

**Transformation und Pilusbiogenese:
zwei voneinander unabhängige Systeme
in *Acinetobacter* sp. BD413**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Olivia Gohl
aus Goslar

Göttingen 2002

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität zu Göttingen angefertigt.

D7

Referentin: Priv. Doz. Dr. B. Averhoff

Korreferent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung: 01.11.2002

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	8
2.1 Organismen und Plasmide	8
2.2 Zellanzucht	14
2.2.1 Nährmedien	14
2.2.1.1 Mineralmedium	14
2.2.1.2. Komplexmedien	15
2.2.2. Antibiotika	15
2.2.3 Zellanzucht	16
2.2.4 Messung der optischen Dichte	16
2.2.5 Reinheitskontrolle und Stammhaltung	16
2.3 Standardtechniken für das Arbeiten mit DNA	17
2.3.1 Isolierung von Plasmiden	17
2.3.2 Isolierung chromosomaler DNA mittels DNA-Extraktionskit	18
2.3.3 Präparative Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Acinetobacter</i> sp.	19
2.3.4 Lagerung von DNA	19
2.3.5 Schnelle Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> ('Cracking')	20
2.3.6 Gelelektrophorese von DNA im Agarosegel	20
2.3.7 Färbung und Fotografie von DNA in Agarose- oder Polyacrylamidgelen	21
2.3.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	21
2.4 Enzymatische Modifikationen von DNA	22
2.4.1 Restriktionsverdau von DNA	22
2.4.2 Herstellung von stumpfen DNA-Enden	22
2.4.3 Dephosphorylierung von DNA	22
2.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten	23
2.4.5 N-terminale Sequenzierung von Proteinen	23
2.4.5.1 Enzymatische Spaltungen von Proteinen im Polyacrylamidgel	23
2.4.5.2 " <i>in situ</i> "-Verdau membrangebundener Proteine (PATTERSON 1994)	24
2.5 DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion	25
2.6 SOUTHERN-Hybridisierung	26
2.6.1 Markierung von DNA mit Digoxigenin-11-dUTP	26

2.6.2 Übertragung von DNA auf Nylonmembranen durch Vakuublott	27
2.6.3 Hybridisierung und Detektion	28
2.7 Transfer von DNA in <i>E. coli</i> und <i>Acinetobacter</i> sp.	30
2.7.1 DNA-Übertragung durch Konjugation (‘spot mating’)	30
2.7.2 DNA-Übertragung durch Transformation	30
2.7.2.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (INOUE <i>et al.</i> 1990)	30
2.7.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> und Blau-Weiß-Selektion	31
2.7.2.3 Transformation von <i>Acinetobacter</i> sp.	32
2.8 Standardtechniken für das Arbeiten mit Proteinen	33
2.8.1 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976; modifiziert)	33
2.8.2 Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	33
2.8.3 Native Gradienten-PAGE (SCHÄGGER & VON JAGOW 1991; mod.)	35
2.8.4 Zweidimensionale Auftrennung von Proteinen	36
2.8.5 Größenbestimmung von Proteinen	37
2.8.6 Färbung von Proteinen mit Coomassie (WEBER & OSBORN 1969)	37
2.8.7 Silber-Färbung (BLUM <i>et al.</i> 1987; modifiziert)	38
2.8.8 Konzentrierung von Proteinen	39
2.8.9 Dialyse von Proteinlösungen	39
2.9 WESTERN-Blotting	40
2.9.1 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen denaturierender Gele	40
2.9.2 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen nativere Gele	41
2.10 Überexpression und Anreicherung von Fusionsproteinen	41
2.10.1 Überexpression von Male-Fusionsproteinen	41
2.10.2 Aufreinigung von Male-Fusionsprotein über Affinitätschromatographie	42
2.10.3 Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen	43
2.10.4 Denaturierung von Einschlußkörpern und Renaturierung	44
2.10.5 Spaltung von Fusionsproteinen mit dem Faktor Xa	44
2.11 Immunologische Methode	45
2.11.1 Herstellung polyklonaler Antiseren	45
2.11.2 Immunodetektion von Proteinen mittels Chemilumineszenz	45
2.12 Enzymaktivitätstests	46
2.12.1 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität	46
2.12.2 Bestimmung der NADH-Dehydrogenase-Aktivität	47
2.13 Isolierung von Membranen und Proteinen	48
2.13.1 Isolierung der dicken und dünnen Pili	48
2.13.2 Präparation von Gesamt-Membranen	49

2.13.3 Isolierung von cytoplasmatischer und äußerer Membran	50
2.13.4 Solubilisierung der gewaschenen Membranen	51
2.13.5 Chromatographische Methoden	51
2.13.5.1 Anionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose	52
2.13.5.2 Gelfiltration mit Sephadex S-300	53
2.14 Reinigung humaner Erythrocyten	54
2.15 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	54
2.15.1 Herstellung von Kohle-Trägerfolien	54
2.15.2 Negativkontrastierung	55
2.15.3 Elektronenmikroskopische Abbildung	55
2.15.4 Einbettung von Zellen	55
2.15.5 Ultramikrotomie	56
2.16 Zentrifugationen	57
2.17 Bezugsquellen für Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme	57
3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	59
3.1 Untersuchung der Beteiligung von c-PHB an der Transformation	59
3.1.1 Unterbrechung der PHB-Synthese in <i>Acinetobacter</i> sp. ADP23	59
3.1.2 Untersuchung der <i>phaC</i> -Mutante B100 auf Speicherstoff-Synthese	61
3.1.3 Transformationstest der <i>phaC</i> -Mutante B100	62
3.2 Überexpression und Reinigung von Proteinen	64
3.2.1 Überexpression und Reinigung des Kompetenzproteins ComC	65
3.2.2 Untersuchungen zur spezifischen Bindung der Anti-ComC-Antikörper	66
3.2.3 Überexpression und Reinigung des Kompetenzproteins ComA	67
3.2.4 Untersuchungen zur spezifischen Bindung der Anti-ComA-Antikörper	69
3.3 Identifizierung weiterer Kompetenzgene in <i>Acinetobacter</i> sp. BD413	70
3.3.1 Identifizierung des <i>comEA</i> -Gens in <i>Acinetobacter</i> sp. BD413	70
3.3.2 Unterbrechung des Kompetenzgens <i>comEA</i> aus <i>Acinetobacter</i> sp. BD413	72
3.3.3 Transformationstest der <i>comEA</i> -Mutante T100	74
3.3.4 Transkriptionale Regulation von <i>comEA</i>	76
3.4 Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion von ComEA	79
3.4.1 Überexpression und Aufreinigung von ComEA	79
3.4.2 Untersuchungen zur spezifischen Bindung der Anti-ComEA-Antikörper	81
3.4.3 Steigerung der Expressionsrate von <i>comEA</i>	82
3.4.4 Detektion von ComEA in Zelllysaten	84
3.4.5 Lokalisation von ComEA	85

3.4.6 DNA-Bindestudien mit ComEA	88
3.5 Identifizierung von Protein/Protein-Interaktionen	90
3.5.1 Solubilisierung von Zellmembranen	91
3.5.2 Reinigung des gelösten ComP-Komplexes	94
3.5.3 Auftrennung des ComP-Komplexes in einer 2D-Gelelektrophorese	97
3.5.4 Elektronenmikroskopische Darstellung des ComP- Komplexes	98
3.5.5 Vergleich der ComP-Komplexgröße nach Behandlung mit Triton-X 100	100
3.6 Charakterisierung der Pili von <i>Acinetobacter</i> sp. BD413	103
3.6.1 Reinigung der Pilusstrukturen und N-terminale Sequenzierung	103
3.6.2 Klonierung der Pilusstrukturgene	105
3.6.3 Unterbrechung der Pilusgene von <i>Acinetobacter</i> sp. ADP239	107
3.6.4 Generierung einer Doppelmutante	109
3.6.5 Untersuchung der Zelloberfläche nach Unterbrechung der Pilusgene	113
3.6.6 Physiologische Untersuchung der Pilus-Mutanten	115
3.6.6.1 Transformationstest der Pilus-Mutanten	116
3.6.6.2 Test auf gleitende Bewegung der Pilus-Mutanten	117
3.6.7 Molekulare Charakterisierung des dicken Pilus	120
3.6.7.1 Untersuchung der Aminosäuresequenz der 28 kDa-Untereinheit	120
3.6.7.2 Analyse des <i>filA</i> -Lokus	124
3.6.7.3 Unterbrechung und Deletionen der ORFs im <i>fil</i> -Cluster	125
3.6.7.4 Untersuchung auf Pilusbiogenese der Mutantenstämme	130
3.6.7.5 Komplementation der Mutantenstämme K101 und K102	132
3.6.8 Charakterisierung des dünnen Pilus	135
3.6.8.1 Untersuchung der Untereinheit des dünnen Pilus	135
3.6.8.2 Untersuchung der genomischen Lokalisation von <i>fimA</i>	137
3.6.8.3 Elektronenmikroskopische Darstellung der dünnen Pili	139
3.6.9 Regulation der Expression der Pilusgene <i>filA</i> und <i>fimA</i>	140
4. DISKUSSION	152
4.1 Struktur und Funktion der Pili von <i>Acinetobacter</i> sp. BD413	152
4.1.1 Die Pilusstrukturen sind nicht an der natürlichen Transformation beteiligt	152
4.1.2 Die Pilusstrukturen von <i>Acinetobacter</i> sp. BD413 sind nicht an der gleitenden Fortbewegung beteiligt	153
4.1.3 <i>Acinetobacter</i> sp. BD413 bildet Biofilme	157
4.2 Das Transformationssystem von <i>Acinetobacter</i> sp. BD413	161
4.2.1 Das Polymer PHB ist nicht am Transport der DNA durch die	

Zellmembranen beteiligt	161
4.2.2 Struktur und Funktion der Pilin-ähnlichen Kompetenzfaktoren	163
4.2.3 Assemblierung des Pilin-ähnlichen Kompetenzproteins ComP in <i>Acinetobacter</i> sp. BD413	169
4.2.4 ComEA vermittelt die Bindung der DNA auf der Zelloberfläche	172
4.2.5 Das DNA-Aufnahmesystem in <i>Acinetobacter</i> sp. BD413	174
5. ZUSAMMENFASSUNG	179
6. LITERATUR	181

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp ^r	Ampicilinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
ATPase	ATP-Synthase
Bis-Tris	Bis(2-Hydroxyethyl)-Amino-Tris(Hydroxymethyl)Methan
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylamino]1-Propansulfonsäure
cm	Zentimeter
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
DTE	Dithioerythritol
E	Extinktion
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
eds.	editor: Herausgeber
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> : und andere
Fa.	Firma
g	Gramm
Gal	Galaktosyl-, Galaktose
h	Stunde
H ₂ O _{dest.}	destilliertes Wasser
H ₂ O _{demin.}	demineralisiertes Wasser

i.d.R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
k-	Kilo (10^3)
kb	Kilobasen
Km ^r	Kanamycinresistenz
konz.	konzentriert
l	Liter
λ	Wellenlänge
log	Logarithmus
M	molar
m-	milli (10^{-3})
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
μ -	micro (10^{-6})
min	Minute
Mr	Molekulargewicht
N-	Amino-
n-	nano (10^{-9})
NAD(P)	Nicotinamidadenindinukleotid-(phosphat)
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PEG	Polyethylenglycol
PSI	Druckeinheit
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Spurenelementlösung
Sm ^r	Streptomycinresistenz
sp.	Spezies
Sp ^r	Spectomycinreststenz
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N, N`-Tetramethyldiamin

Tet ^r	Tetracyclinresistenz
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	Unit, Enzymeinheit (1 U = 1 mmol Substrat/min)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Nukleotidbase

A	Purinbase Adenin	G	Purinbase Guanin
C	Pyrimidinbase Cytosin	T	Pyrimidinbase Thymin

Aminosäuren

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

1. Einleitung

Die Sekretion von Proteinen in das extracytoplasmatische Kompartiment und der Import von Makromolekülen aus dem extrazellulären Milieu stellen einen grundlegenden Aspekt in der Physiologie der Bakterien dar. Transportprozesse vermitteln neben der Substratversorgung wichtige biologische Eigenschaften, wie die Bindung und Invasion von Wirtszellen, den Transfer genetischer Informationen über Konjugation und Transformation, sowie Zellkommunikation ('Quorum Sensing') und Mobilität der Bakterien. Extrazelluläre Enzyme, Exotoxine und Untereinheiten von Flagellen oder Pili (Fimbrien) müssen hierfür sowohl die innere als auch die äußere Zellmembran sowie die Mureinschicht passieren, um den Bestimmungsort zu erreichen. Darüber hinaus setzen die Synthese von Oberflächenstrukturen und der Transport von Proteinen aufgrund ihrer regulatorischen und strukturellen Komplexität eine koordinierte Biogenese und Assoziation von Struktur- und Assemblierungsproteinen voraus.

Die Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß die in den verschiedenen Prozessen involvierten Proteine hohe Homologien aufweisen, was für einen gemeinsamen evolutiven Ursprung spricht. Proteine, die Ähnlichkeiten aufweisen, finden sich z.B. in den Typ-IV-Sekretionswegen, bei Konjugationssystemen sowie im DNA-Aufnahmeapparat des natürlich kompetenten Bakteriums *Helicobacter pylori* (HOFREUTER *et al.* 2001). Hierzu zählt auch das System für den Transfer des T-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* in Pflanzenzellen (LAI & KADO 2000). Die ähnlichen Proteine der genannten Transportsysteme bilden Kanalstrukturen in den Zellmembranen, weisen ATPasen-Aktivität auf oder dienen der Bindung an Wirtszellen oder an andere Bakterien. Das Typ-III-Sekretionssystem, welches als nadelförmiger Komplex Toxine direkt in die Wirtszelle injiziert, weist Homologien zu Basalkörpern der Flagellen auf. Dieser basale Membrananker besteht aus einem oberen in der Peptidoglycan-Schicht lokalisierten Ring und einem unteren Doppelring, der die innere Membran durchspannt und ins Cytoplasma ragt (TAMANO *et al.* 2000, SEKIYA *et al.* 2001). Bisher wurden acht konservierte Proteine des Typ-III-Sekretionssystems identifiziert, dessen homologe Komponenten an der Flagellen-Synthese beteiligt sind (HÜCK 1998). Den Durchtritt durch die äußere Membran vermittelt im Typ-III-Sekretionssystem eine Pore, deren Untereinheiten Ähnlichkeiten zu der Proteinfamilie der Sekretine aufweisen (HOBBS & MATTICK 1993). Während die Flagelline in helikaler Anordnung ein Filament von ca. 20 nm Durchmesser und einer Länge von 5-10 μ m bilden, weist dagegen der nadelförmige Sekretionskomplex beispielsweise bei *Salmonella* oder *Shigella* eine Länge von 45 nm und eine Breite von 8 nm auf (KUBORI *et al.* 1998, TAMANO *et al.* 2000), wodurch der funktionale Unterschied

– zum einen als Mittel der Fortbewegung und zum anderen als röhrenförmige Struktur für Export und Injektion der Proteine in die Zielzelle – zum Ausdruck kommt.

Ein weiterer prinzipiell ähnlicher Transportmechanismus muß der Typ-II-Sekretion, der natürlichen Transformation und Typ-IV-Pilusbiogenese zugrunde liegen. Die Komponenten der Typ-IV-Pilusbiogenese natürlich transformierbarer Bakterien sind am DNA-Import durch die äußere Membran und die Peptidoglykanschicht beteiligt. Doch weisen nicht alle Organismen, die Typ-IV-Pili synthetisieren die Fähigkeit zur natürlichen Transformation auf, da transformationsspezifische Proteine, die nicht in die Pilusbiogenese involviert sind, für die Bindung und Aufnahme der DNA erforderlich sind. Hierzu zählen z.B. Proteine, die nukleolytische oder DNA-bindende Eigenschaften aufweisen und Faktoren, die am Transport der DNA durch die inneren Membran beteiligt sind (PROVVEDI & DUBNAU 1999, PROVVEDI *et al.* 2001). Andererseits weisen nicht alle transformierbaren Bakterien Typ-IV-Pili auf, welches zu dem Schluß führt, daß die Pilusstrukturen keine Voraussetzung für die DNA-Aufnahme darstellen. Zu dieser Gruppe von transformierbaren Bakterien zählen der gut untersuchte Gram-negative Organismus *Haemophilus influenzae* und natürlich kompetenten Gram-positiven Bakterien, wie z.B. *Bacillus subtilis* und *Streptococcus pneumoniae* (CHUNG & DUBNAU 1998, DOUGHERTY & SMITH 1999). Hier sind die Pilin-ähnlichen Proteine in der Cytoplasmamembran, im Periplasma und (bei Gram-negativen Bakterien) in der äußeren Membran lokalisiert (CHUNG *et al.* 1998).

Bei der Typ-II-Sekretion übernehmen die Komponenten, die Ähnlichkeiten zu den Struktur- und Assemblierungsproteinen der Typ-IV-Pili zeigen, den Transport von Exoenzymen durch den periplasmatischen Raum und die äußere Membran. Zuvor gelangen die zu exportierenden Proteine durch einen Sec- oder Tat-abhängigen Transport durch die Cytoplasmamembran ins Periplasma. Während Typ-IV-Piline zu einem mehrere Micrometer langen Filament assembliert werden, wurden dagegen für die Pilin-ähnlichen Komponenten des DNA-Aufnahme- und des Typ-II-Sekretionssystems eine Pseudopilusstruktur postuliert, welche verankert in der Cytoplasmamembran den periplasmatischen Raum und die äußere Membran durchspannt. Diese Struktur könnte zum einen im Falle des Transformationssystems DNA-bindende Proteine exponieren oder eine Aussparung für den Import des DNA-Stranges bilden, oder zum anderen im Falle des Typ-II-Sekretionssystems durch die Assemblierung Exoenzyme durch die Pore (Sekretin) in der äußeren Membran in den extrazellulären Raum schleusen.

Die Klasse der Typ-IV-Pili wurde bereits ausgiebig untersucht, da diese Strukturen die Adhäsion pathogener Organismen an Wirtszellen vermitteln. Zu diesen zählen u.a. *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, enteropathogene und enterotoxische *E. coli*-Stämme (EPEC und ETEC), *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* und *Moraxella*

bovis (STROM & LORY 1993). Weiterhin vermittelt der Typ-IV-Pilus eine spezielle Art der gleitenden Fortbewegung auf festen Oberflächen, die 'Twitching Motility' genannt wird. Dieses Gleiten beruht auf Synthese und Retraktion der Pilusstruktur unter Vorschub der Zelle (WALL & KAISER 1999). Die Assemblierung der Piline erfolgt nach deren Prozessierung durch eine Präpilineptidase an der Cytoplasmamembran (STROM & LORY 1992, STROM *et al.* 1993). Vermutlich bildet die Peptidase einen Komplex mit ca. zehn unterschiedlichen Proteinen, die an der inneren Zellmembran oder im Periplasma lokalisiert sind. Einige dieser Komponenten sind Pilin-ähnliche Proteine, die verglichen mit der Hauptstrukturkomponente nur in sehr geringen Mengen exprimiert werden, oder ATP-bindende Proteine (TURNER *et al.* 1993, SANDKVIST *et al.* 1995, LORY 1998). Das Sekretin in der äußeren Membran, welches durch Lipoproteine stabilisiert wird, bildet eine Pore, durch die die Sekretion des Pilus erfolgt (DRAKE *et al.* 1997, BITTER *et al.* 1998). Während der ersten Schritte der Synthese des Pilus wird ein Assemblierungsfaktor, der gleichzeitig als Adhäsion fungiert, an seiner Spitze inkorporiert, welcher ebenso in der äußeren Membran lokalisiert ist (JONSSON *et al.* 1991, RUDEL *et al.* 1995, 1995a, 1995b, ALM *et al.* 1996, RYLL *et al.* 1997).

Aufgrund der zahlreich ähnlichen Komponenten von Transformations- und Typ-IV-Pilusbiogenessystem wird für den DNA-Aufnahmeapparat natürlich kompetenter Bakterien eine ähnliche Biogenese angenommen. Die Synthese des DNA-Aufnahmeapparats unterliegt dabei einer Regulation, d.h. sie werden in der physiologischen Phase der Kompetenzinduktion gebildet. Dabei entscheiden definierte Umweltbedingungen, intra- und extrazelluläre Signalstoffe, die mittels Rezeptoren wahrgenommen werden, über die Induktion der Genexpression, wobei die Dauer, Rate und Effizienz der DNA-Aufnahme von Spezies zu Spezies variiert. Die Anforderungen, welche die verschiedenen Organismen zur Induktion der Kompetenz an ihre Umwelt stellen reichen von optimalen Wachstumsbedingungen bis hin zu wachstumslimitierenden Mangelbedingungen oder basieren auf bestimmte Medium-Zusammensetzungen. Bei *Bacillus subtilis* z.B. ist die Entwicklung der Kompetenz von Pheromonen abhängig, die sich mit steigender Zelldichte im Medium akkumulieren (DUBNAU 1991, HAHN *et al.* 1994; MAGNUSON 1994) und als Initiatoren einer komplexen Phosphorylierungskaskade fungieren, so daß schließlich beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase die Kompetenzgene exprimiert werden und daraufhin die Aufnahme der DNA für einen kurzen Zeitraum ermöglicht wird.

Das zweite sehr gut untersuchte Transformationssystem Gram-positiver Bakterien ist das von *Streptococcus pneumoniae*. Dieser Stamm entwickelt die höchste Kompetenz bereits im Verlauf des exponentiellen Wachstums für eine kurze Zeit bei einer bestimmten Zelldichte (TOMASZ 1966, TROMBE *et al.* 1992), wobei an der Induktion ein extrazelluläres

Aktivatorpeptid beteiligt ist (HAVARSTEIN 1995, PESTOVA *et al.* 1996, ALLOING *et al.* 1998). Neben dieser Kompetenzstimulation über 'Quorum Sensing' sind weitere Faktoren wie divalente Kationen (GIAMMARINARO *et al.* 1999), der pH-Wert (TROMBE *et al.* 1992, TROMBE 1993) und die O₂-Konzentration von Bedeutung (ECHENIQUE *et al.* 2000). Wie *Bacillus subtilis* zeigen *Azotobacter vinelandii* (PAGE & VON TIGERSTROM 1978) und *Haemophilus influenzae* (GOODGAL 1982) die höchste Transformationsfrequenz am Anfang des stationären Wachstums, wobei bei *Haemophilus influenzae* der cAMP-Spiegel von Bedeutung ist (CHANDLER 1992, MACFADYEN *et al.* 1998). Die Überführung der Zellen in ein Medium, das keine ausreichende Substrat oder O₂-Versorgung liefert, wirkt dabei zusätzlich stimulierend auf die DNA-Aufnahme (WISE *et al.* 1973). *Neisseria gonorrhoeae* exprimiert im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Organismen die Kompetenzgene in einer nahezu konstitutiven Weise (BISWAS *et al.* 1977).

Nach der Synthese des DNA-Aufnahmeapparats erfolgt die Anlagerung der freien DNA über Bindeproteine an der Zelloberfläche. Dabei geht die DNA in einen waschfesten, jedoch weiterhin DNase-sensitiven Zustand über. Bei *Bacillus subtilis* und *Streptococcus pneumoniae* konnten 30 bis 80 Bindestellen pro kompetenter Zelle nachgewiesen werden, was auf die Synthese eines DNA-bindenden Proteins zurückzuführen ist (LORENZ & WACKERNAGEL 1994, PESTOVA & MORRISON 1998, PROVVEDI & DUBNAU 1999); bei *Haemophilus influenzae* wurden dagegen nur maximal 8 Bindestellen kalkuliert (DEICH & SMITH 1980). Auf der Zelloberfläche von *Bacillus subtilis* konnte eine Endonuklease identifiziert werden, die spezifisch doppelsträngige DNA schneidet und an der Fragmentierung der gebundenen DNA beteiligt ist (PROVVEDI *et al.* 2001). Während bei der größten Zahl der bisher charakterisierten Organismen sowohl homologe als auch heterologe DNA gebunden und aufgenommen wird, zeigen *Haemophilus influenzae* und *Neisseria gonorrhoeae* Affinitäten zu kurzen, im eigenen Chromosom zahlreich vertretenen Erkennungssequenzen und somit eine Diskriminierung heterologer DNA (GOODGAL 1982). Bei *Neisseria* wird die Selektivität für homologe DNA erst im eigentlichen Aufnahme-prozeß wirksam (GOODMAN & SCOCCA 1988; CHEN & GOTSCHLICH 2001).

Nach der Bindung folgt die DNA-Aufnahme durch die Zellhülle durch einen energieabhängigen Mechanismus. Die Charakterisierung von bereits identifizierten, für die natürliche Transformation essentiellen Genen in Gram-positiven und Gram-negativen Organismen ergab, daß zahlreiche DNA-Aufnahmeproteine signifikante Ähnlichkeiten aufweisen, so daß bei den verschiedenen Organismen von einem grundsätzlich ähnlichen Aufnahmemechanismus ausgegangen werden kann, wobei sich die Struktur dieser Apparate aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus der Zellhülle unterscheiden muß. Die

DNA wird als Doppelstrang durch die äußere Membran (bei Gram-negativen Bakterien), durch die Peptidoglycanschicht und als Einzelstrang unter Hydrolyse des komplementären Stranges durch die Cytoplasmamembran in das Cytoplasma aufgenommen, wobei Energie in Form von ATP oder proton-motorischer Kraft erforderlich ist (GRINIUS 1980, PALMEN & HELLINGWERF 1997). Die freien Nukleotide außerhalb der Zelle und die Abhängigkeit der DNA-Aufnahme von zweiwertigen Kationen lassen auf eine beteiligte Nuklease schließen, die bei *Streptococcus pneumoniae* bereits nachgewiesen wurde (PUYET *et al.* 1990). Der letzte Transformationsschritt beinhaltet die genetische Etablierung der aufgenommenen DNA. Die Voraussetzung dafür sind homologe Bereiche, die den entsprechenden Bereich des Chromosom in einem RecA-abhängigen Rekombinationsereignis ersetzen können (DUBNAU & CIRIGLIANO 1973, 1973a, DUBNAU *et al.* 1973; VOSMAN & HELLINGWERF 1991, GREGG-JOLLY & ORNSTON 1994). Alternativ kann bei Aufnahme geeigneter Replikons die Rekonstitution der DNA zu sich unabhängig replizierenden Plasmiden erfolgen.

Eine relativ hohe Transformationsfrequenz zeigt ein Stamm des Gram-negativen Bodenbakteriums *Acinetobacter* (JUNI & JANIK 1969). Hierbei handelt es sich um ein im Boden lebendes, strikt aerobes, zur β -Gruppe der Proteobakterien zugeordnetes Bakterium, welches sich durch eine hohe metabolische Diversität auszeichnet (JUNI 1978). Die Physiologie der natürlichen Transformation von *Acinetobacter* sp. BD4 bzw. seiner kapsellosen Mutante sp. BD413 wurde in zahlreichen Untersuchungen analysiert (PALMEN *et al.* 1993). Dabei konnte gezeigt werden, daß *Acinetobacter* sp. BD413 unmittelbar nach dem Überimpfen in frisches Medium eine hohe Kompetenz für natürliche Transformation entwickelt und diese im Verlauf des exponentiellen Wachstums auf ein niedriges Grundniveau reguliert (PALMEN *et al.* 1993). Die DNA-Aufnahme ist nicht sequenzspezifisch und ist abhängig von zweiwertigen Kationen wie Mg^{2+} , Mn^{2+} oder Ca^{2+} (LORENZ *et al.* 1992), was auf die Beteiligung einer Nuklease schließen läßt. Die auf der Zelloberfläche gebundene doppelsträngige DNA wird dabei als Einzelstrang durch einen energieabhängigen Prozeß in die Zelle aufgenommen und durch ein RecA-abhängiges Rekombinationsereignis ins Chromosom integriert (PALMEN *et al.* 1993, PALMEN & HELLINGWERF 1997). Ungeachtet der zahlreichen Informationen von der Physiologie der Transformation in *Acinetobacter* sp. BD413 sind für Untersuchungen der molekularen Grundlage und für das Verständnis von Struktur und Funktion des Transformationssystems die Identifizierung und Charakterisierung der Komponenten essentiell.

Zur Charakterisierung des Transformationsapparates bei *Acinetobacter* sp. BD413 sind durch die Insertion eines Kanamycinmarkers transformationsdefekte Mutanten erzeugt

worden, die in den letzten Jahren zur Identifizierung einer Vielzahl von Kompetenzgenen geführt hatte. So konnte z.B. ein mit *comA* bezeichnetes Kompetenzgen identifiziert werden (FRIEDRICH *et al.* 2001), dessen Genprodukt Ähnlichkeiten zu ComA aus *Neisseria gonorrhoeae* und ComEC aus *Bacillus subtilis* aufweist (FACIUS & MEYER 1993, HAHN *et al.* 1993). ComA bzw. ComEC sind vermutlich an dem Transport der DNA durch die Cytoplasmamembran beteiligt. Weiterhin wurde durch Transposonmutagenese das Gencluster bestehend aus *comM*, *-N*, *-O*, *-L* und *comQ* identifiziert, welche Homologien zu den Genen aufweisen, die für das Sekretin des Typ-II-Sekretionssystems, der Typ-IV-Pilusbiogenese und dessen Assemblierungsfaktoren codieren (ROSENPLÄNTER pers. Mitteilung). Datenbankabgleiche des Genprodukts eines weiteren BD413-Kompetenzgens *comC* aus BD413 ergaben Ähnlichkeiten zu den gut untersuchten Proteinen PilC1 Und PilC2 aus *Neisseria gonorrhoeae* (JONSSON *et al.* 1991) und *Neisseria meningitidis* (NASSIF *et al.* 1994) sowie PilY1 aus *Pseudomonas aeruginosa* (ALM *et al.* 1996), die an der Biosynthese von Typ-IV-Pili und der gleitenden Fortbewegung `Twitching Motility` beteiligt sind. Immunologische Studien bei *Neisseria gonorrhoeae* demonstrierten, daß ComC in der äußeren Membran lokalisiert ist aber ebenso an der Spitze des Typ-IV-Pilus zu finden ist (MORAND *et al.* 2001, SCHEUERPFUG *et al.* 1999, RAHMAN *et al.* 1997). Bei den Kompetenzfaktoren ComP, ComB, ComE und ComF handelt es sich um Proteine mit signifikanten Ähnlichkeiten zu Typ-IV-Pilinen (PORSTENDÖRFER *et al.* 1997, BUSCH *et al.* 1998, HERZBERG *et al.* 1999). Das sehr gut untersuchte Protein ComP ist in den Zellmembranen lokalisiert, an der Bindung der DNA auf der Zelloberfläche beteiligt und wird posttranslational glykosyliert, was für die Untereinheiten der Typ-IV-Pili ein charakteristisches Merkmal darstellt. Verglichen zu den Strukturproteinen ComB, ComE und ComF wird ComP relativ stark exprimiert (PORSTENDÖRFER *et al.* 2000), welches zu der Vermutung führte, daß ComP die Hauptstrukturuntereinheit darstellt.

Während die Typ-IV-Piline zu einem mehrere Micrometer langen Pilus assembliert werden, ist eine Assemblierung der Hauptstrukturkomponenten des Typ-II-Sekretionssystems sowie des DNA-Aufnahmesystems nicht untersucht. Aufgrund des homologen Biosyntheseapparates kann die Synthese eines Pseudopilus postuliert werden, der den periplasmatischen Raum durchspannt. Eine solche Pseudopilusstruktur ist allerdings noch in keinem Fall identifiziert worden. Vor dem Hintergrund, daß zum einen die Untereinheiten des Typ-IV-Pilus eine essentielle Funktion bei der DNA-Bindung und -Aufnahme ausüben und zum anderen eine Pilusstruktur aber kein notwendiges Strukturmerkmal für die natürliche Transformation darstellt, bleibt die Frage offen, inwiefern der Typ-IV-Pilus die DNA-Aufnahme vermittelt bzw. ob die Piline in einem separaten Transformationssystem, der zu keiner filamentösen Struktur assembliert, diese Funktion ausüben.

Obwohl bei bisher untersuchten transformierbaren Organismen die Komponenten der Typ-IV-Pilusbiogenese an der gleitenden Fortbewegung 'Twitching Motility' und DNA-Aufnahme beteiligt sind, führten dagegen Unterbrechungen in den Kompetenzgenen von *Acinetobacter* sp. BD413 nicht zu einer Beeinträchtigung der gleitenden Fortbewegung und der Pilusbiogenese, was einer direkten Involvierung der Pilusstrukturen in die DNA-Aufnahme widerspricht (PORSTENDÖRFER *et al.* 1997, LINK *et al.* 1998, BUSCH *et al.* 1998, HERZBERG *et al.* 1999). Bei den zwei Pilustypen von BD413 handelt es sich zum einen um flexible Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 6 nm und zum anderen um starre, bündelbildende Filamente, die einen Durchmesser von 2-3 nm aufweisen (PORSTENDÖRFER *et al.* 1997, 2000). Die Charakterisierung dieser Pilusstrukturen ermöglicht die Klassifizierung der Pilustypen von BD413. Mit Hilfe der gereinigten Pili sollen die strukturellen Untereinheiten identifiziert, charakterisiert und ihre Gene anschließend mutagenisiert werden. Sich anschließende Mutantenstudien werden dann den eindeutigen Schluß zulassen, ob die Pili von *Acinetobacter* sp. BD413 an der Transformation beteiligt sind. Parallel zu diesen Untersuchungen sollen periplasmatische und Membrandurchspannende Subkomplexe des Transformationsapparats isoliert und strukturell analysiert werden, um Hinweise auf den Aufbau des Transformationssystems zu erhalten. Bei der Detektion und Isolierung dieser Subkomplexe wird von den bereits vorliegenden Antikörpern gegen das Pilin-ähnliche Protein ComP ausgegangen.

Weiters Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung von am DNA-Transport beteiligten Komponenten. Hierfür soll die uns vorliegende genomische Sequenz von *Acinetobacter* sp. BD413 genutzt werden, was eine Identifizierung von Kompetenzgenen durch Sequenzabgleiche erlaubt. Die sich anschließenden strukturellen und funktionellen Charakterisierungen sollen daraufhin weitere Hinweise auf den Mechanismus des DNA-Transports durch die Zellmembranen liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

In Tabelle 2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten *Acinetobacter* sp.- und *E. coli*-Stämme zusammengefaßt. In Tabelle 2.2 und 2.3 sind die verwendeten Vektoren und rekombinanten Plasmide aufgeführt.

Tab. 2.1: *Acinetobacter* sp./*E. coli*-Stämme

Stamm	Relevanter Geno- oder Phänotyp ^a	Referenz/Herkunft
<i>Acinetobacter</i> sp. ^b BD413	kapsellose Variante des Wildtyps BD4	JUNI, 1972
<i>Acinetobacter</i> sp. ^b ADP239	spontane <i>pobA</i> -Mutante von BD413 ^c	HARTNETT <i>et al.</i> , 1990
<i>Acinetobacter</i> sp. ^b T205	transformationsdefekte Mutante von ADP239, <i>pobA</i> ⁻ , \square <i>comP</i> , Km ^r	PORSTENDÖRFER <i>et al.</i> , 1997
<i>Acinetobacter</i> sp. ^b T206	transformationsdefekte Mutante von ADP239, <i>pobA</i> ⁻ , <i>comP::nptII</i> , Km ^r	PORSTENDÖRFER <i>et al.</i> , 1997
<i>Acinetobacter</i> sp. ^b T308	transformationsdefekte Mutante von ADP239, <i>pobA</i> ⁻ , <i>comC::nptII</i> , Km ^r	LINK <i>et al.</i> , 1998
<i>Acinetobacter</i> sp. ^b T401	transformationsdefekte Mutante von ADP239, <i>pobA</i> ⁻ , <i>comB::nptII</i> , Km ^r	HERZBERG <i>et al.</i> 2000
<i>Acinetobacter</i> sp. ^b T701	transformationsdefekte Mutante von ADP239, <i>pobA</i> ⁻ , <i>comA::nptII</i> , Km ^r	FRIEDRICH <i>et al.</i> , 2001
<i>Acinetobacter</i> sp. ^b T100	transformationsdefekte Mutante von ADP239, <i>pobA</i> ⁻ , <i>comEA::nptII</i> , Km ^r	diese Arbeit

<i>Acinetobacter</i> sp. ^b B100	PHB-Synthese defekte Mutante von ADP239, <i>phaC::nptII</i> , Km ^r	diese Arbeit
<i>Acinetobacter</i> sp. ^b K101	Fil-Pilus-Synthese defekte Mutante von ADP239, <i>filA::nptII</i> , Km ^r	diese Arbeit
<i>Acinetobacter</i> sp. ^b K102	Fil-Pilus-Synthese defekte Mutante von ADP239, <i>orfB::nptII</i> , Km ^r	diese Arbeit
<i>Acinetobacter</i> sp. ^b K103	Fil-Pilus-Synthese defekte Mutante von ADP239, \square <i>orfC::nptII</i> , Km ^r	diese Arbeit
<i>Acinetobacter</i> sp. ^b K104	Fil-Pilus-Synthese defekte Mutante von ADP239, \square <i>orfD</i> / \square <i>orfE::nptII</i> , Km ^r	diese Arbeit
<i>Acinetobacter</i> sp. ^b N100	Fim-Pilus-Synthese defekte Mutante von ADP239, <i>fimA::nptII</i> , Km ^r	diese Arbeit
<i>Acinetobacter</i> sp. ^b KN100	Fil/Fim-Pilus-Synthese defekte Mutante von ADP239, <i>fimA::nptII</i> , \square <i>filA::</i> , Km ^r Sm ^r	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> DH5 \square	F ⁻ , <i>lacZ</i> \square <i>M15</i> , <i>recA1</i> , \square , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , \square (<i>lacZYA</i> , <i>argF</i>)	HANAHAN 1983
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>hsdF</i> , <i>gal</i> (\square <i>cIts857 ind1</i> Sam7 <i>nin5 lacUV5-T7 geneI</i>)	STUDIER & MOFFAT 1986

^a: Phänotypbezeichnung; Km^r: Kanamycinresistenz, Sm^r: Streptomycinresistenz

^b: Früher *Acinetobacter calcoaceticus*

^c: kein Wachstum auf *p*-Hydroxybenzoat (Defekt im *p*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase-Gen (*pobA*)
Genotypenbezeichnung für *E. coli* siehe BACHMANN (1990)

Tab. 2.2: Vektoren

Pasmid	Relevanter Geno- oder Phänotyp ^a	Größe (kb)	Referenz/Herkunft
pUC18	Amp ^r , <i>lacPOZ'</i> , ColE1, ori R	2,68	MESSING & VIEIRA 1992
pGEM-7Zf+	Amp ^r , <i>lacPOZ'</i>	3,0	Pomega Serva GmbH, Heidelberg
pBluescriptII KS/SK+/-	Amp ^r , <i>lacPOZ'</i> , ColE1, ori R, F1 ori	2,96	Stratagene
pRK415	Tet ^r , <i>lacPOZ'</i> , ori R, breites Wirtsspektrum, geringe Kopienzahl	10,5	KEEN <i>et al.</i> 1988
pBK	Tet ^r , <i>mob</i> ⁺ , <i>tra</i> ⁻ , promotorlose <i>lacZ</i> - und <i>gusA</i> -Reportergene	12,4	KUSIAN 1994
pMal-c2	Amp ^r , <i>lacPOZ'</i> , ori R, <i>malE-lacZ</i> □- Fusionsgen, <i>rrB</i> -Terminator, <i>lacI</i> ^q - Repressor	6,6	New England Biolabs, Schwalbach
pRK2013	Km ^r , <i>mob</i> ⁺ , <i>tra</i> ⁺ , ColE1, ori R	48	FIGURSKI & HELINSKI 1979
pJC40	Amp ^r , T7-Promotor, □10-Terminator, codiert für 10 Histidin-Reste und eine Faktor Xa-Schnittstelle	2,4	CLOS & BRANDAU 1994

Tab. 2.3: rekombinante Plasmide

Plasmid (Vektor)	Relevanter Geno- oder Phänotyp ^a	Größe (kb)	Referenz/Herkunft
pCC01 (pJC40)	Amp ^r ; 1,3 kb- <i>HindIII/BamHI</i> - Fragment aus pRK9	3,7	diese Arbeit
pRK9 (pRK415)	Tet ^r ; enthält 4,6 kb- <i>ClaI/XbaI</i> - Fragment aus <i>Acinetobacter</i> sp. T308 (enthält <i>comC</i>)	15,1	LINK 1998
pRP1 (pRK415)	Tet ^r ; 1,4 kb- <i>BglII/SacI</i> -Insert, enthält <i>comP</i> und <i>orfC</i>	11,9	PORSTENDÖRFER 1997

pUI1638 (pBIIKS+)	Amp ^r , Sm ^r ; enthält 2,0 kb- <i>Bam</i> HI- \square Sm/Sp-Kassette in mittlerer <i>Kpn</i> I- Schnittstelle (stumpfe Enden) von pUI1188	5,4	NEIDLE, pers. Mitteilung
pUI1188 (pBIIKS+)	Amp ^r ; enthält doppelte MCS (von <i>Sst</i> I bis <i>Apa</i> I)	3,4	NEIDLE, pers. Mitteilung
pUS01 (pUC18)	Amp ^r , Sm ^r ; 2,0 kb- <i>Eco</i> RV/ <i>Hinc</i> II- \square Sm/Sp-Kassette aus pBS01 in <i>Ssp</i> I von pUK18	4,7	diese Arbeit
pBS01 (pBIISK+)	Amp ^r , Sm ^r ; 1,2 kb- <i>Hind</i> III- \square Sm- Gen aus pUI1638	3,2	diese Arbeit
pBK01 (pBIISK+)	Amp ^r ; 0,68 kb-PCR-Fragment von <i>filA</i> (stumpfe Enden in <i>Eco</i> RV)	3,6	diese Arbeit
pBK03 (pBIISK+)	Amp ^r , Km ^r ; <i>nptII</i> -Marker in <i>Eco</i> RV von pBK01 (<i>filA</i> :: <i>nptII</i>)	4,8	diese Arbeit
pGK04 (pGEM-7Zf+)	Amp ^r , Km ^r ; enthält Mutationsort der Pilus-Mutante K101 als <i>Sac</i> I/ <i>Xba</i> I-Fragment (<i>filA</i> :: <i>nptII</i> , <i>orfB</i>)	11,0	diese Arbeit
pGK06 (pGEM-7Zf+)	Amp ^r ; 1,0 kb- <i>Sna</i> BI/ <i>Sac</i> I-Fragment aus pGK04 (<i>orfB</i>)	4,0	diese Arbeit
pGK07 (pGEM-7Zf+)	Amp ^r ; Km ^r ; <i>nptII</i> -Marker in <i>Hinc</i> II von pGK06	5,2	diese Arbeit
pUK11 (pUC18)	Amp ^r ; 3,6 kb- <i>Eco</i> RI/ <i>Sac</i> I-Fragment aus pGK04 (<i>filA</i> :: <i>nptII</i> , <i>orfB</i>)	6,3	diese Arbeit
pUK12 (pUC18)	Amp ^r ; 0,51 kb- <i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I-PCR- Fragment stromaufwärts von <i>filA</i>	3,2	diese Arbeit
pUK13 (pUC18)	Amp ^r ; 0,45 kb- <i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I-PCR- Fragment stromabwärts von <i>filA</i>	3,1	diese Arbeit
pGK16 (pGEM-7Zf+)	Amp ^r ; 0,79 kb- <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI-PCR- Fragment stromaufwärts von <i>orfC</i>	3,8	diese Arbeit
pGK17 (pGEM-7Zf+)	Amp ^r ; 0,79 kb- <i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I-PCR- Fragment stromabwärts von <i>orfC</i>	3,8	diese Arbeit
pGK18 (pGEM-7Zf+)	Amp ^r ; 0,73 kb- <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI-PCR- Fragment stromaufwärts von <i>orfD</i>	3,7	diese Arbeit

pGK19 (pGEM-7Zf+)	Amp ^r ; 0,68 kb- <i>EcoRI/XbaI</i> -PCR-Fragment stromabwärts von <i>orfE</i>	3,7	diese Arbeit
pGK21 (pGEM-7Zf+)	Amp ^r , Km ^r ; <i>nptII</i> -Marker in <i>SmaI</i> (MCS) von pBK16	5,0	diese Arbeit
pGK22 (pGEM-7Zf+)	Amp ^r , Km ^r ; <i>nptII</i> -Marker in <i>SmaI</i> (MCS) von pBK18	4,9	diese Arbeit
pGK23 (pGEM-7Zf+)	Amp ^r , Km ^r ; 2,0 kb- <i>BamHI/XbaI</i> -Fragment aus pGK21 inpGK16(□ <i>orfC</i> :: <i>nptII</i>)	5,8	diese Arbeit
pGK24 (pGEM-7Zf+)	Amp ^r , Km ^r ; 2,0 kb- <i>BamHI/XbaI</i> -Fragment aus pGK22 in pGK19 (□ <i>orfD</i> /□ <i>orfE</i> :: <i>nptII</i>)	5,6	diese Arbeit
pUK25 (pUC18)	Amp ^r ; 0,4 kb- <i>BamHI/XbaI</i> -PCR-Fragment des Promotors von <i>filA</i>	3,1	diese Arbeit
pBK27 (pBK)	Tet ^r ; 0,4 bp- <i>EcoRI/XbaI</i> -Insert aus pUK25 (<i>filA</i> -Promotor <i>lacZ</i> -fusioniert)	10,9	diese Arbeit
pUK29 (pUC18)	Amp ^r , Sm ^r ; □-Marker aus pBS01 in <i>HincII</i> (MCS) von pUK13	5,1	diese Arbeit
pUK30 (pUC18)	Amp ^r , Sm ^r ; 2,0 kb- <i>PstI/EcoRI</i> -Fragment aus pUK29 mit stumpfen Enden in pUK12 (□ <i>filA</i> ::□)	5,5	diese Arbeit
pKK32 (pRK415)	Tet ^r , Km ^r ; enthält Mutationsort der Pilus-Mutante K102 als 3,6- <i>EcoRI/SacI</i> -Fragment (<i>filA</i> , <i>orfB</i> :: <i>nptII</i>)	14,1	diese Arbeit
pKK33 (pRK415)	Tet ^r , Km ^r ; 3,6 kb- <i>EcoRI/SacI</i> -Fragment aus pGK11 (<i>filA</i> :: <i>nptII</i> , <i>orfB</i>)	14,1	diese Arbeit
pKK34 (pRK415)	Tet ^r ; Deletion des 1,1 kb- <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragments in pKK33 (□ <i>filA</i> , □ <i>nptII</i>)	13,0	diese Arbeit
pKP35 (pRK415)	Tet ^r ; 0,58 bp- <i>XbaI</i> /stumpfes Ende- <i>comP</i> -PCR-Produkt in pBK27 (<i>filA</i> -Promotor vor <i>comP</i>)	11,1	diese Arbeit
pBN01 (pBKIIKS+)	Amp ^r ; 0,69 kb- <i>PstI/XbaI</i> -PCR-Fragment von <i>fimA</i>	3,7	diese Arbeit

pBN02 (pBKIIKS+)	Amp ^r ; Deletion von <i>EcoRI</i> in MCS von pBN01 durch Ligation glatter Enden von <i>PstI</i> und <i>EcoRV</i>	3,7	diese Arbeit
pBN03 (pBKIIKS+)	Amp ^r , Km ^r ; <i>nptII</i> -Marker in <i>EcoRI</i> von pBN02 (<i>fimA::nptII</i>)	4,9	diese Arbeit
pUN09 (pUC18)	Amp ^r ; 0,3 kb- <i>BamHI/XbaI</i> -PCR-Fragment des Promotorbereichs von <i>fimA</i>	3,0	diese Arbeit
pBN10 (pBK)	Tet ^r ; 0,3 bp- <i>EcoRI/XbaI</i> -Insert aus pUK25 (<i>fimA</i> -Promotor <i>lacZ</i> -fusioniert)	12,7	diese Arbeit
pMD05 (pMal-c2)	Amp ^r , 0,33 kb-PCR-Produkt (<i>EcoRI/XbaI</i>) von <i>comEA</i> (ohne Signalsequenz)	6,9	diese Arbeit
pUD08 (pUC18)	Amp ^r , 0,75 kb- <i>PstI/XbaI</i> -PCR-Produkt von <i>comEA</i> in pUS01 (<i>comEA</i>)	5,4	diese Arbeit
pUD09 (pUC18)	Amp ^r , Sm ^r , Km ^r ; <i>nptII</i> -Marker in <i>SspI</i> von pUD08 (<i>comEA::nptII</i>)	6,6	diese Arbeit
pBD10 (pBK)	Tet ^r ; 0,46 bp- <i>PstI/SacI</i> -Insert aus pUD08 mit glatten Enden in <i>EcoRI/XbaI</i> (<i>comEA lacZ</i> -fusioniert)	12,9	diese Arbeit
pKD11 (pRK415)	Tet ^r ; 0,75 bp- <i>PstI/XbaI</i> -Insert aus pUD08 in <i>PstI/HindIII</i> (<i>XbaI</i> , <i>HindIII</i> 'blunt end' ligiert) (<i>comEA</i>)	11,3	diese Arbeit
pPD12 (pRK415)	Tet ^r ; 0,48 bp-PCR- <i>comEA</i> -Produkt in <i>PstI/SacI</i> von pRP1 (<i>comP</i> -Promotor vor <i>comEA</i>)	12,4	diese Arbeit
pMA03 (pMal-c2)	Amp ^r ; 0,83 kb- <i>EcoRI/XbaI</i> -PCR-Produkt von <i>comA</i> (C-Terminus)	7,4	diese Arbeit
pUB01 (pUC18)	Amp ^r ; 1,3 kb- <i>SacI/XbaI</i> -PCR-Fragment von <i>phaC</i>	4,0	diese Arbeit
pUB02 (pUC18)	Amp ^r ; Km ^r ; <i>nptII</i> -Marker in <i>BstXI</i> von pUB01 (<i>phaC::nptII</i>)	5,2	diese Arbeit

^a: Phänotypenbezeichnung: Amp^r: Ampicillinresistenz; Tet^r: Tetracyclinresistenz, Km^r: Kanamycinresistenz, Sm^r: Streptomycinresistenz

2.2 Zellanzucht

2.2.1 Nährmedien

Die unten aufgeführten Nährmedien konnten entweder als Flüssigmedium oder als feste Nährböden verwendet werden. Feste Medien wurden durch Zusatz von 1,5% (w/v) Agar zu der entsprechenden Nährlösung hergestellt, wobei für Mineralmedien Bactoagar und für andere Medien Japanagar verwendet wurde. Mineralmedien wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ angesetzt, alle anderen Medien mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$. Schließlich waren die Medien für 20 min bei 121°C zu autoklavieren.

2.2.1.1 Mineralmedium

Das Mineralmedium (ORNSTON & STANIER 1966) für die Anzucht von *Acinetobacter* setzte sich aus einer Minerallösung und einem Phosphatpuffer zusammen:

Phosphatpuffer

KH_2PO_4	3,4 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	4,4 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 1000 ml
pH	6,8

Minerallösung

NH_4Cl	1 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,58g
KNO_3	0,1 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	67 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{M}_2\text{O}_7 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	2 mg
SL 9	1 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 1000 ml

Die beiden Komponenten wurden als 20fach konzentrierte Lösungen angesetzt und getrennt autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf unter 50°C wurden diese im gleichen Verhältnis unter Berücksichtigung der Verdünnung kurz vor Gebrauch gemischt und mit der gewünschten Kohlenstoffquelle versetzt. In Tab. 2.4 sind die dem Mineralmedium zugesetzten Kohlenstoffquellen aufgeführt.

Tab. 2.4: Substrate für das Mineralmedium

Substrat	Stammlösung (in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$)	Endkonzentration
Succinat (Na-Salz)	1 M	20 mM
Benzoat (Na-Salz)	1 M	5 mM
<i>p</i> -Hydroxybenzoat	1 M	5 mM

Spurenelementlösung (SL) 9 (TSCHECH & PFENNIG 1984; modifiziert)

Titriplex	2,8 g
Fe(II)SO ₄ x 7 H ₂ O	2 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	122 mg
ZnCl ₂	70 mg
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	36 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2 mg
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

2.2.1.2. Komplexmedien**LB-Medium** (SAMBROOK *et al.* 1989)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O _{demin.}	ad 1000 ml

SOB-Medium (HANAHAN 1983)

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
H ₂ O _{demin.}	ad 1000 ml

2.2.2. Antibiotika

Von den Antibiotika wurden Stammlösungen in H₂O_{dest.} angesetzt, die bei -20°C aufbewahrt wurden. Die Antibiotika wurden den autoklavierten Nährlösungen erst nach deren Abkühlen auf weniger als 50°C zugegeben. Tetracyclinhaltige Medien wurden lichtgeschützt gelagert. Tab. 2.5 zeigt eine Übersicht der verwendeten Antibiotika und der eingesetzten Konzentrationen.

Tab. 2.5: Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung (mg/ml)	Endkonzentration (µg/ml)
Ampicillin	100	100
Kanamycin	20	20
Tetracyclin	15	15
Streptomycin	20	20

2.2.3 Zellanzucht

Acinetobacter- und *E. coli*-Stämme wurden aerob in Flüssigkulturen in Reagenzgläsern, Erlenmeyerkolben mit Schikanen oder 3 l-Kleyverkolben angezogen. Kulturen von *Acinetobacter* wurden in Mineralmedium mit Kohlenstoffquelle oder in LB-Medium bei 30°C, *E. coli* in LB-Medium bei 37°C auf einem Rotationsschüttler (Typ RC 108, Infors AG, Basel) inkubiert. Eine Massenzucht erfolgte in einem 100 l Fermenter (UD 100) der Firma Braun (Melsungen). Hauptkulturen wurden - wenn nicht anders angegeben – 3%ig (v/v) mit einer Vorkultur angeimpft. Die Kultivierung auf festen Medien erfolgte beim Wachstum auf LB-Platten bei den o.g. Temperaturen über Nacht; auf Mineralmedium wurde *Acinetobacter* für 1 bis 1,5 Tage inkubiert.

2.2.4 Messung der optischen Dichte

Der Wachstumsverlauf einer Flüssigkultur konnte photometrisch durch Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen den Medienleerwert verfolgt werden. Die OD wurde dabei in einer Küvette (Schichtdicke 1 cm) mit einem PM4-Spektralphotometer (Carl Zeiss, Oberkochen) bestimmt. Um Meßungenauigkeiten zu vermeiden, mußten die Proben ab einer OD von 0,3 mit Medium verdünnt werden.

2.2.5 Reinheitskontrolle und Stammhaltung

Die Reinheitskontrolle der Kulturen erfolgte mikroskopisch, wobei *Acinetobacter* als unbewegliches, abgerundetes Kurzstäbchen – oft assoziiert als Diplokokken - zu erkennen war. Durch Ausstrich auf Selektiv- bzw. Komplexmedium konnten auch Koloniemorphologie und Färbung als Identifizierungsmerkmale herangezogen werden.

Für eine längere Konservierung der Bakterienstämme mußte eine Stammsammlung angelegt werden, die bei -70°C aufzubewahren war. Dafür wurde eine Reinkultur über Nacht in LB-Medium angezogen und mit 30% (v/v) Glycerin bzw. 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Davon wurde 1 ml in einem sterilen Schraub-Eppendorf-Reaktionsgefäß bei -70°C eingefroren. Um nicht auf die Stammsammlung zurückgreifen zu müssen, wurde für den täglichen Gebrauch der Bakterienstämme eine Kultur auf Agarplatten mit Selektivmedium angezogen. Bei 4°C waren die Kulturen, je nach Stamm, mehrere Wochen lagerfähig.

2.3 Standardtechniken für das Arbeiten mit DNA

2.3.1 Isolierung von Plasmiden

Für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*-Klonen wurde der 'QIAPrep Spin'-Plasmidisolierungskit (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet und in der dort vorgeschriebenen Weise verfahren. Hierbei wurden beim Vorliegen von 'High Copy Plasmiden' 3 ml einer in LB-Medium (2.2.1.2) über Nacht gewachsenen Zellkultur durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand sorgfältig abgenommen. Die Zellen wurden in 250 μl P1-Puffer sehr gut resuspendiert, mit 250 μl P2-Puffer versetzt, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Denaturierung der Proteine im Zellysate erfolgte durch Zugabe von 350 μl P3-Puffer und die Sedimentation dieser Proteine und Zelltrümmer durch eine 10minütige Zentrifugation bei RT (13000 Upm; Biofuge 17 S). Zur Bindung der Plasmide wurde der klare Überstand auf eine Plasmidpräp-Säule gegeben, 1 min zentrifugiert (13000 Upm, RT) und der Durchfluß verworfen. Diente das Plasmid für eine spätere Sequenzierung, so wurde zur Entfernung von Protein- und Membranrückständen ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt mit 500 μl PB-Puffer zwischengeschaltet (1 min, 13000 Upm, RT). Nachdem 750 μl Waschpuffer (PE) auf die Säule gegeben worden war und zum vollständigen Entfernen des Puffers zweimal 1 min zentrifugiert wurde (13000 Upm, RT), konnten die an dem Säulenmaterial haftenden Plasmide durch Zugabe von 50 μl Elutionspuffer (EP) oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, 1minütiger Inkubation bei RT und anschließender Zentrifugation (1 min, 13000 Upm, RT) eluiert werden.

Für die Isolierung von 'Low Copy Plasmiden' (z.B. pRK415-, pBK-Derivaten) diente eine 15 ml-Kultur, dessen geerntete Zellen mit jeweils der doppelten Menge an P1-, P2- und P3-Puffer versehen wurden, wobei wie oben beschrieben zu verfahren war. Durch dieselbe Plasmidpräp-Säule wurde daraufhin zweimal hintereinander dieses Lysat zentrifugiert und danach mit den Waschschritten weiter verfahren wie bereits beschrieben.

Puffer 1

Tris-HCl 1,2 g
EDTA 0,74 g
H₂O_{demin.} ad 200 ml
pH 8,0

Puffer 2

NaOH 0,8 g
SDS 1 % (w/v)
H₂O_{demin.} ad 100 ml

Puffer 3

K-Acetat 63 g
H₂O_{demin.} ad 200 ml
pH 5,5

RNase A-Lösung

Die RNase A wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 7,5/15 mM NaCl gelöst, 15 min auf 85°C erhitzt, um vorhandene DNasen zu denaturieren, und auf RT abgekühlt. Die Stammlösung wurde bei -20°C gelagert.

RNase A (Stammlösung) 70 µl
TE-Puffer ad 1000 µl

Die Lagerung dieser Lösung erfolgte bei 4°C.

2.3.2 Isolierung chromosomaler DNA mittels DNA-Extraktionskit

Der 'Genomic DNA Kit' (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bietet eine schnelle und einfache Methode, um chromosomale DNA aus 0,5 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur unterschiedlichster Bakterienspezies zu isolieren, wobei ca. 10-30 µg DNA extrahiert werden.

Die Zellen wurden über Nacht in LB-Medium angezogen, geerntet (RT, 14000 Upm, 30 s, Eppendorf Centrifuge 5417R) und der Überstand entfernt. Durch die Zugabe von 0,3 ml Lyse-Lösung und die anschließende fünfminütige Inkubation bei 80°C erfolgte der Aufschluß der Zellen. Nach Zugabe von 1,5 µl RNase A-Lösung (4 mg/ml) wurde die Probe 45 min bei 37°C inkubiert bevor bei Raumtemperatur 100 µl Präzipitationslösung hinzugegeben, gut gemixt und die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation pelletiert wurden (RT, 14000 Upm, 3 min, Eppendorf Centrifuge 5417R). Der Überstand konnte daraufhin in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben werden, worin zuvor 0,3 ml Isopropanol pipettiert worden waren. Nach Zentrifugation (RT, 14000 Upm, 1 min, Eppendorf Centrifuge 5417R) war die DNA als weißes Pellet erkennbar. Der Überstand

wurde entfernt und das Reaktionsgefäß auf saugfähigem Papier getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte in 50-100 μ l $H_2O_{\text{dest.}}$ über Nacht bei 4°C.

2.3.3 Präparative Isolierung chromosomaler DNA aus *Acinetobacter* sp.

Die Gewinnung von Gesamt-DNA aus *Acinetobacter* sp. erfolgte über Phenol/Chloroform-Extraktionen, wenn größere Mengen an DNA benötigt wurden (AUSUBEL *et al.* 1993). Hierbei lag die Ausbeute bei 0,5 mg DNA. Um die chromosomale DNA vor starken Scherkräften zu bewahren, wurden alle Präparationschritte extrem vorsichtig gehandhabt und für das Pipettieren nur abgeschnittene Spitzen mit großer Öffnung verwendet.

Acinetobacter sp. wurde in 100 ml LB-Medium über Nacht angezogen und am nächsten Tag abzentrifugiert (4°C, 10 min, 8000 Upm, Sorvall Rotor GSA). Das Pellet wurde in 9,5 ml TE-Puffer (2.3.4) aufgenommen und nach Zugabe von 0,5 ml 10% (w/v) SDS und 50 μ l Proteinase-K-Lösung (20 mg/ml TE-Puffer) 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz von 1,8 ml 5 M NaCl und mehrmaligem Schwenken wurden 1,5 ml CTAB/NaCl-Lösung zugegeben und die Suspension für 20 min bei 65°C inkubiert. Zur Proteinextraktion wurden 14 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt und bei 20000 Upm 20 min zentrifugiert (4°C, Sorvall, SS34). Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und mit 6 ml Phenol versetzt. Nach Zugabe von 6 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) mußte nochmals zentrifugiert (4°C, 20 min, 20000 Upm, Sorvall Rotor SS34) und die DNA-haltige Oberphase nochmals mit 12 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert werden. Durch Zugabe von 0,8 Vol. Isopropanol wurde die DNA gefällt und 30 min bei 15000 Upm (RT, Sorvall Rotor SS34) pelletiert. Die DNA konnte bei RT getrocknet, in 1 ml TE-Puffer (2.3.7) oder H_2O_{bidest} aufgenommen und anschließend bei 4°C aufbewahrt werden.

CTAB/NaCl-Lösung

10% (w/v) Hexadecyltrimethylammoniumbromid
0,7 M NaCl

2.3.4 Lagerung von DNA

Zum Schutz der Plasmid-DNA vor autokatalytischem Zerfall und DNase-Aktivität wurde die DNA in TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert. Sollte die DNA nur kurze Zeit gelagert und bald weiter verarbeitet werden, so konnte diese in $H_2O_{\text{dest.}}$ gelöst werden.

TE-Puffer

Tris-HCl	1,2	g
EDTA	0,37	g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml
pH	8,0	

2.3.5 Schnelle Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* ('Cracking')

Mit Hilfe der schnellen Plasmidisolierung konnten innerhalb kurzer Zeit mehrere *E. coli*-Klonen auf ihr rekombinantes Plasmid hin überprüft und identifiziert werden. Die isolierten Plasmide wurden nicht restriktionsgeschnitten, sondern anhand des Laufverhaltens der ccc-Form im Agarosegel identifiziert. Diese Methode eignete sich nur für Plasmide mit hoher Kopienzahl.

Kleine Mengen (ca. 0,2 μ l) einer frisch gewachsenen Kolonie wurden mit einer Pipettenspitze abgenommen und in 15 μ l 10 mM EDTA pH 8,0 resuspendiert. Nach Zugabe von 15 μ l Cracking-Puffer (0,2 M NaOH, 0,5% [w/v] SDS, 20% [w/v] Saccharose) wurde die Probe 5 min bei 70°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und anschließend mit 1,5 μ l 4 M KCl und 0,5 μ l 0,4% (w/v) Bromphenolblaulösung versetzt und gut gemischt. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde die Probe zentrifugiert (4°C, 5 min, 15000 Upm, Biofuge 17 RS) und 20 μ l des Überstands direkt für die Agarose-Gelelektrophorese (2.3.6) eingesetzt.

2.3.6 Gelelektrophorese von DNA im Agarosegel

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Elektrophoresekammern eigener Bauart elektrophoretisch aufgetrennt. Verwendet wurde 0,8-1,0%ige Agarose in TAE-Puffer, der auch als Elektrophoresepuffer diente. Das Gelvolumen betrug bei Minigelen 12,5 ml, bei Midigelen 25 ml und bei Maxigelen 100 ml. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/10 Vol Farbstoffschwerelösung (6 x Loading Dye, MBI Fermentas, Wilna, Litauen) versetzt. Das Einlaufen der Proben in das Gel erfolgte bei 40 V, die Auftrennung bei 60 bis 100 V.

TAE-Puffer

Tris-Acetat	4,8	g
EDTA	0,37	g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml
pH	8,0	

2.3.7 Färbung und Fotografie von DNA in Agarose- oder Polyacrylamidgelen

DNA kann mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht werden; denn dieser unter UV-Licht fluoreszierende Farbstoff interkaliert zwischen die Basen und markiert so die DNA. Dafür wurde das Gel 15 min in ein wässriges Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) gelegt und anschließend für 5 min in einem H₂O-Bad entfärbt. Unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm konnte die DNA sichtbar gemacht werden und mit einem Videoprinter (Mitsubishi, Model P78E, Intas, Göttingen) fotografiert werden.

2.3.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Diese Methode wurde angewendet, um einzelne DNA-Fragmente aus einem Agarosegel zu isolieren. Sie beruht auf der Adsorption von DNA an eine Silicagelmembran in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze. Benutzt wurde der 'QIAquick Gel Extraction Kit' (Qiagen, Hilden).

Das DNA-Gemisch wurde zunächst in einem Agarosegel aufgetrennt. Das zu isolierende DNA-Fragment mußte unter UV-Licht schnell mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein zuvor gewogenes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und das Gewicht des Gelstückes bestimmt werden. Anschließend wurde das dreifache Volumen des Puffers QX1 hinzugefügt (nach der Formel: Gelmasse [mg] x 3 = Vol [µl] QX1). Das Gemisch wurde bis zum Auflösen des Gels unter mehrmaligem Schwenken bei 50°C inkubiert (ca. 5 min). Es folgten die Zugabe von 1 Gelvolumen Isopropanol, vorsichtiges Mischen und die Beladung der QIAquick-Säule mit der Lösung. Nach Zentrifugation (RT, 13000 Upm, 1 min, Biofuge 17 RS) wurde der Durchfluß verworfen und die Säule mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen (RT, 13000 Upm, 1 min, Biofuge 17 RS). Zur vollständigen Entfernung des Waschpuffers wurde nach Verwerfen des Durchflusses nochmals zentrifugiert (RT, 13000 Upm, 1 min, Biofuge 17 RS), bevor die Säule in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt wurde. Die Elution der DNA erfolgte durch 1minütige Inkubation mit 30 µl H₂O_{demin.} und anschließende Zentrifugation (RT, 13000 Upm, 1 min, Biofuge 17 RS).

2.4 Enzymatische Modifikationen von DNA

2.4.1 Restriktionsverdau von DNA

Für den enzymatischen Restriktionsverdau von DNA wurden 0,5-1 µg DNA in H₂O_{dest.} aufgenommen und mit 0,1 Vol Reaktionspuffer (10fach konzentriert) versetzt. Bei einem Reaktionsvolumen von 20 µl startete der Verdau mit maximal 0,5 µl Enzymlösung, wonach eine Inkubation für 2-12 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (i.d.R. 37°C) erfolgte. Die verdaute DNA konnte anschließend für Ligationen (2.4.4) oder Fragmentisierungen (2.3.8) eingesetzt werden. Bei Restriktionsspaltungen chromosomaler DNA wurde diese zunächst zum Entknäulen 10 min bei 60°C inkubiert. Dem Restriktionsansatz wurden gegebenenfalls zuvor 2 µl Spermidin (Stammlösung 1 M) pro 50 µl Ansatz zugefügt, um die Spaltbarkeit der DNA zu erhöhen (BOUCHE 1981).

2.4.2 Herstellung von stumpfen DNA-Enden

Sollten DNA-Fragmente ligiert werden, die keine oder nur eine mit der Klonierungsstelle des Vektors kompatible Restriktionsschnittstelle aufwiesen, mußten die 5'-Überhänge mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I aus *E. coli* mit Nukleotiden zu stumpfen Enden aufgefüllt bzw. abgedaut werden. Die dazu verwendeten Komponenten stammten aus dem Erase-a-Base-System (Promega/Serva, Heidelberg). Die Enzyme im Restriktionsansatz wurden nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert, der Ansatz mit 1 x Klenowpuffer auf 18 µl aufgefüllt und mit 0,3 µl Klenow-Fragment (2,5 U/µl) versetzt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei 37°C wurden 1 µl dNTP-Mix (0,4 mM) hinzugegeben und der Ansatz weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Dieser konnte nun für eine Ligation stumpfer Enden (2.4.4) eingesetzt werden.

2.4.3 Dephosphorylierung von DNA

Zur Vermeidung von Selbstligationen konnte lineare Plasmid-DNA an den 5'-Enden mittels alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) dephosphoryliert werden (SAMBROCK *et al.* 1989). Dafür wurden 100 µl Plasmid-DNA-Lösung mit 0,05 U CIP und CIP-Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 7 µl 10% (w/v) SDS, 1,4 ml 0,5 M EDTA und 0,7 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurde die Reaktion nach 30minütiger Inkubation bei 56°C abgestoppt.

2.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation wird eine Phosphodiesterbindung zwischen doppelsträngigen DNA-Fragmenten gebildet, die mindestens ein freies 3'-Hydroxyende und 5'-Phosphatende besitzen. Da der Erfolg einer Ligation u.a. von Länge und Konzentration der Vektor- und der zu inserierenden DNA abhängt, wurde das zu ligierende DNA-Fragment in 4-6fachem Überschuß eingesetzt. Vor der Ligation wurden die Restriktionsenzyme in den DNA-Lösungen durch 10minütiges Erhitzen auf 65-85°C inaktiviert. Ligationen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl, Boehringer Mannheim) in dem vom Hersteller gelieferten Puffer. Der Ligationsansatz wurde für 2 h bei 22°C oder ca. 16 h bei 16°C inkubiert. Anschließend konnte er direkt zur Transformation von *E. coli* eingesetzt werden (2.7.2.2).

2.4.5 N-terminale Sequenzierung von Proteinen

Die N-terminale Ansequenzierung der Proteine wurde von DR. J. KELLERMANN (MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt.

2.4.5.1 Enzymatische Spaltungen von Proteinen im Polyacrylamidgel

Die Spaltung der Proteine im SDS-Gel und deren Elution sowie die Auftrennung der entstandenen Polypeptide wurde nach der folgenden Vorgehensweise durchgeführt:

Spaltung

- Gel mit Coomassie färben und mit 10% Essigsäure entfärben
- Proteinbande und Referenzbande aus dem Gel ausschneiden (Gel ohne Protein sollte so groß wie Proteinbande sein)
- durch ein Sieb drücken und zerkleinern (Poren 30 µm x. 100 µm)
- Zerquetschtes Gel mit _ konz. Inkubationspuffer 2 min waschen (12,5 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH 8,5 bei Endo LysC)
- abzentrifugieren und Puffer entfernen
- 1 h im "speedvac" antrocknen (ca 5% Restwasser; „gummiartig“)
- Endoprot. Lys C in 400 µl 12,5 mM Tris-HCl, pH 8,5 lösen (Enzym : Protein = 1 : 10) + 0.1% Laurylmaltosid
- je 200 µl zu Probe und Referenz geben und 6 h (bis über Nacht) bei 37°C im Heizblockschüttler inkubieren

Elution

- 2 x 1 h mit 1% TFA inkubieren, danach abzentrifugieren
- anschließend 1 x 3 h mit 10% Ameisensäure, 20% Isopropanol, 60% Acetonitril eluieren, mit den anderen Eluaten vereinen und auf die HPLC auftragen.

Trennung über HPLC

Säule: Purospher 60 RP18e (Merck, Darmstadt) 1mm x 150 mm

Puffer A: 0.1% Trifluoressigsäure

Puffer B: 0.085% TFA in Acetonitril

Flußrate: 20 µl/min Gradient: 5 - 60% in 90 min

Detektion: 206 nm

Der N-terminale Abbau der Aminosäuren (EDMAN & BEGG 1967) erfolgt in einem automatischen Sequencer Procise 492 (Applied Biosystems, PE)

2.4.5.2 „in situ“-Verdau membrangebundener Proteine (Patterson 1994)

Die PVDF-Membran mit der Proteinbande (gleiche Prozedur mit Membran ohne Protein als Negativkontrolle) wurde in 3mm x 3mm Stücke geschnitten und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 500 µl Quench-Lösung 30 min bei Raumtemperatur inkubieren. Daraufhin wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgenommen, die Membranstücke 8x mit H₂O_{dest.} und anschließend 1x mit Verdauopuffer gewaschen. Es folgte die Zugabe von 0,75 µg Enzym (Trypsin 'sequencing grade', Boehringer Mannheim) in möglichst wenig Verdauopuffer (Membran mußte bedeckt sein) und eine 8stündige Inkubation bei 37°C. Der Überstand wurde abgenommen und in ein zweites 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt bevor die Membran 2x mit 1% TFA + 0,2% Laurylmaltosid im Ultraschall gewaschen, abzentrifugiert und ebenfalls in ein Reaktionsgefäß überführt wurde. Anschließend mußte noch einmal mit 10% Ameisensäure, 20% Isopropanol, 20% Acetonitril gewaschen und die Überstände eingengt werden. Die Polypeptide konnten schließlich über die HPLC aufgetrennt werden.

Vor Injektion der Probe auf die HPLC-Säule wurden 50 µl Inkubationspuffer injiziert.

Trennung über HPLC

Säule: Purosphere RP18e (Merck, Darmstadt) 1 mm x 150 mm

Puffer A: 0,1% Trifluoressigsäure

Puffer B: 0,085% TFA in Acetonitril

Flußrate: 20 µl/min Gradient: 5 - 60% in 90 min

Detektion: 206 nm

HPLC: Hewlett Packard 1100

Der N-terminale Abbau der Aminosäuren (EDMAN & BEGG 1967) erfolgt in einem automatischen Sequencer Procise 492 (Applied Biosystems, PE)

Quench-Lösung: 0,2% Polyvinylpyrolidon (PVP 30) in H₂O_{dest.}

Verdauungspuffer: 0,025 M Tris-HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA, 10% CH₃CN, 0,1% Laurylmaltosid (pH vor Spaltung überprüfen)

2.5 DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnten DNA-Bereiche *in vitro* amplifiziert werden. Als Polymerase wurde die Vent-Polymerase mit 3'→5' Korrekturleseaktivität eingesetzt. Da die zu amplifizierenden DNA-Bereiche mit neuen Restriktionsschnittstellen flankiert werden sollten, wurden Primer verwendet, die entsprechend der neuen Schnittsequenzen Fehlpaarungen zum DNA-Matrizenstrang aufwiesen. Aufgrund dieser Fehlpaarung wurde als Primer-Anlagerungstemperatur 40°C gewählt. Die verwendeten Primer waren 21–31 bp lang und besaßen 1–3 Basenfehlpaarungen.

Die von Aminosäuresequenzen abgeleiteten Primer wiesen aufgrund der Codierung einer Aminosäure durch mehrere verschiedene Basentriplets, die sich meist in der dritten Position unterschieden, variable Basen auf. Hierbei wurde die Tatsache beachtet, daß Guanin-Tymin-Paarungen die Primeranlagerung nicht behindern und somit die Zahl der variablen Basen eingegrenzt werden konnte. Da die Zahl der Fehlpaarungen der 'gewobbelten' Primer mit 5–6 variablen Basen sehr hoch lag, wurde zur Spezifizierung 60 mM TMAC (Trimethylacetat) und zur Endknäulung der chromosomalen DNA, die als Matrize diente, 2% (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid) hinzugegeben. Darüber hinaus wurde die PCR in einem Gradientencycler (Mastercycler-Gradient, Eppendorf) mit einem Temperaturgradient von 37°C bis 57°C durchgeführt.

Der Ansatz für die PCR wurde auf Eis in einem 0,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß aus folgenden Komponenten angesetzt:

Primer 1	20-100 pmol
Primer 2	20-100 pmol
Matrizen-DNA	0,5-1,0 μ g
dNTP-Lösung (10 mM)	2-4 μ l
10 x Puffer	10 μ l
H ₂ O _{dest.}	ad 99,5 μ l
Polymerase (2 U/ml)	0,5 μ l

Bis auf die Polymerase, wurden alle Komponenten zusammengegeben, gemischt und mit 30 μ l Wachs überschichtet. Anschließend wurde der Ansatz in einen PCR-Thermoblock (MiniCycler, Biozym, Hess. Oldendorf) gestellt und 5 min bei 97°C denaturiert. Nachdem der Ansatz auf 86°C herunter temperiert war, konnte die Polymerase zugegeben werden. Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen mit folgenden Reaktionsschritten:

Denaturierung	30 s	97°C
Primer-Anlagerung	45 s	40°C (bzw. 37-57°C, Gradientencycler)
Synthese	1-4 min	72°C (1 kb pro min Synthesezeit)

Die DNA-Amplifikation wurde anschließend im Agarosegel überprüft (2.3.6) und unter Verwendung der neu eingebauten Schnittstellen in den Vektor (Tab. 2.2) kloniert.

2.6 Southern-Hybridisierung

2.6.1 Markierung von DNA mit Digoxigenin-11-dUTP

Die Markierung von DNA-Sonden mit Digoxigenin-11-dUTP erfolgte nach der 'random primed'-Methode mit dem DIG DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim). Diese Methode beruht auf der Hybridisierung einer Mischung von Hexanukleotiden fast aller möglichen Basensequenzen an die zu markierende DNA. Der komplementäre Strang wird anschließend unter Einbau von Dig-11-dUTP von den 3'-Enden der 'random primer' durch das Klenow-Enzym synthetisiert. Für die Markierungsreaktion wurden 3-10 μ g DNA durch 10minütiges Erhitzen auf 95°C und anschließendes sofortiges Abkühlen in Eis/NaCl

denaturiert. Unter weiterer Inkubation auf Eis wurde die DNA-Lösung mit 2 µl Hexanukleotidgemisch und 2 µl dNTP-Markierungsgemisch versetzt und mit H₂O auf ein Reaktionsvolumen von 19 µl gebracht. Die Markierungsreaktion erfolgte bei 37°C über Nacht und wurde durch die Zugabe von 2 µl EDTA (200 mM, pH 8,0) abgestoppt. Markierte DNA-Sonden konnten bei -20°C gelagert oder nach einer Hitzedenaturierung (10 min, 100°C) direkt für eine Hybridisierung eingesetzt werden.

2.6.2 Übertragung von DNA auf Nylonmembranen durch Vakuumblot (PEFEROEN *et al.* 1982)

Die Übertragung der zu untersuchenden DNA von einem Agarosegel auf eine Nylonmembran wurde mit einer Vakuumblotapparatur (Vakuumblotter VBII, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Im Gegensatz zum DNA-Transfer nach SOUTHERN (1975) wird hier die Übertragung der DNA nicht durch Kapillarkräfte, sondern durch ein Vakuum bewirkt.

Die im Agarose-Midigel aufgetrennte DNA (2.3.6) wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert (2.3.7). Zur besseren Übertragung großer DNA-Fragmente, mußte das Agarosegel zur Einführung von Strangbrüchen 5 min mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) bestrahlt werden. Entsprechend der Gelgröße wurden ein Chromatographiepapier (Whatman 3MM) sowie eine Nylonmembran (NEF-976, Gene Screen Plus, Du Pont, Bad Homburg) zurechtgeschnitten, für 10 min in 20 x SSC getränkt und anschließend auf die mit H₂O angefeuchtete Saugunterlage der Vakuumblot Apparatur gelegt. Mit Hilfe einer Plastikmaske, welche die Ränder der Nylonmembran um mindestens 1 cm überdeckte, wurde der freie Teil der Unterlage luftdicht abgedeckt. Das Agarosegel mußte luftblasenfrei auf die Membran gelegt werden, wobei darauf zu achten war, daß die Geltaschen außerhalb des Maskenfensters lagen. Nach Befestigung des Deckels konnte in der unteren Kammer der Apparatur ein Unterdruck von 55 mbar angelegt werden. Eine 15minütige Überschichtung des Gels in Depurinisierungslösung führte zur Zerkleinerung der DNA-Fragmente. Zur weiteren Erleichterung des DNA-Transfers wurde das Gel für je 15 min mit Denaturierungslösung bzw. Neutralisationslösung überschichtet. Nicht durchgesaugte Lösungsreste wurden mit einer Glaspipette abgenommen. Der eigentliche DNA-Transfer fand durch Überschichten des Gels mit 20 x SSC für 30 min statt, wobei der Unterdruck auf 80 mbar erhöht wurde. Nach dem Transfer wurde die Membran zur endgültigen Fixierung der DNA 3 min von beiden Seiten mit UV-Licht bestrahlt, kurz gewässert und auf Chromatographiepapier (Whatman 3MM) für 3 min bei 80°C getrocknet. Die Membran konnte direkt für eine Hybridisierung eingesetzt oder in Folie eingeschweißt bei 4°C gelagert werden.

Denaturierungslösung

NaCl 1,5 M
NaOH 0,5 M

Neutralisationslösung

Tris-HCl 1,0 M
NaCl 2,0 M
pH 5,5

20 x SSC-Puffer

Na₃-Citrat x 2 H₂O 88 g
NaCl 175 g
H₂O_{demin.} ad 1000 ml
pH 7,0

Depurinisierungslösung

HCl 0,25 N

2.6.3 Hybridisierung und Detektion

Hybridisierungen fanden in verschraubbaren Glasröhrchen (Schott, Mainz) von 16 cm Länge und 3,8 cm Durchmesser statt. Die Membran wurden mit der DNA-haltigen Seite nach innen in die Röhrchen geschoben. Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschungen erfolgten bei gleichmäßiger Temperatur und Rotation in einem Hybridisierungssofen (OV2, Biometra, Göttingen). Die trockene Membran wurden mit 2 x SSC/0,1% SDS (w/v) angefeuchtet und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 2 h mit Hybridisierungslösung ohne Sonde bei 68°C prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurde anschließend die Vorhybridisierungslösung durch ein Gemisch von Hybridisierungslösung (2,5 ml/100 cm² Membranfläche) und hitzedenaturierter Dig-DNA-Sonde (20-200 ng/ml) ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C über Nacht. Nach der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und konnte bis zu einem Jahr bei -20°C gelagert werden. Um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, wurde die Membran anschließend 2 x 5 min bei RT mit 2 x SSC/0,1% SDS (w/v), und danach 2 x 15 min bei 68°C mit 0,1 x SSC/0,1% SDS (w/v) gewaschen. Anschließend konnte die Membran direkt für die Detektion eingesetzt werden.

Hybridisierungslösung

Blocking-Stammlösung 20 ml
N-Lauroylsarkosin 2 ml
(10 % [w/v])
SDS (10 % [w/v]) 0,4 ml
20 x SSC-Puffer 50 ml
H₂O_{demin.} ad 200 ml

Blocking-Stammlösung

Blocking-Reagenz 10 g
DIG-Puffer 1 ad 100ml
Das Blocking-Reagenz wurde im Mikrowellenofen im Puffer gelöst, dann autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Die Detektion DIG-markierter DNA-Fragmente erfolgte mit dem 'DIG Luminescent Detection Kit' (Boehringer Mannheim). Dabei wird das Digoxigenin durch Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Fragmente, die eine alkalische Phosphatase tragen, nachgewiesen. Bei Zugabe von CSPD[□] wird dieses durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Die dabei emittierte Chemilumineszenz (λ = 477 nm) kann auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden. Die Detektion erfolgte unter leichtem Schwenken bei RT. Die Volumenangaben beziehen sich auf 100cm² Membranfläche. Zunächst wurde die Membran 2 min mit 100 ml Waschpuffer gespült, bevor sie 30 min in 100 ml DIG-Puffer 2 inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran für 30 min in frisch angesetzter Antikörper-Konjugat-Lösung (4 µl Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Fragment + 40 ml DIG-Puffer 2) inkubiert. Nach 2 x 15minütigem Waschen in 100 ml Waschpuffer erfolgte die Äquilibration der Membran für 2 min in 20 ml DIG-Puffer 3. Anschließend konnte die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und 5 min mit dem chemilumineszenten Substrat (100 µl CSPD[□] + 10 ml DIG-Puffer 3) inkubiert werden. Nachdem das Substrat aus der Plastikhülle entfernt worden war, mußte die Membran 15 min in einer Expositionskassette (Intas, Göttingen) bei 37°C inkubiert werden. Zur Detektion der emittierten Lumineszenz wurde auf die Folie für 45 min (evtl. über Nacht) ein Röntgenfilm exponiert. Der Röntgenfilm wurde anschließend ca. 1 min in Kodak LX24-Lösung entwickelt, kurz gewässert, in Kodak AL4-Lösung fixiert und nach erneuter Wässerung bei RT getrocknet.

Waschpuffer

Tween 20	1,5 ml
DIG-Puffer 1	ad 500 ml

DIG-Puffer 1

Maleinsäure	11,6g
NaCl	8,8 g
NaOH	7,0 g
H ₂ O _{demin.}	ad 1000 ml
pH 7,5	

DIG-Puffer 2

Blocking-Stammlösung	20 ml
DIG-Puffer 1	ad 200 ml
Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.	

DIG-Puffer 3

Tris	12,1g
NaCl	5,8 g
H ₂ O _{demin.}	ad 1000 ml
pH 9,5	

2.7 Transfer von DNA in *E.coli* und *Acinetobacter* sp.

2.7.1 DNA-Übertragung durch Konjugation ('spot mating')

Um Derivate des Plasmids pRK415 oder pBK von *E. coli* DH5a auf *Acinetobacter* sp. zu übertragen, wurde die Fähigkeit beider Organismen zur Konjugation genutzt (JUNI 1978), wobei hierfür das Helferplasmid pRK2013 erforderlich war. Donor, Rezipient und der *E. coli*-Stamm, der das Plasmid pRK2013 trägt, wurden getrennt in 5 ml LB-Medium über Nacht unter Selektionsdruck angezogen und am nächsten Morgen abzentrifugiert (RT, 10 min, 3000 Upm, Heraeus Christ-Zentrifuge). Um Antibiotikareste vollständig zu entfernen, wurde das Pellet einmal mit LM-Medium gewaschen und anschließend in 4 ml LB-Medium aufgenommen. Für die Konjugation konnten nun Donor, Helferstamm und Rezipient im Verhältnis 1:1:7 zusammengeführt und von diesem Konjugationsgemisch 200 µl auf einen Membranfilter (BA85, Schleicher und Schuell, Dassel) pipettiert werden, der zuvor auf eine LB-Platte gelegt wurde. Als Kontrolle (Nachweis auf Spontanmutationen) wurden die jeweils eingesetzten Kulturvolumina des Rezipienten und Donor getrennt auf LB-Platten mit Membranfiltern pipettiert. Konjugationsansatz und Kontrolle wurden nun 1 bis 2 Tage bei 30°C inkubiert, die bewachsenen Membranfilter daraufhin in 2 ml-Reaktionsgefäße mit jeweils 1,5 ml Mineralmedium überführt und durch kräftiges Schütteln resuspendiert. Zur Selektion der Transkonjuganten wurden 5-50 µl des Konjugationsansatzes und der Kontrollen auf entsprechendem Selektivagar ausplattiert. Als Selektionsdruck mußten dabei solche Bedingungen gewählt werden, die nur die Transkonjuganten, nicht aber Rezipient und Donor wachsen ließen. Für die Selektion bezüglich *Acinetobacter* erfolgte die Ausplattierung auf Succinat-Mineralmedium-Agar, worauf *Acinetobacter* schnelles, *E. coli* sehr langsames Wachstum zeigte. Die Ansätze wurden 1 bis 2 Tage bei 30°C inkubiert.

2.7.2 DNA-Übertragung durch Transformation

2.7.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (INOUE *et al.* 1990)

E. coli-Zellen wurden bei 18°C in 250 ml SOB-Medium (2.2.1.2) in einem Schüttelwasserbad (Gyrotory, Water Bath Shaker, Modell G76, New Brunswick Scientific, Edison, N.Y., USA) angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 mußte die Kultur für 10 min auf Eis gestellt und anschließend abzentrifugiert werden (4°C, 10 min, 5500 Upm, Sorvall Rotor GSA). Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB vorsichtig resuspendiert und für weitere 10 min auf Eis gestellt. Nach erneutem Zentrifugieren (4°C, 10 min, 5500 Upm,

Sorvall Rotor GSA) wurde das Pellet in 20 ml TB aufgenommen und unter langsamem Schwenken 1,5 ml DMSO zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 10 min auf Eis gestellt und anschließend in 200 µl Fraktionen in gekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße portioniert. Anschließend erfolgte eine Schockgefrierung der Zellen in flüssigem Stickstoff und die Lagerung bis zur Verwendung bei -70°C . Die Zellen blieben mehrere Monate lang kompetent.

Transformationspuffer (TB)

Pipes	10 mM
MnCl ₂ (getrennt autoklaviert)	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
pH 6,7	

2.7.2.2 Transformation von *E. coli* und Blau-Weiß-Selektion

Kompetente *E. coli*-Zellen (2.9.2.1) wurden auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit einem DNA-Ligationsansatz gemischt und 30 min erschütterungsfrei auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 45 s auf 42°C erhitzt und 0,6 ml LB-Medium (2.2.1.2) zugegeben. Nach 60 min Inkubation bei 37°C unter leichtem Schütteln wurden die Zellen auf Selektivagar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Transformanten konnten anhand der plasmidkodierte Antibiotikaresistenzen selektioniert werden. Klone mit rekombinanten Plasmiden ließen sich mittels des 'Blau-Weiß-Tests' erkennen. Der Test beruht darauf, daß der *E. coli*-Stamm DH5 α eine aminoternale Deletion im β -Galaktosidasegen besitzt (*lacZ* Δ M15). Nach der Induktion durch IPTG wird diese verkürzte, enzymatisch inaktive β -Galaktosidase gebildet. Klonierungsvektoren wie pUC18, pBIISK und pRK415 besitzen strangabwärts ihrer multiplen Klonierungsstelle das *lacZ'*-Gen, welches für die ersten 146 Aminosäuren der β -Galaktosidase kodiert, das sogenannte β -Peptid. Dieses kann *in vivo* mit der verkürzten β -Galaktosidase zum aktiven Enzym assoziieren (β -Komplementation) und eine intakte β -Galaktosidase bilden, die nach Induktion mit IPTG das Substratanalogon x-Gal zum blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo hydrolysiert. Klone, die nur den Vektor ohne Insert tragen, zeigen in Gegenwart von IPTG und x-Gal eine blaue Koloniefärbung. Dagegen bilden Klone, deren Vektor in der multiplen Klonierungsstelle ein DNA-Insert tragen und somit den Leserahmen des *lacZ'*-Gens unterbrechen, keine intakte β -Galaktosidase und sind folglich durch eine weiße Koloniefärbung zu erkennen. Dabei ist zu beachten, daß klonierte Inserts, die den Leserahmen nicht verschieben und kein Stop-Codon tragen, blaue Kolonien ergeben können.

Für den 'Blau-Weiß-Test' wurden die Transformanten auf Selektivagar ausplattiert, der zuvor mit 80 µl 2% (w/v in Dimethylformamid) x-Gal und 20 µl 0,1 M IPTG beschichtet wurde. Nach ein- bis zweitägiger Inkubation bei 37°C konnten weiße Kolonien gepickt und nach einer analytischen Plasmidisolierung (2.3.1) das klonierte DNA-Fragment nachgewiesen werden.

2.7.2.3 Transformation von *Acinetobacter* sp.

Alle Transformationstests mit *Acinetobacter* sp. erfolgten grundsätzlich mit der *pobA*-Mutante *Acinetobacter* sp. ADP239. Dieser Stamm geht direkt aus dem Stamm BD413 hervor und ist durch eine Mutation im *pobA*-Gen gekennzeichnet, wodurch er nicht mehr in der Lage ist, *p*-Hydroxybenzoat als Kohlenstoffquelle über den \square -Ketoacidweg zu metabolisieren. Wachstum auf *p*-Hydroxybenzoat-haltigem Medium kann folglich nur erfolgen, wenn ADP239 das *pobA*-Wildtypallel über natürliche Transformation aufnehmen und integrieren kann.

Die Überprüfung der Transformationsfähigkeit von *Acinetobacter* sp. erfolgte durch Inkubation der Zellen mit chromosomaler Wildtyp-DNA und anschließendem Wachstumsnachweis auf *p*-Hydroxybenzoat. Zur Induktion der natürlichen Kompetenz wurden 1,5 ml einer ausgewachsenen Succinat-Übernachtskultur geerntet (RT, 14000 U_{pm}, 30 s, Eppendorf Centrifuge 5417R), in 3 ml frisches Succinat-Mineralmedium resuspendiert und bei 30°C schüttelnd für 15 min inkubiert. 100 µl Kultur wurden daraufhin mit 0,1 µg DNA versetzt, 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend auf *p*-Hydroxybenzoat-haltigem Mineralagar in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert. Die Inkubation der Ansätze erfolgte für 1-2 Tage bei 30°C.

Beim Transformationsschnelltest wird die Mutation des Stammes ADP239 (und dessen Abkömmlinge) im *pobA*-Gen genutzt, welches für die *p*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase codiert. Der Defekt in dem Gen führte dazu, daß *p*-Hydroxybenzoat nicht als Kohlenstoff-Quelle genutzt werden kann. Über die natürliche Transformation besteht die Möglichkeit für das Bakterium ein intaktes *pobA*-Gen ins eigene Genom zu integrieren und somit die Fähigkeit auf *p*-Hydroxybenzoat zu wachsen wiederzuerlangen. Beim Transformationstest wurde die Impföse mit Zellsuspension auf einer *p*-Hydroxybenzoat-Agarplatte durch einen Tropfen chromosomaler DNA des Stammes BD413 gezogen, welche ein intaktes *pobA*-Gen trug. Bei der Fähigkeit zur natürlichen Transformation kann das defekte *pobA*-Gen durch das intakte Gen ersetzt werden, was zum Wachstum auf der aromatischen Verbindung führt. Für diesen schnellen, einfachen Transformationsnachweis wurde *p*-Hydroxybenzoat-haltiger Mineralagar an gekennzeichneten Stellen mit 0,1 µg Wildtyp-DNA beschichtet und der zu testende *Acinetobacter*-Stamm darauf ausgestrichen (VOSMAN et al. 1991). Das Wachstum konnte nach 24-stündiger Inkubation bei 30°C überprüft werden.

Zur Herstellung von Mutanten von *Acinetobacter* sp. durch Insertion eines Resistenzmarkers ins Chromosom wurde eine 1,5 ml-Kultur auf Succinat-Mineralmedium über Nacht angezogen, zentrifugiert (RT, 14000 Upm, 30 s, Eppendorf Centrifuge 5417R), anschließend in 3 ml frisches Succinat-Mineralmedium resuspendiert und 15 min schüttelnd kultiviert. Nach Zugabe von sättigenden Mengen an Marker-DNA zu 0,2 ml Kultur wurden die Zellen 1 h ruhend inkubiert und anschließend auf LB-Selektivmedium ausplattiert.

2.8 Standardtechniken für das Arbeiten mit Proteinen

2.8.1 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976; modifiziert)

Diese Proteinbestimmung beruht auf einer Verschiebung des Extinktionsmaximums des Coomassie-Farbstoffes von 465 nm auf 584 nm aufgrund hydrophober und ionischer Wechselwirkungen mit Proteinen in saurer Lösung. Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden die Proben auf ein Volumen von 100 µl gebracht, mit 1 ml BRADFORD-Reagenz versetzt und nach 5 min die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Als Referenz diente eine mit Rinderserumalbumin (BSA) aufgenommene Eichgerade von 1 bis 25 µg Protein. Höhere Proteinkonzentrationen können mit dieser Methode nicht genau quantifiziert werden.

BRADFORD-Reagenz

Serva Blau G-250	70 mg
Ethanol (96 %, v/v)	50 ml
Phosphorsäure (85 %, v/v)	100 ml
H ₂ O _{dest.}	850 ml

2.8.2 Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970; modifiziert)

Mit Hilfe des Detergenz SDS (Natrium-Dodecylsulfat) werden Quartär- und Tertiärstrukturen von Proteinen zerstört und diesen entsprechend ihrer Peptidkettenlänge eine äquivalente negative Ladung angelagert. Diese negative Ladung ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer molekularen Masse im Polyacrylamidgel. β-Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken, so daß intra- oder interpeptidische Verknüpfungen gelöst werden, um die bestmögliche Entfaltung zu gewährleisten.

Für die Gelelektrophorese wurde eine Minigel-Elektrophoresekammer (Biometra, Göttingen) mit 10 cm x 10 cm x 0,1 cm-Glasplatten verwendet. Um einen optimalen Trennbereich von 10 – 50 kDa zu erzielen, wurden 15 %ige Polyacrylamidgele, für eine Auftrennung von Proteinen mit 50 – 100 kDa 8%ige Gele hergestellt. Die Trenn- und Sammelgellösung konnten auf Vorrat hergestellt und bei 4°C lichtgeschützt für ca. 4 Monate gelagert werden (Tab. 2.6). Zunächst wurde das Trenngel gegossen und vorsichtig mit H₂O_{dest.} überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und anschließend der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisation konnte der Kamm aus dem Sammelgel gezogen werden.

Die Proben, die eine Proteinmenge von maximal 10 mg aufwiesen, wurden mit 0,2 Volumen SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend in die Geltaschen aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte zwischen 20 und 30 mA.

Die Lösungen wurden filtriert und lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Für ein Minigel wurde zur Polymerisation von 9 ml Trenngel und 2,5 ml Sammelgel 100 µl bzw. 40 µl einer wäßrigen 10 %igen (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung und 40 µl bzw. 10 µl TEMED hinzugegeben.

Tab. 2.6: Trenn- und Sammelgellösungen

	Trenngel (15% / 8%)	Sammelgel (4%)
H ₂ O _{dest.}	2,5 ml / 6,7 ml	3,0 ml
4 x Trenngelpuffer	3,75 ml	-
4 x Sammelgelpuffer	-	1,2 ml
Glycerin	1,6 ml	-
Acrylamid M-BIS 30% Stammlösung 19/1	9,0 ml / 4,8 ml	0,8 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	100 µl	60 µl
TEMED	25 µl	10 µl

4 x Trenngelpuffer

Tris-HCl 1,5 M
SDS 0,4% (w/v)
pH 8,8

4 x Sammelgelpuffer

Tris-HCl 0,5 M
SDS 0,4% (w/v)
pH 6,8

SDS-Probenpuffer

4 x Sammelgelpuffer	25 ml
SDS (10%)	40 ml
β-Mercaptoethanol	10 ml
Glycerin	20 ml
Bromphenolblau (0,2 % in Methanol)	1 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

10 x SDS-Laufpuffer

Tris	30 g
SDS	10 g (w/v)
Glycin	144 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000ml

2.8.3 Native Gradienten-PAGE (SCHÄGGER & VON JAGOW, 1991; modifiziert)

Bei der Elektrophorese im nativen Gradientengel wandern Proteine so lange in Richtung Anode, bis die abnehmende Porengröße die weitere Passage verhindert. Voraussetzungen für diese gerichtete Mobilität sind zum einen die negative Nettoladung und zum anderen die freie Beweglichkeit der Proteine; denn gerade Membranproteine tendieren zur Aggregation. Um einer möglichen artifiziellen Zusammenlagerung bereits solubilisierter Membranproteine entgegenzuwirken, wurden den Acrylamidlösungen Detergenzien oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration zugesetzt. Da positiv geladene Proteine nicht ins Gel einwandern, wurde der Proteinfarbstoff Coomassie eingesetzt, der selbst eine negative Ladung besitzt, an die meisten Proteine bindet und somit eine negative Nettoladung verleiht. Die Probe wurde farblos ohne Bromphenolblau oder Coomassie, mit Saccharose (> 6%) beschwert, aufgetragen, so daß die Geltasche weitere 15 µl einer zweiten Lösung zur Übersichtung der Probe aufnehmen konnte. Diese zweite Lösung bestand nun aus einer tiefblauen (ca. 0,01% [w/v]) Coomassielösung (in Kathodenpuffer mit 5% (w/v) Saccharose). Während der Elektrophorese gelangt der Farbstoff in die Probe, bindet und beschleunigt die Wanderung der Proteine, was zu einer scharfen Bandierung führte.

Um die Laufzeiten für native Gele möglichst kurz zu halten, wurde für die Elektrophorese ausschließlich eine Minigel-Kammer (Trenngröße 10 x 10 x 0,1 cm) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte 12-20 h bei einer Spannung von 100 V bei 4°C. Es wurden folgende Lösungen angesetzt:

‘Leichte Lösung’ (4 %, w/v)

Acrylamid	4 g
Bisacrylamid	0,2 g
Bis-Tris	50 mM
6-Aminocaprinsäure	10 mM
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

‘Schwere Lösung’ (20 %, w/v)

Acrylamid	20 g
Bisacrylamid	1 g
Bis-Tris	50 mM
6-Aminocaprinsäure	10 mM
Glycerin	20 ml

Der pH-Wert der Acrylamidlösungen wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt, die Lösungen filtriert und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Kathodenpuffer

Bis-Tris	15 mM
Tricin	50 mM

Der pH-Wert lag bei 7-7,5 (nicht titriert).

Anodenpuffer

Tris-HCl	0,2 M
pH	8,0

Für ein Gradientengel von 4–20% wurden je 3,4 ml ‘Leichte’ und ‘Schwere’ Lösung in die Kammern eines kleinen Gradientenmischers gefüllt. Um die homogene Schichtung des Gradienten später beurteilen zu können, wurde nur der ‘Leichten Lösung’ 40 µl Coomassie aus einer 5%igen wäßrigen Stammlösung zugesetzt. Nach Zugabe von 14 µl einer 10%igen (w/v) APS-Lösung und 4 µl TEMED in jede Kammer wurde der Gradientenmischer geöffnet, die Acrylamidlösung mittels einer Peristaltikpumpe (Merodos GS, Fa. Merodos, Nörten-Hadenberg) in die vorbereitete Gelkammer gepumpt und danach das Gel vorsichtig mit H₂O_{dest.} überschichtet. Nach der Polymerisation konnte das Wasser entfernt und das Sammelgel gegossen werden. Hierzu wurde die ‘Leichte Lösung’ mit Gelpuffer (50 mM Bis-Tris-HCl, 10 mM 6-Aminocaprinsäure, pH 7,5) 10%ig verdünnt (z.B. 9 ml ‘Leichte Lösung’ und 1 ml Gelpuffer), mit 70 µl APS-Lösung und 15 µl TEMED versetzt, auf das Gradientengel gegossen und mit einem Kamm versehen.

2.8.4 Zweidimensionale Auftrennung der Proteine

Die mittels der nativen PAGE aufgetrennten Proteinkomplexe (2.8.3) ließen sich anschließend in einer SDS-PAGE in die jeweiligen Untereinheiten zerlegen. Zunächst wurde wie unter 2.8.2 beschrieben das SDS-Trenngel gegossen, daraufhin ein 5-10 mm breites Sammelgel aufgeschichtet, wobei zum oberen Glasrand eine ca. 8 mm breite Aussparung freizulassen war. Auch hier diente H₂O_{dest.} der Überschichtung des Sammelgels, um eine

ebene Gelkante zu erhalten. Aus dem nativen Gel wurde der mittlere Bereich der gewünschten Spur herausgeschnitten und zwischen die beiden Glasplatten des hergestellten SDS-Gels geschoben. Dabei durften keine Luftblasen oder Wassereinschlüsse zwischen dem Sammelgel und dem nativen Gelstreifen verbleiben. Da die Länge des nativen Gelstreifens geringer war als die Breite des SDS-Gels, wurden die beiderseits entstandenen Freiräume mit erwärmter Agarose [1,5%ig in Kathodenpuffer (2.8.3)] aufgefüllt und erkalten lassen. Mit Hilfe einer Kanüle konnte in die erstarrte Agarose eine Aussparung gestochen werden, in die nach dem Befüllen der Gelkammer mit Laufpuffer der SDS-Größenstandard aufgetragen werden konnte. Kurz vor dem Start der PAGE erfolgte eine 1-2 mm breite Überschichtung des Gels mit einer Denaturierungslösung, die aus 10x SDS-Laufpuffer - versetzt mit 20% (w/v) Saccharose - bestand. Die Denaturierung der Proteine im nativen Gelstreifen erfolgte zunächst bei einer langsamen Elektrophorese bei 3 mA und mit dem Eintritt in das Sammelgel bei 20-30 mA. Aufgrund der geringen Proteinmenge, die in der 2. Dimension aufgetrennt wurde, erfolgte die Färbung des Gels mittels Silbernitrat (2.8.7)

2.8.5 Größenbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteingrößen erfolgte nach Auftrennung im Polyacrylamidgel (2.8.2, 2.8.3) anhand der Laufstrecken eines internen Standards. Als Größenstandard für die SDS-PAGE diente eine 10 kDa-Leiter im Bereich von 10-120 kDa (Gibco BRL). Als Molekulargewichtsstandard für die native PAGE wurde der `HMW Calibration Kit` (Fa. Pharmacia, Freiburg) verwendet, der den Größenbereich von 67 kDa bis 660 kDa abdeckte.

2.8.6 Färbung von Proteinen mit Coomassie (WEBER & OSBORN, 1969)

Nach einer nativen oder SDS-Gelelektrophorese (2.8.2, 2.8.3) konnten die aufgetrennten Proteine mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt und sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Polyacrylamidgel für 30 min in Färbelösung gelegt und auf einer Wippe langsam geschwenkt. Die Entfärbung des Gels erfolgte anschließend in Entfärberlösung. Die Proteine behielten während des Entfärbens ihre blaue Färbung bei, während der Hintergrund aufklarte.

Färbelösung

Serva Blau G-250	0,6 g
Serva Blau R-250	0,6 g
Methanol	500 ml
Eisessig	70 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Entfärber

Methanol	330 ml
Eisessig	100 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

2.8.7 Silber-Färbung (BLUM *et al.* 1987; modifiziert)

Zur Färbung eines Polyacrylamidgels mit Silbernitrat wurden folgende Lösungen benötigt:

Fixierlösung

Methanol	50 ml
Eisessig	12 ml
Formaldehyd (37 %ig, v/v)	0,1 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

auf Vorrat anzusetzen und bei 4°C zu lagern; Formaldehyd wurde erst unmittelbar vor dem Gebrauch zugesetzt.

Thiosulfatlösung

Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0,2 g
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

Die Lösung wurde frisch angesetzt.

Imprägnierlösung

AgNO ₃	0,2 g
Formaldehyd (37 %, v/v)	0,1 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

Die Lösung wurde frisch angesetzt.

Entwicklerlösung

Na ₂ CO ₃	3,5 g
Thiosulfatlösung (s.o.)	2 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml
Formaldehyd (37 %, v/v)	0,1 ml

Die Lösung wurde frisch angesetzt.

Stopplösung

EDTA	1,86g
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

Die Lösung wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7-8 titriert und konnte mehrere Wochen gelagert werden.

Die Gele wurden unter leichtem Schwenken auf einer Wippe folgendermaßen behandelt:

- 1-24 h fixieren
- dreimal 20 min in 50 % (v/v) Ethanol waschen
- 1 min in Thiosulfatlösung inkubieren
- dreimal 20 s in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ waschen
- 20 min imprägnieren
- zweimal kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ waschen
- entwickeln, bis die Banden deutlich sichtbar sind
- kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ waschen
- mindestens 10 min in der Stopplösung schwenkend inkubieren

Zur Aufbewahrung wurden die Gele zweimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ gewaschen, kurz in 1 M Eisessig geschwenkt, in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

2.8.8 Konzentrierung von Proteinen

Um Proteinlösungen zu konzentrieren, wurden Centriprep-Einweg-Konzentrator-Röhrchen (Amicon GmbH/ Millipore GmbH, Eschborn) mit den Ausschlußgrößen 10 kDa, 30 kDa bzw. 50 kDa verwendet. Dabei konnten Proteinlösungen von maximal 15 ml auf 1 ml eingengt werden. Volumina bis maximal 2 ml wurden mit Centrisart I (Sartorius AG, Göttingen) mit einer Ausschlußgrenze von 20 kDa auf ein Volumen von minimal 200 μl eingengt. Die Zentrifugationen erfolgten dabei in einer Sigma 3 k-1 Zentrifuge im 'Swing out-Rotor'.

2.8.9 Dialyse von Proteinlösungen

Vor dem Gebrauch wurden die Dialyseschläuche (Visiking, Fa. Serva, Heidelberg) in den folgenden Lösungen für jeweils ca. 5 min gekocht:

- 3 % (w/v) Na_2CO_3
- $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
- 2 mM Na_2 -EDTA
- $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

Die Schläuche wurden anschließend in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ bei 4°C gelagert.

Die Proteinlösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in die vorbereiteten Schläuche gefüllt und 48 h gegen das 200 bis 1000fache Volumen bei mehrfachem Pufferwechsel bei 4°C dialysiert.

2.9 WESTERN-Blotting

2.9.1 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen denaturierender Polyacrylamidgele

Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE (2.8.2) wurde für weitere immunologische Analysen Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Übertragung erfolgte elektrophoretisch nach dem 'Semi-Dry'-Verfahren unter Verwendung einer 'Blotting'-Kammer (Nova Blot, Pharmacia LKB, Freiburg). Das für den Transfer benötigte Whatmanpapier und die Nitrocellulosemembran (Sartorius AG, Göttingen) wurden auf Gelgröße zugeschnitten und mit dem SDS-Gel in Transferpuffer gelegt. Auf die Anodenplatte wurden in folgender Reihenfolge 3 Lagen Whatmanpapier, die Nitrocellulosemembran, das Gel und wiederum 3 Lagen Whatmanpapier jeweils unter Vermeidung von Luftblasen aufgelegt und überschüssiger Transferpuffer mit saugfähigem Papier entfernt. Abschließend konnte die Kathodenplatte aufgelegt und leicht beschwert werden. Die Proteine wurden bei konstanter Spannung und beginnend mit 5 mA/cm² Membranfläche solange übertragen, bis die Stromstärke auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes abgesunken war. Die auf die Membran transferierten Proteine konnten mit Ponceau-Rot angefärbt und der Größenstandard mit Bleistift markiert werden. Alternativ konnte derjenige Bereich von der Membran, der den geblotteten Größenstandard enthielt, abgeschnitten und separat mit Coomassie gefärbt werden, wie es für die Färbung der Gele beschrieben wurde (2.6.8). Nach dem Blotten konnte das Gel zur Kontrolle mit Coomassie gefärbt werden (2.6.8).

Transferpuffer

Tris	15,1 g
Glycin	14,4 g
Methanol	200 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
pH 8,6; nicht titriert,	
Lagerung bei 4°C	

Ponceau-Rot-Lösung

Essigsäure (96 %, v/v)	30% (v/v)
Ponceau S	0,2% (w/v)
Die Lösung wurde mit H ₂ O _{dest.} hergestellt	

2.9.2 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen nativer Polyacrylamid-Gradienten-Gele auf Nitrocellulosemembranen

Beim Blotten von nativen Gradientengelen ist der Transfer auf die Nitrocellulosemembran erschwert, weil sich die Proteine im Gel in einem Vernetzungsgrad des Acrylamids befinden, in dem nur noch eine sehr langsame Wanderung im elektrischen Feld stattfinden kann. Deshalb muß, verglichen mit homogenen Gelen, die Transferzeit entsprechend erhöht und für einen quantitativen Transfer das Protein mit SDS denaturiert werden.

Der Transfer erfolgte in einem 'Semi-Dry'-Verfahren unter Verwendung einer 'Blotting'-Kammer (Nova Blot, Pharmacia LKB, Freiburg), wie es bereits unter 2.9.1 für das Blotten von SDS-Gelen beschrieben worden war. Beim WESTERN Blot nativer Gele wurden zunächst denaturierende Bedingungen eingestellt, indem die für den Transfer benötigten Whatmanlagen der Kathodenseite mit SDS-Laufpuffer getränkt wurden. Die Whatmanlagen der Anodenseite und die Nitrocellulosemembran wurden mit Transferpuffer getränkt (2.9.1). Nach dem Anlegen der Spannung drang das negativ geladene Detergenz SDS in das native Gel ein, so daß die Proteine denaturieren und bereits teilweise auf die Nitrocellulosemembran gelangten. In einem zweiten Schritt erfolgte der Austausch der Whatmanlagen gegen in Transferpuffer (2.9.1) getränkte Lagen, wobei das Gel auf der Nitrocellulosemembran nicht verschoben werden durfte. Die angelegte Spannung transferierte die im Gel verbliebenen Proteine unter Entfernung überschüssigen SDS auf die Membran.

Die auf die Membran transferierten Proteine konnten mit Ponceau-Rot (2.9.1) sichtbar gemacht werden oder Banden des Größenstandard mit Coomassie angefärbt werden; das Gel wurde zur Kontrolle mit Coomassie gefärbt (2.8.6).

2.10 Überexpression und Anreicherung von Fusionsproteinen

2.10.1 Überexpression von MalE-Fusionsproteinen

Die Überexpression vom C-Terminus des ComA und von ComEA erfolgte als Fusionsprotein mit dem Maltosebindeprotein (MBP). Als Überexpressionsvektor diente dabei pMAL-c2 (Tab.2.2). *comEA* sowie das verkürzte *comA*-Konstrukt wurden dafür im Leserahmen an das 3'-Ende des *malE*-Gens kloniert, welches unter der Kontrolle eines P_{tac} -Promoters steht. Der P_{tac} -Promotor ist in der Abwesenheit des Induktors IPTG durch den lac_I -Repressor blockiert. Zugabe von IPTG induziert die Expression des Fusionsproteins.

Als Wirtsorganismus diente *E. coli* DH5 α , dessen eigene RNA-Polymerase am P_{tac}-Promotor bindet und die Transkription durchführt.

Die Anzucht des rekombinanten *E. coli* DH5 α erfolgte für das ComA-Fusionsprotein in 250 ml LB-Medium und für die ComEA-Fusion in 9 l LB-Medium bei 37°C (2.2.1.2). Bei einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 erfolgte die Induktion mit 0,1 mM IPTG. Danach wurden die Zellen für zwei Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (4°C, 10 min, 7000 Upm, Sorvall Rotor GSA) geerntet. Das Zellpellet wurde einmal mit 20 mM Tris-HCl gewaschen und in 15 bzw. 300 ml Säulenpuffer aufgenommen. Der Zellausbruch erfolgte eisgekühlt drei Minuten durch Ultraschall (UP 200s Ultraschallprozessor, Dr. Hielscher GmbH) mit 30% Amplitude in 0,5 Zyklen. Der Zellaufbruch wurde mikroskopisch überprüft und die Zelltrümmer anschließend durch Zentrifugation (4°C, 10 min, 7000 Upm, Sorvall Rotor SS34, GSA) vom löslichen Überstand getrennt. Mittels SDS-PAGE (2.8.2) wurde überprüft, ob sich das Fusionsprotein im löslichen Überstand oder in den Zelltrümmern befand.

Säulenpuffer

Tris-HCl (1 M, pH 7,5)	20 ml
NaCl	11,7g
EDTA (0,25 M)	4 ml
DTE (0,5 M)	3 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Der Puffer wurde filtriert und war vier Wochen haltbar.

2.10.2 Aufreinigung von Male-Fusionsproteinen über Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung des Male-Fusionsprotein basiert auf der hohen Bindungsaffinität des MBP zu Amylose-Säulenmaterial. Die Bindungskapazität liegt bei 3 mg MBP pro ml Säulenmaterial. Das Amylose-gebundene Male-Fusionsprotein kann durch geringe Mengen von Maltose von der Säule eluiert werden.

Das Amylosematerial wurde blasenfrei in eine 10 ml-Säule gefüllt und anschließend nacheinander mit 3 x Säulenvolumen H₂O_{demin.}, 3 x Säulenvolumen 0,1% SDS, 1 x Säulenvolumen H₂O_{demin.} und 3 x Säulenvolumen Säulenpuffer äquillibriert. Entsprechend der Bindungskapazität des Säulenmaterials wurde Proteinrohextrakt auf die Säule geladen. Nachdem der Rohextrakt in die Säule eingelaufen war, wurde die Säule mit 10-12 x Säulenvolumen Säulenpuffer gewaschen und anschließend das Male-Fusionsprotein mit 2 ml Säulenpuffer/10 mM Maltose eluiert. Das Eluat wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen und die Aufreinigung des Fusionsproteins mittels SDS-PAGE

(2.8.2) kontrolliert. Zur Regenerierung der Säule wurde diese mit 10 x Säulenvolumen Säulenpuffer äquilibriert und konnte somit drei- bis fünfmal verwendet werden. Die Lagerung der Säule erfolgte mit Säulenpuffer bei 4°C.

Die Bindung von MalE-Fusionsproteinen in großen Lysatvolumina wurde im `Batch-Verfahren` durchgeführt. Die in Säulenpuffer äquilibrierte Matrix wurde in einem Meßzylinder zum Zelllysat gegeben, geschwenkt und im Kühlschrank für ca. 1 h sedimentiert. Der Überstand konnte verworfen werden und die Amylose zweimal mit jeweils 100 ml Säulenpuffer gewaschen werden, indem diese resuspendiert und wiederum im Kühlschrank sedimentierte. Schließlich erfolgte die Elution mit 4 ml 10 mM Maltose. Der Überstand, welcher jetzt das freigesetzte Fusionsprotein enthielt, wurde in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und die restliche Matrix abzentrifugiert (4°C, 1 min, 14000 Upm, Biofuge 17 S).

2.10.3 Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen

Die Expression des rekombinanten pJC40-Derivats führte zu einem Hybridprotein, welches aus zehn abspaltbaren N-terminalen Histidinresten und dem gewünschten Protein bestand. Dieses Hybridprotein konnte über eine Ni²⁺-NTA-Säule aufgereinigt werden, wobei das Protein mittels seiner Histidinreste mit hoher Affinität für immobilisierte Nickel-Kationen an des Säulenmaterial gebunden wurden. Durch Imidazol konnten die Histidinreste von der Matrix verdrängt werden.

Die Bindung des 10 Histidinreste-tragenden Fusionsproteins an das Ni²⁺-NTA-Säulen-Material wurde wie folgt durchgeführt: Das Zell-Lysat wurde zusammen mit 1 ml 50%iger (v/v) Säulenmaterial-Suspension (Ni²⁺-NTA Agarose, Qiagen GmbH, Hilden) für 30 min gerührt, wobei die Bindekapazität der Ni²⁺-NTA-Agarose 5-10 mg/ml betrug. Nach der Inkubation wurde das Gemisch in eine leere 10 ml-Säule (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gefüllt. Die Säule mußte, nachdem sich die Matrix abgesetzt hatte, zweimal mit je 40 ml Wasch-Puffer 1 und zweimal mit je 30 ml Waschpuffer 2 gewaschen werden. Die Elution der an die Säulen-Matrix gebundenen Proteine erfolgte mit 4 ml Elutionspuffer. Die Aufreinigung des Hybridproteins wurde mittels SDS-PAGE überprüft (2.8.2). Dabei durften Imidazol-haltige Proben nicht auf 100°C erhitzt, sondern lediglich 10 min bei 37°C direkt vor dem Auftragen erwärmt werden.

<u>Waschpuffer 1</u>	Na-Phosphat-Puffer	50 mM
	NaCl	0,3 M
	pH 8,0	
<u>Waschpuffer 2</u>	Na-Posphat-Puffer	50 mM
	NaCl	0,3 M
	Glycerin (87%)	10% (v/v)
	Imidazol	20 mM
	pH 6,0	
<u>Elutionspuffer</u>	Imidazol	0,25 M
	Waschpuffer 2	ad 10 ml
	pH 6,0	

2.10.4 Denaturierung von Einschlußkörpern und Renaturierung der freigesetzten Proteine

Bildete *E. coli* bei der Überexpression der gewünschten Proteine Einschlußkörper, so befanden sich diese im Sediment zusammen mit den Zelltrümmern. Für eine Aufreinigung mußten die in Einschlußkörpern befindlichen aggregierten Proteine gelöst werden.

Für die Denaturierung der Einschlußkörper wurde das Sediment mit Harnstoff behandelt, so daß die Fusionsproteine denaturiert in Lösung gingen. Dazu wurde zunächst 250 ml induzierte *E. coli* Kultur geerntet, mittels Ultraschall aufgeschlossen und die Einschlußkörper zusammen mit den Zelltrümmern bei 7000 Upm (4°C, 10 min, Sorvall Rotor GSA) sedimentiert. Die Solubilisierung dieses Sediments erfolgte in 6 M Harnstoff, welcher zuvor in 100 ml Säulenpuffer gelöst worden war. Nichtgelöste Bestandteile wurden bei 14000 Upm (4°C, 10 min, Sorvall Rotor SS34) sedimentiert und der daraus resultierende Überstand gegen 4 l Säulenpuffer über Nacht bei 4°C dialysiert. Die nach der Dialyse ausgefallenen Proteine und Lipide mußten wiederum durch Zentrifugation entfernt werden (4°C, 10 min, 14000 Upm, Sorvall Rotor SS34). Die im Dialysat gelösten Maltosebindeproteine – fusioniert mit dem gewünschten Protein – konnten daraufhin an die Matrix gebunden werden.

2.10.5 Spaltung von Fusionsproteinen mit dem Faktor Xa

Die Spaltung des MalE-Fusionsproteins zur Trennung des Zielproteins vom MBP, erfolgte über eine dazwischenliegende Erkennungssequenz für den Proteasefaktor Xa. Dieser Faktor spaltet Peptide hinter der spezifischen Erkennungssequenz Ile-Glu-Gly-Arg.

Die Spaltungsreaktion wurde in maximal 50 μ l Säulenpuffer/10 mM Maltose bei RT über Nacht durchgeführt. Dabei spaltete 1 μ g Faktor Xa (New England Biolabs, Schwalbach) 50 μ g Fusionsprotein. Die erfolgreiche Spaltung wurde mittels SDS-PAGE (2.11.2) kontrolliert.

2.11 Immunologische Methode

2.11.1 Herstellung polyklonaler Antiseren

Zur Herstellung polyklonaler Antiseren mit Anti-ComP-Antikörper wurde ein Kaninchen mit aufgereinigtem MBP-ComP-Fusionsprotein immunisiert. Die erste Injektion erfolgte mit 200 μ g, die folgenden Injektionen mit jeweils 70 μ g Fusionsprotein. Pro Injektionen konnten maximal 500 μ l Antigenlösung mit 500 μ l Freund's Adjuvans injiziert werden. Injektion und Blutungen wurden von der Firma BioScience, Göttingen, nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<u>Injektionen:</u>	Tage 0, 21, 49 und 56
<u>Blutungen:</u>	0. Tag (Präimmunserum)
	35. Tag (2 ml + 15 ml Serum)
	53. Tag (2 ml + 20 ml Serum)
	65. Tag (mind. 50 ml Serum)

Die Seren wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.11.2 Immunodetektion von Proteinen mittels Chemilumineszenz

Der Nachweis der auf Nitrocellulosemembran transferierten Proteine mit spezifischen Antikörpern erfolgte mit Hilfe einer gekoppelten Peroxidase (Protein A HRP Konjugat; Boehringer, Mannheim). Diese Methode, die im allgemeinen mit einem vorangegangenen 'Western Blotting' auch als 'Immunoblotting' bezeichnet wird, basiert auf der spezifischen Bindung eines Antikörpers (primärer Antikörper) an das zu detektierende Protein. Der Fc-Teil des primären Antikörpers kann danach durch Protein A, welches eine Peroxidase trägt, erkannt und gebunden werden. Der Nachweis dieser Peroxidase kennzeichnet somit indirekt das zu detektierende Zielprotein. Die Nachweisreaktion erfolgt dadurch, daß die Peroxidase das Substrat Luminol (ein Diacylhydrazid) oxidiert, worauf das gebildete Zwischenprodukt Licht emittiert. Eine Intensivierung der Lichtemission bewirkt 4-Iodophenol, welches als

Radikaltransmitter zwischen dem gebildeten Sauerstoffradikal und Luminol wirkt. Das Licht kann auf einem Röntgenfilm festgehalten werden.

Nach dem WESTERN-Blot (2.9) wurde die Nitrocellulosemembran unter Schwenken zunächst für 1 h bei RT mit 'Blocking-Reagenz' [1 ml auf 9 ml PBST; BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) Kit] behandelt, um unspezifische Bindungen der Antikörper oder des Protein A mit der Membran zu verhindern. Die Bindung der Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur für mindestens 2 h oder über Nacht bei 4°C, wobei das Antiserum 1:10000 bis 1:20000 mit PBST zu verdünnen war. Nach drei 15minütigen Waschschritten mit PBST konnte das Protein A HPR Konjugat (Boehringer, Mannheim) in 10000facher Verdünnung in PBST für 1-2 h hinzugegeben werden. Schließlich folgten drei 15minütige Waschschrritte mit PBST, bevor die Membran in Frischhaltefolie an 3 Seiten eingeschweißt wurde und 1 ml Lösung A und 10 µl Lösung B durch die offene Seite hinzupipettiert werden konnte (POD-Kit). Nach 2 min Inkubation wurde die Detektionslösung herausgestrichen und in der Dunkelkammer für 1-10 min ein Röntgenfilm (Kodak, Stuttgart) aufgelegt. Anschließend mußte der Film für ca. 2 min in Kodak LX24-Lösung entwickelt, kurz gewässert und in Kodak AL4-Lösung 2 min fixiert werden. Nach dem Abspülen der Fixierlösung mit Wasser konnte der Film bei Raumtemperatur getrocknet werden.

PBST

NaCl	8,2 g
KCl	0,75 g
Na ₂ HPO ₄	2,29 g
KH ₂ PO ₄	0,27 g
Tween 20	0,5 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

PBS

PBST ohne Tween 20

2.12 Enzymaktivitätstests

2.12.1 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde photometrisch durch die Umsetzung von *o*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) zu *o*-Nitrophenol ermittelt. Die dabei auftretende zeitabhängige Gelbfärbung wurde bei 420 nm gemessen. Jeder Meßansatz enthielt 100 µl Zellkultur-Probe (evtl. verdünnt oder konzentriert) und 900 µl Z-Puffer. Der Zellaufschluß erfolgte durch Zugabe von 5 µl 0,1% SDS und 10 µl Chloroform. Nach

kräftigem Schütteln wurden die Ansätze 5 min bei 28°C inkubiert und anschließend die Umsetzungsreaktion durch Zugabe von 200 ml ONPG (4 mg/ml Phosphat-Puffer) gestartet. Beim Auftreten einer Gelbfärbung wurde der Ansatz mit 0,5 ml 1 M Na₂CO₃ abgestoppt, die Zelltrümmer abzentrifugiert (RT, 30 s, 15000 Upm, Biofuge 17 RS) und anschließend die OD bei 420 nm gemessen. Die ONPG-Umsatzrate wurde nach MILLER (1972) durch folgende Formel berechnet:

$$\frac{1000 \cdot \Delta OD_{420}}{OD_{600} \cdot \Delta t \cdot 0,1} = U/OD_{600} \quad \begin{array}{l} U = \text{Units} \\ t = \text{Zeit [min]} \end{array}$$

Z-Puffer

Phosphat-Puffer	100 ml
KCl	75 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	25 mg
β-Mercaptoethanol	270 μl

Phosphat-Puffer

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	21,5g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	5,5 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
pH	7,2

2.12.2 Bestimmung der NADH-Dehydrogenase-Aktivität

Die NADH+H⁺-oxidierende Aktivität von gewaschenen, fraktionierten Membranen aus *Acinetobacter* sp. BD413 wurde photometrisch bestimmt, indem die Abnahme der gelben Färbung des Elektronenakzeptors Ferricyanid bestimmt wurde. Bei einer Wellenlänge von 420 nm beträgt der Extinktionskoeffizient (ε) des Ferricyanids 1,0 mM⁻¹ cm⁻¹. Der Enzymtest wurde unter aeroben Bedingungen in einem Volumen von 1 ml durchgeführt und enthielt folgende Komponenten.

965 μl	50 mM Tris-HCl
5 μl	50 mM NADH (Endkonzentration 0,25 mM)
25 μl	20 mM Kalium-Ferricyanid (Endkonzentration 0,5 mM)

Start:

5 μg Membran (μg bezieht sich auf die Proteinmenge der Membranen)

Die spezifische Enzymaktivität wurde aus dem linearen Bereich der Kinetik und der Proteinkonzentration nach folgender Beziehung berechnet:

$$\frac{\Delta OD_{420} (\text{min}^{-1}) \cdot V}{\Delta \cdot d \cdot v \cdot c} = \text{spezifische Aktivität} \quad \begin{array}{l} (\text{U/mg Protein}) \\ = (\mu\text{mol/min mg Protein}) \end{array}$$

U	: Unit*
$\Delta OD_{420}/\text{min}$: Extinktionsänderung pro Minute
V	: Gesamtvolumen im Ansatz (l)
d	: Schichtdicke der Küvette (1 cm)
v	: Probevolumen der Membran (l)
ϵ	: spezifische Extinktionskoeffizient ($1,0 \cdot \text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
c	: Proteinkonzentration (der Membran)

* Die internationale Enzymeinheit Unit (U) entspricht dem Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute.

2.13 Isolierung von Membranen und Proteinen

2.13.1 Isolierung der dicken und dünnen Pili

Eine 3 l-Kultur von *Acinetobacter* wurde über Nacht in einem 3 l-Kluyver-Kolben in Succinat-Mineralmedium angezogen. Die vorsichtige Belüftung sollte Turbulenzen im Medium vermeiden, die zum Abscheren der Pili geführt hätte. Die Zellen wurden gerettet (6000 Upm, 10 min, 4°C; Sorvall Rotor GSA), in 20 ml Tris/Saline-Puffer resuspendiert und zweimal durch eine 26 G x 1/2"-Kanüle (Braun Melsungen) gespritzt, so daß die filamentösen Strukturen abscheren. Die Sedimentation der Zellen erfolgte durch zweimaliges Zentrifugieren bei 6000 Upm für jeweils 5 min (4°C; Rotor SS34). Daraufhin befanden sich die abgescherten Pili im Überstand. War die Aggregation der dünnen Pili erwünscht, so wurde durch Dialyse (2.8.9) eine hohe Ionenkonzentration eingestellt. Durch Ultrazentrifugation des Überstandes bzw. des Dialysates (42000 Upm, 4°C, 1 h; Rotor T-865 oder Ti60) sedimentierten die Proteine hoher molekularen Masse, die in 300 μl Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5 bzw. Dialysepuffer) aufgenommen wurden. Die Auftrennung nach Dichte erfolgte in einem 20-70%igen Stufen-Saccharosegradienten, wobei die Stufendifferenz 10% Saccharose betrug (26000 Upm, 18 h, 4°C; Swing-Out-Rotor TH-641). Anschließend konnte mit Hilfe einer Peristaltikpumpe und einer 0,9 x 120 Kanüle (TSK-Supra, Braun Melsungen) der Gradient in neun 1,3 ml-Volumina fraktioniert werden; das Sediment ließ sich in 100 μl Tris/Saline-Puffer resuspendieren. Schließlich folgte die Sedimentation der Proteine der einzelnen Fraktionen durch Ultrazentrifugation, wozu diese zuvor mindestens fünffach mit Tris/Saline-Puffer verdünnt wurden (42000 Upm, 1 h, Sorval Rotor Ti60). Die Überprüfung des Pilusgehaltes der in 50-100 μl resuspendierten Sedimente erfolgte in einer 15%igen SDS-PAGE (2.8.2).

Dialysepuffer

Tris-HCl	20 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	200 mM
pH7,5	

Tris/Saline-Puffer

Tris-HCl	30 mM
Tris-HCl	30 mM
pH 7,5	

2.13.2 Präparation von Gesamt-Membranen

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in Succinal-Minimalmedium über Nacht (2.2.3). Die Bakterien befanden sich zur Zellernte somit in der stationären Wachstumsphase, in der die bisher untersuchten Kompetenzgene von *Acinetobacter* sp. BD413 am höchsten exprimiert werden (BUSCH *et al.* 1999, HERZBERG *et al.* 2000, PORSTENDÖRFER *et al.* 2000, FRIEDRICH *et al.* 2001). Für die Anzucht im kleinen Maßstab eigneten sich Schikanekolben, die zur Durchlüftung auf einem Schüttler zu befestigen waren oder 3 l-Kleuyver-Kolben. Eine Massenzucht erfolgte in einem 100 l-Fermenter (UD 100) der Firma Braun (Melsungen). Nach dem Ernten der Kultur durch einen niedertourigen Zentrifugationsschritt (6000 Upm, 10 min, 4°C; Sorvall Rotor, SS34, GSA oder GS3) und dem Waschen mit Tris/Saline-Puffer konnten die Zellen bei -70°C gelagert werden. Die im 100 l-Fermenter angezogenen Zellen wurden mittels Durchlaufzentrifugation in einer CEPA-Spindelzentrifuge (Carl Padberg, Lahr) mit 80 l/h geerntet. Hierzu wurde ein Schlauch am Bodenauslaß des Fermenters mit Hilfe von Schlauchschellen angeschlossen und mit der Zentrifuge verbunden. Zur Entleerung des Fermenters wurde dieser mit einem Überdruck von 1 bar beschickt.

Den mit Lysispuffer im Verhältnis mindestens von 3:1 (Puffer:Zellen) verdünnten Zellen wurden nach 10 min Inkubation bei 30°C etwas DNase und RNase zugegeben und eine MgCl₂-Konzentration von 15 mM eingestellt, bevor der zweimalige Durchlauf in der FRENCH-Press (Fa. SLM Aminco, Urbana, USA) bei einem Druck von 12000 PTI den Großteil der Zellen aufschloß. Durch zwei niedertourige Zentrifugationsschritte ließen sich ganze Zellen entfernen (6000 Upm, 10 min, 4°C; Sorvall Rotor, SS34, GSA oder GS3). Die Membranvesikel sedimentierten in einem Ultrazentrifugationsschritt (42000, 1 h, 4°C; Rotor T865 oder Ti60). Um das Cytoplasma auszuverdünnen, mußte das Sediment zweimal mit mindestens dem 10fachen Volumen des Membranpuffer gewaschen werden. Schließlich wurde das Pellet in 2 Volumina Membranpuffer resuspendiert und gegebenenfalls bei -70°C gelagert.

Lysepuffer

Tris-HCl	30 mM
EDTA	10 mM
NaCl	50 mM
6-Aminocapronsäure	5 mM
Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt und kurz vor Gebrauch 20 mg pro 1 g Zellmasse (Feuchtgewicht) Lysozym und 1 mM PMSF gelöst.	

Membranpuffer

Tris-HCl	30 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	50 mM
6-Aminocapronsäure	5 mM
pH 7,5	

Tris/Saline-Puffer

Tris-HCl	30 mM
NaCl	0,9% (w/v)
pH 7,5	

2.13.3 Isolierung von cytoplasmatischer und äußerer Membran (HANCOCK & NIKAIDO, 1987)

In einem 3 l-Kleuyver-Kolben wurde in Succinat-Mineralmedium eine 3 l-Kultur von *Acinetobacter* sp. BD413 über Nacht angezogen und, wie unter 2.13.2 genauer beschrieben, weiterbehandelt: Die Zellen wurden geerntet, gewaschen, anschließend resuspendiert, in der FRENCH-Press aufgeschlossen und die noch verbliebenen ganzen Zellen zentrifugiert. Da nach der Sedimentation der Membranen in der Ultrazentrifuge sich diese nur schwer resuspendieren ließen, und danach immer noch kleinste Verklumpungen erkennbar waren, erfolgte zur Abtrennung des Cytoplasmas zunächst nur eine Verdichtung der Membranen, wozu mit einer 70%igen Saccharosestammlösung (in Membranpuffer) im Zelllysate eine Saccharosekonzentration von 15% (w/v) eingestellt und auf ein 70%iges (w/v) Saccharosekissen (3 ml) zentrifugiert wurde (1 h, 4°C, 27000 Upm; Swing-Out-Rotor AH-629). Hierbei mußte darauf geachtet werden, daß das Zelllysate mit Membranpuffer (bzw. mit der Saccharosestammlösung) vor der Überschichtung des Saccharosekissens mindestens dreifach verdünnt wurde; ansonsten wären die Membranen aufgrund der hohen Viskosität nicht verdichtet worden.

Anschließend konnten die Membranen (~ die untersten 6 ml) auf einen neuen Gradienten (4 ml 70% Saccharose, 10 ml 64 % Saccharose, 10 ml 58% Saccharose, 9 ml 52% Saccharose, jeweils in Membranpuffer) überschichtet werden. Die Trennung von cytoplasmatischer und äußerer Membran erfolgte durch Zentrifugation über Nacht (4°C,

27000 Upm; Swing-Out-Rotor AH-629). Die resultierenden Banden wurden mit einer PASTEUR-Pipette vorsichtig abgenommen, in einen T-865 oder Ti60 Zentrifugenbecher überführt und in Membranpuffer (2.13.2) suspendiert. Die mittlere gelbliche Bande bildeten Cytoplasmamembranen und die obere weißliche Bande bestand aus äußeren Membranen. (PORSTENDÖRFER 1998). Die erneute Sedimentation erfolgte für 1 h bei 42000 Upm (4°C; Rotor T-865 oder Ti60). Die pelletierten Membranen wurden in für die Resuspendierung kleinst möglichen Volumina Membranpuffer (2.13.2) aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

2.13.4 Solubilisierung der gewaschenen Membranen

Zur Lösung der Membranproteine dienten gewaschene Membranen von *Acinetobacter*-Stämmen. Vor jeder Solubilisierung waren die Membranen mit Membranpuffer (2.13.2) auf die gewünschte Proteinkonzentration einzustellen, so daß sich nach Zugabe des Detergenz eine Proteinkonzentration von 4-5 mg/ml ergab. Daraufhin wurden die Proben unter Rühren 15 min auf Eis inkubiert. Die Trennung der solubilisierten Proteine von ungelösten Membranen erfolgte im präparativen Maßstab durch Zentrifugation in einer Sorvall OTD-55 b Ultrazentrifuge (42000 Upm, 20 min, 4°C; Rotor T-865 oder Ti60), im analytischen Maßstab in einer Tischzentrifuge (15000 Upm, 20 min, 4°C; Biofuge 17 RS).

2.13.5 Chromatographische Methoden

An die Solubilisierung der Membran schlossen sich flüssigkeitschromatographische Schritte an, die mittels einer Gradifrac-Einheit (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) durchgeführt wurden und aus folgenden Komponenten bestand: Kontroller und Fraktionssammler Gradifrac; Pumpe P50; Probenauftragsventil V 7; UV-Monitor Uvicord SII mit Durchflußzelle und angeschlossenem 2-Kanal-Schreiber REC 102; Leitfähigkeitsmeßgerät mit Durchflußzelle, Mischzelle (1,6 ml) und zwei Magnetventile PSV 50, von denen eines zum Aufbau des Salzgradienten und das andere zur Umschaltung zwischen Fraktionssammler und Abfallgefäß diente. Zum Auftragen größerer Volumina wurde des weiteren eine Pumpe Typ P1 benutzt.

Das Gradifrac-System war programmierbar, so daß die Elution und Fraktionierung unter Aufzeichnung des Protein- und Salzgehaltes automatisch ablief. Sämtliche benutzte Puffer wurden durch Filtration durch eine in einen Glasfilterhalter mit Fritte eingespannte Cellulose-Acetat-Membran (Porendurchmesser: 40 µm) von Partikeln befreit. Die Entgasung durch das Anlegen eines Vakuums oder durch das Autoklavieren der Lösungen

sollte die spätere Bildung von Luftblasen in der Säule vermeiden. Die Durchführung der Chromatographie bei 4°C verlangsamte die proteolytischen Prozesse.

2.13.5.1 Anionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose

Für die Anionenaustausch-Chromatographie wurde das Gelmaterial Q-Sepharose in Verbindung mit einer XK 50/20-Säule (beides Fa. Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) genutzt. Die Trennung beruht darauf, daß Moleküle mit negativen Ladungen - wie beispielsweise Proteine oder Cl⁻-Ionen - an die Matrix binden. Dabei konkurrieren verschiedene Anionen um die Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten. So können an das Material gebundene Proteine durch einen NaCl-Gradienten in der Reihenfolge ihrer Bindungsstärke verdrängt und nacheinander eluiert werden. Da die Nettoladung der Proteine pH-abhängig ist, erfolgt die Bindung an den Anionenaustauscher erst bei pH-Werten oberhalb des isoelektrischen Punktes des jeweiligen Proteins. Die Bindung kann demnach durch eine weitere Erhöhung des pH-Wertes verstärkt werden.

Die benötigte Menge Gelmaterial wurde nacheinander mit 500 ml 0,5 M HCl und 0,5 M NaOH auf einer 1 l-Fritte gewaschen, mit 500 ml einer 3 M NaCl-Lösung abgesättigt, mit der gleichen Menge 30 mM Tris-HCl (pH 7,5) äquilibriert und resuspendiert.

Zur Eichung des Gradifrac-Systems wurde anstelle der Säule eine Schlauchverbindung zwischen Ventil und UV-Meßgerät eingesetzt. Die Kalibrierung der Induktionsmeßzelle erfolgte durch Pumpen von Hochsalz-Elutionspuffer (30 mM Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5; evtl. Detergenz oberhalb der Mizellenkonzentration) und Betätigung der 100% Taste und danach durch Spülen mit dem salzfreien Äquilibrierungspuffer (30 mM Tris-HCl, pH 7,5, evtl. Detergenz) und Betätigung der 0% Taste. Es folgt die Eichung des Uvicord SII durch Einstellen eines 10%-Wertes für den Proteingehalt am Schreiber. Die Empfindlichkeit des Proteinmeßgerätes wurde schrittweise erhöht und die Änderung des Schreiberausschlags am Nullpunkt-Justierknopf jedesmal ausgeglichen. Dieses bewirkte, daß die Grundlinie in allen Empfindlichkeitsstufen identisch war und während der Elution ohne Verlust der Grundlinieneinstellung auf den Proteingehalt abgestimmt werden konnte. Anschließend konnte der untere Adapter der Säule angeschlossen und mit dieser befestigt werden. Nach dem Einfüllen des Sepharose Q-Materials und dem Anbringen des oberen Adapters ließ sich das Material mit Äquilibrierungspuffer bei einer Durchflußrate von 2,5 ml/min packen. Bei konstanter Sedimentationshöhe und einem Salzgehalt von unter 1% konnte der Stempel des oberen Adapters positioniert und die Säule in Betrieb genommen werden.

Nach dem Auftragen des Membransolubilisat (2.13.4) mit 1 ml/min wurde solange mit 30 mM Tris-HCl (pH 7,5) gespült, bis alle nichtgebundenen Stoffe entfernt worden waren (mindestens 4 Gelvolumina, Durchflußrate 2 ml/min). Danach erfolgte die

stufenweise Elution mit 2 ml/min mittels ansteigender NaCl-Konzentrationen, wobei die Elutionsvolumina jeder Stufe 4 Gelvolumina betragen. Die Fraktionsvolumina betragen ca. 15-30% des Matrixvolumens.

Einen Überblick über die Proteingehalte ergab die Messung der Extinktion bei 280 nm in der Durchflußzelle des Uvicord SII, die per Schreiberaufzeichnung dokumentiert wurde; ebenso wurden die Salzkonzentration und die Fraktionsgröße festgehalten.

Die Regeneration des Anionenaustausch-Materials erfolgte wie oben beschrieben und die Lagerung bei 4°C in 20% (v/v) Ethanol.

2.13.5.2 Gelfiltration mit Sephadex S-300

Das Prinzip der Gelfiltration beruht auf der unterschiedlichen Verweildauer von Proteinen verschiedener Größe in einem porösen Gelmaterial. Bei dem hier verwendeten Gel befinden sich all diejenigen Proteine im Ausschlußvolumen, die größer als 1500 kDa sind. Kleinere Partikel verweilen mit abnehmender Größe zunehmend länger in den Poren und werden dementsprechend später eluiert. Der Trennbereich von Sephacryl S-300 HR (Fa. Phamacia Biotech Europe GMBH, Freiburg) erstreckte sich von 10 kDa bis 1500 kDa. Um Aggregationen während der Elution zu vermeiden, wurde dem Gelfiltrationspuffer 2 mM Dodecylmaltosid zugegeben.

Die Gelfiltration kann bei globulären Proteinen zur Bestimmung der molekularen Masse herangezogen werden. Dazu wurde die Säule zunächst geeicht, indem eine Beziehung zwischen Retardationsvolumen und molekularer Masse hergestellt wurde. 0,5 ml folgender Eichproteine (4 mg/ml) passierten nacheinander die Säule: Ferritin (450 kDa), Katalase (240 kDa), Aldolase (158 kDa) und Albumin (45 kDa). Um Wechselwirkungen mit der Gelmatrix und Aggregationen der zu untersuchenden gelösten Membranproteinen zu verhindern, wrde dem Gelfiltrationspuffer 100 mM NaCl und 2 mM Dodecylmaltosid (Endkonzentration) zuzusetzt.

Die fertig gepackte Säule wurde luftblasenfrei an das Gradifrac-System angeschlossen und bei 0,5 ml/min mit 200 ml Gelfiltrationspuffer gewaschen. Nun konnte die Eichung des Nullwertes des UV-Meßgerätes für die Proteindetektion erfolgen (2.13.5.1). Die Flußrate wurde daraufhin auf 0,3 ml/min heruntergeregelt und mittels der Auftragspumpe die Probe aufgetragen.

Zur Reinigung des Säulenmaterials wurden in entgegengesetzter Laufrichtung jeweils 50 ml 2 M NaCl, 0,5 M NaOH, 10 mM HCl und zur Konservierung abschließend 20% (v/v) Ethanol durch die Säule gepumpt.

Gelfiltrationpuffer

Tris-HCl	30 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	100 mM
6-Aminocapronsäure	5 mM
Dodecylmaltosid	2 mM
pH 7,5	

2.14 Reinigung humaner Erythrocyten mittels Dichtegradientenzentrifugation (LeucoSep Kit)

Die Aufreinigung der humanen Erythrocyten wurde freundlicherweise von Frau Dr. Vehmeyer (Universitätsklinikum, Göttingen; Hämatologie) vorgenommen und die gereinigten Erythrocyten zur Verfügung gestellt.

Die Vorgehensweise der Isolierung der Roten Blutkörperchen wurde nach Anleitung des LeucoSep Kits vorgenommen. Das LeucoSep Kit besteht aus einem Röhrchen mit Filterscheibe und einer Ficoll-Trennlösung. 15 ml Ficoll-Trennlösung wurden zunächst auf die Filterscheibe des LeucoSep-Röhrchens gegeben und dann zentrifugiert (1 min, 400 x g, 4°C), so daß sich das Ficoll unterhalb der Filterscheibe befand. Anschließend wurden 20 ml Blut (mit Gerinungshemmer: Hanks/EDTA) auf die Filterscheibe gegeben. Durch erneute Zentrifugation (10 min, 1000 x g, 4°C) reicherten sich die Erythrocyten und die Granulozyten unterhalb der Filterscheibe an, während sich darüber ein Ring aus PBMC (**P**eripheral **b**lood **m**ononuclear **c**ells) bildete. Für die weitere Reinigung der Erythrocyten wurde die Filterscheibe vorsichtig durchstoßen und die darunter befindliche Lösung in ein leeres 50 ml Röhrchen gegossen, mit Hanks-Lösung auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (15 min, 400 x g, 4°C), so daß die Roten Blutkörperchen sedimentierten. Der Überstand wurde verworfen.

2.15 Elektronenmikroskopische Untersuchungen**2.15.1 Herstellung von Kohle-Trägerfolien**

Die Kohlefolien wurden nach BRADLEY (1958) durch indirekte Widerstandsbedampfung mit konisch zugespitzten Kohlestäbchen (Spektralkohle höchster

Reinheit, Ringsdorf, Bonn-Bad Godesberg) in einer Hochvakuum Bedampfungsanlage (E 306, Edwards High Vacuum Ltd., Crawley, Sussex, Großbritannien) auf frisch gespaltenem Glimmer (Plano, W. Plannet GmbH, Marburg) hergestellt. Die Schichtdicke der Folien schwankte in Abhängigkeit von der Bedampfungsdauer zwischen 5 und 20 nm.

2.15.2 Negativkontrastierung

Ein ca. 3 x 3 mm großes kohlebedampftes Glimmerstück (2.15.1) wurde zugeschnitten und schräg in einen Tropfen der zu untersuchenden Proteinlösung oder Zellsuspension getaucht, so daß der Kohlefilm partiell auf der Tropfenoberfläche abflottieren konnte. Je länger die Folie auf den Tropfen verblieb, desto mehr Proteine adsorbierten dabei an die Kohlefilmoberfläche. Der Kohlefilm wurde anschließend auf die gleiche Art in einem Tropfen $H_2O_{\text{dest.}}$ gewaschen, auf einem Tropfen Kontrastierungslösung (4%ige Uranylacetat, pH 4,0 oder 3% Phosphorwolframsäure, pH 7,0) vollständig abflottiert und anschließend auf einem Kupfergrid aufgenommen. Überschüssige Kontrastierungslösung wurde vorsichtig mit einem Filterpapier abgesaugt.

2.15.3 Elektronenmikroskopische Abbildung

Die Elektronenmikroskopie erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop TEM 902 (Zeiss, Oberkochen) mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV. Vergrößerungen wurden mit einer Kreuzgitter-Replika (Bazers Union, Liechtenstein) ermittelt. Als Fotonegativmaterial dienten Planfilme der Abmessung 8,3 x 10,2 cm (Scienta 23D-56, Agfa Gevaert, Leverkusen).

2.15.4 Einbettung von Zellen für elektronenmikroskopische Dünnschichtdarstellungen

Für Ultradünnschnitte von Zellen mußten diese eingebettet werden. Hierzu wurden die Zellen in 15 ml LB-Medium, dem 0,5% (w/v) Glucose zugesetzt worden war, über Nacht angezogen, geerntet und zweimal mit PBS (50 mM, pH 7,5) gewaschen (Zentrifugationsschritte bei 4°C, 10 min, Sorvall Rotor SS34). Den in 5 ml PBS resuspendieren Zellen wurde 0,7 ml 25% Glutaraldehyd zugesetzt und für 90 min auf Eis inkubiert, bevor die fixierten Bakterien in PBS gewaschen wurden (4°C, 10 min, Sorvall Rotor SS34). Das in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführte Zellpellet wurde daraufhin mit 2%igem auf 40°C erwärmten Agar (in PBS) sorgfältig gemischt, wobei das Verhältnis von Pelletvolumen und Agarlösung 1:1 betragen mußte, und anschließend für

10 min auf Eis abgekühlt. Um die in Agar eingebetteten Zellen aus dem Reaktionsgefäß zu befreien, wurde die Spitze mit einer Klinge abgeschnitten und der Inhalt auf einen Glasobjektträger geschoben, wo dieser in ca. 2 mm Stücke geschnitten wurde. Diese Stücke mußten, um ein Austrocknen zu vermeiden, sofort in 3,5 ml Präparatengläser (12 x 35 mm, Ochs) weiterverarbeitet werden.

Die Einbettung wurde nach SPURR (1969) durchgeführt. Die Proben wurden mit der Doppelfixierung nach BEHN & ARNOLD (1974) vorbehandelt und in SPURR-Harz eingebettet. Es wurde nach folgendem Plan vorgegangen:

- Dreimal 20 min in PBS bei 0°C waschen
- Fixierung in 1% (w/v) Osmiumtetroxid in PBS bei 4°C für 30 min
- Dreimal 20 min in H₂O_{dest.} bei 4°C waschen
- Entwässerung in einer aufsteigenden Acetonreihe bei 0°C
 - 10 min in 10, 30 und 50% wäßrigem Aceton
 - über Nacht oder 3 h in 2% (w/v) Uranylacetat in 70% Aceton
 - 10 min in 70, 90 und 100% Aceton (über wasserfreiem CuSO₄ getrocknet)
 - 20 min in 100% Aceton bei RT
- Verdopplung des Volumens mit Kunstharz bei RT (Harz:Aceton 1:1)
- nach 30 min erneut Verdopplung des Volumens mit Kunstharz
- nach 90 min Austausch gegen frisches Kunstharz
- am nächsten Tag erneuter Austausch gegen frisches Kunstharz
- nach 3 h in 0,5 ml Gelatinekapseln (G. Pohl-Boskamp, Hohenlockenstedt/Holstein) übertragen
- Gelatinekapseln zu 3/4 mit Kunstharz füllen
- 10 min Evakuierung, um Gasblasen zu entfernen
- 8 h bei 70°C polymerisieren

Zusammensetzung des Kunstharzes (Serva):

Vinylcyclohexendioxid (ERL 4206)	15,0 g
DER 732 (oder DER 736 nur 9,0 g)	13,5 g
Nonenylbernsteinsäureanhydrid (NSA)	39,0 g
□-Dimethylaminoethanol (S1)	0,6 g

2.15.5 Ultramikrotomie

Die polymerisierten Proben wurden mit einer Diamantfräse (TM 60, Reichert, Österreich) so angespitzt, daß ein Pyramidenstumpf mit einer quadratischen Spitze von

maximal $0,5 \text{ mm}^2$ Oberfläche entsteht. Die Dünnschnitte wurden mit einem Ultramikrotom (Ultrame III, LKB. Bromma, Schweden) unter Verwendung von Glasmessern angefertigt.

Die Messer wurden aus 25 mm breiten und 6,5 mm dicken Glasstreifen (LKB, Bromma, Schweden) mit einem Messerbrecher (Knifemaker LKB 7800) hergestellt und besaßen bei einem Gegenstück von ca. 0,5 mm Dicke einen realen Winkel um 55° an der Messerkante. Sie wurden mit einem Kunststoffrog zur Aufnahme von filtrierten $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, auf dem die Schnitte abflottierten, versehen und konnten mehrere Tage ohne Qualitätsverlust gelagert werden.

Die auf der Wasseroberfläche abflottierten Ultradünnschnitte besaßen bei silberner Interferenzfarbe eine Dicke von 60-90 nm. Die Schnitte wurden mit formvarbeschichteten Kupfergrids aufgenommen.

2.16 Zentrifugationen

Für alle molekularbiologischen und proteinchemischen Arbeiten wurden je nach Lösungs- bzw. Kulturvolumen unterschiedliche Zentrifugen und Rotoren genutzt. Sofern nicht anders angegeben, wurden Volumina bis 2,0 ml in einer Biofuge 15 bzw. Biofuge 17 RS der Firma Heraeus, Osterode/Harz zentrifugiert. Dabei entsprachen beispielsweise 15000 Upm = 18000 x g. Volumina, die oberhalb 2 ml lagen, wurden in einer Sorvall RC 5B-Zentrifuge der Firma. Du Pont, Bad Homburg, mit den Rotoren SS-34, GS-3 oder GS-A zentrifugiert. Dabei entsprachen beispielsweise 15000 Upm = 27000 x g. Membranen wurden in einer Ultrazentrifuge der Firma Du Pont, Bad Homburg, mit dem Rotor T-865 (50000 Upm = ~ 170000 x g) bzw. mit den „Swing-Out-Rotoren“ AH-629 und TH-641 (28000 Upm = ~ 170000 x g) durchgeführt.

2.17 Bezugsquellen für Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Hannover), Roth (Karlsruhe) oder Fluka Chemie AG (Neu-Ulm) mit den Reinheitsgraden 'reinst' oder 'pro analysis' verwendet. Restriktionsendonukleasen stammten von den Firmen Gibco BRL (Eggenstein), MBI Fermentas (Wilna, Litauen) und Pharmacia (Freiburg). Spezielle Chemikalien und Biochemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

AGS, Heidelberg:	Agarose
Biomol Feinchemikalien, Hamburg:	IPTG
Biozym Diagnostik (Vertrieb für Epicentre Technologies, Madison, Wisconsin, USA):	SequiTherm Excel DNA Sequencing Kit
BoehringerMannheim, Mannheim:	DIG DNA Labeling Kit, DIG DNA Luminescent Detection Kit, DIG Glycan Detection Kit RNaseA, T4 DNA-Ligase BM Chemiluminescence Blotting Substrate Kit, Protein A HPR Konjugat, Rnase, Triton X-100
Fluka, Schweiz:	<i>p</i> -Hydroxybenzoat, Glycerin, Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB), Kaliumacetat, Saccharose, Bis-Tris
Genomed, Bad Oeynhausen:	JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit, JETstar Plasmid Midi Kit 2.0
GERBU Biotechnik, Gaiberg:	Ampicillin, X-Gal, Acrylamid M-Bis
Gibco BRL, Eggenstein:	Hefeextrakt, Protein-Größenstandard
MBI Fermentas, Wilna, Litauen:	DNA-Größenstandard (1 kb-Leiter)
Merck, Darmstadt:	Proteinase K, Lysozym
Kodak, Stuttgart:	Entwickler LX24, Fixierer AL4, Röntgenfilme X-Omat AR
Oxoid, Basingstoke, England:	Trypton
Pharmacia, Freiburg:	High Moleculare Weight (HMW) Marker-Proteine
Promega (Vertrieb durch Serva):	ProtoBlot Western Blot AP System
Roth GmbH & Co, Karlsruhe:	Isoamylalkohol, Roti-Phenol, Tris
ServaFeinbiochemikaHeidelberg:	EDTA, Erase-a-Base-System, Ethidiumbromid, Harnstoff, Kanamycin, Long Ranger Gel Solution, SDS, TEMED, Tween 20
Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen:	N-Lauroylsarkosin, Spermidin, Tetracyclin

3. Experimente und Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Beteiligung von c-PHB an der natürlichen Transformation

PHB (D-[-]-Poly- β -Hydroxybutyrat) ist ein in Bakterien weit verbreiteter Speicherstoff, der aus (R)-3-Hydroxybutyrat enzymatisch synthetisiert wird. Dieses hochmolekulare Polymer (60-1000 kDa) liegt in der Zelle in Einschlußkörpern vor (DAWES & SENIOR 1973, ANDERSON & DAWES 1990). Daneben wurde PHB mit niedrigerem Molekulargewicht (~12 kDa) in bakteriellen Zellmembranen identifiziert und als c-PHB bezeichnet (REUSCH & SADHOFF 1983, REUSCH *et al.* 1986).

REUSCH und SADHOFF (1988) identifizierten in den Zellmembranen von *E. coli* und anderen Bakterien zylindrisch aufgebaute Komplexe, die aus c-PHB (c steht für Cytoplasmamembran) und anorganischem Calcium-Polyphosphat aufgebaut sind und Calcium-Ionen durch Membranen transportieren (REUSCH *et al.* 1995). Dabei soll das amphiphilische c-PHB eine helikale polare Pore bilden, welche das passierende Calcium-Polyphosphat umgibt und löst. Eine weitere Funktion für c-PHB wurde bei der DNA-Aufnahme postuliert: Der Gehalt des Polymers c-PHB in den Zellmembranen korreliert mit der Kompetenzentwicklung in *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae* und *E. coli* (REUSCH *et al.* 1986, REUSCH & SADHOFF 1983); doch die direkte Beteiligung an der DNA-Aufnahme wurde bisher nicht gezeigt.

3.1.1 Unterbrechung der PHB-Synthase in *Acinetobacter* sp. ADP239

In der Gattung *Acinetobacter* ist PHB als Speicherstoff weit verbreitet (SCHEMBRI *et al.* 1994, 1995, 1995a). Durch Unterbrechung des Gens, welches für die PHB-Synthase in BD413 codiert, kann seine Auswirkung hinsichtlich der natürlichen Transformation untersucht werden. Über Datenbankabgleiche konnte ein einziger ORF auf dem Chromosom von BD413 identifiziert werden, dessen Genprodukt Ähnlichkeiten zu einer Vielzahl von bereits untersuchten PHB-Synthasen (PhaC) in anderen Organismen aufweist. Exemplarisch ist ein Aminosäuresequenz-Abgleich mit den PHB-Synthasen (PhaC) aus *Bacillus megaterium* und *Allochromatium vinosum* dargestellt, die Identitäten von 30% bzw. 42% und Ähnlichkeiten von 59% bzw. 60% zu dem potentiellen PhaC aus BD413 zeigen (Abb. 3.1).

```

1  MQRMES IKS--L IHHQQIKL KHL SARIFNEKSLVLSQTTPEYVIAE---FDQTKIRYY- Ac. sp. BD413
1  MAIPYVQEWEKLIKSMPSSEYKSARRFKRAYEIMTTEAEPVGLTPKEVIWKKNKAKLYR B. megaterium
1  M-FPIDIRPKLTQEML-DY---SRKLGQGMENLLNAEAITDGVSPKQAVYSEDKLVLYR Allo. vinosum

54  ---AAQRLYKEPLVFVAPLA INMDIYDLYPYRS LIQYFQAQGFVYLDWGRLT YQDR Ac. sp. BD413
61  YTPVKD--NLHKTPILLVYALIN KPYILD LTPGNSLVEYLLNRGFDVYLDWGT PGL EDS B. megaterium
56  YDRPEGAP EAQPVPLLI VYALVNR PYMTDIQEDRS TIKGLLATGQDVYLDWGY PDQADR Allo. vinosum

110 HLNFLSFI RKALPEYIQ-VIRTHS QSDKISLHGWSMAGIFVLLYSALNQP NHVKNLIVLG Ac. sp. BD413
119 NMKLDDYI VDYIPKAAKVLRTSKSPD-LSVLGYCMGGTMTSIFAALNEDLPIKNLIFMT B. megaterium
116 ALTDDYINGYI DRCVD-YLREAHGV DKVNL LGICQGGAFSLMY SALHPD-KVRNLVTMV Allo. vinosum

169 SPI DSYASGRIGKLYQFVHKS IASNKKLQTRLYSGLPKRLIHTPGILNALGFKILDPKGW Ac. sp. BD413
178 SPDFSDTG-LYGAF-LDDRYFNL DKAVDT--FGNIPPEMID-----FGNKM LKPI TN B. megaterium
174 TPVDFKTPDNLLSAW-VQN--VDIDLAVDT--MGNIPGEL LN-----WTFLSLKPFSL Allo. vinosum

229 IDGH-IQLK NLENKKL VQEHA TLGHFLNM IDYPAGINQDMLFN VWLQNP LKHGAIRLQ Ac. sp. BD413
227 FYGPPVTLVDRSENQRFV ESWKLMQKVVADGIPFAGEAYRQWIRDFYQNKLINGELEVR B. megaterium
222 TGQKYVNMVDLLDDPDKVKNFLRMEKWI FDSPDQAGETFRQF IKDFYQNGFLNGGVVLG Allo. vinosum

288 DQVIELKNIQSSLLI GAGRSDQLVTA DAVKPLTQLTSSSDVTFTLIPGGHLGLMSSQASS Ac. sp. BD413
287 GRKVDLKNIKANILNIAASRDH IAMPHQVAALMDAVSSEDKYKLLQTGHVSVVFGPKAV B. megaterium
282 GQEVLDKDI TPCVLNIFALQDHLVPPDASRALKGLTSSPDYTELAFPGGHI GIYVSGKAQ Allo. vinosum

348 EEFWPMFKHWLAQRS TQIQG Ac. sp. BD413
347 KETYP SIGDWLEKRSK B. megaterium
342 KEVTPAIGKWLNER Allo. vinosum

```

Abb. 3.1: Sequenzvergleich der PHB-Synthase PhaC von *Acinetobacter* sp. BD413. PhaC aus BD413 zeigt (über die 'Clustal'-Methode ermittelten) Ähnlichkeiten zu PHB-Synthasen aus *Bacillus megaterium* (PhaC) und *Allochro matium vinosum* (PhaC).

Die Amplifikation des potentiellen PHB-Synthase-Gens *phaC* für die spätere Unterbrechung in ADP239 erfolgte mit den Primern PHB-*SacI*-N2 (5'-CTTTTTCG GAGCTCAGAAATATGC-3') und PHB-*XbaI*-C2 (5'-GCTTGAAGCTGCTCTAGATAA TTCAAC-3'). Das mit *SacI* und *XbaI* geschnittene PCR-Produkt (1,3 kb) wurde in die äquivalenten Schnittstellen von pUC18 ligiert, wodurch das Plasmid pUB01 resultierte. In die *BstXI*-Schnittstelle des Inserts von pUB01 wurde nach dem Restriktionsverdau mit *BstXI* die überhängenden Enden mit Klenow-Fragment aufgefüllt und mit dem *HincII*-geschnittenen *nptII*-Marker aus pUC4K mit glatten DNA-Fragmentenden ligiert. Für die homologe Rekombination in das Chromosom von *Acinetobacter* ADP239 ergaben sich somit im resultierenden Plasmid pUB02 den Resistenzmarker flankierende Genbereiche von 230 bp und 1070 bp. Die Mutante mit der Unterbrechung im *phaC*-Gen, welches für die mögliche PHB-Synthase codiert, wurde als B100 bezeichnet.

Die Überprüfung der einmaligen und homologen Integration des Resistenzmarkers fand über einen SOUTHERN Blot statt. Dazu wurde die isolierte chromosomale DNA des Stammes B100 mit *EcoRV* und *SalI* sowie mit *SalI* und *XbaI* geschnitten, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, geblotet und mit einer Kanamycin-Sonde hybridisiert. Die relevanten *EcoRV*- und *SalI*-Schnittstellen schlossen vor der Mutagenisierung im

ADP239-Chromosom einen DNA-Bereich von 1,9 kb ein. Mit dem eingefügten Kanamycin-Marker von ca. 1,2 kb ergaben sich daraufhin 3,1 kb (Abb. 3.2, Spur 1). Für die *SalI/XbaI*-geschnittene chromosomale DNA vergrößerte sich die Basenpaaranzahl entsprechend von ursprünglich 2,3 kb auf 3,5 kb (Abb. 3.2, Spur 2). Diese Detektion der erwarteten DNA-Fragmentlängen bestätigte die richtige Integration des *nptII*-Markers ins Zielgen.

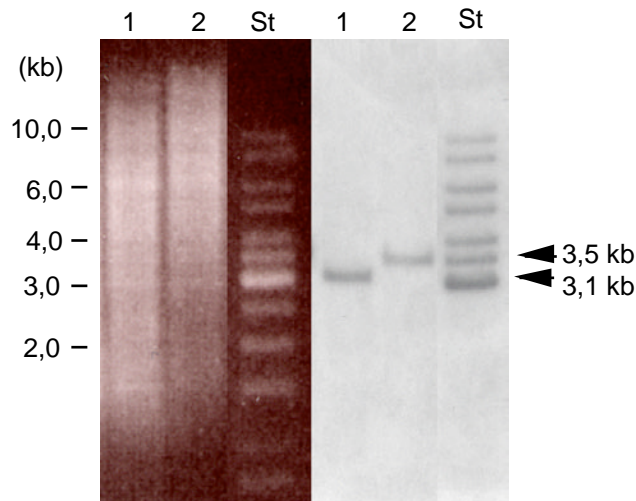


Abb. 3.2: SOUTHERN Hybridisierung restriktionsverdauter DNA der *phaC*-Mutante B100 gegen eine Kanamycin-Sonde. Die isolierte chromosomale DNA von *Acinetobacter* sp. B100 wurde mit *EcoRV**SalI* (Spur 1) und *SalI/XbaI* (Spur 2) verdaut, im Agarosegel aufgetrennt und nach dem Blot mit einer Kanamycin-Sonde hybridisiert. Die Sonde detektierte unspezifisch die DNA des DNA-Größenstandards (St) im Bereich von 3-10 kb. Auf der linken Seite ist das Ethidiumbromid-gefärbte Gel und auf der rechten der SOUTHERN Blot dargestellt.

3.1.2 Untersuchung der *phaC*-Mutante B100 auf Speicherstoff-Synthese

Nach der Unterbrechung des *phaC*-Gens in *Acinetobacter* sp. ADP239 wurde zur Kontrolle die PHB-Synthese des Wildtyp-Stamms mit der des Mutanten-Stamms B100 verglichen. Hierfür wurden die zwei Stämme über Nacht in Succinat-Mineralmedium unter Phosphat-limitierten Bedingungen angezogen, indem dem Medium nur 1/100 der üblichen Menge Phosphatpuffer zugesetzt worden war. Nach der Ernte der Kulturen erfolgte die in „Material und Methoden“ ausführlich beschriebene Einbettung der Zellen in Kunstharz.

In Abbildung 3.3 sind die Ultradünnschnitte von ADP239 und der *phaC*-Mutante B100 gezeigt. Der Wildtyp synthetisierte PHB-Speichergranula, die einen großen Teil des cytoplasmatischen Raums beanspruchten. Exeplarisch sind zwei Zellen dargestellt (Abb. 3.3, A/B) Im Cytoplasma der *phaC*-Mutante B100 dagegen waren keine derartigen

Einschlußkörperchen zu sehen (Abb. 3.3, C/D). Dies zeigt, daß das identifizierte und unterbrochene Gen *phaC* im Stamm B100 tatsächlich für die Synthese dieses Speicherpolymers verantwortlich ist und zudem kein Isoenzym diese Aufgabe übernehmen kann.

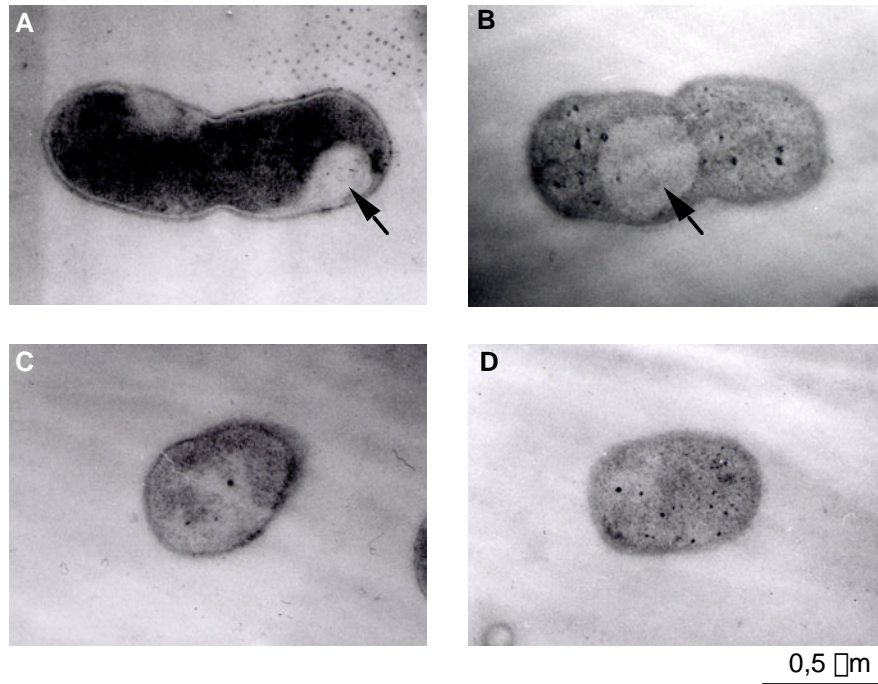


Abb. 3.3: Elektronenmikroskopische Darstellung von PHB-Granula in Ultradünnschnittschnitten von *Acinetobacter*. Der Wildtyp-Stamm *Acinetobacter* sp. BD413 bildet nach dem Wachstum auf Succinat-Mineralmedium unter Phosphatmangel Einschlußkörper, die der Speicherstoff PHB enthalten (A und B). Die PHB-Granula sind mit Pfeilen markiert. Die *phaC*-Mutante B100, die einen Defekt in der PHB-Synthese besitzt, bildet keine PHB-Granula (C und D).

3.1.3 Transformationstest der *phaC*-Mutante B100

Wäre das membranständige Polymer c-PHB an der natürlichen Transformation beteiligt, so müßte die Mutante B100 mit einem Transformationsdefekt oder mit niedrigerer Transformationsfrequenz reagieren. Zur Klärung dieser Frage wurde ein Transformationsschnelltest durchgeführt (Material und Methoden 2.7.2.3).

Acinetobacter sp. ADP239 wuchs vor dem Passieren der BD413-DNA nicht auf der *p*-Hydroxybenzoat-Agar-Platte, was den Defekt im *pobA*-Gen demonstrierte; nach Kontakt mit der BD413-DNA zeigten sich dagegen Kolonien, so daß von einem intakten natürlichen Transformationssystem im Kontrollstamm ausgegangen werden kann (Abb. 3.4). Da sich die Mutante B100 in gleicher Weise verhielt, kann geschlossen werden, daß

B100 keinen Transformationsdefekt aufweist. Die ermittelten Transformationsfrequenzen der PhaC-Synthase-Mutante B100 lagen im gleichen Größenbereich von *Acinetobacter* sp. ADP239 (lag-Phase bei 10^{-3} - 10^{-4}).

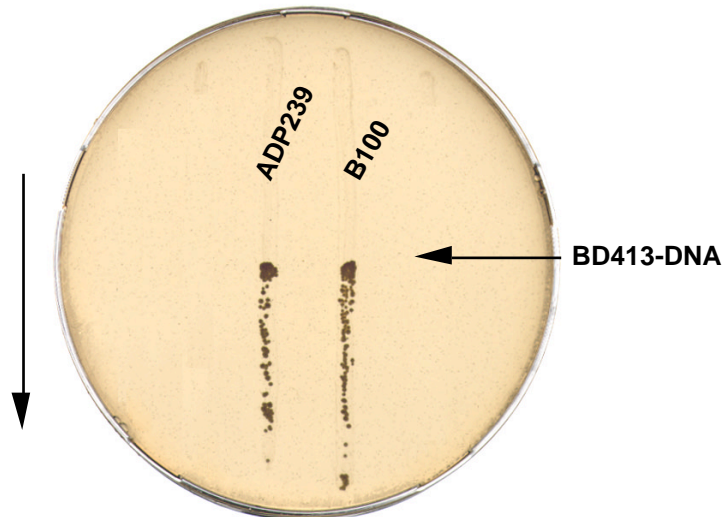


Abb. 3.4: Transformationstest der *phaC*-Mutante *Acinetobacter* sp. B100. Da ADP239 und die generierte Mutante B100 einen Defekt im *pobA*- (Hydroxybenzoat-Hydroxylase-) Gen besitzen, wachsen die Stämme nicht auf *p*-Hydroxybenzoat. Nach dem Passieren der Impföse durch einen Tropfen chromosomaler DNA von *Acinetobacter* sp. BD413 findet aufgrund der Fähigkeit zur natürlicher Transformation Wachstum statt. Der senkrechte Pfeil gibt die Richtung der ausgestrichenen Zellen an.

Nach dieser Untersuchung verhielt sich die Mutante B100, die eine Unterbrechung in dem Gen trägt, welches für die PHB-Synthase PhaC codiert, hinsichtlich ihrer natürlichen Fähigkeit zur Transformation identisch zum Wildtyp, welches die Schlußfolgerung zuläßt, daß das Polymer PHB nicht essentiell an der DNA-Aufnahme von BD413 beteiligt ist. Obwohl *Acinetobacter* sp. BD413 kein zweites Gen besitzt, dessen Genprodukt Ähnlichkeiten zu PHB-Synthasen aufweist, ist dennoch nicht ausgeschlossen, daß eine Synthese von membranständigem c-PHB über einen anderen Biogeneseweg erfolgt. Der c-PHB-Gehalt in den Zellmembranen von Wildtyp und Mutante B100 müßte zur endgültigen Klärung der Frage, ob c-PHB an der natürlichen Transformation beteiligt ist, hierzu bestimmt werden.

3.2 Überexpression und Reinigung von Proteinen des Transformationssystems von *Acinetobacter* sp. BD413

Um die Kompetenzproteine ComA und ComC, die an der DNA-Aufnahme durch die Zellhülle von *Acinetobacter* sp. BD413 beteiligt sind, in späteren Lokalisierungs- und Charakterisierungsversuchen nachweisen zu können, sollten polyklonale Antikörper gegen diese Polypeptide hergestellt werden. Ihre spezifische Bindung erlauben eine Detektion der Proteine in verschiedenen Zellfraktionen. Dieses setzt eine Überexpression und anschließende Reinigung voraus.

Die Unterbrechung von *comC* in *Acinetobacter* sp. BD413 führte zu einem vollständigen Transformationsdefekt und einer verminderten Fähigkeit doppelsträngige DNA auf der Zelloberfläche zu binden (LINK *et al.* 1998). Die ausgehend vom ersten potentiellen Startcodon der *comC*-Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz besteht aus 1208 Aminosäuren (3624 bp) mit einer errechneten molekularen Masse von 132 kDa (LINK *et al.* 1998). Datenbankabgleiche ergaben Ähnlichkeiten zu den gut untersuchten Proteinen PilC1 und PilC2 aus *Neisseria gonorrhoeae* (JONSSON *et al.* 1991) und *Neisseria meningitidis* (NASSIF *et al.* 1994) sowie PilY1 aus *Pseudomonas aeruginosa* (ALM *et al.* 1996), die an der Biosynthese von Typ-IV-Pili und der gleitenden Fortbewegung 'Twitching Motility' beteiligt sind. Mit Ausnahme von PilC2 aus *Neisseria gonorrhoeae* sind die PilC-Proteine außerdem für die Anheftung der Bakterien an die Wirtszelle verantwortlich und erfüllen bei *Neisseria gonorrhoeae* zusätzlich eine Funktion bei der natürlichen Transformation (MORAND *et al.* 2001, SCHEUERPFUG *et al.* 1999, RAHMAN *et al.* 1997). Immunologische Studien bei *Neisseria gonorrhoeae* ergaben, daß ComC in der äußeren Membran lokalisiert und ebenso an der Spitze des Typ-IV-Pilus zu finden ist. Bei BD413 führte eine Unterbrechung des Kompetenzgens *comC* nicht zu einem veränderten Pilus-Phänotyp und nicht zu einer beeinträchtigten Fähigkeit zur gleitenden Fortbewegung.

In *Acinetobacter* sp. BD413 wurde ein Kompetenzgen *comA* identifiziert, dessen Genprodukt Ähnlichkeiten zu den gut untersuchten Kompetenzproteinen ComA aus *Neisseria gonorrhoeae*, comEC aus *Bacillus subtilis*, Rec-2 aus *Hemophilus influenzae* sowie CelB aus *Streptococcus pneumoniae* aufweist (FRIEDRICH *et al.* 2001, CAMPBELL *et al.* 1998, CLIFTON *et al.* 1994, FACIUS & MEYER 1993, HAHN *et al.* 1993). Für diese bereits untersuchten Kompetenzproteine wurde eine Lokalisation in der Cytoplasmamembran nachgewiesen, wobei 8-10 transmembrane Helices angenommen werden. Bezüglich seiner Funktion wird eine Beteiligung bei der Translokation der aufgenommenen DNA (nach Bildung von Einzelstrang-DNA) durch die innere Membran postuliert (FACIUS *et al.* 1996, HAHN *et al.* 1993, INAMINE & DUBNAU 1995).

3.2.1 Überexpression und Reinigung des Kompetenzproteins ComC

Für die Überexpression eines Proteinfragmentes von ComC aus BD413 wurde das 1280 bp-*HindIII/BamHI*-Fragment (426 Aminosäuren, ca. 50 kDa), welches von der 583. bis zur 1863. Base reichte, aus dem 3624 bp-*comC*-Gen (kloniert in pRK9) direkt in den ebenso geschnittenen Überexpressionsvektor pJC40 ligiert, woraus das Plasmid pCC01 resultierte. Die Klonierung eines größeren Genbereichs oder des vollständigen *comC*-Gens führte zu toxischen Effekten, was einer Überexpression entgegenstand. Die Expression des *comC*-Fragments im rekombinanten pCC01-Vektors führte zu einem Hybridprotein, welches aus zehn N-terminalen Histidinresten und dem ComC-Fragment bestand. Die Polyhistidinreste dienen der späteren Isolierung des gewünschten Proteins, da Histidine eine hohe Affinität zu Nickelionen besitzen und somit über die Ni²⁺-NTA Matrix aufgereinigt werden können. Nach der Transformation von pCC01 in *E. coli* BL21 erfolgte die Anzucht einer 250 ml Kultur in LB-Medium bei 37°C. Bei einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 wurde der vor dem klonierten Genfragment lokalisierte T7-Promotor durch Zugabe von IPTG induziert und die Zellen zwei weitere Stunden inkubiert. Die Synthese des induzierten Proteins führte zu keiner Beeinträchtigung des Zellwachstums. Nachdem die Zellen geerntet, gewaschen und durch Ultraschall aufgeschlossen worden waren, wurde die Überexpression durch SDS-PAGE überprüft.

Die IPTG-Induktion lieferte im SDS-Gel eine Bande starker Intensität bei 50 kDa, die vor der Induktion nicht vorhanden gewesen war und die der erwarteten molekularen Masse des Hybridproteins entsprach. Die daraufhin vorgenommene Zellfraktionierung zeigte, daß sich das gewünschte Protein ausschließlich in der partikularen, Membran- und Zelltrümmer-haltigen Fraktion befand, so daß das überexprimierte ComC-Hybridprotein in Form von Einschlußkörpern vorlag. Gelöstes Hybridprotein, welches dann in der cytoplasmatischen Fraktion lokalisiert sein mußte, lag nicht vor. Durch kurze niedertourige Zentrifugation (3000 Upm, 2 min, 4°C, Eppendorf Zentrifuge 5417R) konnten die Einschlußkörper von gelösten Fremdproteinen und dem größten Teil der Membranen abgetrennt werden (Abb. 3.5). Für die Aufreinigung über die Ni²⁺-NTA Matrix wurde das Sediment zunächst mit 6 M Harnstoff behandelt, so daß die Fusionsproteine denaturiert in Lösung gingen, und danach gegen PBS dialysiert. Entsprechend der Bindekapazität des Säulenmaterials wurde die Säule mit dem dialysierten, renaturierten Protein beladen und anschließend gewaschen. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit Imidazol-haltigem Puffer. Dieses Eluat wurde daraufhin zur Entfernung des Imidazols gegen Phosphat-Saline-Puffer (PBS) dialysiert. Auf diese Art konnten aus 250 ml Kultur ca. 4 ml Eluat mit einer Proteinkonzentration von 400 µg/ml gewonnen werden.

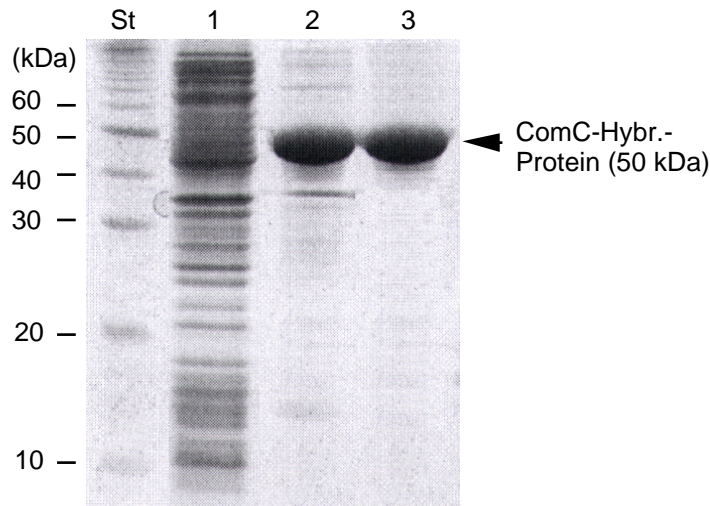


Abb. 3.5: Aufreinigung des überexprimierten ComC-Hybridproteins mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Im SDS-Gel wurden die lösliche cytoplasmatische (Spur 1), die partikuläre Fraktion (Spur 2) und das gereinigte Fusionsprotein (Spur 3) aufgetragen.

Obwohl nach der Reinigung über die Ni²⁺-NTA Matrix neben dem gewünschten Fusionsprotein weitere Banden mit geringerer molekularer Masse im SDS-Gel zu erkennen waren, erwies sich das Eluat als sauber (Abb. 3.5). Mit Hilfe von Antikörpern gegen die Histidinreste konnte in Immunoblots gezeigt werden, daß es sich bei diesen Banden ausschließlich um Abbruchfragmente des ComC-Hybridproteins handelte, die ebenso an das Säulenmaterial gebunden hatten und mit Imidazol eluierten (Abb. 3.5).

3.2.2 Untersuchungen zur spezifischen Bindung der Anti-ComC-Antikörper

Um für Lokalisationen von ComC ein Nachweissystem zu etablieren, welches die spezifische Detektion und Markierung von ComC ermöglicht, wurde ein Kaninchen mit dem überexprimierten und aufgereinigten ComC-Hybridprotein immunisiert. Hierdurch konnte nach zwei Monaten Antiserum gewonnen werden, welches für mehrere Tests, wie z.B. ELISAs (‘enzyme linked immunoabsorbent assay’), ‘Dotblots’ und ‘Immunoblots’ mit dem aufgereinigten ComC-Hybridprotein sowie *Acinetobacter* sp. BD413-Zellextrakt und äußere und innere Membranfraktionen eingesetzt wurden. Es zeigte sich dabei, daß das Antiserum einen hohen Titer an spezifischen Antikörpern gegen das aufgereinigte ComC-Hybridprotein enthielt. 0,1 µg des Hybridproteins konnte mit Antiserum nachgewiesen werden, welches in einem Volumen von 10 ml 1:100 000 verdünnt wurde. Mit 1:25 000 verdünntem Antiserum konnte eine minimale Hybridproteinmenge von 5 ng detektiert werden.

Obwohl spezifische Antikörper vorlagen, konnte ComC jedoch in *Acinetobacter* nicht nachgewiesen werden. Wurden hohe Protein- und/oder Antiserum-Konzentrationen für den Immunoblot eingesetzt, so stieg die Zahl der Proteine, die Kreuzreaktionen mit Antikörpern eingingen, eine spezifische Detektion von ComC konnte auch dann nicht dargestellt werden. Immunoblots von *Acinetobacter* sp. ADP239, der den Wildtyp repräsentiert, und der ComC-Mutante T308 wiesen identische Bandenmuster auf, welche auf unspezifische Kreuzreaktionen des Antiserums zurückzuführen waren.

Obwohl spezifische Antikörper gegen das ComC-Hybridprotein vorlagen, die Markierung von ComC in Zellextrakten jedoch zu keinem Detektionssignal führte, kann an zwei Gründe gelegen haben. Zum einen wies möglicherweise die Faltung des ComC-Fragmentes, welches für die Immunisierung eingesetzt worden war, Unterschiede zu der Tertiärstruktur des von der Zelle synthetisierten ComC auf. Dies führt zur Exposition von unterschiedlichen Epitopen und schließlich zu der Generierung von Antikörpern, die zwar das für die Immunisierung eingesetzte Hybridprotein detektieren, die Epitope des ComC-Proteins aber nicht erkennen. Zum anderen könnte die fehlende Detektion von ComC in den Zelllysaten auf die geringe Konzentration dieses Proteins zurückzuführen sein, welche dann unterhalb der Empfindlichkeit des auf Chemilumineszenz basierenden Detektionssystems liegt.

Um unspezifische Kreuzreaktionen bei der Detektion hoher Zelllysate-Proteinkonzentrationen zu minimieren, könnte sich eine Reinigung des Antiserums bezüglich Anti-ComC-Antikörpern anschließen. Hierzu müßte das Antiserum zuerst im Immunoblot gegen Proteine der ComC-Mutante und darauffolgend dasselbe Serum gegen Proteine des Wildtyps eingesetzt werden. Durch den vorgeschalteten ersten Schritt werden diejenigen Antikörper gebunden, die unspezifische Proteine markieren und des ComC-Signal möglicherweise überlagern.

3.2.3 Überexpression und Reinigung des Kompetenzproteins ComA

Um die Funktion des Proteins ComA bei der natürlichen Transformation von *Acinetobacter* sp. BD413 aufzuklären, seine Lokalisation in der Zelle zu bestimmen und mögliche Proteinassoziationen zu identifizieren, mußte das Protein für die Herstellung von Antikörpern zunächst überexprimiert werden. Da die vermehrte Expression des gesamten Gens aufgrund toxischer Effekte nicht möglich gewesen war, wurde in dieser Arbeit der hydrophile C-Terminus von ComA als Fusionsprotein gereinigt. Als Überexpressionsvektor diente hierfür pMal-c2, wobei das *malE*-Gen, welches für das Maltosebindeprotein MBP codiert, stomaufwärts des *comA*-Genfragments kloniert vorlag.

Zunächst wurde mittels des Primerpaares ComA-*EcoRI*-N2 (5'-GTGGTTCCAGAATTC TGGTCAG-3') und ComA-*XbaI*-C2 (5'-CTGCAACCATCTAGACGACTGACG-3') ein 830 bp-Genfragment des 3'-Ende von *comA* amplifiziert (30 kDa), in die *EcoRI*- und *XbaI*-Schnittstelle von pMal-c2 ligiert, so daß das Plasmid pMA03 entstand. Nach Überprüfung des Inserts durch Sequenzierung wurden Mutationen und Verschiebungen des Leserasters ausgeschlossen. Für die Überexpression erfolgte nach der Transformation von pMA03 in *E. coli* DH5 α die Kultivierung in 250 ml LB-Medium bei 37°C. Bei einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 wurde der vor dem *malE*-Gen lokalisierte *P_{tac}*-Promotor durch Zugabe von IPTG induziert und die Zellen für zwei weitere Stunden inkubiert. Die durch IPTG-Induktion bewirkte Expression des ComA/MalE-Fusionsproteins hatte keine negative Auswirkung auf das weitere Wachstum der Kultur.

Nachdem die Zellen geerntet, gewaschen und durch Ultraschall aufgeschlossen worden waren, wurde die Expression durch SDS-PAGE überprüft. Es zeigte sich im Gel nach der IPTG-Induktion eine intensiv gefärbte Proteinbande von 72 kDa, die vor der Induktion nur sehr schwach zu erkennen gewesen war (Abb. 3.6). Dieses Protein setzte sich aus dem 42 kDa-Maltosebindeprotein und dem 30 kDa-ComA-Fragment zusammen. Die Fraktionierung des Zelllysats in partikuläre Bestandteile (Zelltrümmer/Membranen) und lösliche cytoplasmatische Bestandteile ließ weiterhin erkennen, daß sich das 72 kDa-ComA-Fusionsprotein im Sediment befand; die lösliche Fraktion dagegen enthielt dieses Protein nicht. Demzufolge bildete sich während der Überexpression Einschlusskörper, die im Folgenden gelöst werden mußten. Hierfür wurde das Sediment mit 6 M Harnstoff behandelt, so daß die Fusionsproteine denaturiert in Lösung gingen. Durch Dialyse erfolgte daraufhin die Entfernung des Harnstoffs und somit eine Rückfaltung der Proteine, was für die Aufreinigung des gewünschten Proteins über die Bindung an die Amylose-Matrix notwendig war.

Die Aufreinigung des ComA/MalE-Fusionsproteins basierte auf der hohen Bindungsaffinität des MBP (Maltosebindeproteins) zum Amylose-Säulenmaterial. Entsprechend der Bindekapazität des Säulenmaterials wurde die Säule mit dem dialysierten, renaturierten Protein beladen und anschließend gewaschen. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit Maltose-haltigem Phosphat-Saline-Puffer (PBS). Auf diese Art konnten aus 250 ml Kultur ca. 3 ml Eluat mit einer Proteinkonzentration von 400 μ g/ml gewonnen werden. Obwohl nach der Reinigung über die Amylose-Matrix neben dem gewünschten Fusionsprotein weitere Banden mit geringerer molekularer Masse im SDS-Gel zu erkennen waren, erwies sich das Eluat als sauber (Abb. 3.6). Mit Hilfe von Anti-MBP-Antikörpern konnte in Immunoblots gezeigt werden, daß es sich bei diesen Banden ausschließlich um Abbruchfragmente des MBP handelte, die wie das Fusionsprotein an das Säulenmaterial gebunden waren und mit Maltose eluierten (Abb. 3.6).

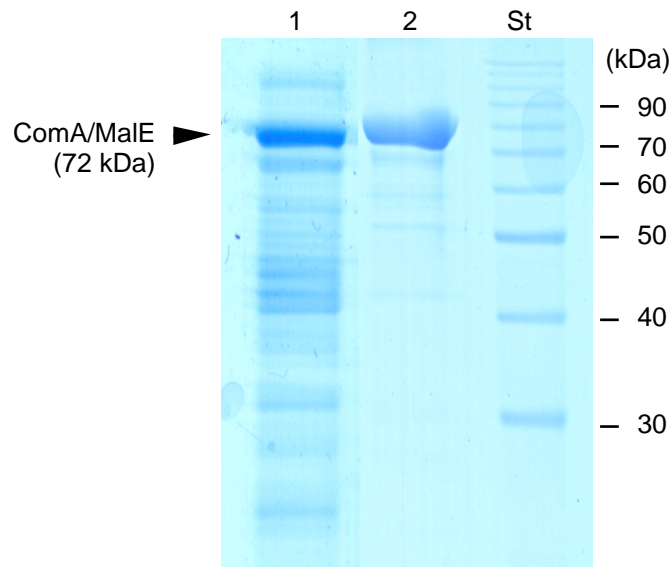


Abb. 3.6: Aufreinigung des überexprimierten ComA/MalE-Fusionsproteins mittels Amylose-Affinitätschromatographie. Im SDS-Gel wurden die partikuläre Fraktion (Spur 1) und das gereinigte Fusionsprotein (Spur 2) aufgetragen.

3.2.4 Untersuchungen zur spezifischen Bindung der Anti-ComA-Antikörper

Für Lokalisationsstudien von ComA in den Zellkompartimenten von *Acinetobacter* sp. BD413 sollte die Nachweismethode über Markierung des gewünschten Proteins mit spezifischen Antikörpern genutzt werden. Die Generierung von Anti-ComA-Antikörpern erfolgte über die Immunisierung eines Kaninchens mit dem überexprimierten und aufgereinigten ComA/MalE-Fusionsprotein. Hierdurch konnte nach zwei Monaten Antiserum gewonnen werden, welches für mehrere Tests, wie z.B. ELISAs (‘enzyme linked immunoabsorbent assay’), ‘Dotblots’ und ‘Immunoblots’ mit dem aufgereinigten ComA/MalE-Fusionsprotein sowie *Acinetobacter* sp. BD413-Zellextrakt und äußere und innere Membranfraktionen eingesetzt wurde. Es zeigte sich dabei, daß das Antiserum einen hohen Titer an spezifischen Antikörpern gegen das aufgereinigte ComA/MalE-Fusionsprotein sowie ebenso gegen das abgespaltene ComA-Proteinfragment enthält. 0,1 µg des Hybridproteins (nach Spaltung mit dem Faktor Xa) konnte mit Antiserum nachgewiesen werden, welches in einem Volumen von 10 ml 1:75 000 verdünnt wurde. Mit 1:25 000 verdünntem Antiserum konnte eine minimale Hybridproteinmenge (nach Spaltung mit dem Faktor Xa) von 7,5 ng detektiert werden.

Obwohl spezifische Antikörper vorlagen, konnten ComA jedoch in *Acinetobacter* nicht nachgewiesen werden. Die elektrophoretische Auftrennung hoher Proteinmengen von

Zelllysaten oder Membranfraktionen und die Detektion mit ansteigender Konzentration von Anti-ComA-Antiserum führten im Immunoblot lediglich zu Kreuzreaktionen, eine spezifische Detektion von ComA konnte nicht dargestellt werden. Immunoblots von *Acinetobacter* sp. ADP239, der den Wildtyp repräsentierte, und der *comA*-Mutante T701 wiesen identische Bandenmuster unspezifisch detekierter Proteine auf. Da die Detektion auf der Höhe des zu erwartenden ComA-Signals bei 90-95 kDa keine Signale erkennen ließ, konnte eine Überlagerung eines ComA-Signals durch unspezifische Kreuzreaktionen ausgeschlossen werden.

Das Vorliegen spezifischer Antikörper gegen das ComA-Proteinfragment und das negative Ergebnis der immunologischen Markierung von ComA in Zellextrakten spiegelt die Problematik der Detektion von ComC wider (3.2.2). Wie für ComC und das dafür generierte Antiserum bereits diskutiert, liegen die Gründe der fehlenden Detektion von ComA in der Zelle möglicherweise in der zum nativen ComA unterschiedlichen Faltung des ComA-Fragmentes als Bestandteils des Male-Fusionsproteins oder an einem zu geringen ComA-Gehalt in der Zelle.

3.3 Identifizierung weiterer Kompetenzgene in *Acinetobacter* sp. BD413

Die Untersuchungen von Transformationssystemen unterschiedlicher Bakterien haben ergeben, daß sie ähnliche Komponenten einschließen, ungeachtet der phylogenetischen Distanz dieser Bakterien. Für bereits vollständig sequenzierte Genome von Organismen besteht somit die Möglichkeit durch Sequenzabgleiche nach potentiellen konservierten Kompetenzproteinen zu suchen. Da die komplette genomische Sequenz von *Acinetobacter* sp. BD413 seit kurzem vorliegt und uns zugänglich ist, eröffnet sich somit die Möglichkeit weitere potentielle Kompetenzgene im *Acinetobacter*-Genom zu identifizieren.

3.3.1 Identifizierung des *comEA*-Gens in *Acinetobacter* sp. BD413

Ein DNA-bindendes Kompetenzprotein wurde in *Bacillus subtilis* (ComEA), *Streptococcus pneumoniae* (ComEA) sowie in *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* (ComE) identifiziert und charakterisiert (CHEN & GOTSCHLICH 2001, PROVVEDI & DUBNAU 1999). Während ComEA der Gram-positiven Organismen neben der basischen N-terminalen Domäne, die DNA-Bindung vermittelt, einen C-terminalen hydrophoben Bereich aufweist, der die Verankerung des Proteins in der Zellmembran vermittelt, besteht ComE aus *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* allein aus

der basischen Domäne. Da die Transformationssysteme untereinander homolog sind, war es sehr wahrscheinlich, daß *Acinetobacter* sp. BD413 ein zu ComE bzw. ComEA äquivalentes Protein besitzt.

Über den Aminosäuresequenz-Abgleich der DNA-bindenden Kompetenzproteine ComEA (C-Terminus) bzw. ComE mit den abgeleiteten Proteinen des Chromosoms von *Acinetobacter* sp. BD413 konnte ein ORF identifiziert werden, dessen abgeleitete Aminosäure-Sequenz zu 55% bzw. 52% identisch und zu 71% bzw. 70% ähnlich zu ComEA (C-Terminus) bzw. ComE war. Dieser ORF aus *Acinetobacter* sp. BD413 wurde *comEA* genannt. Wie ComE aus *Neisseria gonorrhoeae* weist ComEA aus BD413 einen basischen DNA-bindenden Bereich auf, der aus zwei konservierten 'Helix-turn-Helix'-Motiven besteht (Abb. 3.7). Diese beiden Sequenzabschnitte umfassen jeweils 20 Aminosäuren, die in charakteristischer Weise die basische Aminosäure Lysin tragen und somit zu dem anhand der Aminosäure-Zusammensetzung ermittelten basischen pI-Wert von 10,5 beitragen. Bei ComE aus *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* weist das prozessierte Protein nach der Abspaltung eines 19 Aminosäure-Signalpeptids eine molekulare Masse von 8 kDa auf (CHEN & GOTSCHLICH 2001). Eine derartige potentielle Prozessierungssequenz von $_{+1}$ VNINxA ist ebenso bei ComEA von *Acinetobacter* sp. BD413 zu finden (Abb. 3.7), so daß für das prozessierte Protein eine errechnete molekulare Masse von 7,6 kDa postuliert werden konnte.

1	MSIRHFF--TFFWA-----TLL--T-----	<i>Acin. sp. BD413</i>
1	VTAKHPFRKPPIIRG-----FLLCPEK-----	<i>N. meningitidis</i>
1	MNWL NQHKKATILASA AVFTAIMIFLATGKNKEPVKQAVPTETENTVVKQEANDESNE	<i>B. subtilis</i>
17	--LFSM--QIVFAQGFDDQYDAWK TQ-----QKAHDTRLN SS---ASHHSLSKPTQ	<i>Acin. sp. BD413</i>
23	--MSGM--AGQYP--YGVRSGLRRNG-----LKLWDIHFRMTRFIVARCGLLFATL	<i>N. meningitidis</i>
61	TIVIDIKGA VQHPGVYEMRTGDRV SQAIEKAGGTSEQADEAQVNLAEILQDGTVVYIPKK	<i>B. subtilis</i>
61	QSGTGVK-----▼VNINSATAKE LQQLHGVGEKKA LAIVEYRQYQYGFKA	<i>Acin. sp. BD413</i>
68	KGKTMKMFVLF CMLFSCAFSLAAVNINAASQQL EALPGI GPAKAKAI AEYRAQNGAFK	<i>N. meningitidis</i>
121	GEETA VQQGGG SVQS DGG-KGAL VNINTAT LEE LQGISGVGPSKA EAI IA YRE ENGRFQ	<i>B. subtilis</i>
104	SVDDLQKVKGI GPKFI EKNRDLRLA IZ	<i>Acin. sp. BD413</i>
128	SVDDLTKVKGI GPAVLAKL KDQASVGAPAPK GPAKPALPAKK	<i>N. meningitidis</i>
180	TIEDITKVS GIGEKSF EKI KSITV-----K	<i>B. subtilis</i>

Abb. 3.7: Sequenzabgleich des Proteins ComEA von *Acinetobacter* sp. BD413 (nach 'Clustal'). ComEA aus BD413 zeigt Ähnlichkeiten zu DNA-bindenden Kompetenzproteinen aus *Neisseria meningitidis* (ComE) und *Bacillus subtilis* (ComEA). Die Pfeilspitze markiert die Prozessierungsstelle. Die unterstrichenen Bereiche markieren 'Helix-turn-Helix'-Motive für die DNA-Bindung.

Das Genom von *Neisseria gonorrhoeae* weist vier Kopien des DNA-bindenden Proteins ComE auf, dessen Gene in der Zelle exprimiert werden (CHEN & GOTSCHLICH 2001). Um einen vollständigen Transformationsdefekt zu erzeugen, mußten demzufolge die vier *comE*-Gene gemeinsam unterbrochen werden. Nach den Homologiestudien liegt in *Acinetobacter* sp. BD413 dagegen nur ein potentiellen *comEA*-ähnliches Gen vor. Betrachtet man die chromosomale Lage dieses Gens, so finden sich keine Parallelen zu genomischen Lokalisationen von Genen, die für DNA-bindende Kompetenzproteine codieren. ComEA aus BD413 wird stromaufwärts von einem MazG-ähnlichen Protein und einer potentiellen Reduktase/Dehydrogenase flankiert. Stromabwärts liegen Gene, dessen Produkte für eine mögliche Poly(A)-Polymerase und eine Pyrophosphokinase codieren. Im Vergleich dazu liegen die vier *comEs* aus *Neisseria gonorrhoeae* stromabwärts von rRNA-Operonen (CHEN & GOTSCHLICH 2001).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß *Acinetobacter* sp. BD413 einen ORF besitzt, dessen Genprodukt Ähnlichkeiten zu identifizierten und charakterisierten DNA-bindenden Kompetenzen aufweist. Diese Gen liegt auf dem Chromosom von BD413 als einzige Kopie vor.

3.3.2 Unterbrechung des Kompetenzgens *comEA* aus *Acinetobacter* sp. BD413

Die Unterbrechung des über Datenbank-Abgleiche identifizierte *comEA* im Genom von ADP239 sollte klären, ob es sich bei diesem Gen tatsächlich um ein Kompetenzgen handelte. Da für das Einfügen des *nptII*-Markers in das gewünschte Gen nur die *SspI*-Schnittstelle in Frage kam, mußte vor der Klonierung dieses Genbereichs die *SspI*-Schnittstelle im Vektor pUC18 entfernt werden. Da die *SspI*-Schnittstelle glatte DNA-Enden liefert, wurde für die Eliminierung dieser Schnittstelle ein DNA-Fragment hineinkloniert. Dazu wurde die Streptomycin-Kassette mit *EcoRV/HincII* aus pBS01 in die *SspI*-Schnittstelle von pUC18 ligiert, so daß der Vektor pUS01 entstand, der daraufhin sowohl eine Ampicillin- als auch eine Streptomycin-Resistenz besaß (Abb. 3.8).

Nach der Amplifizierung des *comEA* an der chromosomalen BD413-DNA mittels der Primer-ComEA-*PstI* NA1.2 (5`-CTAAGTGAGTTTGAAGCTGCAGTGCATAAG-3`) und ComEA-*XbaI*-CB4 (5`-GTCGATAACCCACATCTAGACGCGCGCAAG-3`) wurde das 750 bp PCR-Produkt mit *PstI* und *XbaI* in pUS01 kloniert, woraus das Plasmid pUD08 entstand (Abb. 3.8). In die *SspI*-Schnittstelle des Inserts konnte daraufhin der *nptII*-Marker gesetzt werden. Dazu wurde der Marker mit *PstI* aus dem Plasmid pUC4K geschnitten, mit Klenow-Enzym behandelt und mit glatten Enden in die *SspI*-Schnittstelle ligiert. Aus dem

entstandene Plasmid pUD09 konnte das mit dem Kanamycin-Gen unterbrochene Insert mit *PstI/XbaI* herausgeschnitten und in *Acinetobacter* sp. ADP239 transformiert werden. Über die den Marker flankierenden Bereiche von 470 bzw. 280 bp fand eine Rekombination in das gewünschte Gen statt, woraus der Stamm T100 resultierte.

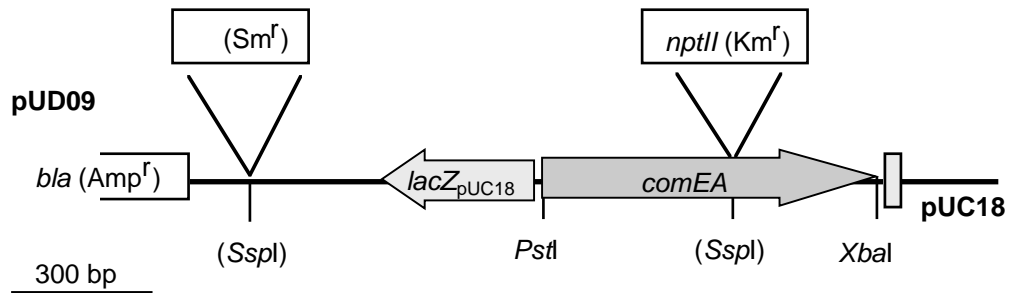


Abb. 3.8: Plasmidkonstruktion für die Unterbrechung von *comEA*. In die *SspI*-Schnittstelle von pUC18 wurde zunächst zur Eliminierung dieser Schnittstelle die Streptomycin-Kassette aus pBS01 mit *EcoRI* und *HincII* kloniert, woraus pUS01 resultierte. Nach der Amplifikation des *comEA*-Gens wurde das PCR-Produkt mit *PstI* und *XbaI* in die MCS des Vektors kloniert (pUD08) und zur Unterbrechung des Gens der *nptII*-Marker in die *SspI*-Schnittstelle ligiert (pUD09). Die Resistenzgene sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Das *lacZ*-Gen von pUC18 gibt die Leserichtung des vektoreigenen Promotors an. Die in Klammern dargestellten Schnittstellen können nicht mehr restriktionsverdaut werden.

Die Überprüfung der einmaligen und homologen Integration des Resistenzmarkers fand über einen SOUTHERN Blot statt. Hierfür wurde die isolierte chromosomale DNA des Stammes T100 mit *EcoRV* bzw. mit *HincII* verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einer Kanamycin-Sonde hybridisiert. Die beiden relevanten *EcoRV*-Schnittstellen schlossen vor der Mutagenisierung im ADP239-Chromosom einen DNA-Bereich von 2,0 kb ein. Mit dem eingefügten Kanamycin-Marker von ca. 1,2 kb ergaben sich daraufhin 3,2 kb (Abb. 3.9, Spur 1). Für die *HincII*-geschnittene chromosomale DNA vergrößerte sich die Basenpaaranzahl entsprechend von ursprünglich 2,4 kb auf 3,6 kb (Abb. 3.9, Spur 2). Diese detektierten DNA-Fragmentlängen bestätigte die richtige Integration des *nptII*-Markers ins Zielgen.

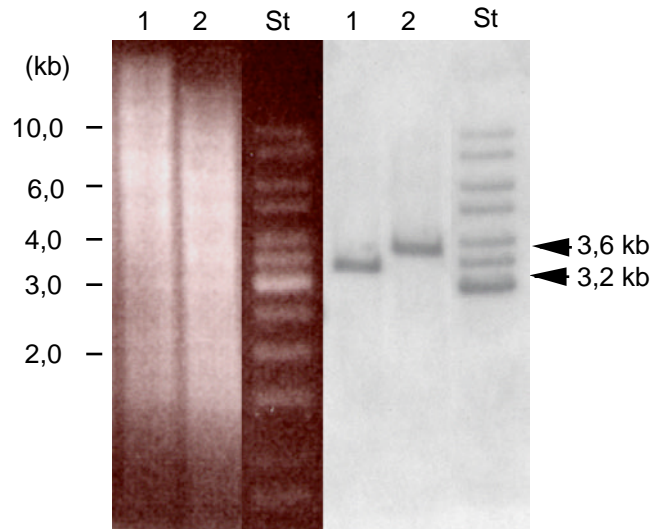


Abb. 3.9: SOUTHERN Hybridisierung restriktionsverdauter DNA der *comEA*-Mutante T100 gegen eine Kanamycin-Sonde. Die isolierte chromosomale DNA von *Acinetobacter* sp. T100 wurde mit *EcoRV* (Spur 1) und *HincII* (Spur 2) geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt und nach dem Blot mit einer Kanamycin-Sonde hybridisiert. Die Sonde hybridisierte unspezifisch mit der DNA des Größenstandards (St) im Bereich von 3-10 kb. Auf der linken Seite ist das Ethidiumbromid-gefärbte Gel und auf der rechten der SOUTHERN Blot dargestellt.

3.3.3 Transformationstest der *comEA*-Mutante T100

Die Überprüfung der erhaltenen Mutante T100 auf ihre Fähigkeit zur natürlichen Transformation erfolgte im Transformationsschnelltest (2.7.2.3). Für diesen Test wurde die mit Zellsuspension benetzte Impföse durch einen Tropfen chromosomaler BD413-DNA gezogen, der sich auf einer Mineralmedium/*p*-Hydroxybenzoat-Agarplatte befand. Abbildung 3.11 zeigt in Spur 1, daß sich nach dem Passieren des DNA-Tropfens beim Kontrollstamm ADP239 Wachstum einstellte. Die generierte Mutante T100 mit einer Unterbrechung in *comEA* (ein Abkömmling des Stammes ADP239) wuchs auch nach Kontakt mit BD413-DNA nicht auf *p*-Hydroxybenzoat, was den *pobA*-Defekt demonstrierte und auf einen Transformationsdefekt schließen ließ (Abb. 3.11, Spur 2). Demzufolge mußte in der generierten Mutante T100 ein Kompetenzgen unterbrochen worden sein.

Um zu zeigen, daß der Verlust der natürlichen Kompetenz auf den Defekt in der *ComEA*-Synthese zurückzuführen war und nicht auf einen durch das Kanamycin-Gen verursachten polaren Effekt auf stromabwärts liegende Gene, sollte der Stamm T100 mit dem intakten *comEA*-Gen *in trans* komplementiert werden. Als Vektor diente pRK415, in

welchen das *PstI/XbaI*-Insert (*comEA*) aus pUD08 (Abb. 3.8) kloniert wurde, wobei durch die Auswahl der Schnittstellen für die Klonierung die Leserichtung von *comEA* entgegen dem Vektor-eigenen *lacZ*-Promotor liegen mußte. Aus diesem Grund konnten die Restriktionsschnittstellen *PstI* und *XbaI* in pRK415 nicht für eine direkte Integration des *comEA* als *PstI/XbaI*-Insert genutzt werden. Das *comEA*-Insert in dem resultierenden Plasmid pKD11 besaß am 5'-Ende die intakte *PstI*-Schnittstelle; am 3'-Ende wurde hingegen die *XbaI*-Schnittstelle mit Klenow-Enzym aufgefüllt und mit glatten DNA-Enden in den Vektors pRK415 ligiert (Abb. 3.10). Dafür wurde zuvor der Vektor mit *HindIII* geschnitten, mit Klenow-Enzym behandelt, sowie schließlich mit *PstI* verdaut. Nachdem pKD11 konjugativ in *Acinetobacter* sp. T100 übertragen worden war, konnte mit diesem Stamm der Transformations Schnelltest durchgeführt werden.

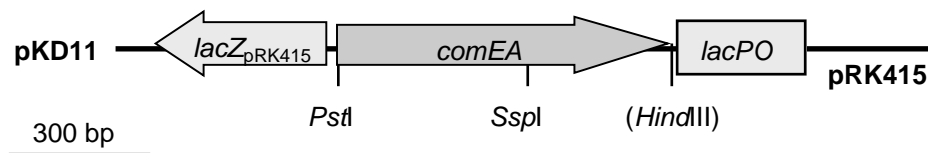


Abb. 3.10: Plasmidkonstruktion von pKD11. pRK415 wurde mit *HindIII* geschnitten, mit Klenow-Enzym behandelt und daraufhin mit *PstI* verdaut. Für die Klonierung von *comEA* in den geschnittenen pRK415 wurde pUD08 zunächst mit *XbaI* geschnitten, mit Klenow-Enzym behandelt und schließlich mit *PstI* verdaut. Nach der Ligation in pRK415 lag das *comEA*-Gen entgegen der Leserichtung des vektoreigenen *lacZ*-Promotors. Die gezeigte *HindIII*-Schnittstelle kann aufgrund der vorangegangenen Behandlung mit Klenow-Enzym nicht mehr geschnitten werden.

Die transformationsdefekte Mutante T100, die nach dem Kontakt mit BD413-DNA kein Wachstum auf *p*-Hydroxybenzoate zeigte, regenerierte die natürliche Kompetenz durch den Besitz des *comEA*-tragenden Plasmids pKD11 (Abb. 3.11), was bestätigte, daß allein die Mutation in *comEA* zu dem Transformationsdefekt führte.

Nach diesen Untersuchungen ließ sich zeigen, daß die gezielte Unterbrechung von *comEA* einen vollständigen Transformationsdefekt zur Folge hatte und daß es sich bei diesem Gen um ein Kompetenzgen handelt. Die erfolgreiche Komplementation des Defektes zeigte weiterhin, daß vor *comEA* eine Promotorstruktur liegt und der Transformationsdefekt nicht auf einen polaren Effekt auf stromabwärts liegende Gene beruhte.

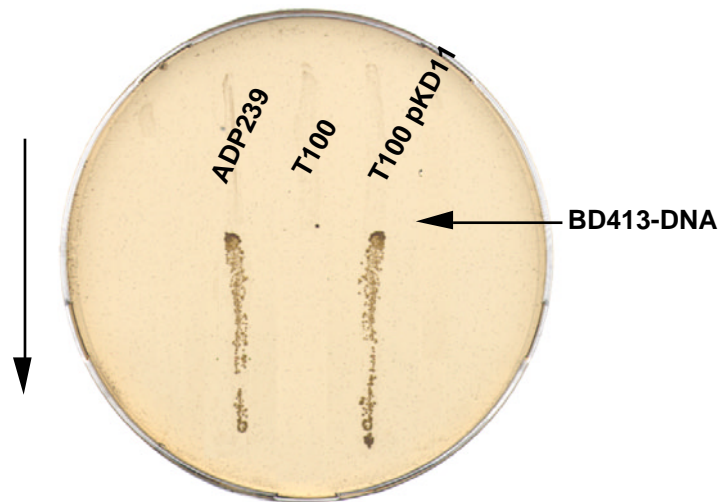


Abb. 3.11: Transformationstest der *comEA*-Mutante *Acinetobacter* sp. T100. Da ADP239 und die generierte Mutante T100 einen Defekt im *pobA*- (Hydroxybenzoat-Hydroxylase-) Gen besitzen, wachsen die Stämme nicht auf *p*-Hydroxybenzoat. Nach dem Passieren der Impföse durch einen Tropfen chromosomale DNA von *Acinetobacter* sp. BD413 findet bei der Fähigkeit zur natürlicher Transformation Wachstum statt. Der senkrechte Pfeil gibt die Richtung der ausplattierten Zellen an.

3.3.4 Transkriptionale Regulation von *comEA*

Die bisher untersuchten Kompetenzproteine ComA, ComB, ComC, ComE, ComF und ComP werden auf transkriptionaler Ebene auf ähnliche Weise reguliert, wobei die Expression mit dem Überimpfen in frisches Succinat-Mineralmedium auf ein niedriges Niveau abfällt, um mit dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase wieder anzusteigen (HERZBERG *et al.* 1999, PORSTENDÖRFER *et al.* 2000, FRIEDRICH *et al.* 2001). Demgegenüber wird die maximale Transformationsfrequenz erst kurz nach dem Überimpfen in frisches Medium erreicht. Im Folgenden sollte überprüft werden, inwieweit die Expression des Kompetenzgens *comEA* entsprechend der bereits charakterisierten Kompetenzgene aus *Acinetobacter* sp. BD413 oder entsprechend des Verlaufs der Transformationsfrequenz reguliert wird. Weiterhin sollte die Expressionsrate Hinweise auf den Gehalt von ComEA in der Zelle liefern.

Mit Hilfe des *lacZ*-Reportergens, dessen Genprodukt – eine β -Galaktosidase – im optisch enzymatischen Test quantifiziert werden konnte, wurde Wachstumsphasen-abhängig die vom *comEA*-Promotor ausgehende Transkription verfolgt. Das dafür eingesetzte *lacZ* lag im Vektor pBK mit Ribosomen-Bindestelle aber ohne eigenen Promotor vor. In die stromaufwärts zum *lacZ*-Gen liegenden Restriktionsschnittstellen

EcoRI und *XbaI* wurde unter Entfernung des *gusA*-Reportergens das aus dem Plasmid pUD08 stammende *PstI/SstI*-Fragment, welches das 5'-Ende von *comEA* enthielt, mit glatten DNA-Enden ligiert. Vor dem ersten potentiellen ATG-Startcodon, welches eine 66 Aminosäuren lange Signalsequenz liefert, liegen 260 bp, die das 3'-Ende (253 bp) des stromaufwärts von *comEA* lokalisierte Gen beinhaltet. Neben dem ersten ATG von *comEA* sind weiterhin 60 bp stromabwärts ein ATG und 42 bp, 45 bp, 138 bp sowie 165 bp ein potentielles TTG-Startcodon lokalisiert. Anhand der Basensequenz kann kein eindeutiger Transkriptionsstart vorhergesagt werden.

Diejenigen *PstI/SstI-comEA*-Genfragmente, die die richtige Orientierung in dem resultierenden Plasmid pBD10 hatten, bewirkten eine Blaufärbung der auf X-Gal-LB-Medium gewachsenen *E. coli*-Kolonien.

Für die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurde das Plasmid pBD10 in *Acinetobacter* sp. ADP239 konjugativ übertragen. Als Kontrolle diente der Vektor pBK. Eine damit durchgeführte Nullwertbestimmung in *Acinetobacter* sp. ADP239 ergab keine meßbare β -Galaktosidaseaktivität. Deshalb konnte im folgendem Versuch die gemessene Aktivität auf die stromabwärts des *comEA*-Promotors klonierte β -Galaktosidase zurückgeführt werden. Aufgrund der im Vergleich zu dem chromosomal lokalisierten *comEA* höheren Kopienzahl des eingesetzten Plasmids pBD10, ließ sich die gemessene Aktivität nicht unmittelbar in eine absolute Transkriptionsrate übertragen. Sie ermöglicht in erster Linie Aussagen darüber, inwiefern ein Gen unter bestimmten Bedingungen und in welcher Relation zu anderen Genen exprimiert wird.

Zur Messung der Wachstumsphasen-abhängigen Transkription wurden 50 ml Succinat-Mineralmedium mit einer ausgewachsenen Vorkultur inokuliert und bei 30°C schüttelnd inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und das Kulturwachstum über die optische Dichte verfolgt. Für die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurde so viel Probenvolumen entnommen und eventuell durch Zentrifugation konzentriert, daß schließlich in jeder Probe eine optische Dichte (600 nm) von 5 resultierte. Die Enzymaktivität wurde nach MILLER (1972) durch Umsetzung von *o*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) zu *o*-Nitrophenol pro Zeit und pro Zelldichte bestimmt. Die Zeit der Inkubation und die Zelldichte wurde in dem Versuch für alle Proben konstant gehalten, so daß sich die Gelbfärbung durch die Entstehung von *o*-Nitrophenol zu den ermittelten MILLER-Units direkt proportional verhielt.

Für *comEA* zeigte sich vor dem Überimpfen der ausgewachsenen Vorkultur in frisches Medium und in der stationären Wachstumsphase maximale β -Galaktosidaseaktivität von 140 MILLER-Units, die während der lag-Phase und des beginnenden exponentiellen Wachstums auf ein Grundniveau von 70 MILLER-Units

abnahm (Abb. 3.12). Zum Ende des exponentiellen Wachstums bis hin zur späten stationären Phase stieg der Wert langsam wieder auf den maximalen Wert.

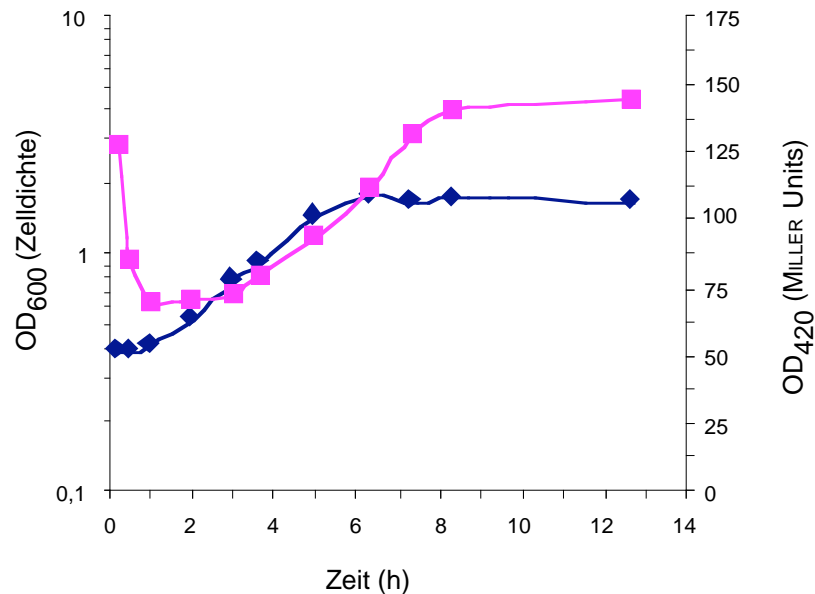


Abb. 3.12: Expression des Kompetenzgens *comEA*. Die Promotoraktivität von *comEA* wurde als *lacZ*-Transkriptionsfusion im Verlauf einer statischen Kultur in Succinat-Mineralmedium (◆) bestimmt. Die Promotorregionen wurden jeweils vor das *lacZ*-Gen kloniert und die β -Galaktosidaseaktivität im enzymatischen Test gemessen (■).

Die β -Galaktosidase-Aktivitätsmessung ergab, daß *comEA* Wachstumsphasenabhängig exprimiert wird, so daß von einer Regulation auf Transkriptionsebene ausgegangen werden kann. Verglichen zu den bereits untersuchten Kompetenzgenen *comA*, *-B*, *-E*, *-F* und *comP* aus *Acinetobacter* sp. D413 zeigte *comEA* einen identischen wachstumsphasenabhängigen Verlauf der Expression.

3.4 Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion des Kompetenzproteins ComEA

In natürlich transformierbaren Bakterien erfolgt nach der Kompetenzinduktion die Synthese des DNA-Aufnahmeapparates, der die freie DNA durch die Zellhülle schleust. Der erste Schritt dieses Transportvorganges besteht zunächst in der Bindung der DNA an die Zelloberfläche. DNA-bindende Kompetenzproteine wurden bereits in *Bacillus subtilis* (ComEA), *Streptococcus pneumoniae* (ComEA) sowie in *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* (ComE) identifiziert und charakterisiert (CHEN & GOTSCHLICH

2001, PROVVEDI & DUBNAU 1999). Mit *comEA* konnte in *Acinetobacter* sp. BD413 ein ähnliches Kompetenzgen identifiziert werden, welches als einmalige Kopie im Chromosom vorliegt und eine essentielle Funktion bei der natürlichen Transformation ausübt.

Nach der genetischen Untersuchung des *comEA*-Gens sollte nun eine Charakterisierung des Genproduktes auf proteinchemischer Ebene folgen, was die Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen ComEA und die Überprüfung der DNA-bindenden Eigenschaft beinhaltete.

3.4.1 Überexpression und Aufreinigung von ComEA

Die Untersuchung der Funktion von ComEA bei der DNA-Aufnahme, die Bestimmung seiner Lokalisation und der Nachweis von Proteininteraktionen setzt die Generierung von Antikörpern voraus.

Aufgrund der Ähnlichkeit von ComEA aus *Acinetobacter* sp. BD413 zum Kompetenzprotein ComE aus *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* konnte eine Signalsequenz für ComEA aus BD413 postuliert werden (3.3.1). Da Signalsequenzen i.d.R. beim Transport durch die Cytoplasmamembran abgespalten werden und aus diesem Grund keine Domäne des funktionsfähigen Proteins in seinem Zielkompartiment darstellen, wurde ComEA ohne das Signalpeptid überexprimiert. Die anhand der Aminosäuresequenz errechnete molekulare Masse des prozessierten ComEA-Proteins beträgt 7,6 kDa. Da für eine optimale Immunantwort ein Polypeptid eine minimale Molmasse von 20 kDa aufweisen sollte, wurde das Maltosebindeprotein (MBP)-Fusionssystem genutzt. Hierfür wurde das Gen des Zielproteins im Leseraster stromabwärts von *malE* des Überexpressionsvektors pMal-c2 kloniert. ComEA - fusioniert mit MalE (42 kDa) - besaß als immunogenes Antigen eine errechnete molekulare Masse von 49 kDa. Nach der Expression konnte über die MalE-Komponente das Fusionsprotein an eine Amylose-Affinitätssäule selektiv gebunden und schließlich mit Maltose eluiert werden.

Für die Klonierung in pMal-c2 wurde zunächst derjenige 330 bp *comEA*-Genbereich mit den Primern ComEA-*EcoRI*-NB3 (5`-CTGGCACTGGGGTGGAAATTC AATATTAAC-3`) und ComEA-*XbaI*-CB4 (5`-GTCGATAACCCACATCTAGA CGCGCGCAAG-3`) an der chromosomalen DNA des Stammes BD413 amplifiziert, welcher nach der Translation das prozessierte Protein lieferte. Die als Primer eingesetzten Oligonukleotide enthielten die Schnittstellen *EcoRI* und *XbaI*, was die spezifische Ligation unter Berücksichtigung des *malE*-Leserasters mit dem ebenso geschnittenen Vektor

erlaubte. Das dabei entstandene Plasmid pMD05 konnte nach der Transformation in *E. coli* DH5 α für die Überexpression eingesetzt werden.

Vorversuche zur Überexpression belegten, daß sich das gewünschte Protein ausschließlich in der löslichen Zellfraktion befand, doch nur in relativ geringer Mengen gebildet wurde. Um dennoch genügend Fusionsprotein für eine Immunisierung zu erhalten, wurden 9 l Zellkultur angezogen. Hierfür wurde *E. coli* DH5 α pMD05 in 3x3 l LB-Medium (Kluyver-Kolben) bei 37°C bis zu einer OD von 0,7-0,8 angezogen, der vor dem *malE*-Gen lokalisierte *P_{tac}*-Promotor durch Zugabe von IPTG induziert und die Zellen für zwei weitere Stunden inkubiert. Die durch die IPTG-Induktion bewirkte Expression des Male/ComEA-Fusionsproteins hatte keine negative Auswirkung auf den weiteren Verlauf des Wachstums der Kultur.

Nachdem die Zellen gewaschen und resuspendiert in 300 ml Säulenpuffer durch Ultraschall aufgeschlossen worden waren, wurde die Überexpression durch SDS-PAGE überprüft. Die Induktion lieferte nach der Auftrennung im SDS-Gel eine Proteinbande von ca. 49 kDa, die vor der IPTG-Behandlung nicht sichtbar gewesen war. Dieses Protein setzte sich aus dem 42 kDa-Maltosebindeprotein und dem 7,0 kDa-ComEA-Protein zusammen. Das Fusionsprotein lag in gelöster Form im Cytoplasma und nicht zusammengelagert in Einschlusskörpern vor, die gemeinsam mit Membranen und Zelltrümmern nach der Ultrazentrifugation in der partikulären Fraktion sedimentiert worden wären (Abb. 3.13).

Die Aufreinigung des Male/ComEA-Fusionsproteins basiert auf der hohen Bindungsaffinität des Maltosebindeproteins zur Amylose-Matrix. Entsprechend der Bindekapazität wurde das Amylose-Material zu der löslichen Fraktion des Zellaufschlusses gegeben, im Meßzylinder sedimentiert, gewaschen und schließlich mit Maltose-haltiger PBS eluiert. Auf diese Weise konnten aus 9 l Kultur 6 ml Eluat mit einer Proteinkonzentration von 120-150 μ g/ml gewonnen werden. Da diese Konzentration für eine Immunisierung nicht ausreichte, wurde das Eluat in Centriprep-Röhrchen auf ein Volumen von 2 ml mit 400 μ g/ml eingengt. Die Überprüfung der Aufreinigung des Male/ComEA-Fusionsproteins in einer SDS-PAGE lieferte die Gewißheit, daß alle Fremdproteine abgetrennt worden waren; nur die 49 kDa-Proteinbande war nach Färbung mit Silbernitrat erkennbar (Abb. 3.13, Spur 3).

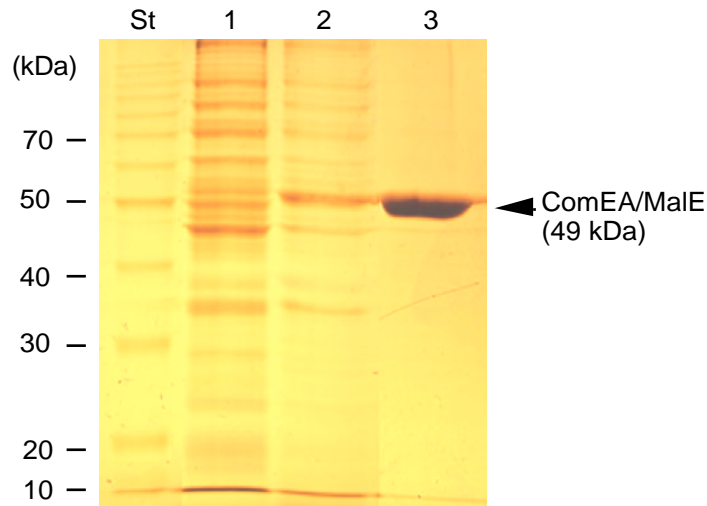


Abb. 3.13: Aufreinigung des überexprimierten ComEA/MalE-Fusionsproteins mittels Amylose-Affinitätschromatographie. In einer SDS-PAGE wurden die partikuläre Fraktion (Spur 1), die lösliche Fraktion (Spur 2) und das gereinigte Fusionsprotein (Spur 3) aufgetragen.

Für die Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen ComEA wurde ein Kaninchen mit insgesamt 600 μ g Fusionsprotein immunisiert. Da ComEA mit einer molekularen Masse von 7,6 kDa zu klein war und folglich nicht immunogen genug gewesen wäre, wurde das Fusionsprotein für die Immunisierung nicht mit dem Faktor Xa gespalten, sondern vollständig injiziert. Das so gewonnene Antiserum enthielt demnach Antikörper gegen ComEA und das Maltosebindeprotein MalE.

3.4.2 Untersuchungen zur spezifischen Bindung der Anti-ComEA-Antikörper

Lokalisationsstudien von ComEA in den Zellmembranen von *Acinetobacter* sp. BD413 sollten über immunologische Verfahren mittels spezifischer Antikörper durchgeführt werden. Das durch die Immunisierung eines Kaninchens mit dem ComEA/MalE-Fusionsprotein hergestellte Antiserum wurde für ELISAs (‘enzyme linked immunoabsorbent assay’), ‘Dotblots’ und ‘Immunoblots’ mit dem aufgereinigten ComEA/MalE-Fusionsprotein, *Acinetobacter* sp. BD413-Zellextrakt sowie äußerer und innerer Membranfraktionen eingesetzt. Es zeigte sich dabei, daß das Antiserum einen hohen Titer an spezifischen Antikörpern gegen das aufgereinigte ComEA/MalE-Fusionsprotein sowie ebenso gegen das abgespaltene ComEA-Proteinfragment enthielt, was das Vorliegen von spezifischen Antikörpern gegen ComEA demonstrierte. 0,2 μ g von ComEA des mit dem Faktor Xa gespaltenen Hybridproteins konnte nach der Auftrennung

in einer SDS-PAGE in einem Immunoblot mit Antiserum nachgewiesen werden, welches in einem Volumen von 10 ml 1:70 000 verdünnt wurde. Mit 1:25 000 verdünntem Antiserum konnte eine minimale ComEA-Menge von 10 ng detektiert werden. Das von *Acinetobacter* synthetisierte ComEA konnte auch nach elektrophoretischer Auftrennung hoher Proteinkonzentrationen (bis 10 μ g Protein) dennoch nicht detektiert werden.

Das Vorliegen spezifischer Antikörper gegen ComEA in Verbindung mit dem negativen Detektionsergebnis von ComEA in Zelllysaten spiegelt die Problematik der Detektion von ComA und ComC wider (s.o.). Wie bereits erwähnt, lag der Grund möglicherweise in der zum nativen Protein unterschiedlichen Faltung des Fusionsproteins oder an einem zu geringen Gehalt des gewünschten Proteins in der Zelle. Für ComEA trifft vermutlich letzteres zu, da das *comEA*-Gen in *Acinetobacter* nur sehr gering exprimiert wird (3.3.4). Darüber hinaus lag das Fusionsprotein nach der Überexpression in *E. coli* DH5 α in nativer Form gelöst im Cytoplasma vor, was eine intakte Faltung favorisierte und zu spezifischen Antikörpern führen müßte. Um zu prüfen, ob das fehlende spezifische Signal nach der immunologischen Detektion auf den zu geringen Gehalt des Proteins zurückzuführen war, sollte *comEA* in *Acinetobacter* höher exprimiert werden.

3.4.3 Steigerung der Expressionsrate von *comEA*

Die geringe Expressionsrate von *comEA* und das fehlende spezifische Signal in immunologischen Nachweismethoden der Zellextrakte von *Acinetobacter* sp. BD413 mittels Anti-ComEA-Antikörper, ließ die Vermutung zu, daß der ComEA-Gehalt der Zelle für eine Detektion über Chemilumineszenz zu gering ist. Für die Erhöhung der Expression von *comEA* wurde der vor dem Kompetenzgen *comP* lokalisierte σ^{54} -abhängige Promotor genutzt (PORSTENDÖRFER *et al.* 2000). ComP konnte bisher in BD413 als einziges Protein immunologisch detektiert werden, was eine Synthese von ComP anzeigt, die durch die Markierung mit Antikörpern darstellbar ist. Dieser Promotor bot möglicherweise eine moderat erhöhte Transkription im Verlauf der natürlichen Kompetenzentwicklung von *Acinetobacter*, was für die spätere subzelluläre Lokalisation von ComEA als funktionaler Bestandteil des natürlichen Transformationssystems wesentlich war.

Für die Klonierung hinter den *comP*-Promotor mußte zunächst mittels PCR derjenige Bereich amplifiziert werden, der das vollständige Gen und seine Ribosomenbindestelle beinhaltet. Da der Transkriptionsstart von ComEA nicht eindeutig bestimmt werden konnte, wurde das potentielle ATG-Startcodon berücksichtigt, welches 198 bp stromaufwärts der Prozessierungsstelle (GGGTG \square AAAGTC) liegt. Zwischen diesem Startcodon und der Prozessierungssequenz befindet sich kein Stopcodon und keine

Terminatorstruktur des benachbarten Gens, so daß mögliche Transkriptionsstarts, die nach dem postulierten Start-ATG folgen, ebenso zu der gewünschten gesteigerten Expression von *comEA* führen. Die Transkription durch einen eventuell vorhandenen *comEA*-eigenen Promotor würde dennoch einer Verstärkung des stromaufwärts klonierten *comP*-Promotors unterliegen.

Mittels der Primer *ComEA-PstI-N* (5`-CTGGAATCAAGCCAAACTGCAGCTGAATAA-3`) und *ComEA-SacI-C* (5`-GATGTTGCTAATCAGAGCTCTAACCTGAG-3`) wurde an dem Plasmid pUD08 (Abb. 3.8) ein 480 bp DNA-Fragment amplifiziert. Dieses Fragment beinhaltet stromaufwärts des potentiellen ATG-Startcodon von *comEA* weitere 20 bp und stromabwärts des TAA-Stopcodons 70 bp. Als Klonierungsvektor diente pRP1 (ein pRK415-Derivat), der ein 1,4 kb großes *BglIII/SacI*-Fragment mit *comP* und *orfC* trägt (PORSTENDÖRFER 1998, Abb. 3.14). Da die *PstI*-Schnittstelle in der MCS von pRP1 eliminiert worden war, konnte die in *comP* lokalisierte *PstI*-Schnittstelle für die Integration des PCR-Produktes genutzt werden. pRP1 wurde dafür zunächst mit *PstI* und *SacI* restriktionsverdaut, so daß ein 0,9 kb-Fragment herausgeschnitten wurde. Die Ligation des geschnittenen Plasmids erfolgte schließlich mit dem äquivalent geschnittenen PCR-Produkt, woraus das Plasmid pKD12 resultierte (Abb. 3.14).

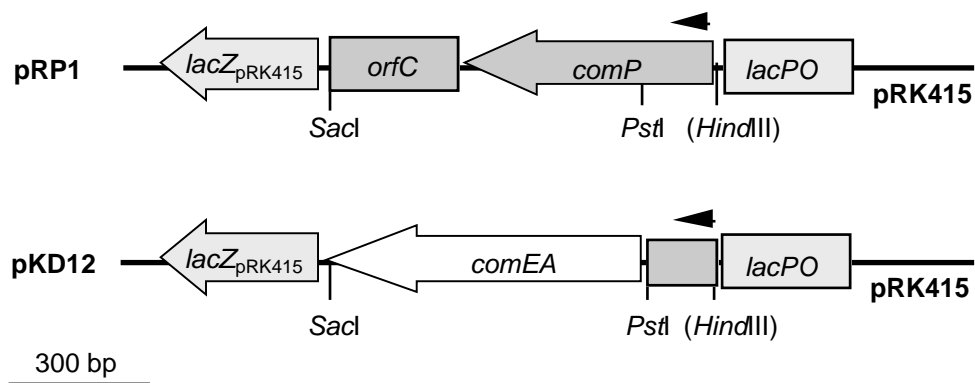


Abb. 3.14: Plasmidkonstruktion von pKD12 aus pRP1. pRP1 wurde mit *PstI* und *SacI* geschnitten und mit dem durch Amplifikation generierten *comEA* ligiert. Die gezeigte *HindIII*-Schnittstelle kann aufgrund der vorangegangener Behandlung mit Klenow-Enzym nicht mehr geschnitten werden. Der Pfeil markiert die Promotorregion von *comP*. Dargestellt sind nur die für die Klonierung relevanten Schnittstellen.

Durch die konjugative Übertragung von pKD12 in *Acinetobacter* sp. T100, der aufgrund der Unterbrechung im chromosomalen *comEA* einen vollständigen Transformationsdefekt aufwies (3.3.3), konnte die Komplementation dieses Defekts überprüft werden. Die über einen Transformationstest ermittelte uneingeschränkte Fähigkeit zur natürlichen Transformation von *Acinetobacter* sp. T100 pKD12 indizierte die Funktionsfähigkeit von ComEA hinter dem *comP*-Promotor.

3.4.4 Detektion von ComEA in Zelllysaten

Mit Hilfe des Anti-ComEA-Antiserums sollte ComEA zunächst in Zelllysaten von *Acinetobacter* sp ADP239 pKD12, dessen Plasmid den starken *comP*-Promotor vor *comEA* trägt, verglichen zu ADP239, der den Wildtyp repräsentiert und der *comEA*-Mutante T100 detektiert werden.

Die über Nacht in Succinat-Mineralmedium angezogenen Kulturen wurden geerntet und mit SDS-Probenpuffer behandelt, so daß die Zellen lysierten. Für den WESTERN Blot erfolgte zunächst die Auftrennung von 10 µg Protein der Zelllysate aller drei Stämme in einer 15%igen PAGE. Für die immunologische Detektion des Blots wurde das Anti-ComEA-Antiserum 1:20 000 verdünnt.

Der Immunoblot von Proteinextrakte der drei Stämme lieferte Signale, die zum einen in allen Spuren und zum anderen nur bei dem pKD12-tragenden Stamm erkennbar waren (Abb. 3.15). Das spezifische Signal, welches ComEA entspricht, durfte nicht in *Acinetobacter* sp. T100 erscheinen, da in diesem Stamm die Synthese von ComEA defekt war. Aus diesem Grund sind die in allen Zelllysaten markierten Proteine auf Kreuzreaktionen des Antiserums zurückzuführen. Da ein Signal starker Intensität nur in *Acinetobacter* sp. ADP239 pKD12 erkennbar war, der eine erhöhte Expression von *comEA* aufwies und da es nach der elektrophoretischen Auftrennung bei ca. 7-8 kDa lag, mußte es sich bei diesem detektierten Protein um das 7,6 kDa große ComEA handeln. Eine sehr schwach detektierte Proteinbande auf dieser Laufhöhe war ebenso im Zellextrakt von ADP239 zu erkennen, was den sehr geringen Gehalt des Proteins in der Zelle demonstrierte (Abb. 3.15).

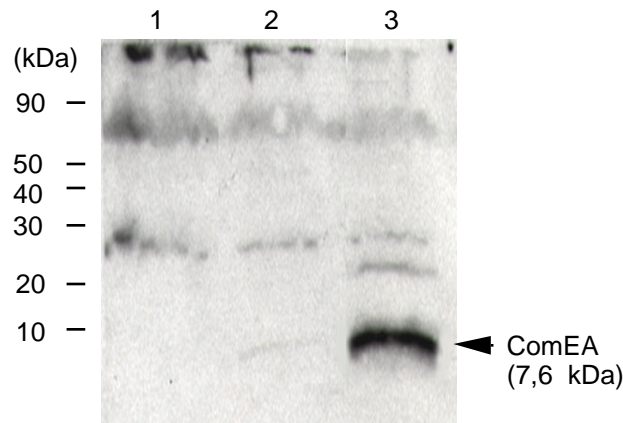


Abb. 3.15: Detektion von ComEA in Gesamtzell-Lysaten. *Acinetobacter* sp. T100 (*comEA*-Mutante) (Spur 1), ADP239 (Spur 2) und ADP239 pKD12 (Spur 3) wurden in Succinat-Mineralmedium angezogen, geerntet und mit SDS-Probenpuffer lysiert. Jeweils 10 μ g Protein wurden in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem WESTERN Blotting mit Anti-ComEA-Antiserum (1:20000) detektiert.

Diese Untersuchungen zeigten, daß das mit dem ComEA/MalE-Fusionsprotein hergestellte Antiserum spezifische Antikörper gegen das von *Acinetobacter* synthetisierte ComEA besaß. Aufgrund des geringen ComEA-Gehalts in *Acinetobacter* sp. ADP239 und der Kreuzreaktionen des Antiserums mit anderen Proteinen des Zellysats kann ComEA im Wildtyp nicht eindeutig detektiert werden. Erst eine erhöhte Expression von *comEA* führte zu einer spezifischen Detektion.

Da die hergestellten Antiseren gegen ComA bzw. ComC Antikörper gegen die Fusionsproteine enthielten, die Zielproteine in Zellysaten von ADP239 aber nicht markiert werden konnten (3.2.2/3.2.4), ist es wahrscheinlich, daß auch ComA und ComC nur schwach synthetisiert werden und durch erhöhte Expression mittels des *comp*-Promotors detektierbar sind.

3.4.5 Lokalisation von ComEA

Zur Lokalisation von ComEA in *Acinetobacter* sp. ADP239 pKD12 wurden Immunoblots mit Anti-ComEA-Antiserum und verschiedenen Zellfraktionen durchgeführt. Es sollte die subzelluläre Lokalisation von ComEA geprüft werden, wodurch sich möglicherweise Hinweise auf eine Funktion bei der DNA-Aufnahme ergeben. Da ComEA Ähnlichkeiten zu DNA-bindenden Proteinen aufweist, könnte dieser Kompetenzfaktor an der Bindung der DNA auf der Zelloberfläche beteiligt sein. Ein weiteres in BD413 gut untersuchtes Kompetenzprotein ist das Pilin-ähnliche Protein ComP, dessen Defekt die

Bindung der DNA auf der Zelloberfläche inhibiert (PORSTENDÖRFER *et al.* 1997). Dies läßt vermuten, daß ComP an der Exposition von ComEA beteiligt ist. Das Fehlen von ComP könnte somit zu einer veränderten Lokalisation von ComEA führen. Aus diesem Grund wurde die Lokalisation von ComEA in der *comP*-Mutante T206 im Vergleich zu ADP239 pKD12 untersucht. Hierfür wurde das Plasmid pKD12 konjugativ in *Acinetobacter* sp. T206 transferiert.

Die Isolierung von Proteinextrakten verschiedener Zellfraktionen erfolgte entsprechend der in „Material und Methoden“ dargestellten Weise. Die Zellen wurden über Nacht in 250 ml Succinat-Mineralmedium angezogen, geerntet und in einem Volumen von 20 ml mittels FRENCH-Pressen aufgeschlossen. Dieser Ansatz stellte das Gesamt-Zellysate dar. Anschließend wurde die lösliche cytoplasmatische Fraktion von den Zellmembranen durch Zentrifugation getrennt. Die Zellmembranen wurden schließlich über einen Saccharosegradienten in innere und äußere Membran getrennt und in 0,5 ml Volumen resuspendiert. Die obere weißliche Bande stellte die äußere Membran dar und die in der Mitte des Saccharosegradienten gelblich erscheinende Bande die Cytoplasmamembran. Die Reinheit der äußeren Membran wurde über die Bestimmung der Aktivität der in der Cytoplasmamembran lokalisierten NADH-Dehydrogenase bestimmt. Verglichen zur inneren Membran war in der äußeren Membran eine NADH-Dehydrogenase-Aktivität von 10-15% zu messen, was für die Interpretation hinsichtlich der Lokalisation von ComEA berücksichtigt werden muß.

Das Gesamt-Zellysate und die cytoplasmatische Fraktion, die jeweils ein Volumen von 20 ml ausmachten, wiesen Proteinkonzentrationen von 1,3 mg/ml bzw. 1,1 mg/ml auf. Die Differenz der Proteinkonzentrationen von Gesamt-Zellysate und Cytoplasma ergibt die Proteinkonzentration der Zellmembranen, die somit bezogen auf 20 ml Volumen 0,2 mg/ml betragen muß. Eingeengt auf 1 ml Volumen ergibt dies den theoretischen Wert von 4 mg/ml. Die jeweils in 0,5 ml resuspendierten cytoplasmatischen und äußeren Zellmembranen wiesen beide eine Proteinkonzentration von ca. 1,0 mg/ml auf (insgesamt 1 ml mit 1,0 mg/ml). Die Ausbeute der gereinigten und getrennten Zellmembranen betrug daher 25%. Da die Proteinkonzentration der Membranen in elektrophoretischer Auftrennung und Immunoblot für eine Auftragung äquivalenter Volumina von Cytoplasma und Membranfraktion zu gering war, wurden jeweils 10 µg Protein eingesetzt. Die Relation zwischen innerer und äußerer Membran blieb bestehen, da beide Fraktionen die gleiche Proteinkonzentration aufwiesen.

Die Auftrennung der Proben in einer 15%igen PAGE und nachfolgender Silberfärbung des Gels ließ erkennen, daß das Gesamt-Zellysate und die Cytoplasmafraktion ein ähnliches Bandenmuster aufweisen (Abb. 3.16). Dies war dadurch zu begründen, daß die Zellen zu ca. 85% aus löslichen Proteinen aufgebaut sind (vgl. Proteinbestimmung). Die äußeren und inneren Membranen zeigten dagegen ein

unterschiedliches Proteinmuster: Während in der Cytoplasmamembran zwei Proteine dominieren, die molekulare Massen von ca. 41 kDa und ca. 75 kDa aufweisen, zeigte die äußere Membran eine homogene Proteinverteilung unterschiedlicher molekularen Massen. Auffällig war die grünlich erscheinende diffuse Bande, die unterhalb der Höhe des 10 kDa-Markerprotein in der äußeren Membran-Fraktion angefärbt wurde (Abb. 3.16). Da Zuckerreste in der Silberfärbung oft eine graue Färbung annehmen, könnte diese Bande die Polysaccharide darstellen, die sich auf der Oberfläche von Zellen finden.

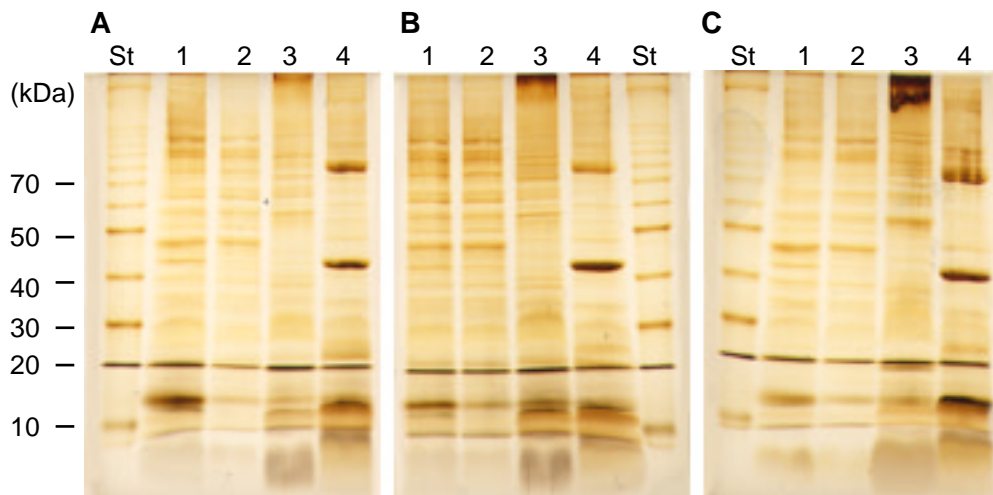


Abb. 3.16: Elektrophoretische Auftrennung der Zellkompartimente. Die Zellen wurden in Succinat-Mineralmedium angezogen, geerntet und mittels FRENCH-Pressen aufgeschlossen. Gleiche Proteinmengen (10 μ g) des Gesamt-Zelllysats (Spur 1), Cytoplasmas (Spur 2) sowie der äußeren (Spur 3) und inneren (Spur 4) Membran wurden in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt. Das Gel (A) stellt die *comEA*-Mutante T100 dar; in Gel (B) ist ADP239 pKD12 und in (C) T206 pKD12 aufgetragen.

Aufgrund des optimaleren Vergleichs der Bandenmuster wurden für den Immunoblot die gleichen Zellkompartimente der drei Stämme (T100, ADP239 pKD12, T206 pKD12) nebeneinander aufgetragen. Nach der Detektion des WESTERN Blots mit Anti-ComEA-Antiserum konnte ein Protein markiert werden, welches an der unteren Lauffront der Gelelektrophorese bei ca. 7-8 kDa aufgetrennt worden war und in der *comEA*-Mutante T100 fehlte (Abb. 3.17). Darüber hinaus lieferte die Markierung mit den Antikörpern weitere Signale, die jedoch ebenso in der *comEA*-Mutante erschienen und somit als unspezifische Kreuzreaktionen identifizierbar waren. Das spezifische ComEA-Signal war im Gesamt-Zelllysate der Stämme ADP239 pKD12 und T206 pKD12 in vergleichbarer Intensität, in der cytoplasmatischen Fraktion dagegen nur sehr schwach zu erkennen. Diese beiden Stämme zeigten weiterhin eine ähnliche Verteilung von ComEA in den Zellmembranen (Abb. 3.17). Neben einem ComEA-Signal schwacher Intensität in der

cytoplasmatischen Membran zeigte sich eine relativ starke Intensität in der äußeren Membran. Die Doppelbanden des Blots sind auf die schlechte elektrophoretische Auftrennung zurückzuführen, da der Lipidgehalt durch die Auftragung von 10 μ g Protein sehr hoch gewesen war und die Auftrennung im unteren Bereich des Gels störte. (Wurde weniger Protein aufgetragen so ließ sich ComEA nicht detektieren.)

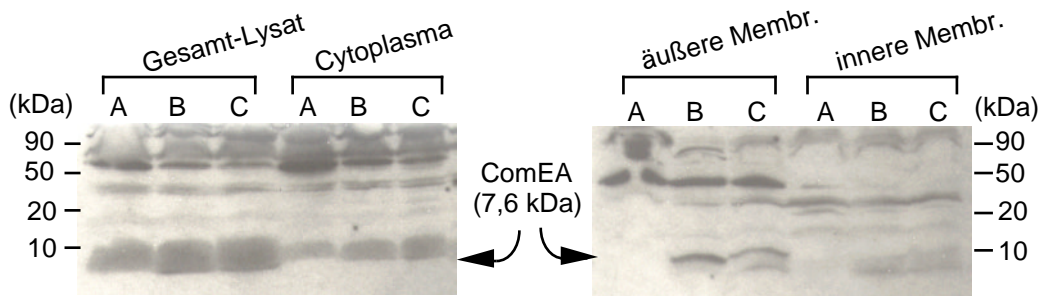


Abb. 3.17: Detektion von ComEA in Zellkompartimenten. Die Zellen der *comEA*-Mutante T100 (A), von ADP239 pKD12 (B) und T206 pKD12 (C) wurden in Succinat-Mineralmedium angezogen, geerntet und mittels FRENCH-Pressen aufgeschlossen. Daraufhin erfolgte eine Fraktionierung der Zellen in Cytoplasma sowie äußere und innere Membran. Proben dieser Fraktionen wurden in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt und der WESTERN Blot mit Anti-ComEA-Antiserum behandelt.

Diese Untersuchungen zeigten, daß nach der Expression von *comEA* durch den *comP*-Promotor ComEA in den Zellkompartimenten detektiert werden konnte. Der höchste Gehalt dieser Proteins war in der äußeren Membran zu verzeichnen gewesen, in geringerer Konzentration in der inneren Membran- und Cytoplasma-Fraktion. Der Defekt in der Synthese des Typ-IV-Pilin-ähnlichen Kompetenzproteins ComP führte zu keiner veränderten Lokalisation von ComEA.

3.4.6 DNA-Bindestudien mit ComEA

Das in dieser Arbeit identifizierte Kompetenzprotein ComEA weist für DNA-Bindeproteine typische 'Helix-turn-Helix'-Motive mit basischem Charakter auf (3.3.1). Die DNA-Bindung des Proteins sollte durch die Verzögerung des Laufverhaltens eines Plasmids im Agarosegel demonstriert werden. Hierfür wurden ansteigende Konzentrationen (20, 40, 80, 120, 200 und 400 ng) des zuvor mit dem Faktor Xa-gespaltenen MalE/ComEA-Fusionsproteins mit 100 μ g des Plasmids pBIISK und 5 mM EDTA (Endkonzentration) versetzt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit DNA-Beschwererlösung in einem 0,8%igem Agarosegel bei 50 V aufgetrennt. Je höher die zugesetzte Proteinmenge war, desto langsamer war der elektrophoretische Lauf im Gel,

was auf der sukzessiv gesteigerten molekularen Masse des Plasmids nach Bindung von ComEA beruhte (Abb. 3.18). Um auszuschließen, daß das Maltosebindeprotein (MBP) MalE mit der DNA interagiert wurde das Plasmid allein mit MalE (100 und 400 ng) inkubiert und aufgetrennt. Da diese Kontrolle keinen 'Shift' im Agarosegel bewirkte, konnte eine Wechselwirkung von MalE mit der DNA ausgeschlossen werden (Abb. 3.18).

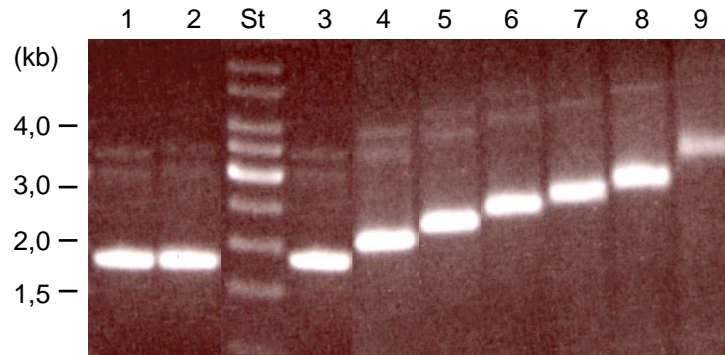


Abb. 3.18: Bindung von ComEA an zirkuläre Plasmid-DNA.

Das als ComEA/MalE-Fusionsprotein überexprimierte und aufgereinigte DNA-Bindeprotein wurde mit dem Faktor Xa in die beiden Komponenten pMal und ComEA gespalten und in ansteigender Konzentration zu dem Plasmid pBIISK (je 100 ng) gegeben. Die zugesetzten Proteinmengen der Proben betragen 20 ng (Spur 4), 40 ng (Spur 5), 80 ng (Spur 6), 120 ng (Spur 7), 200 ng (Spur 8) und 400 ng (Spur 9). Spur 3 enthält kein Protein. In den Spuren 1 und 2 wurde das Plasmid mit 100 ng bzw. 400 ng MalE-Protein versetzt.

Unmarkierte doppelsträngige DNA kann durch Negativkontrastierung mit Uranylacetat elektronenmikroskopisch nicht abgebildet werden, da der Durchmesser der DNA zu gering ist. Das globuläre Fusionsprotein MalE/ComEA besitzt eine molekulare Masse von 49 kDa, was einen Durchmesser von ca. 2 nm entspricht und demzufolge elektronenmikroskopisch erkennbar ist.

Für die elektronenmikroskopische Abbildung der Bindung des ComEA/MalE-Fusionsproteins an DNA wurden 200 ng pBIISK und 20 μ l einer 40 μ g/ml MalE/ComEA-Lösung (0,8 μ g) in Anwesenheit von 5 mM EDTA (Endkonzentration) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (Gesamtvolumen 60 μ l) und daraufhin mit 4% Uranylacetat kontrastiert. Das Fusionsprotein lagerte sich an die Plasmid-DNA an, so daß die linear verschlungene Struktur der DNA indirekt durch das Protein abgebildet werden konnte (Abb. 3.19). Durch die Zusammenlagerung der DNA-bindenden Proteine an das Plasmid erhielt diese Struktur einen Durchmesser von 2-4 nm. Nicht gebundene Proteine lagen einzeln und ungeordnet auf dem Grid, so daß sie keine kontrastreiche Struktur ergaben. Bei der Betrachtung von einerseits nur Plasmid-DNA und andererseits nur ComEA/MalE-

Fusionsprotein, oder nach der Inkubation von DNA mit dem MBP MalE allein - ohne die ComEA-Komponente -, waren die filamentösen Strukturen der DNA-Proteinkomplexe nicht vorhanden. Dieses Ergebnis zeigte, daß ComEA als Fusionsprotein an DNA bindet.

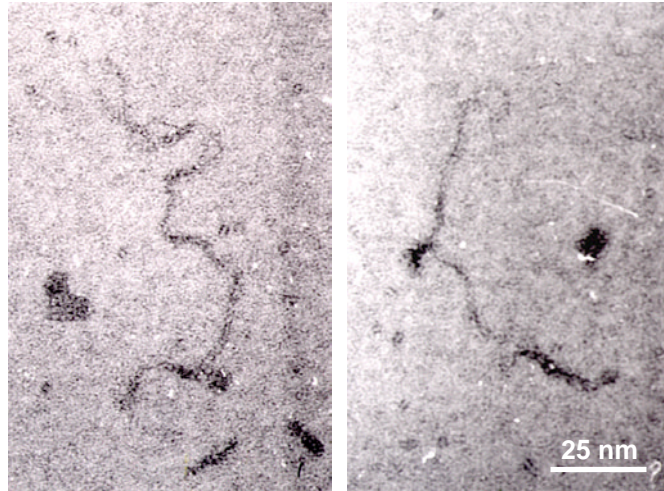


Abb. 3.19: Bindung des ComEA/MalE-Fusionsproteins an zirkuläre Plasmid-DNA. In einem Gesamtprobevolumen von 60 μ l wurden 0,8 μ g Fusionsprotein und 200 ng Plasmid pBIISK in Anwesenheit von 5 mM EDTA inkubiert. Die Bindung des Proteins an die DNA wurde elektronenmikroskopisch durch die Kontrastierung mit 4% Uranylacetat dargestellt. Gezeigt sind zwei Plasmide, an die das Fusionsprotein gebunden hat.

3.5 Identifizierung von Protein/Protein-Interaktionen im DNA-Aufnahmesystem von *Acinetobacter* sp. BD413

Untersuchungen der Komponenten des Transformationssystems, der Typ-IV-Pilusbiogenese und des Typ-II-Sekretionswegs zeigten, daß die drei Systeme wahrscheinlich einen gemeinsamen evolutiven Ursprung haben. Bei natürlich kompetenten Bakterien, die Typ-IV-Pili synthetisieren, sind die identischen Proteine der Pilusbiogenese ebenso an der DNA-Aufnahme beteiligt. Doch stellt die Anwesenheit von Pilusstrukturen auf der Zelloberfläche keine Bedingung für die natürliche Transformation dar. So synthetisieren das Gram-negative Bakterium *Haemophilus influenzae* und alle bisher untersuchten Gram-positiven Organismen, die natürlich transformierbar sind, keine Typ-

IV-Pili. Da Pilin-ähnliche Komponenten ebenso für die Typ-II-Sekretion und die DNA-Aufnahme essentiell sind, obwohl keine Pilusstruktur auf der Zelloberfläche synthetisiert wird, muß neben der Filamentbildung auf der Zelloberfläche dem Strukturprotein eine weitere Funktion als essentielle Komponente bei Proteinexport oder DNA-Import zugeschrieben werden. Die regulatorischen Größen oder die Involvierung von Proteinen, die in einem Falle die Biogenese eines Typ-IV-Pilus bewirken und in dem anderen Fall Strukturen ausbilden, die nicht als Filament auf der Zelloberfläche erscheinen, sind unbekannt.

Mit den Kompetenzproteinen ComB, ComE, ComF und ComP wurden bei *Acinetobacter* sp. BD413 vier Typ-IV-Pilin-ähnliche Komponenten identifiziert, wobei ComP mittels Antikörper detektiert werden konnte, für Piline in charakteristischer Weise glykosyliert wird und in den Zellmembranen und Periplasma lokalisiert ist. (PORSTENDÖRFER *et al.* 1997, LINK *et al.* 1998, BUSCH *et al.* 1999, HERZBERG *et al.* 2000, PORSTENDÖRFER *et al.* 2000). Weiterhin stellt ComP keine Komponente der Pili von *Acinetobacter* sp. BD413 dar, was mit den Beobachtungen übereinstimmt, daß Unterbrechungen in den bereits untersuchten Kompetenzgenen, dessen Genprodukte Ähnlichkeiten zu den Komponenten der Typ-IV-Pilusbiogenese aufweisen, zu einem unveränderten Pilusphänotyp führen.

Da der Mechanismus und das Zusammenspiel der einzelnen Kompetenzproteine bei der DNA-Aufnahme ungeklärt ist, sollten Protein/Protein-Interaktionsstudien mit der Pilin-ähnlichen Komponente ComP erste Hinweise diesbezüglich liefern. ComP ist als in den Zellmembranen lokalisierte Komponente an der Bindung der DNA auf der Zelloberfläche beteiligt, so daß eine sehr kurze Pilusstruktur postuliert werden kann, die nur den periplasmatischen Raum durchspannt und eventuell DNA-bindende Proteine exponiert. Die schonende Solubilisierung von Zellmembranen mit milden Detergenzien, sollte demnach Pilus-ähnliche ComP-Assoziationen erhalten.

3.5.1 Solubilisierung von Zellmembranen

Vorangegangene Solubilisierungsexperimente mit isolierten Zellmembranen ergaben, daß das Detergenz Dodecylmaltosid ComP quantitativ herauslöste; Triton X-100 und CHAPS lösten dagegen maximal 80%, was durch eine Erhöhung der Detergenzkonzentration nicht gesteigert werden konnte (GOHL 2000). Durch Fraktionierung der Zellkompartimente konnte weiterhin gezeigt werden, daß eine Verteilung von ComP in den Zellmembranen zu ca. 80% in der Cytoplasmamembran und zu ca. 20% in der äußeren Membran vorliegt (GOHL 2000, PORSTENDÖRFER *et al.* 2000). Für eine weitere Charakterisierung eines ComP-Komplexes wurden im Folgenden Gesamtmembranen aus *Acinetobacter* sp. BD413 isoliert und mit Dodecylmaltosid gelöst.

Acinetobacter sp. BD413 wurde im Fermenter bis zur stationären Wachstumsphase in Succinat-Mineralmedium angezogen und durch Zentrifugation geerntet. Nach dem Aufschluß von 35 g Zellmasse (Feuchtgewicht; in 70 ml Lysispuffer resuspendiert) mittels FRENCH-Pressen erfolgte die Abtrennung ganzer Zellen und die Isolierung der Membranen durch Zentrifugations- und Resuspendierungsschritte (Membranpuffer; jeweils 200 ml) wie in „Material und Methoden“ beschrieben ist. Die schließlich in 70 ml Membranpuffer resuspendierten Membranen wurden mit 130 ml einer 10 mM Dodecylmaltosid-Lösung (20 mM Tris-HCl, pH 7,5) solubilisiert (Endkonzentration 6,5 mM Detergenz), so daß eine Proteinkonzentration von 4 mg/ml resultierte. Nicht gelöste Bestandteile sedimentierten durch Ultrazentrifugation, wonach sich eine Proteinverteilung von 3,1 mg/ml im Überstand und 0,9 mg/ml im Sediment ergab (Protein des Sediments bezogen auf das äquivalente Volumen von 200 ml).

Abbildung 3.20 verdeutlicht, daß sich ComP nahezu quantitativ im Überstand befand: Nachdem gleiche Proteinmengen (0,5 μ g) von Überstand und Sediment in der SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, wurde ComP immunologisch detektiert. Während der Überstand ein starkes Signal lieferte, lag der ComP-Gehalt im Sediment an der unteren Detektionsgrenze.

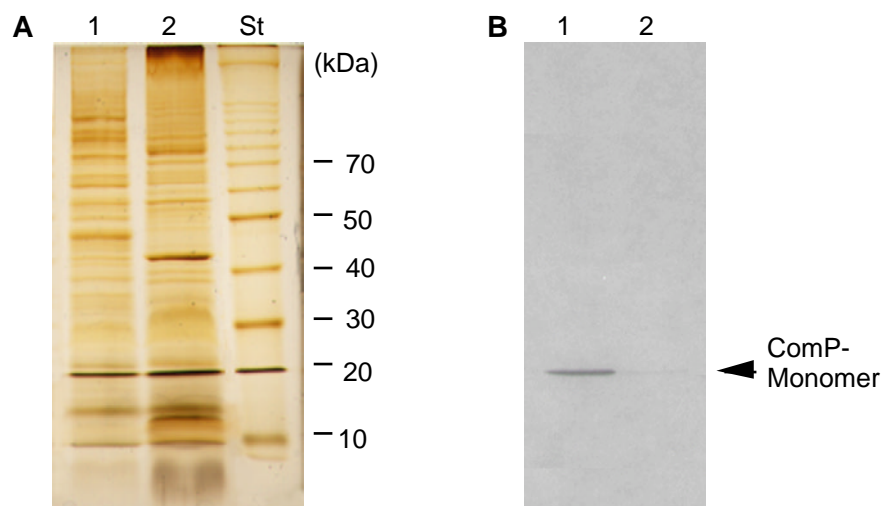


Abb. 3.20: Detektion von ComP im Membransolubilisat. *Acinetobacter* sp. BD413 wurde nach der Anzucht in Succinat-Mineralmedium mit der FRENCH-Pressen aufgeschlossen, die Membranen isoliert und mit Dodecylmaltosid gelöst. Durch Ultrazentrifugation erfolgte die Trennung in lösliche (1) und unlösliche Fraktion (2). Die beiden Fraktionen (0,5 μ g Protein) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt (A) und der WESTERN Blot mit Anti-ComP-Antiserum detektiert (B).

Bei Isolierungen von Proteinkomplexen aus aufgeschlossenen Zellen muß berücksichtigt werden, daß Proteininteraktionen durch die Passage der FRENCH-Pressen zerstört werden können. Aus diesem Grund wurden ganze Zellen in gleicher Weise wie Membranen behandelt. Die mit Lysozym (in Lysispuffer) behandelten Zellen (4 mg/ml) wurden hierfür für die Solubilisierung mit 6,5 mM Dodecylmaltosid (Endkonzentration) eingesetzt. Die Abtrennung nicht gelöster Bestandteile erfolgte durch Ultrazentrifugation. Der Überstand enthielt daraufhin gelöstes ComP.

Die Abschätzung der molekularen Masse des durch Dodecylmaltosid freigesetzten ComP, sowohl der solubilisierten Membranfraktion als auch der gelösten ganzen Zellen, erfolgte in einer 'Blue Native PAGE' und die Detektion von ComP mittels Immunoblot. Ein ComP-Signal war nach dieser Auftrennung und Detektion sowohl im Zellsolubilisat als auch im Membransolubilisat auf gleicher Höhe bei ca. 240 kDa zu erkennen (Abb. 3.21). Die *comP*-Mutante T206 lieferte kein Signal. Da ComP als Monomer eine molekulare Masse von 20 kDa aufweist, mußte das Signal bei 240 kDa auf einen Proteinkomplex zurückzuführen gewesen sein (Gohl 2000). Um den Aufbau dieses Komplexes zu untersuchen und die Struktur elektronenmikroskopisch abbilden zu können, schloß sich eine Aufreinigung an.

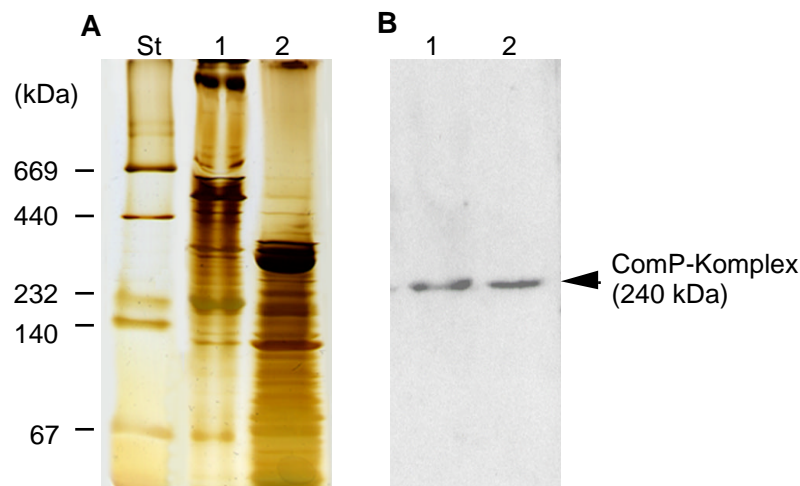


Abb. 3.21: Detektion eines ComP-Komplexes. Gereinigte Membranen (Spur 1) und ganze Zellen (Spur 2) mit jeweils einer Proteinkonzentration von 4 µg/ml wurden mit 6,5 mM Dodecylmaltosid gelöst, 5 µg Protein in einer 'Blue Native PAGE' aufgetrennt (A) und geblottet. Anti-ComP-Antikörper detektierten einen 240 kDa Proteinkomplex (B).

3.5.2 Reinigung des gelösten ComP-Komplexes

Erste Versuche einen ComP-haltigen Komplex zu reinigen wurden bereits durchgeführt (Gohl 2000). Eine Affinitätschromatographie an immobilisierten Anti-ComP-Antikörpern führte zu keine Bindung des gewünschten Proteinkomplexes. Die Reinigung des ComP-Komplexes an milden Anionenaustauschern wie DEAE-Sepharose und Hydroxylapatit hatte nur eine geringe Trennwirkung auf das Membransolubilisat (Gohl 2000). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der stärkere Anionenaustauscher Sepharose Q verwendet.

Für die spätere Auftrennung von 180 ml Membransolubilisat wurden 50 ml Sepharose Q-Matrix in eine XK 26/20-Säule gepackt und mit 20 mM Tris-HCl/2 mM Dodecylmaltosid (pH 7,5) äquilibriert. Nach dem Beladen der Säule mit dem Solubilisat erfolgte die Elution der nicht gebundenen Proteine mit 200 ml Äquilibrierungspuffer. Die sukzessive Elution der gebundenen Proteine wurde durch die stufenweise Erhöhung der NaCl-Konzentration im Elutionspuffer durchgeführt. Hierfür enthielten jeweils 200 ml Puffer in ansteigender Konzentrationen 50 mM NaCl, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 500 mM und 1500 mM NaCl. Die Fraktionsgröße betrug 15 ml.

In Abbildung 3.22 (A) ist das Elutionsprofil der Sepharose Q-Säule zu sehen, wobei die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen gegen das Elutionsvolumen aufgetragen wurde. Die Fraktionen der ersten drei Elutionsstufen enthielten jeweils maximal 0,12 mg/ml Protein; mit 200 mM NaCl eluierte ca. 0,2 mg/ml, und die folgenden Elutionsschritte wuschen jeweils bis zu 0,35 mg/ml Protein von der Matrix. Nach dem letzten Elutionsschritt waren die Proteine quantitativ von der Säulenmatrix entfernt worden, da sich keine Proteine im Eluat fanden, welches aus der Regenerierung der Matrix resultierte. Die Detektion des eluierten ComP-Komplexes in einem WESTERN Blot erfolgte nach der Auftrennung der Fraktionen eines jeden 'Peaks' in einer SDS-PAGE, wobei äquivalente Proteinmengen aufgetragen wurden (Abb. 3.22). Daraufhin war zu erkennen, daß ComP im 2. 'Proteinpeak' eluierte und in niedrigerer Konzentration ebenso im 3. 'Peak' zu finden war, was einer NaCl-Konzentration von 100 bzw. 150 mM NaCl entsprach.

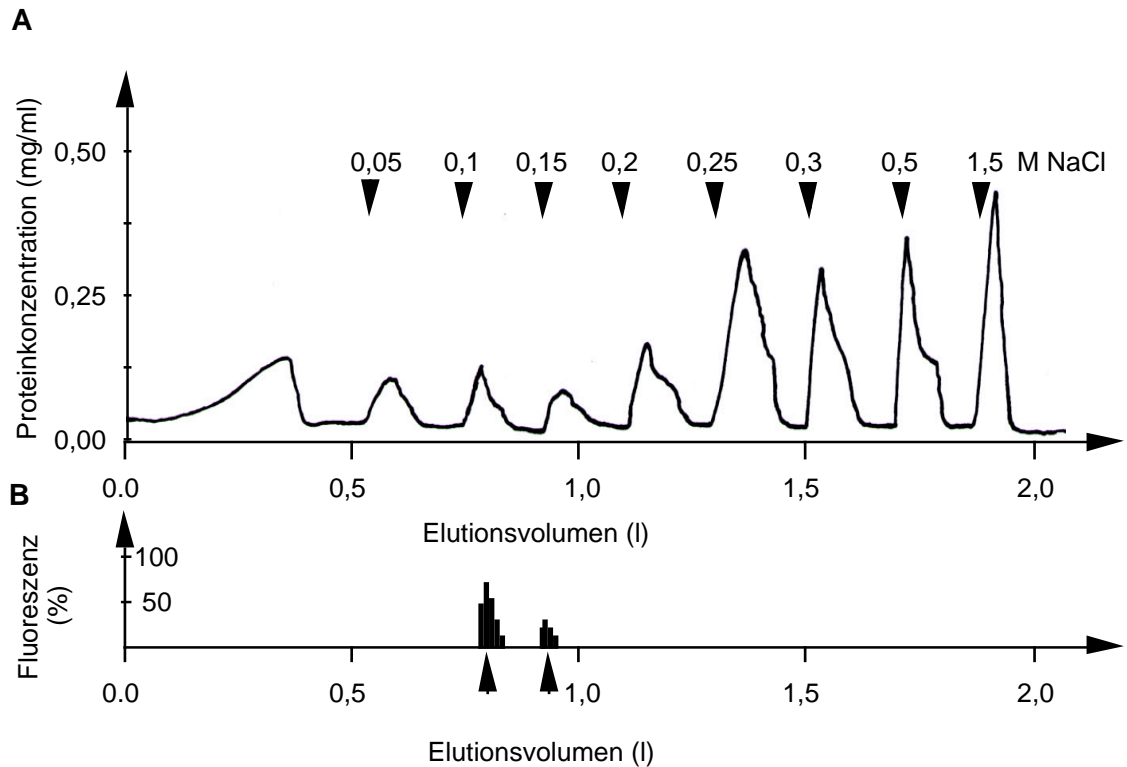


Abb. 3.22: Anionenaustausch-Chromatographie des Membransolubilisats an Sepharose Q. (A) Die Scheiberaufzeichnung gibt die Konzentration der eluierten Proteine an, die mit steigender NaCl-Konzentration von der Sepharose Q-Matrix gewaschen wurden. (B) Der ComP-Gehalt der gesammelten Fraktionen wurden im WESTERN Blot (1 μ g Protein) gegen Anti-ComP-Antiserum bestimmt und im Fluoreszenzphotometer bestimmt. Die Pfeile in Abbildung B markieren die Fraktionen, die für die nachfolgende Gelfiltration eingesetzt wurden.

Die Bestimmung der molekularen Masse des ComP-Komplexes in den aufgereinigten Fraktionen erfolgte über die Retention beim Passieren über eine S300-Sepharose Gelfiltrationsäule. Hierfür wurden jeweils 0,5 ml des über die Sepharose Q-Matrix aufgereinigte ComP-Komplexes auf die Gelfiltrationsäule gegeben und eluiert. Hierbei handelte es sich um eine Fraktionen des ersten ComP-haltigen Protein-Peaks (100 mM NaCl) und eine Fraktion des zweiten Peaks (150 mM NaCl), die jeweils den höchsten ComP-Gehalt aufwiesen. Die gesammelten Fraktionen wurden daraufhin immunologisch mittels WESTERN Blot auf ihren ComP-Gehalt geprüft. Als Größenmarker für die Gelchromatographie dienten Ferritin (450 kDa), Katalase (240 kDa), Aldolase (158 kDa) und Albumin (45 kDa), die jeweils in gleicher Weise auf die Säule gegeben und eluiert wurden. Die Detektion der Markerproteine erfolgte hier über eine BRADFORD-Proteinbestimmung der gesammelten Fraktionen. In Abbildung 3.23 ist das Elutionsverhalten der Markerproteine und das des ComP-Komplexes dargestellt, indem die molekulare Masse logarithmisch gegen das Elutionsvolumen aufgetragen wurde. Die poröse Matrix der Gelfiltration bewirkte, daß kleine Partikel, also Proteine mit geringer

molekularen Masse in die Poren diffundierten und somit länger in der Säule zurückblieben und später eluierten; Proteine hoher molekularer Masse verblieben dagegen im sogenannten Ausschlußvolumen und eluierten zuerst von der Säule. Im Idealfall ergab sich für globuläre Proteine eine logarithmische Beziehung zwischen molekularer Masse und Elutionsvolumen. Anhand des Elutionsvolumens konnte für den ComP-Komplex eine Masse von 200-260 kDa ermittelt werden, was mit der über die `Blue Native PAGE` abgeschätzten Masse von 240 kDa übereinstimmt (Abb. 3.23).

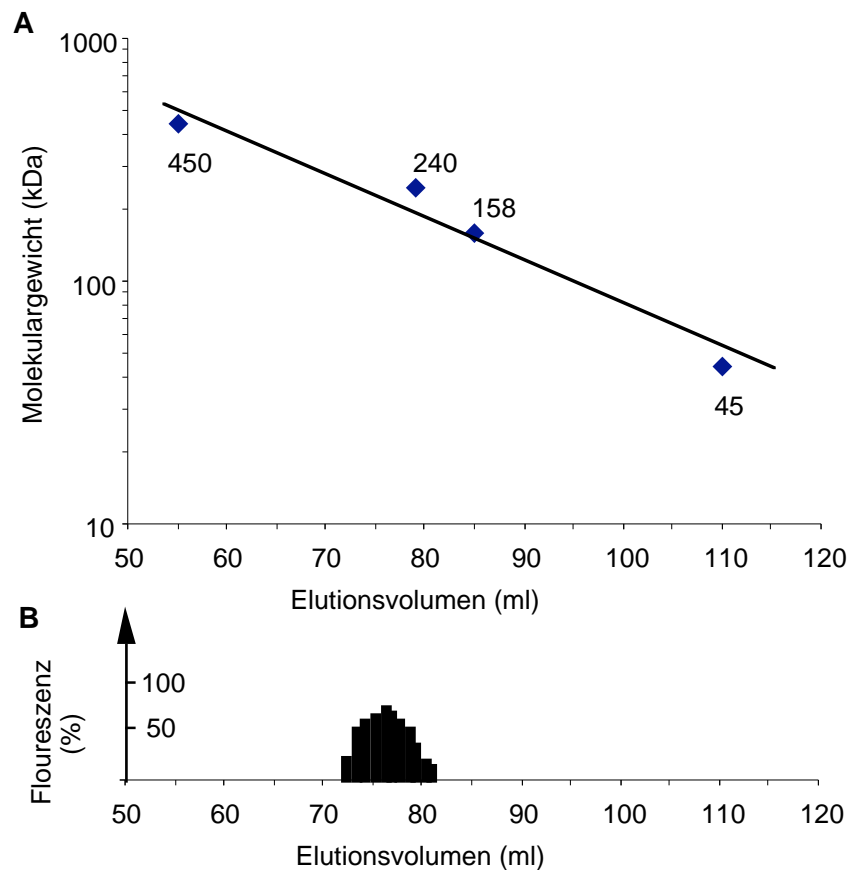


Abb. 3.23: Gelfiltrationschromatographie des ComP-Komplexes.

(A) Die bekannten Molekulargewichte der Markerproteine wurden halblogarithmisch gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Mit abnehmender Masse wurden die folgenden Marker-Proteine aufgetrennt: Ferritin (450 kDa), Katalase (240 kDa), Aldolase (158 kDa) und Albumin (45 kDa). (B) Das Elutionsvolumen des über die Sepharose Q-Matrix aufgereinigten ComP-Komplexes wurde in einer zweiten Gelchromatographie bestimmt. Die Bestimmung des ComP-Gehalts der Fraktionen erfolgte mittels Immunoblotting, wobei die Signalstärke über die Intensität der Fluoreszenz bestimmt wurde.

3.5.3. Auftrennung des ComP-Komplexes in einer 2D-Gelelektrophorese

Der aus den Zellmembranen von *Acinetobacter* sp. BD413 solubilisierte ComP-haltige Proteinkomplex, der eine molekulare Masse von ca. 240 kDa aufweist, stellt entweder ein Homomultimer dar, der aus ComP-Monomeren aufgebaut ist, oder ein Heteromultimer, in dem neben ComP weitere Proteine assoziiert vorliegen. Der Untereinheiten-Aufbau des Multimers sollte im Folgenden durch eine zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese dargestellt werden. Für die elektrophoretische Auftrennung diente der über Sepharose Q aufgereinigte ComP-Komplex, der bei 100 mM NaCl von der Säulen-Matrix eluierte (3.5.2).

Die erste Dimension der 2D-Gelelektrophorese stellte eine `Blue Native PAGE` dar, wodurch eine Auftrennung des ComP-Komplexes und der noch vorhandenen Fremdproteinen erzielt wurde. Das bei 240 kDa detektierte Protein des Immunoblots der nativen PAGE bestätigte, daß die Proteinbande stärkster Intensität auf der Höhe von 240 kDa den ComP-Komplex darstellt (Abb. 3.24). Proteine, die kein Bestandteil des ComP-Komplexes waren, wiesen im Silber-gefärbten Gel keine distikte Bandierung auf und konnten aufgrund der verglichen zum 240 kDa-Komplex höheren molekularen Masse vom ComP-Multimer unterschieden werden.

In der zweiten Dimension wurde der Zerfall des Proteinkomplexes durch SDS genutzt. Nachdem der ComP-Komplex in der ersten Dimension elektrophoretisch aufgetrennt worden war, wurden die Spur des nativen Gels horizontal auf ein SDS-Gel gelegt, mit SDS-Auftragspuffer überschichtet und die Proteine unter denaturierenden Bedingungen in der zweiten Dimension aufgetrennt. Dies hatte zur Folge, daß die Proteine des Komplexes vertikal aufgetrennt wurden. Die Denaturierung des 240 kDa-ComP-Komplexes lieferte nur einen Proteinspot bei 20 kDa, welcher das ComP-Monomer repräsentierte, was mittels Immunoblot gezeigt werden konnte (Abb. 3.24).

Die Trennung des ComP-Komplexes ausschließlich in ComP-Monomere indizierte, daß ein ComP-Homomultimer vorliegen mußte. Aufgrund der relativ starken Intensität des ComP-Proteinspots im SDS-Gel und der Annahme, daß maximal 12 Monomere den Komplex bildeten, wäre auch nur eine andersartige Komponente - dann ca. in 12fach geringerer Intensität angefärbt - im SDS-Gel sichtbar gewesen.

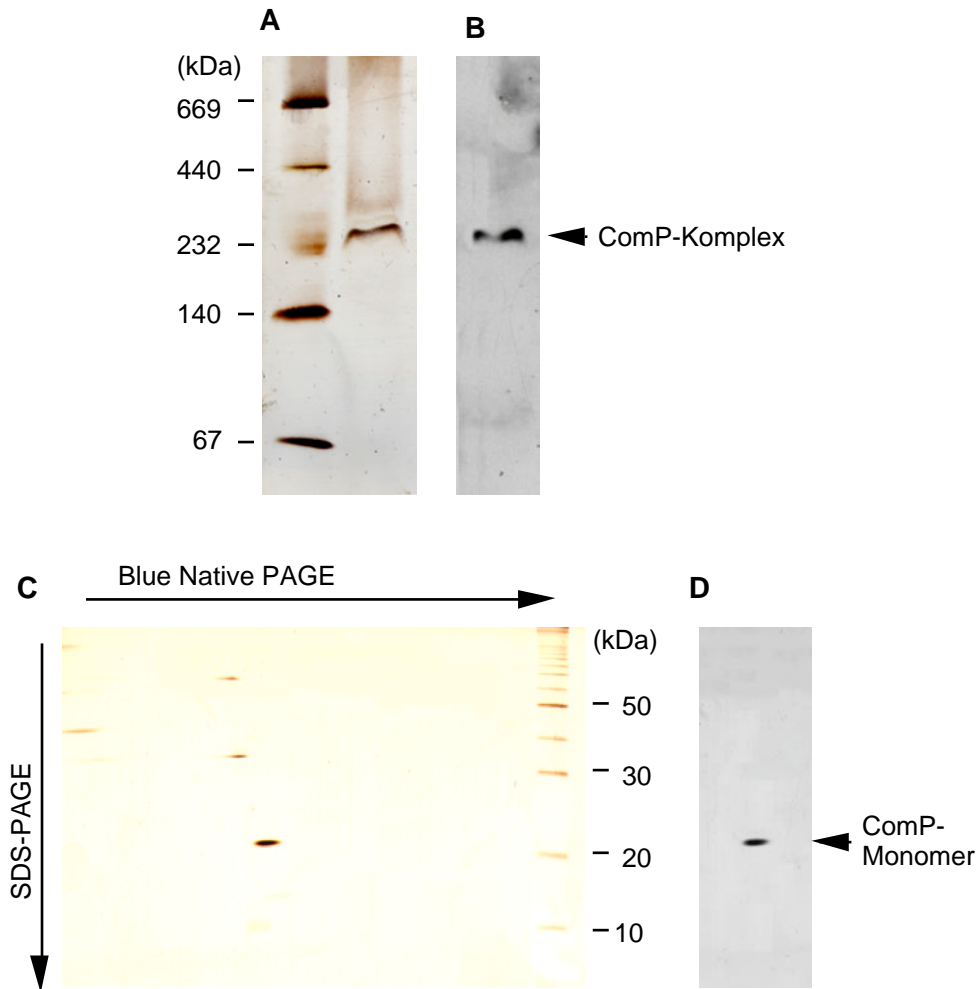


Abb. 3.24: Zweidimensionale Auftrennung des ComP-Komplexes. Der über Anionenaustausch-Chromatographie gereinigte ComP-Komplex wurde in einer 'Blue Native PAGE' aufgetrennt (A) und im Immunoblot mit Anti-ComP-Antikörper detektiert (B). Die native Gel-Spur wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt (C) und ComP wiederum im Immunoblot detektiert (D).

Die Ergebnisse der Gelfiltration, 'Blue Native PAGE' und 2D-Gelelektrophorese demonstrierten, daß ComP einen aus den Zellmembranen solubilisierbaren Komplex bildet, der eine Masse von ca. 240 kDa aufweist und ein ComP-Homomultimer darstellt.

3.5.4 Elektronenmikroskopische Darstellung des ComP-Komplexes

Ein 240 kDa-ComP-Komplex konnte über Anionenaustausch-Chromatographie an Sepharose Q gereinigt werden (3.5.2). Die Struktur dieses aus Typ-IV-Pilin-ähnlichen Proteinen aufgebauten Komplexes sollte daraufhin elektronenmikroskopisch abgebildet werden. Vor dem Hintergrund, daß die Untereinheiten des Typ-IV-Pilus eine helikale Struktur ausbilden, ist es naheliegend, daß der identifizierte ComP-Komplex des Transformationssystemns einen ähnlichen Aufbau aufweist.

In der helikalen Pilusstruktur, die einen Durchmesser von 5-6 nm besitzt, bilden fünf Piline jeweils eine Umdrehung mit einer Steighöhe von ca. 4 nm (PARGE *et al.* 1995, FOREST & TAINER 1997). Geht man davon aus, daß das 240 kDa-Multimer aus 12 Untereinheiten des 20 kDa-CompPs aufgebaut ist, so ergeben sich 2 Umdrehungen, die eine Höhe von von 8 nm einnehmen. Für den CompP-Komplex bedeutet dies einen zylindrischen Aufbau mit den Abmessungen von 6 x 8 nm. Da in der elektronenmikroskopischen Abbildung diese geringe Differenz von 2 nm zwischen Breite und Höhe des Proteinaggregates nicht in Erscheinung tritt, ist die Annahme einer globulären Struktur des CompP-Multimers wahrscheinlicher als die elektronenmikroskopische Abbildung einer länglichen Pilusstruktur.

Für die elektronenmikroskopische Darstellung wurde der gereinigte CompP-Komplex mit 4% Uranylacetat negativ kontrastiert. Abbildung 3.25 (A) zeigt eine Übersicht der globulären Proteinkomplexe, die Durchmesser von maximal 5-8 nm aufweisen. Die Proteinkomplexe geringerer Größe stellten vermutlich Abbruchfragmente dar, dessen Zerfall der saure pH-Wert von 4 des Kontrastierungsmittels bewirkt haben könnte. Nach der vergrößerten Darstellung ausgewählter CompP-Komplexe war erkennbar, daß ihre Orientierung auf dem Grid nicht einheitlich erschien und keine charakteristische (helikale) Anordnung der Untereinheiten auszumachen war. Es ist denkbar, daß Uranylacetat zu einer teilweisen Denaturierung einer potentiellen helikalen Struktur geführt hatte. Die Aufsicht der Komplexe ließ 4-5 gleichartige Untereinheiten erkennen, was somit in Anbetracht der globulären Struktur auf eine Gesamtzahl von 8-14 Untereinheiten schließen läßt. Diese Aufsicht auf 4-5 Untereinheiten würde mit der Anordnung in der Typ-IV-Pilusstruktur übereinstimmen, in der 5 Untereinheiten eine Umdrehung ausmachen.

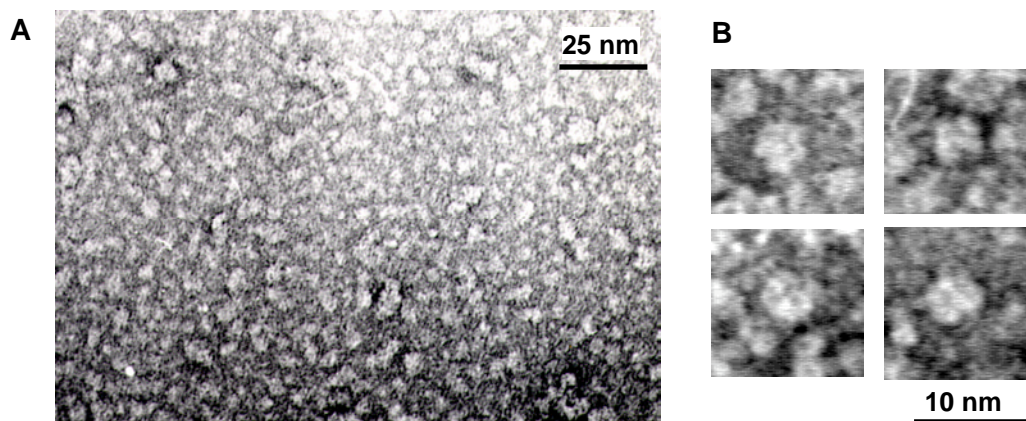


Abb. 3.25: Elektronenmikroskopische Darstellung des gereinigten CompP-Komplexes. Der CompP-Komplex wurde mit Dodecylmaltosid aus den Zellmembranen von *Acinetobacter* sp. BD413 gelöst und über Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt. (A) Für die elektronenmikroskopische Abbildung erfolgte die Negativkontrastierung mit 4% Uranylacetat. (B) Für eine detailliertere Darstellung wurden exemplarisch vier CompP-Komplexe vergrößert.

Zusammenfassend zeigen die elektronenmikroskopischen Untersuchungen, daß der Komplex aus 8-14 gleichartigen Untereinheiten aufgebaut ist, was mit den Ergebnissen der Bestimmung der molekularen Masse des ComP-Komplexes von 240 kDa übereinstimmt.

3.5.5 Vergleich der ComP-Komplexgröße vor und nach Behandlung mit Triton-X100

HU *et al.* (2002) postulierte, daß das Typ-IV-Pilin-ähnliche Protein XpsG, welches eine essentielle Komponente des Typ-II-Sekretionssystems von *Xanthomonas campestris* darstellt, eine Pseudopilusstruktur ausbildet. Nach dem Aufschluß der Zellen mittels FRENCH-Pressen und der Fraktionierung der Zellkompartimente befand sich XpsG sowohl in der Membranfraktion als auch in der löslichen Fraktion, die das Cytoplasma, das Periplasma und die Scherfraktion bildete. Gelchromatographische Untersuchungen belegten weiterhin, daß das lösliche XpsG Bestandteil eines Komplexes ist, welcher eine molekulare Masse größer als 443 kDa aufweist. Nach der Behandlung mit dem milden Detergenz Triton X-100 zerfiel dieser Komplex in Untereinheiten, die nach der Gelfiltration im Bereich der molekularen Massen von 66 bis 443 kDa eluierten. Zu einem weiteren Zerfall des Proteinkomplexes führte die Behandlung mit Desoxycholat, so daß eine molekulare Masse von ca. 36 kDa detektiert wurde.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob ComP eine zum XpsG-Komplex vergleichbare Proteinassoziations (> 443 kDa) ausbildet. Hierfür wurde das durch den Zellaufschluß freigesetzte ComP nicht mit Detergenz behandelt, sondern sofort für die Bestimmung der molekularen Masse eingesetzt. Die *comP*-Mutante *Acinetobacter* sp. T206 wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Die Zellen einer über Nacht in Succinat-Mineralmedium angezogenen 250 ml-Kultur wurden dafür geerntet, mit der FRENCH-Pressen aufgeschlossen, die Zelltrümmer und Membranen durch Ultrazentrifugation abgetrennt und der Überstand zur partiellen Reinigung in einem Saccharosegradient, der sich von 8%-50% Saccharose erstreckte, aufgetrennt. Nach der Fraktionierung des Gradienten erfolgte die Detektion von ComP in den Proben nach der Auftrennung in einer 15%igen SDS-PAGE mittels Immunoblot gegen Anti-ComP-Antiserum. Der WESTERN Blot verdeutlichte, daß ComP von der auf den Saccharosegradienten aufgetragenen Probe in die unteren Saccharoseschichten zentrifugiert worden war. In der (obersten) 6. Fraktion konnte ComP nicht detektiert werden; der höchste Gehalt des Proteins lag in der 2., 3. und 4. Fraktion und in geringerer Menge in den Fraktionen 1 und 5 vor (Abb. 3.26).

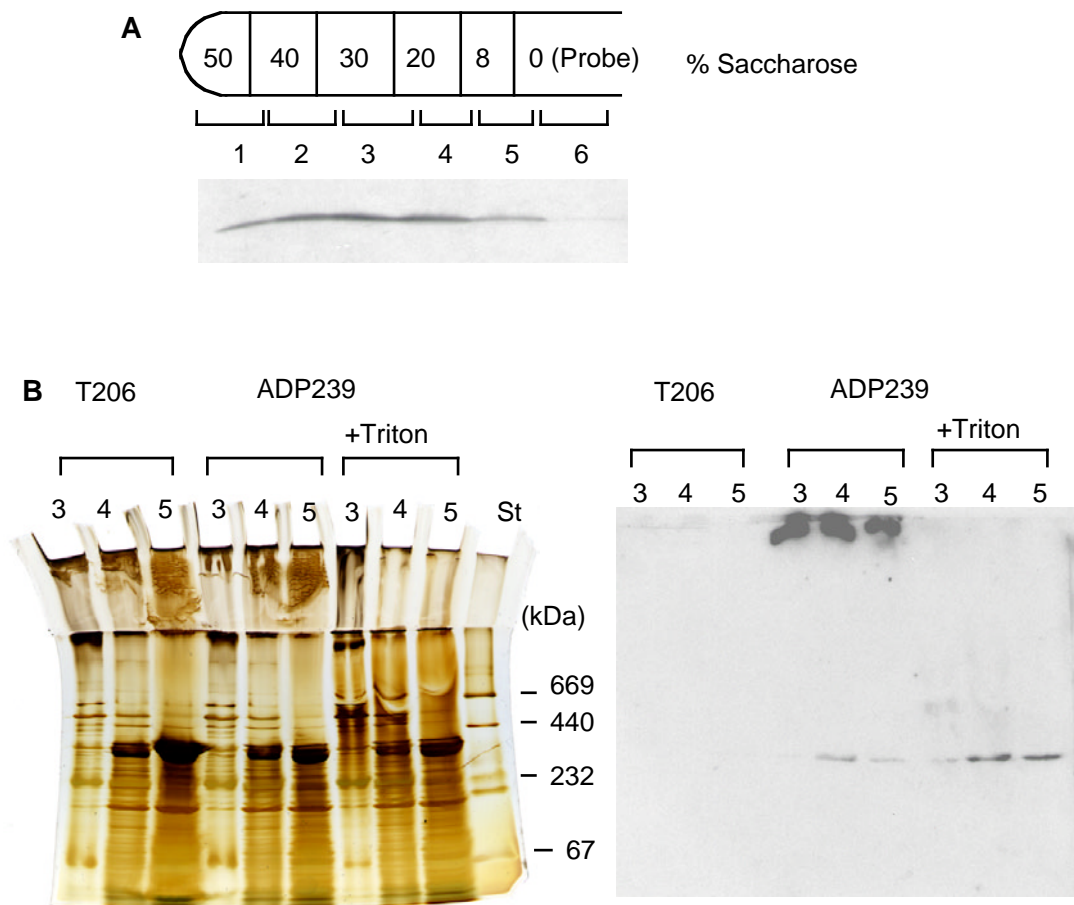


Abb. 3.26: Detektion eines ComP-Komplexes. Kulturen von *Acinetobacter* sp. ADP239 und der *comP*-Mutante T206 wurden über Nacht in Succinat-Mineralmedium angezogen und geerntet. Die lösliche Fraktion der durch FRENCH-Pressen aufgeschlossenen Zellen wurde im Saccharosegradienten (8%-50%) aufgetrennt und der ComP-Gehalt in den Fraktionen 1-6 im WESTERN Blot analysiert (A). Die Fraktionen 3, 4 und 5 wurden in einer 'Blue Native PAGE' aufgetrennt und im WESTERN Blot gegen Anti-ComP-Antiserum detektiert (B).

Die 3., 4. und 5. Fraktionen von ADP239 und T206 wurden in einer nativen Gradienten-PAGE aufgetrennt und im WESTERN Blot mit Anti-ComP-Antikörpern behandelt. Parallel dazu wurden Proben der 3., 4. und 5. Fraktionen von ADP239 mit 1% (v/v) Triton X-100 (Endkonzentration) versetzte und ebenso elektrophoretisch aufgetrennt und im WESTERN Blot ComP detektiert. Die als Negativkontrolle aufgetragenen Proben der ComP-Mutante T206 zeigten erwartungsgemäß keine Signale, da ComP in dieser Mutante nicht synthetisiert wird (Abb. 3.26, B). Die Fraktionen 3, 4 und 5 des Wildtyp-Stammes ADP239 enthielten ComP-haltige Komplexe, die nicht in das 3%ige Gel der nativen PAGE eingewandert waren und in den Auftragstaschen verblieben. (Abb. 3.26, B). Die Abmessung des ComP-haltigen Aggregates mußte demzufolge größer als die Porenweite des 3%igen Polyacrylamidgels gewesen sein. Nach der Behandlung mit

Triton X-100 ließ sich ComP elektrophoretisch auftrennen, so daß ein Komplex von ca. 240 kDa detektiert werden konnte, der bereits bei der Solubilisierung der Zellmembranen von *Acinetobacter* identifiziert wurde (3.5.2). Daraus ist zu schließen, daß die Behandlung mit dem milden Detergenz Triton X-100 zu einem teilweisen Zerfall der ComP-haltigen Assoziation zu dem 240 kDa-ComP-Komplex führte.

Die Untersuchungen des XpsG-haltigen Komplexes schlossen zwar ein Vorliegen von XpsG-haltigen Membranvesikeln aus, doch die potentielle Detektion von ComP-haltigen Vesikeln anstelle von ComP-haltigen Proteinkomplexen muß in weiteren Studien untersucht werden. Vor dem Hintergrund, daß die Kompetenzproteine ComB und ComC aus *Acinetobacter* sp. BD413 Ähnlichkeiten zu Typ-IV-Pilinen bzw. Assemblierungsfaktoren der Typ-IV-Pili aufwiesen (LINK *et al.* 1998, HERZBERG *et al.* 2000), ist es somit wahrscheinlich, daß ComB und ComC für die Assemblierung des ComP-Proteinkomplexes essentiell sind. Fehlen die ComP-Komplexe in den Mutanten, so handelt es sich möglicherweise nicht um ComP-haltige Membranvesikel.

3.6 Charakterisierung der Pili von *Acinetobacter* sp. BD413

Acinetobacter sp. BD413 besitzt auf der Zelloberfläche zwei morphologisch unterscheidbare Pilustypen. Zum einen sind dies starre, oft in Bündeln assoziierte Filamente mit einem Durchmesser von 2-3 nm und zum anderen flexible Strukturen, die eine Länge von mehreren μm erreichen und einen Durchmesser von ca. 6 nm aufweisen (HENRICHSEN 1975, PORSTENDÖRFER *et al.* 1997, 2000). Die dünneren Pili sind mit der Adsorption des Bakteriums an hydrophobe Oberflächen in Verbindung gebracht worden (ROSENBERG *et al.* 1981), während die dickeren Filamente physiologisch nicht untersucht sind. Der für Typ-IV-Pili charakteristische Durchmesser, der von 4 nm bis 6 nm reicht, und die Fähigkeit von BD413 zur gleitenden Fortbewegung, ließ die Vermutung zu, daß es sich bei den dicken Pili um Typ-IV-Pili handeln könnte. Dagegen sprach jedoch die Tatsache, daß die bei *Acinetobacter* sp. BD413 bisher identifizierten Kompetenzgene, die Ähnlichkeiten zu Pilinen oder Typ-IV-Pilus-Assemblierungsfaktoren zeigten, nicht in die Pilusbiogenese und die gleitende Fortbewegung involviert sind, wie Mutantenstudien der transformationsdefekten Mutanten ergaben (PORSTENDÖRFER *et al.* 1997, LINK *et al.* 1998, BUSCH *et al.* 1999, HERZBERG *et al.* 2000, ROSENPLÄNTER pers. Mitteilung). Im Gegensatz dazu sind bei bisher untersuchten natürlich kompetenten Bakterien, die Typ-IV-Pili synthetisieren, die Komponenten der Pilusbiogenese an der Transformation beteiligt. Weiterhin weisen die Pili von *Acinetobacter* sp. BD413 eine peritriche Anordnung auf, während die `Twitching Motility` vermittelnden Typ-IV-Pili polar lokalisiert sind.

3.6.1 Reinigung der Pilusstrukturen und N-terminale Sequenzierung der Pilusuntereinheiten

Die Charakterisierungen der beiden Pilustypen von *Acinetobacter* sp. BD413 auf genetischer Ebene und die Generierung Pilussynthese-defekter Stämme sollte die Frage klären, ob dieser Strukturen an der natürlichen Transformation und `Twitching Motility` beteiligt sind. Darüberhinaus wäre eine eindeutige Klassifizierung und Charakterisierung beider Pilustypen möglich.

Zur Aufreinigung der Pilusstrukturen wurde *Acinetobacter* sp. BD413 in einem 3 l-Kluyverkolben mit Mineralmedium und Succinat über Nacht angezogen, geerntet und seine filamentösen Strukturen von der Zelloberfläche abgeschert, was durch das zweimalige Passieren durch eine Kanüle erfolgte, wie in „Material und Methoden“ ausführlich beschrieben ist. Nach Abtrennung der Zellen durch niedertourige Zentrifugation pelletierten in der Ultrazentrifuge die abgescherten Pili. Daraufhin ließen sich die resuspendierten Filamente in einem 20-70%igen Saccharosegradienten reinigen. Die Proben des fraktionierten Gradienten wurden elektronenmikroskopisch und nach der

Auftrennung in einer 15%igen SDS-PAGE auf ihren Pilusgehalt hin überprüft. Die dicken Filamente waren daraufhin bei 40%-45% (w/v) Saccharose und die dünneren im Bereich zwischen 38-43% (w/v) zu finden. Wurde die Scherfraktion vor dem Beladen auf den Saccharosegradienten gegen 100 mM NaCl/150 mM CaCl₂ dialysiert, so aggregierten die dünnen Pili und sedimentierten nach der Dichtegradienten-Zentrifugation auf den Boden des Röhrchens; die dicken Pili lagen dagegen weiterhin als Einzelfilamente vor, was auf eine polare, hydrophile Pilusoberfläche hindeutete. Die Aggregation bei hoher Ionenkonzentration spiegelt den hydrophoben Charakter der dünnen Pili wider. Die elektronenmikroskopische Abbildung 3.27 (B) zeigt die Fraktionen mit gereinigten aggregierten, starren dünnen Pilusstrukturen und mit flexiblen einzeln vorliegenden dicken Pili.

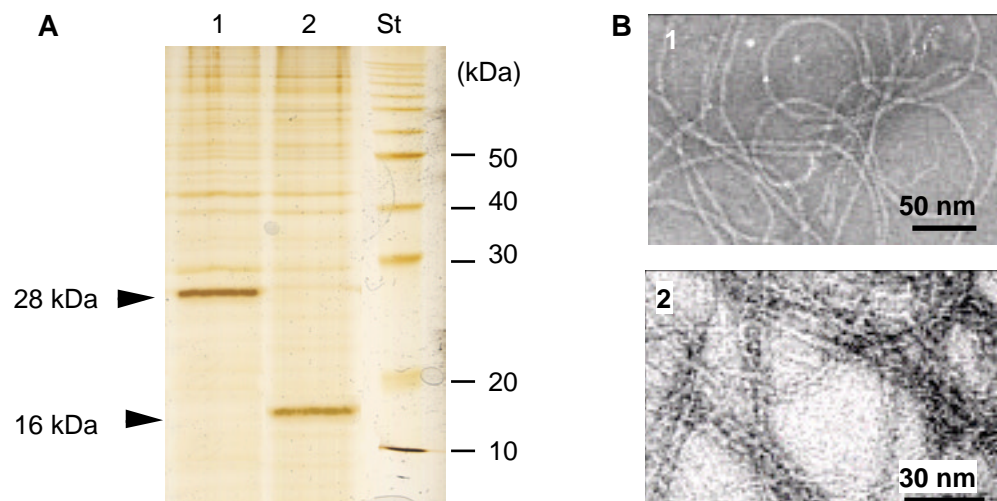


Abb. 3.27: Reinigung der Pilusstrukturen von *Acinetobacter* sp. BD413. (A) Auftrennung der mittels Saccharosegradienten-Zentrifugation aufgereinigten dicken und dünnen Pili in einem 15%igen SDS-Gel. Die Untereinheiten des dicken Pilus bandierten bei 28 kDa (Spur 1) und die der dünnen Pili bei 16 kDa (Spur 2). (B) Elektronenmikroskopische Abbildung der gereinigten dicken (1) und dünnen (2) Pili.

Für die spätere N-terminale Anequenzierung der Pilusuntereinheiten erfolgte eine Auftrennung der 28 kDa- und der 16 kDa-Untereinheit im 15%igen SDS-Gel (Abb. 3.27, A). Die Proteine eines Gels wurden mit Coomassie angefärbt, die eines zweiten Gels auf eine PVDF-Membran geblottet. Vor der N-terminalen Sequenzierung wurden die Proteine einer Trypsinspaltung unterzogen, wobei mehrere Peptide entstanden und somit interne Sequenzen zugänglich waren (EDMAN & BEGG 1967, PATTERSON 1994). Diese Arbeit wurde von Dr. J. KELLERMANN (MPI für Biochemie, Martinsried) freundlicherweise durchgeführt. Die 28 kDa-Untereinheit des dicken Pilus lieferte neben dem N-Terminus drei weitere interne Sequenzen (Abb. 3.28, A).

3.6.2 Klonierung der Pilusstrukturgene

Für die spätere Charakterisierung und Unterbrechung des Strukturgens, welches für die 28 kDa-Untereinheit des dicken Pilus codiert, mußte das Gen isoliert und in einen Vektor kloniert werden. Um zunächst das entsprechende Gen an der chromosomalen DNA von *Acinetobacter* sp. BD413 zu amplifizieren (die chromosomale Sequenz von BD413 lag zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor), wurden gewobbelte Primer mit Hilfe der Aminosäure-Abfolge des N-Terminus (DNAG) und einer internen Sequenz (VEVAG) abgeleitet. Dabei wurde beachtet, daß Thymin/Guanin-Paarungen die Primeranlagerung nicht negativ beeinflussen (CRICK 1965). Der N-terminale Primer DICK-N2 besaß die Basenfolge 5`-GATAATGC(GT)GG(GT)AT(AT)-3` und der C-terminale Primer DICK-I3 die Basenfolge 5`-CC(GT)GC(GT)ACTTC(GT)CC-3`. An partiell *Xba*I-restriktionsverdauter chromosomaler BD413-DNA, in Anwesenheit von 2% DMSO und 60 mM TMAC (Trimethylammoniumacetat) konnte bei einer Primer-Anlagerungstemperatur von 42°C, bei der die Primer an den Matrizenstrang anlagerten, ein Genfragment amplifiziert werden, welches eine Länge von ca. 680 bp aufwies. Nachdem dieses PCR-Produkt mit stumpfen Enden in die *Eco*RV-Schnittstelle von pBIISK kloniert worden war, woraus des Plasmid pBK01 resultierte, erfolgte eine Überprüfung des Inserts durch Sequenzierung.

Die erhaltene Basenabfolge wurde in die Aminosäure-Sequenz übersetzt und mit den Aminosäure-Sequenzen verglichen, die aus den N-terminalen Sequenzierungen der Trypsin-verdauten Pilusuntereinheit stammten. Angrenzend an die beginnende und endende Primersequenz waren die Aminosäure-Abfolgen zu finden, die identisch zu denjenigen waren, die durch die N-terminale Sequenzierung gefunden worden waren (Abb. 3.28, B). Daneben waren zwei weitere aus der N-terminalen Sequenzierung bekannte Abfolgen von 17 bzw. 21 Aminosäuren zu finden, die hinter Trypsin-Spaltungsstellen lagen. Diese Übereinstimmungen zwischen der Sequenz des PCR-Produkts und derjenigen der Peptide (der N-terminalen Ansequenzierung) belegten, daß ein Fragment des Pilusgens kloniert worden war.

A

N-terminale Sequenz:	interne Sequenzen:
! DGLNIGIKLDNAGISIGKLY	! ETNPTEILSGLTSLGK
	! NNSAQNINTYIQGVHLGSSTA
	! SIGDVEVAGLNVGNSTI

B

DNAGISIGKLYVHDNDGLGTDNITGATG TAGAIAINGVTVKQNTSENLLDL
 KIDTNGSATTSSNGAQQGAFLNIAATVGAVDIDI GSIGIGSSNTAVN TTTGLRGIK
ETNPTEILSGLTSLGKVAANIQLGATPQGAMIVLNSTLQKGLTISNLGINDAA
 GGGQIYLDNIYVRGADNTTGDLTNLATVGVGTANGIVIKNNSAQNINTYIQGVHL
 GSSTAKSIGDVEVAGADN TTGDLTNL A T V G V T ~~NNSAQNINTYIQGV~~
HLGSSTAKSIGDVEVAG

Abb. 3.28: N-terminale und interne Sequenzen sowie Aminosäuresequenz des über PCR amplifizierten Fragmentes der Untereinheit des dicken Pilus. (A) Die aufgereinigten Untereinheiten wurden für die N-terminale Sequenzierung Trypsin-verdaut, so daß neben dem N-Terminus interne Sequenzen generiert werden konnten. (B) Mittels gewobelter Primer wurde ein ca. 680 bp DNA-Fragment des Gens amplifiziert, welches für die Untereinheit des dicken Pilus codiert. Dieses Fragment (in seine Aminosäuresequenz übersetzt) enthält die ermittelten internen Sequenzen der N-terminalen Sequenzierung (unterstrichene Bereiche).

Während die N-terminale Sequenzierung mit vorangegangener Trypsin-Spaltung der Untereinheit des dicken Pilus insgesamt vier Sequenzen ergeben hatte, lieferte die Trypsin-Spaltung der Untereinheit des dünnen Pilus zwei Proteinfragmente. Da der N-Terminus der Untereinheit für die N-terminale Sequenzierung nicht zugänglich war, konnte nur eine interne Sequenz von 16 Aminosäuren (GITLGGPTNSAQYVAG) generiert werden, was eine Amplifikation des Gens an der chromosomalen DNA von *Acinetobacter* sp. BD314 ausschloß. Mittlerweile lag die von INTEGRATED GENOMICS (Inc., Chicago, USA) zur Verfügung gestellte vorläufige genomische Sequenz des Stammes BD413 vor, so daß das dünne Pilusgen anhand eines Abgleiches identifiziert werden konnte. Dies ermöglichte die Amplifikation des Gens, welches für die 16 kDa-Untereinheit des dünnen Pilus codiert, mit den Primern Dü-*Pst*I-N2B (5'-ATTAAATTGATCTGCAGCTAGTGATG-3') und Dünn-*Xba*I-C (5'-ATGCGAGTATCTAGAATGCTG-3'). Dieses 690 bp-Genfragment wurde mit *Pst*I und *Xba*I in pBIISK kloniert werden, woraus das Plasmid pBN01 resultierte.

Diese ersten Untersuchungen führten zu der Klonierung von Genfragmenten von sowohl der Untereinheiten des dicken als auch des dünnen Pilus, so daß im Folgenden Pilus-Mutanten generiert werden konnten.

3.6.3 Unterbrechung der Pilusgene von *Acinetobacter* sp. ADP239

Durch die Generierung N-terminaler und interner Aminosäuresequenzen der strukturellen 28 kDa-Untereinheit des dicken Pilus, konnte ein Genfragment amplifiziert und in pBIISK kloniert werden, wonach das Plasmid pBK01 resultierte (3.6.2). Um das Gen unterbrechen zu können, wurde das Genfragment in pBK01 mit einem Kanamycin-Gen (*nptII*-Marker) unterbrochen, welches aus pUC4K stammte. Dafür wurde die mit *PstI* geschnittene Resistenz-Kassette mit Klenow-Fragment behandelt und mit glatten DNA-Enden in die *EcoRV*-Schnittstelle des Inserts von pBK01 ligiert (Abb. 3.29). Die Kanamycin-Kassette befand sich nun in dem resultierenden Plasmid pBK03 zwischen 450 bp und 230 bp flankierender DNA, die aus Bereichen des Pilusgens bestanden. Das herausgeschnittene Insert, welches jetzt 1880 bp aufwies, diente der Mutagenisierung von *Acinetobacter* sp. ADP239 durch Rekombination des mutagenisierten Gens in des Genom, wozu die natürliche Transformation genutzt wurde. Die Mutante mit der Unterbrechung im Gen, welches für die Untereinheit des dicken Pilus codiert, wurde mit K101 bezeichnet.

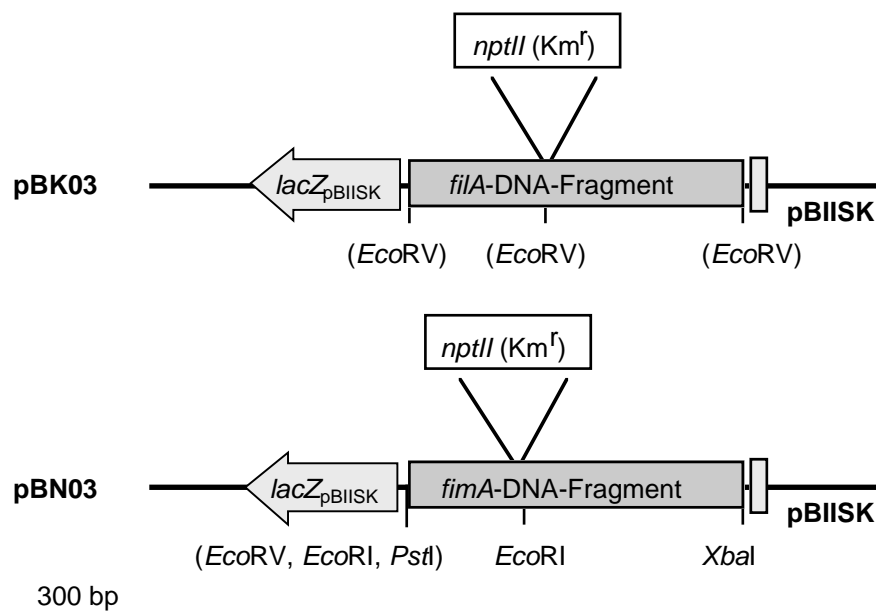


Abb. 3.29: Plasmidkonstruktionen für die Unterbrechung der Pilusgene. DNA-Fragmente der Gene, die für die Untereinheit des dicken bzw. des dünnen Pilus codieren, wurden amplifiziert und in pBIISK kloniert, woraus die Plasmide pBK01 bzw. pBN02 resultierten. Das Resistenzgen wurde bei pBK01 in die *EcoRV*-Schnittstelle und bei pBN02 in die *EcoRI*-Schnittstelle ligiert, so daß pBK03 und pBN03 entstanden. Die in Klammern dargestellten Namen der Restriktionsschnittstellen können aufgrund der Ligationen mit glatten DNA-Enden nicht mehr geschnitten werden. Es sind nur die für die Klonierungen relevanten Schnittstellen gezeigt. Die Resistenzgene (*nptII*) sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Das *lacZ*-Gen von pBIISK gibt die Leserichtung des vektoreigenen Promotors an. *filA* bezeichnet das Gen für die Untereinheit des dicken Pilus und *fimA* das Gen für die Untereinheit den dünnen Pilus von *Acinetobacter* sp. BD413.

Der Abgleich der internen Aminosäuresequenz der 16 kDa-Untereinheit des dünnen Pilus mit dem Genom von *Acinetobacter* sp. BD413 führte zu einem offenen Leserahmen (ORF), der mittels PCR amplifiziert und kloniert werden konnte, woraus das Plasmid pBN01 resultierte (3.6.2). Für die Unterbrechung des Inserts sollte seine *EcoRI*-Schnittstelle genutzt werden. Um zunächst die *EcoRI*-Schnittstelle in der MCS zu entfernen, mußte pBN01 mit *PstI* und *EcoRV* geschnitten und nach Klenow-Behandlung mit stumpfen Enden ligiert werden. In dieses modifizierte Plasmid pBN02, welches mit *EcoRI* linearisiert wurde, konnte die ebenfalls mit *EcoRI* geschnittene Kanamycin-Kassette (*nptII*-Marker) aus pUC4K ligiert werden, was zu dem Vektor pBN03 führte (Abb. 3.29). Durch diese Insertion befand sich die Kanamycin-Kassette zwischen 180 bp und 510 bp flankierender DNA, die aus Bereichen des dünnen Pilusgen bestanden. Das herausgeschnittene Insert, welches jetzt 1890 bp aufwies, diente der Mutagenisierung von *Acinetobacter* sp. ADP239, wozu die natürliche Transformation genutzt wurde. Die Mutante mit der Unterbrechung im Gen, welches für die Untereinheit des dünnen Pilus codiert, wurde N100 bezeichnet.

Die Überprüfung auf einmalige und richtige Integration des *nptII*-Markers erfolgte durch SOUTHERN-Hybridisierung. Dazu wurde die chromosomale DNA des Stammes N100 mit *ScaI/EcoRV* in einem Ansatz und mit *ScaI/NheI* in einem anderen verdaut. Die chromosomale DNA des Stammes K101 wurde mit *EcoRI* bzw. *EcoRI/SacI* geschnitten. Die Restriktionsverdaue konnten danach elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einer Kanamycin-Sonde die Laufhöhe der Resistenz-Marker sichtbar gemacht werden.

Abbildung 3.30 (A) zeigt für K101 die Anwesenheit des Resistenz-Markers in einem DNA-Fragment von 5,9 kb nach dem *EcoRI*-Verdau. Vor der Intergration des 1,2 kb-Markers lagen beide *EcoRI*-Schnittstellen 4,7 kb voneinander entfernt; nach der Unterbrechung des Gens, welches für die 28 kDa-Pilusuntereinheit codiert, vergrößerte sich der Abstand auf 5,9 kb. Der Doppelverdau mit *EcoRI* und *SacI* lieferte weiterhin den Beweis, daß der integrierte Marker den Genbereich um 1,2 kb erweiterte: Nicht die ursprüngliche Basenzahl von 2,4 kb, sondern ein 3,6 kb-Fragment wurde detektiert (Abb. 3.30, A). Die Größendifferenzen der detektierten DNA-Fragmente entsprachen den Größen der Kanamycinkassette, d.h. daß das mutagenisierte Gene homolog ins Genom rekombiniert wurde.

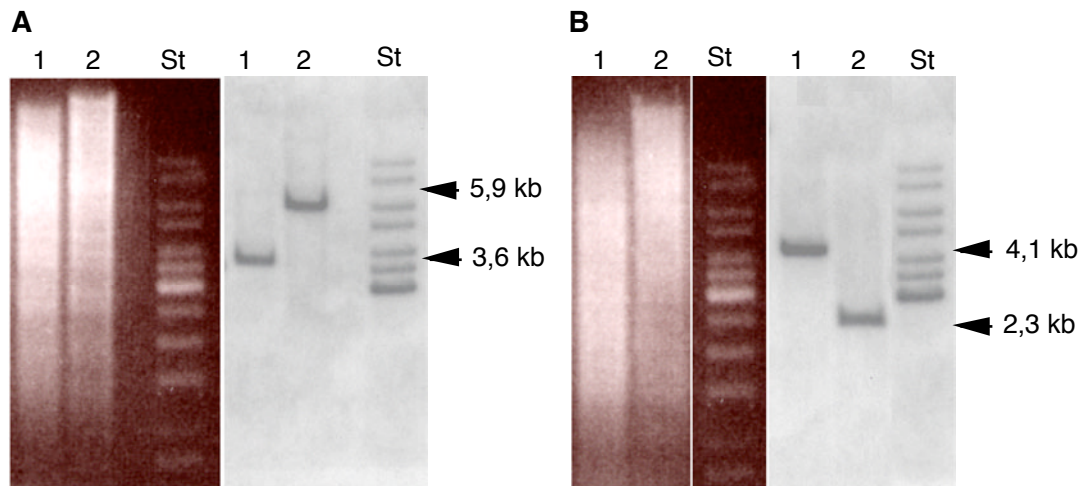


Abb. 3.30: SOUTHERN Hybridisierung restriktionsverdauter DNA gegen eine Kanamycin-Sonde. (A) Die isolierte chromosomale DNA von *Acinetobacter* K101 wurde mit *EcoRI/SacI* (Spur 1) und *EcoRI* (Spur 2) geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt und nach dem Blotten gegen eine Kanamycin-Sonde hybridisiert. (B) Die chromosomale DNA von *Acinetobacter* sp. N100 wurde mit *ScaI/EcoRV* (Spur 1) und *ScaI/NheI* (Spur 2) geschnitten und das Kanamycin-Gen mit einer Sonde detektiert. Die Sonde hybridisierte unspezifisch mit der DNA des Größenstandards (St) im Bereich von 3-10 kb. Auf der linken Seite beider Abbildungen (A/B) ist das Ethidiumbromid-gefärbte Gel und auf der rechten der SOUTHERN Blot dargestellt.

In gleicher Weise wurde der durch die Restriktionsschnittstellen eingeschlossene Genbereich des Gens, welches für die 16 kDa-Untereinheit des dünnen Pilus codiert, um 1,2 kb vergrößert. Die *ScaI/EcoRV* geschnittene chromosomale DNA lieferte ein Fragment von 4,1 kb (ursprünglich 2,9 kb), die *ScaI/NheI* geschnittene DNA ein Fragment von 2,3 kb (ursprünglich 1,1 kb) (Abb. 3.30, B).

Die Detektionen des *nptII*-Markers indizierte die richtigen Integrationen des Markers in das Zielgen. Darüber hinaus lieferte die geschnittene chromosomale DNA nur ein Signal, was eine mehrfache (nicht-homologe) Rekombination ausschloß.

3.6.4 Generierung einer Doppelmutante mit Defekten in den Untereinheiten der dicken und dünnen Pili

Die alleinige morphologische Betrachtung von filamentösen Strukturen auf der Zelloberfläche läßt eine eindeutige Unterscheidung und Klassifizierung in Pilustypen nicht zu. Zum einen können Filamente gleicher Morphologie ebenso zu unterschiedlichen Pilustypen gehören oder andererseits homologe Strukturproteine Filamente unterschiedlichen Durchmessers bilden.

Acinetobacter sp. BD413 besitzt zwei elektronenmikroskopisch unterscheidbare Pilusstrukturen von 2-3 nm und 6 nm im Durchmesser, die auf genetischer und

molekularer Ebene nicht untersucht sind. Diese Filamente liegen in hoher Zahl vor, sind peritrich angeordnet und zum Teil zu Bündel aggregiert (PORSTENDÖRFER *et al.* 1997, 2000). Ein dritter Filamenttyp, der möglicherweise nur in geringer Zahl vorliegt und einen Durchmesser von 2-6 nm aufweist, könnte auf der Zelloberfläche übersehen werden. Um beweisen zu können, daß das Bakterium tatsächlich nur zwei Pilustypen synthetisiert, mußten die beiden Pilusgene unterbrochen werden. Sind danach noch Pili sichtbar, so gibt es möglicherweise einen dritten Typ, der an der Transformation beteiligt sein könnte.

Während für die Unterbrechung der Pilusgene mit dem 1,2 kb großen *nptII*-Marker flankierende chromosomale DNA von ca. 450 bp bzw. 230 bp ausreichen, wurde für die Unterbrechung des dicken Pilusgen mit der 2,0 kb Streptomycin-Kassette □ zum einen ein größerer Bereich flankierender DNA (510 bp bzw. 450 bp) amplifiziert und zum anderen das betreffende Strukturgen um 830 bp deletiert. Die Primer DiDel-1-*EcoRI* (5'-GTAGAATATTCAGAATTCTGAAAAATGATA-3') und DiDel-2-*XbaI* (5'-CCAAAGCCAATCTAGAGAATATTTTCATTC-3') bzw. DiDel-3-*XbaI* (5'-AAATGTAGGTAACTCTAGATTACCATTAG-3') und DiDel-4-*EcoRI* (5'-CGTACAATTCCTCGGAATTCCTCCTCTATG-3') amplifizierten an der BD413-DNA die Bereiche, die stromaufwärts bzw. stromabwärts des dicken Pilusgen lagen. Diese beiden PCR-Produkte wurden mit *EcoRI/XbaI* jeweils in pUC18 kloniert (resultierende Plasmide pUK12 bzw. pUK13, Abb. 3.31). In das pUC18-Derivat pUK12, welches den stromaufwärts liegenden Bereich enthielt, wurde daraufhin die mit *EcoRV* und *HincII* geschnittene Streptomycin-Kassette aus pBS01 in die *HincII*-Schnittstelle (MCS) gesetzt, wonach pUK29 resultierte (Abb. 3.31). Dies führte dazu, daß das klonierte PCR-Produkt an seinem 3'-Ende von dem Streptomycin-Marker begrenzt wurde; nun mußte das zweite PCR-Produkt, welches kloniert in pUK13 vorlag, den Streptomycin-Marker zur anderen Seite begrenzen. Dies erfolgte, indem die Streptomycin-Kassette zusammen mit dem klonierten PCR-Produkt aus pUK29 durch den Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *PstI* herausgeschnitten, mit Klenow-Fragment die überhängenden Enden aufgefüllt wurden und das DNA-Fragment mit stumpfen DNA-Enden in die *HincII*-Schnittstelle (MCS) von pUK13 ligiert wurde. Daraus resultierte das Plasmid pUK30 (Abb. 3.31).

Zur Transformation von *Acinetobacter* sp. N100, welcher bereits das durch den *nptII*-Marker unterbrochene Strukturgen der Untereinheit des dünnen Pilus trug, konnte die Streptomycin-Kassette mit flankierender DNA durch einen Verdau mit *EcoRI* und *PstI* von Vektor-DNA befreit werden.

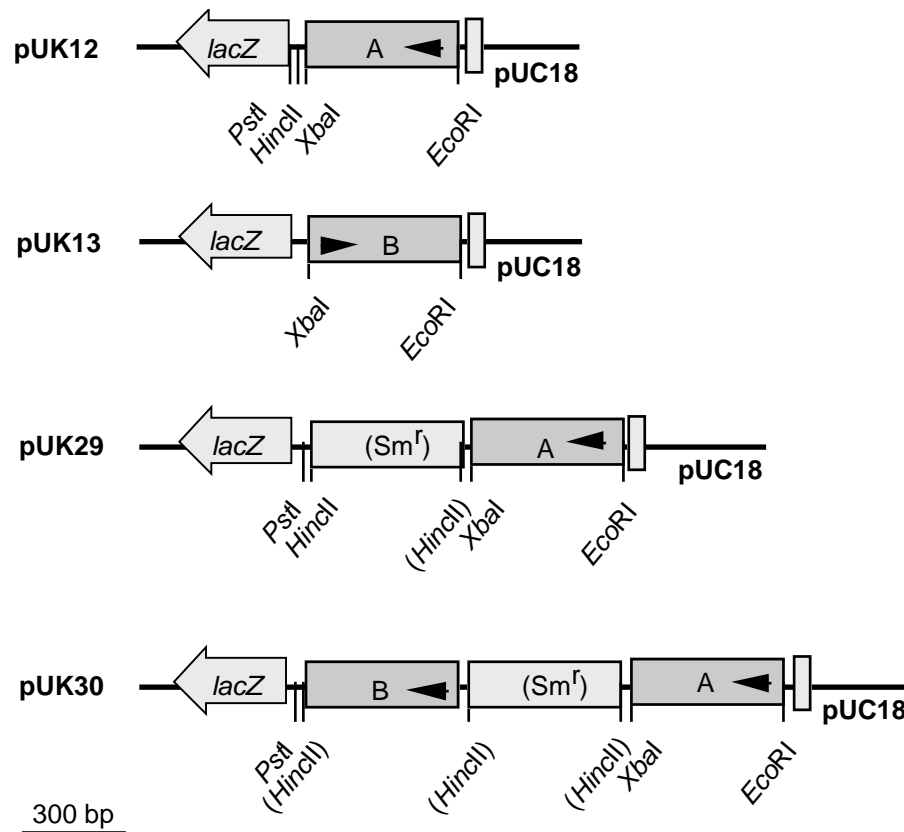


Abb. 3.31: Plasmidkonstruktionen für die Unterbrechung des Pilusgen *filA* der Untereinheit des dicken Pilus mit einem Streptomycinresistenz-Marker. Die PCR-Produkte von DNA-Bereichen stromauf- (A) und stromabwärts (B) des Gens, welches für die Untereinheit des dicken Pilus codiert, wurden jeweils in die Schnittstellen *EcoRI* und *XbaI* von pUC18 kloniert, woraus pUK12 bzw. pUK13 resultierten. In die *HindIII*-Schnittstelle von pUK12 wurde die Streptomycin-Kassette ligiert und daraufhin in das entstandene Plasmid pUK29 das Insert (B) aus pUK13 in richtiger Orientierung gesetzt. Daraus resultierte pUK30, in dem die DNA-Bereiche stromauf- und stromabwärts des Gens der Untereinheit des dicken Pilus durch das Resistenzgen unterbrochen sind. Die Pfeile markieren die Leserichtung des Pilusgens. Die in Klammern dargestellten Namen der Restriktionsschnittstellen können aufgrund der Ligationen mit glatten DNA-Enden nicht mehr geschnitten werden. Der Streptomycin-Marker ist nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Das *lacZ*-Gen von pUC18 gibt die Leserichtung des vektoreigenen Promotors an.

Nach der Transformation des Inserts aus pUK30 in die Mutante N100, die bereits eine *nptII*-Insertion im Gen trägt, welches für die Untereinheit des dünnen Pilus codiert, lag im Chromosom der daraus resultierenden Mutante KN100 zusätzlich eine Deletion des Strukturgens, welches für die Untereinheit des dicken Pilusgen codiert, mit dem Streptomycin-Marker \square vor.

Die Überprüfung der neu eingefügten Mutation durch den Streptomycin-Marker erfolgte mittels SOUTHERN-Blot. Dafür wurde die isolierte chromosomale DNA des

Stammes KN100 zum einen mit *EcoRI* und zum anderen mit *EcoRI* und *SacI* verdaut, im Agarosegel aufgetrennt, geblottet und gegen eine Streptomycin-Sonde detektiert. Durch die Hybridisierung wurde ein 3,6 kb-Fragment markiert, welches der *EcoRI/SacI*-Restriktionsverdau lieferte (Abb. 3.32). In der chromosomalen DNA des Wildtyps ADP239 lagen diese beiden Schnittstellen 2,45 kb auseinander; unter Berücksichtigung der 0,83 kb-Deletion des dicken Pilusgen und nach der Unterbrechung mit der 2,0 kb Streptomycin-Kassette ergaben sich die detektierten 3,6 kb. Die relevanten *EcoRI*-Schnittstellen schlossen im Wildtyp BD413-Chromosom 4,56 kb ein. Nach der homologen Rekombination des Konstruktes, bei dem das dicke Pilusgen durch den Streptomycin-Marker ersetzt worden war, rückten die *EcoRI*-Schnittstellen um weitere 1,17 bp auseinander, so daß auf dem SOUTHERN Blot eine Bande von 5,7 kb detektiert wurde (Abb. 3.32, Spur 2).

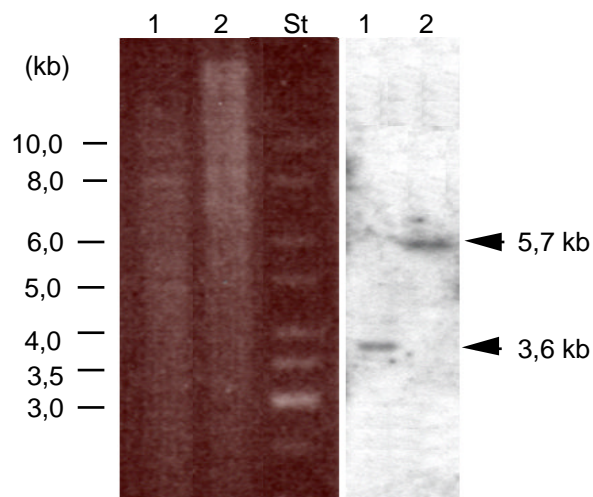


Abb. 3.32: SOUTHERN Blot der Pilusdoppelmutante KN100. Die chromosomale DNA von *Acinetobacter* KN100 wurde mit *EcoRI/SacI* (Spur 1) und *EcoRI* (Spur 2) geschnitten. Nach der Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel und dem Blotten erfolgte die Hybridisierung gegen einer Streptomycin-Sonde. Links ist das Ethidiumbromid-gefärbte Gel und rechts der Blot dargestellt.

Die Detektion der Streptomycin-Kassette in restriktionsverdauter chromosomaler DNA nach der Auftrennung im Agarose-Gel auf derjenigen Laufhöhe, die mit der theoretisch ermittelten DNA-Fragmentlänge übereinstimmte bestätigte die richtige homologe Rekombination ins Zielgen.

3.6.5 Untersuchung der Zelloberfläche nach Unterbrechung der Pilusgene

Nach der Isolierung der beiden Pilusstrukturen von *Acinetobacter* sp. BD413 und N-terminaler Sequenzierung der Untereinheiten konnten die Gene der Strukturproteine identifiziert und daraufhin unterbrochen werden. Die Überprüfung der Mutanten-Stämme N100 (*nptII*-Insertion im Gen der Untereinheit des dünnen Pilus), K101 (*nptII*-Insertion im Gen der Untereinheit des dicken Pilus) und KN100 (Unterbrechungen in beiden Strukturgenen) hinsichtlich ihrer Pilusbiogenese erfolgte auf morphologischer Ebene mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und proteinchemisch durch Auftrennung der Scherfraktionen in einer SDS-PAGE.

Für die Negativkontrastierung mit 4% Uranylacetat wurden die Zellen in 3 ml Succinat-Mineralmedium über Nacht angezogen, zentrifugiert und in 2 ml Phosphat-Saline-Puffer (PBS) resuspendiert. Eine 3 l-Übernacht-Kultur in einem Kluverkolben diente zur Herstellung der Scherfraktion, was in „Material und Methoden“ ausführlich beschrieben ist. Nach der Zellernte erfolgte das Abscheren der Pili durch die 2malige Passage der Kultur durch eine Kanüle. Nach dem Abtrennen der Zellen durch niedertourige Zentrifugation sedimentierten in der Ultrazentrifuge bei 42000 Upm die abgescherten Pili zusammen mit weiteren Proteinaggregaten und Vesikeln. Eine hinreichende Aufreinigung der dünnen und dicken Pili erfolgte, indem das resuspendierte Sediment auf einen zweistufigen Saccharosegradient, bestehend aus 20% und 60% Saccharose, zentrifugiert wurde. Die Interphase zwischen 20%iger und 60%iger Saccharoselösung stellte die Pilusfraktion (beider Pilustypen) dar. Die Untersuchung dieser proteinhaltigen Phase bezüglich der Pilusstrukturen erfolgte in einem 15%igen SDS-Gel, welches mit Silbernitrat gefärbt wurde.

Nach Auftrennung der Pilusfraktion der Positivkontrolle ADP239 in der SDS-PAGE waren die Untereinheiten der dicken Pili bei 28 kDa und die der dünnen Pili bei 16 kDa zu erkennen (Abb. 3.33, A), was die inakte Pilussynthese beider Filamenttypen signalisierte. Die elektronenmikroskopische Abbildung 3.33 (B) bestätigte das Vorhandensein der beiden Pilustypen, da zum einen die dicken Pili mit einem Durchmesser von 6 nm und zum anderen die dünneren, zum Teil aggregierten Strukturen mit Durchmessern von 2-3 nm erkennbar waren. 90% der Zellen wiesen beide Pilustypen auf.

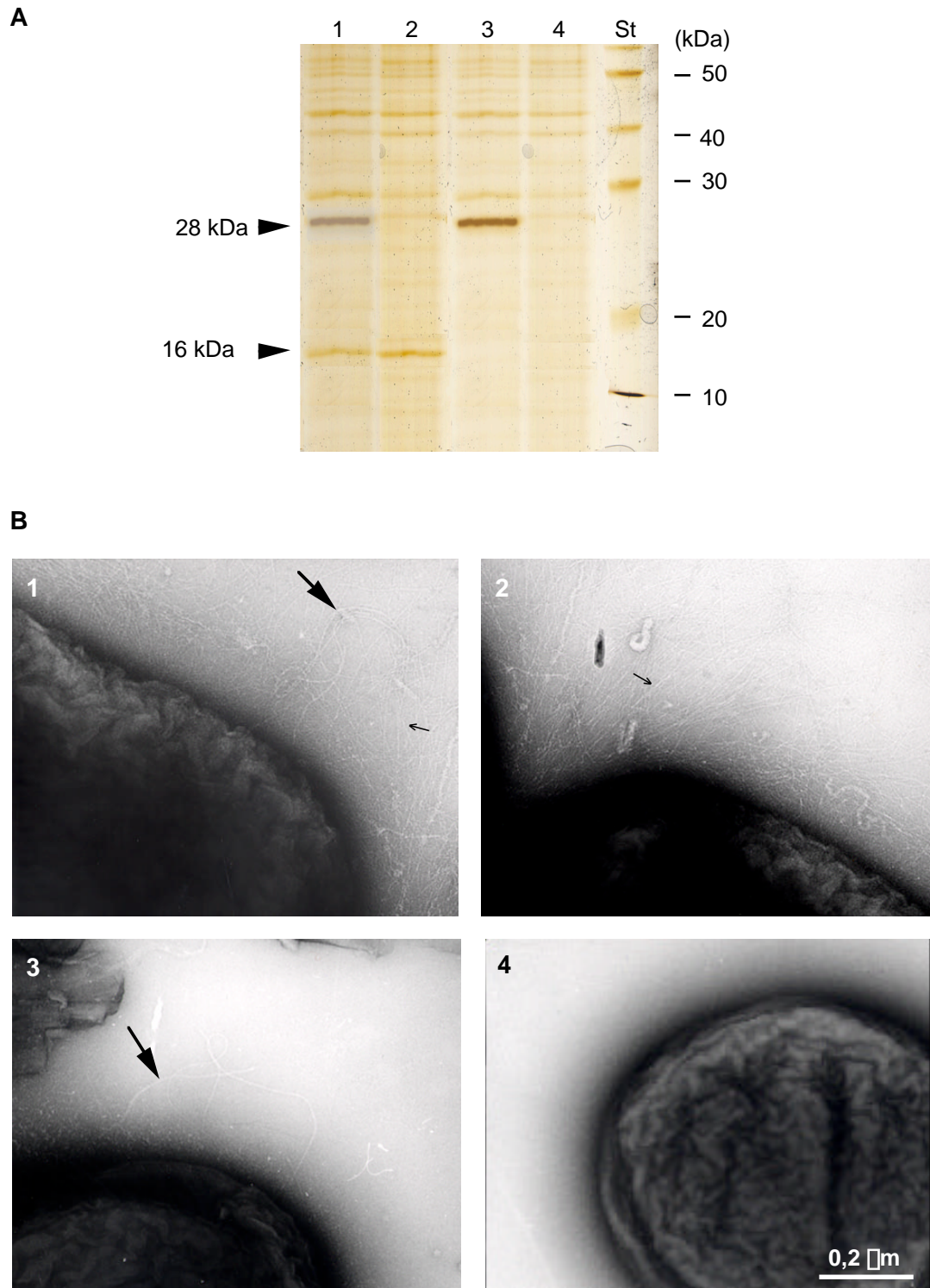


Abb. 3.33: Pilusbiogenese auf der Zelloberfläche von *Acinetobacter*-Stämmen. (A) Nach dem Abschneiden der Pili von den Zelloberflächen wurden diese in Saccharosegradienten gereinigt und die Pilus-Fraktion im 15%igen SDS-Gel aufgetrennt. (B) Die Zellen wurden über Nacht in Mineralmedium angezogen, gewaschen und mit 4% Uranylacetat negativ kontrastiert. (1) BD413; (2) K101; (3) N100; (4) KN100. Die ausgefüllten, großen Pfeilspitzen markieren dicke Pili und die kleineren Pfeile dünne Pili.

Dem Stamm K101, der eine Unterbrechung im dicken Pilusgen trägt, fehlte die dicke Pilusstruktur und somit die 28 kDa-Bande im SDS-Gel (Abb. 3.33), was die Unterbrechung des Strukturgens indizierte. Hier war auf der Zelloberfläche ausschließlich der dünne Pilus-Typ zu sehen, wie in Abbildung 3.33 (B/2) exemplarisch gezeigt ist. Die erkennbare 16 kDa-Bande und die fehlende 28 kDa-Bande im SDS-Gel bestätigen diesen Pilus-Phänotyp. Umgekehrt verhielt es sich mit dem Stamm N100, der die *nptII*-Marker-Insertion im Strukturgen der 16 kDa-Pilusuntereinheit trägt: Allein die dicken Pili wurden synthetisiert, deren Untereinheiten im SDS-Gel bei 28 kDa erkennbar waren; dünne Pili und die dazugehörige 16 kDa-Bande fehlten aufgrund der Unterbrechung des Strukturgens des dünnen Pilus (Abb. 3.33, B/3).

Dem Stamm KN100 fehlten in der elektronenmikroskopischen Abbildung sowohl die dicken als auch die dünnen Pili, was die Unterbrechungen der beiden Strukturgene widerspiegelte. Daß die Pili keinen Bestandteil der Scherfraktion darstellten, konnte durch die beiden fehlenden Banden bei 28 bzw. 16 kDa im SDS-Gel verifiziert werden (Abb. 3.33, A/4). Die morphologische Betrachtung der Zelloberfläche von KN100 ergab, daß diese Mutante mit Unterbrechungen beider Pilusstrukturgene weder dicke noch dünne Pili synthetisierte, was durch die fehlenden Pilusprotein-Banden in der SDS-PAGE bestätigt wurde. Die elektronenmikroskopische Betrachtung von jeweils ca. 50 Zellen des Stamms KN100, die unter verschiedenen Bedingungen (LB-/Mineralmedium, Flüssig-/Agar-Kulturen, Kluverkolben) angezogen worden waren, versicherten weiterhin, daß *Acinetobacter* sp. BD41 keinen dritten Pilustyp synthetisiert.

Vor dem Hintergrund, daß über die N-terminale Ansequenzierung der gereinigten Strukturproteine pilusspezifische Basensequenzen generiert wurden, die zur Identifizierung und Klonierung der jeweiligen Gene führten, und die Unterbrechungen der beiden Pilusstrukturgene die erwarteten Phänotypen erzeugten, kann eindeutig der Schluß gezogen werden, daß es sich bei diesen Genen um die Gene der strukturellen Untereinheiten der dicken bzw. der dünnen Pili handelt.

3.6.6 Physiologische Untersuchung der Pilus-Mutanten

Bei den bisher untersuchten natürlich kompetenten Bakterien sind die Komponenten der Typ-IV-Pilusbiogenese in die DNA-Aufnahme involviert. Darüber hinaus vermittelt dieser Pilustyp eine gleitende Fortbewegung ('Twitching Motility') auf festen feuchten Oberflächen. Da *Acinetobacter* sp. BD413 auf der Zelloberfläche Pili synthetisiert, sich gleitend fortbewegen kann und natürlich transformierbar ist, wurde das Vorhandensein von Typ-IV-Pili und die Beteiligung dieser filamentösen Strukturen in die DNA-Aufnahme postuliert. Zur Klärung der Frage einer möglichen Involvierung der filamentösen

Strukturen von BD413 in die Transformation oder in die gleitende Bewegung sollten die Stämme K101 und N100, mit Unterbrechungen in den Genen für die Untereinheit der dicken bzw. der dünnen Pili und der Stamm KN100, der Unterbrechungen in beiden Strukturgenen trägt, diesbezüglich untersucht werden.

3.6.6.1 Transformationstest der Pilus-Mutanten

Der Test auf natürliche Transformationsfähigkeit erfolgte über den in „Material und Methoden“ beschriebenen Transformationsschnelltest. Abbildung 3.34 zeigt die *p*-Hydroxybenzoat-Agarplatte mit den linear ausgetrichenen Stämmen.

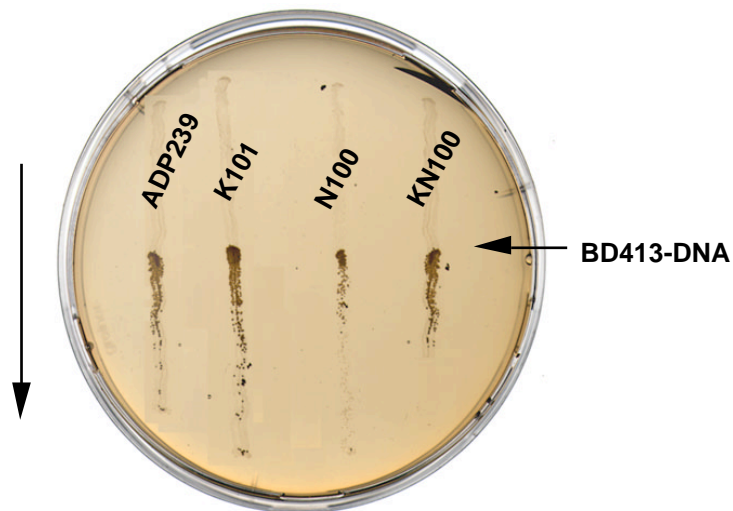


Abb. 3.34: Transformationstest der Pilus-Mutanten-Stämme K101, N100 und KN100. Da die Unterbrechung der Pilusgene in der *pobA*-Mutante *Acinetobacter* sp. BD413 durchgeführt worden war, konnte die Transformation über den Schnelltest durch Wachstum auf *p*-Hydroxybenzoat überprüft werden. Nach dem Passieren der Impföse durch einen Tropfen chromosomale DNA von *Acinetobacter* sp findet bei der Fähigkeit zur natürlichen Transformation Wachstum statt. Der senkrechte Pfeil markiert die Richtung des Ausstrichs.

Der erste Strich repräsentiert die Positivkontrolle ADP239, die vor dem Passieren der BD413-DNA keine Koloniebildung aufwies, nach dem Benetzen mit DNA aufgrund natürlicher Transformationsfähigkeit die Verwertung der vorliegenden Kohlenstoff-Quelle regenerierte. Die parallel angeordneten Pilus-defekten Stämme K101, N100 und KN100 zeigten bezüglich ADP239 ein identisches Bild, was die Fähigkeit zur natürlichen Transformation indizierte (Abb. 3.34). Demnach konnte eine essentielle Funktion der

Pilusstrukturen von *Acinetobacter* sp. BD413 bei der natürlichen Transformation ausgeschlossen werden.

Dieses Ergebnis läßt den eindeutigen Schluß zu, daß die dicken und dünnen Pili von *Acinetobacter* sp. BD413 nicht an der natürlichen Transformation beteiligt sind.

3.6.6.2 Test auf gleitende Bewegung der Pilus-Mutanten

Die Untersuchung der gleitenden Fortbewegung der verschiedenen Pilusmutanten K101 (defekt in der Synthese dicker Pili), N100 (defekt in der Synthese dünner Pili) und KN100 (Pilusdoppelmutante) verglichen zum Wildtypstamm ADP239 erfolgte über die Morphologie der über Nacht bei hoher Luftfeuchtigkeit gewachsenen Kolonien auf frisch gegossenen Succinat-Mineralmedium-Agarplatten bzw. LB-Platten. Die Zellen in dem auf die Agarplatte aufgesetzten 0,5 μ l Kulturtropfen vermehrten sich in dieser Zeit und bildeten danach Koloniedurchmesser von ca. 4 cm (Abb. 3.35).

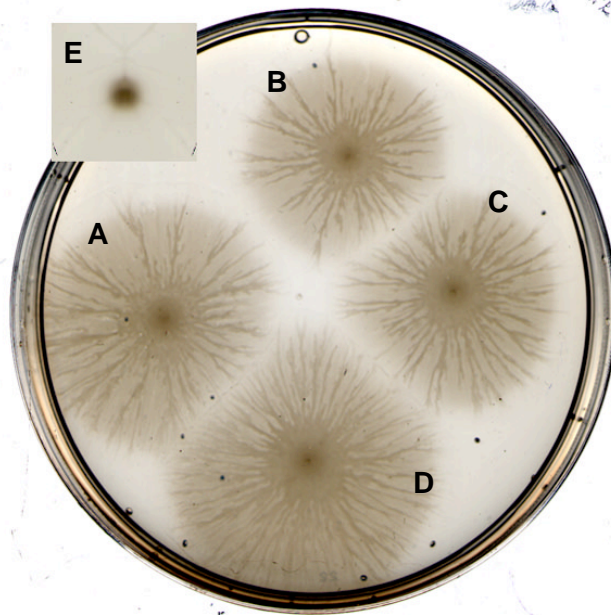


Abb. 3.35: Gleitende Bewegung von *Acinetobacter*. 0,5 μ l Zellsuspension einer in LB-Medium angezogenen Kultur wurde auf eine frisch gegossene Agarplatte gegeben und über Nacht unter feuchter Atmosphäre inkubiert. (A) ADP239; (B) K101 (*filA*-Mutante); (C) N100 (*fimA*-Mutante); (D) KN100 (*filA*/*fimA*-Doppelmutante); (E) *E. coli* DH5a

Sowohl nach der Inkubation der Zellen auf LB-Medium als auch auf Mineralmedium zeigten sich ähnliche Kulturdurchmesser und –morphologien. Dabei handelte es sich um flach auslaufende rundliche Gebilde mit der höchsten Erhebung im Zentrum, wobei die

Ränder weit und leicht gelappt ausliefen. In radialer Richtung bildeten sich beim Wachstum rippenartige Erhebungen. Im Gegensatz zu den *Acinetobacter*-Stämmen wuchsen *E. coli*-Zellen, die sich auf Agarplatten nicht fortbewegen können und somit als Negativkontrolle dienten, zu einer halbrund nach oben gewölbten Kolonie heran. Der Durchmesser dieser Kolonie betrug hierbei 0,5 cm (Abb. 3.35, E).

Der 'Twitching'-Test verdeutlichte, daß das Fehlen der dicken bzw. der dünnen Pili bei den Stämmen K101 bzw. N100 und das Fehlen beider Filamentstrukturen bei der Mutante KN100 nicht zu einer veränderten Koloniemorphologie führte. Aus diesem Grund muß das Gleiten von *Acinetobacter* sp. BD413 Pilus-unabhängig erfolgen.

Daß die Ausbildung der flachen, breit auslaufenden Kolonien auf aktives Gleiten zurückzuführen war und nicht auf oberflächenbedingte Abstoßungsreaktionen der Bakterien beruhte, wurde daraufhin lichtmikroskopisch überprüft. Anstelle der Agarplatten dienten hierbei mit Mineralmedium beschichtete Objektträger, die mit 0,5 μ l der jeweiligen Zellsuspensionen punktiert über Nacht bei hoher Luftfeuchtigkeit in Petrischalen inkubiert wurden. Bei Vergrößerungen von 100 und 400 zeigte sich der wellenförmige Vorschub der Zellfront, zuäußerst bestehend aus einer Zellage, dem nachfolgend Richtung Zentrum stufenartig weitere Zellebenen aufgelagert waren (Abb. 3.36, A/1). Bemerkenswert dabei ist, daß sich eine geschlossene einzellige Lage auf einen weiten Bereich von bis zu 100-200 μ m erstreckte. Da auch hier die Koloniemorphologie der Pilusmutanten K101, N100 und KN100 – wie die makroskopische Betrachtung bereits indiziert hatte – verglichen zum Wildtypstamm ADP239 keine Unterschiede aufwies, sind im Folgenden die Abbildungen des Wildtyps und der Pilusdoppelmutante KN100 exemplarisch gezeigt.

Die Kolonieränder der Stämme ADP239 und KN100 wiesen zwar vom Zellverband abgetrennte Zellgruppen und vereinzelt Bakterien auf, doch lagen diese relativ dicht, so daß sich nach weiteren Zellteilungen unter dem Vorschub der geschlossenen Einzelzell-Lage die erwähnten rund-gelappten Randbereiche ergaben und sich keine weit abwandernden Tochterkolonien bildeten (Abb. 3.36, A/1). Während demzufolge am Rand der Kolonie Wachstum und gleitende Fortbewegung auf der Agaroberfläche zu finden waren, wuchsen die Zellen zur Mitte hin zunehmend in die Höhe. Dabei ist nicht auszuschließen, daß die Bakterien in den oberen Zellagen ebenso gleitende Bewegungen ausführten. Der unbewegliche Stamm *E. coli* wuchs dagegen als runde Zellaggregation, in welcher der Randbereich ausschließlich durch Zellteilung und Wachstum eine Ausdehnung erfuhr (Abb. 3.36, A/3). Hier waren keine Bakterien außerhalb dieser Randlinie und keine geordnete Zellschichtung zu erkennen.

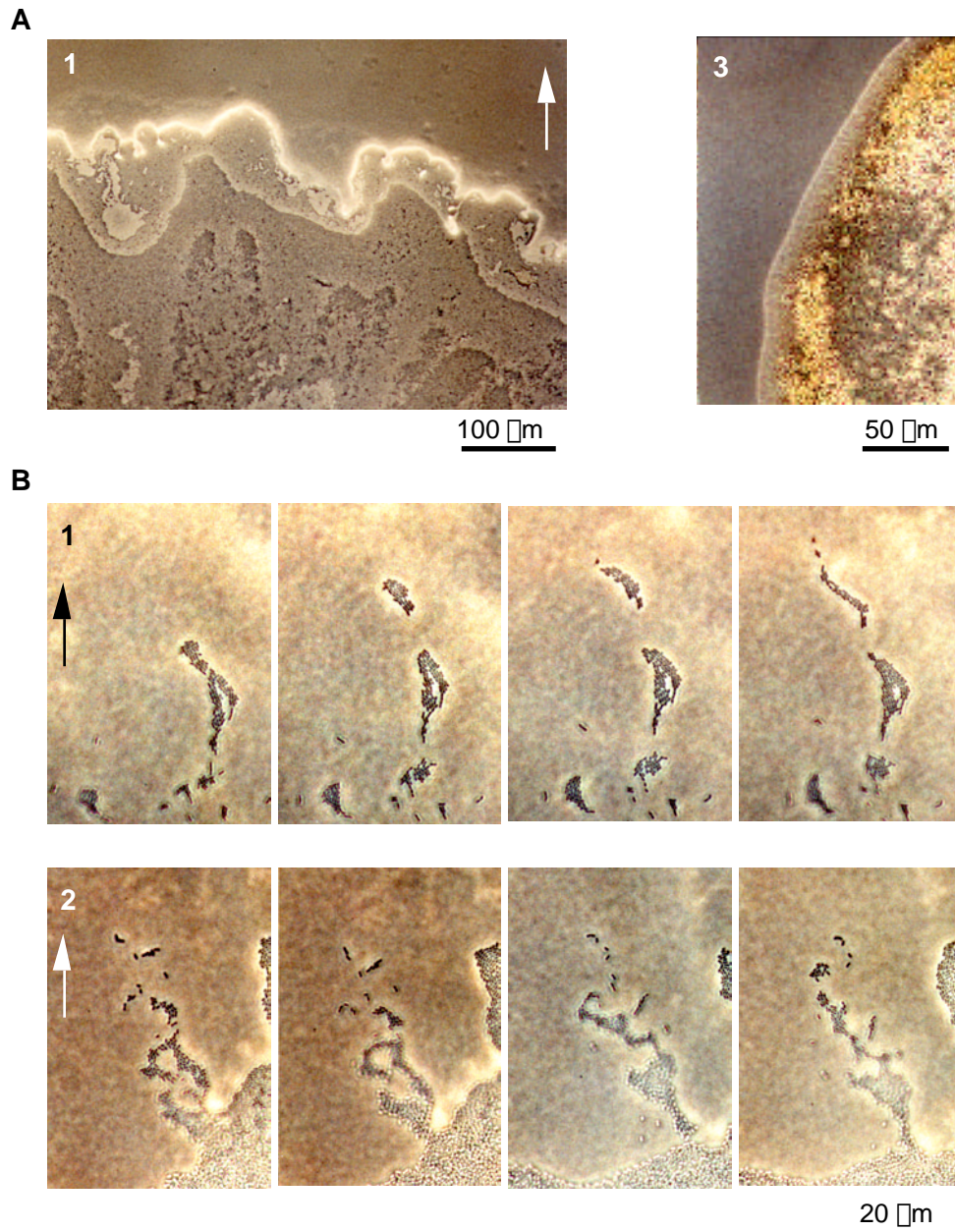


Abb. 3.36: Lichtmikroskopische Darstellung der gleitenden Bewegung von *Acinetobacter*. (A) Nach dem Wachstum von *Acinetobacter* sp. ADP239 (1) und *E. coli* DH5a (3) auf frisch gegossenen Agarplatten unter feuchter Atmosphäre sind die Kolonieränder dargestellt. (B) Die Bildserie zeigt die gleitende Bewegung von ADP239 (1) und der Pilusdoppelmutante KN100 (2). Die Fotos wurden in 8minütigen Intervallen geschossen. Die Pfeile markieren die Richtung der gleitenden Bewegung.

Die sich am Rand der Kolonie teilenden Zellen des Stammes ADP239 bildeten zunächst eine Zellgruppierung von ca. 20 Bakterien, die sich daraufhin vom Kolonierand entfernten und schließlich eine langgestreckte Linie bildeten. Während dieses Gleitens fand in dem beobachteten Zeitraum von 24 min keine weitere Zellteilung statt. In ähnlicher Weise bewegten sich die Zellen des Stammes KN100 vom Rand der Kolonie in Richtung

der nicht bewachsenen Agarfläche. Nach Zellteilungen fand eine Streckung des Zellaggregates statt, wobei sich auch hier der Zellverband nicht auflöste, sondern die Bakterien in Kontakt miteinander blieben. Unter Berücksichtigung, daß die Bilderfolgen in einem Abstand von 8 min aufgenommen wurden, konnte eine Geschwindigkeit der gleitenden Bewegung von 2-3 $\mu\text{m}/\text{min}$ kalkuliert werden (Abb. 3.36, B).

Die lichtmikroskopische Betrachtung von Einzelzellverbänden verdeutlichte, daß die gleitende Bewegung von *Acinetobacter* sp. BD413 einen aktiven Prozeß darstellte und nicht allein auf Wachstum und Zellteilungen mit anschließender horizontaler Verschiebung der Bakterien untereinander beruhte. Weiterhin erfolgte das Gleiten unabhängig der dicken und dünnen Pili, so daß hier eine pilusunabhängige Fortbewegung vorliegen mußte.

3.6.7 Molekulare Charakterisierung des dicken Pilus

Die Unterbrechung des Strukturgens, welches für die Untereinheit des dicken Pilus codiert, resultierte in dem Stamm K101, der keine dicken Pili auf der Zelloberfläche synthetisiert und verglichen zum Wildtyp-Stamm eine unveränderte Fähigkeit zur natürlichen Transformation und zur gleitenden Bewegung aufweist (3.6.6.1/3.6.6.2). Um die vollständige Sequenz des Pilus-Strukturgens zu erhalten (die genomische Sequenz von BD413 lag zu dieser Zeit noch nicht vor), sollte zunächst der Mutationsort aus der chromosomalen DNA des Stamms K101 und anschließend nach einer neuen *nptII*-Insertion in das benachbarte Gen schließlich das Wildtypallel kloniert werden. Für eine weitere Charakterisierung des dicken Pilus sollte die genomische Lokalisation des Strukturgens und die Involvierung benachbarter Gene in die Pilusbiogenese untersucht werden.

3.6.7.1 Untersuchung der Aminosäuresequenz und Quartärstruktur der 28 kDa-Untereinheit des dicken Pilus

Für einen Datenbankabgleich der Pilusuntereinheit mit bereits sequenzierten Genomen von Mikroorganismen und für Untersuchungen der Primärstruktur des Proteins wurde zunächst der Mutationsort von *Acinetobacter* sp. K101 kloniert und der DNA-Bereich, der den *nptII*-Marker flankiert, sequenziert.

Nach dem Restriktionsverdau der isolierten chromosomalen DNA von *Acinetobacter* sp. K101 mit *SacI* und *XbaI* und der Ligation in den ebenso geschnittenen Vektor pGEM-7f(+) konnte ein ca. 11 kb-Fragment, welches den Kanamycin-Marker besaß, kloniert werden. Durch die Sequenzierung des die Resistenzkassette flankierenden DNA-Bereichs in dem resultierenden Plasmid pGK03 lag das dicke Pilusgen in seiner Sequenz vollständig

vor. Das Gen bestand aus 244 Aminosäuren (864 bp), was einer errechneten molekulare Masse von 28,9 kDa entsprach. Da die N-terminale Aminosäuresequenz des prozessierten Proteins bestimmt worden war (3.6.1), mußte ein Leaderpeptid mit einer molekularen Masse von 3,8 kDa (36 Aminosäuren) vorgelegen haben. Daraufhin besaß das prozessierte Protein eine errechnete molekulare Masse von 25,1 kDa, was mit der über die SDS-PAGE bestimmten Masse von 28 kDa in der gleiche Größenordnung lag. Der N-Terminus des Präproteins war vorwiegend aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaut, wobei für Leadersequenzen in charakteristischer Weise direkt am N-Terminus an 2. und 6. Position die basische Aminosäure Lysin stand. Die Prozessierungsstelle ($_{-5}\text{SATTGQ}^{\square}\text{DG}_{+2}$) wies weiterhin die für Signalsequenzen charakteristischen Aminosäuren Alanin, Serin und Glycin auf (MARTOGLIO & DOBBERSTEIN 1998).

Das Hydrophobizitätsdiagramm der Untereinheit des dicken Pilus zeigte jeweils zwei hydrophile und hydrophobe Bereiche, die sich alternierend zusammensetzten, wobei der überwiegende Anteil der Aminosäuren einen hydrophoben Charakter aufweist (Abb. 3.37). Da die dicken Pili von BD413 einen hydrophilen Charakter besitzen (3.6.1/3.6.10), sind vermutlich die geladenen und polaren Aminosäure-Reste exponiert und die unpolaren zum Zentrum der Pilusstruktur gerichtet. Diese Verteilung der Polaritäten konnte für die Typ-I- und Typ-IV-Pili gezeigt wurde, die in helikaler Anordnung assembliert werden und in der Kernregion durch hydrophobe Wechselwirkungen Stabilität erlangen (FOREST & TAINER 1997, FERNÁNDEZ & BERENQUER 2000).

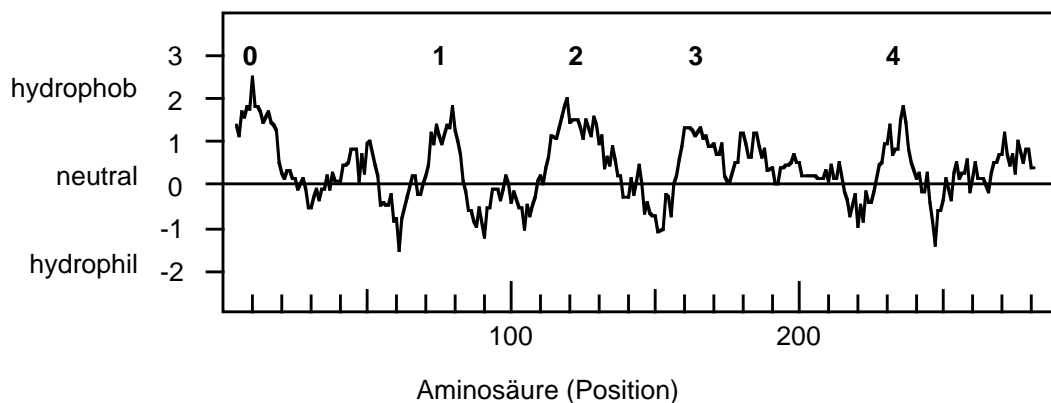


Abb. 3.37: Hydrophobizitätsdiagramm der Untereinheit FilA des dicken Pilus nach KYTE & DOOLITTLE (1982). Die Ordinate gibt die relative Hydrophobizität wieder. Positive Werte geben hydrophobe und negative Werte hydrophile Bereiche an. Die Abszisse zeigt die Position der Aminosäure ausgehend vom N-Terminus an. Die mit Ziffern (0-4) markierten Bereiche zeigen hydrophobe Proteindomänen an, wobei die Domäne, die mit Ziffer 0 versehen ist, die Signalsequenz darstellt.

Daß der dicke Pilus dem allgemeinen Bauprinzip stabiler Filamente als helikale Struktur folgt, konnten elektronenmikroskopische Darstellungen belegen. Der 6 nm breite Pilus zeigte eine helikale Anordnung der Untereinheiten, wobei die Steighöhe jeder Umdrehung 4-5 nm beträgt (Abb. 3.38). Die hohe Auflösung verdeutlichte vereinzelt Bereiche in der Pilusstruktur, die schmaler erschienen als 6 nm. In diesen Bereichen liegt die Pilus-Spirale in gestreckter Form vor, wobei die Höhe einer Umdrehung ca. 10 nm beträgt.

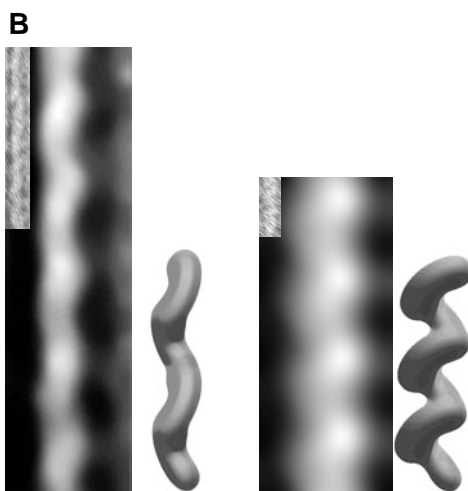
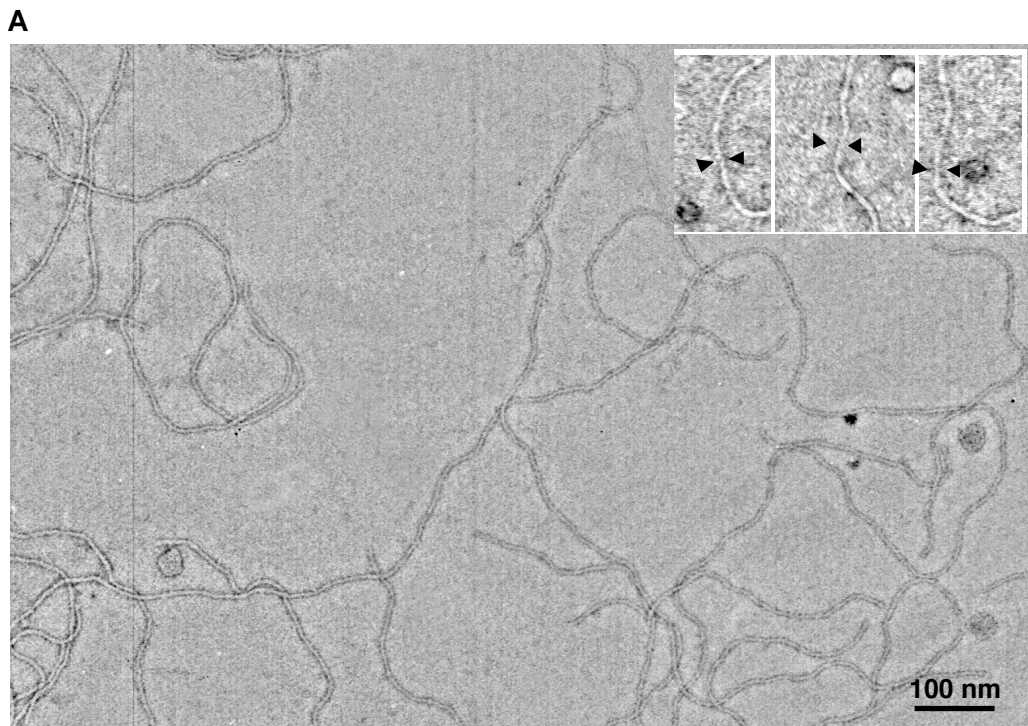


Abb. 3.38: Struktur der dicken Pili von *Acinetobacter* sp. BD413. Die dicken Pili, die einen Durchmesser von 6 nm und eine helikale Untereinheitenstruktur aufweisen, zeigen in einigen Bereichen eine gestreckte Helix mit einem Durchmesser von 4 nm. In Abbildung (A) ist die elektronenmikroskopische Darstellung der Pili zu sehen, wobei die Bildfolge oben rechts auf die gestreckte Helix verweist (durch Pfeile markiert). In Abbildung (B) ist die gestreckte (links) und gestauchte (rechts) Helixstruktur schematisch wiedergegeben.

Der Datenbankabgleich der Aminosäuresequenz der Untereinheit des dicken Pilus ergab keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen oder uncharakterisierten hypothetischen Proteinen bereits sequenzierter Organismen. Weiterhin weisen Abschnitte des Proteins keine charakteristischen Sequenzen bekannter Domänen auf. Eine Verwandtschaft zu bekannten Pilusuntereinheiten konnte somit ausgeschlossen werden. Die strukturelle Untereinheit des dicken Pilus wurde daraufhin FilA genannt.

Da die strukturellen Untereinheiten von Pili im allgemeinen eine hohe Aminosäuresequenz-Variabilität auszeichnet, kann der dicke Pilus von *Acinetobacter* sp. BD413 erst durch die Untersuchung seiner genomischen Lokalisation und des Pilusbiogenese-Wegs einem bekannten Typ oder einem neuen Pilustyp zugeordnet werden.

3.6.7.2 Analyse des *filA*-Lokus

Da in Prokaryonten vielfach Gene derselben Biosyntheseeinheit geclustert oder in einem Operon vorliegen, lassen sich oftmals durch Vergleiche noch nicht untersuchter Gencluster Zusammenhänge zu bereits untersuchten Transkriptionseinheiten finden, die bei der Betrachtung eines einzelnen Gens nicht in Erscheinung treten. Da die in dieser Arbeit identifizierte Untereinheit FilA des dicken Pilus keine Ähnlichkeit zu bekannten Strukturproteinen aufwies, sollte die Untersuchung benachbarter ORFs, die Assemblierungsfaktoren darstellen könnten, mögliche Hinweise auf eine Verwandtschaft zu einer bekannten Pilusklasse liefern oder im Falle von Biosynthesefaktoren, die keine Ähnlichkeit zu bereits identifizierten Assemblierungsproteinen aufweisen, einen neuen Pilustyp bestätigen.

Das Strukturgen *filA* bildet das erste Gen in einem potentiellen Cluster von insgesamt sechs ORFs gleicher Leserichtung (Abb. 3.39). Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz drei der stromabwärts lokalisierten ORFs weisen Ähnlichkeiten zu hypothetischen Proteinen auf, die ihrerseits aufgrund von Ähnlichkeiten zu hypothetischen Proteinen annotiert wurden. Diesen Annotationen liegt demnach keine proteinchemische Charakterisierung zugrunde, so daß die Zuordnung einer Funktion aufgrund von hypothetischen Proteinen, denen eine potentielle Funktion zugeschrieben wurde, fraglich erscheint. Aus diesem Grund sind in der folgenden Beschreibung die Ähnlichkeiten zu hypothetischen Proteinen erwähnt, doch lassen diese Ähnlichkeiten keinen Schluß hinsichtlich ihrer Funktion zu, da die Annotation der ähnlichen Proteine nicht experimentell überprüft worden sind.

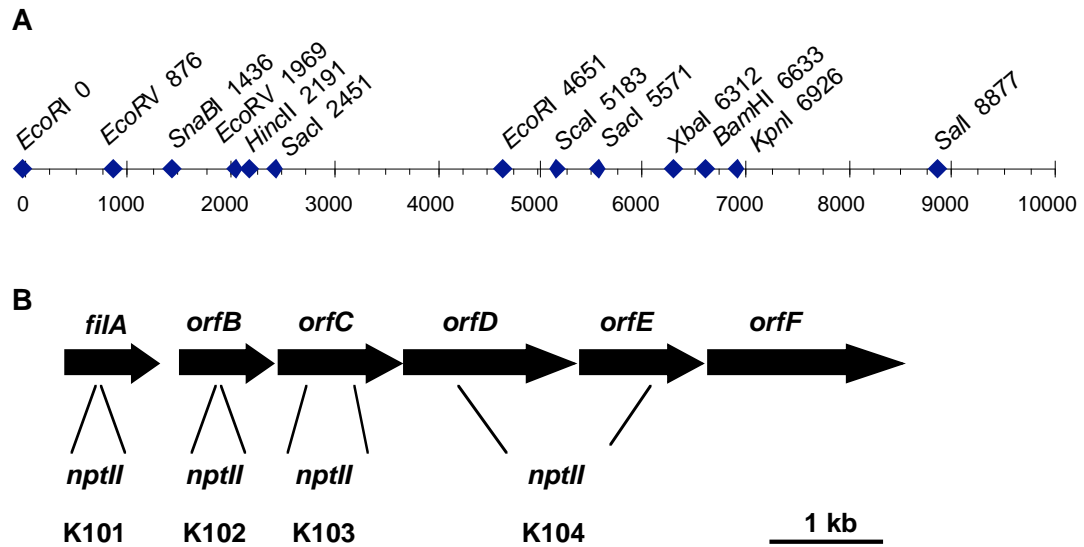


Abb. 3.39: Organisation des *fil*-Genclusters. *filA* bildet das erste Gen in einem Cluster mit insgesamt 6 ORFs gleicher Leserichtung. (A) Relevante Restriktionsschnittstellen sind auf der Skala markiert, die die Basen-Position angibt. (B) Die Mutanten-Stämme K101 und K102 tragen Unterbrechungen in *filA* bzw. *orfB*. Im Chromosom der Stämme K103 und K103 wurden *orfC* bzw. *orfD/orfE* durch den *nptII*-Marker deletiert.

Der zweite ORF des potentiellen *fil*-Clusters, *orfB*, zeigt Ähnlichkeiten zu hypothetischen ATP-bindenden Komponenten von ABC-Transportern oder hypothetischen Bacteriocin-Resistenz-Proteinen (< 35% Ähnlichkeit). *orfC* weist geringe Sequenzähnlichkeiten zu hypothetischen Acetatkinasen auf (< 30% Ähnlichkeit). Zu bereits charakterisierten Proteinen wurden für beide Genprodukte keine Ähnlichkeiten gefunden. Der vierte ORF, *orfD*, stellt möglicherweise aufgrund hydrophober Aminosäuresequenz-Bereiche ein äußeres Membranprotein dar (< 42% Ähnlichkeit); doch auch hier bestand keine signifikante Ähnlichkeit zu untersuchten Proteinen. Dem fünften und sechsten ORF des Genclusters, *orfE* und *orfF*, konnte keine mögliche Funktion zugeordnet werden, da in der Datenbank keine Ähnlichkeiten gefunden wurden. Auch hier bestand – wie bei *FilA* – keine Ähnlichkeit zu uncharakterisierten hypothetischen Proteinen in bereits sequenzierten Organismen.

Die Datenbankabgleiche ergaben für die ORFs des potentiellen *fil*-Clusters keine Ähnlichkeit zu Komponenten bereits identifizierter Pilusbiosynthesewegen. Aufgrund der gleichen Leserichtung der Gene im *fil*-Cluster, wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Genprodukte der stromabwärts des Strukturgens *filA* lokalisierten ORFs in die Biogenese des dicken Pilus von *Acinetobacter* sp. BD413 involviert sind und daß es sich um eine neue Klasse und einen neuen Biosyntheseweg von filamentbildenden Strukturen handelt.

3.6.7.3 Unterbrechung und Deletionen der ORFs im *fil*-Cluster

Um die Frage zu klären, ob die stromabwärts des *filA*-Gens liegenden ORFs in die Biosynthese der dicken Pilusstruktur von BD413 involviert sind, wurde zunächst *orfB* gezielt unterbrochen. Weiterhin sollten zwei Bereiche von 1,1 kb bzw. 2,7 bp deletiert werden, die zum einen *orfC* und zum anderen *orfD* zusammen mit *orfE* betrafen.

Zur Herstellung des Konstruktes für die Unterbrechung des zu *filA* benachbarten *orfB* diente das Plasmid pGK03, welches das aus der chromosomalen DNA von *Acinetobacter* sp. K101 stammende 11 kb-*XbaI/SacI*-Fragment trug (3.6.7.1). Auf diesem Plasmid liegt das mit dem *nptII*-Marker unterbrochene Gen *filA* und der dazu stromabwärts liegende *orfB*. Nach der Subklonierung des 1,0 kb-*SnaBI/SacI*-Bereiches aus pGK03 in pGEM-7f(+) (*SmaI/SacI*) entstand das Plasmid pGK06, welches jetzt allein den gewünschten *orfB* trug (vgl. Restriktionskarte in Abb. 3.39). Nach der Integration des mit *HincII*-geschnittenen *nptII*-Markers (aus pUC4K) in die *HincII*-Schnittstelle des Inserts von pGK06 entstand pGK07 (Abb. 3.40). Daraufhin befand sich das Resistenzgen zwischen 740 bp und 260 bp flankierender DNA, die aus Bereichen des *orfB* bestanden. Das herausgeschnittene Insert, welches jetzt 2,2 kb aufwies, diente der Mutagenisierung von *Acinetobacter* sp. ADP239, wozu die natürliche Transformation genutzt wurde. Die Mutante mit der Unterbrechung in *orfB* wurde als K102 bezeichnet.

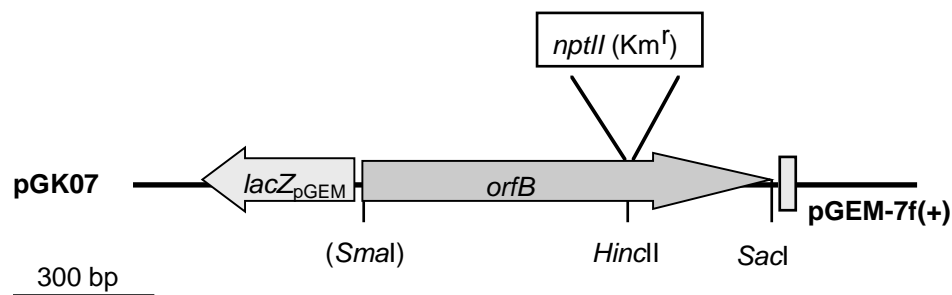


Abb. 3.40: Plasmidkonstruktion für die Unterbrechung von *orfB*. In die *HincII*-Schnittstelle des in pGEM-7f(+) klonierten *SnaBI/SacI*-Fragments wurde die Kanamycin-Kassette ligiert. Das Resistenzgen ist nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Dargestellt sind nur die für die Klonierung relevanten Schnittstellen, wobei die in Klammern dargestellte *SmaI*-Schnittstelle aufgrund der Ligation mit der *SnaBI*-Schnittstelle des Inserts nicht mehr restriktionsverdaut werden kann. Das *lacZ*-Gen von pGEM-7f(+) gibt die Leserichtung des vektoreigenen Promotors an.

Die Überprüfung der homologen Rekombination ins Zielgen erfolgte mittels SOUTHERN Hybridisierung, indem die isolierte chromosomale DNA der entstandenen Mutante K102 mit *EcoRI* bzw. mit *EcoRI/SacI* restriktionsverdaut, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet wurde. Die Größe des *nptII*-Marker-tragenden

DNA-Fragments konnte mit einer Kanamycin-Sonde detektiert werden. Vor der Intergration des 1,2 kb-Resistenz-Markers lagen beide relevanten *EcoRI*-Schnittstellen 4,7 kb voneinander entfernt; nach der Unterbrechung von *orfB* vergrößerte sich der Abstand auf 5,9 kb, die im SOUTHERN Blot detektiert wurden (Abb. 3.41). Der Doppelverdau mit *EcoRI* und *SacI* lieferte weiterhin den Beweis, daß der integrierte Marker den Genbereich um 1,2 kb erweiterte: Nicht die ursprüngliche Basenzahl von 2,4 kb, sondern ein 3,6 kb-Fragment wurde detektiert (Abb. 3.41). Die Übereinstimmung der theoretisch ermittelten *nptII*-Marker-tragenden DNA-Fragmentlängen mit denjenigen, die der SOUTHERN Blot lieferte, demonstrierte die richtige Integration des Markers ins Zielgen.

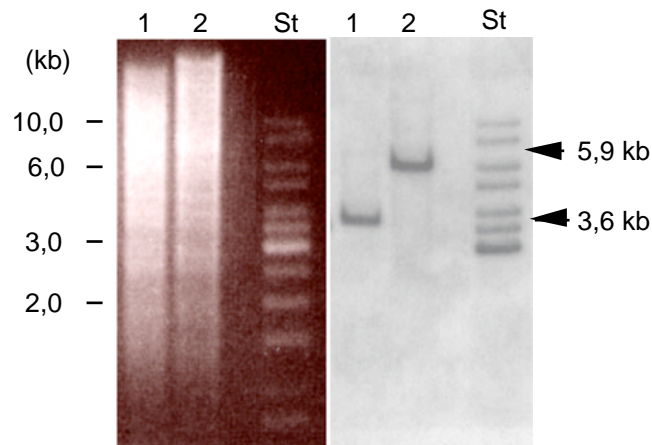


Abb. 3.41: SOUTHERN Hybridisierung restriktionsverdauter DNA gegen eine Kanamycin-Sonde. Die isolierte chromosomale DNA von *Acinetobacter* sp. K102 (*orfB*-Mutante) wurde mit *EcoRI/SacI* (Spur 1) und *EcoRI* (Spur 2) geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt und nach dem Blotten gegen eine Kanamycin-Sonde hybridisiert. Die Sonde markierte unspezifisch die DNA Banden des Größenstandards (St) im Bereich von 3-10 kb. Auf der linken Seite ist das Ethidiumbromid-gefärbte Gel und auf der rechten der SOUTHERN Blot dargestellt.

Da *orfC* keine geeignete Schnittstelle für eine Resistenzmarker-Insertion aufwies, wurden die DNA-Bereiche, die später den Marker flankieren sollten, getrennt mittels PCR-amplifiziert. Die generierten Primer wiesen dazu Restriktionsschnittstellen auf, die eine Klonierung mit dem *nptII*-Marker erlaubten. Die Primer AcKinMu-*SacI*-NA1 (5`-CATT AAAGAGAGAGCTCCAGGGACAGTTC-3`) und AcKinMu-*BamHI*-CA1 (5`-GAGCTC TCTTCATTGGATCCACCACATTAT-3`) amplifizierten an der BD413-DNA stromaufwärts von *orfC* einen Bereich von 790 bp, der nach dem Restriktionsverdau mit *SacI/BamHI* in pGEM-7f(+) kloniert wurde, wonach das Plasmid pGK16 resultierte (Abb. 3.42). In den mit *SmaI* (MCS) linearisierten pGK16 wurde daraufhin der mit *HincII*

geschnittene *nptII*-Marker aus pUC4K ligiert. Aus diesem resultierenden Plasmid pGK21 konnte das gesamte Insert (*nptII*-Marker und PCR-Produkt) mit *SacI/EcoRI* herausgeschnitten und in den äquivalent geschnittenen pGK17 kloniert werden. pGK17 (ein pGEM-7f(+)-Derivat) enthielt das mit *EcoRI/XbaI* klonierte 790 bp PCR-Produkt, welches mit den Primern AcKinMu-*EcoRI*-NB1 (5'-CAATGGAACATTGG GAATTCGCTTAACTGAAG-3') und AcKinMu-*XbaI*-CB1 (5'-CAGCAGAAGCAAA TCTAGAAATAACGTCATTG-3') zuvor amplifiziert worden war. Das entstandene Plasmid pGK23 enthielt schließlich den *nptII*-Marker und angrenzend die für die spätere homologe Rekombination flankierenden DNA-Bereiche (Abb. 3.42). Für die Transformation von *Acinetobacter* sp. ADP239 konnte das gesamte Insert mit *SacI* und *XbaI* herausgeschnitten werden. Die Mutante mit der Deletion von *orfC* wurde als K103 bezeichnet.

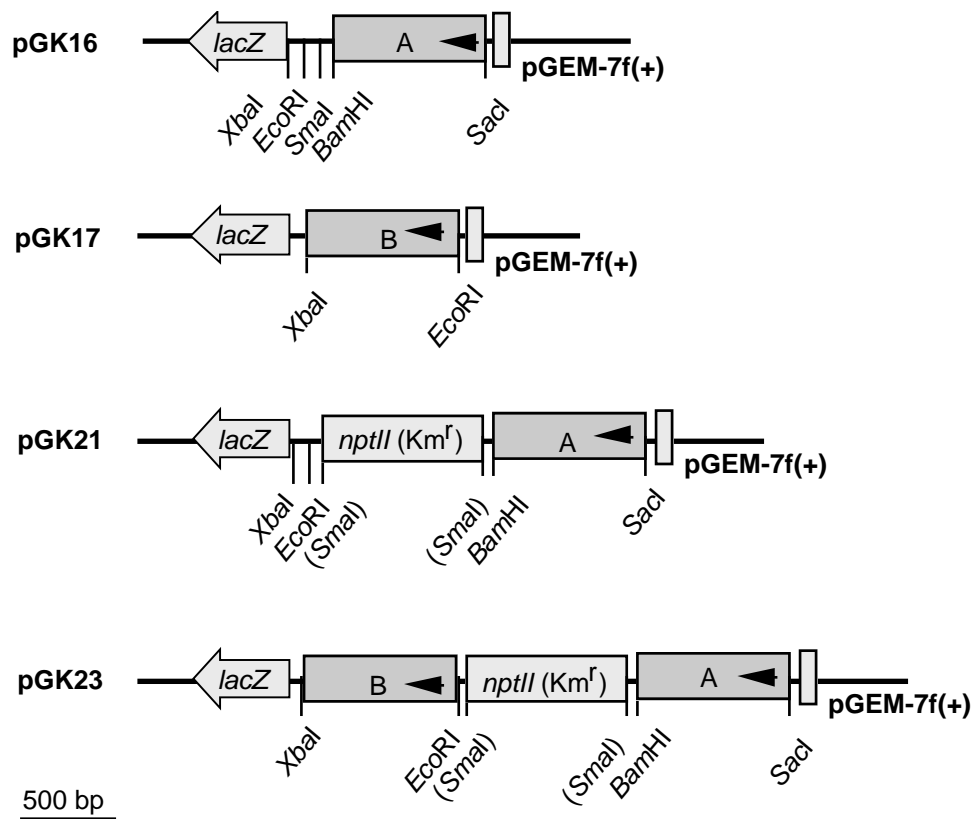


Abb. 3.42: Plasmidkonstruktionen für die Unterbrechung von *orfC*. Die PCR-Produkte von DNA-Bereichen stromauf- (A) und stromabwärts (B) des Gens *orfC* wurden jeweils in pGEM-7f(+) kloniert, woraus pGK16 bzw. pGK17 resultieren. In die *SmaI*-Schnittstelle von pGK16 wurde die Kanamycin-Kassette ligiert und daraufhin in das entstandene Plasmid pGK21 das Insert (B) aus pGK17 mit *EcoRI* und *XbaI* kloniert. Daraus resultierte pGK23, in dem die DNA-Bereiche stromauf- und stromabwärts von *orfC* durch das Resistenzgen unterbrochen sind. Die Pfeile markieren die Leserichtung von *orfC*. Die in Klammern dargestellten Namen der Restriktionsschnittstellen können aufgrund der Ligation mit glatten DNA-Enden nicht mehr geschnitten werden. Der Kanamycin-Marker ist nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Dargestellt sind nur die für die Klonierung relevanten Schnittstellen. Das *lacZ*-Gen von pGEM-7f(+) gibt die Leserichtung des vektoreigenen Promotors an.

Die Überprüfung auf einmalige und homologe Rekombination ins Genom des entstandenen Stamms *Acinetobacter* sp. K103 erfolgte über die Detektion des *nptII*-Markers in einem SOUTHERN Blot. Die isolierte chromosomale DNA von K103 wurde mit *EcoRV/XbaI* und *KpnI* restriktionsverdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, gebロットet und schließlich die Laufhöhe des DNA-Fragmentes, welches den Kanamycin-Marker trug, mit einer *nptII*-Sonde detektiert.

In der chromosomalen DNA des Wildtyps ADP239 lagen die beiden relevanten Schnittstellen *EcoRV* und *XbaI* 4,3 kb auseinander; unter Berücksichtigung der 1,1 kb-Deletion des *orfC* und der Integration der 1,2 kb großen Kanamycin-Kassette ergaben sich die detektierten 4,4 kb (Abb. 3.43, A). Die relevanten *KpnI*-Schnittstellen schlossen im ADP239-Chromosom 6,0 kb ein. Nach der Transformation, nachdem *orfC* durch den Resistenz-Marker (1,2 kb) ersetzt worden war, erfolgte eine zusätzlicher Integration von 0,1 kb, so daß im SOUTHERN-Blot eine Bande von 6,1 kb detektiert wurde (Abb. 3.43, A).

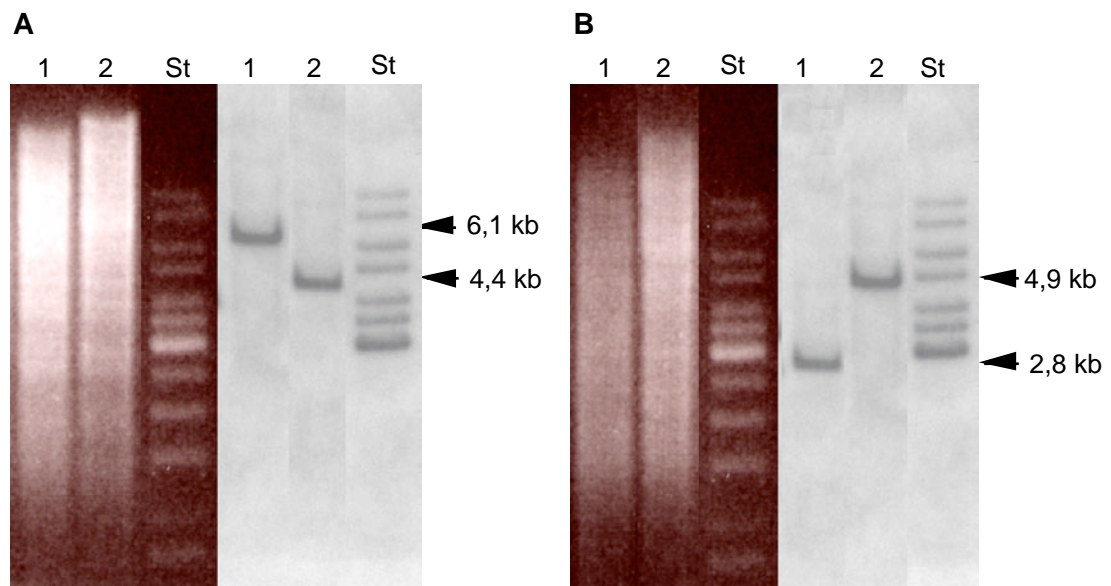


Abb. 3.43: SOUTHERN Hybridisierung restriktionsverdauter DNA gegen eine Kanamycin-Sonde. (A) Die isolierte chromosomale DNA von *Acinetobacter* sp. K103 (*orfC*-Mutante) wurde mit *KpnI* (Spur 1) und *EcoRV/XbaI* (Spur 2) geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt und nach dem Blotten gegen eine Kanamycin-Sonde hybridisiert. (B) Die chromosomale DNA von *Acinetobacter* sp. K104 (*orfD/orfE*-Mutante) wurde mit *EcoRV* (Spur 1) und *SacI/SalI* (Spur 2) geschnitten und das Kanamycin-Gen mit einer Sonde detektiert. Die Sonde markierte in unspezifischer Weise die DNA des Größenstandards (St) im Bereich von 3-10 kb. Auf der linken Seite beider Abbildungen (A/B) ist das Ethidiumbromid-gefärbte Gel und auf der rechten der SOUTHERN Blot dargestellt.

Nachdem die zu *filA* stromabwärts lokalisierten *orfB* und *orfC* spezifisch unterbrochen bzw. deletiert worden waren, sollte eine weitere Deletion, die *orfD* und *orfE* gemeinsam betraf, einen weiteren Hinweis über die Beteiligung der stromabwärts von *filA*

lokalisierten ORFs an der Pilusbiogenese liefern. Dazu wurden die DNA-Bereiche stromaufwärts von *orfD* und stromabwärts von *orfE* mittels PCR amplifiziert. Die Klonierungsstrategie hinsichtlich der gewählten Schnittstellen erfolgte -wie bei der Deletion von *orfC* beschrieben - in pGEM-7f(+) (s.o.). Die Primer OMMu-*SacI*-NA1 (5'-CAATATTACCTTAAGGAGCTCCATTCCATTTG-3') und OMMu-*BamHI*-CA1 (5'-CGAATGCAACATTGGATCCCCCGTCAAGAC-3') amplifizierten an der BD413-DNA stromaufwärts von *orfD* einen Bereich von 730 bp, der nach dem Restriktionsverdau mit *SacI* und *BamHI* in pGEM-7f(+) kloniert wurde, wonach das Plasmid pGK18 entstand (Abb. 3.44).

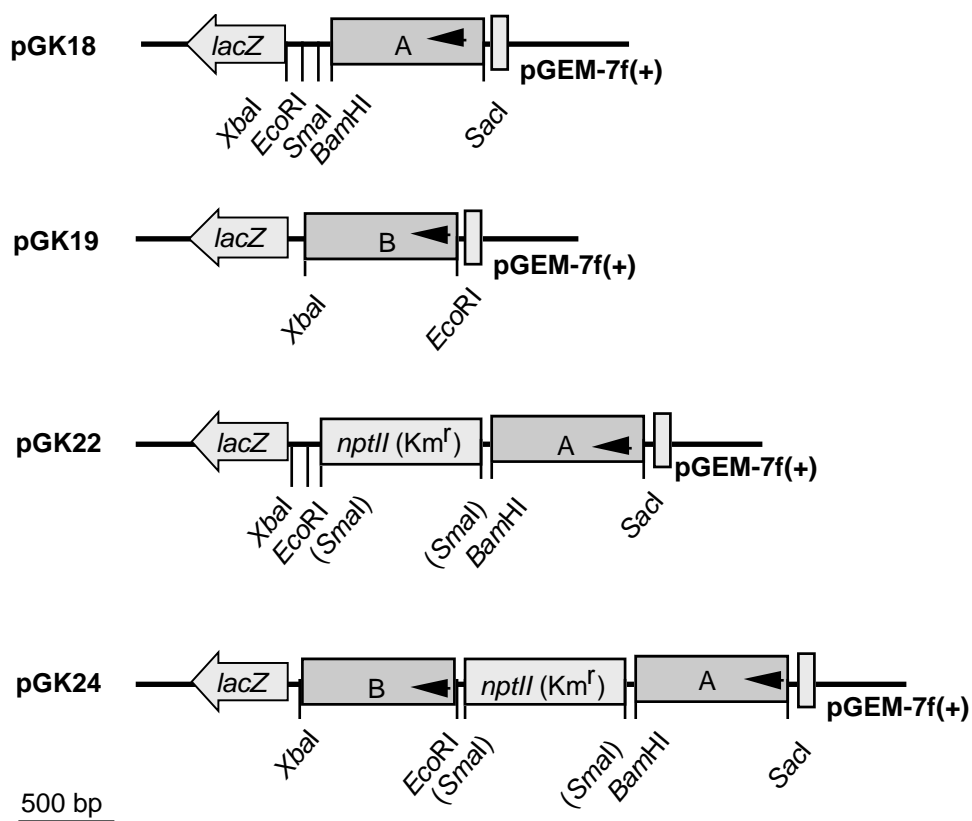


Abb. 3.44: Plasmidkonstruktionen für die gemeinsame Unterbrechung von *orfD* und *orfC*. Die PCR-Produkte von DNA-Bereichen stromaufwärts von *orfD* (A) und stromabwärts von *orfE* (B) wurden jeweils in pGEM-7f(+) kloniert, woraus pGK18 bzw. pGK19 resultierten. In die *SmaI*-Schnittstelle von pGK18 wurde die Kanamycin-Kassette ligiert und daraufhin in das entstandene Plasmid pGK22 das Insert (B) aus pGK19 mit *EcoRI* und *XbaI* kloniert. Daraus resultierte pGK24, in dem die DNA-Bereiche stromauf- und stromabwärts von *orfD* bzw. *orfE* durch das Resistenzgen unterbrochen sind. Die Pfeile markieren die Leserichtung von *orfD* bzw. *orfE*. Die in Klammern dargestellten Namen der Restriktionsschnittstellen können nicht mehr geschnitten werden. Der Kanamycin-Marker ist nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Dargestellt sind nur die für die Klonierung relevanten Schnittstellen. Das *lacZ*-Gen von pGEM-7f(+) gibt die Leserichtung des vektoreigenen Promotors an.

In den mit *Sma*I (MCS) linearisierten pGK18 wurde daraufhin der mit *Hinc*II geschnittene *nptII*-Marker aus pUC4K ligiert. Aus dem entstandenen Plasmid pGK22 konnte das gesamte Insert (*nptII*-Marker und PCR-Produkt) mit *Sac*I und *Eco*RI herausgeschnitten und in den äquivalent geschnittenen pGK19 kloniert werden. pGK19 enthielt das mit *Eco*RI/*Xba*I klonierte 680 bp PCR-Produkt, welches mit den Primern unkn5Mu-*Eco*RI-NB1 (5'-GTTATAAAAATCAGGAATTCGCTGCTACAG-3') und unkn5Mu-*Xba*I-CB1 (5'-AAAGATGCCTGCATTCTAGAGATTCATCATG-3') zuvor amplifiziert worden war. Das Plasmid pGK24 enthielt schließlich den *nptII*-Marker und angrenzend die für die spätere homologe Rekombination flankierenden DNA-Bereiche (Abb. 3.44). Für die Transformation von *Acinetobacter* sp. ADP239 konnte das gesamte Insert mit *Sac*I und *Xba*I herausgeschnitten werden. Die Mutante mit der Deletion von *orfD* und *orfE* wurde als K104 bezeichnet.

Die Überprüfung der Deletion und der homologen Rekombination des Resistenz-Markers in der generierten Mutante K104 erfolgte wiederum mittels SOUTHERN Blot. Dafür wurde die isolierte chromosomale DNA des Stammes K104 zum einen mit *Sac*I/*Sal*I und zum anderen mit *Eco*RV restriktionsverdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einer *nptII*-Sonde hybridisiert. In der chromosomalen DNA des Wildtyps BD413 lagen die beiden *Sac*I- und *Sal*I- Schnittstellen 6,4 kb auseinander; unter Berücksichtigung der 2,7 kb-Deletion von *orfD* und *orfE* und der Einfügung der 1,2 kb-Kanamycin-Kassette ergaben sich die detektierten 4,9 kb (Abb. 3.43, B). Die relevante *Eco*RV-Schnittstelle schlossen im ADP239-Chromosom 4,3 kb ein. Die homologe Rekombination des Konstruktes führte zur Deletion von *orfD* und *orfE* durch den Resistenz-Marker (1,2 kb), so daß sich eine Netto-Deletion von 1,5 kb verzeichnen ließ und auf dem SOUTHERN Blot eine Bande von 2,8 kb detektiert wurde (Abb. 3.43, B).

Diese Untersuchungen bestätigten die einfache, homologe Rekombination des Resistenzmarkers ins Zielgen.

3.6.7.4 Untersuchung auf Pilusbiogenese der Mutantenstämme K102, K103 und K104

Die Unterbrechung des Strukturgens *filA* führte zu einem Phänotyp, der einen Defekt in der Biosynthese der dicken Pili aufwies. Da *filA* das erste Gen von insgesamt sechs ORFs darstellte, die in gleicher Leserichtung lagen, ließ dies die Vermutung zu, daß die ORFs zu einem neuartigen Pilus-Biosynthesecuster gehören. Die generierte Mutante K102, mit einer Unterbrechung in *orfB*, der Stamm K103, der eine Deletion von *orfC* trägt und K104, dessen *orfD* und *orfE* gemeinsam deletiert worden waren, wurden daraufhin hinsichtlich ihrer Synthese dicker Pili überprüft.

Wie oben beschrieben und in „Material und Methoden“ ausführlich behandelt, wurden die Pili der Stämme K102, K103 und K104 abgeschert und im zweistufigen Saccharosegradienten gereinigt.

Nach Auftrennung der Pilusfraktion in einem 15%igem SDS-Gel waren in der Spur der Positivkontrolle ADP239 die Untereinheiten der dicken Pili bei 28 kDa und die der dünnen Pili bei 16 kDa zu erkennen, was den Wildtyp-Pilusphänotyp repräsentierte (Abb. 3.45). Den Mutanten-Stämmen K102, K103 und K104, die Unterbrechungen bzw. Deletionen in den zu *filA* stromabwärts lokalisierten ORFs aufwiesen, fehlte die 28 kDa-Bande im SDS-Gel. Elektronenmikroskopische Untersuchungen belegten weiterhin das Fehlen der dicken Pilusstruktur und die nicht beeinträchtigte Synthese der dünnen Pili. Dies indizierte einen Biogenesedefekt von FilA zu einer filamentösen Struktur auf der Zelloberfläche, der durch die Unterbrechungen der zu *filA* stromabwärts lokalisierten ORFs hervorgerufen worden sein mußte. Das Strukturgen *filA* wies seinerseits keine Mutation auf und stellte das erste Gen des Clusters dar, was einen polaren Effekt (ausgelöst durch die gesetzten Mutationen in den Stämmen K102, K103, und K104) ausschloß.

Die 16 kDa-Bande der Untereinheiten der dünnen Pili war dagegen im SDS-Gel aller Mutanten erkennbar, so daß bei den beiden Pilusstrukturen von *Acinetobacter* sp. BD413 von getrennten Biosynthesewegen ausgegangen werden kann.

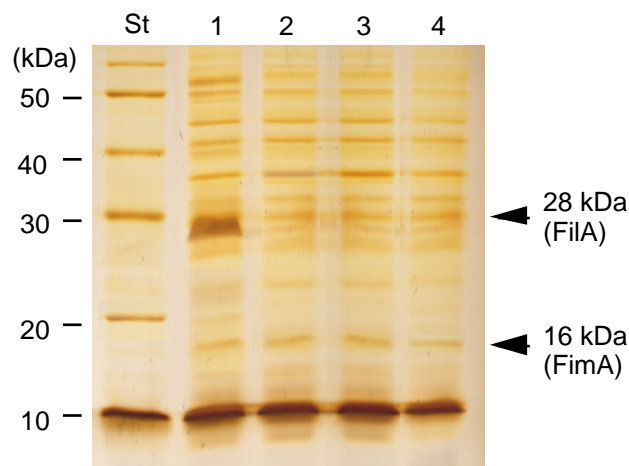


Abb. 3.45: SDS-PAGE der Scherfraktionen. Die Pilusstrukturen des Stammes ADP239 (Spur 1) sowie der Mutanten-Stämme K102 (*orfB*-Mutante) (Spur 2), K103 (*orfC*-Mutante) (Spur 3) und K104 (*orfD/orfE*-Mutante) (Spur 4) wurden von der Zelloberfläche abgeschert, gereinigt und in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt.

Diese Untersuchungen zeigten, daß neben dem über die Aminosäure-Sequenz identifizierten Strukturgen *filA* ebenso die stromabwärts lokalisierten ORFs (*orfB*, *orfC*, *orfD* und/oder *orfE*) an der Biogenese des dicken Pilus von *Acinetobacter* sp. BD413 beteiligt sind. Da keine Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Pilus-Biosynthesewegen bestanden, muß es sich bei dem dicken Pilus um einen neuen, nicht beschriebenen Filament-Typ unbekannter Biogenese handeln. Obwohl die gezielte Unterbrechung von *orfF* aussteht und der Pilus-Synthesedefekt der Mutante K103, die eine gemeinsame Deletion von *orfD* und *orfE* trägt, spezifiziert werden muß, ist es sehr wahrscheinlich, daß hier ein Biosynthesecluster vorliegt.

3.6.7.5 Komplementation der Mutantenstämme K101 und K102

Gene procaryotischer Genome, die für denselben Stoffwechselweg codieren, liegen oft assoziiert in Genclustern vor und werden dann oft als polycistronische mRNA cotranskribiert. Das Strukturgen *filA* des dicken Pilus bildete das erste Gen eines Clusters, welches aus insgesamt sechs ORFs gleicher Leserichtung bestand. Unterbrechungen in den stromabwärts von *filA* lokalisierten Genen *orfB* bzw. *orfC* und die gemeinsame Deletion von *orfD* und *orfE* führten jeweils zu einem Defekt in der dicken Pilusbiogenese. Somit handelt es sich hier um ein Gencluster, das die Synthese der dicken Pilusstruktur vermittelt. Ob darüber hinaus dieses Gencluster ein Operon darstellt, sollten Komplementationsstudien zeigen. Um Hinweise auf einen Promotor außer vor *filA* auch vor *orfB* zu bekommen, wurde die Regeneration des Pilus-Phänotyps durch Komplementation von K101 und K102 mit den jeweiligen Plasmid-codierten intakten Genen untersucht.

Um das zur Komplementation intakte *filA* zu erhalten, wurde ein 3,6 kb-*EcoRI/SacI*-Fragment aus der chromosomalen DNA des Stammes K102 in pRK415 kloniert (vgl. Restriktionskarte in Abb. 3.39). Das daraus resultierende Plasmid pKK32 enthielt neben *filA* das mit dem *nptII*-Marker unterbrochene *orfB* (Abb. 3.46). Das 3,6 kb-*EcoRI/SacI*-Fragment aus der chromosomalen DNA des Stammes K101, welches neben dem intakten *orfB* das durch den *nptII*-Marker unterbrochene *filA* trug, wurde ebenso in pRK415 kloniert, so daß das Plasmid pKK33 entstand. Um eine mögliche Promotoraktivität des *nptII*-Markers auf die Transkription des stromabwärts lokalisierten *orfB* auszuschließen, konnte durch den Restriktionsverdau mit *EcoRI/XhoI* und eine Ligation mit glatten DNA-Enden von pKK33 der relevante DNA-Bereich entfernt werden (Abb. 3.46). Das resultierende Plasmid pKK34, welches das intakte *filB* enthielt, wies daraufhin keine Kanamycin-Resistenz auf.

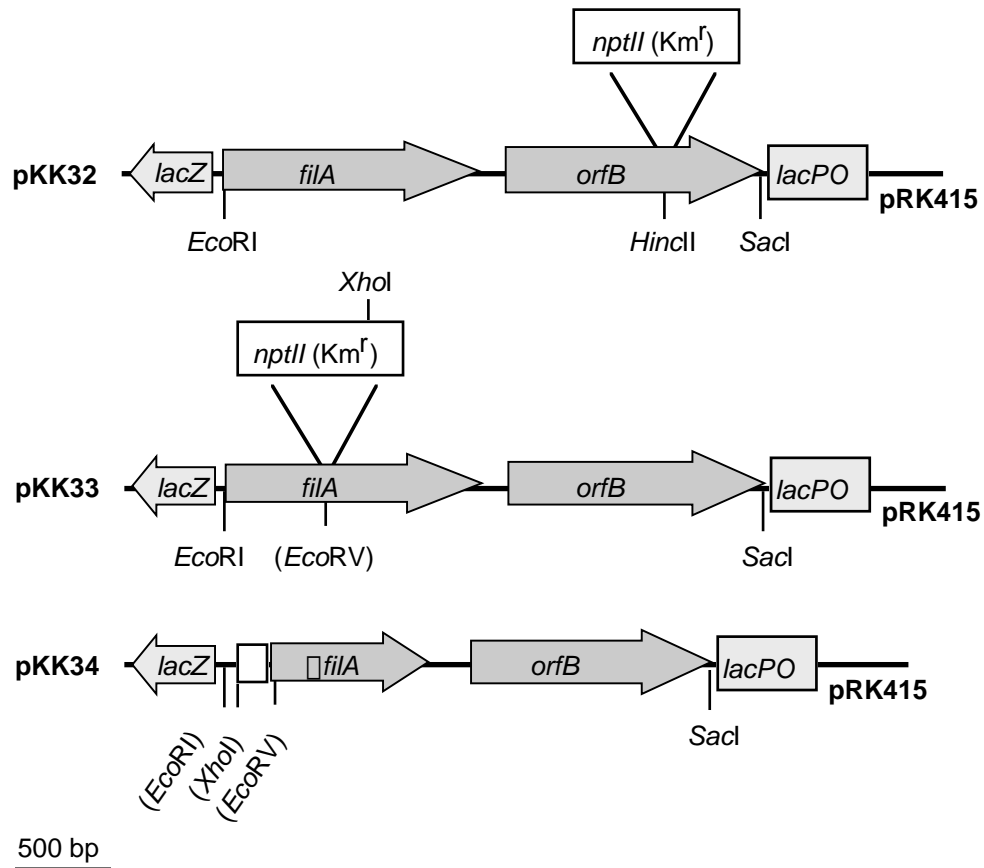


Abb. 3.46: Plasmidkonstruktionen von pKK32 und pKK34. pKK32 enthält das *nptII*-Marker tragende DNA-Fragment aus *Acinetobacter* sp. K102, auf dem das intakte *filA*-Gen und das unterbrochene Gen *orfB* liegt. pKK33 besitzt das DNA-Fragment aus K101, welches das intakte Gen *orfB* und das mit dem Kanamycin-Marker unterbrochene *filA*-Gen trägt. Durch Restriktionsverdau von pKK33 mit *EcoRI* und *XhoI*, Behandlung mit Klenow-Enzym und Ligation der glatten DNA-Enden, konnte der Promotorbereich des *nptII*-Gens eliminiert werden, woraus das Plasmid pKK34 resultierte. Die in Klammern dargestellten Namen der Restriktionsschnittstellen können nicht mehr geschnitten werden. Der Kanamycin-Marker ist nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Dargestellt sind nur die für die Klonierung relevanten Schnittstellen. Das *lacZ*-Gen von pRK415 gibt die Leserichtung des vektoreigenen Promotors an.

Das Plasmid pKK32, welches das intakte *filA*-Gen trug, wurde mittels des Helferstammes *E. coli* pRK2013 in den Stamm K101 konjugiert und pKK34, mit dem intakten *orfB*-Gen, in den Stamm K102. Die daraus resultierenden Stämme K101 pKK32 und K102 pKK34 wurden daraufhin hinsichtlich ihrer Pilusbildung untersucht, was durch die Auftrennung der Scherfraktionen in einer SDS-PAGE erfolgte.

Wie oben beschrieben und in „Material und Methoden“ ausführlich behandelt wurden die Pili der komplementierten Stämme K101 pKK32 und K102 pKK34 abgeschert und im zweistufigen Saccharosegradienten gereinigt.

Nach Auftrennung der Scherfraktionen in einem 15%igem SDS-Gel waren in der Spur der Positivkontrolle ADP239 die Untereinheiten der dicken Pili bei 28 kDa und die der dünnen Pili bei 16 kDa sichtbar (Abb. 3.47), was die intakte Pilusbildung des Wildtyps repräsentierte. Die komplementierten Mutantenstämme K101 pKK32 und K102 pKK34 zeigten ebenso wie der Stamm ADP239 sowohl die 16 kDa- als auch die 28 kDa-Bande. Vor der konjugativen Übertragung der Plasmide, welche *filA* (pKK32) bzw. *orfB* (pKK34) trugen, wiesen die Stämme K101 und K102 einen Defekt in der Pilusbiogenese des dicken Pilus auf, was zu einem Fehlen der 28 kDa in der SDS-PAGE führte (Abb.3.33). Elektronenmikroskopische Untersuchungen demonstrierten darüber hinaus den Wildtyp-ähnlichen Pilusphänotyp der komplementierten Stämme, da bei ca. 90% der Zellen sowohl die dicken als auch die dünnen Pili erkennbar waren.

Die Plasmid-codierten Gene waren somit in der Lage den Defekt in der Synthese der dicken Pili zu komplementieren und ihre Synthese zu regenerieren.

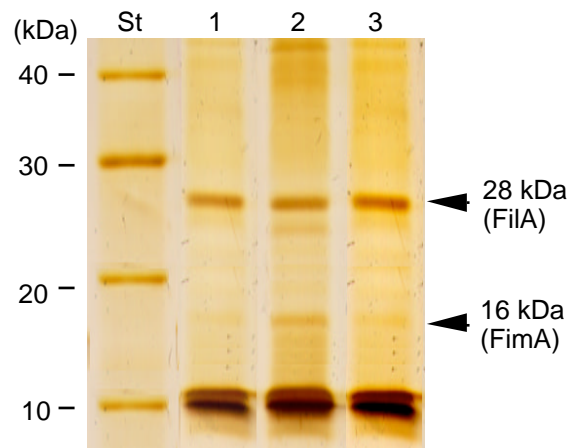


Abb. 3.47: SDS-PAGE der Scherfraktionen
Die Pilusstrukturen des Stammes ADP239 (Spur 1), sowie der komplementierten Mutantenstämme K101 pKK32 (Spur 2) und K102 pKK34 (Spur 3) wurden von der Zelloberfläche abgeschert, gereinigt und in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt.

Diese Ergebnisse zeigten eindeutig, daß sowohl *filA* als auch *orfB* für die Biogenese der dicken Pili essentiell sind. Weiterhin indizierten die Ergebnisse, daß vor *filA* und vor *orfB* intakte Promotorstrukturen lokalisiert sind, die die Transkription der Plasmid-codierten, isolierten Gene erlaubten. Die erfolgreiche Komplementation von K102 mit pKK34 deutet darüber hinaus auf einen Promotor vor *orfC* hin, da in K102 das Gen *orfB* durch eine Kanamycin-Kassette unterbrochen worden war, was im Falle eines Operons vermutlich einen polaren Effekt auf *orfC* ausgeübt hätte. Vermutlich liegt hier ein Biosynthese-Gencluster vor, was durch weitere Mutantenstudien und Transkriptionsanalysen verifiziert werden müßte.

3.6.8 Charakterisierung des dünnen Pilus

Die Unterbrechung des Gens, welches für die 16 kDa-Untereinheit des dünnen Pilus codiert, führte zu der Mutante N100, die keine dünnen Pili auf der Zelloberfläche aufwies. Dieser Pilustyp ist weder an der natürlichen Transformation noch an der gleitenden Fortbewegung des Bakteriums beteiligt. Für eine weitere Charakterisierung des dünnen Pilus sollte zunächst ein Datenbankabgleich des 16 kDa-Untereinheit durchgeführt werden und die genomische Lokalisation des Strukturgens sowie die Involvierung benachbarter Gene in die Pilusbiogenese untersucht werden.

3.6.8.1 Untersuchung der Untereinheit des dünnen Pilus

Das Genprodukt des identifizierten Gens, welches für die Untereinheit des dünnen Pilus codiert, besteht aus 193 Aminosäuren und besitzt eine errechnete molekulare Masse von 19,5 kDa. Der Datenbankabgleich verwies auf eine Vielzahl von Gram-negativen Organismen, die ähnliche Proteine synthetisieren. Abbildung 3.48 zeigt exemplarisch einen Aminosäureabgleich mit homologen Proteinen, die in den Enterobakterien *E. coli* (F17-A), *Proteus mirabilis* (FimA) und dem pflanzenpathogenen Stamm *Xylella fastidiosa* (FimA) identifiziert wurden (LINTERMANS *et al.* 1988). Hierbei handelte es sich um Strukturproteine, die zur Klasse der Typ-I-Fimbrien gezählt werden, molekulare Massen zwischen 15 und 20 kDa aufweisen und vorwiegend bei pathogenen Organismen untersucht sind. Am N-Terminus dieser Protein-Familie befindet sich ein basisches Signalpeptid, welches beim Sec-abhängigen Transport durch die Cytoplasmamembran entfernt wird. Nach potentieller Prozessierung des Präproteins aus BD413 weist das Strukturprotein eine errechnete molekulare Masse von 16,5 kDa auf. Der zur Pilusassemblierung erforderliche Transport der Untereinheit durch die Zellmembran, der basisch-hydrophobe Charakter des N-Terminus und die in der SDS-PAGE abgeschätzte Masse von 16 kDa unterstützten das Vorhandensein eines Leaderpeptids.

1	MKKLNLA LATTLC AAGAM-TSAFAADGTTITINGRVITSTCTL TGSAGADTQNVVVTL	<i>Ac. sp. BD413</i>
1	MQ-KIQFI LG-ILAAA--SSSATLA YDGTITFNKGKVVDTCSVTT-----ESKNLTVTL	<i>E. coli</i>
1	MKIMKNFVLS SIA SAAMLFC GAALAADGTTITVNGRVTDRTCTING-----GTPNFSVTL	<i>Xylella fastidiosa</i>
1	MK-RKVIALATILSAA--FAGSSMAYDGTITFTGKVVAAQTCSVNT-----NDKNLAVTL	<i>Proteus mirabilis</i>
60	PTVLNSAF TANSVQP-TNFTLSLT NAA GSAA CDAVTIAGL KGI-TLGGPTNSAQYVAGD	<i>Ac. sp. BD413</i>
51	PTVSANSLAS SGKVVGLTPFTILLEG-----CNTPAV TGAQNVNAYFEPNANTDYTTGN	<i>E. coli</i>
55	PTVSFNTLRE AGRTAARTPFTIELTN-----C-----TAGSTVATYFEPGPAVDINTSR	<i>Xylella fastidiosa</i>
52	PTVSTTTLNENAA TAGLTPFTIHLTG-----CAI-GMDGAQSVKTYFEPSSDIDVTTHN	<i>Proteus mirabilis</i>
118	TTRLVNTVSGST-VNTQL---KLA SATAPIDFAL TNQLTNSNATTTTSGIWNMQ--AQY	<i>Ac. sp. BD413</i>
105	LTNTASSG--ASNVIQL LNADG--VKA IKLGQAAAQSVDTVA IN-DANV-TLR YNAQY	<i>E. coli</i>
104	LINQAPTA SAATNVQVQL LG SNGLQIPIKT VGTGTAQDNSQWVAVNASGAA-SMHYYTEY	<i>Xylella fastidiosa</i>
105	LKNTAQTK--ADNVQVQL LNSDA--ATTIQ LGTDSATQDVHPVQID-NANV-NLPYFAQY	<i>Proteus mirabilis</i>
171	YSTTATPA AQQVNSV VNYILNYN	<i>Ac. sp. BD413</i>
159	YATGVATAGV-VTSTVNYTIA YQ	<i>E. coli</i>
163	YATGVTTAGS-VVTNIQYTI IYQ	<i>Xylella fastidiosa</i>
159	YATGQSTAGD-VKATVHYTIA YE	<i>Proteus mirabilis</i>

Abb. 3.48: Sequenzvergleich der Untereinheit FimA des dünnen Pilus vor *Acinetobacter* sp. BD413 mit Typ-I-Pilinen. Das Pilus-Strukturprotein FimA zeigt Ähnlichkeiten zu den Untereinheiten der Familie der Typ-I-Pili. Dargestellt ist das F17-1-Pilin von *E. coli* und das FimA-Protein von *Xylella fastidiosa* bzw. *Proteus mirabilis*. Die für die Ausbildung einer Disulfidbrücke essentiellen Cysteine (C) sind fett hervorgehoben. Unterstrichen sind konservierte Bereiche des N-Terminus und des \square -Zipper-Motivs am C-Terminus.

Das Strukturprotein aus *Acinetobacter* sp. BD413 weist die konservierten Cysteine für die Ausbildung einer Disulfidbrücke auf (Positionen 40 und 92), die für die Faltung und Assemblierung der Untereinheit in die wachsende Pilusstruktur essentiell ist (Abb. 3.48). Darüber hinaus war der hoch konservierte C-terminale Bereich vorhanden, welcher aus alternierend angeordneten hydrophoben Aminosäuren aufgebaut ist und mit der aromatischen Aminosäure Phenylalanin endete. Anstelle des konservierten Glycins zu Beginn dieses \square -Zipper-Motivs stand bei *Acinetobacter* die dazu ähnliche Aminosäure Alanin. Dieser C-terminale, 15 Aminosäuren umfassende Bereich ist essentiell für die Insertion in die Cytoplasmamembran, die nachfolgende Interaktion mit dem im Periplasma lokalisierten Chaperon und schließlich für die Polymerisation und Ausbildung der Quartärstruktur des Pilus (HOLMGREN *et al.* 1992, HUNG & HULTGREN 1998, FERNÁNDEZ & BERENQUER 2000). Weiterhin weist die Sequenz des Strukturproteins aus BD413 eine zweite konservierte Region nahe des N-Terminus (Aminosäuren 24-41) auf, die vermutlich mit dem periplasmatischen Chaperon interagiert (KÜHN *et al.* 1993).

Aufgrund der Ähnlichkeit der Untereinheit des dünnen Pilus von *Acinetobacter* sp. BD413 zu den strukturellen Komponenten der Typ-I Pili, wurde das codierende Gen mit *fimA* bezeichnet.

3.6.8.2 Untersuchung der genomischen Lokalisation von *fimA*

Die Gene der bisher untersuchter Typ-I-Pilus-Biogenesesysteme bilden funktionelle Gencluster, oft in Form von Operonen, wobei es erste Hinweise auf eine Prozessierung der polycistronischen mRNA gibt (LOOMIS & MOSELEY 1998). Das Gencluster codiert für mindestens zwei Assemblierungsfaktoren: zum einen ein periplasmatisches Chaperon und zum anderen ein äußeres Membranprotein, welches eine Pore für den Durchtritt des Pilus schafft. Das Chaperon empfängt die Strukturuntereinheiten nach dem Sec-abhängigen Transport an der Cytoplasmamembran, verhindert die vorzeitige Aggregation der Pilus-Untereinheiten und schleust das Monomer zur Öffnung in der äußeren Membran, wo es zur Pilusstruktur assembliert (KNIGHT *et al.* 2000). Im allgemeinen codiert das Gencluster für ein Adhäsın, welches an der Spitze des Pilus lokalisiert ist (KÜHN *et al.* 1993, JONES *et al.* 1995).

Die einfachste Pilusassemblierung, die diesem Syntheseweg folgt, ist der 'dünne flexible Pilus' (z.B. F17), der Fibrillum genannt wird und der für seine Synthese außer der strukturellen Untereinheit ein periplasmatische Chaperon, ein äußeres Membranprotein sowie ein Adhäsın erfordert (SOTO & HULTGREN 1999).

Auf dem Chromosom von *Acinetobacter* sp. BD413 liegen stromabwärts von *fimA* drei weitere ORFs mit der gleichen Orientierung, die nach dem Datenbankabgleich Ähnlichkeiten zu den beschriebenen beiden Assemblierungsfaktoren und dem Adhäsın aufwiesen. Während die Strukturproteine (Pilin und Adhäsın) Aminosäuresequenz-Identitäten von 28% bzw. 23% und Ähnlichkeiten von 44% bzw. 37% aufweisen, zeigen die Assemblierungsfaktoren (Chaperon und äußeres Membranprotein) Identitäten von 41% bzw. 35% und Ähnlichkeiten von 57% bzw. 51% (Tab. 3.1), was die höhere Variabilität der Strukturkomponenten indiziert. Diese vier Komponenten sind als Basisfaktoren in allen Pilusclustern der Typ-I-Biosynthesefamilien zu finden.

Tab. 3.1: Ähnlichkeiten zwischen den Fim-Proteinen aus *Acinetobacter* sp. BD413 und Komponenten bekannter 'Chaperon-Usher'-Synthesewegen.

Genbezeichnung (%) (<i>Acinetob.</i> sp. BD413)	Funktion	Organismus (Gen)	Identität / Ähnlichkeit
<i>fimA</i>	strukt. Untereinheit	<i>E. coli</i> (F17-A)	28/44
<i>fimD</i>	peripl. Chaperon	<i>E. coli</i> (F17-D)	41/57
<i>fimC</i>	'Usher'-Protein	<i>E. coli</i> (F17-C)	35/51
<i>fimH</i>	Adhäsın	<i>E. coli</i> (<i>fimH</i>)	23/37
<i>fimH</i>	Adhäsın	<i>Salmonella typhi</i> (<i>fimH</i>)	23/37

Ein Vergleich der Gencluster des Typ-I-Pilus und des P-Pilus von *E. coli* sowie des Typ-III-Pilus von *Klebsiella pneumoniae* (die zur Klasse der Typ-I-Pili gehören) mit dem *fim*-Cluster von BD413 demonstrierten den konservierten Aufbau dieser Gencluster. Das periplasmatische Chaperon, äußere Membranprotein und Adhäsine sind in ähnlicher Organisation angeordnet (Abb. 3.49). Neben demjenigen Gen, welches für die Hauptstruktur-Untereinheit codiert, finden sich im *Fim*- und *Pap*-Cluster von *E. coli* weitere Gene, die ebenso für Pilus-Untereinheiten codieren, jedoch verglichen zur Hauptstrukturkomponente in geringerer Menge synthetisiert werden und adaptorische Funktionen ausüben (KÜHN *et al.* 1993, JONES *et al.* 1995).

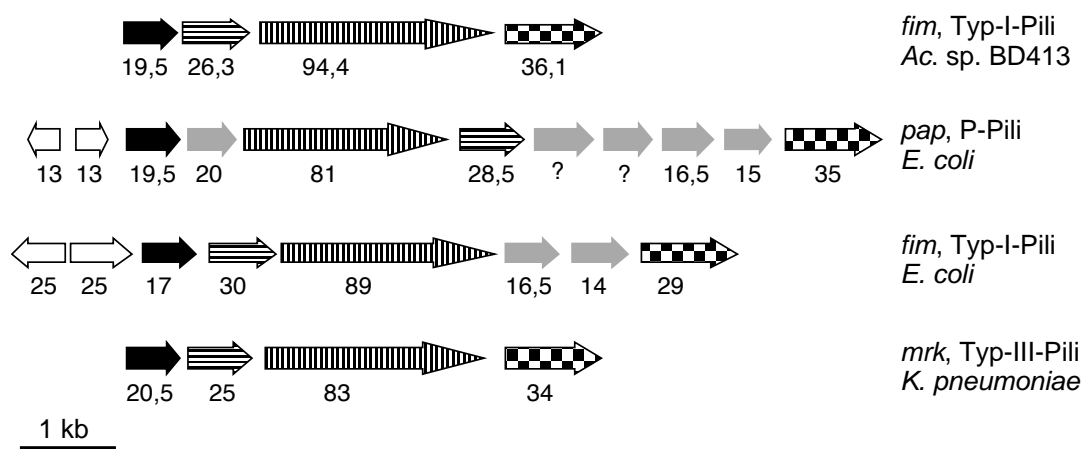


Abb. 3.49: Vergleich der Organisation des *Acinetobacter fimA*-Lokus mit konservierten Genclustern der Typ-I-Pili anderer Mikroorganismen. Die Gene sind durch Pfeile wiedergegeben und die molekularen Massen der Genprodukte unter den Pfeilen dargestellt. Die postulierte oder bewiesene Funktion der Genprodukte ist wie folgt markiert:



Der Vergleich der Gencluster, welche für die Familie der Typ-I-Pili codieren, zeigte, daß *Acinetobacter* die minimale Gen-Ausstattung für die Assemblierung der dünnen Pilusstrukturen besitzt. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die dünnen Pili von *Acinetobacter* sp. BD413 zur Familie der Typ-I-Fimbrien gehören. Neben dem Strukturgen sind stromabwärts des Genclusters konservierte Gene lokalisiert, die für seine Assemblierung und ein Adhäsine codieren.

3.6.8.3 Elektronenmikroskopische Darstellung des Untereinheitenaufbaus der dünnen Pili

Die dünnen Pili von *Acinetobacter* sp. BD413 gehören zur Familie der Typ-I-Pili, die über den 'Chaperone/Usher'-Weg synthetisiert werden. Die Organellen dieser Pilus-Klasse sind i.d.R. zusammengesetzte Strukturen, wobei der Hauptteil gewöhnlich aus einem 7 nm dicken Pilus besteht, in dem die Untereinheiten in einer rechtsgängigen Helix angeordnet sind. Distal lokalisierte Adaptorproteine vermitteln als 3 nm breites Filament die Exposition des Adhäsins (JONES *et al.* 1995, RUSSELL & ORNDORFF 1992). Hier sind mehrere untereinander ähnliche strukturelle Untereinheiten am Aufbau des Pilus beteiligt, dessen Gene in einem Cluster assoziiert vorliegen. Die dünnen Pili von *Acinetobacter* sp. BD413 werden aus nur einer Untereinheit aufgebaut, da im *fim*-Gencluster (und Genom) keine weiteren Strukturgene liegen, die Ähnlichkeiten zu Typ-I-Pilinen aufweisen (Abb. 3.49).

Für die Untersuchung der Untereinheitenstruktur der dünnen Pili von BD413 wurden diese von den Zellen abgeschert, mittels Ultrazentrifugation sedimentiert und über einen 20-70%igen Saccharosegradienten gereinigt. Die Pilus-Fraktion des Gradienten wurde mit PBS auf eine Proteinkonzentration von 50 µg/ml eingestellt und mit 4% Uranylacetat negativ kontrastiert.

Die hoch aufgelöste elektronenmikroskopische Abbildung 3.50 zeigt die Aneinanderreihung der Piline des dünnen Pilus von BD413 in linearer Form, wobei keine helikale Quartärstruktur ausgebildet wurde, die für die komplex aufgebauten Typ-I-Pili charakteristisch ist. Selten lagen die dünnen Pili als Einzelfilament vor, sondern aggregierten zu zweit oder mit einer Vielzahl ihresgleichen zu Bündeln, was auf eine hydrophobe Oberfläche hindeutete. Diese morphologischen Untersuchungen indizierten, daß die dünnen Pili von BD413 zur Untergruppe der als Fibrillen bezeichneten Typ-I-Pili gehören. Die Fibrillen ähneln den Adaptor-Strukturen, die bei den Pap-Pili von *E. coli* einen relativ langen dünnen Pilus von 3 nm Durchmesser bilden und als Bindemodul zwischen dem 7 nm-Pilus und dem Adhäsion fungieren (KÜHN *et al.* 1993).

Acinetobacter sp. BD413 synthetisiert den 2-3 nm dünnen Pilus aus nur einer strukturellen Komponente, die in linearer Assemblierung möglicherweise das Adhäsion-Protein exponiert. Die Komponente, die den für Typ-I-Pili charakteristischen basalen Bereich von 7 nm Durchmesser aufbaut, fehlt somit der Pilusstruktur von BD413.

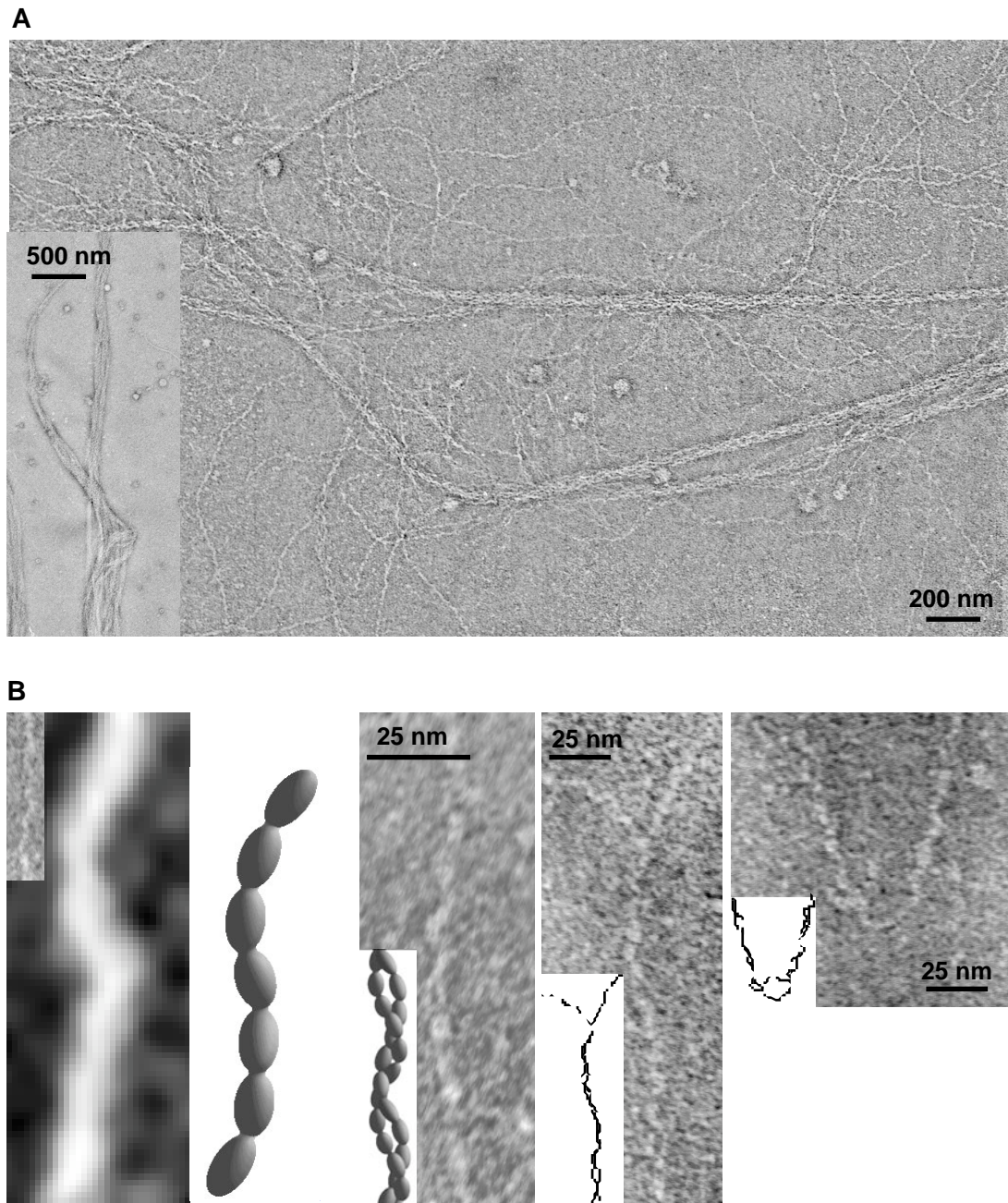


Abb. 3.50: Struktur der dünnen Pili von *Acinetobacter* sp. BD413. In der elektronenmikroskopischen Abbildung (A) sind die bündelbildenden dünnen Pili dargestellt. Abbildung (B) zeigt Vergrößerungen einzelner und verdrehter Pilusfilamente und schematisierte Darstellungen.

3.6.9 Regulation der Expression der Pilusgene *filA* und *fimA* von *Acinetobacter* sp. BD413

WHITE-ZIEGLER *et al.* (2000) untersuchten die Regulation der Expression von Pilusgenen, die zu verschiedenen Klassen der Typ-I-Fimbrien gehören (*pap*, *daa*, *fan*).

Niedrige Temperaturen, hohe Osmolarität, Glukose als Kohlenstoffquelle und Komplexmedien unterdrückten die Transkription der untersuchten Operone.

Um Hinweise auf die Funktion der beiden Pilustypen von *Acinetobacter* sp. BD413 – vor allem hinsichtlich des Selektionsvorteils am natürlichen Standort (Boden) - zu erhalten und die Bedingungen ihrer Synthese mit denen pathogener Organismen zu vergleichen, wurden die Transkriptionsraten von *filA* und *fimA* bestimmt. Daß sich die globale Regulation mittels 'Quorum Sensing' bei *Acinetobacter* sp. BD413 von Mineralmedium zu Komplexmedium unterscheidet, wurde von GONZALES *et al.* (2001) gezeigt: Die Zahl der Signalmoleküle im Kulturüberstand des Mineralmediums verdoppelte bzw. verdreifachte sich verglichen zu derjenigen Zahl im Komplexmedium.

Für die Analyse der Genexpression wurden die DNA-Bereiche der potentiellen Piluspromotoren von *filA* bzw. *fimA* jeweils an das 5'-Ende eines *lacZ*-Gens kloniert. Das dafür eingesetzte Reporter-Gen, welches eine Ribosomen-Bindestelle aber keinen eigenen Promotor trägt, befindet sich auf dem Vektor pBK. Wird durch den stromaufwärts klonierten Promotor das *lacZ*-Gen transkribiert, so wird eine β -Galaktosidase synthetisiert, die im optisch-enzymatischen Test quantifiziert werden kann. Für das Pilusgen *filA* erfolgte zunächst die Amplifikation des potentiellen Promotorbereiches (390 bp) mit den Primern Di-*lacZ*-*Bam*HI-N1 (5'-CAAAATGTAGCAGGATCCAATCCGATAATCG-3') und DiDel2-*Xba*I (5'-CCAAAGCCAATCTAGAGAATATTTTCATTC-3'). Das PCR-Produkt bestand aus 375 bp, die vor dem postulierten ATG-Startcodon lokalisiert sind und aus 15 bp des 5'-Endes von *filA*.

290 bp der Promotorregion des Pilusgen *fimA* wurden mit den Primern Dü-*lacZ*-*Bam*HI-N1.2 (5'-TTTGAGATCGGATCCATTTTTTTTAAAAG-3') und Dü-*lacZ*-*Xba*I-C1 (5'-CAAGTACTTGTAATCTCTAGACCATTAATCG-3') amplifiziert. Das PCR-Produkt bestand aus 190 bp, die vor dem postulierten ATG-Startcodon lokalisiert sind und aus 100 bp des 5'-Endes von *fimA*. Für eine Überprüfung der PCR-Produkte durch Sequenzierung erfolgte die Klonierung beider PCR-Produkte zunächst jeweils über die Schnittstellen *Bam*HI und *Xba*I in pUC18, so daß die Plasmide pUK25 und pUN09 entstanden (Abb. 3.51). Nach Umklonierung über Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Xba*I konnten die PCR-Produkte schließlich in den *Eco*RI und *Xba*I geschnittenen Vektor pBK ligiert werden. Im Plasmid pBN10 lag daraufhin die Promotorregion des *fimA*-Gens stromaufwärts des *lacZ*-Gens und in pBK27 die Promotorregion des *filA*-Gens vor dem *lacZ*-Gen (Abb. 3.51). Nach dem konjugativen Transfer in *Acinetobacter* sp. ADP239 konnte die β -Galaktosidaseaktivität im Verlauf des statischen Wachstums bestimmt und somit die promotorabhängige Transkriptionsrate in 'MILLER Units' abgeleitet werden. Als Kontrolle diente der Vektor pBK, welcher ebenso konjugativ in *Acinetobacter* übertragen wurde. Eine damit durchgeführte Nullwertbestimmung ergab keine meßbare β -Galaktosidaseaktivität, so daß im folgenden Versuch die gemessene Aktivität auf die

Promotoren von *filA* bzw. *fimA* zurückgeführt werden konnte. Aufgrund der im Vergleich zu den chromosomal lokalisierten Promotoren höheren Kopienzahlen der eingesetzten Plasmide, ließ sich die gemessene Aktivität nicht unmittelbar in eine absolute Transkriptionsrate übertragen. Nur die Relationen der Transkriptionsraten, die über die *lacZ*-Fusion des Promotors in pBK ermittelt werden, lassen sich miteinander vergleichen.

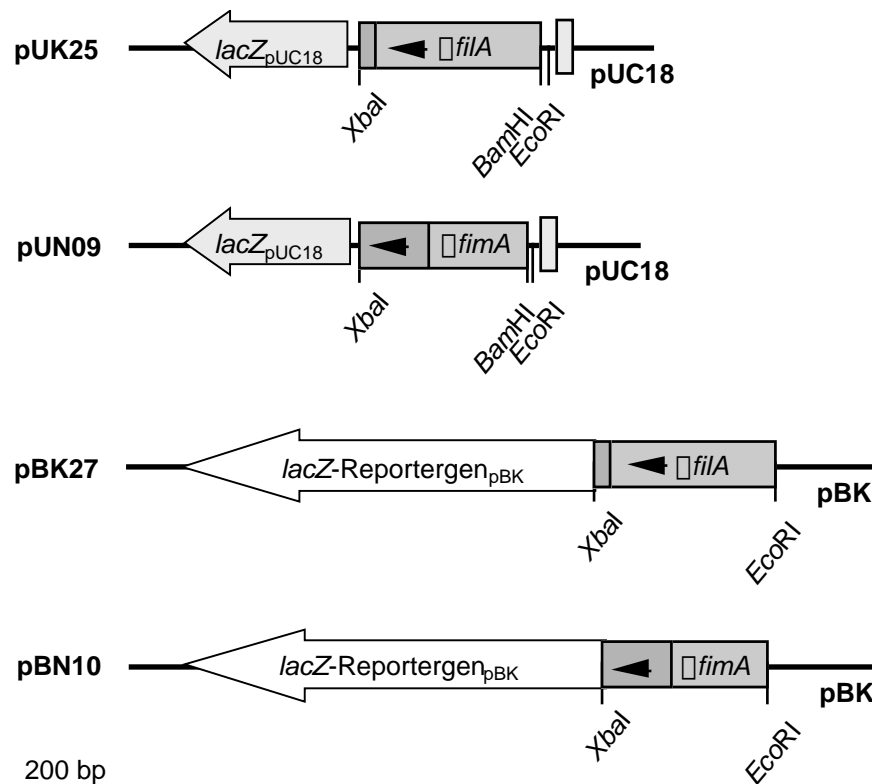


Abb. 3.51: Plasmidkonstruktionen für die *lacZ*-Reportergen-Fusion von *filA* und *fimA*. Nach der Amplifikation der jeweiligen potentiellen Promotorbereiche von *filA* bzw. *fimA* erfolgte zunächst die Klonierung in pUC18 und nachfolgend in pBK, der das promotorlose *lacZ*-Reportergen trägt. Vor dem *filA*-ATG-Startcodon liegen 375 bp und vor dem *fimA*-Startcodon 190 bp kloniert vor (\square *filA* bzw. \square *fimA*). Die in dunkelgrauer Farbe dargestellten Bereiche symbolisieren die 15 bp bzw. 100 bp DNA-Fragmente nach den Startcodons. Die Pfeile geben die Richtung der Transkription an. Dargestellt sich nur die für die Klonierungen relevanten Schnittstellen. Das *lacZ*-Gen von pUC18 gibt die Leserichtung des vektoreigenen Promotors an.

Zur Messung der wachstumsabhängigen Transkription in statischer Kultur wurden 50 ml Succinat-Mineralmedium oder LB-Medium mit einer ausgewachsenen Vorkultur 10%ig angeimpft und bei 30°C oder 37°C schüttelnd inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und sowohl das Kulturwachstum über die optische Dichte verfolgt als auch die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Diese wurde nach MILLER

(1972) durch Umsetzung von *o*-Nitrophenolyl- β -D-Galaktopyronosid (ONPG) zu *o*-Nitrophenol pro Zeit und pro Zelldichte bestimmt. In diesem Versuch wurde die Zelldichte der Proben auf die OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und die Reaktionsansätze für die gleiche Zeitdauer inkubiert, so daß als einzige Variable die von der Zelle in unterschiedlicher Menge synthetisierte β -Galaktosidase verblieb.

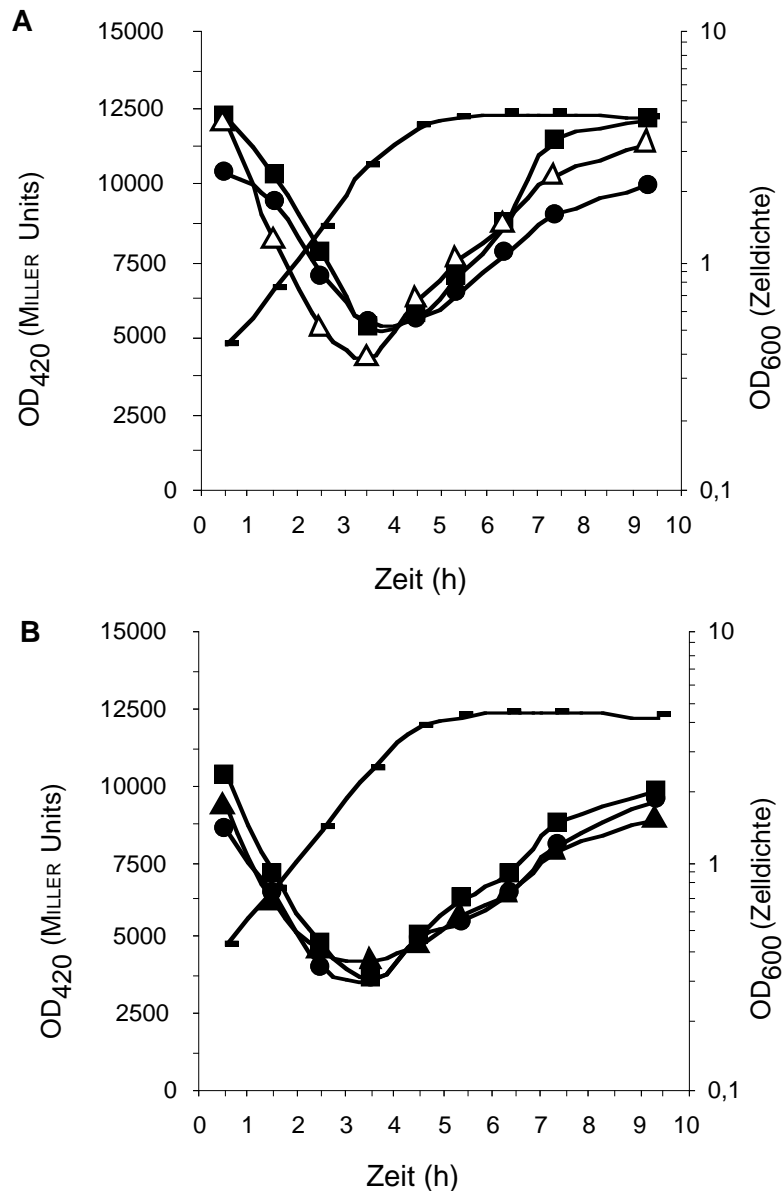


Abb. 3.52: Expression der Pilusgene *filA* und *fimA*. Di Promotoraktivität von *filA* (A) und *fimA* (B) wurden als *lacZ*-Transkriptionsfusion im Verlauf einer statischen Kultur (-) bestimmt. Die Promotorregionen wurden jeweils vor das *lacZ*-Gen kloniert und die β -Galaktosidaseaktivität im enzymatischen Test bestimmt. Di Wachstumsbedingungen variierten von 30°C in Mineralmedium (■) und 37°C in Mineralmedium (▲) sowie 30°C in Komplex- (LB-) Medium (●).

Die Expressionsrate der Gene beider Pilusuntereinheiten lag wie erwartet relativ hoch, da die Pilusstrukturen in großer Zahl auf der Zelloberfläche synthetisiert werden. Verglichen zur exponentiellen Wachstumsphase verdoppelte sich die Expression in der stationären Phase. Für *fimA* wurden in der stationären Phase 10000 MILLER Units erreicht, nach dem Überimpfen in frisches Medium fiel der Wert bis zum Ende des exponentiellen Wachstums auf 4000 MILLER Units, um mit Beginn der stationären Phase wieder anzusteigen (Abb. 3.52). *filA* zeigte ein ähnliches Expressionsprofil, wobei hier Werte von 5000 bis 12000 MILLER Units erreicht wurden. Der Wechsel von Mineral- zu Komplex- (LB-) Medium oder der Temperaturanstieg von 30°C auf 37°C führte in beiden Fällen nicht zu einer veränderten Genexpression. Aus diesem Grund mußte hier eine Regulation vorgelegen haben, die unter den gewählten Bedingungen und Kohlenstoffquellen allein von der Wachstumsphase und/oder Zelldichte, nicht aber von der Mediumzusammensetzung und der Wachstumstemperatur abhängt.

3.6.10 Untersuchung auf Adhäsion an hydrophobe Oberflächen

Wie unter 3.6.5.1 beschrieben war die dicke Pilusstruktur von *Acinetobacter* sp. BD413 mit einem Durchmesser von 6 nm keinem bekannten Pilustyp zuzuordnen und seine Funktion in der Physiologie des Bakteriums ist ebenso unbekannt. Der dünne Pilus mit einem Durchmesser von 2-3 nm konnte hingegen aufgrund seiner Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit und seiner chromosomalen Lage innerhalb eines charakteristischen Genclusters zur Klasse der Typ-I-Pili zugeordnet werden (3.6.8.1).

ROSENBERG *et al.* beschrieben bereits 1980 und 1981 die pilusabhängige Adsorption des zu BD413 verwandten Stammes *Acinetobacter* RAG-1 an hydrophoben Oberflächen. Dieser Stamm RAG-1 synthetisiert dünne und dicke Pili, die morphologisch denen von *Acinetobacter* sp. BD413 gleichen. Weiterhin demonstrierten sie die Fähigkeit des Stammes BD413 zur Adsorption an hydrophobe Oberflächen, wobei die dafür verantwortliche Zelloberflächen-Strukturen hierbei nicht charakterisiert wurden. Die generierten Pilus-defekten Stämme mit Unterbrechungen in den Strukturgenen *filA* bzw. *fimA* sollte nun dazu dienen, die Zelladsorption an hydrophobe Flächen zu spezifizieren.

Der Stamm ADP239, der den Wildtyp repräsentierte, sowie die Mutanten K101 (*filA*⁻), N100 (*fimA*⁻) und KN100 (*filA*⁻/*fimA*⁻) wurden zunächst über Nacht angezogen und nach dem Abzentrifugieren mit frischem Succinat-Mineralmedium auf die gleiche optische Dichte eingestellt. Als hydrophobe Oberfläche wurden leere Petrischalen aus Polystyren genutzt, auf die 2 ml Zellsuspensionen gegeben wurden. Nach 1,5stündiger Inkubation und darauffolgendem Abwaschen der Zellen konnten die verbliebenden, adsorbierten Bakterien durch ein aufgelegtes Deckglas im Lichtmikroskop betrachtet werden. Der Stamm ADP239 und die Mutante K101, die keine dicken Pili synthetisierte, zeigten gleichmäßig

verteilt liegende Einzelzellen und charakteristische Diplokokken, wobei die Zellen ca. 80% der Petrischalenfläche bedeckten (Abb. 3.53, 1/2). Die Zellen der *fimA*-Mutante N100, die keine dünnen Pili synthetisierte, und die der Pilusdoppelmutante KN100 adhärten dagegen signifikant in geringerer Zahl, lagen ungleichmäßig verteilt und bedeckten nur eine Fläche von ca. 5% (Abb. 3.53, 3/4). Auf die Pilusstrukturen bezogen bedeutete dies, daß die Zellen bei der Anwesenheit beider Pilustypen oder allein der dünnen Pili an die hydrophobe Oberfläche adsorbierten; waren dagegen keine Pili oder ausschließlich die dicken Pili vorhanden, so verringerte sich die Adsorption unter den gewählten Bedingungen signifikant. Daraus war zu schließen, daß die dünnen Pili an der Adsorption beteiligt waren, während die dicken Pili keine fördernde oder inhibierende Wirkung diesbezüglich ausübten.

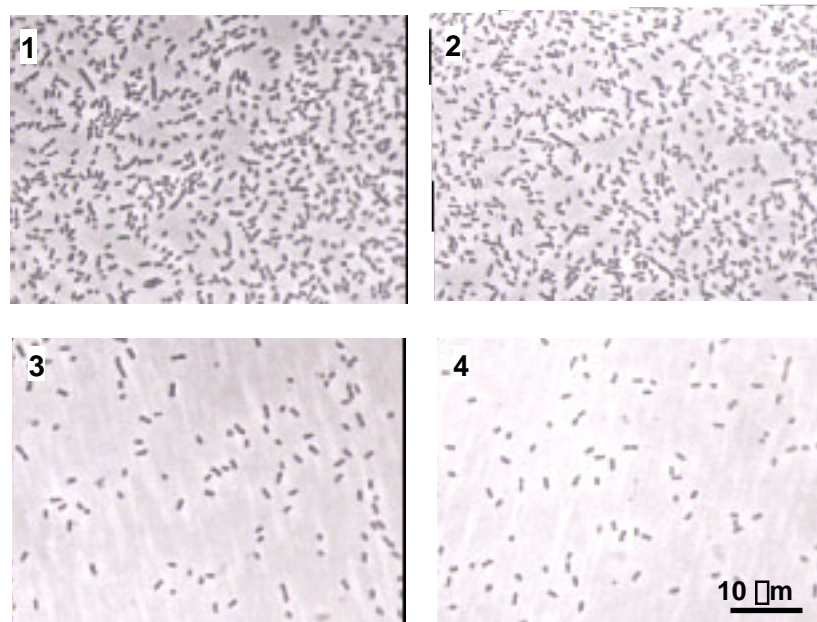


Abb. 3.53: Adhäsion an Polystyren von *Acinetobacter*. In Succinat-Mineralmedium über Nacht angezogene Zellen wurden nach Zentrifugation in frisches Mineralmedium resuspendiert und für 1,5 h in einer leeren Petrischale aus Polystyren inkubiert. Nach dem Abwaschen der nicht gebundenen Bakterien wurden die adsorbierten Zellen lichtmikroskopisch betrachtet. (1) ADP239; (2) K101 (*filA*-Mutante); (3) N100 (*fimA*-Mutante); (4) KN100 (*filA*-/*fimA*-Mutante)

3.6.11 Untersuchungen zur Bindung an Erythrocyten

Die größte Zahl der bisher untersuchten tier- und pflanzenpathogenen Bakterien synthetisieren Pili (Fimbrien) zur Exposition spezifischer Adhäsine, die als Bindungselement an die Wirtszelle dienen. Diese filamentösen Oberflächenstrukturen fungieren demnach – zusammen mit weiteren Faktoren - als erstes Auswahlorgan, welches

die Besiedelung ausschließlich spezifischer Wirtszellen ermöglicht, die das dazu passende Sortiment an Rezeptoren aufweisen. Pili können anhand einer Zahl von Eigenschaften klassifiziert werden, wobei die wichtigste davon ihre Rezeptorspezifität darstellt. Für Typ-I-Fimbrien ist es i.d.R. ein grundlegendes Charakteristikum, die Fähigkeit zu vermitteln, Erythrocyten zu agglutinieren. Da der identifizierte dünne Pilus von *Acinetobacter* sp. BD413 Ähnlichkeiten zur Klasse der Typ-I-Fimbrien aufweist und da das Strukturgen *fimA* das erste Gen eines Genclusters darstellt, welches für typische Assemblierungsfaktoren und ein Adhäsin (3.6.8.2) codiert, wurde im Folgenden die Fähigkeit des Stammes BD413 an Rote Blutkörperchen zu adhären untersucht. Um zusätzlich zum Verhalten des dünnen Pilus dasjenige des dicken Pilus zu analysieren, wurden die Adhäsion der drei Pilusmutanten K101 (*filA*⁻), N100 (*fimA*⁻) und KN100 (*filA*⁻/*fimA*⁻) mit der des Wildtypstammes ADP239 verglichen.

3 ml-Kulturen der *Acinetobacter*-Stämme wurden über Nacht in Succinat-Mineralmedium angezogen, mit 5 ml PBS (Phosphat-gepufferte Saline) gewaschen und nach der Resuspendierung in 500 μ l PBS zu 200 μ l der im Ficoll-Gradienten gereinigten humanen Erythrocyten gegeben. Nach 2 h Inkubation wurden die sich abgesetzten Blutzellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, um nicht adsorbierte Bakterien zu entfernen. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung war daraufhin zu erkennen, daß nur der Wildtypstamm ADP239 und ebenso die *filA*-Mutante K101, welche nur dünne aber keine dicken Pili synthetisierte, Erythrocyten agglutinierten (Abb. 3.54, A). Diese Adsorption der Zellen wurde aufgrund der hohen Dichte der Bakterien in der Probe bestätigt; denn nicht gebundene Bakterien wären nach dem Waschschrift weitgehend entfernt worden. Die Inkubation der *fimA*-Mutante – defekt in der Biogenese der dünnen Pilusstruktur – oder der Doppel-Pilusmutante KN100 mit Erythrocyten führte nicht zu einer Agglutination (Abb. 3.54, A). Darüber hinaus schien die Oberfläche der Blutzellen weniger deformiert. In diesen beiden Proben wurden die Bakterien nach der gemeinsamen Inkubation mit den Erythrocyten durch den Waschschrift weitgehend entfernt. Die wenigen verbliebenen Bakterien lagen zudem frei, nicht assoziiert vor.

Um die Bindung mittels dünner Pili an der Oberfläche von Erythrocyten zu demonstrieren, wurden die Agglutinationen elektronenmikroskopisch betrachtet. Da dünne, in Bündeln assoziierte Pili morphologisch von dicken Pili nur schwierig zu unterscheiden waren, erfolgte die Untersuchung nicht mit dem Wildtypstamm BD413 sondern mit der *filA*-Mutante K101, die keine dicken Pili synthetisiert. Die Agglutination von Erythrocyten mit Bakterien wurde mit Phosphorwolframsäure (pH 7,4) kontrastiert, da der saure pH-Wert des Uranylacetats (pH 4,0) die Erythrocyten lysierte. Wie bereits lichtmikroskopisch erkennbar gewesen war, gruppierten sich die Bakterien um die Erythrocyten (Abb. 4.54, B). Die Deformierung der eukaryontischen Zelle war vermutlich auf die mechanischen

Kräfte zurückzuführen, die durch die Negativkontrastierung und das nachfolgende Trocknen entstanden. In schmalen Zwischenräumen, die zwischen Bakterien und Erythrocyt erkennbar waren, zeigten dünne Pili eine starre Ausrichtung in Richtung eukaryotischer Zelloberfläche (Abb. 3.54, B). Daß die Zellen keinen direkten Kontakt zu den Blutkörperchen zeigten, sondern einen Abstand von 50-100 nm aufwiesen, war vermutlich zum einen auf das an der Spitze des Pilus lokalisierte Adhäsion und die Abstoßungskräfte der Zelloberflächen untereinander zurückzuführen.

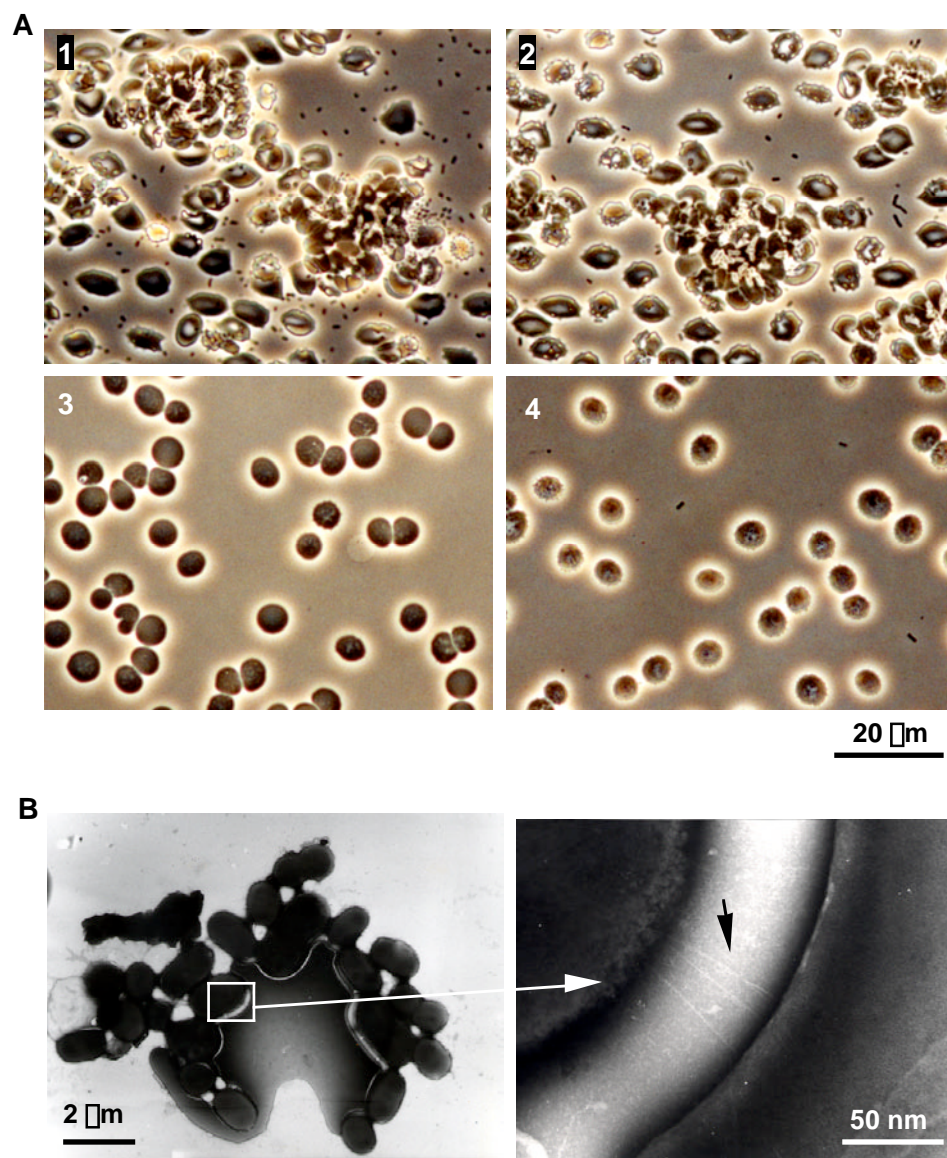


Abb. 3.54: Darstellung der Agglutination von Erythrocyten durch *Acinetobacter* sp. BD413. (A) Lichtmikroskopische Abbildung der Bindung an Erythrocyten von ADP239 (1), K101 (*filA*-Mutante) (2), N100 (*fimA*-Mutante) (3) und KN100 (*filA*/*fimA*-Mutante) (4). (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Adhäsion von K101 (*filA*-Mutante) an ein Rotes Blutkörperchen. Der schwarze Pfeil markiert dünne Pili, die vom Bakterium zur Blutzelle orientiert sind.

Die Agglutination Roter Blutkörperchen durch *Acinetobacter* sp. BD413 mittels der dünnen Pilusstrukturen demonstrierte, daß dieser Pilustyp die für Typ-I-Pili charakteristische Eigenschaft der Adhäsion an Erythrocyten besitzt. Diese Untersuchung zeigten weiterhin, daß nur die dünnen, Typ-I-ähnlichen Pili von *Acinetobacter* sp. BD413 Erythrocyten zu agglutinieren vermochten; die dicken Pili hingegen erwiesen sich diesbezüglich als weder förderlich noch inhibierend.

3.7 Untersuchungen zur Synthese einer Pilusstruktur durch den DNA-Aufnahmeapparat

Die Unterbrechungen der Gene *filA* und *fimA*, die für die Strukturuntereinheiten der dicken und dünnen Pili codieren, hatte die Generierung der Doppelmutante KN100 ermöglicht, die keine filamentösen Strukturen auf der Zelloberfläche synthetisiert. Dies bedeutete, daß *Acinetobacter* sp. BD413 keine Typ-IV-Pili bildet und demzufolge zu der Gruppe derjenigen Organismen gehört, dessen Typ-IV-Pilin-ähnliche Proteine des Transformationssystems zu keinen Pilusstrukturen assemblieren, die auf der Zelloberfläche sichtbar wären. Das Pilin-ähnliche Kompetenzprotein ComP aus *Acinetobacter* sp. BD413, welches keine Pilusstruktur ausbildet, sollte durch eine Erhöhung seiner Expression hinsichtlich seinem Potential zur Filamentsynthese untersucht werden. Hierfür diente der Stamm KN100, der keine filamentösen Strukturen aufweist und das Plasmid pBK27, welches den starken *filA*-Piluspromotor trägt (Abb. 3.52, 3.6.7).

3.7.1 Überexpression des Pilin-ähnlichen Proteins ComP

Zunächst mußte das *comP*-Gen (mit seiner Ribosomen-Bindestelle) als 540 bp-DNA-Fragment amplifiziert werden, welches mit den Primern ComP-*XbaI*-N (5'-CCAACGCGAAATAAAATCTAGACATTGGTG-3') und ComP-blunt-C (5'-AAATACACCAGAACTATCGTGTAATTT-3') erfolgte. Über die N-terminale Schnittstelle *XbaI* und das C-terminale glatte Ende konnte das PCR-Produkt in pBK27 (Abb. 3.51) kloniert werden, welches zuvor mit *PstI* geschnitten, daraufhin mit Klenow-Fragment behandelt und mit *XbaI* restriktionsverdaut wurde. Nach der Ligation befand sich *comP* stromabwärts des starken *filA*-Promotors (Abb. 3.55). Das resultierende Plasmid pBK35 wurde schließlich konjugativ sowohl in *Acinetobacter* sp. KN100 als auch in die *comP*-Mutante T206 transferiert.

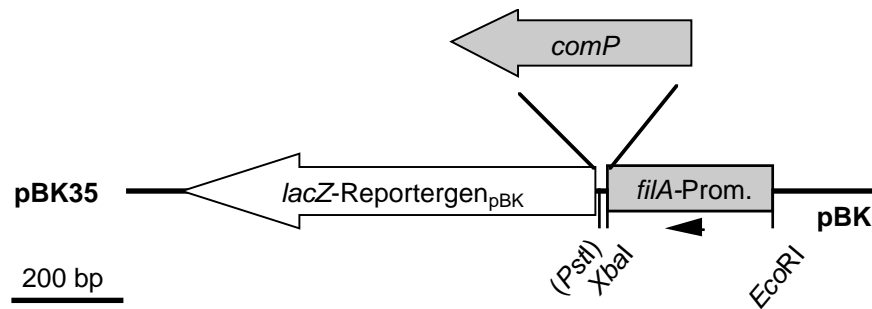


Abb. 3.55: Plasmidkonstruktion für die Überexpression von *comP* durch den *filA*-Promotor. Nach der Amplifikation von *comP* erfolgte die Klonierung in pBK27 (Abb. 3.52), der den *filA*-Promotor (*filA*-Prom.) trägt. Am 5'-Ende von *comP* wurde die *XbaI*-Schnittstelle genutzt, das 3'-Ende wurde hingegen nach Behandlung mit Klenow-Enzym mit glatten DNA-Enden ligiert. Der Pfeil gibt die Richtung der Transkription an. Dargestellt sich nur die für die Klonierungen relevanten Schnittstellen. Da das *comP*-Gen eine Terminatorsequenz enthält, wird das *lacZ*-Reporter gen nicht transkribiert. Nach der Integration des *comP*-Gens kann die *PstI*-Schnittstelle nicht mehr restriktionsverdaut werden.

Mit Hilfe von *Acinetobacter* sp. T206 pBK35 konnte die Wirkung des überexprimierten Strukturproteins ComP auf die natürliche Transformation untersucht werden. Während der Stamm T206 einen vollständigen Transformationsdefekt aufweist (PORSTENDÖRFER *et al.* 1997), konnte die Komplementation dieses Defekts durch das Plasmid pBK35 in dem Transformationsschnelltest untersucht werden. Der positive Transformationstest bestätigte die Komplementation durch das Plasmid pBK35 in dem Stamm T206, da Wachstum auf *p*-Hydroxybenzoat erfolgte.

In *Acinetobacter* sp. KN100 pBK35 ließ sich das überexprimierte ComP hinsichtlich der Pilusbildung untersuchen, indem zunächst der ComP-Gehalt in den Scherfraktionen der KN100-Stämme - mit und ohne Plasmid - verglichen wurde. Ein erhöhter ComP-Gehalt in der Scherfraktion könnte auf eine Pilusbildung hindeuten. Eine 1 l-Kultur wurden in Succinat-Mineralmedium über Nacht in einem Kluverkolben angezogen, gerntet und nach der Resuspendierung in 50 ml PBS zweimal durch eine Kanüle gespritzt. Nach niedertouriger Zentrifugation stellte der Überstand die Scherfraktion da und das Sediment, welches nochmals gewaschen wurde, die Zellfraktion.

Für die immunologische Detektion von ComP wurden jeweils 0,2 μ g Protein der Zellfraktionen (nach der Scherbehandlung) und 50 μ l der Scherfraktionen in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem WESTERN Blotting mit Anti-ComP-Antikörper behandelt. Die Detektion lieferte Signale identischer Intensität in den Zellfraktionen der KN100-Stämme, in denen *comP* einerseits von seinem eigenen Promotor transkribiert und andererseits durch den starken Piluspromotor überexprimiert wurde (Abb. 3.56, 1/2). Signale unterschiedlicher Intensität waren dagegen in den Scherfraktionen zu erkennen:

Während *Acinetobacter* sp. KN100, der hinsichtlich der ComP-Synthese den Wildtyp repräsentiert, nur eine schwach erscheinende Bande aufwies, lieferte der Stamm KN100, der das Plasmid pBK35 trägt, ein Signal stärkerer Intensität (Abb. 3.56, 3/4). Dies bedeutet, daß der ComP-Gehalt nach seiner verstärkten Synthese außerhalb der Zelle erhöht ist, in der Zelle dagegen verglichen zum Wildtyp in ähnlicher Konzentration vorliegt.

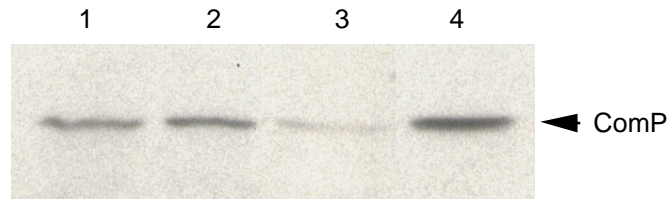


Abb. 3.56: Detektion von ComP in Zelllysate und Scherfraktion. ComP wurde mit Hilfe des starken *filA*-Piluspromotors in *Acinetobacter* KN100 überexprimiert. Die Zellen wurden über Nacht in Succinat-Mineralmedium angezogen, geerntet und die filamentösen Strukturen von der Zelle geschert. Der ComP-Gehalt im Zelllysate (Spur 2) und in der Scherfraktion (Spur 4) wurde nach der Auftrennung in einer 15%igen SDS-PAGE in einem Immunoblot bestimmt. Als Kontrolle diente der Stamm KN100, der nur das chromosomal lokalisierte Wildtypallel trägt, und von dem ebenso das Zelllysate (Spur 1) und die Scherfraktion (Spur 3) mit Anti-ComP-Antikörpern detektiert wurden.

Der erhöhte Export von ComP nach Überexpression kann sowohl zu einer Pilusstruktur als auch zur Sekretion von ComP-Monomeren ins Medium geführt haben. Diese beiden Möglichkeiten sollten mittels elektronenmikroskopischer Betrachtung von *Acinetobacter* sp. KN100 pBK35-Zellen untersucht werden. Die Bakterien wurden in Succinat-Mineralmedium über Nacht angezogen gewaschen und mit 4% Uranylacetat kontrastiert. In mehreren unabhängigen Anzuchten konnten daraufhin bei 5-10% der Zellen ein oder zwei Pili identifiziert werden, die eine Länge von maximal 1 μ m erreichten (Abb. 3.57). Einige Pili lagen als Abruchfragmente vor, was auf einen instabilen Charakter dieser Filamente hindeutete. Weiterhin wiesen die Strukturen einen Durchmesser von 5-6 nm auf. Verglichen zu den flexiblen dicken Pili von *Acinetobacter*, die einen Durchmesser von 6 nm besitzen, zeigten die hier erkennbaren Strukturen einen relativ starren und brüchigen Aufbau. Auf der Zelloberfläche von KN100, der *comP* vom eigenen Promotor transkribiert, waren keine filamentösen Strukturen zu erkennen (Abb. 3.33).

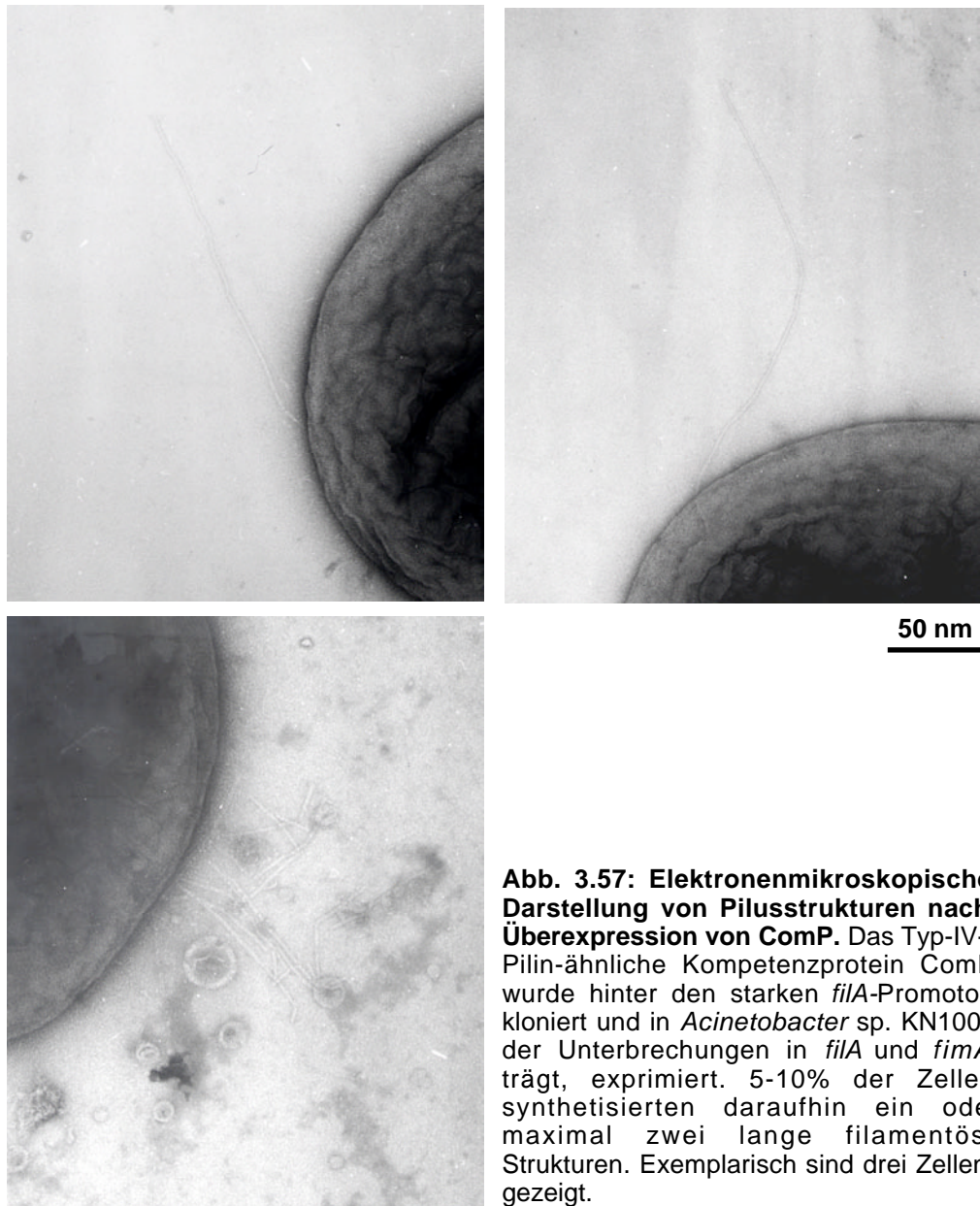


Abb. 3.57: Elektronenmikroskopische Darstellung von Pilusstrukturen nach Überexpression von ComP. Das Typ-IV-Pilin-ähnliche Kompetenzprotein ComP wurde hinter den starken *filA*-Promotor kloniert und in *Acinetobacter* sp. KN100, der Unterbrechungen in *filA* und *fimA* trägt, exprimiert. 5-10% der Zeller synthetisierten daraufhin ein oder maximal zwei lange filamentöse Strukturen. Exemplarisch sind drei Zellen gezeigt.

Die Untersuchungen demonstrierten, daß ComP nach der Expression durch den starken *filA*-Promotor in der Scherfraktion angereichert vorlag und daß dies auf die Assemblierung von ComP in eine Pilusstruktur zurückzuführen war. Diese Überexpression von ComP führte nicht zu einer Beeinträchtigung der natürlichen Transformation.

4. Diskussion

4.1 Struktur und Funktion der Pili von *Acinetobacter* sp. BD413

Die physiologische und molekularbiologische Untersuchung von Transformationssystemen verschiedener natürlich kompetenter Bakterien zeigte einerseits die nahe phylogenetische Verwandtschaft der DNA-Aufnahmeapparate untereinander und führte andererseits zur Identifizierung eines hoch komplexen DNA-Transportsystems, dessen Mechanismus immer noch weitgehend unverstanden ist. Das Typ-IV-Pilusbiogenesystem und der Typ-II-Transportweg stellen zum DNA-Aufnahmeapparat homologe Systeme dar, so daß bei der Interpretation des Zusammenspiels der einzelnen Proteine die Untersuchungsergebnisse aller drei Systeme herangezogen werden können. Da Komponenten der Typ-IV-Pilusbiogenese nicht nur denjenigen des Transformationssystems ähnlich sind, sondern bei genetisch kompetenten Bakterien direkt in die Transformation involviert sind, stellte sich für *Acinetobacter* sp. BD413 die Frage, ob seine Pilusstrukturen zur Familie der Typ-IV-Pili gehören und ebenso an der natürlichen Transformation beteiligt sind. Vor dem Hintergrund, daß *Acinetobacter* sp. BD413 die Fähigkeit der gleitenden Fortbewegung besitzt und Typ-IV-Pili eine spezielle Art der Bewegung vermitteln, die `Twitching Motility` genannt wird, stellte sich weiterhin die Frage, ob die Pili von BD413 in das Gleiten involviert sind.

Acinetobacter sp. BD413 bildet zwei unterschiedliche Pilustypen, die auf der Zelloberfläche peritrich angeordnet sind. Zum einen sind dies dünne, bündelbildende Filamente, die Durchmesser von 2-3 nm aufweisen und zum anderen dicke, flexible Strukturen von ca. 6 nm im Durchmesser. Durch die Aufreinigung der Pilusstrukturen und die N-terminale Anequenzierung der Untereinheiten konnten die entsprechenden Gene identifiziert und charakterisiert sowie Studien an Pilusmutanten angestellt werden.

4.1.1 Die Pilusstrukturen sich nicht an der natürlichen Transformation beteiligt

Die Untersuchungen dieser Arbeit indizierten, daß die dicken und dünnen Pili von *Acinetobacter* sp. BD413 weder in die natürliche Transformation noch in die gleitende Bewegung des Bakteriums involviert sind (3.6.6.). Die dünnen Pili konnten der Familie der Typ-I-Pili zugeordnet werden, während die dicken Pili eine neue Pilusklasse darstellen, die

bisher nicht beschrieben ist (3.6.7/3.6.8). Da *Acinetobacter* sp. BD413 neben den beiden genannten Pilustypen keine weitere Filamentklasse synthetisiert, kann davon ausgegangen werden, daß das Bakterium keine auf der Zelloberfläche sichtbaren Typ-IV-Pili bildet. Diese Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen stimmen mit den Untersuchungen überein, die zeigten, daß nur Typ-IV-Pili die gleitende Fortbewegung `Twitching Motility` und bei bestehender genetischer Kompetenz die DNA-Aufnahme vermitteln; für einen anderer Filamenttyp dagegen konnten diese beiden Funktionen nicht nachgewiesen werden (BRADLY 1980, MERZ *et al.* 2000, JEFFREY *et al.* 2001). Daß *Acinetobacter* sp. BD413 zwei Pilustypen synthetisiert, die nicht in Transformation und Fortbewegung involviert sind, stimmt weiterhin mit den vorangegangenen Untersuchungen transformationsdefekter BD413-Mutanten überein: Defekte in den Pilin-ähnlichen Kompetenzfaktoren ComB, -E, -F und ComP sowie im ComC-Protein, welches Ähnlichkeiten zu Pilusbiogenesefaktoren aufweist, und dem Sekretin ComQ führten nicht zu einem veränderten Pilusphänotyp und nicht zu einer Beeinträchtigung der gleitenden Fortbewegung (PORSTENDÖRFER *et al.* 1997, LINK *et al.* 1998, BUSCH *et al.* 1999, HERZBERG *et al.* 2000, ROSENPLÄNTER pers. Mitteilung).

Da *Acinetobacter* sp. BD413 keine Typ-IV-Pili synthetisiert, gehört das Bakterium zu derjenigen Gruppe von Mikroorganismen, dessen Kompetenzproteine Ähnlichkeiten zu Komponenten der Typ-IV-Pilusbiogenese aufweisen, aber keine Typ-IV-Pili ausbildet. Zu dieser Gruppe gehören ebenso die natürlich kompetenten Gram-positiven Bakterien, wozu die gut untersuchten Organismen *Bacillus subtilis* und *Streptococcus pneumoniae* zählen, und das Gram-negative Bakterium *Haemophilus influenzae* (CHUNG & DUBNAU 1998, BRIAN & SMITH 1999).

4.1.2 Die Pilusstrukturen von *Acinetobacter* sp. BD413 sind nicht an der gleitenden Fortbewegung beteiligt

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß *Acinetobacter* sp. BD413 ohne Pilusstrukturen bei hoher Luftfeuchtigkeit auf festen Oberflächen gleitet (3.6.6.2). Da die Pilusstrukturen von *Acinetobacter* sp. BD413 nicht in die gleitende Bewegung involviert sind und da das Bakterium keine Typ-IV-Pili synthetisiert, kann das Gleiten der Zellen nicht auf Typ-IV-Pilus-vermittelter `Twitching Motility` beruhen, sondern muß Pilus-unabhängig erfolgen. Daß das `Twitchen` an die Synthese von Typ-IV-Pilusstrukturen gebunden ist, zeigten zahlreiche Untersuchungen von BRADLY (1980), MERZ *et al.* (2000) und JEFFREY *et al.* (2001). An den Zellpolen erfolgt zunächst die Assemblierung der Typ-IV-Piline in eine bis zu mehreren Mikrometern lange filamentöse Struktur, die an festen Oberflächen, Wirtszellen oder anderen Bakterien bindet. Daraufhin führt die

Deassemblierung der Piline zu einer Retraktion des Pilus, was in einem Vorschub der Zelle resultiert.

Gleitende Fortbewegungen wurden bereits 1975 von HENRICHSEN und BLOM an unterschiedlichen *Acinetobacter*-Stämme untersucht. Sie demonstrierten bei fünf von 16 Stämmen 'Twitching Motility', was mit dem Vorhandensein polar angeordneter Pili korrelierte, die Durchmesser von 5-6 nm aufwiesen, und aufgrund des beobachteten Gleitens und der Morphologie der Pilusstrukturen der Familie der Typ-IV-Pili zugeordnet wurden. Unbewegliche *Acinetobacter*-Stämme wiesen keine an den Zellpolen lokalisierte Pili auf. Der Stamm BD4 unterschied sich von den genannten fünf gleitenden Stämmen in der Ausbildung von relativ weiten aus einer oder wenigen Zellschichten aufgebauten Kolonierändern, was nach HENRICHSEN und BLOM (1975) nicht auf 'Twitching' sondern 'Sliding' zurückzuführen war. 'Sliding' stellte ihrer Meinung nach eine spezielle Form der gleitenden Fortbewegung dar, in der sich die Bakterien dicht gepackt in Einzelzellagen als eine Einheit voranschieben. Es wurde postuliert, daß diese Bewegung auf die Expansionskräfte der sich teilenden Zellen zurückzuführen ist, wobei spezielle Oberflächeneigenschaften die Reibung zwischen den Bakterien und dem Substrat reduzieren (HENRICHSEN 1972, 1983). Pilus-vermitteltes Gleiten zeigt dagegen ein anderes Erscheinungsbild: Frühere Studien deuteten 'Twitching Motility' als relativ langsame, unorganisierte Art der Bewegung, wobei sich die Zellen überwiegend einzeln in ruckartiger Weise bewegen (HENRICHSEN 1972). Doch beschreiben neuere Studien das Typ-IV-Pilus-vermittelte 'Twitching' als einen schnellen, hoch organisierten Mechanismus der Fortbewegung, in dem die Zellen vorzugsweise parallel assoziiert in Richtung ihrer Längsachse gleiten (SEMMLER *et al.* 1999, LIU *et al.* 2001). Diese unterschiedliche Beschreibung der gleichen Form der Bewegung veranschaulicht die Schwierigkeit, die beim Vergleich subjektiver Betrachtung der 'Twitching Motility' resultiert. Ein weiteres wichtiges Kriterium bei der Untersuchung gleitender Bewegungen ist die Zusammensetzung und Behandlung der Agarplatten sowie die Inkubationszeit, demnach das Alter der Kolonie, was in den verschiedenen Veröffentlichungen zahlreichen Variationen unterliegt. Aus diesem Grund erfordern die unterschiedlichen Kulturbedingungen und Betrachtungsweisen eine genetische Charakterisierung des Gleitens.

Die Untersuchungen dieser Arbeit bestätigen die frühere Beschreibung der gleitenden Bewegung von BD413 (BD4) als 'Sliding' in Form dicht gepackter Einzelzellage, die einen weiten Randbereich der wachsenden Kolonie einnimmt (HENRICHSEN & BLOM 1975). Es zeigte sich, daß zur Mitte der Kolonie stufenförmig weitere Zellagen aufgeschichtet sind und sich daraufhin mehrere Plateaus ergeben.

Vermutlich entsteht eine neue aufgeschichtete Zellage, wenn die durch die Zellteilung hervorgerufene Volumenzunahme die durch das Gleiten geschaffene Fläche übersteigt. Dieser Effekt nimmt zu, je weiter ein Bakterium vom Rand der Kolonie entfernt, in Richtung Zentrum liegt. Die Stufung ist demnach abhängig von Teilungsrate und Geschwindigkeit des Gleitens, was sich in der konzentrischen Anordnung der Stufen widerspiegelt.

Daß aber die Expansion der Kolonie nicht allein aufgrund von Zellteilung, Wachstum und Oberflächenbeschaffenheit zurückzuführen war, verdeutlichten Zellen, die sich vom Rand der Kolonie lösten und in kleinen Aggregaten parallel orientiert in Richtung der Längsachse bewegten. Der Ausrichtung in paralleler Längsrichtung und der Fortbewegung vom Rand der Kolonie muß einem aktiven Prozeß zugrunde liegen.

Die aktive Entfernung von Zellen vom Randbereich einer Kolonie in Form von einzellschichtigen Aggregaten auf feuchten Oberflächen scheint ein allgemeines Charakteristikum gleitender Bakterien darzustellen, und nicht auf eine bestimmte Weise der gleitenden Fortbewegung beschränkt zu sein. Unterschiede liegen vor allem in der Geschwindigkeit der gleitenden Bakterien begründet, was sich in erster Linie in der unterschiedlichen Distanz der Zellen zum Rand der Kolonie äußert. Bei *Acinetobacter* sp. BD413 wird der durch die sich entfernenden Zellen gelappte oder gezähnte Kolonierand schnell durch die sich teilenden Bakterien in Form einer einschichtigen Zellage ausgefüllt und daraufhin begradigt, da die Expansion durch Zellwachstum die relativ langsame Bewegung von 2-3 μm pro Minute nahezu kompensiert. Der Randbereich von Kolonien der sich über 'Twitching Motility' fortbewegenden Organismen *Pseudomonas aeruginosa* und *Ralstonia solanacearum*, sowie Vertreter der sich Pilus-unabhängig fortbewegenden *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe weist neben den in floßartiger Weise gleitenden Zellaggregaten eine netzartige Struktur auf, die auf in Längsrichtung assoziierten gleitende Zellen beruht (MCBRIDE 2000). Aufgrund der relativ schnellen Fortbewegung werden die hierdurch entstandenen Zellzwischenräume verglichen zu BD413 langsamer durch die sich teilenden und wachsenden Zellen aufgefüllt.

Da die Bewegung von *Acinetobacter* sp. BD413 nicht auf 'Twitching Motility' beruht, sondern Pilus-unabhängig erfolgt, muß eine andere Form der Fortbewegung vorliegen. Neben der 'Twitching Motility', die u.a. bei manchen einzelligen Cyanobakterien auftritt (BHAYA 2000, 1999), wurde eine weitere Form der Bewegung bei einer Gruppe von Cyanobakterien untersucht, die ausschließlich bei filamentösen Formen zu finden ist. Bei den gut untersuchten Bakterien *Phormidium uncinatum* und *Anabaena variabilis* finden sich nahe der Septen aneinandergrenzender Zellen Reihen von Poren, die Durchmesser von 14-16 nm aufweisen (HOICZYK 1998, 1995). Es wird postuliert, daß die

Poren für die Sekretion von Polysacchariden verantwortlich sind und dadurch das Zellfilament in gleitender Weise vorantreiben (HOICZYK 2000). Bei *Phormidium uncinatum* wurde weiterhin das extrazelluläre Protein Oscillin identifiziert, welches helikale faserartige Strukturen auf der Zelloberfläche ausbildet und mit der Rotation des Zellfilamentes in Verbindung steht. Beides zusammen, Polysaccharid-Sekretion und Oscillin-Fasern sprechen für eine gleitende Fortbewegung unter damit verbundener Rotation des Zellfilaments, wobei die Bakterien erstaunliche 500 μm in der Minute zurücklegen können (HOICZYK 1998).

Ein Vergleich dieser Pilus-unabhängigen Form der Fortbewegung mit der gleitenden Bewegung von *Acinetobacter* sp. BD413 zeigt keine gemeinsamen Charakteristika. So erreicht BD413 nicht die enorme Geschwindigkeit von 500 μm in der Minute sondern vermag nur mit 2-3 μm pro Minute zu gleiten, bildet keine Zellfilamente und synthetisiert keine Exopolysaccharide. Aufgrund dieser grundsätzlichen Unterschiede in Morphologie und Physiologie der Bewegung von filamentösen Cyanobakterien und *Acinetobacter* sp. BD413, muß ein unterschiedlicher Mechanismus der gleitenden Fortbewegung vorliegen.

Eine weitere Form des Pilus-unabhängigen Gleitens wurde bei stäbchenförmigen Organismen beschrieben. Neben der Typ-IV-Pilus-abhängigen Bewegung von *Myxococcus xanthus* und *Stigmatella aurantiaca*, die zur Bildung von Fruchtkörpern führt und somit als „soziales“ Gleiten bezeichnet wird, besitzen diese Bakterien die Fähigkeit zum „abenteuerlichen“ Gleiten, welches Pilus-unabhängig erfolgt und der Bewegung der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe ähnelt. Untersuchungen gefriergetrockneter Zellen der Vertretern dieser Gruppe von gleitenden Bakterien wie *Myxococcus xanthus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Flexibacter filiformis* und *Flavobacterium johnsoniae* (früher *Cytophaga johnsoniae*) mittels 'Scanning'-Elektronenmikroskopie führten zur Identifizierung helikal angeordneter wulstiger Strukturen auf der Zelloberfläche, die Durchmesser von 170-380 nm aufweisen. Hierbei handelt es sich um helikal Bänder, welche die stäbchenförmige Zelle umgeben (LÜNSDORF & SCHAIRER 2001, FREESE *et al.* 1997). Es scheint, daß die Bewegung dieses Oberflächenreliefs die Zelle vorantreibt. Die Geschwindigkeiten, die erreicht werden, variieren von Spezies zu Spezies. Während die Bewegung der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe mit 120-240 $\mu\text{m}/\text{min}$ eine schnelle Ausbreitung erlaubt, erreicht *Myxococcus xanthus* maximal 1 $\mu\text{m}/\text{min}$.

Bisher untersuchte Mutanten-Stämme von *Flexibacter johnsoniae* zeigten oft neben dem Defekt in der gleitenden Bewegung eine veränderte oder inhibierte Zellteilung, was den Zusammenhang beider physiologischen Prozesse indiziert. In Übereinstimmung damit wurden Gene identifiziert, die am Zellwandaufbau sowie der gleitenden Bewegung beteiligt sind. Beispielsweise führte ein Defekt in der Synthese von Sulfonolipiden, die ein Bestandteil der äußeren Membran darstellen, zu einer beeinträchtigten Mobilität

(ABBANAT *et al.* 1985, GODCHAUX *et al.* 1990). Darüber hinaus wurden weitere Gene identifiziert, deren Genprodukte vermutlich in der Zellhülle lokalisiert sind. Dazu zählen Komponenten, die Ähnlichkeiten zu ABC-Transporten (GlsA, -F, -G), äußeren Membranproteinen (GldI, -J) oder Proteintransportern (FtsX) aufweisen (AGARWAL *et al.* 1997, MCBRIDE 2001, KEMPF & MCBRIDE 2000). Die größte Zahl dieser Gene, die für die gleitende Bewegung essentiell sind, zeigen keine Homologien zu bereits charakterisierten Genen in anderen Organismen.

Diese Pilus-unabhängige Bewegung von Einzelzellen oder Zellaggregaten weist Ähnlichkeiten zum Gleiten von *Acinetobacter* sp. BD413 auf; im Besonderen die relativ langsame Fortbewegung von *Myxococcus xanthus*, der beim „abenteuerlichen“ Gleiten nur 1 μm in der Minute erreicht, korreliert mit der Geschwindigkeit von 2-3 μm pro Minute, die von *Acinetobacter* sp. BD413 erzielt werden. Interessant wären in diesem Zusammenhang elektronenmikroskopische Untersuchungen der Zelloberfläche von *Acinetobacter* sp. BD413 nach 'Cryo'-Präparation, die Hinweise auf Strukturen geben könnten wie sie bei *Myxococcus xanthus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Flexibacter filiformis* und *Flavobacterium johnsoniae* identifiziert wurden. Die Ähnlichkeitsvergleiche der in die gleitende Bewegung involvierten Gene des gut untersuchten Organismus *Flexibacter johnsoniae* mit dem Genom von *Acinetobacter* sp. BD413 lieferten keine signifikanten Homologien, so daß eine nahe Verwandtschaft hinsichtlich des Mechanismus der gleitenden Fortbewegung zwischen diesen beiden Organismen ausgeschlossen werden kann.

Aus diesen Betrachtungen läßt sich das Gleiten von *Acinetobacter* sp. BD413 nicht eindeutig einem bestimmten Typ der bisher untersuchten Fortbewegungsarten zuordnen. Vor dem Hintergrund, daß die größte Zahl der Bakterien ein mehr oder weniger ausgeprägtes Gleiten zeigen, was im Zuge von Untersuchungen der Bildung von bakteriellen Biofilmen analysiert wurde (O'TOOLE *et al.* 2000), und daß die Bedingungen, unter denen Organismen diesen Phänotyp ausbilden, wenig erforscht sind, läßt dies die Vermutung zu, daß es eine große Zahl von Fortbewegungsmechanismen gibt, die noch nicht untersucht sind. *Acinetobacter* sp. BD413 stellt möglicherweise einen Organismus dar, der eine noch unbekannt Form der gleitenden Bewegung ausübt.

4.1.3 *Acinetobacter* sp. BD413 bildet Biofilme

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die dicken und dünnen Pili von *Acinetobacter* sp. BD413 nicht in die gleitende Bewegung und in die natürliche Transformation involviert sind; doch für die dünnen Pili konnte die Bindung an Polystyren demonstriert werden (3.6.10). *Acinetobacter* sp. BD413 besitzt somit die Fähigkeit mit

seinen dünnen, Typ-I-Fimbrien-ähnlichen Pili an hydrophobe Oberflächen zu adsorbieren und daraufhin einen Biofilm auszubilden. In Flüssigkultur synthetisiert BD413 die dünnen Pili in hoher Zahl, auf Agarplatten dagegen sind elektronenmikroskopisch nur vereinzelt diese filamentösen Strukturen zu sehen. Diese Beobachtung stimmt mit der Funktion der dünnen Pili als Adhäsine überein, die einen initialen Kontakt mit geeigneten Oberflächen herstellen. Befindet sich das Bakterium daraufhin auf dem festen Nährboden, so scheinen die Pili nicht mehr notwendig.

Filamentösen Strukturen der Bakterien stellen oft das erste Mittel bei der Initiation von Biofilmen dar. Beispielsweise bewirkt der Typ-IV-Pilus Tcp (‘toxin co-regulated pilus’) von *Vibrio cholerae* als wichtiger Virulenzfaktor die Besiedelung tierischer Eingeweide (HERRINGTON *et al.* 1988). Die Flagellen und die Typ-IV-Pili Msh (‘mannose-sensitive hemagglutinin’) des Bakteriums sind dagegen nicht für die Pathogenität verantwortlich, sondern dienen der Besiedelung abiotischer Oberflächen wie Glas oder Plastik (THELIN & TAYLOR 1996). Bei *Pseudomonas aeruginosa* sind ebenso sowohl Typ-IV-Pili als auch Flagellen an der Adsorption an Oberflächen beteiligt (DE WEGER *et al.* 1987, DOIG *et al.* 1988). Für *E. coli* K-12 konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Flagellum-abhängige Bewegung und Typ-I-Pili den ersten Kontakt an Oberflächen vermitteln (GENEVAUX *et al.* 1996, PRATT & KOLTER 1998).

In natürlicher Umgebung leben die meisten Bakterien assoziiert an Oberflächen und bilden dabei oft komplex aufgebaute Gemeinschaften, die als Biofilme bezeichnet werden. Diese Zell-Konsortien sind ubiquitär vertreten, bedecken biotische sowie abiotische Flächen und zeichnen sich durch außergewöhnliche Resistenz gegenüber Antibiotika-Behandlungen, gegenüber Immunantworten von Wirtsorganismen und hydrodynamischen Scherkräften aus. Der Aufbau der Oberflächen-assozierten Bakteriengemeinschaft stellt einen hoch organisierten Prozeß dar, dessen Regulation von zahlreichen Signalstoffen abhängt (O`TOOLE *et al.* 2000). Die dünnen Pili von *Acinetobacter* sp. BD413, die zur Familie der Typ-I-Pili gehören, sind in ähnlicher Weise für die Adsorption an abiotische Oberflächen verantwortlich. Der hydrophobe Charakter dieser Pili vermittelt vor allem die Bindung an apolare Flächen wie Plastik (z.B. Polystyren) und langkettigen Kohlenwasserstoffen (ROSENBERG 1981, ROSENBERG *et al.* 1981). Neben der Biofilmbildung wird hier die Beteiligung der dünnen Pili an der Verwertung von C-Quellen deutlich; denn bei *Acinetobacter* sp. RAG-1, der vermutlich ebenso Typ-I-Fimbrien-ähnliche Pili synthetisiert, sind diese essentiell für die Verwertung hydrophober Kohlenstoff-Quellen (ROSENBERG *et al.* 1981). Der erste Schritt beim Abbau von aromatischen oder aliphatischen Kohlenwasserstoffen ist der Einbau von molekularem Sauerstoff mittels zellassozierten Enzymen (FOSTER 1962). Dies bedeutet, daß das Bakterium, welches sich in wäßriger Lösung befindet, mit dem hydrophoben Substrat

interagieren muß. Für die Metabolisierung der hydrophoben langkettigen Kohlenwasserstoffe ist aus diesem Grund ein direkter Kontakt des Bakteriums mit dem Substrat notwendig. Es ist naheliegend, daß diese Pilus-vermittelte Eigenschaft einen Selektionsvorteil des Bodenbakteriums in seinem Habitat bewirken.

Neben der Biofilmbildung an abiotische Oberflächen sind die Typ-I-Pili bei pathogenen Organismen an der spezifischen Besiedelung von Wirtszellen beteiligt, wobei hier die Pili als Lektine fungieren und spezifische Zucker binden. Beispielsweise konnte für den FIC-Pilus von *E. coli* die Bindung an β -GalNac-1,4- β -Gal und für den Pap-Pilus eine Affinität zu Glycolipiden, die β -D-Gal-1,4- β -D-Gal tragen, nachgewiesen werden (LUND *et al.* 1988, KHAN *et al.* 2000). Da stromabwärts des Gens *fimA*, welches für die Untereinheit des dünnen Pilus in BD413 codiert, das *fimH*-Gen liegt, dessen Genprodukt Ähnlichkeiten zu Adhäsinen von Typ-I-Pili aufweist, und die dünnen Pili von BD413 die Eigenschaft vermitteln Erythrocyten zu agglutinieren (3.6.11), wäre für diesen Pilustyp ebenso eine Lektineeigenschaft denkbar. In Anbetracht der Tatsache, daß einige *Acinetobacter*-Stämme (z.B. *Acinetobacter baumannii*) bei immungeschwächten Menschen Biofilme auf Epithelzellen ausbilden, läßt dies die Vermutung zu, daß bei diesen pathogenen Stämmen Typ-I-Pili eine Rolle spielen, zumal neben der alleinigen Adhärenz und Persistenz keine Virulenzfaktoren synthetisiert werden, die ein eigenes Krankheitsbild verursachen. Viele pathogene Bakterien synthetisieren neben Adhäsinen wirtszellschädigende Toxine, Oberflächensubstanzen, welche die Immunantwort schwächen, sowie spezielle Eisen-Aufnahmesysteme und Invasine, die für die Persistenz im Wirtsorganismus essentiell sind (HACKER & KAPER 2000). Bei den bisher untersuchten Stämmen der Gattung *Acinetobacter* konnten derartige Virulenzfaktoren nicht nachgewiesen werden.

Die Schwierigkeit bei der Bekämpfung pathogener *Acinetobacter*-Stämme liegt vor allem in der schnellen Resistenzbildung dieser Stämme, die somit einer Antibiotikatherapie nicht mehr zugänglich sind. *Acinetobacter* könnte durch seine einfache Persistenz - ohne Synthese von weiteren Virulenzfaktoren - ein Bindeglied zwischen Bodenbakterium, harmlosen Komensalen und pathogenen Organismen darstellen, so daß ein fließender Übergang zwischen den verschiedenen Lebensformen besteht.

Acinetobacter sp. BD413 wurde als typisches Bodenbakterium nicht als virulent eingestuft. Gegen die Funktion der Typ-I-Pilus-ähnlichen Filamente von *Acinetobacter* sp. BD413 als Virulenzfaktor spricht die Temperatur- und Medium-unabhängige Expression des Strukturgens *fimA*. In Flüssigkultur wurden sowohl in Mineralmedium als auch in Komplexmedium bei 30°C oder bei 37°C identische Expressionsraten ermittelt (3.6.9). Im Gegensatz dazu bilden einige Stämme von *E. coli* K12 und *Vibrio cholerae* keine Biofilme

in Mineralmedium; erst nach Zugabe von Aminosäuren zeigt sie diese Eigenschaft (PRATT & KOLTER 1998, WATNICK *et al.* 1999). Im allgemeinen ist bei der Synthese von Virulenzfaktoren eine Abhängigkeit von Wachstumstemperatur zu beobachten, was bereits für die Synthese des K1-Kapselantigens sowie der Adhärenzfaktoren, welche die Bindung enteropathogener *E. coli*-Stämme oder *Salmonella typhimurium* an Wirtszellen vermitteln und was für die Expression von Invasinen bei pathogenen *Shigella*- und *Yersinia*-Stämmen demonstriert wurde (BRUBAKER 1991, DE GRAAF *et al.* 1980, JONES & RICHARDSON 1981, BORTOLUSSI *et al.* 1983, MAURELLI *et al.* 1984). Der eine Pyelonephritis hervorrufende *E. coli* J96 synthetisiert Pap-Pili, die humane Erythrocyten agglutinieren (HULL *et al.* 1981). Untersuchungen zur Expression des Strukturgens *papA* der Pap-Pili mittels *lacZ*-Fusionen zeigten eine Thermoregulation auf der Ebene der Translation. Verglichen zum Wachstum der Bakterien bei 37°C führten Temperaturen von 22°C oder 30°C zur signifikanten Reduktion der Pilusbiogenese (GÖRANSSON & UHLIN 1984). Daß die Pilusbiogenese von *Acinetobacter* sp. BD413 keiner Thermoregulation und keiner Substratkontrolle unterliegt, spricht demnach gegen die Funktion als Virulenzfaktor

Daß die Agglutination von Erythrocyten, wie dies für die dünnen Pili von BD413 demonstriert wurde (3.6.11), nicht unbedingt ein Pathogenitätsmerkmal darstellt, veranschaulichen weiterhin die Msh-Pili von *Vibrio cholerae*. Obwohl diese Typ-IV-Pili die Fähigkeit vermittelt Erythrocyten zu binden, ist diese Typ-IV-Pilustyp nicht an der initialen Besiedelung von Wirtszellen involviert (THELIN & TAYLOR 1996). Für die Kolonisierung der Wirtszell-Oberflächen dient ein zweiter Typ-IV-Pilus (Tcp), der einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt (HERRINGTON *et al.* 1988).

Während die dicken Pili von BD413 an der Adsorption an hydrophobe Oberflächen nicht beteiligt sind, bewirkt ein Defekt in der Synthese der dünnen Pili eine starke Reduktion des initialen Kontaktes, aber keinen vollständigen Defekt in der Adsorption (3.6.10). Demnach müssen weitere Faktoren zur Biofilmbildung beitragen, die keinen Piluscharakter aufweisen. Ein ähnliches Verhalten fanden MARKIN und BEVERIDGE (1996) bei der Untersuchung des Adsorptionsverhalten von *Pseudomonas aeruginosa*. Zusätzlich zu Flagellen und Pili bewirkten Variationen im Aufbau der Polysaccharide auf der Zelloberfläche ein verändertes Adsorptionsverhalten. *Pseudomonas aeruginosa* synthetisiert zwei verschiedene Arten von Polysacchariden, die als A-Bande und B-Bande beschrieben wurden. Bei näherer Betrachtung einer Mutante führte das Fehlen der B-Bande zu einer reduzierten Bindung an hydrophile Oberflächen und einem erhöhten Vermögen an hydrophobe Oberflächen zu binden. Die A-Bande hat nur geringe Auswirkung auf die Adhäsion (MARKIN & BEVERIDGE 1996). Aus diesen Untersuchungen ist zu schließen, daß auch bei *Acinetobacter* sp. BD413 die Lipopolysaccharide neben den dünnen Pilusstrukturen an der Adsorption beteiligt sein könnten.

Während die dünnen Pili von *Acinetobacter* sp. BD413 durch ihren apolaren Charakter für die Bindung an hydrophobe Oberflächen verantwortlich sind, wie die Mutantenstudien dieser Arbeit zeigten, ist es naheliegend, daß die dicken Pili eine Affinität zu einer weiteren, andersartigen Oberfläche vermitteln, was eine Besiedelung eines definierten Standortes ermöglicht. Für die dicken Pili konnte eine Beteiligung an der Bindung an Erythrocyten oder hydrophobe Oberflächen sowie eine Beteiligung an der gleitenden Fortbewegung des Bakteriums ausgeschlossen werden. Interessant ist demnach in Zukunft die Untersuchung der Funktion dieses Pilustyps, welcher bisher nicht beschrieben wurde.

4.2 Das Transformationssystem von *Acinetobacter* sp. BD413

Die gezielte Unterbrechung von potentiellen Kompetenzgenen lieferte neue Einblicke in den Aufbau des DNA-Aufnahmeapparats von *Acinetobacter* sp. BD413. In dieser Arbeit wurde PHB (D-[-]-Poly- β -Hydroxybutyrat), welches sowohl als Speichergranulum im Cytoplasma als auch als Helixstruktur in den Zellmembranen vorkommt, hinsichtlich der Involvierung in die natürliche Transformation untersucht. Über Ähnlichkeitsvergleiche konnte ein DNA-bindendes Kompetenzprotein ComEA identifiziert werden, welches mit der äußeren Membran assoziiert ist. Weiterhin lieferten Proteininteraktionsstudien des Pilin-ähnlichen Proteins ComP Erkenntnisse über das Zusammenspiel der Kompetenzproteine und über den Mechanismus der DNA-Aufnahme, was die Beziehung zwischen dem natürlichen Transformationssystem und dem Typ-IV-Pilusbiogenesystem verdeutlichte.

4.2.1 Das Polymer PHB ist nicht am Transport der DNA durch die Zellmembranen beteiligt

PHB (D-[-]-Poly- β -Hydroxybutyrat) ist ein Bestandteil der Zellmembranen und des Cytoplasmas vieler Bakterien. Während das PHB des Cytoplasmas in Form von Granula in erster Linie als Speicherstoff dient und molekulare Massen von 60-1000 kDa erreicht (DAWES & SENIOR 1973), ist die Funktion der membranständigen PHB-Moleküle (cPHB) mit molekularen Massen von ~12 kDa weitgehend unbekannt. Untersuchungen zeigten, daß cPHB im hydrophoben Milieu helikale Strukturen ausbildet und das Potential besitzt Kanalstrukturen durch Zellmembranen zu bilden, die durchlässig für Ionen sind (MARCHESSAULT *et al.* 1990, CORNIBERT & MARCHESSAULT *et al.* 1972). REUSCH und SADHOFF (1983) untersuchten den Zusammenhang zwischen PHB-Synthese und DNA-

Aufnahme bei der natürlichen Transformation, wobei sie für *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis* und *Haemophilus influenzae* einen erhöhten PHB-Gehalt in den Membranen nach Kompetenzinduktion nachwies. Dies legte die Vermutung nahe, daß membranständiges cPHB an der DNA-Aufnahme natürlich kompetenter Bakterien beteiligt ist. Jedoch kann bei näherer Betrachtung der Anzuchtbedingungen eine zufällige Korrelation von PHB-Synthese und der Entwicklung der natürlichen Kompetenz nicht ausgeschlossen werden. So erfolgte die Kompetenzinduktion von *Azotobacter vinelandii* nach Überimpfen einer exponentiell wachsenden Kultur in definiertes Medium und anschließendem Wachstum für 12 bis 28 Stunden (PAGE & VON TIGERSTROM 1978). Dabei erreichen die Bakterien die stationäre Wachstumsphase, in der im allgemeinen ebenso eine vermehrte PHB-Synthese zur Bildung von Speicherstoffen erfolgt. Ähnliches gilt für *Bacillus subtilis*: Die Kultur erreicht seine höchste Transformationsfrequenz mit dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase (YOUNG 1967). Bei *Haemophilus influenzae* führt ebenso die Limitierung der Nährstoffe oder des Sauerstoffs zu gesteigerten Transformationsfrequenzen (HERRIOTT *et al.* 1970, GOODGAL 1982).

Bei *Acinetobacter* sp. BD413 ist eine Induktion der Expression von Kompetenzgenen zum Ende des exponentiellen Wachstums zu beobachten, um in der stationären Phase ein Maximum zu erreichen (BUSCH *et al.* 1999, HERZBERG *et al.* 2000, PORSTENDÖRFER *et al.* 2000). Die höchste Transformationsrate wird daraufhin nach dem Überimpfen in frisches Medium erreicht. Inwieweit DNA bereits in der stationären Wachstumsphase gebunden und aufgenommen wird, dann aber nicht homolog ins Genom rekombiniert sondern metabolisiert wird, wurde bisher noch nicht überprüft.

Die Synthese des DNA-Aufnahmeapparates in der stationären Wachstumsphase bei *Acinetobacter* sp. BD413 zeigt parallelen zu der Ausbildung der natürlichen Transformation bei den oben genannten Organismen *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis* und *Haemophilus influenzae*. Der Gehalt an cPHB in den Zellmembranen steigt bei den drei Bakterienspezies mit dem Eintritt in die genetisch kompetente Phase. Diese Korrelation kann jedoch kein Indiz für die Involvierung von PHB in die DNA-Aufnahme sein, da die Speicherstoffsynthese gewöhnlich am Ende des exponentiellen Wachstums und in der stationären Phase erfolgt. Durch die Unterbrechung des *phaC*-Gens in *Acinetobacter* sp. BD413, welches für die PHB-Synthase codiert, konnte gezeigt werden, daß die natürliche Transformation nicht eingeschränkt ist. Somit kann membranständiges cPHB bei *Acinetobacter* sp. BD413 keine essentielle Funktion in der DNA-Aufnahme ausüben. Da die in die natürliche Transformation involvierten Komponenten unter den natürlich kompetenten Organismen hoch konserviert sind, spricht dies für einen gleichen Mechanismus der DNA-Aufnahme. Aus diesem Grund scheint eine cPHB-abhängige DNA-Aufnahme auch in *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis* und *Haemophilus*

influenzae sehr fraglich. Bei *Bacillus subtilis* konnte zudem gezeigt werden, daß die Pilin-ähnlichen Proteine mit Peptidoglycan oder ihresgleichen assoziieren (CHUNG & DUBNAU 1998, CHUNG *et al.* 1998). 'Cross-Linking' von Kompetenzproteinen an cPHB konnte dagegen nicht demonstriert werden.

Zusammenfassend läßt sich aus diesen Betrachtungen folgern, daß PHB keine essentielle Komponente bei der DNA-Aufnahme natürlich transformierbarer Bakterien darstellt.

4.2.2 Struktur und Funktion der Pilin-ähnlichen Kompetenzfaktoren

Durch Untersuchungen von Genen, deren Produkte Homologien zu Pilus- oder Flagellen-Biosynthese-Komponenten aufweisen, kann zum einen nicht ohne weiteres von einem Vorliegen einer filamentösen Struktur ausgegangen werden und zum anderen nicht auf eine Pilus- oder Flagellum-spezifische Funktion geschlossen werden. So bildet zum Beispiel die Klasse der Typ-I-Pili einerseits Filamente und andererseits Zelloberflächen-integrale Strukturen, die beide gleichermaßen Adhäsion vermitteln (BIGLE *et al.* 1989, TENNENT *et al.* 1990, HACKER 1990, RIEGMAN *et al.* 1990, DEGRAAF 1990). Gut untersucht sind die Flagellumbiosynthese und das dazu homologe Typ-III-Sekretionssystem. Die strukturellen Untereinheiten bzw. Exoproteine beider Systeme gelangen durch den Hohlraum des Filamentes zur Spitze und werden dort zu einem Filament assembliert bzw. freigesetzt. Das 0,5-1 μm lange Flagellum vermittelt durch seine Rotation eine schwimmende oder schwärmende Fortbewegung; im Gegensatz dazu dienen die röhrenförmigen Strukturen, die in ihrer Länge von 45 nm bis 700 nm variieren, zur Sekretion von Proteinen (TAMANO *et al.* 2000, SEKIYA *et al.* 2001).

Eine Variabilität in der Assemblierung bzw. in der Funktion struktureller Untereinheiten liegt wie bei der Typ-I-Pilus- und Flagellenbiosynthese ebenso bei der Typ-IV-Pilusbiogenese vor. Zur Pilusbiogenese ähnliche Komponenten sind im DNA-Aufnahmeapparat der natürlichen Transformationssysteme und bei den Typ-II-Sekretionswegen zu finden. Bei natürlich transformierbaren Bakterien sind die Komponenten für die Assemblierung des Pilus ebenso an der DNA-Aufnahme durch die äußere Membran und den periplasmatischen Raum beteiligt. Daß die Pilusstruktur aber keine essentielles Strukturmerkmal für die DNA-Aufnahme darstellt, beweist eine Gruppe von natürlich kompetenten Organismen, wozu *Acinetobacter* sp. BD413, *Haemophilus influenzae* und natürlich transformierbare Gram-positive Bakterien gehören, die keine Typ-IV-Pilusstrukturen synthetisieren, aber zur DNA-Aufnahme diejenigen Komponenten besitzen, die denen der Typ-IV-Pilusbiogenese homolog sind (DUBNAU 1991, TOMB *et al.* 1991). Unbekannt ist, welche regulatorischen Faktoren oder strukturellen Unterschiede in

der Aminosäuresequenz der Piline zur Synthese einerseits eines außerhalb der Zelle erscheinenden Filaments und andererseits zu Strukturen führen, die nicht über die äußere Membran hinaus assemblieren. Vorstellbar wären regulatorische oder assemblierende, für die Pilusbiogenese spezifische Proteine, die den homologen Systemen, die keine Pili synthetisieren, fehlen. Bisher konnten jedoch derartige Komponenten nicht identifiziert werden. Die hohe Variabilität in der Aminosäuresequenz des C-Terminus der Untereinheiten dieser Proteinfamilie, läßt die Vermutung zu, daß diese Domäne mit dem Potential der Filamentbildung in Zusammenhang steht. In diesem variablen Bereich könnten spezifische Aminosäurereste Interaktionen zwischen den Monomeren in der Pilusstruktur vermitteln, die den ausschließlich in den Zellmembranen und im Periplasma lokalisierten Pilin-ähnlichen Proteinen fehlen. Durch Abgleiche der Aminosäuresequenzen von Pilinen und Pilin-ähnlichen Proteinen konnten jedoch keine konservierten Aminosäuren im C-Terminus identifiziert werden, die ein charakteristisches Merkmal darstellen. Daß die Stabilität des Pilus in erster Linie durch den im Zentrum des Pilus lokalisierten hydrophoben N-Terminus der Piline erlangt wird, verdeutlichen Arbeiten, die eine mehrlagige Struktur des Typ-IV-Pilus von *Neisseria gonorrhoeae* und *Pseudomonas aeruginosa* aufklärten (FOREST & TAINER 1997, KEIZER *et al.* 2001). Die Piline sind in helikaler Ausrichtung angeordnet, wobei fünf Untereinheiten eine Umdrehung ausmachen. Im Zentrum bilden die N-terminalen Helices durch hydrophobe Interaktionen ein Gerüst, welches die Grundstabilität verleiht. In Form von β -Faltblättern, die vom C-Terminus der Piline ausgebildet werden und welche die Zuckerketten tragen, wird der hydrophobe Kern umgeben. Diese Aminosäurereste bilden untereinander Wasserstoff-Brückenbindungen, was dem Pilus eine zusätzliche mechanische Stabilität verleiht (FOREST & TAINER 1997, KEIZER *et al.* 2001).

Da keine signifikanten Auffälligkeiten in der Aminosäuresequenz zu beobachten sind, kann nur aufgrund der Funktion eine Unterteilung vorgenommen werden. Die eine Gruppe bilden die strukturellen Untereinheiten der Pili, die sogenannten Piline, die als langes Filament assembliert werden, welches außerhalb der Zelle sichtbar ist. Diese strukturellen Proteine liegen häufig glykosyliert vor (MARCEAU & NASSIF 1999, JENNINGS *et al.* 1998, MARCEAU *et al.* 1998). Zur anderen Gruppe zählen die Typ-IV-Pilin-ähnlichen Proteine, die ausschließlich in den Zellmembranen und im Periplasma lokalisiert sind und dort als Assemblierungsfaktoren bezüglich der strukturellen Untereinheiten (Piline) des Typ-IV-Pilus wirken. Während die Piline in hoher Zahl synthetisiert werden, werden die Pilin-ähnlichen Proteine in relativ geringer Menge gebildet, was den funktionalen Unterschied widerspiegelt. Beispielsweise wurden bei *Pseudomonas aeruginosa* zusätzlich zur strukturellen Untereinheit PilA fünf weitere Pilin-ähnliche Proteine Pile, -V, -W, -X und FimU identifiziert, die für die Pilusbiogenese essentiell sind und in geringer Menge in der Zellhülle lokalisiert sind (RUSSEL & DARZIN 1994, ALM & MATTICK 1995, 1997, ALM

et al. 1996). Unterschiede in der Syntheserate von Komponenten dieser Proteinfamilie sind nicht nur bei der Pilusbiogenese sondern ebenso bei den Typ-II-Sekretionswegen von *Klebsiella oxytoca* und *Pseudomonas aeruginosa* zu beobachten, obwohl das Sekretionssystem keine Pili ausbildet. Von den fünf Pilin-ähnlichen Proteinen PulG, -H, -I, -J und PulK des Pullulanase-Sekretionssystems von *Klebsiella* wird PulG in größerer Menge synthetisiert (REYSS & PUGSLEY 1990); bei *Pseudomonas aeruginosa* stellt XcpT die Hauptkomponente dar, wobei XcpH, -I, -J und XcpK geringer exprimiert vorliegen (FILLOUX *et al.* 1990). Immunologische Detektionen der Pilin-ähnlichen Kompetenzfaktoren in *Acinetobacter* sp. BD413 lieferten Indizien, daß ComP verglichen zu ComB, -E und ComF in höherer Rate synthetisiert wird. Während ComP durch generierte Antikörper eindeutig detektiert werden konnte, waren die anderen Pilin-ähnlichen Proteine immunologisch nicht darzustellen. Darüber hinaus unterliegt ComP einer posttranslationalen Glykosylierung, was ein charakteristisches Merkmal für Typ-IV-Piline darstellt und Pilin-ähnlichen Proteinen, die als Assemblierungsfaktoren wirken, i.d.R. fehlt (PORSTENDÖRFER *et al.* 2000). Diese Beobachtungen ließen die Hypothese zu, daß nicht nur im Typ-IV-Pilusbiogenesesystem eine funktionale Differenzierung zwischen Pilingen und Pilin-ähnlichen Proteinen besteht, sondern auch in den verwandten Systemen zu finden ist (Transformations- und Typ-II-Sekretionssystem), die keine Pilusstruktur synthetisieren. Denkbar wäre die Synthese einer Pseudopilusstruktur - aufgebaut aus den am stärksten exprimierten strukturellen Komponenten -, deren Länge nicht über die äußere Membran hinausreicht.

Das Kompetenzprotein ComP aus *Acinetobacter* sp. BD413 stellt ein Typ-IV-Pilin-ähnliches Protein dar, welches in den Zellmembranen lokalisiert ist, aber zu keiner außerhalb der Zelle sichtbaren Pilusstrukturen assembliert (PORSTENDÖRFER *et al.* 1997, 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß ComP das Potential zur Filamentbildung besitzt (3.7.1). Die Klonierung von *comP* hinter den starken *filA*-Promotor führte aufgrund der Überexpression von *comP* zur Synthese von Filamenten, die eine Länge von bis zu 1 μ m erreichten. In ähnlicher Weise wurde das Typ-IV-Pilin-ähnliche Protein PulG, welches die Pilin-ähnliche Hauptkomponente des Typ-II-Sekretionswegs aus *Klebsiella oxytoca* darstellt, nach seiner Überexpression in *E. coli* K-12 als Pilusstruktur assembliert (SAUVONNET *et al.* 2000). Hier wurde die Überexpression durch die Lokalisation des *pul*-Clusters, welches für das Pullulanase-Sekretionssystem codiert, auf einem 'High Copy Plasmid' erzielt.

Die Assemblierung von ComP bzw. PulG in eine Pilusstruktur unterstützt die Hypothese, daß eine Differenzierung in Strukturpilingen und Assemblierungspilingen nicht nur im Typ-IV-Pilusbiogenesesystem vorliegt, sondern auch in den verwandten Systemen, die keine eigentlichen Pilusstrukturen assemblieren, zu finden ist; denn die Assemblierung

einer Pilusstruktur aus ComP- bzw. PulG-Proteinen indiziert den grundsätzlich ähnlichen Aufbau des Transformationssystems und des Typ-II-Sekretionswegs zum Typ-IV-Pilusbiogenesystem. Erwähnenswert ist die Tatsache, daß diese Beobachtungen vermutlich nur für Gram-negative Organismen zutrifft, die eine äußere Membran synthetisieren. Die für die natürliche Transformation von *Bacillus subtilis* essentiellen Pilin-ähnlichen Gene (*comGC*, *-GD* *-GE* und *comGG*) sind als ein Operon organisiert und werden von einer polycistronischen mRNA translatiert (CHUNG *et al.* 1998), was eine einheitliche Syntheserate und äquivalente Proteinmengen indiziert. Da es für immunologische Detektionen in *Bacillus subtilis* erforderlich war, die Pilin-ähnlichen Genen höher zu exprimieren, belegt dies weiterhin, daß jede dieser Komponenten eher den im allgemeinen in geringer Menge synthetisierten Pilin-ähnlichen Assemblierungsproteinen als den relativ hoch exprimierten Strukturproteinen zugehörig sind. Demzufolge fehlt dem Gram-positiven Organismus *Bacillus subtilis* die Typ-IV-Pilin-ähnliche Strukturkomponente, die Pilin-Charakter aufweist. In Anbetracht der Tatsache, daß Gram-positive Organismen keine Typ-IV-Pili synthetisieren, sind die strukturellen Piline bzw. strukturellen Pilin-ähnlichen Proteine vermutlich an die Anwesenheit einer äußeren Membran gebunden.

Das Potential der Pilin-ähnlichen Proteine PulG aus *Klebsiella oxytoca* und ComP aus *Acinetobacter* sp. BD413 nach Überexpression eine Pilusstruktur auszubilden deutet darauf hin, daß die Pilusbiogenese in erster Linie vom Expressionslevel des Strukturgens abhängt, und nicht allein auf Assemblierungsfaktoren beruhen. Dies stimmt damit überein, daß bisher keine Komponenten identifiziert wurden, die eine spezifische Funktion allein für die Assemblierung einer Pilusstruktur zeigen und in denjenigen verwandten Systemen fehlen, die keine filamentöse Struktur bilden. Die Assemblierung in eine stabile, lange Pilusstruktur kann darüber hinaus nicht auf spezifische Aminosäuren in der Primärsequenz der Piline bzw. Pilin-ähnlichen Proteine zurückzuführen sein, da ComP bzw. PulG als Untereinheit des Pilus keine Mutationen trugen. Da der hydrophobe N-Terminus unter den Piliten und Pilin-ähnlichen Proteinen eine hoch konservierte Aminosäuresequenz aufweist, der C-terminale Bereich dagegen Variabilitäten zeigen, ist es naheliegend, daß die Grundstabilität der von PulG und ComP ausgebildeten Pilusstrukturen vom N-Terminus vermittelt wird. Die ComP-Pili weisen einen starren und brüchigen Charakter auf, was auf eine relative Instabilität der filamentösen Struktur hinweist. Diese wäre mit fehlenden Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen ComP-Monomeren zu erklären, die bei PILE von *Neisseria gonorrhoeae* vom C-Terminus des Proteins ausgebildet werden und die β -Faltblätter untereinander verbinden und stabilisieren.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung, inwiefern Pilin-ähnliche Proteine, die nicht zu den Struktur- sondern zu den Assemblierungsfaktoren

gehören ebenso nach Überexpression filamentöse Strukturen ausbilden können. Eine Pilusbildung, z.B. von ComB, -E oder ComF aus *Acinetobacter* sp. BD413, würde die Hypothese bestätigen, daß eine Grundstabilität der Typ-IV-Pili in erster Linie vom konservierten, hydrophoben N-Terminus ausgeht und die Assemblierung in ein Filament ausschließlich von einer hohen Syntheserate abhängt. Bilden die Pilin-ähnlichen Proteine nach Überexpression kein Filament, so würde dies jedoch darauf hindeuten, daß Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen den beiden Gruppen der Proteinfamilie der Typ-IV-Piline dafür verantwortlich sind.

Bemerkenswert ist die Beobachtung, daß der erhöhte ComP-Gehalt in der Zelle nicht zur Synthese mehrerer kurzer Pili, sondern nur zur Assemblierung von einem oder maximal zwei langen Filamenten führte. Dies läßt sich damit begründen, daß entweder nur ein Assemblierungsapparat gebildet, oder daß ComP-Monomere nur zu einem Assemblierungsort geleitet wurde. Letzteres würde mit den Untersuchungen bei *Neisseria gonorrhoeae* übereinstimmen. Das Gen *pilE*, welches für die strukturelle Untereinheit der Typ-IV-Pili codiert, wurde unter die Kontrolle der regulatorischen *lacIOP*-Sequenz gestellt (LONG *et al.* 2001). Bei niedrigstem Induktionsniveau mit 0,005 mM IPTG wies die größte Zahl der Zellen keine Pili auf; nur 5-10% der Bakterien synthetisierten ein oder zwei lange Pili. Dieser Pilusphänotyp ist vergleichbar mit demjenigen von *Acinetobacter* sp. BD413, bei dem *comP* durch den starken Piluspromotor exprimiert wird. Nach sukzessiver Erhöhung der Induktion des *lacIOP*-Promotors in *Neisseria* erhöhte sich die Zahl der Pili von zuerst mehreren einzeln liegenden Pili bis hin zu einer Vielzahl aggregierter Pilusbündel. Da die für die Assemblierung verantwortlichen Pilusbiogenese-Gene keiner artifiziellen Regulation unterlagen, sondern durch den zelleigenen Promotor transkribiert wurden, ist es anzunehmen, daß die Zahl der Assemblierungsapparate pro Zelle unter den verschiedenen Induktionsniveaus von *PilE* konstant blieb. Es konnte gezeigt werden, daß das überexprimierte *PilE* keinen induktiven oder inhibitorischen Effekt auf die Synthese der Assemblierungsfaktoren ausübte. Dies bedeutet für die Pilusassemblierung, daß sich Piline nacheinander an Assemblierungsapparaten sammeln, bis ein Schwellenwert an strukturellen Untereinheiten erreicht ist, so daß daraufhin diese zu einem Pilus assembliert werden. Erst dann wird möglicherweise ein weiterer Assemblierungsort mit Piliinen versorgt. Daß die Zahl der Pilusstrukturen nicht unmittelbar die Zahl der Assemblierungsapparate widerspiegelt, zeigt weiterhin die Überexpression des *pul*-Clusters aus *Klebsiella oxytoca*. Auf diesem Gencluster lagen alle Gene, die für die Pullulanase-Sekretion essentiell sind. Sowohl unter der Kontrolle des nativen Promotors als auch nach Überexpression des *pul*-Clusters blieben die Proportionen zwischen Assemblierungsfaktoren und Strukturproteinen gleich, d.h. die Sekretionssysteme wurden mit der gleichen Anzahl von PulG-Proteinen ausgestattet, nur stieg mit der erhöhten

Expression die Zahl der Sekretionssysteme. Doch werden bei niedriger Expression keine Pili und bei hoher Expression filamentöse Strukturen synthetisiert. Es wäre zu erwarten gewesen, daß die Zahl der Sekretionssysteme zunimmt und die Verteilung der Komponenten gleich bleibt. Die hohe Zahl des Pilin-ähnlichen Proteins PulG muß hier an einigen Assemblierungsapparaten das Signal zur Pilusbiogenese geliefert haben, während andere nicht durch PulG besetzt wurden.

Die 10-20fache Steigerung der *comP*-Expression in *Acinetobacter* sp. BD413 ließ ComP zu Pilusstrukturen assemblieren, wobei die natürliche Fähigkeit zur DNA-Aufnahme bestehen blieb. Bei *Neisseria gonorrhoeae* ergab die sehr geringe Expression von *pilE*, die zu keiner Pilussynthese führte, Transformationsraten von 10^{-5} . Eine Steigerung war mit der Erhöhung der Pile-Synthese zu beobachten gewesen: Eine Induktion von *pilE*, bei dem 5-10% der Zellen einen Pilus oder zwei Pili synthetisierten, führte zu Transformationsraten um 10^{-4} . Mit der sukzessiven Steigerung der Expression von *pilE* erhöhte sich die Anzahl der Pili und damit die Transformationsrate bis zu einem Sättigungswert von 10^{-3} . Bei dieser maximalen Transformationsrate synthetisierten die Zellen eine hohe Zahl von Pilusstrukturen. Dies läßt vermuten, daß die Synthese der Filamente für die DNA-Aufnahme nicht hinderlich, sondern im Gegenteil, eher förderlich ist. Eine weitere Steigerung der *pilE*-Expression führte nicht zu einer weiteren Erhöhung der Transformationsraten, sondern zu einer Stagnation der maximalen Raten von 10^{-3} . Dies könnte damit zusammenhängen, daß bei diesem Wert alle Assemblierungsapparate belegt sind oder andere Kompetenzproteine limitierend wirken. Interessant wäre zu untersuchen, ob die Überexpression von ComP in *Acinetobacter* sp. BD413 ebenso zu einer Erhöhung der Transformationsrate führt oder ob in diesem Organismus andere Faktoren die Transformationsrate bestimmen.

Die Korrelation der Zahl der Pilusstrukturen mit der Transformationsrate bei *Neisseria gonorrhoeae* und das Potential von ComP aus *Acinetobacter* sp. BD413 Pili zu bilden sind starke Indizien, daß das Typ-IV-Pilusbiogenesesystem die DNA-Aufnahme vermittelt und demzufolge keine Trennung zwischen Transformationssystem und Typ-IV-Pilusbiogenesesystem herrscht. Würden zwei Systeme nebeneinander existieren, die aus den gleichen Proteinen aufgebaut werden, so wäre zu erwarten gewesen, daß durch die Erhöhung der Pile-Menge die Zahl der DNA-Aufnahmeapparate zugunsten der Pilusbildenden Systeme abnimmt. Dies hätte eine Erniedrigung der Transformationsrate bei Steigerung der *pilE*-Expression zur Folge gehabt.

Sind Typ-IV-Pilusbiogenese und DNA-Aufnahme identische Systeme, so ist es wahrscheinlich, daß zusätzliche transformationsspezifische Komponenten, die mit dem Typ-IV-Pilusbiogenesesystem interagieren, das 'Twitching Motility'-vermittelnde System

ebenso DNA aufnehmen lassen. Da die Pilusstruktur nach ihrer Synthese durch Deassemblierung verkürzt werden kann, ist es naheliegend, daß diese Struktur dadurch zwei Funktionen übernimmt: Der außerhalb der Zelle sichtbare lange Pilus dient durch wiederholte Assemblierung und darauffolgende Deassemblierung der gleitenden Fortbewegung, wobei der verkürzte Zustand der DNA-Aufnahme dient. Der verkürzte Zustand wäre dann dem DNA-Aufnahmeapparat ähnlich, wie er in den natürlich kompetenten Organismen zu finden ist, die keine auf der Zelloberfläche erkennbaren Typ-IV-Pili synthetisieren. Das Kompetenzprotein ComP aus *Acinetobacter* sp. BD413, welches möglicherweise verglichen zu den anderen Pilin-ähnlichen Proteinen ComB, -E und ComF in größerer Menge synthetisiert wird, könnte als strukturelle Komponente (Pilin) einen sehr kurzen, stabilen Pilus bilden, der die äußere Membran und die Lipopolysaccharidschicht durchspannt. ComB, -E und ComF müßten dann gegenüber ComP als Assemblierungsfaktoren wirken. Die Überexpression von ComP läßt den Pseudopilus dann zu einem Typ-IV-Pilus assemblieren.

4.2.3 Assemblierung des Pilin-ähnlichen Kompetenzproteins ComP in *Acinetobacter* sp. BD413

Acinetobacter sp. BD413 gehört zu derjenigen Gruppe der Organismen, deren Kompetenzproteine zwar Ähnlichkeiten zu den Komponenten der Typ-IV-Pilusbiogenese aufweisen, aber keine Typ-IV-Pilusstruktur synthetisiert. Weitere natürlich kompetente Bakterien ohne Typ-IV-Pili sind z.B. der Gram-negative Organismus *Haemophilus influenzae* und Gram-positiven Bakterien, wie der gut untersuchte *Bacillus subtilis* und *Streptococcus pneumoniae*. Bei diesen Bakterien wird möglicherweise eine kurze Pseudopilusstruktur synthetisiert, die den periplasmatischen Raum durchspannt und DNA-bindende Proteine exponiert oder mit seiner Deassemblierung einen Kanal durch die Mureinschicht schafft, wodurch der DNA-Strang geleitet werden kann. Daß die Pilin-ähnlichen Proteine für den Transport der DNA durch die Peptidoglycanschicht verantwortlich sind, zeigte die Regeneration der DNA-Aufnahme bei *Bacillus subtilis*: Nach enzymatischem Abbau des Mureins zeigten transformationsdefekte Stämme, die Mutationen in Pilin-ähnlichen Kompetenzgenen aufwiesen, eine Regeneration der DNA-Aufnahme (PROVVEDI & DUBNAU 1999). Durch Protoplastierung fand die DNA Zugang zur inneren Zellmembran und konnte daraufhin ins Cytoplasma transportiert werden. Die Funktion der Pilin-ähnlichen Proteine liegt vermutlich in der Exposition des DNA-bindenden Proteins auf der Zelloberfläche und im nachfolgenden Import durch die Peptidoglycanschicht. In ähnlicher Weise stellt man sich den Proteinexport des Typ-II-Sekretionswegs vor, nur erfolgt hier der Transport des Exoenzyms ausschließlich nach

außen. Durch Assemblierung der Typ-IV-Pilin-ähnlichen Komponenten wird vermutlich das Exoprotein durch das Periplasma und die äußere Membran geleitet.

Mittels Gelfiltration konnte kürzlich bei *Xanthomonas campestris* ein Proteinkomplex als Bestandteil des Typ-II-Sekretionswegs identifiziert werden, der eine molekulare Masse > 669 kDa aufweist und das Typ-IV-Pilin-ähnliche Protein XpsG enthält (HU *et al.* 2002). Eine Abbildung der Struktur und somit die Identifizierung eines Pseudopilus steht jedoch noch aus. Durch eine Mutation in XpsG, die zu einem Defekt in der Proteinsekretion und Komplexbildung führte, die Lokalisation von XpsG verglichen zum Wildtyp parallel nicht änderte, wurde ausgeschlossen, daß es sich bei dem identifizierten Komplex nur um membranständiges XpsG in Form von Vesikeln handelte.

Bei *Acinetobacter* sp. BD413 konnte in dieser Arbeit ebenso neben dem 240 kDa-ComP-Komplex, der gegenüber milden Detergenzien stabil ist, ein größerer ComP-haltiger Proteinkomplex identifiziert werden (3.5.5), dessen genaue molekulare Masse und Zusammensetzung noch nicht untersucht wurde. Charakteristisch für beide Komplexe, aus *Acinetobacter* sp. BD3413 und *Xanthomonas campestris*, ist ihre Sensitivität gegenüber milden Detergenzien wie Dodecylmaltosid oder Triton X-100. Dieses Verhalten spricht gegen eine kurze Pilus-ähnliche Struktur im DNA-Aufnahmeapparat oder Typ-II-Sekretionssystem, da der eigentliche Typ-IV-Pilus gegenüber diesen milden Detergenzien stabil ist.

Was die Komponenten innerhalb der Zellhülle betrifft, so bestünde jedoch ein identischer Aufbau von DNA-Aufnahme- und Pilus-Biogenesesystem, wenn der Assemblierungsgrad und damit die Stabilität des Typ-IV-Pilus im Periplasma und an der äußeren Membran Unterschiede aufwies: Während die strukturellen Untereinheiten im Periplasma mit der in der Cytoplasmamembran lokalisierten Assemblierungsplattform möglicherweise nur locker assoziiert werden, könnten diese beim Durchtritt durch die Pore (das Sekretin) in der äußeren Membran eine strukturelle Orientierung erfahren, die dadurch Stabilität verleiht. Diese Hypothese wird durch bisherige Untersuchungen zur Biogenese des Pilus bestätigt: Bisher konnten keine Proteininteraktionen (außer durch chemisches 'Cross-Linking') nachgewiesen werden, welche die Pilusstruktur mit Komponenten der Assemblierungsmaschinerie der Cytoplasmamembran und des Periplasmas verbindet. Die für die Pilussynthese essentiellen Pilin-ähnlichen Proteine, die in den Zellmembranen und im Periplasma lokalisiert sind, konnten bisher nicht als basal lokalisierter Bestandteil der Pilusstruktur nachgewiesen werden. Weiterhin wurde PilC bei *Neisseria gonorrhoeae* als ein Assemblierungsfaktor charakterisiert, welcher mit der äußeren Membran cofraktioniert und für die Pilusassemblierung essentiell ist (RYLL *et al.* 1997, RUDEL *et al.* 1995). Fehlt PilC, so wird keine Pilusstruktur synthetisiert. Die Funktion von PilC als Assemblierungsfaktor an der äußeren Membran bekräftigt die Hypothese, daß die

endgültige Assemblierung zu einem stabilen Filament nicht an der Cytoplasmamembran oder im Periplasma, sondern an der äußeren Membran erfolgt. Daß PilC aus *Neisseria* erst an der äußeren Membran wirkt, zeigten erfolgreiche Komplementationen eines PilC-Defekts mit gereinigtem, extrazellulär zugesetztem PilC-Protein (RUDEL *et al.* 1995). Die Hypothese einer Assemblierung zu einer stabilen Pilusstruktur erst an der äußeren Membran wird weiterhin durch die Beobachtung erhärtet, daß sich Typ-IV-Pili sensitiv gegenüber Scherkräften verhalten, wobei die Bruchstelle direkt an der Zelloberfläche liegt (HENRICHSEN 1975). Die essentielle Funktion der äußeren Zellmembran wird bei der Betrachtung Gram-positiver Organismen deutlich, da diese Gruppe von Bakterien keine Typ-IV-Pili ausbildet, was vermutlich auf das Fehlen der äußeren Membran zurückzuführen ist. Die Typ-IV-Pilin-ähnlichen Proteine des natürlich kompetenten Gram-positiven *Bacillus subtilis* wurden im Cytoplasma und Periplasma detektiert, wobei auch hier keine stabile Pseudopilusstruktur nachgewiesen werden konnte. Die Ähnlichkeit der Transformationssysteme beider Gram-Typen läßt die Vermutung zu, daß auch bei natürlich kompetenten Gram-positiven Bakterien ein Triton X-100-labiler Komplex – aufgebaut aus Typ-IV-Pilin-ähnlichen Komponenten – existiert, wie er bei *Xanthomonas campestris* und *Acinetobacter* sp. BD413 detektiert wurde. Eine stabile Assoziation von Pilin-ähnlichen Proteinen, wie dies für ComP als Bestandteil eines 240 kDa-Komplexes gezeigt werden konnte, scheint dagegen an die Anwesenheit einer äußeren Membran gebunden zu sein.

Wenn die Synthese des aus PilQ-Untereinheiten aufgebauten Sekretins in der äußeren Membran, wodurch der Pilus tritt, fehlt, und die Retraktion des Pilus aufgrund eines PilT-Defektes inhibiert ist, so synthetisiert *Neisseria gonorrhoeae* Typ-IV-Pili in den periplasmatischen Raum (WOLFGANG *et al.* 2000). Demgegenüber werden bei Anwesenheit von PilT in der *pilQ*-Mutante die Piline sofort abgebaut, so daß keine Pilusstruktur erscheint. Dies verdeutlicht, daß PilT bei *Neisseria* für die Deassemblierung und nachfolgende Protolyse und möglicherweise für die labile Assoziation der Piline im Periplasma verantwortlich ist.

Während bei *Acinetobacter* sp. BD413 nach der Solubilisierung von Zellmembranen mit einem milden Detergenz nur das stabile 240 kDa ComP-Homomultimer nachzuweisen ist, welches möglicherweise den exponierten Teil des DNA-Aufnahmeapparates an der äußeren Membran darstellt und mit den stabilisierenden Faktoren ComC und ComQ in Kontakt steht, könnte der mit dem Deassemblierungsfaktor (ComT, bei *Acinetobacter* noch nicht identifiziert) assoziierte und somit labile basale (Pseudo-) Pilusbereich des Periplasmas nur in Abwesenheit von milden Detergenzien dargestellt werden. Das Vorliegen einer stabilen (Pseudo-) Pilusstruktur bereits im Periplasma bei einem gemeinsamen Pil(Com)T- und Pil(Com)Q-Defekt - wie es für *Neisseria gonorrhoeae* gezeigt wurde (WOLFGANG *et al.* 2000) -, muß demzufolge auf das Fehlen

destabilisierender Komponenten zurückgeführt werden, die stabilisierende Faktoren in der äußeren Membran entbehrlich machen. Das Zusammenspiel zwischen den genannten stabilisierenden und destabilisierenden Faktoren zeigte sich weiterhin in einem *Neisseria gonorrhoeae*-Stamm, in dem neben PilT auch PilC defekt sind. Obwohl eine Mutation allein in *pilC* die Pilusbildung inhibierte, führte ein zusätzlicher Defekt in PilT zu einer Regeneration der Pilusbiogenese (WOLFGANG *et al.* 1998). Wie erwartet, erwiesen sich diese Pili hinsichtlich der Vermittlung der DNA-Aufnahme und 'Twitching Motility' als funktionslos, da vermutlich die PilT-vermittelte Retraktion über eine Destabilisierung der Pilusstruktur entfiel.

Für die Assemblierung der Pilin-ähnlichen Proteine im DNA-Aufnahmeapparat von *Acinetobacter* sp. BD413 kann zusammenfassend ein folgender Mechanismus postuliert werden: Die Pilin-ähnlichen Proteine ComB, -E und ComF sind im Periplasma locker assoziiert und ermöglichen ComP den Durchtritt durch die Peptidoglycanschicht in Form von Monomeren oder in labiler Assoziation. An der äußeren Membran erfolgt seine Assemblierung zu einer kurzen Pilusstruktur (240 kDa-Komplex), welche die äußere Membran und die Lipopolysaccharidschicht durchspannt. Kalkuliert man 12 ComP-Monomere, die den 240 kDa-Komplex aufbauen, so müßte die Länge des potentiellen Pseudopilus eine Höhe von 8 bis maximal 10 nm einnehmen, was die Durchquerung der äußeren Membran und möglicherweise die der Lipopolysaccharidschicht erlaubt.

4.2.4 ComEA vermittelt die Bindung der DNA auf der Zelloberfläche

Das Kompetenzprotein ComEA aus *Acinetobacter* sp. BD413 konnte über Ähnlichkeitsvergleiche mit bereits untersuchten DNA-bindenden Proteinen anderer natürlich kompetenter Organismen identifiziert werden (3.3.1). Dieses Protein stellt eine essentielle Komponente des DNA-Aufnahmesystems in BD413 dar, da die Unterbrechung des Gens *comEA* zu einem vollständigen Transformationsdefekt führte (3.3.3). Während das Protein bei den Gram-negativen Organismen *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* und *Acinetobacter* sp. BD413 ausschließlich aus den charakteristischen für die DNA-Bindung essentiellen 'Helix-turn-Helix'-Motiven aufgebaut ist (CHEN & GOTSCHLICH 2001), weist ComEA bei Gram-positiven Organismen (*Bacillus subtilis*) zusätzlich eine N-terminale hydrophobe Domäne auf (PROVVEDI & DUBNAU 1999). Für ComEA aus *Bacillus subtilis* konnte gezeigt werden, daß dieser N-Terminus die Verankerung des Proteins in der Cytoplasmamembran vermittelt, die basische DNA-bindende Domäne dagegen die Bindung der DNA auf der Zelloberfläche und den anschließenden Transport in den DNase-resistenten Zustand erlaubt (PROVVEDI & DUBNAU 1999). Hierfür sind neben ComEA die Pilin-ähnlichen Kompetenzproteine ComGC, -GD, -GE und ComGG erforderlich, die sowohl in der cytoplasmatischen Membran als auch in

der Peptidoglycanschicht lokalisiert sind. Vermutlich vermitteln die Pilin-ähnlichen Proteine den Transport des C-Terminus von ComEA durch die Peptidoglycanschicht (CHUNG & DUBNAU 1998, PROVVEDI & DUBNAU 1999). Diese Hypothese, daß die Pilin-ähnlichen Proteine jenseits der Cytoplasmamembran agieren, stimmt mit den Untersuchungen überein, die demonstrierten, daß nach der enzymatischen Lyse des Peptidoglycangerüsts von *Bacillus subtilis* die Pilin-ähnlichen Proteine nicht für die Transformation erforderlich sind (CHUNG *et al.* 1998). Die freie DNA kann nach Protoplastierung direkt von dem in der inneren Membran verankerten ComEA-Protein gebunden werden. Eine direkte Bindung von ComEA oder der DNA mit den Pilin-ähnlichen Proteinen konnte bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Hier scheint somit eine sehr labile Assoziation vorzuliegen, wie diese ebenso zwischen Exoprotein und Pilin-ähnliche Proteine des Typ-II-Sekretionssystems postuliert wird (RUSSEL 1998, POSSOT *et al.* 2000). Im Sekretionssystem stellen die Pilin-ähnlichen Proteine essentielle Komponenten für den Transport der Exoproteine durch den periplasmatischen Raum und die äußere Membran dar. Der Transport von Exoproteinen erfordert keine nachweisbare Bindung mit den Pilin-ähnlichen Proteine. Aufgrund der Verschiedenartigkeit der transportierten Proteine über dasselbe Typ-II-Sekretionssystem eines Bakteriums konnte bisher keine Signalstruktur oder Erkennungsdomäne identifiziert werden, welche die Spezifikation als zu exportierendes Protein erlaubt. Beispielsweise werden in *Pseudomonas aeruginosa* die Enzyme, wie eine Lipase, Elastase, alkalische Phosphatase und das ADP-ribosylierende Toxin A, über denselben Sekretionsweg transportiert (LAZDUNSKI *et al.* 1990). Für das Exoprotein PelB aus *Erwinia chrysanthemi* konnte jedoch eine Bindung mit dem äußeren Membranprotein OutD, welches das Sekretin bildet, nachgewiesen werden (SHEVCHIK *et al.* 1997). Diese Bindung erfolgt am N-Terminus von OutD, der den variablen, ins Periplasma ragenden Teil dieser Proteinfamilie darstellt und somit für die spezifische Proteinerkennung erforderlich ist. Dies läßt vermuten, daß die Spezifikation nicht durch die Pilin-ähnlichen Proteine sondern durch andere Faktoren, wie z. B. das Sekretin, vermittelt wird.

Die zu transportierenden Proteine werden über das Sec-System durch die Cytoplasmamembran geleitet, wobei das Signalpeptid entfernt wird. Mit der Freisetzung ins Periplasma erfolgt daraufhin die Passage der Peptidoglycanschicht und die äußere Membran, an der die Pilin-ähnlichen Proteine beteiligt sind. Für ComEA wäre ein zu den Exoproteinen ähnlicher Transport denkbar, da das Protein eine Signalsequenz besitzt und an der äußeren Membran agieren muß. In Anlehnung an das Typ-II-Sekretionssystem wäre wahrscheinlich, daß ComEA durch die variable, ins Periplasma ragende Domäne des ComQ-Proteins erkannt und gebunden wird und mittels ComP an die Zelloberfläche gelangt. Während aber die Exoproteine ins Medium entlassen werden oder assoziiert an der Zelloberfläche wirken, ist für das Transformationssystem anzunehmen, daß die DNA-

bindenden Proteine - assoziiert mit doppelsträngiger DNA - zurück in den periplasmatischen Raum gelangen. Es wäre weiterhin vorstellbar, daß ComEA, nach der Bindung an DNA und durch gezielte nukleolytische Fragmentierung der DNA durch eine in BD413 noch nicht identifizierte Nuklease, in diesem Zustand eine Assoziation zu den Pilin-ähnlichen Proteinen eingeht und daraufhin durch Deassemblierung der Pilin-ähnlichen Proteine durch das ComQ-Sekretin und daraufhin durch die Peptidoglycanschicht an die Cytoplasmamembran gelangt. Diese Hypothese würde mit den Untersuchungen an *Bacillus subtilis* übereinstimmen, die demonstrieren, daß eine effektive DNA-Aufnahme nur nach gezielter Nuklease-Aktivität durch NucA auf der Zelloberfläche erfolgt (PROVVEDI *et al.* 2001). Dieses dadurch generierte DNA-Ende - gebunden an ComEA - könnte somit die gezielte Bindung an Pilin-ähnliche Proteine vermitteln.

Daß das Pilin-ähnliche Protein ComP aus *Acinetobacter* sp. BD413 indirekt an der Bindung von DNA auf der Zelloberfläche beteiligt ist, belegten Studien mit der Mutante T206, in der *comP* unterbrochen ist. Diese Mutante zeigte neben dem Defekt in der natürlichen Transformation eine beeinträchtigte Bindung der DNA auf der Zelloberfläche (PORSTENDÖRFER *et al.* 1997). Dies läßt sich vermutlich darauf zurückführen, daß ComP eine essentielle Funktion bei der Exposition von ComEA ausübt. Die unveränderte Lokalisation von ComEA in der Mutante T206 (3.4.5) ist damit zu erklären, daß zunächst die Pilin-ähnlichen Proteine ComB, -E und ComF den Transport durch den periplasmatischen Raum vermitteln, so daß das DNA-bindende Protein bis zur äußeren Membran gelangt und eventuell an der ins Periplasma ragenden Domäne von ComQ bindet. Aufgrund der der äußeren Membran aufliegenden Lipopolysaccharide läßt dies die Vermutung zu, daß erst eine ComP-abhängige Exposition von ComEA die effektive DNA-Bindung und daraufhin den Import vermittelt.

In Übereinstimmung mit dem Typ-IV-Pilusbiogenesensystem kann vermutet werden, daß der ComP-haltige Komplex durch ComC stabilisiert wird und durch ein PilT-homologes Protein (ComT) eine Retraktion erfährt, so daß ComEA mit der gebundenen DNA ins Periplasma gelangt.

4.2.5 Das DNA-Aufnahmesystem in *Acinetobacter* sp. BD413

Die aus den Untersuchungen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und durch die Interpretation der Ergebnisse in Bezug zu vorangegangenen Studien läßt sich für den DNA-Aufnahmeapparat von *Acinetobacter* sp. BD413 ein folgendes Model postulieren (Abb. 4.1):

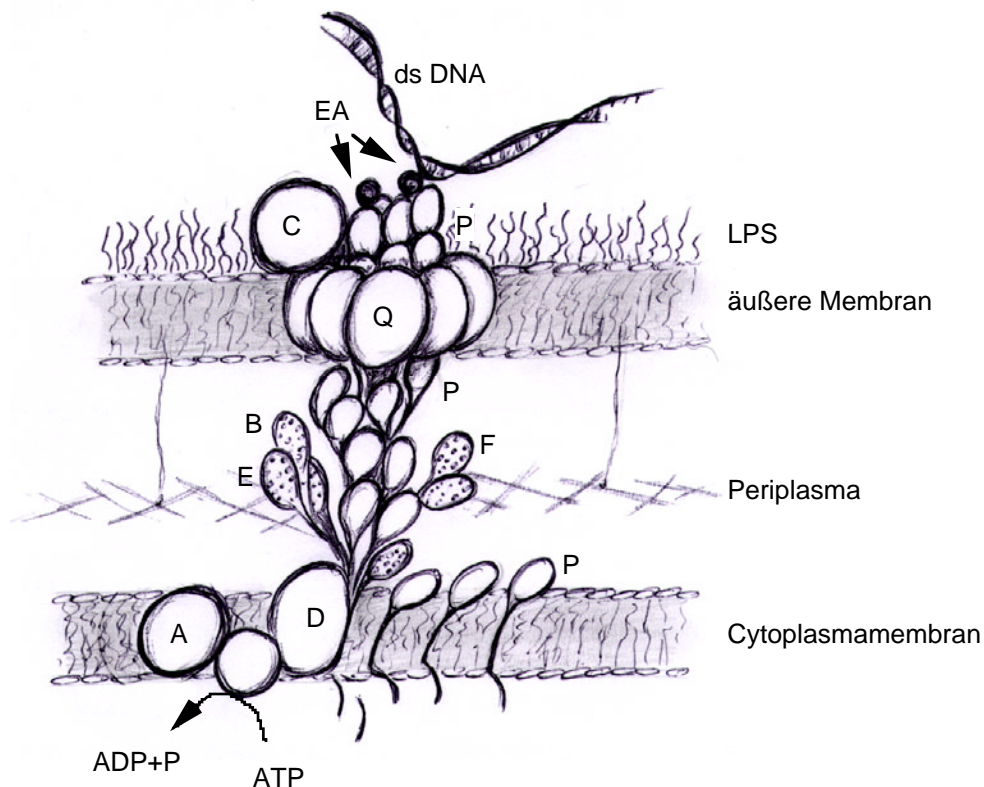


Abb. 4.1: Assemblierung des DNA-Aufnahmesystems in *Acinetobacter sp. BD413*.

Die Pilin-ähnlichen Proteine ComB, -E, -F und ComP werden durch die Präpilinpeptidase ComD an der Cytoplasmamembran prozessiert und ins Periplasma entlassen. Während ComB, -E und ComF als Assemblierungsfaktoren im Periplasma wirken, wird ComP am Sekretin ComQ mit Hilfe des Assemblierungsproteins ComC an der äußeren Membran zu einer kurzen stabilen Pilusstruktur assembliert. Hierdurch werden an der Spitze dieser Struktur die DNA-bindenden ComEA-Proteine exponiert. Über die nachfolgende Deassemblierung von ComP gelangt die gebundene DNA in den periplasmatischen Raum bis zur Cytoplasmamembran. Die mit Punkten versehene, oval dargestellten Pilin-ähnlichen Proteine, deren fädige Struktur den hydrophoben N-Terminus symbolisiert, stellen ComB, -E und ComF dar. Die äquivalenten, nicht ausgefüllt dargestellten Komponenten symbolisieren ComP-Monomere.

Die Pilin-ähnlichen Proteine ComB, -E, -F und ComP werden zunächst durch die Präpilinpeptidase ComD (AVERHOFF pers. Mitteilung) an der Cytoplasmamembran prozessiert. Während ComB, -E und ComF sowie zunächst auch ComP in der inneren Membran und im Periplasma labil assoziiert agieren, erfolgt eine Assemblierung von ComP an dem aus ComQ-Untereinheiten aufgebauten Sekretin zu einer kurzen stabilen Pilusstruktur, die ca. 240 kDa aufweist, an der äußeren Membran. Der ebenso an der äußeren Membran oder an der Spitze des ComP-Pseudopilus lokalisierte Assemblierungsfaktor ComC dient der Stabilisierung dieser Struktur. In dieser Form dient ComP der Exposition des DNA-bindenden Proteins ComEA, was dazu führt, daß negative elektrostatische Wechselwirkungen mit der Lipopolysaccharidschicht und die mechanische Barriere der Zellhülle überwunden werden und die DNA somit auf der Zelloberfläche

gebunden werden kann. Nach endonukleolytischer Spaltung der gebundenen DNA nahe am ComEA-Protein erfolgt durch die Retraktion des ComP-Komplexes der Transport mit Hilfe der Pilin-ähnlichen Proteine durch das Periplasma. An der Cytoplasmamembran wird ein Strang der DNA hydrolysiert und der komplementäre Strang in einem ComA-abhängigen Prozeß ins Cytoplasma transportiert.

4.3 Ausblick

Im Vordergrund weiterer Arbeiten sollte die Untersuchung des Mechanismus der DNA-Aufnahme in *Acinetobacter* sp. BD413 stehen, indem das Zusammenspiel der Kompetenzproteine durch Interaktionsstudien weiter analysiert wird. Da sich das DNA-bindende Protein ComEA erst nach erhöhter Expression mittels Antikörper detektieren ließ, so ist es naheliegend, daß auch die bisher in Zellysaten nicht zu detektierenden Proteine ComA, -B, -C, -E und ComF erst nach Klonierung der jeweiligen Genen hinter den stärkeren *comP*-Promotor markieren lassen. Dadurch bieten sich gute Aussichten mit den bereits generierten Antikörpern über Lokalisations- und Proteininteraktionsstudien die Funktionen der Kompetenzfaktoren aufzuklären. Wichtig erscheint hier nicht nur die Untersuchungen diesbezüglich im Wildtypstamm, sondern auch in den bisher generierten transformationsdefekten Stämmen. Durch Proteinlokalisationen in den Mutanten, die von denjenigen des Wildtypstamms abweichen, lassen sich indirekt Aussagen über interagierende Komponenten treffen.

Während Proteinwechselwirkungen über die schonende Solubilisierung der Kompetenzproteine aus den Zellmembranen verfolgt werden sollte, bieten auch molekularbiologische Techniken durch Klonierung kurzer, C-terminaler Adaptorproteine ('His-Tag' oder 'Strep-Tag'), die eine schonende Aufreinigung von Proteinen erlauben, eine weitere Möglichkeit assoziierte Faktoren nachzuweisen. Dies bietet weiterhin die Möglichkeit, neue, bisher nicht beschriebene Kompetenzproteine zu identifizieren.

Während sich die bisherigen Untersuchungen bei *Acinetobacter* vor allem mit der Bindung der DNA auf der Zelloberfläche und mit dem Transport durch die äußere Membran und das Periplasma beschäftigten, erlaubt die Charakterisierung des vermutlich in der Cytoplasmamembran lokalisierten Kompetenzproteins ComA die Möglichkeit, den Import durch die innere Membran zu verfolgen. Es wurde postuliert, daß ComA eine kanalartige Struktur ausbildet, welche eine Schleuse für den DNA-Import schafft. Da nur ein Einzelstrang ins Cytoplasma gelangt, muß hierbei eine Nuklease beteiligt sein, die den komplementären Strang hydrolysiert und deren Charakterisierung noch aussteht. Die Kopplung von Einzelstranghydrolyse und DNA-Aufnahme durch die Cytoplasmamembran macht die Interaktion beider Komponenten wahrscheinlich.

Interessante Ergebnisse versprechen darüber hinaus physiologische Studien der DNA-Bindung und -Aufnahme. So stellt sich beispielsweise die Frage, ob in Übereinstimmung mit dem Gram-positiven Organismus *Bacillus subtilis* auch bei *Acinetobacter* nach der enzymatischen Lyse der Peptidoglycanschicht die Pilin-ähnlichen Proteine für die DNA-Aufnahme entbehrlich sind. Sind daraufhin Proteoplasten in der Lage DNA zu binden und aufzunehmen? Als Positivkontrolle eines Transformationstests müßte hierbei der Wildtyp BD413 bzw. ADP239 und als Negativkontrolle die *comA*-Mutante T701 fungieren. Die unterschiedliche Verankerung des DNA-bindenden Proteins ComEA bei Gram-positiven und -negativen Bakterien, zum einen mit der Cytoplasmamembran und zum anderen mit der äußeren Membran, läßt eventuell auf einen voneinander abweichenden DNA-Aufnahmeprozess schließen.

Während die Induktion der natürlichen Transformation mit der Synthese der Kompetenzproteine eingeleitet wird und daraufhin maximale Transformationsraten erzielt werden, erfolgen diese Prozesse bei *Acinetobacter* sp. BD413 bei unterschiedlichen Milieubedingungen. Die Kompetenzproteine werden zunächst in der stationären Wachstumsphase gebildet, damit das Bakterium nach dem Überimpfen in frisches Medium maximale Transformationsraten erzielen kann. Da die Messung der Transformationsraten nur die erfolgreiche homologe Rekombination der aufgenommenen DNA ins Genom widerspiegeln, ist dies kein direktes Maß für die Bindung und Aufnahme der DNA, die als von der homologen Rekombination getrennte Prozesse angesehen werden können. Somit stellt sich bei *Acinetobacter* die Frage, ob die DNA erst unter den physiologischen Bedingungen der lag-Phase aufgenommen wird oder bereits in der stationären Phase, in der die Synthese der Kompetenzproteine am höchsten ist. Da in der stationären Phase eine Limitierung der Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen herrscht, ist es denkbar, daß die aufgenommene DNA als Energiequelle genutzt wird bevor eine homologe Rekombination erfolgen kann. Durch Untersuchung des Verbleibs der Atome der eventuell aufgenommenen DNA in der stationären Wachstumsphase könnten diese verschiedene Nutzung der DNA analysiert werden.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Pilusstrukturen von *Acinetobacter* sp. BD413 bieten Anknüpfungspunkte für weiterführende Arbeiten. Der neue Pilustyp des Bakteriums weist eine unter den filamentösen Strukturen einzigartige Flexibilität auf, was eine genauere Betrachtung der Untereinheitenstruktur interessant macht. Über Röntgenstrukturanalysen könnten die Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten identifiziert werden, die einerseits die Stabilität und andererseits die hohe Flexibilität verleihen. Die Untersuchung der fünf Biosynthesegene, die sich zusammen mit dem

Strukturgen *filA* in einem Biosynthese-Cluster befinden, eröffnet die Charakterisierung eines neuen Biogenesewegs von Pilusstrukturen. Bisher sind mit der Flagellum-, der Typ-IV- und Typ-I-Pilusbiogenese erst drei Synthesewege von filamentösen Strukturen beschrieben, was die Analyse weiterer Biogenesemechanismen fordert.

Durch die Identifizierung der Pilusgene und nach Mutantenstudien stellte sich heraus, daß *Acinetobacter* sp. BD413 keine Typ-IV-Pili synthetisiert und sich Pilus-unabhängig gleitend fortbewegt. Der Vergleich zu bereits charakterisierten Bewegungsarten von Bakteien lieferte keine Übereinstimmung. Dieses Ergebnis läßt die Vermutung zu, daß es sich beim Gleiten von *Acinetobacter* sp. BD413 um einen unbekanntem Mechanismus handelt, dessen Charakterisierung noch aussteht. Durch Mutagenisierungen des Genoms ließen sich über generierte Mutanten, die Defekte in der gleitenden Fortbewegung aufweisen, spezifische Gene identifizieren. Da das Genom vom Stamm BD413 vollständig sequenziert vorliegt, ist ein anderer Weg die Betrachtung interessanter ORFs, die möglicherweise in die gleitende Fortbewegung involviert sind.

5. Zusammenfassung

1. *Acinetobacter* sp. BD413 synthetisiert flexible dicke (6 nm im Durchmesser) und starre, bündelbildende dünne (2-3 nm im Durchmesser) Pilusstrukturen. Beide Pilustypen wurden isoliert und ihre strukturellen Untereinheiten gereinigt. Die Sequenzierung der N-Termini der Pilusuntereinheiten ermöglichte die Klonierung der Gene mittels PCR.
2. Die Analyse des Gens *fila* der Untereinheit des dicken Pilus ergab keine Verwandtschaft zu bisher bekannten strukturellen Proteinen. Die Charakterisierung des Gens der Untereinheit des dünnen Pilus führte zu dem Ergebnis, daß dieser Pilustyp der Familie der Typ-I-Pili zuzuordnen ist.
3. Die dünnen Pili vermitteln die Adsorption an hydrophobe Oberflächen und vermögen Erythrocyten zu agglutinieren, eine Eigenschaft, die charakteristisch für Typ-I-Pili ist. Das Strukturgen *fimA* bildet das erste Gen eines aus insgesamt vier Genen aufgebauten Gencluster, dessen weitere drei Produkte Ähnlichkeiten zu periplasmatischen Chaperonen, äußeren Membranproteinen sowie zu Adhäsinen zeigen. Die FimA-Untereinheiten sind in linearer Form angeordnet, dessen resultierendes Filament einen Durchmesser von 2-3 nm bildet und aufgrund seiner Hydrophobizität untereinander aggregieren, so daß Pilusbündel entstehen. Die FimA-Untereinheiten des flexiblen dicken Pilus bilden eine helikale Struktur aus, wobei die Steighöhe der Helix von 4-5 nm bis hin zu 10 nm variiert.
4. Die Strukturgene der beiden Pilustypen von BD413 werden transkriptional reguliert, wobei das Minimum beim exponentiellen Wachstum und das Maximum in der stationären Phase erreicht wird.
5. Nach der Unterbrechung der Gene *fila* und *fimA*, die für die Untereinheit des dicken bzw. des dünnen Pilus codieren, ergaben Mutantenstudien, daß keiner der beiden Filamenttypen an der natürlichen Transformation beteiligt ist. Ebenso sind die Pili nicht essentiell für die gleitende Bewegung der Bakterien auf festen Oberflächen.

6. Das Genom von *Acinetobacter* sp. BD413 codiert für eine PHB-Synthase (PhaC). Die Unterbrechung dieses Gens führte zu einer Mutante, die keine PHB-Granula synthetisiert. Durch einen Transformationstest konnte gezeigt werden, daß PHB kein essentieller Bestandteil des DNA-Aufnahmeapparates ist.
7. Die Überexpression des Typ-IV-Pilin-ähnlichen Kompetenzproteins ComP in *Acinetobacter* sp. BD413 führt zur Synthese einer Pilusstruktur, die den Typ-IV-Pili ähnelt.
8. Das Pilin-ähnliche Kompetenzprotein ComP liegt in den Zellmembranen als ein durch milde Detergenzien solubilisierbares 240 kDa-Homomultimer vor, der somit einen Subkomplex des DNA-Aufnahmeapparates darstellt.
9. Das Kompetenzprotein ComEA, welches im prozessierten Zustand eine molekulare Masse von 7,6 kDa aufweist und für die natürliche Transformation von *Acinetobacter* sp. BD413 eine essentielle Komponente darstellt, ist in der äußeren Zellmembran lokalisiert und vermittelt dort die Bindung von doppelsträngiger DNA. Die DNA-Bindung erfolgt dabei unabhängig von der Basensequenz.
10. Hinsichtlich der Regulation auf Ebene der Transkription verhält sich *comEA* identisch zu den bereits untersuchten Kompetenzproteinen in *Acinetobacter* sp. BD413: In der stationären Wachstumsphase erreicht die Transkriptionsrate ihr Maximum, fällt nach dem Überimpfen in frisches Medium auf ein Minimum, um am Ende des exponentiellen Wachstums wieder anzusteigen. Mittels generiertem Anti-ComEA-Antiserum konnte das native ComEA in BD413 erst nach der erhöhten Expression durch den *comP*-Promotor detektiert werden, was auf einen sehr geringen ComEA-Gehalt in der Zelle hinweist.

6. Literatur

- ABBANAT DR, GODCHAUX W 3RD, POLYCHRONIOU G, LEADBETTER ER.** Biosynthesis of a sulfonolipid in gliding bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985 Jul 31;130(2):873-878
- AGARWAL S, HUNNICUTT DW, MCBRIDE MJ.** Cloning and characterization of the *Flavobacterium johnsoniae* (*Cytophaga johnsoniae*) gliding motility gene, *gldA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997 Oct 28;94(22):12139-12144
- ALLOING G, MARTIN B, GRANADEL C, CLAVERYS JP.** Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease. *Mol. Microbiol.* 1998 29:75-83
- ALM RA, HALLINAN JP, WATSON AA, MATTICK JS.** Fimbrial biogenesis genes of *Pseudomonas aeruginosa*: *pilW* and *pilX* increase the similarity of type 4 fimbriae to the GSP protein-secretion systems and *pilYI* encodes a gonococcal PilC homologue. *Mol. Microbiol.* 1996 Oct;22(1):161-173
- ANDERSON AJ, DAWES EA.** Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 1990 Dec;54(4):450-472.
- AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMANN JG, SMITH JA, STRUHL K.** Current protocols in molecular biology. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons, Inc. 1993, New York.
- BACHMANN BJ.** Linkage map of *Escherichia coli* K12. Edition 8. *Microbiol. Rev.* 1990 54:130-197
- BEACHEY EH, GIAMPAPA CS, ABRAHAM SN.** Bacterial adherence. Adhesin receptor-mediated attachment of pathogenic bacteria to mucosal surfaces. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988 Dec;138(6 Pt 2):S45-48
- BEHN W, ARNOLD CG.** Die Wirkung von Streptomycin und Neamin auf die Chloroplasten- und Mitochondrienstruktur von *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplasma* 1974 82:77-89

- BELSKY I, GUTNICK DL, ROSENBERG E.** Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: determination of emulsifier-bound fatty acids. *FEBS Letters* 1979 101:175-178
- BISWAS GD, SOX T, BLACKMAN E, SPARLING PF.** Factors affecting genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 1977 Feb;129(2):983-992
- BLUM HB, GROSS HJ.** Improved silver staining method of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987 8:93-99
- BORTOLUSSI R, FERRIERI P, QUIE PG.** Influence of growth temperature of *Escherichia coli* on K1 capsular antigen production and resistance to opsonization. *Infect. Immun.* 1983 Mar;39(3):1136-1141
- BOUCHE JP.** The effect of spermidine on endonuclease inhibition by agarose contaminants. *Anal. Biochem.* 1981 Jul 15;115(1):42-45
- BRADFORD MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976 72:248-254
- BRADLEY DE.** A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can. J. Microbiol.* 1980 Feb;26(2):146-154
- BRUBAKER RR.** Factors promoting acute and chronic diseases caused by *Yersinia*. *Clin. Microbiol Rev.* 1991 Jul;4(3):309-324
- BUSCH S, ROSENPLANTER C, AVERHOFF B.** Identification and characterization of ComE and ComF, two novel pilin-like competence factors involved in natural transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999 Oct;65(10):4568-4574
- CAMPBELL EA, CHOI SY, MASURE HR.** A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Mol. Microbiol.* 1998 27:929-939
- CHANDLER MS.** The gene encoding cyclic AMP receptor protein is required for competence development in *Haemophilus influenzae* Rd. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992 89:1626-1630

- CHEN I, GOTSCHLICH EC.** ComE, a competence protein from *Neisseriagonorrhoeae* with DNA-binding activity. *J. Bacteriol.* 2001 183(10):3160-3168
- CHUNG YS, BREIDT F, DUBNAU D.** Cell surface localization and processing of the ComG proteins, required for DNA binding during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 1998 Aug;29(3):905-913
- CHUNG YS, DUBNAU D.** All seven *comG* open reading frames are required for DNA binding during transformation of competent *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 1998 Jan;180(1):41-5
- CLIFTON SW, MCCARTHY D, ROE BA.** Sequence of the *rec-2* locus of *Haemophilus influenzae*: homologies to *comE*-ORF3 of *Bacillus subtilis* and *msbA* of *Escherichia coli*. *Gene.* 1994 Aug 19;146(1):95-100
- CLOS J, BRANDAU S.** pJC20 and pJC40--two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 1994 Apr;5(2):133-137
- CORNIBERT J, MARCHESSAULT RH.** Physical properties of poly- β -hydroxybutyrate. IV. Conformational analysis and crystalline structure. *J. Mol. Biol.* 1972 Nov 28;71(3):735-756
- DAWES EA, SENIOR PJ.** The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 1973;10:135-266
- DE GRAAF FK, KLAASEN-BOOR P, VAN HEES JE.** Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanine. *Infect. Immun.* 1980 Oct;30(1):125-128
- DE GRAAF FK.** Genetics of adhesive fimbriae of intestinal *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1990;151:29-53
- DE WEGER LA, VAN DER VLUGT CI, WIJFJES AH, BAKKER PA, SCHIPPERS B, LUGTENBERG B.** Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.* 1987 Jun;169(6):2769-2773

- DEICH RA, SMITH HO.** Mechanism of homospecific DNA uptake in *Haemophilus influenzae* transformation. *Mol Gen Genet.* 1980 Feb;177(3):369-374
- DEWANTI R, WONG AC.** Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food. Microbiol.* 1995 Jul;26(2):147-164
- DOIG P, TODD T, SASTRY PA, LEE KK, HODGES RS, PARANCHYCH W, IRVIN RT.** Role of pili in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.* 1988 Jun;56(6):1641-1646
- DOUGHERTY BA, SMITH HO.** Identification of *Haemophilus influenzae* Rd transformation genes using cassette mutagenesis. *Microbiology.* 1999 Feb;145 (Pt 2):401-409
- DRAKE SL, SANDSTEDT SA, KOOMEY M.** PilP, a pilus biogenesis lipoprotein in *Neisseria gonorrhoeae*, affects expression of PilQ as a high-molecular-mass multimer. *Mol. Microbiol.* 1997 Feb;23(4):657-668
- DUBNAU D, CIRIGLIANO C.** Fate of transforming deoxyribonucleic acid after uptake by competent *Bacillus subtilis*: nonrequirement of deoxyribonucleic acid replication for uptake and integration of transforming deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 1973 Mar;113(3):1512-1514
- DUBNAU D, CIRIGLIANO C.** Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. VI. Non-covalent association of donor and recipient DNA. *Mol. Gen. Genet.* 1973 Jan 24;120(2):101-106
- DUBNAU D, DAVIDOFF-ABELSON R, SCHER B, CIRIGLIANO C.** Fate of transforming deoxyribonucleic acid after uptake by competent *Bacillus subtilis*: phenotypic characterization of radiation-sensitive recombination-deficient mutants. *J. Bacteriol.* 1973 Apr;114(1):273-286
- DUBNAU D.** Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 1991 Sep;55(3):395-424
- DUBNAU D.** The regulation of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 1991 Jan;5(1):11-18

- ECHENIQUE JR, CHAPUY-REGAUD S, TROMBE M-C.** Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: involvement of *ciaRH* and *comCDE*. Mol. Microbiol. 2000 36(3):688-696
- ECHENIQUE JR, CHAPUY-REGAUD S, TROMBE MC.** Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: involvement of *ciaRH* and *comCDE*. Mol. Microbiol. 2000 May;36(3):688-696
- EDMAN P, BEGG G.** A protein sequenator. Eur. J. Biochem. 1967 Mar;1(1):80-91
- FACIUS D, FUSSENEGGER M, MEYER TF.** Sequential action of factors involved in natural competence for transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. FEMS Microbiol. Lett. 1996 Apr 1;137(2-3):159-164
- FACIUS D, MEYER TF.** A novel determinant (*comA*) essential for natural transformation competence in *Neisseria gonorrhoeae* and the effect of a *comA* defect on pilin variation. Mol. Microbiol. 1993 Nov;10(4):699-712
- FERNANDEZ LA, BERENQUER J.** Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 2000 Jan;24(1):21-44
- FILLOUX A, BALLY M, BALL G, AKRIM M, TOMMASSEN J, LAZDUNSKI A.** Protein secretion in gram-negative bacteria: transport across the outer membrane involves common mechanisms in different bacteria. EMBO J. 1990 Dec;9(13):4323-4329
- FILLOUX A, MICHEL G, BALLY M.** GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Rev. 1998 Sep;22(3):177-198
- FINKEL SE, KOLTER R.** DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. J. Bacteriol. 2001 Nov;183(21):6288-6293
- FOREST KT, TAINER JA.** Type-4 pilus-structure: outside to inside and top to bottom-a minireview. Gene. 1997 Jun 11;192(1):165-169
- FREESE A, REICHENBACH H, LUNSDORF H.** Further characterization and in situ localization of chain-like aggregates of the gliding bacteria *Myxococcus fulvus* and *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 1997 Feb;179(4):1246-1252.

- FRIEDRICH A, HARTSCH T, AVERHOFF B.** Natural transformation in mesophilic and thermophilic bacteria: identification and characterization of novel, closely related competence genes in *Acinetobacter* sp. strain BD413 and *Thermus thermophilus* HB27. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001 Jul;67(7):3140-3148
- GENEVAUX P, MULLER S, BAUDA P.** A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996 Aug 15;142(1):27-30
- GIAMMARINARO P, SICARD M, GASC AM.** Genetic and physiological studies of the CiaH-CiaR two-component signal-transducing system involved in cefotaxime resistance and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 1999 145:1859-1869
- GODCHAUX W 3RD, GORSKI L, LEADBETTER ER.** Outer membrane polysaccharide deficiency in two nongliding mutants of *Cytophaga johnsonae*. *J. Bacteriol.* 1990 Mar;172(3):1250-1255
- GOHL O.** Der DNA-Aufnahmeapparat in *Acinetobacter* sp. BD413: Identifizierung, Anreicherung und Untersuchung zur Membranverankerung. Diplomarbeit Georg-August-Universität Göttingen, 1999 unveröffentlicht
- GOODGAL SH.** DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Annu. Rev. Genet.* 1982;16:169-192
- GOODMAN SD, SCOCCA JJ.** Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988 Sep;85(18):6982-6986
- GORANSSON M, UHLIN BE.** Environmental temperature regulates transcription of a virulence pili operon in *E. coli*. *EMBO J.* 1984 Dec 1;3(12):2885-2888
- GREGG-JOLLY LA, ORNSTON LN.** Properties of *Acinetobacter calcoaceticus* *recA* and its contribution to intracellular gene conversion. *Mol. Microbiol.* 1994 Jun;12(6):985-992
- GRINIUS L.** Nucleic acid transport driven by ion gradient across cell membrane. *FEBS Lett.* 1980 Apr 21;113(1):1-10

- HACKER J, BENDER L, OTT M, WINGENDER J, LUND B, MARRE R, GOEBEL W.** Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathog.* 1990 Mar;8(3):213-225
- HACKER J, KAPER JB.** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000;54:641-679
- HAHN J, INAMINE G, KOZLOV Y, DUBNAU D.** Characterization of *comE*, a late competence operon of *Bacillus subtilis* required for the binding and uptake of transforming DNA. *Mol. Microbiol.* 1993 Oct;10(1):99-111
- HAHN J, KONG L, DUBNAU D.** The regulation of competence transcription factor synthesis constitutes a critical control point in the regulation of competence in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 1994 Sep;176(18):5753-5761
- HANAHAHAN D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 1983 Jun 5;166(4):557-580
- HANCOCK RE, NIKAIIDO H.** Outer membranes of gram-negative bacteria. XIX. Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and use in reconstitution and definition of the permeability barrier. *J. Bacteriol.* 1987 139:381-390
- HARTNETT GB, AVERHOFF B, ORNSTON LN.** Selection of *Acinetobacter calcoaceticus* mutants deficient in the *p*-hydroxybenzoate hydroxylase gene (*pobA*), a member of a supraoperonic cluster. *J Bacteriol.* 1990 Oct;172(10):6160-6161
- HAVARSTEIN LS, COOMARASWAMY G, MORRISON DA.** An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 Nov 21;92(24):11140-11144
- HENRICHSEN J, BLOM J.** Examination of fimbriation of some gram-negative rods with and without twitching and gliding motility. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. [B].* 1975 Jun;83(3):161-170
- HERRINGTON DA, HALL RH, LOSONSKY G, MEKALANOS JJ, TAYLOR RK, LEVINE MM.** Toxin, toxin-coregulated pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *J. Exp. Med.* 1988 Oct 1;168(4):1487-1492

- HERRIOTT RM, MEYER EM, VOGT M.** Defined nongrowth media for stage II development of competence in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* 1970 Feb;101(2):517-524
- HERZBERG C, FRIEDRICH A, AVERHOFF B.** *comB*, a novel competence gene required for natural transformation of *Acinetobacter* sp. BD413: identification, characterization, and analysis of growth-phase-dependent regulation. *Arch. Microbiol.* 2000 Mar;173(3):220-228
- HIDAKA Y, HASEGAWA M, NAKAHARA T, HOSHINO T.** The entire population of *Thermus thermophilus* cells is always competent at any growth phase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1994 Jul;58(7):1338-1339
- HOBBS M, MATTICK JS.** Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol. Microbiol.* 1993 Oct;10(2):233-243
- HOFREUTER D, HAAS R.** Natural transformation in *Helicobacter pylori*: DNA transport in an unexpected way. *Trends Microbiol.* 2002 Apr;10(4):162
- HOFREUTER D, ODENBREIT S, HAAS R.** Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 2001 Jul;41(2):379-391
- HOLMGREN A, KUEHN MJ, BRANDEN CI, HULTGREN SJ.** Conserved immunoglobulin-like features in a family of periplasmic pilus chaperones in bacteria. *EMBO J.* 1992 Apr;11(4):1617-1622
- HU NT, LEU WM, LEE MS, CHEN A, CHEN SC, SONG YL, CHEN LY.** XpsG, the major pseudopilin in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a pilus-like structure between cytoplasmic and outer membranes. *Biochem. J.* 2002 Jul 1;365(Pt 1):205-211
- HÜCK CJ.** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998 Jun;62(2):379-433

- HULL RA, GILL RE, HSU P, MINSHEW BH, FALKOW S.** Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect. Immun.* 1981 Sep;33(3):933-938
- HUNG DL, HULTGREN SJ.** Pilus biogenesis via the chaperone/usher pathway: an integration of structure and function. *J. Struct. Biol.* 1998 Dec 15;124(2-3):201-220
- HUNNICUTT DW, MCBRIDE MJ.** Cloning and characterization of the *Flavobacterium johnsoniae* gliding-motility genes *gldB* and *gldC*. *J. Bacteriol.* 2000 Feb;182(4):911-918
- INAMINE GS, DUBNAU D.** ComEA, a *Bacillus subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport. *J. Bacteriol.* 1995 Jun;177(11):3045-3051
- INOUE H, NOJIMA H, OKAYAMA H.** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 1990 Nov 30;96(1):23-28
- JENNINGS MP, VIRJI M, EVANS D, FOSTER V, SRIKHANTA YN, STEEGHS L, VAN DER LEY P, MOXON ER.** Identification of a novel gene involved in pilin glycosylation in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* 1998 Aug;29(4):975-984
- JONES CH, PINKNER JS, ROTH R, HEUSER J, NICHOLS AV, ABRAHAM SN, HULTGREN SJ.** FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995 Mar 14;92(6):2081-2085
- JONES CH, PINKNER JS, ROTH R.** FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92:20815
- JONES GW, RICHARDSON LA.** The attachment to, and invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: the contribution of mannose-sensitive and mannose-resistant haemagglutinating activities. *J. Gen. Microbiol.* 1981 Dec;127 (Pt 2):361-370
- JONSSON AB, NYBERG G, NORMARK S.** Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in *pilC*, a novel gene for pilus assembly. *EMBO J.* 1991 Feb;10(2):477-488

- JUNI E, JANIK A.** Transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* (*Bacterium anitratum*). J. Bacteriol. 1969 Apr;98(1):281-288
- JUNI E.** Genetics and physiology of *Acinetobacter*. Annu. Rev. Microbiol. 1978;32:349-371
- JUNI E.** Interspecies transformation of *Acinetobacter*: genetic evidence for a ubiquitous genus. J. Bacteriol. 1972 Nov;112(2):917-931
- KEEN NT, TAMAKI S, KOBAYASHI D, TROLLINGER D.** Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. Gene. 1988 Oct 15;70(1):191-197
- KEIZER DW, SLUPSKY CM, KALISIAK M, CAMPBELL AP, CRUMP MP, SASTRY PA, HAZES B, IRVIN RT, SYKES BD.** Structure of a pilin monomer from *Pseudomonas aeruginosa*: implications for the assembly of pili. J. Biol. Chem. 2001 Jun 29;276(26):24186-24193
- KEMPF MJ, MCBRIDE MJ.** Transposon insertions in the *Flavobacterium johnsoniae* *ftsX* gene disrupt gliding motility and cell division. J. Bacteriol. 2000 Mar;182(6):1671-1679
- KNIGHT SD, BERGLUND J, CHOUDHURY D.** Bacterial adhesins: structural studies reveal chaperone function and pilus biogenesis. Curr. Opin. Chem. Biol. 2000 Dec;4(6):653-660
- KUBORI T, MATSUSHIMA Y, NAKAMURA D, URALIL J, LARA-TEJERO M, SUKHAN A, GALAN JE.** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. Science. 1998 Apr 24;280(5363):602-605
- KÜHN MJ, OGG DJ, KIHLEBERG J, SLONIM LN, FLEMMER K, BERGFORS T, HULTGREN SJ.** Structural basis of pilus subunit recognition by the PapD chaperone. Science. 1993 Nov 19;262(5137):1234-1241
- KUSIAN B, BOWIEN B.** Operator binding of the CbbR protein, which activates the duplicate *cbb* CO₂ assimilation operons of *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. 1995 Nov;177(22):6568-6574

- LAEMMLI UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(259):680-685
- LAI EM, KADO CI.** The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends Microbiol.* 2000 Aug;8(8):361-369
- LAZDUNSKI A, GUZZO J, FILLOUX A, BALLY M, MURGIER M.** Secretion of extracellular proteins by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*. 1990 Feb-Mar;72(2-3):147-56
- LINK C, EICKERNJAGER S, PORSTENDÖRFER D, AVERHOFF B.** Identification and characterization of a novel competence gene, *comC*, required for DNA binding and uptake in *Acinetobacter* sp. strain BD413. *J. Bacteriol.* 1998 Mar;180(6):1592-1595
- LINK C.** Charakterisierung von Komponenten des natürlichen Transformationssystems in *Acinetobacter* sp. BD413. Diplomarbeit Georg-August-Universität Göttingen, 1997 unveröffentlicht
- LINTERMANS P, POHL P, DEBOECK F, BERTELS A, SCHLICKE C, VANDEKERCKHOVE J, VAN DAMME J, VAN MONTAGU M, DE GREVE H.** Isolation and nucleotide sequence of the F17-A gene encoding the structural protein of the F17 fimbriae in bovine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1988 Jun;56(6):1475-1484
- LIU H, KANG Y, GENIN S, SCHELL MA, DENNY TP.** Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology*. 2001 Dec;147(Pt 12):3215-3229
- LONG CD, HAYES SF, VAN PUTTEN JP, HARVEY HA, APICELLA MA, SEIFERT HS.** Modulation of gonococcal piliation by regulatable transcription of *pilE*. *J. Bacteriol.* 2001 Mar;183(5):1600-1609
- LOOMIS WP, MOSELEY SL.** Translational control of mRNA processing in the F1845 fimbrial operon of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1998 Nov;30(4):843-853
- LORENZ MG, REIPSCHLAGER K, WACKERNAGEL W.** Plasmid transformation of naturally competent *Acinetobacter calcoaceticus* in non-sterile soil extract and groundwater. *Arch. Microbiol.* 1992;157(4):355-360

- LORENZ MG, WACKERNAGEL W.** Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 1994 Sep;58(3):563-602
- LORY S.** Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: shared pathways of extracellular protein targeting. *Curr. Opin. Microbiol.* 1998 Feb;1(1):27-35
- LUND B, MARKLUND BI, STROMBERG N, LINDBERG F, KARLSSON KA, NORMARK S.** Uropathogenic *Escherichia coli* can express serologically identical pili of different receptor binding specificities. *Mol. Microbiol.* 1988 Mar;2(2):255-263
- LUNSDORF H, SCHAIRER HU.** Frozen motion of gliding bacteria outlines inherent features of the motility apparatus. *Microbiology.* 2001 Apr;147(Pt 4):939-947
- MACFADYEN LP, MA C, REDFIELD RJ.** A 3',5' cyclic AMP (cAMP) phosphodiesterase modulates cAMP levels and optimizes competence in *Haemophilus influenzae* Rd. *J. Bacteriol.* 1998 Sep;180(17):4401-4405
- MACFADYEN LP, MA C, REDFIELD RJ.** A 3', 5' cyclic AMP (cAMP) phosphodiesterase modulates cAMP levels and optimizes competence in *Haemophilus influenzae* Rd. *J. Bacteriol.* 1998 180:4401-4405
- MAGNUSON R, SOLOMON J, GROSSMAN AD.** Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *Bacillus subtilis*. *Cell.* 1994 Apr 22;77(2):207-216
- MARCEAU M, FOREST K, BERETTI JL, TAINER J, NASSIF X.** Consequences of the loss of O-linked glycosylation of meningococcal type IV pilin on piliation and pilus-mediated adhesion. *Mol. Microbiol.* 1998 Feb;27(4):705-715
- MARCEAU M, NASSIF X.** Role of glycosylation at Ser63 in production of soluble pilin in pathogenic *Neisseria*. *J. Bacteriol.* 1999 Jan;181(2):656-661
- MARCHESSAULT RH, MONASTERIOS CJ, MORIN FG, SUNDARARAJAN PR.** Chiral poly(beta-hydroxyalkanoates): an adaptable helix influenced by the alkane side-chain. *Int. J. Biol. Macromol.* 1990 Apr;12(2):158-165
- MARTOGLIO B, DOBBERSTEIN B.** Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell. Biol.* 1998 Oct;8(10):410-415

- MAURELLI AT, BLACKMON B, CURTISS R 3RD.** Temperature-dependent expression of virulence genes in *Shigella* species. *Infect. Immun.* 1984 Jan;43(1):195-201
- MCBRIDE MJ.** Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001;55:49-75
- MERZ AJ, SO M, SHEETZ MP.** Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature.* 2000 Sep 7;407(6800):98-102
- MESSING J, VIEIRA J.** A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. 1982. *Biotechnology.* 1992;24:202-209
- MILLER JH.** Assay of β -galactosidase. In: PLATT T, MILLER-HILL B, MILLER JH (Hrsg.): *Experiments in molecular genetics*, S. 319-353. 1972 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA
- MORAND PC, TATTEVIN P, EUGENE E, BERETTI JL, NASSIF X.** The adhesive property of the type IV pilus-associated component PilC1 of pathogenic *Neisseria* is supported by the conformational structure of the N-terminal part of the molecule. *Mol. Microbiol.* 2001 May;40(4):846-856
- NASSIF X, BERETTI JL, LOWY J, STENBERG P, O'GAORA P, PFEIFER J, NORMARK S, SO M.** Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseriameningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994 Apr 26;91(9):3769-3773
- NOWICKI B, SVANBORG-EDEN C, HULL R, HULL S.** Molecular analysis and epidemiology of the Dr hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1989 Feb;57(2):446-451
- ORNSTON LN, STANIER RY.** The conversion of catechol and protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 1966 Aug 25;241(16):3776-3786
- O'TOOLE G, KAPLAN HB, KOLTER R.** Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000;54:49-79
- OTT M, SCHMOLL T, GOEBEL W, VAN DIE I, HACKER J.** Comparison of the genetic determinant coding for the S-fimbrial adhesin (*sfa*) of *Escherichia coli* to other

- chromosomally encoded fimbrial determinants. *Infect. Immun.* 1987 Aug;55(8):1940-1943
- PAGE WJ, VON TIGERSTROM M.** Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. *Can. J. Microbiol.* 1978 Dec;24(12):1590-1594
- PALMEN R, HELLINGWERF KJ.** Uptake and processing of DNA by *Acinetobacter calcoaceticus*-a review. *Gene.* 1997 Jun 11;192(1):179-190
- PALMEN R, VOSMAN B, BUIJSMAN P, BREEK CK, HELLINGWERF KJ.** Physiological characterization of natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Gen. Microbiol.* 1993 Feb;139 (Pt 2):295-305
- PARGE HE, FOREST KT, HICKEY MJ, CHRISTENSEN DA, GETZOFF ED, TAINER JA.** Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. *Nature.* 1995 Nov 2;378(6552):32-38
- PATTERSON SD.** From electrophoretically separated protein to identification: strategies for sequence and mass analysis. *Anal. Biochem.* 1994 Aug 15;221(1):1-15
- PEFEROEN M, HUYBRECHTS R, DE LOOF A.** Vacuum blotting: a new simple and efficient transfer of proteins from sodium dodecylsulfate polyacrylamid gels to nitrocellulose. *FEBS Lett.* 1982 145:369-372
- PESTOVA EV, HAVARSTEIN LS, MORRISON DA.** Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol. Microbiol.* 1996 Aug;21(4):853-862
- PESTOVA EV, MORRISON DA.** Isolation and characterization of three *Streptococcus pneumoniae* transformation-specific loci by use of a *lacZ* reporter insertion vector. *J. Bacteriol.* 1998 May;180(10):2701-2710
- PORSTENDÖRFER D, GOHL O, MAYER F, AVERHOFF B.** ComP, a pilin-like protein essential for natural competence in *Acinetobacter* sp. Strain BD413: regulation, modification, and cellular localization. *J. Bacteriol.* 2000 Jul;182(13):3673-3680

- PORSTENDÖRFER D.** Isolierung, Charakterisierung und Funktionsanalyse von ComP, einer essentiellen Komponente des natürlichen Transformationssystems in *Acinetobacter* sp. BD413. Dissertation Georg-August-Universität Göttingen, 1998 unveröffentlicht
- POSSOT OM, VIGNON G, BOMCHIL N, EBEL F, PUGSLEY AP.** Multiple interactions between pullulanase secretion components involved in stabilization and cytoplasmic membrane association of Pule. *J. Bacteriol.* 2000 Apr;182(8):2142-2152
- PRATT LA, KOLTER R.** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 1998 Oct;30(2):285-293
- PROVEDI R, CHEN I, DUBNAU D.** NucA is required for DNA cleavage during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 2001 May;40(3):634-644
- PROVEDI R, DUBNAU D.** ComEA is a DNA receptor for transformation of competent *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 1999 Jan;31(1):271-280
- PUYET A, GREENBERG B, LACKS SA.** Genetic and structural characterization of *endA*. A membrane-bound nuclease required for transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* 1990 Jun 20;213(4):727-738
- RAHMAN M, KALLSTROM H, NORMARK S, JONSSON AB.** PilC of pathogenic *Neisseria* is associated with the bacterial cell surface. *Mol. Microbiol.* 1997 Jul;25(1):11-25
- REUSCH R N, HUANG H, BRAMBLE LL.** Poly- β -hydroxybutyrate/Polyphosphate complexes form voltage-activated Ca^{2+} channels in the plasma membranes of *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 1995 69:754-766
- REUSCH RN, HISKE T, SADOFF H.** Poly- β -hydroxybutyrate membrane structure and its relationship to genetic transformability in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1986 168:553-562
- REUSCH RN, SADOFF HL.** D-(-)-poly- β -hydroxybutyrate in membranes of genetically competent bacteria. *J. Bacteriol.* 1983 Nov;156(2):778-788
- REUSCH RN, SADOFF HL.** D-(-)-poly- β -hydroxybutyrate in membranes of genetically competent bacteria. *J. Bacteriol.* 1983 156:778-788

- REUSCH RN, SADOFF HL.** Putative structure and function of a poly- β -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. 1988 USA. 85:4176-4180
- RIEGMAN N, KUSTERS R, VAN VEGGEL H, BERGMANS H, VAN BERGEN EN HENEGOUWEN P, HACKER J, VAN DIE I.** F1C fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* strain: genetic and functional organization of the foc gene cluster and identification of minor subunits. J. Bacteriol. 1990 Feb;172(2):1114-1120
- ROSENBERG E, ZUCKERBERG A, RUBINOWITZ H, GUTNICK DL.** Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. Appl. Env. Microbiol. 1979 37:402-408
- ROSENBERG E, ZUCKERBERG A, RUBINOWITZ H, GUTNICK DL.** Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. Appl. Env. Microbiol. 1979 37:402-408
- ROSENBERG M, PERRY A, BAYER EA, GUTNICK DL, ROSENBERG E, OFEK I.** Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane. Infect. Immun. 1981 Jul;33(1):29-33
- ROSENBERG M.** Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. Appl. Environ. Microbiol. 1981 Aug;42(2):375-377
- RUDEL T, BOXBERGER HJ, MEYER TF.** Pilus biogenesis and epithelial cell adherence of *Neisseria gonorrhoeae pilC* double knock-out mutants. Mol. Microbiol. 1995 Sep;17(6):1057-1071
- RUDEL T, FACIUS D, BARTEN R, SCHEURPFLUG I, NONNENMACHER E, MEYER TF.** Role of pili and the phase-variable PilC protein in natural competence for transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995a Aug 15;92(17):7986-7990
- RUDEL T, SCHEURERPFUG I, MEYER TF.** *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin. Nature. 1995b Jan 26;373(6512):357-359

- RUSSEL M.** Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J. Mol. Biol.* 1998 Jun 12;279(3):485-499
- RUSSELL PW, ORNDORFF PE.** Lesions in two *Escherichia coli* type 1 pilus genes alter pilus number and length without affecting receptor binding. *J. Bacteriol.* 1992 Sep;174(18):5923-5935
- RYLL RR, RUDEL T, SCHEUERPFUG I, BARTEN R, MEYER TF.** PilC of *Neisseria meningitidis* is involved in class II pilus formation and restores pilus assembly, natural transformation competence and adherence to epithelial cells in PilC-deficient gonococci. *Mol. Microbiol.* 1997 Mar;23(5):879-892
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T.** Molecular cloning: a laboratory manual (2nd ed.) 1989. Cold Spring Harbor, New York
- SANDKVIST M, BAGDASARIAN M, HOWARD SP, DIRITA VJ.** Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*. *EMBO J.* 1995 Apr 18;14(8):1664-1673
- SAUVONNET N, VIGNON G, PUGSLEY AP, GOUNON P.** Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 2000 May 15;19(10):2221-2228
- SCHÄGGER H, VON JAGOW G.** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 1991 199:223-231
- SCHEMBRI MA, BAYLY RC, DAVIES JK.** Cloning and analysis of the polyhydroxyalkanoic acid synthase gene from an *Acinetobacter* sp.: evidence that the gene is both plasmid and chromosomally located. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994 May 1;118(1-2):145-152
- SCHEMBRI MA, BAYLY RC, DAVIES JK.** Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes. *J. Bacteriol.* 1995a Aug;177(15):4501-4507
- SCHEMBRI MA, WOODS AA, BAYLY RC, DAVIES JK.** Identification of a 13-kDa protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules from *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995 Nov 15;133(3):277-283

- SCHEUERPFUG I, RUDEL T, RYLL R, PANDIT J, MEYER TF.** Roles of PilC and PilE proteins in pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* to human erythrocytes and endothelial and epithelial cells. *Infect. Immun.* 1999 Feb;67(2):834-843
- SEKIYA K, OHISHI M, OGINO T, TAMANO K, SASAKAWA C, ABE A.** Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001 Sep 25;98(20):11638-11643
- SEMMLER AB, WHITCHURCH CB, MATTICK JS.** A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 1999 Oct;145 (Pt 10):2863-2873
- SHEVCHIK VE, ROBERT-BAUDOY J, CONDEMINE G.** Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general secretory pathway, and secreted proteins. *EMBO J.* 1997 Jun 2;16(11):3007-3016
- SOTO GE, HULTGREN SJ.** Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* 1999 Feb;181(4):1059-1071
- SOUTHERN EM.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 1975 Nov 5;98(3):503-517
- SPURR A.** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 1969 26:31-43
- STROM MS, LORY S.** Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu. Rev. Microbiol.* 1993;47:565-596
- STROM MS, NUNN DN, LORY S.** A single bifunctional enzyme, PilD, catalyzes cleavage and N-methylation of proteins belonging to the type IV pilin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993 Mar 15;90(6):2404-2408
- STUDIER FW, MOFFATT BA.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 1986 May 5;189(1):113-130

- TAMANO K, AIZAWA S, KATAYAMA E, NONAKA T, IMAJOH-OHMI S, KUWAE A, NAGAI S, SASAKAWA C.** Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J.* 2000 Aug 1;19(15):3876-3887
- TAYLOR R, SHAW C, PETERSON K, SPEARS P, MEKALANOS J.** Safe, live *Vibrio cholerae* vaccines? *Vaccine.* 1988 Apr;6(2):151-154
- TENNENT JM, LINDBERG F, NORMARK S.** Integrity of *Escherichia coli* P pili during biogenesis: properties and role of PapJ. *Mol. Microbiol.* 1990 May;4(5):747-758
- THELIN KH, TAYLOR RK.** Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. *Infect. Immun.* 1996 Jul;64(7):2853-2856
- TOMASZ A.** Model for the mechanism controlling the expression of competent state in *Pneumococcus* cultures. *J. Bacteriol.* 1966 Mar;91(3):1050-1061
- TOMB JF, EL-HAJJ H, SMITH HO.** Nucleotide sequence of a cluster of genes involved in the transformation of *Haemophilus influenzae* Rd. *Gene.* 1991 Jul 31;104(1):1-10
- TOMB JF.** A periplasmic protein disulfide oxidoreductase is required for transformation of *Haemophilus influenzae* Rd. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992 Nov 1;89(21):10252-10256
- TROMBE MC, CLAVE C, MANIAS JM.** Calcium regulation of growth and differentiation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 1992 Jan;138 (Pt 1):77-84
- TROMBE MC.** Characterization of a calcium porter of *Streptococcus pneumoniae* involved in calcium regulation of growth and competence. *J. Gen. Microbiol.* 1993 Mar;139 (Pt 3):433-439
- TSCHECH A, PFENNIG N.** Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* 1984 137:163-167
- TURNER LR, LARA JC, NUNN DN, LORY S.** Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 1993 Aug;175(16):4962-4969

- VALLET I, OLSON JW, LORY S, LAZDUNSKI A, FILLOUX A.** The chaperon/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene cluster (*cup*) and their involvement in biofilm formation. *PANS* 2001 98(12):6911-6916
- VOSMAN B, HELLINGWERF KJ.** Molecular cloning and functional characterization of a *recA* analog from *Pseudomonas stutzeri* and construction of a *P. stutzeri recA* mutant. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1991 Feb;59(2):115-123
- VOSMAN B, KOK R, HELLINGWERF KJ.** Random insertional mutagenesis in *Acinetobacter*. In: TOWNER KJ, BERGOGNE-BÉRÉZIN E, FEWSON CA (eds.). *The Biology of Acinetobacter*. Taxonomy, Clinical Importance, Molecular Biology, Physiology, Industrial Relevance. 1991 New York: Plenum Press
- WATNICK PI, FULLNER KJ, KOLTER R.** A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* 1999 Jun;181(11):3606-3609
- WEBER K, OSBORN M.** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1969 Aug 25;244(16):4406-4412
- WHITE-ZIEGLER CA, VILLAPAKKAM A, RONASZEKI K, YOUNG S.** H-NS controls *pap* and *daa* fimbrial transcription in *Escherichia coli* in response to multiple environmental cues. *J. Bacteriol.* 2000 Nov;182(22):6391-6400
- WISE EM JR, ALEXANDER SP, POWERS M.** Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate as a regulator of bacterial transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1973 Feb;70(2):471-474
- WOLFGANG M, LAUER P, PARK HS, BROSSAY L, HEBERT J, KOOMEY M.** PilT mutations lead to simultaneous defects in competence for natural transformation and twitching motility in piliated *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* 1998a Jul;29(1):321-330
- WOLFGANG M, PARK HS, HAYES SF, VAN PUTTEN JP, KOOMEY M.** Suppression of an absolute defect in type IV pilus biogenesis by loss-of-function mutations in *pilT*, a twitching motility gene in *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998 Dec 8;95(25):14973-14978

WOLFGANG M, VAN PUTTEN JP, HAYES SF, DORWARD D, KOOMEY M. Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. *EMBO J.* 2000 Dec 1;19(23):6408-6418.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Frau Priv.Doz. Dr. Beate Averhoff für die Überlassung des Themas, die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, den motivierenden Optimismus, für die Möglichkeit der Teilnahme an zahlreichen Tagungen und besonders für die Bereitschaft der Betreuung aus München zum Ende meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Gottschalk möchte ich herzlich für die Ermöglichung eines selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens und für sein Interesse am Fortgang der Arbeit sowie für die Möglichkeit zur Fertigstellung meiner Arbeit in Göttingen danken.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern im Labor 255 möchte ich für das hervorragende Arbeitsklima danken. Besonders erwähnt seien hierbei Christina Herzberg mit ihrer Hilfsbereitschaft und ihrem Fachwissen, meine Transformations-Mitstreiter Alexandra Friedrich mit den täglichen erheiternden Erlebnisberichten und der Organisation schöner Aufenthalte in München sowie Christine Rosenplänter, die immer ein offenes Ohr für meine Proteine hatte. Besonders möchte ich Christiane Scherp für ihr soziales Engagement danken, womit sie immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Danken möchte ich weiterhin Birgit Veith, Doris Schmidt und Volker Held, die das Labor 255 zum Ende meiner Arbeit mit neuem Leben füllten, und besonders Dr. Armin Ehrenreich für die erleichternde Gewißheit, daß jedes Computerproblem zu bewältigen ist.

Besonderer Dank gilt ebenfalls der elektronenmikroskopischen Abteilung von Prof. Dr. F. Mayer und den immer hilfsbereiten Mitarbeitern Dr. Michael Hoppert, Carolin Wichmann, Jan Hegermann und Inge Kornrumpf; ohne sie wäre ein Großteil dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn M. Hellwig danke ich für die Bereitstellung verschiedenster Utensilien (Kluyver-Kolben !), seinen Hilfestellungen bei der Praktikumsbetreuung und den immer guten Tee (mit oder ohne Verdünnung).

Dank gilt auch dem Werkstatt-Team aus dem Keller, Gerd Birke, 'Charlie' Bertram und Jürgen Steckel, für die Bewältigung nicht-biologischer Probleme, wobei sie vor keiner Reparaturmaßnahme oder technischen Neukonstruktionen zurückschreckten.

Besonders danken möchte ich Carsten Raasch, der mir während der gesamten Zeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand, für die lustigen KAZ-Abende, die Gesellschaft bei so manchem Mensa-Essen und für die entspannenden sonnigen Tage am Baggersee sowie für das Korrekturlesen.

Allen Institutsangehörigen, die mir mit Tips oder sonstiger Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei hiermit ebenfalls gedankt.

Meinen Eltern möchte ich herzlichst für die Ermöglichung des Studiums und für die Fürsorge und Unterstützung danken, sowie meinem Bruder für die Fahrdienste zwischen Goslar und Göttingen.

Ebenso herzlich danke ich Dirk Porstendörfer für sein Verständnis, den Ratschlägen und seinem Interesse an der Arbeit und für die gesamte schöne Zeit.

Lebenslauf

14. Dezember 1971	Geboren in Goslar
August 1978	Einschulung in die Grundschule Sudmerberg
September 1982	Beginn der Orientierungsstufe an der Schule „Bei der Eiche“ in Oker
September 1984	Wechsel an das Ratsgymnasium in Goslar
Juni 1991	Abitur
August 1991-Juni 1994	Lehre zur Damenschneiderin (im Handwerk) an der Berufsfachschule Textil und Kehmstedtstiftung in Goslar
Juni 1994	Gesellenprüfung zur Damenschneiderin
Oktober 1994	Immatrikulation an der Georg-August-Universität Göttingen für das Studienfach Biologie (Diplom)
Oktober 1996	Vordiplom in den Fächern Mikrobiologie, Botanik, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie
Juli 1998	Mündliche Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie und Organische Chemie
August 1998-September 1999	Experimentelle Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. G. Gottschalk am Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen mit dem Thema „Der DNA-Aufnahmeapparat in <i>Acinetobacter</i> sp. BD413: Identifizierung, Anreicherung und Untersuchung zur Membranverankerung.“
Oktober 1999	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation