulenzproteine *in vivo* ermöglichen und darüber hinaus Aussagen über funktionelle Ähnlichkeiten der beiden Systeme erlauben.

2.1. Heterologe Expression des *B. suis virB*-Operons in *A. tumefaciens*

Das 12 kb lange *virB*-Operon von *B. suis* wurde in das Plasmid pTrc300 kloniert, das ein breites Wirtsspektrum innerhalb der Gruppe der Proteobakterien hat. Es enthält einen *trc*-Promoter, der die Induktion der Virulenzgen-Expression mittels IPTG ermöglicht (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999b). Die in dieser Arbeit eingesetzten Plasmide wurden von C. Höppner (2004) konstruiert und sind in Abbildung 30 dargestellt. Zur heterologen Expression des *virB*-Operons von *B. suis* diente *A. tumefaciens* UIA143. Dieser Stamm hat das Chromosom von *A. tumefaciens* A348 und ist resistent gegen Erythromycin. Im Gegensatz zu A348 enthält UIA143 jedoch kein Ti-Plasmid (Bohne *et al.*, 1998). Die in Abbildung 30 dargestellten Plasmide wurden in *A. tumefaciens* UIA143 transferiert und die Selektion plasmid-tragender Zellen erfolgte mittels der plasmid-kodierten Resistenzen für Spectinomycin und Streptomycin und der chromosomal kodierten Erythromycin-Resistenz.

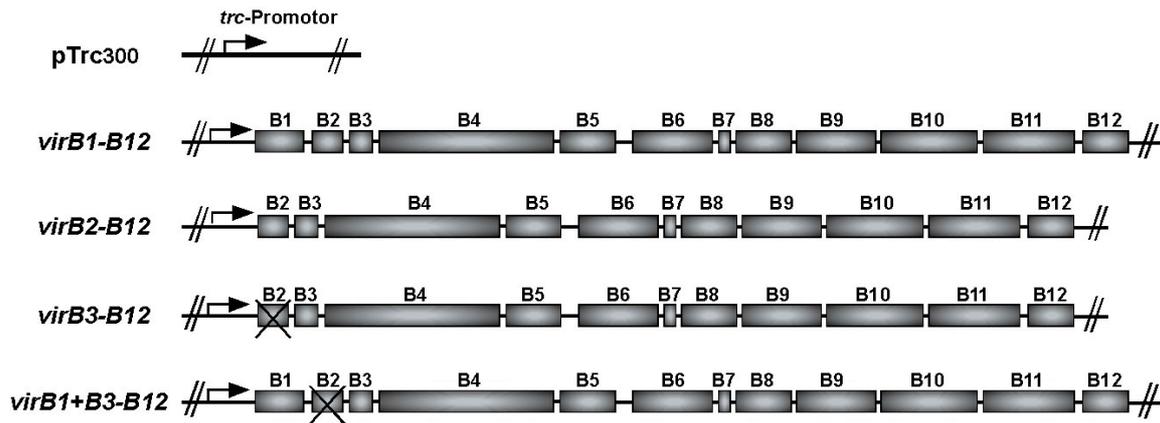


Abbildung 30: Übersicht der Plasmide für die heterologe Expression des *B. suis* *virB*-Operons. Als Ausgangsvektor für die unterschiedlichen Klonierungen diente das Plasmid pTrc300. Alle Operonen standen unter der Kontrolle eines *trc*-Promotors. In das Plasmid wurde zum einen das gesamte *virB*-Operon mit den Genen *virB1* bis *virB12* kloniert (*virB1-B12*). Ein weiterer Vektor enthielt kein *virB1*-Gen (*virB2-B12*). Durch eine Mutation im Startcodon des *virB2*-Gens entstand der Vektor pTrc-*virB3-B12*, bei dem keine Produktion von VirB2 stattfindet. Aus dem Plasmid pTrc-*virB3-B12* entstand durch Klonierung des Gens für *virB1* der Vektor pTrc-*virB1+B3-B12*.

Als erster Schritt der Analyse sollte überprüft werden, ob die Expression der verschiedenen *virB*-Operonen zur Produktion vergleichbarer Mengen der Virulenzproteine führte. Dafür wurden die Stämme in AB-Minimalmedium kultiviert und die *virB*-Expression mittels IPTG induziert. Proben der Kulturen wurden in SB-Puffer lysiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und einer *Western Blot*-Analyse unterzogen (Abb. 31 B). Um sicher zu gehen, dass die verschiedenen Proben vergleichbare Proteinmengen aufwiesen, wurde zusätzlich ein SDS-Gel mit Coomassie angefärbt (Abb. 31 A).

In allen Stämmen fand eine IPTG-induzierte Expression der Virulenzgene statt, aber die Mengen der VirB-Proteine unterscheiden sich stark (Abb. 31). Die Stämme, die die Plasmide pTrc-*virB2-B12*, pTrc-*virB3-B12* und pTrc-*virB1+B3-B12* trugen, produzierten die VirB-Proteine in detektierbaren Mengen, allerdings waren diese nur im Fall von VirB11 und VirB12 vergleichbar. In pTrc-*virB3-B12* und pTrc-*virB1+B3-B12*-tragenden Stämmen wurden VirB9 und VirB10 in höheren Mengen nachgewiesen, als in UIA143 pTrc-*virB2-B12*. In pTrc-*virB2-B12*-tragenden Zellen dagegen wurde im Vergleich zu UIA143 pTrc-*virB3-B12* und UIA143 pTrc-*virB1+B3-B12* eine hohe Menge von VirB5 detektiert. Einzig die Proteine VirB11 und VirB12 wurden in allen drei Stämmen in vergleichbaren Mengen produziert.

Am stärksten war aber der Unterschied zwischen dem Stamm, der das gesamte Komplement der *virB*-Gene trug (*virB1-virB12*) und den restlichen drei Stämmen. In den pTrc-*virB1-B12*-tragenden Zellen wurden VirB5, VirB8 und VirB12 detektiert, wogegen die

Proteine VirB1, VirB2 und VirB9 bis VirB11 nur in sehr niedrigen Mengen vorlagen. Offensichtlich bewirkte die Produktion von VirB1 eine Verringerung der Menge von VirB2 im Vergleich mit pTrc-*virB2-B12*-tragenden Zellen. VirB1 alleine hatte aber keinen negativen Einfluss auf die Mengen der Virulenzproteine VirB5 und VirB8 bis VirB12, wie man an den Resultaten der Analysen von Lysaten der pTrc-*virB1+B3-B12*-tragenden Zellen erkennen kann. Die Mengen dieser Proteine unterschieden sich nicht von denen des Stammes UIA143 pTrc-*virB3-B12*. Wenn VirB1 und VirB2 zusammen produziert wurden, dann wirkte sich dies offensichtlich negativ auf die Mengen der restlichen Virulenzproteine in der Zelle aus. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob die starken Unterschiede auf dem Abbau der Proteine in der Zelle oder Unterschieden der Transkript-Stabilitäten beruhten.

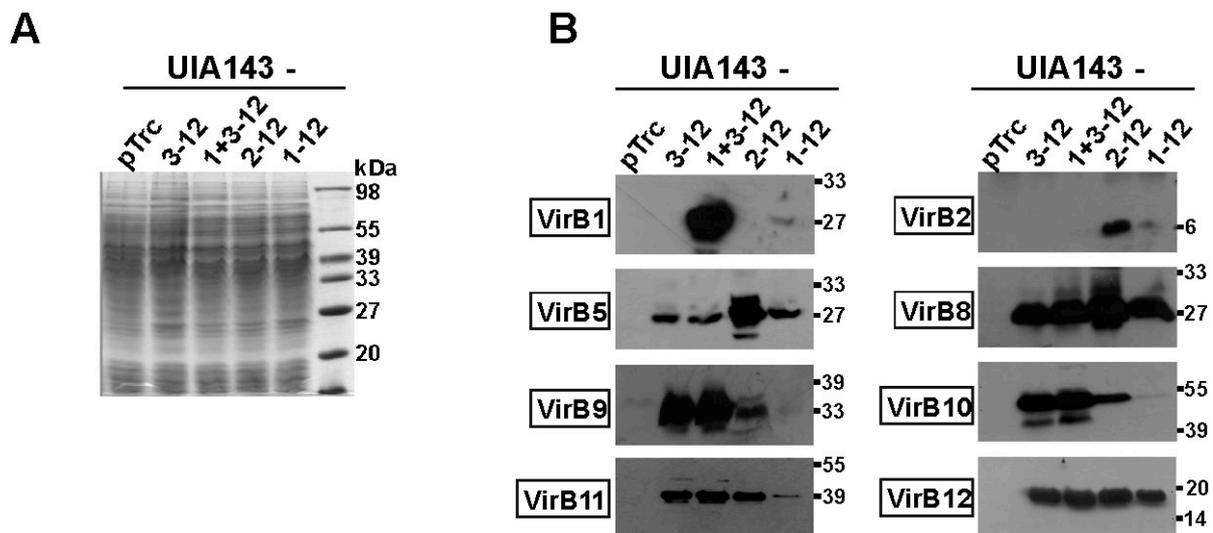


Abbildung 31: Vergleich der Anhäufung der heterolog produzierten Virulenzproteine von *B. suis* in *A. tumefaciens*. pTrc-*virBsuis*-tragende UIA143-Stämme (UIA143-pTrc, -pTrc-*virB3-B12* (3-12), -pTrc-*virB1+B3-B12* (1+3-12), -pTrc-*virB2-B12* (2-12) und -pTrc-*virB1-B12* (1-12).) wurden unter Virulenzgen-induzierenden Bedingungen kultiviert, Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit VirB-spezifischen Antisera analysiert. **(A)** Zum Vergleich der Beladung der einzelnen Spuren wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt. **(B)** Detektion der Virulenzproteine VirB1, VirB2, VirB5 und VirB8-VirB12 mit spezifischen Antisera.

Auf Grund der Resultate dieser vergleichenden Studien der VirB-Protein-Mengen in den Zellen wurde beschlossen in allen folgenden Versuchen nur die Plasmide pTrc-*virB2-B12*, pTrc-*virB3-B12* und pTrc-*virB1+B3-B12* einzusetzen. Die niedrigen Mengen von VirB-Proteinen im Stamm UIA143 pTrc-*virB1-B12* erlaubten keine weiterführenden Analysen.

2.2. Identifizierung oberflächen-exponierter Proteine in pTrc-*virB**suis*-tragenden *A. tumefaciens*

B. suis weist im Gegensatz zu einigen anderen T4SS humanpathogener Organismen beide Gene für die potentiellen Piluskomponenten VirB2 und VirB5 auf. Es gibt allerdings keine Hinweise darauf, dass extrazelluläre Pilus-Strukturen in *Brucella* tatsächlich ausgebildet werden. Nachdem gezeigt worden war, dass nach heterologer Expression des *virB*-Operons eine Detektion der Proteine VirB2 und VirB5 in Zelllysaten möglich war (Abb. 31 B), sollte im Folgenden untersucht werden, ob diese beiden Proteine auch in extrazellulären Pilus-Fractionen nachgewiesen werden können. Zu diesem Zweck wurden die pTrc-*virB**suis*-tragenden UIA143-Stämme in Anwesenheit von IPTG auf AB-Minimalmedium-Platten zur Induktion der Virulenzgene kultiviert. Um multimere Strukturen von der Zelloberfläche zu lösen, erfolgte eine mehrfache Passage der Zellen durch eine Kanüle. Nach Abtrennung der Zellen wurden die Überstände einer Ultrazentrifugation unterzogen, um lösliche Bestandteile von Strukturen hoher molekularer Masse (Pili und/oder Flagellen) zu trennen. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE und *Western Blot*-Analyse mit spezifischen Antisera untersucht (Abb. 32). Als Kontrolle wurde ein mittels Acetosyringon induzierter Wt-Stamm von *A. tumefaciens* C58 analysiert, und die Piluskomponenten VirB2 und VirB5 wurden in den extrazellulären Fraktionen nachgewiesen (Abb. 32 A).

Wie in Abbildung 32 B zu erkennen, konnte in keinem der drei Stämme die potentielle Haupt-Piluskomponente VirB2 in den Sedimenten der Ultrazentrifugation nachgewiesen werden. Offensichtlich wird dieses Virulenzprotein nicht auf die Zelloberfläche von *A. tumefaciens* transportiert und in eine Oberflächenstruktur eingebaut. Interessanterweise wurde aber in UIA143 pTrc-*virB2-B12* und UIA143 pTrc-*virB1+B3-B12* extrazellulär vorliegendes VirB5 detektiert. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass in den Proben von UIA143 pTrc-*virB1+B3-B12* auch VirB10 extrazellulär in Sedimenten der Ultrazentrifugation nachgewiesen wurde. Da VirB10 in der inneren Membran lokalisiert, sollte es in den Proben der Oberflächen-exponierten Proteine nicht zu detektieren sein. Offensichtlich lysierte dieser Stamm im Rahmen der Pilus-Isolierungsprozedur teilweise, so dass Proteine der Zellhülle mit in die Probe gelangten und dies könnte auch die Detektion von VirB5 erklären. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass sich VirB5 tatsächlich auf der Zelloberfläche befand, da es in geringen Mengen auch in den Pilus-Fractionen von UIA143 pTrc-*virB2-B12* nachgewiesen wurde. Dies könnte auf eine Pilus-ähnliche Struktur in pTrc-*virB2-B12*-tragenden Zellen hindeuten.

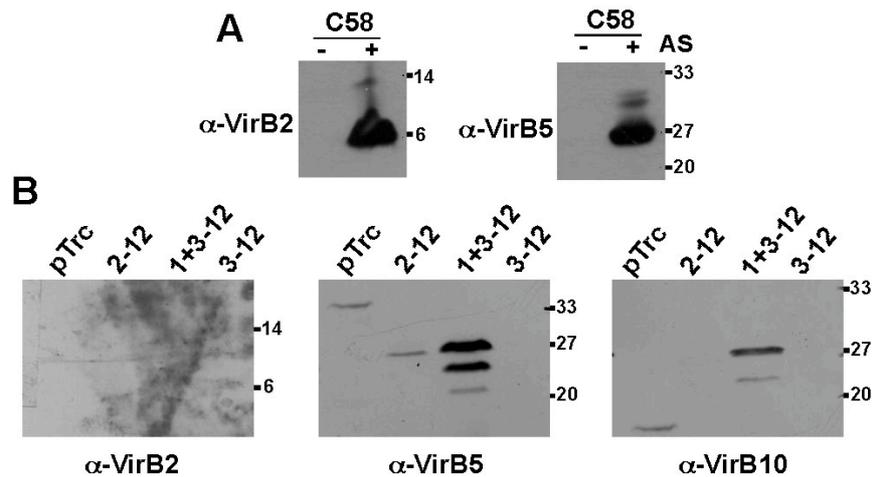


Abbildung 32: Detektion der Piluskomponenten VirB2 und VirB5 in Pilus-Fractionen. (A) Isolierung der T-Pili von der Oberfläche des Stammes *A. tumefaciens* C58. Zellen wurden unter Virulenzgen-induzierenden (+) und nicht-induzierenden (-) Bedingungen kultiviert und Pili wurden isoliert. Die daraus resultierenden Proben wurden mittels spezifischer Antiseren auf die Anwesenheit der *A. tumefaciens*-Proteine VirB2 und VirB5 hin untersucht. **(B)** Isolierung der Oberflächenstrukturen von pTrc-*virBsuis*-tragenden UIA143-Zellen. Die Virulenzgen-Expression der Stämme mit den Plasmiden pTrc300, pTrc-*virB2-B12* (2-12), pTrc-*virB1+B3-B12* (1+3-12) und pTrc-*virB3-B12* (3-12) wurde mittels IPTG induziert, und anschließend wurden oberflächen-exponierte Strukturen hoher molekularer Masse isoliert. Die Proben wurden mittels spezifischer Antiseren für *B. suis* VirB2, VirB5 und VirB10 untersucht.

2.3. Analyse von *B. suis* VirB-Protein-Interaktionen in *A. tumefaciens* mittels Quervernetzung

Wie unter 2.1. ausgeführt, können die Virulenzproteine des T4SS von *B. suis* in *A. tumefaciens* heterolog produziert werden. In der Folge wurde der Frage nachgegangen, ob diese Komponenten in einem in der Membran lokalisierten Protein-Komplex assemblieren. Um die Protein-Protein-Interaktionen der Membrankomponenten so zu erfassen, wie sie in der Zelle vorliegen, wurde als erster Ansatz *in-vivo*-Quervernetzung mit BS³ durchgeführt. BS³ ist das wasserlösliche Analog des in Versuch 1.6.2. eingesetzten Reagenz DSS und reagiert ebenfalls mit primären Aminen. Auf Grund einer nur begrenzten Membranpermeabilität (nur die äußere Membran) ist BS³ dazu geeignet, Proteine in der inneren Membran und außerhalb der Zytoplasmamembran quervernetzen.

IPTG-induzierte UIA143-Zellen, die die Plasmide pTrc300, pTrc-*virB2-B12*, pTrc-*virB3-B12* oder pTrc-*virB1+B3-B12* trugen, wurden in PBS (pH 6) suspendiert, auf eine OD₆₀₀ von 1,0 verdünnt und mit 1 mM BS³ versetzt. Die Proben wurden zur Beendigung der Quervernetzung für fünf Minuten in SB-Puffer bei 100°C inkubiert, per SDS-PAGE aufgetrennt und unter Verwendung spezifischer Antiseren untersucht (Abb. 33). Um

auszuschließen, dass es sich bei den detektierten Quervernetzungsprodukten um unspezifische Signale handelt, wurden auch Lysate von nicht BS³-behandelten Zellen analysiert.

Die Resultate der Quervernetzungsversuche zeigten, dass fast alle der Virulenzproteine quervernetzt wurden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Proteine in Komplexe assemblierten, aber die Vernetzungsmuster unterschieden sich deutlich. Quervernetzungs-Produkte von VirB5 wurden nur in UIA143 pTrc-*virB2-B12* nachgewiesen. Alle anderen VirB-Proteine (VirB8, VirB9, VirB10 und VirB11) wurden hingegen nur in den Stämmen UIA143 pTrc-*virB1+B3-B12* und UIA143 pTrc-*virB3-B12* zu höhermolekularen Produkten verknüpft.

Die Identifikation der gebildeten Proteinkomplexe erfolgte an Hand ihrer molekularen Massen und es wurde in der Folge versucht, die Vernetzungsprodukte möglichen Komplexen der Virulenzproteine zu zuordnen. Wie in Abbildung 33 dargestellt, wurden für alle VirB-Proteine Quervernetzungsprodukte nachgewiesen. Eine Ausnahme bildete **VirB12**, von dem nur die monomere Form detektiert wurde. Auf Grund der Sequenzvorhersagen geht man davon aus, dass es sich bei VirB12 um ein Lipoprotein in der äußeren Membran handeln könnte (O'Callaghan *et al.*, 1999). Das Resultat der Quervernetzung wirft allerdings die Frage auf, ob VirB12 ein Bestandteil des VirB-Membrankomplexes ist.

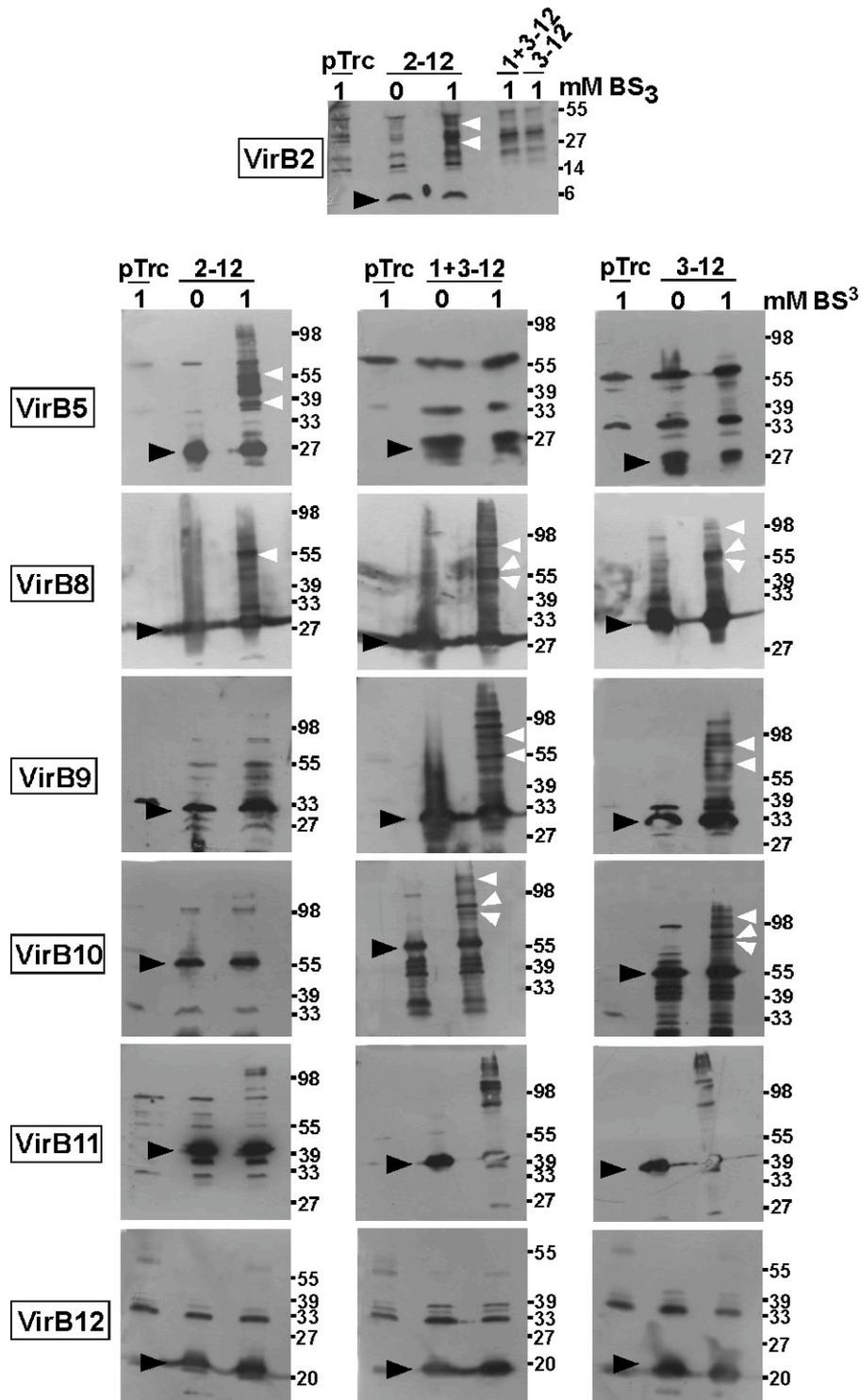


Abbildung 33: Detektion der VirB-Proteine von *B. suis* nach *in-vivo*-Quervernetzung von pTrc-*virBsuis*-tragenden UIA143 mit BS³. Virulenzgen-induzierte Zellen wurden mit 1 mM BS³ versetzt, die Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und per *Western Blot* analysiert. Als Kontrolle wurden nur pTrc300-tragende, mit BS³ behandelte Zellen analysiert (pTrc, erste Spur). Lysate der Stämme UIA143 pTrc-*virB2-B12* (2-12;), -pTrc-*virB1+B3-B12* (1+3-12;) und -pTrc-*virB3-B12* (3-12) wurden sowohl aus quervernetzten (1 mM BS³), als auch aus unbehandelten (0 mM BS³) Proben analysiert. Schwarze Pfeilspitzen zeigen Monomere der Virulenzproteine an, weiße Pfeilspitzen die höhermolekularen Quervernetzungsprodukte.

Im Fall von **VirB2** und **VirB5** wurde nur in UIA143 pTrc-*virB2-B12* mit beiden Antisera ein Produkt von ca. 35 kDa nachgewiesen. Eventuell könnte es sich dabei um ein Vernetzungsprodukt der beiden Proteine handeln. Darüber hinaus wurde mit VirB5-spezifischem Antiserum ein Quervernetzungsprodukt von 55 kDa identifiziert. Wie bereits in den gelfiltrations-chromatographischen Analysen und Quervernetzungsversuchen der gereinigten Proteine mit FA gezeigt wurde (Abb. 7), bildet VirB5 von *B. suis* Dimere, so dass es sich bei diesem Vernetzungsprodukt vermutlich um ein VirB5-Dimer handelte.

Analyse mit **VirB8**-spezifischem Antiserum zeigte zwei Vernetzungsprodukte (55 kDa und 60 kDa). Es könnte sich hierbei zum einen um ein VirB8-Dimer handeln (ca. 54 kDa), zum anderen um eine Vernetzung zwischen VirB8 und VirB9 (ca. 60 kDa). Auch mit VirB9-spezifischem Antiserum wurde ein Signal im Bereich von ca. 60 kDa detektiert. Ein drittes mit VirB8-Serum nachgewiesenes Produkt hatte ungefähr die Größe von 80 kDa, was einer Verknüpfung von VirB8 und VirB10 entsprechen könnte (82 kDa).

Neben dem möglichen **VirB8-VirB9** Komplex (60 kDa) wurde mit VirB9-spezifischem Antiserum ein Vernetzungsprodukt von ungefähr 90 kDa identifiziert. Hierbei könnte es sich um einen VirB9-VirB10-Komplex handeln.

Die beiden potentiellen **VirB10**-Verknüpfungsprodukte (mit VirB8 und VirB9) wurden auch mit VirB10-spezifischem Antiserum identifiziert. Zudem wurde ein Signal größer als 100 kDa detektiert, was einem VirB10-Dimer entsprechen könnte (ca. 110 kDa).

Bei diesen Interpretationen muss berücksichtigt werden, dass auch nicht interagierende, aber in enger Nachbarschaft liegende Proteine vernetzt werden können. Die Zuordnung der Quervernetzungsprodukte zu möglichen Bindungen zwischen Virulenzproteinen kann daher nur als ein Hinweis auf Protein-Protein-Interaktionen gewertet werden. Um die detektierten Vernetzungsprodukte besser miteinander vergleichen zu können, wurden zusätzlich hochauflösende SDS-Gele und *Western Blot*-Analysen durchgeführt, in denen eine bessere Auftrennung der quervernetzten Proteine erfolgte und die die Zuordnung der molekularen Massen ermöglichten (Daten nicht gezeigt).

2.4. Lokalisierung der Virulenzproteine von *B. suis* in *A. tumefaciens*

Um die in *Agrobacterium* heterolog produzierten VirB-Proteine von *B. suis* zu lokalisieren, wurden subzelluläre Fraktionen der UIA143-Stämme mit den verschiedenen *B. suis virB* Operon-Plasmiden analysiert. Hierfür wurden die pTrc-*virBsuis*-tragenden UIA143-Stämme

in Anwesenheit von IPTG auf AB-Minimalmedium-Platten zur Induktion der Virulenzgene kultiviert. Die Zellen wurden lysiert und das resultierende Totalzelllysate („T“) mittels Ultrazentrifugation in die Membranbestandteile („M“) und lösliche Proteine („S1“) aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden gelelektrophoretisch separiert und die Detektion der VirB-Proteine erfolgte in einer *Western Blot*-Analyse mit spezifischen Antisera (Abbildung 34).

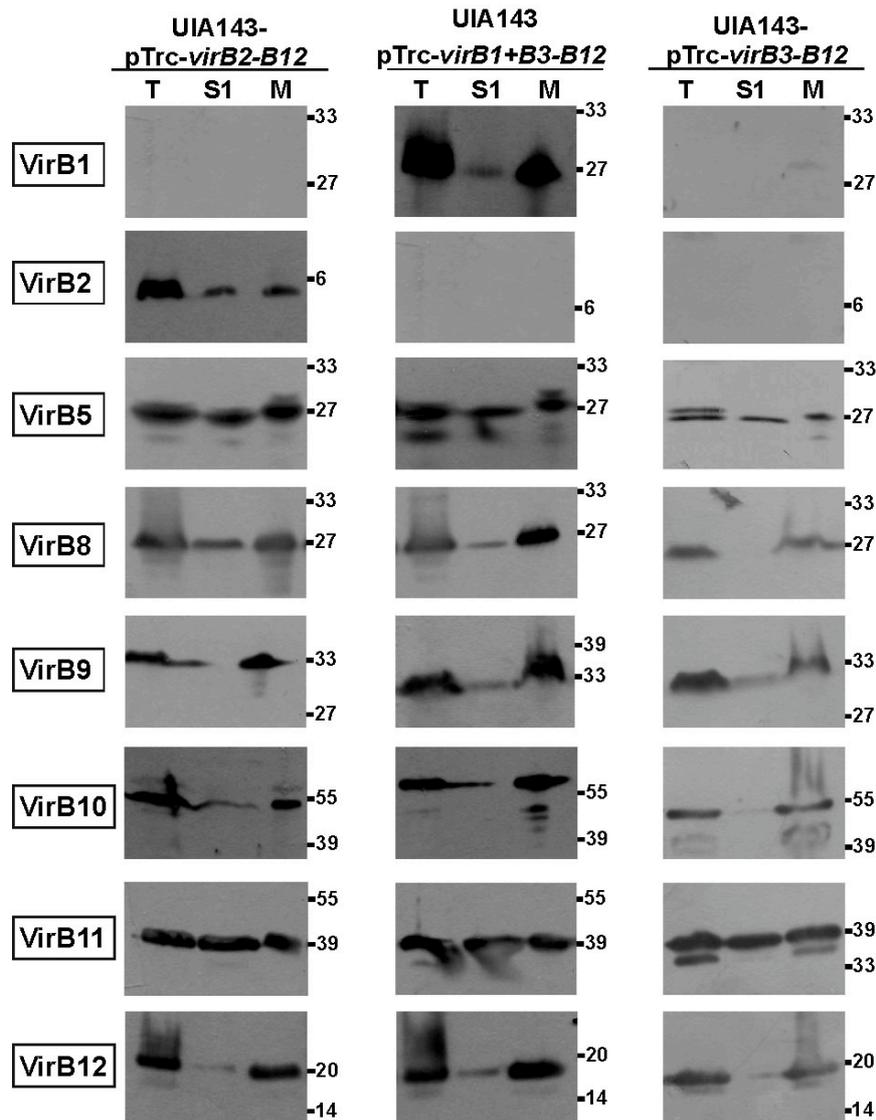


Abbildung 34: Analyse der Lokalisierung von *B. suis* VirB-Proteinen in UIA143-Zellen. UIA143 mit Plasmiden pTrc-*virB2-B12*, pTrc-*virB1+B3-B12* und pTrc-*virB3-B12* wurden unter Virulenzgen-induzierenden Bedingungen kultiviert und anschließend wurden subzelluläre Fraktionen isoliert. Nach Separation der Proben mittels SDS-PAGE wurden die Fraktionen auf Vorhandensein der VirB-Proteine analysiert. T = Totalzelllysate; M = Membranfraktion; S1 = lösliche Proteine.

Alle untersuchten Virulenzproteine wurden in der Membranfraktion nachgewiesen. Unterschiede der Lokalisierung der verschiedenen VirB-Proteine von *B. suis* wurden nur in

wenigen Fällen beobachtet. Im Unterschied zu den VirB-Proteinen von *A. tumefaciens*, die fast ausschließlich in der Membranfraktion detektiert wurden (Krall *et al.*, 2002; Thorstenson *et al.*, 1993), lagen die heterolog produzierten Proteine von *B. suis* auch in der „S1“-Fraktion löslicher Proteine vor (Zytoplasma und Periplasma). VirB2, VirB5 und VirB11 wurden sowohl in der löslichen, als auch in der Membranfraktion in etwa gleichen Mengen detektiert. VirB1, VirB9, VirB10 und VirB12 dagegen lagen zum größten Teil in den Membranen vor und nur geringe Mengen wurden in der „S1“-Fraktion nachgewiesen. Einen „Sonderfall“ bildet allerdings VirB8. Das Protein wurde im Stamm UIA143 pTrc-*virB2-B12* in ähnlichen Mengen in den „S1“- und „M“-Fraktionen detektiert. In den anderen beiden Stämmen dagegen war der Anteil des Proteins in der Membranfraktion deutlich höher. Insgesamt lagen die VirB-Proteine des Kernkomplexes (VirB8, VirB9 und VirB10) in den Zellen des Stammes UIA143 pTrc-*virB3-B12* in einem größeren Anteil in den Membranen vor, als bei UIA143 pTrc-*virB2-B12* und UIA143 pTrc-*virB1+B3-B12*.

2.5. Solubilisierung der *B. suis*-VirB-Proteine aus *A. tumefaciens* mit n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)

Die unter 2.3. und 2.4. dargestellten Resultate ließen den Schluss zu, dass ein Teil der heterolog produzierten Virulenzproteine von *B. suis* einen Proteinkomplex in den Membranen ausbilden könnte. Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die Fragen zu klären, wie stabil dieser ist, welche Proteine daran beteiligt sind und welche Protein-Protein-Interaktionen ausgebildet werden. Dazu wurde ein biochemischer Ansatz verfolgt, der bereits erfolgreich zur Isolierung der Subkomplexe des VirB/D4-Transmembrankomplexes von *A. tumefaciens* eingesetzt worden war (Krall *et al.*, 2002). Unter Verwendung des milden und nicht-ionischen Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) (Schägger und von Jagow, 1991) wurde versucht, den VirB-Proteinkomplex von *B. suis* aus den Membranen von *A. tumefaciens* zu isolieren und seine Stabilität und Protein-Protein-Interaktionen zu analysieren.

Membranproteine können unterschiedlich stark in biologischen Membranen verankert sein. Dies ist abhängig von der Struktur und Länge der hydrophoben und in die Membran eingelagerten Domänen. Die Analyse von Membranproteinen ausserhalb des natürlichen biologischen Kontexts ist deshalb nur nach einer effizienten Solubilisierung der Proteine möglich. Die Effizienz hängt sowohl von dem Protein selbst, als auch von der Konzentration des gewählten Detergenz und von dessen Eigenschaften ab. Dabei ist entscheidend, dass die

eingesetzte Menge des Detergenz höher sein muss als die kritische micellare Konzentration (CMC), bei der Detergenzien noch Micellen bilden. Andererseits darf die Detergenz-Konzentration nicht zu hoch sein, damit der solubilisierter Komplex nicht aufgelöst oder seine Aktivität gehemmt wird (Lottspeich und Zorbas, 1998). In Vorversuchen wurde deshalb die optimale DDM-Konzentration ermittelt, die für die Extraktion der VirB-Proteine von *B. suis* nötig ist. Dazu wurden Membranen der pTrc-*virBsuis*-tragenden UIA143-Stämme wie unter 2.4. beschrieben isoliert, in ACA-Puffer suspendiert und anschließend auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt. Durch Inkubation der Membranen mit unterschiedlichen Konzentrationen DDM (0 bis 2%) wurden die Proteine aus den Membranen herausgelöst, und mittels Ultrazentrifugation in DDM-unlösliche Membranproteine („P“) und lösliche Membranproteine („S2“) separiert. Zur Beurteilung der Effizienz der Solubilisierung mit DDM wurden die unterschiedlichen „P“- und „S2“-Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und einer Immunoblot-Analyse mit spezifischen Antisera unterzogen.

Wie aus Abbildung 35 ersichtlich wurden alle Virulenzproteine bereits ohne die Zugabe von DDM teilweise solubilisiert („S2“, 0%). Möglicherweise führte die heterologe Produktion der VirB-Proteine von *B. suis* in *Agrobacterium* zu einer im Vergleich zu dem nativen VirB/D4-System unvollständigen und schwächeren Verankerung der Proteine in den Membranen. Zudem ist bekannt, dass die im ACA-Puffer vorliegende ϵ -Amino-n-capronsäure die Solubilisierung von Membranproteinen unterstützt (Schägger und von Jagow, 1991). Die Steigerung der DDM-Konzentrationen bewirkte bei VirB1, VirB2, VirB11 und VirB12 keine Steigerung der Solubilisierungs-Effizienz. Im Fall von VirB5, VirB8, VirB9 und VirB10 hingegen führte die Zugabe von 0,5% DDM zu einer Erhöhung der Menge solubilisierter Proteins. Wie schon bei der Analyse subzellulärer Fraktionen zu beobachten (2.4.), waren die VirB-Proteine in UIA143 pTrc-*virB3-B12* offensichtlich am stärksten in den Membranen verankert. In Extrakten aus diesem Stamm wurde im Fall von VirB5, VirB8, VirB9 und VirB10 eine weitere Steigerung der Solubilisierung bei Zugabe von 1,5% DDM beobachtet. Für alle weiteren Experimente wurden deshalb die VirB-Proteine mit 1,5% DDM solubilisiert, um eine maximale Effizienz der Extraktion zu erreichen.

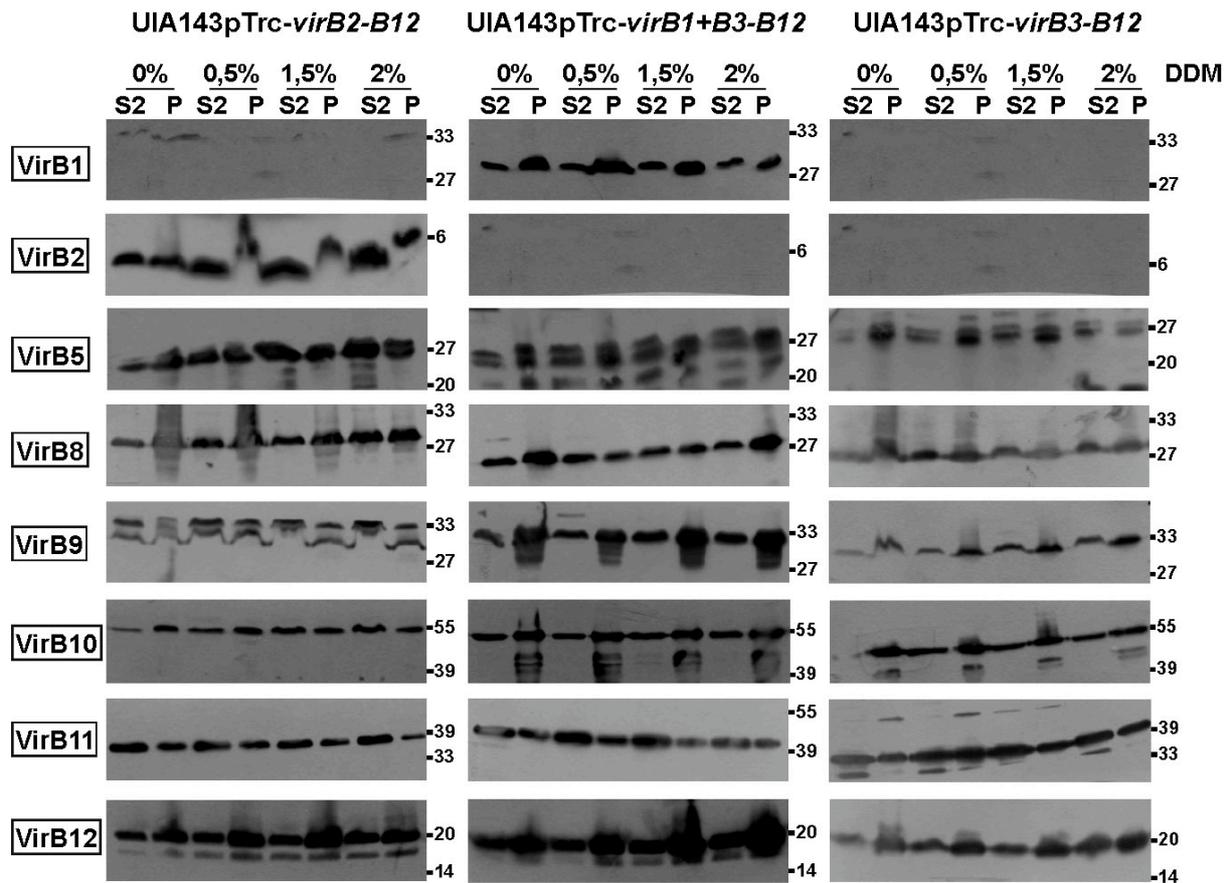


Abbildung 35: Effizienz der Solubilisierung der VirB-Proteine von *B. suis*. Aus virulenzgen-induzierten UIA143-Zellen, die die Plasmide pTrc-*virB2-B12*, pTrc-*virB1+B3-B12* bzw. pTrc-*virB3-B12* trugen, wurden Membranen isoliert und mit 0 / 0,5 / 1,5 und 2% n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) extrahiert. Anschließend erfolgte eine Trennung in solubilisierbare („S2“) und nicht-solubilisierbare („P“) Membranproteine per SDS-PAGE und Analyse mit spezifischen Antisera.

2.6. Auftrennung der DDM-solubilierten Proteine mittels blauer nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Protein-Protein-Interaktionen in den solubilierten Proteinkomplexen zu überprüfen, wurden sie in der Folge unter nativen Bedingungen aufgetrennt. Die Separation erfolgte mit der von Schagger und Jagow speziell für Membranprotein-Komplexe entwickelten blauen nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) (Schagger und von Jagow, 1991; Schagger *et al.*, 1994). Hierbei wird der anionische Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau als SDS-Ersatz genutzt. Den extrahierten Proteinen wird somit eine für die Elektrophorese benötigte negative Ladung verliehen, die native Konformation bleibt aber weitgehend erhalten. Die Proteine wandern während der BN-PAGE entlang eines Polyacrylamid-Gradienten bis zu dem Punkt, an dem sie die Poren des Gels nicht mehr durchdringen können und werden so gemäß ihrer molekularen Masse separiert.

Mit 1,5% DDM solubilisierte Proteine wurden mit Coomassie-Blau G-250 versetzt und unter Verwendung eines nativen Polyacrylamid-Gradientengels (7 bis 20%) aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte für 48 Stunden (5 mA bei 4°C). Anschließend wurden die Proteine auf PVDF-Membranen transferiert und diese mit spezifischen Antisera analysiert (Abb. 36). Zur Bestimmung der molekularen Massen wurden Referenzproteine in parallelen Spuren separiert.

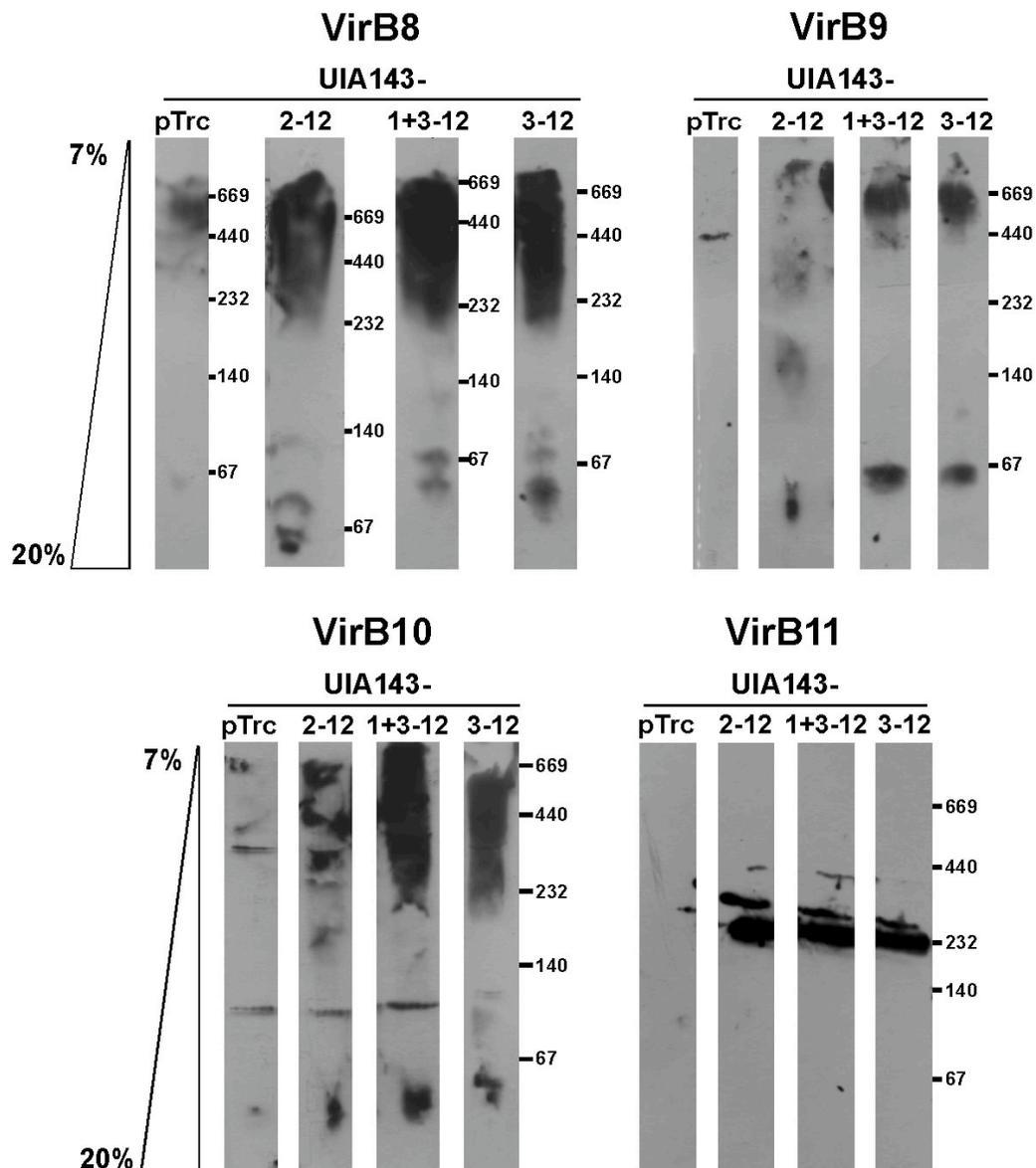


Abbildung 36: BN-PAGE-Analyse DDM-solubilisierter Membranproteine in Polyacrylamid-Gradientengelen (7 bis 20%). Membranen Virulenzgen-induzierter UIA143-Zellen, die die Plasmide pTrc300 (pTrc), pTrc-*virB2-B12* (2-12), pTrc-*virB1+B3-B12* (1+3-12) bzw. pTrc-*virB3-B12* (3-12) trugen, wurden mit 1,5% DDM inkubiert und die solubilisierten Proteine anschließend mit Coomassie-Blau versetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels BN-PAGE in einem nativen Gradientengel. Die VirB-Proteine wurden unter Verwendung spezifischer Antisera detektiert.

VirB8, VirB9, VirB10 und VirB11 wurden in den Extrakten aus allen drei Stämmen in Komplexen unterschiedlicher molekularer Massen nachgewiesen (Abb. 36). Die Detektion mit VirB8-, VirB9- und VirB10-spezifischen Antiseren zeigte, dass diese Proteine in einem oder mehreren hochmolekularen Komplexen der molekularen Massen zwischen 232 und 669 kDa ko-fraktionierten. Dies spricht für eine Assemblierung dieser Kernkomponenten zu einem Multiproteinkomplex in den Membranen, die auch bei *A. tumefaciens* beobachtet wurde (Krall *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurden kleine Mengen dieser drei Proteine auch im Bereich der molekularen Masse von 67 kDa detektiert. Hierbei könnte es sich um nicht vollständig assemblierte Teilkomplexe handeln. Analysen mit VirB11-spezifischem Antiserum identifizierten dieses Protein in einem Komplex der molekularen Masse von ca. 232 kDa. VirB11-Homologe sind eine der ATPasen der T4SS und wurden als Homohexamere identifiziert (Yeo *et al.*, 2000). Bei dem detektierten Komplex könnte es sich um dieses Homo-Oligomer handeln.

Die Detektionen mit VirB2-, VirB5- und VirB12-spezifischen Antiseren ergaben in keinem Fall Signale (nicht gezeigt). Möglicherweise liegen diese Proteine nicht in hochmolekularen Komplexen vor, so dass sie mit der eingesetzten Methode nicht nachgewiesen werden konnten. Aus diesem Grund wurden Proben mittels einer BN-PAGE in einem kurzen Gel ohne Gradienten aufgetrennt, das die Detektion Proteine niedrigerer molekularer Massen ermöglichen sollte (Abb. 37).

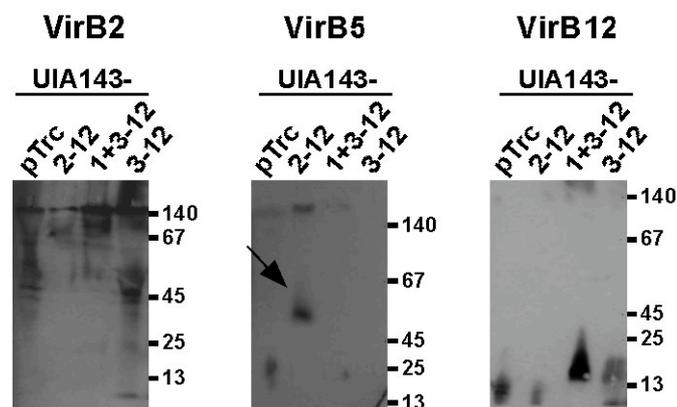


Abbildung 37: BN-PAGE Analyse DDM-solubilisierter Membranproteine in kurzen nativen Polyacrylamidgelen. Membranen Virulenzgen-induzierte UIA143-Zellen, die die Plasmide pTrc300 (pTrc), pTrc-*virB2-B12* (2-12), pTrc-*virB1+B3-B12* (1+3-12) bzw. pTrc-*virB3-B12* (3-12) trugen, wurden mit 1,5% DDM inkubiert und die solubilisierten Proteine anschließend mit Coomassie-Blau versetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels BN-PAGE in einem nativen Polyacrylamidgel ohne Gradient. VirB2, VirB5 und VirB12 wurden unter Verwendung spezifischer Antiseren detektiert.

Nach Verwendung dieses Gelsystems wurde VirB5 als Protein der molekularen Masse von ungefähr 55 kDa detektiert was der Größe eines VirB5-Dimers entspricht (Abb. 37). Dieses Signal wurde allerdings nur in den Zellen nachgewiesen, die Virulenzgene von dem Plasmid pTrc-*virB2-B12* exprimierten, was mit den Resultaten der Quervernetzungsexperimente mit BS³ in Einklang steht (Abb. 33). Auch in diesem Ansatz wurden nur in diesem Stamm höhermolekulare Quervernetzungsprodukte von VirB5 identifiziert. VirB2 und VirB12 dagegen wurden nach Separierung im kurzen BN-Gel weder in Proben aus UIA143 pTrc-*virB1+B3-B12* noch UIA143 pTrc-*virB3-B12* nachgewiesen (Abb. 37). Da VirB12 auch schon in den *in vivo*-Experimenten mit BS³ nicht quervernetzt worden war, liegt die Vermutung nahe, dass VirB12 nicht in den VirB-Membrankomplex integriert ist.

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

VirB2 wurde sowohl nach Separierung in den Gradientengelen, als auch in der kurzen BN-PAGE nicht nachgewiesen. Möglicherweise scheiterte die Separation und Identifikation dieses Proteins daran, dass trotz Zugabe von Coomassie zu den Proben das Protein oder seine Komplexe eine neutrale oder positive Nettoladung behielten, so dass eine Auftrennung mittels Elektrophorese nicht möglich war. Daher wurde ein alternativer Ansatz gewählt, um den pTrc-*virB2-B12*-tragenden Stamm zu analysieren. Proben der mit 1,5% DDM solubilisierten Membranproteine wurden mittels einer Superdex-75-Säule gelfiltrations-chromatographisch aufgetrennt. Der Auftrennungsbereich dieser Säule liegt zwischen 3 kDa und 70 kDa, was eine Identifizierung des VirB2-Proteins auch im Bereich niedriger molekularer Massen ermöglichen sollte.

Die Eluate der Gelfiltrations-Chromatographie wurden durch TCA gefällt, mit SB-Puffer versetzt und per SDS-Page aufgetrennt. Die Detektion von VirB2 und VirB5 erfolgte mittels *Western Blot*-Analyse. Die Zuordnung der Proteine in den eluierten Fraktionen zu einer molekularen Masse erfolgte durch Vergleich mit unter identischen Bedingungen aufgetrennten Referenzproteinen. Als Kontrolle wurden Solubilisate der Membranen von UIA143 pTrc300-Zellen analysiert (Daten nicht gezeigt).

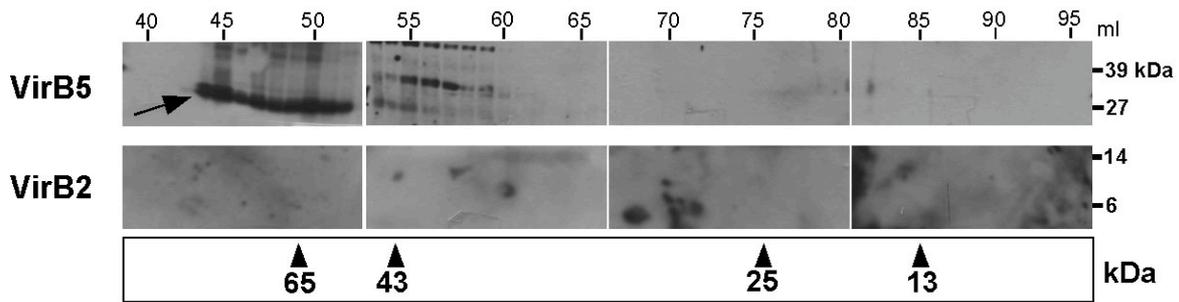


Abbildung 38: Gelfiltrations-Chromatographische Auftrennung DDM-solubilisierter Membranproteine unter Verwendung einer Superdex75-Säule. Membranen Virulenzgen-induzierter UIA143-Zellen, die das Plasmid pTrc-*virB2-B12* trugen, wurden mit 1,5% DDM inkubiert und die solubilisierten Proteine anschließend auf eine Superdex75-Säule aufgetragen. Die eluierten Proteine (Fraktionen in ml angegeben) wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und die *blots* einer Analyse mit VirB2- und VirB5-spezifischen Antisera unterzogen. Die molekularen Massen der in der Gelfiltration zur Kalibrierung eingesetzten Proteine sind unterhalb der Chemoluminogramme angegeben.

In Abbildung 38 sind die Resultate der Gelfiltrations-Chromatographie mit Solubilisaten von UIA143 pTrc-*virB2-B12* dargestellt. Wie bereits nach der Separation mit der kurzen BN-PAGE wurde VirB5 in einem Proteinkomplex der Masse von ca. 65 kDa identifiziert, aber auch diese Methode erlaubte nicht die Detektion von VirB2 in den Eluat.

Insgesamt war es mit den hier eingesetzten Methoden möglich zu zeigen, dass in pTrc-*virB1+B3-B12*- und pTrc-*virB3-B12*-tragenden Zellen die Komponenten des Kernkomplexes (VirB8 bis VirB10 und VirB11) in den Membranen von *A. tumefaciens* zu einem Teilkomplex assemblieren.

3. Identifizierung möglicher zellulärer Interaktionspartner von VirB5 aus *B. suis* mittels „screening“ einer HeLa cDNA-Bibliothek

Bakterien der Gattung *Brucella* sind in der Lage, während des Infektionsprozesses in Wirtszellen einzudringen, dem lytischen System der Zelle zu entkommen und in einer speziellen intrazellulären Nische zu überleben und sich zu vermehren (Boschiroli *et al.*, 2001). Die Mechanismen, die dieses Überleben ermöglichen, sind noch nicht bekannt. Inzwischen wurde nachgewiesen, dass das in verschiedenen *Brucella*-Spezies identifizierte *virB*-Operon für den Infektionsprozess und das intrazelluläre Überleben essentiell ist (Comerci *et al.*, 2001; O'Callaghan *et al.*, 1999). Möglicherweise spielen Komponenten des VirB-Transmembrankomplexes bei Interaktionen mit der Wirtszelle im Rahmen der Pathogenese eine Rolle. In den letzten Jahren wurden in vielen Fällen Oberflächenproteine von pathogenen Mikroorganismen identifiziert, die an Interaktionen mit Proteinen der Wirtszellen beteiligt sind. Interaktionen können zum einen mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche eingegangen werden und damit die Adhäsion des Bakteriums an den Wirt initiieren, wie z.B. das IncG-Protein von *Chlamydia trachomatis* (Scidmore und Hackstadt, 2001). Darüber hinaus wurden kürzlich mittels eines Zwei-Hybrid-Screens Membranproteine von *Arabidopsis thaliana* identifiziert, die mit der Piluskomponente VirB2 von *A. tumefaciens* interagieren (Hwang und Gelvin, 2004). Im Fall des *Brucella* VirB-Systems sind derartige Interaktionen nicht bekannt, aber es gibt Hinweise darauf, dass diese nach Aufnahme in die eukaryotische Zelle eine Rolle spielen könnten (Sieira *et al.*, 2000). Bakterielle Oberflächenproteine könnten an Interaktionen mit intrazellulären Komponenten der Wirtszelle beteiligt sein und damit einen entscheidenden Beitrag zum Überleben des Organismus in der Zelle liefern, z.B. durch Interaktionen mit Enzymen des Primärmetabolismus, wie es für OpaP von *Neisseria gonorrhoeae* beschrieben wurde (Williams *et al.*, 1998).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, zelluläre Interaktionspartner der potentiellen Piluskomponente VirB5 des T4SS von *B. suis* zu identifizieren. Dazu sollten aus einer HeLa cDNA-Bibliothek mittels eines Hefe Zwei-Hybrid-screens mögliche Bindungspartner isoliert werden.

3.1. Verwendung einer HeLa cDNA-Bibliothek zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen

Zur Identifizierung von HeLa-cDNA-kodierten Polypeptiden, die mit VirB5 interagieren, wurde das *Matchmaker* Hefe Zwei-Hybrid-System unter Verwendung einer bereits in Hefe transformierten cDNA-Bibliothek eingesetzt. Das Prinzip des *Matchmaker*-Systems wurde unter Punkt 1.5. ausführlich erläutert (s. auch Abb. 11). Als Köder wurde das mit der DNA-Bindedomäne (DNA-BD) fusionierte VirB5 von *B. suis* eingesetzt. Die Konstruktion des dafür benötigten Expressionsvektors pGBKT7-*virB5* und die durchgeführten Vorversuche sind im Abschnitt 1.5.1. beschrieben. Als Quelle für mit dem Köder interagierende Proteine diente eine cDNA-Bibliothek, bei der die Proteine der Wirtszelle als Fusion mit der Aktivierungsdomäne (AD) des GAL4-Transkriptionsaktivators produziert wurden (HeLa cDNA-Bibliothek, BD Bioscience Clontech). Als Expressionsvektor diente pGADT7-Rec, in den die doppelsträngige cDNA aus HeLa-Zellen mittels homologer Rekombination eingebracht worden war (*BD Matchmaker Library Construction Kit User Manual*). Die Bibliothek wurde in dem Hefestamm *S. cerevisiae* Y187 konstruiert und die Anzahl der unabhängigen Klone betrug $1,3 \times 10^7$.

3.2. Selektion der Interaktionspartner exprimierenden Hefestämme

Die Durchführung des *Screening* erfolgte mittels Paarung von Hefezellen des Stamms AH109 (*mating typ* MATa, produzierte Köder) und des HeLa-cDNA-tragenden Stammes Y187 (MAT α). Die Paarung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit einer 50 ml Übernachtskultur von AH109 pGBKT7-*virB5* und 1 ml Y187-Kultur, die die cDNA-Bibliothek enthielt. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen sedimentiert und in 10 ml Medium suspendiert. Anschließend wurde das gesamte Volumen auf 120 Minimalmedium-Platten (100-150 μ l pro Platte) aufgebracht. Die Selektion auf Klone, die nach der Paarung HeLa-cDNA-kodierte Polypeptide produzierten und in der Lage waren mit VirB5 zu interagieren, erfolgte in drei Schritten. Eine Übersicht über den Ablauf des Zwei-Hybrid-*screens* ist in Abbildung 39 gegeben.

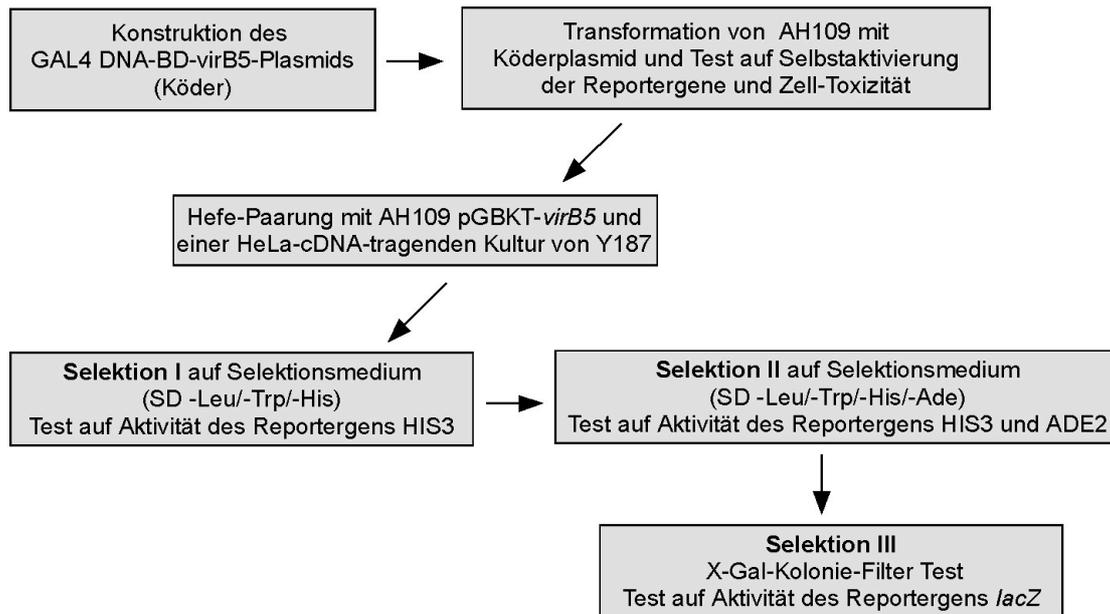


Abbildung 39: Ablauf des *screening* einer HeLa-cDNA-Bibliothek

Der erste Selektionsschritt erfolgte durch Wachstum auf Minimalmedium SD-Leu/-Trp/-His. Dabei wurden zum einen die Hefezellen isoliert, die beide Expressionsvektoren des Zwei-Hybrid-Systems enthielten, zum anderen wurde aber bereits die durch Interaktionen aktivierte Transkription des Reportergens HIS3 untersucht. Nach 6-8 tägiger Inkubation wurden die 450 gewachsenen Kolonien von den Selektionsplatten abgenommen und auf SD-Leu/-Trp/-His/-Ade-Medium übertragen. Somit erfolgte eine weitere Selektion, die auf der Aktivierung des Gens ADE2 beruhte. Dies reduzierte die Zahl auf 200 Kolonien in denen die Transkription des HIS3-Gens und des ADE2-Gens aktiviert war. Um die Stringenz der Selektion weiter zu erhöhen, wurden alle Transformanten auf die Aktivität der β -Galaktosidase mittels eines X-Gal Kolonie-Filter-Tests überprüft. In 130 der Kolonien wurde β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Um ausschließen zu können, dass der positive Phänotyp auf Auto-Induktionsaktivität der c-DNA-kodierten Polypeptide bzw. Mutationen im Reportergen oder dessen regulatorischen Elementen beruhte, wurden die Plasmide in der Folge weiterführend analysiert. Dazu wurden alle Genbank-Plasmide aus den selektierten Hefeklonen isoliert. Da die Plasmidisolierung aus Hefe allerdings zu einem Gemisch aus Genbank-Plasmiden und pGBKT7-*virB5* führte, wurden die Plasmide anschließend in *E. coli* DH5 α transformiert. Mittels Selektion der Transformanten auf Carbenicillin-enthaltendem LB-Medium wurden in den darauf folgenden Plasmidisolierungen ausschließlich die pGADT7-Rec-Plasmide mit den cDNA-Insertionen isoliert. Die zu untersuchenden Plasmide wurden in AH109 transformiert und eine Analyse der pGBKT7-*virB5*-unabhängigen

Aktivierung der Reportergene HIS3 und ADE2 wurde durchgeführt. Alle Stämme, die in der Lage waren auf dem Minimalmedium SD-Leu/-Trp/-His/-Ade zu wachsen, wurden verworfen, da das Wachstum offenbar nicht auf einer Interaktion der cDNA-Genprodukte mit VirB5 beruhte. Darüber hinaus wurde überprüft, ob einzelne Plasmide mehrfach vorkamen. Dafür wurden alle isolierten Plasmide einer PCR-Amplifikation unter Verwendung der Oligonukleotide pT7-7 5' und ADsequ 3' unterzogen, die die enthaltene c-DNA amplifizierte. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit dem Restriktionsenzym *BsuRI* (= *HaeIII*) geschnitten und die Restriktionsmuster wurden verglichen. Plasmide, deren PCR-Produkte identische Restriktionsmuster aufwiesen, waren offenbar Replikate und wurden aussortiert. In Abbildung 40 sind die amplifizierten cDNA-Fragmente und Restriktionen der 23 Plasmide dargestellt, die mit dem Hefe Zwei-Hybrid-Screen nach Durchführung aller Selektionsschritte isoliert wurden.

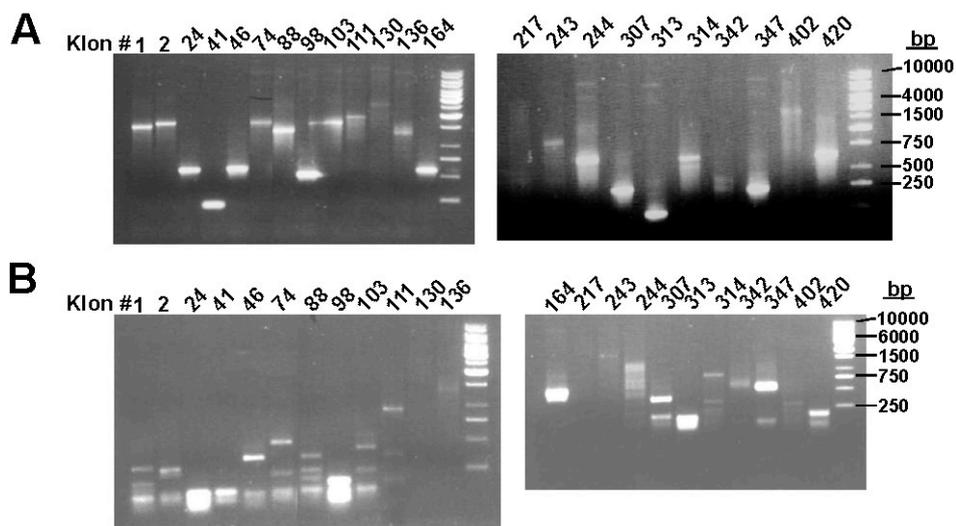


Abbildung 40: PCR-Produkte und Restriktion der Genbank-Plasmide. Aus den im Zwei-Hybrid-System selektierten Hefestämmen wurden die pGADT7-Rac-Plasmide isoliert und die cDNA-Insertion mittels PCR amplifiziert (A). Die resultierenden PCR-Produkte wurden mit dem Enzym *BsuRI* geschnitten (B). Die Proben wurden in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Die Größen von Referenz-DNA-Fragmenten sind rechts neben den Gelen angegeben.

3.3. Analyse der isolierten Klone durch Sequenzierung der entsprechenden cDNA

Die Genbank-Plasmide aus 23 Hefestämmen, die offenbar VirB5-Interaktionspartner exprimierten, wurden mit den Oligonukleotiden pT7-7 5' und ADsequ 3' sequenziert. Diese hybridisieren im Bereich des T7-Promotors bzw. in der Terminationssequenz, so dass Sequenzen von beiden Enden der jeweiligen c-DNA-Fragmente identifiziert wurden. Die

resultierenden Sequenzen wurden mit Hilfe des blastn-Programmes (NCBI) mit Datenbank-Einträgen verglichen, um die kodierten Proteine zu identifizieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Im Zwei-Hybrid-Screen isolierte Genbank-Plasmide und die Ergebnisse der Sequenzvergleiche

Klon	Ergebnisse des Sequenzvergleiches	Gen-ID (PubMed)
# 1	CAPN1; Calpain 1 (mu/I), große Untereinheit	<i>Homo sapiens</i> 823
# 2	PCYT2; Phosphat-Cytidylyltransferase 2, Ethanolamin	<i>Homo sapiens</i> 5833
# 24	Ähnlichkeit zu cSH-PTP2; Protein-Tyrosin-Phosphatase mit SH2-Domäne	<i>Homo sapiens</i> 441868
# 41	keine Sequenz erhalten	
# 74	PCBP1; poly- (rC) Bindeprotein	<i>Homo sapiens</i> 5093
# 88	NQO2; NAD(P)H-Dehydrogenase, Quinon 2	<i>Homo sapiens</i> 4835
# 98	RNH; Ribonuklease / Angiogenin-Inhibitor	<i>Homo sapiens</i> 6050
# 103	PCBP1; poly- (rC) Bindeprotein, identisch mit # 74	<i>Homo sapiens</i> 5093
# 111	RNF2; <i>ring finger</i> Protein 2	<i>Homo sapiens</i> 6045
# 130	EPM2A; Laforin-interagierendes Protein 1	<i>Homo sapiens</i> 9852
# 136	ARPC4; <i>actin related protein</i> , Untereinheit 4 des Arp2/3-Komplex	<i>Homo sapiens</i> 10093
# 164	PHGDHL1; ähnlich zu Phosphoglycerate-Dehydrogenase	<i>Homo sapiens</i> 337867
# 217	Klon RP11-627J17 <i>Homo sapiens</i> Chromosom 3	----
# 243	TMX2; Thioredoxin-verwandtes Transmembranprotein 2	<i>Homo sapiens</i> 51075
# 244	NQO2; NAD(P)H-Dehydrogenase, identisch mit # 88 und #314	<i>Homo sapiens</i> 4835
# 307	ATP5J; ATP-Synthase, mitochondrialer F0-Komplex, UE F6	<i>Homo sapiens</i> 522
# 313	RNH; Ribonuklease / Angiogenin-Inhibitor, identisch mit #98	<i>Homo sapiens</i> 6050
# 314	NQO2; NAD(P)H-Dehydrogenase, identisch mit # 88 und #244	<i>Homo sapiens</i> 4835
# 342	ALP1; Alkalische Phosphatase, intestinal	<i>Homo sapiens</i> 248
# 347	ALP1; Alkalische Phosphatase, intestinal, identisch mit # 342	<i>Homo sapiens</i> 248
# 402	THOP1; Thimet-Oligopeptidase 1	<i>Homo sapiens</i> 7064
# 420	PSMD8; Proteasom, 26S-UE	<i>Homo sapiens</i> 5714

Einigen der Proteine, die als potentielle Interaktionspartner von VirB5 identifiziert wurden, wurde bislang keine Funktion zugeordnet (Klone 130, 164 und 217). Ein großer Teil der isolierten Genbank-Plasmide enthielt dagegen cDNA-Fragmente, deren Produkte an Prozessen der Genexpression oder des RNA-Metabolismus und Katabolismus beteiligt sind. Dazu gehörten RNH (Klone 98 und 313) aus der Familie der Ribonuklease-Inhibitoren

(Zneimer *et al.*, 1990), und RNF2 (Klon 111), das innerhalb eines Proteinkomplexes als Transkriptionsfaktor dient (Tuckfield *et al.*, 2002). Die cDNA-Fragmente der Klone 74 und 103 stimmten mit der Gensequenz eines RNA-bindenden Proteins überein (PCBP1), welches an der mRNA-Prozessierung während der Genexpression beteiligt ist (Chkheidze und Liebhaber, 2003).

Eine weitere Gruppe konnte Proteinen zugeordnet werden, die am Elektronentransfer in Mitochondrien beteiligt sind. Mehrere Klone enthielten cDNA-Fragmente, die mit verschiedenen Abschnitten des Gens der NAD(P)H-Dehydrogenase übereinstimmten (Klone 88, 244, 314). Darüber hinaus wurde die cDNA eines Thiothoxin-verwandten Proteins identifiziert, das beim Elektronentransport eine Rolle spielt (Meng *et al.*, 2003).

Zwei der isolierten Genbank-Plasmide enthielten cDNAs, deren Sequenz mit Genen übereinstimmten, die für Proteine mit proteolytischen Eigenschaften kodierten. Dazu gehörte eine Thimet-Oligopeptidase (Klon 402), die zu den Metallopeptidasen gezählt wird, (Saric *et al.*, 2004) und die 26S Untereinheit eines Proteasoms (Klon 420).

Die Alkalische Phosphatase (Klon 342) und die Phosphat-Cytidyltransferase (Klon 2) sind an Phospholipid-Biosynthesen, z.B. während des Glycerolipid-Metabolismus, beteiligt. Die Phosphat-Cytidyltransferase weist eine Ethanolamin-Phosphat-Cytidyltransferase-Aktivität auf und spielt eine Rolle bei der Biosynthese von Phosphatidylethanolamin. Dieses weit verbreitete Membranlipid wird auch in den Membranen wachsender Autophagosom-Vorläufer angehäuft (Dorn *et al.*, 2002; Melchior, 2003). Interessanterweise fusionieren *Brucella*-enthaltende Vesikel mit frühen Autophagosomen, so dass eine Bindung von VirB5 an derartige Enzyme biologische Relevanz haben könnte.

Auch ein weiteres Polypeptid könnte während des Infektionsprozesses von *Brucella* eine Rolle spielen. Das aus Klon 24 isolierte Plasmid enthielt cDNA, dessen kodiertes Produkt Ähnlichkeit zu Protein-Tyrosin-Phosphatasen mit SH2 (*Src homology 2*)-Domänen aufweist. Diese Proteine katalysieren die Dephosphorylierung von Phospho-Tyrosin-Proteinen und spielen in vielen Signaltransduktionswegen eine Rolle. Im Fall des *H. pylori*-Virulenzfaktors CagA wurde nachgewiesen, dass eine SH2-Tyrosin-Phosphatase das Zielprotein darstellt (Higashi *et al.*, 2002). Auch im Fall dieses Proteins könnte somit eine Bindung von VirB5 biologische Relevanz haben.

Zwei weitere der insgesamt 23 Genbank-Plasmide kodierten Polypeptide, denen im Zusammenhang mit der Infektion durch *Brucella* ssp. eine Funktion zukommen könnte. Die c-DNA von Klon 1 war identisch mit der für das Protein Calpain 1 kodierenden Sequenz. Hierbei handelt es sich um eine intrazelluläre Calcium-aktivierte neutrale Cystein-Protease.

Das in Säugerzellen ubiquitär vorkommende Protein ist aus einer großen katalytischen und einer kleinen regulatorischen Untereinheit aufgebaut. Das im Rahmen des *screens* identifizierte cDNA-Fragment wurde dem für die große Untereinheit kodierenden Abschnitt zugeordnet. Das Protein liegt an verschiedensten Stellen in der Zelle vor und ist in eine Vielzahl von Aktivitäten involviert, wie z.B. Signaltransduktion, Mobilität und Apoptose (Goll *et al.*, 2003). Der an der Bildung und Erhaltung des zellulären Zytoskeletts beteiligte Arp2/3-Komplex (kodiert von Plasmid 136) ist offensichtlich an der Phagozytose von Pathogenen beteiligt und stellt einen besonders interessanten Kandidaten für einen VirB5-Interaktionspartner dar. Im Abschnitt 2 der Diskussion werden diese beiden Proteine genauer diskutiert.

Diskussion

1. Analyse der VirB5-Interaktionen

In den letzten Jahren haben viele Arbeitsgruppen versucht, die einzelnen Komponenten verschiedener bakterieller T4SS detailliert zu charakterisieren. Einigen Proteinen wurden mögliche Funktionen zugewiesen oder ihre Kristall-Strukturen wurden aufgeklärt. Um aber eine Vorstellung über den Vorgang der Assemblierung der T4SS und des Translokationsprozesses zu bekommen ist es von entscheidender Bedeutung, das Zusammenspiel dieser Komponenten im Detail zu analysieren. Zu den Proteinen, deren Rolle während der Typ IV-Sekretion noch weitgehend unklar ist, gehört auch VirB5. Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mögliche Interaktionen der potentiellen Piluskomponente VirB5 von *B. suis* mit den Kernkomponenten VirB8, VirB9 und VirB10 *in vitro* zu untersuchen.

1.1. Bestätigung der Interaktion von VirB5 mit VirB8 und VirB10

Für die geplanten biochemischen Analysen wurden die Virulenzproteine von *B. suis* als StrepII- und His₆Trx-Fusionsproteine in *E. coli* überproduziert und in der Folge gereinigt. Mittels Gelfiltrations-Chromatographie und Quervernetzungsversuchen wurde die Fähigkeit von VirB5, VirB8, VirB9 und VirB10 überprüft, *in vitro* Oligomere auszubilden. Interessanterweise wurde in beiden Versuchsansätzen eine Dimerisierung von VirB5 nachgewiesen, was mit den gelfiltrations-chromatographischen Analysen der homologen Proteine von *A. tumefaciens* (VirB5) und pKM101 (TraC) übereinstimmt (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999a; Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999b). Neuere Untersuchungen von TraC mittels analytischer Ultrazentrifugation lassen dagegen den Schluss zu, dass VirB5-Proteine in Lösung primär als Monomere vorliegen (Yeo *et al.*, 2003). Allerdings wurde in dieser Arbeit im Hefe Zwei-Hybrid-System eine Interaktion von VirB5 mit sich selbst nachgewiesen. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass diese möglicherweise transiente Interaktion *in vivo* eine Rolle spielt.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden mehrere Interaktionen der *B. suis* VirB-Virulenzproteine nachgewiesen, die den so genannten Kernkomplex bilden. Demnach kann VirB8 sowohl mit sich selbst, als auch mit VirB10

interagieren. VirB10 interagiert zusätzlich mit VirB9 und sich selbst. Da diese Interaktionen bereits für die homologen Proteine des Ti-Plasmids gezeigt wurden (Das und Xie, 2000; Finberg *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 2002) und man sie auch im Fall einiger Konjugationssysteme postuliert (Harris *et al.*, 2001), erfüllen diese Komponenten in den verschiedenen T4SS vermutlich ähnliche Funktionen. Man nimmt an, dass sie einen T4SS-Kanal zwischen der inneren und äußeren Membran ausbilden. Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Arbeit für einige dieser Kernkomponenten zum ersten Mal Interaktionen mit VirB5 nachgewiesen. Die Ko-Adsorptionsversuche und die Zwei-Hybrid-Analysen zeigten mögliche Interaktionen von VirB8 bzw. VirB10 mit VirB5, die durch die Bindung an VirB5-Peptidmembranen und die Analyse von VirB5-Varianten bestätigt wurden. Im Fall von VirB5 war bisher nur die Ko-Fraktionierung mit der Piluskomponente VirB2 und dem Lipoprotein VirB7 gezeigt worden (Krall *et al.*, 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen zum ersten Mal frühere Vermutungen, dass VirB5 nicht nur eine Nebenkomponekte des Pilus darstellt, sondern eine zusätzliche Rolle in der Struktur des Transporters oder während der Assemblierung des Pilus spielen könnte (Hapfelmeier *et al.*, 2000; Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999a).

1.2. Lokalisierung der VirB8/VirB10-Bindestellen in VirB5

Basierend auf der bekannten Struktur des ähnlichen Proteins TraC wurden die möglichen Bindestellen von VirB8 und VirB10 in VirB5 lokalisiert. Dazu wurde zuerst der Grad der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von VirB5 aus *B. suis* und TraC des pKM101-Plasmids ermittelt und anschließend wurden die unterschiedlich stark konservierten Bereiche in der TraC-Struktur dargestellt. Die meisten der konservierten Aminosäuren von VirB5 und TraC liegen in dem hydrophoben „Kern“ des Proteins, was strukturelle Gemeinsamkeiten nahe legt. Weiterhin lokalisieren viele der identischen bzw. ähnlichen Aminosäuren in dem globulären Anhang des Proteins, dem eine besondere Rolle im Zusammenhang mit Protein-Protein-Interaktionen zugeschrieben wurde (Yeo *et al.*, 2003). Unter den identifizierten konservierten Aminosäuren befinden sich zahlreiche oberflächen-exponierte hydrophobe Aminosäuren. Inzwischen gibt es viele Hinweise darauf, dass an der Oberfläche von Protein-Interaktionsstellen in vielen Fällen hydrophobe Aminosäuren, wie z.B. L, I oder V, eine hohe Präsenz aufweisen (Jones und Thornton, 1996; Zhou und Shan, 2001). Somit sprach schon vom theoretischen Standpunkt vieles dafür, dass die globuläre Region eine Rolle bei den Protein-Protein-Interaktionen spielen könnte. Mittels der Übertragung der identifizierten

VirB8- und VirB10-Bindestellen auf die TraC-Struktur wurde eben dies deutlich. Die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren von VirB5 lokalisieren hauptsächlich in dem kleinen und helicalen Anhang der TraC-Struktur, von Beginn der 3_{10} -Helix bis zum Anfang der α -Helix. Dieses Bild ergab sich sowohl aus den Resultaten der Peptidmembran-Experimente, als auch aus denen des kompetitiven Interaktionstests. Einen weiteren Hinweis darauf, dass die in der 3_{10} -Helix liegenden Aminosäuren eine Rolle bei der Bindung von VirB5 mit VirB8 spielen, lieferte die Struktur/Funktionsanalyse. Eine VirB5-Variante mit Aminosäure-Austausch in dieser Region („R69A“) war nicht mehr in der Lage, VirB8 zu binden. Yeo *et al.* (2003) zeigten, dass ein Aminosäure-Tausch von T69 im TraC-Protein ebenfalls einen gravierenden Effekt aufwies. In *E. coli* führte dieser Austausch zu einer Reduktion der in den Pilus eingebauten Menge von TraC, was eine reduzierte Konjugationsrate zur Folge hatte. Offensichtlich ist dieser Bereich der VirB5-Proteine für eine vollständige Pilusbiogenese notwendig. Basierend auf diesen Daten kann im Moment nur spekuliert werden, ob die Interaktion mit VirB8 ebenfalls zum Prozess der Pilus-Assemblierung beiträgt.

Ein weiterer Bereich, der in den *Pep Spot*-Versuchen von VirB8 und VirB10 gebunden wurde, war die C-terminale Region des VirB5-Proteins. Diese Interaktionen wurden in den kompetitiven Peptid-Inhibitionsversuchen allerdings nicht bestätigt. Auch weiterführende Analysen mit VirB5-Varianten, die Veränderungen im C-Terminus trugen, lassen nicht den Schluss zu, dass dieser Bereich für die Interaktionen mit VirB8 oder VirB10 eine Rolle spielt (D. Sivanesan, persönliche Mitteilung). Auch der Effekt des As-Austauschs D142A in VirB5 kann nicht eindeutig bewertet werden. Diese VirB5-Variante interagierte weder mit VirB8 noch mit VirB10, aber Peptid III, welches diese Aminosäure beinhaltet, zeigte keinen Effekt im kompetitiven Peptidtest. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Aminosäure-Austausch die Konformation des Proteins stört, und dass dies die Bindung der anderen Domänen beeinflusst. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass eine Veränderung dieser Aminosäure in TraC starke Auswirkungen auf die biologische Aktivität hatte. Obwohl TraC-D142E normal in den Pilus eingebaut wurde, wies dieser *E. coli*-Stamm eine stark reduzierte Konjugationsrate auf und war nicht mehr in der Lage, eine Pilus-vermittelte Phageninfektion zu unterstützen. Dies legt den Schluss nahe, dass TraC/VirB5 neben einer möglichen Rolle bei der Pilusbiogenese auch eine Funktion als Adhäsion einnehmen könnte (Yeo und Waksman, 2004).

Im Verlauf dieser Arbeit wurde klar, dass es sich bei der VirB5-VirB8-Interaktion, verglichen mit der VirB10-Interaktion, offensichtlich um die stabilere und stärkere Bindung handelte. Dennoch zeigte die Darstellung der Bindestellen der beiden Proteine mittels der

TraC-Struktur, dass vermutlich fast identische Bereiche von VirB5 für die Interaktionen mit VirB8 und VirB10 eine Rolle spielen. Innerhalb des im Periplasma gebildeten Kanals interagieren VirB8 und VirB10 miteinander, was sowohl in dieser Arbeit für die Virulenzproteine von *B. suis* gezeigt werden konnte, als auch für das T4SS von *A. tumefaciens* (Das und Xie, 2000). Somit wäre möglich, dass es sich bei der Interaktion zwischen VirB5 und VirB10 um eine „indirekte“ Bindung handelt, die nur durch die Nähe zu VirB8 vermittelt wird. Allerdings könnte die Ähnlichkeit der Bindestellen auch auf eine sukzessive Interaktion von VirB5 mit den beiden Proteinen zurückzuführen sein; VirB5 könnte erst mit VirB8 interagieren und dann an VirB10 „weitergeleitet“ werden.

In jedem Fall muss berücksichtigt werden, dass für die Interpretationen der Daten, die über die Interaktionen von VirB5 von *B. suis* gewonnen wurden, die Struktur von TraC aus *E. coli* herangezogen wurde. Die Lokalisierung der Bindestellen kann deshalb nicht ohne Vorbehalte auf VirB5 übertragen werden. Dennoch ist deutlich geworden, dass der globuläre Anhang der Struktur einen entscheidenden Beitrag zu den Interaktionen der VirB5-Proteine leistet. Der Frage in welchen Phasen der Typ IV-Sekretion diese Interaktionen von Bedeutung sind, muss allerdings weiterhin nachgegangen werden. Die hier dargestellten Ergebnisse liefern aber zum ersten Mal konkrete Hinweise auf mit VirB5 interagierende Proteine des Kernkomplexes und darauf, wie diese Interaktion ablaufen könnte. Ein weiteres Ziel könnte nun die Identifizierung der an der Interaktion beteiligten Bereiche von VirB8 sein. Es sind bereits VirB8-Varianten bekannt, die nicht mehr in der Lage sind, eine Interaktion mit VirB9 und VirB10 auszubilden (Kumar und Das, 2001). Detaillierte Struktur-Funktionsanalysen der einzelnen Untereinheiten des Komplexes werden auch in Zukunft nötig sein, um die Rolle der Virulenzproteine während des Sekretionsprozesses zu klären.

1.3. Überlegungen zu den VirB5-Interaktionen

Die nachgewiesenen Interaktionen von VirB5 mit zwei der Kern-Komponenten werfen die Frage auf, welche Rolle diese für die Funktion des Transportapparates haben könnten. Zum einen könnte VirB5 eine strukturelle Aufgabe zukommen, indem es den Kernkomplex mit dem extrazellulären Pilus verbindet und somit stabilisiert. Unter Berücksichtigung der Daten, die in den letzten Jahren im Rahmen von Analysen von *A. tumefaciens* VirB5 veröffentlicht wurden, wäre allerdings auch eine Funktion für die Assemblierung des Pilus denkbar. Schon mehrfach wurde die Hypothese aufgestellt, dass VirB5 als Chaperon oder *usher*-Protein für

die Haupt-Piluskomponente VirB2 fungieren könnte (Lai *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2000). Beide Proteine gelangen unter Abspaltung des Signalpeptids mittels eines Sec-abhängigen Transports über die innere Membran. Die beiden Komponenten könnten bereits im Periplasma zusammentreffen und anschließend könnte mit VirB5 als Trägerprotein der VirB2-Pilin-Transfer zur äußeren Membran stattfinden. Wie aber passen die Strukturkomponenten VirB8 und VirB10 in das Bild? Beide Proteine lokalisieren in der inneren Membran. Strukturvorhersagen im Fall von VirB8 ergaben, dass der N-Terminus wahrscheinlich im Zytoplasma liegt, dass das Protein die innere Membran mit einem Transmembranbereich durchspannt und dass der C-terminale Bereich im Periplasma lokalisiert. Besonders diese C-terminale Region weist eine starke Konservierung bei VirB8-Homologen verschiedener T4SS auf und könnte deshalb für Interaktionen im periplasmatischen Raum von Bedeutung sein. Im Fall von VirB10 wird postuliert, dass es zusammen mit VirB9 die innere Membran mit der äußeren verbindet und gemeinsam mit VirB8 eine heterooligomere Struktur im Periplasma ausbildet (Cao und Saier, 2001; Kumar und Das, 2001). Neuere Daten schreiben VirB8 allerdings noch eine weitere Rolle zu. In verschiedenen Experimenten wurde eine Interaktion mit der möglichen Transglykosylase VirB1 nachgewiesen (Höppner, 2004; Ward *et al.*, 2002). VirB8 könnte also als Nukleationspunkt dienen, VirB1 „rekrutieren“ und somit eine lokalisierte Lyse der Mureinschicht bewirken, an deren Position dann die weitere Assemblierung des Komplexes stattfindet. Dafür spricht ferner, dass VirB8 auch für eine korrekte Lokalisation von VirB9 und VirB10 in der Zelle benötigt wird (Kumar *et al.*, 2000). Zu diesen frühen Schritten der Biogenese der Transportmaschinerie zählt aber vermutlich auch die Pilus-Assemblierung. Da die Kernstruktur möglicherweise auch als Translokationskanal fungiert (Cao und Saier, 2001; Cascales und Christie, 2003, 2004), könnten die Piluskomponenten VirB5 und VirB2 durch den Transportkanal aus dem Periplasma an die äußere Membran gelangen. Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass der erste Kontakt von VirB5-VirB2 mit dem Transporter durch das Membranprotein VirB4 vermittelt wird (Yuan und Baron, persönliche Mitteilung). Sobald dieser Komplex mit dem Transportkomplex verbunden ist, könnte dann durch die Interaktion von VirB5 mit VirB8 und die anschließende Bindung an VirB10 der Transfer durch den Transportkanal erfolgen. Diese Theorie wird durch die Tatsachen unterstützt, dass VirB4 mit VirB8 interagiert und dass VirB8 in einer *virB4*-Deletionsmutante nur in stark erniedrigter Menge detektiert wurde (Yuan und Baron, persönliche Mitteilung). Untersuchungen von Cascales und Christie ergaben, dass VirB8 und VirB6 frühe Schritte des Substrat-Transports durch den T4SS-Kanal katalysieren (Cascales und Christie, 2004). Es ist

aber denkbar, dass dieser Weg über VirB6 und VirB8 vor dem Substrattransport auch für die Assemblierung des Gesamtkomplexes inklusive der Pilus-Biogenese genutzt wird. Eine direkte Interaktion zwischen VirB5 und VirB6 konnte allerdings noch nicht gezeigt werden. Frühere genetische Studien belegen aber die Bedeutung von VirB6 für die Ausbildung eines Pilus (Fullner *et al.*, 1996; Fullner, 1998), und in einer *virB6*-Deletionsmutante war die Menge von VirB5 in der Zelle reduziert (Hapfelmeier *et al.*, 2000).

In den Untersuchungen von Krall *et al.* (2002) wurde VirB5 bereits zusammen mit einigen anderen Komponenten des VirB-Transmembrankomplexes ko-lokalisiert, und Hinweise für eine Interaktion mit VirB11 wurden auch erhalten (unveröffentlichte Daten). In dieser Arbeit wurden aber zum ersten Mal Interaktion von VirB5 mit Komponenten des Kernkomplexes direkt nachgewiesen. Um zu zeigen, dass die Interaktionen mit VirB8 und VirB10 während der Biogenese des Pilus eine Rolle spielen, sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig. Die Interaktion mit VirB8 könnte auch nach der Pilus-Assemblierung bestehen bleiben, um das Gerüst des T4SS zu stabilisieren und den Pilus dauerhaft mit dem Periplasma zu verbinden.

2. Heterologe Expression des *virB*-Operons von *B. suis* in *A. tumefaciens*

Neben den beschriebenen *in vitro*-Analysen wurde ein weiterer Ansatz zur Untersuchung von Interaktionen zwischen den Virulenzproteinen von *B. suis* durchgeführt. Um biochemische Studien *in vivo* durchführen zu können, wurde *A. tumefaciens* als Modellorganismus für die Expression der Virulenzgene von *Brucella* etabliert. Die Assemblierung der Proteine zu einem Transportkomplex würde in *A. tumefaciens* zwar nicht in ihrem eigentlichen Umfeld erfolgen, aber die Analysen wären weniger artifiziell als die der gereinigten Proteine *in vitro*. Ein Vergleich mit den Informationen, die über das T4SS von *A. tumefaciens* gewonnen wurden, würde zusätzlich eine Beurteilung genereller Mechanismen und Strukturen verschiedener T4SS ermöglichen.

2.1. Expression der *virB*-Gene in *A. tumefaciens*

Während der Testexpressionen der unterschiedlichen pTrc300-Derivate in *A. tumefaciens* UIA143 zeigte sich, dass die Mengen der meisten VirB-Proteine sich abhängig von der

Organisation der *virB*-Operonen signifikant unterschieden. Erstaunlicherweise waren die Mengen der VirB-Proteine in UIA143 pTrc-*virB1-B12* verglichen mit den anderen Stämmen (UIA143 pTrc-*virB2-B12*, UIA143 pTrc-*virB1+B3-B12* und UIA143 pTrc-*virB3-B12*) stark reduziert. Bei heterologer Expression des *virB*-Operons beeinflussten sich VirB1 und VirB2 offensichtlich gegenseitig negativ. Die Expression von *virB1* zusammen mit *virB2* übte darüber hinaus einen negativen Effekt auf die Mengen aller anderen *B. suis* VirB-Proteine in *A. tumefaciens* aus. Im Gegensatz dazu hatten *virB1* bzw. *virB2* alleine keinen Einfluss auf die Mengen der anderen VirB-Proteine (in UIA143 pTrc-*virB1+B3-B12* und UIA143 pTrc-*virB2-B12*). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, warum die Mengen der Proteine in den verschiedenen Stämmen so stark voneinander abwichen, obwohl die Unterschiede der Sequenzen der Plasmide relativ gering sind. Eine Analyse mittels RT-PCR könnte helfen zu beurteilen, ob bereits während der Transkription der *virB*-Gene Unterschiede der mRNA-Stabilität auftreten.

2.2. Lokalisierung und Solubilisierung der VirB-Proteine

Alle in UIA143 heterolog produzierten *B. suis*-Virulenzproteine unterschieden sich hinsichtlich ihrer Lokalisierung von denen eines *A. tumefaciens* Wt-Stammes, in dem die Proteine fast ausschließlich in der Membranfraktion detektiert wurden (Krall *et al.*, 2002; Shirasu und Kado, 1993). Im heterologen System wurden die meisten der Proteine auch in der „S1“-Fraktion nachgewiesen, welche die löslichen Proteine enthält.

Um die Virulenzproteine von *B. suis* aus der Membran von *A. tumefaciens* UIA143 zu extrahieren, wurde das milde und nicht-ionische Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) eingesetzt. Dies ermöglichte es, die Membran-Verankerung der verschiedenen heterolog produzierten VirB-Komponenten zu beurteilen. Die Proteine wurden zum größten Teil sogar ohne Zugabe von DDM und in allen Fällen durch niedrige Konzentrationen des Detergenz solubilisiert. Möglicherweise ist dies auf die im eingesetzten Puffer vorliegende ϵ -Amino-n-capronsäure zurückzuführen, die eine unterstützende Wirkung bei der Solubilisierung von Membranproteinen aufweist (Schägger und von Jagow, 1991). Bei vergleichbaren Solubilisierungsversuchen mit den T4SS-Komponenten von *A. tumefaciens* wurden ebenfalls einige der Proteine bereits bei 0% DDM aus der Membran herausgelöst (Krall *et al.*, 2002). Ein weiterer Grund für die verringerte Membran-Affinität der Virulenzproteine von *B. suis* könnte in der heterologen Produktion liegen. Eventuell bilden sich nicht alle notwendigen Interaktionen der beteiligten Komponenten so aus, wie es im nativen System der Fall wäre,

weil *Brucella*-spezifische Assemblierungsfaktoren fehlen. Darüber hinaus könnten auch Unterschiede in der Membran-Zusammensetzung zwischen *Agrobacterium* und *Brucella* dazu führen, dass die Membranverankerung der heterolog produzierten Proteine herabgesetzt ist.

2.3. Identifizierung von T4SS-Subkomplexen von *B. suis* in den Membranen von *A. tumefaciens*

Im Zuge der Quervernetzungsversuche mit BS³ und der BN-PAGE-Analysen wurde deutlich, dass zumindest ein Teil der heterolog produzierten Virulenzproteine von *B. suis* Komplexe in den Membranen von *A. tumefaciens* ausbildet. Hierbei scheint es sich um einen Subkomplex aus den Kernkomponenten VirB8 - VirB10 und eventuell auch mit VirB11 zu handeln. Nach Separation der solubilisierten Membranproteine unter nativen Bedingungen wurden in den drei untersuchten Stämmen (UIA143 mit pTrc-*virB2-B12*, pTrc-*virB1+B3-B12* bzw. pTrc-*virB3-B12*) VirB8, VirB9 und VirB10 gemeinsam in einem Komplex hoher molekularer Masse identifiziert. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Proteine in den Membranen nahe nebeneinander vorliegen und Interaktionen ausbilden, was durch Quervernetzungs-Experimente bekräftigt wurde. Nach Separation mittels BN-PAGE wurde VirB11 in einem kleineren Komplex von ungefähr 232 kDa detektiert. Dieses Protein war somit nicht oder nur schwach mit den Kernkomponenten VirB8, VirB9 und VirB10 verbunden. Für diese Interpretation spricht auch, dass VirB11 leichter aus den Membranen extrahiert wurde, und somit nicht stark an den T4SS-Komplex bindet. An Hand der Daten der Kristallstruktur des Homologen HP0525 aus *H. pylori* postulierten Yeo *et al.* (2000), dass VirB11 in seiner funktionellen Form als Hexamer vorliegt und eine Pore ausbilden könnte. Vor diesem Hintergrund ist es besonders interessant, dass das mittels BN-PAGE separierte VirB11 ungefähr die molekulare Masse eines Homohexameres hatte. Dies könnte als ein Hinweis auf die mögliche Funktionalität des Proteins in dem ausgebildeten Teilkomplex gewertet werden.

VirB12 konnte in keinem Komplex detektiert werden. Das 19 kDa große Protein enthält sowohl eine Signal- als auch eine Lipoprotein-Modifizierungssequenz. Es ist nicht bekannt, welche Funktion VirB12 in *Brucella* hat, und ob es Teil des assemblierten Sekretionssystems ist, aber es scheint nicht essentiell für das intrazelluläre Überleben in Makrophagen zu sein (O'Callaghan *et al.*, 1999). In den Analysen, die der heterologen Expression der Virulenzgene folgten, wurde VirB12 fast ausschließlich in der Membranfraktion detektiert. Dennoch bestand offensichtlich keine starke Affinität zu den Membranen, da das Protein auch ohne die

Zugabe von DDM extrahiert wurde. Darüber hinaus wurden weder VirB12-spezifische Quervernetzungsprodukte in den Zelllysaten detektiert, noch wurde das Protein in den mittels BN-PAGE separierten Komplexen identifiziert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen führen zu der Annahme, dass VirB12 möglicherweise keine Komponente des Transportkomplexes ist. Es könnte als Lipoprotein in der äußeren Membran eine Rolle bei der Interaktion mit Oberflächenproteinen der Wirtszelle spielen. Diese Annahme wird durch einen von O'Callaghan *et al.* (1999) durchgeführten Sequenzvergleich bestärkt, der Ähnlichkeiten mit dem Protein F von *Pseudomonas syringae* feststellte. Dieser pflanzenpathogene Organismus nutzt OprF als Adhäsion und dies könnte auch die Rolle von VirB12 sein.

In keinem der Versuchsansätze wurde ein Komplex niedriger molekularer Masse identifiziert, der in Analogie zu *A. tumefaciens* die potentiellen Piluskomponenten VirB5 und VirB2 enthielt (Krall *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde weder in UIA143 pTrc-*virB1-B12*, noch in UIA143 pTrc-*virB2-B12* VirB2 an der Oberfläche der Zellen detektiert. Interessanterweise war es jedoch möglich, VirB5 in abgescherten und der Oberfläche exponierten Strukturen nachzuweisen, was auf eine Pilus-ähnliche Struktur hindeuten könnte. Nach Separation solubilisierter Membranproteine mittels BN-PAGE und Gelfiltrations-Chromatographie von Proben des Stamms UIA143 pTrc-*virB2-B12* wurde VirB5 in einem Komplex von ungefähr 65 kDa identifiziert, aber ein Nachweis von VirB2 war nicht möglich. Dies könnte mit einer nicht vollständigen Prozessierung des Proteins zusammenhängen. Im Fall von *A. tumefaciens* VirB2 ist bekannt, dass nach Abspaltung der Signalsequenz, eine Zyklisierung des verbleibenden Peptides erfolgt (Lai *et al.*, 2000). Bisher wurde nicht geklärt, ob diese Prozessierung parallel zur Reaktion der Signalpeptidase stattfindet oder ob sie in einem zusätzlichen Schritt abläuft, bei dem ein weiteres Enzym benötigt wird. Diese Prozessierung des T-Pilins von *A. tumefaciens* erfolgt jedoch nicht in *E. coli* (Lai *et al.*, 2002). Ein Sequenzvergleich mit dem VirB2-Homolog TrbC des IncP-Plasmids lieferte Hinweise dafür, dass auch das VirB2-Protein von *B. suis* als zirkuläres Peptid vorliegen könnte (Eisenbrandt *et al.*, 2000). Andere post-translationale Modifikationen sind ebenfalls denkbar, wie z.B. die Acetylierung von TraA des F-Plasmids (Moore *et al.*, 1993). Möglicherweise sind für die Pilus-Assemblierung von VirB2 von *B. suis* nach der Abspaltung des Signalpeptides weitere Modifikationen notwendig, die in *A. tumefaciens* nicht erfolgen.

2.4. Funktionalität des T4SS von *B. suis* in *A. tumefaciens*

Parallel zu den in dieser Arbeit beschriebenen biochemischen Analysen wurden Studien zur Funktionalität der gebildeten Proteinkomplexe durchgeführt (Höppner, 2004). Dabei wurde mittels eines Konjugationstest untersucht, ob die *Agrobacterium*-Stämme, die das T4SS von *B. suis* produzieren, als Rezipienten für den Transfer eines IncQ-Plamides dienen können. Diese Untersuchungen zeigten, dass der Stamm UIA143 pTrc-*virB1+B3-B12* die höchste Rezipientenaktivität aufwies. Die Transfereffizienz erreichte 40% verglichen mit einem *Agrobacterium*-Stamm mit nativem T4SS. UIA143 pTrc-*virB3-B12* hatte ungefähr 10% der Transfereffizienz. Die Stämme UIA143 pTrc-*virB1-B12* und UIA143 pTrc-*virB2-B12* stimulierten den konjugativen Plasmidtransfer nicht. Eine auf den ersten Blick überraschende aber sehr interessante Beobachtung ist, dass nur die Stämme als Rezipienten fungierten, denen das *virB2*-Gen fehlte. Dies ist mit den Resultaten der Quervernetzungsversuche der entsprechenden Stämme konsistent. Quervernetzungsprodukte hoher molekularer Massen wurden nur in den Membranen der Stämme detektiert, die Plasmid pTrc-*virB1+B3-B12* oder pTrc-*virB3-B12* trugen. Offensichtlich waren nur hier die einzelnen Komponenten des Komplexes so zueinander lokalisiert, dass Protein-Protein-Interaktionen ausgebildet werden konnten, woraus ein funktionaler Kanal resultierte. Eine Ursache für die fehlende Rezipientenaktivität von UIA143 pTrc-*virB2-B12* könnte die möglicherweise fehlende Modifikation des VirB2-Proteins sein, die zu einer Akkumulation nicht prozessierten Proteins im Periplasma führen könnte. Eine Assemblierung des Proteinkomplexes zwischen innerer und äußerer Membran und funktionale Protein-Protein-Interaktionen könnten dadurch verhindert werden. Die biochemischen Daten legen zwar nahe, dass auch in den Stämmen UIA143 pTrc-*virB1+B3-B12* und UIA143 pTrc-*virB3-B12* kein vollständiges T4SS assembliert wird, aber eine wahrscheinlich auf die Komponenten VirB8, VirB9, VirB10 und VirB11 zurückzuführende Teilfunktion war dennoch nachweisbar. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits in Konjugationsversuchen mit *A. tumefaciens* gemacht. In der Donorzelle waren alle VirB-Proteine mit Ausnahme von VirB1 essentiell. Um als Rezipient fungieren zu können waren allerdings nur VirB7-VirB10 notwendig (Liu und Binns, 2003). Offensichtlich bilden diese Komponenten bereits eine Struktur aus, die ausreicht, um DNA über die Zellhülle hinweg aufzunehmen. Dies scheint mit den Kernkomponenten von *B. suis* ebenfalls möglich. Eine deutliche Steigerung der Aufnahmeeffizienz wurde in dem Stamm beobachtet, der zusätzlich *virB1* trug. VirB1 übt seine Funktion wahrscheinlich während der Assemblierung des Transmembran-Komplexes aus (Koraimann, 2003). Die Mureinschicht

stellt bei der Assemblierung von Strukturen innerhalb der Zellhülle eine Barriere dar (Dijkstra und Keck, 1996), die mit Hilfe von VirB1 wahrscheinlich zum Teil aufgelöst wird.

Die Daten in dieser Arbeit zeigen Gemeinsamkeiten in der Struktur und der Assemblierung der T4SS von *A. tumefaciens* und *B. suis* auf. Wie bei *Agrobacterium* bilden VirB8 bis VirB11 offensichtlich den Kernkomplex zwischen den Membranen aus, der für den T4SS-Apparat sowohl eine strukturelle, als auch eine funktionelle Bedeutung hat. Die Funktionen von VirB2 und VirB5 für das T4SS von *B. suis* bleiben allerdings weiterhin unklar. Beide Proteine spielen für die Funktionalität des Kernkomplexes keine Rolle, aber interessanterweise liegt VirB5 auch ausserhalb der Zelle vor. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, ob dies auch in *Brucella* der Fall ist. Das Fehlen einer pilus-ähnlichen Struktur im heterologen System erlaubt allerdings keine Aussage über die tatsächliche Situation in *B. suis*. Da in den letzten Jahren gezeigt wurde, dass die T4SS verschiedener Organismen eine Vielfalt von Oberflächenstrukturen ausbilden, könnte eine derartige Struktur in *Brucella* in ihrer Morphologie und Zusammensetzung von der in *A. tumefaciens* verschieden sein.

3. Isolierung zellulärer Interaktionspartner des VirB5-Proteins und ihre Bedeutung für den Infektionsprozess von *B. suis*

Das in *B. suis* identifizierte *virB*-Operon ist für den Infektionsprozess und das intrazelluläre Überleben des Organismus essentiell. Komponenten des Transmembrankomplexes könnten möglicherweise durch Interaktionen mit Proteinen der Wirtszelle in der Pathogenese eine Rolle spielen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mit VirB5 von *B. suis* interagierende Proteine in HeLa-Zellen zu identifizieren. Nach Fertigstellung der Genbank-Analysen konnten allerdings im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Analysen der potentiellen Interaktionspartner mehr durchgeführt werden. Weitere Untersuchungen zur Bestätigung der Interaktionen sind deshalb vonnöten. Im Folgenden wird die mögliche Rolle der im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen identifizierten humanen Proteine diskutiert.

3.1. Die Rolle des VirB-Systems für das intrazelluläre Überleben von *Brucella* ssp.

Die Wege der Bindung und Aufnahme von *Brucella* ssp. an Wirtszellen sind nicht vollständig bekannt, aber verschiedene Beobachtungen legen nahe, dass die Bakterien von nicht-professionellen Phagozyten aktiv internalisiert werden (Comerci *et al.*, 2001). Mutation in Genen des regulatorischen Zwei-Komponentensystem BvrS / BvrR aus *Brucella* führten allerdings zu einer stark reduzierten Aufnahme in Makrophagen und HeLa-Zellen, was eine aktive Förderung der Aufnahme durch das Bakterium vermuten lässt (Sola-Landa *et al.*, 1998). Widersprüchlich sind auch die Daten über die Erforderlichkeit des VirB-Systems von *Brucella* ssp. während der Infektion. Comerci *et al.* (2001) zeigten, dass ein funktionales T4SS für die Aufnahme in die Zelle und die ersten Schritte der Biogenese *Brucella*-enthaltender Vakuolen nicht entscheidend ist. Andere Untersuchungen dagegen legen einen VirB-abhängigen Aufnahme-Mechanismus und eine Funktion des VirB-Systems bereits in den ersten Minuten der Infektion nahe (Watarai *et al.*, 2002; Watarai *et al.*, 2003). Dagegen spricht allerdings, dass nur ein geringer Anteil der Bakterien die ersten Stunden nach Eintritt in die Wirtszelle überlebt. Dies könnte bedeuten, dass das Vermögen intrazellulär zu überleben nicht von Beginn an programmiert ist (Celli und Gorvel, 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die *virB*-Gene von *B. suis* erst intrazellulär exprimiert werden und dafür war die starke Ansäuerung des Phagosomen-Milieus entscheidend (Boschiroli *et al.*, 2002). Für die Persistenz von *Brucella* und das Ausbilden der Replikations-Nische ist das VirB-System aber in jedem Fall essentiell (Comerci *et al.*, 2001; Sieira *et al.*, 2000) und man geht davon aus, dass mehrere Virulenzfaktoren über dieses T4SS in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangen. Hierbei könnte entscheidend sein, dass die Effektoren zur richtigen Zeit und am richtigen Ort die Vakuole verlassen. Die potentiellen Piluskomponenten VirB2 und VirB5 könnten vor und während der Sekretion eine Bindung mit dem Phagosom oder auch mit dem Zielprotein eines Virulenzfaktors eingehen und somit bewirken, dass die sekretierte Komponente direkt wirken kann.

3.2. Mögliche Interaktionspartner von VirB5 in der Zelle und ihre Bedeutung für den Infektionsprozess

3.2.1. Der Arp2/3-Komplex

Eines der Proteine, das im *Two-Hybrid-Screen* als potentieller Interaktionspartner von VirB5 identifiziert wurde, war die Untereinheit 4 des Arp2/3-Komplexes. Dieser

Multiproteinkomplex ist an der Bildung und Erhaltung des zellulären Cytoskeletts beteiligt und stellt einen besonders interessanten Kandidaten für einen VirB5-Interaktionspartner dar. Die mögliche Bedeutung einer solchen Interaktion für den Infektionsprozess von *B. suis* wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

Gegenwärtig sind neben *Brucella* ssp. zahlreiche intrazelluläre Pathogene bekannt, welche den Weg und/oder die Reifung ihres membrangebundenen Kompartimentes innerhalb der Wirtszelle verändern (Dorn *et al.*, 2002). Bislang ist es unklar, was diese Vesikel-Umleitung bewirkt, da der Prozess der Phagosom-Biogenese selbst noch nicht ausreichend verstanden ist. Es ist schon länger bekannt, dass Proteine des Zytoskelettes bei der Ausbildung der Phagosomen während der Phagozytose mitwirken. Einige pathogene Organismen nutzen dies und stimulieren die Aktin-Polymerisation für eine effiziente Aufnahme (Alrutz *et al.*, 2001; Cossart und Sansonetti, 2004). Für einen langen Zeitraum wurde die Meinung vertreten, dass die Aktin-Filamente, die die neu internalisierten Phagosomen umhüllen, rasch depolymerisieren, um die Fusionen mit Endosomen und Lysosomen zu ermöglichen. Inzwischen wurde aber von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt dass es im Gegensatz zur früheren Annahme sogar zu einer Anreicherung von Aktin an Phagosomen kommt (Desjardins *et al.*, 1994; May und Machesky, 2001). Darüber hinaus nimmt man an, dass die Bewegung der Vesikel innerhalb der Zelle von Aktin-Polymerisierungsprozessen abhängig ist, und dass die Interaktion mit Aktin-Filamenten eine entscheidende Rolle in der Phagosomen-Biogenese spielt (Gotthardt *et al.*, 2002; Southwick *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002). Das Aktin-Netzwerk kann durch verschiedene Proteine umstrukturiert werden, von denen einige auch zu Phagosomen rekrutiert werden. Als einer der potentiellen Nukleationsfaktoren für die Reorganisation von Aktin gilt der aus sieben Untereinheiten bestehende Arp2/3-Komplex (Machesky und Gould, 1999). Wie dieser Komplex rekrutiert und aktiviert wird ist unklar. Die ersten Beweise für eine Aktivität des Arp2/3-Komplexes als Nukleationsfaktor für Aktin waren Beobachtungen, dass er die Aktin-Polymerisation an der Oberfläche von *Listeria monocytogenes* induzieren konnte (Welch *et al.*, 1997). Inzwischen wurde auch im Fall von *Shigella* und *Rickettsia* gezeigt, dass mittels des Arp2/3-Komplexes das Aktin-Netzwerk des Wirtes umorganisiert und ein so genannter „Aktinschweif“ ausgebildet wird, welcher der intrazellulären Fortbewegung dient (Cossart, 2000). Weitere genetische und zellbiologische Daten belegen aber, dass eine Stimulation des Aktin-Netzwerkes auch von intravakuolären Organismen genutzt wird, um mit der Phagosom-Reifung zu interferieren. Im Fall von Vakuolen mit dem intrazellulären Bakterium *Salmonella*

typhimurium in Makrophagen beobachtete man eine Akkumulation von Aktin um die Vakuole, was vermutlich deren Stabilisierung dient. Für diese Rekrutierung von Aktin-Filamenten ist ein Virulenzfaktor nötig (SifA), der mittels eines Typ III-Sekretionssystems aus dem Bakterium in das Zytosol der Wirtszelle geschleust wird (Meresse *et al.*, 2001). Im Fall des eukaryontischen Krankheitserregers *Leishmania donovani* wurde gezeigt, dass F-Aktin um das *Leishmania*-enthaltende Vesikel akkumuliert und dadurch möglicherweise die Bewegung zu Phagosomen physikalisch blockiert wird (Amer und Swanson, 2002).

Über den weiteren Verlauf der Reifung der *Brucella*-enthaltenden Vakuolen ist bekannt, dass sie mit Vesikeln des frühen endosomalen Weges fusionieren. Diese weichen dann aber von ihrem üblichen Reifungsprozess ab, der zur Ausbildung eines Phagolysosoms führen würde (Abb. 41).

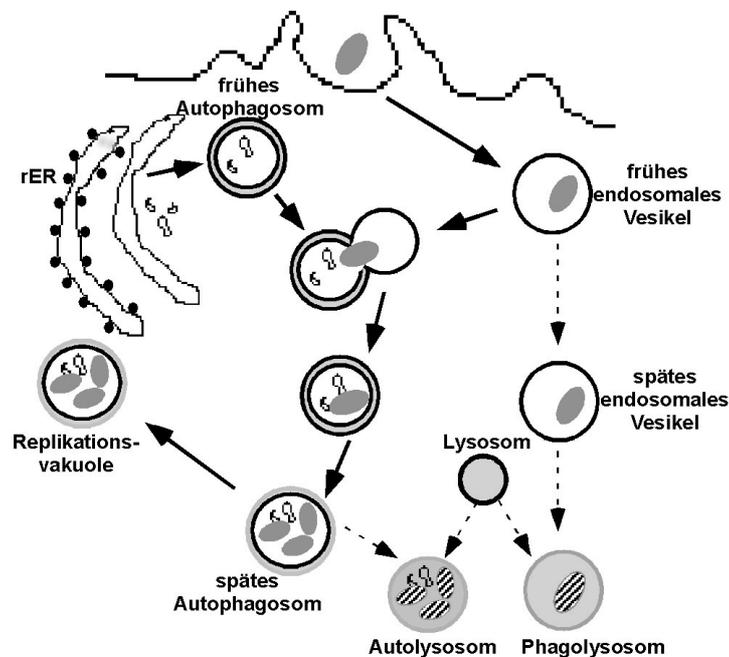


Abbildung 41: Modell des intrazellulären Weges von *Brucella* ssp. in Hela-Zellen. Nach der Aufnahme gelangen die Bakterien in frühe Vesikel des endosomalen Weges und fusionieren dann mit frühen Autophagosomen. Diese reifen zu späten Autophagosomen heran, deren Fusion mit Lysosomen verhindert wird. Nach einem retrograden Transport erreichen die *Brucella*-enthaltenden Vesikel das rauhe endoplasmatische Retikulum (rER) und dort findet die Replikation statt. Die schwarzen Pfeile geben den Weg der Vakuolen in Zellen an, welche virulente *Brucella*-Stämme enthalten. Die gestrichelten Pfeile zeigen den Weg, den die einzelnen Vesikel in ihrem Reifungsprozess normalerweise durchleben (modifiziert nach Dorn *et al.*, 2002).

An Stelle der Fusion mit Lysosomen bewirkt *Brucella* den Eintritt des endosomalen Vesikels in den autophagocytischen Weg und eine Fusion mit einem frühen Autophagosom, welches aus dem rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER) hervorgeht (Dorn *et al.*, 2002).

Die Vesikel entfernen sich anschließend vom ER und durchlaufen den normalen Reifungsprozess hin zum späten Autophagosom, was mit der Veränderung von Oberflächenmolekülen der Vakuolen einhergeht. Die Fusion dieser späten Autophagosomen mit Lysosomen wird verhindert und das *Brucella*-enthaltende Autophagosom wird zum ER „zurückgeleitet“, wo der Organismus persistiert und sich vermehrt (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998).

Die Umleitung von Vesikeln und die Verhinderung der Fusion mit Lysosomen stellt eine verbreitete Überlebensstrategie intravakuolärer Bakterien dar. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass eine aktive Veränderung des Zytoskelettes der Wirtszelle daran beteiligt sein könnte. Auch *Brucella* ssp. könnte diese Mechanismen nutzen, um sich das intrazelluläre Überleben zu sichern. Es ist deshalb denkbar, dass eine Interaktion von Komponenten des T4SS mit dem Arp2/3-Komplex biologisch relevant sein könnte.

3.2.2. Die Protease Calpain 1

Ein weiterer im *Two-Hybrid-Screen* identifizierter potentieller Interaktionspartner von VirB5 war das Protein Calpain. Es gehört zu den Cystein-Proteasen, ist Calcium-abhängig und ubiquitär in Säugerzellen verbreitet. Die physiologische Funktion und die Substrate von Calpain sind nur zum Teil bekannt. Zu den Prozessen, in die das Protein involviert ist, gehören die Regulation des Zellzyklus, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Apoptose. Seine Rolle während der Apoptose ist Gegenstand aktiver Forschung und wird kontrovers diskutiert (Goll *et al.*, 2003). Calpain ist an der Spaltung einiger Caspasen beteiligt, und diese Proteasen spielen eine Hauptrolle in den Signalketten der Apoptose. Allerdings wurden im Rahmen der Untersuchungen der Funktionen von Calpain sowohl die Inaktivierung pro-apoptotischer Caspasen (Caspase-7 und -9) (Chua *et al.*, 2000), als auch eine Aktivierung (Caspase-3 und -12) (Altnauer *et al.*, 2004; Nakgawa und Yuan, 2000) beschrieben. Darüber hinaus wurde ein Einfluss von Calpain auf die Aktivierung von pro-apoptotischen Proteinen wie Bax und Bid beschrieben (Altnauer *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 1998). Calpain scheint somit unter manchen Bedingungen durch Inaktivierung von Caspasen als negativer Regulator der Apoptose, in anderen Fällen aber auch als positiver Regulator zu fungieren. Die entsprechende Rolle scheint vom Zelltyp und von verschiedenen Signalen abhängig zu sein (Goll *et al.*, 2003).

Der Zelltod durch Apoptose ist eine allgemeine Antwort von Wirtszellen auf verschiedenste bakterielle Infektionen, aber viele Pathogene können im Verlauf einer Infektion die Apoptose-Maschinerie der Zelle zu ihren Gunsten manipulieren. Organismen

wie *Yersinia* ssp., *Salmonella* ssp. oder *L. monocytogenes* sind in der Lage, Apoptoseprozesse zu induzieren (Weinrauch und Zyklinsky, 1999). Im Gegensatz dazu stellt die Induktion des Zelltods durch Apoptose eine Gefahr für obligat intrazelluläre Bakterien dar, da diese Bakteriengruppe zum Wachstum und Überleben die zelluläre Umgebung benötigt. Es überrascht daher nicht, dass in den letzten Jahren für einige intrazelluläre Organismen gezeigt wurde, dass sie den Zelltod ihrer Wirtszelle verhindern. Die dafür notwendigen Faktoren sind nur zum Teil bekannt. Im Fall von *Mycobacterium bovis* beispielsweise vermutet man, dass die Produktion des Cytokins TNF α (*tumor necrosis factor*) eine Rolle spielt (Kremer *et al.*, 1997). Auch im Fall von *B. suis* wurde eine Verhinderung des programmierten Zelltods in humanen Monocyten belegt. Dieser Prozess ist TNF α -unabhängig und benötigt möglicherweise einen sekretierten Virulenzfaktor (Gross *et al.*, 2000). In den Bakterien *Chlamydia* ssp. und *Bartonella henselae* wurde eine Veränderung in der Signalkette der Apoptose nachgewiesen. Dies stellte einen völlig neuen Weg dar, wie Mikroorganismen mit der Apoptose-Maschinerie des Wirtes interferieren können. Chlamydien verhindern wahrscheinlich durch den Abbau pro-apoptotischer BH3-only-Proteine (Bim / Bod) eine Induktion der Apoptose (Fischer *et al.*, 2004). Für *B. henselae* konnte eine Unterdrückung der Aktivitäten von Caspase-3 und Caspase-8 durch unbekannte Faktoren gezeigt werden (Kirby und Nekorchuk, 2002). Beide Caspasen spielen eine entscheidende Rolle in der Signalkaskade, die letztendlich zum Zelltod führt. Es ist durchaus möglich, dass auch *Brucella* durch die Interaktion von VirB5 mit Calpain auf ähnliche Weise in die Apoptose-Prozesse der Zelle eingreift. Interessanterweise wurde Calpain 1 unter anderem in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) mit Ausrichtung zur zytosolischen Seite lokalisiert (Hood *et al.*, 2004). Wie oben ausgeführt werden *Brucella*-enthaltende Autophagosomen in einem retrograden Transport zum rER zurückgeleitet (Abb. 41). Dort wird die Replikations-Nische ausgebildet, und die Vakuolen akkumulieren Oberflächenproteine, die typisch für die Membranen des ER sind. Pizarro-Cerdá *et al.* (1998) schlugen vor, dass *B. abortus* das Autophagosom sogar verlässt und zur Replikation in das rER des Wirtes eindringt. Dort könnte möglicherweise eine Interaktion von VirB5 mit Calpain erfolgen und somit zu einer gezielten Sekretion von Virulenzfaktoren führen.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Komponenten des Typ IV Sekretionssystems des pathogenen Organismus *B. suis* analysiert werden. Mittels einer Kombination aus *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten sollten weitere Einblicke in das Zusammenspiel der Komponenten des Komplexes und den Mechanismus der Assemblierung des Transporters gewonnen werden.

Für die Durchführung biochemischer Studien waren Anzuchten des zu untersuchenden Organismus im großen Maßstab nötig. Da dies mit *B. suis* aufgrund seiner Pathogenität nicht möglich war, wurde *A. tumefaciens* als Modellsystem für die Expression der Virulenzgene von *B. suis* etabliert. Heterolog produzierte Virulenzproteine von *B. suis* wurden in den Membranfraktionen des *Agrobacterium*-Stammes UIA143 nachgewiesen. Solubilisierungsexperimente zeigten allerdings, dass die Membranverankerung im Vergleich zu den nativen T4SS-Komponenten von *A. tumefaciens* erniedrigt war. Mittels BN-PAGE und Quervernetzungsversuchen wurde gezeigt, dass in Agrobakterien, die die Virulenzproteine VirB3-VirB12 und VirB1+3-12 von *B. suis* produzierten, einige dieser Komponenten interagieren. Die Proteine VirB8 - VirB10 und VirB11 assemblierten in der Membran zu einem Teilkomplex, dessen Funktionalität nachgewiesen wurde. Zusammen mit Daten aus vorausgegangenen Untersuchungen des VirB/D4-Systems von *A. tumefaciens* legen die Resultate dieser Arbeit den Schluss nahe, dass diesen Kernkomponenten in allen Systemen sowohl eine strukturelle als auch funktionelle Bedeutung zukommt.

Mittels heterologer Expression war es allerdings nicht möglich, Informationen über die Lokalisation oder Funktion der potentiellen Piluskomponenten VirB2 und VirB5 zu erhalten.

In *in vitro* Experimenten wurden Interaktionen des VirB5-Proteins aus *B. suis* mit weiteren Komponenten des T4SS analysiert. Dabei wurden mittels Zwei-Hybrid-Analysen und Ko-Adsorptionsversuchen die Kernkomponenten VirB8 und VirB10 als potentielle Bindungspartner identifiziert. Weitere Untersuchungen von VirB5-Varianten und durch Konkurrenz der Bindung mit VirB5-Peptiden bestätigten diese Interaktionen. Durch Vergleiche mit der Struktur des Homologen TraC von pKM101 wurden die möglichen VirB8- und VirB10-Bindestellen lokalisiert. Damit wurde zum ersten Mal ein biochemischer Nachweis dafür erbracht, dass VirB5 mit Komponenten des Kernkomplexes interagiert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, mögliche zelluläre Interaktionspartner aus menschlichen Zellen zu identifizieren, die mit VirB5 aus dem obligat intrazellulären *B. suis* interagieren. Dazu wurde die cDNA-Bibliothek aus HeLa-Zellen mittels eines Hefe Zwei-Hybrid-Screens durchsucht und 23 potentielle Interaktionspartner wurden identifiziert. Nach Sequenzvergleichen der cDNA-Fragmente mit Sequenzen des humanen Genomes fielen drei der potentiellen Partner durch eine Funktion auf, die während des Infektionsprozesses von *Brucella* eine Rolle spielen könnten:

(I) Die Untereinheit 4 des Arp2/3-Komplexes: Dieser Komplex dient als Nukleationsfaktor der Aktin-Polymerisierung bei der Umformung des Zytoskelettes, und spielt vermutlich eine Rolle bei der Biogenese von Phagosomen und ihrer Wanderung durch die Zelle.

(II) Die Protease Calpain: Diesem ubiquitären Protein werden mehrere physiologische Funktionen zugeschrieben, unter anderem auch eine Rolle in Signalkaskaden der Apoptose. Es ist allerdings noch unklar, ob Calpain als negativer oder positiver Regulator der Apoptose dient.

(III) Ein Protein, das Ähnlichkeiten zu Protein-Tyrosin-Phosphatasen mit SH2-Domänen aufweist: Phospho-Tyrosin-Proteine spielen in vielen Signaltransduktionswegen eine Rolle und wurden bereits in anderen pathogenen Organismen als Zielproteine von Virulenzfaktoren nachgewiesen.

B. suis ist in der Lage, sich das intrazelluläre Überleben durch verschiedene und zum größten Teil noch unbekannt Mechanismen zu sichern. Die in dieser Arbeit identifizierten humanen Proteine könnten als Interaktionspartner der T4SS-Komponente VirB5 biologische Relevanz für die Pathogenese des Organismus haben. Zur Bestätigung dieser möglichen Interaktionen sind weiterführende Analysen notwendig.

Literaturverzeichnis

- Alrutz, M.A., Srivastava, A., Wong, K.-W., D'Souza-Schorey, C., Tang, M., Ch'ng, E., Snapper, S.B., and Isberg, R.R. (2001) Efficient uptake of *Yersinia pseudotuberculosis* via integrin receptors involves a Rac1-Arp 2/3 pathway that bypass N-WASP function. *Mol. Microbiol.* **42**: 689 - 703.
- Altzner, F., Conus, S., Cavalli, A., Folkers, G., and Simon, H.-U. (2004) Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**: 5947 - 5957.
- Amer, A.O., and Swanson, M.S. (2002) A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 56 - 61.
- Ansaldi, M., Lepelletier, M., and Mejean, V. (1996) Site-specific mutagenesis by using an accurate recombinant polymerase chain reaction method. *Anal Biochem.* **234**: 110-111.
- Atmakuri, K., Ding, Z., and 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.
- Balsiger, S., Ragaz, C., Baron, C., and Narberhaus, F. (2004) Replicon-specific regulation of small heat shock genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **186**: 6824-6829.
- Baron, C., Llosa, M., Zhou, S., and Zambryski, P.C. (1997a) C-terminal processing and cellular localization of VirB1, a component of the T-complex transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **179**: 1203-1210.
- Baron, C., Thorstenson, Y.R., and Zambryski, P.C. (1997b) Biochemical analysis of the complex between the lipoprotein VirB7 and VirB9 in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **179**: 1211-1218.
- Baron, C., O'Callaghan, D., and Lanka, E. (2002) Bacterial secrets of secretion: EuroConference on the biology of type IV secretion processes. *Mol. Microbiol.* **43**: 1359-1366.
- Beaupré, C.E., Bohne, J., Dale, E.M., and Binns, A.N. (1997) Interactions between VirB9 and VirB10 membrane proteins involved in movement of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J. Bacteriol.* **179**: 78-89.
- Berger, B.R., and 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., and 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.
- Bohne, J., Yim, A., and Binns, A.N. (1998) The Ti plasmid increases the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens* as a recipient in *virB*-mediated conjugal transfer of an IncQ plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 7057-7062.
- Boschiroli, M.L., Foulongne, V., and O'Callaghan, D. (2001) Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 58-64.
- Boschiroli, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., G., B., Allardet-Servent, A., Cazevieille, C., Liautard, J.P., Ramuz, M., and O'Callaghan, D. (2002) The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 1544-1549.

- 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.
- Burns, D.L. (1999) Biochemistry of type IV secretion. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 25-29.
- Burns, D.L. (2003) Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**.
- Cao, T.B., and Saier, M.R.J. (2001) Conjugal type IV macromolecular transfer systems of Gram-negative bacteria: organismal distribution, structural constraints and evolutionary conclusions. *Microbiology* **147**: 3201-3214.
- Cascales, E., and Christie, P.J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature Rev. Microbiol.* **1**: 137-149.
- Cascales, E., and Christie, P.J. (2004) Definition of a bacterial type IV secretion pathway for DNA substrate. *Science* **304**: 1170-1173.
- Celli, J., and Gorvel, J.-P. (2004) Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Microb.* **7**: 93 - 97.
- Chen, L., Chen, Y., Wood, D.W., and Nester, E.W. (2002) A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **184**: 4838-4845.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., and Fields, S. (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9578-9582.
- Chkheidze, A.N., and Liebhaber, S.A. (2003) A novel set of nuclear localization signals determine distributions of the alphaCP RNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 8405 - 8415.
- 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., and Vogel, J.P. (2000) Bacterial Type IV secretion: conjugation systems adapted for delivery of effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* **8**: 354-360.
- Christie, P.J. (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* **40**: 294-305.
- Chua, B.T., Guo, K., and Li, P. (2000) Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J. Biol. Chem.* **235**: 5131 - 5135.
- Comerci, D.J., Martinez-Lorenzo, M.J., Sieira, R., Gorvel, J.P., and Ugalde, R.A. (2001) Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell. Microbiol.* **3**: 159-168.
- Corbel, M.J. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg. Inf. Des.* **3**: 213-221.
- Cossart, P. (2000) Actin-based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player. *Cell. Microbiol.* **2**: 195 - 205.
- Cossart, P., and Sansonetti, P.J. (2004) Bacterial invasion: The paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242 - 248.
- Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., and Rappuoli, R. (1999) *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* **284**: 1328-1333.
- Dang, T.A., Zhou, X.-R., Graf, B., and 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., and Xie, Y.-H. (2000) The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9 and VirB10 interact with one another. *J. Bacteriol.* **182**: 758-763.
- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Redkar, R.J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Reznik, G., Jablonski, L., Larsen, N., D'Souza, M., Bernal, A., Mazur, M., Goltsman, E., Selkov, E., Elzer, P.H., Hagijs, S., O'Callaghan, D., Letesson, J.J., Haselkorn, R., Kyrpides, N., and Overbeek, R. (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 443-448.
- Desjardins, M., Celis, J.E., van Meer, G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffith, G., and Huber, L.A. (1994) Molecular characterisation of phagosomes. *J. Biol. Chem.* **269**: 32194 - 32200.
- Dijkstra, A.J., and Keck, W. (1996) Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J. Bacteriol.* **178**: 5555-5562.
- Ding, Z., Atmakuri, K., and Christie, P.J. (2003) The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol.* **11**: 527-535.
- Dorn, B.R., Dunn, W.A.J., and Progulske-Fox, A. (2002) Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell. Microbiol.* **4**: 1-10.
- Dumas, F., Duckely, M., Pelczar, P., van Gelder, P., and Hohn, B. (2001) An *Agrobacterium* VirE2 channel for transferred-DNA transport into plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 485-490.
- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lai, E.M., Lurz, R., Kado, C.I., and 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.
- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lurz, R., and Lanka, E. (2000) Maturation of IncP pilin precursors resembles the catalytic dyad-like mechanism of leader peptidases. *J. Bacteriol.* **182**: 6751-6761.
- Fiedler, S., and Wirth, R. (1988) Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal Biochem.* **170**: 38-44.
- Fields, S., and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein-interactions. *Nature* **340**: 245 - 246.
- Finberg, K.E., Muth, T.R., Young, S.P., Maken, J.B., Heitritter, S.M., Binns, A.N., and Banta, L.M. (1995) Interactions of VirB9, -10, and -11 with the membrane fraction of *Agrobacterium tumefaciens*: solubility studies provide evidence for tight associations. *J. Bacteriol.* **177**: 4881-4889.
- Fischer, S.F., Vier, J., Kirschnek, S., Klos, A., Hess, S., Ying, S., and Hacker, G. (2004) *Chlamydia* inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3-only proteins. *J. Exp. Med.* **200**: 905 - 916.
- Frank, R. (1992) Spot synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **48**: 9217 - 9232.
- Fullner, K.J., Lara, J.L., and Nester, E.W. (1996) Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science* **273**: 1107-1109.
- Fullner, K.J. (1998) Role of *Agrobacterium virB* genes in transfer of T complexes and RSF1010. *J. Bacteriol.* **180**: 430-434.

- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., and Cong, J. (2003) The Calpain system. *Physiol. Rev.* **83**: 731 - 801.
- Gomis-Ruth, F.X., Moncalian, G., Perez-Luque, R., Gonzalez, A., Cabezon, E., de la Cruz, F., and Coll, M. (2001) The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* **409**: 637-641.
- Gotthardt, D., Warnatz, H.J., Henschel, O., Brückert, F., Schleicher, M., and Soldati, T. (2002) High resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases. *Mol. Biol. Cell* **13**: 3508 - 3520.
- Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P., and Dornand, J. (2000) In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect. Immun.* **68**: 342-351.
- Halling, S.M., and Bricker, B.J. (1994) Characterisation and occurrence of two repeated palindromic DNA elements of *Brucella* ssp. Bru-RS1 and Bru-RS2. *Mol. Microbiol.* **14**: 681-689.
- Hapfelmeier, S., Domke, N., Zambryski, P.C., and Baron, C. (2000) VirB6 is required for stabilization of VirB5, VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **182**: 4505-4511.
- Harlow, E., and Lane, D., (eds) (1988) *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993) The p21 Cdk-interactin protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805-816.
- Harris, R.L., Hombs, V., and Silverman, P.M. (2001) Evidence that F plasmid proteins TraV, TraK, and TraB assemble into an envelope-spanning structure in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **42**: 757-766.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., and Hatakeyama, M. (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* **295**: 683-686.
- Hood, J.L., Brooks, W.H., and Roszman, T.L. (2004) Differential compartmentalization of the calpain/calpastin network with the endoplasmic reticulum and golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* **279**: 43126 - 43135.
- Höppner, C. (2004) Characterisation of interactions and enzymes activities of the type IV secretion system components VirB1 and VirB11 from *B. suis* and *A. tumefaciens*. Dissertation der Fakultät der Biologie, LMU München.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animal and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 379-433.
- Hwang, H.H., and Gelvin, S.B. (2004) Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *Plant Cell* **18**: 3148-3167.
- Jakubowski, S.J., Krishnamoorthy, V., and Christie, P.J. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 protein participates in formation of VirB7 and VirB9 complexes required for type IV secretion. *J. Bacteriol.* **185**: 2867-2878.
- Jakubowski, S.J., Krishnamoorthy, V., Cascales, E., and Christie, P.J. (2004) *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion system. *J. Mol. Biol.* **341**: 961-977.

- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436.
- Janin, J., and Rodier, F. (1995) Protein-protein interaction at crystal contacts. *Proteins* **23**: 580-587.
- Jones, S., and Thornton, J.M. (1996) Principles of protein-protein-interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 13-20.
- Kado, C.I. (1991) Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* **10**: 1-32.
- Kirby, J.E., and Nekorchuk, D.M. (2002) *Bartonella*-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 4656 - 4661.
- Koraimann, G. (2003) Cell wall degrading enzymes in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 2371-2378.
- Krall, L., Wiedemann, U., Unsin, G., Weiss, S., Domke, N., and 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.
- Kremer, L., Estaquier, E., Brandt, E., Ameisen, C., and Loch, C. (1997) *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin infection prevents apoptosis of resting human monocytes. *Eur. J. Immunol.* **27**: 2450 - 2456.
- Kromayer, M., Wilting, R., Tormay, P., and Böck, A. (1996) Domain structure of the prokaryotic selenocysteine-specific elongation factor SelB. *J. Mol. Biol.* **262**: 413-420.
- Kumar, R.B., Xie, Y.-H., and Das, A. (2000) Subcellular localization of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore proteins: VirB8 is essential for assembly of the transport pore. *Mol. Microbiol.* **36**: 608-617.
- Kumar, R.B., and Das, A. (2001) Functional analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore protein VirB8. *J. Bacteriol.* **183**: 3636-3641.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lai, E.-M., Chesnokova, O., Banta, L.M., and Kado, C.I. (2000) 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., and Kado, C.I. (2000) The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends Microbiol.* **8**: 361-369.
- Lai, E.-M., Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lanka, E., and Kado, C.I. (2002) Biogenesis of T Pili in *Agrobacterium tumefaciens* requires precise VirB2 propilin cleavage and cyclisation. *J. Bacteriol.* **184**: 327-330.
- LaVallie, E.R., Di Blasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F., and McCoy, J.M. (1993) A thioredoxin gene fusion system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/Technology* **11**: 187-193.
- Liu, Z., and Binns, A.N. (2003) Functional subsets of the VirB type IV transport complex proteins involved in the capacity of *Agrobacterium tumefaciens* to serve as a recipient in virB-Mediated conjugal transfer of plasmid RSF1010. *J. Bacteriol.* **185**: 3259-3269.
- Livingstone, C.D., and Barton, G.J. (1993) Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation. *Comput. Appl. Biosci.* **9**: 745-756.

- Llosa, M., Zunzunegui, S., and 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.
- Lottspeich, F., and Zorbas, H. (1998) *Bioanalytik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Machesky, L.M., and Gould, K.L. (1999) The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**: 117 - 121.
- May, R.C., and Machesky, L.M. (2001) Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **114**: 1061 - 1077.
- Melchior, F. (2003) Ubiquitin-verwandte Proteine. *Biospektrum* **6**: 691 - 693.
- Meng, X., Zhang, C., Chen, J., Peng, S., Cao, Y., Ying, K., Xie, K., and Mao, Y. (2003) Cloning and identification of a novel cDNA coding thioredoxin-related transmembrane protein. *Biochem. Genet.* **41**: 99 - 106.
- Meresse, S., Unsworth, K.E., Habermann, A., Griffiths, G., Fang, F., Martinez-Lorenzo, M.J., Waterman, S.R., Gorvel, J.P., and Holden, D.W. (2001) Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar *Salmonella*. *Cell Microbiol.* **3**: 567 - 577.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. [Cold Spring Harbor, N.Y.]: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Moore, D., Hamilton, C.M., Maneewannakul, K., Mintz, Y., Frost, L.S., and Ippen-Ihler, K. (1993) The *E. coli* K12 F-plasmid gene *traX* is required for acetylation of F-pilin. *J. Bacteriol.* **175**: 1375-1383.
- Mushegian, A.R., Fullner, K.J., Koonin, E.V., and Nester, E.W. (1996) A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7321-7326.
- Nagai, H., and Roy, C.R. (2003) Show me the substrates: modulation of host cell function by type IV secretion systems. *Cell. Microbiol.* **5**: 373-383.
- Nakgawa, T., and Yuan, J. (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.* **150**: 887 - 894.
- O'Callaghan, D., Cazevaille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., and 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.
- Odenbreit, S., Püls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., and R., H. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* **287**: 1497-1500.
- O'Callaghan, D., Cazevaille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., and 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.

- Pansegrau, W., Schoumacher, F., Hohn, B., and 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.
- Paulsen, I.T., Seshadri, R., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Read, T.D., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L.M., Beanan, M.J., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Nelson, W.C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S.E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S.R., White, O., Salzberg, S.L., Hoover, D.L., Lindler, L.E., Halling, S.M., Boyle, S.M., and Fraser, C.M. (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 13148-13153.
- Philippsen, A. (2002) DINO: Visualizing structural biology / www.dino3d.org.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E., and Gorvel, J.P. (1998) *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.* **66**: 5711-5724.
- Rohde, M., Püls, J., Buhrdorf, R., Fischer, W., and Haas, R. (2003) A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* **49**: 219-234.
- Rouot, B., Alvarez-Martinez, M.-T., Marius, C., Mentanteau, P., Guilloteau, L., Boigegrain, R.-A., Zumbihl, R., O' Callaghan, D., Domke, N., and Baron, C. (2003) Production of the type IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5- and VirB8-specific antisera. *Infect. Immun.* **71**: 1075-1082.
- Sagulenko, V., Sagulenko, E., Jakubowski, S., Spudich, E., and Christie, P.J. (2001) VirB7 lipoprotein is exocellular and associates with the *Agrobacterium tumefaciens* T-pilus. *J. Bacteriol.* **183**: 3642-3651.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Saric, T., Graef, C.I., and Goldberg, A.L. (2004) Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metalloproteases. *J. Biol. Chem.* **279**: 46723 - 46732.
- Sauer, F.G., Barnhart, M., Choudhury, D., Knight, S.D., Waksman, G., and Hultgren, S.J. (2000) Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 548-556.
- Schägger, H., and 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., and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**: 223-231.
- Schägger, H., Cramer, W.A., and von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**: 220-230.
- Schandel, K.A., Muller, M.M., and Webster, R.E. (1992) Localisation of TraC, a protein involved in assembly of the F conjugative pilus. *J. Bacteriol.* **174**: 3800-3806.

- Scheiffele, P., Pansegrau, W., and Lanka, E. (1995) Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA processing: purified proteins 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., Angerer, C., Wanner, G., Zambryski, P.C., and Baron, C. (1999a) Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **181**: 7485-7492.
- Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N., and Baron, C. (1999b) 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., Rittig, M., Preithner, S., and Baron, C. (2001) Biomonitoring of pJP4-carrying *Pseudomonas chlororaphis* with Trb protein-specific antisera. *Environ. Microbiol.* **3**: 720-730.
- Schmiederer, M., Arcenas, R., Widen, R., Valkov, N., and Anderson, B. (2001) Intracellular induction of the *Bartonella henselae* virB operon by human endothelial cells. *Infect. Immun.* **69**: 6495-6502.
- Schrammeijer, B., Risseeuw, E., Pansegrau, W., Regensburg-Tuink, T.J., Crosby, W.L., and 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.
- Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., Vergunst, A.C., Jácome, E.J., and Hooykaas, P.J.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**: 860-868.
- Schulein, R., and Dehio, C. (2002) The VirB/VirD4 type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Mol. Microbiol.* **46**: 1053-1067.
- Scidmore, M.A., and Hackstadt, T. (2001) Mammalian 14-3-3beta associates with the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane via its interaction with IncG. *Mol. Microbiol.* **39**: 1638-1650.
- Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**.
- Seubert, A., Hiestand, R., de la Cruz, F., and Dehio, C. (2003) A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **49**: 1253-1266.
- Shirasu, K., and Kado, C.I. (1993) Membrane localization of the Ti plasmid VirB proteins involved in the biosynthesis of a pilin-like structure in *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**: 287-294.
- Sieira, R., Comerci, D.J., Sanchez, D.O., and Ugalde, R.A. (2000) A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J. Bacteriol.* **182**: 4849 - 4855.
- Sola-Landa, A., Pizzaro-Cerda, J., Grillo, M.J., Moreno, E., Moriyon, I., and Blasco, J.M. (1998) A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.* **29**: 125 - 138.
- Southwick, F.S., Li, W., Zhang, F., Zeile, W.L., and Purich, D.L. (2003) Actin-based endosome and phagosome rocketing in macrophages: activation by the secretagogue antagonists lanthanum and zinc. *Cell Motil. Cytoskeleton* **54**: 41 - 55.
- Spudich, G.M., Fernandez, D., Zhou, X.-R., and 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.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Thorstenson, Y.R., Kuldau, G.A., and Zambryski, P.C. (1993) Subcellular localization of seven VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*: implications for the formation of a T-DNA transport structure. *J. Bacteriol.* **175**: 5233-5241.
- Tuckfield, A., Clouston, D.R., Wilanowski, T.M., Zhao, L.L., Cunningham, J.M., and Jane, S.M. (2002) Binding of the RING polycomb proteins to specific target genes in complex with the grainyhead-like family of developmental transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 1936 - 1946.
- Walsh, C. (2003) Where will new antibiotics come from? *Nature Rev. Microbiol.* **1**: 65-70.
- Ward, D., Draper, O., Zupan, J.R., and Zambryski, P.C. (2002) Peptide linkage mapping of the *A. tumefaciens* vir-encoded type IV secretion system reveals novel protein subassemblies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 11493-11500.
- Watarai, M., Andrews, H.L., and Isberg, R.R. (2001) Formation of a fibrous structure on the surface of *Legionella pneumophila* associated with exposure of DotH and DotO proteins after intracellular growth. *Mol. Microbiol.* **39**: 313-329.
- Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K., and Shirahata, T. (2002) Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* **4**: 341-355.
- Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., and Horiuchi, M. (2003) Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *J. Exp. Med.* **198**: 5 - 17.
- Weinrauch, Y., and Zyklinsky, A. (1999) The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**.
- Weiss, A.A., Johnson, F.D., and Burns, D.L. (1993) Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2970-2974.
- Welch, M.D., Iwamatsu, A., and Mitchison, T.J. (1997) Actin polymerisation is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **385**: 265 - 269.
- Williams, J.M., Chen, G.-C., Zhu, L., and Rest, R.F. (1998) Using the yeast two-hybrid system to identify human epithelial cell proteins that bind gonococcal Opa proteins: intracellular gonococci bind pyruvate kinase via their Opa proteins and require host pyruvate for growth. *Mol. Microbiol.* **27**: 171 - 186.
- Winans, S.C., Burns, D.L., and Christie, P.J. (1996) Adaption of a conjugal system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol.* **4**: 64-68.
- Winstead, E.R. (2002) Potential bioweapon, *Brucella suis*, is sequenced. *online publication: Genome news network (GNN)*.
- Wood, D.E., Thomas, A., Devi, L.A., Berman, Y., Beavis, R.C., Reed, J.C., and Newcomb, E.W. (1998) Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene* **17**: 1069 - 1078.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., and Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3469-3478.

- Yanisch-Perron, C., Viera, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC18 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yeo, H.-J., Yuan, Q., Beck, M.R., Baron, C., and Waksman, G. (2003) Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 15947 - 15952.
- Yeo, H.J., Savvides, S.N., Herr, A.B., Lanka, E., and Waksman, G. (2000) Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol. Cell*. **6**: 1461-1472.
- Yeo, H.J., and Waksman, G. (2004) Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system. *J. Bacteriol.* **186**: 1919-1926.
- Zhang, F., Southwick, F.S., and Purich, D.L. (2002) Actin-based phagosome motility. *Cell Motil. Cytoskeleton* **53**: 81 - 88.
- Zhou, H.X., and Shan, Y. (2001) Prediction of protein interaction sites from sequence profile and residue neighbor list. *Proteins* **44**: 336-343.
- Zneimer, S.M., Crawford, D., Schneider, N.R., and Beutler, B. (1990) Mapping of the human ribonuclease inhibitor gene (RNH) to chromosome 11p15 by *in situ* hybridization. *Genomics* **8**: 175 - 178.
- Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O., and Zambryski, P.C. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: A feast of fundamental insights. *Plant J.* **23**: 11-28.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Privatdozent Dr. Christian Baron für die Betreuung dieser Doktorarbeit. Seine Anregungen und Ratschläge, sowie seine fortwährende Unterstützung und Motivation haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Bedanken möchte ich mich auch für seine intensive wissenschaftliche Förderung, die mir interessante Forschungsaufenthalte und mehrere Fortbildungsreisen ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. A. Böck danke ich für die Selbstverständlichkeit, mit der er uns nach dem Umzug von Herrn Baron nach Kanada in seine Arbeitsgruppe integrierte. Seine Ratschläge, aber auch seine Unterstützung gerade im letzten Jahr meiner Doktorarbeit haben mir sehr geholfen.

Ein herzlicher Dank geht auch an Dr. David O'Callaghan (INSERM, Nîmes) und seine Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und die Möglichkeit neue Methoden zu erlernen.

Allen Mitgliedern der „alten“ AG Baron danke ich ganz herzlich für eine schöne Zeit, das gute Arbeitsklima und die vielen fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche: Natalie, Lili, Heike, Susanne, Silke und Gabi. I'd like to thank the canadian Baron-lab (Durga - special thanks for the sequencing job, Qing, Sakis, Khaled) for their help, informations and warmly e-mails, that gave me the feeling to be still a part of a team.

Meinen „biologischen Mitstreitern“ Kathi und Ben, aber auch Sanne, Martina, Judith und Sonja danke ich für ihre Freundschaft und ihre Hilfe weit über diese Arbeit hinaus. Bei Christoph, meinem letzten verbliebenen Laborkollegen, möchte ich mich für die wirklich tolle Zusammenarbeit bedanken, für seine Freundschaft und den immer währenden Optimismus, dass ich das schon schaffen werde.

Ein ganz großes Danke geht an meine Geschwister, meine Eltern und an Frank für ihre Liebe und Unterstützung - es ist gut Euch immer auf meiner Seite zu wissen!

Danke!

Lebenslauf

Name: Anna Carle

Geburtsdatum: 27. September 1974

Geburtsort: Mainz

1981 – 1985: Besuch der Schloß-Ardeck-Grundschule in Gau-Algesheim

1985 – 1994: Besuch der Hildegardisschule in Bingen; Abitur

1994 – 1995: Freiwilliges Soziales Jahr im Studienheim Augustinum, München-Pasing

Oktober 1995: Immatrikulation an der Ludwig-Maximilians-Universität München im Studiengang Biologie

Juni 2000: Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Neurobiologie, Infektionsbiologie und Immunologie

August 2000 – April 2001: Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie unter Leitung von Privatdozent Dr. C. Baron mit dem Thema „Analyse der Interaktionen von VirE2 und VirD2 mit weiteren Virulenzproteinen von *Agrobacterium tumefaciens*“

Mai – Juni 2001: Forschungsaufenthalt im Labor von Dr. D. O’Callaghan, INSERM, Nîmes, Frankreich

September 2001: Beginn der vorliegenden Dissertation am Department I, Bereich Mikrobiologie der LMU München unter Leitung von Privatdozent Dr. C. Baron

Oktober 2001 und Oktober 2002: Forschungsaufenthalte im Labor von Dr. D. O’Callaghan, INSERM, Nîmes, Frankreich