

**Funktionale Analyse der
N-terminalen Region des Zytolysins ClyA
von *Escherichia coli***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Guido Völkerink
aus Greven

Frankfurt 2006
(DF1)

vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan : Prof. Dr. Rüdiger Wittig

Gutachter : Prof. Dr. Jörg Soppa
PD Dr. Albrecht Ludwig

Datum der Disputation : 06.12.2006

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von PD Dr. Albrecht Ludwig am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

PD Dr. Albrecht Ludwig für die Überlassung des interessanten Themas, für seine Diskussionsbereitschaft sowie die Unterstützung und die Ermutigung bei allen aufgetretenen Fragestellungen,

Prof. Dr. Volker Brade, der als Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat und stets großes Interesse am Fortgang der Experimente gezeigt hat,

Prof. Dr. Jörg Soppa, der freundlicherweise die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat und damit meine Dissertation im Fachbereich Biowissenschaften ermöglicht hat,

Prof. Dr. Roland Benz und seinen Mitarbeitern für die hervorragende Kooperation bei der Durchführung der Porentests an künstlichen Lipidmembranen,

Christine von Rhein für ausgezeichnete technische Unterstützung,

PD Dr. Peter Kraiczy, Dr. Kristina Hartmann, Denia Frank, Andrea Hönes, Christa Hansen-Hübner, Anna Laxa und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die freundschaftliche Zusammenarbeit,

...und meiner Familie!

2.17	Genexpression zur Synthese rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	37
2.17.1	Genexpression mit pACYC184-Vektoren	37
2.17.2	Genexpression mit pPROTet.E133-Vektoren	37
2.17.3	Genexpression mit dem Plasmid pAL201	38
2.18	Isolierung periplasmatischer und intrazellulärer Proteine von <i>E. coli</i>	38
2.19	Isolierung der inneren und äußeren Membran von <i>E. coli</i>	39
2.20	Präparative SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Isolierung rekombinanter Proteine von <i>E. coli</i>	40
2.21	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	41
2.22	Bestimmung der biologischen Aktivität rekombinanter Proteine von <i>E. coli</i>	41
2.22.1	Bestimmung der hämolytischen Aktivität	41
2.22.2	Protein-Quervernetzung (<i>Crosslinking</i>) mit Glutaraldehyd	42
2.22.3	Protein-Interaktion mit Erythrozytenmembranen	43
2.22.4	Protein-Interaktion mit künstlichen Lipidmembranen	43
IV.	Ergebnisse	45
1	Funktionale Analyse der N-terminalen Region des Zytolysins ClyA von <i>E. coli</i> K12 durch gezielte Mutagenese	45
1.1	Konstruktion von ClyA-Derivaten mit gezielten Mutationen am N-Terminus	45
1.2	Nachweis der Expression der durch <i>in vitro</i> -Mutagenese erzeugten mutierten <i>clyA</i> -Gene in <i>E. coli</i> DH5 α	49
1.3	Auswirkungen der gezielten Mutationen in der N-terminalen Region von ClyA auf die hämolytische Aktivität des ClyA-Proteins	51
1.3.1	Phänotypische Eigenschaften der rekombinanten <i>E. coli</i> DH5 α -Klone, die ClyA-Mutanten produzieren	51
1.3.2	Quantitativer Vergleich der hämolytischen Aktivität rekombinanter <i>E. coli</i> -Stämme, die wildtypisches ClyA bzw. ClyA-Mutanten synthetisieren	53
1.4	Auswirkungen der Mutationen am N-Terminus von ClyA auf die Sekretion des Zytolysins	57
1.4.1	Analyse der periplasmatischen und intrazellulären Proteine rekombinanter <i>E. coli</i> -Stämme, die ClyA-Mutanten produzieren	57
1.4.2	Analyse der inneren und äußeren Membran von rekombinanten DH5 α -Klonen, die ClyA-Mutanten synthetisieren	61
1.5	Auswirkungen der in ClyA eingeführten Mutationen auf die Oligomerbildung des Zytolysins	62
1.5.1	ClyA-Quervernetzung durch den chemischen <i>Crosslinker</i> Glutaraldehyd	62
1.6	Auswirkungen der gezielten Mutationen in der N-terminalen Region von ClyA auf die Bindungsfähigkeit des Proteins an Erythrozytenmembranen	76
1.7	Auswirkungen der N-terminalen Mutationen auf die porenbildende Eigenschaft des ClyA-Proteins an künstlichen Lipidmembranen	79
2	Untersuchung der Bedeutung der N-terminalen Region von ClyA für den Sekretionsmechanismus des Zytolysins durch Konstruktion und Analyse von Fusionsproteinen	91
2.1	Konstruktion von <i>clyA-bla</i> -Fusionsgenen und Herstellung rekombinanter pACYC184-Derivate	91
2.2	Expression der <i>clyA-bla</i> -Fusionsgene in <i>E. coli</i> DH5 α	94
2.3	Klonierung der Fusionsgene in den Expressionsvektor pPROTet.E133	95
2.4	Expression der <i>clyA-bla</i> -Fusionsgene in <i>E. coli</i> BL21PRO	98

V.	Diskussion	101
VI.	Literaturverzeichnis	109
VII.	Publikationen	118
VIII.	Abkürzungsverzeichnis	119
IX.	Anhang	122

I. Zusammenfassung

Das Zytolysin ClyA von *Escherichia coli* ist der Prototyp einer neuartigen Familie von porenbildenden, bakteriellen Zytolysinen, welche in verschiedenen Vertretern der *Enterobacteriaceae* vorkommen. Es handelt sich bei diesem Toxin um ein Protein von 34 kDa, das hämolytische und zytotoxische Aktivität aufweist und das in Zellmembranen stabile Poren einführt, indem es sich zu ringförmigen ClyA-Oligomeren zusammenlagert. Die vorliegende Dissertation sollte einen Beitrag zur funktionalen Charakterisierung des ClyA-Proteins von *E. coli* K12 liefern. Insbesondere sollte die Bedeutung der N-terminalen Region für den Sekretionsmechanismus, für die hämolytische und porenbildende Aktivität, für die Interaktion mit Zielmembranen und für die Fähigkeit zur Oligomerisierung des Proteins analysiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierzu ClyA-Derivate mit spezifischen Mutationen innerhalb des N-terminalen Bereiches hergestellt und auf ihre Funktionstüchtigkeit überprüft. Diese Untersuchungen gingen von den bestehenden Erkenntnissen aus, dass die Sekretion von ClyA über eine periplasmatische Zwischenstufe verläuft und keine N-terminale Prozessierung des Toxins erfolgt.

Es wurde festgestellt, dass bereits kurze, sukzessive Deletionen innerhalb der beginnenden N-terminalen Region, wie die Deletion der Aminosäuren an Position zwei bis fünf (ClyA Δ_{2-5}) und sechs bis zehn (ClyA Δ_{6-10}), einen deutlich hemmenden Effekt auf den Transfer von ClyA über die zytoplasmatische Membran zur Folge hatte, welcher durch die Deletion der Aminosäuren an Position zwei bis zehn (ClyA Δ_{2-10}) weiter verstärkt wurde. Größere N-terminale Mutationen, wie die Deletionen der Aminosäuren an Position zwei bis fünfzehn (ClyA Δ_{2-15}) und zwei bis zwanzig (ClyA Δ_{2-20}) sowie interne Deletionen, die Aminosäuren jenseits von Aminosäureposition zehn betrafen (ClyA Δ_{6-15} , ClyA Δ_{11-15} , ClyA Δ_{11-20} , ClyA Δ_{16-20}), führten zur fast vollständigen Inhibierung (ClyA Δ_{6-15}) oder totalen Blockierung (ClyA Δ_{11-15} , ClyA Δ_{11-20} , ClyA Δ_{16-20} , ClyA Δ_{2-20} , ClyA Δ_{2-15}) des Transports von ClyA in den periplasmatischen Raum.

Während die hämolytische Aktivität der ClyA-Mutanten ClyA Δ_{2-5} , ClyA Δ_{6-10} und ClyA Δ_{2-10} zwar abnahm, jedoch im Vergleich zu der des wildtypischen ClyA-Proteins noch verhältnismäßig hoch war, beeinflussten die weiteren Deletionen (ClyA Δ_{6-15} , ClyA Δ_{11-15} , ClyA Δ_{11-20} , ClyA Δ_{16-20} , ClyA Δ_{2-15} , ClyA Δ_{2-20}) die hämolytische Eigenschaft des Toxins ganz erheblich. So verursachten diese Mutationen eine massive Abnahme (ClyA Δ_{6-15}) bzw. einen

kompletten Verlust (ClyA $_{\Delta 11-15}$, ClyA $_{\Delta 11-20}$, ClyA $_{\Delta 16-20}$, ClyA $_{\Delta 2-20}$, ClyA $_{\Delta 2-15}$) der zytolytischen Aktivität des ClyA-Proteins gegenüber Erythrozyten.

Untersuchungen an künstlichen Lipidmembranen ergaben, dass die Deletion der Aminosäuren an Position zwei bis fünf, sechs bis zehn und zwei bis zehn die porenbildende Aktivität des ClyA-Proteins nur unwesentlich beeinträchtigt. Dagegen störte die Deletion der Aminosäuren an Position zwei bis fünfzehn und zwei bis zwanzig die porenbildende Eigenschaft von ClyA so tiefgreifend, dass keine (ClyA $_{\Delta 2-20}$) oder nur Transmembranporen mit extrem geringem Innendurchmesser (ClyA $_{\Delta 2-15}$) erzeugt wurden. Daneben spiegelten instabile Membranporen, die durch die ClyA-Mutanten ClyA $_{\Delta 6-15}$, ClyA $_{\Delta 11-15}$, ClyA $_{\Delta 11-20}$ und ClyA $_{\Delta 16-20}$ im künstlichen Lipid-Bilayer gebildet wurden, die negativen Auswirkungen dieser Mutationen auf die porenbildende Aktivität des Toxins wider.

Die gesammelten Daten unterstreichen somit nicht nur die essentielle Bedeutung der N-terminalen Region des Zytolysins ClyA von *E. coli* K12 für den Transport in den periplasmatischen Raum, sondern auch für die hämolytische und porenbildende Eigenschaft des Toxins. Allerdings wurde die hämolytische und porenbildende Aktivität des ClyA-Proteins erst durch Mutationen ab Aminosäureposition zehn signifikant beeinträchtigt. Demgegenüber verdeutlichten Untersuchungen zum Bindungsverhalten an Zielzellen sowie *Crosslinking*-Experimente, dass die N-terminale Aminosäuresequenz von Position zwei bis zwanzig von ClyA weder für die Bindung an Erythrozyten noch für die Oligomerisierung des Toxins einen wesentlichen Faktor darstellt.

II. Einleitung

Zytolytische Toxine (Zytolysine) besitzen die Fähigkeit, eukaryotische Zellen zu lysieren, indem sie die Funktion der Zellmembran als Permeabilitätsbarriere nachhaltig stören. Diese Toxine werden von einer Vielzahl pathogener Bakterien gebildet, die Krankheiten bei Menschen und Tieren verursachen. Basierend auf ihrem Wirkungsmechanismus gegenüber Zielmembranen lassen sich die zytolytischen Toxine in drei Gruppen gliedern (Rowe und Welch, 1994): (a) enzymatisch aktive Zytolysine, die Membran-Lipide abbauen; (b) Zytolysine mit detergenzartiger Aktivität, die Zellmembranen auflösen; und (c) porenbildende Zytolysine, die in Zielmembranen inserieren und Transmembranporen erzeugen, was zum osmotischen Einstrom von Wasser und schließlich zum Zerplatzen der angegriffenen Zellen führen kann. Zytolysine stellen aufgrund ihrer Eigenschaften potentielle Virulenzfaktoren dar (Groisman et al., 1994; Alouf, 2001). Für mehrere dieser Toxine konnte bereits tatsächlich nachgewiesen werden, dass sie einen entscheidenden Beitrag zur Virulenz der entsprechenden Bakterien leisten. Die genaue Funktion bei krankheitserregenden Infektionen ist jedoch meist nur unzureichend geklärt.

Die Mehrzahl der von pathogenen Bakterien gebildeten zytolytischen Toxine zählt zu den porenbildenden Zytolysinen. Im Gegensatz zu den Zytolysinen mit detergenzartiger Aktivität handelt es sich bei den porenbildenden Zytolysinen generell um Proteine. Viele dieser porenbildenden Zytolysine werden aufgrund ihrer lytischen Aktivität gegenüber Erythrozyten als Hämolytine bezeichnet (Ludwig, 1996; del Castillo et al., 1997). Darüber hinaus wirken die meisten dieser Zytolysine gegenüber einer Vielzahl von Zelltypen zytotoxisch, obgleich einzelne Zytotoxine durch eine hohe Zielzellspezifität charakterisiert sind (Ludwig, 1996). Des Weiteren zeigen sich die porenbildenden Zytolysine in ihren Primärstrukturen überaus verschieden und können zudem durch unterschiedliche Mechanismen Transmembranporen in Zellmembranen erzeugen. Außerdem sind sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien verschiedene Familien porenbildender Zytolysine existent, deren Mitglieder jeweils strukturelle und funktionale Homologien aufweisen (Ludwig und Goebel, 1999; Alouf, 2001).

In Gram-positiven Bakterien werden die porenbildenden Zytolysine zumeist in funktionaler Form synthetisiert und unter Abspaltung eines aminoterminalen Signalpeptids über die Zytoplasmamembran aus der Bakterienzelle geschleust. Hierzu zählen sowohl die Cholesterinbindenden Zytolysine wie das Streptolysin O von *Streptococcus pyogenes* (Sekiya et al., 1993; Bhakdi et al., 1996) als auch das α -Toxin von *Staphylococcus aureus*, das den

Prototyp einer eigenen Familie von porenbildenden Zytolysinen darstellt (Song et al., 1996). Im Gegensatz dazu liegen die von Gram-negativen Bakterien gebildeten porenbildenden Zytolysine zunächst oftmals als inaktive Protoxine vor, die durch Modifikation oder proteolytische Prozessierung in die aktive Toxinform überführt werden (Stanley et al., 1998; Ludwig und Goebel, 1999). Zu ihnen gehören beispielsweise die RTX-Toxine, deren Aktivierung durch eine posttranslationale Fettsäureacylierung erfolgt, sowie das Aerolysin von *Aeromonas hydrophila*, das durch eine proteolytische Prozessierung aktiviert wird (Parker et al., 1994; Ludwig und Goebel, 1999). Daneben vermitteln spezifische und zum Teil komplexe Sekretionssysteme den Export dieser Toxine über die Zytoplasmamembran und die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien (Ludwig und Goebel, 1999).

In *E. coli* sind unterschiedliche porenbildende Zytolysine bekannt. Hierzu zählt das α -Hämolysin (HlyA), das von vielen uropathogenen *E. coli*-Stämmen (UPEC) synthetisiert wird, die extraintestinale Infektionskrankheiten des Harntrakts verursachen können (Welch et al., 1981; Hacker et al., 1983; Ludwig und Goebel, 1999). Das zum α -Hämolysin zu ca. 61% identische EHEC-Hämolysin (Schmidt et al., 1995) stellt ein weiteres porenbildendes Zytolysin dar. Es wird von enterohämorrhagischen *E. coli*-Stämmen (EHEC) des Serotyps O157:H7 gebildet, die die vorherrschenden Erreger der hämorrhagischen Kolitis und des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) beim Menschen sind (Ludwig und Goebel, 1999). Sowohl das EHEC-Hämolysin als auch das α -Hämolysin gehören der in pathogenen Gram-negativen Bakterien weit verbreiteten und großen Familie der RTX-Toxine an, die zumeist zytolytische und zytotoxische Aktivitäten gegenüber einer Vielzahl von Human- und Animalzellen besitzen (Ludwig und Goebel, 1999).

Das Zytolysin ClyA von *E. coli* ist das erste bekannte Mitglied einer neuartigen Familie von porenbildenden Zytolysinen. Es handelt sich hierbei um ein hämolytisch und zytotoxisch wirksames Protein (Oscarsson et al., 1996), welches keine Homologie zum α -Hämolysin aufweist. Das Toxin besitzt eine molekulare Masse von ca. 34 kDa und wird von dem chromosomalen *clyA*-Gen kodiert, welches zuerst in dem nichtpathogenen Bakterienstamm *E. coli* K12 entdeckt wurde (Oscarsson et al., 1996; del Castillo et al., 1997; Ludwig et al., 1999). Die genetische Determinante des Zytolysins ClyA ist zudem in mehreren pathogenen klinischen *E. coli*-Isolaten existent. So weisen zahlreiche enteroinvasive, enteroaggregative, enterotoxische und Shiga-Toxin-produzierende/enterohämorrhagische *E. coli*-Stämme (EIEC, EAEC, ETEC, STEC/EHEC) intakte *clyA*-Gene auf, die für Toxine kodieren, deren Primärstrukturen zu 99-100% mit der von ClyA von *E. coli* K12 (ClyA_{K12}) übereinstimmen (Ludwig et al., 2004). Im Gegensatz dazu zeigen alle bisher untersuchten klinischen Isolate

von uropathogenen, enteropathogenen und neonatale-Meningitis-erregenden *E. coli*-Stämmen (UPEC, EPEC, NMEC) ausschließlich defekte *clyA*-Gene, die durch Rastermutationen bzw. umfangreiche Deletionen gekennzeichnet sind (Ludwig et al., 2004). In einem vogelpathogenen *E. coli*-Isolat wurde ein *clyA*-homologes Gen identifiziert, das mit dem *clyA*-Gen von *E. coli* K12 (*clyA*_{K12}) zu ca. 71% identisch ist und dessen Genprodukt in der Aminosäuresequenz eine Übereinstimmung von 74-75% zum ClyA_{K12}-Protein aufweist (Reingold et al., 1999; Wallace et al., 2000; Wyborn et al., 2004b). Darüber hinaus sind kürzlich in *Salmonella enterica* Serovar Typhi- und *S. enterica* Serovar Paratyphi A-Stämmen funktionale Hämolysin-Gene entdeckt worden, deren Proteinprodukte hinsichtlich der Aminosäuresequenz zu 91% bzw. 90% deckungsgleich mit ClyA_{K12} sind (Oscarsson et al., 2002; von Rhein et al., im Druck). Des Weiteren liegt ein mit dem *E. coli clyA*-Gen verwandtes Gen in *Shigella flexneri* vor, das jedoch zumindest in den bisher untersuchten *Sh. flexneri*-Stämmen eine interne Deletion von elf Basenpaaren aufweist (del Castillo et al., 2000; Wallace et al., 2000; Ludwig et al., unveröffentlicht). Dennoch verdeutlicht die zum Protein ClyA_{K12} zu 98% identische Aminosäuresequenz den engen Verwandtschaftsgrad des *clyA*-Gens von *Sh. flexneri* zum *clyA*-Gen von *E. coli* K12 (Wallace et al., 2000).

Im Gegensatz zum α -Hämolysin von *E. coli* und zum EHEC-Hämolysin wird das Zytolysin ClyA unter Standard-*in vitro*-Kulturbedingungen (bei Wachstum unter aeroben Bedingungen in einem Vollmedium) nicht in signifikantem Ausmaß in *E. coli* gebildet (Ludwig et al., 1995; Oscarsson et al., 1996; Ludwig et al., 1999). Daher zeigen Bakterienkolonien von *E. coli* K12 sowie von *clyA*-tragenden pathogenen *E. coli*-Stämmen unter diesen Bedingungen keine hämolytische Aktivität auf Blutagar (Rowe und Welch, 1994; Ludwig et al., 2004). Offenbar unterliegt die Synthese des ClyA-Toxins einer komplexen Regulation. So scheinen Histon-ähnliche Proteine die Expression des *clyA*-Gens negativ kontrollieren zu können (del Castillo et al., 1997). Insbesondere das H-NS-Protein (*histone-like nucleoid structural protein*), das die Regulation vieler Gene in *E. coli* beeinflusst (Atlung und Ingmer, 1997; Williams und Rimsky, 1997) zeichnet sich für die Repression der Transkription von *clyA* verantwortlich (Gomez-Gomez et al., 1996; del Castillo et al., 1997; Westermark et al., 2000). Dabei interagiert das H-NS-Protein bevorzugt mit zwei Bereichen innerhalb der gekrümmten und A/T-reichen *clyA*-Promotorregion (Westermark et al., 2000; Wyborn et al., 2004a). H-NS-defiziente Mutanten von *E. coli* K12 zeigen einen hämolytischen Phänotyp auf Blutagar und verdeutlichen somit die negativ regulierende Eigenschaft von H-NS auf die Synthese des Zytolysins ClyA (Gomez-Gomez et al., 1996). Andererseits sind bestimmte Transkriptionsfaktoren bekannt, die die Produktion von ClyA in *E. coli* positiv regulieren. Hierzu zählt das

in *E. coli* sowie *Salmonella enterica* gebildete SlyA-Protein (Ludwig et al., 1995; Oscarsson et al., 1996; Ludwig et al., 1999). Die Expression des *clyA*-Gens wird hierbei durch die direkte Interaktion des Regulatorproteins SlyA mit dem *clyA*-Promotor aktiviert. Da innerhalb der *clyA*-Promotorregion die Bindungsstelle des SlyA-Proteins mit der des H-NS-Proteins überlappt, wirkt SlyA der negativ regulierenden Eigenschaft des H-NS-Proteins auf die Transkription von *clyA* entgegen (Westermarck et al., 2000; Wyborn et al., 2004a). Eine Überproduktion von SlyA in *E. coli* hat somit die vermehrte Expression von *clyA* zur Folge. Darüber hinaus können die Transkriptionsfaktoren FNR (*fumarate and nitrate reduction regulator*) und CRP (*cyclic AMP receptor protein*) unter anaeroben Wachstumsbedingungen (FNR) bzw. bei Glucose-Mangel (CRP) mit hoher Affinität in der *clyA*-Promotorregion binden und dadurch ebenfalls aktivierend auf die Expression von *clyA* in *E. coli* wirken (Green und Baldwin, 1997; Ralph et al., 1998; Westermarck et al., 2000; Wyborn et al., 2004a). Des Weiteren führt die Überproduktion des Regulatorproteins MprA von *E. coli* (del Castillo et al., 1997) sowie des HlyX-Proteins von *Actinobacillus pleuropneumoniae*, das mit dem FNR-Protein von *E. coli* zu 73% übereinstimmt (Green et al., 1997), gleichfalls zur verstärkten Synthese des *clyA*-Genprodukts in *E. coli* K12.

Die dreidimensionale Struktur des aus 303 Aminosäuren bestehenden Zytolysins ClyA von *E. coli* K12 ist durch Röntgenstrukturanalysen bestimmt worden (Wallace et al., 2000). Die von den Autoren postulierte, spezielle Struktur von ClyA_{K12} ist in Abbildung 1 dargestellt.

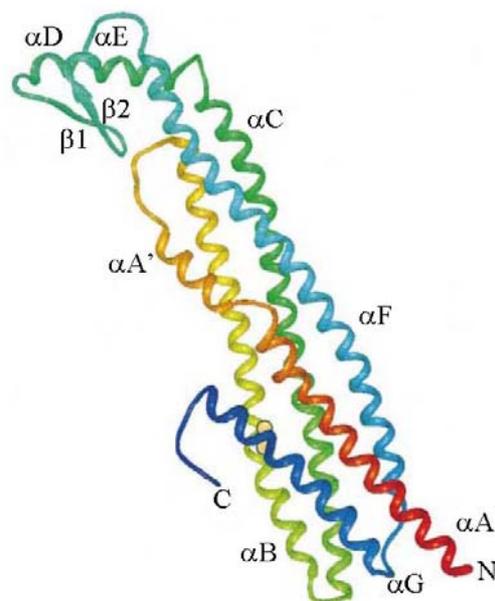


Abb. 1: Struktur des ClyA_{K12}-Monomers (aus Wallace et al., 2000).

Die einzelnen Sekundärstrukturabschnitte des ClyA-Moleküls sind ausgehend vom N-Terminus (Aminosäure 1) zum C-Terminus (Aminosäure 303) von rot nach blau farbig dargestellt. Die zwei Cysteinreste (Aminosäure 87 und Aminosäure 285) des ClyA-Proteins sind als gelbe Kreise gekennzeichnet.

Das kristallisierte ClyA_{K12}-Protein erscheint als ein stabförmiges Molekül, dessen Schaft sich aus einem Bündel von vier 70-80 Å langen, linkshändigen Helices formiert (*four-helix-bundle*): α -Helix A/A' (Aminosäuren 1-34/37-46), die durch einen deutlichen Knick an den Aminosäurepositionen 35-36 gekennzeichnet ist, α -Helix B (Aminosäuren 56-101), α -Helix C (Aminosäuren 106-159) und α -Helix F (Aminosäuren 207-258). Dabei winden sich die Helices zu einer linkshändigen Supersekundärstruktur (*supercoil*), dessen Zentrum nahezu gänzlich aus hydrophoben Seitenketten besteht. Darüber hinaus sind zwei zusätzliche Strukturelemente identifiziert, die die außergewöhnliche Topologie des ClyA_{K12}-Proteins zu verantworten haben. So weist die C-terminale Region eine weitere, 35 Å lange α -Helix G (Aminosäuren 286-291) auf, die sich zwischen die Helices A und B drängt, so dass in der unteren Hälfte des Schaftes ein Bündel von fünf Helices (*five-helix-bundle*) vorliegt. Des Weiteren befindet sich am Kopf des Moleküls eine hydrophobe β -Haarnadelstruktur, die aus den zwei β -Strängen β 1 (Aminosäuren 185-187) und β 2 (Aminosäuren 193-195) besteht und von zwei relativ kurzen Helices, α -Helix D (Aminosäuren 164-179) und α -Helix E (Aminosäuren 196-199), flankiert wird. Zudem existieren zwei Cysteinreste (Aminosäureposition 87 und 285), die im gefalteten Toxin nahe beieinander liegen und eine putative Disulfidbrücke bilden können. Aufgrund dieser besonderen Strukturmerkmale besitzt das ClyA-Protein offenbar eine neuartige Topologie, die für keine andere bekannte Proteinfamilie zutreffend ist (Wallace et al., 2000).

Das Zytolysin ClyA von *E. coli* weist zytotoxische Aktivität gegenüber HeLa-Zellkulturen sowie Makrophagen-Zelllinien von Mäusen und Menschen auf und ist imstande Apoptose zu induzieren (Oscarsson et al., 1999; Lai et al., 2000). Diese Eigenschaften deuten darauf hin, dass das Toxin zur Virulenz von pathogenen *E. coli*-Stämmen beitragen könnte. Zudem wirkt ClyA von *E. coli* auf Erythrozyten von unterschiedlichen Spezies zytolytisch (Atkins et al., 2000; Wyborn et al., 2004b). Wie aus elektronenmikroskopischen Analysen hervorgeht, erzeugt das Zytolysin in den Zellmembranen von Zielzellen relativ große Transmembranporen, die aus jeweils acht bis zehn ringförmig angeordneten ClyA-Molekülen bestehen (Abb. 2; Atkins et al., 2000; Wallace et al., 2000; Ludwig et al., unveröffentlicht). Des Weiteren zeigen osmotische Protektionsexperimente mit Erythrozyten sowie Untersuchungen an künstlichen Lipidmembranen, dass das ClyA-Protein stabile, mäßig kationenselektive Transmembranporen mit einem Innendurchmesser von 2.5-3.0 nm bildet (Ludwig et al., 1999; Oscarsson et al., 1999). Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass die Transmembranporen durch ClyA-Oligomere generiert werden (Ludwig et al., 1999; Wallace et al., 2000).

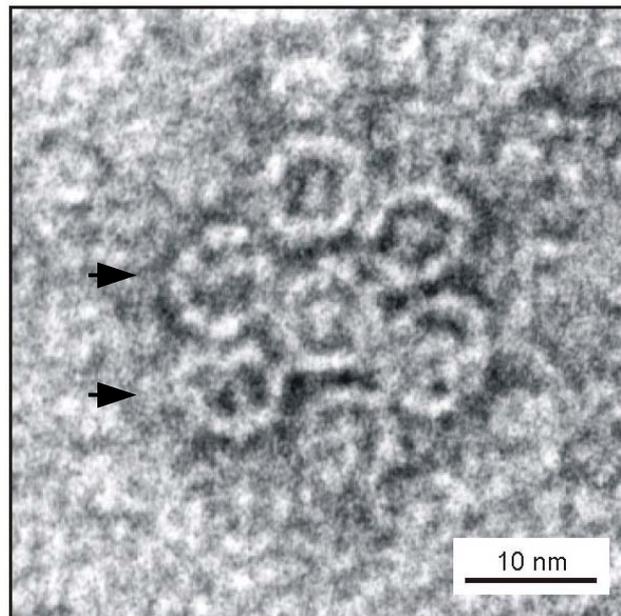


Abb. 2: Porenbildung des Zytolysins ClyA von *E. coli* K12 in Erythrozytenmembranen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. A. Ludwig).

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Zellmembranfragments einer Erythrozytenzelle nach Lyse durch ClyA. ClyA-Oligomere, die aus acht bis zehn ClyA-Molekülen bestehen, bilden Transmembranporen mit einem Innendurchmesser von ca. 2.5-3.0 nm. Zwei dieser Poren sind in der Abbildung durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Bildung dieser oligomeren Protein-Strukturen scheint dabei maßgeblich vom Redox-Zustand der zwei Cysteinreste (Abb. 1) des ClyA-Proteins abhängig zu sein (Wai et al., 2003a). So verhindert offenbar die intramolekulare Disulfidbrücke die vorzeitige Oligomerisierung von ClyA im Periplasma von *E. coli*, während eine reduzierende Umgebung sich positiv auf die Bildung von ClyA-Oligomeren auswirken kann (Atkins et al., 2000; Wai et al., 2003a). Intramolekulare Disulfidbindungen, für deren Bildung eine oxidative Umgebung notwendig ist, können sowohl die Stabilität als auch die spezifische Aktivität von Proteinen erhöhen (Ritz und Beckwith, 2001). In Bakterienzellen von *E. coli* sind unterschiedliche Thiol-Redox-Systeme bekannt, die einerseits SH-Gruppen von Cysteinen oxidieren und andererseits Disulfidbindungen reduzieren können (Ritz und Beckwith, 2001). So vermittelt beispielsweise das Thioredoxin-System die Reduktion von Disulfidbindungen im Zytoplasma, während das Dsb-Redox-System des Periplasmas durch Oxidation der Cysteinreste die Bildung von Disulfidbindungen katalysiert (Ritz und Beckwith, 2001).

Die Bindung von ClyA an Erythrozyten läuft jedoch unabhängig vom Redox-Zustand des Zytolysins ab, da sowohl ClyA-Monomere als auch ClyA-Oligomere befähigt sind, mit der Zellmembran zu assoziieren (Atkins et al., 2000). Weiterhin wird vermutet, dass die Insertion der Toxin-Moleküle in die Membran über die hydrophobe β -Haarnadelstruktur des Proteins

erfolgt (Wallace et al., 2000; Wyborn et al., 2004b), die sich in der kristallisierten ClyA-Struktur an einer exponierten Position befindet (Abb. 1) und eine putative Transmembranregion darstellt (del Castillo et al., 1997).

Während des bakteriellen Wachstums akkumulieren rekombinante *E. coli*-Stämme, die *clyA_{K12}* überexprimieren, das ClyA-Protein im periplasmatischen Raum (Ludwig et al., 1999). Geringe Mengen des Toxins werden dabei während der exponentiellen Wachstumsphase auch in den Kulturüberstand freigesetzt (Ludwig et al., 1999). Der Transport von ClyA aus *E. coli*-Zellen erfolgt demnach über eine periplasmatische Zwischenstufe. Daneben ist der Export des ClyA-Proteins offenbar mit der Ausschleusung weiterer periplasmatischer Proteine aus der Bakterienzelle, wie beispielsweise der β -Lactamase, gekoppelt (Ludwig et al., 1999; del Castillo et al., 2001). Bislang ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, über welchen Mechanismus das ClyA-Protein über die innere und äußere Membran der Bakterienzelle transportiert wird. Das ClyA-Protein wird bei seiner Sekretion nicht prozessiert, da es keine abspaltbare N-terminale Signalsequenz aufweist und demnach nicht als ein Protoxin synthetisiert wird (del Castillo et al., 1997; Ludwig et al., 1999). Die Sekretion von ClyA kann daher nicht über den generellen Proteinsekretionsweg (Typ-II-Sekretionsweg; Pugsley, 1993; Sandkvist, 2001) erfolgen (Ludwig et al., 1999). Diese Erkenntnisse wurden auch durch Untersuchungen mit sogenannten *gsp-knock-out*-Mutanten bestätigt, bei denen einzelne Komponenten des Typ-II-Sekretionsweges (*general-secretory-pathway*) in der Bakterienzelle durch Mutagenese ausgeschaltet sind (Wai et al., 2003a). Auch die in Gram-negativen Bakterien bekannten, spezifischen Sekretionswege der Typen I (Koronakis et al., 1989; Thanabalu et al., 1998; Koronakis et al., 2000), III (Hueck, 1998; Galan und Collmer, 1999), IV (Christie und Vogel, 2000) und V (Henderson et al., 2000) sind für den ClyA-Transport in *E. coli* nicht bedeutsam (Wai et al., 2003a). So repräsentieren die Sekretionswege der Typen I, III und IV Transportmechanismen, durch die Proteine auf direktem Weg über beide Membranen aus der Bakterienzelle geschleust werden und daher der Transfer nicht über eine periplasmatische Zwischenstufe erfolgt. Dabei handelt es sich zum Teil um spezifische Transportsysteme, die in Bakterienstämmen wie *E. coli* K12 nicht existieren (Typ-I-Sekretionsweg). Proteine, die mit Hilfe des Typ-V-Sekretionsweges über die zytoplasmatische Membran transportiert werden, weisen hingegen ein N-terminales Signalpeptid auf. Demnach muss die Translokation des Zytolysins ClyA_{K12} durch die zytoplasmatische und äußere Membran über andere Transportsysteme geschehen. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass sich auf dem Chromosom von *E. coli* K12 und von pathogenen *E. coli*-

Stämmen in der Nachbarschaft des *clyA*-Gens keine Strukturgene befinden, welche spezifisch für die Sekretion von ClyA nötig sein könnten (Blattner et al., 1997; del Castillo et al., 1997). Allgemein bekannt ist, dass Gram-negative Bakterien während des bakteriellen Wachstums kontinuierlich Membranvesikel von der Zelloberfläche abschnüren und darin unterschiedliche Proteine einschließen (Beveridge, 1999). So weisen die Membranvesikel von EHEC-Stämmen des Serotyps O157:H7 neben Bestandteilen des Periplasmas und der äußeren Membran auch Shiga-Toxine auf, die offenbar über diesen Transportmechanismus in den Kulturüberstand sezerniert werden (Kolling und Matthews, 1999). Wie aus der Analyse äußerer Membranvesikel von *E. coli* K12 hervorgeht, kann anscheinend auch das Zytolysin ClyA über den Vesikel-vermittelten Transport aus der Bakterienzelle geschleust werden (Wai et al., 2003a). Die Autoren postulieren, dass von der Zelloberfläche abgetrennte Membranvesikel von *E. coli* K12 sowohl die periplasmatische β -Lactamase als auch das porenbildende ClyA-Protein enthalten. Darüber hinaus soll das Zytolysin ClyA in den Membranvesikeln von *E. coli* K12 als hämolytisch wirksames Protein-Oligomer vorliegen und die hämolytische Aktivität des periplasmatischen, monomeren ClyA_{K12}-Proteins um ein Vielfaches übertreffen (Wai et al., 2003a). Der durch Vesikel vermittelte Transport des Zytolysins ClyA stellt somit einen putativen Sekretionsweg dar, der jedoch ausschließlich den Transfer des Toxins vom Periplasma in den extrazellulären Raum beschreibt. Dagegen bleibt weiterhin unklar, über welchen Mechanismus die Translokation von ClyA durch die zytoplasmatische Membran stattfindet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die funktionale Charakterisierung des Zytolysins ClyA von *E. coli* K12 fortzuführen, wobei der Schwerpunkt auf der Aufklärung des bislang unverstandenen Sekretionsmechanismus des Toxins lag. Insbesondere sollte die Bedeutung der N-terminalen Region des ClyA_{K12}-Proteins für die Sekretion, aber auch für die Bindung an Zielzellen, für die Toxinoligomerisierung und für die hämolytische und porenbildende Eigenschaft des Zytolysins geklärt werden. Hierzu sollten gezielt gerichtete Mutationen im ClyA-Protein von *E. coli* K12 erzeugt und auf ihre funktionalen Auswirkungen analysiert werden. Ein weiteres Vorhaben dieser Arbeit war, den Einfluss des N-terminalen Bereiches von ClyA_{K12} auf die Sekretion des Proteins durch die Konstruktion von ClyA-Hybrid-Proteinen zu untersuchen.

III. Material und Methoden

1 Material

1.1 *E. coli*-Stämme

Tab. 1: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme.

Stamm	Referenz	Genotyp	Verwendung
<i>E. coli</i> DH5 α		F ⁻ N80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF), U169 <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>pho1</i> , <i>hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>supE44</i> λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Transformation, Überexpression rekombinanter Proteine
<i>E. coli</i> BL21PRO	BD Biosciences	<i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>F^-</i> , <i>tetR</i> , <i>P_{lacI}^q/lacI</i> , <i>Sp^r</i>	Transformation, Überexpression rekombinanter Proteine

1.2 Kulturmedium zur Anzucht von *E. coli*

2 \times YT-Medium für Flüssigkulturen (Sambrook et al., 1989)

NaCl 10.0 g/l

Hefe-Extrakt 10.0 g/l

Bacto-Trypton 16.0 g/l

ad 1 l A. dest.

autoklavieren für 20 min bei 120°C und 1 atü

1 \times YT-Medium für Festmedien (Sambrook et al., 1989)

NaCl 5.0 g/l

Hefe-Extrakt 5.0 g/l

Bacto-Trypton 8.0 g/l

Agar 15.0 g/l

ad 1 l A. dest.

Zur Herstellung von Blutagarplatten wurden dem Ansatz nach dem Autoklavieren (20 min bei 120°C und 1 atü) 40 ml defibriniertes Pferdeblut (Oxoid) zugesetzt. Bei Bedarf erfolgte die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums. Ampicillin wurde in der Endkonzentration von 100 µg/ml, Chloramphenicol in der Endkonzentration von 30 µg/ml verwendet.

Antibiotika-Stammlösungen:

100 mg/ml Ampicillin (Amp) gelöst in A. dest.

30 mg/ml Chloramphenicol (Cm) gelöst in Ethanol p.a.

1.3 Vektoren

Tab. 2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.

Bezeichnung	Charakteristika	Verwendung	Referenz
pUC18	2.686 kb, <i>high-copy</i> , <i>lacZα</i> -Gen, Amp ^r	Klonierung	GenBank-Nummer: L09136 New England Biolabs
pACYC184	4.245 kb, <i>low-copy</i> , Tc ^r , Cm ^r	Klonierung, Expression rekombinanter Fusionsproteine	GenBank-Nummer: X06403 New England Biolabs
pPROTet.E133	ca. 2.2 kb, Expressionsvektor, <i>P_{LtetO-1}</i> , Cm ^r	Klonierung, Überexpression rekombinanter Fusionsproteine	BD Biosciences

1.4 Plasmidkonstrukte

Tab. 3: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pAL201	pUC18-Derivat, ca. 4 kb; mit <i>clyA</i> von <i>E. coli</i> K12 auf einem 1.324 kb großen Insert; unter P _{<i>clyA</i>} - und P _{<i>lacZ</i>} - Kontrolle; Amp ^r	Ludwig et al., 1999
pAL201- <i>clyA</i> _{Δ2-5}	pAL201-Derivat mit Deletion der Codons 2-5 im <i>clyA</i> -Gen von <i>E. coli</i> K12	diese Arbeit
pAL201- <i>clyA</i> _{Δ6-10}	pAL201-Derivat mit Deletion der Codons 6-10 im <i>clyA</i> -Gen von <i>E. coli</i> K12	diese Arbeit
pAL201- <i>clyA</i> _{Δ2-10}	pAL201-Derivat mit Deletion der Codons 2-10 im <i>clyA</i> -Gen von <i>E. coli</i> K12	diese Arbeit
pAL201- <i>clyA</i> _{Δ2-15}	pAL201-Derivat mit Deletion der Codons 2-15 im <i>clyA</i> -Gen von <i>E. coli</i> K12	diese Arbeit
pAL201- <i>clyA</i> _{Δ2-20}	pAL201-Derivat mit Deletion der Codons 2-20 im <i>clyA</i> -Gen von <i>E. coli</i> K12	diese Arbeit
pAL201- <i>clyA</i> _{Δ6-15}	pAL201-Derivat mit Deletion der Codons 6-15 im <i>clyA</i> -Gen von <i>E. coli</i> K12	diese Arbeit
pAL201- <i>clyA</i> _{Δ11-15}	pAL201-Derivat mit Deletion der Codons 11- 15 im <i>clyA</i> -Gen von <i>E. coli</i> K12	diese Arbeit
pAL201- <i>clyA</i> _{Δ11-20}	pAL201-Derivat mit Deletion der Codons 11- 20 im <i>clyA</i> -Gen von <i>E. coli</i> K12	diese Arbeit
pAL201- <i>clyA</i> _{Δ16-20}	pAL201-Derivat mit Deletion der Codons 16- 20 im <i>clyA</i> -Gen von <i>E. coli</i> K12	diese Arbeit
pAL201- <i>clyA</i> _{A16P}	pAL201-Derivat mit Nukleotidaustausch in Codon 16 vom <i>clyA</i> -Gen von <i>E. coli</i> K12: GCA (Alanin) → CCA (Prolin)	diese Arbeit

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pGV.I-c1b	pACYC184-Derivat mit Genfusionskonstrukt (1052 bp) bestehend aus <i>clyA</i> -Fragment (ATG-Start-Codon mit <i>clyA</i> -5'-flankierender Region einschließlich des <i>clyA</i> -Promotors) und <i>bla</i> -Fragment (Codon 24-287 mit 3'-flankierender Sequenz).	diese Arbeit
pGV.I-c25b	pACYC184-Derivat mit Genfusionskonstrukt (1124 bp) bestehend aus <i>clyA</i> -Fragment (Codons 1-25 mit <i>clyA</i> -5'-flankierender Region einschließlich des <i>clyA</i> -Promotors) und <i>bla</i> -Fragment (Codon 24-287 mit 3'-flankierender Sequenz).	diese Arbeit
pGV.I-c50b	pACYC184-Derivat mit Genfusionskonstrukt (1199 bp) bestehend aus <i>clyA</i> -Fragment (Codons 1-50 mit <i>clyA</i> -5'-flankierender Region einschließlich des <i>clyA</i> -Promotors) und <i>bla</i> -Fragment (Codon 24-287 mit 3'-flankierender Sequenz).	diese Arbeit
pGV.I-c100b	pACYC184-Derivat mit Genfusionskonstrukt (1349 bp) bestehend aus <i>clyA</i> -Fragment (Codons 1-100 mit <i>clyA</i> -5'-flankierender Region einschließlich des <i>clyA</i> -Promotors) und <i>bla</i> -Fragment (Codon 24-287 mit 3'-flankierender Sequenz).	diese Arbeit
pGV.II-c1b	pPROTet.E133-Derivat mit Genfusionskonstrukt (852 bp) bestehend aus <i>clyA</i> -Fragment (ATG-Start-Codon mit verkürzter <i>clyA</i> -5'-flankierender Region) und <i>bla</i> -Fragment (Codon 24-287 mit 3'-flankierender Sequenz).	diese Arbeit
pGV.II-c25b	pPROTet.E133-Derivat mit Genfusionskonstrukt (924 bp) bestehend aus <i>clyA</i> -Fragment (Codons 1-25 mit verkürzter <i>clyA</i> -5'-flankierender Region) und <i>bla</i> -Fragment (Codon 24-287 mit 3'-flankierender Sequenz).	diese Arbeit

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pGV.II-c50b	pPROTet.E133-Derivat mit Genfusionskonstrukt (999 bp) bestehend aus <i>clyA</i> -Fragment (Codons 1-50 mit verkürzter <i>clyA</i> -5'-flankierender Region) und <i>bla</i> -Fragment (Codon 24-287 mit 3'-flankierender Sequenz).	diese Arbeit
pGV.II-c100b	pPROTet.E133-Derivat mit Genfusionskonstrukt (1149 bp) bestehend aus <i>clyA</i> -Fragment (Codons 1-100 mit verkürzter <i>clyA</i> -5'-flankierender Region) und <i>bla</i> -Fragment (Codon 24-287 mit 3'-flankierender Sequenz).	diese Arbeit

1.5 Oligonukleotide

Tab. 4: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
P _{Δ2-5-1}	GAGGCGAATGATTATGGCAGATAAAACGGTAG	<i>in vitro</i> -Mutagenese
P _{Δ2-5-2}	CTACCGTTTTATCTGCCATAATCATTTCGCCTC	<i>in vitro</i> -Mutagenese
P _{Δ2-10-1}	GAGGCGAATGATTATGGAAGTAGTTAAAAAC	<i>in vitro</i> -Mutagenese
P _{Δ2-10-2}	GTTTTTAACTACTTCCATAATCATTTCGCCTC	<i>in vitro</i> -Mutagenese
P _{Δ2-15-1}	GAGGCGAATGATTATGGCAATCGAAACCGCAG	<i>in vitro</i> -Mutagenese
P _{Δ2-15-2}	CTGCGGTTTCGATTGCCATAATCATTTCGCCTC	<i>in vitro</i> -Mutagenese
P _{Δ11-20-1}	GCAGATAAAACGGTAGATGGAGCATTAGATC	<i>in vitro</i> -Mutagenese
P _{Δ11-20-2}	GATCTAATGCTCCATCTACCGTTTTATCTGC	<i>in vitro</i> -Mutagenese

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
P _{Δ16-20-1}	GTAGAAGTAGTTAAAAACGATGGAGCATTAGATC	<i>in vitro</i> - Mutagenese
P _{Δ16-20-2}	GATCTAATGCTCCATCGTTTTTAACTACTTCTAC	<i>in vitro</i> - Mutagenese
P _{Δ11-15-1}	GCAGATAAAACGGTAGCAATCGAAACCGCAG	<i>in vitro</i> - Mutagenese
P _{Δ11-15-2}	CTGCGGTTTCGATTGCTACCGTTTTATCTGC	<i>in vitro</i> - Mutagenese
P _{Δ6-10-1}	GATTATGACTGAAATCGTTGAAGTAGTTAAAAAC GC	<i>in vitro</i> - Mutagenese
P _{Δ6-10-2}	GCGTTTTTAACTACTTCAACGATTCAGTCATAAT C	<i>in vitro</i> - Mutagenese
P _{Δ6-15-1}	GATTATGACTGAAATCGTTGCAATCGAAACCGCA G	<i>in vitro</i> - Mutagenese
P _{Δ6-15-2}	CTGCGGTTTCGATTGCAACGATTCAGTCATAATC	<i>in vitro</i> - Mutagenese
P _{Δ16P-1}	GGTAGAAGTAGTTAAAAACCCAATCGAAACCGCA G	<i>in vitro</i> - Mutagenese
P _{Δ16P-2}	CTGCGGTTTCGATTGGGTTTTTAACTACTTCTACC	<i>in vitro</i> - Mutagenese
P _{Δ2-20-1} (ClyA 104)	GAGGCGAATGATTATGGATGGAGCATTAGATC	<i>in vitro</i> - Mutagenese
P _{Δ2-20-2} (ClyA 105)	GATCTAATGCTCCATCCATAATCATTTCGCCTC	<i>in vitro</i> - Mutagenese
pUC reverse	GCGGATAACAATTCACACAGG	Sequenzierung
ClyA127	CTTATCTTGTGCATGCGTGGCCTTC	rekombinante PCR
ClyA-bla1	GTTTCTGGGTGAAAGCGACTTAACTCT TTTATGG	rekombinante PCR / Sequenzierung
ClyA-bla2	GTCGCTTTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAG	rekombinante PCR

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
ClyA-bla3	GTTTCTGGGTGTAGCAAAATATACGCTGCGAGC	rekombinante PCR / Sequenzierung
ClyA-bla4	GTATATTTTGCTACACCCAGAAACGCTGGTGAAA G	rekombinante PCR
ClyA-bla5	GTTTCTGGGTGATCTAATGCTCCATCTGCGG	rekombinante PCR / Sequenzierung
ClyA-bla6	GGAGCATTAGATCACCCAGAAACGCTGGTGAAAG	rekombinante PCR
Bla1	GTATATATGAGTCGACTTGGTCTG	rekombinante PCR
ClyA-bla7	GGCGAATGATTATGCACCCAGAAACGCTG	<i>in vitro</i> - Mutagenese
ClyA-bla8	CAGCGTTTCTGGGTGCATAATCATTGCGC	<i>in vitro</i> - Mutagenese
ClyA 6	GACATTGACGCATCCCG	Sequenzierung
ClyA 8	CAGACCTTTGATGAAACC	Sequenzierung
ClyA 28	CGACGACGCTCATCCAGC	Sequenzierung
ClyA-GV1	GTTGTAAAACAGGAATTCCATTACAATTTA	PCR
pACYC-bla- GV1	CTCAAGGGCATCGGTGCGACTTGGTC	PCR
5' PRO Tet- Seq Primer	CACATCAGCAGGACGCACTGAC	Sequenzierung
3' PRO Tet- Seq Primer	CGCTCGCCGCAGCCGAAC	Sequenzierung

1.6 Antikörper

Tab. 5: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Bezeichnung	Zielprotein	Eigenschaften	Referenz
Ak1 _{ClyA}	ClyA	polyklonales Kaninchenserum	Ludwig et al., 2004
Ak2 (Anti-Kaninchen IgG)	Kaninchen- Immunglobulin G (IgG)	polyklonales Ziegen Serum; Meerrettich-Peroxidase- konjugiertes Anti- Kaninchen IgG	(Jackson Immuno Research)

1.7 Rekombinante Proteine

In dieser Arbeit wurden folgende rekombinante Proteine verwendet:

Untersucht wurden die von den pAL201-Derivaten kodierte ClyA-Deltionsmutanten bzw. ClyA-Substitutionsmutanten (ClyA_{Δ2-5}, ClyA_{Δ6-10}, ClyA_{Δ2-10}, ClyA_{Δ2-15}, ClyA_{Δ2-20}, ClyA_{Δ6-15}, ClyA_{Δ11-15}, ClyA_{Δ11-20}, ClyA_{Δ16-20}, ClyA_{Δ16P}) sowie die ClyA-Bla-Fusionsproteine der pACYC184- und pPROTet.E133-Derivate.

1.8 Enzyme

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme aufgeführt:

DNase I (Amersham Biosciences), Lysozym (Sigma-Aldrich), RNase (DNase frei, Roche), Restriktionsenzyme (Biolabs), Deep Vent_R DNA Polymerase (New England Biolabs), *Pwo*-DNA-Polymerase (Peqlab), *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene), T4-DNA-Ligase (Roche).

1.9 Sonstige Reagenzien und Materialien

An dieser Stelle sind weitere in der Arbeit benötigte Reagenzien und Materialien zusammengefasst:

Blottingpapier (GB002/GB005, Schleicher & Schuell BioScience), *PROTet 6x HN Bacterial Expression System* (BD Biosciences), *QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit*

(Stratagene), Dialyseschläuche (*SERVAPOR dialysis tubing* (16 mm) SERVA), *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (Amersham Biosciences), *WESTRAN PVDF Protein Transfer and Sequencing Membrane* (Schleicher & Schuell BioScience), *Silver Staining Kit* (Pharmacia Biotech), *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen), *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), *MinElute Reaction Cleanup Kit* (Qiagen), Ultrafiltrationseinheiten (*Vivaspin 4 ml Concentrator (Membrane 10.000 MWCO PES*, Vivascience), *DC Protein Assay Kit II* (BioRad), dNTP-Mix (Roti-Mix PCR 3, Roth), Bacto-Tryptone / Bacto-Yeast-Extract / Agar (Becton Dickinson).

1.10 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden mit dem jeweils höchsten Reinheitsgrad von den Firmen Amersham, Applichem, BD Biosciences, J. T. Baker, KMF optiChem, Merck, Roth, Sigma-Aldrich bezogen. Bei spezifischen Substanzen ist der Hersteller jeweils gesondert im Text aufgeführt.

1.11 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden verwendet:

Plasmidisolierung nach Schnelllysatzmethode

Lösung I:

25 mM Tris-HCl pH 8.0

50 mM Glucose

10 mM Na-EDTA

Lösung II:

0.2 N NaOH

1.0% SDS

3 M Na-Acetat pH 4.8

RNase (500 ng/μl)

Agarosegel-Elektrophorese

10× TBE-Puffer:

900 mM Tris

900 mM Borsäure

25 mM Na-EDTA

Stoppuffer:

0.001% (w/v) Bromphenolblau

50% (w/v) Saccharose

0.25 mM Na-EDTA

Herstellung kompetenter Zellen

50 mM CaCl₂

50 mM CaCl₂/20% (v/v) Glycerin

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Trenngelen (10.0%/12.5%):

1M Tris-HCl pH 8.8	11.2 ml
Acrylamid-4K-Lösung	10.0 ml/12.5 ml
10% (w/v) SDS	0.6 ml
10% (w/v) APS	0.1 ml
TEMED	0.025 ml
A. dest.	8.1 ml/5.6 ml

Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Sammelgelen:

1M Tris-HCl pH 6.8	1.7 ml
Acrylamid-4K-Lösung	1.25 ml
10% (w/v) SDS	0.2 ml
10% (w/v) (APS)	0.05 ml
TEMED	0.025 ml
A. dest.	7.0 ml

1× Probenpuffer:

20 mM Tris-HCl pH 6.8

10% Glycerin

5% (v/v) β -Mercaptoethanol

2% (w/v) SDS

0.05% (w/v) Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer:

350 mM Glycin

50 mM Tris

1 mM SDS

Coomassie-Blue-Färbung

Färbelösung:

0.125% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

50% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung I:

50% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung II:

5% (v/v) Methanol

7.5% (v/v) Essigsäure

Sibernitrat-Färbung (Pharmacia Biotech)

Lösung 1:

Ethanol 100 ml

Eisessig 25 ml

A. dest. ad 250 ml

Lösung 2:

Ethanol	75 ml
Glutaraldehyd (25% w/v)	1.25 ml
Natriumthiosulfat (5% w/v)	10 ml
Na-Acetat	17 g
A. dest.	ad 250 ml

Lösung 3:

Silbernitrat (2,5% w/v)	25 ml
Formaldehyd (37% w/v)	100 µl
A. dest.	ad 250 ml

Lösung 4:

Natriumcarbonat	6.25 g
Formaldehyd (37% w/v)	50 µl
A. dest.	ad 250 ml

Lösung 5:

Na-EDTA	3.65 g
A. dest.	ad 250 ml

Lösung 6:

Glycerin (100%)	20 ml
Ethanol	150 ml
A. dest.	ad 500 ml

Westernblot mit PVDF-Membranen

Methylgrün-Lösung:

125 mM Tris-HCl pH 6.8

20% (v/v) Glycerin

1% (w/v) Methylgrün

10× TBS:

100 mM Tris-HCl pH 7,5

1.5 M NaCl

Tris-Glycin-Puffer pH 8.3:

25 mM Tris

192 mM Glycin

10% (v/v) Methanol

Waschpuffer:

1× TBS (konventioneller Blot)

1× TBS/0.1% (v/v) Tween 20 (ECL-Blot)

Blockpuffer:

Konventioneller Blot: 1× TBS/2% (w/v) BSA

ECL-Blot: 1× TBS/0.1% (v/v) Tween 20/5% (w/v) *blocking agent* (Amersham)

0.3% (w/v) Chloronaphtol-Lösung (konventioneller Blot):

Chloronaphtol 10 mg

Methanol 3.3 ml

Färbelösung (konventioneller Blot):

1× TBS 46.65 ml

30% (v/v) Wasserstoffperoxid 16.65 µl

0.3% (w/v) Chloronaphtol-Lösung 3.3 ml

Isolierung der inneren und äußeren Membran

Saccharose-Tris-Lösung:

0.75 M Sucrose

10 mM Tris-HCl pH 7.8

1.5 mM Na-EDTA pH 8.0

5 mM Na-EDTA pH 8.0

Saccharose/Na-EDTA-Lösungen:

55% (w/w) Saccharose/5 mM Na-EDTA pH 8.0

50% (w/w) Saccharose/5 mM Na-EDTA pH 8.0

45% (w/w) Saccharose/5 mM Na-EDTA pH 8.0

40% (w/w) Saccharose/5 mM Na-EDTA pH 8.0

35% (w/w) Saccharose/5 mM Na-EDTA pH 8.0

30% (w/w) Saccharose/5 mM Na-EDTA pH 8.0

25% (w/w) Saccharose/5 mM Na-EDTA pH 8.0

Isolierung periplasmatischer und intrazellulärer Proteine

Schockpuffer:

30 mM Tris-HCl pH 8.0

20% Sucrose

0.5 M Na-EDTA pH 8.0

10 mM Tris-HCl pH 8.0

Weitere Puffer und Lösungen

10× TE-Puffer pH 8.0:

100 mM Tris-HCl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)

PBS-Puffer:

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2.0 mM KH₂PO₄

2 Methoden

2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*, die für Spaltungen mit Restriktionsenzymen und PCR-Ansätze benötigt wurde, erfolgte mittels alkalischer Lyse (Kraft et al., 1988). Dazu wurde eine Bakterienkolonie in 5 ml 2× YT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1.4 ml der Bakterienkultur in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, bei 13000 rpm (2 min) zentrifugiert und der Überstand quantitativ entfernt. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µl eiskalter Lösung I, der man kurz zuvor 4 mg/ml Lysozym (Muramidase) zugesetzt hatte, aufgenommen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Gemisch wurden 200 µl frisch hergestellte Lösung II zugegeben. Durch vorsichtiges Schwenken des Eppendorf-Gefäßes entstand ein klares Lysat. Nach Inkubation des Ansatzes für 5 min auf Eis erfolgte die Zugabe von 150 µl eiskaltem 3 M Na-Acetat pH 4.8, dann wurde gemischt und erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) wurde die Plasmid-DNA von chromosomaler DNA und ausgefallenen Proteinen getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1/1) versetzt, um störende Proteinreste zu entfernen. Die Phasentrennung wurde durch Schütteln und anschließende Zentrifugation (13000 rpm, 4 min) beschleunigt. Danach wurde die obere wässrige Phase mit der Plasmid-DNA vorsichtig abgezogen, in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 1 ml Ethanol p.a. versetzt, wodurch die Plasmid-DNA präzipitierte. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) die ausgefällte DNA sedimentiert, mit Ethanol p.a. gewaschen und für 15 min in der Vakuumzentrifuge (Eppendorf) getrocknet. Abschließend wurde die getrocknete Plasmid-DNA in 20 µl A. dest. mit RNase (25 ng/µl Endkonzentration) aufgenommen und bei -20°C gelagert. Um hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierungsreaktionen (III 2.8) zu erhalten, wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) verwendet.

2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung erfolgte über Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei entspricht eine bei 260 nm gemessene optische Dichte von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook et al., 1989). Anhand der gemessenen Extinktion und des Verdünnungsfaktors wurde die DNA-Konzentration der Lösung automatisch vom Photometer Ultrospec 3100 pro (Amersham) berechnet.

2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dazu wurden Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 100 µl hergestellt:

100 ng Matrizen-DNA

10 µl 10× ThermoPol-Buffer (Biolabs)

2 µl 10 mM dNTP-Mix (Endkonzentration 200 µM; Roti-Mix-PCR 3, Roth)

100 pmol Oligonukleotid X

100 pmol Oligonukleotid Y

2 U Deep Vent_R DNA Polymerase (Biolabs)

Die Vervielfältigung der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des Thermocyclers GeneAmp PCR-System 2400 (Applied Biosystems) durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierung von 3 min bei 94°C (*Delay*), folgten 30 Zyklen, in denen die DNA-Fragmente jeweils für 30 sec bei 94°C denaturiert, für 30 sec bei 50°C mit den Oligonukleotiden hybridisiert (*Annealing*) und für 1 min/kb bei 72°C durch die DNA-Polymerase erneut synthetisiert (*Extension*) wurden. Die PCR wurde durch einen finalen Elongationsschritt (*Delay*) für 3 min bei 72°C abgeschlossen.

2.4 Restriktion von DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen, wobei in allen Spaltungsansätzen *One-Phor-All-Buffer* (Amersham) als Restriktionspuffer verwendet wurde. Hierzu wurde ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl hergestellt:

2 µl Plasmid-DNA (ca. 0.5 µg)
1 µl 10× *One-Phor-All-Buffer*
1 µl Restriktionsendonuklease X (5-20 U)
optional 1 µl Restriktionsendonuklease Y (5-20 U)
A. dest. ad 10 µl

Die Inkubation des Restriktionsansatzes erfolgte im Thermomixer (Eppendorf) bei einer Temperatur von 37°C für 1 bis 3 h.

2.5 Ligation von DNA

Für Klonierungen eingesetzte DNA wurde mit der T4 DNA-Ligase (Roche) ligiert. Da die Funktionalität der T4 DNA-Ligase ATP-abhängig ist, wurde ein 10× Ligasepuffer verwendet, der eine ATP-Endkonzentration von 1 bis 5 mM aufwies. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Gesamtvolumen von 15 µl für 16 h bei 4°C inkubiert. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den Herstellerangaben.

2.6 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für Transformationen wurden kompetente Zellen der *E. coli*-Stämme DH5α und BL21PRO nach dem modifizierten Protokoll von Hanahan et al. (1983) hergestellt. Dazu wurde eine Übernachtskultur in 30 ml 2× YT-Medium 1:100 verdünnt und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0.7 bis 0.8 inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5000× g, 10 min, 4°C) und einmal mit 10 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung gewaschen. Dann wurden die Zellen in 15 ml 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert, erneut sedimentiert (5000× g, 10 min, 4°C) und in 3 ml 50 mM CaCl₂/20% Glycerin aufgenommen. Die Lagerung erfolgte in 200 µl-Aliquots bei -80°C.

2.7 Transformation von *E. coli*

Das Transformationsprotokoll wurde in leicht modifizierter Form von Sambrook et al. (1989) übernommen. Ein 200 µl-Aliquot kompetenter Zellen (III 2.1.6) wurde mit dem gesamten Ligationsansatz (III 2.5) oder 0.1 bis 0.5 µg gereinigter Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 3 min bei 43°C und eine erneute

dreißigminütige Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml 2× YT-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Das Ausplattieren erfolgte auf antibiotikumhaltige 1× YT-Agarplatten, die über Nacht bei 37°C bebrütet wurden.

2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte bei einem kommerziellen Anbieter (SeqLab, Göttingen).

Dazu wurde folgender Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 7 µl für die Sequenzierungsreaktion hergestellt:

0.6 µg Plasmid-DNA

20 pmol Sequenzierungs-Oligonukleotid

Für die Analyse der Sequenzen stand das Programm Chromas 1.62 (Technelysium Pty. Ltd.) zur Verfügung.

2.9 Agarosegel-Elektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1%igen horizontalen Agarosegelen bei einer Spannung von 200 V. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose im Elektrophoresepuffer aufgekocht und gelöst. Als Elektrophoresepuffer wurde 1× TBE verwendet. Als Molekulargewichtsstandard diente mit *EcoRI* verdaute SPP1-DNA (8576 - 81 bp, Marker VII, Roche). Die Agarosegele wurden mit 0.1 bis 0.5 µg/ml Ethidiumbromid angefärbt und die DNA im UV-Licht sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationssystems von Cybertech.

2.10 Verfahren der rekombinanten PCR zur Fusion von DNA-Sequenzen

Die Methode der rekombinanten PCR (Higuchi, 1990) ermöglichte eine direkte Fusion zweier beliebiger DNA-Sequenzen ohne Einführung einer Restriktionsschnittstelle. In diesem PCR-Verfahren (Abb. 3) wurden vier Oligonukleotide benötigt (Oligonukleotid A und B zur Amplifikation des ersten Fragments und Oligonukleotid C und D zur Amplifikation des zweiten Fragments), wobei zwei Oligonukleotide (Oligonukleotid B und C) so generiert wurden, dass diese sich in mehreren Basenpaaren überlappten. Unter Verwendung einer

DNA-Polymerase mit *proofreading*-Aktivität wurden in zwei voneinander getrennt ablaufenden Reaktionsansätzen je eine PCR mit den Oligonukleotiden A und B sowie den Oligonukleotiden C und D durchgeführt.

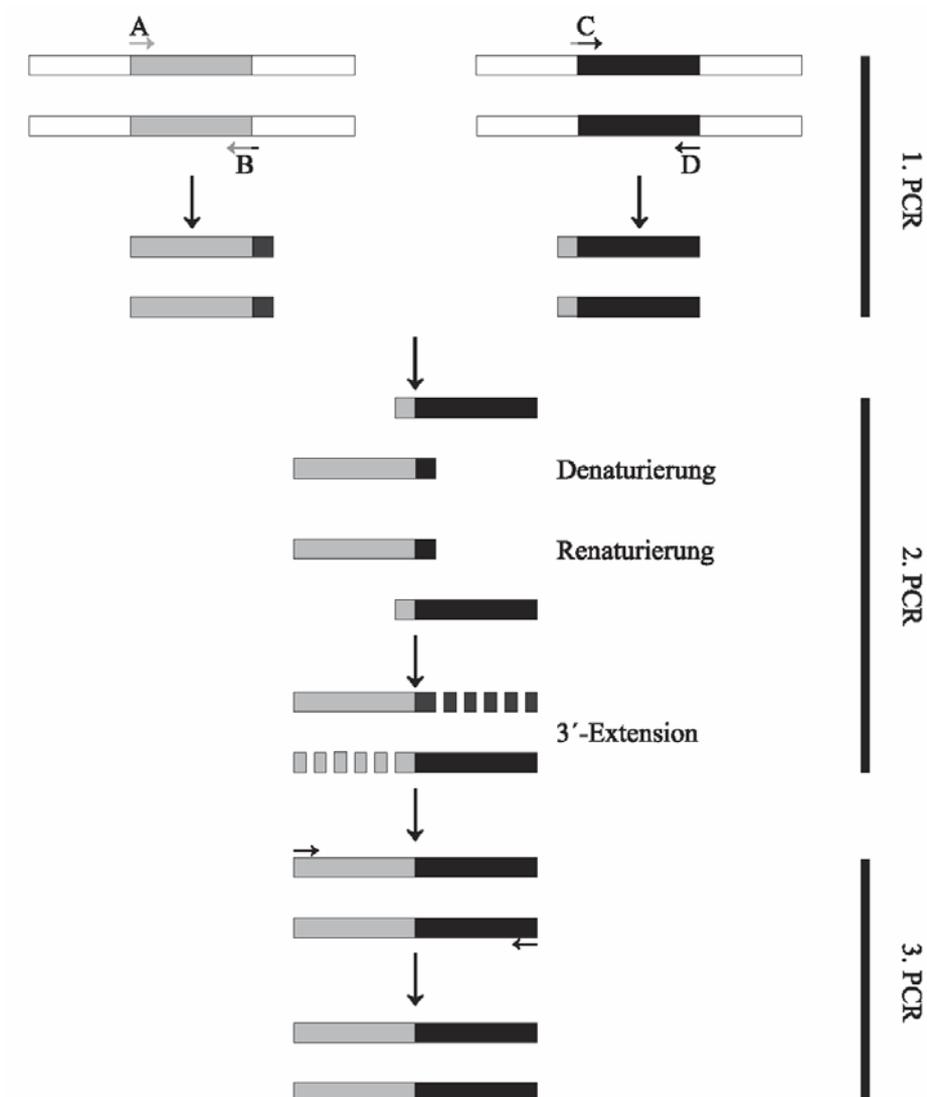


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung des rekombinanten PCR-Verfahrens (nach Higuchi, 1990).

Dazu wurde folgender Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 100 μ l angesetzt:

1 μ l Matrizen-DNA

10 μ l 10 \times Reaktionspuffer komplett für *Pwo*-DNA-Polymerase (Peqlab)

2 μ l 10 mM dNTP-Mix

1 μ l Oligonukleotid A bzw. C (je 1 μ g/ μ l)

1 μ l Oligonukleotid B bzw. D (je 1 μ g/ μ l)

2 μ l *Pwo*-DNA-Polymerase (1 U/ μ l, Peqlab)

83 μ l A. dest

Mit diesem Reaktionsansatz wurde eine PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. initiale Denaturierung 94°C für 3 min
2. 30 Zyklen Denaturierung 94°C für 30 sec
Annealing 55°C für 30 sec
Extension 72°C für 45 sec/kb
3. finale Elongation 72°C für 3 min

Durch Verwendung des *QIAquick-PCR Purification-Kits* (Qiagen) wurden die entstandenen PCR-Produkte aufkonzentriert und von PCR-Oligonukleotiden, Salzen sowie der *Pwo*-DNA-Polymerase gereinigt. Danach wurden die DNA-Fragmente miteinander gemischt und eine zweite PCR durchgeführt (Abb. 3), in der dem Reaktionsansatz keine Oligonukleotide zugeführt wurden. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 100 µl hergestellt:

- 10 µl 10× Reaktionspuffer komplett für *Pwo*-DNA-Polymerase (Peqlab)
- 2 µl 10 mM dNTP-Mix
- 2 µl *Pwo*-DNA-Polymerase (1 U/µl, Peqlab)
- 5 µl PCR-Produkt A/B (aus PCR-Ansatz 1)
- 5 µl PCR-Produkt C/D (aus PCR-Ansatz 1)
- 76 µl A. dest

Mit diesem Reaktionsansatz wurde eine PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. initiale Denaturierung 94°C für 3 min
2. ein Zyklus Denaturierung 94°C für 30 sec
Annealing 55°C für 30 sec
Extension 72°C für 45 sec/kb
3. finale Elongation 72°C für 3 min

Hier erfolgte die Anlagerung (*Annealing*) der PCR-Fragmente in den überlappenden DNA-Bereichen und anschließend eine 3'-Verlängerung (*Extension*) der DNA-Einzelstränge.

In einer direkt anschließenden PCR (Abb. 3) wurden die DNA-Fragmente des zweiten PCR-Ansatzes vervielfältigt. Hierzu wurden dem Reaktionsansatz die Oligonukleotide A und D (jeweils 1 µl der Oligonukleotide in einer Konzentration von 1 µg/µl) zugegeben und die Amplifizierung unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. initiale Denaturierung 94°C für 3 min
2. 30 Zyklen Denaturierung 94°C für 30 sec
Annealing 55°C für 30 sec
Extension 72°C für 45 sec/kb
3. finale Elongation 72°C für 3 min

Die erstellten PCR-Fragmente wurden durch Verwendung des *QIAquick-PCR Purification-Kits* (Qiagen) gereinigt und im Anschluß einer präparativen Agarosegel-Elektrophorese unterzogen (III 2.11)

2.11 Präparative Agarosegel-Elektrophorese

Die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch direkte Exzision. Hierbei wurden die betreffenden DNA-Fragmente mittels Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und durch Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) aufgereinigt.

2.12 Klonierung von PCR-Fragmenten in Plasmide und Vektoren

PCR-Produkt und Plasmid-DNA wurden in zwei separaten Spaltungsansätzen mit identischen Restriktionsenzymen geschnitten (III 2.4). Anschließend wurden beide Restriktionsansätze jeweils über eine Säule des *Minelute-Reaction-Cleanup-Kits* (Qiagen) gereinigt, die DNA in einem Volumen von 10 µl A. dest. eluiert und in die Ligation (III 2.5) eingesetzt.

2.13 *in vitro*-Mutagenese zur Herstellung von Gen-Mutationen

Das Verfahren der *in vitro*-Mutagenese ermöglichte es, gezielte Mutationen innerhalb eines Gens einzuführen. Durch Verwendung komplementärer Mutageneseoligonukleotide, welche die gewünschte Mutation tragen, sowie des *QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene) konnten mittels PCR spezifische Deletionen bzw. Substitutionen eingeführt werden (Abb. 4).

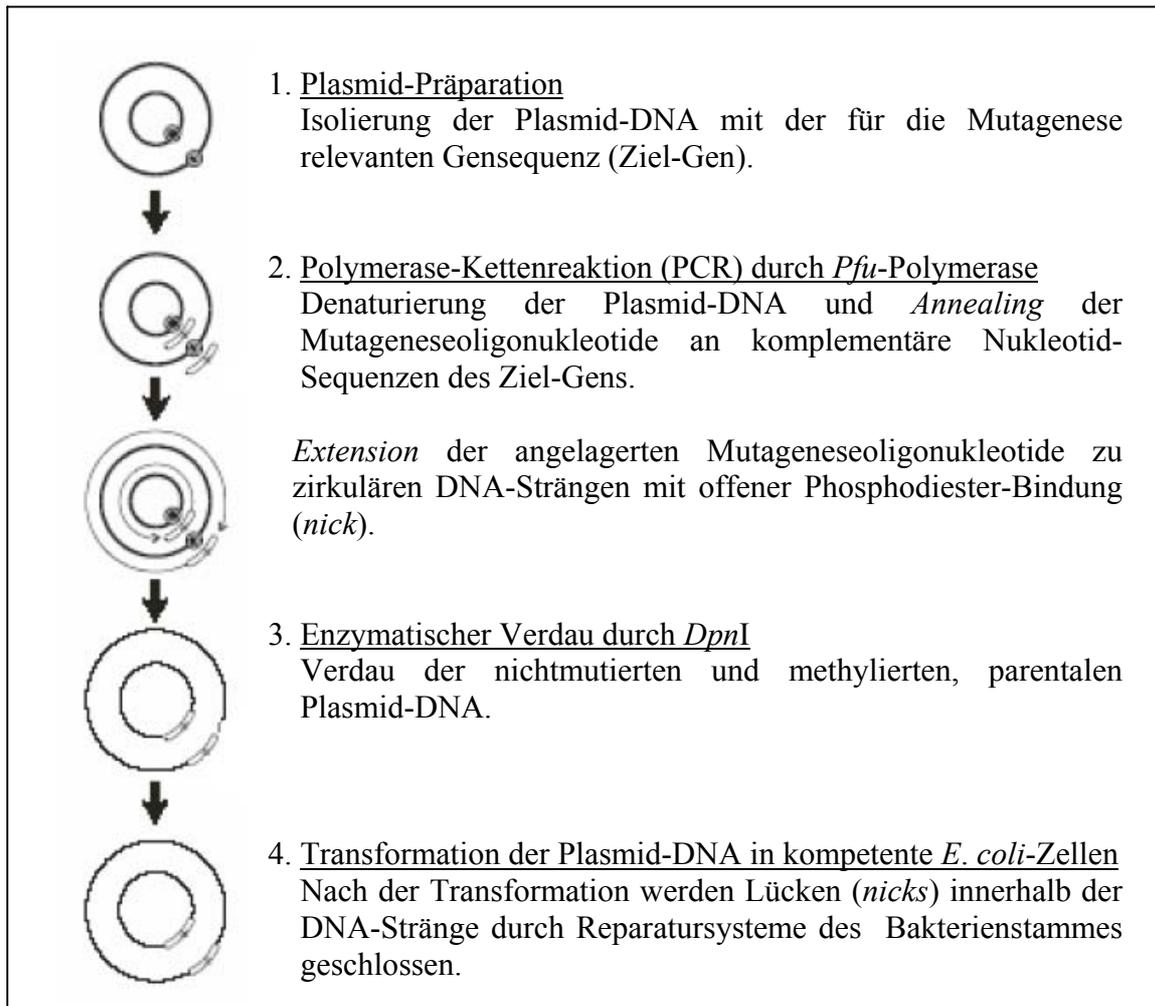


Abb. 4: Schematische Übersicht über die *in vitro*-Mutagenese (Stratagene).

Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 μl hergestellt:

- 1 μl (5-50 ng) Matrizen-DNA
- 5 μl 10 \times *Pfu*-Polymerasen-Puffer
- 1 μl 10 mM dNTP-Mix
- 1.25 μl Mutageneseoligonukleotid I (je 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- 1.25 μl Mutageneseoligonukleotid II (je 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- 1 μl *Pfu*-DNA-Polymerase (2.5 U/ μl)
- 39.5 μl A. dest

Mit diesem Reaktionsansatz wurde eine PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. initiale Denaturierung 95°C für 3 min
2. 18 Zyklen Denaturierung 95°C für 30 sec
Annealing 55°C für 1 min
Extension 68°C für 2 min/kb
3. finale Elongation 68°C für 3 min

Im Anschluß erfolgte der enzymatische Verdau der parentalen, methylierten Matrizen-DNA durch *DpnI*, bei dem der PCR-Ansatz nach Zugabe von 0.5 µl *DpnI* (20 U/µl) für 1 h bei 37°C inkubiert wurde. Abschließend wurden die mutagenisierten Plasmide in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (III 2.7). Durch Plasmid-DNA-Isolierungen (III 2.1) und anschließenden Restriktionsreaktionen (III 2.4) sowie Sequenzierungsanalysen (III 2.8) wurde jede durchgeführte *in vitro*-Mutagenese auf Richtigkeit überprüft.

2.14 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese erfolgt die Trennung der Proteine ausschließlich aufgrund ihrer Molekülgröße, da die Anlagerung des Detergenz SDS an die Proteine deren Ladungsunterschiede aufhebt. Die SDS-PAGE wurde in 10.0%igen bzw. 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgelen bei einer Spannung von 150 V nach dem Protokoll von Laemmli (1970) durchgeführt. Die Bestimmung der molekularen Masse der Proteine erfolgte mit Hilfe bekannter Größenstandards der Firma BioRad. Als Größenstandard dienten der *Precision Plus Protein Standard All Blue* (10-250 kDa) sowie der *SDS-PAGE Molecular Weight Standard Broad Range* (6.5-200 kDa). Die Elektrophorese wurde beendet, nachdem die Bromphenolblau-Front der Markerspür das untere Gelende erreicht hatte. Im Anschluß wurden die SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie Brilliant Blue R-250-Färbelösung für 1 h gefärbt und mit Entfärbelösung I für eine Stunde sowie mit Entfärbelösung II über Nacht entfärbt. Als Alternative zur Coomassie-Blue-Färbung wurde die Silbernitrat-Färbung nach dem Protokoll von Pharmacia Biotech (Nielsen und Brown, 1983) durchgeführt, wodurch die Sensitivität der Anfärbung um ein Vielfaches verstärkt werden konnte. Angefärbte Proteingele wurden luftblasenfrei zwischen Cellophan-Folie gelegt und im Geltdrockner (BioRad) bei 60 bis 80°C für 2 h getrocknet. Für Westernblot-Analysen wurde unmittelbar vor Ende der Elektrophorese 0.5 bis 5.0 µl Methylgrün-Lösung in jede Probenspur des

Proteingels gegeben und die elektrophoretische Auftrennung solange fortgesetzt, bis die Methylgrün-Front die Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte.

2.15 Westernblot-Analyse

Für die Westernblot-Analyse (modifiziert nach Towbin et al., 1979) wurden die Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung (III 2.14) durch das *Semi-dry-Blot*-Verfahren mit dem *Semi-dry-Blotter* (Perfect blue, Peqlab) auf eine Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Membran (Schleicher & Schuell BioSciences) transferiert. Für den *Semi-dry*-Proteintransfer wurde Tris-Glycin-Puffer als kontinuierlicher Transferpuffer gewählt, in dem die zuvor mit Methanol p.a. abgesättigte PVDF-Membran für ca. 10 min äquilibriert wurde. Der Blot-Aufbau erfolgte nach dem Protokoll von Schleicher & Schuell, wobei das verwendete Filterpapier (Schleicher & Schuell) und die PVDF-Membran zuvor auf die Größe des SDS-Polyacrylamid-Trenngels zugeschnitten wurden:

1. Platinanode
2. drei Lagen mit Tris-Glycin-Puffer getränktes Filterpapier GB004
3. eine Lage mit Tris-Glycin-Puffer getränktes Filterpapier GB002
4. PVDF-Membran
5. in Tris-Glycin-Puffer getauchtes SDS-Polyacrylamidgel, von dem zuvor das Sammelgel und das überschüssige Trenngel entfernt wurden.
6. eine Lage mit Tris-Glycin-Puffer getränktes Filterpapier GB002
7. drei Lagen mit Tris-Glycin-Puffer getränktes Filterpapier GB004
8. Stahlkathode

Der Transfer der Proteine wurde für 30 min bei einer von der Größe der Membran abhängigen Spannung (3.5 mA/cm^2) durchgeführt.

2.15.1 Konventioneller Westernblot

Nach Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese in $1\times$ TBS/2% BSA-Blockpuffer für 1 h inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Im Anschluß erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 in $1\times$ TBS-Puffer über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubation wurde die PVDF-Membran zweimal mit $1\times$ TBS-Puffer gespült, anschließend einmal für 15 min und dreimal für je 5 min mit $1\times$ TBS-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper

zu entfernen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 (in 1× TBS-Puffer) für 3 h bei Raumtemperatur. Die PVDF-Membran wurde erneut zweimal mit 1× TBS-Puffer gespült und anschließend einmal für 15 min sowie dreimal für je 5 min mit 1× TBS-Puffer gewaschen, bevor die Detektion mittels Färbelösung erfolgte. Nach einer Inkubationszeit von maximal 5 min wurde die Färbereaktion durch Zugabe von A. dest gestoppt.

2.15.2 Westernblot mit dem *ECL Plus Western Blotting Detection Kit* (Amersham Biosciences)

Im Anschluß an den *Semy-dry*-Proteintransfer wurde die PVDF-Membran in Blockpuffer (5.0% (w/v) *blocking agent* in 1× TBS/0.1% (v/v) Tween 20) abgesättigt. Nach einstündiger Inkubation wurde die Membran mit dem Waschpuffer (1× TBS/0.1% (v/v) Tween 20) zunächst zweimal gespült und anschließend einmal für 15 min und zweimal für 5 min gewaschen. Als nächster Schritt erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers in einer Verdünnung von 1:20000 in 1× TBS/0.1% (v/v) Tween 20. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurde unspezifisch gebundener Antikörper durch mehrere Waschvorgänge mit dem Waschpuffer (1× TBS/0.1% (v/v) Tween 20) entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe des sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörpers in einer Verdünnung von 1:50000 (in 1× TBS/0.1% (v/v) Tween 20). Nach dreistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die PVDF-Membran erneut mehrmals mit dem Waschpuffer (1× TBS/0.1% (v/v) Tween 20) gewaschen und für den Detektionsvorgang auf eine Frischhaltefolie gelegt. Die Detektion des sekundären Antikörpers erfolgte durch Überschichtung der Membran mit einem Gemisch aus Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:40 aus dem *ECL Plus Western Blotting Detection Kit* für max. 5 min. Danach wurde die Membran in Frischhaltefolie eingepackt. In der Dunkelkammer wurden ECL Hyperfilme für unterschiedliche Zeiten (von 1 sec bis zu 15 sec) in einer Röntgenfilmkassette auf die Membran gelegt und anschließend in der Entwicklermaschine entwickelt.

2.16 Herstellung gesamtzellulärer Lysate von *E. coli*-Zellen

2.16.1 Herstellung gesamtzellulärer Lysate von *E. coli*-Zellen durch Ultraschallbehandlung

Für die Herstellung der Lysate von *E. coli*-Zellen wurde eine *E. coli*-Übernachtskultur in 1 ml-Aliquots in Eppendorf-Gefäße portioniert und in der Tischzentrifuge (Eppendorf) sedimentiert (13000 rpm, 5 min), wonach der Überstand quantitativ entfernt wurde. Die Zellpellets wurden zwei- bis dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und abschließend in je 100 µl PBS-Puffer resuspendiert. Danach wurden die Zellen in einem Branson B12 Ultraschallgerät (Heinemann) zehnmal für 15 sec bei 4°C auf Einstellung 7 beschallt, so dass mikroskopisch keine intakten Zellen mehr nachgewiesen werden konnten. Anschließend wurden die Bakterienlysate mit gleichem Volumen 2× Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 99°C erhitzt und abzentrifugiert (13000 rpm, 5 min). In dieser Form wurden die Bakterienlysate für SDS-PAGE-Analysen (III 2.14) bzw. für Westernblot-Analysen (III 2.15) verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.16.2 Herstellung gesamtzellulärer Lysate von *E. coli*-Zellen durch Behandlung mit Lysozym und Einfrieren/Auftauen

Um Lysate von *E. coli*-Zellen herzustellen, wurde 1 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in ein Eppendorf-Gefäß abgefüllt und in der Tischzentrifuge zentrifugiert (13000 rpm, 5 min). Danach wurde der Überstand quantitativ entfernt und die Zellpellets in PBS-Puffer gewaschen und resuspendiert. Nach Zugabe von 0.01 Vol. frisch angesetzter Lysozym-Lösung, welche die glykosidische Bindung des Mureins zwischen den N-Acetyl-Muraminsäure- und N-Acetylglucosaminbausteinen spaltet, erfolgte eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Durch sechsmaliges Einfrieren (-75°C, 15 min) und Auftauen (30°C, 3 min) wurde die Zellwand aufgebrochen und die Bakteriensuspension durch freiwerdende chromosomale DNA deutlich zähflüssig. Zum Abbau der chromosomalen DNA wurde den Bakterienlysaten je 0.01 Vol. 1 M MgCl₂ sowie 0.01 Vol. DNase I (10 U/µl) zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 Vol. 2× Probenpuffer. Die Lysate wurden erhitzt (99°C, 5 min) und zentrifugiert (13000 rpm, 5 min) und konnten in der SDS-PAGE bzw. im Westernblot analysiert oder bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt werden.

2.17 Genexpression zur Synthese rekombinanter Proteine in *E. coli*

2.17.1 Genexpression mit pACYC184-Vektoren

Die Analyse der von *E. coli*-Stämmen mit pACYC184-Vektoren gebildeten rekombinanten Proteine erfolgte durch SDS-PAGE, in der die Zellaufschlüsse der entsprechenden Bakterienkulturen verwendet wurden. Hierzu wurde eine Bakterienkolonie in 5 ml 2× YT-Medium angeimpft und unter Selektionsdruck über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Übernachtskultur in 10 ml 2× YT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum 1:100 verdünnt und bis zur spät-logarithmischen Wachstumsphase (optische Dichte bei 600 nm [OD₆₀₀] von 0.9-1.0) bei 37°C und 200 rpm im Inkubationsschüttler (Infors) inkubiert. Danach wurden 1 ml-Aliquots der Bakterienkultur in Eppendorf-Gefäße überführt und die *E. coli*-Zellen durch Zentrifugation (13000 rpm, 3 min) sedimentiert, wonach der Überstand quantitativ entfernt wurde. Die Zellpellets wurden in je 100 µl PBS-Puffer aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung (zehnmals für 15 sec bei 4°C, Einstellung 7) lysiert. Anschließend wurden die Bakterienlysate mit gleichem Volumen 2× Probenpuffer versetzt, erhitzt (99°C, 5 min) und für 5 min in der Tischzentrifuge (13000 rpm) abzentrifugiert.

2.17.2 Genexpression mit pPROTet.E133-Vektoren

Für die Genexpression zur Synthese rekombinanter Proteine mit dem pPROTet.E.133-Vektor (BD Biosciences) wurden 5 ml 2× YT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum sowie einer einzelnen Bakterienkolonie versetzt und über Nacht unter Schütteln bei 37°C und 200 rpm bebrütet. Es wurden 100 ml 2×YT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit 2 ml der Übernachtskultur versetzt und unter Schütteln bei 37°C bis zur früh-logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ von 0.5-0.6) inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Synthese des entsprechenden rekombinanten Proteins durch Zugabe von Anhydrotetracyclin in den Endkonzentrationen von 0.1 ng/ml bis 100 ng/ml und die weitere Anzucht der Kultur für insgesamt 8 h unter Schütteln bei 37°C. Zu verschiedenen Zeitpunkten (nach 0, 20, 40, 60, 80, 100 min, sowie nach 2, 4, 6, 8 h) wurden der induzierten Bakterienkultur 1 ml-Aliquots entnommen, die Zellen sedimentiert (13000 rpm, 5 min), der Überstand entfernt und die Zellpellets bei -20°C gelagert. Für die Gesamtprotein-Analyse wurden die gefrorenen Zellpellets aufgetaut und in 100 µl PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Ultraschallgerät zehnmals für 15 sec bei 4°C (Einstellung 7)

beschallt. Nach Sedimentation der Zellreste (13000 rpm, 5 min) wurde der Überstand abgenommen, mit gleichem Volumen 2× Probenpuffer aufgefüllt, bei 99°C erhitzt (5 min) und bei 13000 rpm (5 min) zentrifugiert. Anschließend erfolgte die direkte Analyse der Zellaufschlüsse in der SDS-PAGE oder die Lagerung der Proteinproben bei -20°C.

2.17.3 Genexpression mit dem Plasmid pAL201

Zur Überprüfung der Genexpression mit dem Plasmid pAL201 wurden 1.3 ml Übernachtskultur durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) sedimentiert und der Überstand entfernt. Danach wurde das Bakterienpellet in 650 µl 1× Probenpuffer resuspendiert und die Bakteriensuspension zehnmal für 15 sec bei 4°C mit dem Ultraschallgerät sonifiziert. Das Bakterienlysat wurde im Thermomixer (Eppendorf) bei 99°C für 5 min erhitzt und bei 13000 rpm zentrifugiert (5 min). Anschließend erfolgte die Analyse der gesamtzellulären Proteine durch SDS-PAGE. Alternativ zur beschriebenen Methode wurde die Bakteriensuspension direkt nach Zugabe von 1× Probenpuffer bei 99°C erhitzt und auf eine Ultraschallbehandlung verzichtet.

2.18 Isolierung periplasmatischer und intrazellulärer Proteine von *E. coli*

Die periplasmatischen und intrazellulären Proteine einer *E. coli*-Kultur wurden durch einen osmotischen Schock (Ludwig et al., 1999) isoliert. Dazu wurde eine Bakterienkolonie in 10 ml 2× YT-Medium gegeben und unter Selektionsdruck bei 37°C und 200 rpm im Inkubationsschüttler bebrütet. Nach Inkubation über Nacht wurden 1.3 ml Übernachtskultur in ein Eppendorf-Gefäß überführt, bei 7000 rpm zentrifugiert (5 min) und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde einmal mit 500 µl 10 mM Tris-HCl pH 8.0 gewaschen. Danach erfolgte die Aufnahme des Bakterienpellets in 500 µl Schockpuffer sowie 1 µl 500 mM Na-EDTA pH 8.0 (Endkonzentration 1 mM Na-EDTA) und anschließende Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min unter gelegentlichem Schwenken der Bakteriensuspension, wobei sich der Protoplast von der äußeren Zellmembran löste. Durch Zentrifugation (7000 rpm, 5 min) wurden die Zellen sedimentiert, vom Überstand quantitativ befreit und in 1.3 ml eiskaltem A. dest. resuspendiert. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis, in der es zum Aufbrechen der äußeren Membran und der Freisetzung der periplasmatischen Proteine in den Überstand kam, wurden die Sphäroplasten bei 13000 rpm sedimentiert (5 min) und auf Eis deponiert. 1 ml des Überstandes wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und zur

Präzipitation der darin enthaltenen periplasmatischen Proteine mit 111 μ l eiskalter Trichloressigsäure (10% [v/v] Endkonzentration) gemischt. Nach einstündiger Inkubation des Gemisches auf Eis erfolgte die Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) der präzipitierten Proteine, wonach der Überstand dekantiert wurde. Das Proteinpellet wurde einmal mit 500 μ l Aceton gewaschen und für 15 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Abschließend wurden die getrockneten periplasmatischen Proteine in 40 μ l 1 \times Probenpuffer und 0.5 μ l gesättigte Tris-Lösung gelöst und im Thermomixer bei 99°C erhitzt (5 min). Die Isolierung der intrazellulären Proteine aus den pelletierten Sphäroplasten erfolgte durch Zugabe von 650 μ l 1 \times Probenpuffer und Erhitzen bei 99°C (5 min).

2.19 Isolierung der inneren und äußeren Membran von *E. coli*

Die Isolierung der inneren und äußeren Membran von *E. coli* erfolgte modifiziert nach Osborn et al. (1972). Dazu wurde eine Übernachtskultur in 300 ml 2 \times YT-Medium mit Antibiotikum 1:10 verdünnt, bis zur logarithmischen Phase (OD_{600} von 0.8) bei 37°C unter Schütteln inkubiert und in der Sorvall RC 2-B-Zentrifuge (Du Pont) bei 8000 rpm (4°C, 10 min) sedimentiert, wonach die Überstände quantitativ entfernt wurden. Nach dem Zentrifugationsschritt erfolgte die weitere Durchführung des Versuches im Eisbad. Die Zellpellets wurden in 9 ml kalter Saccharose-Tris-Lösung resuspendiert und nach Zugabe von 1 ml Lysozym-Lösung (1 mg Lysozym in 1 ml Saccharose-Tris-Lösung) für 10 min auf Eis inkubiert. Unter leichtem Schwenken erfolgte die langsame, aber kontinuierliche Zugabe von 20 ml kalter 1.5 mM Na-EDTA pH 8.0-Lösung, die die Komplexbildung zweiwertiger Kationen innerhalb der Zellwand bewirkt und den Abbau der Mureinschicht durch Lysozym fördert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 50 ml-Greinerröhrchen verteilt und die Sphäroplasten durch Ultraschallbehandlung zwölfmal für 20 sec bei 4°C bis zur deutlichen Aufklärung der Bakteriensuspension lysiert. Nichtlysierte und intakte Zellen wurden in der Zentrifuge 5702R (Eppendorf) bei 4400 rpm und 4°C (7 min) abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen inneren und äußeren Membranen wurden in Polyallomer-röhrchen (für Ti 50.2 Rotoren) überführt, mit einem Gemisch aus Saccharose-Tris-Lösung (1 Vol.) und 1.5 mM Na-EDTA pH 8.0-Lösung (2 Vol.) aufgefüllt und mit Metallkappen fest verschlossen. Die Pelletierung der Membranen erfolgte bei 48000 rpm und 4°C für 2 h im Ti 50.2 Rotor (Beckmann) in der Ultrazentrifuge. Im Anschluß wurden die sedimentierten Membranen in 1 ml 25% (w/w) Saccharose/5 mM Na-EDTA pH 8.0 aufgenommen und auf einen Saccharose-Stufengradienten mit 5%iger Stufung (30-55% [w/w] Saccharose in 5 mM

Na-EDTA pH 8.0) appliziert. Der Gradient wurde in einem Beckmann SW 41 Rotor für 14 h bei 36000 rpm und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Danach wurden alle makroskopisch sichtbaren Fraktionen der äußeren und inneren Membran mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgezogen und in verschiedene Eppendorf-Gefäße überführt. Für SDS-PAGE-Analysen wurden jeweils 10 µl der Membranfraktion mit 10 µl 2× Probenpuffer versetzt und im Thermomixer (99°C, 5 min) erhitzt.

2.20 Präparative SDS-PAGE zur Isolierung rekombinanter Proteine von *E. coli*

In der präparativen Proteingel-Elektrophorese wurden die überproduzierten rekombinanten Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnitten. Dazu wurden 50 ml einer über Nacht inkubierten Bakterienkultur auf zwei 50 ml-Greiner Röhrchen verteilt, in der Zentrifuge bei 4400 rpm und 4°C (10 min) zentrifugiert und der Überstand quantitativ entfernt. Die pelletierten Zellen wurden anschließend in je 5 ml 10 mM Tris-HCl pH 8.0 aufgenommen und durch Behandlung mit Lysozym (1 mg/ml Endkonzentration) und mehrmaligen Einfrieren/Auftauen (III 2.16.2) lysiert. Der Abbau der chromosomalen DNA erfolgte durch 0.01 Vol. DNase I (10 U/µl) in Anwesenheit von 0.01 Vol. 1 M MgCl₂. Die Bakterienlysate wurden in Dialyseschläuche (16 mm) überführt und mittels Aquacide (Calbiochem) sowie gegebenenfalls unter Verwendung von Ultrafiltrationseinheiten (Vivaspin 4 ml Concentrator (Membrane 10000 MWCO PES, Vivascience) auf ein Gesamtvolumen von ca. 500 µl reduziert. Im Anschluß daran erfolgte die Zugabe von 1 Vol. nicht denaturierendem 1× Probenpuffer (ohne Zusatz von β-Mercaptoethanol und Bromphenolblau). Danach wurde die gesamte Lysatprobe auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12.5%) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde die Protein-Marker-Spur sowie die erste Spur mit den Lysatproteinen vom restlichen Gel getrennt und die Proteine dieser zwei Spuren durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (20 min) und Entfärbung mit Entfärbelösung I und II (jeweils 20 min) sichtbar gemacht. Der angefärbte Gelstreifen wurde an das ungefärbte Gelstück angelegt und als Marker verwendet. Auf diese Weise konnte aus dem ungefärbten Gel der Gelbereich herausgeschnitten werden, der im gefärbten Gelstreifen der Bande des überproduzierten rekombinanten Proteins entsprach. Der ausgeschnittene Gelbereich wurde mit dem Skalpell in kleine Gelstückchen zerschnitten, in zwei Eppendorf-Gefäße überführt und mit 10 mM Tris-HCl pH 8.0 überdeckt. Die anschließende Inkubation bei 4°C über Nacht führte zur Diffusion der rekombinanten Proteine aus dem Gel in den Tris-HCl-Puffer. Am folgenden Tag wurde der Überstand mit

den darin enthaltenen rekombinanten Proteinen abgezogen, mit 1 Vol. nicht denaturierendem 1× Probenpuffer (ohne Zusatz von β -Mercaptoethanol und Bromphenolblau) vermischt und durch eine weitere präparative SDS-PAGE erneut gereinigt. Durch den zusätzlichen Reinigungsschritt wurden die rekombinanten Proteine nahezu ganz von störenden Proteinnebenbanden getrennt. Optional konnte eine dritte präparative SDS-PAGE angeschlossen werden. Abschließend wurden den isolierten und in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 gelösten rekombinanten Proteinen Genapol X-080 (Fluka; 0.1% [v/v] Endkonzentration) zugesetzt. In dieser Form konnten die Proteine bei -20°C für spätere Tests an künstlichen Lipid-Bilayern gelagert werden.

2.21 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte unter Verwendung des *DC Protein Assay Kits II* (BioRad). Zunächst wurde die Extinktion verschiedener Verdünnungen eines Proteinstandards bei einer Wellenlänge von 750 nm ermittelt und eine Eichgerade erstellt. Anschließend wurde die Extinktion der Proteinprobe gemessen und in die Eichkurve eingesetzt. Anhand dessen konnten Proteinkonzentrationen von 0.1 bis 1.4 mg/ml bestimmt werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.22 Bestimmung der biologischen Aktivität rekombinanter Proteine von *E. coli*

2.22.1 Bestimmung der hämolytischen Aktivität

Die hämolytische Aktivität von wildtypischem ClyA-Protein und von ClyA-Mutanten wurde sowohl durch die Analyse des Phänotyps der entsprechenden ClyA-produzierenden *E. coli*-Klone auf Blutagar überprüft als auch durch quantitative Hämolysinaktivitätstests untersucht. Zur phänotypischen Charakterisierung wurde jeweils eine Einzelkolonie mit Hilfe eines Zahnstochers auf eine Blutagarplatte gepickt und unter Selektionsdruck bei 37°C für 17 bis 18 h bebrütet. Nach der Inkubation wurden die Bakterienkolonien auf die Bildung charakteristischer Hämolysehöfe und deren Größe begutachtet. Zusätzlich erfolgte die quantitative Bestimmung der hämolytischen Aktivität von wildtypischem ClyA-Protein und von ClyA-Mutanten an Erythrozyten aus defibriniertem Pferdeblut. Zu diesem Zweck wurden zunächst Bakterienlysate von ClyA-bildenden *E. coli*-Übernachtskulturen durch Lysozym-

Zugabe und Einfrieren/Auftauen angefertigt und auf Eis gelagert. Die anschließende Herstellung der Erythrozytensuspension erfolgte im Eisbad. Dazu wurden 5.2 ml frisches Pferdeblut bei 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert, mehrfach mit kalter 0.9% (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und abschließend in 50 ml 0.9% (w/v) NaCl-Lösung aufgenommen. Danach wurden 1 ml-Aliquots der Erythrozytensuspension (ca. 7×10^8 Zellen/ml) mit unterschiedlichen Mengen (0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 1, 5, 10, 20, 50 μ l) der Bakterienlysate versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Inkubation von Erythrozytensuspensionen mit sehr minimalen Bakterienlysatmengen (0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2) wurden Verdünnungen der jeweiligen Bakterienlysate (1:5, 1:10, 1:20, 1:100) hergestellt und in einem Volumen von 1 μ l eingesetzt. Abschließend wurden die intakten Erythrozyten bei 13000 rpm (2 min) abzentrifugiert und die Extinktion des Überstands bei einer Wellenlänge von 543 nm gegen einen Leerwert (1 ml Erythrozytensuspension) bestimmt.

2.22.2 Protein-Quervernetzung (*Crosslinking*) mit Glutaraldehyd

Die chemische Quervernetzung von Proteinen (*Crosslinking*) erfolgte modifiziert nach Chen et al. (1996) und Wai et al. (2003a) und konnte sowohl mit periplasmatischen als auch mit intrazellulären Proteinen von *E. coli*-Zellen, die wildtypisches ClyA-Protein sowie ClyA-Mutanten synthetisierten, durchgeführt werden. Dazu wurden periplasmatische und intrazelluläre Proteine zunächst isoliert (III 2.18), wobei die sedimentierten Sphäroplasten in 10 mM Tris-HCl pH 7.5 resuspendiert und die intrazellulären Proteine durch Lysozym und Einfrieren/Auftauen freigesetzt wurden. Durch Zusatz von 0.01 Vol. 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) wurde die Proteinprobe vor Proteasen geschützt. Nach einstündiger Inkubation der Proteinprobe mit Dithiothreitol (0.1 M Endkonzentration) bei Raumtemperatur, während der die Cystein-Reste der Proteine reduzierten, wurde dem Reaktionsansatz Glutaraldehyd (2,5 mM Endkonzentration) zugeführt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C, wodurch die Proteine über die reaktiven Carbonyl-Gruppen des Glutaraldehyds miteinander verknüpft wurden. Dabei wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 min) Proben entnommen und die Vernetzungsreaktion durch Zugabe von gleichem Volumen 2 \times Probenpuffer gestoppt. Die Protein-Quervernetzung mit Hilfe des homobifunktionalen *Crosslinkers* Glutaraldehyd wurde durch SDS-PAGE-Analysen überprüft und durch Westernblot-Analysen mit einem gegen ClyA gerichteten polyklonalen Antikörper verifiziert.

2.22.3 Protein-Interaktion mit Erythrozytenmembranen

Die Überprüfung der Interaktion von ClyA bzw. ClyA-Mutanten mit Biomembranen erfolgte durch Analyse von Zellmembranfragmenten lysierter Erythrozyten (*ghosts*). Dazu wurden je 1.5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur bei 13000 rpm zentrifugiert (5min) und der Überstand entfernt. Die sedimentierten Zellen wurden in 150 µl PBS-Puffer aufgenommen und durch Zugabe von Lysozym sowie Einfrieren/Auftauen aufgeschlossen. Im Anschluß wurden 1 ml-Aliquots einer in 0.9% NaCl erstellten Erythrozytensuspension (ca. 7×10^8 Zellen/ml) mit 1 µl Bakterienlysat bei 37°C inkubiert. In einigen Fällen wurde die Erythrozytensuspension mit periplasmatischen Proteinpräparationen von *E. coli* versetzt. Nach dreißigminütiger Inkubation wurde der Reaktionsansatz bei 13000 rpm zentrifugiert (2 min) und die Extinktion des Überstandes im Photometer bei 543 nm bestimmt. Sedimentierte, unversehrte Erythrozytenzellen sowie Zellmembranfragmente der roten Blutkörperchen wurden fünfmal in A. dest. und zweimal in PBS-Puffer gewaschen, wodurch die vollständige Lyse der noch intakten Erythrozyten erreicht und nicht assoziiertes ClyA-Protein entfernt wurde. Die Erythrozytenmembranen (*ghosts*) wurden pelletiert (13000 rpm, 2 min), in 100 µl 1× Probenpuffer aufgenommen und bei 99°C erhitzt. Abschließend erfolgte die Überprüfung der Erythrozytenmembranen auf Assoziation mit dem jeweiligen ClyA-Protein von *E. coli* in der SDS-PAGE und im Westernblot mit Hilfe eines Anti-ClyA_{K12}-Antiserums.

2.22.4 Protein-Interaktion mit künstlichen Lipidmembranen

Untersuchungen zur Interaktion von ClyA bzw. ClyA-Mutanten mit künstlichen Lipid-Bilayern erfolgten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Benz (Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften [Biozentrum], Lehrstuhl für Biotechnologie, Universität Würzburg). Wildtypisches ClyA-Protein sowie ClyA-Mutanten von *E. coli*-Übernachtskulturen wurden zunächst durch die präparative SDS-PAGE (III 2.20) isoliert und die Konzentration mit dem *DC Protein Assay Kit II* (III 2.21) bestimmt. Anschließend wurde die porenbildende Aktivität der ClyA-Proteine an einer künstlich erstellten Lipidmembran (Benz et al., 1978; Benz et al., 1979; Benz et al., 1989) getestet. Die Erzeugung des planaren, künstlichen Lipid-Bilayers erfolgte innerhalb einer Teflonmesskammer, die durch eine dünne Zwischenwand in zwei Kompartimente unterteilt und mit einer Elektrolytlösung (1M KCl pH 6) befüllt wurde (Abb. 5). So wurde eine Teflonöse in eine 1%ige Lösung aus Diphtanoyl-Phosphatidylcholin (DPhPC) in *n*-Decan getaucht und anschließend quer über die sich in der Zwischenwand

befindende kreisförmige Öffnung gezogen. Die Bildung des schwarz schimmernden Lipid-Bilayers (*black lipid membrane*) wurde mit Hilfe einer Vergrößerungsoptik bestätigt. Danach wurde die Elektrolytlösung mit jeweils 50 bzw. 500 ng/ml ClyA-Protein (in 10 mM Tris-HCl pH 8.0/0.1% [v/v] Genapol) versetzt. Anschließend wurde mit Hilfe einer Spannungsquelle und einem Paar Silber/Silberchlorid-Elektroden eine Spannung von 20 mV angelegt. Die Entstehung von Transmembranporen im künstlichen Lipid-Bilayer konnte aufgrund des Ionenflusses nachgewiesen und klassifiziert werden (Porenfrequenz, Porenleitfähigkeit, Porenstabilität). Die Daten wurden mit Hilfe eines digitalen Oszilloskops und eines Einkanalschreibers erfasst und aufgezeichnet.

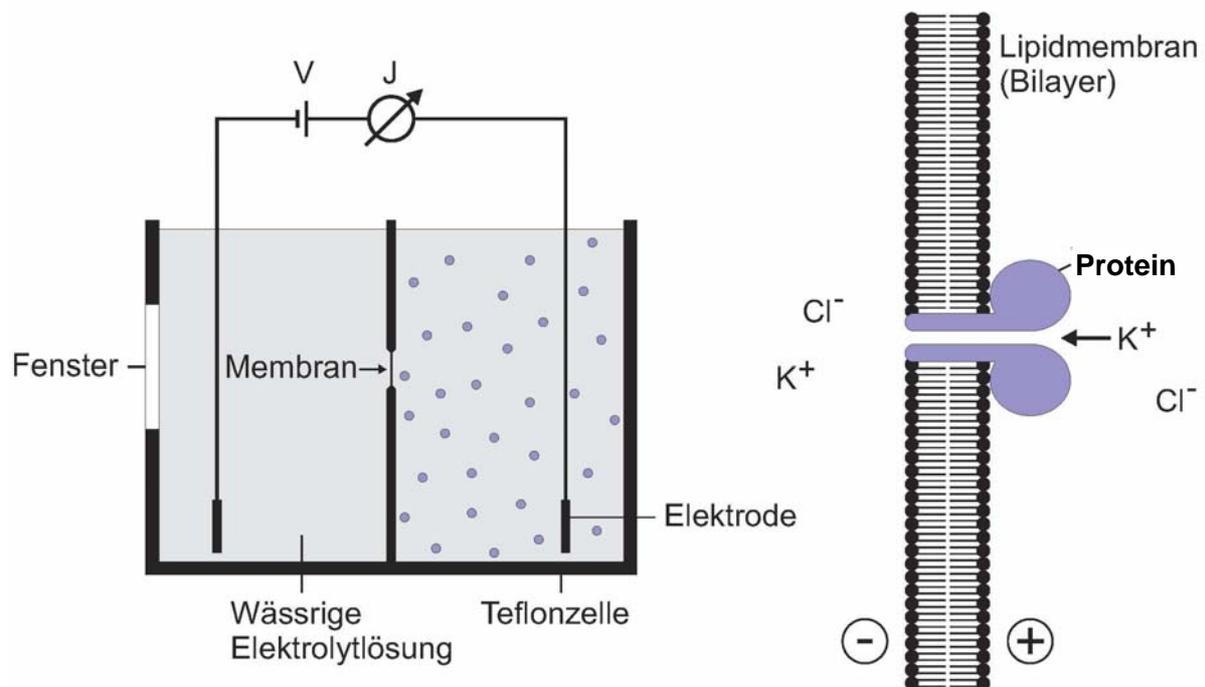


Abb. 5: Nachweis von Membranporen an künstlichen Lipid-Bilayern.

Nach Zugabe des wildtypischen ClyA-Proteins bzw. der ClyA-Mutanten konnte die Bildung von Membranporen im Lipid-Bilayer anhand des Ionenflusses festgestellt werden. Da die von *E. coli*-ClyA gebildeten Poren mäßig kationenselektiv sind, strömen in Gegenwart von KCl hauptsächlich K^+ -Ionen durch die Poren. Zugesezte, porenbildende ClyA-Moleküle sind violett dargestellt.

IV. Ergebnisse

1 Funktionale Analyse der N-terminalen Region des Zytolysins ClyA von *E. coli* K12 durch gezielte Mutagenese

Um die Bedeutung der N-terminalen Region von ClyA für den Transport des Toxins über die Zytoplasmamembran sowie für weitere funktionale Eigenschaften des Zytolysins, wie die Oligomerisierungsfähigkeit, die hämolytische und porenbildende Aktivität und die Bindungsfähigkeit an Zielmembranen zu untersuchen, wurden verschiedene Derivate von ClyA mit gezielten Mutationen konstruiert und bezüglich ihrer biologischen Funktionen analysiert.

1.1 Konstruktion von ClyA-Derivaten mit gezielten Mutationen am N-Terminus

Die Herstellung der unterschiedlichen ClyA-Derivate erfolgte durch *in vitro*-Mutagenese im *clyA*-Gen. Hierzu wurde das Plasmid pAL201 (Abb. 6; Ludwig et al., 1999) verwendet, ein pUC18-Derivat, welches das *clyA*-Gen von *E. coli* K12 als 1324 bp großes DNA-Fragment in der *Sma*I-Schnittstelle des Polylinkers von pUC18 (Yanisch-Perron et al., 1985) trägt.

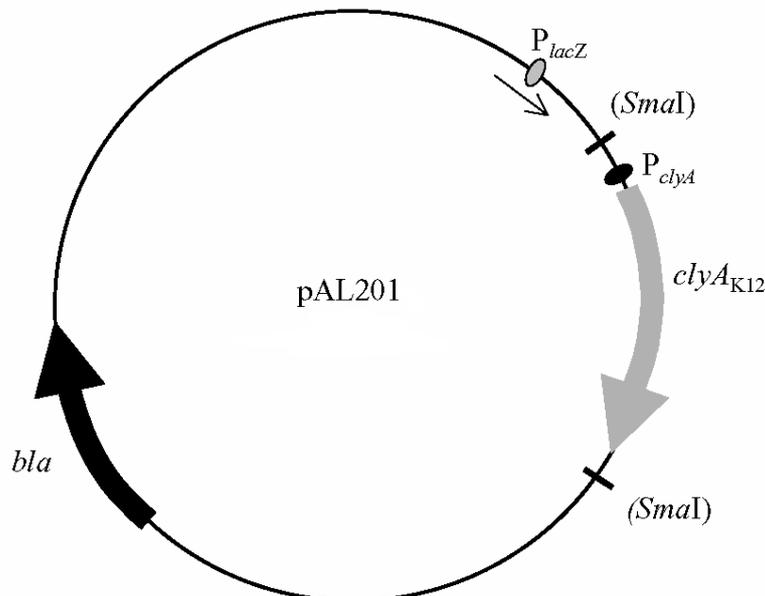
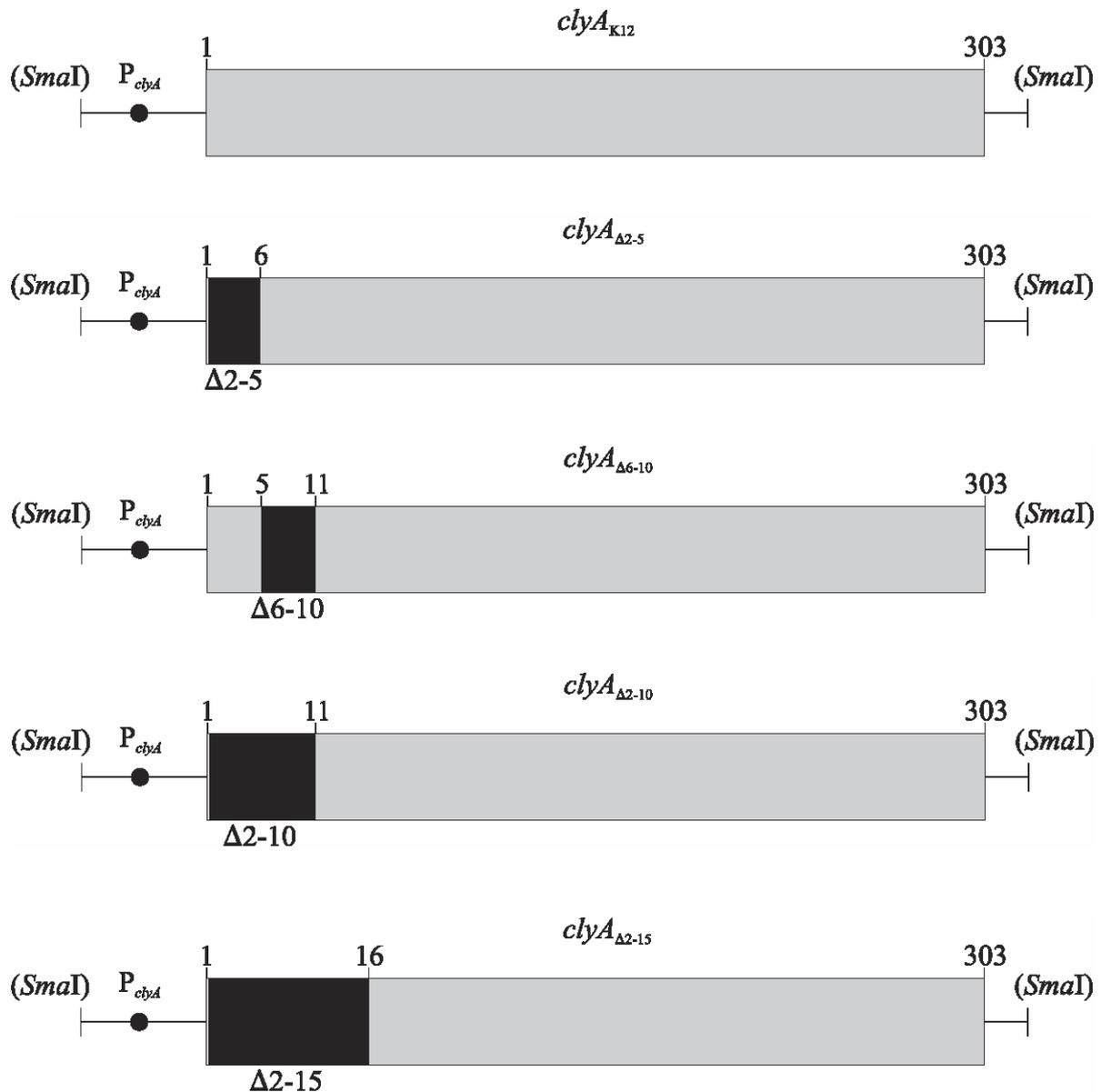


Abb. 6: Struktur des Plasmids pAL201.

Die Insertion des *clyA*-Gens (1324 bp-PCR-Produkt aus *E. coli* K12) erfolgte in die *Sma*I-Schnittstelle des pUC18-Vektors. In dem Konstrukt steht das *clyA*-Gen unter der Kontrolle der Promotoren P_{lacZ} und P_{clyA} . Die *Sma*I-Schnittstelle wurde bei der Klonierung zerstört und ist daher in Klammern gesetzt. Des Weiteren ist ein Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) auf dem Plasmid lokalisiert.

In pAL201 ist das *clyA*-Gen so orientiert, dass es nicht nur unter der Kontrolle des *clyA*-eigenen Promotors (P_{clyA}) steht, sondern auch unter der des *lacZ*-Promotors von pUC18 (P_{lacZ}). Durch gezielte Mutagenese von pAL201 mit Hilfe des *QuikChange*TM *Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene) wurden pAL201-Derivate erzeugt, die jeweils ein mutiertes *clyA*-Gen mit folgenden Veränderungen enthielten: Deletion der Codons 2-5 (*clyA* $_{\Delta 2-5}$); Deletion der Codons 6-10 (*clyA* $_{\Delta 6-10}$); Deletion der Codons 2-10 (*clyA* $_{\Delta 2-10}$); Deletion der Codons 2-15 (*clyA* $_{\Delta 2-15}$); Deletion der Codons 2-20 (*clyA* $_{\Delta 2-20}$); Deletion der Codons 6-15 (*clyA* $_{\Delta 6-15}$); Deletion der Codons 11-15 (*clyA* $_{\Delta 11-15}$); Deletion der Codons 11-20 (*clyA* $_{\Delta 11-20}$); Deletion der Codons 16-20 (*clyA* $_{\Delta 16-20}$); Nukleotidaustausch in Codon 16 (*clyA* $_{\Delta 16P}$), bei dem die Nukleotidsequenz GCA (Alanin) durch CCA (Prolin) substituiert wurde.



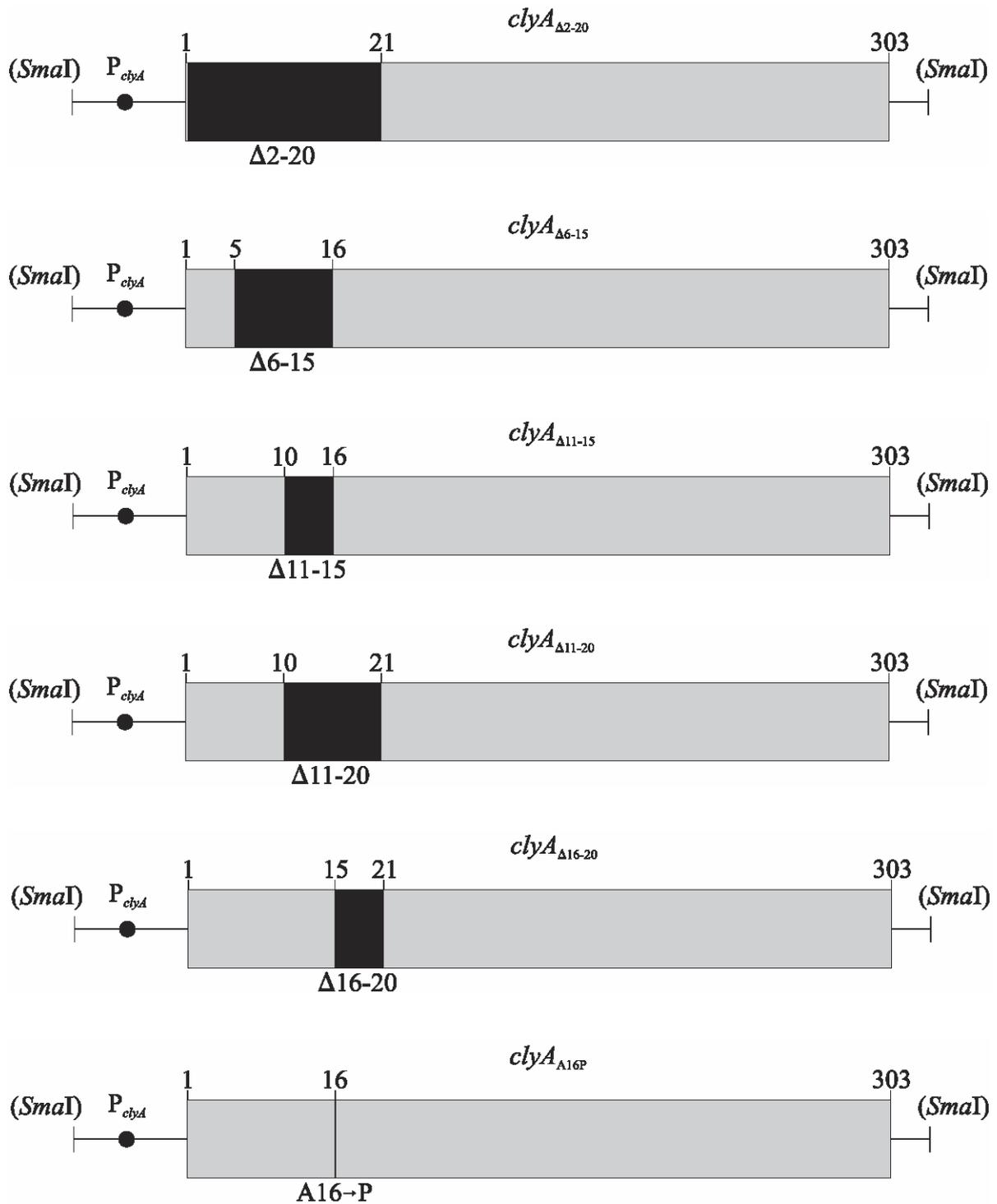


Abb. 7: Gezielte Mutagenese im *clyA*-Gen von pAL201.

Deletierte und substituierte Codons sind schwarz dargestellt und als Δ (Deletion) bzw. \rightarrow (Codonaustausch) definiert. Stromaufwärts des Startcodons (Codon 1) ist die zerstörte *SmaI*-Schnittstelle (*SmaI*) sowie der *clyA*-eigene Promotor (P_{clyA}) gezeigt. Stromabwärts des Stopcodons (Codon 303) befindet sich die 3'-Region des *clyA*-Gens und die vormalige *SmaI*-Schnittstelle.

Die daraus resultierenden pAL201-Derivate wurden wie folgt bezeichnet: pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-5}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 6-10}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-10}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-15}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-20}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 6-15}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 11-15}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 11-20}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 16-20}$ und pAL201-*clyA* $_{\Delta 16P}$. In Restriktionsansätzen und Sequenzierungsanalysen wurden die pAL201-Derivate auf Richtigkeit der Mutationen überprüft. Die Restriktion der pAL201-Derivate erfolgte mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BglIII*. Dabei spaltete die Restriktionsendonuklease *EcoRI* in der MCS-Region (*multiple cloning site*) des Plasmids ca. 280 bp stromaufwärts des *clyA*-Startcodons, während sich die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *BglIII* ca. 70 bp stromabwärts des Startcodons im *clyA*-Gen befand.

Wie Abbildung 8 zeigt, entstand durch die Restriktion mit *EcoRI* und *BglIII* jeweils ein DNA-Fragment von 3.658 kb Größe, das dem linearisierten Vektor mit dem größten Teil des *clyA*-Gens entsprach, und ein weiteres Fragment, dessen Länge abhängig von der eingeführten Mutation zwischen 0.29 und 0.36 kb variierte.

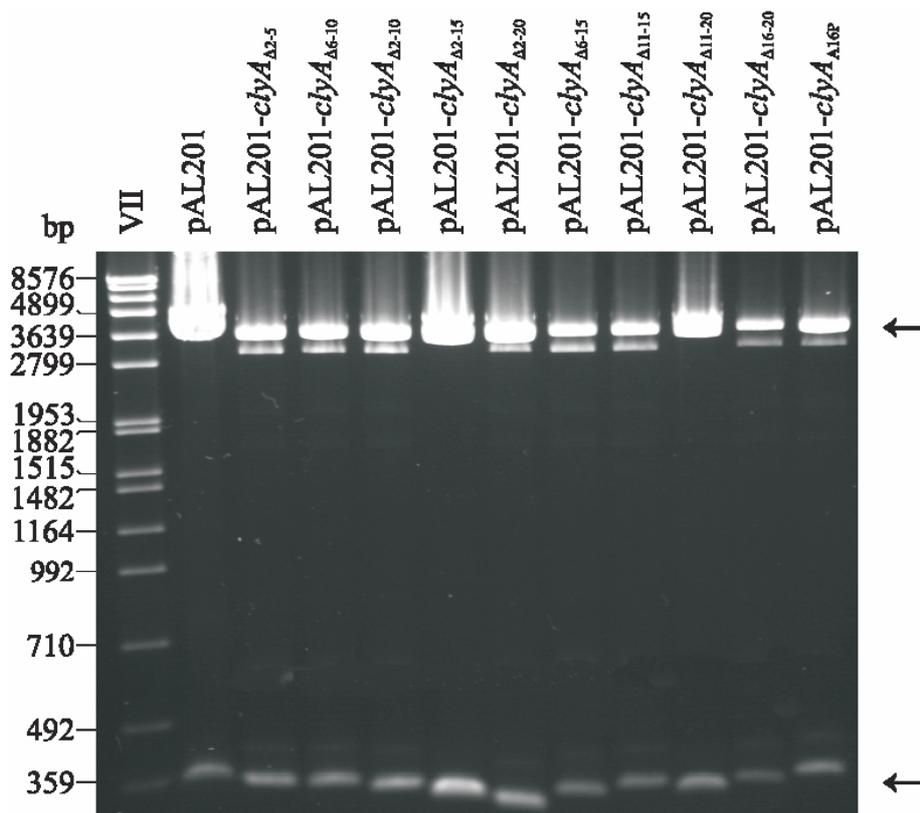


Abb. 8: Restriktionsanalyse von pAL201-Derivaten mit gezielten Mutationen im 5'-terminalen Bereich des *clyA*-Gens.

Gezeigt wird die mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BglIII* geschnittene DNA des Plasmids pAL201 und der pAL201-Derivate, elektrophoretisch aufgetrennt in einem 1%igen Agarosegel. Die Restriktionsfragmente sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Größen der Fragmente des DNA-Standards VII sind links dargestellt (bp).

In Tabelle 6 sind die unterschiedlichen Größen der mit *EcoRI* und *BglII* aus den pAL201-Derivaten herausgeschnittenen DNA-Fragmente zusammengefasst. Durch Sequenzierung der mutierten *clyA*-Gene konnte die Richtigkeit dieser Mutationen eindeutig belegt werden.

Tab. 6: Theoretische Größen der mit *EcoRI* und *BglII* aus pAL201-Derivaten herausgeschnittenen DNA-Fragmente.

pAL201 / pAL201-Derivat	Länge des <i>EcoRI/BglII</i> - Fragments (in bp)
pAL201	352
pAL201- <i>clyA</i> Δ 2-5	340
pAL201- <i>clyA</i> Δ 6-10	337
pAL201- <i>clyA</i> Δ 2-10	325
pAL201- <i>clyA</i> Δ 2-15	310
pAL201- <i>clyA</i> Δ 2-20	295
pAL201- <i>clyA</i> Δ 6-15	322
pAL201- <i>clyA</i> Δ 11-15	337
pAL201- <i>clyA</i> Δ 11-20	322
pAL201- <i>clyA</i> Δ 16-20	337
pAL201- <i>clyA</i> Δ 16P	352

1.2 Nachweis der Expression der durch *in vitro*-Mutagenese erzeugten mutierten *clyA*-Gene in *E. coli* DH5 α

Die konstruierten pAL201-Derivate wurden in *E. coli* DH5 α transformiert. Um die Expression der mutierten *clyA*-Gene zu überprüfen, wurden Zellysate von Übernachtskulturen der entsprechenden rekombinanten DH5 α -Stämme hergestellt und durch SDS-PAGE analysiert. Im Vorfeld erfolgte eine Wachstumskontrolle der Übernachtskulturen durch photometrische Bestimmung (OD₆₀₀). Die Übernachtskulturen der DH5 α -Stämme mit den pAL201-Derivaten pAL201-*clyA* Δ 11-15, pAL201-*clyA* Δ 11-20 und pAL201-*clyA* Δ 16-20 wiesen im Gegensatz zu den Übernachtskulturen von DH5 α /pAL201 und von den restlichen DH5 α /pAL201-Derivaten deutlich geringere Extinktionen auf. Möglicherweise veränderten die Mutationen die Konformation des ClyA-Proteins und waren toxisch für die Bakterienzellen, so dass das Zellwachstum dieser Bakterienstämme beeinträchtigt wurde.

Wie in Abbildung 9 zu sehen, konnte die Synthese der ClyA-Mutanten in allen Fällen nachgewiesen werden, wobei die entsprechenden ClyA-Proteinbanden im Bereich des Markerproteins Carbonat-Dehydratase (31 kDa) zu finden waren. Bei der Analyse gesamtzellulärer Proteine aus Zellysaten von DH5 α /pUC18 (Vektorkontrolle), die in entsprechender Menge auf das SDS-Gel aufgetragen wurden, war diese Proteinbande nicht zu sehen.

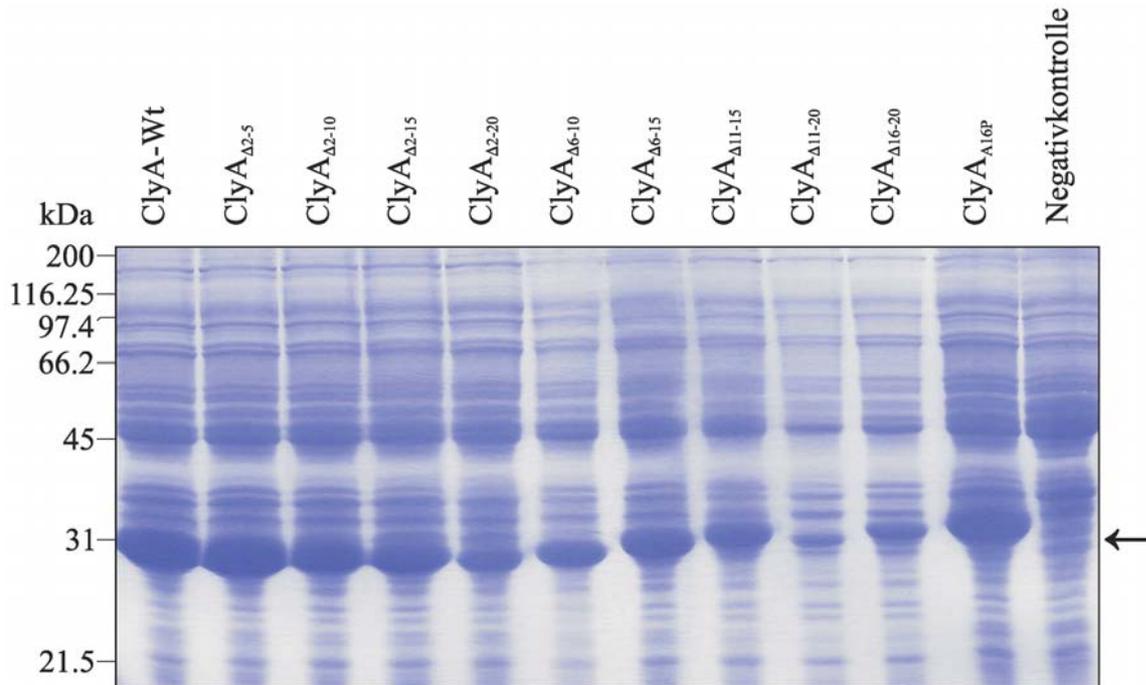


Abb. 9: SDS-PAGE zum Nachweis der Produktion von ClyA-Mutanten mit spezifischen Veränderungen in der N-terminalen Region des ClyA-Proteins.

Abgebildet sind die in einem SDS-Gel aufgetrennten und durch Coomassie-Blue-Färbung angefärbten Zellysate von *E. coli* DH5 α /pAL201 (ClyA-Wt), von den *E. coli* DH5 α /pAL201-Derivaten sowie von *E. coli* DH5 α /pUC18 (Negativkontrolle). Analysiert wurden jeweils gesamtzelluläre Proteine aus 25 μ l Übernachtskultur. Die Expressionsprodukte liegen im Bereich der molekularen Masse der Carbonat-Dehydratase (31 kDa) des Größenstandards und sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die molekulare Masse der Markerproteine ist seitlich aufgeführt (kDa).

Da wildtypisches ClyA-Protein, dessen theoretische molekulare Masse 34 kDa ist (Oscarsson et al., 1996; del Castillo et al., 1997), im SDS-Gel bei einer Größe von ca. 32 kDa läuft (del Castillo et al., 1997), konnte angenommen werden, dass es sich hierbei um die synthetisierten Genprodukte der mutierten *clyA*-Gene als auch des ursprünglichen *clyA*-Gens handelte. Die in das *clyA*-Gen eingeführten Mutationen hatten innerhalb der Proteinstruktur den Verlust von Aminosäuren oder den Austausch einer Aminosäure zur Folge, was sich auf die molekulare Masse des Toxin-Moleküls mehr oder weniger stark auswirkte. Daher präsentierten die Proteinbanden der ClyA-Derivate leicht variierende Laufhöhen. Zudem wurden Unterschiede in der Proteinbandenintensität der produzierten ClyA-Mutanten deutlich. Insbesondere war

die Menge an sichtbarem ClyA-Protein in Zellysaten von den *E. coli* DH5 α -Stämmen erheblich geringer, die ein vermindertes Zellwachstum aufwiesen. Jedoch konnte auch in Zellysaten des *E. coli*-Stammes DH5 α /pAL201-*clyA* Δ ₂₋₂₀, der normales Wachstum zeigte, weniger ClyA-Protein (ClyA Δ ₂₋₂₀) festgestellt werden, wofür vielleicht eine zunehmende Proteininstabilität und Proteolyse verantwortlich war. Dessen ungeachtet ermöglichte die nachgewiesene Produktion der ClyA-Mutanten den Einfluss der N-terminalen Region auf die funktionalen Eigenschaften des Zytolysins eingehender zu untersuchen.

1.3 Auswirkungen der gezielten Mutationen in der N-terminalen Region von ClyA auf die hämolytische Aktivität des ClyA-Proteins

1.3.1 Phänotypische Eigenschaften der rekombinanten *E. coli* DH5 α -Klone, die ClyA-Mutanten produzieren

Zur Überprüfung der phänotypischen Eigenschaften wurden der Bakterienstamm DH5 α /pAL201 sowie die DH5 α /pAL201-Derivate als Einzelkolonieausstriche auf Blutagarplatten angezüchtet. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Einzelkolonien der *E. coli* DH5 α -Klone auf die Bildung charakteristischer Hämolysehöfe überprüft. Zur Dokumentation der phänotypischen Eigenschaften dieser Bakterienstämme wurde jeweils eine Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher auf eine Blutagarplatte gepickt und die hämolytische Aktivität anhand der Größe und Intensität der Hämolysehöfe nach Inkubation über Nacht bei 37°C sowie nach anschließender Lagerung für fünf Tage bei 4°C beurteilt (Abb. 10 A, B).

Wie den Abbildungen 10 A, B zu entnehmen ist, verursachten ausschließlich Bakterienkolonien jener *E. coli*-Stämme kräftige Hämolysehöfe, die wildtypisches ClyA-Protein oder die ClyA-Mutanten ClyA Δ ₂₋₅ bzw. ClyA Δ ₆₋₁₀ produzierten. Im Vergleich zu DH5 α /pAL201 nahm die hämolytische Aktivität der Einzelkolonien von DH5 α /pAL201-*clyA* Δ ₂₋₅ und DH5 α /pAL201-*clyA* Δ ₆₋₁₀ jedoch sichtbar ab. Die Einzelkolonien von DH5 α /pAL201-*clyA* Δ ₂₋₁₀, die ebenfalls deutliche hämolytische Aktivität auf Blutagar aufwiesen, zeigten hingegen weitaus kleinere Hämolysehöfe. Ein schwerwiegender Verlust der Hämolysin-Aktivität war bei den Einzelkolonien von DH5 α /pAL201-*clyA* Δ ₆₋₁₅ und DH5 α /pAL201-*clyA* Δ _{16P} zu beobachten. Während die zytolytische Aktivität gegenüber Erythrozyten von DH5 α /pAL201-*clyA* Δ ₆₋₁₅ nach fünftägiger Lagerung noch schwach feststellbar war, wurde die hämolytische Aktivität des *E. coli* DH5 α -Stammes, der die ClyA-Mutante ClyA Δ _{16P} synthetisierte, noch

tiefgreifender beeinträchtigt, so dass nur ein minimaler Hämolyseausum beobachtet werden konnte.

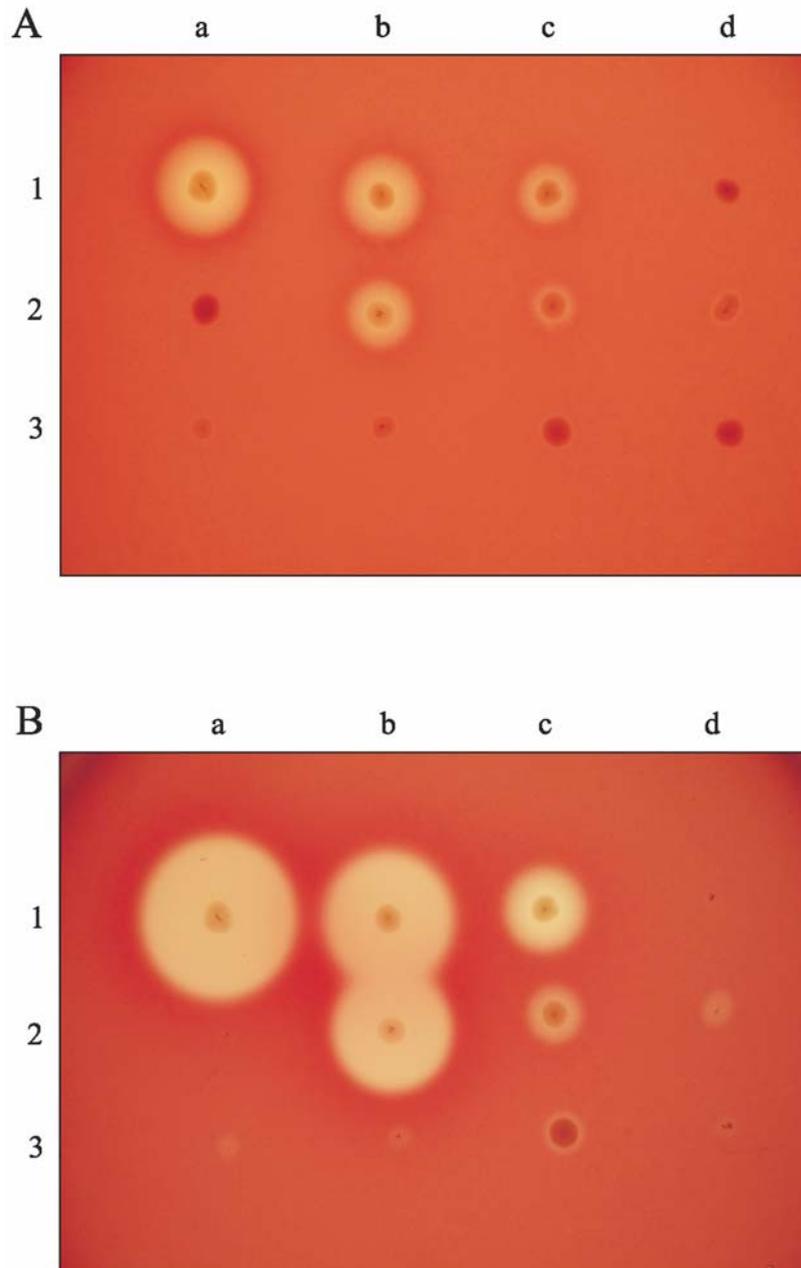


Abb. 10 A, B: Phänotypischer Vergleich von DH5 α /pAL201 mit den DH5 α /pAL201-Derivaten.

Zu sehen ist eine Blutagarplatte mit den Einzelkolonien der *E. coli* DH5 α -Stämme mit folgenden Plasmiden: pAL201 (1a), pAL201-*clyA* Δ ₂₋₅ (1b), pAL201-*clyA* Δ ₂₋₁₀ (1c), pAL201-*clyA* Δ ₂₋₁₅ (1d), pAL201-*clyA* Δ ₂₋₂₀ (2a), pAL201-*clyA* Δ ₆₋₁₀ (2b), pAL201-*clyA* Δ ₆₋₁₅ (2c), pAL201-*clyA* Δ ₁₁₋₁₅ (2d), pAL201-*clyA* Δ ₁₁₋₂₀ (3a), pAL201-*clyA* Δ ₁₆₋₂₀ (3b), pAL201-*clyA* Δ _{16P} (3c) und pUC18 (3d; Negativkontrolle). Die Blutagarplatte wurde direkt nach 17 h Inkubation bei 37°C (A) und nach einer anschließenden fünftägigen Lagerung bei 4°C (B) fotografiert. In einigen Fällen (B: 1d, 2a, 2d, 3a, 3b, 3d) erfolgte die Überprüfung der hämolytischen Aktivität der Stämme unterhalb der Einzelkolonie. Dazu wurden die entsprechenden Bakterienkolonien von der Blutagarplatte entfernt.

Darüber hinaus waren keinerlei hämolytische Eigenschaften bei Einzelkolonien von *E. coli* DH5 α -Klonen mit den pAL201-Derivaten pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-15}$ und pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-20}$ zu sehen. Ähnlich verhielten sich Einzelkolonien der *E. coli*-Stämme DH5 α /pAL201-*clyA* $_{\Delta 11-15}$, DH5 α /pAL201-*clyA* $_{\Delta 11-20}$ und DH5 α /pAL201-*clyA* $_{\Delta 16-20}$, die ebenfalls keinen hämolytischen Phänotyp aufwiesen. Allerdings konnte unterhalb dieser Bakterienkolonien noch eine geringfügige hämolytische Restaktivität konstatiert werden.

1.3.2 Quantitativer Vergleich der hämolytischen Aktivität rekombinanter *E. coli*-Stämme, die wildtypisches ClyA bzw. ClyA-Mutanten synthetisieren

Die hämolytische Aktivität des ClyA-Wildtyps und der ClyA-Mutanten wurde in quantitativen Hämolyse-Aktivitätstests ermittelt und gegenübergestellt. Dabei erlaubte die Sensitivität des Hämolyse-Assays eine genauere Bestimmung der hämolytischen Aktivität der ClyA-Derivate, als dies durch Beurteilung des Phänotyps auf Blutagar möglich war.

Die Grafiken der Abbildungen 11 A, B stellen das repräsentative Ergebnis von einem der durchgeführten quantitativen Hämolyse-Aktivitätstests dar, in dem die Erythrozytensuspension (ca. 7×10^8 Zellen/ml) mit unterschiedlichen Mengen der Bakterienlysate (A: 1-50 μ l; B: 0.01-1 μ l) inkubiert wurde. Hierbei entsprach die eingesetzte Proteinmenge der Bakterienlysate von DH5 α /pAL201 ungefähr den verwendeten Proteinmengen der *E. coli* DH5 α -Lysate mit den Plasmiden pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-5}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 6-10}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-10}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 6-15}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-15}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-20}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 16P}$ und pUC18. Da rekombinante *E. coli* DH5 α -Klone mit den pAL201-Derivaten pAL201-*clyA* $_{\Delta 11-15}$, pAL201-*clyA* $_{\Delta 11-20}$ und pAL201-*clyA* $_{\Delta 16-20}$ geringeres Zellwachstum präsentierten, mußte die quantitative hämolytische Aktivität dieser ClyA-Mutanten (ClyA $_{\Delta 11-15}$, ClyA $_{\Delta 11-20}$, ClyA $_{\Delta 16-20}$) gesondert beurteilt werden.

Wie in Abbildung 11 A zu sehen, wurde für Bakterienstämme, die die ClyA-Mutanten ClyA $_{\Delta 2-5}$ und ClyA $_{\Delta 6-10}$ synthetisierten, eine dem ClyA-Wildtyp vergleichbar starke hämolytische Aktivität registriert. Daneben zeigte das Zellysate von DH5 α /pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-10}$ nur unwesentlich geringere hämolytische Aktivität. Des Weiteren führte der Einsatz unterschiedlicher Mengen (1-50 μ l) der Bakterienlysate von DH5 α /pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-5}$, DH5 α /pAL201-*clyA* $_{\Delta 6-10}$ und DH5 α /pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-10}$ zu keinem weiteren Anstieg der gemessenen Extinktion, da bereits geringe Lysatmengen (1 μ l) nahezu sämtliche rote Blutkörperchen lysierten und somit die maximal messbare Hämoglobinkonzentration im Überstand erreicht war.

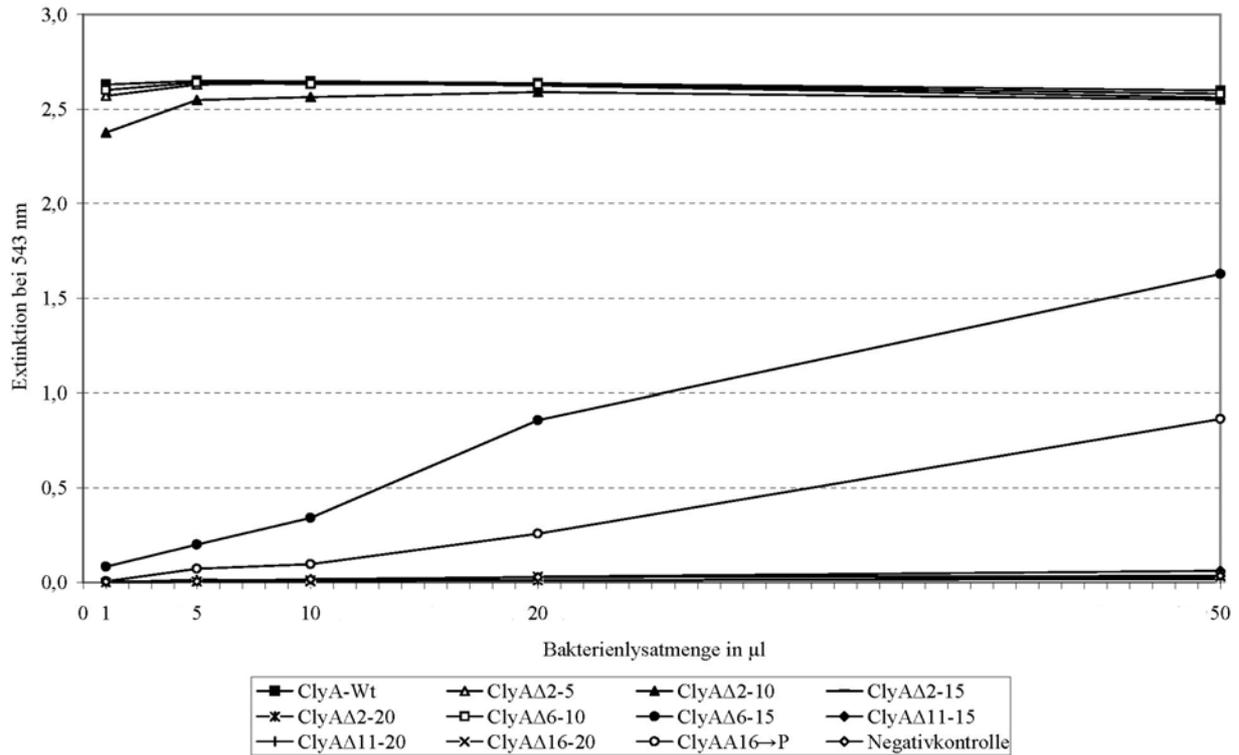


Abb. 11 A: Quantitativer Vergleich der hämolytischen Aktivität von *E. coli*-Stämmen, die ClyA-Mutanten produzieren.

Dargestellt sind Hämolytin-Aktivitäten der ClyA-Mutanten im Vergleich zum ClyA-Wildtyp. Gemessen wurde die Extinktion (543 nm) der Überstände von jeweils 1 ml Erythrozytensuspension (7×10^8 Zellen/ml) nach Inkubation mit Bakterienlysaten von DH5 α -Stämmen mit pAL201, pAL201-Derivaten und pUC18 (Negativkontrolle). Eingesetzt wurden unterschiedliche Lysatmengen (1, 5, 10, 20, 50 µl).

Im Gegensatz dazu zeigten die ClyA-Mutanten ClyA Δ_{6-15} und ClyA Δ_{16P} starke Verluste der hämolytischen Aktivität, so dass erst der Zusatz großer Lysatmengen (20, 50 µl) von DH5 α /pAL201-*clyA* Δ_{6-15} und DH5 α /pAL201-*clyA* Δ_{16P} zur signifikanten Lyse der Erythrozyten führte. Hingegen erwiesen sich die ClyA-Mutanten ClyA Δ_{2-15} und ClyA Δ_{2-20} als gänzlich hämolytisch inaktiv. Da auch große Lysatmengen (50 µl) der *E. coli* DH5 α -Klone mit den Plasmiden pAL201-*clyA* Δ_{11-15} , pAL201-*clyA* Δ_{11-20} und pAL201-*clyA* Δ_{16-20} ähnlich wie DH5 α /pUC18 (Negativkontrolle) keine zytolytische Aktivität gegenüber Erythrozyten hatten, konnte angenommen werden, dass die hämolytische Eigenschaft der ClyA-Derivate ClyA Δ_{11-15} , ClyA Δ_{11-20} bzw. ClyA Δ_{16-20} genau wie bei den Mutanten ClyA Δ_{2-15} und ClyA Δ_{2-20} verloren ging.

Die Grafik der Abbildung 11 B stellt die quantitative hämolytische Aktivität des wildtypischen ClyA-Proteins sowie der ClyA-Derivate ClyA Δ_{2-5} , ClyA Δ_{6-10} , ClyA Δ_{2-10} und ClyA Δ_{6-15} dar, die bei der Verwendung von geringen Bakterienlysatmengen (0.01-1 µl) gemessen wurden. Dabei ließen sich Unterschiede in der hämolytischen Aktivität des ClyA-Wildtyps und der Toxin-Mutanten ClyA Δ_{2-5} , ClyA Δ_{6-10} und ClyA Δ_{2-10} erkennen. So zeigte das

Bakterienlysat von DH5 α /pAL201-*clyA* Δ 2-10 sowohl gegenüber dem Zellysat von DH5 α /pAL201 als auch gegenüber den Bakterienlysaten von DH5 α /pAL201-*clyA* Δ 2-5 und DH5 α /pAL201-*clyA* Δ 6-10, die relativ gleiche hämolytische Eigenschaften aufwiesen, deutlich geringere hämolytische Aktivität. Auch die hämolytische Aktivität der *ClyA*-Mutanten *ClyA* Δ 2-5 und *ClyA* Δ 6-10 nahm im Vergleich zum *ClyA*-Wildtyp sichtbar ab. Darüber hinaus zeigten Zellysate von DH5 α /pAL201-*clyA* Δ 6-15 unter diesen Versuchsbedingungen nahezu keine hämolytische Aktivität.

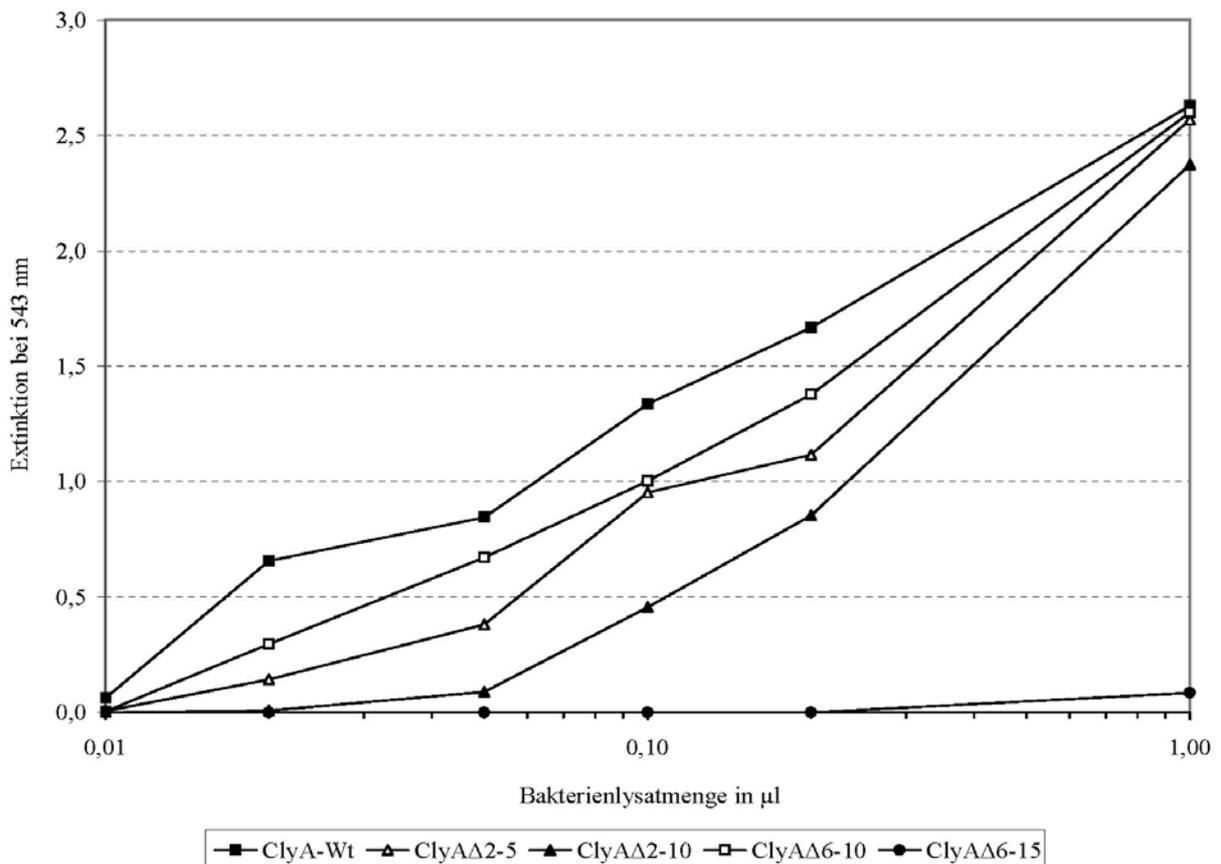


Abb. 11 B: Quantitativer Vergleich der hämolytischen Aktivität von *E. coli*-Stämmen, die *ClyA*-Mutanten produzieren.

Dargestellt sind Hämolyse-Aktivitäten der *ClyA*-Mutanten *ClyA* Δ 2-5, *ClyA* Δ 6-10, *ClyA* Δ 2-10 und *ClyA* Δ 6-15 im Vergleich zum wildtypischen *ClyA*-Protein. Gemessen wurde die Extinktion (543 nm) der Überstände von jeweils 1 ml Erythrozytensuspension (7×10^8 Zellen/ml) nach Inkubation mit Bakterienlysaten von DH5 α -Stämmen mit pAL201, pAL201-*clyA* Δ 2-5, pAL201-*clyA* Δ 6-10, pAL201-*clyA* Δ 2-10 und pAL201-*clyA* Δ 6-15. Der Einsatz minimaler Lysatmengen (0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20 μ l) wurde im Versuch durch Verwendung von jeweils 1 μ l der entsprechenden Verdünnungen (1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5) erreicht. Die verwendeten Bakterienlysatmengen sind auf der Abzisse logarithmisch aufgetragen.

Durch Auswertung mehrerer, unabhängig voneinander durchgeführter Hämolyse-Assays konnte somit auf die hämolytische Aktivität der *ClyA*-Mutanten im Vergleich zum

wildtypischen ClyA-Protein zurückgeschlossen werden. So ergaben sich für die ClyA-Mutanten ClyA Δ_{2-5} und ClyA Δ_{6-10} quantitative Hämolyisin-Aktivitäten von ca. 50% des ClyA-Wildtyps, während für ClyA Δ_{2-10} die hämolytische Aktivität mit 10-25% beziffert werden konnte. Obgleich diese Werte eine starke Reduktion der hämolytischen Aktivität suggerierten, ist diese im Vergleich zum wildtypischen ClyA-Protein als noch erheblich einzustufen. Gravierender hingegen ist die Beeinträchtigung der hämolytischen Eigenschaft bei den ClyA-Mutanten ClyA Δ_{6-15} und ClyA Δ_{16P} , deren Aktivität unter einem Prozent (<1%) des wildtypischen ClyA-Proteins lag. Des Weiteren konnten für die Toxin-Mutanten ClyA Δ_{2-15} und ClyA Δ_{2-20} sowie für ClyA Δ_{11-15} , ClyA Δ_{11-20} und ClyA Δ_{16-20} in keinem der durchgeführten Hämolyisin-Aktivitätstests hämolytische Eigenschaften festgestellt werden, was auf den völligen Verlust der hämolytischen Aktivität der ClyA-Proteine schließen lässt. Eine Zusammenfassung der Auswirkungen der in ClyA eingeführten Mutationen auf die hämolytische Aktivität des Zytolysins ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Vergleich der hämolytischen Aktivität des in DH5 α /pAL201 sowie in DH5 α /pAL201-Derivaten produzierten ClyA-Proteins von *E. coli*.

ClyA / ClyA-Mutante	Hämolytische Aktivität	
	phänotypisch ^a	quantitativ (%) ^b
ClyA-Wildtyp	++++	100
ClyA Δ_{2-5}	+++	50
ClyA Δ_{6-10}	+++	50
ClyA Δ_{2-10}	++	10-25
ClyA Δ_{6-15}	+	<1
ClyA Δ_{16P}	(+)	<1
ClyA Δ_{11-15}	(-)	-
ClyA Δ_{11-20}	(-)	-
ClyA Δ_{16-20}	(-)	-
ClyA Δ_{2-15}	-	-
ClyA Δ_{2-20}	-	-
Negativkontrolle ^c	-	-

^a +++++ (sehr stark), +++ (stark), ++ (gemäßigt stark), + (schwach), (+) (sehr schwach), (-) (hämolytische Restaktivität), - (hämolytisch inaktiv).

^b Die quantitative hämolytische Aktivität, die in mindestens drei unabhängigen Hämolyse-Assays ermittelt wurde, ist in Prozent im Vergleich zum wildtypischen ClyA-Protein angegeben.

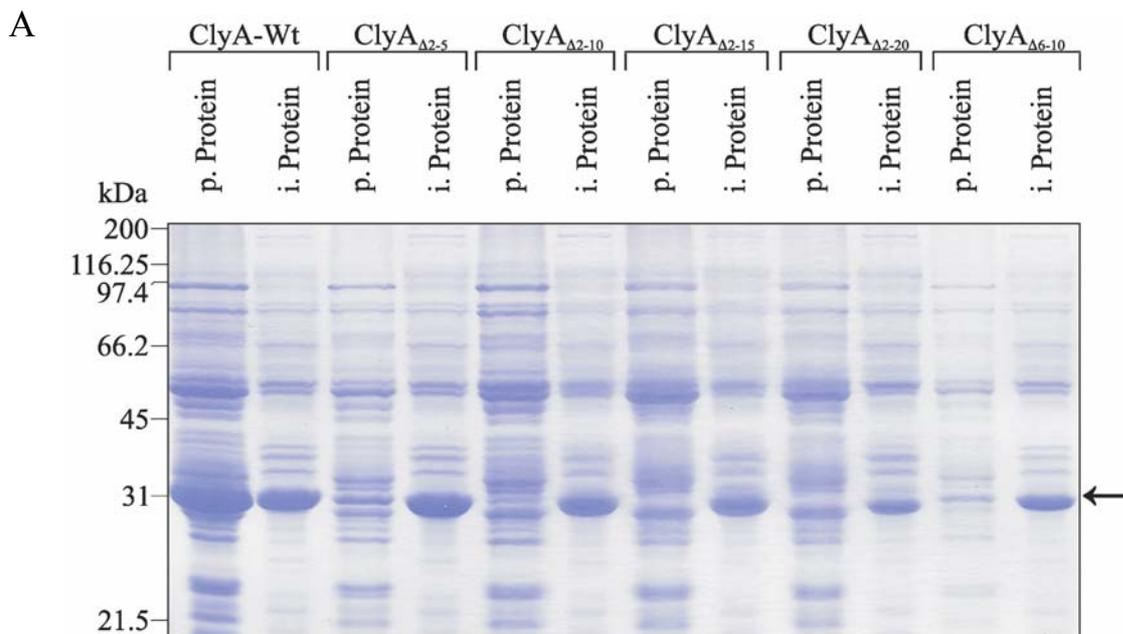
^c *E. coli* DH5 α mit Vektor pUC18.

1.4 Auswirkungen der Mutationen am N-Terminus von ClyA auf die Sekretion des Zytolysins

1.4.1 Analyse der periplasmatischen und intrazellulären Proteine rekombinanter *E. coli*-Stämme, die ClyA-Mutanten produzieren

Um zu analysieren, ob die verschiedenen spezifischen Mutationen in der N-terminalen Region einen Einfluss auf die Sekretion des ClyA-Proteins haben, wurden periplasmatische und intrazelluläre Proteinproben von den rekombinanten DH5 α -Klonen, die diese ClyA-Mutanten produzierten, durch SDS-PAGE und im Westernblot auf das Vorhandensein von ClyA-Protein untersucht. Die Isolierung der periplasmatischen und intrazellulären Proteine erfolgte aus Übernachtskulturen der entsprechenden Bakterienstämme. Dabei wurde die äußere Membran der Bakterienzellen durch osmotischen Schock aufgebrochen, so dass zunächst die periplasmatischen Proteine isoliert werden konnten. Die durch starkes Erhitzen herbeigeführte Lyse der verbleibenden Sphäroplasten bewirkte die Freisetzung der intrazellulären Proteine. Zunächst wurden die Proteinproben durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 12 A, B).

In den Abbildungen 12 A, B ist zu erkennen, dass alle ClyA-Mutanten (ClyA Δ_{2-5} , ClyA Δ_{2-10} , ClyA Δ_{2-15} , ClyA Δ_{2-20} , ClyA Δ_{6-10} , ClyA Δ_{6-15} , ClyA Δ_{11-15} , ClyA Δ_{11-20} , ClyA Δ_{16-20} , ClyA Δ_{16P}) sowie das wildtypische ClyA-Protein (ClyA-Wt) in der intrazellulären Fraktion der jeweiligen *E. coli* DH5 α -Klone zu finden waren.



B

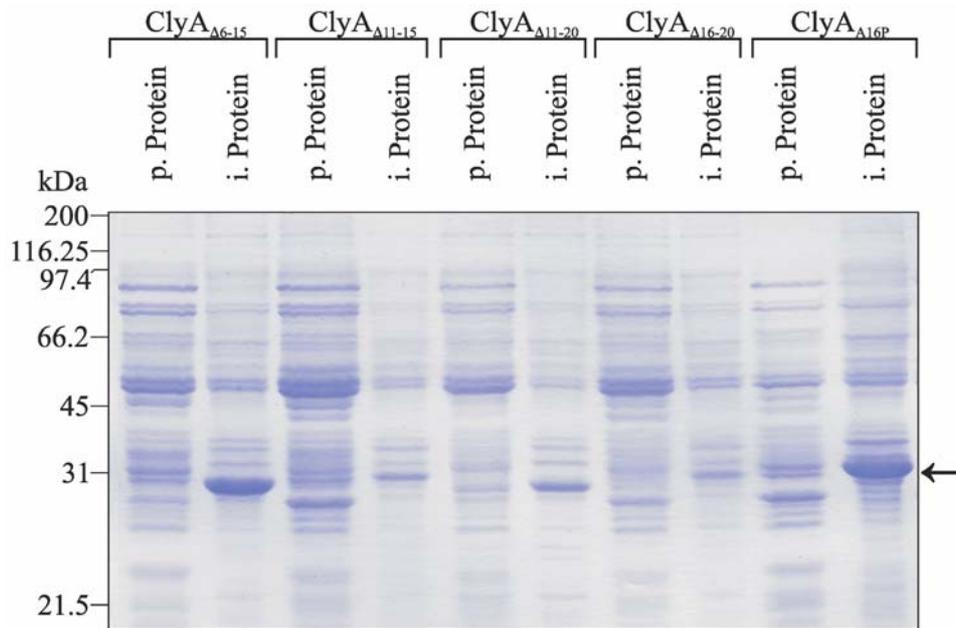


Abb. 12 A, B: SDS-PAGE-Analyse der periplasmatischen und intrazellulären Proteine von rekombinanten *E. coli*-Stämmen, die ClyA-Derivate synthetisieren.

Dargestellt sind die aufgetrennten periplasmatischen (p. Protein) und intrazellulären Proteine (i. Protein) der *E. coli* DH5 α -Klone, die ClyA-Mutanten produzieren, im Vergleich zu entsprechenden Zellfraktionen von DH5 α /pAL201, der wildtypisches ClyA bildet (ClyA-Wt). Analysiert wurden jeweils die periplasmatischen Proteine aus 125 μ l Übernachtskultur sowie die intrazellulären Proteine aus 10 μ l Bakterienkultur in einem 12.5%igen SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Blue-Färbung. Die Laufhöhe der Expressionsprodukte liegt im Bereich der 31 kDa-Bande des Größenstandards und ist durch einen Pfeil markiert. Die molekulare Masse der Markerproteine ist seitlich aufgeführt (kDa).

Allerdings gab es Differenzen in der nachgewiesenen Toxinmenge. So produzierten die *E. coli*-Stämme DH5 α /pAL201-*clyA* $_{\Delta 11-15}$, DH5 α /pAL201-*clyA* $_{\Delta 11-20}$ und DH5 α /pAL201-*clyA* $_{\Delta 16-20}$ deutlich weniger ClyA-Protein als DH5 α /pAL201 (ClyA-Wt), was jedoch mit der Beobachtung korrelierte, dass diese Bakterienstämme in allen Experimenten im Vergleich zu DH5 α /pAL201 schlechter wuchsen. Die Analyse der periplasmatischen Zellfraktionen gab Aufschluss über den Transport des Toxins vom intrazellulären in den periplasmatischen Raum. So konnte auf dem Coomassie-Blue-gefärbten SDS-Gel nur bei den *E. coli*-Stämmen DH5 α /pAL201, DH5 α /pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-5}$, DH5 α /pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-10}$ und DH5 α /pAL201-*clyA* $_{\Delta 6-10}$ das ClyA-Protein deutlich in der periplasmatischen Proteinpräparation festgestellt werden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen und kleine Mengen an ClyA eindeutig nachweisen zu können, wurde eine Westernblot-Analyse der periplasmatischen Proteine mit einem Anti-ClyA $_{K12}$ -Antiserum angeschlossen (Abb. 13).

Wie in Abbildung 13 zu sehen, wurden die Proteine ClyA-Wt, ClyA $_{\Delta 2-5}$, ClyA $_{\Delta 2-10}$, ClyA $_{\Delta 6-10}$, ClyA $_{\Delta 6-15}$ und ClyA $_{\Delta 16P}$ in den periplasmatischen Proteinpräparationen der entsprechenden *E. coli* DH5 α -Klone detektiert.

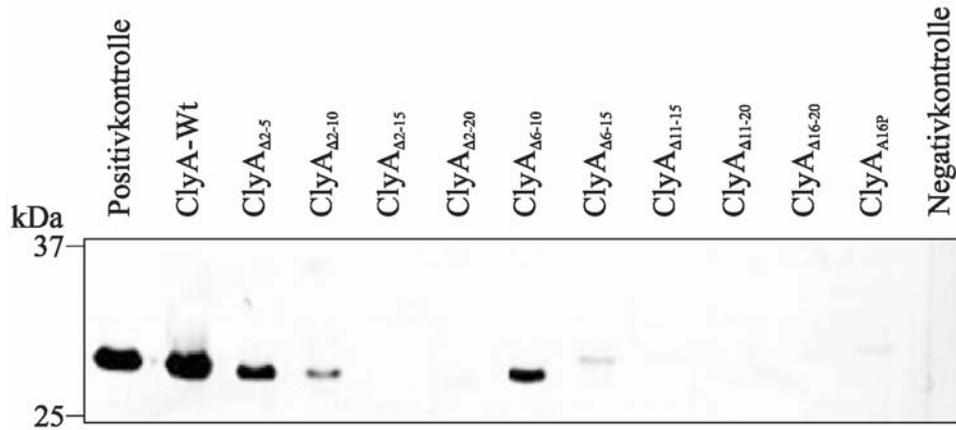


Abb. 13: Analyse der periplasmatischen Proteinpräparationen von rekombinanten DH5 α -Klonen, die wildtypisches ClyA bzw. ClyA-Derivate produzieren, im konventionellen Westernblot.

Periplasmatische Zellfraktionen des Stammes DH5 α /pAL201 (ClyA-Wt) sowie der rekombinanten DH5 α -Klone, die ClyA-Derivate synthetisieren, wurden für eine SDS-PAGE eingesetzt. Aufgetragen wurden periplasmatische Proteine aus 25 μ l Bakterienkultur. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese mittels Westernblot-Analyse auf Vorhandensein von ClyA untersucht. Als Positivkontrolle wurde gereinigtes, wildtypisches ClyA-Protein (0.5 μ g) aufgetragen; als Negativkontrolle wurde die periplasmatische Proteinpräparation des Stammes DH5 α /pUC18 verwendet. Die molekulare Masse der Markerproteine ist links aufgeführt (kDa).

Während jedoch im Fall von DH5 α /pAL201 eine starke ClyA-Bande konstatiert wurde, erschienen die Signale der ClyA-Mutanten ClyA Δ ₂₋₅ und ClyA Δ ₆₋₁₀ schon deutlich schwächer. Dies bedeutete, dass bereits die Deletion der Aminosäuren zwei bis fünf und sechs bis zehn in der N-terminalen Region des Proteins den Transport von ClyA in das Periplasma erheblich störten. Die gut sichtbaren und etwa gleich starken Signale machten deutlich, dass der Toxintransport über die Zytoplasmamembran durch diese beiden Deletionen vergleichbar eingeschränkt wurde. Weitaus schwächere Signale zeigten die ClyA-Proteine der periplasmatischen Proteinpräparationen aus DH5 α /pAL201-*clyA* Δ ₂₋₁₀ und DH5 α /pAL201-*clyA* Δ ₆₋₁₅ im Westernblot, wobei die ClyA-Mutante ClyA Δ ₆₋₁₅ in eindeutig geringerer Menge im Periplasma zu finden war als die Toxin-Mutante ClyA Δ ₂₋₁₀. Das schwächste Signal wurde bei der periplasmatischen Zellfraktion des Stammes DH5 α /pAL201-*clyA* Δ _{16P} beobachtet, wo es durch den Austausch der Aminosäure Alanin durch Prolin vermutlich zu einem Bruch in der α -helikalen Region des N-Terminus kommt (Wallace et al., 2000). Offensichtlich wurde der Toxintransport so gravierend gestört, dass die ClyA-Mutante ClyA Δ _{16P} nur in verschwindend geringer Menge im Periplasma nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu wurden die ClyA-Mutanten ClyA Δ ₂₋₁₅, ClyA Δ ₂₋₂₀, ClyA Δ ₁₁₋₁₅, ClyA Δ ₁₁₋₂₀ und ClyA Δ ₁₆₋₂₀ in den periplasmatischen Proteinfraktionen nicht detektiert. Demnach fand eine Translokation dieser ClyA-Proteine ins Periplasma nicht mehr statt. Als Folge dieser Mutationen kam es offenbar

zur Anhäufung des ClyA-Proteins im Zytoplasma und/oder in der Zytoplasmamembran, was für die Bakterienzelle eine Stress-Situation bedeuten könnte. Diese Vermutung wurde unterstützt durch die Tatsache, dass die Bakterienstämme DH5 α /pAL201-*clyA* Δ ₁₁₋₁₅, DH5 α /pAL201-*clyA* Δ ₁₁₋₂₀ und DH5 α /pAL201-*clyA* Δ ₁₆₋₂₀ ein schlechtes Zellwachstum aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bereits kleine Deletionen am N-Terminus von Aminosäureposition zwei bis zehn (ClyA Δ ₂₋₅, ClyA Δ ₆₋₁₀, ClyA Δ ₂₋₁₀) die Sekretion von ClyA über die Zytoplasmamembran von *E. coli* stark beeinträchtigten. Größere Deletionen am N-Terminus von vierzehn oder neunzehn Aminosäuren (ClyA Δ ₂₋₁₅, ClyA Δ ₂₋₂₀) führten zum vollständigen Erliegen des Zytolysintransports. Deletionen zwischen Aminosäureposition zehn und zwanzig sowie die Substitution A16→P inhibierten die Translokation des Toxins so tiefgreifend, dass das ClyA-Protein im Periplasma nur noch in sehr geringer Menge (ClyA Δ ₆₋₁₅, ClyA Δ _{A16P}) oder gar nicht mehr nachzuweisen war (ClyA Δ ₁₁₋₁₅, ClyA Δ ₁₁₋₂₀, ClyA Δ ₁₆₋₂₀). Diese in Tabelle 8 zusammengefassten Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die N-terminale Region von ClyA einen wesentlichen Faktor für die Sekretion des Toxins über die Zytoplasmamembran von *E. coli* darstellt.

Tab. 8: Nachweis der ClyA-Mutanten in den periplasmatischen und intrazellulären Zellfraktionen der rekombinanten DH5 α -Klone.

ClyA / ClyA-Mutante	ClyA-Menge im Periplasma ^a	ClyA-Menge im Zytoplasma ^a
ClyA-Wt	+++	+++
ClyA Δ ₂₋₅	++	+++
ClyA Δ ₂₋₁₀	+	+++
ClyA Δ ₂₋₁₅	-	+++
ClyA Δ ₂₋₂₀	-	+++
ClyA Δ ₆₋₁₀	+ / +++	++ / +++
ClyA Δ ₆₋₁₅	(+)	+++
ClyA Δ ₁₁₋₁₅	-	+ / ++
ClyA Δ ₁₁₋₂₀	-	+ / ++
ClyA Δ ₁₆₋₂₀	-	+ / ++
ClyA Δ _{A16P}	(-)	+++

^a +++ (sehr stark), ++ (stark), ++/+++ (stark bis sehr stark), + (gemäßigt stark), +/++ (gemäßigt stark bis stark), (+) (schwach), (-) (minimalst), - (kein ClyA).

1.4.2 Analyse der inneren und äußeren Membran von rekombinanten DH5 α -Klonen, die ClyA-Mutanten synthetisieren

Ausgehend von der Beobachtung, dass manche der ClyA-Mutanten bei ihrer Synthese in *E. coli* DH5 α das Zellwachstum beeinträchtigten (ClyA Δ_{11-15} , ClyA Δ_{11-20} , ClyA Δ_{16-20}) und nicht über die Zytoplasmamembran transportiert wurden (ClyA Δ_{11-15} , ClyA Δ_{11-20} , ClyA Δ_{16-20} , ClyA Δ_{2-15} , ClyA Δ_{2-20}), stellte sich die Frage, ob diese ClyA-Mutanten in der Zytoplasmamembran steckten. Daher sollten die inneren und äußeren Membranen der rekombinanten *E. coli* DH5 α -Klone, die ClyA-Derivate produzierten, auf das Vorhandensein von ClyA analysiert werden.

Die Membranfraktionierung von Bakterien (Osborn et al., 1972) wird ermöglicht durch die unterschiedliche Zusammensetzung der inneren und äußeren Membran. Durch Ultrazentrifugation von Bakterienlysaten in einem Saccharose-Stufengradienten lassen sich die Membranen in vier Banden unterschiedlicher Dichte auftrennen. Dabei beinhalten die sehr dicht beieinander liegenden leichteren L₁- und L₂-Banden die Zytoplasmamembran, während die dichteste Bande (H-Bande) die äußere Zellmembran darstellt. Zwischen der H-Bande und den zwei L-Banden befindet sich eine Schicht mittlerer Dichte (M-Bande), die neben der äußeren Membran auch Anteile der Zytoplasmamembran enthält. Auf diesem Weg lassen sich äußere und innere Membran von Bakterien isolieren und können anschließend durch SDS-PAGE bzw. im Westernblot analysiert werden.

Tatsächlich war die eindeutige Trennung von äußerer und innerer Membran bei den *E. coli* DH5 α -Klonen, die ClyA-Mutanten synthetisierten, ebenso wenig möglich wie bei *E. coli* DH5 α /pAL201. Nach erfolgter Ultrazentrifugation kam es nicht zu der erwarteten Auftrennung der Membranen in scharfe L₁-, L₂-, M-, und H-Banden. Vielmehr zeigte der Saccharose-Stufengradient unscharfe und ineinander übergehende Banden, die sich nicht sauber voneinander trennen ließen. Zusätzlich variierte die Anzahl der Banden sehr stark, so dass in einem Versuch bis zu sechs Banden zu erkennen waren, die nicht eindeutig zuzuordnen waren. Die Ursache hierfür ist vermutlich, dass die Lyse der Bakterien durch Ultraschall unzureichend war und die Fragmentierung der Zellen nicht vollständig erfolgte. Somit lagen mehr gemischte als reine zytoplasmatische und äußere Membranfetzen vor. Ein weiterer Grund ist möglicherweise, dass nach der Lyse der Zellen die im Überstand enthaltenen inneren und äußeren Membranfragmente bei der Ultrazentrifugation nicht hinreichend pelletierten, da nur ein bedingt geeigneter Rotor zur Verfügung stand und dadurch bei geringerer Drehzahl zentrifugiert werden musste. Dementsprechend erfolgte die

anschließende Auftrennung mit weniger und/oder mit nicht ausreichend fragmentiertem Membranmaterial, so dass die Ultrazentrifugation nur zur Bildung von diffusen, nicht zuordnungsfähigen Proteinbanden führte. Die Analyse der Membranfraktionen in der SDS-PAGE hatte somit keine Aussagekraft, so dass dieser Versuchsansatz keine weiteren Erkenntnisse hinsichtlich der Sekretion über die Zytoplasmamembran von ClyA liefern konnte.

1.5 Auswirkungen der in ClyA eingeführten Mutationen auf die Oligomerbildung des Zytolysins

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass aus jeweils acht bis zehn ClyA-Molekülen gebildete Oligomere an der Ausbildung von Transmembranporen beteiligt sind (Atkins et al., 2000; Wallace et al., 2000). Zudem wurde der Nachweis erbracht, dass die Bildung einer Disulfidbindung zwischen den zwei Cysteinresten an Aminosäureposition 87 und 285 innerhalb eines ClyA-Moleküls die Entstehung der Transmembranporen inhibiert, während der reduzierte Zustand dieser Cysteinreste als essentiell für die Oligomerisierung des ClyA-Proteins erscheint (Atkins et al., 2000; Wallace et al., 2000; Wai et al., 2003a). Der Einfluss der N-terminalen Region des ClyA-Proteins auf seine Oligomerisierungsfähigkeit sollte anhand der in ClyA eingeführten Mutationen aufgeklärt werden. Hierzu wurden die einzelnen ClyA-Mutanten chemisch quervernetzt und auf Bildung von oligomeren Proteinstrukturen überprüft.

1.5.1 ClyA-Quervernetzung durch den chemischen *Crosslinker* Glutaraldehyd

Die chemische Quervernetzung des ClyA-Proteins erfolgte unter Verwendung zytoplasmatischer Zellfraktionen von DH5 α /pAL201 (ClyA-Wildtyp) und von rekombinanten DH5 α -Klonen, die ClyA-Derivate erzeugten, nach Zusatz von Dithiothreitol (DTT) mit dem homobifunktionalen *Crosslinker* Glutaraldehyd. Durch Zugabe von DTT wurde gewährleistet, dass die Cysteinreste der ClyA-Proteine in reduzierter Form vorlagen, was offenbar für die Oligomerisierung des Toxins notwendig ist (Atkins et al., 2000; Wai et al., 2003a). Die Proteinquervernetzung wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 min) durch Zugabe von 1 Vol. 2 \times Probenpuffer gestoppt und durch SDS-PAGE und im konventionellen Westernblot analysiert.

Die Abbildungen 14 bis 25 zeigen die Ergebnisse der Quervernetzung der intrazellulären Proteinpräparationen von ClyA-Mutanten produzierenden DH5 α -Stämmen, von DH5 α /pAL201, der wildtypisches ClyA-Protein synthetisiert, und von DH5 α /pUC18 (Negativkontrolle). In den SDS-PAGE-Analysen mit anschließender Coomassie-Blue-Färbung (Abb. 14 B bis Abb. 25 B) konnte eine Proteinaggregationen (kleine Pfeile) nach Inkubation mit DTT und Glutaraldehyd (Spuren 4-10) in den zytoplasmatischen Zellfraktionen von allen untersuchten DH5 α -Stämmen beobachtet werden. Parallel zur Ausbildung von hochmolekularen Proteinstrukturen nahm die monomere Form der ClyA-Proteine (großer Pfeil) kontinuierlich ab. Des Weiteren konnten bereits durch die separate Inkubation mit Glutaraldehyd für 15 min bei 37°C Vernetzungsreaktionen von Proteinen (Spur 3) festgestellt werden, während die alleinige Zugabe von Dithiotreitol zu keiner erkennbaren Proteinvernetzung führte (Spur 1). Durch Immunoblot-Analysen mit einem Anti-ClyA_{K12}-Antiserum (Abb. 14 A bis Abb. 25 A), konnte bestätigt werden, dass es sich bei den durch DTT und Glutaraldehyd vernetzten Proteinen auch um oligomere Proteinstrukturen (kleine Pfeile) der ClyA-Mutanten bzw. des ClyA-Wildtyps (Spuren 4-10) handelte. Dabei wiesen die im Westernblot detektierten ClyA-Oligomere eine molekulare Masse von mehr als 250 kDa auf, was auf eine Vernetzung von mindestens acht bis zehn ClyA-Molekülen hinwies. Gleichfalls zeigte sich die Notwendigkeit des Dithiotreitol-Zusatzes, da in den ausschließlich mit Glutaraldehyd inkubierten Proben (Spur 3) keine Aggregation von ClyA zu beobachten war. In den vernetzten intrazellulären Proteinpräparationen von DH5 α /pUC18 (Negativkontrolle) wurde wie erwartet keine Vernetzung von ClyA-Protein konstatiert.

Die nachweisliche Bildung von ClyA-Multimeren durch die chemische Vernetzung der ClyA-Mutanten sowie des ClyA-Wildtyps führte zu der Schlussfolgerung, dass der N-terminale Bereich des Zytolysins von Aminosäureposition zwei bis zwanzig für die Ausbildung oligomerer Proteinstrukturen unerheblich ist. Eine Übersicht der Ergebnisse zeigt die Tabelle 9.

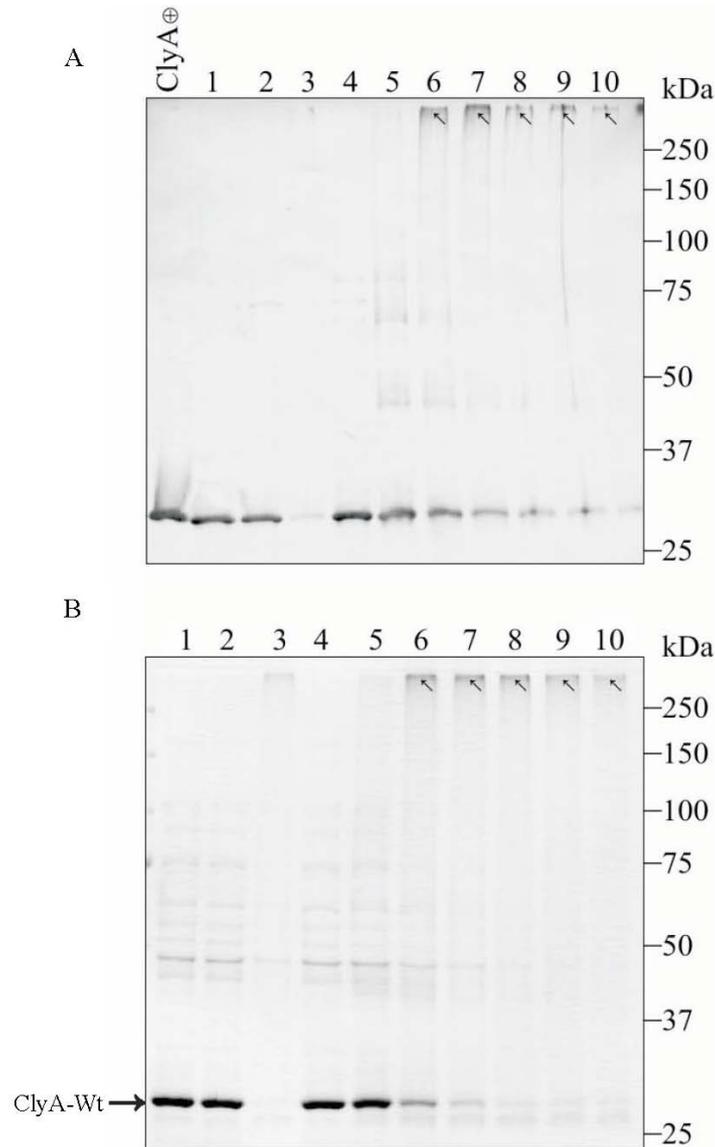


Abb. 14 A, B: Quervernetzung des wildtypischen ClyA-Proteins (ClyA-Wt) von DH5 α /pAL201.

Eine intrazelluläre Proteinpräparation von DH5 α /pAL201 (ClyA-Wt) wurde entweder nur mit DTT, nur mit A. dest bzw. nur mit Glutaraldehyd für insgesamt 15 min bei 37°C bebrütet, oder mit DTT und Glutaraldehyd versetzt und für verschieden lange Zeiträume bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben im konventionellen Westernblot (A) bzw. in der SDS-PAGE mit Coomassie-Blue-Färbung (B) auf Vorhandensein von ClyA untersucht. Aufgetragen wurden intrazelluläre Proteine aus 0.5 μ l Bakterienkultur im Immunoblot bzw. aus 5.0 μ l Bakterienkultur in der SDS-PAGE. Als positive Kontrolle (ClyA+) wurde gereinigtes, wildtypisches ClyA-Protein (0.5 μ g) aufgetragen. ClyA-Oligomere (A) bzw. Proteinaggregate (B) sind durch kleine Pfeile gekennzeichnet. Die molekulare Masse der Markerproteine (kDa) ist rechts aufgeführt.

- Spur 1: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von DTT;
- Spur 2: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von A. dest.;
- Spur 3: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Inkubation mit Glutaraldehyd;
- Spuren 4-10: Intrazelluläre Proteinpräparationen nach Zugabe von DTT und Inkubation mit Glutaraldehyd für 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 min.

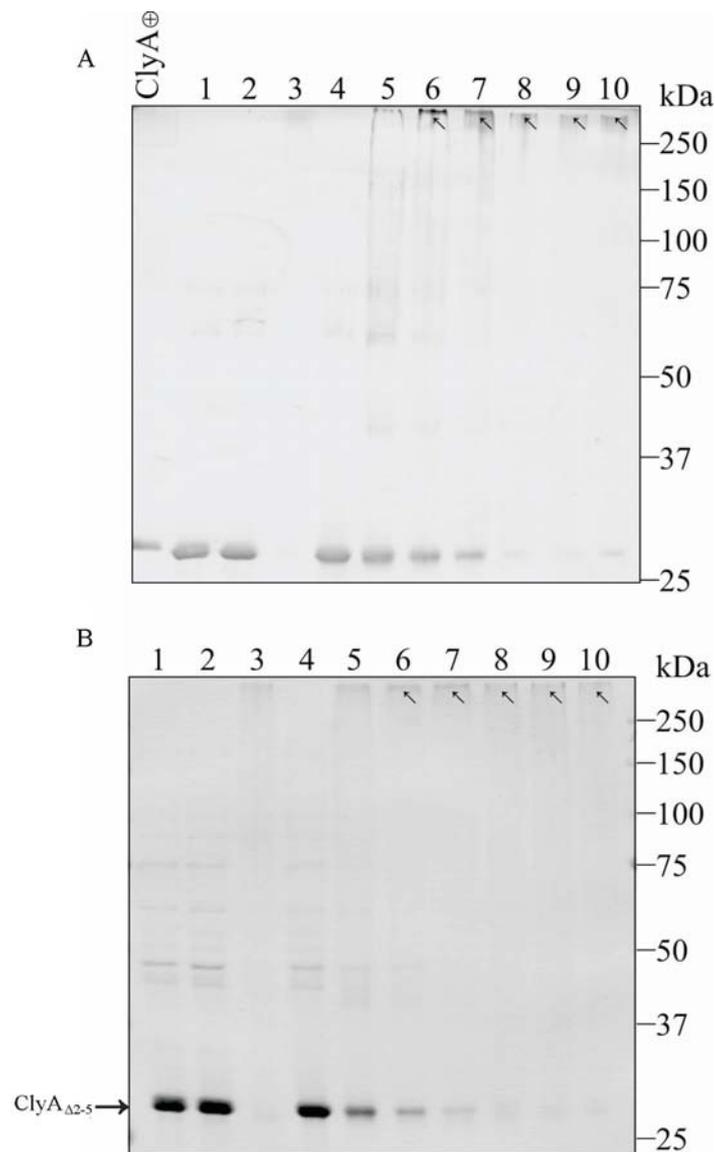


Abb. 15 A, B: Quervernetzung der ClyA-Mutante ClyA_{Δ2-5} von DH5α/pAL201-*clyA*_{Δ2-5}. Die Abbildung 15 A zeigt das Ergebnis des konventionellen Westernblots. In Abbildung 15 B ist das Coomassie-Blue-gefärbte SDS-Gel dargestellt. Die Details zur Versuchsdurchführung sind identisch zur Abbildung 14 A, B.

- Spur 1: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von DTT;
- Spur 2: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von A. dest.;
- Spur 3: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Inkubation mit Glutaraldehyd;
- Spuren 4-10: Intrazelluläre Proteinpräparationen nach Zugabe von DTT und Inkubation mit Glutaraldehyd für 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 min.

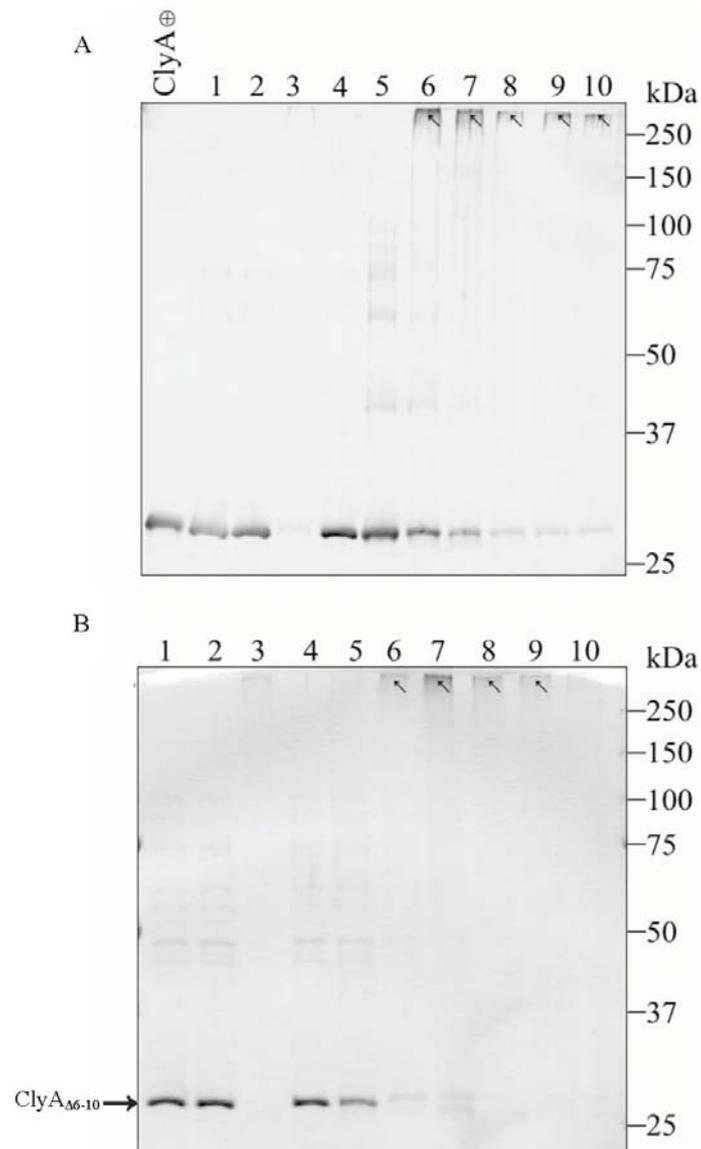


Abb. 16 A, B: Quervernetzung der ClyA-Mutante ClyA Δ 6-10 von DH5 α /pAL201-*clyA* Δ 6-10. Die Abbildung 16 A zeigt das Ergebnis des konventionellen Westernblots. In Abbildung 16 B ist das Coomassie-Blue-gefärbte SDS-Gel dargestellt. Die Details zur Versuchsdurchführung sind identisch zur Abbildung 14 A, B.

- Spur 1: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von DTT;
- Spur 2: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von A. dest.;
- Spur 3: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Inkubation mit Glutaraldehyd;
- Spuren 4-10: Intrazelluläre Proteinpräparationen nach Zugabe von DTT und Inkubation mit Glutaraldehyd für 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 min.

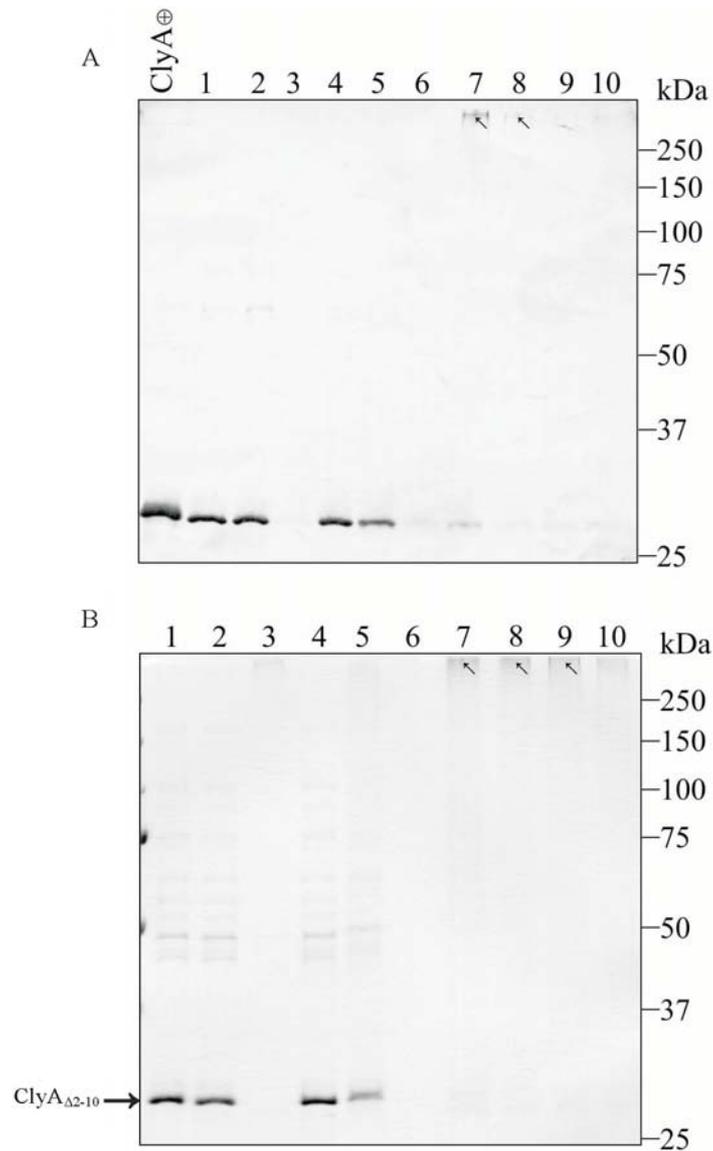


Abb. 17 A, B: Quervernetzung der ClyA-Mutante ClyA Δ 2-10 von DH5 α /pAL201-*clyA* Δ 2-10. Die Abbildung 17 A zeigt das Ergebnis des konventionellen Westernblots. In Abbildung 17 B ist das Coomassie-Blue-gefärbte SDS-Gel dargestellt. Die Details zur Versuchsdurchführung sind identisch zur Abbildung 14 A, B.

- Spur 1: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von DTT;
- Spur 2: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von A. dest.;
- Spur 3: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Inkubation mit Glutaraldehyd;
- Spuren 4-10: Intrazelluläre Proteinpräparationen nach Zugabe von DTT und Inkubation mit Glutaraldehyd für 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 min.

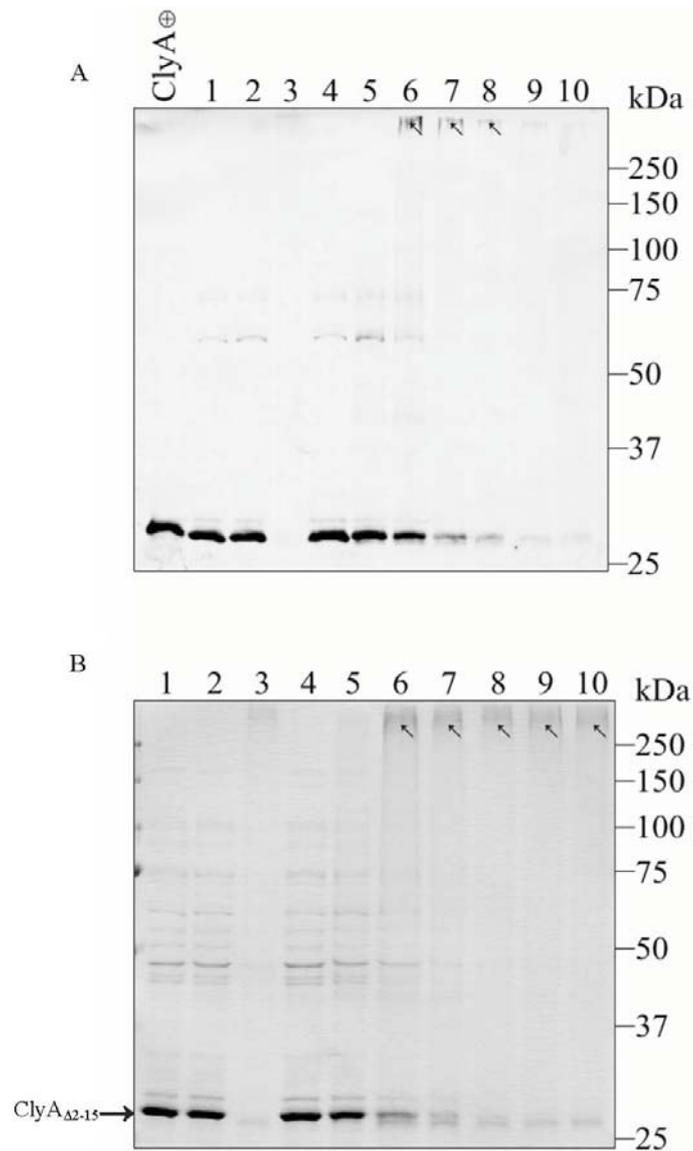


Abb. 18 A, B: Quervernetzung der ClyA-Mutante ClyA Δ_{2-15} von DH5 α /pAL201-*clyA* Δ_{2-15} . Die Abbildung 18 A zeigt das Ergebnis des konventionellen Westernblots. In Abbildung 18 B ist das Coomassie-Blue-gefärbte SDS-Gel dargestellt. Die Details zur Versuchsdurchführung sind identisch zur Abbildung 14 A, B.

- Spur 1: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von DTT;
- Spur 2: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von A. dest.;
- Spur 3: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Inkubation mit Glutaraldehyd;
- Spuren 4-10: Intrazelluläre Proteinpräparationen nach Zugabe von DTT und Inkubation mit Glutaraldehyd für 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 min.

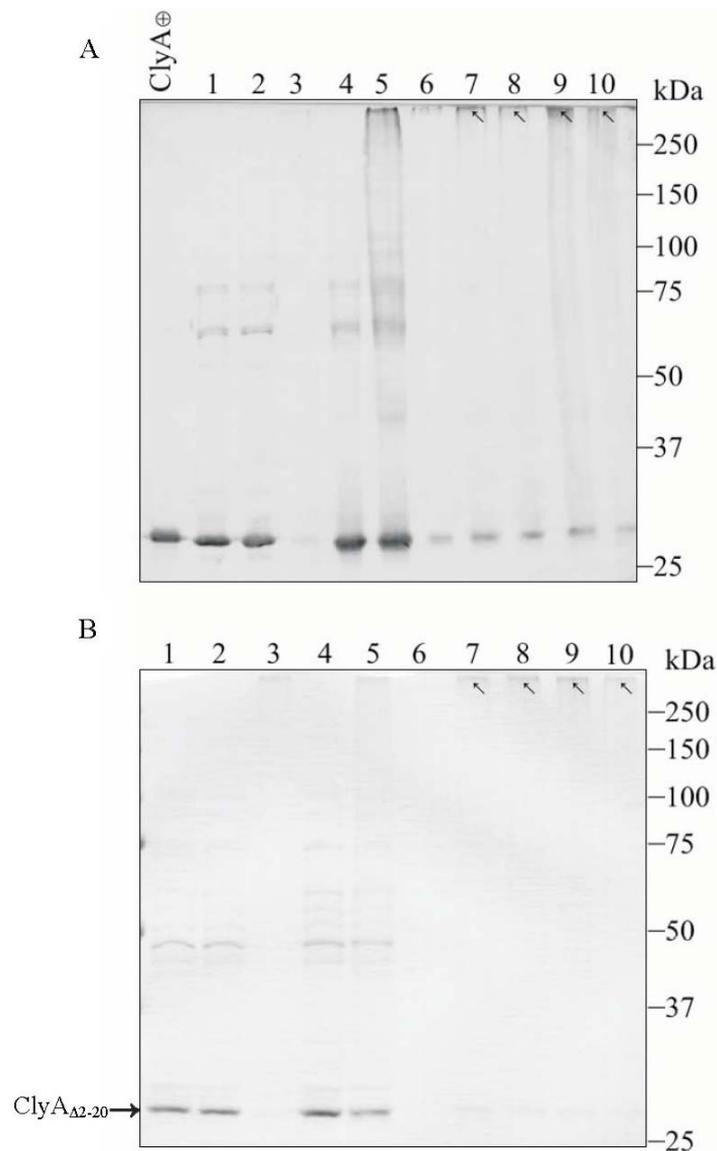


Abb. 19 A, B: Quervernetzung der ClyA-Mutante ClyA Δ 2-20 von DH5 α /pAL201-*clyA* Δ 2-20. Die Abbildung 19 A zeigt das Ergebnis des konventionellen Westernblots. In Abbildung 19 B ist das Coomassie-Blue-gefärbte SDS-Gel dargestellt. Die Details zur Versuchsdurchführung sind identisch zur Abbildung 14 A, B.

- Spur 1: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von DTT;
- Spur 2: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von A. dest.;
- Spur 3: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Inkubation mit Glutaraldehyd;
- Spuren 4-10: Intrazelluläre Proteinpräparationen nach Zugabe von DTT und Inkubation mit Glutaraldehyd für 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 min.

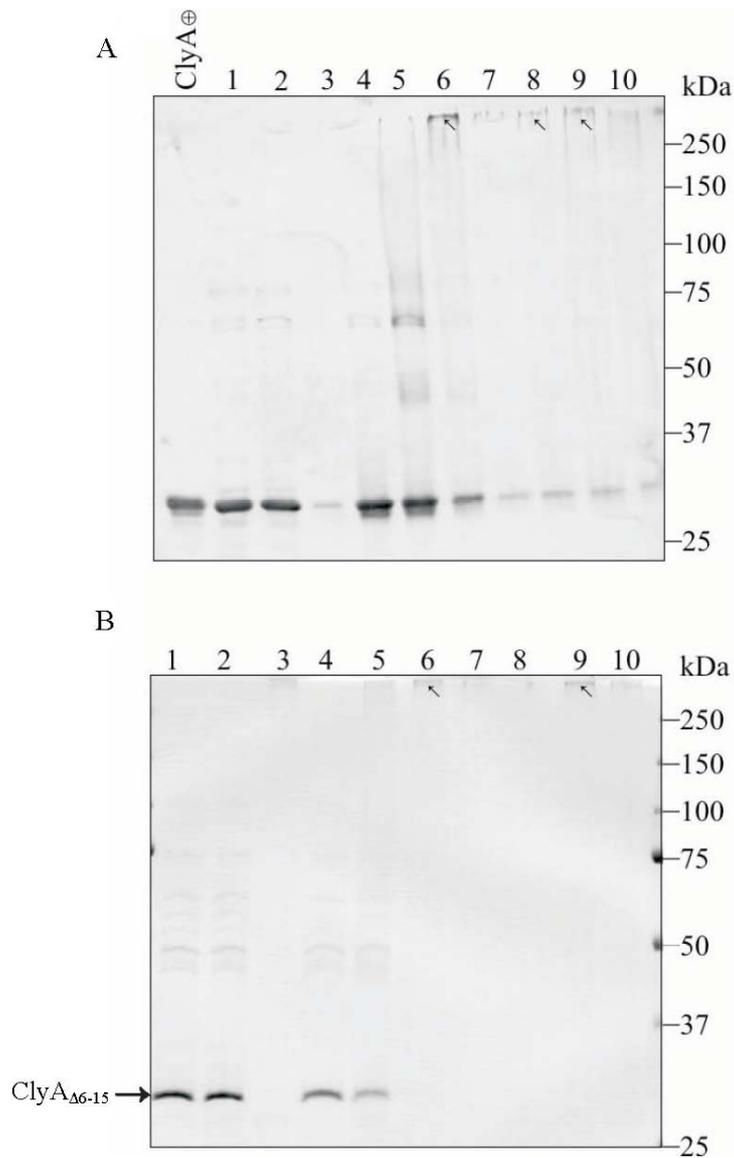


Abb. 20 A, B: Quervernetzung der ClyA-Mutante ClyA_{Δ6-15} von DH5α/pAL201-*clyA*_{Δ6-15}. Die Abbildung 20 A zeigt das Ergebnis des konventionellen Westernblots. In Abbildung 20 B ist das Coomassie-Blue-gefärbte SDS-Gel dargestellt. Die Details zur Versuchsdurchführung sind identisch zur Abbildung 14 A, B.

- Spur 1: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von DTT;
- Spur 2: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von A. dest.;
- Spur 3: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Inkubation mit Glutaraldehyd;
- Spuren 4-10: Intrazelluläre Proteinpräparationen nach Zugabe von DTT und Inkubation mit Glutaraldehyd für 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 min.

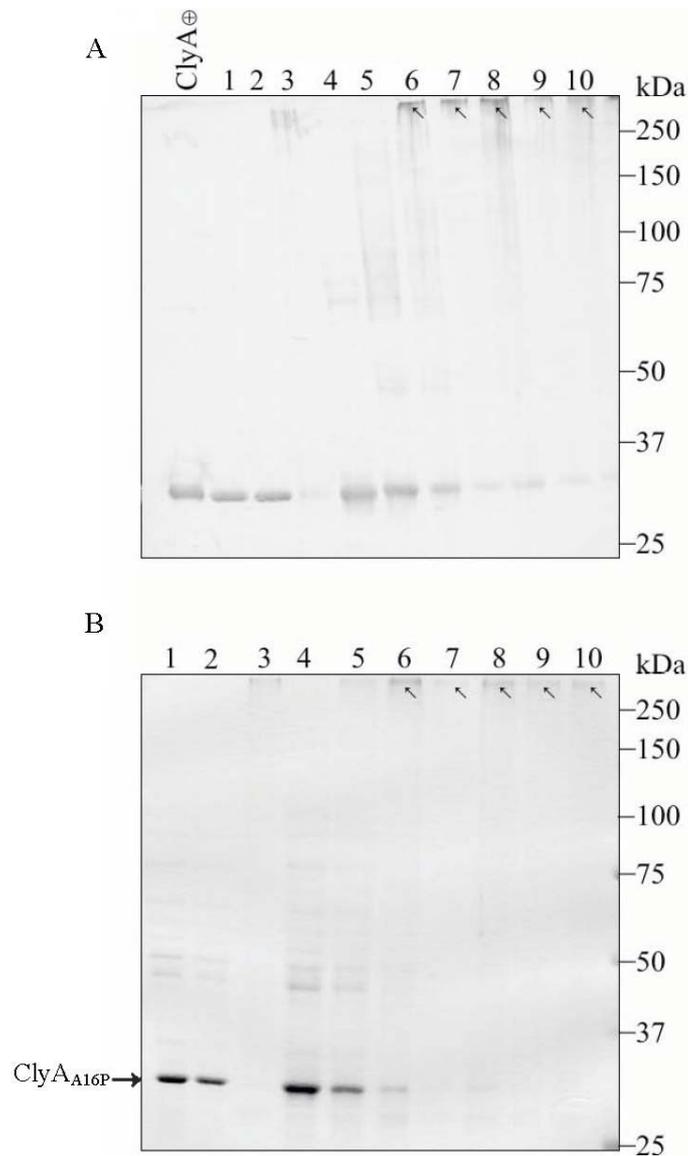


Abb. 21 A, B: Quervernetzung der ClyA-Mutante ClyA_{A16P} von DH5 α /pAL201-*clyA*_{A16P}

Die Abbildung 21 A zeigt das Ergebnis des konventionellen Westernblots. In Abbildung 21 B ist das Coomassie-Blue-gefärbte SDS-Gel dargestellt. Die Details zur Versuchsdurchführung sind identisch zur Abbildung 14 A, B.

- Spur 1: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von DTT;
- Spur 2: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von A. dest.;
- Spur 3: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Inkubation mit Glutaraldehyd;
- Spuren 4-10: Intrazelluläre Proteinpräparationen nach Zugabe von DTT und Inkubation mit Glutaraldehyd für 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 min.

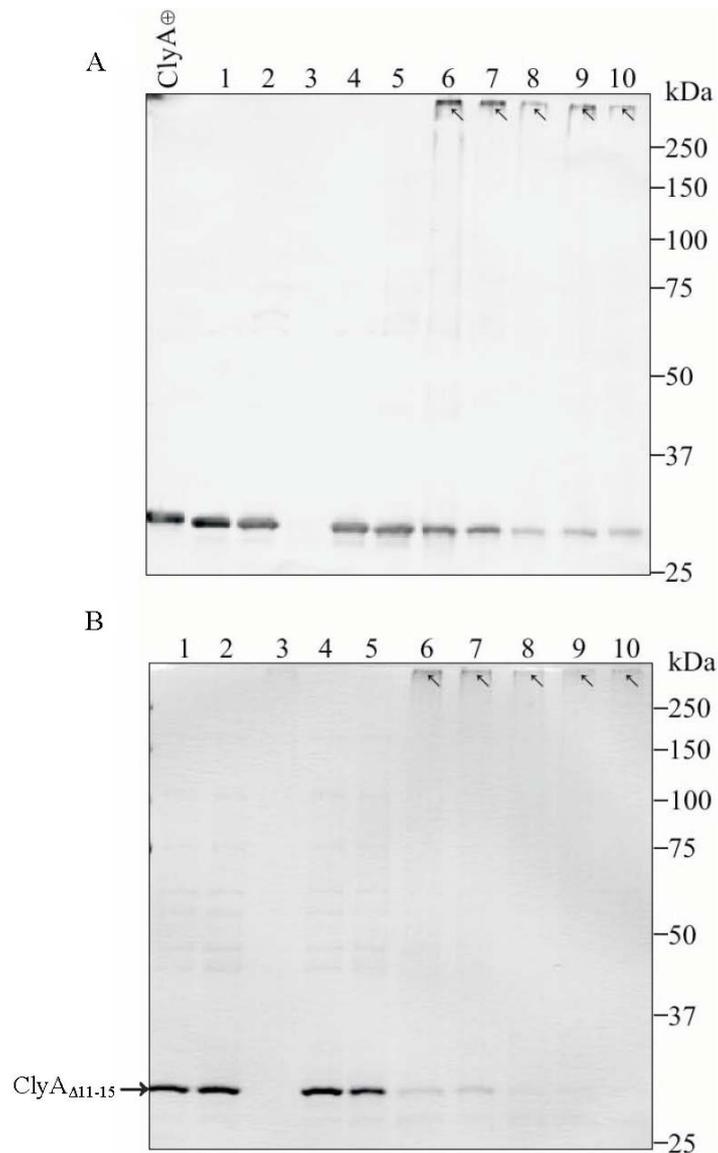


Abb. 22 A, B: Quervernetzung der ClyA-Mutante ClyA Δ 11-15 von DH5 α /pAL201-clyA Δ 11-15.

Die Abbildung 22 A zeigt das Ergebnis des konventionellen Westernblots. In Abbildung 22 B ist das Coomassie-Blue-gefärbte SDS-Gel dargestellt. Die Details zur Versuchsdurchführung sind identisch zur Abbildung 14 A, B.

- Spur 1: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von DTT;
- Spur 2: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von A. dest.;
- Spur 3: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Inkubation mit Glutaraldehyd;
- Spuren 4-10: Intrazelluläre Proteinpräparationen nach Zugabe von DTT und Inkubation mit Glutaraldehyd für 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 min.

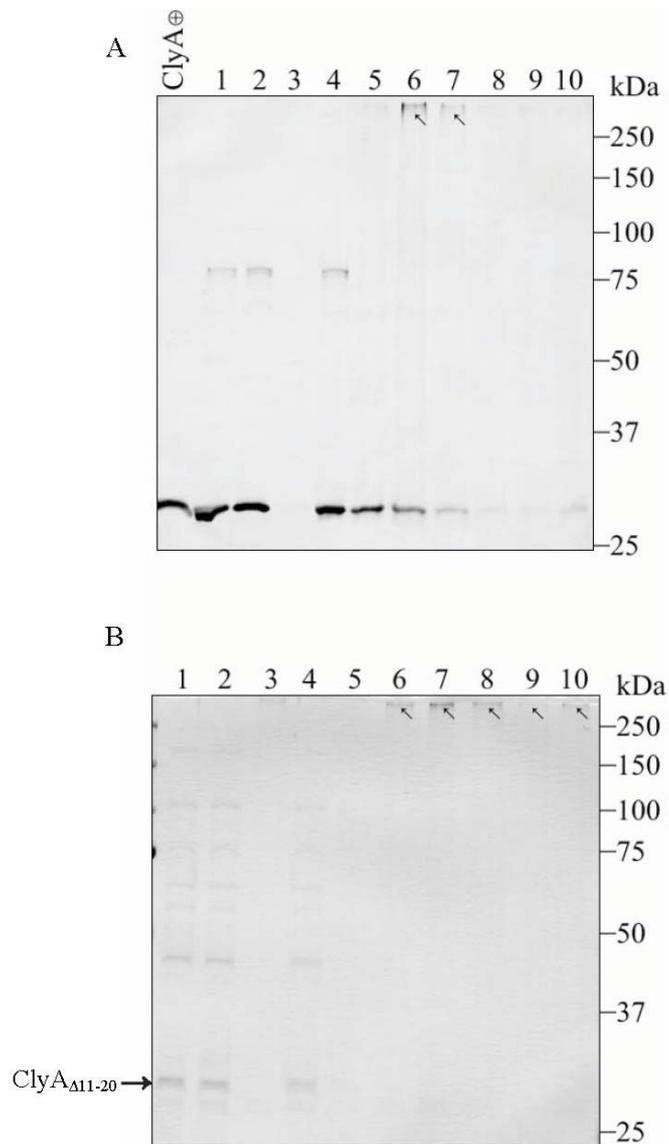


Abb. 23 A, B: Quervernetzung der ClyA-Mutante ClyA Δ 11-20 von DH5 α /pAL201-clyA Δ 11-20.

Die Abbildung 23 A zeigt das Ergebnis des konventionellen Westernblots. In Abbildung 23 B ist das Coomassie-Blue-gefärbte SDS-Gel dargestellt. Die Details zur Versuchsdurchführung sind identisch zur Abbildung 14 A, B.

- Spur 1: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von DTT;
- Spur 2: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von A. dest.;
- Spur 3: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Inkubation mit Glutaraldehyd;
- Spuren 4-10: Intrazelluläre Proteinpräparationen nach Zugabe von DTT und Inkubation mit Glutaraldehyd für 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 min.

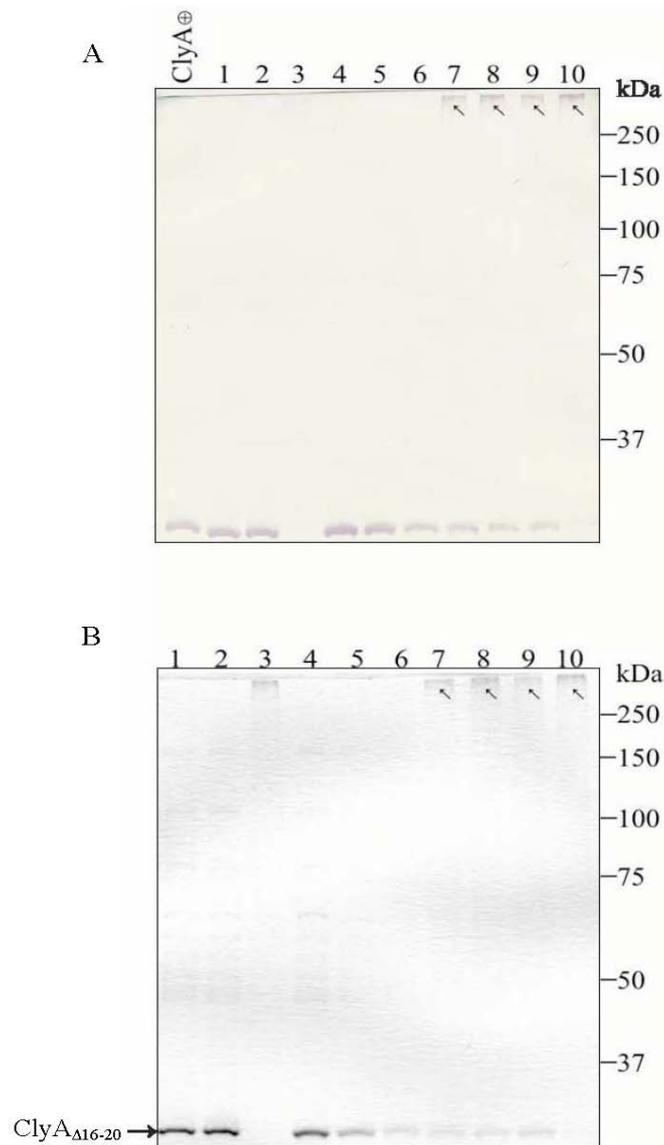


Abb. 24 A, B: Quervernetzung der ClyA-Mutante ClyA Δ 16-20 von DH5 α /pAL201-clyA Δ 16-20.

Die Abbildung 24 A zeigt das Ergebnis des konventionellen Westernblots. In Abbildung 24 B ist das Coomassie-Blue-gefärbte SDS-Gel dargestellt. Die Details zur Versuchsdurchführung sind identisch zur Abbildung 14 A, B.

- Spur 1: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von DTT;
- Spur 2: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von A. dest.;
- Spur 3: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Inkubation mit Glutaraldehyd;
- Spuren 4-10: Intrazelluläre Proteinpräparationen nach Zugabe von DTT und Inkubation mit Glutaraldehyd für 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 min.

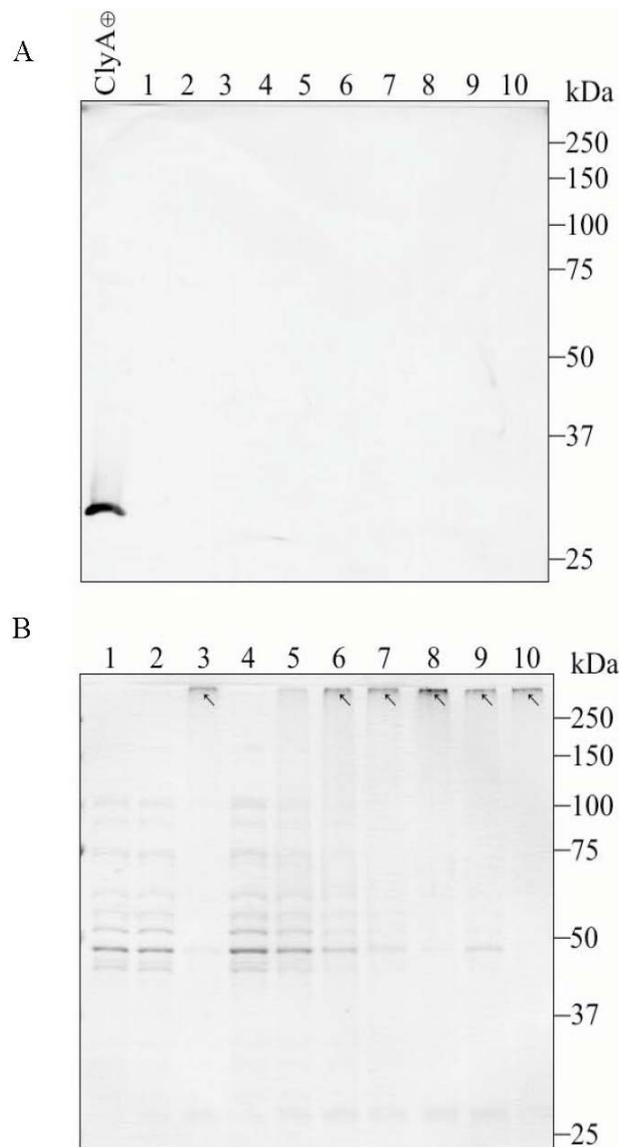


Abb. 25 A, B: Quervernetzung der zytoplasmatischen Zellfraktion von DH5 α /pUC18 (Negativkontrolle).

Die Abbildung 25 A zeigt das Ergebnis des konventionellen Westernblots. In Abbildung 25 B ist das Coomassie-Blue-gefärbte SDS-Gel dargestellt. Die Details zur Versuchsdurchführung sind identisch zur Abbildung 14 A, B.

- Spur 1: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von DTT;
- Spur 2: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Zugabe von A. dest.;
- Spur 3: Intrazelluläre Proteinpräparation nach Inkubation mit Glutaraldehyd;
- Spuren 4-10: Intrazelluläre Proteinpräparationen nach Zugabe von DTT und Inkubation mit Glutaraldehyd für 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 min.

Tab. 9: Nachweis oligomerer ClyA-Proteine von rekombinanten *E. coli* DH5 α -Klonen nach Zugabe von DTT und chemischer Quervernetzung mit Glutaraldehyd.

Bakterienstamm	Nachweis von ClyA-Oligomeren
DH5 α /pAL201 (ClyA-Wildtyp)	ja
DH5 α /pAL201- <i>clyA</i> Δ ₂₋₅	ja
DH5 α /pAL201- <i>clyA</i> Δ ₆₋₁₀	ja
DH5 α /pAL201- <i>clyA</i> Δ ₂₋₁₀	ja
DH5 α /pAL201- <i>clyA</i> Δ ₂₋₁₅	ja
DH5 α /pAL201- <i>clyA</i> Δ ₂₋₂₀	ja
DH5 α /pAL201- <i>clyA</i> Δ ₆₋₁₅	ja
DH5 α /pAL201- <i>clyA</i> Δ ₁₁₋₁₅	ja
DH5 α /pAL201- <i>clyA</i> Δ ₁₁₋₂₀	ja
DH5 α /pAL201- <i>clyA</i> Δ ₁₆₋₂₀	ja
DH5 α /pAL201- <i>clyA</i> _{A16P}	ja
DH5 α /pUC18 (Negativkontrolle)	nein

1.6 Auswirkungen der gezielten Mutationen in der N-terminalen Region von ClyA auf die Bindungsfähigkeit des Proteins an Erythrozytenmembranen

Die Insertion von ringförmig angeordneten ClyA-Oligomeren (Wallace et al., 2000) in Zellmembranen von Erythrozyten und die damit einhergehende Bildung von Transmembranporen verursacht in einem hypotonen Milieu einen kollektionalosmotischen Wassereinstrom in die Zelle, der schließlich zur Zell-Lyse führen kann. Für die Insertion in Zielmembranen scheint insbesondere die hydrophobe β -Haarnadelstruktur, die in der wasserlöslichen Struktur des ClyA-Moleküls eine exponierte Position einnimmt, von essentieller Bedeutung zu sein (Atkins et al., 2000; Wallace et al., 2000). Da verschiedene Deletionen wie auch der Aminosäureaustausch A16 \rightarrow P innerhalb der N-terminalen Region des ClyA-Proteins zu einer drastischen Beeinträchtigung bzw. zum Verlust der hämolytischen Aktivität führten, stellte sich die Frage, ob die entsprechenden ClyA-Mutanten noch die Fähigkeit besitzen, an Erythrozytenmembranen zu binden. Um diese Frage zu klären, wurden rote Blutkörperchen mit wildtypischem ClyA bzw. den ClyA-Mutanten inkubiert und die Erythrozytenmembranen anschließend auf das Vorhandensein von ClyA-Protein durch SDS-PAGE und im Westernblot analysiert. Anhand eines Vorversuches, in dem Erythrozyten mit

wildtypischem ClyA-Protein inkubiert wurden, sollte überprüft werden, ob sich in den Erythrozytenmembranen tatsächlich gebundenes Toxin nachweisen ließ. Dazu wurde 1 ml Erythrozytensuspension (ca. 7×10^8 Zellen/ml) mit den periplasmatischen Proteinen aus 600 μ l Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α /pAL201 inkubiert, was zur vollständigen Lyse der Erythrozyten führte. Nach mehreren Waschvorgängen wurden die Erythrozytenmembranen (*ghosts*) in 100 μ l 1 \times Probenpuffer aufgenommen und durch SDS-PAGE bzw. im Immunoblot untersucht.

Wie der Abbildung 26 zu entnehmen ist, konnte bei der Zellmembranpräparation, die durch Inkubation von Erythrozyten mit periplasmatischen Proteinen von DH5 α /pAL201 (EZ + ClyA-Wt) entstand, eine auffallende Proteinbande bei ca. 31 kDa festgestellt werden (Pfeil), die auch im periplasmatischen Proteinextrakt von DH5 α /pAL201 (ClyA-Wt) zu finden war (Pfeil). In den Membranen von Erythrozyten, die durch die Zugabe von Wasser lysiert wurden (Negativkontrolle; EZ + A. dest.), war diese Proteinbande hingegen nicht zu beobachten. Daher konnte angenommen werden, dass es sich um die Proteinbande des an den Erythrozytenmembranen gebundenen ClyA-Wildtyps handelte.

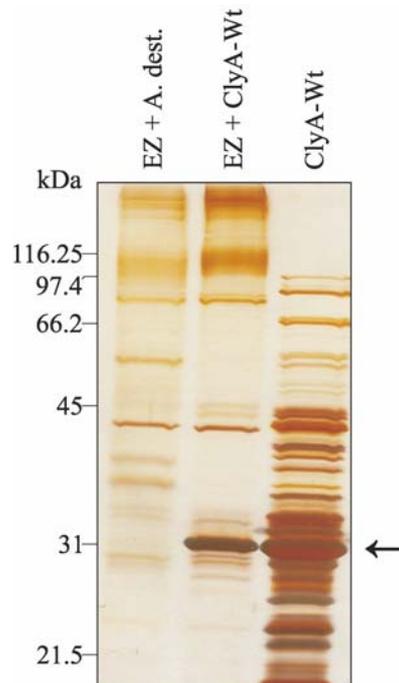


Abb. 26: Nachweis der Interaktion von wildtypischem ClyA-Protein (ClyA-Wt) mit Erythrozyten-Zellmembranen (EZ).

Das Silbernitrat-gefärbte SDS-Gel (12.5%) zeigt Proteine von Erythrozyten-Zellmembranen (EZ) nach Inkubation mit Wasser (EZ + A. dest.) bzw. mit periplasmatischen Proteinen von DH5 α /pAL201 (EZ + ClyA-Wt). Vergleichend dazu sind die periplasmatischen Proteine aus 30 μ l Übernachtskultur von DH5 α /pAL201 (ClyA-Wt) aufgetragen. Das ClyA-Protein ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die molekulare Masse der Markerproteine ist links aufgeführt (kDa). Weitere Details zur Versuchsdurchführung siehe Text.

Dieses Ergebnis wurde in einem anschließenden Westernblot durch den Einsatz des Anti-ClyA_{K12}-Antiserums bestätigt (Abb.27).

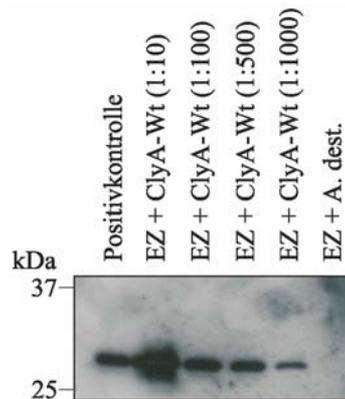


Abb. 27: Nachweis der Assoziation von wildtypischem ClyA-Protein (ClyA-Wt) mit Erythrozytenmembranen.

Im Immunoblot (*ECL Plus Western Blotting Detection Kit*) analysiert wurden jeweils 1 µl der unterschiedlich stark verdünnten Proteine der Erythrozytenmembranen (1:10, 1:100, 1:500, 1:1000) nach Inkubation mit periplasmatischen Proteinen von DH5α/pAL201 (EZ + ClyA-Wt) im Vergleich zu 1 µl unverdünnter Proteinprobe von Erythrozytenmembranen nach Inkubation mit Wasser (EZ + A. dest.). Als Positivkontrolle wurde gereinigtes, wildtypisches ClyA-Protein (2.5 ng) verwendet. Die molekulare Masse der Markerproteine ist seitlich aufgeführt (kDa).

In den anschließenden Experimenten sollten die ClyA-Mutanten auf ihre Bindungsfähigkeit an Erythrozyten examiniert werden. Für die Inkubation von jeweils 1 ml Erythrozytensuspension (ca. 7×10^8 Zellen/ml) wurden gesamtzelluläre Proteinpräparationen von rekombinanten *E. coli* DH5α-Klonen, die mutiertes ClyA-Protein synthetisierten, verwendet, da bei vielen ClyA-Derivaten eine erhebliche Störung des Transports über die Zytoplasmamembran vorlag. Die eingesetzte Proteinmenge entsprach dem gesamtzellulären Proteinanteil von 10 µl Übernachtskultur. Bei Erythrozyten, die infolge der Inkubation mit nicht-hämolytischen oder schwach hämolytischen ClyA-Mutanten nicht oder nur teilweise lysierten, wurde durch Zugabe von A. dest. die vollständige Lyse herbeigeführt. Eine Negativkontrolle wurde durch Inkubation der Erythrozytensuspension mit dem Bakterienlysat von DH5α/pUC18 und anschließende Lyse der Erythrozyten mit A. dest. erstellt. Die Analyse der isolierten Zellmembranen (*ghosts*) auf Vorhandensein von ClyA-Protein erfolgte im konventionellen Westernblot mit einem Anti-ClyA_{K12}-Antiserum.

Wie aus Abbildung 28 hervorgeht, wurde sowohl der ClyA-Wildtyp als auch sämtliche ClyA-Mutanten in den isolierten Erythrozytenmembranen detektiert. Daher ist zu vermuten, dass die Deletionen am N-Terminus von ClyA wie auch der Aminosäureaustausch A16→P für die Bindung an Erythrozytenmembranen nicht primär von Bedeutung sind. Die erheblich schwächeren Signale der im Westernblot detektierten ClyA-Mutanten ClyA_{Δ11-15}, ClyA_{Δ11-20}

und ClyA $_{\Delta 16-20}$ waren darauf zurückzuführen, dass die rekombinanten DH5 α -Klone, die diese Toxine überproduzierten, deutlich geringeres Wachstum präsentierten. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei manchen ClyA-Mutanten die Fähigkeit zur Bindung an die Erythrozytenmembran teilweise beeinträchtigt war. So zeigte das ClyA-Derivat ClyA $_{\Delta 2-20}$ im Westernblot ein schwächeres Signal als der ClyA-Wildtyp, obwohl die Stämme DH5 α /pAL201-*clyA* $_{\Delta 2-20}$ und DH5 α /pAL201 vergleichbares Wachstum aufwiesen.

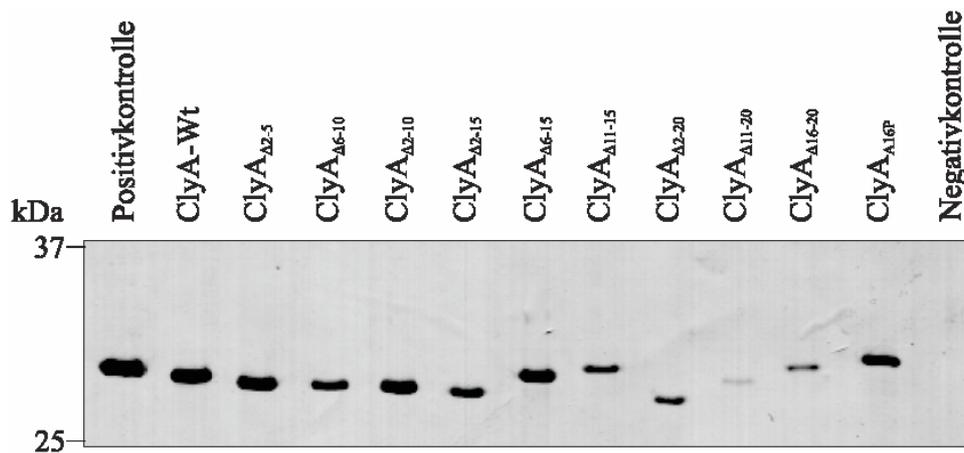


Abb. 28: Nachweis der Interaktion von wildtypischem ClyA-Protein und von ClyA-Mutanten mit Erythrozytenmembranen.

Im konventionellen Westernblot wurden die Membranfragmente der Erythrozyten auf Bindung von ClyA nach Inkubation mit Zellysaten von rekombinanten DH5 α -Klonen, die wildtypisches ClyA bzw. ClyA-Mutanten überproduzierten, analysiert. Gereinigtes, wildtypisches ClyA-Protein (0.5 μ g) wurde als Positivkontrolle verwendet. Als Negativkontrolle fungierten Membranfragmente von Erythrozyten, die zuvor mit dem Bakterienlysat von DH5 α /pUC18 inkubiert und durch Zugabe von A. dest. lysiert wurden. Positive Signale zeigen das gebundene Zytolysin an. Die molekulare Masse der Markerproteine ist links aufgeführt (kDa). Weitere Details zur Versuchsdurchführung sind dem Text zu entnehmen.

1.7 Auswirkungen der N-terminalen Mutationen auf die porenbildende Eigenschaft des ClyA-Proteins an künstlichen Lipidmembranen

Untersuchungen an künstlichen Lipidmembranen zeigten, dass das Zytolysin ClyA von *E. coli* in Membranen aus Diphytanoylphosphatidylcholin (DPhPC/*n*-Decan) stabile, mäßig kationenselektive Transmembranporen erzeugt, die in Gegenwart von 1 M KCl-Lösung eine durchschnittliche Leitfähigkeit von ca. 10 nS aufweisen (Ludwig et al., 1999). Allerdings wurden unter diesen Bedingungen zum Teil auch geringere bzw. höhere Leitfähigkeiten gemessen, die zwischen 6 und 14 nS liegen (Ludwig et al., 1999). Unter der Voraussetzung, dass die erzeugten Membranporen einen Hohlzylinder bilden, deren flüssiger Innenraum dieselbe spezifische Leitfähigkeit (σ) besitzt wie die verwendete Elektrolytlösung, lässt sich mit Hilfe der gemessenen Einzelkanal-Leitfähigkeit (G) der Durchmesser einer Membranpore

berechnen. Dazu wird die Gleichung $G = \sigma \pi r^2 / l$ verwendet, wobei σ die spezifische Leitfähigkeit der 1 M KCl-Lösung ($\sigma = 112 \text{ mS cm}^{-1}$), r der Poren-Radius und l die Länge des Einzelkanals ist (Flügge et al., 1984). In der Annahme, dass die Länge des Einzelkanals der Dicke der Lipidmembran ($l = 0.6 \text{ nm}$) entspricht (Benz et al., 1989), beträgt der Durchmesser des Einzelkanals einer von wildtypischem ClyA erzeugten Membranpore ca. 2.6 nm bei einer gemessenen Leitfähigkeit von 10 nS in Gegenwart einer 1 M KCl-Lösung (Ludwig et al., 1999). Osmotische Protektionsexperimente mit Erythrozyten bestätigten die ermittelte Größe der von wildtypischem ClyA-Protein erzeugten Transmembranporen (Ludwig et al., 1999; Oscarsson et al., 1999).

Die porenbildende Aktivität der von rekombinanten *E. coli* DH5 α -Klonen gebildeten ClyA-Mutanten wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Roland Benz (Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften [Biozentrum], Lehrstuhl für Biotechnologie, Universität Würzburg) an künstlichen Lipidmembranen aus DPhPC/*n*-Decan untersucht und mit der des wildtypischen Toxins verglichen. Leitfähigkeitsmessungen an künstlichen Lipid-Bilayern sollten insbesondere Aufschluss über die Fähigkeit zur Porenbildung sowie deren Häufigkeit, die Porengröße und die Porenstabilität bei gegebener Toxinkonzentration geben. In Vorarbeiten wurden zunächst das wildtypische ClyA-Protein und die ClyA-Mutanten durch präparative SDS-PAGE aus Bakterienlysaten von *E. coli* DH5 α /pAL201 bzw. von *E. coli* DH5 α mit den entsprechenden pAL201-Derivaten isoliert. Im Anschluß daran erfolgte die Bestimmung und Angleichung der Proteinkonzentration der gereinigten ClyA-Präparationen, so dass sämtliche ClyA-Mutanten wie auch der ClyA-Wildtyp in einer Proteinendkonzentration von ca. 0.5 mg/ml vorlagen. Die präparativ isolierten ClyA-Proteine sind in Abbildung 29 dargestellt.

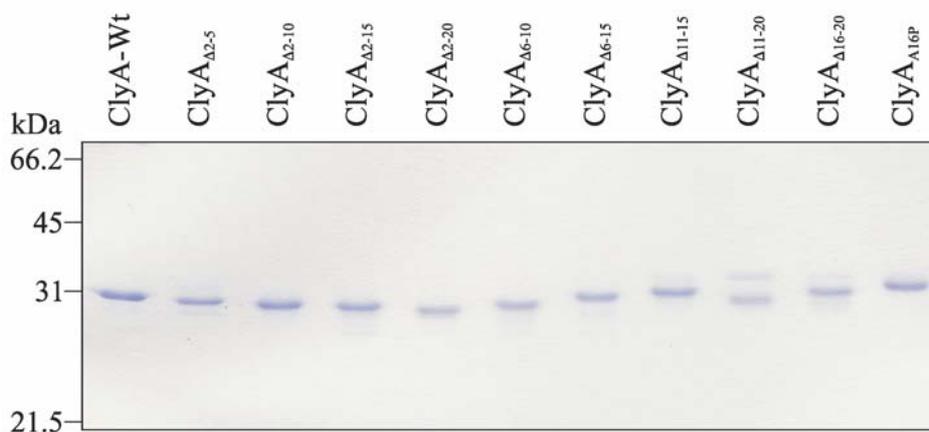


Abb. 29: Nachweis von wildtypischem ClyA-Protein und von ClyA-Mutanten, die aus Zellsaten der entsprechenden ClyA-überproduzierenden DH5 α -Stämme durch präparative SDS-PAGE isoliert wurden.

Ein Coomassie-Blue-gefärbtes SDS-Gel (12.5%), in dem die Präparationen des ClyA-Wildtyps und der ClyA-Mutanten elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Aufgetragen wurde 1 μg Protein pro Spur. Die molekulare Masse der Markerproteine ist links aufgeführt (kDa).

Das wildtypische ClyA-Protein und die N-terminalen ClyA-Mutanten wurden in Tests an künstlichen Lipidmembranen einerseits hinsichtlich der Eigenschaften der erzeugten Einzelkanäle (Einzelkanal-Leitfähigkeit, Porenstabilität, Porenbildungsfrequenz) untersucht und andererseits auf ihre gesamte Membranaktivität (makroskopische Membranleitfähigkeit) analysiert. Die Ergebnisse der Experimente sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Porenbildende Eigenschaften von wildtypischem ClyA und von ClyA-Derivaten mit N-terminalen Mutationen an künstlichen Lipidmembranen.

ClyA / ClyA-Mutante ^a	Einzelkanal-			Makroskopische Membran- leitfähigkeit ^f
	Leitfähigkeit Ø ^b (nS)	Durchmesser Ø ^d (nm)	Stabilität ^e	
ClyA-Wt	10	~ 2.61	+	++++
ClyA _{Δ2-5}	10	~ 2.61	+	++++
ClyA _{Δ6-10}	5	~ 1.85	+	++++
ClyA _{Δ2-10}	7	~ 2.19	+	+++
ClyA _{Δ2-15}	0.5	~ 0.58	+	+
ClyA _{Δ2-20}	-	-	-	-
ClyA _{Δ6-15}	7/12 ^c	~ 2.19/2.86	-	+++
ClyA _{Δ11-15}	6/12 ^c	~ 2.02/2.86	-	+++
ClyA _{Δ11-20}	6/12 ^c	~ 2.02/2.86	-	+
ClyA _{Δ16-20}	7/12 ^c	~ 2.19/2.86	-	+++
ClyA _{A16P}	8	~ 2.34	+	++++

^a Verwendet wurden die aus den rekombinanten *E. coli* DH5α-Klonen isolierten und gereinigten ClyA-Proteine.

^b Die durchschnittliche (Ø) Leitfähigkeit der durch wildtypisches bzw. mutiertes ClyA-Protein erzeugten Einzelkanäle in einer aus DPhPC/*n*-Decan bestehenden Lipidmembran (0.4 mm²) wurde bei einer angelegten Membranspannung von 20 mV bestimmt. Als Elektrolytlösung wurde 1 M KCl (pH 6.0) verwendet. Die ClyA-Endkonzentration im Testansatz betrug 50 ng/ml.

^c Diese ClyA-Mutanten erzeugten Poren, deren Leitfähigkeiten mehrere Frequenz-Maxima aufwiesen und aus denen zwei durchschnittliche Einzelkanal-Leitfähigkeiten berechnet wurden.

^d Der durchschnittliche (Ø) Porendurchmesser wurde mit Hilfe der Formel $G = \sigma \pi r^2 / l$ berechnet (Details siehe Text).

^e Bei ClyA-Proteinen, die mit + gekennzeichnet sind, zeigten die Membranporen eine hohe Stabilität, so dass ein Schließen der Membrankanäle allenfalls sehr selten festzustellen war.
Bei ClyA-Proteinen, die mit - versehen sind, war die Lebensdauer der Poren begrenzt. Diese Toxine bildeten entweder vermehrt oder überwiegend/ausschließlich kurzlebige Einzelkanäle.

^f Die makroskopische Membranleitfähigkeit (Membranaktivität) setzt sich zusammen aus der Größe und der Anzahl der erzeugten Membranporen. Die Membranaktivität der ClyA-Mutanten ist im Vergleich zu der des wildtypischen ClyA-Proteins angegeben: ++++ (sehr hoch), +++ (hoch), + (schwach), - (nicht nachweisbar). Die Membranaktivität wurde nach 30 minütiger Inkubation der ClyA-Proteine mit der planaren Lipidmembran (0.4 mm²) in Gegenwart von 1 M KCl bestimmt. Die angelegte Membranspannung lag bei 20 mV und die ClyA-Endkonzentration im Versuchsansatz betrug 500 ng/ml.

In der planaren DPhPC-Lipidmembran generierte wildtypisches ClyA-Protein (ClyA-Wt) Poren, die Leitfähigkeiten von 6 bis 14 nS aufwiesen, wobei die durchschnittliche (\emptyset) Leitfähigkeit der im Histogramm ausgewerteten Einzelkanäle 10 nS betrug (Abb. 30, 31). Die kontinuierliche Bildung von stabilen Transmembranporen durch ClyA-Wt, die eine Lebensdauer von mehr als 5 min besaßen, konnte zudem durch den stufenartig ansteigenden Stromfluss festgestellt werden (Abb. 30).

Deletionen innerhalb der Sequenz von Aminosäureposition zwei bis zehn in der N-terminalen Region von ClyA hatten offensichtlich keine schwerwiegende Beeinträchtigung der porenbildenden Eigenschaften des Zytolysins zur Folge (Tab. 10). Im künstlichen Lipid-Bilayer erzeugten die ClyA-Derivate ClyA Δ_{2-5} , ClyA Δ_{6-10} und ClyA Δ_{2-10} Poren, die im Vergleich zu den Einzelkanälen des wildtypischen ClyA-Proteins ähnlich hohe Leitfähigkeiten aufwiesen (Abb. 30, 31). Somit ergab sich für die durch ClyA Δ_{2-5} gebildeten Membranporen eine durchschnittliche Leitfähigkeit von 10 nS. Die durchschnittliche Einzelkanal-Leitfähigkeit der Toxin-Mutanten ClyA Δ_{6-10} und ClyA Δ_{2-10} betrug 5 bzw. 7 nS. Außerdem zeigten die drei ClyA-Mutanten im Vergleich zum ClyA-Wildtyp eine hohe bis sehr hohe makroskopische Membranleitfähigkeit (Membranaktivität), was bedeutet, dass die Anzahl der Poren, die bei einer ClyA-Endkonzentration von 500 ng/ml gebildet wurden, nicht oder nur geringfügig erniedrigt war. Des Weiteren waren die Membrankanäle dieser ClyA-Derivate von großer Stabilität, so dass ein stufenartig ansteigender Stromfluss konstatiert wurde (Abb. 30). Insgesamt war die durchschnittliche Leitfähigkeit der Einzelkanäle von ClyA Δ_{2-5} , ClyA Δ_{6-10} und ClyA Δ_{2-10} zwar zum Teil leicht geringer als die des wildtypischen ClyA-Proteins, aber auch die Poren von ClyA-Wt hatten bezüglich der Leitfähigkeit, wie oben erwähnt, eine relativ große Schwankungsbreite (6-14 nS). Die Erkenntnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass die porenbildende Aktivität dieser Toxin-Mutanten nicht erheblich gestört ist.

Größere Deletionen am N-Terminus von ClyA hingegen, wie die Deletion der Aminosäuren an Position zwei bis fünfzehn (ClyA Δ_{2-15}) bzw. zwei bis zwanzig (ClyA Δ_{2-20}), hatten einen gravierenden Effekt auf die porenbildende Aktivität des Toxins (Tab. 10). Zwar besaßen die in Gegenwart von ClyA Δ_{2-15} erzeugten Poren eine relativ hohe Stabilität, was anhand des fortlaufenden, stufenartigen Anstiegs der Stromstärke zu erkennen war (Abb. 30). Jedoch war die durchschnittliche Leitfähigkeit der erfassten Einzelkanäle (0.5 nS) im Vergleich zu der des wildtypischen ClyA-Proteins (10 nS) um das 20fache reduziert (Abb. 30, 31). Zudem wurden deutlich weniger Membranporen im DPhPC-Lipid-Bilayer gebildet, was ebenfalls zur starken Abnahme der makroskopischen Membranleitfähigkeit führte. Durch Deletion der

Aminosäuren an Position zwei bis zwanzig wurde die porenbildende Funktion des ClyA-Proteins sogar vollständig inhibiert. Die Ausbildung definierter Poren in der künstlichen Lipidmembran war bei der ClyA-Mutante ClyA Δ ₂₋₂₀ in Einzelkanalmessungen nicht nachzuweisen (Abb. 30).

Interne Deletionen in der N-terminalen Region des ClyA-Proteins, die die Aminosäureposition zehn bis zwanzig betrafen, hatten einen großen Einfluss auf die Stabilität der Membranporen. So bildeten die ClyA-Derivate ClyA Δ ₆₋₁₅ und ClyA Δ ₁₁₋₁₅ in Lipidmembranen aus DPhPC neben stabilen Membrankanälen auch vermehrt instabile Poren, die sich bereits nach kurzer Lebensdauer schlossen, während die Einzelkanäle der Mutanten ClyA Δ ₁₁₋₂₀ und ClyA Δ ₁₆₋₂₀ sogar überwiegend (ClyA Δ ₁₆₋₂₀) bzw. völlig (ClyA Δ ₁₁₋₂₀) instabil waren. Membranporen, die beispielsweise durch die ClyA-Mutante ClyA Δ ₁₁₋₂₀ erzeugt wurden, hatten eine maximale Lebenszeit von 15 bis 20 sec. In den Einzelkanalmessungen war somit kein stufenartig ansteigender Stromfluss feststellbar (Abb. 30). Die durchschnittliche Leitfähigkeit der durch ClyA Δ ₆₋₁₅ (7 bzw. 12 nS), ClyA Δ ₁₁₋₁₅ (6 bzw. 12 nS), ClyA Δ ₁₁₋₂₀ (6 bzw. 12 nS) und ClyA Δ ₁₆₋₂₀ (7 bzw. 12 nS) generierten Membranporen war im Vergleich zur durchschnittlichen Leitfähigkeit der Poren des wildtypischen ClyA-Proteins nur leicht verändert (Abb. 31), was auf ähnlich große Porennendurchmesser schließen lässt. Des Weiteren war die makroskopische Membranleitfähigkeit der ClyA-Derivate ClyA Δ ₆₋₁₅, ClyA Δ ₁₁₋₁₅ und ClyA Δ ₁₆₋₂₀ relativ hoch. Im Gegensatz dazu erzeugte die Toxin-Mutante ClyA Δ ₁₁₋₂₀ deutlich weniger Einzelkanäle, was sich auf die makroskopische Membranleitfähigkeit des Proteins stark reduzierend auswirkte (Tab. 10). Diese Beobachtungen zeigten, dass der N-terminale Bereich ab der Aminosäureposition zehn des ClyA-Proteins wichtig für die porenbildende Eigenschaft des Toxins ist.

Der Aminosäureaustausch A16→P führte offensichtlich zu keiner starken Beeinträchtigung der porenbildenden Aktivität des Zytolysins ClyA. Ähnlich dem wildtypischen ClyA-Protein produzierte die ClyA-Mutante ClyA_{A16P} eine Vielzahl von stabilen Poren im künstlichen Lipid-Bilayer (Abb. 30), die relativ große Leitfähigkeiten von 7 bzw. 9 nS aufwiesen (Ø Leitfähigkeit von 8 nS; Abb. 31) und daher wesentlich zur hohen makroskopischen Membranleitfähigkeit des Proteins beitrugen. Aus den Beobachtungen, dass ClyA_{A16P} (i) normale porenbildende Eigenschaften an künstlichen Lipidmembranen zeigte, (ii) mit Erythrozytenmembranen interagieren konnte, (iii) aber nur minimale bis keine hämolytische Aktivität aufwies, muss gefolgert werden, dass diese ClyA-Mutante zwar noch oberflächlich an Erythrozytenmembranen binden kann, diese Bindung jedoch nicht produktiv ist, d. h. das

Eintauchen des ClyA-Proteins in die wesentlich komplexer strukturierte Erythrozytenmembran nicht erfolgt.

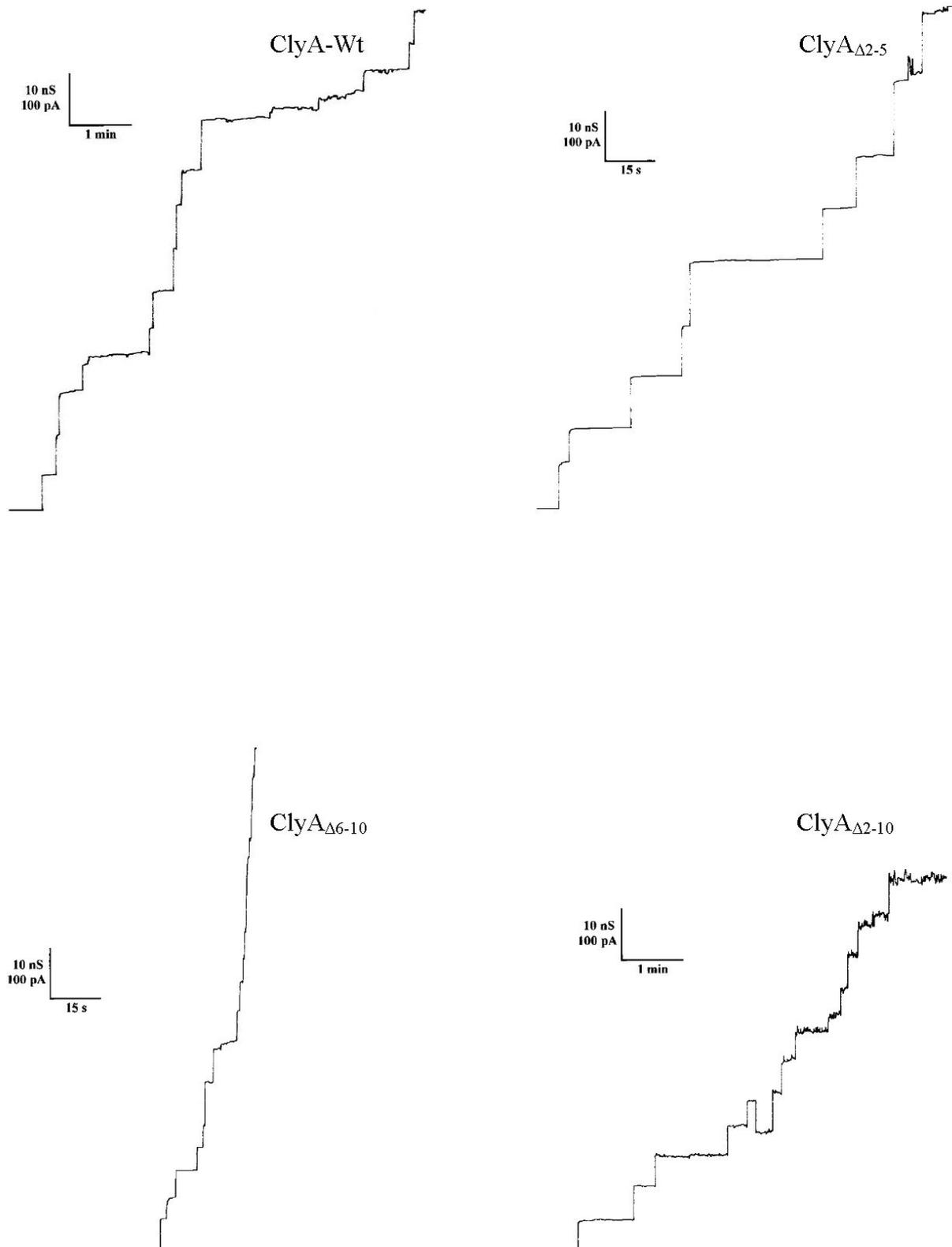


Abb. 30 A: Erläuterungen siehe Abbildungslegende auf Seite 86.

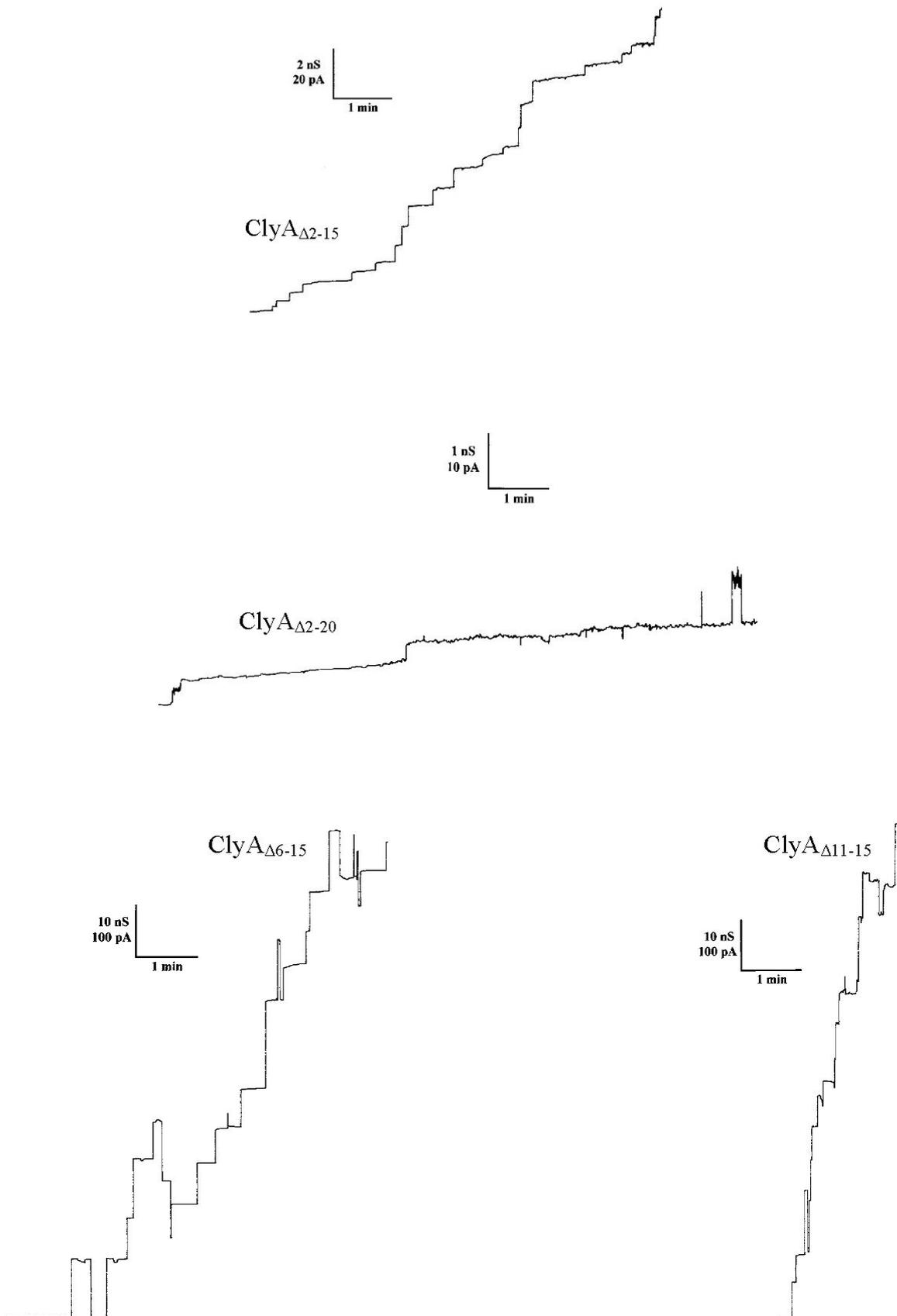


Abb. 30 B: Erläuterungen siehe Abbildungslegende auf Seite 86.

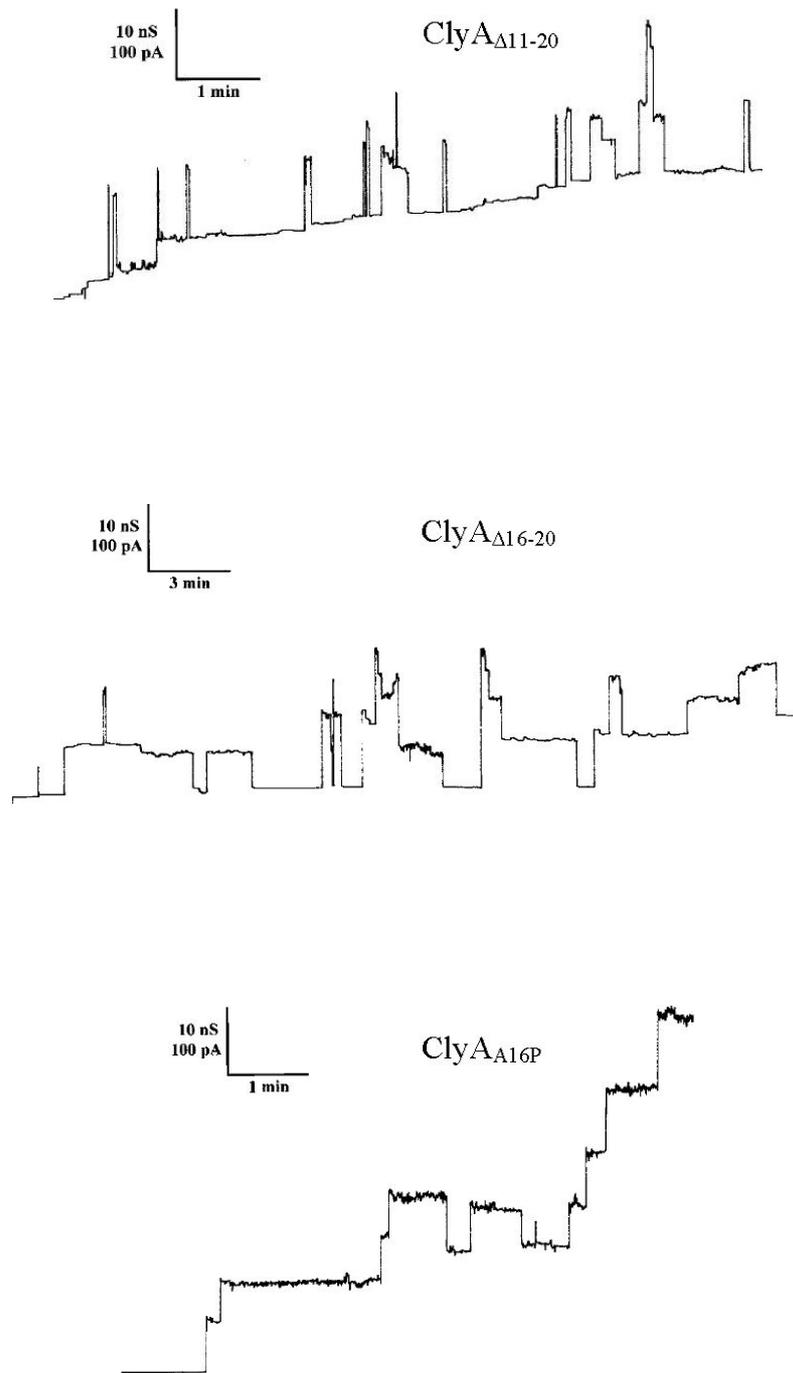


Abb. 30 C: Erläuterungen siehe Abbildungslegende.

Abb. 30 A-C: Einzelkanalmessungen von Transmembranporen, die durch wildtypisches ClyA und durch ClyA-Derivate in künstlichen DPhPC-Lipidmembranen erzeugt wurden.

Die Einzelkanalmessungen wurden bei einer angelegten Membranspannung von 20 mV und einer Temperatur von 20°C durchgeführt. Als Elektrolytlösung (wässrige Phase) wurde 1 M KCl (pH 6.0) eingesetzt. Die ClyA-Endkonzentration in der wässrigen Phase war in allen Fällen 50 ng/ml. Verwendet wurden folgende ClyA-Präparationen: wildtypisches ClyA-Protein (ClyA-Wt), $ClyA_{\Delta 2-5}$, $ClyA_{\Delta 6-10}$, $ClyA_{\Delta 2-10}$, $ClyA_{\Delta 2-15}$, $ClyA_{\Delta 2-20}$, $ClyA_{\Delta 6-15}$, $ClyA_{\Delta 11-15}$, $ClyA_{\Delta 11-20}$, $ClyA_{\Delta 16-20}$, $ClyA_{\Delta 16P}$.

Ergebnisse

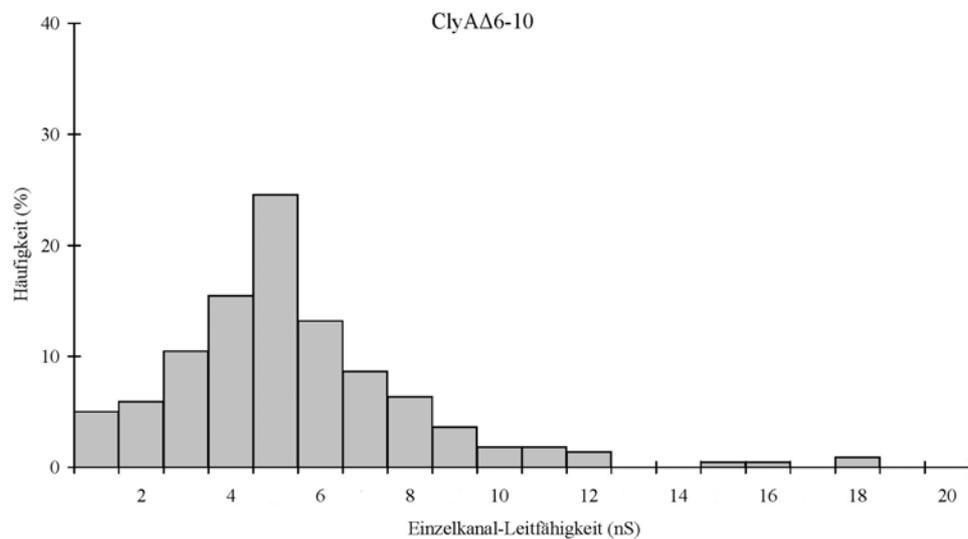
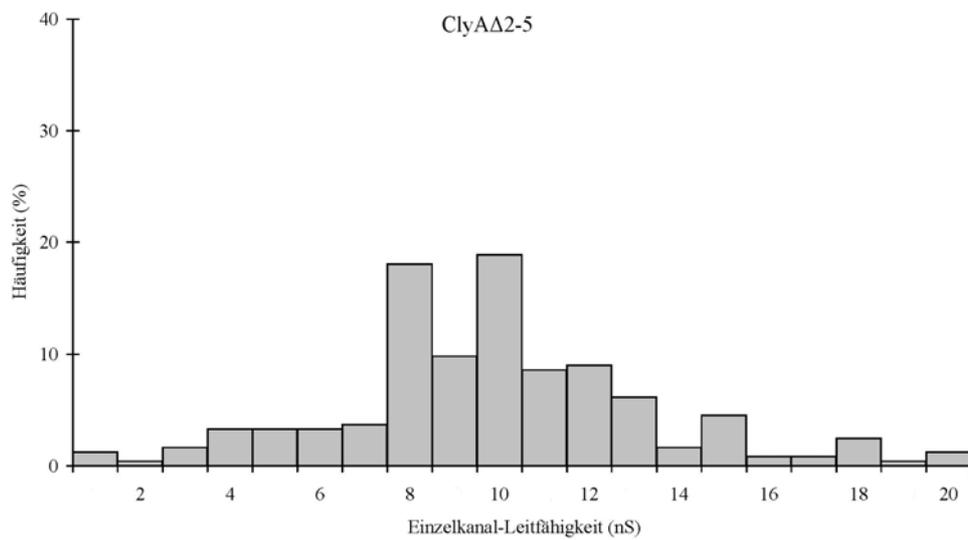
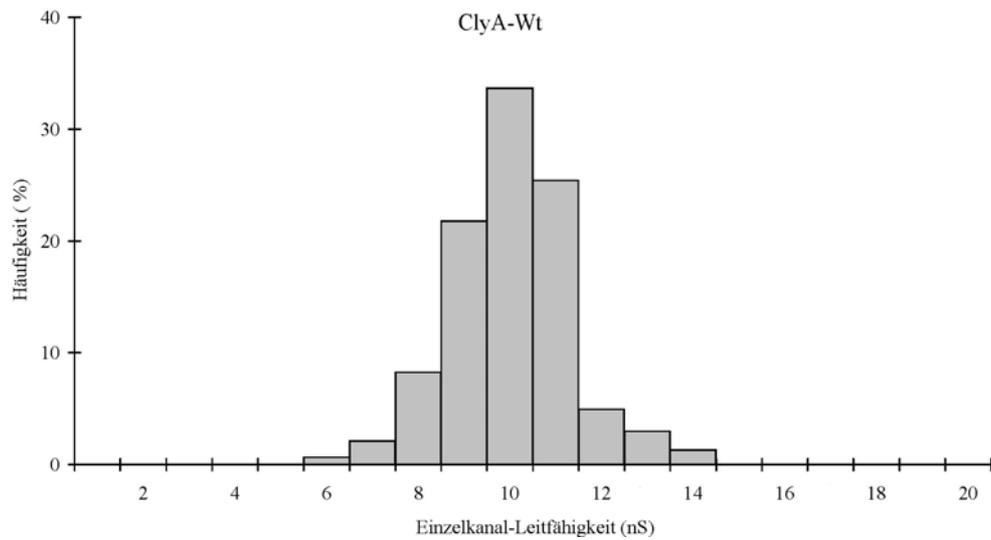


Abb. 31 A: Erläuterungen siehe Abbildungslegende auf Seite 90.

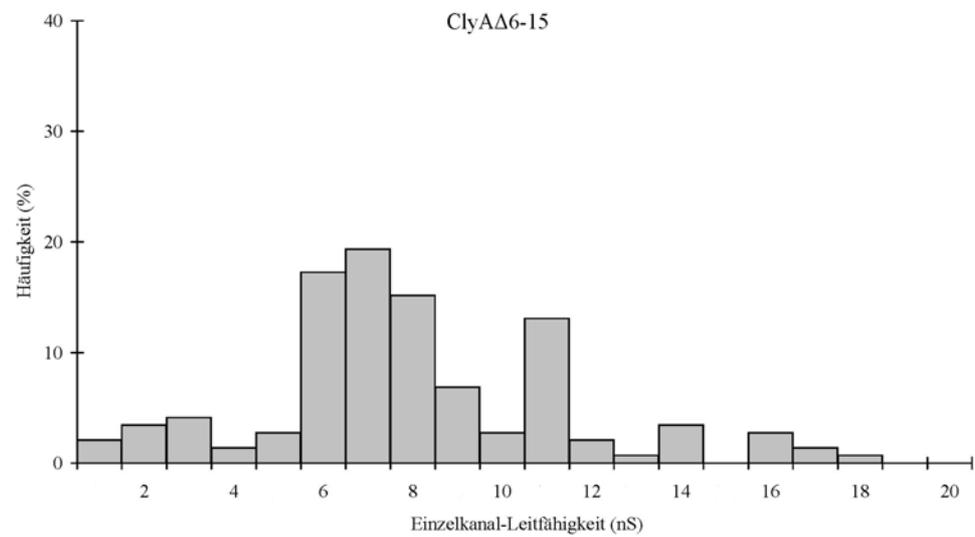
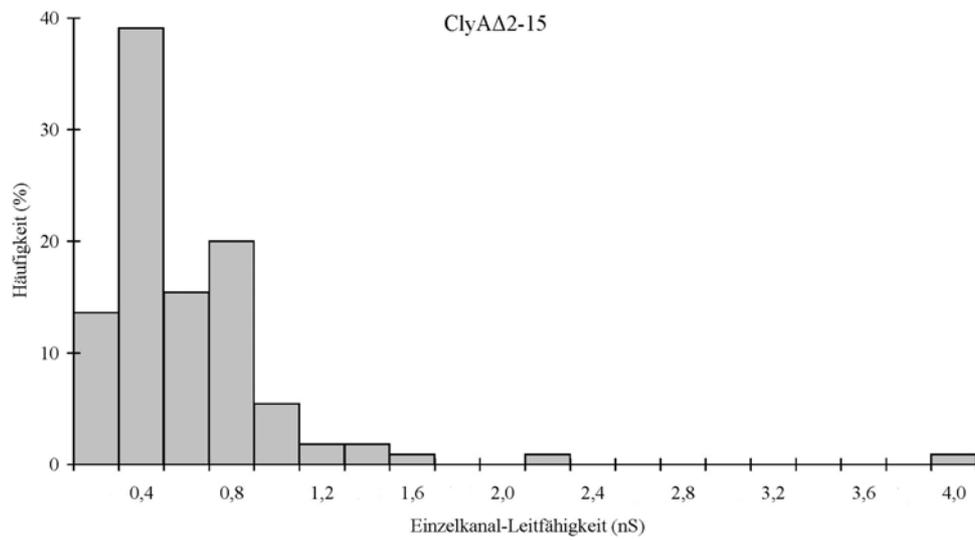
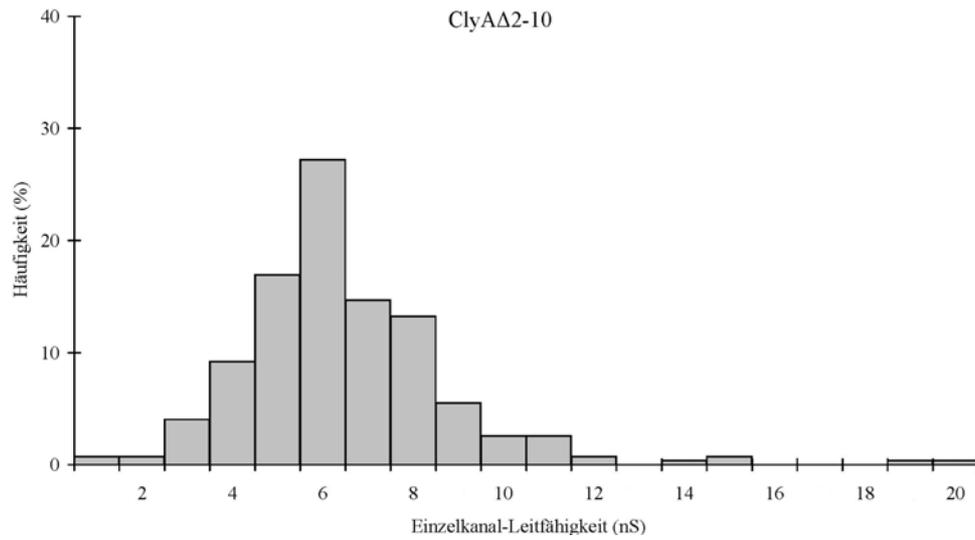


Abb. 31 B: Erläuterungen siehe Abbildungslegende auf Seite 90.

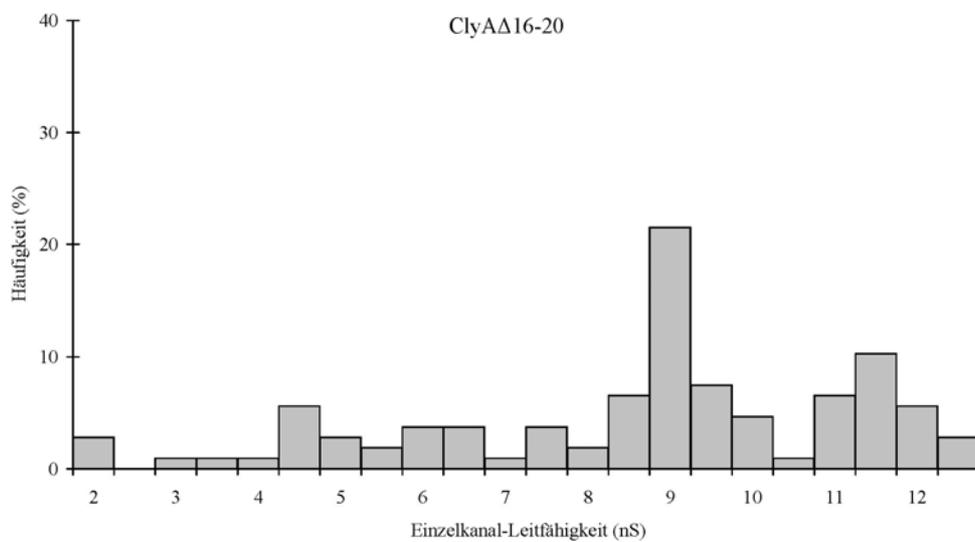
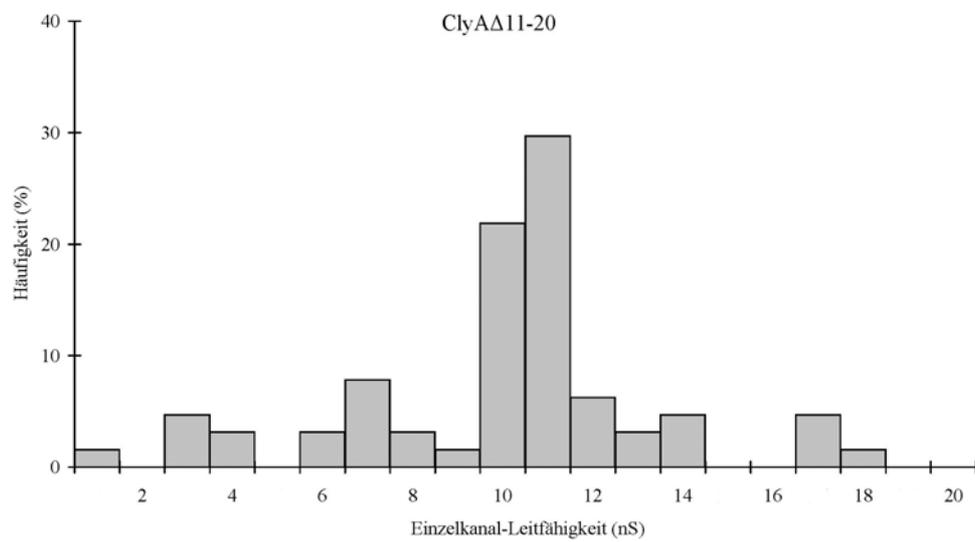
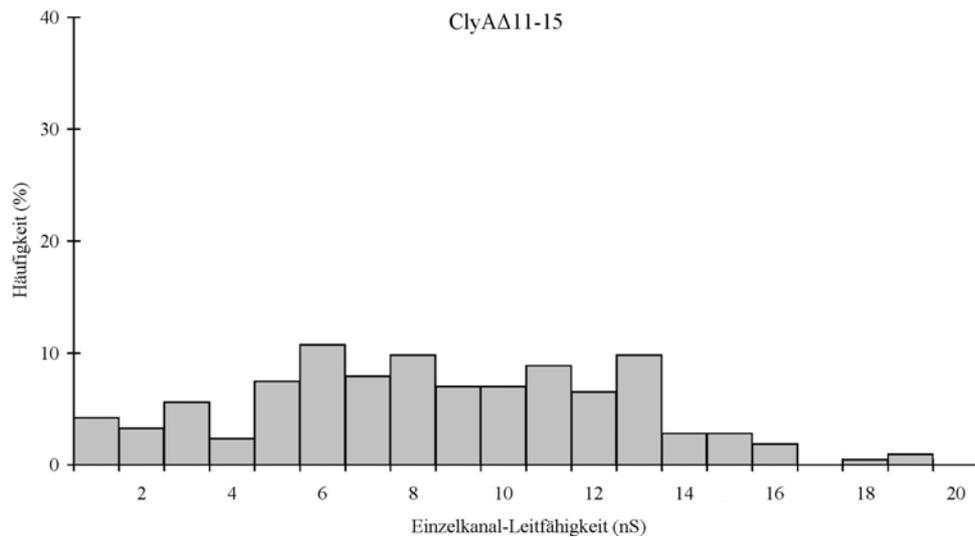


Abb. 31 C: Erläuterungen siehe Abbildungslegende auf Seite 90.

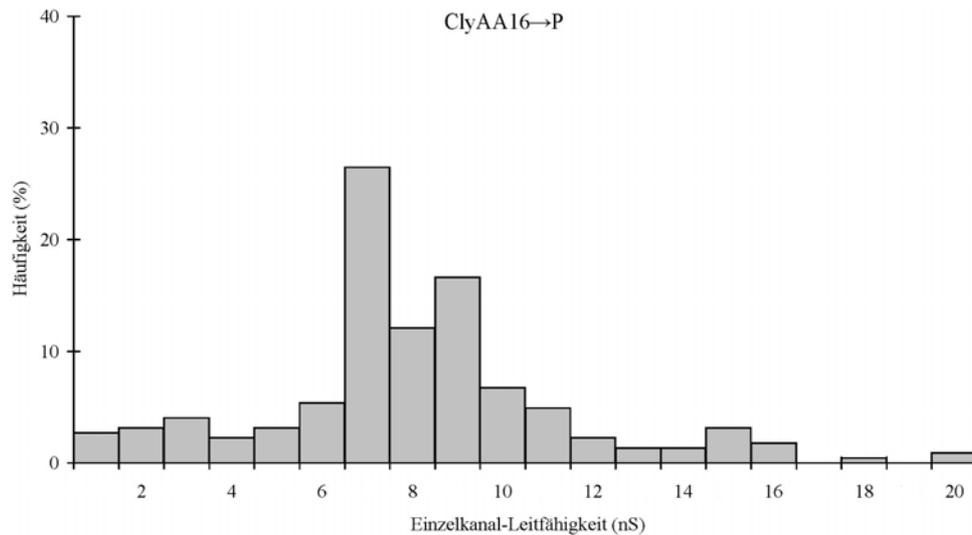


Abb. 31 D: Erläuterungen siehe Abbildungslegende.

Abb. 31 A-D: Histogramme der gemessenen Leitfähigkeitsfluktuationen an planaren DPhPC-Lipidmembranen nach Zugabe von wildtypischem ClyA-Protein bzw. von ClyA-Mutanten.

Die eingesetzte Proteinkonzentration des ClyA-Wildtyps bzw. der ClyA-Derivate betrug in sämtlichen Messungen 50 ng/ml (Endkonzentration) bei einer angelegten Membranspannung von 20 mV und einer Temperatur von 20°C. Die wässrige Phase enthielt 1 M KCl (pH 6.0). Die durchschnittliche ($\bar{\emptyset}$) Leitfähigkeit der durch ClyA erzeugten Membranporen ist nachfolgend aufgeführt. Die Anzahl der im Histogramm ausgewerteten Einzelkanäle ist in Klammern gesetzt. Einige der ClyA-Mutanten zeigten zwei oder mehr Maxima in den Histogrammen.

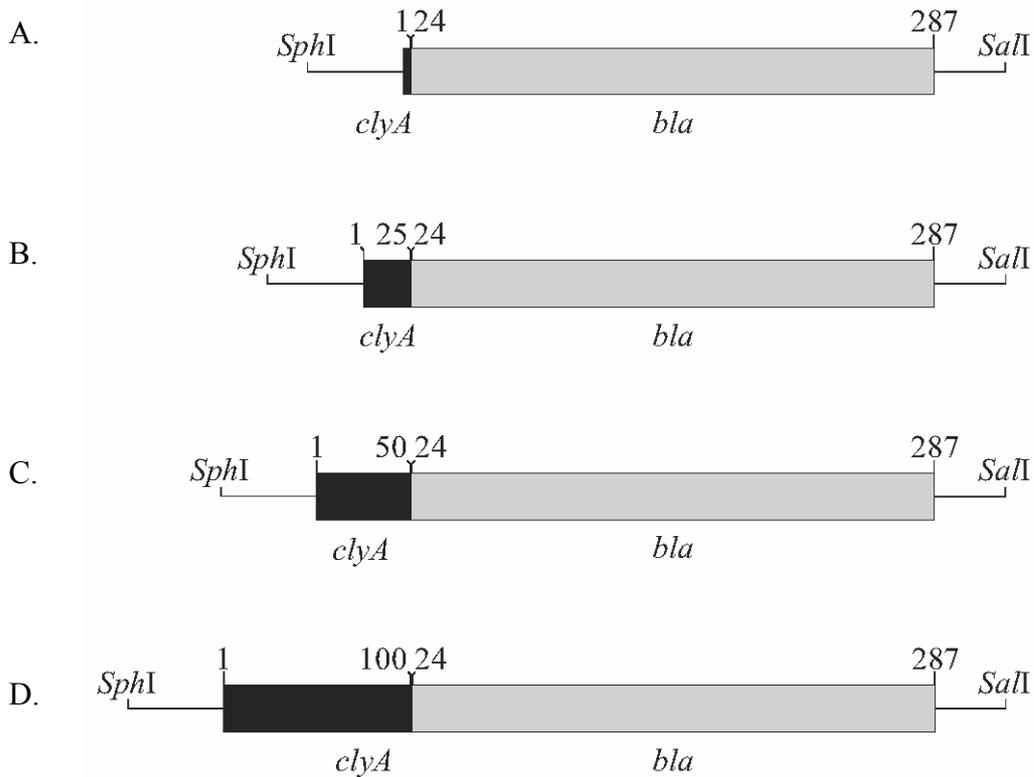
- ClyA-Wt : $\bar{\emptyset}$ Leitfähigkeit von ca. 10 nS (303 Einzelkanäle)
- ClyA Δ_{2-5} : $\bar{\emptyset}$ Leitfähigkeit von ca. 11 nS (244 Einzelkanäle)
- ClyA Δ_{6-10} : $\bar{\emptyset}$ Leitfähigkeit von ca. 5nS (220 Einzelkanäle)
- ClyA Δ_{2-10} : $\bar{\emptyset}$ Leitfähigkeit von ca. 6 nS (272 Einzelkanäle)
- ClyA Δ_{2-15} : $\bar{\emptyset}$ Leitfähigkeit von ca. 0.5 nS (110 Einzelkanäle)
- ClyA Δ_{6-15} : $\bar{\emptyset}$ Leitfähigkeit von ca. 7/11 nS (145 Einzelkanäle)
- ClyA Δ_{11-15} : $\bar{\emptyset}$ Leitfähigkeit von ca. 6/11 nS (214 Einzelkanäle)
- ClyA Δ_{11-20} : $\bar{\emptyset}$ Leitfähigkeit von ca. 5/11 nS (64 Einzelkanäle)
- ClyA Δ_{16-20} : $\bar{\emptyset}$ Leitfähigkeit von ca. 9/11 nS (107 Einzelkanäle)
- ClyA Δ_{16P} : $\bar{\emptyset}$ Leitfähigkeit von ca. 9 nS (223 Einzelkanäle)

2 Untersuchung der Bedeutung der N-terminalen Region von ClyA für den Sekretionsmechanismus des Zytolysins durch Konstruktion und Analyse von Fusionsproteinen

Der Einfluss des N-terminalen Bereiches von ClyA auf den Sekretionsmechanismus des Toxins sollte zudem durch die Herstellung von Fusionsproteinen analysiert werden. Hierzu wurden verschieden lange Abschnitte der N-terminalen Region von ClyA mit der periplasmatischen β -Lactamase (Bla) fusioniert. Die Analyse der Aminosäureabfolge der β -Lactamase mit dem Programm SignalP V1.1 (ExpASy-Tools) zeigte, dass das Enzym eine N-terminale Prozessierungsstelle aufweist, die zwischen der Aminosäure 23 und 24 liegt. Für die Konstruktion der ClyA-Bla-Fusionsproteine wurde daher ausschließlich das reife β -Lactamase-Protein verwendet. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die N-terminale Region von ClyA ein Transportsignal darstellt, dass die Sekretion eines heterologen Proteins veranlasst.

2.1 Konstruktion von *clyA-bla*-Fusionsgenen und Herstellung rekombinanter pACYC184-Derivate

Durch rekombinante PCR und *in vitro*-Mutagenese (III 2.13) wurden verschieden lange 5'-terminale *clyA*-Fragmente (Codon 1, Codon 1-25, Codon 1-50, Codon 1-100) *in-frame* mit der DNA-Sequenz des *bla*-Gens von Codon 24 bis Codon 287 (Stopcodon) fusioniert. Die konstruierten Fusionsgene wurden an der 5'-terminalen Seite von der *clyA*-proximalen DNA-Sequenz einschließlich der *clyA*-Promotorregion flankiert (240 bp) und mit einer *SphI*-Schnittstelle versehen. Das 3'-terminale Ende der Fusionsgene bildete die flankierende DNA-Sequenz des *bla*-Gens (17 bp) mit abschließender *SalI*-Schnittstelle. Die vier Fusionsgene sind schematisch in Abbildung 32 dargestellt.

**Abb. 32: Konstruktion von *clyA-bla*-Fusionsgenen.**

- A. Fusionsgen *clyA*(Codon 1)-*bla*(Codon 24-287) mit *clyA*-eigenem Promotor.
 B. Fusionsgen *clyA*(Codon 1-25)-*bla*(Codon 24-287) mit *clyA*-eigenem Promotor.
 C. Fusionsgen *clyA*(Codon 1-50)-*bla*(Codon 24-287) mit *clyA*-eigenem Promotor.
 D. Fusionsgen *clyA*(Codon 1-100)-*bla*(Codon 24-287) mit *clyA*-eigenem Promotor.

Die Fusionsgene *clyA*(Codon 1-25)-*bla*(Codon 24-287), *clyA*(Codon 1-50)-*bla*(Codon 24-287) und *clyA*(Codon 1-100)-*bla*(Codon 24-287) wurden durch rekombinante PCR hergestellt. Dabei erfolgte die Amplifizierung der *clyA*-Fragmente aus dem *clyA*_{K12}-Gen des Plasmids pAL201, wobei das Oligonukleotid ClyA 127 als vorderer Primer und die Oligonukleotide ClyA-bla1 (Codon 1-50), ClyA-bla3 (Codon 1-100) und ClyA-bla5 (Codon 1-25) als hintere Primer gewählt wurden. Zur Amplifizierung des *bla*-Fragments aus dem *bla*-Gen des pUC18-Vektors wurden die Oligonukleotide ClyA-bla2 (Codon 1-50), ClyA-bla4 (Codon 1-100) und ClyA-bla6 (Codon 1-25) als vordere Primer und das Oligonukleotid Bla1 als hinterer Primer verwendet. Die Klonierung der Fusionsgene in den Vektor pACYC184 (Chang und Cohen, 1978) führte zur Konstruktion folgender pACYC184-Derivate: pGV.I-c25b, pGV.I-c50b, pGV.I-c100b. In den pACYC184-Derivaten (Abb. 33) stand das jeweilige *clyA-bla*-Gen sowohl unter der Kontrolle des *clyA*-eigenen Promotors (P_{clyA}) als auch unter der Kontrolle des *tet*-Promotors von pACYC184 (P_{tet}).

Das Fusionsgen *clyA*(Codon 1)-*bla*(Codon 24-287) wurde durch *in vitro*-Mutagenese mit Hilfe der Oligonukleotide *ClyA-bla7* und *ClyA-bla8* konstruiert. Hierbei führte die spezifische Deletion der *clyA*-Codons 2-25 im Plasmid pGV.I-c25b direkt zum pACYC184-Derivat pGV.I-c1b.

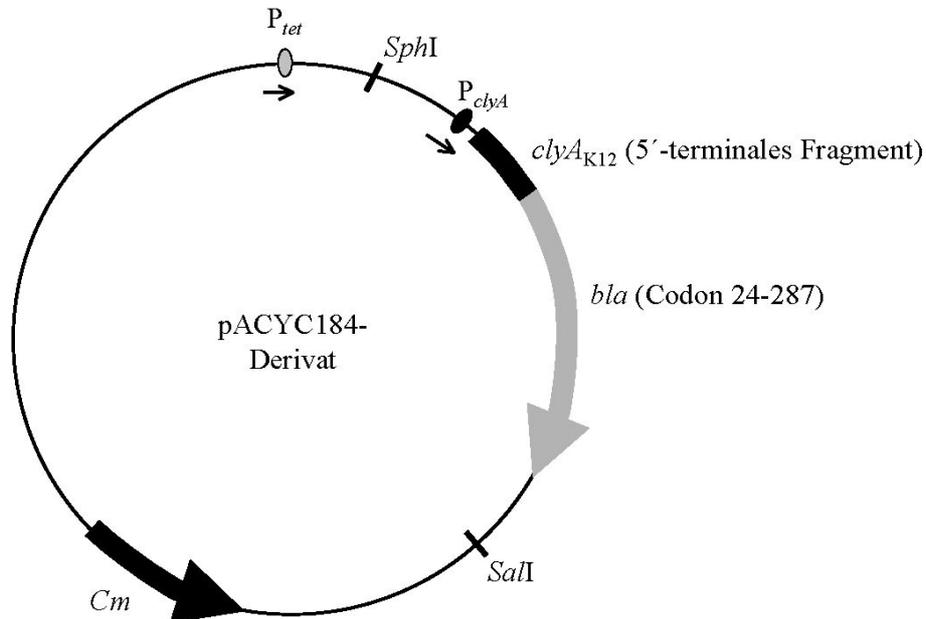


Abb. 33: Struktur von pACYC184-Derivaten, die *clyA-bla*-Fusionsgene enthalten.

Die Fusionsgene sind von den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *SphI* und *SalI* flankiert. Die Expression des *clyA-bla*-Fusionsgens unterliegt der Kontrolle des *tet*-Promotors (P_{tet}) von pACYC184 sowie des *clyA*_{K12}-Promotors (P_{clyA}).

Die vier pACYC184-Derivate wurden in Spaltungsansätzen mit den Restriktionsenzymen *SphI* und *SalI* geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt.

Wie in Abbildung 34 dargestellt, unterschieden sich die Inserts der pACYC184-Derivate hinsichtlich ihrer Größe deutlich voneinander. So ergab sich für *clyA*(Codon 1-100)-*bla*(Codon 24-287) ein 1349 bp-Fragment, für *clyA*(Codon 1-50)-*bla*(Codon 24-287) ein 1199 bp-Fragment, für *clyA*(Codon 1-25)-*bla*(Codon 24-287) ein 1124 bp-Fragment und für *clyA*(Codon 1)-*bla*(Codon 24-287) ein 1052 bp-Fragment, was den rechnerischen Längen der Inserts entsprach. Kennzeichnend für den linearisierten Vektor pACYC184 war ein DNA-Fragment mit einer Größe von 4245 bp. Sequenzierungsanalysen bestätigten die Richtigkeit der vier *clyA*-Fragmente einschließlich der *clyA-bla*-Fusionsstelle jedes Fusionsgens. Das entsprechende Ergebnis konnte auch für die Nukleotidsequenz des *bla*-Fragments stromabwärts von der Fusionsstelle konstatiert werden, die mit der Sequenz des *bla*-Gens des pUC18-Vektors ab Codon 24 übereinstimmte.

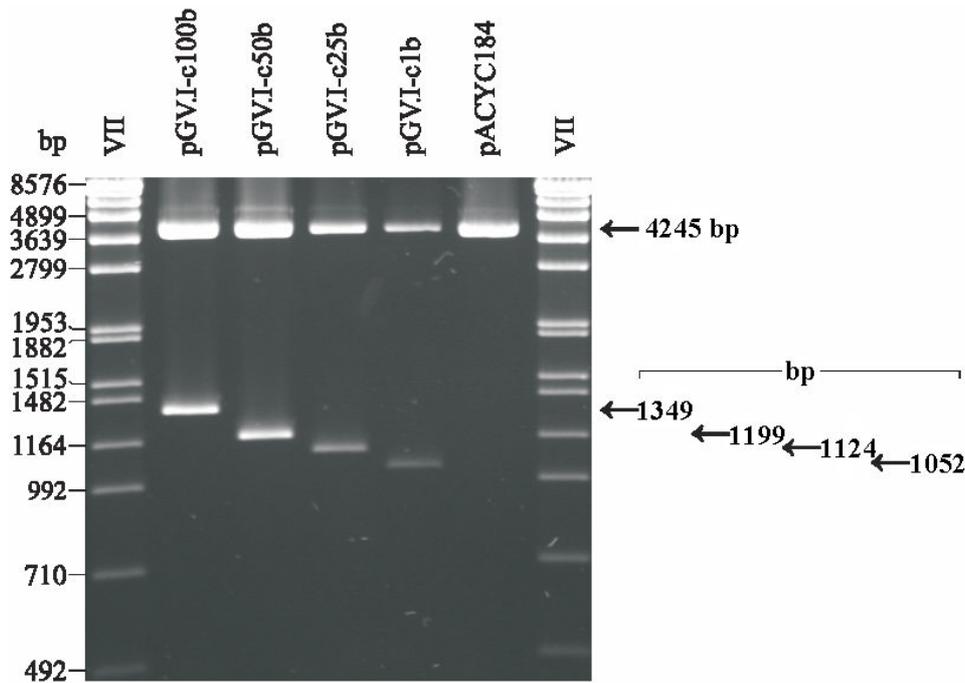


Abb. 34: Restriktionsanalyse der pACYC184-Derivate, die *clyA-bla*-Fusionsgene enthalten.

Gezeigt wird die mit den Restriktionsendonukleasen *SphI* und *SalI* geschnittene DNA der pACYC184-Derivate pGV.I-c100b (*clyA* Codon 1-100; *bla* Codon 24-287), pGV.I-c50b (*clyA* Codon 1-50; *bla* Codon 24-287), pGV.I-c25b (*clyA* Codon 1-25; *bla* Codon 24-287) und pGV.I-c1b (*clyA* Codon 1; *bla* Codon 24-287) sowie des pACYC184-Vektors, separiert in einem 1%igen Agarosegel. Die Größen der DNA-Fragmente sind rechts aufgeführt (bp). Die Größen der Fragmente des DNA-Standards VII sind links dargestellt (bp).

2.2 Expression der *clyA-bla*-Fusionsgene in *E. coli* DH5 α

Die konstruierten pACYC184-Derivate wurden in *E. coli* DH5 α transformiert. Um die Expression der Fusionsgene zu kontrollieren, wurden Bakterienlysate von spät-logarithmischen Zellen (OD₆₀₀ von 0.9-1.0) der entsprechenden DH5 α -Stämme hergestellt (III 2.17.1) und durch SDS-PAGE analysiert.

Wie in Abbildung 35 zu sehen, waren die Proteinbandenmuster der verwendeten Zellysate untereinander sehr homogen. Sowohl für DH5 α /pGV.I-c1b, DH5 α /pGV.I-c25b, DH5 α /pGV.I-c50b als auch für DH5 α /pGV.I-c100b konnte die Synthese der ClyA-Bla-Fusionsproteine nicht festgestellt werden, die eine theoretische molekulare Masse im Bereich von 29 bis 41 kDa hätten aufweisen müssen. Da es sich bei pACYC184 um einen Vektor handelt, der innerhalb einer Bakterienzelle nur in sehr geringer Kopienzahl vermehrt wird (*low-copy*), könnte sich diese Eigenschaft reduzierend auf die Bildung der Hybrid-Proteine auswirken und eine Ursache für die nicht nachweisbare Produktion der ClyA-Bla-Fusionsproteine darstellen. Zudem könnte die *clyA*-eigene Promotorregion des Fusionsgens

durch Repressor-Moleküle reprimiert und damit die Transkription der Nukleotidsequenz nachhaltig inhibiert sein. Aufgrund dieser Überlegungen sollten die Fusionsgene in ein kontrollierbares Expressionssystem eingefügt werden.

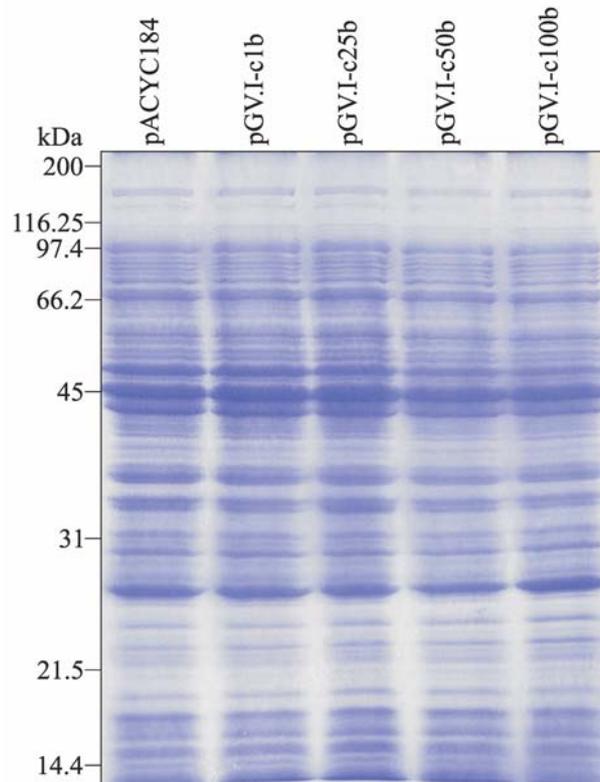


Abb. 35: SDS-PAGE zum Nachweis der Synthese von ClyA-Bla-Fusionsproteinen in *E. coli* DH5 α .

Dargestellt sind die in einem SDS-Gel aufgetrennten und durch Coomassie-Blue-Färbung angefärbten Zellysate von *E. coli* DH5 α -Stämmen mit pACYC184 und den Plasmiden pGV.I-c1b, pGV.I-c25b, pGV.I-c50b und pGV.I-c100b. Analysiert wurden jeweils gesamtzelluläre Proteine aus 50 μ l Bakterienkultur. Die molekulare Masse der Markerproteine ist seitlich aufgeführt (kDa).

2.3 Klonierung der Fusionsgene in den Expressionsvektor pPROTet.E133

Als Expressionssystem wurde der Vektor pPROTet.E133 (Lutz und Bujard, 1997; BD Biosciences) gewählt. Zur Herstellung von pPROTet.E133-Derivaten wurden zunächst die vier *clyA-bla*-Gene durch PCR mit Hilfe der Oligonukleotide ClyA-GV1 (vorderer Primer) und pACYC-bla-GV1 (hinterer Primer) aus den pACYC184-Derivaten amplifiziert. Hierbei wurde das 5'-terminale Ende der *clyA-bla*-Fragmente um 200 bp gekürzt, was den Verlust des *clyA*-eigenen Promotors sowie der *SphI*-Schnittstelle zur Folge hatte, während das 3'-terminale Ende unverändert blieb. Die verkürzte *clyA*-proximale DNA-Sequenz der Fusionsgene wurde bei der PCR mit einer *EcoRI*-Schnittstelle versehen.

Die Abbildung 36 zeigt schematisch die amplifizierten Fusionsgene *clyA*(Codon 1)-*bla*(Codon 24-287), *clyA*(Codon 1-25)-*bla*(Codon 24-287), *clyA*(Codon 1-50)-*bla*(Codon 24-287) und *clyA*(Codon 1-100)-*bla*(Codon 24-287).

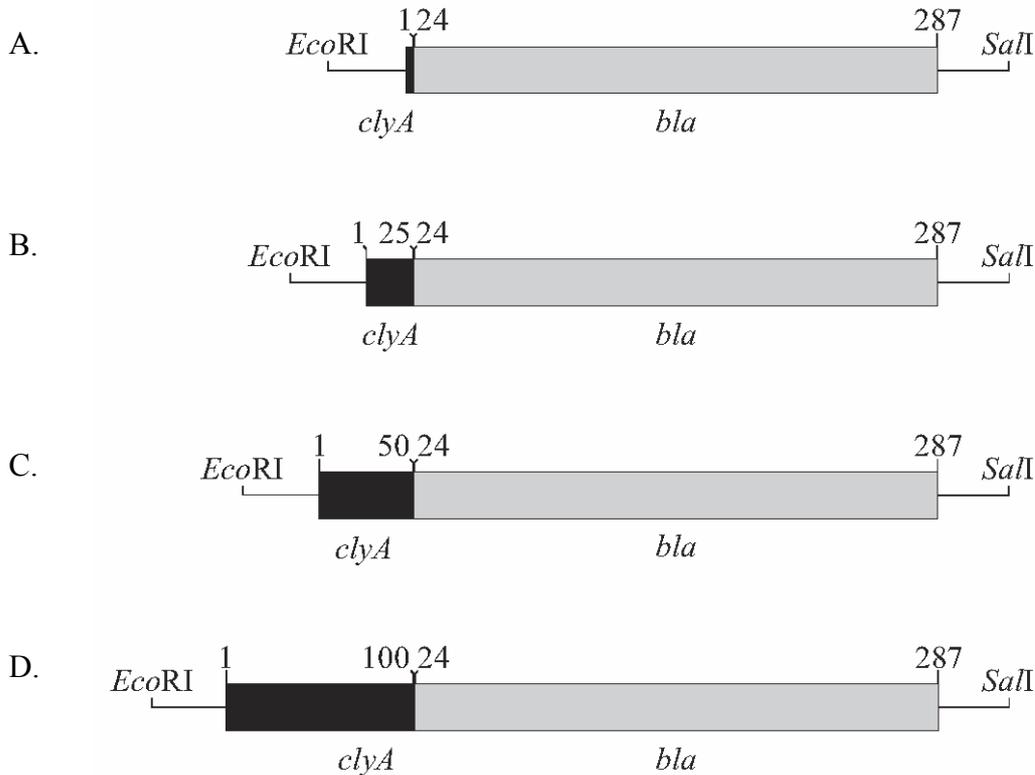


Abb. 36: Struktur der vier *clyA-bla*-Fusionsgene mit verkürzter 5'-flankierender DNA-Region.

- A. Fusionsgen *clyA*(Codon 1)-*bla*(Codon 24-287)
- B. Fusionsgen *clyA*(Codon 1-25)-*bla*(Codon 24-287)
- C. Fusionsgen *clyA*(Codon 1-50)-*bla*(Codon 24-287)
- D. Fusionsgen *clyA*(Codon 1-100)-*bla*(Codon 24-287)

Durch die Klonierung der Fusionsgene zwischen die *EcoRI*- und *SaII*-Schnittstelle des Expressionsvektors pPROTet.E133 wurden folgende Plasmide erzeugt: pGV.II-c1b, pGV.II-c25b, pGV.II-c50b und pGV.II-c100b. In den pPROTet.E133-Derivaten (Abb. 37) stand das jeweilige *clyA-bla*-Gen ausschließlich unter der Kontrolle des Promotors $P_{Ltet0-1}$ von pPROTet.E133. In Restriktionsansätzen mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *SaII* und Sequenzierungsanalysen wurden die pPROTet.E133-Derivate auf Richtigkeit überprüft.

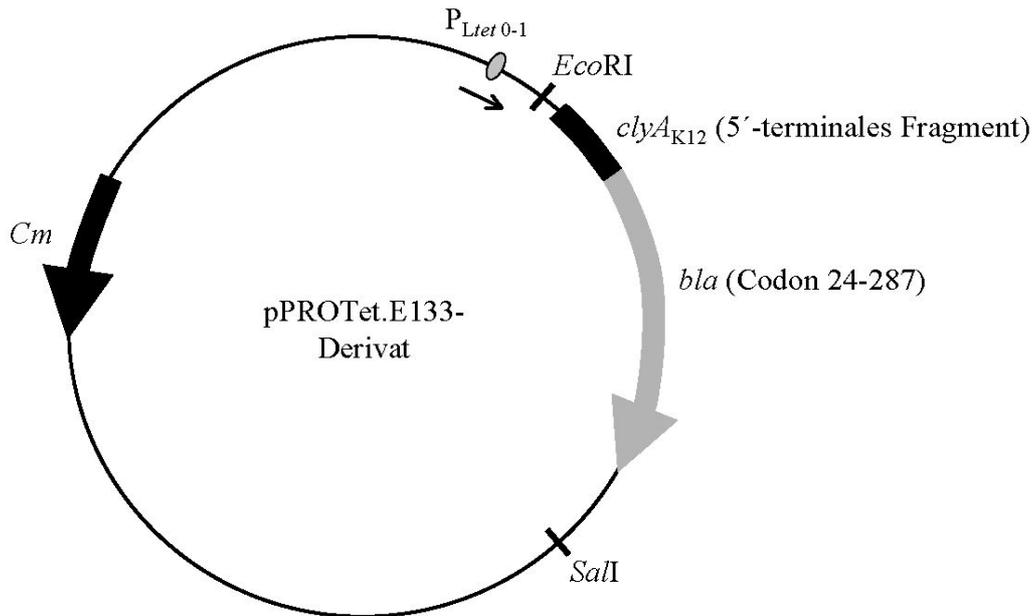


Abb. 37: Struktur von pPROTet.E133-Derivaten, die *clyA-bla*-Fusionsgene tragen.

Die Fusionsgene sind von den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *SalI* flankiert. Die Expression des *clyA-bla*-Fusionsgens unterliegt ausschließlich der Kontrolle des Promotors $P_{Ltet0-1}$ von pPROTet.E133 und wird durch Anhydrotetracyclin (*Atc*) induziert.

Wie in der Abbildung 38 zu sehen ist, wurden die Insert-Fragmente der mit *EcoRI* und *SalI* verdauten pPROTet.E133-Derivate im 1%igen Agarosegel aufgrund der verkürzten 5'-flankierenden DNA-Region der *clyA-bla*-Fusionsgene erheblich weiter aufgetrennt als die Insert-Fragmente aus den pACYC184-Derivaten (Abb. 34). So ergab sich für *clyA*(Codon 1-100)-*bla*(Codon 24-287) ein 1149 bp-Fragment, für *clyA*(Codon 1-50)-*bla*(Codon 24-287) ein 999 bp-Fragment, für *clyA*(Codon 1-25)-*bla*(Codon 24-287) ein 924 bp-Fragment und für *clyA*(Codon 1)-*bla*(Codon 24-287) ein 852 bp-Fragment. Der linearisierte Vektor pPROTet.E133 zeigte ein Größe von 2200 bp.

Sequenzierungsanalysen bewiesen zudem die Richtigkeit der DNA-Sequenz jedes Fusionsgens mit verkürzter 5'-flankierender DNA-Region. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Expression der *clyA-bla*-Fusionsgene in *E. coli* BL21PRO. Im Gegensatz zu *E. coli* DH5 α sind in dem Bakterienstamm *E. coli* BL21PRO Lon-Proteasen (Li et al., 2005) nicht existent (Phillips et al., 1984), so dass synthetisierte rekombinante Proteine vermutlich eine höhere Stabilität aufweisen.

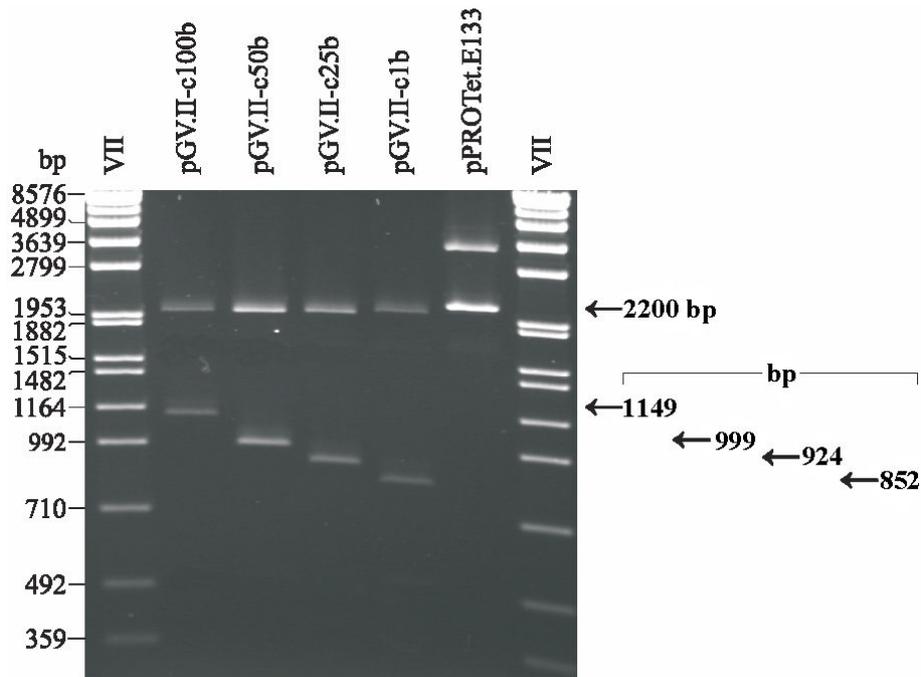


Abb. 38: Restriktionsanalyse von pPROTet.E133-Derivaten mit *clyA-bla*-Fusionsgenen. Dargestellt ist die mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *SalI* geschnittene DNA der pPROTet.E133-Derivate pGV.II-c100b (*clyA* Codon 1-100; *bla* Codon 24-287), pGV.II-c50b (*clyA* Codon 1-50; *bla* Codon 24-287), pGV.II-c25b (*clyA* Codon 1-25; *bla* Codon 24-287) und pGV.II-c1b (*clyA* Codon 1; *bla* Codon 24-287) sowie des pPROTet.E133-Vektors. Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente erfolgte in einem 1%igen Agarosegel. Die Größen der DNA-Fragmente sind rechts aufgeführt (bp). Die Größen der Fragmente des DNA-Standards VII sind links wiedergegeben (bp).

2.4 Expression der *clyA-bla*-Fusionsgene in *E. coli* BL21PRO

Die Expression der pPROTet.E133-Derivate in *E. coli* BL21PRO wurde durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (Atc) in den Endkonzentrationen von 0.1 ng/ml und 100 ng/ml wie beschrieben induziert (III 2.17.2). Im Anschluß erfolgte die Analyse der gesamtzellulären Proteine der entsprechenden Bakterienstämme durch SDS-PAGE, wobei jedoch nur die Expression des Fusionsgens *clyA*(Codon 1)-*bla*(Codon 24-287) in *E. coli* BL21PRO zu beobachten war, während die Genprodukte der pPROTet.E133-Derivate pGV.II-c25b, pGV.II-c50b und pGV.II-c100b im SDS-Gel nicht nachgewiesen werden konnten.

Wie die Abbildung 39 darlegt, konnte die Expression von *clyA*(Codon 1)-*bla*(Codon 24-287) in *E. coli* BL21PRO anhand der Synthese des mutmaßlichen ClyA-Bla-Proteins (Pfeile) belegt werden, das im SDS-Gel unterhalb des 31 kDa-Markerproteins aufgetrennt wurde. Das putative Fusionsprotein war ausschließlich in Lysaten von BL21PRO/pGV.II-c1b-Kulturen zu finden, die zuvor mit 100 ng/ml Atc induziert und für mindestens 40 min bei 37°C inkubiert wurden. Während der Inkubationszeit von 40 bis 100 min war zudem eine kontinuierliche

Steigerung der Expression von *clyA*(Codon 1)-*bla*(Codon 24-287) festzustellen, die jedoch bei längerer Inkubation bei 37°C nicht mehr beobachtet werden konnte. Das Genprodukt wies eine molekulare Masse von ca. 29 kDa auf, was der molekularen Masse der reifen, prozessierten β -Lactamase entspricht (Zlokarnik et al., 1998).

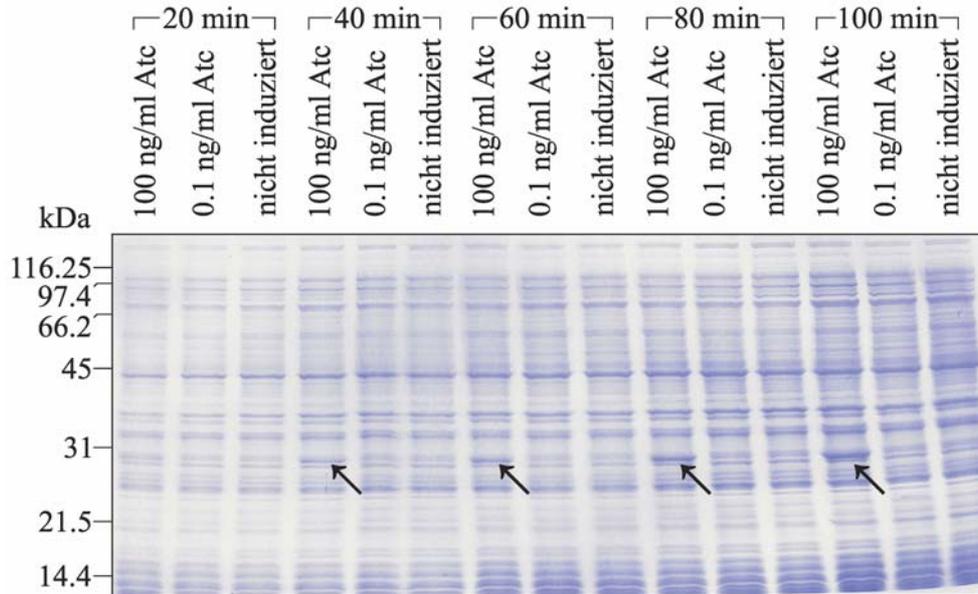


Abb. 39: Expression des pPROTet.133-Derivats pGV.II-c1b in *E. coli* BL21PRO.

Abgebildet ist das Coomassie-Blue-gefärbte SDS-Gel mit den aufgetragenen Bakterienlysaten des induzierten und nichtinduzierten Stammes BL21PRO/pGV.II-c1b nach Inkubationszeiten von 20, 40, 60, 80, 100 min bei 37°C. Induziert wurde mit 100 ng/ml bzw. 0.1 ng/ml Anhydrotetracyclin (Atc). Analysiert wurden jeweils gesamtzelluläre Proteine aus 50 μ l Bakterienkultur. Die molekulare Masse der Markerproteine ist seitlich aufgeführt (kDa).

Die Abbildung 40 zeigt die SDS-PAGE-Analyse der gesamtzellulären Proteine von BL21PRO/pGV.II-c25b nach Induktion durch Anhydrotetracyclin und steht beispielhaft für die Expression der pPROTet.E133-Derivate pGV.II-c50b und pGV.II-c100b in *E. coli* BL21PRO.

So konnte keines der mutmaßlichen Fusionsproteine in Lysaten der rekombinanten BL21PRO-Stämme mit den Plasmiden pGV.II-c25b, pGV.II-c50b und pGV.II-c100b nachgewiesen werden. Auch die Veränderung der Anhydrotetracyclin-Konzentration (im Bereich zwischen 0.1 bis 150 ng/ml) sowie die Verlängerung der Inkubationszeit auf bis zu 8 h bei 37°C führte nicht zur sichtbaren Synthese der Hybrid-Proteine. Da sämtliche *clyA-bla*-Fusionsgene in Ordnung waren, wie die DNA-Sequenzanalyse zeigte, lässt sich vermuten, dass die Expression dieser drei *clyA-bla*-Fusionsgene zwar fehlerfrei erfolgte, die Fusionsproteine jedoch sehr instabil waren und unmittelbar nach der Proteinbiosynthese wieder abgebaut wurden.

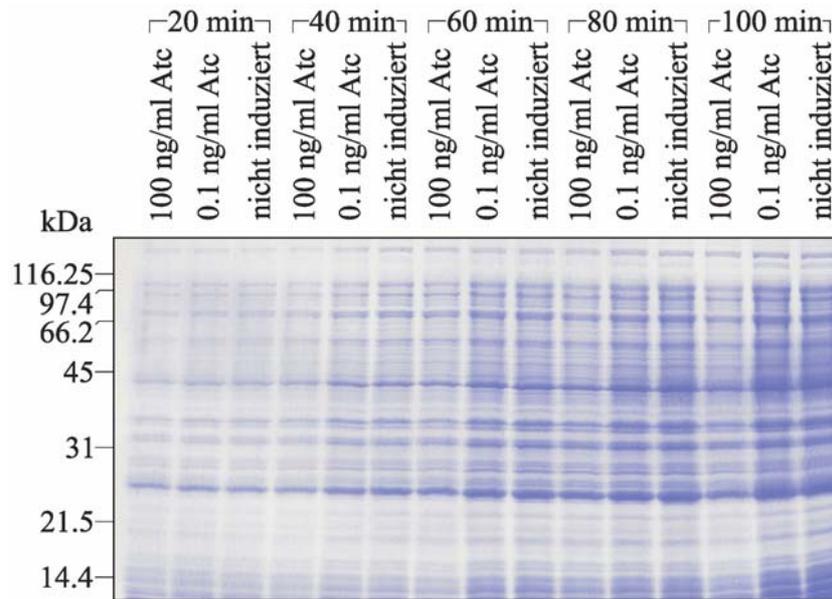


Abb. 40: Expression des pPROTet.133-Derivats pGV.II-c25b in *E. coli* BL21PRO.

Dargestellt ist das Coomassie-Blue-gefärbte Proteingel mit den aufgetragenen Bakterienlysaten von induzierten und nichtinduzierten Kulturen des Stammes BL21PRO/pGV.II-c25b nach Inkubationszeiten von 20, 40, 60, 80 und 100 min bei 37°C. Die Induktion erfolgte mit 100 ng/ml bzw. 0.1 ng/ml Anhydrotetracyclin (Atc). Analysiert wurden jeweils gesamtzelluläre Proteine aus 50 µl Bakterienkultur. Die molekulare Masse der Markerproteine ist seitlich aufgeführt (kDa).

Mit Hilfe der konstruierten *clyA-bla*-Fusionsgene konnte somit keine Aussage bezüglich der Fähigkeit der N-terminalen Region von ClyA, die reife β -Lactamase über die Zytoplasmamembran von *E. coli* zu transportieren, getroffen werden. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse zeigt Tabelle 11.

Tab. 11: Expression von *clyA-bla*-Fusionsgenen mit Derivaten von pACYC184 bzw. pPROTet.E133 in *E. coli* DH5 α bzw. *E. coli* BL21PRO.

<i>E. coli</i> Stamm	Plasmid	Expression des <i>clyA-bla</i> -Fusionsgens ^a
<i>E. coli</i> DH5 α	pGV.I-c1b	-
	pGV.I-c25b	-
	pGV.I-c50b	-
	pGV.I-c100b	-
<i>E. coli</i> BL21PRO	pGV.II-c1b	+
	pGV.II-c25b	-
	pGV.II-c50b	-
	pGV.II-c100b	-

^a Expression nachweisbar (+), keine Expression nachweisbar (-)

V. Diskussion

Das Zytolysin ClyA repräsentiert den Prototyp einer neuartigen Familie von porenbildenden Zytolysinen, die in verschiedenen *Enterobacteriaceae*, insbesondere in *E. coli*-Stämmen sowie in *S. enterica* Serovar Typhi- und *S. enterica* Serovar Paratyphi A-Stämmen, zu finden sind (Ludwig et al., 1995; Oscarsson et al., 1996; del Castillo et al., 1997; Oscarsson et al., 2002; Ludwig et al., 2004; von Rhein et al., im Druck). Das hämolytisch und zytotoxisch wirksame Zytolysin ClyA, das eine molekulare Masse von ca. 34 kDa aufweist, erzeugt in Zielmembranen Poren aus jeweils acht bis zehn ringförmig angeordneten ClyA-Molekülen (Oscarsson et al., 1996; Ludwig et al., 1999; Oscarsson et al., 1999; Lai et al., 2000; Wallace et al., 2000; Wyborn et al., 2004b). Nach bisherigen Erkenntnissen wird das ClyA-Protein von *E. coli* nicht prozessiert (del Castillo et al., 1997; Ludwig et al., 1999). Die Sekretion des ClyA-Proteins verläuft jedoch über eine periplasmatische Zwischenstufe und das Toxin kann über einen Vesikel-vermittelten Transport vom Periplasma in den extrazellulären Raum geschleust werden (Ludwig et al., 1999; del Castillo et al., 2001; Wai et al., 2003a).

Die vorliegende Dissertation sollte zur funktionalen Charakterisierung des Zytolysins ClyA von *E. coli* K12 beitragen. Insbesondere die Sekretion des Toxins, die offenbar über einen zweistufigen Transportprozess erfolgt, konnte bislang nicht vollständig aufgeklärt werden. So war zu Beginn der Arbeit der Transfermechanismus des ClyA-Proteins in den periplasmatischen Raum unbekannt. Dennoch zeigten Voruntersuchungen, dass eine große Deletion in der N-terminalen Region des ClyA-Proteins von *E. coli* K12, die die Aminosäurepositionen zwei bis zwanzig (ClyA Δ 2-20) umfasste, die Translokation des Zytolysins ins Periplasma vollständig inhibierte. Ausgehend von dieser Beobachtung sollte daher die Bedeutung der N-terminalen Region des ClyA-Proteins für den Transport des Toxins über die Zytoplasmamembran eingehender untersucht werden. Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere, gezielte Mutationen innerhalb des N-terminalen Bereiches von ClyA durch *in vitro*-Mutagenese eingeführt und deren Auswirkungen auf die Funktionalität des Zytolysins überprüft.

So wurde konstatiert, dass bereits die Deletionen der Aminosäuren an Position zwei bis fünf (ClyA Δ 2-5) und sechs bis zehn (ClyA Δ 6-10) am N-Terminus den Transportprozess des ClyA-Proteins ins Periplasma enorm beeinträchtigten. Dieser Effekt wurde durch die Deletion der Aminosäuren an Position zwei bis zehn (ClyA Δ 2-10) noch weiter verstärkt. Interne Mutationen, die Aminosäuren ab der Position zehn betrafen (ClyA Δ 6-15, ClyA Δ 11-15, ClyA Δ 11-20, ClyA Δ 16-20, ClyA Δ 16P), führten zur kompletten oder fast vollständigen Blockierung des ClyA-Transfers ins

Periplasma. So verblieben die ClyA-Mutanten ClyA Δ ₁₁₋₁₅, ClyA Δ ₁₁₋₂₀ und ClyA Δ ₁₆₋₂₀ gänzlich im Zytoplasma, während der Transport von ClyA Δ ₆₋₁₅ und ClyA_{A16P} in den periplasmatischen Raum noch äußerst minimal erfolgte. Des Weiteren bewirkten Deletionen, die vierzehn oder mehr Aminosäuren des N-terminalen Bereiches umfassten (ClyA Δ ₂₋₁₅, ClyA Δ ₂₋₂₀), einen totalen Transport-Defekt des Toxins über die Zytoplasmamembran.

Diese Ergebnisse zeigten, dass das äußerste N-terminale Ende des Zytolysins ClyA von *E. coli* K12 für die sekretorischen Prozesse des Proteins ein notwendiger Bestandteil ist und maßgeblich den Transport des Zytolysins ins Periplasma beeinflusst.

Darüber hinaus beeinträchtigten die N-terminalen Deletionen innerhalb der Sequenz von Aminosäureposition zwei und zwanzig sowie die A16→P-Substitution von ClyA die zytolytische Aktivität des Proteins gegenüber Erythrozyten und führten sogar in einigen Fällen zum Verlust der hämolytischen Eigenschaft. So konnte beobachtet werden, dass durch die Deletion der Aminosäuren an Position zwei bis fünf (ClyA Δ ₂₋₅), sechs bis zehn (ClyA Δ ₆₋₁₀) und zwei bis zehn (ClyA Δ ₂₋₁₀) die hämolytische Aktivität des Toxins zwar abnahm, aber im Vergleich zu der des wildtypischen ClyA-Proteins noch relativ stark vorhanden war. Hingegen hatten Mutationen innerhalb der Sequenz von Aminosäureposition elf bis zwanzig (ClyA Δ ₆₋₁₅, ClyA Δ ₁₁₋₁₅, ClyA Δ ₁₁₋₂₀, ClyA Δ ₁₆₋₂₀, ClyA_{A16P}) sowie die größeren Deletionen (ClyA Δ ₂₋₁₅, ClyA Δ ₂₋₂₀) schwerwiegende Auswirkungen auf die hämolytische Funktion des Zytolysins ClyA, so dass diese dramatisch reduziert wurde (ClyA Δ ₆₋₁₅, ClyA_{A16P}) oder sogar gänzlich verloren ging (ClyA Δ ₁₁₋₁₅, ClyA Δ ₁₁₋₂₀, ClyA Δ ₁₆₋₂₀, ClyA Δ ₂₋₁₅, ClyA Δ ₂₋₂₀).

Die zum Teil erhebliche Beeinträchtigung der hämolytischen Aktivität des ClyA-Proteins konnte theoretisch auf verschiedenen Ursachen basieren. So war denkbar, dass die Fähigkeit des ClyA-Proteins zur Bindung an Zielmembranen, zur Bildung von Oligomeren oder zur Erzeugung von Transmembranporen infolge der gezielten Mutationen am N-Terminus gestört wurde. Daher sollten die Auswirkungen der verschiedenen Deletionen von Aminosäuren sowie des Aminosäureaustauschs A16→P auf besagte Funktionen des Toxins überprüft werden.

So ergaben die Studien, in denen Erythrozytenmembranen nach Inkubation mit den jeweiligen ClyA-Mutanten im Westernblot mit ClyA-spezifischen Antikörpern auf das Vorhandensein von ClyA überprüft wurden, dass der N-terminale Bereich des Zytolysins für die Bindung des Toxins an Erythrozytenmembranen nicht vorrangig von Bedeutung war. Obgleich die Assoziation sämtlicher ClyA-Mutanten mit Erythrozytenmembranen bestätigt werden konnte, wurden einige Toxin-Mutanten deutlich schwächer detektiert. Insbesondere die sekretionsdefekten ClyA-Mutanten ClyA Δ ₁₁₋₂₀ und ClyA Δ ₁₆₋₂₀, deren Produktion in *E. coli*

mit einem auffallend vermindertem Zellwachstum einherging, zeigten im Westernblot nur dünne Proteinbanden. Vermutlich stand hier weniger ClyA-Protein für die Interaktion mit der Erythrozytenmembran zur Verfügung. Dennoch konnte bei manchen Mutanten eine leichte Beeinträchtigung der spezifischen Bindungsaktivität des ClyA-Proteins nicht ausgeschlossen werden. So wurden die Toxin-Mutanten ClyA Δ_{2-15} und ClyA Δ_{2-20} an Erythrozytenmembranen in erheblich geringerer Intensität nachgewiesen als beispielsweise der ClyA-Wildtyp oder die ClyA-Mutante ClyA Δ_{2-5} , obwohl das Wachstum der Bakterienstämme, die diese ClyA-Proteine synthetisierten, nicht beeinträchtigt war.

Des Weiteren hatten sämtliche Mutationen am N-Terminus von ClyA keinen erkennbaren Einfluss auf die Oligomerisierung des Zytolysins. So konnte die chemische Quervernetzung jeder ClyA-Mutante einschließlich des wildtypischen ClyA-Proteins durch Verwendung von Glutaraldehyd anhand der Bildung von Toxin-Oligomeren bestätigt werden. Dabei wiesen die in Westernblotanalysen detektierten ClyA-Multimere eine molekulare Masse von mehr als 250 kDa auf, was darauf hindeutet, dass mindestens acht bis zehn ClyA-Moleküle miteinander verknüpft wurden. Zudem war feststellbar, dass die chemische Quervernetzung von monomerem ClyA-Protein ausschließlich in reduzierender Umgebung zur Toxin-Oligomerisierung führte. Die Beobachtung, dass ClyA-Oligomere nur in Anwesenheit von Dithiotreitol gebildet wurden, lässt auf den postulierten Redox-Status des Zytolysins schließen, der maßgeblich durch die Bildung bzw. Auflösung einer putativen Disulfidbindung zwischen den Cysteinresten an Aminosäureposition 87 und 285 beeinflusst wird (Atkins et al., 2000; Wallace et al., 2000; Wai et al., 2003a). Offensichtlich lagen die Cysteinreste der ClyA-Mutanten sowie des ClyA-Wildtyps in den jeweiligen zytoplasmatischen Proteinpräparationen der *E. coli*-Stämme in oxidierter Form vor, so dass die Bildung der ClyA-Oligomere von der Zugabe des Reduktionsmittels Dithiotreitol und damit von der Reduktion der intramolekularen Disulfidbindung abhängig war (Atkins et al., 2000; Wai et al., 2003a).

Zweifellos hätten elektronenmikroskopische Analysen von Erythrozytenmembranen nach Inkubation mit den entsprechenden ClyA-Derivaten weitere, wertvolle Erkenntnisse hinsichtlich der Oligomerisierungsfähigkeit der Toxin-Mutanten erbracht. Bedauerlicherweise konnten diese jedoch aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

Untersuchungen an planaren, künstlichen Lipidmembranen, die in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Benz in Würzburg realisiert wurden, zeigten, dass der Sequenz von Aminosäureposition zwei bis zwanzig des N-Terminus auch eine wesentliche Bedeutung für die porenbildende Aktivität des ClyA-Proteins zukommt. Dabei wurde festgestellt, dass die porenbildende Aktivität der ClyA-Mutanten an den künstlichen Lipid-Bilayern zumeist mit

der hämolytischen Aktivität korrelierte. Demzufolge hatten Mutationen innerhalb der Sequenz von Aminosäureposition zwei bis zehn keine schwerwiegenden Auswirkungen auf die porenbildende Funktion des Toxins. So bildeten die ClyA-Mutanten ClyA Δ ₂₋₅, ClyA Δ ₆₋₁₀ und ClyA Δ ₂₋₁₀ genauso wie der ClyA-Wildtyp stabile Membranporen mit einer Lebensdauer von mehr als 5 min, die eine ähnlich hohe Leitfähigkeit zeigten, wie die Einzelkanäle des wildtypischen ClyA-Proteins. Im Gegensatz dazu erzeugte die Toxin-Mutante ClyA Δ ₂₋₁₅ stabile Membrankanäle, die äußerst geringe Einzelkanal-Leitfähigkeiten aufwiesen, was vermutlich auf eine extreme Reduktion der Poreninnendurchmesser zurückzuführen war. Die Bildung von sehr kleinen Einzelkanälen im Lipid-Bilayer deutet darauf hin, dass die Anzahl der an der Porenstruktur beteiligten Toxin-Moleküle abnahm. Alle weiteren ClyA-Derivate, die eine Deletion in der N-terminalen Sequenz von Aminosäureposition zehn bis zwanzig trugen, produzierten entweder keine Membranporen (ClyA Δ ₂₋₂₀), oder vermehrt instabile (ClyA Δ ₆₋₁₅, ClyA Δ ₁₁₋₁₅) bzw. überwiegend oder durchweg unbeständige (ClyA Δ ₁₁₋₂₀, ClyA Δ ₁₆₋₂₀) Membranporen in DPhPC-Lipidmembranen. Insbesondere die Beobachtung, dass einige dieser ClyA-Mutanten instabile Poren bildeten, unterstreicht die bedeutende Funktion der N-terminalen Region für die Stabilität des Toxin-Oligomers und damit für die porenbildende Aktivität von ClyA. Hingegen beeinträchtigte der durch die Einführung von Prolin künstlich erzeugte Helixbruch an der Aminosäureposition sechzehn nur geringfügig die porenbildende Aktivität von ClyA an künstlichen Lipid-Bilayern. Offenbar war die Toxin-Mutante ClyA_{A16P} in der Lage, sowohl mit Erythrozytenmembranen zu assoziieren als auch in künstliche Lipidmembranen einzutauchen, jedoch nicht mehr fähig, in komplexe Erythrozyten-membranen zu inserieren und Erythrozyten zu lysieren. Daraus lässt sich schließen, dass die α -Helix A/A'-Struktur von ClyA für die Bildung von Transmembranporen unbedeutend ist, aber sowohl für die produktive Bindung an Erythrozytenmembranen, als auch für die Sekretion einen wesentlichen Faktor darstellt.

Die hämolytische und porenbildende Aktivität von ClyA scheint von der β -Haarnadelstruktur des Zytolysins abhängig zu sein. So haben Mutationen innerhalb der β -Haarnadelstruktur erhebliche Auswirkungen auf die hämolytische Eigenschaft von ClyA (Wallace et al., 2000; del Castillo et al., 2001; Wai et al., 2003b; Wyborn et al., 2004b) und beeinträchtigen auch die porenbildende Aktivität des Zytolysins an künstlichen Lipidmembranen (Wai et al., 2003b). Zudem zeigt die Röntgenkristallstruktur des ClyA-Proteins (Abb. 1), dass die β -Haarnadel eine ausgedehnte hydrophobe Region an der Oberfläche des Toxin-Moleküls bildet, die potentielle Wechselwirkungen mit Lipidmembranen ermöglicht (Wallace et al., 2000).

Der genaue Mechanismus, über den ClyA-Moleküle in die Lipidmembran eintauchen und Transmembranporen erzeugen, ist bislang allerdings unklar. Dennoch lassen sich mit Hilfe der bisherigen Erkenntnisse Transmembranporen-Modelle konstruieren, in denen die hydrophobe β -Haarnadelstruktur des ClyA-Moleküls mit der Lipidmembran assoziiert und das Toxin als Oligomer inseriert (Abb. 41).

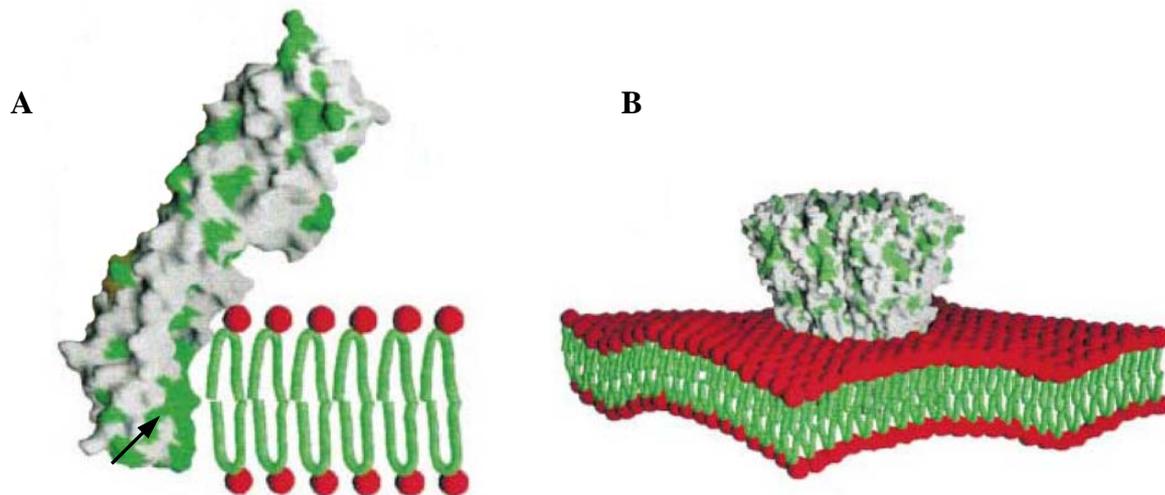


Abb. 41 A, B: Putative Interaktion von ClyA mit Lipidmembranen (aus Wallace et al., 2000).

(A) Die hydrophobe, ca. 30 Å weite β -Haarnadel (Pfeil) des monomeren ClyA-Moleküls assoziiert mit den hydrophoben Fettsäureschwänzen der Lipidmembran. (B) Modell einer aus acht ClyA-Molekülen gebildeten Transmembranpore, in der die β -Haarnadelstrukturen des ClyA-Multimers mit den hydrophoben Fettsäureschwänzen der Lipiddoppelschicht interagieren. Die hydrophoben Fettsäureschwänze und die hydrophilen Köpfe der Membranlipide sind grün bzw. rot gefärbt (A, B). Hydrophobe Regionen des ClyA-Monomers (A) sowie des ClyA-Multimers (B) sind grün gekennzeichnet.

Dabei wird zugrunde gelegt, dass die ca. 30 Å großen β -Haarnadelstrukturen des ringförmigen ClyA-Multimers mit den hydrophoben Fettsäureschwänzen der Lipiddoppelschicht interagieren (Wallace et al., 2000) und somit dessen Insertion in die Ziellmembran vermitteln. Vermutlich wird hierbei die hydrophile Innenseite des wasserdurchlässigen Kanals von den hydrophilen Regionen oberhalb und unterhalb der β -Haarnadeldomäne des ClyA-Proteins gebildet, die sowohl mit den hydrophilen Köpfen der Membranlipide als auch mit den nichthydrophoben Bereichen benachbarter ClyA-Moleküle in Wechselwirkung treten können (Wallace et al., 2000).

Obgleich die hydrophobe β -Haarnadelstruktur des ClyA-Proteins als postulierte Transmembranregion für die Insertion des Toxins in Ziellmembranen essentiell zu sein scheint (Wallace et al., 2000), ist der Einfluss der N-terminalen Region auf die porenbildende und

hämolytische Aktivität des Zytolysins unverkennbar. Mutationen innerhalb dieser Region hatten zumeist unmittelbare Folgen auf besagte Eigenschaften des Toxins. Vermutlich spielt der N-terminale Bereich des Zytolysins für die Ausbildung von Wechselwirkungen der ClyA-Moleküle untereinander eine wesentliche Rolle und beeinflusst somit nachhaltig die produktive Bindung an Zielmembranen. Sicherlich wären auch hier elektronenmikroskopische Untersuchungen hilfreich gewesen, zusätzliche Daten über die porenbildende Aktivität der Toxin-Mutanten zu gewinnen. Jedoch konnten diese aufgrund der bereits erwähnten zeitlichen Umstände nicht erbracht werden.

Ausgehend von der Beobachtung, dass der Transport der künstlich erzeugten ClyA-Mutanten erheblich bzw. gänzlich inhibiert war, stellte sich die Frage, ob die N-terminale Region von ClyA ein alleiniges Sekretionssignal darstellt. Daher sollte anhand der Konstruktion und Analyse von Fusionsproteinen geklärt werden, ob das N-terminale Ende des ClyA-Proteins die Sekretion der heterologen β -Lactamase (Bla) über die Zytoplasmamembran von *E. coli* veranlassen kann.

Die β -Lactamase wurde aufgrund ihrer strukturellen und funktionalen Eigenschaften als Fusionspartner gewählt. Bei der reifen β -Lactamase handelt es sich um ein Enzym mit einer molekularen Masse von ca. 29 kDa, das β -Lactam-Antibiotika (Cephalosporine, Penicilline) hydrolytisch spaltet und zur Resistenz von Bakterien gegenüber dieser Antibiotika-Gruppe führt (Sutcliffe et al., 1978; Zlokarnik et al., 1998). Das globuläre, wasserlösliche und monomere Protein ist eines der meist untersuchten Enzyme, die in das Periplasma von *E. coli* transportiert werden (Plückthun et al., 1986). Beim Transport des Enzyms über die zytoplasmatische Membran, der über den generellen Typ-II-Sekretionsweg von *E. coli* verläuft (Sauvonnet et al., 1996; Sandkvist, 2001), wird das aus den ersten 23 Aminosäuren gebildete Transportsignal vom reifen Protein abgeschnitten (Sutcliffe et al., 1978; Kadonaga et al., 1984). Der Transport des Proteins über die innere Membran lässt sich unkompliziert nachweisen, da nur die periplasmatische, reife β -Lactamase dem Bakterium die Resistenz gegenüber Ampicillin verleiht (Plückthun et al., 1986). Darüber hinaus ist die enzymatische Aktivität des Proteins durch den Einsatz chromogener Reagenzien feststellbar und kann photometrisch bestimmt werden (O'Callaghan et al., 1971).

Die Konstruktion von Hybrid-Proteinen, in denen β -Lactamase als Fusionspartner fungiert, wurde bereits in mehreren Arbeiten zur Analyse von Proteintransportprozessen erfolgreich eingesetzt. In der Studie von del Castillo et al. (2001), in der das vollständige ClyA-Protein von *E. coli* an das reife Bla-Protein fusioniert wurde, konnte die Ausschleusung des Hybrid-Proteins aus der Bakterienzelle anhand der extrazellulären β -Lactamase-Aktivität

nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Untersuchung von del Castillo et al. (2001) sollte in dieser Arbeit die Konstruktion des ClyA-Bla-Proteins durch die Fusion definierter N-terminaler Aminosäureabschnitte des ClyA-Proteins mit dem reifen Bla-Protein erfolgen. Daher wurden verschieden lange 5'-terminale *clyA*-Fragmente (Codon 1, Codon 1-25, Codon 1-50, Codon 1-100) mit dem für die reife β -Lactamase kodierenden DNA-Fragment (Codon 24-287) fusioniert und zunächst in pACYC184-Vektoren exprimiert. Jedoch konnte die Expression der Fusionsgene anhand der Synthese von Hybrid-Proteinen nicht nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür lag vermutlich an der komplexen Regulation des *clyA*-Gens, das unter Standard-Laborbedingungen nicht in signifikantem Ausmaß in *E. coli* exprimiert wird (Ludwig et al., 1995; Oscarsson et al., 1996; del Castillo et al., 1997; Green und Baldwin, 1997; Westermarck et al., 2000; Wyborn et al., 2004a). Zudem wäre denkbar, dass die *low-copy*-Eigenschaft des Vektors pACYC184 (Chang et al., 1978) die Produktion von Hybrid-Proteinen nur in minimalsten Mengen zuließ, weshalb sie durch SDS-PAGE-Analysen nicht festgestellt werden konnten. Aufgrund dieser Überlegungen erfolgte die Expression der Fusionsgene in einem kontrollierbaren System. Hierzu wurde die *clyA*-eigene Promotorregion entfernt, um mögliche reprimierende Effekte auf die Expression der Fusionsgene auszuschließen. Ferner hatte die Insertion der Fusionsgene in den Expressionsvektor pPROTetE.133 den Vorteil, dass die Genexpression nur unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors ($P_{Ltet\ 0-1}$) stand. Die Expression des Fusionsgens *clyA*(Codon 1)-*bla*(Codon 24-287) konnte anhand des gebildeten Genproduktes durch eine SDS-PAGE-Analyse nachgewiesen werden. Dagegen waren die Expressionsprodukte der übrigen Fusionsgene nicht vorzufinden. Es ließ sich daher vermuten, dass diese Hybrid-Proteine möglicherweise aufgrund einer anormalen Konformation und/oder Missfaltung unmittelbar nach der Synthese durch ATP-abhängige Proteasen, wie beispielsweise durch Clp-Proteasen, degradiert wurden (Gottesmann und Maurizi, 1992; Suzuki et al., 1997). Somit konnten mit dieser Versuchsreihe keine weiteren Aussagen getroffen werden, ob der N-terminale Bereich von ClyA ein separates Sekretionssignal repräsentiert.

In der Röntgenkristallstruktur des ClyA-Proteins bildet die N-terminale α -Helix A/A' mit den vier weiteren α -Helices B, C, F und G eine *five-helix-bundle*-Struktur aus (Wallace et al., 2000). Dabei entsteht eine Protein-Domäne mit langen α -helicalen Regionen. Solche helicalen Protein-Domänen treten auch in einigen anderen Toxin-Strukturen, wie beispielsweise dem Colicin Ia, auf und sind dabei oftmals in Translokationsprozesse involviert (Wiener et al., 1997; Wallace et al., 2000). Da Mutationen in der C-terminalen α -Helix G von ClyA den Proteintransport ins Periplasma ebenfalls nachhaltig beeinträchtigen (Oscarsson et al., 1999;

Wai et al., 2003b; Ludwig et al., unveröffentlicht), ist vermutlich die intakte *five-helix-bundle*-Konformation für den Transportmechanismus des Zytolysins unerlässlich und stellt möglicherweise ein aus mehreren Sequenzabschnitten zusammengesetztes Transportsignal dar. Diesbezüglich gilt es zusätzliche Informationen über die Bedeutung des *five-helix-bundles* für den Transfer des ClyA-Proteins durch die zytoplasmatische Membran von *E. coli* zu gewinnen. So könnten durch *in vitro*-Mutagenese gezielt eingeführte Mutationen innerhalb der *five-helix-bundle*-Struktur zu weiteren Erkenntnissen über dessen Einfluss auf den Sekretionsmechanismus von ClyA führen.

VI. Literaturverzeichnis

Alouf JE (2001) Pore-forming bacterial protein toxins: an overview. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 257: 1-14.

Atkins A, Wyborn NR, Wallace AJ, Stillman TJ, Black LK, Fielding AB, Hisakado PJ, Artymiuk PJ, Green J (2000) Structure-function relationships of a novel bacterial toxin, hemolysin E. The role of α_G . *J. Biol. Chem.* 275: 41150-41155.

Atlung T, Ingmer H (1997) H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* 24: 7-17.

Benz R, Janko K, Boos W, Lauger P (1978) Formation of large ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 511: 305-319.

Benz R, Janko K, Lauger P (1979) Ionic selectivity of pores formed by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 551: 238-247.

Benz R, Schmid A, Wagner W, Goebel W (1989) Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: Evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect. Immun.* 57: 887-895.

Beveridge TJ (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 181: 4725-4733.

Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B, Weller U, Kehoe M, Palmer M (1996) Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol.* 165: 73-79.

Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-74.

Chang ACY, Cohen SN (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134: 1141-1156.

Chen L-Y, Chen D-Y, Miaw J, Hu N-T (1996) XpsD, an outer membrane protein required for protein secretion by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a multimer. *J. Biol. Chem.* 271: 2703-2708.

Christie PJ, Vogel JP (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* 8: 354-360.

del Castillo FJ, Leal SC, Moreno F, del Castillo I (1997) The *Escherichia coli* K-12 *sheA* gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin. *Mol. Microbiol.* 25: 107-115.

del Castillo FJ, Moreno F, del Castillo I (2000) Characterization of the genes encoding the SheA haemolysin in *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella flexneri* 2a. *Res. Microbiol.* 151: 229-230.

del Castillo FJ, Moreno F, del Castillo I (2001) Secretion of the *Escherichia coli* K-12 SheA hemolysin is independent of its cytolytic activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 281-285.

Flügge UI, Benz R (1984) Pore-forming activity in the outer membrane of a chloroplast envelope. *FEBS Lett.* 169: 85-89.

Galan JE, Collmer A (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322-1328.

Gomez-Gomez JM, Blazquez J, Baquero F, Martinez JL (1996) *hns* mutant unveils the presence of a latent haemolytic activity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 19: 909-910.

Gottesmann S, Maurizi MR (1992) Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol. Rev.* 56: 592-621.

Green J, Baldwin ML (1997) The molecular basis for the differential regulation of the *hlyE*-encoded haemolysin of *Escherichia coli* by FNR and HlyX lies in the improved activating region 1 contact of HlyX. *Microbiol.* 143: 3785-3793.

Groisman EA, Ochman H (1994) How to become a pathogen. *Trends Microbiol.* 2: 289-294.

Hacker J, Hughes C, Hof H, Goebel W (1983) Cloned haemolysin genes from *Escherichia coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice. *Infect. Immun.* 42: 57-63.

Hanahan D (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557.

Henderson IR, Capello R, Nataro JP (2000) Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. *Trends Microbiol.* 8: 529-532.

Higuchi R (1990) Recombinant PCR. In *PCR-Protocols: A guide to methods and applications*, pp 177-183. Edited by Inris MA, Gelfard DH, White TJ, San Diego, Ca: Academic Press.

Hueck CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animal and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 379-433.

Kadonaga JT, Gautier AE, Straus DR, Charles AD, Edge MD, Knowles JR (1984) The role of the β -lactamase signal sequence in the secretion of proteins by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 259: 2149-2154.

Kolling GL, Matthews KR (1999) Export of virulence genes and shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1843-1848.

Koronakis V, Koronakis E, Hughes C (1989) Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* haemolysin protein across both bacterial membranes. *EMBO J.* 8: 595-605.

Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C (2000) Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405: 914-919.

Kraft R, Tardiff J, Krauter KS, Leinwand LA (1988) Using mini-prep plasmid DNA for sequencing double stranded templates with Sequenase. *Biotechniques* 6: 544-546.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lai X-H, Arencibia I, Johansson A, Wai SN, Oscarsson J, Kalfas S, Sundqvist K-G, Mizunoe Y, Sjöstedt A, Uhlin BE (2000) Cytocidal and apoptotic effects of the ClyA protein from *Escherichia coli* on primary and cultured monocytes and macrophages. *Infect. Immun.* 68: 4363-4367.

Li M, Rasulova F, Melnikov EE, Rotanova TV, Gustchina A, Maurizi MR, Wlodawer A (2005) Crystal structure of the N-terminal domain of *E. coli* Lon protease. *Protein Science* 14: 2895-2900.

Ludwig A, Tengel C, Bauer S., Bubert A, Benz R, Mollenkopf HJ, Goebel W (1995) SlyA, a regulatory protein of *Salmonella typhimurium*, induces a haemolytic and pore-forming protein in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 249: 474-486.

Ludwig A, Garcia F, Bauer S, Jarchau T, Benz R, Hoppe J, Goebel W (1996) Analysis of the *in vivo* activation of haemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 5422-5430.

Ludwig A (1996) Cytolytic toxins from Gram-negative bacteria. *Microbiol. Sem.* 12: 281-296.

Ludwig A, Bauer S, Benz R, Bergmann B, Goebel W (1999) Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 31: 557-567.

Ludwig A, Goebel W (1999) The family of the multigenic encoded RTX toxins, pp. 330-348. In Alouf JE, Freer JH (ed.), The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, 2nd ed. Academic Press, London, United Kingdom.

Ludwig A, von Rhein C, Bauer S, Hüttinger C, Goebel W (2004) Molecular analysis of cytolysin A (ClyA) in pathogenic *Escherichia coli* strains. J. Bacteriol. 186: 5311-5320.

Lutz R, Bujard H (1997) Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I₁-I₂ regulatory elements. Nucl. Acids Res. 25:1203-1210.

Nielsen BL, Brown LR (1983): The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 141: 311-315

O'Callaghan CH, Morris A, Kirby SM, Shingler AH (1972) Novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. Antimicrob. Agents Chemother. 1: 283-288.

Osborn MJ, Gander JE, Parisi E, Carson J (1972) Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem. 247: 2962-2972.

Oscarsson J, Mizunoe Y, Uhlin BE, Haydon DJ (1996) Induction of a haemolytic activity in *Escherichia coli* by the *slyA* gene product. Mol. Microbiol. 20: 191-199.

Oscarsson J, Mizunoe Y, Li L, Lai X-H, Wieslander A, Uhlin BE (1999) Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 32: 1226-1238.

Oscarsson J, Westermark M, Löfdahl S, Olsen B, Palmgren H, Mizunoe Y, Wai SN, Uhlin BE (2002) Characterization of a pore-forming cytotoxin expressed by *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A. Infect. Immun. 70: 5759-5769.

Parker MW, Buckley JT, Postma JP, Tucker AD, Leonard K, Pattus F, Tsernoglou D (1994) Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature* 367: 292-295.

Phillips TA, Van Bogelen RA, Neidhardt FC (1984) *lon* gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *J. Bacteriol.* 159: 283-289.

Plückthun A, Knowles JR (1987) The consequences of stepwise deletions from the signal-processing site of β -Lactamase. *J. Biol. Chem.* 262: 3951-3957.

Pugsley AP (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 50-108.

Ritz D, Beckwith J (2001) Roles of thiol-redox-pathways in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 21-48.

Ralph ET, Guest JR, Green J (1998) Altering the anaerobic transcription factor FNR confers a hemolytic phenotype on *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 10449-10452.

Rowe GE, Welch RA (1994) Assays of haemolytic toxins. *Methods Enzymol.* 235: 657-667.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY USA.

Sandkvist M (2001) Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* 40: 271-283.

Sauvonnet N, Pugsley AP (1996) Identification of two regions of *Klebsiella oxytoca* pullulanase that together are capable of promoting β -lactamase secretion by the general secretory pathway. *Mol. Microbiol.* 22: 1-7.

Schmidt H, Beutin L, Karch H (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63: 1055-1061.

Sekiya K, Satoh R, Danbara H, Futaesaku Y (1993) A ring-shaped structure with a crown formed by streptolysin O on the erythrocyte membrane. *J. Bacteriol.* 175: 5953-5961.

Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE (1996) Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274: 1859-1866.

Stanley P, Koronakis V, Hughes C (1998) Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 309-333.

Sutcliffe JG (1978) Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3737-3741.

Suzuki CK, Rep M, van Dijl JM, Suda K, Grivell LA, Schatz G (1997) ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem. Sci.* 22: 118-123.

Thanabalu T, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V (1998) Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J.* 17: 6487-6496.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.

von Rhein C, Bauer S, Lopez Sanjurjo EJ, Benz R, Goebel W, Ludwig A Genetic characterization and functional analysis of a pore-forming hemolysin from *Salmonella enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A. *J. Bacteriol.* Im Druck.

Wai SN, Lindmark B, Söderblom T, Takade A, Westermarck M, Oscarsson J, Jass J, Richter-Dahlfors A, Mizunoe Y, Uhlin BE (2003a) Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell* 115: 25-35.

Wai SN, Westermark M, Oscarsson J, Jass J, Maier E, Benz R, Uhlin BE (2003b) Characterization of a dominantly negative mutant ClyA cytotoxin proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185: 5491-5499.

Wallace AJ, Stillman TJ, Atkins A, Jamieson SJ, Bullough PA, Green J, Artymiuk PJ (2000) *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of the membrane pores by electron microscopy. *Cell* 100: 265-276.

Welch RA, Dellinger EP, Minshew B, Falkow S (1981) Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature* 294: 665-667.

Westermark M, Oscarsson J, Mizunoe Y, Urbonaviciene J, Uhlin BE (2000) Silencing and activation of a ClyA cytotoxin expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182: 6347-6357.

Wiener M, Freymann D, Ghosh P, Stroud RM (1997) Crystal structure of colicin Ia. *Nature* 385: 461-464.

Williams RM, Rimsky S (1997) Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein H-NS: a central controller of gene regulatory networks. *FEMS Microbiol. Lett.* 156: 175-185.

Wyborn NR, Stapleton MR, Norte VA, Roberts RE, Grafton J, Green J (2004a) Regulation of *Escherichia coli* hemolysin E expression by H-NS and *Salmonella* SlyA. *J. Bacteriol.* 186: 1620-1628.

Wyborn NR, Clark A, Roberts RE, Jamieson SJ, Tzokov S, Bullough PA, Stillman TJ, Artymiuk PJ, Galen JE, Zhao L, Levine MM, Green J (2004b) Properties of haemolysin E (HlyE) from a pathogenic *Escherichia coli* avian isolate and studies of HlyE export. *Microbiology* 150: 1495-1505.

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.

Zlokarnik G, Negulescu PA, Knapp TE, Mere L, Burres N, Feng L, Whitney M, Roemer K, Tsien RY (1998) Quantitation of transcription and clonal selection of a single living cells with β -lactamase as reporter. *Science* 279: 84-88.

VII. Publikationen

Völkerink G, von Rhein C, Lopez Sanjurjo EJ, Benz R, Ludwig A Molecular analysis of the N- and C-terminal region of the cytolysin A (ClyA) from *Escherichia coli*. Manuskript in Vorbereitung.

VIII. Abkürzungsverzeichnis

A

A. dest	destilliertes Wasser
Amp	Ampicillin
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammonium-Peroxysulfat
A/T	Adenin/Thymin-Gehalt
Atc	Anhydrotetracyclin

B

<i>bla</i>	<i>bla</i> -Gen
Bla	β-Lactamase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin

C

<i>clyA</i> _{K12}	<i>clyA</i> -Gen von <i>E. coli</i> K12
ClyA _{K12}	Zytolysin ClyA von <i>E. coli</i> K12
Cm	Chloramphenicol
Cm ^r	Chloramphenicol-Resistenz
CRP	<i>cyclic AMP receptor protein</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus

D

DNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DNase	Desoxyribonuklease
DPhPC	Diphytanoyl-Phosphatidylcholin
DTT	1,4-Dithio-DL-treitol

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>

F

FNR	<i>fumarate and nitrate reduction regulator</i>
-----	---

G

<i>gsp</i>	<i>general secretory pathway</i>
G/C-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt

H

HCl	Salzsäure
H-NS	<i>histone-like nucleoid structural protein</i>
H ₂ O	Wasser
HUS	enteropathisches hämolytisch-urämisches Syndrom

K

kb Kilobasen
kDa Kilodalton

M

MCS *multiple cloning site*
MgCl₂ Magnesiumchlorid

N

NaCl Natriumchlorid
NaOH Natronlauge
NMEC neonatale Meningitis erregende *E. coli*
N-Terminus Amino-Terminus

O

OD optische Dichte

P

p.a. *pro analysi*
PBS *phosphate-buffered saline*
P_{cl_yA} Promotor des *cl_yA*_{K12}-Gens
PCR *polymerase chain reaction*
P_{lacZ} Promotor des Plasmids pAL201
P_{Ltet0-1} Promotor des Expressionsvektors pPROTet.E133
PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid
P_{tet} Promotor des Vektors pACYC184
PVDF Polyvinyliden-Difluorid

R

RNase Ribonuklease
rpm *rounds per minute*
RTX *repeats in toxin*

S

SDS Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*)
SDS-PAGE SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
STEC Shiga-Toxin-produzierende *E. coli*

T

TBE Tris-Borat-EDTA
TBS *tris-buffered saline*
Tc Tetracyclin
Tc^r Tetracyclin-Resistenz
TCA Trichloressigsäure
TE Tris-EDTA
TEMED N,N,N,N-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl Tris-Salzsäure

Abkürzungsverzeichnis

U	
U	Unit
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i>
UV	ultraviolett
V	
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
Vol.	Volumen
W	
w/v	<i>weight per volume</i>

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

IX. Anhang

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 17.03.2006

Guido Völkerink

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation „Funktionale Analyse der N-terminalen Region des Zytolysins ClyA von *Escherichia coli*“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 17.03.2006

Guido Völkerink

Curriculum vitae

zur Person:

Name: Guido Völkerink
Geburtstag: 7. Februar 1974
Geburtsort: Greven
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1986-1994 Gymnasium Nordhorn
Abschluß mit allg. Hochschulreife

Grundwehrdienst:

1994-1995 Grundwehrdienstleistender in
Budel (NL) und Jever (D)

Studium:

1995-2002 Studium der Biologie (Diplom) an der
Universität Bielefeld
Juni 1998 Diplom-Vorprüfung
Mai 2001 bis Mai 2002 Diplomarbeit am Lehrstuhl
für Gentechnologie/Mikrobiologie in Bielefeld
Thema: „Das OmpA-Protein als Rezeptor bei der
Konjugation und Phageninfektion“
Gutachter: Dr. B. Dreiseikelmann
 Prof. Dr. R. Eichenlaub
Juli 2002 Diplomprüfung im Studiengang Biologie
Verleihung des akademischen Grades des
Diplom-Biologen im Juli 2002

Promotionsstudium:

2003-2006 März 2003 bis Juni 2005 Durchführung der Doktorarbeit
am Institut für Medizinische Mikrobiologie
(Direktor: Prof. Dr. V. Brade) des Klinikums der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a. M.
unter Anleitung von PD Dr. A. Ludwig
Juli 2005 bis März 2006 Anfertigung der schriftlichen
Dissertation