

**Der DNA-Translokator und Typ-IV-Pilus von  
*Thermus thermophilus* HB27: Funktion und  
Interaktion von Komponenten der  
verknüpften Systeme**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
Kerstin Kruse  
aus Delmenhorst

Frankfurt, 2019  
(D 30)

Vom Fachbereich 15 der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. Sven Klimpel
1. Gutachter:	Prof. Dr. Beate Averhoff
2. Gutachter:	Prof. Dr. Jens Wöhnert
Datum der Disputation:	20. August 2019

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Kruse K, Salzer R, Joos F und Averhoff B (2018) Functional dissection of the three N-terminal general secretory pathway domains and the Walker motifs of the traffic ATPase PilF from *Thermus thermophilus*. *Extremophiles* **22**:461-471

und:

Kruse K, Salzer R und Averhoff B (2019) The traffic ATPase PilF interacts with the inner membrane platform of the DNA translocator and type IV pili from *Thermus thermophilus*. *FEBS Open Bio* **9**:4-17

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Horizontaler Gentransfer .....	1
1.2 Mechanismen des DNA-Transfers.....	2
1.3 Der DNA-Translokator von <i>T. thermophilus</i> .....	5
1.4 Motor-ATPasen: Antriebsmotoren von Transportprozessen.....	10
1.4.1 Phylogenie der Motor-ATPasen .....	10
1.4.2 Funktion und Struktur der Motor-ATPase PilF aus <i>T. thermophilus</i> .....	12
1.5 Struktur und Funktionen von Typ-IV-Pili .....	17
1.6 Piline: Bausteine des T4P .....	19
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	21
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
2.1 Organismen, Plasmide, Oligonukleotide .....	22
2.1.1 Organismen .....	22
2.1.2 Plasmide .....	24
2.1.3 Oligonukleotide .....	26
2.2 Kultivierung und Lagerung von Organismen.....	29
2.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	29
2.2.2 Kultivierung von <i>T. thermophilus</i> .....	29
2.2.3 Medienzusätze .....	29
2.2.4 Lagerung von Stämmen.....	30
2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	30
2.3.1 Klonierungstechniken.....	30
2.3.2 Ortsgerichtete Mutagenese .....	31
2.3.3 Isolierung von DNA.....	31
2.3.4 Transformation von <i>E. coli</i> .....	31
2.3.5 Natürliche Transformation von <i>T. thermophilus</i> und Bestimmung der Transformationsfrequenz.....	32
2.3.6 Elektroporation von <i>T. thermophilus</i> .....	32
2.3.7 Agarosegelelektrophorese .....	33
2.3.8 Isolierung der RNA aus <i>T. thermophilus</i> .....	33
2.3.9 Generierung von cDNA durch Reverse-Transkriptase (RT)-PCR.....	33

<b>2.4</b>	<b>Analyse von Proteinen .....</b>	<b>34</b>
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) .....	34
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (1951).....	34
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	34
2.4.4	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	35
2.4.5	Western Blot-Analyse.....	35
<b>2.5</b>	<b>Isolierung der Membranen von <i>T. thermophilus</i> .....</b>	<b>37</b>
2.5.1	Isolierung der Gesamtmembran-Fraktion.....	37
2.5.2	Trennung der inneren und äußeren Membran von <i>T. thermophilus</i> .....	37
<b>2.6</b>	<b>Produktion und Reinigung von Proteinen .....</b>	<b>38</b>
2.6.1	Heterologe Produktion und Reinigung von PilF-Varianten .....	38
2.6.2	Heterologe Produktion und Reinigung von PilN, PilM und PilMN .....	39
2.6.3	Heterologe Produktion und Reinigung von PilMNO .....	40
2.6.4	Produktion und Reinigung von ComZ aus <i>T. thermophilus</i> .....	40
<b>2.7</b>	<b>Analyse der Protein-Protein Interaktionen durch Koinkubation und Koelution von Strep-Tactin-Säulen .....</b>	<b>41</b>
<b>2.8</b>	<b>Gelfiltration zur Bestimmung der molekularen Masse von Proteinkomplexen .....</b>	<b>42</b>
<b>2.9</b>	<b>Analyse der ATP-Bindung an PilF und PilM.....</b>	<b>42</b>
2.9.1	Bindung von [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-ATP.....	42
2.9.2	Bestimmung des ATP-Gehalts von Proteinen .....	43
<b>2.10</b>	<b>Messung der ATP-Hydrolyse-Aktivität .....</b>	<b>43</b>
2.10.1	Phosphat-Bestimmung mittels AAM-Reagenz .....	43
2.10.2	Phosphat-Bestimmung mittels Malachitgrün .....	44
<b>2.11</b>	<b>Thermofluor-Assay .....</b>	<b>45</b>
<b>2.12</b>	<b>Isotherme Titrationskalometrie.....</b>	<b>45</b>
<b>2.13</b>	<b>Elektronenmikroskopische Analyse der Pilierung.....</b>	<b>45</b>
<b>2.14</b>	<b>Analyse der „twitching motility“ .....</b>	<b>46</b>
<b>2.15</b>	<b>Adhäsion von <i>T. thermophilus</i> an Plastikoberflächen .....</b>	<b>47</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Rolle Präpilin-ähnlicher Proteine in <i>T. thermophilus</i>.....</b>	<b>48</b>
3.1.1	Deletion von <i>TTC1842</i> , <i>TTC1651</i> , <i>TTP0075</i> und <i>TTP0076</i> .....	51
3.1.2	Phänotypische Analysen der Präpilin-Mutanten .....	57
<b>3.2</b>	<b>Analysen des Kompetenzproteins ComZ .....</b>	<b>62</b>
3.2.1	Deletion und Komplementation von <i>comZ</i> .....	62
3.2.2	Reinigung von ComZ aus <i>T. thermophilus</i> .....	69
<b>3.3</b>	<b>Die Rolle der Walker A- und Walker B-Motive bei der Aktivität, der Assemblierung und der Stabilität von PilF-Komplexen.....</b>	<b>72</b>
3.3.1	Erstellung der Proteinvarianten PilF <sub>K654A</sub> und PilF <sub>E718A</sub> .....	73
3.3.2	ATP-Bindung und -Hydrolyse von PilF <sub>K654A</sub> und PilF <sub>E718A</sub> .....	75
3.3.3	Komplexbildung und -stabilität von PilF <sub>K654A</sub> und PilF <sub>E718A</sub> .....	76

<b>3.4</b>	<b>Rolle des Walker A- und Walker B-Motivs bei der Funktion von PilF in der T4P-Biogenese und der natürlichen Transformation .....</b>	<b>79</b>
3.4.1	Erstellung der <i>T. thermophilus</i> -Mutanten <i>pilFK654A</i> und <i>pilFE718A</i> .....	79
3.4.2	Phänotypische Charakterisierung der Mutanten <i>pilFK654A</i> und <i>pilFE718A</i> .....	81
<b>3.5</b>	<b>Interaktion von PilF mit Komponenten des DNA-Translokators und T4P-Assemblierungskomplexes .....</b>	<b>84</b>
3.5.1	Heterologe Produktion und Koaufrreinigung von PilMN und PilMNO.....	84
3.5.2	PilM interagiert mit PilF.....	88
3.5.3	PilMN- und PilMNO-Komplexe stimulieren die ATPase-Aktivität von PilF.....	90
3.5.4	Die Rolle verschiedener PilF-Domänen bei der Interaktion mit PilMN.....	93
3.5.5	Die ATP-Bindung von PilM ist nicht notwendig für die Interaktion mit PilF .....	97
3.5.6	Lysin 26 in PilM ist nicht essentiell für die natürliche Transformation und „twitching motility“ .....	99
<b>3.6</b>	<b>Interaktion von PilF mit dem Sekundärbotenstoff c-di-GMP.....</b>	<b>103</b>
3.6.1	Überprüfung von PilF auf potentielle c-di-GMP-Bindemotive .....	103
3.6.2	Untersuchung der c-di-GMP-Bindung mittels ITC.....	104
3.6.3	Verknüpfung der c-di-GMP-Bindestellen von PilF mit den GSPII-Domänen und ihren Funktionen .....	105
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>108</b>
<b>4.1</b>	<b>Interaktionen der Komponenten des DNA-Translokators und T4P.....</b>	<b>108</b>
4.1.1	Der PilMNO-Komplex bildet die Plattform des T4P und DNA-Translokators in der inneren Membran .....	109
4.1.2	Die Stimulierung der ATPase-Aktivität von PilF .....	113
<b>4.2</b>	<b>Funktion der Domänen der Motor-ATPase PilF .....</b>	<b>115</b>
<b>4.3</b>	<b>Die Bindung von c-di-GMP an PilF.....</b>	<b>118</b>
<b>4.4</b>	<b>Die Funktionen der Pilin-ähnlichen Proteine .....</b>	<b>121</b>
4.4.1	Funktion der Pilin-ähnlichen Proteine in dicken und dünnen Pili .....	121
4.4.2	Rolle Präpilin-ähnlicher Proteine bei der natürlichen Transformation und der Funktionalität der T4P .....	122
4.4.3	Mögliche Funktion von ComZ im Pseudopilus des DNA-Translokators .....	125
<b>4.5</b>	<b>Konkurrenz des DNA-Translokators und der T4P von <i>T. thermophilus</i> um Komponenten mit dualer Funktion.....</b>	<b>128</b>
4.5.1	Vergleich des DNA-Translokators mit dem T4P .....	129
4.5.2	Konkurrenz zwischen T4P und DNA-Translokator.....	132
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>134</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>136</b>

---

<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>152</b>
<b>7.1</b>	<b>Plasmidkarten .....</b>	<b>152</b>
<b>7.2</b>	<b>Elutionsprofile von Gelfiltrationen .....</b>	<b>156</b>
	<b>DANKSAGUNG.....FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>	
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>159</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonyl Fluorid
ÄM	äußere Membran
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ASCE	„additional strand, conserved E“
ATP	Adenosintri-phosphat
BFP	„bundle forming pilus“
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
c-di-GMP	3',5'-cyclisches Diguanylat
CL	Cardiolipin
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide
DDM	Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EM	elektronenmikroskopisch
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	„electrophoretic mobility shift assay“
EPEC	enteropathogener <i>E. coli</i>
ETEC	enterotoxischer <i>E. coli</i>
GF	Gelfiltration
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IM	innere Membran
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ITC	isotherme Titrationskalometrie
MWCO	Molekulargewichtgrenzwert („molecular weight cut off“)
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
P <sub>i</sub>	Orthophosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA

T2SS	Typ-II-Sekretionssystem
T4P	Typ-IV-Pili
T4SS	Typ-IV-Sekretionssystem
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
w/v	Gewicht pro Volumen
v/v	Volumen pro Volumen

# 1 Einleitung

## 1.1 Horizontaler Gentransfer

### Horizontaler Gentransfer trägt zur Evolution bei

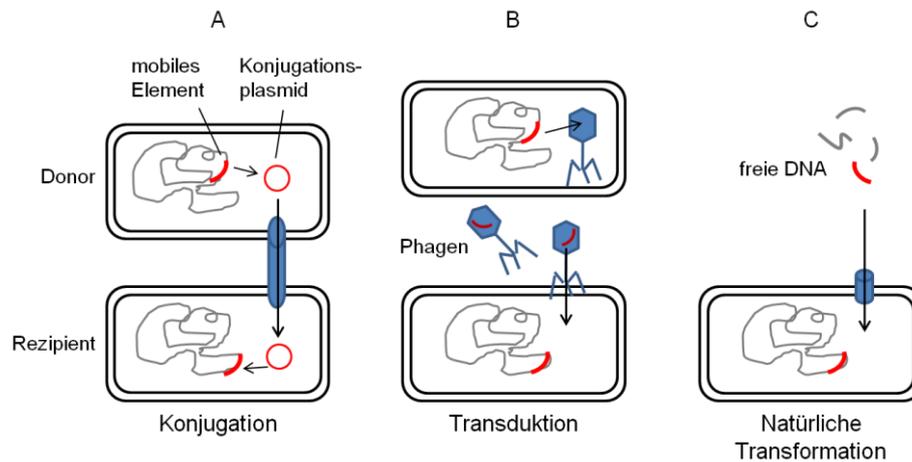
Im Jahr 1928 veröffentlichte Griffith den ersten experimentellen Beweis dafür, dass Bakterien in der Lage sind, genetische Informationen untereinander auszutauschen. Er zeigte, dass ein *Streptococcus pneumoniae*-Stamm, der keine Schleimkapsel bildete, in der Lage war, die Information für die Schleimkapselbildung aus einem abgetöteten *S. pneumoniae*-Stamm zu übernehmen. Dadurch wurde der zunächst nicht pathogene Stamm zu einem pathogenen Schleimkapselbildner. Somit war bewiesen, dass eine Transformation von vererbaren Informationen stattgefunden hatte. Erst viel später entwickelte sich der Begriff horizontaler Gentransfer (HGT) für die Übertragung von DNA zwischen Organismen, die nicht direkt voneinander abstammen.

HGT kann zwischen Organismen der gleichen Spezies, unterschiedlicher Arten oder sogar zwischen Organismen verschiedener Domänen stattfinden (Brown 2003; Doolittle 1999; Koonin *et al.* 2001; Jain *et al.* 2002). Auf diese Weise trägt HGT zur Evolution bei, da er eine schnelle Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen erlaubt. Dies spielt insbesondere bei Prokaryoten eine Rolle, da sie sich nicht sexuell fortpflanzen, also nicht in jeder Generation genetisches Material rekombinieren. Die HGT-vermittelte Evolution von Mikroorganismen kann zu Problemen für den Menschen führen, da sich so auch Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzen schneller ausbreiten (Rasko *et al.* 2011; Davison 1999; Ochman *et al.* 2000).

Interessanterweise scheint HGT zwischen verschiedenen Domänen insbesondere bei thermophilen Prokaryoten eine große Rolle zu spielen. So wurde z. B. für die hyperthermophilen Bakterien *Thermotoga maritima* und *Aquifex aeolicus* beschrieben, dass 24 % bzw. 16 % der Proteincodierenden Gene archaeellen Ursprungs sind, was deutlich über dem Durchschnitt (~ 3 %) mesophiler Bakterien liegt (Aravind *et al.* 1998; Nelson *et al.* 1999; Ochman *et al.* 2000; Koonin 1997). *Thermus thermophilus* HB27 ist ein thermophiles Modellbakterium für die Analyse der Aufnahme freier DNA (natürliche Transformation), dessen DNA-Translokator im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurde. *T. thermophilus* ist ebenfalls in der Lage, DNA von Organismen anderer Spezies und Domänen effektiv aufzunehmen (Schwarzenlander und Averhoff 2006). Genomanalysen haben gezeigt, dass auch *T. thermophilus* HB27 viele Gene thermophiler Bakterien und Archaeen durch HGT erlangt hat, wobei dies vermutlich maßgebend zur Anpassung an extreme Umweltbedingungen beigetragen hat (Omelchenko *et al.* 2005).

## 1.2 Mechanismen des DNA-Transfers

Klassisch wird bei Bakterien zwischen drei Arten der DNA-Übertragung unterschieden (Abb. 1.1):



**Abb. 1.1. Drei Mechanismen des DNA-Transfers.** Bei der Konjugation überträgt die Donor-Zelle DNA (rot) durch einen Konjugationsapparat/T4SS (blau) in die Rezipienten-Zelle (A). Bei der DNA kann es sich um ein extrachromosomales Konjugationsplasmid handeln oder um ein in das Chromosom integriertes, mobiles genetisches Element, das zunächst mobilisiert wird. Bei der Transduktion gelangt DNA einer mit Phagen infizierten Zelle während des lytischen Zyklus in neu entstehende Phagen (blau) (B). Bei der Infektion einer weiteren (Rezipienten-)Zelle wird die DNA übertragen. Bei der natürlichen Transformation nimmt die Rezipienten-Zelle freie DNA durch einen DNA-Translokator (blau) auf (C). In allen drei Fällen kann die aufgenommene DNA (rot) unter bestimmten Voraussetzungen (z. B. homologe Sequenzen) in das Rezipienten-Genom integriert werden.

### I. Konjugation (Abb. 1.1 A)

Bei der Konjugation stehen die beiden Zellen, zwischen denen der DNA-Transfer stattfindet, im direkten Zell-Zell Kontakt. Dieser wird zunächst durch Konjugations-Pili aufgebaut (Bradley 1980). Die Donor-Zelle überträgt dann durch ein Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS) die DNA und oft auch Proteine in die Nachbarzelle (Suzuki und Griffiths 1976; Wallden *et al.* 2010). Bei der Konjugation wird häufig auch eine Relaxase benötigt, die einen Einzelstrangbruch in der zu übertragenden DNA einfügt (Llosa *et al.* 2002; Guglielmini *et al.* 2012). Oft liegt die DNA, die die genetische Information für das Konjugationssystem (T4SS, Relaxase usw.) trägt, in Form eines Plasmides vor, sie kann aber auch als mobiles Element im Chromosom integriert sein. In der Regel werden diese Konjugationsgene bei der Konjugation übertragen, daneben können auch weitere DNA-Bereiche der Donor-Zelle transferiert werden (Guglielmini *et al.* 2012; Frost *et al.* 2005).

## II. Transduktion (Abb. 1.1 B)

Bei der Transduktion sind Phagen an der Übertragung von DNA beteiligt. Während des lytischen Zyklus entstehen neue Phagen-Partikel, die in der Regel Phagen-DNA beinhalten. Allerdings kann es auch zum Einbau von Wirts-DNA kommen. Infiziert der Phage dann eine weitere Bakterienzelle, wird das DNA-Fragment des vorherigen Wirtes in den neuen Wirt übertragen (Zinder und Lederberg 1952).

## III. Transformation (Abb. 1.1 C)

Die Transformation beschreibt die Aufnahme von freier DNA aus der Umgebung. Bakterien, die natürlicherweise zur Transformation in der Lage sind, nennt man natürlich kompetent. Dabei kann die natürliche Kompetenz konstitutiv vorliegen, wie für *T. thermophilus* und *Helicobacter pylori* nachgewiesen (Hidaka *et al.* 1994; Israel *et al.* 2000), oder sie wird Wachstumsphasen-abhängig (Porstendörfer *et al.* 2000; Claverys und Håvarstein 2002; Hamoen *et al.* 2003) oder durch bestimmte Bedingungen induziert, wie z. B. Nährstoffmangel (Kahn und Smith 1984; Luke *et al.* 2004; Meibom *et al.* 2005), Antibiotikastress (Prudhomme *et al.* 2006; Charpentier *et al.* 2011) oder DNA-Schäden (Charpentier *et al.* 2011; Dorer *et al.* 2010). Natürlich kompetente Bakterien bilden einen Membran-durchspannenden DNA-Translokator aus, durch den die DNA in das Cytoplasma der Zelle gelangt.

Neben diesen Formen der DNA-Übertragung gibt es auch eine kürzlich für *T. thermophilus* beschriebene Mischform von Konjugation und Transformation, Transjugation genannt. Bei der Transjugation schleust die Donor-Zelle aktiv DNA aus und steht im direkten Zell-Zell-Kontakt mit der Rezipienten-Zelle (Blesa *et al.* 2015; Blesa *et al.* 2018). Letztere nimmt die DNA durch den DNA-Translokator auf, muss also natürlich kompetent sein. Im Gegensatz dazu benötigt die Donor-Zelle keinen DNA-Translokator, sondern eine TdtA ATPase zum Ausschleusen der DNA (Blesa *et al.* 2017). Alle Bereiche der chromosomalen und plasmidalen DNA von *T. thermophilus* können bei der Transjugation übertragen werden.

### Die Phasen der natürlichen Transformation

Die natürliche Transformation kompetenter Bakterien lässt sich in drei Phasen einteilen: DNA-Bindung, DNA-Prozessierung und -Aufnahme und Integration der aufgenommenen DNA in das Genom (Lorenz und Wackernagel 1994; Averhoff 2004; Dubnau 1999).

Zunächst bindet freie DNA an bestimmte Stellen der kompetenten Zelle, wobei die Zahl der Bindestellen variieren kann (Singh 1972; Deich und Smith 1980). Diese DNA kann daraufhin nicht mehr abgewaschen werden, ist aber weiterhin DNase-sensitiv (Schwarzenlander *et al.* 2009; Smith *et al.* 1981). Für einige Bakterien, wie *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter baylii* und *Haemophilus influenzae*, wurde beschrieben, dass sie sowohl doppelsträngige (ds) als auch ein-

zelsträngige (ss) DNA aufnehmen (Smith *et al.* 1985; Palmen *et al.* 1993; Postel und Goodgal 1966).

Der DNA-Transport in das Zellinnere und die Prozessierung der DNA sind eng verknüpft und finden z. T. zeitgleich statt. Wurde dsDNA gebunden, so wird ein Strang der DNA durch eine Nuklease, die sich auf der Zelloberfläche befindet, geschnitten (Chen und Dubnau 2004; Averhoff 2009). Bei dem in dieser Arbeit genutztem Modellorganismus *T. thermophilus* ist diese kompetenz-spezifische Nuklease bisher nicht bekannt.

Bei Gram-negativen Bakterien, wie *T. thermophilus*, gelangt die DNA durch einen Sekretinkomplex durch die äußere Membran in das Periplasma. Dieser Sekretinkomplex ist ein Kanal, der aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ist (Chen und Dubnau 2004). In Gram-negativen, wie auch Gram-positiven Bakterien bindet die DNA an den DNA-Rezeptor ComEA, welcher ein C-terminales Helix-Turn-Helix-Motiv zur DNA-Bindung aufweist. Gut untersuchte ComEA-Orthologe aus *B. subtilis* und *S. pneumoniae* sind membrangebunden (Provvedi und Dubnau 1999; Pestova und Morrison 1998). Im Gegensatz dazu sind die ComEA-Orthologe aus Gram-negativen Bakterien wie *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Campylobacter jejuni* periplasmatisch (Seitz *et al.* 2014; Chen und Gotschlich 2001; Jeon und Zhang 2007). Schließlich gelangt die DNA durch das polytopische Membranprotein ComEC in das Cytoplasma, wobei vermutet wird, dass ComEC einen Kanal bildet (Dubnau 1999). Neben diesen Komponenten sind noch weitere Proteine an der DNA-Aufnahme beteiligt und werden in Kapitel 1.3 anhand des DNA-Translokators aus *T. thermophilus* genauer beschrieben.

Aufgenommene Plasmide können schließlich rekonstituiert werden (Chen und Dubnau 2004). Zudem kann aufgenommene ssDNA durch homologe Rekombination in das Bakteriengenom integriert werden. Allerdings müssen dafür homologe Sequenzen im Genom und der aufgenommenen DNA vorhanden sein. Das ssDNA bindende Protein DprA bzw. Smf ist an der Weiterleitung der DNA zu der Rekombinase RecA beteiligt (Friedrich *et al.* 2002; Mortier-Barrière *et al.* 2007). Wenn die freie DNA schließlich stabil in das Genom der kompetenten Zelle integriert wurde, ist die Transformation abgeschlossen.

### 1.3 Der DNA-Translokator von *T. thermophilus*

#### ***T. thermophilus* als Modellorganismus für die Analyse natürlicher Transformationssysteme**

*T. thermophilus* HB27 wurde erstmals 1971 aus heißen Quellen auf der japanischen Halbinsel Izu isoliert (Oshima und Imahori 1974). Es handelt sich um ein thermophiles, Gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium, dessen optimale Wachstumstemperatur bei 65 - 72 °C liegt. Phylogenetisch ist *T. thermophilus* im Phylum *Deinococcus-Thermus* einzuordnen, das thermophile und strahlungsresistente Bakterien beinhaltet. *T. thermophilus* bildet keine Flagellen, kann sich aber auf feuchten Oberflächen kriechend fortbewegen. Diese als „twitching motility“ bezeichnete Fortbewegung wird durch Assemblierung, Anhaftung und Deassemblierung von T4P erzeugt. Eine *T. thermophilus* HB27-Zelle weist typischerweise ca. sechs Pili an einem der Zellpole auf (Friedrich *et al.* 2002; Salzer *et al.* 2015) und hat ein außergewöhnlich großes Periplasma (~ 70 nm), das eine dünne Peptidoglyanschicht beinhaltet (Gold *et al.* 2015; Quintela *et al.* 1995). Die Zelle wird von einer gleichmäßigen, kristallinen Schicht umgeben, die aus S-layer-Proteinen aufgebaut ist. Die S-layer-Proteine sind in der Peptidoglyanschicht verankert (Caston *et al.* 1988; Caston *et al.* 1993; Castan *et al.* 2002; Quintela *et al.* 1995).

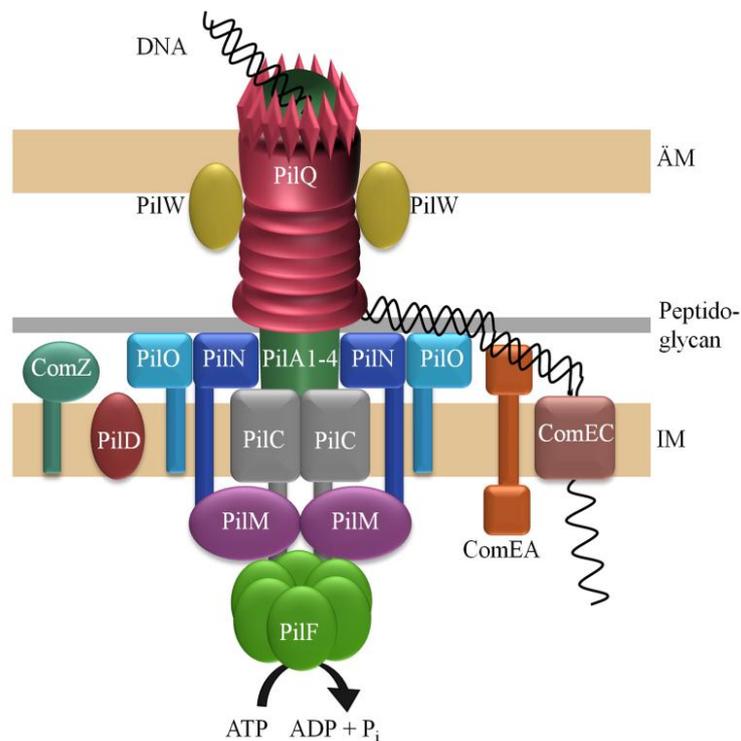
*T. thermophilus* zeichnet sich durch eine hohe natürliche Transformationsfrequenz aus. So wurden für den Stamm *T. thermophilus* HB27 die höchsten bekannten Transformationsraten von bis zu  $10^{-1}$  bis  $10^{-2}$  Transformanden/Lebendzellzahl beschrieben (Koyama *et al.* 1986). Dabei wird DNA aus anderen Spezies und anderen Domänen mit etwa der gleichen Effizienz aufgenommen wie DNA aus *T. thermophilus* (Schwarzenlander und Averhoff 2006). Diese hohe Transformierbarkeit, sowie die Thermostabilität seiner Proteinkomplexe machen *T. thermophilus* zu einem guten Modellorganismus für die Analyse der Struktur und Funktion des Transformationssystems (Averhoff und Friedrich 2003; Averhoff 2004, 2009; Cava *et al.* 2009).

#### **Das Modell des DNA-Translokators**

Mutantenstudien sowie Untersuchungen isolierter Kompetenzproteine des natürlichen Transformationssystems führten zu dem in Abbildung 1.2 dargestellten Modell des DNA-Translokators von *T. thermophilus* HB27: Während der natürlichen Transformation bindet DNA an den Sekretinkomplex, wobei das Sekretin PilQ einen Kanal durch die äußere Membran (ÄM) bildet (Burkhardt *et al.* 2011; Gold *et al.* 2015). Die Lokalisation von PilQ in der ÄM ist abhängig vom Kompetenzprotein PilW. Die Präpilinpeptidase PilD prozessiert Präpiline zu reifen Pilinen, so auch das Hauptpilin PilA4 und die Nebepiline PilA1 - 3. Diese Piline assemblieren zu einem Pseudopilus, der an der DNA-Aufnahme beteiligt ist (Friedrich *et al.* 2003). Das Membranprotein ComEA bindet die DNA im Periplasma und leitet sie weiter zu ComEC, welches den DNA-Transport durch die innere Membran (IM) vermittelt (Friedrich *et al.* 2001; Schwarzenlander *et al.* 2009; Salzer *et al.* 2016b). Die Energie für den DNA-Translokator wird durch die cytoplasmatische Assemblierungs-ATPase PilF bereitgestellt (Rose *et al.* 2011; Salzer *et al.* 2014b). Die IM-Proteine PilC, ComZ, PilN und PilO, sowie das IM-assoziierte Protein

PilM, sind ebenfalls essentiell für die Assemblierung bzw. die Funktion des DNA-Translokators (Friedrich *et al.* 2002).

Viele dieser Proteine spielen auch eine Rolle bei der Bildung von T4P (Friedrich *et al.* 2002; Friedrich *et al.* 2003; Salzer *et al.* 2014b; Averhoff und Friedrich 2003). Es gibt Hinweise darauf, dass T4P selbst an der DNA-Aufnahme in *V. cholerae* und *N. gonorrhoeae* beteiligt sind (Seitz *et al.* 2014; Lang *et al.* 2009). Im Gegensatz dazu deuten Untersuchungen unpilierter *T. thermophilus*-Mutanten darauf hin, dass in diesem Bakterium keine Oberflächen-exponierten T4P für die DNA-Aufnahme benötigt werden (Salzer *et al.* 2014a; Kruse *et al.* 2018). Neben Übereinstimmungen der Komponenten mit denen der T4P weist der DNA-Translokator auch Ähnlichkeiten zu Typ-II-Sekretionssystemen (T2SS) auf, die ebenfalls einen Pseudopilus nutzen um Makromoleküle durch die äußere Zellmembran zu transportieren (Peabody *et al.* 2003; Hobbs und Mattick 1993).



**Abb. 1.2. Modell des DNA-Translokators aus *T. thermophilus* HB27.** Der DNA-Translokator durchspannt die innere Membran (IM), die periplasmatische Peptidoglycanschicht und die äußere Membran (ÄM). Bekannte Komponenten dieses Proteinkomplexes sind die hexamere ATPase PilF, das cytoplasmatische Protein PilM, die IM Proteine PilN, PilO, PilC, ComEA und ComEC, die Präpilinpeptidase PilD, das Membranprotein PilW und der Sekretinkomplex PilQ. An letzteren bindet ein noch unbekanntes Protein, das eine „Krone“-Struktur ausbildet (Rauten). Außerdem an der DNA-Aufnahme beteiligt sind die Piline PilA1-4, die vermutlich einen Pseudopilus bilden (dunkelgrün) und das weitestgehend unerforschte Protein ComZ.

## Der Sekretinkomplex PilQ

Sekretine bilden multimere Komplexe in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien. Sie ermöglichen dadurch den Transport von Makromolekülen durch T2SS, Typ-III-Sekretionssysteme (T3SS) und DNA-Translokatoren, sowie die Extrusion von T4P (Costa *et al.* 2015; Korotkov *et al.* 2011a; Chen und Dubnau 2004; Wall *et al.* 1999; Bitter 2003). PilQ aus *T. thermophilus* HB27 assembliert zu einem tridecameren Komplex, der einen Kanal durch die äußere Membran und durch Teile des Periplasmas bildet (Burkhardt *et al.* 2011; D'Imprima *et al.* 2017; Gold *et al.* 2015). Mit einer Länge von 34 nm ist PilQ aus *T. thermophilus* ungewöhnlich lang im Vergleich zu anderen Sekretinkomplexen, wie z. B. PilQ aus *Pseudomonas aeruginosa*, InvG aus *Salmonella typhimurium* oder GspD aus *V. cholerae* (Koo *et al.* 2016; Hu *et al.* 2018; Yan *et al.* 2017). Elektronenmikroskopische (EM) Untersuchungen des gereinigten PilQ-Komplexes aus *T. thermophilus* HB27 haben gezeigt, dass sich unterhalb der konservierten Sekretindomäne sechs Ringstrukturen (N0-N5) befinden, wobei die N1-Ringdomäne und die Sekretindomäne jeweils ein Tor beinhalten, das den PilQ-Kanal verschließen kann (Burkhardt *et al.* 2011; Burkhardt *et al.* 2012; Salzer *et al.* 2016a). Diese Struktur von PilQ aus *T. thermophilus* unterscheidet sich stark von der aller anderen bekannten Sekretinkomplexe, die nur 2 – 4 Ringdomänen und ein Tor aufweisen (Korotkov *et al.* 2011a; Worrall *et al.* 2016; Koo *et al.* 2016).

EM-Analysen haben außerdem eine weitere Struktur offenbart, die eine Art „Krone“ auf der Sekretindomäne von PilQ bildet (D'Imprima *et al.* 2017). Diese „Krone“ (Rauten in Abb. 1.2) besteht aus 13 Zacken, die nicht durch Aminosäuren von PilQ selbst gebildet werden. Es handelt sich also um ein bisher unbekanntes Protein. EMSA-Interaktionsstudien haben gezeigt, dass der PilQ-Komplex (inklusive Krone) DNA bindet (Burkhardt *et al.* 2011). Punktmutationen in PilQ, die zu einer instabilen „Krone“ führten, hoben zudem die natürliche Transformierbarkeit auf, was darauf hindeutet, dass die „Kronen“-Struktur eine wichtige Rolle bei der DNA-Aufnahme spielt (D'Imprima *et al.* 2017).

Für die Assemblierung und die Lokalisation des PilQ-Komplexes in der äußeren Membran ist das Membranprotein PilW notwendig. PilW, welches sowohl in der äußeren als auch in der inneren Membran nachgewiesen werden konnte, hat keine Homologe in Organismen außerhalb des *Deinococcus-Thermus*-Phylums (Rumszauer *et al.* 2006). PilW, ebenso wie PilQ sind sowohl für die natürliche Transformation, als auch für die Assemblierung von T4P essentiell (Friedrich *et al.* 2002; Rumszauer *et al.* 2006).

## Piline

Bei der natürlichen Transformation bindet die externe DNA zunächst an den PilQ-Komplex, dessen „Kronen“-Struktur aus der äußeren Membran herausragt (Gold *et al.* 2015; D'Imprima *et al.* 2017). Anschließend kann die DNA durch den PilQ-Kanal in das Periplasma gelangen, wo sie vor externen DNasen geschützt ist. An diesem Transport sind auch Piline beteiligt, die in Kapitel 1.6 genauer beschrieben werden. Dabei wird sowohl das Hauptpilin PilA4 benötigt, das auch der Hauptbestandteil der T4P ist, als auch die Kompetenz-spezifischen Nebenspiline PilA1, PilA2 und PilA3 (Friedrich *et al.* 2003). Vermutlich bilden diese Untereinheiten einen Pseudo-

pilus, der die Tore im PilQ-Komplex öffnet und/oder die DNA bindet und in das Periplasma leitet. Piline werden zunächst als Präpiline gebildet. Diese werden durch die membrangebundene Präpilinpeptidase PilD prozessiert, bevor sie zu einem Pilus oder Pseudopilus assembliert werden. PilD und PilA4 spielen duale Rollen bei der natürlichen Transformation und der T4P-Biogenese. Im Gegensatz dazu sind PilA1, 2 und 3 nur für die Transformation essentiell, spielen aber keine Rolle bei der T4P-Assemblierung (Friedrich *et al.* 2002; Friedrich *et al.* 2003).

Neben den Genen des Hauptpilins PilA4 und der kompetenzspezifischen Nebempiline PilA1, 2 und 3, liegen im Genom von *T. thermophilus* HB27 acht weitere Gene vor, die für potentielle Präpiline codieren (Friedrich *et al.* 2003). Die Funktion dieser potentiellen Piline bei der Transformation, der T4P-Assemblierung und der T4P-vermittelten Funktionen ist nicht vollständig geklärt und war Gegenstand dieser Arbeit.

### **Der Assemblierungskomplex an der inneren Membran**

Weitere Proteine, die sowohl für die Assemblierung von T4P, als auch für die Assemblierung und/oder Funktion des DNA-Translokators essentiell sind, sind die inneren Membranproteine PilC, PilN, PilO und das cytoplasmatische, aber membranassoziierte Protein PilM (Friedrich *et al.* 2002; Rumszauer *et al.* 2006). Das membranintegrale PilC bildet Tetramere, wobei die N-Termini (Aminosäuren 1 - 168) im Cytoplasma lokalisiert sind (Karuppiah *et al.* 2010). Cryo-EM-Tomographien der T4P aus *Myxococcus xanthus* deuten darauf hin, dass der PilC-Komplex an der Basis des (Pseudo-)pilus lokalisiert ist (Chang *et al.* 2016).

PilM ist ein ATP bindendes, cytoplasmatisches Protein, das durch Interaktion mit dem Membranprotein PilN an der inneren Membran lokalisiert ist (Karuppiah und Derrick 2011; Karuppiah *et al.* 2013; Rumszauer *et al.* 2006). Die N-terminalen acht Aminosäuren von PilN sind stark konserviert in allen PilN-Homologen und binden in einer Vertiefung in PilM. PilN und PilO weisen strukturelle Ähnlichkeiten zueinander auf. Sie bestehen aus einem kurzen, cytoplasmatischen N-Terminus, gefolgt von einer Transmembrandomäne, einer „coiled-coil“-Domäne und einer Ferredoxin-ähnlichen, C-terminalen Kern-Domäne im Periplasma (Sampaleanu *et al.* 2009; Karuppiah *et al.* 2013). PilN und PilO binden aneinander, wobei sowohl die Kern-Domäne, als auch die "coiled-coil" und die Transmembrandomäne an dieser Interaktion beteiligt sind (Sampaleanu *et al.* 2009; Leighton *et al.* 2016; Leighton *et al.* 2015). EM-Analysen von co-isoliertem PilM, PilN und PilO aus *T. thermophilus* haben gezeigt, dass diese drei Proteine Komplexe mit einer 2:2:2 Stöchiometrie bilden und dass diese Komplexe mit dem Hauptpilin PilA4 interagieren (Karuppiah *et al.* 2013).

Die Proteine PilM, PilN, PilO, PilW und PilQ werden durch das *pilMNOWQ*-Operon codiert. In anderen Organismen, die DNA-Translokatoren bzw. T4P bilden, ist diese Genabfolge ebenfalls konserviert. Allerdings befindet sich dort *pilP*, welches für ein nicht in *T. thermophilus* vorhandenes Lipoprotein codiert, an der Position von *pilW*.

### **ComEA und ComEC**

ComEA von *T. thermophilus* bindet dsDNA im Periplasma und ist essentiell für die natürliche Transformation (Salzer *et al.* 2016b; Friedrich *et al.* 2001). DNA-Binde- und Aufnahmestudien an *T. thermophilus*-Zellen indizieren, dass ComEA am Transport der DNA durch die äußere Membran beteiligt ist, da eine *comEA*-Mutante signifikant erhöhte Mengen an DNase-sensitiver DNA gebunden hatte (Schwarzenlander *et al.* 2009). Im Gegensatz zu ComEA-Orthologen aus anderen Gram-negativen Bakterien beinhaltet ComEA aus *T. thermophilus* eine Transmembrandomäne und eine 196 Aminosäuren lange cytoplasmatische Domäne, deren Funktion noch nicht geklärt ist (Salzer *et al.* 2016b). Die Gesamtlänge von 298 Aminosäuren und die Membranverankerung gleichen eher ComEA-Proteinen aus Gram-positiven Bakterien (Inamine und Dubnau 1995). ComEC ist in *T. thermophilus* im gleichen Operon codiert wie ComEA und spielt eine Rolle beim Transport der DNA durch die IM (Salzer *et al.* 2016b; Schwarzenlander *et al.* 2009). ComEC gilt als Schlüsselprotein der natürlichen Kompetenz, wird aber, wie auch ComEA, nicht für die T4P-Biogenese benötigt (Johnston *et al.* 2014; Salzer *et al.* 2016b).

### **Das ungewöhnliche Protein ComZ**

Das Kompetenzgen *comZ* befindet sich im gleichen Lokus wie die Präpilogene *pilA1*, *pilA2*, *pilA3* und *pilA4*. Über ComZ ist nur wenig bekannt, da außerhalb des *Deinococcus-Thermus*-Phylums keine Homologe bekannt sind. Die Mutation von *comZ* in *T. thermophilus* führte zum Wegfall der natürlichen Transformierbarkeit, hatte aber keinen Einfluss auf die Pilierung (Friedrich *et al.* 2003). Im Rahmen dieser Arbeit sollte das ComZ-Protein gereinigt und seine potentielle Assemblierung zu homopolymeren Komplexen, sowie die subzelluläre Lokalisation von ComZ in *T. thermophilus* analysiert werden.

### **Die ATPase PilF**

Die DNA-Aufnahme ist ein Energie-abhängiger Prozess, ebenso wie die Assemblierung von T4P. Die Motor-ATPase PilF stellt die Energie für diese Prozesse bereit und spielt somit eine duale Rolle bei der natürlichen Transformation und T4P-Biogenese (Rose *et al.* 2011; Salzer *et al.* 2014b). PilF bildet einen löslichen, hexameren Komplex, der Zinkionen bindet (Salzer *et al.* 2013; Salzer *et al.* 2014a; Rose *et al.* 2011). Die Funktionen einzelner PilF-Domänen und die Interaktionen von PilF mit anderen Komponenten des DNA-Translokators standen im Fokus dieser Dissertation.

## 1.4 Motor-ATPasen: Antriebsmotoren von Transportprozessen

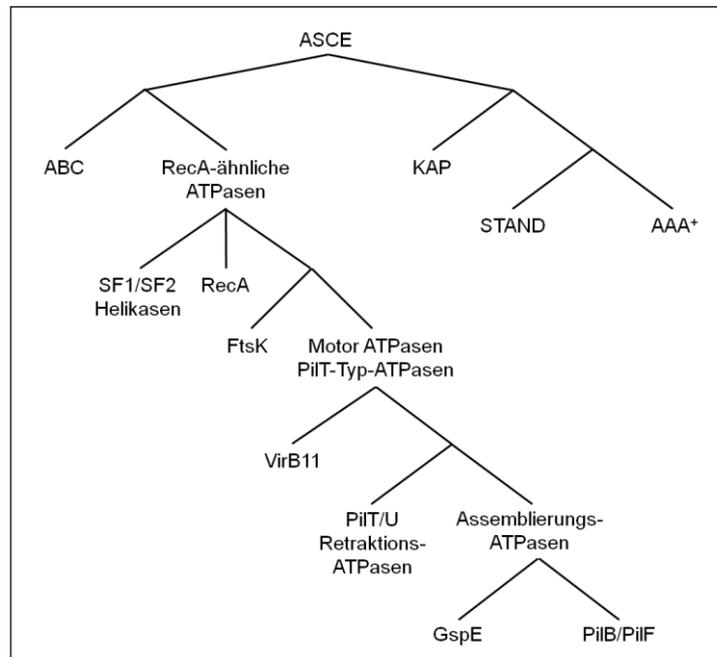
### 1.4.1 Phylogenie der Motor-ATPasen

PilF aus *T. thermophilus* ist eine Motor-ATPase. Motor-ATPasen treiben verschiedene Transport- und Bewegungsprozesse an, wie z. B. die Sekretion von Proteinen durch T2SS und T4SS, die Bewegung archaeeller Flagellen oder die Assemblierung und Retraktion von T4P. Phylogenetisch sind die Motor-ATPasen in die Familie der ASCE-ATPasen einzuordnen (Erzberger und Berger 2006) (Abb. 1.3).

ASCE-ATPasen tragen die von Walker und Kollegen beschriebenen konservierten Motive zur NTP-Bindung (Walker A-Motiv) und -Hydrolyse (Walker B-Motiv) (Walker *et al.* 1982) und gehören zur phylogenetisch sehr alten Gruppe der P-loop ATPasen (Leipe *et al.* 2003). Das Walker A-Motiv weist die Konsensussequenz GxxxxGK[S/T] (x steht für eine beliebige Aminosäure) auf und das Walker B-Motiv die Konsensussequenz hhhhD (h steht für eine beliebige hydrophobe Aminosäure).

Die ASCE-ATPasen zeichnen sich durch ein konserviertes Glutamat aus, das auf das Aspartat des Walker B-Motivs folgt. Zudem beinhalten diese ATPasen einen zusätzlichen  $\beta$ -Strang zwischen dem Walker A- und Walker B-Motiv. Deshalb erhielt diese ATPase-Familie den Namen ASCE für „additional strand, conserved E“ (Leipe *et al.* 2003). Die ASCE-Familie enthält zum einen STAND- („signal transduction ATPase with numerous domains“) und AAA<sup>+</sup>- („ATPasen associated with diverse cellular activities“) ATPasen, zum anderen ABC-ATPasen („ATP-binding cassette“) und RecA-ähnliche ATPasen (Abb. 1.3) (Iyer *et al.* 2004; Erzberger und Berger 2006). Zu Letzteren zählen neben den RecA-ATPasen auch SF1/SF2-Helikasen, die DNA- oder RNA-Stränge entwinden, FtsK-ATPasen, die bei der Chromosomen-Segregation während der Zellteilung eine Rolle spielen und Motor-ATPasen, die am Transport von Makromolekülen durch Membranen beteiligt sind.

Zu den Motor-ATPasen (PilT-Typ-ATPasen) gehören VirB11-Typ-, Retraktions- und Assemblierungs-ATPasen (Abb. 1.3). VirB11-ATPasen sind Teil von T4SS. Retraktions-ATPasen der PilT/PilU-Familie werden für die Retraktion von T4P benötigt. Die Assemblierungs-ATPasen unterscheiden sich von den Retraktions-ATPasen dadurch, dass sie ein Zinkionen bindendes Tetracystein-Motiv beinhalten und eine etwa 160 - 175 Aminosäuren lange N-terminale Region, die nicht in PilT/PilU-ATPasen vorhanden ist (Jakovljevic *et al.* 2008).



**Abb. 1.3. Einordnung der PilB/PilF Motor-ATPasen in die Familie der ASCE-ATPasen.** Das Diagramm beruht auf der Einteilung der ASCE-ATPasen nach (Erzberger und Berger 2006) und der Motor-ATPasen nach (Peabody *et al.* 2003).

Bei den Assemblierungs-ATPasen lassen sich die GspE- und die PilB/PilF-Assemblierungs-ATPasen unterscheiden. GspE-ATPasen stellen die Energie für T2SS bereit, PilB/PilF-ATPasen, zu denen auch PilF aus *T. thermophilus* gehört, treiben die Assemblierung von T4P an. Chen *et al.* (2005) unterscheiden bei den Assemblierungs-ATPasen weiterhin zwischen einer XspE- und einer EpsE-Subklasse. Die XspE-ATPasen, zu denen u. A. die T2SS-ATPase XspE aus *Xanthomonas campestris* und PilB/PilF-T4P-Assemblierungs-ATPasen gehören, weisen eine  $\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$  Faltung in der N-terminalen Domäne auf. Im Gegensatz dazu haben EpsE-ATPasen, zu denen u. A. die T2SS-ATPase EpsE aus *V. cholerae* zählt, einen kürzeren N-Terminus mit einer alpha-Helix weniger ( $\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$ ) (Chen *et al.* 2005; Abendroth *et al.* 2005). Des Weiteren gehören zur Familie der Motor-ATPasen auch archaelle ATPasen, die zur Fortbewegung mittels des archaellen Flagellums benötigt werden, welches ähnlich aufgebaut ist wie bakterielle T4P (Jarrell und Albers 2012; Pohlschroder *et al.* 2011).

Durch Mutantenstudien konnte gezeigt werden, dass *T. thermophilus* HB27 zwei Retraktions-ATPasen bildet, PilT1 und PilT2, die beide für die Retraktion der T4P benötigt werden, aber nicht für die natürliche Transformation (Salzer *et al.* 2014b). Desweiteren wurde PilF als Assemblierungs-ATPase des PilB/PilF-Typs identifiziert. PilF ist sowohl essentiell für die natürliche Transformation als auch für die T4P-Assemblierung (Friedrich *et al.* 2002; Salzer *et al.* 2014b) und wird im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

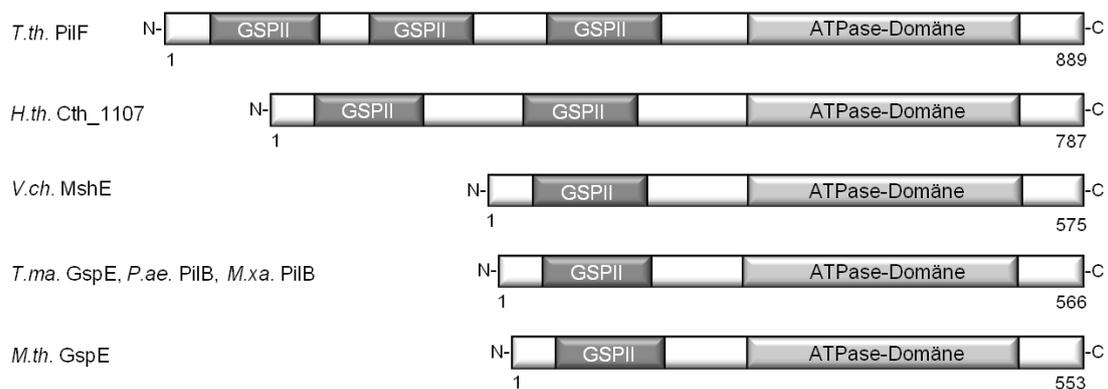
### 1.4.2 Funktion und Struktur der Motor-ATPase PilF aus *T. thermophilus*

#### PilF ist essentiell für die natürliche Transformation und T4P-Assemblierung

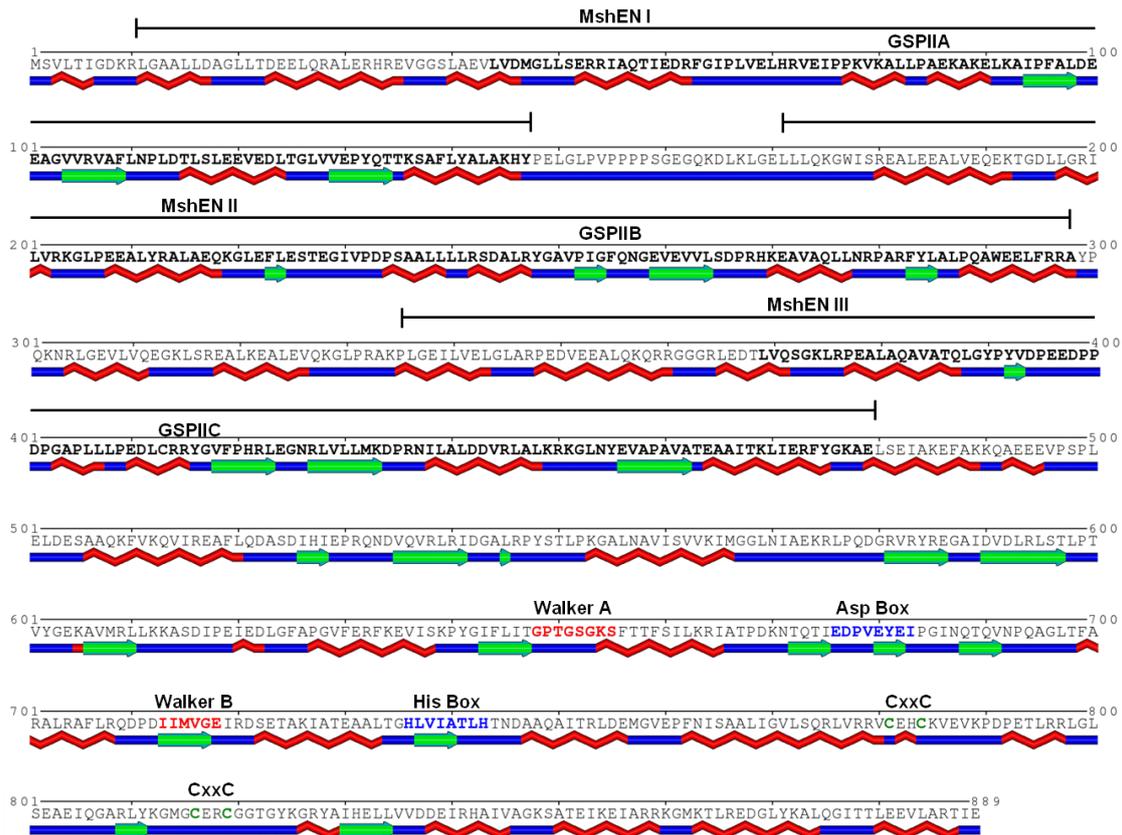
Durch Mutantenstudien konnte gezeigt werden, dass in *T. thermophilus* die Assemblierungs-ATPase PilF bei der natürlichen Transformation eine Rolle spielt und für diese essentiell ist (Friedrich *et al.* 2002). Weitere Analysen der *pilF:km*-Mutante zeigten, dass PilF am Transport der externen DNA durch die äußere Membran beteiligt ist (Schwarzenlander *et al.* 2009). Durch Deletion von *pilF* konnte zudem gezeigt werden, dass PilF auch für die Assemblierung von T4P notwendig ist und dass die  $\Delta pilF::bleo$ -Deletionsmutante weder zur Adhäsion an Plastikoberflächen, noch zur „twitching motility“ in der Lage ist (Salzer *et al.* 2014b; Salzer *et al.* 2014a).

#### Der N-Terminus von PilF enthält drei GSPII- und MshEN-Domänen

Mit einer Länge von 889 Aminosäuren ist PilF aus *T. thermophilus* ungewöhnlich groß im Vergleich zu anderen Motor-ATPasen (Abb. 1.4). Sequenzabgleiche haben gezeigt, dass diese Länge durch eine Verdreifachung der sogenannten GSPII-Domäne (steht für „general secretory pathway II“, Protein E, N-terminale Domäne) zustande kommt (Rose *et al.* 2011). Diese GSPII-Domäne ist die bereits erwähnte Faltung  $\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$  in PilB/PilF- und XpsE-ATPasen (Chen *et al.* 2005; Abendroth *et al.* 2005). Im N-Terminus von *T. thermophilus*-PilF taucht diese Faltung dreimal auf (Abb. 1.4, Abb. 1.5, Aminosäuren 44 - 147, 201 - 298 und 369 - 479) (Rose *et al.* 2011), wohingegen andere Assemblierungs-ATPasen nur eine oder zwei GSPII-Domänen aufweisen (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4. Vergleich der Domänenabfolge ausgewählter Assemblierungs-ATPasen.** PilF aus *T. thermophilus* (*T.th.*) enthält drei N-terminale GSPII-Domänen und die C-terminale, katalytische ATPase-Domäne. Die Assemblierungs-ATPase Cth\_1107 aus *Hungateiclostridium thermocellum* ATCC27405 (*H.th.*) weist zwei GSPII-Domänen auf. Die meisten Assemblierungs-ATPase enthalten jedoch nur eine N-terminale GSPII-Domäne, wie MshE aus *V. cholerae* (*V.ch.*), GspE aus *T. maritima* (*T.ma.*), PilB aus *P. aeruginosa* (*P.ae.*) und *M. xanthus* (*M.xa.*) oder GspE aus *Moorella thermoacetica* (*M.th.*). Die Länge der jeweiligen Proteine in Aminosäuren ist angegeben.



**Abb. 1.5. Primär- und Sekundärstruktur von PilF aus *T. thermophilus*.**  $\alpha$ -Helices sind rot dargestellt,  $\beta$ -Faltblätter grün. Die GSPII-Domänen sind fett hervorgehoben. Walker A- und Walker B-Motiv sind in roter Schrift, Asp- und His-Box in blau und die Cysteine des Tetracysteinmotivs sind in grüner Schrift dargestellt. Die Positionen der MshEN-Domänen sind durch Linien oberhalb der Sequenz dargestellt. Die Sekundärstrukturen wurden mit SABLE (sable.cchmc.org) vorhergesagt, die Abbildung wurde mit dem Programm POLYVIEW erstellt (Porollo et al. 2004).

Die Deletion der drei GSPII-Domänen von PilF aus *T. thermophilus* führte zu einer veränderten Komplex-Assemblierung und/oder -Stabilität. Die ATPase-Aktivität wurde jedoch nicht beeinflusst (Kruse et al. 2018). *In vivo* hatte die Deletion der ersten zwei GSPII-Domänen (GSPIIA und B) keinen Effekt auf die natürliche Transformation oder Pilus-Assemblierung von *T. thermophilus*. Erst die Deletion aller drei Domänen führte zum Verlust der T4P und natürlichen Transformierbarkeit. Interessanterweise hatte die Deletion der dritten GSPII-Domäne (GSPIIC) zur Folge, dass die Zellen kaum piliert waren, aber jede zweite Zelle natürlich transformierbar wurde. Das deutet darauf hin, dass T4P in *T. thermophilus* nicht direkt an der DNA-Aufnahme beteiligt sind.

Kürzlich wurde die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne der Assemblierungs-ATPase MshE aus *V. cholerae* aufgeklärt (Wang et al. 2016). MshE ist an der Assemblierung von Mannose-sensitiven Haemagglutinin-T4P und damit assoziierter Biofilmbildung beteiligt (Jones et al. 2015). Die N-terminale Domäne, MshEN, umfasst sowohl vier  $\alpha$ -Helices als auch die darauf folgende GSPII-Domäne der ATPase. Interessanterweise wird in der MshEN-Domäne der Sekundärbotenstoff c-di-GMP gebunden, der als Regulator von bakterieller Motilität, Viru-

lenz, Biofilmbildung und des Zell-Zyklus bekannt ist (Wang *et al.* 2016; Jenal *et al.* 2017; Hengge 2009).

Analysen an T2SS und T4P Assemblierungs-ATPasen weiterer Bakterien ergaben, dass die c-di-GMP bindende MshEN-Domäne weit verbreitet ist (Roelofs *et al.* 2015; Jones *et al.* 2015; Wang *et al.* 2016; Hendrick *et al.* 2017). Der Abgleich mit der Primär- und Sekundärstruktur von PilF aus *T. thermophilus* zeigt, dass die MshEN-Faltung ( $\alpha\alpha\alpha\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$ ) dreimal auftritt (Abb. 1.5)(Wang *et al.* 2016). Ob diese drei Domänen c-di-GMP binden, ist jedoch nicht bekannt, weshalb die c-di-GMP-Bindung an PilF in dieser Arbeit analysiert wurde.

### **Das Walker A- und Walker B-Motiv**

Der C-Terminus von PilF enthält das konservierte Walker A- (GxxxxGKS) und Walker B-Motiv (hhhhGE, wobei h für eine hydrophobe Aminosäure steht) (Abb. 1.5). Das Walker B-Motiv weicht vom klassischen hhhhD-Motiv (Walker *et al.* 1982) dadurch ab, dass das konservierte Aspartat durch ein Glycin ausgetauscht ist. Dieses Glycin ist jedoch in der Familie der Motor-ATPasen konserviert, ebenso wie das darauf folgende katalytische Glutamat in den ASCE-ATPasen konserviert ist (Jakovljevic *et al.* 2008; Seitz und Blokesch 2013; Leipe *et al.* 2003). Dieses Glutamat bildet mit einem Wassermolekül im aktiven Zentrum der ATPase eine Wasserstoffbrückenbindung aus. Das wiederum ermöglicht dem Wassermolekül eine nukleophile Attacke auf das  $\gamma$ -Phosphat des ATP, wodurch Orthophosphat und ADP entstehen. Das Glutamat ermöglicht also die ATP-Hydrolyse, was auch dadurch bestätigt wurde, dass die Mutation dieses katalytischen Glutamats bei zahlreichen ASCE-ATPasen zum Verlust der ATP-Hydrolyse führte (Wendler *et al.* 2012; Chiang *et al.* 2008; Jakovljevic *et al.* 2008).

Während das Walker B-Motiv also die Hydrolyse des ATP katalysiert, ist das Walker A-Motiv für die ATP-Bindung essentiell. Das konservierte Lysin des Walker A-Motivs geht dabei polare Interaktionen mit dem  $\gamma$ - und  $\beta$ -Phosphat des ATP ein, weshalb die Mutation dieses Lysins in der Regel zum Verlust der ATP-Bindung führt (Turner *et al.* 1993; Hanson und Whiteheart 2005). Zudem führt diese Mutation und der damit einhergehende Verlust der ATP-Bindung häufig zu einer Beeinträchtigung der Komplexbildung und/oder -stabilität der ATPasen (Wendler *et al.* 2012; Hanson und Whiteheart 2005).

Die Rolle der Walker-Motive in *T. thermophilus*-PilF wurde bisher noch nicht analysiert. Allerdings führte die Zugabe des ATP-Analogons AMP-PNP zum isolierten PilF-Wildtyp-Komplex zu einer erhöhten Thermostabilität. Dies weist darauf hin, dass ATP-Bindung und/oder -Hydrolyse die Komplexstabilität von PilF beeinflussen könnte.

### **Die Asp-Box, His-Box und des Tetracysteinmotivs**

Neben den Walker-Motiven enthält die C-terminale ATPase-Domäne von PilF auch eine Asp-Box und eine His-Box, die ebenfalls konserviert sind (Planet *et al.* 2001) (Abb. 1.5) Zur Rolle dieser Motive ist bisher nur wenig bekannt. Untersuchungen der T4P-ATPasen PilB, PilT und PilU aus *P. aeruginosa* deuten darauf hin, dass die sauren Aminosäuren der Asp-Box und die Histidine der His-Box die ATPase-Aktivität beeinflussen (Chiang *et al.* 2008). Mutationen

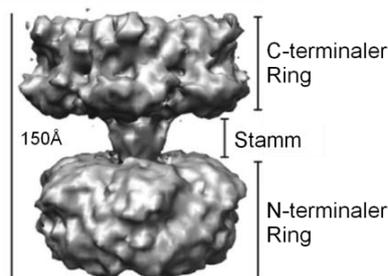
in den Motiven führten zu Einschränkungen der T4P-Funktionalität, wobei die Asp- und His-Box eine untergeordnete Rolle gegenüber den Walker-Motiven spielten.

Als Assemblierungs-ATPase enthält PilF aus *T. thermophilus* auch ein C-terminales Tetracysteinmotiv, wobei zwei CxxC-Motive durch 31 Aminosäuren voneinander getrennt sind (Abb. 1.5). Die vier Cysteine koordinieren zusammen ein Zinkion (Salzer *et al.* 2013; Salzer *et al.* 2014a). Durch Aminosäure-Austausche im Tetracysteinmotiv konnte gezeigt werden, dass Zinkionen-Bindung eine wichtige Rolle bei der Komplexstabilität von PilF spielt, aber die ATPase-Aktivität nicht beeinflusst (Salzer *et al.* 2014a). Des Weiteren ist Zinkionen-Bindung in PilF weder essentiell für die natürliche Transformation noch für die Pilus-Assemblierung. Allerdings führten die Mutationen zu Einschränkungen bei der „twitching motility“.

### Die Struktur des PilF-Komplexes

Viele Motor-ATPasen bilden hexamere Komplexe, wie z. B. GspE aus *Archaeoglobus fulgidis*, EpsE aus *V. cholerae*, PilT aus *P. aeruginosa* oder BfpD aus enteropathogenem *E. coli* (EPEC) (Yamagata und Tainer 2007; Lu *et al.* 2013; Misic *et al.* 2010; Crowther *et al.* 2005; Satyshur *et al.* 2007; Mancl *et al.* 2016). Auch PilF aus *T. thermophilus* bildet ein Hexamer, welches eine molekulare Masse von ca. 600 kDa aufweist (Rose *et al.* 2011; Collins *et al.* 2013). Einzelpartikel-EM-Analysen des heterolog produzierten Komplexes zeigten, dass er eine Hantel-artige Struktur bildet, bei der zwei Ringe durch einen dünnen Stamm verbunden sind (Abb. 1.6).

Einer der Ringe enthält die N-terminalen Domänen der PilF-Protomere, während der andere die C-terminalen ATPase-Domänen enthält. Der C-terminale Ring wurde auch durch Röntgenkristallographie untersucht, wobei ein elongierter Ring mit einer Symmetrieachse deutlich wurde (Mancl *et al.* 2016; Collins *et al.* 2018). Eine solche Elongation wurde auch bei PilT-Retraktions-ATPasen und T2SS-ATPasen beobachtet (Misic *et al.* 2010; Satyshur *et al.* 2007; Lu *et al.* 2013).



**Abb. 1.6. Struktur des PilF-Komplexes (modifiziert nach Collins *et al.* (2013)).** Einzelpartikel-cryo-EM-Analysen führten zu diesem 3D-Modell des hexameren PilF-Komplexes. In der Seitenansicht des  $150 \text{ \AA} \times 130 \text{ \AA}$  großen Komplexes ist deutlich die Aufteilung in zwei Ringstrukturen zu sehen, die durch einen dünnen Stamm verbunden sind.

Mancl *et al.* (2016) stellten für die Funktionsweise von PilF aus *T. thermophilus* einen Rotationsmechanismus vor, bei dem durch die koordinierte Bindung und Hydrolyse von ATP eine Bewegung der ATPase-Untereinheiten relativ zueinander entsteht. Diese rotationsartige Bewegung könnte dann an andere Komponenten des DNA-Translokators/T4P weitergegeben werden, was zur Assemblierung des (Pseudo-)Pilus führen könnte. Ein solcher Mechanismus wurde auch für die T4P-Assemblierungs-ATPase PilB aus *Geobacter metallireducens* beschrieben (McCallum *et al.* 2017).

Ein neueres Modell von PilF aus *T. thermophilus* kombinierte EM- und Röntgenstrukturdaten und führte so zu einer hochauflösenden Struktur (bis zu 2,44 Å) der konservierten C-terminalen Domäne in Verbindung mit der ungewöhnlichen N-terminalen Domäne (Collins *et al.* 2018). Dieses Modell deutet an, dass eine durch ATP-Bindung und -Hydrolyse hervorgerufene Verschiebung des N-Terminus relativ zum C-Terminus von PilF eine wichtigere Rolle spielen könnte als die Interaktion zwischen benachbarten Protomeren. Interessanterweise konnte in diesem Modell die Struktur der N-terminalen GSPIIA-Domäne nicht aufgelöst und in die PilF-Struktur integriert werden, weshalb die Autoren vermuten, dass diese Domäne an andere Komponenten des DNA-Translokators/T4P bindet (Collins *et al.* 2018).

### **Potentielle Interaktionspartner von PilF**

Die Frage, wie die durch ATP-Hydrolyse bereitgestellte Energie von PilF für die Pilus-Assemblierung und DNA-Aufnahme genutzt wird, ist bisher ungeklärt. Mögliche „Kupplungsproteine“, die PilF mit den periplasmatischen Komponenten des DNA-Translokators/T4P verbinden, sind PilC und der PilMNO-Assemblierungskomplex.

Die Interaktion von PilC-Homologen mit Assemblierungs-ATPasen wurde z. B. für *Erwinia chrysanthemi*, EPEC, *P. aeruginosa* und *M. xanthus* nachgewiesen (Py *et al.* 2001; Crowther *et al.* 2005; Takhar *et al.* 2013; Bischof *et al.* 2016). In anderen Studien konnte hingegen keine direkte Bindung nachgewiesen werden (McCallum *et al.* 2016; Georgiadou *et al.* 2012; Arts *et al.* 2007). Diese Interaktion scheint also nicht in allen Systemen vorhanden zu sein.

Strukturelle Untersuchungen der T2SS-ATPasen aus *V. cholerae* und *X. campestris* haben gezeigt, dass diese direkt an den cytoplasmatischen N-Terminus von EpsL bzw. XpsL, Strukturhomologen von PilM, binden (Abendroth *et al.* 2005; Shiue *et al.* 2006). Diese Interaktion erfolgte über die N-terminale Domäne der ATPase und führte jeweils zur Stimulation der ATPase-Aktivität. Auch wenn die Bindung von PilB/PilF-ATPasen an PilM für T4P-Assemblierungsapparate aus *P. aeruginosa*, *M. xanthus* und *Neisseria meningitidis* nachgewiesen wurde, so konnte in T4P- oder DNA-Translokator-Systemen bisher keine Stimulation der ATPase durch PilM gezeigt werden (McCallum *et al.* 2016; Bischof *et al.* 2016; Goosens *et al.* 2017). Die potentielle Interaktion von PilF mit PilM und weiteren Komponenten des DNA-Translokators in *T. thermophilus* ist noch unerforscht und war Gegenstand dieser Arbeit.

## 1.5 Struktur und Funktionen von Typ-IV-Pili

### Komponenten der T4P

T4P sind flexible, bis zu mehreren Mikrometer lange und sehr dünne (5 - 9 nm) filamentöse Zellorganellen von Prokaryoten. Sie bestehen aus tausenden Untereinheiten, den Pilinen, die ausgehend von ihrer Basis helikal assembliert werden (Craig und Li 2008; Clausen *et al.* 2009). Der Assemblierungskomplex enthält die durch das *pilMNOWQ*-Operon codierten Proteine, sowie das Membranprotein PilC. Diese Proteine sind also sowohl für die natürliche Transformation, als auch für die T4P-Biogenese essentiell. Weitere Proteine mit einer dualen Funktion in beiden Systemen sind die Assemblierungs-ATPase PilF, das Hauptpilin PilA4 und die Präpilineptidase PilD (Friedrich *et al.* 2002; Salzer *et al.* 2014b). *T. thermophilus* enthält weitere potentielle Piline, deren Rolle bei der T4P-Assemblierung und den T4P-vermittelten Funktionen noch unklar ist und die in dieser Arbeit analysiert werden sollen. Proteine, die keine Rolle bei der natürlichen Transformation spielen, aber bei der T4P-Dynamik, sind die Retraktions-ATPasen PilT1 und PilT2 (Salzer *et al.* 2014b). Diese werden zwar nicht für die Bildung der Pili benötigt, aber für ihre Retraktion und damit auch für die durch T4P vermittelte kriechende Fortbewegung auf Oberflächen.

### Funktionen der T4P

T4P vermitteln Funktionen wie Zell-Zell-Adhäsion, Adhäsion an abiotischen Oberflächen, Biofilmbildung, Fruchtkörperentwicklung und Fortbewegung auf Oberflächen (Merz und So 2000; Strom und Lory 1993; Tønnum und Koomey 1997; Burrows 2005). Letztere tritt als „social gliding“ oder „twitching motility“ auf (Wall und Kaiser 1999) und entsteht durch aufeinanderfolgende Assemblierung, Anhaftung und Deassemblierung der Pili.

Die Assemblierung bzw. Deassemblierung findet jeweils an der Basis des T4P statt, wo Piline zur Pilusstruktur hinzugefügt, bzw. daraus entfernt werden (Wall und Kaiser 1999; Proft und Baker 2009). Bei der „twitching motility“ von *T. thermophilus* wird die T4P-Assemblierung durch PilF vermittelt. Die Energie für die Deassemblierung wird durch Retraktions-ATPasen der PilT/PilU-Familie bereitgestellt (Planet *et al.* 2001). T4P können während der Retraktion und der damit verknüpften Fortbewegung der Zelle Kräfte von bis zu 149 pN aushalten. Die Retraktions-ATPasen, die diese Kräfte aufbauen, sind somit die stärksten bekannten Molekularmotoren (Maier *et al.* 2002; Clausen *et al.* 2009). In *T. thermophilus* HB27 gibt es zwei Gene, die für Retraktions-ATPasen codieren, *pilT1* und *pilT2*. Durch Mutantenstudien konnte gezeigt werden, dass beide ATPasen essentiell für die T4P-Deassemblierung und „twitching motility“ von *T. thermophilus* sind (Salzer *et al.* 2014b).

Für einige pilierte Bakterien, wie *N. meningitidis*, *V. cholerae* und *S. pneumoniae*, wurde beschrieben, dass T4P extrazellulär DNA binden und direkt an der natürlichen Transformation beteiligt sind (Cehovin *et al.* 2013; Seitz und Blokesch 2013; Laurenceau *et al.* 2013). Bei *T. thermophilus*, sowie *Pseudomonas stutzeri* und *N. gonorrhoeae*, gibt es allerdings Hinweise darauf, dass keine Oberflächen-exponierten, langen Pilusstrukturen für die natürliche Transfor-

mation benötigt werden (Salzer *et al.* 2014a; Kruse *et al.* 2018; Graupner *et al.* 2001; Aas *et al.* 2002b). In *T. thermophilus* führten bestimmte Deletionen in *pilQ* (*pilQΔN1*, *pilQΔN2*, *pilQΔN3*, *pilQΔN4*, *pilQΔN5*) oder *pilF* (*pilFΔGSPiIC*) zu einer Reduktion der Pilierung (Burkhardt *et al.* 2012; Salzer *et al.* 2016a; Kruse *et al.* 2018). Mutationen im Tetracysteinmotiv von *pilF* (*pilF<sub>C819A</sub>*, *pilF<sub>2CysA</sub>*, *pilF<sub>3CysA</sub>*, *pilF<sub>4CysA</sub>*) führten sogar zu einem unpilierten Phänotyp. Dennoch wiesen alle diese Mutanten Wildtyp-artige oder sogar stark erhöhte Transformationsraten auf. Dies zeigt, dass die natürliche Transformation in *T. thermophilus* unabhängig von Oberflächen-exponierten T4P funktioniert.

## 1.6 Piline: Bausteine des T4P

T4P werden in zwei Gruppen unterteilt, T4aP und T4bP. Für die Assemblierung der T4bP werden 10 - 12 Proteine benötigt, die in nur einem gut konservierten Gencluster codiert sind, während die Anordnung der T4aP-Gene variabler und die Zahl der T4aP-Gencluster höher (5 - 7) ist (Pelicic 2008). Die Untereinheiten der T4aP und T4bP, die Piline, unterscheiden sich durch die Länge ihrer Leitsequenz: Leitsequenzen der T4bP-Piline sind 15 - 30 Aminosäuren lang, während die der T4aP-Piline weniger als 10 Aminosäuren aufweisen. T4bP wurden bisher nur für *E. coli*-Stämme, Salmonellen und die Toxin-korregulierten Pili von *V. cholerae* beschrieben (Craig und Li 2008). Die T4bP-Strukturen bilden dabei häufig Bündel, was zur Aggregation mehrerer Zellen führen kann (Craig *et al.* 2004; Strom und Lory 1993). *T. thermophilus* bildet die weiter verbreiteten T4aP, weshalb im Folgenden die Untereinheiten dieser Pili genauer beschrieben werden.

### Piline haben eine charakteristische Leitsequenz

Piline sind kleine Proteine aus ~ 150 Aminosäuren, die zunächst als Präpiline gebildet und dann durch die Präpilinpeptidase prozessiert werden (Berry und Pelicic 2015; van Dam 2014). Präpiline zeichnen sich durch einen konservierten N-Terminus aus, der die Erkennungssequenz für die Peptidase enthält. Diese Leitsequenz, auch Klasse III Signalpeptid genannt, umfasst die 4 - 7 N-terminalen Aminosäuren, die insgesamt positiv geladen sind (i. d. R. 2 basische Aminosäuren), gefolgt von einem essentiellen Glycin ( $G_{-1}$ ), das die erste Aminosäure im reifen Pilin bildet. Hinter diesem  $G_{-1}$  prozessiert die Präpilinpeptidase und methyliert das darauf folgende Phenylalanin ( $F_{+1}$ ) (Hobbs und Mattick 1993; Szabó *et al.* 2007). In einigen Präpilin-ähnlichen Proteinen ist das  $F_{+1}$  gegen ein Methionin, Leucin oder Valin ausgetauscht (Strom und Lory 1993; Hobbs und Mattick 1993). Die fünfte Aminosäure des reifen Pilins ist ein konserviertes Glutamat ( $E_{+5}$ ). Die ersten 20 Aminosäuren des reifen Pilins sind insgesamt hydrophob und bilden eine  $\alpha$ -Helix (Pelicic 2008; Strom und Lory 1993).

### Die Struktur der Piline

Im Gegensatz zur Leitsequenz ist die Gesamt-Sequenz der Piline nur wenig konserviert (Pelicic 2008). So liegt auch die Aminosäuresequenz-Identität zwischen den Piligen von *T. thermophilus* HB27 und denen des eng verwandten Stammes *T. thermophilus* HB8 nur bei ca. 21 % (Karuppiyah *et al.* 2016). Strukturen der Piline aus *T. thermophilus* HB8 sowie aus anderen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien zeigen jedoch, dass die Protein-Faltung der Piline ähnlich ist. Diese zeichnet sich durch eine Unterteilung in eine N-terminale  $\alpha$ -Helix und eine globuläre Kopfdomäne aus (Giltner *et al.* 2012).

Die C-terminale Kopfdomäne enthält wiederum eine zentrale  $\alpha$ -Helix, die an vier antiparallele  $\beta$ -Faltblätter angelagert ist (Craig und Li 2008; Karuppiyah *et al.* 2016). Die  $\alpha$ -Helix der Kopfdomäne ist mit der  $\beta$ -Faltblatt-Struktur durch eine  $\alpha/\beta$ -Schleufe verbunden. Diese enthält häufig posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierungen und Phosphorylierungen oder

O-glykosidische Verknüpfungen mit z. B. Phosphoethanolamin und Phosphocholin (Aas *et al.* 2006; Craig und Li 2008; Forest *et al.* 1999; Ng *et al.* 2006; Hegge *et al.* 2004). Solche Modifikationen könnten eine Rolle spielen bei der Adhäsion von Bakterien, der von pathogenen Bakterien ausgelösten Immunantwort oder auch bei der Bindung von DNA an Piline. In den Pilinen PilA4 und Tt1222 aus *T. thermophilus* HB8 wurden zudem Disulfid-Brücken in der  $\alpha/\beta$ -Schleife entdeckt (Karuppiah *et al.* 2013; Karuppiah *et al.* 2016). Neben der beschriebenen Pilin-Kerndomäne ( $\alpha$ - $\alpha/\beta$ -Schleife- $\beta\beta\beta\beta$ ) kann die Kopfdomäne weitere Schleifen und  $\beta$ -Faltblatt-reiche Bereiche enthalten (Karuppiah *et al.* 2016; Craig und Li 2008; Parge *et al.* 1995).

Die N-terminale  $\alpha$ -Helix ist alleinstehend und hydrophob. Sie dient der Membranverankerung des Pilins, bevor es in den Pilus integriert wird (Berry und Pelicic 2015; Craig *et al.* 2006). Im Pilus bilden die  $\alpha$ -Helices der Piline durch hydrophobe Interaktionen den Kern des T4P, der von den Kopfdomänen umgeben ist (Craig *et al.* 2006; Egelman 2007; Wang *et al.* 2017).

### **Nebenciline haben unterschiedliche Funktionen**

T4P sind aus zahlreichen Kopien des jeweiligen Hauptpilins aufgebaut. Daneben sind sehr geringe Mengen von Nebencilinen in Pilus-Präparationen zu detektieren. Diese spielen eine Rolle beim Aufbau, der Regulation und/oder der Funktion der T4P (Giltner *et al.* 2012).

Beispielsweise bilden die Nebenciline PilV, PilW, PilX und FimU aus *P. aeruginosa* einen Basis-Komplex, der für die Assemblierung von T4P benötigt wird (Nguyen *et al.* 2015). Ähnliches wurde für die Nebenciline aus *M. xanthus*, *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* beschrieben (Chang *et al.* 2016; Carbonnelle *et al.* 2006; Winther-Larsen *et al.* 2005). Andere Nebenciline, wie PilX aus *N. meningitidis* und PilV aus *N. gonorrhoeae*, sind in die Anhaftung von T4P an andere Zellen involviert (Helaine *et al.* 2005; Winther-Larsen *et al.* 2001). Es wurden auch regulatorische Rollen für Nebenciline beschrieben, so können sie die Zahl oder die Länge der T4P beeinflussen (Imhaus und Dumenil 2014; Båga *et al.* 1987). Das *N. meningitidis* Nebencilin ComP ist in der Lage, Sequenz-spezifisch DNA zu binden, was auf eine entscheidende Rolle bei der DNA-Aufnahme hinweist (Cehovin *et al.* 2013).

*T. thermophilus* HB27 bildet drei Nebenciline, PilA1, PilA2 und PilA3, die nicht für die T4P-Bildung, aber für die natürliche Transformation benötigt werden. Eine direkte DNA-Bindung an die Nebenciline von *T. thermophilus* wurde bisher nicht gezeigt, aber die Mutation der Präpilin-gene *pilA1*, *pilA2* und *pilA3* führte zum Verlust der natürlichen Kompetenz (Friedrich *et al.* 2003). Es lag etwas mehr DNA an den Zellen der  $\Delta pilA1-3::km$ -Mutante gebunden vor als beim Wildtyp, jedoch wurde weniger DNA in einen DNase-resistenten Zustand aufgenommen (Schwarzenlander *et al.* 2009). Ähnliches wurde auch bei der *pilA4::km*-Mutante beobachtet. Dies zeigt, dass sowohl PilA4, als auch PilA1, 2 und 3 wichtig für die DNA-Aufnahme durch die ÄM sind. Daneben wurden acht weitere Präpilin-gene im Genom von *T. thermophilus* HB27 identifiziert. Durch Mutation von fünf dieser Gene konnte gezeigt werden, dass diese nicht essentiell für die T4P-Assemblierung oder natürliche Transformation sind (Friedrich *et al.* 2003). Die Funktion dieser acht potentiellen Präpilin-gene in *T. thermophilus* ist somit weiter unbekannt und sollte im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden.

## 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion potentieller Präpiline bei der T4P-vermittelten „twitching motility“ und Adhäsion von *T. thermophilus* HB27 untersucht werden. Hierzu sollten Mutanten generiert und, zusammen mit bereits vorliegenden Präpilin-Mutanten, phänotypisch analysiert werden.

Desweiteren sollte die Funktion des nicht-konservierten Kompetenzproteins ComZ geklärt werden. Dafür sollte eine ComZ-Deletionsmutante erstellt und anschließend komplementiert werden und auf ihre Transformierbarkeit und Pilus-Funktionen überprüft werden. Durch Western Blot-Analysen subzellulärer Fraktionen von *T. thermophilus* sollte die Lokalisation von ComZ ermittelt werden. Es sollte ein Protokoll zur Aufreinigung von ComZ etabliert werden und mit dem aufgereinigten ComZ sollten biochemische Analysen durchzuführen werden.

Im Fokus weiterer Analysen stand die Assemblierungs-ATPase PilF, die eine duale Rolle bei der natürlichen Transformation und der Biogenese der T4P von *T. thermophilus* spielt. Durch Mutation des Walker A- und Walker B-Motivs in PilF sollte die Rolle dieser Motive bei der Bildung von Proteinkomplexen und ihre Funktion bei der natürlichen Transformation und der T4P-Bildung sowie den T4P-Funktionen geklärt werden.

Außerdem sollte analysiert werden, ob PilF mit dem membrangebundenen Assemblierungskomplex PilMNO interagiert und welche Rolle einzelne Domänen von PilF und PilM dabei spielen. Dafür sollten die Proteine und Proteinkomplexe heterolog in *E. coli* produziert und aufgereinigt werden, um dann Interaktionsstudien von PilF mit PilMNO und ATPase-Tests durchzuführen.

Schließlich sollte gezeigt werden, ob PilF in der Lage ist, den Sekundärbotenstoff c-di-GMP zu binden, und ob die triplizierte MshEN-Domäne von PilF zur Bindung mehrerer c-di-GMP Moleküle führt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen, Plasmide, Oligonukleotide

#### 2.1.1 Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2.1 (*E. coli*-Stämme) und Tabelle 2.2 (*T. thermophilus*-Stämme) aufgeführt. *E. coli* DH5 $\alpha$  und 10-beta wurde zur Vervielfältigung der in Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4 aufgelisteten Plasmide verwendet. Die *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) und T7 Express dienen zur heterologen Überproduktion von *T. thermophilus*-Proteinen.

**Tab. 2.1. Verwendete *E. coli*-Stämme.**

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , $\phi 80'$ <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA</i> , <i>argF</i> ) <i>U169</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ ,	(Hanahan 1983)
10-beta	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ), 7697 <i>araD139</i> , <i>fhuA</i> , $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>galK16</i> , <i>galE15</i> , <i>e14-</i> , $\phi 80$ <i>dlacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> , <i>recA</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> , <i>rpsL</i> , (Str <sup>R</sup> ), <i>rph</i> , <i>spoT1</i> , $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> )	New England Biolabs, Ipswich
BL21 (DE3)	<i>fhuA2</i> [ <i>lon</i> ], <i>ompT</i> , <i>gal</i> ( $\lambda$ DE3) [ <i>dcm</i> ] $\Delta$ <i>hsdS</i>	Stratagene, Zuidoost
T7 Express	<i>fhuA2</i> , <i>lacZ::T7 gene1</i> , [ <i>lon</i> ], <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>sulA11</i> , R( <i>mcr-73::miniTn10-Tet<sup>S</sup></i> ) <sub>2</sub> , [ <i>dcm</i> ] R( <i>zgb-210::Tn10-Tet<sup>S</sup></i> ), <i>endA1</i> , $\Delta$ ( <i>mcrC-mrr</i> ) <i>114::IS10</i>	New England Biolabs, Ipswich

**Tab. 2.2. Verwendete *T. thermophilus*-Stämme.**

<i>T. thermophilus</i> -Stamm	Genotyp bzw. Phänotyp <sup>a</sup>	Referenz
HB27	Wildtyp	(Oshima und Imahori 1974)
HB27-Strep <sup>R</sup>	spontane Strep <sup>R</sup> -Mutante	(Friedrich <i>et al.</i> 2001)
<i>TTP0077::km</i>	Km <sup>R</sup>	(Friedrich <i>et al.</i> 2002)
<i>TTC1836::km</i>	Km <sup>R</sup>	(Friedrich <i>et al.</i> 2003)
<i>pilA4::km</i>	Km <sup>R</sup>	(Friedrich <i>et al.</i> 2003)
$\Delta$ <i>TTP0075-77::km</i>	Km <sup>R</sup>	(Friedrich <i>et al.</i> 2003)

<i>TTP0078::km</i>	Km <sup>R</sup>	(Pahl 2017)
<i>ΔTTC1842::bleo</i>	Bleo <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>ΔTTC1651::bleo</i>	Bleo <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>ΔTTP0075::bleo</i>	Bleo <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>ΔTTP0076::bleo</i>	Bleo <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>ΔcomZ::bleo</i>	Bleo <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>ΔcomZ::bleo + comZ-His9</i>	<i>ΔcomZ::bleo</i> , pDM12- <i>comZ-His9</i> , Bleo <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>ΔpilF::bleo</i>	Bleo <sup>R</sup>	(Salzer <i>et al.</i> 2014b)
<i>pilFWT</i>	<i>ΔpilF::bleo</i> , pDM12- <i>pilF</i> , Bleo <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	(Salzer <i>et al.</i> 2014b)
<i>pilFK654A</i>	<i>ΔpilF::bleo</i> , pDM12- <i>pilFK654A</i> , Bleo <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>pilFE718A</i>	<i>ΔpilF::bleo</i> , pDM12- <i>pilFE718A</i> , Bleo <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>ΔpilMNO::bleo</i>	Bleo <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>ΔpilMNO::bleo + pilMNO</i>	<i>ΔpilMNO::bleo</i> , pMKE2-P <sub>M</sub> - <i>pilMNO</i> , Bleo <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>ΔpilMNOWQ::bleo</i>	Bleo <sup>R</sup>	I. Rose, Goethe-Universität Frankfurt
<i>pilMNOWQ<sub>WT</sub></i>	<i>ΔpilMNOWQ::bleo</i> , pP <sub>M</sub> - <i>pilMNOWQ</i> , Bleo <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>pilM<sub>K26A</sub>NOWQ</i>	<i>ΔpilMNOWQ::bleo</i> , pP <sub>M</sub> - <i>pilM<sub>K26A</sub>NOWQ</i> , Bleo <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>pilFΔGSPIIA</i>	<i>ΔpilF::bleo</i> , pDM12- <i>pilFΔGSPIIA</i> , Bleo <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	R. Salzer, Goethe-Universität Frankfurt
<i>pilFΔGSPIIAB</i>	<i>ΔpilF::bleo</i> , pDM12- <i>pilFΔGSPIIAB</i> , Bleo <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	R. Salzer, Goethe-Universität Frankfurt
<i>pilFΔGSPIIABC</i>	<i>ΔpilF::bleo</i> , pDM12- <i>pilFΔGSPIIABC</i> , Bleo <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	R. Salzer, Goethe-Universität Frankfurt
<i>pilFΔGSPIIC</i>	<i>ΔpilF::bleo</i> , pDM12- <i>pilFΔGSPIIC</i> , Bleo <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	R. Salzer, Goethe-Universität Frankfurt

<sup>a</sup> Strep<sup>R</sup>, Streptomycinresistenz; Km<sup>R</sup>, Kanamycinresistenz Bleo<sup>R</sup>, Bleomycinresistenz.

### 2.1.2 Plasmide

Klonierungsvektoren, die für die Erstellung von rekombinanten Plasmiden verwendet wurden, sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet.

**Tab. 2.3. Verwendete Klonierungsvektoren.**

Plasmid	Geno- bzw. Phänotyp/Verwendung <sup>a</sup>	Größe [Bp]	Referenz
pET28a(+)	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag/Thrombinschnittstelle/T7-Tag, C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Km <sup>R</sup>	5369	Merck KGaA, Darmstadt
pUC19	<i>lacZα</i> , Amp <sup>R</sup>	2686	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985)
pDM12	<i>E. coli/Thermus</i> -, „Shuttle“-Vektor, P <sub>bc1</sub> , Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	7400	(Werner <i>et al.</i> 2010)
pWUR112	Bleo <sup>R</sup> , P <sub>slpA</sub>	4404	(Brouns <i>et al.</i> 2005)
pMKE2	P <sub>nar</sub> , P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Km <sup>R</sup>	7424	(Moreno <i>et al.</i> 2005)

<sup>a</sup> Km<sup>R</sup>, Kanamycinresistenz; Amp<sup>R</sup>, Ampicillinresistenz; Gm<sup>R</sup>, Gentamycinresistenz; Bleo<sup>R</sup>, Bleomycinresistenz

**Tab. 2.4. Verwendete rekombinante Plasmide.**

Plasmid	Geno- bzw. Phänotyp/Verwendung <sup>a</sup>	Größe [Bp]	Referenz
pUC19- <i>ΔTTC1842::bleo</i>	Amp <sup>R</sup> , Bleo <sup>R</sup> , zur Deletion von <i>TTC1842</i>	5371	Diese Arbeit
pUC19- <i>ΔTTC1651::bleo</i>	Amp <sup>R</sup> , Bleo <sup>R</sup> , zur Deletion von <i>TTC1651</i>	5425	Diese Arbeit
pUC19- <i>UPTTP75DW</i>	Amp <sup>R</sup> , Bleo <sup>R</sup> , zur Erstellung von pUC19- <i>ΔTTP75::bleo</i>	5016	Diese Arbeit
pUC19- <i>ΔTTP75::bleo</i>	Amp <sup>R</sup> , Bleo <sup>R</sup> , zur Deletion von <i>TTP0075</i>	5354	Diese Arbeit
pUC19- <i>UPTTP76DW</i>	Amp <sup>R</sup> , Bleo <sup>R</sup> , zur Erstellung von pUC19- <i>ΔTTP76::bleo</i>	5262	Diese Arbeit
pUC19- <i>ΔTTP76::bleo</i>	Amp <sup>R</sup> , Bleo <sup>R</sup> , zur Deletion von <i>TTP0076</i>	5349	Diese Arbeit
pUC19- <i>comZ::bleo</i>	Amp <sup>R</sup> , Bleo <sup>R</sup> , zur Deletion von <i>comZ</i>	5542	Diese Arbeit
pDM12 - <i>comZ</i> -His <sub>9</sub>	Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , P <sub>bc1</sub> , Expression von <i>comZ</i> , C-terminaler His <sub>9</sub> -Tag	8253	Diese Arbeit
pET28- <i>pilF</i>	Km <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , Überproduktion von PilF, N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	8086	(Rose <i>et al.</i> 2011)

pET28- <i>pilFK654A</i>	Km <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , Überproduktion von PilF <sub>K654A</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	8086	Diese Arbeit
pET28- <i>pilFE718A</i>	Km <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , Überproduktion von PilF <sub>E718A</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	8086	Diese Arbeit
pET28- <i>pilFΔGSPiIA</i>	Km <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , Überproduktion von PilFΔGSPiIA (Δ1-147), N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	7535	(Aderhold 2010)
pET28- <i>pilFΔGSPiIAB</i>	Km <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , Überproduktion von PilFΔGSPiIAB (Δ1-298), N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	7082	(Aderhold 2010)
pET28- <i>pilFΔGSPiIABC</i>	Km <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , Überproduktion von PilFΔGSPiIABC (Δ1-479), N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	6439	(Aderhold 2010)
pET28- <i>pilFΔGSPiIC</i>	Km <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , Überproduktion von PilFΔGSPiIC (Δ369-479), N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	7753	R. Salzer, Goethe-Universität Frankfurt
pDM12- <i>pilF</i>	Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , P <sub>bc1</sub> , Expression von <i>pilF</i>	9249	(Salzer <i>et al.</i> 2014b)
pDM12- <i>pilFK654A</i>	Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , P <sub>bc1</sub> , Expression von <i>pilF</i> <sub>K654A</sub>	9249	Diese Arbeit
pDM12- <i>pilFE718A</i>	Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , P <sub>bc1</sub> , Expression von <i>pilF</i> <sub>E718A</sub>	9249	Diese Arbeit
pET28a-PilMN	Km <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , Überproduktion von His <sub>6</sub> -PilM und PilN-Strep	7082	(Salzer 2016)
pET28a-PilN	Km <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , Überproduktion von PilN-Strep	5899	Diese Arbeit
pET28a- Strep- PilM	Km <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , Überproduktion von Strep-PilM	6409	Diese Arbeit
pET28a-PilMNO	Km <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , Überproduktion von His <sub>6</sub> -PilM, PilN und PilO-Strep	7674	Diese Arbeit
pET28a- PilM <sub>K26A</sub> N	Km <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , Überproduktion von His <sub>6</sub> -PilM <sub>K26A</sub> und PilN-Strep	7082	Diese Arbeit
pUC19- <i>ΔpilMNO::bleo</i>	Amp <sup>R</sup> , Bleo <sup>R</sup> , zur Deletion von <i>pilMNO</i>	5009	Diese Arbeit
pMKE2- <i>pilMNO</i>	Km <sup>R</sup> , <i>pilM</i> -Promotor, Expression von <i>pilMNO</i>	9493	Diese Arbeit
pUC19- <i>ΔpilMNOWQ</i>	Amp <sup>R</sup> , Bleo <sup>R</sup> , zur Deletion von <i>pilMNOWQ</i>	5102	I. Rose, Goethe-Universität Frankfurt
pP <sub>M</sub> - <i>pilMNOWQ</i>	Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , <i>pilM</i> -Promotor, Expression von <i>pilMNOWQ</i>	12548	I. Rose, Goethe-Universität Frankfurt
pP <sub>M</sub> - <i>pilM<sub>K26A</sub>NOWQ</i>	Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , <i>pilM</i> -Promotor, Expression von <i>pilM<sub>K26A</sub>NOWQ</i>	12548	Diese Arbeit

<sup>a</sup> Km<sup>R</sup>, Kanamycinresistenz; Amp<sup>R</sup>, Ampicillinresistenz; Gm<sup>R</sup>, Gentamycinresistenz; Bleo<sup>R</sup>, Bleomycinresistenz

## 2.1.3 Oligonukleotide

Tab. 2.5. Verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3' Richtung) <sup>a</sup>	Zielsequenz <sup>b</sup> / Verwendung
Bleo_for_NotI	ATTTGCGGCCGCGTCCACCGCTTTCTG AAGGTCC	<i>bleo<sup>R</sup></i>
Bleo_rev_PstI	AAACTGCAGCTTCCGGCTCGTATGTTGT GTGG	<i>bleo<sup>R</sup></i>
TTC1842up_for	CTATGAATTCCTCGGTAAGCGTGGATGG ACAAGCTCTGG	„upstream“ Region von <i>TTC1842</i>
TTC1842up_rev	ATTAGCGGCCGCGCTTCATTGACACAC CTCCTCGGTGG	„upstream“ Region von <i>TTC1842</i>
TTC1842dw_for	GTAGCTGCAGCACGCCCTGTAGAATGA GCCCATGCTC	„downstream“ Re- gion von <i>TTC1842</i>
TTC1842dw_rev	TACGAAGCTTGGAAGGCCTGCGCCTTGA GGAGGTCCAC	„downstream“ Re- gion von <i>TTC1842</i>
Check1842_for	CGCTACCTGGCGGAGGCGGGCGTCTTC	<i>TTC1840</i>
Check1842_rev	CACCTTCAGGACCTCCTCCAGGCCGAGC CC	<i>TTC1843</i>
TTC1651up_for	ACTCGAATTCCTTTACGAGGCCATCGT CCTCGAG	„upstream“ Region von <i>TTC1651</i>
TTC1651up_rev	TAGACTGCAGGCCCTCACCTCTCCCAA CATTTTAACG	„upstream“ Region von <i>TTC1651</i>
TTC1651dw_for	ACTTGCGGCCGCGGTCTACGAGGCCCTG GACAAGGGGTAG	„downstream“ Re- gion von <i>TTC1651</i>
TTC1651dw_rev	GTACAAGCTTCGCTTTGAGGTGGAGGCC ATCCTGGAG	„downstream“ Re- gion von <i>TTC1651</i>
Check1651_for	CGAGGCCCTGCTCCTCCGCGTCTTCCTGG	<i>TTC1649</i>
Check1651_rev	CCCAGGAGGCCCTCTTCGCCCTGAAGCG GC	<i>TTC1653</i>
Bleo_for_G1	TCCTCAGTTGATCGCCGTCCACCGCTTTC TGAA	<i>bleo<sup>R</sup></i>
Bleo_rev_G1	GGTGCCGTGAAGAGTACCCGGGGATCCT CTAGATTAGTC	<i>bleo<sup>R</sup></i>
TTP75up_for_G1	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGGTG AGGGTCTCCAGGGTGTAG	„upstream“ Region von <i>TTP0075</i>
TTP75up_rev_G1	ATCCCCGGGTACTCTTCACGGCACCTCTC CCTCCCTCCTTACATG	„upstream“ Region von <i>TTP0075</i>
TTP75dw_for_bleo	GCGGTGGACGGCGATCAACTGAGGATCG GGGAAACGGAGGTGG	„downstream“ Re- gion von <i>TTP0075</i>
TTP75dw_rev_G1	AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGGGC GTGGACCACATGCCAGC	„downstream“ Re- gion von <i>TTP0075</i>
CheckTTP75_for	GTCTCCAAGAGGGCCTTGGCGGCAATTC	<i>aidB</i>

CheckTTP75_rev	GAGCCGACGTGTCGTCGGGTCAAAG	<i>TTP0077</i>
TTP76up_for_G1	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGGGT AGGCCACCTGGTGGGTG	„upstream“ Region von <i>TTP0076</i>
TTP76up_rev_G1	GATCCCCGGGTACTCTTCACGGCACCAC CTCCG	„upstream“ Region von <i>TTP0076</i>
TTP76dw_for_G1	AGCGGTGGACGGCGATCAACTGAGGAGG TGAAGTGTGTCC	„downstream“ Re- gion von <i>TTP0076</i>
TTP76dw_rev_G1	AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGCAT TCGCATGGGACGATGCG	„downstream“ Re- gion von <i>TTP0076</i>
CheckTTP76_for	CCGTCACCAGGGCCACATCGGCAAG	<i>aidB</i>
CheckTTP76_rev	GTGGCGAGGAAGGAGCCTCCGAGGTTG	<i>TTP0078</i>
TTP78Test_for	CGGCGAGGTCCGAAGCCTCTCC	<i>TTP0078</i>
TTP78Test_rev	GGAAGCGGCGGTTCGTAGGTGAAG	<i>TTP0078</i>
comZ_up_for	ACTAGAATTCGGGAAACTGGCGGAGCTT TACTTCGTGG	„upstream“ Region von <i>comZ</i>
comZ_up_rev	ATTAGCGGCCCGCCAGGTCACCTCCTAGG GGGTGGGCAG	„upstream“ Region von <i>comZ</i>
comZ_dw_for	TCATCTGCAGGAGCGCCGCTAGCTTTCA CACCGTTTTAC	„downstream“ Re- gion von <i>comZ</i>
comZ_dw_rev	CATTGCATGCGAGAAGCGCCTTAAAGTT CTTGAGGTTCCG	„downstream“ Re- gion von <i>comZ</i>
Check_comZ_for	CGTCCAGGTCTTGAGCGCCGCTCG	<i>pilA2</i>
Check_comZ_rev	CCTGGACGGGGTTTGGAGGGGGTGTG	<i>TTC0859</i>
comZ_for_Nde	GTAGCATATGGTGAACGCGAAAGGTATC GCCCTCGTAGCC	<i>comZ</i>
comZ_His9_rev	ATATGCGGCCGCTCAATGATGATGGTGAT GATGGTGATGATGGCGGCGCTCATAGG	<i>comZ</i>
pilF_pDM12_for	ATTACATATGCACCATCATCACCACCATCA TAGCGTGCTCACCATAGGGGACAAAAGG	<i>pilF</i>
pilF_rev	ACGCTGCGGCCGCATTACTCAATGGTAC GC	<i>pilF</i>
pilF_WA_for	CGGGGTCGGGCGCCAGCTTC	<i>pilF</i>
pilF_WA_rev	TGGGCCCGGTGATGAGGAAGATGC	<i>pilF</i>
pilF_WB_for	CATGGTGGGGGCCATCCGGGAC	<i>pilF</i>
pilF_WB_rev	ATGATGTCCGGTCTCTGCCTGAG	<i>pilF</i>
Seq_pDM12_for	TGACGGGACATCTGTCCTTG	pDM12
Seq_pDM12_rev	CTGCATGTCTCCATGTTTCATTG	pDM12
pilM_for_NdeI	GCCACCATATGTTCAAAGCCTTAGCCA GCTCTTCC	<i>pilM, pilMN</i>
pilM_Strep_for	TGAACCATGGCTTGGAGCCACCCGAGTT CGAAAAATCCGCTTTCAAAGCCTTAGCC AGCTCTTC	<i>pilM</i>

pilM_rev	ATTAGCGGCCGCCTAATCAAGGGGCTCC ACCCCCCTC	<i>pilM</i>
pilM_His_for	GCCACATATGCATCACCACCATCACCATC ACTTCAAAGCCTTAGCCAGCTC	<i>pilMNO</i>
pilO_Strep_rev	ATATGCGGCCGCTCATTTTTCGAACTGCG GGTGGCTCCAGGCGCTTGGGGTGCTCCCT CCCGTTTCC	<i>pilMNO</i>
pilN_for	AGGACCATGGTGATTAGGCTGAACCTTC TCCCCAAAACC	<i>pilN</i>
pilN_Strep_rev	ATTAGCGGCCGCTTATTTTTCGAACTGCG GGTGGCTCCAAGCGCTGCGAGCACCGCTT TCACCCCC	<i>pilN, pilMN</i>
pilM-K26A-for	<u>GCA</u> CTCGTGGAGGTGTCCGGGAACC	<i>pilM</i>
pilM-K26A-rev	CAGGGCGGAGGCCCGATCTCCAAG	<i>pilM</i>
pilM_up_for	ACCAGAATTCTACGTGGAGCAGGAAAG GCGCTACCTGGACGTGGC	„upstream“ Region von <i>pilM</i>
pilM_up_rev	ATTACTGCAGACCCCCTCCTTATACCGG CGCCTTCGGGAAGGC	„upstream“ Region von <i>pilM</i>
pilO_dw_for	ATTAGCGGCCGCAGGCGGAAACGGGAG GGAGCACCCCATGAAGAAC	„downstream“ Re- gion von <i>pilO</i>
pilO_dw_rev	CTTCAAGCTTGGCTTCCCCGCCGGGACGA CGAGGTAGCCCTC	„downstream“ Re- gion von <i>pilO</i>
pilM_ctrl_for	CGCAGGCTGGACCTCTACG	„upstream“ Region von <i>pilM</i>
pilM_ctrl_rev	CACGGATCCACGCGCTCTTC	„downstream“ Re- gion von <i>pilO</i>
pilQ_down_rev2	ATTAAAGCTTGCTCCAGTAGATGGCGTC GTGGACCTCG	„downstream“ Re- gion von <i>pilQ</i>
polyA	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	PilF Ligand

<sup>a</sup> Fett gedruckte Nukleotide sind Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, kursiv gedruckte Nukleotide codieren für Tags, unterstrichene Codone führen zu einem Aminosäureaustausch

<sup>b</sup> *bleo<sup>R</sup>*, Bleomycinresistenz-Kassette aus pWUR112

## 2.2 Kultivierung und Lagerung von Organismen

### 2.2.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli* wurde in LB-Medium (10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt) oder in 2×YT-Medium (16 g/l Trypton, 5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt). Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem Medium 1,6 % (w/v) Agar hinzugefügt.

Die Anzucht erfolgte unter Schütteln (150 Upm) bei 37 °C. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm im Spektralphotometer (U-1800, Hitachi, Düsseldorf) verfolgt. Zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme wurden die in Kapitel 2.2.3 aufgeführten Medienzusätze verwendet.

### 2.2.2 Kultivierung von *T. thermophilus*

Die Anzucht von *T. thermophilus* erfolgte standardmäßig in TM<sup>+</sup>-Medium (8 g/l Trypton, 4 g/l Hefeextrakt, 3 g/l NaCl, 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,17 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5) bei 68 °C unter Schütteln bei 150 Upm. Die Zelldichte wurde durch Messung im Spektralphotometer (U-1800, Hitachi, Düsseldorf) bei 600 nm bestimmt. Um TM<sup>+</sup>-Agarplatten herzustellen, wurde dem Medium 2 % (w/v) Agar (Bacto) hinzugefügt. Die Inkubation auf TM<sup>+</sup>-Agar erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 68 °C, in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre. Wenn erforderlich wurden dem Medium Antibiotika in den in Tabelle 2.6 angegebenen Konzentrationen zugesetzt.

### 2.2.3 Medienzusätze

Zur Selektion der Stämme wurden dem Medium, wenn erforderlich, die in Tabelle 2.6 aufgeführten Antibiotika zugesetzt. Um die Insertion von DNA in den Klonierungsvektor pUC19 zu überprüfen, wurde Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Dafür wurde dem LB-Medium nach dem Autoklavieren 0,5 mM IPTG und 40 µg/ml X-Gal zugesetzt. Agarplatten, die X-Gal oder Bleomycin enthielten, wurden unter Lichtausschluss gelagert.

**Tab. 2.6. Antibiotikakonzentrationen.**

Antibiotikum	Endkonzentration in LB-Medium [µg/ml]	Endkonzentration in flüssigem TM <sup>+</sup> -Medium [µg/ml]	Endkonzentration in TM <sup>+</sup> -Agar [µg/ml]
Ampicillin	100	-	-
Kanamycin	20	20	40
Bleomycin	3	25	40
Streptomycin	-	100	100

## 2.2.4 Lagerung von Stämmen

Zur Lagerung von *E. coli*- und *T. thermophilus*-Stämmen wurden je 700 µl einer Übernachtskultur mit 300 µl einer sterilen 50 %igen (v/v) Glycerin-Lösung vermischt und in Schraubdeckelgefäßen bei -70 °C gelagert.

## 2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Molekularbiologische Methoden wurden im Wesentlichen angewandt wie von Sambrook *et al.* (1989) beschrieben.

### 2.3.1 Klonierungstechniken

DNA wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dafür wurden folgende Polymerasen, den Herstellerangaben folgend, verwendet: „Phusion High-Fidelity DNA Polymerase“ (New England Biolabs, Ipswich), „Q5 High-Fidelity DNA Polymerase“ (New England Biolabs, Ipswich) oder „PrimeSTAR GXL DNA Polymerase“ (Takara, Saint-Germain-en-Laye). Bei Verwendung der „Phusion High-Fidelity DNA Polymerase“ wurde der mitgelieferte Puffer für GC-reiche DNA verwendet und der Reaktion wurden 3 % (v/v) DMSO zugesetzt. Starteroligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis) bezogen.

Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Ipswich) wurden ebenfalls nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Inkubationszeit variierte dabei von 2 – 16 h. Die Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte bei 80 °C für 20 min. Um die Religation von geschnittenen Plasmiden zu verhindern, wurden diese mit thermosensitiver alkaliner Phosphatase („FastAP“, Thermo Fisher Scientific, Waltham) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inaktivierung der Phosphatase bei 75 °C.

Zur Ligation von DNA wurde T4 DNA-Ligase (New England Biolabs, Ipswich) unter Zugabe von 0,5 mM ATP nach Herstellerangaben verwendet. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C.

Zur Klonierung der Plasmide pUC19- $\Delta$ TTP75::*bleo* und pUC19- $\Delta$ TTP76::*bleo* wurde der „Gibson Assembly Master Mix“ (New England Biolabs, Ipswich) nach Herstellerangaben verwendet. Bei dieser Methode werden Starteroligonukleotide so gewählt, dass miteinander zu verknüpfende PCR-Produkte homologe Enden aufweisen. Bei der Assemblierungsreaktion, die bei 50 °C stattfindet, werden die 3'-Enden der eingesetzten DNAs durch eine Exonuklease teilweise abgedaut. Die dann einzelsträngigen, homologen Bereiche lagern sich aneinander an, Lücken werden durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt und die DNA-Fragmente werden durch eine DNA-Ligase ligiert.

### 2.3.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Um einzelne Aminosäuren in einem Protein auszutauschen, wurden die entsprechenden Codone in einer PCR ausgetauscht. Dabei wurde dem „Phusion site-directed mutagenesis“ Protokoll gefolgt (New England Biolabs, Ipswich). Eines der Starteroligonukleotide wurde so erstellt, dass es das neue, für die gewünschte Aminosäure codierende Basentriplett enthält. Das zweite Starteroligonukleotid wurde so gewählt, dass es direkt neben dem ersten in entgegengesetzter Orientierung an die Matrizen-DNA bindet. Um im Anschluss an die PCR die Matrizen-DNA zu entfernen, wurde sie mit DpnI (New England Biolabs, Ipswich) verdaut. 5'-Phosphorylierung beider Starteroligonukleotide ermöglichte die Ligation direkt nach der Aufreinigung der PCR-Produkte. Die phosphorylierten Starteroligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis) bezogen.

### 2.3.3 Isolierung von DNA

Plasmide wurden aus 5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur mit dem „GenElute Plasmid Miniprep Kit“ (Sigma-Aldrich, St. Louis) nach Herstellerangaben isoliert, wobei die Elution in Wasser erfolgte. Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem „GenElute PCR Clean-Up Kit“ (Sigma-Aldrich, St. Louis).

Genomische DNA aus *T. thermophilus* wurde mittels Phenol-Chloroform Extraktion isoliert. Zunächst wurden Zellen einer 5-ml-Übernachtskultur abzentrifugiert ( $16000 \times g$ , 1 min) und anschließend in 500  $\mu$ l TE-Puffer (50 mM Tris 10 mM EDTA, pH 8,0) gelöst. Zum Zellaufschluss wurden 25  $\mu$ l einer 10 %igen (w/v) SDS-Lösung und 5  $\mu$ l Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) hinzugefügt, und das Gemisch wurde eine Stunde bei 52 °C inkubiert. Nach Zugabe von 90  $\mu$ l einer 5 M NaCl-Lösung und 75  $\mu$ l einer 10 %igen (w/v) CTAB-NaCl-Lösung (275 mM CTAB, 700 mM NaCl) wurde 20 min bei 65 °C inkubiert. Die Probe wurde 1:1 mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) durch starkes Schütteln vermischt. Nach Zentrifugation für 10 min bei  $16000 \times g$  wurde die wässrige Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt. Es folgte eine weitere Zentrifugation, die Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurde weitere zwei Male mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) im Verhältnis 1:1 gemischt und zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 0,8 Vol. Isopropanol zu der wässrigen Phase aus dieser ausgefällt. Die DNA wurde mit gekühltem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und schließlich in Wasser gelöst.

### 2.3.4 Transformation von *E. coli*

Plasmide wurden in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte basierend auf der  $\text{CaCl}_2$ -Methode von Mandel und Higa (1970). Im Einzelnen wurden Zellen einer Übernachtskultur 1:100 in LB-Medium verdünnt

und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach 2 – 3 h, bei Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,5 – 0,6, wurden 50 ml der Kultur in ein Polypropylengefäß überführt und 10 min auf Eis gekühlt. Nach einer Zentrifugation bei  $4000 \times g$ , 4 °C, für 10 min, wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 2,7 ml gekühltem 0,1 M  $CaCl_2$  gelöst. Es wurde weitere 15 min auf Eis gekühlt, bevor 2,3 ml gekühltes, 50 %iges (v/v) Glycerin zugesetzt wurde. Die Zellen wurden zu je 200 µl aliquotiert und bis zur Verwendung in flüssigem  $N_2$  eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Transformation wurde durchgeführt wie von Hanahan (1983) beschrieben, jedoch wurde während der Regenerationsphase LB-Medium verwendet.

### 2.3.5 Natürliche Transformation von *T. thermophilus* und Bestimmung der Transformationsfrequenz

Um *T. thermophilus* zu transformieren, wurden 30 µl einer in  $TM^+$ -Medium kultivierten Übernachtskultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 370 µl vorgewärmtem  $TM^+$ -Medium überführt. Es wurden ca. 5 µg DNA hinzugegeben und die Suspension wurde 30 min bei 68 °C und 1400 Upm im „Thermomixer“ (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Reagenzglas mit 3 ml  $TM^+$ -Medium überführt und weitere 3 h bei 68 °C schüttelnd (150 Upm) inkubiert, bevor auf Antibiotika-haltigem  $TM^+$ -Agar ausplattiert wurde. Kolonien waren nach ein bis zwei Tagen sichtbar.

Um die Transformationsfrequenzen verschiedener Mutanten besser vergleichen zu können, wurde die Transformierbarkeit mit exponentiell wachsenden Kulturen bestimmt. Hierfür wurden Zellen einer stationären Vorkultur in 20 ml  $TM^+$ -Medium auf eine  $OD_{600}$  von 0,2 verdünnt und bei 68 °C schüttelnd inkubiert. Bei Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,5 wurden 30 µl der Kultur in einem 2-ml-Reaktionsgefäß mit 370 µl vorgewärmtem  $TM^+$ -Medium vermischt. Es wurden 5 µg chromosomale DNA einer Streptomycin-resistenten *T. thermophilus* HB27-Mutante hinzugegeben und wie oben beschrieben bei 68 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden verschiedene Verdünnungen der Kultur auf Streptomycin-haltigem Agar ausplattiert. Um die Lebendzellzahl zu bestimmen, wurden zudem Zellen aus derselben Kultur auf  $Tm^+$ -Agar ausplattiert. Die Transformationsfrequenz wird angegeben als Transformanden/Lebendzellzahl.

### 2.3.6 Elektroporation von *T. thermophilus*

Um Plasmide in *T. thermophilus*-Zellen einzubringen, die durch Mutation von Kompetenzgenen nicht natürlich kompetent sind, wurden 20 ml  $TM^+$ -Medium mit einer Übernachtskultur der entsprechenden *T. thermophilus*-Mutante auf eine  $OD_{600}$  von 0,2 angeimpft. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ ) wurden 2 ml der Kultur abzentrifugiert ( $8000 \times g$ , 2 min). Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml einer sterilen 10 %igen (v/v) Glycerin-Lösung gewaschen und anschließend in 150 µl einer 10 %igen (v/v) Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit ca. 5 µg Plasmid-DNA versetzt und 5 min auf Eis gekühlt. Die Elektroporation erfolgte in einer Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand) bei

200  $\Omega$ , 25  $\mu$ FD und 2,5 kV. Zur Regeneration wurde die Suspension in 3 ml vorgewärmtes TM<sup>+</sup>-Medium überführt und 3 h bei 68 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Antibiotika-haltigen TM<sup>+</sup>-Agarplatten ausplattiert.

### 2.3.7 Agarosegelelektrophorese

DNA wurde durch Gelelektrophorese in 0,8 % oder 1,2 %igen (w/v) Agarose-TAE-Gelen aufgetrennt. Zur Größenabschätzung wurden die DNA-Standards „GeneRuler 1 kb Ladder“ oder „GeneRuler 100 bp Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet.

### 2.3.8 Isolierung der RNA aus *T. thermophilus*

Zur Isolation der RNA wurden zunächst 10 ml TM<sup>+</sup>-Medium mit einer *T. thermophilus* HB27-Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft. Die Zellen wurden bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ~ 2 durch Zentrifugation bei 4 °C, 5 min mit 4200 × g pelletiert. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden danach in 100  $\mu$ l TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) mit Lysozym (3 mg/ml) gelöst und zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Die dann folgenden Schritte der Aufreinigung erfolgten mit dem „Invitrap Spin Universal RNA Mini Kit“ nach Herstellerangaben (Stratec Biomedical AG, Birkenfeld Deutschland). Es wurde in 62  $\mu$ l RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Um die verbliebene DNA aus den Proben zu entfernen, erfolgte nach der RNA-Aufreinigung eine Behandlung mit „RQ1 RNase-Free DNase“ nach Herstellerangaben (Promega GmbH, Mannheim), wobei die Inkubation bei 37 °C für 1,5 h erfolgte. Zur Kontrolle auf DNA-Rückstände wurde eine PCR mit den Starterolinukleotiden TTP78Test\_for und TTP78Test\_rev durchgeführt, wobei keine PCR-Produkte entstanden.

### 2.3.9 Generierung von cDNA durch Reverse-Transkriptase (RT)-PCR

Zur Synthese komplementärer DNA (cDNA) wurde die „M-MLV Reverse Transcriptase“ (Promega GmbH, Mannheim) eingesetzt. Dafür wurden 4  $\mu$ g RNA gemeinsam mit 4  $\mu$ g hexameren Zufallsstarter-olinukleotiden („Random Primers“, Promega GmbH, Mannheim) 5 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 10  $\mu$ l Reaktionspuffer (M-MLV Reverse Transcriptase 5 × „Reaction Buffer“, Promega GmbH, Mannheim), 10  $\mu$ l RNase-freie dNTPs (10 mM), sowie 1,2  $\mu$ l RNasin (Promega GmbH, Mannheim) und 2  $\mu$ l Reverse Transkriptase hinzugegeben. Es wurde zunächst 5 min bei Raumtemperatur und anschließend 50 min bei 50°C inkubiert. Die cDNA wurde als Matrize für eine PCR mit den Starterolinukleotiden TTP78Test\_for und TTP78Test\_rev (Tab. 2.5) verwendet, um die Transkription des Gens *TTP0078* in verschiedenen Mutanten zu analysieren.

## 2.4 Analyse von Proteinen

### 2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurden 200 µl der zu untersuchenden Proteinlösung mit 1 ml Bradford-Reagenz (100 mg Coomassie Blue G250 in 50 ml Ethanol, 850 ml H<sub>2</sub>O, 100 ml Phosphorsäure, filtriert) in einer Küvette vermischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm im Photometer (U-1800, Hitachi, Düsseldorf). Die Eichgerade wurde mit 0 – 10 µg Rinderserumalbumin (BSA) erstellt.

### 2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (1951)

Die Proteinbestimmung nach Lowry (1951) wurde eingesetzt, um die Konzentrationen von Membranprotein-Lösungen zu ermitteln. Die Proteine in 100 µl wässriger Lösung wurden durch Zugabe von 20 µl einer 100 mM SDS-Lösung denaturiert. Die Probe wurde mit Lowry-Reagenz vermischt, bevor 100 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz (50 % (v/v) in H<sub>2</sub>O) hinzugegeben wurde. Nach 20 min Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktion bei 650 nm gemessen. Auch hier wurden 0 – 10 µg BSA zur Erstellung der Eichgerade verwendet.

Lowry-Reagenz:

2 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 0,1 N NaOH	24 ml
2 % (w/v) Kaliumnatriumtartrat	0,5 ml
1 % (w/v) CuSO <sub>4</sub>	0,5 ml

### 2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende Gelelektrophorese wurde mit SDS-Gelen nach Lämmli (1970) oder Schägger und Jagow (1987) durchgeführt. Als Größenstandard wurde der „PageRuler Prestained“-Marker von Thermo Fisher Scientific (Waltham) verwendet.

Um nach der Reinigung des PilMNO-Komplexes (Kapitel 2.6.3) PilN (23 kDa) und PilO-Strep (22,5 kDa) voneinander zu trennen, wurde ein 4 - 20 % „FastGene“ SDS-PAGE-Gel (Nippon Genetics Europe, Düren) mit MOPS-Laufpuffer nach Herstellerangaben verwendet.

Gele wurden mit Coomassie-Lösung (0,053 % (w/v) Coomassie Blue R250, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Schwenken in Entfärbler (30 % (v/v) Methanol, 15 % (v/v) Essigsäure) entfernt. Alternativ wurde mit „InstantBlue“ (Expedeon Inc., San Diego) gefärbt.

#### 2.4.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteinkomplexe unter nicht denaturierenden Bedingungen aufzutrennen, wurden 3 - 13 % bzw. 5 - 20 % Polyacrylamid-Gradiententengele erstellt (Tab. 2.7) (Wittig und Schägger 2005). Dafür wurden die Bestandteile des 13 %igen und des 3 %igen Trenngels bzw. des 20 %igen und des 5 %igen Gels in einen Gradientenmischer gegeben und als ca. 17 × 17 cm großes Gel gegossen. Nach dem Auspolymerisieren der Trenngele wurden diese mit dem Sammelgel überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte mit Kathodenpuffer (50 mM Tricine, 7,5 mM Imidazol, 0,02 % (w/v) DDM, 0,01 % (w/v) Na-Desoxycholat) und Anodenpuffer (25 mM Imidazol, pH 7,0) bei 4 °C. Proteine des „Amersham HMW Calibration Kit for native Electrophoresis“ (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) wurden im gleichen Puffer wie die zu untersuchenden Proteine gelöst und dienten als Größenstandard. Alle Proben wurden mit Nativ-Ladepuffer (Endkonzentration: 0,01 % (w/v) Ponceau S, 5 % (v/v) Glycerin) versetzt.

**Tab. 2.7. Zusammensetzung nativer Polyacrylamidgele.**

Bestandteil	20 % Acrylamidgel	15 % Acrylamidgel	5 % Acrylamidgel	3 % Acrylamidgel	Sammelgel
AB-Mix <sup>a</sup>	5,84 ml	4,38 ml	1,46 ml	0,88 ml	0,90 ml
3× Gelpuffer <sup>b</sup>	4,67 ml	4,67 ml	4,67 ml	4,67 ml	4,0 ml
H <sub>2</sub> O	0,7 ml	2,06 ml	7,79 ml	8,33 ml	7,1 ml
Glycerin	2,8 ml	2,8 ml	0 ml	0 ml	0 ml
APS <sup>c</sup>	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	150 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	40 µl

<sup>a</sup> AB-Mix: 48 % (w/v) Acrylamid, 1,5 % (w/v) Bisacrylamid in H<sub>2</sub>O

<sup>b</sup> 3× Gelpuffer: 75 mM Imidazol, 1,5 M 6-Aminohexansäure, 0,05 % (v/v) Triton X-100, pH 7,0

<sup>c</sup> 10 % (w/v) APS in H<sub>2</sub>O

Die Polyacrylamidgele wurden mit „Blue Silver“ (5 % (w/v) Aluminiumsulfat, 0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 10 % (v/v) Ethanol, 2 % (v/v) Phosphorsäure) oder mit „InstantBlue“ (Expedeon Inc., San Diego) gefärbt.

#### 2.4.5 Western Blot-Analyse

Western Blot-Analysen wurden durchgeführt um Proteine immunologisch nachzuweisen. Zunächst wurden Proteine mit einem halbtrockenen Transfersystem vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Blotting-Membran (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) mit 1,3 mA/cm<sup>2</sup> für 1 h übertragen. Dafür wurden zwei Anoden-nahe Whatman-Papiere in Anoden-Puffer I (20 % (v/v) Methanol, 36,4 g/l Tris, pH 10,4) getränkt. Ein weiteres Whatmanpapier und die Nitrocellulose-Membran wurden in Anoden-Puffer II (20 % (v/v) Methanol, 3 g/l Tris, pH 10,4) getränkt und drei Kathoden-nahe Whatman-Papiere in Kathoden-Puffer (20 % (v/v) Methanol, 5,2 g/l 6-Aminohexansäure, 3 g/l Tris, pH 9,4).

Nach der Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wurde diese 1 h bei Raumtemperatur oder 16 h bei 8 °C in M-PBST-Puffer (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 2,68 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, 0,05 % (v/v) Tween 20, 5 % (w/v) Magermilchpulver) geschwenkt. Anschließend wurde 1 h bei Raumtemperatur mit polyklonalem Antiserum, welches in PBST-Puffer (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 2,68 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, 0,05 % (v/v) Tween 20) verdünnt wurde, inkubiert. Die verwendeten Antiseren stammten aus Kaninchen und wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: Anti-PilF (1:7500), anti-PilM (1:5000), anti-PilN (1:5000), anti-ComZ (1:5000). Dann wurde die Membran dreimal 10 min in PBST-Puffer gewaschen, gefolgt von einer 1-h-Inkubation mit „Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-Konjugat“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) (1:10000 in PBST). Nach weiteren dreimal 10 min Waschen in PBST-Puffer, wurde die Peroxidase-Reaktion gestartet. Dafür wurde die Blotting-Membran ca. 2 min in 4 ml Lösung A (50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris, pH 8,6), 400 µl Lösung B (11 mg *p*-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO) und 2,5 µl 30 %iger (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung geschwenkt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte im „ECL ChemoStar Plus Imager“ (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) oder durch Belichtung von Röntgenfilmen (DV-B Medizinischer Universal-Röntgenfilm, Typon Röntgenfilm GmbH, Baden-Baden). Röntgenfilme wurden durch Schwenken in Entwicklerlösung (Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach) entwickelt und anschließend in Fixiererlösung fixiert (Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach).

Für die Detektion von His-Tags wurde der monoklonale Maus-Anti-His (Penta-His)-Antikörper von Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Als Sekundärantikörper diente hier „Ziege anti-Maus IgG-HRP-Konjugat“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) in einer Verdünnung von 1:10000. Proteine mit Strep-Tag wurden mit Strep-Tactin-HRP-Konjugat (Iba Lifesciences, Göttingen) detektiert. Der immunologische Nachweis wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt.

Die Übertragung von Proteinkomplexen aus nativen Polyacrylamidgelen auf eine Nitrocellulose-Blotting-Membran erfolgte in zwei Schritten. Vier Whatman-Papiere und die Membran wurden in Transferpuffer (20 % (v/v) Methanol, 125 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,6) getränkt und auf der Anodenfläche der Blottingapparatur platziert. Darauf wurden das native Gel und vier Whatman-Papiere, die in SDS-Laufpuffer (1 g/l SDS, 3,03 g/l Tris, 14,41 g/l Glycin, pH 8,5) getränkt waren, gelegt und mit der Kathodenfläche abgedeckt. Nach 1 h bei 8 V wurden die Kathoden-nahen Whatman-Papiere gegen drei Whatman-Papiere, die in Transferpuffer getränkt wurden, ausgetauscht. Nach einer weiteren Stunde bei 8 V wurde die Übertragung der Proteine durch Färben mit PonceauS (0,2 % (w/v) PonceauS, 30 % (v/v) Essigsäure) überprüft. Die dadurch sichtbaren Standardproteine wurden gekennzeichnet. Die weitere Immunodetektion erfolgte wie für denaturierte Proteine beschrieben.

## 2.5 Isolierung der Membranen von *T. thermophilus*

### 2.5.1 Isolierung der Gesamtmembran-Fraktion

Membranen von *T. thermophilus* wurden durch mechanischen Zellaufschluss und Ultrazentrifugation isoliert. Die zu analysierenden Stämme wurden in 100 ml TM<sup>+</sup>-Medium bei 68 °C schüttelnd (150 Upm) inkubiert. Bei Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 11000 × g geerntet. Anschließend wurden sie mit 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) gewaschen. Für den Zellaufschluss wurden die Zellen in 4 ml Tris-Puffer (10 mM, pH 8,0) resuspendiert. Nach zweimaliger Passage durch die „French Pressure Cell“ bei 16000 psi (American Instrument Company, Maryland) und einer 30-s-Behandlung mit der Ultraschalltauchsonde (Branson 250, Danbury; duty cycle 5, output 40 %) waren keine intakten Zellen in der Suspension durch Mikroskopieren zu detektieren. Zelltrümmer wurden durch 15 min Zentrifugation bei 4 °C und 11000 × g entfernt. Der Überstand wurde bei 150000 × g und 4 °C für 1 h ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde in Tris-Puffer resuspendiert und dann erneut zentrifugiert (150000 × g, 4 °C, 1 h) um restliche, lösliche Zellbestandteile zu entfernen. Die sedimentierte Membranfraktion wurde schließlich in 3 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> resuspendiert und dann für Western Blot-Analysen eingesetzt.

### 2.5.2 Trennung der inneren und äußeren Membran von *T. thermophilus*

Für die Bestimmung der subzellulären Lokalisation von *T. thermophilus*-Proteinen wurden Zellen in lösliche Bestandteile, innere und äußere Membran getrennt wie von Salzer (2009) beschrieben. Die *T. thermophilus*-Kultur wurde in 100 ml TM<sup>+</sup>-Medium bei 68 °C in einem Schikanekolben schüttelnd (150 Upm) inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ~ 1,5 erreicht war. Die Zellen wurden bei 4 °C und 11000 × g zentrifugiert und anschließend zweimal mit 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) gewaschen. Die Zellen wurden in 4 ml Lysepuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und dann mechanisch aufgeschlossen. Dieser Aufschluss erfolgte durch zweimalige Passage durch die „French Pressure Cell“ bei 16000 psi (American Instrument Company, Maryland) und eine 30-s-Behandlung mit der Ultraschalltauchsonde (Branson 250, Danbury; duty cycle 5, output 40 %). Dem Gemisch wurde MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration: 5 mM) zugegeben und nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 11000 × g entfernt. Der Überstand wurde durch Ultrazentrifugation (150000 × g, 4 °C, 1 h) in eine lösliche und eine unlösliche (Membranen) Fraktion getrennt. Der Überstand, also die lösliche Fraktion, wurde in neue Zentrifugationsröhrchen gefüllt und erneut zentrifugiert, um restliche Membranbestandteile zu entfernen.

Die unlösliche Fraktion wurde in 8 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst, dreimal durch eine Kanüle pipettiert und dann ebenfalls zentrifugiert (150000 × g, 4 °C, 1 h). Um danach innere und äußere Membran zu trennen, wurde das Membran-Pellet in 8 ml Laurylsarkosin-Puffer gelöst (2 % (w/v) N-

Laurylsarkosin, 10 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0) und für 10 min auf Eis inkubiert. Bei der anschließenden Ultrazentrifugation ( $150000 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 h) wurde die äußere Membran pelletiert. Der Überstand mit den Proteinen der inneren Membran wurde abgenommen und das äußere-Membranpellet wurde in 2 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  resuspendiert. Die Lagerung aller Zellbestandteile erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 2.6 Produktion und Reinigung von Proteinen

### 2.6.1 Heterologe Produktion und Reinigung von PilF-Varianten

Die heterologe Produktion von PilF erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3). 10 l Kanamycin-haltiges LB-Medium wurden mit 400 ml Übernachtskultur beimpft, so dass eine  $\text{OD}_{600}$  von ca. 0,2 entstand. Es folgte eine Inkubation im Fermenter „Biostad C“ (B. Braun Biotech International, Melsungen) bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Rühren ( $550\text{ Upm}$ ) bei einer Luftzufuhr von 8 l/min. Nach 2,5 h wurde die Expression von *pilF* durch Zugabe von 1 mM (Endkonzentration) IPTG induziert und die Inkubationstemperatur wurde auf  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  gesenkt. Nach weiteren 4 h Kultivierung wurden die Zellen durch Zentrifugation bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $11000 \times g$ , 10 min, pelletiert. Die Zellen wurden mit PilF-Puffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 7,5) gewaschen und dann in Flüssigstickstoff eingefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Etwa 35 g Zellmaterial wurden in PilF-Puffer aufgetaut. Es wurden eine Spatelspitze AEBSF-Hydrochloride (BioChem GmbH, Darmstadt) und 1 mg/ml DNase I hinzugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch zweimalige Passage durch die „French Pressure Cell“ bei 16000 psi (American Instrument Company, Maryland) und anschließende, einminütige Behandlung mit der Ultraschalltauchsonde (Branson 250, Danbury; duty cycle 5, output 50 %). *E. coli*-Proteine wurden durch 20 min Inkubation bei  $68\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefällt. Abweichend davon wurden Proben, die die PilF-Varianten PilFGSPIIA, PilFGSPIIAB, PilFGSPIIABC oder PilFGSPIIC enthielten, nur 10 bis 15 min hitzeinkubiert. Nach 20 min Zentrifugation bei  $11000 \times g$  wurde der Überstand filtriert (Porengröße:  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ ) und dann mit 7 ml Ni-NTA-Agarose bei  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in einen Säulenkörper gegeben und der Durchlauf wurde abgelassen. Die Säule wurde mit 60 ml PilF-Puffer mit 40 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte mit 12 ml PilF-Puffer mit 300 mM Imidazol. Das Eluat wurde mit einem „VivaSpin 20“ Konzentratoren (MWCO: 100 kDa) auf ca.  $500\text{ }\mu\text{l}$  ankonzentriert. Als finaler Reinigungsschritt erfolgte eine Gelfiltration über eine „Superdex 200 10/300“-Säule mittels der „ÄKTAprime plus“ (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg). Die Elution erfolgte in filtriertem und entgastem Bicine-Puffer (50 mM Bicine, 200 mM NaCl, pH 8,5) bei einer Flussrate von  $0,4\text{ ml/min}$ . Proben der gesammelten 0,5-ml-Fraktionen wurden, ebenso wie Proben aller anderen Reinigungsschritte, mittels SDS-PAGE überprüft. Die Fraktionen 17 - 21 der Gelfiltration enthielten in der Regel gereinigtes PilF, wurden vereinigt und zusammen ankonzentriert.

### 2.6.2 Heterologe Produktion und Reinigung von PilN, PilM und PilMN

Für die heterologe Produktion von His-PilM, PilN-Strep, His-PilMN-Strep und Strep-PilM wurden *E. coli* BL21 (DE3)-Stämme verwendet, die die jeweiligen rekombinanten pET28a-Plasmide enthielten. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C in Kanamycin-haltigem LB-Medium, welches mit einer Übernachtskultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft wurde. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 1 wurde die Genexpression durch Zugabe von 1 mM (Endkonzentration) IPTG induziert. Die Zellen wurden nach weiteren 4 h Inkubation bei 37 °C durch Zentrifugation geerntet (11000 × g, 8 min, 4 °C) und mit MN-Puffer (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7,5) gewaschen. Die Zellen wurden in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Etwa 30 g *E. coli*-Zellen wurden in MN-Puffer resuspendiert und 1 mg/ml DNase I und 1 mM PMSF wurden hinzugefügt. Die Zellen wurden durch zweimalige Passage durch die „French Pressure Cell“ bei 16000 psi aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 11000 × g, 4 °C für 20 min entfernt. Anschließend wurden lösliche Fraktionen und Membranen durch Ultrazentrifugation bei 150000 × g, 4 °C, 50 min voneinander getrennt. PilN und PilMN-Komplexe wurden aus den Membranen isoliert. Dafür wurde die Membranfraktion in MN-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (150000 × g, 4 °C, 50 min). Membranproteine wurden dann durch Zugabe von 1 % (w/v) DDM solubilisiert. Nach einer Inkubation bei 4 °C für 1 h wurden nicht gelöste Bestandteile durch Ultrazentrifugation abgetrennt (150000 × g, 4 °C, 50 min). Der Überstand wurde auf eine Säule mit 7 ml „Strep-Tactin Superflow High capacity“-Material (iba Lifesciences, Göttingen) geladen. Die Säule wurde mit 35 ml MN-Puffer mit 0,4 mM DDM gewaschen und anschließend wurde mit 24 ml MN-Elutionspuffer (MN-Puffer, 0,4 mM DDM, 2,5 mM D-Desthiobiotin) eluiert. Die Elutionsfraktion wurde mittels eines „VivaSpin 20“ Konzentrators (MWCO: 10 kDa (PilN) bzw. 30 kDa (PilMN)) ankonzentriert.

His-PilM wurde aus löslichen Fraktionen der *pilMN* exprimierenden *E. coli*-Zellen isoliert. Die Überstände nach der Ultrazentrifugation wurden erneut zentrifugiert (150000 × g, 4 °C, 50 min), um restliche Membranbestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde 1 h bei 4 °C mit 7 ml Ni-NTA-Agarose inkubiert. Das Gemisch wurde in einen Säulenkörper gegeben und mit 70 ml MN-Puffer mit 35 mM Imidazol gewaschen. His-PilM wurde in 15 ml MN-Puffer mit 350 mM Imidazol eluiert und anschließend ankonzentriert (MWCO: 30 kDa). Wurde das gereinigte His-PilM für ATPase-Tests mit PilF eingesetzt, enthielt der Elutionspuffer 0,4 mM DDM, da so die Pufferbedingungen in Tests mit PilMN, PilN und PilM vergleichbar waren.

Strep-PilM wurde für Interaktionsanalysen mit PilF benötigt. Die Strep-*pilM* exprimierenden Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert und aufgeschlossen. Strep-PilM wurde aus zellfreierem Rohextrakt durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie isoliert. Dabei wurde mit 7 Säulenvolumen MN-Puffer gewaschen und, wenn nicht anders angegeben, mit 3 Säulenvolumen MN-Elutionspuffer eluiert.

### 2.6.3 Heterologe Produktion und Reinigung von PilMNO

Die Koexpression von PilM, PilN, und PilO erfolgte wie von Karupiah *et al.* beschrieben (2013). Dafür wurden die mit pET28a-PilMNO transformierten *E. coli* T7 Express-Zellen in Schikanekolben mit  $2 \times$  YT-Medium bei 37 °C schüttelnd (150 Upm) kultiviert, bis eine  $OD_{600}$  von ca. 1 erreicht war. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 0,1 mM (Endkonzentration) IPTG, gefolgt von einer Inkubation bei 16 °C, 150 Upm, über Nacht. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei  $11000 \times g$ , 4 °C für 10 min geerntet und mit MNO-Puffer (25 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 5 % (v/v) Glycerin, pH 8,0) gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Der Zellaufschluss erfolgte durch zweimalige Passage durch die „French Pressure Cell“ bei 16000 psi. Die Isolierung der Membranen, Solubilisierung der Membranproteine mit 1 % (w/v) DDM und die Strep-Tactin-Affinitätschromatographie erfolgte wie für die Reinigung von PilMN beschrieben, allerdings wurde MNO-Puffer statt MN-Puffer verwendet. Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde mit einem „VivaSpin 20“ Konzentrator (MWCO: 100 kDa) ankonzentriert und dann mittels Gelchromatographie aufgetrennt. Es wurde eine „Superdex 200 (10/300)“-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) verwendet, die Equilibrierung erfolgte mit MNO-Puffer mit 0,4 mM DDM, die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Die PilMNO-haltigen Peakfraktionen wurden vereinigt und erneut ankonzentriert.

### 2.6.4 Produktion und Reinigung von ComZ aus *T. thermophilus*

Für die Reinigung von ComZ wurde der *T. thermophilus*-Stamm  $\Delta comZ::bleo + pDM12-comZ-His_9$  verwendet, der konstitutiv *comZ* mit einem C-terminalen  $His_9$ -Tag exprimiert. 1 l  $TM^+$ -Medium mit Kanamycin wurden mit einer Übernachtskultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,2 angeimpft und bei 68 °C und 150 Upm schüttelnd inkubiert. Nach ~ 20 h Wachstum und Erreichen einer  $OD_{600}$  von 5,0 wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4 °C,  $11000 \times g$ , 10 min, pelletiert, in ComZ-Puffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 5 mM  $MgSO_4$ , 5 mM CaCl, pH 8,4) gewaschen und anschließend in Flüssigstickstoff eingefroren.

Die ~ 10 g *T. thermophilus*-Zellen wurden für die Proteinreinigung in ComZ-Puffer in Anwesenheit von 1 mM PMSF und 1 mg/ml DNase I aufgetaut. Die Zellen wurden durch zweimaliges Passieren durch die „French Pressure Cell“ bei 16000 psi und Sonifizierung mit der Ultraschalltauchsonde für zweimal 45 s (Branson 250, Danbury; duty cycle 5, output 50 %) aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei  $11000 \times g$ , 4 °C entfernt. Durch Ultrazentrifugation bei  $150000 \times g$ , 4 °C für 50 min wurde die Probe in eine lösliche und eine Membranfraktion getrennt. Proteine der Membranfraktion wurden durch Inkubation mit 50 ml ComZ-Puffer mit 3 % (w/v) DDM für 2 h bei Raumtemperatur solubilisiert. Nach erneuter Ultrazentrifugation ( $150000 \times g$ , 4 °C, 50 min) wurde der Überstand 1:5 mit ComZ-Puffer verdünnt und mit 4 ml TALON-Material (Takara, Saint-Germain-en-Laye) für 1 h bei 8 °C inkubiert. Das Gemisch wurde danach in einen Säulenkörper gefüllt, und in 3 Schritten

wie folgt gewaschen: 100 ml ComZ-Puffer mit 0,4 mM DDM, dann 75 mM Imidazol in 20 ml ComZ-Puffer mit 0,4 mM DDM und dann 150 mM Imidazol in 10 ml ComZ-Puffer mit 0,4 mM DDM. Die Elution erfolgte ebenfalls in drei Schritten mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen: 250 mM Imidazol in 10 ml ComZ-Puffer mit 0,4 mM DDM, 300 mM Imidazol in 10 ml ComZ-Puffer mit 0,4 mM DDM und 600 mM Imidazol in 4 ml ComZ-Puffer mit 0,4 mM DDM. Die erste und zweite Elutionsfraktion enthielten ComZ und wurden zusammen mit einem Konzentrator (MWCO: 30 kDa) bis auf ein Volumen von 500  $\mu$ l ankonzentriert. Das Konzentrat wurde mittels Gelfiltration mit einer „Superdex 200 (10/300)“-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) aufgetrennt. Die Equilibrierung erfolgte mit ComZ-Puffer mit 0,4 mM DDM, die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Die Peakfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert, ComZ-haltige Fraktionen wurden vereinigt und ankonzentriert.

## 2.7 Analyse der Protein-Protein Interaktionen durch Koinkubation und Koelution von Strep-Tactin-Säulen

Die Interaktion zwischen PilF-Varianten und PilM, PilN, PilMN oder PilMNO wurde durch Koinkubation und Koelution an Strep-Tactin-Säulen analysiert. Die PilM-Varianten, PilN, PilMN bzw. PilMNO dienten als Köder-Proteine und wurden an eine Strep-Tactin-Säule gebunden. Dafür wurde die Reinigung der Strep-Tag-haltigen Protein(komplex)e aus 15 g *E. coli*-Zellen, wie in Kapitel 2.6.2 bzw. 2.6.3 beschrieben, bis zur Bindung der Proteine an die „Strep-Tactin Superflow High capacity“-Säulen durchgeführt, wobei 1 ml Säulenmaterial verwendet wurde. Die Säule wurde mit 5 ml MN-Puffer inkl. 0,4 mM DDM gewaschen. Anschließend wurden 500  $\mu$ g gereinigtes PilF, gelöst in 1 ml Bicine-Puffer (50 mM Bicine, 200 mM NaCl, pH 8,5, 0,4 mM DDM) hinzugegeben und es erfolgte eine Koinkubation von PilF mit dem Köder-Protein auf der Säule für 15 min bei Raumtemperatur. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit  $10 \times 1$  ml MN-Puffer inkl. 0,4 mM DDM entfernt. Die Elution erfolgte in 3 ml Elutionsbuffer (MN-Puffer mit 0,4 mM DDM und 2,5 mM D-Desthiobiotin). Die Eluate wurden mit einem „Amicon Ultracel“-Filter (MWCO: 10 kDa, Merck Millipore, Billerica) ankonzentriert und je 10  $\mu$ l wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die letzte Waschfraktion wurde im gleichen Maße ankonzentriert und auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde eine „leere“ Strep-Tactin-Säule mit 500  $\mu$ g PilF inkubiert, gewaschen und eluiert wie oben beschrieben.

## 2.8 Gelfiltration zur Bestimmung der molekularen Masse von Protein-komplexen

Um die Komplexbildung verschiedener PilF-Varianten zu untersuchen, wurden Gelfiltrationen an der „ÄKTA-FPLC“ mit „UPC-900-Detektor“ und „P-900-Pumpsystem“ (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Die „Superose 6 10/300 GL“-Säule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) wurde dafür mit Bicine-Puffer (50 mM Bicine, 200 mM NaCl, pH 8,5) equilibriert. Je 500 µg der gereinigten Proteine wurden bei einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetrennt. Zur Kalibrierung wurden Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa) und Ovalbumin (44 kDa) aus dem Gelfiltrations-Kalibrierungskit „HMW“ (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) nach Herstellerangaben verwendet. Die Proteine wurden dafür ebenfalls in Bicine-Puffer gelöst.

## 2.9 Analyse der ATP-Bindung an PilF und PilM

### 2.9.1 Bindung von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP

Um die Bindung von ATP an PilF- und PilM-Varianten zu untersuchen, wurden die entsprechenden gereinigten Proteine mit radioaktiv markiertem ATP vernetzt wie von Babst *et al.* (1998) beschrieben und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Exposition der SDS-Gele auf einer Speicherleuchtstoffolie („Storage phosphor screen“) wurde die Radioaktivität nachgewiesen.

Es wurden jeweils 1 µg (PilM) bzw. 2 µg (PilF) gereinigtes Protein in einem 20-µl-Reaktionsansatz mit 15 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP für 5 bis 10 min auf Eis inkubiert. Die Quervernetzung der Moleküle erfolgte für 10 min in ca. 5 cm Abstand zu einer UV-Lampe (254 nm). Um die Proteine zu fällen, wurden 10 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) zugesetzt und 5 min bei 16000 × g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl Aceton gewaschen und nach 2 min Zentrifugation bei 16000 × g wurde der Überstand abgenommen und das Pellet bei 37 °C getrocknet. Die Probe wurde schließlich in 15 µl SDS-Probenpuffer gelöst und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde dann für ca. 30 min bei 80 °C getrocknet (Gel-trockner Model 543, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) und für 3 bis 4 h auf den „Storage phosphor screen“ (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) aufgelegt. Die Auswertung erfolgte mit dem „Typhoon 9400 imager“ (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) und die detektierten ATP-Mengen wurden mittels des „ImageJ Analyse Tools“ (Abràmoff *et al.* 2004) verglichen.

## 2.9.2 Bestimmung des ATP-Gehalts von Proteinen

Der ATP-Gehalt von PilM und PilMN-Komplexen nach der Aufreinigung aus *E. coli* wurde mittels Luciferase-Luciferin-Reaktion bestimmt (Kimmich *et al.* 1975). Dafür wurden definierte Protein-Mengen in 80  $\mu$ l MN-Probenpuffer durch Zugabe von 10 % (w/v) TCA und 15-minütiger Inkubation auf Eis gefällt. Nach Zugabe von 11,6  $\mu$ l gesättigter  $K_2CO_3$ -Lösung und 18,6  $\mu$ l Na-*TES*-Puffer (0,4 M Na-*TES*, pH 7,4) wurde für 10 min bei  $16200 \times g$  zentrifugiert. 20  $\mu$ l des Überstandes wurden mit 250  $\mu$ l ATP-Bestimmungspuffer (5 mM  $Na_2HAsO_4$ , 4 mM  $MgSO_4$ , 20 mM Glycylglycin, pH 8) vermischt. Nach Zugabe von 5  $\mu$ l „Firefly Lantern Extract“ (Sigma-Aldrich, St. Louis) wurde die Lumineszenz für 10 s im Luminometer (LB 9509 Junior, Berthold Technologies, Bad Wildbad) gemessen. Die Kalibrierungsgerade umfasste einen Bereich von 0 bis 200 pmol ATP pro Ansatz.

## 2.10 Messung der ATP-Hydrolyse-Aktivität

### 2.10.1 Phosphat-Bestimmung mittels AAM-Reagenz

Die ATPase-Aktivität wurde bestimmt, indem das durch die ATP-Hydrolyse freigesetzte Orthophosphat über die Zeit quantifiziert wurde (Heinonen und Lahti 1981). Bei der Reaktion von Orthophosphat mit Ammoniummolybdat entsteht Phosphomolybdat, welches in Aceton gelöst im sauren Milieu eine gelbe Färbung hat, die bei 355 nm gemessen werden kann.

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität von PilF-Derivaten wurden zunächst 200  $\mu$ g gereinigtes Protein mit 1200  $\mu$ l Testpuffer (50 mM Tris, 50 mM MOPS, 50 mM Glycin, 50 mM CHES, 150 mM KCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 5 % (v/v) Glycerin, pH 9,5) 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 3 min bei 68 °C inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 30  $\mu$ l einer 100 mM  $Na_2ATP$ -Lösung (Endkonzentration im Testansatz: 2,5 mM) gestartet wurde. Nach 0, 4, 8, 12 und 16 min wurde je eine 200  $\mu$ l Probe aus dem Testansatz entnommen und mit 40  $\mu$ l einer 30 %igen (w/v) TCA-Lösung versetzt. Das dabei ausgefallene Protein wurde 7 min bei  $16400 \times g$  abzentrifugiert. 200  $\mu$ l des Überstandes wurden mit 1 ml AAM-Reagenz (50 % (v/v) Aceton, 625 mM  $H_2SO_4$ , 2,5 mM  $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ ) gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 355 nm gemessen. Die Orthophosphatkonzentration wurde mithilfe einer Eichgerade bestimmt, die mit verschiedenen  $KH_2PO_4$ -Mengen (0 - 100 nmol  $KH_2PO_4$ ) erstellt wurde. Die physikalische ATP-Hydrolyse wurde unter gleichen Bedingungen ohne Zugabe von Protein bestimmt und von den für PilF ermittelten Werten abgezogen, um nur die durch PilF katalysierte ATP-Hydrolyse zu erhalten.

### 2.10.2 Phosphat-Bestimmung mittels Malachitgrün

Die Bestimmung der Orthophosphatkonzentration mittels Malachitgrün-Test ist sensitiver als die mit AAM-Reagenz und erlaubt so auch den Einsatz von geringeren Mengen an Enzym bei der Bestimmung der ATPase-Aktivität (Itaya und Ui 1966; Henkel *et al.* 1988; Camberg und Sandkvist 2005). Wie beim Test mit AAM-Reagenz entsteht zunächst Phosphomolybdat. Malachitgrün ist bei dem verwendeten pH-Wert von unter 2 gelblich, bildet aber zusammen mit Phosphomolybdat einen blau-grünen Komplex, der spektrophotometrisch bei 650 nm nachgewiesen werden kann. Diese Technik wurde verwendet, um die Stimulation von PilF durch Zugabe verschiedener Proteine und Substanzen zu untersuchen.

Zur Messung der ATPase-Aktivität von PilF wurden 40 µg gereinigtes PilF (entspricht 66,7 pmol des Hexamers) in einem 200 µl Reaktionsansatz mit 3 mM ATP in Testpuffer (50 mM Tris, 50 mM MOPS, 50 mM Glycin, 50 mM CHES, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % (v/v) Glycerin, pH 9,5) inkubiert. Die Hydrolyse erfolgte bei 68 °C über einen Zeitraum von 15 min, wobei alle 5 min 40 µl Proben entnommen und mit 8 µl einer 30 %igen (w/v) TCA-Lösung versetzt wurden. Nach 7-minütiger Zentrifugation bei 16400 ×g wurde der Phosphatgehalt des Überstandes bestimmt. Dafür wurden 40 µl des Überstandes mit 800 µl Malachitgrün Reagenz (1,05 % (w/v) Ammoniummolybdat 0,034 % (w/v) Malachitgrün Hydrochlorid, 0,1 % (v/v) TritonX-100, 1 N HCl) für 2 min inkubiert. Es wurden 100 µl einer 34 %igen (w/v) Natriumcitrat-Lösung hinzugegeben, gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 650 nm gemessen und die Phosphatmenge wurde mit Hilfe einer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Eichkurve (0 - 16 nmol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ermittelt. Alle Messungen erfolgten in technischen Duplikaten.

Um die Stimulation der PilF ATPase-Aktivität zu untersuchen, wurden dem Reaktionsansatz verschiedene Mengen (0 pmol, 400 pmol, 667 pmol, 1,33 nmol, 2 nmol) gereinigtes PilMNO, PilMN, PilM bzw. PilN hinzugefügt. Dabei wurde die Menge an hinzugefügtem MN-Puffer inkl. 0,4 mM DDM stets gleich gehalten. Die ATPase-Aktivität von PilMNO, PilMN, PilM und PilN wurde ebenfalls analysiert, wobei jeweils 2 nmol des gereinigten Proteins bzw. Protein-komplexes eingesetzt wurden.

Cardiolipin (CL) wurde in einer Stammkonzentration von 5 mM dem Protokoll von Camberg *et al.* (2007) folgend in Lipidpuffer (20 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) gelöst. Die Lösung wurde 2 min kräftig geschüttelt, dann in Flüssigstickstoff eingefroren und 3 min bei 37 °C aufgetaut. Dies wurde zehnmal wiederholt, bis Vesikel entstanden waren. Dem PilF-ATPase-Test mit oder ohne 1,33 nmol PilMN wurde CL in einer Endkonzentration von 125 µM bzw. 250 µM hinzugefügt, bevor die Reaktion durch Zugabe von ATP gestartet wurde.

Um den Einfluss von DNA auf die PilF-Aktivität zu untersuchen, wurden 3 µg bzw. 30 µg einer 25 Nukleotide langen polyA-ssDNA (Tab. 2.5) der ATPase-Reaktion in An- oder Abwesenheit von 1,33 nmol PilMN hinzugefügt.

In einem weiteren Versuch wurden den Reaktionsansätzen 200 µM c-di-GMP (bereitgestellt von Heiko Keller, Goethe-Universität Frankfurt) beigefügt. Anschließend wurde die ATP-Hydrolyse durch PilF oder PilF + PilMN bestimmt.

## 2.11 Thermofluor-Assay

Die Thermostabilität von PilF-Komplexen wurde mittels Thermofluor-Assay unter Verwendung von „SYPRO Orange“ (Invitrogen) analysiert (Niesen *et al.* 2007). „SYPRO Orange“ bindet spezifisch an hydrophobe Bereiche von Proteinen, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffs stark zunimmt. Beim Zerfall von Proteinkomplexen oder der Denaturierung werden mehr hydrophobe Proteinbereiche für die Interaktion mit „SYPRO Orange“ frei, was als Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden kann. Die Messung erfolgte in einem 20- $\mu$ l-Ansatz mit Bicine-Puffer (50 mM Bicine, 200 mM NaCl, pH 8,5) und 10  $\mu$ g gereinigtem PilF. Zur Erhitzung und Fluoreszenzmessung (Anregung: 460 nm, Emission: 510 nm) wurde der „Rotor Gene Q5 Plex high resolution melt (HRM) Thermocycler“ von Qiagen (Hilden) verwendet. Um den Einfluss der Ligandenbindung auf die Thermostabilität der PilF-Komplexe zu untersuchen, wurden dem Ansatz 5 mM AMP-PNP oder 2,5 mM ADP hinzugesetzt. Der Thermofluor-Assay wurde in Kooperation mit Barbara Rathmann (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.) durchgeführt.

## 2.12 Isotherme Titrationskalometrie

Zur Analyse der c-di-GMP Bindung an PilF wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Jens Wöhnert (Goethe-Universität Frankfurt) isotherme Titrationskalometrie (ITC) durchgeführt. Dafür wurden 50  $\mu$ M gereinigtes PilF in Bicine-Puffer (50 mM Bicine, 200 mM NaCl, pH 8,5) in die Messzelle einer „MicroCal™ iTC<sub>200</sub>“ (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) gegeben. Je 2  $\mu$ l des Liganden, der ebenfalls in Bicine-Puffer gelöst vorlag, wurden in 120 s Intervallen injiziert. Jede Injektion erfolgte über einen Zeitraum von je 4 s. Die Referenztemperatur betrug 20 °C. Die Liganden c-di-AMP (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA), cGAMP und c-di-GMP wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer Konzentration von 800  $\mu$ M in Bicine Puffer gelöst. Die Messungen wurden von Jonas Watzel durchgeführt, die Auswertung erfolgte ebenfalls in Zusammenarbeit mit dem AK Wöhnert.

## 2.13 Elektronenmikroskopische Analyse der Pilierung

*T. thermophilus*-Zellen wurden elektronenmikroskopisch untersucht, um die Zahl der Pili zu ermitteln. Die zu analysierenden *T. thermophilus*-Stämme wurden zunächst 2 Tage bei 68 °C auf TM<sup>+</sup>-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen kultiviert. Ein ca. 0,5 cm  $\times$  0,5 cm großes Stück des bewachsenen Agars wurde ausgeschnitten und in einem ca. 5- $\mu$ l-Tropfen H<sub>2</sub>O für 2 min inkubiert. Der Agar wurde entfernt und ein entladenes Kupferraster (400 Mesh) wurde in die Zellsuspension eingetaucht, so dass es Zellen aufnahm. Das Raster wurde anschließend dreimal mit je einem Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen und überschüssiges Wasser wurde mit einem Filterpapier abgesaugt. Das beladene Kupferraster wurde mit dem

BAF 060 „freeze-fracture-system“ (BAL-TEC, Liechtenstein) bei einem Druck von  $3 - 4 \times 10^{-7}$  mbar und einer Temperatur von 28 °C schrägbedampft. Platin/Carbon wurde in einem Winkel von 25 ° bis zu 1,5 nm Dicke aufgebracht. Die Analyse der Zellen erfolgte in einem Transmissions-Elektronenmikroskop (EM 208S, FEI, USA) und wurde von R. Salzer (Goethe-Universität, Frankfurt a. M.) durchgeführt. F. Joos (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.) hat die Kupferraster vorbereitet und die Schrägbedampfung durchgeführt.

## 2.14 Analyse der „twitching motility“

„Twitching motility“, die gleitende Fortbewegung auf feuchten Oberflächen, wurde untersucht, indem *T. thermophilus*-Zellen auf BSA-haltigem Minimalmedium (

Tab. 2.8) ausgebracht wurden. Alle Lösungen wurden mit Millipore-Wasser angesetzt. Agar, Wasser, Lösung A und Lösung B wurden zunächst autoklaviert. Alle weiteren Lösungen wurden separat steril filtriert und nach dem Autoklavieren zugegeben.

**Tab. 2.8. Zusammensetzung des Minimalmediums.**

Bestandteil	Menge	Zusammensetzung	Konzentration in Stammlösung <sup>a</sup>	Endkonzentration
Lösung A (pH 8)	20 ml	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	215 mM	4,3 mM
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	92,5 mM	1,85 mM
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	945 mM	18,9 mM
		NaCl	1710 mM	34,2 mM
Lösung B	10 ml	MgCl <sub>2</sub>	60 mM	0,6 mM
		CaCl <sub>2</sub>	17 mM	0,17 mM
Lösung C	100 µl	FeSO <sub>4</sub>	216 mM	21,6 µM
		CoCl <sub>2</sub>	34 mM	3,4 µM
		NiCl <sub>2</sub>	0,85 mM	0,085 µM
Lösung D	100 µl	NaMoO <sub>4</sub>	43,2 mM	4,32 µM
Lösung E	100 µl	VO <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,6 mM	0,46 µM
Lösung F	100 µl	MnCl <sub>2</sub>	25,3 mM <sup>b</sup>	2,53 µM
Lösung G	100 µl	ZnSO <sub>4</sub>	2,1 mM	0,21 µM
Lösung H	100 µl	CuSO <sub>4</sub>	0,6 mM	0,06 µM
Vitamin-Lösung	1 ml	Thiamin	1 mg/l	1 µg/l
		Biotin	0,1 mg/l	0,1 µg/l
Hefeextrakt	1 ml		10 % (w/v)	0,01 % (w/v)
BSA	10 ml		10 % (w/v)	0,1 % (w/v)
Agar	20 g			2 % (w/v)

<sup>a</sup> Wenn nicht anders angegeben, in H<sub>2</sub>O gelöst

<sup>b</sup> MnCl<sub>2</sub> wurde in 0,01 N HCl gelöst

Die zu untersuchenden *T. thermophilus*-Zellen wurden mit einer Pipettenspitze von einer Agarplatte abgenommen und durch Einstechen der Spitze punktuell auf das Minimalmedium ausgebracht. Alternativ wurden Zellen einer stationären Kultur abzentrifugiert (16200 Upm, 1 min) und mit TM<sup>+</sup>-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 10 eingestellt. 2 bis 4 µl dieser Zellsuspension wurden dann auf das Minimalmedium aufgetropft. Die Inkubation erfolgte für 3 Tage bei 68 °C oder für 7 Tage bei 58 °C in einer geschlossenen Schale zusammen mit nassen Papiertüchern, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Um die „twitching“-Höfe besser sichtbar zu machen, wurden die Platten mit Coomassie-Lösung (0,053 % (w/v) Coomassie Blue R250, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) gefärbt. Nach ca. 10 min wurden überschüssiger Farbstoff und die Zellen abgewaschen, so dass die „twitching“-Zone als heller Hof sichtbar wurde.

## 2.15 Adhäsion von *T. thermophilus* an Plastikoberflächen

Die Fähigkeit der *T. thermophilus*-Stämme an Oberflächen zu adhären wurde an Grenzflächen von Polystyrol und flüssigem TM<sup>+</sup>-Medium untersucht, wie von Salzer *et al.* (2014c) beschrieben. Zellen einer in TM<sup>+</sup>-Medium kultivierten Übernachtskultur wurden mit TM<sup>+</sup>-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 verdünnt. Je 100 µl der Zellsuspension wurden in je drei Vertiefungen einer Mikrottestplatte (96 Well, Flachboden, Sarstedt, Nürnberg) gegeben. Die Platte wurde mit einer „Breathe-Easy“ Membran (Diversified Biotech, Boston) überzogen und dann in eine Box mit feuchten Tüchern gestellt. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 68 °C oder 58 °C. Nach der Inkubation wurde die „Breathe-Easy“ Membran entfernt und die OD<sub>600</sub> in den einzelnen Vertiefungen wurde im Photometer (SpectraMax M5, Molecular Devices, SanJose) gemessen. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgegossen und die Platte wurde zweimal je 1 min lang mit Wasser gewaschen. Die Mikrottestplatte wurde bei 68 °C getrocknet, bevor je 200 µl einer 0,1 %igen (w/v) Kristallviolett-Lösung in jede Vertiefung gegeben wurden. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgegossen und die Platte wurde dreimal je 1 min mit Wasser gespült. Während der darauffolgenden 30-minütigen Inkubation mit 200 µl Ethanol pro Vertiefung wurde das in den adhärenenden Zellen gebundene Kristallviolett gelöst. Dieses wurde durch Messung der Absorption bei 570 nm photometrisch detektiert. Der Quotient  $A_{570\text{nm}}/OD_{600\text{nm}}$  ist ein Maß für die Adhäsion.

### 3 Ergebnisse

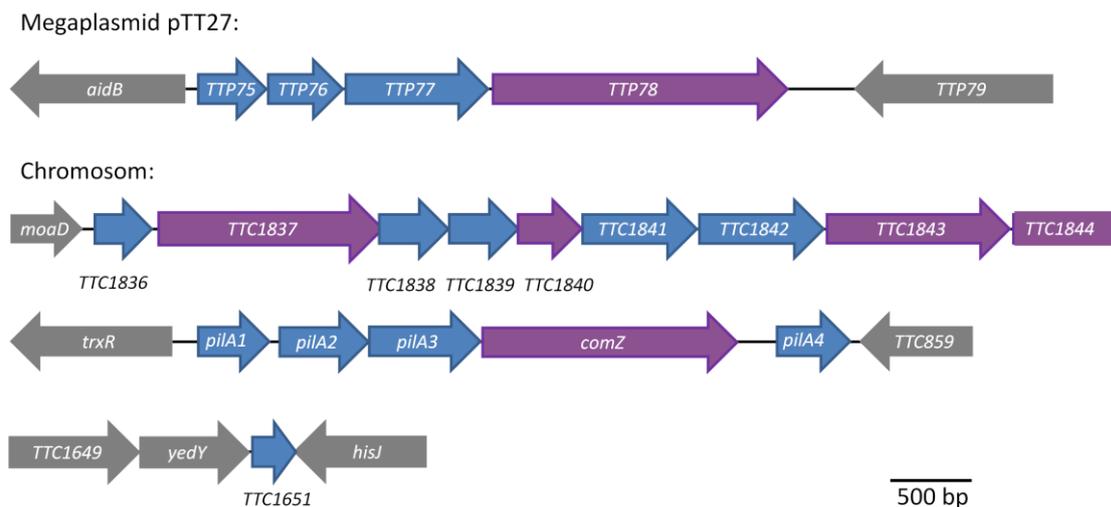
Für die natürliche Transformation von *T. thermophilus* werden mindestens 16 Proteine benötigt, die durch Mutantenstudien als Teil des DNA-Translokators identifiziert werden konnten (Averhoff 2009). Neun dieser Proteine haben eine duale Funktion und sind auch für die Assemblierung von T4P-Pili und die T4P-vermittelte gleitende Bewegung („twitching motility“) und Adhäsion an Oberflächen notwendig.

Eines dieser bifunktionalen Proteine ist die Motor-ATPase PilF, deren Domänen und Interaktionen mit anderen Komponenten des DNA-Translokators im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollen. Darüberhinaus sollte die Funktion Präpilin-ähnlicher Gene bei der natürlichen Transformation und den T4P-Funktionen analysiert werden.

#### 3.1 Die Rolle Präpilin-ähnlicher Proteine in *T. thermophilus*

In *T. thermophilus* HB27 wurden insgesamt 12 Gene in 3 verschiedenen Loci identifiziert, die für Präpilin-ähnliche Proteine codieren (Friedrich *et al.* 2003) (Abb. 3.1). Einer dieser Loci befindet sich auf dem Megaplasmid pTT27 und beinhaltet die Präpilin-ähnlichen Gene *TTP0075*, *TTP0076* und *TTP0077*, sowie das Gen *TTP0078*, die zusammen ein Operon bilden (Pahl 2017) (Abb. 3.1). Der zweite Locus befindet sich auf dem Chromosom von *T. thermophilus* HB27 und beinhaltet neben den fünf Präpilin-ähnlichen Genen *TTC1836*, *TTC1838*, *TTC1839*, *TTC1841* und *TTC1842* weitere Gene, die für Proteine mit Ähnlichkeiten zu T4P oder T2SS codieren, wie z. B. die putative Motor-ATPase *TTC1844* oder das GspF-ähnliche Protein *TTC1845*. Der dritte Locus enthält die Präpilingene *pilA1*, *pilA2*, *pilA3* und *pilA4*, die bereits gut untersucht wurden (Friedrich *et al.* 2003), sowie das Kompetenz-spezifischen Gen *comZ* (Abb. 3.1).

Alle 12 Präpilin-ähnlichen Proteine weisen die Präpilinpeptidase-Erkennungssequenz auf und haben Längen von 116 - 306 Aminosäuren und abgeleitete molekulare Massen von 11,9 - 32,9 kDa (Tab. 3.1). Die Präpilin-ähnlichen Proteine haben eher geringe Sequenzübereinstimmungen mit dem Hauptpilin PilA4, welches der Hauptbestandteil des T4P ist (Tab. 3.1). Piline bestehen aus einer C-terminalen, globulären Kopfdomäne und einer N-terminalen  $\alpha$ -Helix. Die N-terminalen Aminosäuresequenzen der Piline aus *T. thermophilus* zeigen starke Ähnlichkeiten (Abb. 3.2), während die Diversität der Kopfdomänen sehr hoch ist. Dies ist typisch für Piline (Pelicic 2008; Karuppiah *et al.* 2016). Die Proteine ComZ und TTC1651 wurden ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit analysiert (dieses Kapitel und Kapitel 3.2) und sind ebenfalls in Tabelle 3.1 aufgeführt, obwohl sie nicht die komplette Präpilinpeptidase-Erkennungssequenz beinhalten und weniger als 8 % Übereinstimmung mit PilA4 aufweisen (Tab. 3.1).



**Abb. 3.1. Organisation der Gen-Loki mit Präpilin-ähnlichen Genen.** Gene, die für Präpiline oder Präpilin-ähnliche Proteine codieren, sind blau dargestellt. Weitere Gene, die potentiell mit T4P-Funktionen oder natürlicher Transformation assoziiert sind, sind lila, alle weiteren Gene sind grau dargestellt. *aidB*, putative Acyl-CoA Dehydrogenase; *moaD*, Molybdopterin konvertierender Faktor, kleine Untereinheit; *pilA1*, *pilA2*, *pilA3*, Kompetenz-spezifische Präpilogene; *comZ*, *Thermus*-spezifisches Kompetenzgen; *pilA4*, Hauptpilinen; *trxB*, putative Thioedoxin-Reduktase; *yedY*, putative Sulfid-Oxidoreduktase; *hisJ*, putative Histidinol-Phosphatase.

**Tab. 3.1. In silico Analyse der Präpiline und Präpilin-ähnlichen Proteine.**

Präpilin	Abgeleitete Molekulare Masse (kDa) <sup>a</sup>	Länge des Proteins (AS)	Länge der Leitsequenz (AS)	Sequenz-übereinstimmung mit PilA4 <sup>b</sup> (%)
PilA4	13,9	131	6	100
TTP0075	15,6	145	4	24,8
TTP0076	16,6	159	6	19,4
TTP0077	32,9	306	6	10,1
TTC1836	11,9	116	5	22,3
TTC1838	15,6	142	4	24,7
TTC1839	16,6	150	4	21,3
TTC1841	26,2	246	4	10,7
TTC1842	30,0	279	4	11,6
PilA1	16,9	156	5	15,7
PilA2	20,6	193	4	21,0
PilA3	24,9	233	4	15,9
ComZ <sup>c</sup>	59,6	554	5 <sup>c</sup>	6,5
TTC1651 <sup>c</sup>	10,1	88	7 <sup>c</sup>	1,4

<sup>a</sup> Die molekulare Masse wurde mit dem „Compute pI/Mw tool“ des „ExpASY Bioinformatics Resource Portal“ abgeleitet (Gasteiger *et al.* 2005).

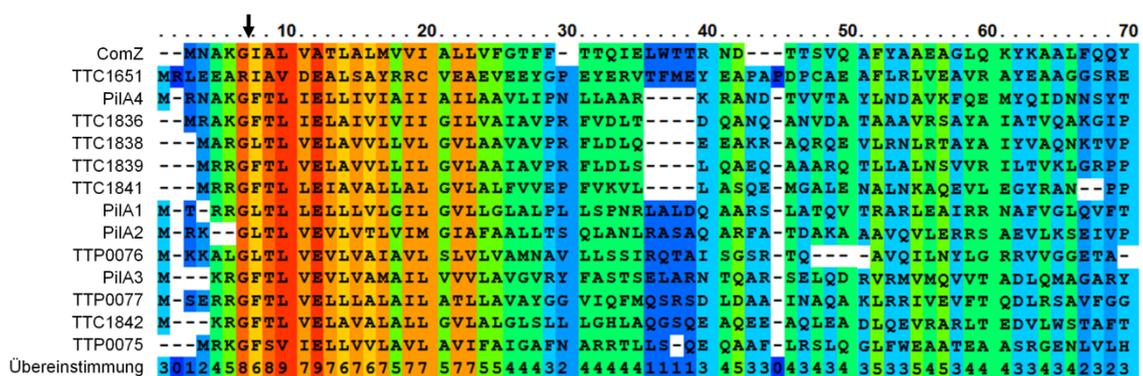
<sup>b</sup> Die Übereinstimmung („identity“) mit PilA4 aus *T. thermophilus* wurde mit „EMBOSS Needle“ des EMBLE-EBI ermittelt (Needleman und Wunsch 1970; McWilliam *et al.* 2013).

<sup>c</sup> Da ComZ und TTC1651 statt der konservierten Sequenz G<sub>-1</sub>[F/L/V/I/M]<sub>+1</sub>E<sub>+5</sub> die Aminosäuren R<sub>-1</sub>I<sub>+1</sub>E<sub>+5</sub> bzw. G<sub>-1</sub>I<sub>+1</sub>A<sub>+5</sub> tragen, ist unklar, ob es sich tatsächlich um Präpiline handelt, die prozessiert werden.

Durch Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass das Hauptpilin PilA4 und die drei Nebenpiline PilA1, PilA2, PilA3 für die natürliche Transformation benötigt werden. Die Mutation von *pilA4* führte zum Verlust der T4P, während die Deletion von *pilA1*, *pilA2* und *pilA3* keinen Einfluss auf die Bildung funktionaler T4P hatte (Friedrich *et al.* 2003).

Zellen, bei denen die Präpilin-ähnlichen Gene *TTP0075-TTP0077*, *TTC1836* oder *TTC1838* mutiert waren, bildeten weiterhin Pili und waren natürlich transformierbar (Friedrich *et al.* 2003). Jedoch wurde bei diesen Mutanten nicht getestet, ob die T4P noch funktional sind, also Adhäsion und „twitching motility“ vermitteln. Kürzlich konnte allerdings gezeigt werden, dass die Deletion von *TTP0075-TTP0077* oder die Mutation von *TTP0077* zum Verlust der „twitching motility“ und der Adhäsion an Plastikoberflächen führt, die gebildeten Pili also nicht mehr funktional sind (Pahl 2017).

Analysen der Proteinzusammensetzung abgeschorterter Pili haben bestätigt, dass PilA4 der Hauptbestandteil der T4P ist. PilA1, 2 und 3 konnten nicht detektiert werden (persönliche Kommunikation, J. Langer, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.). In den abgeschorteten Pili konnten neben PilA4 die Präpilin-ähnlichen Proteine TTC1836, TTC1838, TTC1842, TTP0075, TTP0076 und TTP0077 identifiziert werden. Zudem wurde in den abgeschorteten Pili ein bisher unbekanntes Protein, TTC1651, detektiert, welches Ähnlichkeiten zu Präpilinen aufweist. Die Gene, die *TTC1651* flankieren, codieren für eine putative Sulfit-Oxidoreduktase und eine putative Histidinol-Phosphatase (Abb. 3.1), zeigen also keinen Zusammenhang mit T4P. TTC1651 ist ein sehr kleines Protein (Tab. 3.1). Es enthält die in der Präpilinpeptidase-Erkennungssequenz (G<sub>-1</sub>, [F/L/V/I/M]<sub>+1</sub>, E<sub>+5</sub>, wobei die Zahlen die Position relativ zu der Präpilinpeptidase-Schnittstelle angeben) konservierten Aminosäuren I<sub>+1</sub> und E<sub>+5</sub>, aber nicht das konservierte G<sub>-1</sub>, das für die Prozessierung durch die Präpilinpeptidase benötigt würde (Abb. 3.2). Bei TTC1651 handelt es sich also vermutlich nicht um ein Präpilin, aber möglicherweise um ein Pilus-assoziiertes, Präpilin-ähnliches Protein.



**Abb. 3.2. Sequenzabgleich der N-Termini Präpilin-ähnlicher Proteine aus *T. thermophilus* HB27.** Die N-terminalen Aminosäuresequenzen der Präpiline und Präpilin-ähnlichen Proteine PilA1, PilA2, PilA3, PilA4, TTC1836, TTC1838, TTC1839, TTC1841, TTC1842, TTC1651, TTP0075, TTP0076, TTP0077 und ComZ wurde mit Hilfe des IBIVU PRALINE „multiple sequence alignment tool“ (Simossis und Heringa 2003) verglichen. Die Übereinstimmung der Aminosäuren innerhalb der abgeglichenen Sequenzen ist farblich markiert. Die Präpilinpeptidase-Schnittstelle ist durch einen Pfeil markiert.

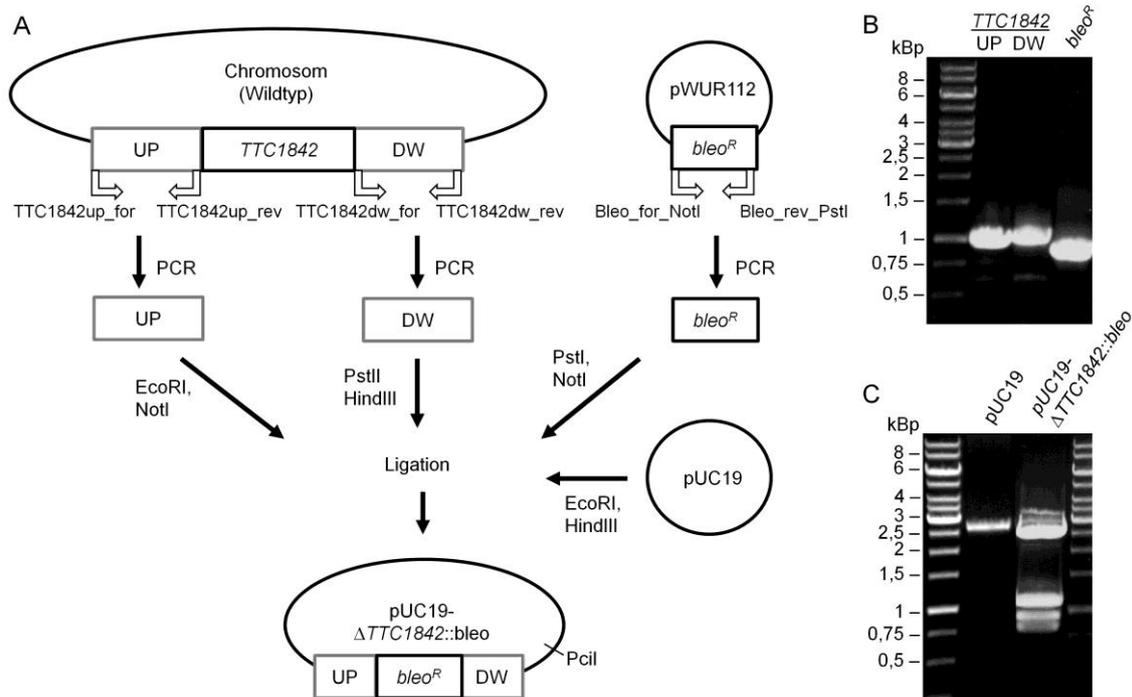
*T. thermophilus*-Zellen, die bei 55 °C statt bei 68 °C kultiviert wurden, zeigten eine stärkere Pilierung und deutlich stärkere Adhäsion an Plastikoberflächen (Salzer *et al.* 2014c). Der Vergleich von Pilus-Fractionen von Zellen die bei 58 °C kultiviert wurden mit Zellen, die bei 68 °C kultiviert wurden, zeigte, dass der Anteil der Präpilin-ähnlichen Proteine TTC1842, TTC1651, TTP0075, TTP0076, und TTP0077 bei 58 °C erhöht war (persönliche Kommunikation J. Langer, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob sich die Mutation bzw. Deletion der Präpilin-ähnlichen Gene *TTC1836*, *TTC1842*, *TTC1651*, *TTP0075* oder *TTP0076* auf die „twitching motility“ und die Adhäsion an Oberflächen bei verschiedenen Temperaturen auswirkt. Da für die Gene *TTC1842*, *TTC1651*, *TTP0075* und *TTP0076* bisher keine (Einzel-)Mutanten vorliegen, mussten diese Gene zunächst deletiert werden.

### 3.1.1 Deletion von *TTC1842*, *TTC1651*, *TTP0075* und *TTP0076*

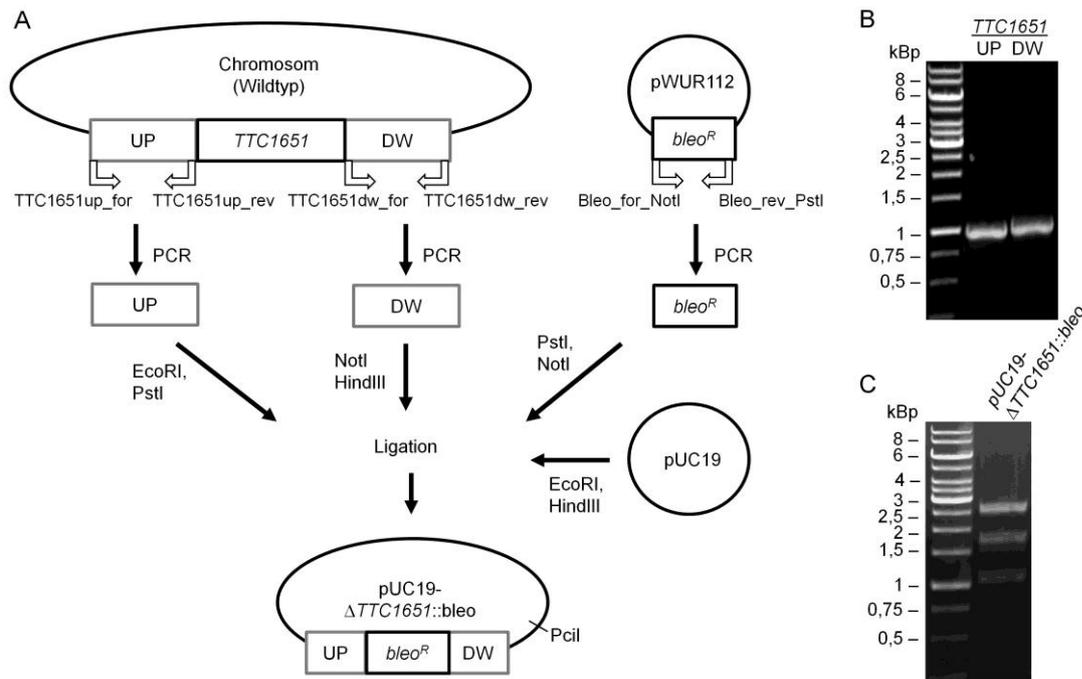
Die Deletion eines Gens in *T. thermophilus* kann durch den Austausch des betreffenden Gens gegen einen Selektionsmarker, in diesem Fall eine Bleomycinresistenz (*bleo*<sup>R</sup>)-Kassette, erfolgen. Dafür wird zunächst ein Plasmid erstellt, das sich nicht in *T. thermophilus* repliziert und das den Selektionsmarker zwischen zwei ~ 1000 Bp DNA-Bereichen trägt. Diese DNA-Bereiche entsprechen der DNA, die das zu deletierende Gen im *T. thermophilus*-Genom flankiert, und werden im Folgenden als UP- und DW-Region bezeichnet (für „upstream“ und „downstream“). An diesen UP- und DW-Regionen kann es in *T. thermophilus* zu einer doppelt-homologen Rekombination mit den entsprechenden DNA-Abschnitten im Genom kommen, wodurch die dazwischenliegenden Gene ausgetauscht werden. Durch die Selektion auf Bleomycinresistenz wird dann die Deletionsmutante isoliert.

Abbildung 3.3 A zeigt die einzelnen Schritte zur Erstellung des Plasmides pUC19- $\Delta$ *TTC1842::bleo*, welches zur Deletion von *TTC1842* genutzt wurde. Die UP- und DW-Region wurde mit genomischer *T. thermophilus*-DNA als Matrize amplifiziert. Dazu wurden die Starteroligonukleotide TTC1842up\_for und TTC1842up\_rev bzw. TTC1842dw\_for und TTC1842dw\_rev (Tab. 2.5) verwendet. Die *bleo*<sup>R</sup>-Kassette wurde mit den Starteroligonukleotiden Bleo\_for\_NotI und Bleo\_rev\_PstI am Plasmid pWUR112 amplifiziert. Die Größen der PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese bestätigt (Abb. 3.3 B). Die UP-Region wurde dann mit EcoRI und NotI verdaut, die DW-Region mit PstI und HindIII und die *bleo*<sup>R</sup>-Kassette mit PstI und NotI. Zudem wurde das Plasmid pUC19 mit EcoRI und HindIII geschnitten und dann gelelektrophoretisch überprüft (Abb. 3.3 C).



**Abb. 3.3. Klonierungsschema zur Erstellung von pUC19- $\Delta$ TTC1842::bleo und Überprüfung des rekombinanten Plasmides im Agarosegel.** Schema der Erstellung von pUC19- $\Delta$ TTC1842::bleo (A). Die *TTC1842*-flankierenden DNA-Regionen wurden mit den in Tab. 2.5 angegebenen Starteroligonukleotiden amplifiziert. Für die UP-Region von *TTC1842* wurde dabei ein PCR-Produkt der Größe 956 Bp erwartet, für die DW-Region ein 973-Bp-Produkt (B, Spur 2 und 3). Die *bleo<sup>R</sup>*-Kassette wurde ebenfalls amplifiziert, wobei ein Produkt der Größe 817 Bp erwartet wurde (B, Spur 4). Der Vektor pUC19 wurde mit EcoRI und HindIII geschnitten, wobei ein 2637-Bp-Fragment entstehen sollte (C, Spur 2). Das erstellte Plasmid pUC19- $\Delta$ TTC1842::bleo wurde zur Kontrolle mit EcoRI und HindIII verdaut. Es wurden vier Fragmente der Größen 2635, 1072, 884 und 780 Bp erwartet (C, Spur 3, siehe auch Abb. A1 im Anhang). Die DNA wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Als Größenstandard wurde die „GeneRuler 1 kb Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet (B und C, Spur 1).

Die vier DNA Fragmente wurden miteinander ligiert und in *E. coli* 10-beta transformiert. Transformanten wurden auf Ampicillin-haltigem LB-Medium selektioniert, das Plasmid pUC19- $\Delta$ TTC1842::bleo (Plasmidkarte im Anhang, Abb. A1) wurde aus den Ampicillin-resistenten *E. coli*-Zellen isoliert und durch Verdau mit EcoRI und HindIII überprüft. Dabei entstanden vier DNA Fragmente der erwarteten Größen 2635, 1072, 884 und 780 Bp (Abb. 3.3 C).

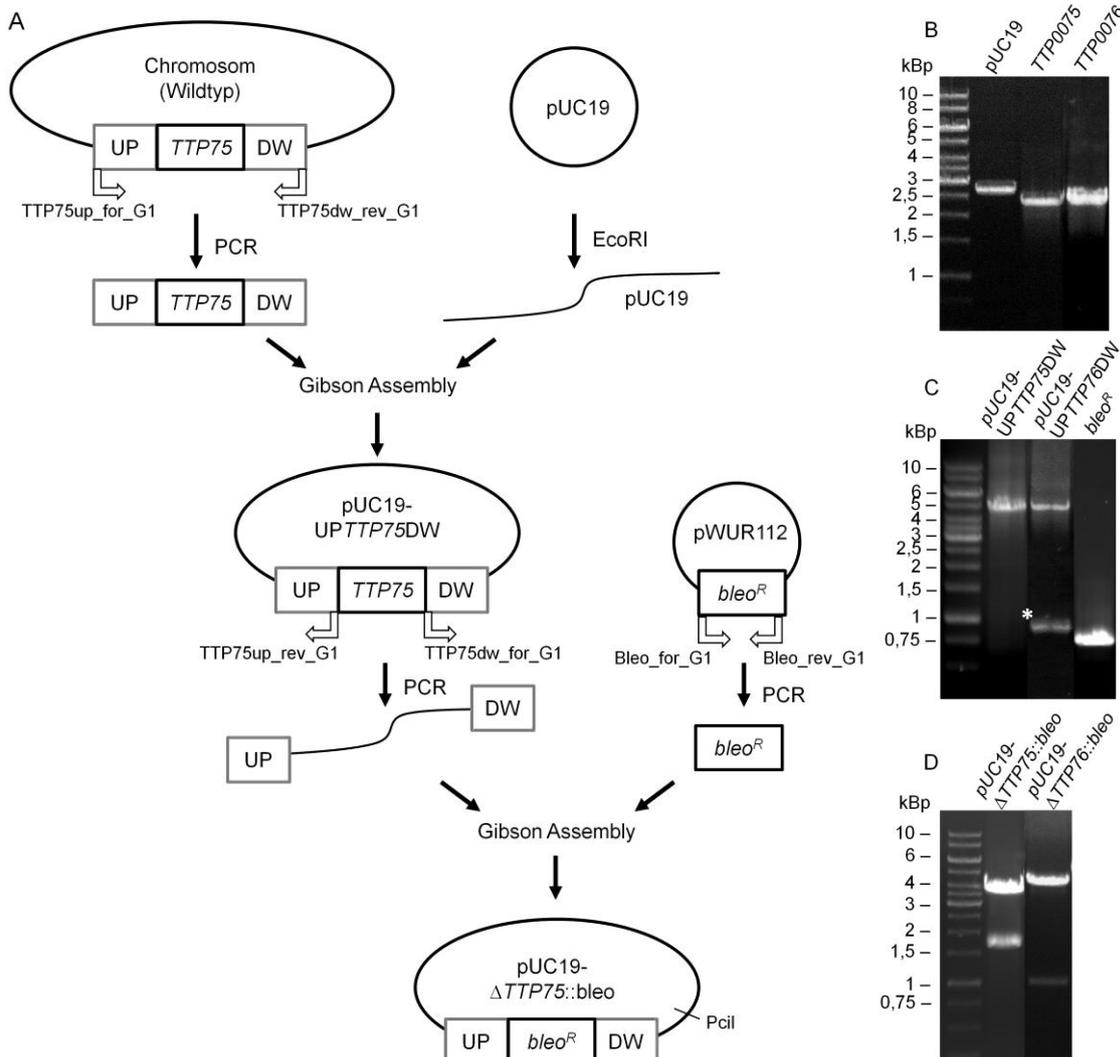


**Abb. 3.4. Klonierungsschema zur Erstellung von pUC19- $\Delta$ TTC1651::bleo und Überprüfung des rekombinanten Plasmides im Agarosegel.** Schema der Erstellung von pUC19- $\Delta$ TTC1651::bleo (A). Die DNA-Regionen, die *TTC1651* flankieren, wurden mit den in Tab. 2.5 angegebenen Starteroligonukleotiden amplifiziert. Für die UP-Region von *TTC1651* wurde ein PCR-Produkt der Größe 997 Bp erwartet, für die DW-Region ein 1019-Bp-Produkt (B). Für die Klonierung wurde die gleiche *bleo<sup>R</sup>*-Kassette und das gleiche mit EcoRI und HindIII verdaute pUC19 verwendet, wie für die Erstellung von pUC19- $\Delta$ TTC1842::bleo. Das erstellte, rekombinante Plasmid pUC19- $\Delta$ TTC1651::bleo wurde zur Kontrolle mit EcoRI und HindIII verdaut (Plasmidkarte mit Restriktionsschnittstellen im Anhang, Abb. A2). Dabei wurden drei Fragmente der Größen 2635, 1727 und 1063 Bp erwartet (C). Die DNA wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Als Größenstandard wurde die „GeneRuler 1 kb Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet (B und C, Spur 1).

Die Klonierung von pUC19- $\Delta$ TTC1651::bleo erfolgte auf die gleiche Weise unter Verwendung der *TTC1651*-spezifischen Starteroligonukleotide (Tab. 2.5), wie in Abbildung 3.4 dargestellt. Nach der Amplifikation wurde die UP-Region mit EcoRI und PstI verdaut und die DW-Region mit NotI und HindIII. Abbildungen 3.4 B zeigt, dass die PCR-Produkte den erwarteten Größen von 997 und 1019 Bp entsprachen. Zur Überprüfung des rekombinanten Plasmides pUC19- $\Delta$ TTC1651::bleo wurde dieses mit EcoRI und HindIII verdaut, wobei die drei erwarteten Fragmente der Größen 2635, 1727 und 1063 Bp entstanden (Abb. 3.4 C, Plasmidkarte im Anhang, Abb. A2).

Für die Deletion der Megaplasmid-codierten Gene *TTP0075* und *TTP0076* wurden ebenfalls pUC19-basierte Plasmide erstellt. Dies erfolgte jedoch in zwei Schritten, wie in Abbildung 3.5 A dargestellt. Für die Erstellung von pUC19- $\Delta$ TTP75::bleo wurde pUC19 mit EcoRI geschnitten und *TTP075* wurde inklusive der UP- und DW-Region mit den Starteroligonukleotiden TTP75up\_for\_G1 und TTP75dw\_rev\_G1 an genomischer DNA amplifiziert (Abb. 3.5 B, Spur 2 und 3). Die beiden DNA-Fragmente wurden durch „Gibson Assembly“ miteinander zum Plasmid pUC19-UP*TTP75*DW verknüpft. Dieses Plasmid diente als Matrize für eine PCR mit den

Starteroligonukleotiden TTP75up\_rev\_G1 und TTP75dw\_for\_G1, wobei das ganze Plasmid mit Ausnahme des zu deletierenden Gens amplifiziert wurde.



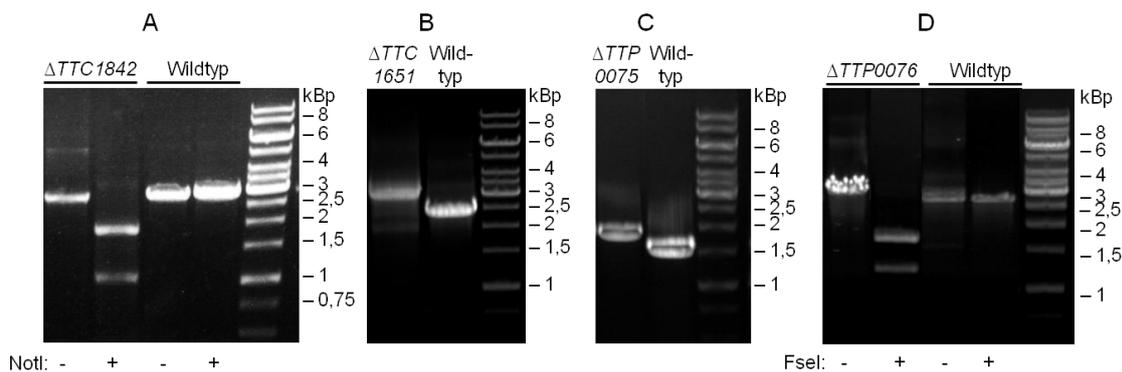
**Abb. 3.5. Klonierungsschema zur Erstellung von pUC19-ΔTTP0075::bleo und pUC19-ΔTTP0076::bleo und Überprüfung der rekombinanten Plasmide mit Agarosegelelektrophorese.** Schema der Erstellung von pUC19-ΔTTP0075::bleo (A). Das zur Deletion von TTP0076 genutzte Plasmid pUC19-ΔTTP0076::bleo wurde auf die gleiche Art erstellt. Das 2686-Bp-Plasmid pUC19 wurde mit EcoRI linearisiert (B, Spur 2). Bei der Amplifikation von TTP0075 inklusive der flankierenden Bereiche wurde ein 2384-Bp-Produkt erwartet, bei der Amplifikation von TTP0076 inklusive der flankierenden Bereiche ein 2630-Bp-Produkt (B, Spur 3 und 4). Das jeweilige PCR-Produkt wurde durch „Gibson Assembly“ mit pUC19 verknüpft, so dass pUC19-UP TTP75 DW bzw. pUC19-UP TTP76 DW entstanden. Diese Plasmide wurden als Matrize für PCRs verwendet, bei denen nur das zu deletierende Gen nicht amplifiziert wurde. Die erwarteten Größen der PCR-Produkte waren 4652 Bp für pUC-UP TTP75 DW (C, Spur 2) und 4577 Bp für pUC-UP TTP76 DW (C, Spur 3). In Abbildung 3.5 C, Spur 3 ist zudem ein unspezifisches Nebenprodukt der PCR zu erkennen (\*). Die 750 Bp lange bleo<sup>R</sup>-Kassette wurde mit den Starteroligonukleotiden Bleo\_for\_G1 und Bleo\_rev\_G1 amplifiziert (C, Spur 4) und mit dem jeweiligen amplifizierten Plasmid fusioniert. Die erstellten Plasmide wurden zur Kontrolle verdaut (Plasmidkarten mit Restriktionsschnittstellen im Anhang, Abb. A3 und A4). Beim Verdau von pUC19-ΔTTP75::bleo mit FseI und SphI wurden Fragmente der Größen 1664 und 3690 Bp erwartet (D, Spur 2), beim Verdau von pUC19-ΔTTP76::bleo mit DraIII Fragmente der Größen 959 und 4303 Bp (D, Spur 3). Als Größenstandard wurde die „GeneRuler 1 kb Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet (B, C, D, Spur 1).

Die *bleo<sup>R</sup>*-Kassette wurde mit den Starteroligonukleotiden *Bleo\_for\_G1* und *Bleo\_rev\_G1* amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese überprüft (Abb. 3.5 C, Spur 2 und 4) und durch „Gibson Assembly“ miteinander fusioniert. Das erstellte Plasmid *pUC19-ΔTTP75::bleo* wurde durch Verdau mit *FseI* und *SphI* überprüft, wobei die zwei erwarteten Restriktions-Produkte (1664 und 3690 Bp) entstanden (Abb. 3.5 D, Spur 2). Die Plasmidkarte von *pUC19-ΔTTP75::bleo* im Anhang zeigt die Positionen der verwendeten Restriktionsschnittstellen (Abb. A3)

Das Plasmid *pUC19-ΔTTP76::bleo* wurde auf die gleiche Weise erstellt. Hier wurden die Starteroligonukleotide *TTP76up\_for\_G1* und *TTP76dw\_rev\_G1* (Tab. 2.5) zur Amplifikation von *TTP0076* mit flankierenden Bereichen genutzt (Abb. 3.5 B, Spur 4). Das PCR-Produkt wurde mit durch *EcoRI*-Verdau linearisiertem *pUC19* verknüpft, so dass das Plasmid *pUC19-UP/TTP76DW* entstand. Dieses diente als Matrize für eine PCR mit den Starteroligonukleotiden *TTP76up\_rev\_G1* und *TTP76dw\_for\_G1* (Abb. 3.5 C, Spur 3). Durch Fusion des PCR-Produktes mit der *bleo<sup>R</sup>*-Kassette mittels „Gibson Assembly“ entstand das Plasmid *pUC19-ΔTTP76::bleo*, welches durch Verdau mit *DraIII* verifiziert wurde (Abb. 3.5 D, Spur 3, Plasmidkarte im Anhang, Abb. A4).

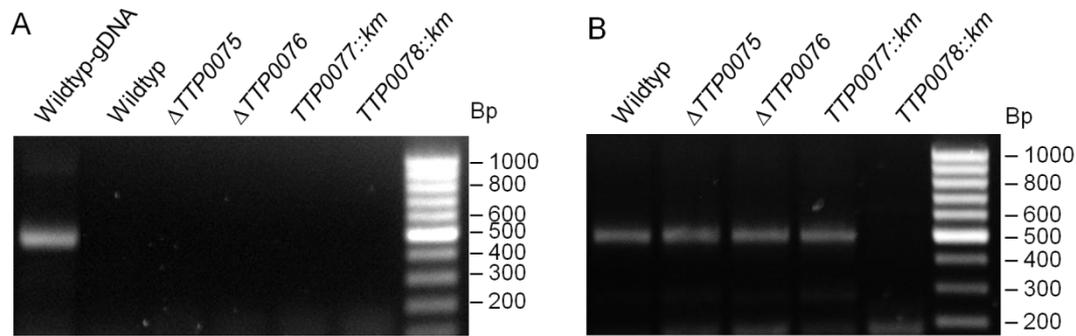
Zur Deletion von *TTC1842*, *TTC1651*, *TTP0075* und *TTP0076* wurden die entsprechenden *pUC19*-Plasmide mit *PciI* linearisiert. Die *PciI*-Restriktionsschnittstellen sind in den Klonierungsschemata in den Abbildungen 3.3, 3.4 und 3.5 und in den Plasmidkarten (Anhang: Abb. A1 - A4) eingezeichnet. Die linearisierten Plasmide wurden in *T. thermophilus* HB27 transformiert. Transformanten wurden auf Bleomycin-haltigem *TM<sup>+</sup>*-Medium selektiert. Um den Austausch der jeweiligen Gene gegen die *bleo<sup>R</sup>*-Kassette zu überprüfen, wurde die genomische DNA der Transformanten isoliert und als Matrize für Kontroll-PCRs verwendet. Die Starteroligonukleotide (siehe Tab. 2.5) wurden dabei so gewählt, dass sie je 10 bis 100 Bp vor der UP-Region bzw. nach der DW-Region binden. Zum Vergleich wurde jede PCR auch mit genomischer DNA des Wildtyps durchgeführt. Die PCR-Produkte der Überprüfung von *ΔTTC1651* und *ΔTTP0075* hatten die erwarteten Größen von 2881 Bp bzw. 1870 Bp und unterschieden sich deutlich von den Produkten, die mit Wildtyp-DNA entstanden (Abb. 3.6 B, C).

Die PCR-Produkte der Überprüfung von *ΔTTC1842* und *ΔTTP0076* hatten eine ähnliche Größe wie die für den Wildtyp erwarteten PCR-Produkte (Abb. 3.6 A und D, jeweils Spur 1 und 3). Deshalb wurden sie mit *NotI* bzw. *FseI* geschnitten. Erkennungssequenzen dieser Restriktionsenzyme befinden sich in der *bleo<sup>R</sup>*-Kassette, nicht aber in dem jeweiligen, zu deletierenden Gen. Da das Produkt der *ΔTTC1842*-Kontroll-PCR durch *NotI* in die zwei erwarteten Fragmente (1808 und 1004 Bp) geteilt wurde, ebenso wie das *ΔTTP0076*-PCR-Produkt durch den Verdau mit *FseI* (1730 und 1266 Bp), wurde die Deletion dieser Gene bestätigt (Abb. 3.6 A, D, jeweils Spur 2).



**Abb. 3.6. Überprüfung der erstellten Deletionsmutanten durch Auftrennung von PCR-Produkten der Mutationsorte im Agarosegel.** Die genomische DNA der Deletionsmutanten  $\Delta TTC1842$  (A),  $\Delta TTC1651$  (B),  $\Delta TTP0075$  (C) und  $\Delta TTP0076$  (D) wurde isoliert und der Austausch der Präpilingene gegen die *bleo<sup>R</sup>*-Kassette wurde mittels PCR überprüft (A, B, C, D, jeweils Spur 1). Dazu wurden jeweils die in Tab. 2.5 aufgelisteten Checkxxxx\_for- und Checkxxxx\_rev-Oligonukleotide (wobei xxxx für den jeweiligen, deletierten Genlokus steht) verwendet. Zum Vergleich wurde die gleiche PCR jeweils mit genomischer DNA des Wildtyps als Matrize durchgeführt (A, Spur 3; B, Spur 2; C, Spur 2; D, Spur 3). Die PCR-Produkte, die bei der Überprüfung der Genloki *TTC1842* und *TTP0076* entstanden, wurden zudem mit NotI bzw. FseI verdaut, um den Unterschied zum Wildtyp-Lokus deutlich zu machen (A, Spur 2 und 4; D, Spur 2 und 4). Die erwarteten Größen der PCR-Produkte waren: A, Spur 1: 2812 Bp ( $\Delta TTC1842$ , unverdaut), A, Spur 2: 1808 und 1004 Bp ( $\Delta TTC1842$ , verdaut), A, Spur 3 und 4: 2842 Bp (Wildtyp, unverdaut und verdaut); B, Spur 1: 2881 Bp ( $\Delta TTC1651$ ), B, Spur 2: 2311 Bp (Wildtyp); C, Spur 1: 1870 Bp ( $\Delta TTP0075$ ), C, Spur 2: 1535 (Wildtyp); D, Spur 1: 2998 Bp ( $\Delta TTP0076$ , unverdaut), D, Spur 2: 1730 und 1268 Bp ( $\Delta TTP0076$ , verdaut), D, Spur 3 und 4: 2750 Bp (Wildtyp, unverdaut und verdaut). Als Größenstandard wurde die „GeneRuler 1 kb Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet (A und D, Spur 5, B und C, Spur 3).

Um polare Effekte in den Mutanten  $\Delta TTP0075::bleo$  und  $\Delta TTP0076::bleo$  auszuschließen, wurde die Transkription des Gens *TTP0078* überprüft. *TTP0078* ist stromabwärts im gleichen Operon wie *TTP0075* und *TTP0076* codiert und spielt ebenfalls eine Rolle bei T4P-assoziierten Funktionen (Pahl 2017). Die RNA der Mutanten  $\Delta TTP0075::bleo$ ,  $\Delta TTP0076::bleo$ , sowie  $TTP0077::km$  wurde isoliert. RNA aus Wildtyp-Zellen diente als Positivkontrolle, RNA aus  $TTP0078::km$  als Negativkontrolle. Durch eine PCR mit den Starteroligonukleotiden TTP78Test\_for und TTP78Test\_rev (Tab. 2.5) wurde die RNA auf DNA-Reste untersucht. Dabei entstanden keine PCR-Produkte, während bei einer PCR, für die genomische DNA als Matrize verwendet wurde, das erwartete 485-Bp-Produkt entstand (Abb. 3.7 A). Somit konnte eine Verunreinigung der RNA mit DNA ausgeschlossen werden. Die Starteroligonukleotide TTP78Test\_for und TTP78Test\_rev binden im hinteren Bereich des Gens *TTP0078*, ab dem Nukleotid 1319 bzw. 1781 des 1902 Nukleotide langen Gens. Durch Reverse-Transkriptase-PCR an der isolierten RNA und anschließende PCR mit TTP78Test\_for und TTP78Test\_rev wurde die Transkription von *TTP0078* in den Stämmen  $\Delta TTP0075$ ,  $\Delta TTP0076$  und  $TTP0077::km$  bestätigt. Hier entstanden, ebenso wie bei der Wildtyp-cDNA, PCR-Produkte der Größe 485 Bp, während kein Produkt bei der PCR an  $TTP0078::km$ -cDNA entstand (Abb. 3.7 B). Da *TTP0078* in  $\Delta TTP0075::bleo$  und  $\Delta TTP0076::bleo$  vergleichbar stark exprimiert wurde wie im Wildtyp, konnten polare Effekte in den beiden Mutanten ausgeschlossen werden.



**Abb. 3.7. Analyse der Transkription des Gens *TTP0078* in den Mutanten  $\Delta TTP0075$ ,  $\Delta TTP0076$  und *TTP0077::km*.** Aus stationären Kulturen der angegebenen Stämme wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit DNase I inkubiert. Durch eine PCR mit den Starteroligonukleotiden TTP78Test\_for und TTP78Test\_for (Tab. 2.5), konnte ausgeschlossen werden, dass die RNA-Proben mit DNA verunreinigt waren (A, Spuren 2 - 6), da keine PCR-Produkte entstanden. Genomische DNA (gDNA) des Wildtyps diente als Positivkontrolle und führte zu dem erwarteten PCR-Produkt der Größe 485 Bp (A, Spur 1). Anschließend diente die RNA als Matrize für eine Reverse-Transkriptase-PCR. Jeweils 4  $\mu$ g der entstandenen cDNA wurden als Matrize für eine PCR mit den Starteroligonukleotiden TTP78Test\_for und TTP78Test\_for verwendet. Je 10  $\mu$ l der PCR-Produkte wurden in einem 1,2 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (B). Als Größenstandard wurde die „GeneRuler 100 bp Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet (A, Spur 7, B, Spur 6).

Polare Effekte auf T4P-assoziierte Funktionen in der  $\Delta TTC1651::bleo$ -Mutante sind sehr unwahrscheinlich, da die *TTC1651*-flankierenden Gene für eine putative Sulfit-Reduktase und eine putative Histidinol-Phosphatase codieren (Abb. 3.1) und diese Proteine nicht mit der T4P-Biogenese oder -Dynamik verknüpft sind. In den Mutanten  $\Delta TTC1651::bleo$  und  $\Delta TTC1842::bleo$  wurde die *bleo<sup>R</sup>*-Kassette in das Genom eingebracht, die in vorangegangenen Arbeiten keine polaren Effekte hatte (Salzer *et al.* 2014b). Um polare Effekte in  $\Delta TTC1842::bleo$  und  $\Delta TTC1651::bleo$  gänzlich auszuschließen, müssten diese Mutanten komplementiert und anschließend phänotypisch analysiert werden.

Neben den bereits aus vorangegangenen Untersuchungen zur Verfügung stehenden Mutanten *TTC1836::km* und *TTP0077::km* (Friedrich *et al.* 2002, 2003) standen somit nun für die phänotypischen Untersuchungen auch die Deletionsmutanten  $\Delta TTC1842$ ,  $\Delta TTC1651$ ,  $\Delta TTP0075$  und  $\Delta TTP0076$  zur Verfügung.

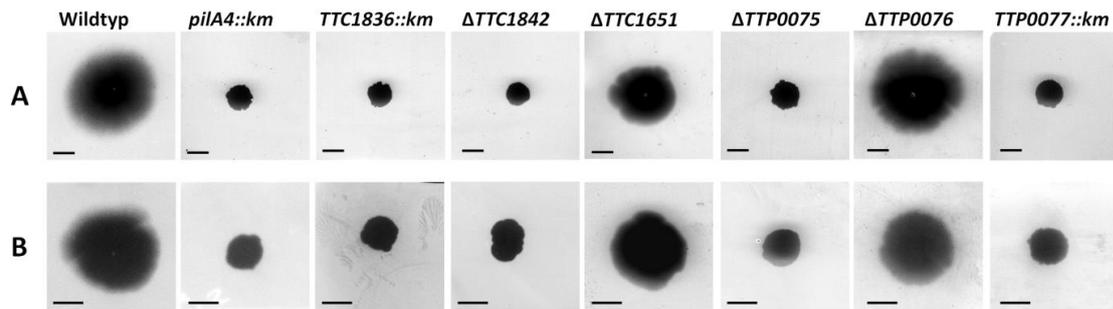
### 3.1.2 Phänotypische Analysen der Präpilin-Mutanten

Bisher sind PilA1, PilA2 und PilA3 die einzigen Nebenciline, für die gezeigt wurde, dass sie für die natürliche Transformation von *T. thermophilus* essentiell sind (Friedrich *et al.* 2003). Nun sollte anhand der neu erstellten Mutanten überprüft werden, ob die Pilin-ähnlichen Proteine TTC1842, TTC1651, TTP0075 und TTP0076 auch eine Rolle bei der natürlichen Transformation spielen.

Exponentiell wachsende Kulturen der Mutanten wurden mit genomischer DNA eines Streptomycin-resistenten *T. thermophilus*-Stammes inkubiert. Nach einer dreistündigen Regenerationszeit wurden die Zellen auf Streptomycin-haltigen TM<sup>+</sup>-Agarplatten ausplattiert. Um die Lebendzellzahl zu bestimmen, wurden die Kulturen gleichzeitig auf TM<sup>+</sup>-Agar ohne Antibiotika ausgebracht. Als Kontrolle diente der *T. thermophilus*-Wildtyp und die nicht transformierbare Mutante *pilA4::km*. Der Wildtyp wies eine Transformationsfrequenz von  $4,04 \times 10^{-4}$  Transformanden/Lebendzellzahl auf, während keine Transformande bei *pilA4::km* detektiert wurde. Die Transformationsfrequenzen der Deletionsmutanten  $\Delta TTC1842$ ,  $\Delta TTC1651$ ,  $\Delta TTP0075$  und  $\Delta TTP0076$  entsprachen der des Wildtyps mit  $1,90 \times 10^{-4}$ ,  $1,39 \times 10^{-4}$ ,  $1,69 \times 10^{-4}$  bzw.  $2,55 \times 10^{-4}$  Transformanden/Lebendzellzahl. Für die Mutanten  $\Delta TTP0075$  und  $\Delta TTP0076$  war dies das erwartete Ergebnis, weil für die  $\Delta TTP0075-0077$  Tripelmutante bereits gezeigt wurde, dass die natürliche Transformation nicht eingeschränkt ist. Da auch die Deletionen von *TTC1842* und *TTC1651* keinen Einfluss auf die Transformationsfrequenz hatten, bleiben PilA1, PilA2 und PilA3 weiterhin die einzigen bekannten Nebenpiline mit einer Funktion bei der natürlichen Transformation von *T. thermophilus* HB27.

Als nächstes wurde überprüft, ob die Mutanten *TTC1836::km*,  $\Delta TTC1842$ ,  $\Delta TTC1651$ ,  $\Delta TTP0075$ ,  $\Delta TTP0076$  und *TTC0077::km* zur Fortbewegung auf Oberflächen, in Form von „twitching motility“, in der Lage sind. Um sicherzustellen, dass das Zellwachstum durch die eingefügten Mutationen nicht beeinträchtigt ist, wurde das Wachstum der Präpilin-Mutanten mit dem des Wildtyps verglichen. Alle Mutanten (*TTC1836::km*,  $\Delta TTC1842$ ,  $\Delta TTC1651$ ,  $\Delta TTP0075$ ,  $\Delta TTP0076$  und *TTC0077::km*) zeigten in TM<sup>+</sup>-Medium bei 68 °C ein ähnliches Wachstumsverhalten, wobei die „lag“-Phasen etwa 60 min andauerten. Die Wachstumsraten während des exponentiellen Wachstums betrugen 0,61 bis 0,74 h<sup>-1</sup> und es wurden maximale OD<sub>600</sub>-Werte von 3,05 bis 3,6 erreicht. Dies entsprach dem für den *T. thermophilus* HB27-Wildtyp ermittelten Werten („lag“-Phase: ~ 60 min, Wachstumsrate: 0,72 h<sup>-1</sup>, maximale OD<sub>600</sub>: 3,45).

Zur Untersuchung der „twitching motility“ wurde jeweils ein Tropfen einer stationären Zellkultur auf Minimalmedium mit 0,1 % (w/v) BSA inkubiert. Nach drei Tagen bei 68 °C hatten sich die Zellen der Wildtyp-Kultur auf der Agar-Oberfläche ausgebreitet und bedeckten eine „twitching“-Zone von ~ 2 cm (Abb. 3.8 A). Die nicht pilierte Mutante *pilA4::km* diente als Negativkontrolle und breitete sich nicht über die Grenzen des ursprünglichen Zelltröpfens hinaus aus. Obwohl die Mutanten *TTC1836::km* und *TTP0077::km* Pili bilden (Friedrich *et al.* 2003; Friedrich 2002), zeigten sie keine „twitching motility“. Die gebildeten Pili sind also entweder nicht in ausreichender Zahl vorhanden oder haben ihre Funktionalität verloren. Auch die Deletion von *TTC1842* bzw. *TTP0075* führte zum Verlust der „twitching motility“ (Abb. 3.8 A). Die  $\Delta TTC1651$ -Mutante hingegen zeigte „twitching motility“, allerdings war diese mit einer „twitching“-Zone von ~ 1,5 cm etwas eingeschränkt. Interessanterweise führte die Deletion von *TTP0076* zu keinen Einschränkungen bei der gleitenden Bewegung auf Oberflächen. Im Gegensatz zu den Präpilinen *TTP0075* und *TTP0077*, die im gleichen Operon codiert sind, scheint *TTP0076* also keine Rolle bei der „twitching motility“ zu spielen.

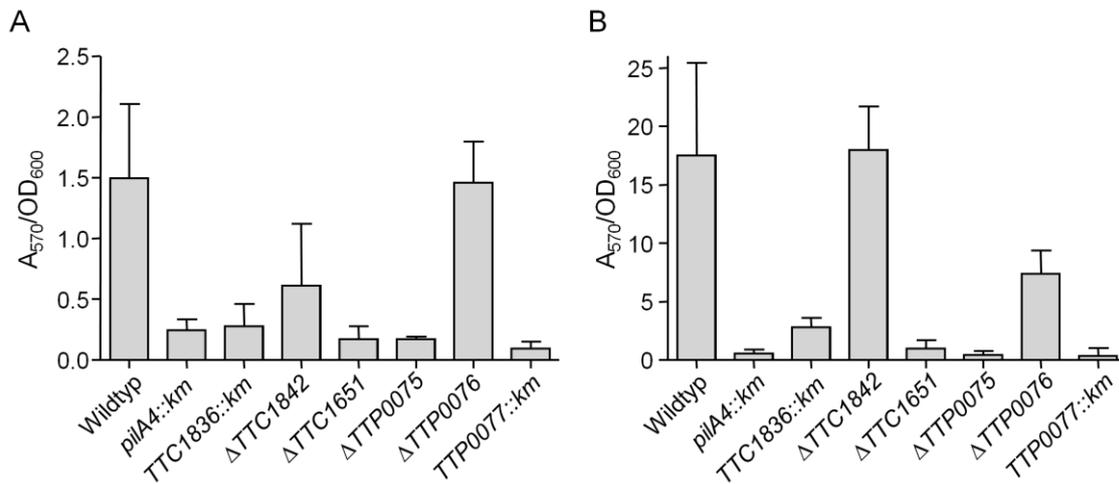


**Abb. 3.8. „Twitching motility“ der Präpilin-Mutanten.** Stationäre Kulturen der angegebenen *T. thermophilus*-Mutanten und des Wildtyps wurden auf Minimalmedium mit 0,1 % (w/v) BSA aufgetropft und anschließend 3 Tage bei 68 °C (A) oder 7 Tage bei 58 °C (B) inkubiert. Die Agarplatten wurden mit Coomassie-Lösung gefärbt. Überschüssiger Farbstoff und Zellen wurden abgewaschen, so dass die „twitching“-Höfe sichtbar wurden. Die Färbung der Bilder wurde invertiert. Größenstandard = 0,5 cm, Bilder sind repräsentativ für mindestens 4 Wiederholungen.

Da sich die Pilierung von *T. thermophilus* bei niedrigeren Temperaturen stark ändert (Salzer *et al.* 2014c) wurde die „twitching motility“ auch nach sieben Tagen Inkubation bei 58 °C analysiert (Abb. 3.8 B). Der Wildtyp bildete unter diesen Bedingungen „twitching“-Höfe von ~ 1,2 cm Durchmesser. Die Mutanten *TTC1836::km*, *ΔTTC1842::bleo*, *ΔTTP0075::bleo* und *TTP0077::km*, sowie *pilA4::km* zeigten, wie schon bei 68 °C, keine „twitching motility“. Die „twitching“-Zonen der Deletionsmutanten *ΔTTC1651::bleo* und *ΔTTP0076::bleo* waren genauso groß, wie die des Wildtyps. Die T4P dieser zwei Mutanten sind unter diesen Bedingungen also voll funktional.

Die Adhäsion von Bakterien an biotische oder abiotische Oberflächen ist ebenfalls abhängig von Pili. T4P sind dabei häufig in den frühen Phasen der Biofilmbildung beteiligt, wo sie zur Oberflächenanhaftung und Mikrokoloniebildung beitragen (O’Toole *et al.* 2000; Costerton *et al.* 1999). In dieser Arbeit wurde die Adhäsion an Plastikoberflächen in Mikrottestplatten mit TM<sup>+</sup>-Medium untersucht. Nach dreitägiger Inkubation wurde die OD<sub>600</sub> gemessen und Medium und nicht adhären- de Zellen wurden abgewaschen. Die an die Mikrottestplatte gebundenen Zellen wurden mit Kristallviolett gefärbt, welches dann photometrisch quantifiziert wurde.

Wie schon bei der Untersuchung der „twitching motility“ wurde auch die Adhäsion bei 68 °C und bei 58 °C analysiert, da die Adhäsion der Wildtyp-Zellen bei der niedrigeren Temperatur stark erhöht ist (Abb. 3.9) (Salzer *et al.* 2014c). Die Mutationen der Gene *TTC1836*, *TTC1651*, *TTP0075* und *TTP0077* führten wie die Mutation von *pilA4* zu einer drastischen Verminderung der Adhäsion bei beiden Inkubationstemperaturen (Abb. 3.9). Die *ΔTTC1842*-Mutante adhären- tierte bei 68 °C, jedoch war der Anteil der adhären- denden Zellen im Vergleich zum Wildtyp geringer (Abb. 3.9 A). Bei 58 °C war die Adhäsion der *ΔTTC1842*-Deletionsmutante vergleichbar mit der des Wildtyps (Abb. 3.9 B). Die Adhäsion der *ΔTTP0076*-Mutante bei 68 °C entsprach der des Wildtyps und war bei 58 °C reduziert gegenüber der des Wildtyps. Sowohl *TTC1842* als auch *TTP0076* sind also nicht notwendig für die Adhäsion von *T. thermophilus* an Plastikoberflächen.



**Abb. 3.9. Adhäsion der Präpilin-Mutanten an Plastikoberflächen** Die angegebenen *T. thermophilus*-Stämme wurden 3 Tage bei 68 °C (A) bzw. bei 58 °C (B) in TM<sup>+</sup>-Medium in Mikrottestplatten kultiviert. Die OD<sub>600</sub> wurde bestimmt, das Medium mit planktonischen Zellen wurde abgegossen und die adhärierenden Zellen wurden mit Kristallviolett gefärbt. Dieses wurde anschließend in Ethanol gelöst und bei 570 nm detektiert. Die Absorption bei 570 nm (A<sub>570</sub>) geteilt durch die OD<sub>600</sub> ist ein Maß für die Adhäsion der Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte + Standardabweichung von mindestens fünf (A) bzw. drei (B) Messungen.

**Tab. 3.2. Funktion der Präpiline aus *T. thermophilus*.** Mutantenstudien (diese Arbeit und (Friedrich *et al.* 2003; Bettermann 2007)) zeigten, für welche der angegebenen Funktionen die Präpiline und Präpilin-ähnlichen Proteine benötigt werden.

Präpilin	„twitching motility“	Adhäsion	Oberflächen-exponierte T4P	natürliche Transformation
TTC1836	+	+	-	-
TTC1842	+	-	- <sup>a</sup>	-
TTC1651	-	+	- <sup>a</sup>	-
TTP0075	+	+	-	-
TTP0076	-	-	-	-
TTP0077	+	+	-	-
PilA1	-	-	-	+
PilA2	-	-	-	+
PilA3	-	-	-	+
PilA4	+	+	+	+

<sup>a</sup> Die Pilierung der Mutanten  $\Delta$ *TTC1842::bleo* und  $\Delta$ *TTC1651::bleo* wurde nicht direkt analysiert, aber aufgrund der detektierten T4P-vermittelten Adhäsion bzw. „twitching motility“ kann auf funktionale T4P geschlossen werden.

Tabelle 3.2 fasst die in dieser und in vorangegangenen Arbeiten (Friedrich *et al.* 2003; Bettermann 2007) ermittelten Funktionen der Präpiline und der Präpilin-ähnlichen Proteine aus *T. thermophilus* zusammen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit zur Funktionalität der T4P zeigen, dass TTC1836, TTP0075 und TTP0077 entscheidende Rollen spielen, sowohl bei der Adhäsion an als auch bei der Fortbewegung auf Oberflächen. Im Gegensatz dazu ist TTP0076 nicht

essentiell für diese beiden Funktionen. TTC1842 scheint notwendig für die „twitching motility“ zu sein, nicht aber für die Adhäsion an Plastikoberflächen, wohingegen TTC1651 wichtig für die Adhäsion ist, aber nur eine untergeordnete Rolle bei der „twitching motility“ zu spielen scheint. Keines der hier untersuchten Pilin-ähnlichen Proteine scheint für die Assemblierung der T4P notwendig zu sein, denn  $\Delta TTC1842::bleo$ ,  $\Delta TTC1651::bleo$  und  $\Delta TTP0076::bleo$  waren zur Adhäsion und/oder „twitching motility“ in der Lage, welches T4P-abhängige Funktionen sind. Für  $TTC1836::km$  und für  $TTP75-77::km$  wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass diese Mutanten T4P bilden (Friedrich *et al.* 2003). Dies führt zu der Hypothese, dass die verschiedenen Nebenpiline und Pilin-ähnlichen Proteine von *T. thermophilus* nicht für der T4P-Assemblierung aber für die unterschiedlichen Funktionen der T4P benötigt werden.

## 3.2 Analysen des Kompetenzproteins ComZ

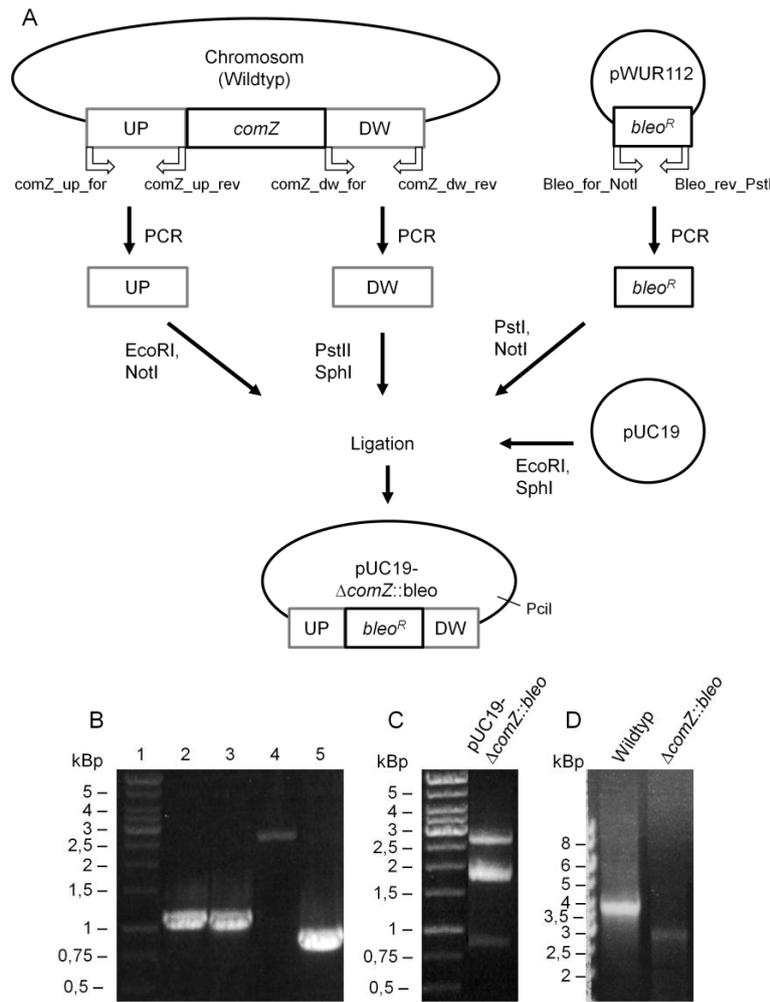
### 3.2.1 Deletion und Komplementation von *comZ*

Das Kompetenzgen *comZ* befindet sich im gleichen Genlokus wie die Nebenciline *pilA1*, *pilA2* und *pilA3* und das Hauptpilin *pilA4* (Abb. 3.1). ComZ weist keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen auf und Sequenzabgleiche führten nur zu Identifikation von Orthologen im Phylum *Deinococcus-Thermus*. Der N-Terminus weist allerdings Ähnlichkeiten zu Präpilinen auf (Abb. 3.2). So sind eine N-terminale, positive Ladung und die Aminosäuren G<sub>-1</sub> und L<sub>+1</sub> der Präpilinpeptidase-Erkennungssequenz vorhanden, sowie eine hydrophobe Transmembranhelix, die bis zur Aminosäure 27 reicht. Dennoch fehlt in ComZ das konservierte E<sub>+5</sub> der Erkennungssequenz und mit einer Länge von 554 Aminosäuren (59,6 kDa) ist es zu groß, um in den T4P eingebaut zu werden (Abb. 3.2, Tab. 3.1). Der N-Terminus von ComZ erfüllt auch die Kriterien eines Signalpeptids zum Proteinexport nach Heijne (1994) mit einer N-terminalen positiven Ladung (Lysin 4) gefolgt von einem hydrophoben Bereich (Isoleucin 6 bis Leucin 19) und einer potentiellen Schnittstelle zwischen Alanin 18 und Leucin 19 (Schwarzenlander 2008). Vergleichbare N-Termini treten aber auch bei Transmembranproteinen auf, die nicht prozessiert werden (De Souza *et al.* 2011). Somit ist es also möglich, dass ComZ durch die Cytoplasmamembran transportiert wird und entweder in dieser als Transmembranprotein verbleibt oder prozessiert wird. Versuche, die subzelluläre Lokalisation von ComZ zu bestimmen oder ComZ heterolog in *E. coli* zu produzieren, blieben bisher erfolglos (Schwarzenlander 2008, 2003).

Frühere Untersuchungen einer *comZ::km*-Insertionsmutante haben gezeigt, dass ComZ essentiell für die natürliche Transformation ist, wobei die Mutante weiterhin DNA in einen DNase-resistenten Zustand aufnehmen konnte (Schwarzenlander *et al.* 2009). Die subzelluläre Lokalisation anderer Kompetenzproteine wurde durch die *comZ::km*-Mutation nicht beeinflusst. Auch die Assemblierung von T4P fand weiterhin statt.

Die Funktionalität der T4P der *comZ*-Mutante wurde bisher nicht überprüft. In dieser Arbeit sollte zunächst eine  $\Delta$ *comZ*-Deletionsmutante erstellt werden, die auf ihre Fähigkeit zur „twitching motility“ und Adhäsion an Oberflächen untersucht werden sollte. Im Anschluss sollte *comZ in trans* in diese Deletionsmutante eingebracht werden. Das für die Komplementation genutzte Gen sollte eine Fusion von *comZ* und der Sequenz eines Histidin-Tags sein, um so eine Reinigung von ComZ aus *T. thermophilus* durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) zu ermöglichen und eine potentielle Assemblierung von ComZ zu analysieren.

Für die Deletion von *comZ* wurde zunächst das Plasmid pUC19- $\Delta$ *comZ::bleo* dem Schema in Abbildung 3.10 A folgend hergestellt. Dafür wurden DNA-Bereiche, die *comZ* im *T. thermophilus*-Chromosom flankieren, mit den Starteroligonukleotidpaaren *comZ\_up\_for/comZ\_up\_rev* bzw. *comZ\_dw\_for/comZ\_dw\_rev* amplifiziert (Tab. 2.5, Abb. 3.10 B). Die *bleo*<sup>R</sup>-Resistenzkassette aus pWUR112 wurde ebenfalls mittels PCR amplifiziert und der Vektor pUC19 wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SphI verdaut (Abb. 3.10 B). Nachdem auch die PCR-Produkte mit den in Abbildung 3.10 A angegebenen Enzymen verdaut wurden, wurden die vier DNA Fragmente in einer Reaktion ligiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert.

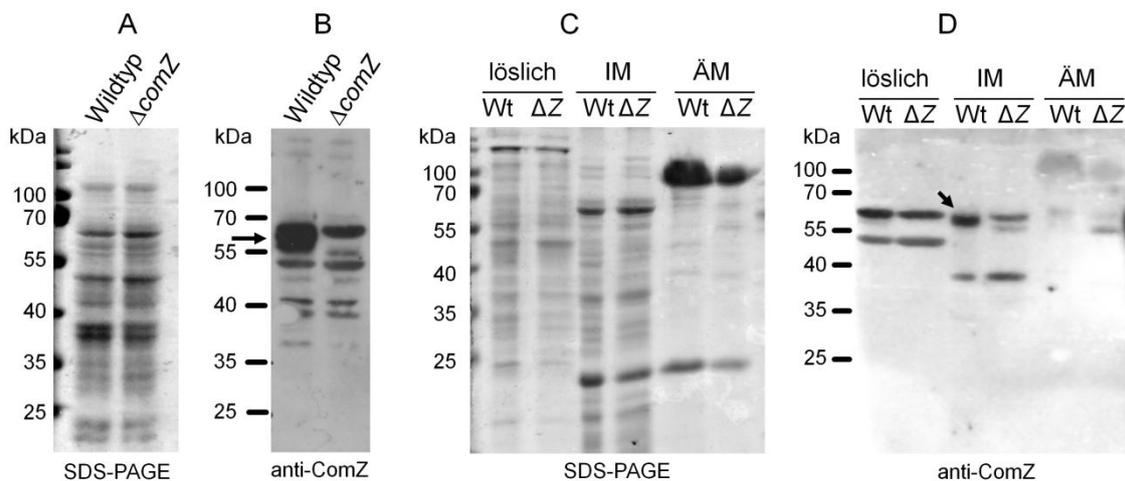


**Abb. 3.10. Klonierungsschema zur Erstellung von pUC19- $\Delta$ *comZ::bleo* und Überprüfung des rekombinanten Plasmides im Agarosegel.** Schematische Darstellung der Klonierung (A). Die *comZ* flankierenden DNA-Bereiche wurden mit den angegebenen Starteroligonukleotiden (Tab. 2.5) an genomischer DNA von *T. thermophilus* amplifiziert. Für die UP-Region wurde ein PCR-Produkt der Größe 1068 Bp erwartet (B, Spur 2) und für die DW-Region ein 1059-Bp-Produkt (B, Spur 3). Der Vektor pUC19 wurde mit *EcoRI* und *SphI* geschnitten, wobei ein 2637-Bp-Fragment entstand (B, Spur 4). Die *bleo<sup>R</sup>*-Kassette des Plasmides pWUR112 wurde mittels PCR amplifiziert, wobei ein 817-Bp-Produkt erwartet wurde (B, Spur 5). Es folgten die dargestellten Restriktionsverdau und die Ligation. Das erhaltene Plasmid pUC19- $\Delta$ *comZ::bleo* wurde durch Verdau mit *EcoRI* und *ScaI* überprüft, wobei DNA Fragmente der Größen 903, 1776 und 2963 Bp erwartet wurden (C, siehe auch Plasmidkarte im Anhang, Abb. A5). Die erstellte Deletionsmutante  $\Delta$ *comZ::bleo* wurde durch PCR mit den Starteroligonukleotiden *Check\_comZ\_for* und *Check\_comZ\_rev* überprüft (D). Bei der PCR mit DNA des Wildtyps sollte ein 3925-Bp-Produkt (D, Spur 1), bei  $\Delta$ *comZ::bleo* ein 2905-Bp-Produkt (D, Spur 2) entstehen. Die DNA wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Als Größenstandard wurde die „GeneRuler 1 kb Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet (B und C, Spur 1).

Aus den Ampicillin-resistenten Transformanden wurde das Plasmid isoliert und durch Verdau mit *EcoRI* und *ScaI* überprüft (Plasmidkarte im Anhang, Abb. A5). Da dieser Verdau die erwarteten DNA-Fragmente der Größen 903, 1776 und 2963 Bp erzeugte (Abb. 3.10 C), wurde pUC19- $\Delta$ *comZ::bleo* durch Inkubation mit *PciI* linearisiert und in *T. thermophilus* transformiert. Die

Selektion der  $\Delta comZ::bleo$ -Mutante erfolgte auf Bleomycin-haltigem  $TM^+$ -Medium. Zur Kontrolle wurde die genomische DNA der Deletionsmutante isoliert und als Matrize für eine PCR mit den Starteroligonukleotiden Check\_comZ\_for und Check\_comZ\_rev eingesetzt. Wie in Abbildung 3.10 D zu sehen ist, entstand dabei das für die Deletionsmutante  $\Delta comZ::bleo$  erwartete PCR-Produkt von 2905 Bp.

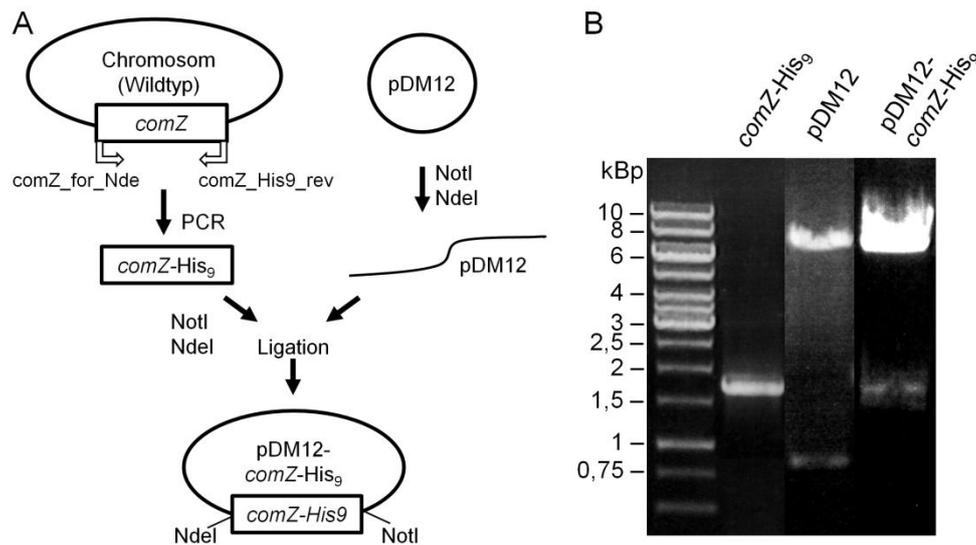
Cornelia Schwarzenlander hatte im Rahmen ihrer Doktorarbeit polyklonales Antiserum gegen ein ComZ-Derivat (MBP- $\Delta ComZ$ ) hergestellt (Schwarzenlander 2008). Western Blot-Analysen mit diesem Antiserum zeigten jedoch keinen Unterschied zwischen dem *T. thermophilus*-Wildtyp und der Insertionsmutante  $comZ::km$ . ComZ konnte also nicht identifiziert werden. Diese Western Blot-Analysen wurden nun mit der Deletionsmutante  $\Delta comZ::bleo$  wiederholt (Abb. 3.11 A, B). Bei der Untersuchung der Gesamtzellextrakte von  $comZ::bleo$  und Wildtyp-Zellen wurden mehrere Proteine unspezifisch in beiden Proben detektiert. Daneben wurde aber auch ein ~ 60 kDa Protein in der Wildtyp-Probe detektiert, welches nicht in  $comZ::bleo$  auftauchte (Abb. 3.11 B, Pfeil). Da die apparente molekulare Masse dieses Proteins mit der abgeleiteten molekularen Masse von ComZ (59,6 kDa) korrespondiert und da dieses Protein nicht in der  $\Delta comZ::bleo$ -Mutante detektiert werden konnte, wurde geschlossen, dass die Deletionsmutante  $comZ::bleo$  korrekt ist.



**Abb. 3.11. Überprüfung der Deletionsmutante  $\Delta comZ::bleo$  (A, B) und Analyse der subzellulären Lokalisation von ComZ (C, D) mittels Western Blot.** Je 10  $\mu g$  Gesamtzellextrakt der  $\Delta comZ::bleo$ -Mutante und des Wildtyps wurden in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (A) und mittels Western Blot mit anti-ComZ-Antiserum (1:5000) analysiert (B). Ein Protein mit einer apparenten molekularen Masse von ~ 60 kDa wurde im Wildtyp, nicht aber in  $\Delta comZ::bleo$  detektiert (B, Pfeil). Dabei handelt es sich also vermutlich um das 59,6-kDa-Protein ComZ. Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von ComZ wurden lösliche Zellbestandteile, innere (IM) und äußere Membranen (ÄM) des Wildtyps (Wt) und der  $\Delta comZ::bleo$ -Mutante ( $\Delta Z$ ) voneinander getrennt. 10  $\mu g$  jeder Fraktion wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (C). Western Blot-Analysen mit anti-ComZ-Antiserum zeigten nur in den Proben der inneren Membranen einen Unterschied, wobei in der inneren Membran des Wildtyps das ~ 60 kDa Protein detektiert wurde (D, Pfeil), in der  $\Delta comZ$ -Mutante aber nicht. SDS-Gele wurden mit Coomassie-Lösung gefärbt.

Da das Antiserum zur Detektion von ComZ genutzt werden konnte, sollte nun durch Western Blot-Analysen die subzelluläre Lokalisation von ComZ bestimmt werden. Dafür wurden die löslichen Zellbestandteile (Cytoplasma, Periplasma) durch Ultrazentrifugation von den Membranen getrennt. Anschließend wurden die innere und äußere Membran durch Behandlung mit 2 % (w/v) N-Laurylsarkosin und Ultrazentrifugation voneinander getrennt. Dies wurde sowohl mit Zellen einer *T. thermophilus*-Wildtyp-Kultur als mit einer  $\Delta comZ::bleo$ -Kultur durchgeführt. Die einzelnen Zellfraktionen der beiden Kulturen wurden im direkten Vergleich durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abb. 3.11 C, D). Es traten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Deletionsmutante in der löslichen oder der ÄM-Fraktion auf. In der inneren Membran des Wildtyps wurde erneut das ~ 60 kDa Protein detektiert, welches nicht in der  $\Delta comZ::bleo$ -Mutante auftrat (Abb. 3.11 D, Pfeil). In der Mutante wurden allerdings zwei schwächere Signale detektiert, die ebenfalls Proteinen mit apparenten Größen von etwa 57 - 62 kDa entsprechen. (Abb. 3.11 D). Es ist anzunehmen, dass diese Proteine ebenfalls in der Wildtyp-Probe vorlagen, aber durch das stärkere ComZ-Signal überdeckt wurden. Um dies genauer zu untersuchen, müsste die Auftrennung der Proteine im Gel optimiert werden und ein weiterer Western Blot mit abgesättigtem anti-ComZ-Antiserum durchgeführt werden. Die in Abbildung 3.11 D gezeigten Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass ComZ in der inneren Membran lokalisiert ist. Ob es sich dabei um ein membranintegrales Protein handelt oder ob ComZ durch Interaktionen mit anderen Proteinen mit der Membran assoziiert ist, müssen zukünftige Analysen zeigen. Zum Beispiel könnten membranassoziierte Proteine durch Behandlung der Membranfraktion mit Harnstoff abgetrennt werden. Western Blot-Analysen mit anti-ComZ-Antiserum könnten dann zeigen, ob sich ComZ weiterhin in der inneren Membran befindet. Auch Western Blot-Analysen der subzellulären Fraktionen anderer Mutanten mit Defekten in den Kompetenzgenen, wie z.B. *pilM::km*, *pilN::km*, *pilO::km*, *pilA4::km* oder *pilA1-3::km*, könnten Hinweise auf die Interaktion von ComZ mit Komponenten des DNA-Translokators liefern.

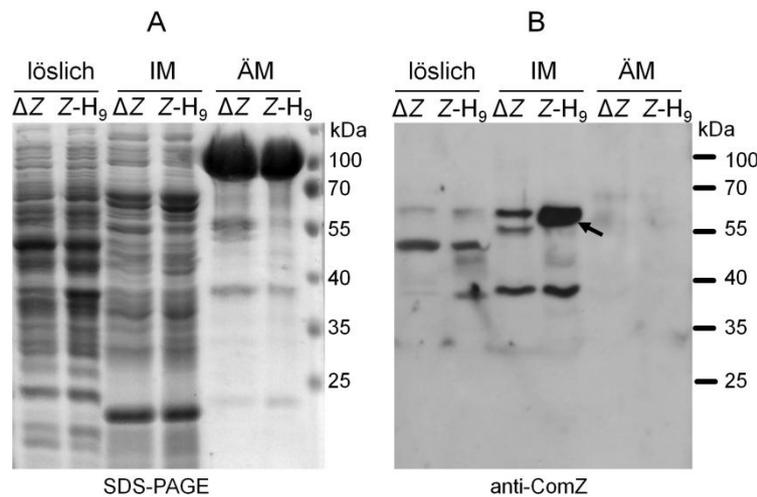
Vor Beginn der Charakterisierung der  $\Delta comZ::bleo$ -Deletionsmutante sollte eine *comZ*-Komplementante erstellt werden, um die Möglichkeit polarer Effekte der *bleo<sup>R</sup>*-Kassette auszuschließen. Hierfür sollte die  $\Delta comZ::bleo$ -Mutante mit dem Plasmid pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> komplementiert werden, welches *comZ*-His<sub>9</sub> unter Kontrolle des konstitutiven *bcI*-Promotors exprimiert. Zur Erstellung des Plasmides wurde das Gen *comZ* mit dem Starteroligonukleotidpaar *comZ\_for\_Nde/comZ\_His9\_rev* amplifiziert, wobei die Sequenz für einen C-terminalen His<sub>9</sub>-Tag angehängt wurde (Tab. 2.5, Abb. 3.12). Das PCR-Produkt, sowie der *E. coli/Thermus*-„Shuttle“-Vektor pDM12 wurden mit NotI und NdeI geschnitten (Abb. 3.12 B, Spur 2 und 3) und miteinander ligiert. *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde mit dem Ligationsansatz transformiert und auf LB-Medium mit Kanamycin und Ampicillin ausplattiert. Aus den Transformanden wurden Plasmide isoliert und durch Verdau mit NotI und NdeI überprüft, wobei die zwei erwarteten Fragmente der Größen 1698 und 6555 Bp entstanden (Abb. 3.12 B, Spur 4). Eine Sequenzierung bestätigte die Insertion des *comZ*-His<sub>9</sub>-Gens in pDM12.



**Abb. 3.12. Klonierungsschema und Überprüfung des rekombinanten Plasmides pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub>.** Schema zur Erstellung des *E. coli/Thermus*-„Shuttle“-Vektors pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> (A). Mittels PCR wurde *comZ*-His<sub>9</sub> mit den Starteroligonukleotiden *comZ*\_for\_Nde und *comZ*\_His9\_rev amplifiziert, wobei ein 1714-Bp-PCR-Produkt erwartet wurde (B, Spur 2). Bei der Restriktion von pDM12 mit NdeI und NotI wurden die erwarteten DNA-Fragmente der Größen 845 und 6555 Bp generiert (B, Spur 3). Das aus der Ligation von *comZ*-His<sub>9</sub> und pDM12 entstandene Plasmid pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> wurde zur Kontrolle mit NdeI und NotI verdaut. Dabei wurden DNA-Fragmente der Größen 1698 und 6555 Bp generiert (B, Spur 4). Die DNA wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die „GeneRuler 1 kb Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) diente als Größenstandard (B, Spur 1).

Das Plasmid pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> wurde durch Elektroporation in die  $\Delta comZ::bleo$ -Deletionsmutante transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Bleomycin und Kanamycin und aus resistenten Kolonien wurde die DNA isoliert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  retransformiert. Aus den Kanamycin-resistenten *E. coli*-Transformanten konnte erneut das Plasmid isoliert werden. Restriktion mit NotI und NdeI und Agarosegelelektrophorese bestätigten, dass die *T. thermophilus*- $\Delta comZ::bleo$ -Mutante das Plasmid pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> *in trans* aufgenommen hatte.

Durch Western Blot-Analysen wurde die mit pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> komplementierte Mutante  $\Delta comZ::bleo$  daraufhin untersucht, ob ComZ in der inneren Membran lokalisiert ist, so wie es beim Wildtyp der Fall war. Die Probenvorbereitung erfolgte wie für Abbildung 3.10 beschrieben und zur Detektion wurde ebenfalls das anti-ComZ-Antiserum verwendet. Im direkten Vergleich der subzellulären Fraktionen der  $\Delta comZ::bleo$ -Mutante mit der Komplementante wurde deutlich, dass ComZ gebildet wurde und in der inneren Membran lokalisiert war (Abb. 3.13). Wie schon für den Wildtyp gezeigt (Abb. 3.11), wurde in der inneren Membran ein ~ 60 kDa Protein detektiert (Abb. 3.13 B, Pfeil), dessen Signal im Western Blot die schwächeren Signale zweier anderer Proteine überdeckt, die in der Deletionsmutante sichtbar waren. Somit beeinflusst weder die konstitutive Expression *in trans* noch der His<sub>9</sub>-Tag die Lokalisation von ComZ in der inneren Membran.

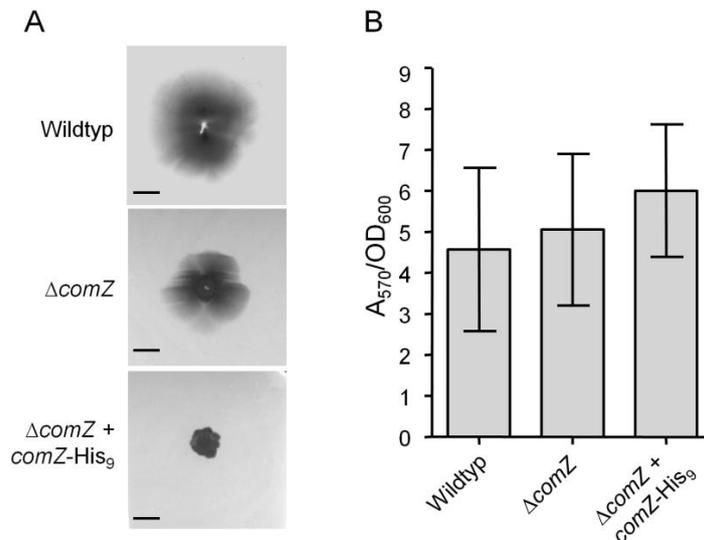


**Abb. 3.13. Detektion von ComZ-His<sub>9</sub> in der inneren Membran.** Die löslichen Zellbestandteile, innere (IM) und äußere Membranen (ÄM) der Mutante  $\Delta comZ::bleo$  ( $\Delta Z$ ) und der mit pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> komplementierten Mutante (Z-H<sub>9</sub>) wurden voneinander getrennt. 10  $\mu$ g jeder Fraktion wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit „Coomassie Brilliant Blue“ gefärbt (A). Western Blot-Analysen mit anti-ComZ-Antiserum (1:5000) zeigten in der inneren Membran der komplementierten Mutante das ~ 60 kDa Protein, welches nicht in  $\Delta comZ::bleo$  auftritt (B, Pfeil).

Als nächstes wurden die Deletionsmutante  $\Delta comZ::bleo$  und die mit pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> komplementierte Mutante phänotypisch untersucht. Dafür wurde ihre Fähigkeit zur natürlichen Transformation, zur „twitching motility“ und zur Adhäsion an Oberflächen analysiert.

Die Transformationsrate wurde wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben durch Zugabe von DNA eines Streptomycin-resistenten *T. thermophilus*-Stammes bestimmt. Die zur Kontrolle parallel bestimmte Transformationsrate des Wildtyps betrug  $6,8 \times 10^{-4}$  Transformanden/Lebendzellzahl. Die Mutante  $\Delta comZ::bleo$  war nicht transformierbar. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Insertionsmutante *comZ::km* ebenfalls nicht natürlich kompetent war (Friedrich *et al.* 2003). Durch Komplementation der  $\Delta comZ::bleo$ -Mutante mit pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> wurde eine Transformationsrate von  $4,5 \times 10^{-4}$  wiederhergestellt, es handelt sich also um eine funktionelle Komplementation. Desweiteren kann daraus geschlossen werden, dass die Deletion von *comZ* keine polaren Effekte auf die für die natürlichen Transformation essentiellen Gene *pilA4* und *pilA3*, welche *comZ* im Genom flankieren, hat.

Die „twitching motility“ wurde, wie oben beschrieben, auf BSA-haltigem Minimalmedium untersucht. Wie in Abbildung 3.14 A zu sehen ist, führte die Deletion von *comZ* nur zu einer leichten Verkleinerung der „twitching“-Zone gegenüber der des Wildtyps. Zum einen indiziert dies, dass  $\Delta comZ::bleo$  T4P bildet, wie für *comZ::km* beschrieben (Friedrich *et al.* 2003). Zum anderen sind diese T4P funktional und können für die Fortbewegung auf Oberflächen genutzt werden. Im Gegensatz dazu war die mit pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> komplementierte  $\Delta comZ::bleo$ -Mutante nicht mehr zur „twitching motility“ in der Lage (Abb. 3.14 A). Möglicherweise führt der His<sub>9</sub>-Tag oder eine Erhöhung der ComZ-Menge im Vergleich zu den Komponenten des T4P zur Einschränkung der T4P-Dynamik, wirkt sich aber nicht auf die natürliche Transformation von *T. thermophilus* aus.



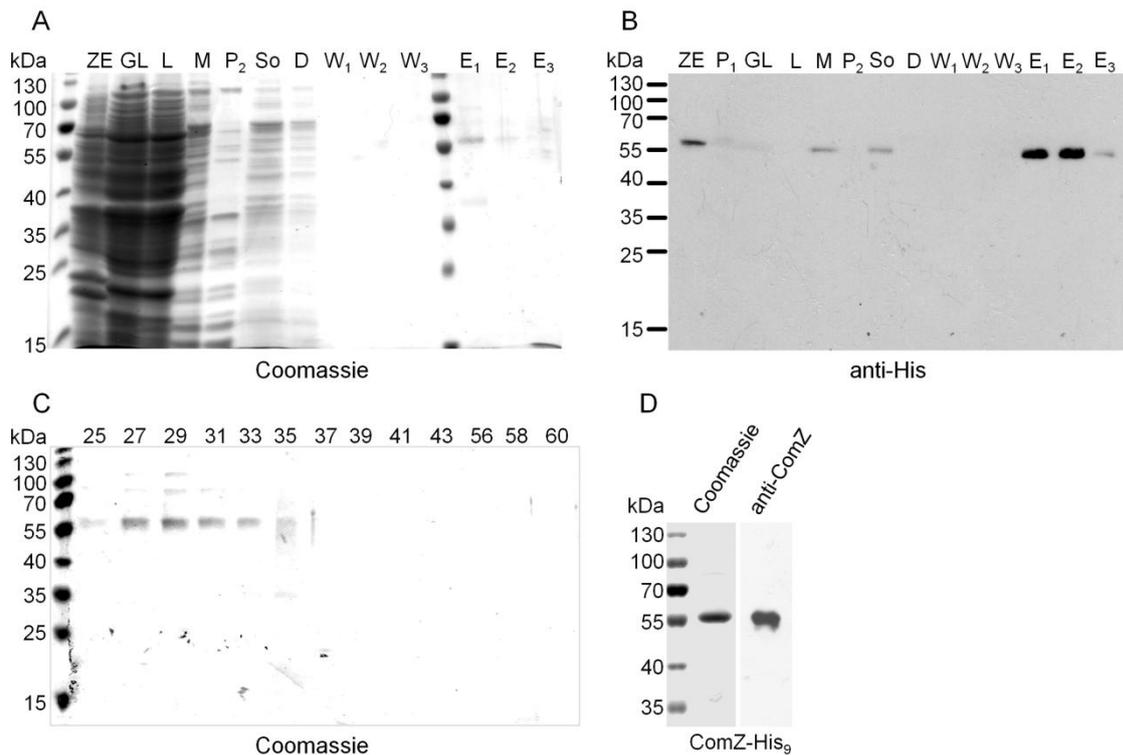
**Abb. 3.14. „Twitching motility“ und Adhäsion der  $\Delta comZ::bleo$ -Mutante und der mit pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> komplementierten Mutante.** Zellen stationärer Kulturen des *T. thermophilus*-Wildtyps, der  $\Delta comZ::bleo$ -Mutante und Mutante komplementiert mit pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> ( $\Delta comZ + comZ$ -His<sub>9</sub>) wurden punktuell auf Minimalmedium mit 0,1 % BSA aufgebracht und 3 Tage bei 68 °C inkubiert. Die Agarplatten wurden mit Coomassie-Lösung gefärbt, anschließend Zellen und überschüssiger Farbstoff abgewaschen. Die Färbung der Bilder wurde invertiert. Die gezeigten „twitching“-Zonen sind beispielhaft für drei biologische Replikate. Größenstandard = 0,5 cm (A). Kulturen der drei *T. thermophilus*-Stämme wurden 2 Tage bei 68 °C in TM<sup>+</sup>-Medium in Mikrottestplatten kultiviert. Die OD<sub>600</sub> wurde bestimmt, das Medium und nicht adhärerende Zellen wurden abgewaschen. Die adhärierenden Zellen wurden mit Kristallviolett gefärbt, welches bei 570 nm detektiert wurde. Die Absorption (A<sub>570</sub>) geteilt durch die OD<sub>600</sub> ist ein Maß für die Adhäsion der Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichung von 3 Experimenten (B).

Die Adhäsion an Plastikoberflächen bei 68 °C wurde wie in Kapitel 2.15 beschrieben quantifiziert. Der Anteil der adhärierenden Zellen in Kulturen des *T. thermophilus*-Wildtyps, der Mutante  $\Delta comZ::bleo$  und der Komplementante unterschied sich nicht signifikant (Abb. 3.14 B). ComZ spielt also bei der Adhäsion von *T. thermophilus* an Plastikoberflächen keine Rolle.

### 3.2.2 Reinigung von ComZ aus *T. thermophilus*

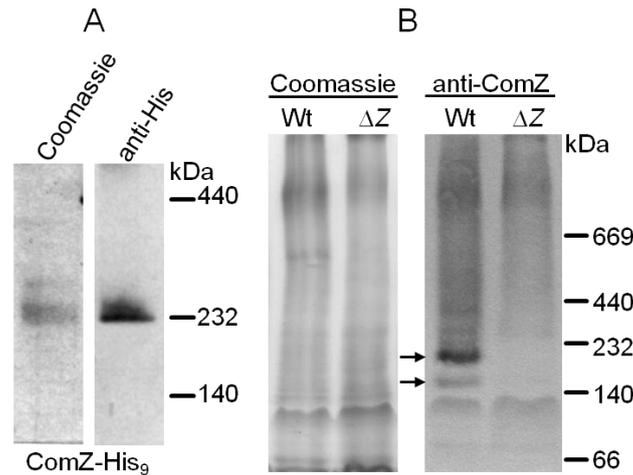
Die erfolgreiche Komplementation von  $\Delta comZ::bleo$  mit dem Plasmid pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> eröffnet die Möglichkeit, ComZ durch IMAC aus *T. thermophilus* zu reinigen. Gereinigtes ComZ-His<sub>9</sub> kann dann genutzt werden, um mehr über dieses ungewöhnliche Protein zu erfahren, z. B. über die Komplexbildung, die Proteinstruktur und die Interaktionen mit anderen Komponenten des DNA Translokators, des T4P oder mit der DNA.

Der *T. thermophilus*-Stamm  $\Delta comZ::bleo$  + pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> wurde über Nacht in TM<sup>+</sup>-Medium bei 68 °C schüttelnd kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von 5,0 erreicht war. Die Zellen wurden abzentrifugiert und tiefgefroren. Für den Zellaufschluss wurden sie in ComZ-Puffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM CaCl, pH 8,4) mit 1 mM PMSF und 1 mg/ml DNase I aufgetaut. Der Zellaufschluss erfolgte mechanisch durch die „French Pressure“-Zelle und Sonifizierung. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und das geklärte Lysat wurde durch Ultrazentrifugation in lösliche Bestandteile und Membranen aufgeteilt. Membranproteine wurden dann mit 3 % (w/v) DDM solubilisiert. Nach einer weiteren Ultrazentrifugation wurde der Überstand mit „TALON“-Material (Takara, Saint-Germain-en-Laye) inkubiert. Bei der darauf folgenden Affinitätschromatographie wurde erst dreimal mit ComZ-Puffer inkl. 0,4 mM DDM und ansteigenden Imidazolkonzentrationen (0 mM, 75 mM, 150 mM) gewaschen. Anschließend wurde in drei Schritten mit verschiedenen Imidazolkonzentrationen eluiert (250 mM, 300 mM, 600 mM). Proben aller Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse unter Verwendung des anti-His-Antikörpers (Qiagen, Hilden) untersucht (Abb. 3.15 A, B). Dadurch wurde deutlich, dass die erste und zweite Elutionsfraktion hauptsächlich ComZ-His<sub>9</sub> enthielten. Diese Fraktionen wurden vereinigt, ankonzentriert (MWCO: 30 kDa) und durch Gelfiltration mit einer „Superdex 200 10/300“-Säule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) weiter gereinigt. Die Gelfiltrationsfraktionen 25 bis 33, die Elutionsvolumen von ~ 9 ml bis ~ 13 ml ententsprechen, enthielten das 59,6-kDa-Protein ComZ-His<sub>9</sub> (Abb. 3.15 C und Abb. A7, Anhang) und wurden erneut vereinigt und ankonzentriert. Die Reinheit und Identität des isolierten Proteins wurde durch SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit dem anti-ComZ-Antiserum bestätigt (Abb. 3.15 D).



**Abb. 3.15. Reinigung des Fusionsproteins ComZ-His<sub>9</sub> aus *T. thermophilus*.** Während der verschiedenen Schritte der Reinigung von ComZ-His<sub>9</sub> wurden Proben entnommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (A). Ein weiteres SDS-Gel wurde für eine Western Blot-Analyse mit anti-His-Antikörpern (1:1000) eingesetzt (B). ZE, konzentrierter Zellextrakt vor Aufschluss der Zellen; GL, geklärtes Lysat nach Zellaufschluss und Zentrifugation; P<sub>1</sub>, Pellet nach Zellaufschluss und Zentrifugation; L, lösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation; M, Membranbestandteile; P<sub>2</sub>, Pellet nach Solubilisierung und Ultrazentrifugation; So, Solubilisat; D, Durchlauf der IMAC; W<sub>1-3</sub>, Waschfraktionen mit ansteigender Imidazolkonzentration; E<sub>1-3</sub>, Elutionsfraktionen mit ansteigender Imidazolkonzentration. Nachdem die Proben E<sub>1</sub> und E<sub>2</sub> vereinigt und ankonzentriert wurden, wurden diese mit einer „Superdex 200“-Gelfiltrationssäule aufgetrennt (Elutionsprofil im Anhang, Abb. A7). Die Gelfiltrationsfraktionen 25 - 43 und 56 - 60 (Elutionsvolumen 9 - 16,8 ml und 21,6 - 23,6 ml) wurden im SDS-Gel (12 % Acrylamid) analysiert (C). Die Fraktionen 25 - 33 wurden vereinigt und ankonzentriert. Gereinigtes ComZ-His<sub>9</sub> wurde mittels SDS-PAGE (12 % Acrylamid) analysiert und mit Coomassie-Lösung gefärbt (D, Spur 2), bzw. immunologisch mit anti-ComZ-Antiserum (1:5000) nachgewiesen (D, Spur 3). Die „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) diente als Größenstandard (A, C, D, Spur 1).

Das erfolgreich gereinigte ComZ-His<sub>9</sub>-Fusionsprotein wurde dann in einem nativen Gel (3 - 20 % Acrylamid) elektrophoretisch aufgetrennt um die Komplexbildung zu untersuchen. Bei der Analyse wurde eine prominente Proteinbande sichtbar, die einem Komplex von 232 kDa entspricht (Abb. 3.16 A, Spur 1). Western Blot-Analysen mit anti-His-Antikörpern bestätigen, dass dieser Komplex ComZ-His<sub>9</sub> beinhaltet (Abb. 3.16 A, Spur 2). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ComZ einen Proteinkomplex bestehend aus vier Protomeren à 59,6 kDa bildet. Um gänzlich auszuschließen, dass dieser Komplex neben ComZ weitere Proteine beinhaltet, sollte er aus dem nativen Gel ausgeschnitten und durch SDS-PAGE analysiert werden.



**Abb. 3.16. Komplexbildung des Fusionsproteins ComZ-His<sub>9</sub>.** Die Komplexbildung des gereinigten ComZ-His<sub>9</sub> wurde untersucht, indem 20 µg isoliertes ComZ-His<sub>9</sub> mittels nativer PAGE (3 - 20 % Acrylamidgel) aufgetrennt wurde (A, Spur 1). Mit einem zweiten Gel wurde eine Western Blot-Analyse mit anti-His-Antikörper (1:1000, Qiagen, Hilden) durchgeführt (A, Spur 2). Um die Komplexbildung von ComZ *in situ* zu untersuchen, wurden 30 µg Membranen von *T. thermophilus* HB27 (Wt) und von der Deletionsmutante  $\Delta comZ::bleo$  ( $\Delta Z$ ) mittels nativer PAGE (3 - 20 % Acrylamidgel) aufgetrennt (B, Spur 1 und 2) und im Western Blot mit anti-ComZ-Antiserum (1:5000) analysiert (B, Spur 2 und 3). Es wurden zwei ComZ-haltige Komplexe (~ 159 und ~ 206 kDa) im Wildtyp detektiert, die nicht in der Deletionsmutante auftraten (B, Pfeile).

Es ist jedoch möglich, dass diese Quartärstruktur ein Artefakt ist, dass bei der Isolierung von ComZ entstanden ist, bei der ComZ in hohen Konzentrationen vorlag und andere *T. thermophilus*-Proteine abgereichert wurden. Der oligomere Zustand von ComZ *in situ* könnte sich von dem Tetramer unterscheiden. Um dies zu analysieren, wurden Membranen von *T. thermophilus* HB27 und von der Deletionsmutante  $\Delta comZ::bleo$  durch Ultrazentrifugation und Waschen in Tris-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0) isoliert. Diese Membranen wurden im nativen Gradientengel (3 - 20 % Acrylamid) aufgetrennt und mit anti-ComZ-Antiserum (1:5000) inkubiert (Abb. 3.16 B). In der Membranfraktion des Wildtyps wurden dabei zwei Proteinkomplexe detektiert, die nicht in der Mutante  $\Delta comZ::bleo$  auftraten (Pfeile in Abb. 3.16 B). Mit apparenten molekularen Massen von 159 und 206 kDa sind diese Komplexe kleiner als das für gereinigtes ComZ-His<sub>9</sub> detektierte potentielle Tetramer. Diese Experimente zeigen dennoch, dass ComZ eine Komponente von membrangebundenen oder -assoziierten Komplexen ist. Ob bzw. welche weiteren Proteine neben ComZ in diesen Komplexen enthalten sind, muss in zukünftigen Experimenten ermittelt werden.

### 3.3 Die Rolle der Walker A- und Walker B-Motive bei der Aktivität, der Assemblierung und der Stabilität von PilF-Komplexen

Das Walker A- und das Walker B-Motiv wurden 1982 erstmals als konservierte Motive von ATPasen identifiziert (Walker *et al.* 1982). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Mutation des konservierten Lysins des Walker A-Motivs in Motor-ATPasen dazu führt, dass kein oder nur sehr wenig ATP gebunden wird (Turner *et al.* 1993; Shiue *et al.* 2006; Yamagata und Tainer 2007; Ghosh *et al.* 2011). Wird das katalytische Glutamat des Walker B-Motivs ausgetauscht, kann die ATPase weiterhin ATP binden, aber nicht mehr hydrolysieren (Chiang *et al.* 2008; Jakovljevic *et al.* 2008; Seitz und Blokesch 2013).

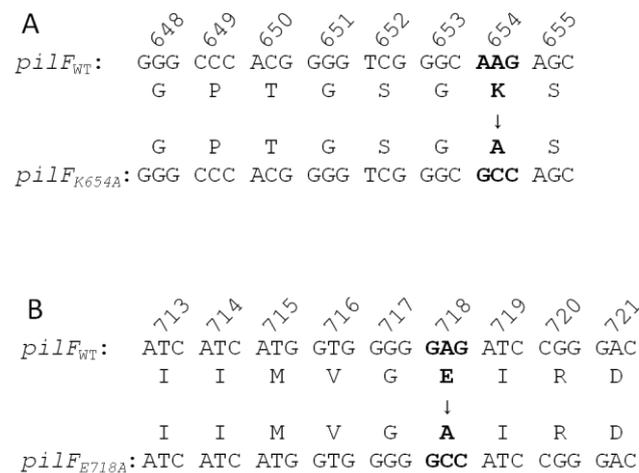
Die Rolle von ATP-Bindung und -Hydrolyse der T4P-Assemblierungs-ATPasen bei der Bildung von Proteinkomplexen ist nicht vollständig geklärt. Für einige, verwandte Systeme wurde gezeigt, dass die ATP-Bindung an die Assemblierungs-ATPase nötig für die Multimerisierung der ATPase ist. Dies ist z. B. der Fall bei XpsE des T2SS von *X. campestris*, bei TrbB des konjugativ übertragbaren Plasmides RP4, bei FlaI des archaellen Flagellums von *Sulfolobus acidocaldarius* und bei BfpD des „bundle-forming pilus“ (BFP) von EPEC (Shiue *et al.* 2006; Krause *et al.* 2000; Ghosh *et al.* 2011; Crowther *et al.* 2005). Andere Motor-ATPasen hingegen bilden Multimere unabhängig von ATP (Krause *et al.* 2000; Sakai *et al.* 2001). Für *T. thermophilus* konnte gezeigt werden, dass PilF hexamere Komplexe bildet und dass die Hitzestabilität dieser Komplexe durch Zugabe von ADP oder PNP-AMP, einem ATP-Analogen, gesteigert wird (Rose *et al.* 2011; Salzer *et al.* 2014a).

Bisher wurde jedoch nicht untersucht, wie sich Mutationen der Walker-Motive und somit der Wegfall von ATP-Bindung und -Hydrolyse auf die Hexamerisierung und die *in vivo* Funktionen von PilF auswirken. Um dies aufzuklären, wurden jeweils das Lysin 654 (K654) und das katalytische Glutamat 718 (E718) gegen ein Alanin ausgetauscht. Bei K654 handelt es sich um das konservierte Lysin des Walker A-Motivs, das vermutlich aufgrund seiner Interaktionen mit dem  $\gamma$ - und  $\beta$ -Phosphat des ATP notwendig für die Bindung von ATP ist (Turner *et al.* 1993; Hanson und Whiteheart 2005). E718 bindet vermutlich als katalytisches Glutamat ein Wassermolekül im aktiven Zentrum von PilF, was für die ATP-Hydrolyse notwendig ist (Iyer *et al.* 2004). Die durch die Aminosäureaustausche entstandenen Proteinvarianten wurden aufgereinigt und charakterisiert um Aufschluss über die Rolle der Walker-Motive bei der Aktivität, Komplexbildung und -stabilität von PilF zu erhalten.

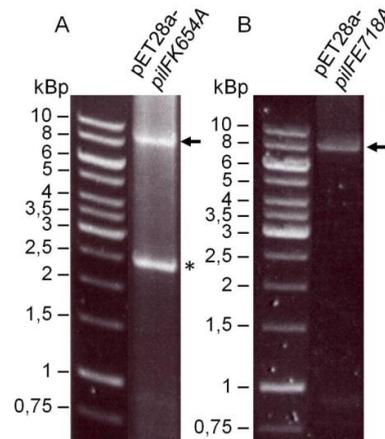
### 3.3.1 Erstellung der Proteinvarianten PilF<sub>K654A</sub> und PilF<sub>E718A</sub>

Um die Auswirkungen der Punktmutationen in den Walker-Motiven auf die Aktivität und die Komplexbildung und -stabilität von PilF zu untersuchen, sollten die PilF-Varianten heterolog in *E. coli* produziert werden. Vor Beginn dieser Arbeit lag bereits das Überexpressionsplasmid pET28-*pilF* vor, in dem *pilF* mit der Sequenz eines N-terminalen His<sub>6</sub>-Tags fusioniert ist, und ein Protokoll zur Reinigung des His<sub>6</sub>-PilF-Fusionsproteins (Rose *et al.* 2011; Salzer *et al.* 2014a).

Zur Erstellung der Expressionsplasmide pET28-*pilFK654A* und pET28-*pilFE718A* diente pET28-*pilF* (Tab. 2.4) als Ausgangsplasmid. Durch ortsgerichtete Mutagenese mit den Oligonukleotidpaaren *pilF\_WA\_for/pilF\_WA\_rev* bzw. *pilF\_WB\_for/pilF\_WB\_rev* (Tab. 2.5) wurden die Codone, die für K654 bzw. E718 codieren, jeweils gegen das Alanincodon GCC ausgetauscht (Abb. 3.17). Nach der PCR erfolgte ein DpnI-Verdau und die Isolierung der PCR-Produkte. Diese wurden durch Agarosegelelektrophorese überprüft und entsprachen der erwarteten Größe von 8086 Bp (Abb. 3.18). Die PCR-Produkte wurden ligiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Aus Kolonien, die auf LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin gewachsen waren, wurden Plasmide isoliert und die Mutation im Walker A- bzw. Walker B-Motiv wurde durch Sequenzierung bestätigt.



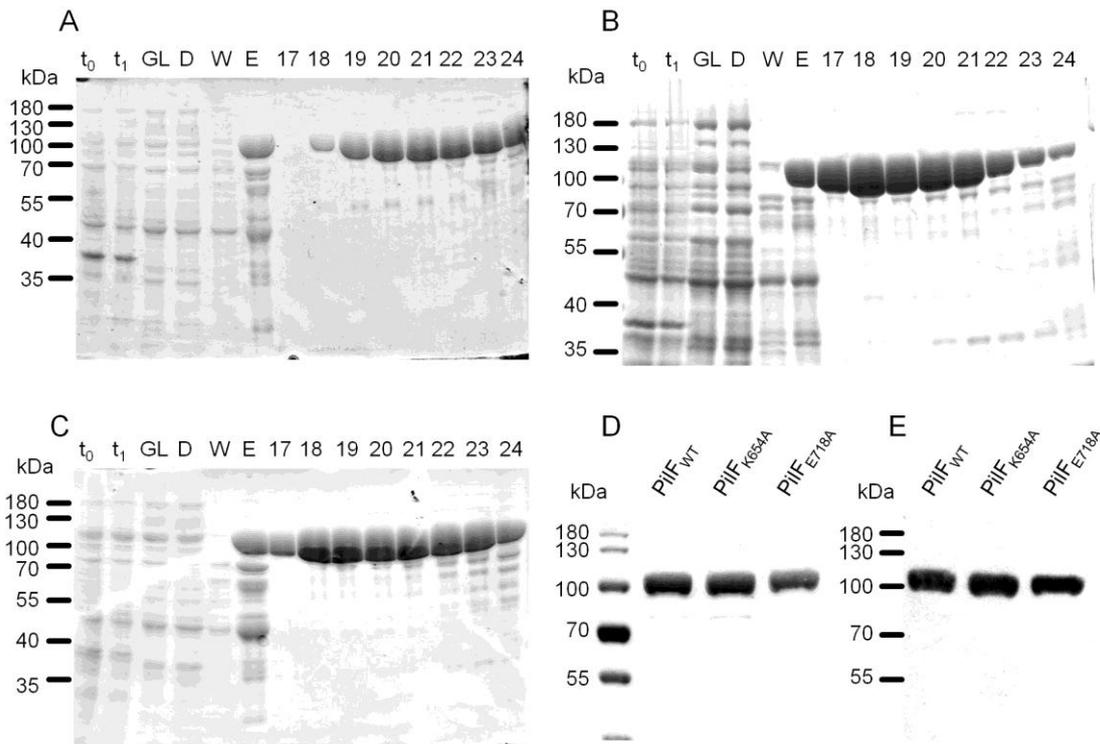
**Abb. 3.17. Codonaustausch in *pilF*<sub>K654A</sub> (A) und *pilF*<sub>E718A</sub> (B).** Vergleich der Sequenz von *pilF*<sub>WT</sub> und *pilF*<sub>K654A</sub> bzw. *pilF*<sub>E718A</sub>. Die ausgetauschten Codone und daraus resultierenden Aminosäuren sind fett hervorgehoben. Die Zahlen geben die Positionen der Aminosäuren in PilF an.



**Abb. 3.18. Überprüfung der PCR-Produkte zur ortsgerichteten Mutagenese von pET28-pilF.** Die PCR zur Erstellung der Plasmide pET28a-pilFK654A (A) und pET28a-pilFE718A (B) erfolgte mit den in Tabell 2.5 aufgelisteten Starteroligonukleotiden. Das Plasmid pET28a-pilF wurde als Matrize verwendet. Erwartet wurden PCR-Produkte der Größe 8086 Bp (Pfeile). Bei der PCR zur Erstellung von pET28a-pilFK654A entstand ein weiteres, unspezifisches Produkt (\*). Die DNA wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Die isolierten Plasmide pET28-pilFK654A und pET28-pilFE718A wurden jeweils in den Überexpressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, erfolgte die Anzucht der *E. coli* BL21 (DE3)-Stämme in 10 l LB-Medium mit 20 mg/l Kanamycin bei 37 °C mit einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,2. Die Expression von pilFK654A bzw. pilFE718A wurde nach 2,5 h Inkubation durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach Reduktion der Temperatur auf 30 °C und weiteren 3 – 4 h Inkubation wurden die Zellen geerntet. Nach Zellaufschluss mit der „French Pressure“-Zelle und der Ultraschallsonde erfolgte eine Hitzepräzipitation bei 68 °C. Die PilF-Varianten wurden aus dem geklärten Lysat durch Nickel-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration mit einer „Superdex 200 10/300“-Säule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) aufgereinigt (Abb. A8, A9, A10, Anhang). Die Elution erfolgte in filtriertem und entgasten Bicine-Puffer (50 mM Bicine, 200 mM NaCl, pH 8,5) bei einer Flussrate von 0,4 ml/min. Proben der gesammelten 0,5-ml-Fractionen wurden, ebenso wie Proben aller anderen Reinigungsschritte, mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 3.19 A, B, C). Die Fraktionen 17 - 21 der Gelfiltration (Elutionsvolumen von 8 - 10,5 ml) enthielten in der Regel gereinigtes PilF, wurden vereinigt und zusammen ankonzentriert (MWCO: 100 kDa). Die apparenten molekularen Massen der aufgereinigten PilF-Varianten von 100 kDa entsprechen den abgeleiteten molekularen Massen der Proteine (100,3 kDa).

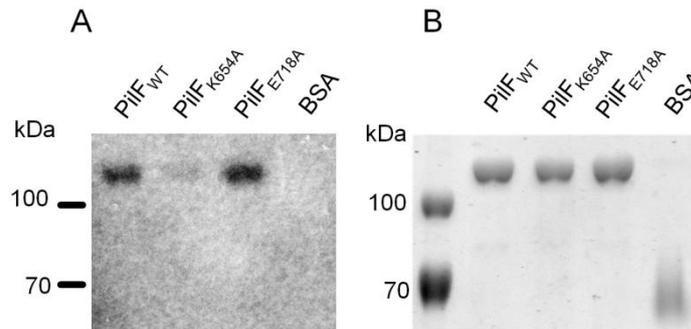
Typische Ausbeuten dieser Reinigungen waren 3 - 5 mg Protein pro 35 g feuchte Zellmasse. Zur Überprüfung der Reinheit wurden jeweils 3 µg isoliertes Protein in einem SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 3.19 D) und mittels Western Blot mit anti-PilF-Antiserum (1:7500) analysiert (Abb. 3.19 E). Es wurde deutlich, dass PilF<sub>K654A</sub> und PilF<sub>E718A</sub>, ebenso wie das PilF Wildtyp-Protein, in hoher Reinheit aufgereinigt wurden und dass die ~ 100 kDa Proteine dabei stabil blieben.



**Abb. 3.19. Reinigung von PilF<sub>WT</sub>, PilF<sub>K654A</sub> und PilF<sub>E718A</sub>.** Im Verlauf der Reinigung von PilF<sub>WT</sub> (A), PilF<sub>K654A</sub> (B), und PilF<sub>E718A</sub> (C) wurden Proben entnommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung angefärbt. t<sub>0</sub>, Gesamtprotein vor Induktion der Genexpression; t<sub>1</sub>, Gesamtprotein bei Ernte der Zellen, ~ 3,5 h nach Induktion; GL, gekläartes Lysat nach Zellaufschluss und Hitzefällung; D, Durchlauf der Nickelaffinitätschromatographie; W, Waschfraktion; E, Elution der Nickelaffinitätschromatographie; 17 - 24, die Zahlen geben die Fraktionen der Gelfiltration an (siehe Abb. A8, A9, A10, Anhang). Die Fraktionen 17 - 21 wurden jeweils vereinigt und ankonzentriert (MWCO: 100 kDa). Je 3 µg der gereinigten Proteine wurden in einem SDS-Gel (10 % Acrylamid) aufgetrennt und mit „Coomassie Brilliant Blue“ gefärbt (D), bzw. im Western Blot immunologisch mit anti-PilF Antiserum (1:7500) nachgewiesen (E).

### 3.3.2 ATP-Bindung und -Hydrolyse von PilF<sub>K654A</sub> und PilF<sub>E718A</sub>

Um zu untersuchen, ob die Proteinvarianten PilF<sub>K654A</sub> und PilF<sub>E718A</sub> in der Lage sind, ATP zu binden, wurden je 2 µg der isolierten Proteine mit 15 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP inkubiert und durch 10-minütige Bestrahlung mit UV-Licht quervernetzt. Wildtyp-PilF diente als Positivkontrolle und BSA als Negativkontrolle. Nach der UV-Licht-Bestrahlung wurden die Proteine gefällt, gewaschen, in SDS-Probenpuffer gelöst und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des radioaktiven ATP erfolgte auf einer Speicherleuchtstoffolie. Wie aus Abbildung 3.20 hervorgeht, binden Wildtyp-PilF und an PilF<sub>E718A</sub> vergleichbare Mengen an ATP. Das für PilF<sub>K654A</sub> detektierte Signal des gebundenen, markierten ATP war hingegen etwa 90 % schwächer. Dies führt zu dem Schluss, dass K654 auch in PilF von *T. thermophilus* eine entscheidende Rolle bei der ATP-Bindung spielt.

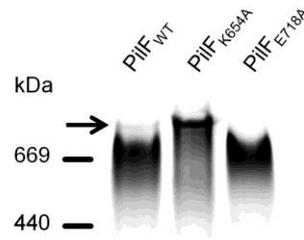


**Abb. 3.20. Bindung von ATP an PilF<sub>WT</sub>, PilF<sub>K654A</sub> und PilF<sub>E718A</sub>.** Je 2 µg der gereinigten PilF-Varianten wurden mit 15 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP durch UV-Licht-Bestrahlung quervernetzt. 2 µg BSA dienten als Negativkontrolle. Die Proteine wurden gefällt, in SDS-Probenpuffer gelöst und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend getrocknet und die Radioaktivität wurde auf einer Speicherleuchtstoffolie detektiert (A). Proben, die auf gleiche Weise behandelt wurden, jedoch in Abwesenheit von ATP, wurden ebenfalls im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt (B).

Desweiteren wurde die ATPase-Aktivität der gereinigten PilF-Varianten analysiert. Die ATPase-Aktivität wurde wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben bestimmt. Den gereinigten PilF-Varianten wurde ATP zugesetzt und die Freisetzung von Phosphat über 12 min bestimmt. Für PilF<sub>K654A</sub> und PilF<sub>E718A</sub> konnte keine ATPase-Aktivität detektiert werden, während Wildtyp-PilF eine Aktivität von  $22,7 \pm 2,2 \text{ nmol P}_i \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  aufwies. Dies führt zu dem Schluss, dass K654 und E718 in PilF notwendig für die ATP-Hydrolyse sind und stimmt mit der Hypothese überein, dass E718 das für die durch PilF-vermittelte ATP-Hydrolyse essentielle Glutamat ist.

### 3.3.3 Komplexbildung und -stabilität von PilF<sub>K654A</sub> und PilF<sub>E718A</sub>

Um zu untersuchen, inwieweit sich die Mutationen im Walker A- und Walker B-Motiv auf die Hexamerbildung von PilF auswirken, wurden die Proteinkomplexe in einer nativen PAGE untersucht. 30 µg der gereinigten PilF<sub>WT</sub>-, PilF<sub>K654A</sub>- und PilF<sub>E718A</sub>-Komplexe wurden in einem 3 - 15 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und dann mit „Blue Silver“ gefärbt. Wie aus Abbildung 3.21 ersichtlich ist, entspricht das Laufverhalten des PilF<sub>E718A</sub>-Komplexes dem des Wildtyp-Komplexes. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die apparente molekulare Masse von >669 kDa einem PilF Hexamer entspricht (Salzer *et al.* 2014a). Auch PilF<sub>K654A</sub> bildete einen hochmolekularen Komplex, der allerdings etwas langsamer im Gel migrierte. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass auch PilF<sub>WT</sub> in geringem Maße auf der gleichen Höhe zu sehen ist, wie der PilF<sub>K654A</sub>-Komplex (Abb. 3.21, Pfeil). Dies deutet an, dass die PilF-Komplexe in verschiedenen Konformationen vorliegen und dass die PilF-Komplexe durch die Mutation von K654 hauptsächlich die langsamer migrierende Konformationen annehmen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass PilF Hexamere bildet unabhängig davon, ob ATP gebunden oder hydrolysiert werden kann.

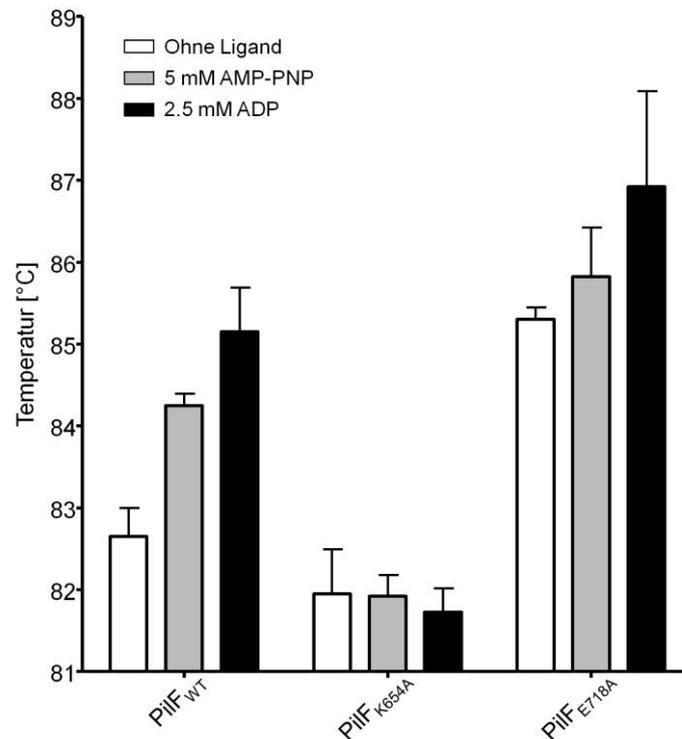


**Abb. 3.21. Komplexbildung von PilF<sub>WT</sub>, PilF<sub>K654A</sub> und PilF<sub>E718A</sub>.** Zur Untersuchung der Komplexbildung wurden je 30 µg der isolierten Proteinvarianten mittels nativer PAGE (3 - 15 % Acrylamid) aufgetrennt. Der Pfeil markiert eine im Gel langsamer migrierende Form des PilF-Komplexes. Die Proteine wurden mit „Blue Silver“ gefärbt.

Die Thermostabilität des PilF-Komplexes kann mittels Thermfluor-Assay ermittelt werden. Dabei wird dem gereinigten Proteinkomplex der Fluoreszenzfarbstoff „SYPRO Orange“ hinzugegeben. Dieser lagert sich an hydrophobe Bereiche von Proteinen an, wodurch die Fluoreszenz stark erhöht wird (Huynh und Partch 2015). Dissoziieren Protomere eines Proteinkomplexes, oder entfaltet sich ein Protein, so wird mehr Fläche für die Bindung von „SYPRO Orange“ frei. Bei PilF konnten mit dieser Methode zwei Entfaltungsereignisse detektiert werden (Salzer *et al.* 2014a). Die zweite Entfaltung, bei der es sich um die Denaturierung von PilF handelt, fand stets bei ~ 90,5 °C statt. Der erste Anstieg der Fluoreszenz wurde bei 80,8 ± 0,8 °C gemessen. Hierbei handelt es sich vermutlich um den Zerfall des Hexamers in Monomere. Durch Zugabe von 5 mM des ATP-Analogons AMP-PNP oder 2,5 mM ADP konnte der PilF-Komplex stabilisiert werden. AMP-PNP erhöhte die Temperatur, bei der der Komplex in Monomere zerfällt, um 4 °C, die Zugabe von ADP um 4,9 °C (Salzer *et al.* 2014a). Somit liegt die Vermutung nahe, dass die PilF-Komplexe der Varianten PilF<sub>K654A</sub> und PilF<sub>E718A</sub>, welche defekt in ATP-Bindung bzw. -Hydrolyse sind, veränderte Thermostabilität zeigen.

In Kooperation mit Barbara Rathmann (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.) wurden gereinigte PilF<sub>K654A</sub>-, PilF<sub>E718A</sub>- und Wildtyp-PilF-Komplexe zusammen mit „SYPRO Orange“ in einem Thermocycler (Qiagen, Hilden, Germany) erhitzt. Der Versuch wurde ebenfalls in Anwesenheit von 5 mM AMP-PNP bzw. 2,5 mM ADP durchgeführt. Der erste Anstieg der Fluoreszenz und somit die Dissoziation des Hexamers erfolgt beim Wildtyp-Komplex bei 82,65 ± 0,35 °C (Abb. 3.22). Die Zugaben von AMP-PNP oder ADP erhöhte diese Temperatur signifikant um 1,6 bzw. 2,5 °C (einseitiger t-Test, p < 0,01). Dieser Befund stimmt mit der oben genannten Stabilisierung des PilF-Komplexes durch AMP-PNP und ADP überein (Abb. 3.22).

Die Thermostabilität des PilF<sub>K654A</sub>-Komplexes unterschied sich in Abwesenheit der Liganden nicht signifikant von der des Wildtyp-Komplexes. Allerdings führte die Zugabe von AMP-PNP oder ADP zu keiner Erhöhung der Stabilität des PilF<sub>K654A</sub>-Komplexes, was aufgrund der fehlenden ATP-Bindung in dieser Variante zu erwarten war (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22. Thermostabilität der PiIF<sub>WT</sub>-, PiIF<sub>K654A</sub>- und PiIF<sub>E718A</sub>-Komplexe.** Dissoziations-temperatur der gereinigten PiIF-Komplexe in Abwesenheit (weiß) oder Anwesenheit von 5 mM AMP-PNP (grau) bzw. 2,5 mM ADP (schwarz). Die Messung erfolgte mittels Thermofluor-Assay (Kapitel 2.11) mit je 10 µg Protein bei pH 8,5. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 2 (PiIF<sub>WT</sub> ohne Ligand) bzw. 4 Messungen (alle weiteren).

Die Komplexe der Variante PiIF<sub>E718A</sub> zeigten hingegen eine um 2,6 °C erhöhte Thermostabilität im Vergleich zu Wildtyp-Komplexen. Da die Mutation des katalytischen Glutamats nur die ATP-Hydrolyse, nicht aber die Bindung des Liganden einschränkt, führte bei dieser Variante die Zugabe von AMP-PNP bzw. ADP, wie beim Wildtyp-PiIF, zu einer Steigerung der Thermostabilität (Abb. 3.22).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass K654 des Walker A-Motivs in PiIF notwendig für die Bindung von ATP oder ADP ist und die fehlende ATP/ADP-Bindung zu einer geringeren Thermostabilität des PiIF-Komplexes führt. Die Mutation des katalytischen E718, welches für die ATP-Hydrolyse essentiell ist, führte hingegen sogar zu einer höheren Thermostabilität, die durch AMP-PNP bzw. ADP noch weiter gesteigert werden konnte.

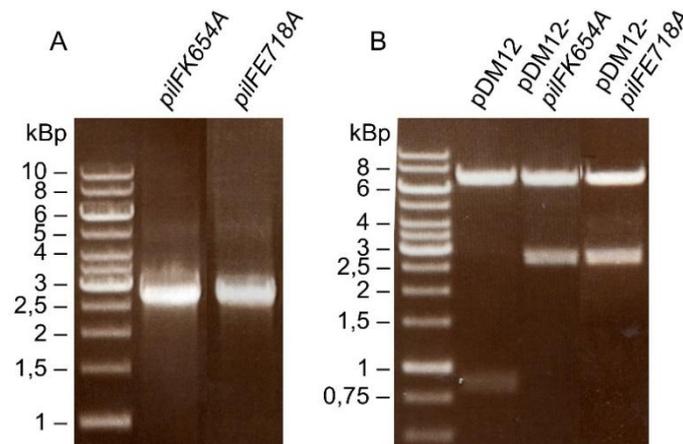
### 3.4 Rolle des Walker A- und Walker B-Motivs bei der Funktion von PilF in der T4P-Biogenese und der natürlichen Transformation

#### 3.4.1 Erstellung der *T. thermophilus*-Mutanten *pilFK654A* und *pilFE718A*

Nachdem die Auswirkungen der Mutationen im Walker A- und Walker B-Motiv auf PilF *in vitro* ermittelt wurden, stellte sich nun die Frage, wie sich diese Mutationen auf die Funktionen von PilF in *T. thermophilus in vivo* auswirken. Um dies zu analysieren, wurde die Deletionsmutante  $\Delta pilF::bleo$  *in trans* mit den Genen *pilFK654A* bzw. *pilFE718A* komplementiert. Anschließend wurden die Auswirkungen der Punktmutationen in *pilF* auf die natürliche Transformation sowie auf T4P-Bildung und T4P-assoziierte Funktionen untersucht. Zunächst musste hierfür eine Klonierung der mutierten *pilF*-Gene in den *E. coli/Thermus*-„Shuttle“-Vektor pDM12 erfolgen.

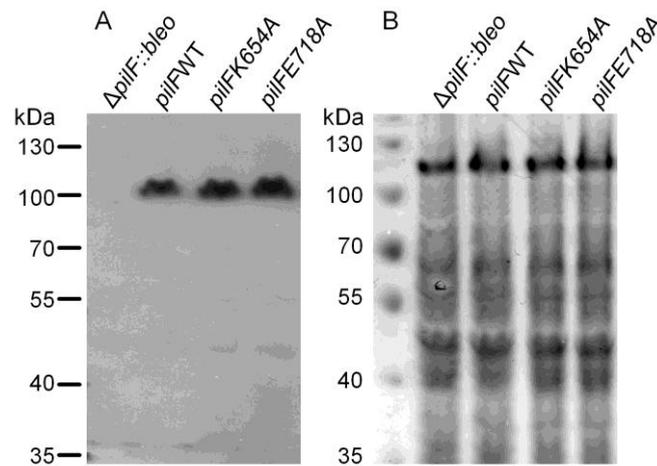
Da die durch ortsgerichtete Mutation erstellten Gene *pilFK654A* und *pilFE718A* bereits in pET28a-Vektoren vorlagen, wurden diese als Matrize für eine PCR genutzt. Die verwendeten Starteroligonukleotide *pilF\_pDM12\_for* und *pilF\_rev* (Tab. 2.5) fügten dabei eine NdeI-Schnittstelle und eine für ein His<sub>6</sub>-Tag codierende Sequenz an des 5'-Ende und eine NotI-Schnittstelle an das 3'-Ende der *pilF*-Sequenz an. Die PCR-Produkte sollten eine Größe von 2719 Bp haben und wurden im Agarosegel detektiert (Abb. 3.23 A). Anschließend wurden die PCR-Produkte mit den Restriktionsenzymen NdeI und NotI inkubiert. Der *E. coli/Thermus*-„Shuttle“-Vektor pDM12 wurde ebenfalls mit NdeI und NotI verdaut und dann dephosphoryliert. Es folgte eine Ligation von pDM12 und dem geschnittenen PCR-Produkt *pilFK654A* bzw. *pilFE718A*. Anschließend wurde *E. coli* DH5 $\alpha$  mit den Ligationsansätzen transformiert und auf Medium mit Kanamycin und Ampicillin ausplattiert.

Aus den resistenten Transformanten wurden die Plasmide isoliert. Diese wurden durch Verdau mit NdeI und NotI auf erfolgreiche Integration der *pilF*-Gene untersucht. Sowohl für pDM12-*pilFK654A*, als auch für pDM12-*pilFE718A* wurden jeweils zwei DNA-Fragmente der erwarteten Größen von 6555 Bp und 2719 Bp im Agarosegel detektiert (Abb. 3.23 B, Spur 3 und 4). Beim Verdau des Ausgangsplasmides pDM12 mit NdeI und NotI entstanden die erwarteten DNA-Fragmente der Größe 6555 Bp und 845 Bp (Abb. 3.23 B, Spur 2). Die korrekte Integration der Gene *pilFK654A* bzw. *pilFE718A* in pDM12 wurde durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden *Seq\_pDM12\_for* und *Seq\_pDM12\_rev* (Tab. 2.5) bestätigt.



**Abb. 3.23. Überprüfung der PCR-Produkte *pilFK654A* und *pilFE718A* und der Plasmide pDM12-*pilFK654A* und pDM12-*pilFE718A*.** Die mutierten Gene *pilFK654A* und *pilFE718A* wurden mit den Starteroligonukleotiden pilF\_pDM12\_for und pilF\_rev amplifiziert, wobei die entsprechenden pET28a-Plasmide als Matrize dienten. Erwartet wurden PCR-Produkte der Größe 2719 Bp (A). Die erstellten pDM12-Plasmide wurden mit NdeI und NotI verdaut, um die Insertion der mutierten *pilF*-Gene zu überprüfen. Dabei sollten DNA-Fragmente der Größen 6555 Bp und 2694 Bp entstehen (B, Spur 3 und 4). Das Ausgangsplasmid pDM12 wurde zum Vergleich ebenfalls mit NdeI und NotI verdaut, wobei Produkte der Größen 6555 Bp und 845 Bp erwartet und detektiert wurden (B, Spur 2). Die DNA wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt, die „GeneRuler 1 kb Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) diente als Größenstandard (A und B, Spur 1).

In vorangegangenen Experimenten wurde die Deletionsmutante  $\Delta pilF::bleo$  erfolgreich mit pDM12-*pilF* komplementiert, was die natürliche Kompetenz, sowie die T4P-Biogenese wiederherstellte (Salzer *et al.* 2014b). Die Expression des *pilF*-Gens erfolgte dabei mittels des konstitutiven Promotors des Cytochrom *bc1*-Gens aus *T. thermophilus*, welcher auf dem Plasmid pDM12 codiert ist (Werner *et al.* 2010). Die Plasmide pDM12-*pilFK654A* und pDM12-*pilFE718A* wurden nun ebenfalls durch Elektroporation in  $\Delta pilF::bleo$  eingebracht. Die Transformanden wurden in Kanamycin-haltigem TM<sup>+</sup>-Medium kultiviert und die Gesamt-DNA wurde isoliert. Etwa 4  $\mu$ g dieser DNA wurden in *E. coli* DH5 $\alpha$  retransformiert. *E. coli*-Zellen, die die in der Gesamt-DNA enthaltenen Plasmide aufgenommen hatten, wurden auf LB-Medium mit Kanamycin und Ampicillin selektioniert. Die Plasmide aus diesen Zellen wurden erneut isoliert, mit NdeI und NotI verdaut und in einer Agarosegelelektrophorese analysiert. Der Verdau führte erneut zu den zwei DNA-Fragmenten der Größen 6555 Bp und 2694 Bp, wie bereits in Abbildung 3.23 gezeigt. Somit kann geschlossen werden, dass die *T. thermophilus*-Stämme die Plasmide pDM12-*pilFK654A* und pDM12-*pilFE718A* tragen.



**Abb. 3.24. Immunologischer Nachweis der PilF-Varianten in den *T. thermophilus*-Mutanten *pilFK654A* und *pilFE718A*.** Jeweils 10 µg Gesamtzellextrakt der  $\Delta pilF::bleo$ -Mutante und der Mutante komplementiert mit pDM12-*pilF* (*pilFWT*), pDM12-*pilFK654A* bzw. pDM12-*pilFE718A* wurden in einem 10 %igen (Acrylamid) SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte ein Western Blot unter Verwendung von polyklonalem anti-PilF-Antiserum (1:7500) (A). Als Ladekontrolle wurde ein weiteres, gleich beladenes Gel, mit „Coomassie Brilliant Blue“ gefärbt (B).

Anschließend sollte überprüft werden, ob die *T. thermophilus*-Mutanten *pilFK654A* und *pilFE718A* die PilF-Proteinvarianten produzieren und ob die PilF-Mengen der Menge entsprechen, die in der mit pDM12-*pilF* komplementierten *pilF::bleo*-Mutante (*pilFWT*) detektiert werden konnte. Dazu wurden stationäre Zellen der *T. thermophilus*-Mutanten  $\Delta pilF::bleo$ , *pilFWT*, *pilFK654A* und *pilFE718A* in SDS-Probenpuffer gelöst und kurz gekocht. Die so gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Mit dem anti-PilF-Antiserum konnten vergleichbare PilF-Mengen in *pilFWT*, *pilFK654A* und *pilFE718A* detektiert werden (Abb. 3.24). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die im folgenden Kapitel beschriebenen Phänotypen der Mutanten durch die Mutationen in den Walker-Motiven hervorgerufen wurden und nicht etwa durch abweichende Mengen an PilF.

### 3.4.2 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten *pilFK654A* und *pilFE718A*

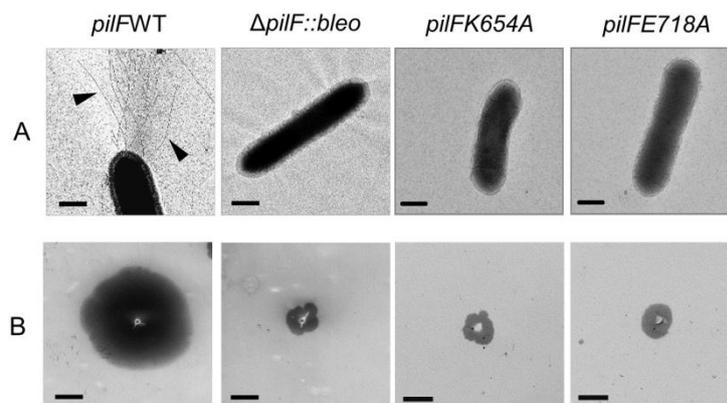
Die Assemblierungs-ATPase PilF ist essentiell für die natürliche Transformation von *T. thermophilus*, ebenso wie für die T4P-Assemblierung und T4P-assoziierte Funktionen wie „twitching motility“ oder Adhäsion an Oberflächen. Dies konnte durch Mutantenstudien mit *pilF*-Insertions- bzw. Deletionsmutanten gezeigt werden (Friedrich *et al.* 2002; Salzer *et al.* 2014b). Im Rahmen dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob die Bindung von ATP an PilF bzw. die ATP-Hydrolyse essentiell für die Funktionen von PilF *in vivo* sind.

Die natürliche Transformation der Mutanten wurde durch Zugabe von genomischer DNA eines Streptomycin-resistenten *T. thermophilus*-Stammes und Selektion auf Streptomycin-haltigem Medium analysiert. Der Wildtyp-Stamm *T. thermophilus* HB27 und die Deletionsmutante

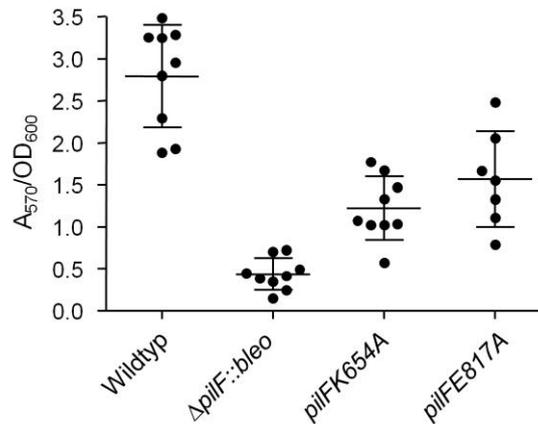
$\Delta pilF::bleo$  wurden ebenfalls untersucht. Während der Wildtyp eine Transformationsfrequenz von  $\sim 8,2 \times 10^{-4}$  Transformanden/Lebendzellzahl aufwies, zeigte die  $\Delta pilF::bleo$ -Mutante keine Transformierbarkeit. Die Mutanten *pilFK654A* und *pilFE817A* wiesen ebenfalls keine Transformanden auf, die Komplementation von  $\Delta pilF::bleo$  mit pDM12-*pilFK654A* oder pDM12-*pilFE718A* konnte die natürliche Transformierbarkeit also nicht wiederherstellen.

Da PilF eine duale Rolle in der natürlichen Transformation und der T4P-Assemblierung spielt, sollte als nächstes untersucht werden, ob die Mutation des Walker A- oder Walker B-Motivs auch einen Einfluss auf die Pilierung von *T. thermophilus* hat. Dazu wurden elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen in Zusammenarbeit mit Friederike Joos (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a.M.) und Ralf Salzer angefertigt. Abbildung 3.25 A zeigt beispielhafte Zellen. Etwa 78 % der mit dem Wildtyp-*pilF*-Gen komplementierten  $\Delta pilF::bleo$ -Mutanten (*pilFWT*) wiesen  $7 \pm 3$  Pili auf, während keine Pili an den anderen 22 % der Zellen detektiert wurden. Dies ist vergleichbar mit der Pilierung des *T. thermophilus* HB27-Wildtyps (Salzer *et al.* 2014b) Die Deletionsmutante  $\Delta pilF::bleo$ , sowie die mit pDM12-*pilFK654A* oder pDM12-*pilFE718A* komplementierte Deletionsmutante wiesen keine Pili auf.

Die Untersuchung der „twitching motility“ auf BSA-haltigem Minimalmedium zeigte ein ähnliches Ergebnis: Die mit Wildtyp-*pilF* komplementierte Mutante nahm eine „twitching“-Zone von  $2,03 \pm 0,13$  cm ein, wohingegen die Mutanten *pilFK654A* und *pilFE718A* sowie  $\Delta pilF::bleo$  nicht in der Lage waren, sich auf der Mediumsoberfläche fortzubewegen (Abb. 3.25 B). Dies steht im direkten Zusammenhang mit den fehlenden Pili, da „twitching motility“ eine T4P-abhängige Bewegung auf Oberflächen ist.



**Abb. 3.25. Pilierung und „twitching motility“ der Mutanten *pilFK654A* und *pilFE718A*.** EM-Aufnahmen von *T. thermophilus*-Zellen (A). Auf  $TM^+$ -Agar gewachsene Zellen wurden mit Kohlenstoff und Platin schrägbedampft (durchgeführt von F. Joos, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a.M.). Pro Stamm wurden  $\sim 250$  Zellen analysiert, die gezeigten Bilder sind beispielhaft (Bilder wurden von R. Salzer angefertigt). Die Pfeilspitzen markieren beispielhaft Pili. Größenstandard =  $0,5 \mu m$ . „Twitching motility“-Zonen wurden analysiert durch punktuellen Aufbringen der Zellen auf Minimalmedium mit 1 % (w/v) BSA und anschließender Inkubation bei  $68^\circ C$  für 72 h. Die Agarplatten wurden mit Coomassie-Lösung gefärbt. Überschüssiger Farbstoff und Zellen wurden dann abgewaschen, so dass die „twitching“-Höfe als nicht gefärbter Bereich sichtbar wurden (B). Die Färbung der Bilder wurde invertiert. Die „twitching“-Höfe sind repräsentativ für drei biologische Replikate. Größenstandard =  $0,5 cm$ .



**Abb. 3.26. Adhäsion von *pilFK654A* und *pilFE718A* an Plastikoberflächen.** Die *T. thermophilus*-Stämme wurden 3 Tage bei 68 °C in TM<sup>+</sup>-Medium in Mikrottestplatten kultiviert. Die OD<sub>600</sub> wurde bestimmt bevor das Medium mit planktonischen Zellen abgegossen wurde. Die adhärierenden Zellen wurden mit Kristallviolett gefärbt, welches bei 570 nm detektiert wurde. Die Absorption bei 570 nm ( $A_{570}$ ) geteilt durch die OD<sub>600</sub> ist ein Maß für die Adhäsion der Zellen. Die Punkte zeigen Ergebnisse der 7 - 9 unabhängigen Messungen. Zudem sind Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

T4P spielen, neben anderen Faktoren, auch bei der Anhaftung an Oberflächen eine Rolle. Um den Einfluss der K654A- und der E718A-Mutation in *pilF* auf die Adhäsion von *T. thermophilus* zu untersuchen, wurden der Wildtyp,  $\Delta pilF::bleo$ , *pilFK654A* und *pilFE718A* in je 200 µl TM<sup>+</sup>-Medium in still stehenden Mikrottestplatten kultiviert. Nach drei Tagen bei 68 °C, hatten sich die Zellen 2 - 3 mal geteilt. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion der mit Wildtyp-*pilF* komplementierte *pilF*-Mutante vergleichbar mit der des *T. thermophilus*-Wildtyp ist und dass die  $\Delta pilF::bleo$ -Deletionsmutante eine stark reduzierte Adhäsion zeigt (Salzer *et al.* 2014a). Auch in dieser Arbeit zeigte die  $\Delta pilF::bleo$ -Deletionsmutante kaum Adhäsion (Abb. 3.26). Interessanterweise konnte die Komplementation mit *pilFK654A* oder mit *pilFE718A* die Adhäsion zum Teil wiederherstellen. Diese Mutanten zeigten allerdings eine nur etwa halb so starke Adhäsion wie der Wildtyp (Abb. 3.26). Somit scheinen die ATP-Bindung und -Hydrolyse in PilF zwar eine Rolle bei der Anhaftung der Zellen an Plastikoberflächen zu spielen, sind aber nicht essentiell dafür.

Zusammenfassend zeigen die physiologischen Untersuchungen der mit pDM12-*pilFK654A* und pDM12-*pilFE718A* komplementierten  $\Delta pilF::bleo$ -Mutante, dass die ATPase-Aktivität von PilF essentiell für die natürliche Transformation, die T4P-Assemblierung und „twitching motility“ ist und eine wichtige Rolle bei der Adhäsion an Plastikoberflächen spielt.

### 3.5 Interaktion von PilF mit Komponenten des DNA-Translokators und T4P-Assemblierungskomplexes

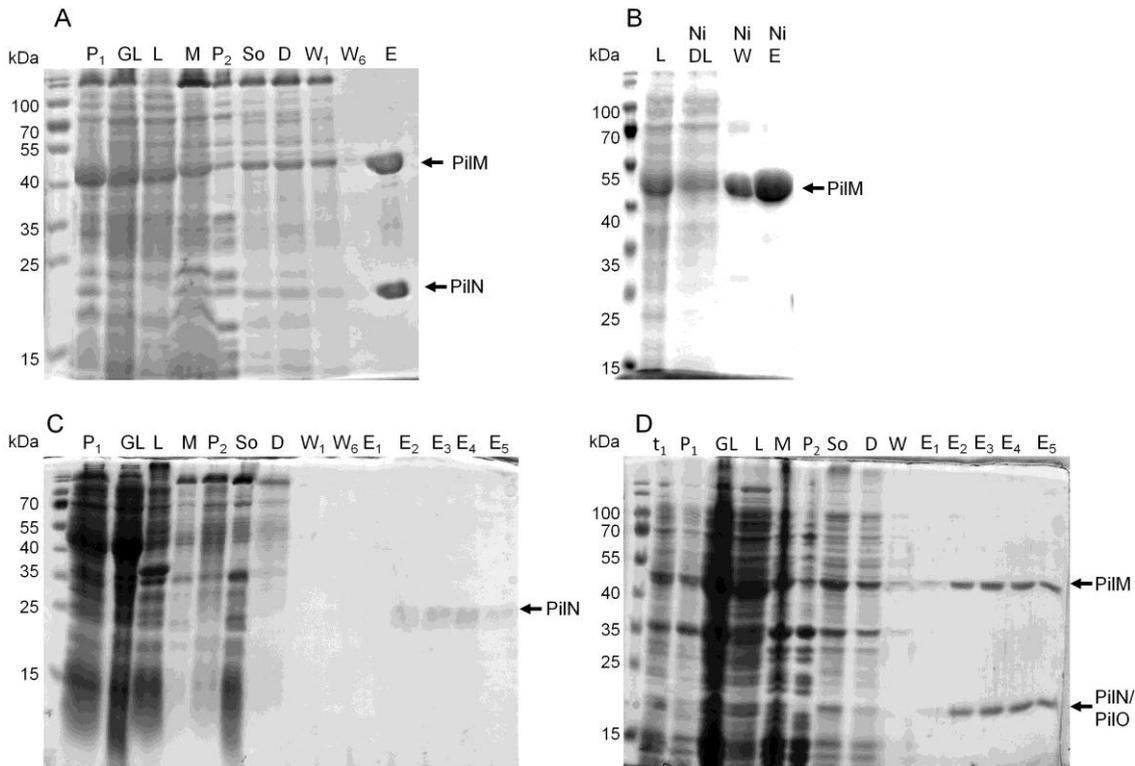
Die durch PilF katalysierte ATP-Hydrolyse ist notwendig für die DNA-Aufnahme und die T4P-Assemblierung von *T. thermophilus*. Allerdings stellt sich die Frage, wie die durch die cytoplasmatische Motor-ATPase PilF bereitgestellte Energie auf die anderen Komponenten des DNA-Translokators/T4P, die im Periplasma und z. T. in der äußeren Membran lokalisiert sind, übertragen wird. Studien der T4P-Systeme aus *M. xanthus*, *P. aeruginosa* und *N. meningitidis* haben gezeigt, dass die PilF-Homologe mit dem membranassoziierten, ATP bindenden Protein PilM interagieren (Bischof *et al.* 2016; McCallum *et al.* 2016; Goosens *et al.* 2017). Eine solche Interaktion wurde für *T. thermophilus* bisher nicht gezeigt. Jedoch zeigten Kristallstrukturen, dass *T. thermophilus*-PilM den N-Terminus des membrangebundenen Proteins PilN bindet (Karuppiah und Derrick 2011). Weitere EM-Untersuchungen ergaben, dass PilM, PilN und PilO einen Komplex (PilMNO) bilden und dass dieser Komplex mit dem Hauptpilin PilA4 interagiert (Karuppiah *et al.* 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun analysiert werden, ob der PilMNO-Komplex mit PilF interagiert. Zudem sollte die Rolle einzelner Domänen von PilF und PilM bei dieser Interaktion analysiert werden.

#### 3.5.1 Heterologe Produktion und Koaufrreinigung von PilMN und PilMNO

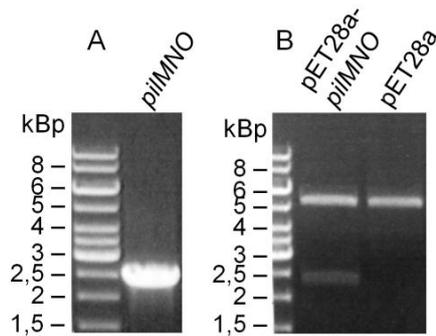
Um die Interaktion der ATPase PilF mit PilM, PilN, PilMN- und PilMNO-Komplexen analysieren zu können, wurden zunächst Expressionsplasmide benötigt, die für PilN-Strep, His<sub>6</sub>-PilMN-Strep und His<sub>6</sub>-PilMNO-Strep codieren. Die Plasmide pET28a-PilMN und pET28a-PilN lagen bereits in *E. coli* BL21 (DE3) vor (Salzer 2016).

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte in 10 l LB-Medium mit Kanamycin bei 37 °C. Die Produktion von His<sub>6</sub>-PilMN-Strep bzw. PilN-Strep wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach dem Zellaufschluss wurde das geklärte Lysat durch Ultrazentrifugation in Membranen und lösliche Bestandteile getrennt. His<sub>6</sub>-PilM wurde in beiden Fraktionen detektiert. Aus der löslichen Fraktion wurde His<sub>6</sub>-PilM mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert (Abb. 3.27 B). Das membranassoziierte His<sub>6</sub>-PilM wurde zusammen mit PilN-Strep aus der Membranfraktion gereinigt. Dafür wurden Membranproteine mit 1 % (w/v) DDM solubilisiert und anschließend wurde eine Strep-Tactin-Affinitätschromatographie durchgeführt (Kapitel 2.6.2). Dies führte zur Koaufrreinigung von PilN-Strep und His<sub>6</sub>-PilM (Abb. 3.27 A). Aus dem pET28a-PilN tragenden *E. coli* BL21 (DE3)-Stamm wurde PilN-Strep ebenfalls aus Membran-Solubilisat durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie isoliert (Abb. 3.27 C).



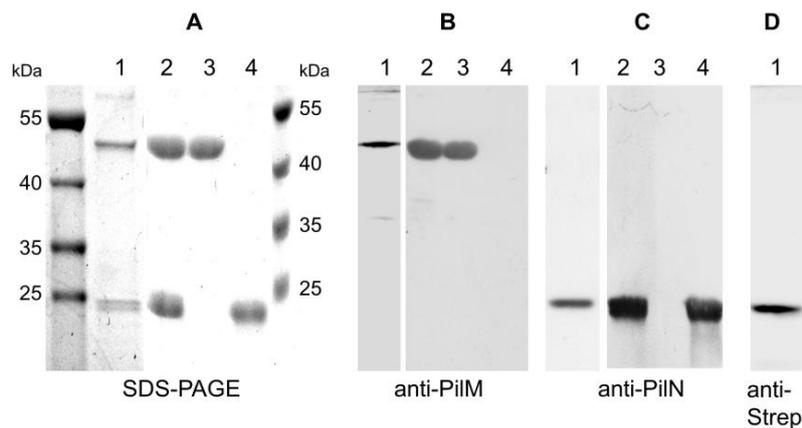
**Abb. 3.27. Reinigung von His<sub>6</sub>-PilMN-Strep (A), His<sub>6</sub>-PilM (B), PilN-Strep (C) und His<sub>6</sub>-PilMNO-Strep (D).** His<sub>6</sub>-PilMN-Strep wurde heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) produziert und aus solubilisierten Membranen durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie isoliert (A). Aus der löslichen Fraktion der gleichen Zellen wurde His<sub>6</sub>-PilM durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (B). PilN-Strep wurde aus solubilisierten Membranen eines *E. coli* BL21 (DE3)-Stammes durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt (C). His<sub>6</sub>-PilMNO-Strep wurde aus solubilisierten Membranen von *E. coli* T7 Express-Zellen durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie und Gelfiltration isoliert (D). Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit „Coomassie Brilliant Blue“ gefärbt. t<sub>1</sub>, Gesamtprotein bei Ernte der Zellen; P<sub>1</sub>, Pellet nach Zellaufschluss und Zentrifugation; GL, gekläartes Lysat nach Zellaufschluss und Zentrifugation; L, Lösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation; M, Membranbestandteile; P<sub>2</sub>, Pellet nach Solubilisierung und Ultrazentrifugation; So, Solubilisat; D, Durchlauf der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie; W<sub>1</sub>, W<sub>6</sub> Waschfraktionen; E, Elution; E<sub>1</sub>-E<sub>6</sub>, einzelne Elutionsfraktionen der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie; Ni DL, Durchlauf der Ni-NTA-Affinitätschromatographie; Ni W, Waschfraktion der Ni-NTA-Affinitätschromatographie; Ni E, Elution der Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Die „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) diente als Größenstandard (A, B, C, D, Spur 1).

Um die Komplexbildung von PilM, PilN und PilO zu analysieren, wurde das Expressionsplasmid pET28a-PilMNO erstellt. Dafür wurden die überlappenden Gene *pilM*, *pilN* und *pilO* mittels der Starteroligonukleotide *pilM*\_His\_for und *pilO*\_Strep\_rev an genomischer DNA aus *T. thermophilus* HB27 amplifiziert (Abb. 3.28 A). Das PCR-Produkt und pET28a wurden mit NdeI und NotI verdaut und, nach Dephosphorylierung von pET28a, ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5α transformiert. Aus Kanamycin-resistenten Transformanden wurden die Plasmide isoliert und durch Restriktion mit NdeI und NotI überprüft. Abbildung 3.28 B zeigt, dass dabei die beiden erwarteten DNA-Fragmente von 5299 Bp und 2375 Bp gebildet wurden, während aus dem Verdau des Ausgangsplasmides pET28a, wie erwartet, nur ein Fragment (5299 Bp) resultierte.



**Abb. 3.28. Überprüfung des PCR-Produktes *pilMNO* und des Plasmides pET28a-PilMNO.** Die Gene *pilM*, *pilN*, *pilO* (*pilMNO*) wurden mit den Starteroligonukleotiden *pilM*\_His\_for und *pilO*\_Strep\_rev amplifiziert. Erwartet wurde ein PCR-Produkt der Größe 2391 Bp (A, Spur 2). Dieses PCR-Produkt wurde in pET28a eingebracht. Das erstellte Plasmid pET28a-PilMNO wurde zur Kontrolle mit NdeI und NotI verdaut. Dabei sollten DNA Fragmente der Größen 5299 Bp und 2375 Bp entstehen (B, Spur 2). Das Ausgangsplasmid pET28a wurde zum Vergleich ebenfalls mit NdeI und NotI Verdaut, wobei ein 5299-Bp-Produkt erwartet wurde (B, Spur 3). Die DNA wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Zur Produktion des PilMNO-Komplexes wurde pET28a-PilMNO in den Expressionsstamm *E. coli* T7 Express (New England Biolabs, Ipswich) transformiert. Hier erfolgte die Zellanzucht, wie von Karrupiah *et al.* (2013) beschrieben, in 2 × YT-Medium mit Kanamycin bei 37 °C. Die Induktion der *pilMNO*-Genexpression erfolgte bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ~ 1 durch Zugabe von 0,1 mM IPTG, gefolgt von einer weiteren Kultivierung bei 16 °C über Nacht. Die Reinigung des His<sub>6</sub>-PilMNO-Strep-Komplexes erfolgte, ähnlich wie die des His<sub>6</sub>-PilMN-Strep-Komplexes, aus mit 1 % (w/v) DDM solubilisierten Membranen (Abb. 3.27 D). His<sub>6</sub>-PilM und PilN wurden hierbei zusammen mit PilO-Strep über eine Strep-Tactin-Säule koioliert. Dies indiziert, dass PilMNO einen Komplex bilden.

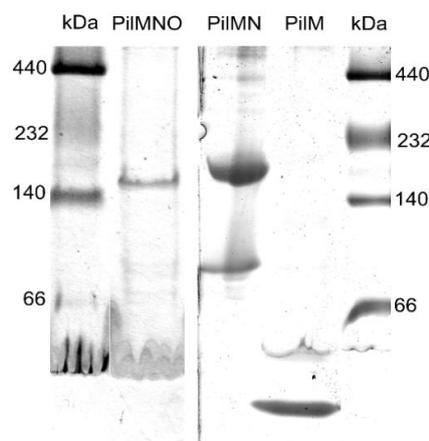


**Abb. 3.29. Western Blot-Analysen der gereinigten PilMNO- und PilMN-Komplexe und der PilM- und PilN-Proteine.** Aus *E. coli* BL21 (DE3) isoliertes His<sub>6</sub>-PilMNO-Strep (Spur 1), His<sub>6</sub>-PilMN-Strep (Spur 2), His<sub>6</sub>-PilM (Spur 3) und PilN-Strep (Spur 4) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (A). Um His<sub>6</sub>-PilM (44 kDa), PilN (23 kDa) und PilO-Strep (22,5 kDa) deutlich voneinander zu trennen, wurde ein 4 – 20 %iges Acrylamid-Gradientengel verwendet (Spur 1), für alle weiteren Präparationen ein 14 %iges Acrylamidgel. Zur Überprüfung der Proteinidentitäten, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt mit anti-PilM-Antiserum (1:5000) (B), anti-PilN-Antiserum (1:5000) (C) und Strep-Tactin-HRP-Konjugat (laut Herstellerangaben, iba Lifesciences, Göttingen) (D).

Anschließend wurden die PilMNO-haltigen Eluate der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie vereinigt, ankonzentriert (MWCO: 100 kDa) und dann durch Gelfiltration mit einer „Superdex 200 (10/300)“-Säule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) aufgetrennt. Die Equilibrierung und Elution erfolgte mit MNO-Puffer (25 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % (v/v) Glycerin, pH 8,0) mit 0,4 mM DDM und einer Flussrate von 0,4 ml/min. Die Peak-Fractionen wurden im SDS-Gel aufgetrennt. Die Fraktionen mit den Elutionsvolumen 8,5 - 13 ml enthielten PilM, PilN und PilO (siehe Abb. A11, Anhang), wurden vereinigt und ankonzentriert (MWCO: 100 kDa). Alle gereinigten Proteinkomplexe wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, wodurch die erfolgreiche Koisolation von PilMNO (Abb. 3.29 A, B, C, D, Spur 1) und PilMN (Abb. 3.29 A, B, C, Spur 2), sowie die Isolation von PilM (Spur 3) und PilN (Spur 4) bestätigt wurde.

Um den oligomeren Status der PilMNO- und PilMN-Komplexe zu bestimmen, wurde eine native PAGE durchgeführt. His<sub>6</sub>-PilMNO-Strep migrierte als ein Komplex, der einer molekularen Masse von ~ 160 kDa entspricht (Abb. 3.30, Spur 2). Das korrespondiert mit einer Stöchiometrie von 2:2:2, wie sie auch von Karrupiah *et al.* (2013) beobachtet wurde. Für His<sub>6</sub>-PilMN-Strep wurden zwei Komplexe detektiert, die ~ 80 und ~ 195 kDa entsprechen, was in etwa Komplexen mit 1:1 und 3:3 Stöchiometrie entspricht (Abb. 3.30, Spur 3).

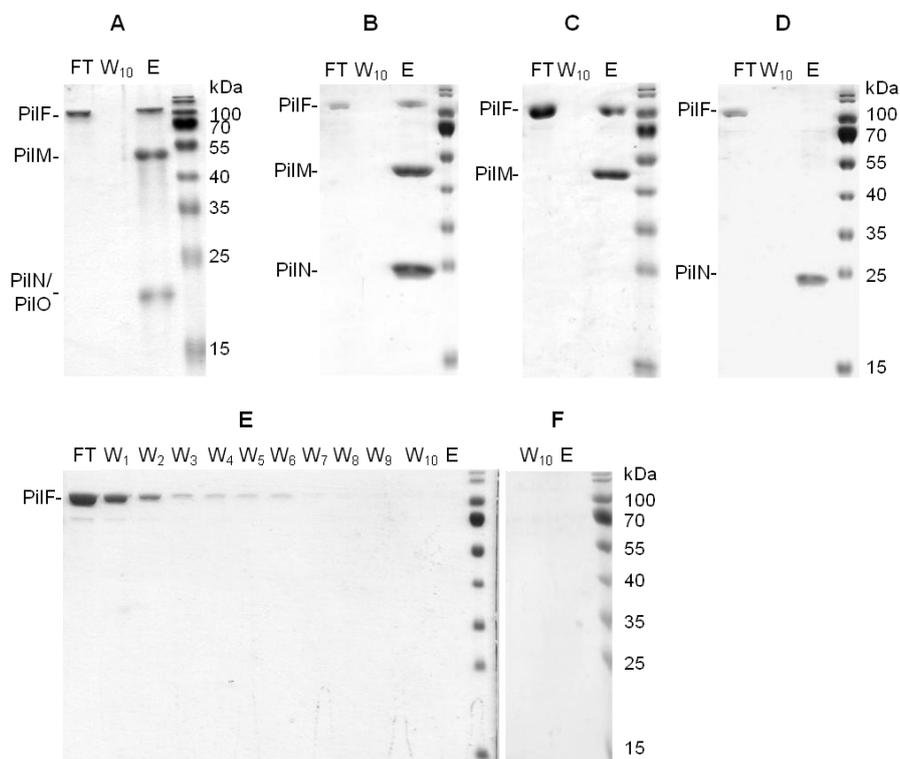
Da für PilM aus *P. aeruginosa* beschrieben wurde, dass es in Abwesenheit von PilN Homodimere bildet (McCallum *et al.* 2016), wurde die mögliche Oligomerisierung von PilM aus *T. thermophilus* mittels nativer PAGE analysiert. His<sub>6</sub>-PilM migrierte schneller als das 66-kDa-Protein des Größenstandards (Abb. 3.30, Spur 4 und 5). Somit liegt His<sub>6</sub>-PilM (abgeleitete molekulare Masse von 44 kDa) nicht als Oligomer vor. Da in der SDS-PAGE der gleichen Proteinprobe keine Abbauprodukte detektiert wurden (Abb. 3.29, Spur 3), kann davon ausgegangen werden, dass His<sub>6</sub>-PilM als Monomer vorliegt. Es konnte also ausgeschlossen werden, dass His<sub>6</sub>-PilM oligomerisiert, instabil ist und/oder Aggregate bildet, wie es für heterolog produziertes PilM aus *M. xanthus* und aus *P. aeruginosa* beschrieben wurde (Bischof *et al.* 2016; McCallum *et al.* 2016).



**Abb. 3.30. Analyse der Komplexbildung von PilMNO, PilMN und PilM durch Auftrennung der (ko)aufgereinigten Proteine im nativen Gel.** His<sub>6</sub>-PilMNO-Strep (Spur 2), His<sub>6</sub>-PilMN-Strep (Spur 3) und His<sub>6</sub>-PilM (Spur 4) wurden unter native Bedingungen in einem 5 - 20 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit „InstantBlue“ gefärbt. Proteine des „Amersham HMW Calibration Kit for native Electrophoresis“ (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) dienen als Größenstandard (Spur 1 und 5).

### 3.5.2 PilM interagiert mit PilF

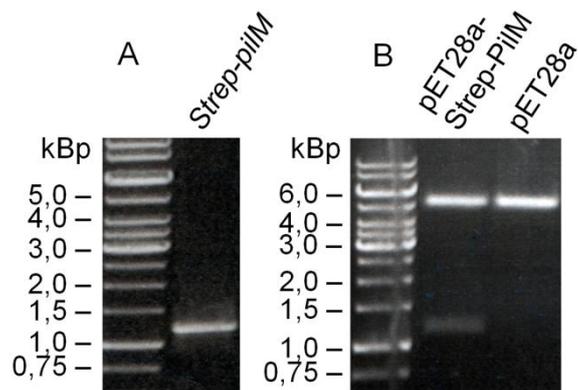
Im Folgenden sollte die potentielle Interaktion der PilMNO- und PilMN-Proteinkomplexe mit der löslichen Assemblierungs-ATPase PilF analysiert werden. His<sub>6</sub>-PilF-Hexamere wurden wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben produziert und gereinigt. Zur Analyse der Protein-Protein-Interaktionen wurden His<sub>6</sub>-PilMN-Strep- bzw. His<sub>6</sub>-PilMNO-Strep-Komplexe an eine Strep-Tactin-Säule gebunden und mit einem Überschuss an His<sub>6</sub>-PilF-Komplexen inkubiert (siehe Kapitel 2.7). Als Negativkontrolle wurde His<sub>6</sub>-PilF mit einer unbeladenen Strep-Tactin-Säule inkubiert. Nachdem diese zehnmal mit einem Säulenvolumen MN-Puffer inkl. 0,4 mM DDM gewaschen wurde, war kein PilF mehr in der Wasch- oder Elutionsfraktion enthalten (Abb. 3.31 E). Auch nach fünffachem Ankonzentrieren der zehnten Waschfraktion und des Eluates, war kein PilF zu detektieren (Abb. 3.31 F). Im Gegensatz dazu eluierte His<sub>6</sub>-PilF zusammen mit PilMNO bzw. PilMN nach Koinkubation (Abb. 3.31 A, B). Dies weist darauf hin, dass PilF mit den PilMNO- und PilMN-Komplexen interagiert.



**Abb. 3.31. PilMNO, PilMN und PilM interagieren mit PilF.** His<sub>6</sub>-PilMNO-Strep (A), His<sub>6</sub>-PilMN-Strep (B), Strep-PilM (C) und PilN-Strep (D) wurden jeweils an eine Strep-Tactin-Säule gebunden und mit gereinigtem His<sub>6</sub>-PilF inkubiert. Vor der Elution wurde mit zehnmal einem Säulenvolumen MN-Puffer inkl. 0,4 mM DDM gewaschen. Die jeweils zehnte Waschfraktion (W<sub>10</sub>) und die Eluate wurden fünffach ankonzentriert und ebenso wie der Durchlauf (DL) mittels SDS-PAGE aufgetrennt (16 % Gel bei PilMNO, 14 % Gel bei PilMN, PilM und PilN). Zur Kontrolle wurde His<sub>6</sub>-PilF auf eine „leere“ Strep-Tactin-Säule geladen. Diese wurde ebenfalls wie oben beschrieben gewaschen und dann eluiert (E). Nach dem Ankonzentrieren der W<sub>10</sub>- und Elutionsfraktion waren keine Proteine zu detektieren (F). DL, Durchlauf; W<sub>1-10</sub>, Waschfraktionen; E, Eluat; Gele wurden mit „InstantBlue“ gefärbt.

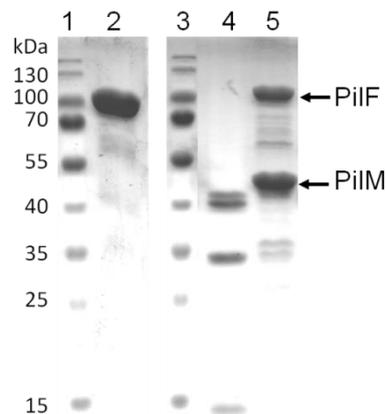
Zur Klärung der Frage, ob PilF mit PilN oder PilM interagiert, wurde zunächst PilN-Strep an eine Strep-Tactin-Säule gebunden. Nach Koinkubation und Affinitätschromatographie koeluierte His<sub>6</sub>-PilF nicht mit PilN-Strep (Abb. 3.31 D), PilF scheint also nicht direkt an PilN zu binden. Somit ist PilM vermutlich der direkte Interaktionspartner von PilF. Um dies zu bestätigen, musste zunächst eine PilM-Variante mit Strep-Tag erstellt werden, die dann als Köderprotein im säulen- gebundenen Interaktionstest genutzt werden konnte. Zur Erstellung des Expressionsplasmides pET28a-Strep-PilM wurde *pilM* an genomischer *T. thermophilus*-DNA mit den Starteroligonukleotiden *pilM*\_Strep\_for und *pilM*\_rev (Tab. 2.5) amplifiziert, wobei die Sequenz für einen N-terminalen Strep-Tag angefügt wurde. Das PCR-Produkt entsprach der erwarteten Größe von 1184 Bp (Abb. 3.32 A, Spur 2) und wurde mit NcoI und NotI verdaut. Der Vektor pET28a wurde ebenfalls mit NcoI und NotI verdaut, dann dephosphoryliert und mit *Strep-pilM* ligiert. Der Liga- tionsansatz wurde in *E. coli* DH5α transformiert. Aus auf Kanamycin-haltigem Medium selektio- nierten Transformanden wurden anschließend Plasmide isoliert. Diese wurden zur Kontrolle mit NcoI und NotI verdaut, wobei die erwarteten DNA-Fragmente der Größen 5240 Bp und 1169 Bp entstanden (Abb. 3.32 B, Spur 2), während im Vergleich beim Verdau von pET28a nur ein Frag- ment der Größe 5240 Bp entstand (Abb. 3.32 B, Spur 3).

Das überprüfte Plasmid pET28a-Strep-PilM wurde zur Proteinproduktion in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Die Produktion und Reinigung von PilM erfolgte mittels Strep-Tactin- Affinitätschromatographie (Kapitel 2.6.2). Zur Analyse der Interaktion mit PilF, wurde Strep- PilM mit gereinigten His<sub>6</sub>-PilF-Komplexen auf der Strep-Tactin-Säule koinkubiert, gewaschen und eluiert. Dabei koeluierte PilF mit Strep-PilM (Abb. 3.31 C). Dies deutet auf eine direkte In- teraktion von PilF und PilM hin.



**Abb. 3.32. Überprüfung des amplifizierten PCR-Produktes *Strep-pilM* und des Plasmides pET28a-Strep-PilM.** *Strep-pilM* wurde mit den Starteroligonukleotiden *pilM*\_Strep\_for und *pilM*\_rev (Tab. 2.5) amplifiziert. Erwartet wurde ein PCR-Produkt der Größe 1184 Bp (A). Das erstellte Plasmid pET28a-Strep-PilM wurde zur Kontrolle mit NcoI und NotI verdaut. Dabei wurden DNA-Fragmente der Größen 5240 Bp und 1169 Bp erwartet (B, Spur 2). Das Ausgangsplasmid pET28a wurde ebenfalls mit NcoI und NotI verdaut, wobei ein 5240-Bp-Produkt generiert wurde (B, Spur 3). Die DNA wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Als Größenstandard wurde die „GeneRuler 1 kb Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet (A und B, Spur 1).

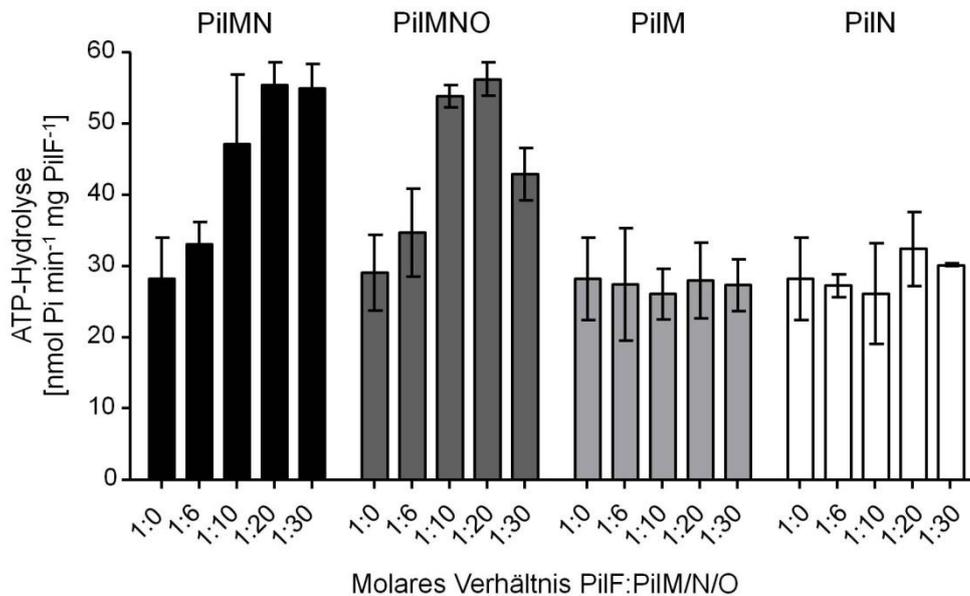
Häufig führt die direkte Interaktion von Proteinen zum Schutz vor Proteinabbau und somit zu einer erhöhten Stabilität (Wang *et al.* 1997; Ray *et al.* 2003; Camberg *et al.* 2007). Während PilF während der Lagerung bei -20 °C stabil bleibt, konnte beobachtet werden, dass das Protein in mehrere, kleinere Peptide zerfällt, wenn es über einen längeren Zeitraum bei 8 °C oder 20 °C gelagert wird. Wie in Abbildung 3.33 zu sehen ist, lag nach 9 Tagen Inkubation bei 20 °C kein vollständiges PilF (100 kDa) mehr vor. Wurde PilF zusammen mit gereinigtem His<sub>6</sub>-PilM 9 Tage bei 20 °C koinkubiert, war der Zerfall von PilF deutlich geringer und ~ 50 % lagen noch als 100-kDa-Protein vor (Abb. 3.33). Dies untermauert die Ergebnisse der Koelution von PilF und PilM. Die erhöhte Stabilität von PilF könnte aus der Bindung von PilM an PilF resultieren, durch die Proteinbereiche in PilF für Proteasen unzugänglich gemacht wurden. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass PilF mit dem membrangebundenen PilMNO-Komplex durch direkte Bindung an PilM interagiert.



**Abb. 3.33. PilM stabilisiert PilF.** 6 µg gereinigtes PilF, welches zuvor bei -20 °C gelagert wurde, wurde in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Spur 2). Wurde PilF 9 Tage bei 20 °C gelagert, war kein ~ 100-kDa-Protein zu detektieren, stattdessen mehrere kleinere Peptide (Spur 4). PilF wurde zusammen mit 3,5 µg gereinigtem His<sub>6</sub>-PilM 9 Tage bei 20 °C gelagert, was zu einem geringeren Zerfall von PilF führte (Spur 5). Spur 1 und 3, „PageRuler Prestained“-Protein-Größenstandard (Thermo Fisher Scientific, Waltham).

### 3.5.3 PilMN- und PilMNO-Komplexe stimulieren die ATPase-Aktivität von PilF

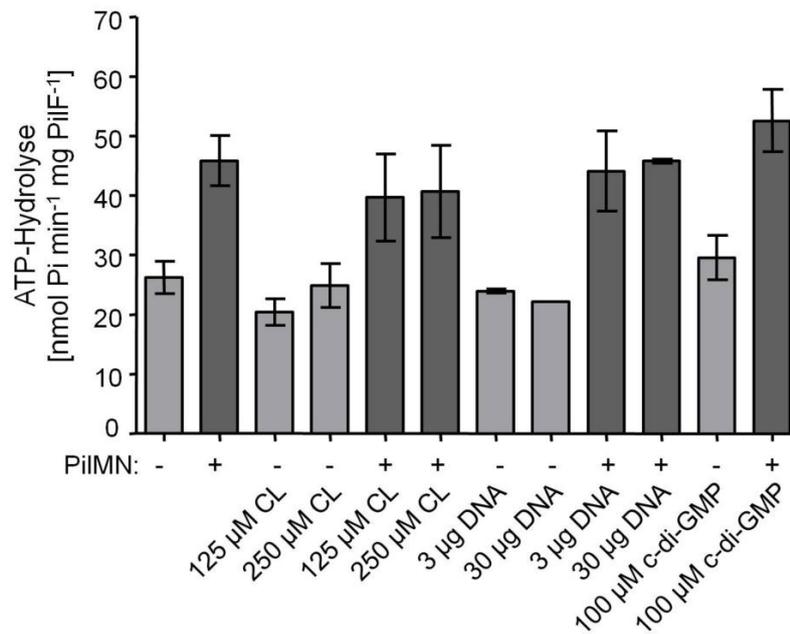
Für die T2SS Assemblierungs-ATPasen EpsE aus *V. cholerae* und XpsE aus *X. campestris* und für die Assemblierungs-ATPase BfpD des BFP von EPEC konnte gezeigt werden, dass ihre ATPase-Aktivität durch Interaktion mit der N-terminalen Domäne von EpsL bzw. XpsL oder BfpC stimuliert wird (Camberg *et al.* 2007; Chen *et al.* 2005; Crowther *et al.* 2005). EpsL (XpsL, BfpC) entspricht einer genetischen Fusion der T4P Proteine PilM und PilN, wobei die N-terminale Domäne von EpsL (XpsL, BfpC) ein Strukturhomolog des cytoplasmatischen PilM ist (Shiue *et al.* 2006; McCallum *et al.* 2016). Eine Stimulation einer T4P Assemblierungs-ATPase durch PilM konnte bisher nicht gezeigt werden (Bischof *et al.* 2016; McCallum *et al.* 2016).



**Abb. 3.34. PilMN- und PilMNO-Komplexe stimulieren PilF ATPase-Aktivität.** Zur Messung der durch PilF katalysierten ATP-Hydrolyse wurden 66,7 pmol PilF Hexamere mit 600 nmol ATP bei 68 °C inkubiert und die Zunahme an freiem Phosphat wurde über 15 min gemessen. Verschiedene Mengen PilMN (schwarz), PilMNO (dunkelgrau), PilM (hellgrau) oder PilN (weiß) wurden hinzugegeben, wobei die Menge an MN-Puffer und Detergenz gleich blieb. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichung von mindestens 3 Experimenten.

Um zu analysieren, ob PilM, PilMN- oder PilMNO-Komplexe aus *T. thermophilus* in der Lage sind, die durch PilF katalysierte ATP-Hydrolyse zu stimulieren, wurden verschiedene Mengen gereinigtes His<sub>6</sub>-PilMN-Strep, His<sub>6</sub>-PilMNO-Strep, His<sub>6</sub>-PilM oder PilN-Strep mit PilF inkubiert und die ATPase-Aktivität gemessen (Abb. 3.34). Die Zugabe von PilMN zu PilF führte tatsächlich zur Stimulation, deren Maximum bei einem molaren Verhältnis von 1:20 (PilF-Hexamer: PilMN-Komplex) erreicht wurde und die zu einer Verdopplung der ATPase-Aktivität von PilF führte. Ebenso führte ein 20-facher Überschuss von PilMNO-Komplexen zu einer 2-fachen Stimulation von PilF. Im Gegensatz dazu hatte die Zugabe von nur PilM oder PilN zu PilF keinen Einfluss auf die ATP-Hydrolyse. PilMN, PilMNO, PilM oder PilN zeigten in Abwesenheit von PilF keinerlei ATPase-Aktivität. Zusammengefasst zeigt dies, dass die Bindung von PilM an PilF zur Stimulation der ATPase-Aktivität führt, aber nur, wenn PilM auch mit PilN interagiert.

Für einige Assemblierungs-ATPasen wurde eine Stimulation durch Membranlipide beschrieben (Camberg *et al.* 2007; Ghosh *et al.* 2011; Auvray *et al.* 2002; Lill *et al.* 1990). Dies könnte, zusammen mit der Interaktion mit dem membrangebundenen PilMNO-Komplex, sicherstellen, dass die volle ATPase-Aktivität erst erreicht wird, wenn die Assemblierungs-ATPase an ihrem Bestimmungsort an der Membran gebunden ist. Die stärkste Stimulierung auf ein 130-faches der Grundaktivität wurde für EpsE aus *V. cholerae* beschrieben, wenn EpsL und Cardiolipin (CL) zugegeben wurden (Camberg *et al.* 2007). CL wurde ebenfalls in der inneren Membran von *T. thermophilus* detektiert (Zhou *et al.* 2011).



**Abb. 3.35. PilF ATPase-Aktivität in Anwesenheit potentieller Interaktionspartner.** Die PilF-katalysierte ATP-Hydrolyse wurde wie für Abbildung 3.34 beschrieben analysiert. Dabei wurde, wenn angegeben, gereinigter PilMN-Komplex im molaren Verhältnis von 1:20 (PilF:PilMN) zugegeben. Zudem wurden die angegebenen Mengen des Phospholipids CL oder des PilF-Liganden polyA-ssDNA hinzugefügt. Die Auswirkungen von 100 µM des Sekundärbotenstoffs c-di-GMP auf die PilF-Aktivität wurde ebenfalls in An- oder Abwesenheit von PilMN untersucht. ATP-Hydrolyse ohne Zugabe von PilMN ist hellgrau, in Anwesenheit von PilMN dunkelgrau dargestellt. Mittelwerte ± Standardfehler von mindestens 2 Experimenten.

Um den Einfluss von CL auf die ATPase-Aktivität von PilF zu analysieren, wurden zwei verschiedene Mengen an CL-Vesikeln (125 µM und 250 µM CL) mit PilF gemischt, entweder alleine oder in Anwesenheit von His<sub>6</sub>-PilMN-Strep-Komplexen, wobei die PilMN-Komplexe in einem Verhältnis von 1:20 (PilF-Hexamere:PilMN-Komplex) hinzugegeben wurden. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von ATP gestartet. In Abwesenheit von CL wurden ATPase-Aktivitäten von  $26,7 \pm 4,9 \text{ nmol P}_1 \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  für PilF alleine und von  $56,3 \pm 0,5 \text{ nmol P}_1 \times \text{mg PilF}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  für PilF stimuliert durch PilMN gemessen. Die PilF-katalysierte ATP-Hydrolyse in Anwesenheit von CL unterschied sich nicht signifikant von den in Abwesenheit von CL gemessenen Aktivitäten (Abb. 3.35). CL beeinflusst die PilF-Aktivität unter den getesteten Bedingungen also nicht.

Als nächstes sollten weitere Interaktionspartner von PilF daraufhin untersucht werden, ob sie die ATP-Hydrolyse stimulieren. PilF spielt eine entscheidende Rolle bei der DNA-Aufnahme und bindet DNA. Collins *et al.* (2013) konnten in EM-Aufnahmen die Bindung von 25 Nukleotiden langer polyA-ssDNA an PilF sichtbar machen. Um die Stimulation von PilF durch DNA zu untersuchen, wurden 3 bzw. 30 µg eines 25 Nukleotide langen polyA-Oligonukleotides der ATPase-Reaktion beigelegt. Dies hatte keinen Effekt (Abb. 3.35), was frühere Beobachtungen bestätigt, bei denen ebenfalls keine Stimulation der ATPase-Aktivität von PilF durch DNA festgestellt werden konnte (Rose *et al.* 2011; Collins *et al.* 2013). Nun stellte sich die Frage, ob die gleichzeitige Zugabe von ssDNA und PilMN-Komplexen die PilF-katalysierte ATP-Hydrolyse stimuliert. Deshalb wurden gereinigte PilF-Hexamere zeitgleich mit polyA-ssDNA (3 µg bzw. 30 µg) und

mit einem 20-fachen Überschuss an His<sub>6</sub>-PilMN-Strep-Komplexen inkubiert. Die ATP-Hydrolyse wurde auch hier durch Zugabe von 3 mM ATP (Endkonzentration) gestartet. Es wurde keine Steigerung der ATPase-Aktivität im Vergleich zu der Probe ohne ssDNA beobachtet (Abb. 3.35).

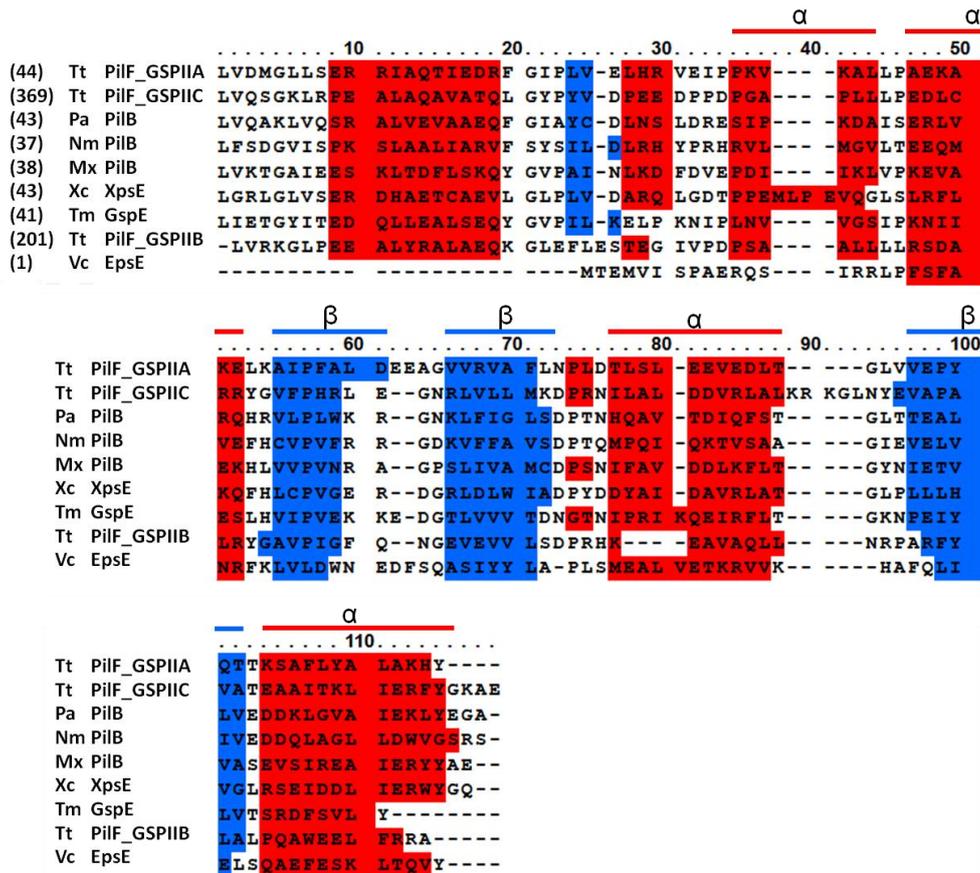
Der Sekundärbotenstoff c-di-GMP spielt bei der Regulation von Biofilmbildung und Zellanhaftung eine wichtige Rolle (Jenal *et al.* 2017; Hengge 2009). PilF aus *T. thermophilus* weist in seiner ungewöhnlich langen N-terminalen Domäne vier potentielle c-di-GMP Bindemotive auf (siehe Kapitel 3.6.1). Um zu analysieren, ob c-di-GMP einen Einfluss auf die PilF-Aktivität hat, wurde die ATPase-Aktivität in Anwesenheit von 100 µM c-di-GMP gemessen. Dies geschah sowohl mit als auch ohne gleichzeitige Zugabe von 1,33 nmol PilMN-Komplexen. Die dann gemessenen ATPase-Aktivitäten von  $33,2 \pm 3,9 \text{ nmol P}_i \times \text{mg PilF}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  und  $52,6 \pm 5,3 \text{ nmol P}_i \times \text{mg PilF}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  unterschieden sich nicht signifikant von den Aktivitäten ohne c-di-GMP (Abb. 3.35). Das entspricht auch den Beobachtungen für die Assemblierungs-ATPase PilB2 aus *Clostridium perfringens*, die ebenfalls c-di-GMP bindet, aber dadurch nicht stimuliert wird (Hendrick *et al.* 2017).

Zusammengefasst konnte somit weder die Zugabe von CL, ssDNA, noch die des Sekundärbotenstoffes c-di-GMP die ATPase-Aktivität von PilF stimulieren.

### 3.5.4 Die Rolle verschiedener PilF-Domänen bei der Interaktion mit PilMN

PilF aus *T. thermophilus* weist eine ungewöhnlich lange N-terminale Domäne auf, die drei GSPII-Domänen (GSPIIA, B, C) beinhaltet (Rose *et al.* 2011). Die GSPII-Domäne ist eine konservierte Faltung, die in T2SS und T4P Motor-ATPasen zu finden ist und die Sekundärstruktur  $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$  hat (Abb. 3.36) (Abendroth *et al.* 2005; Chen *et al.* 2005). Bei XpsE- und PilB-Typ ATPasen geht zudem eine  $\alpha$ -Helix voran ( $\alpha\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$ ). Kristallstrukturen der T2SS-ATPasen XpsE und EpsE aus *X. campestris* und *V. cholerae* haben gezeigt, dass der GSPII-beinhaltende N-Terminus direkt mit den PilM Homologen XpsL bzw. EpsL interagiert (Chen *et al.* 2005; Sandkvist *et al.* 1995; Abendroth *et al.* 2005). Somit stellte sich die Frage, ob eine oder mehrere der GSPII-Domänen von *T. thermophilus*-PilF bei der Interaktion mit PilM eine Rolle spielen.

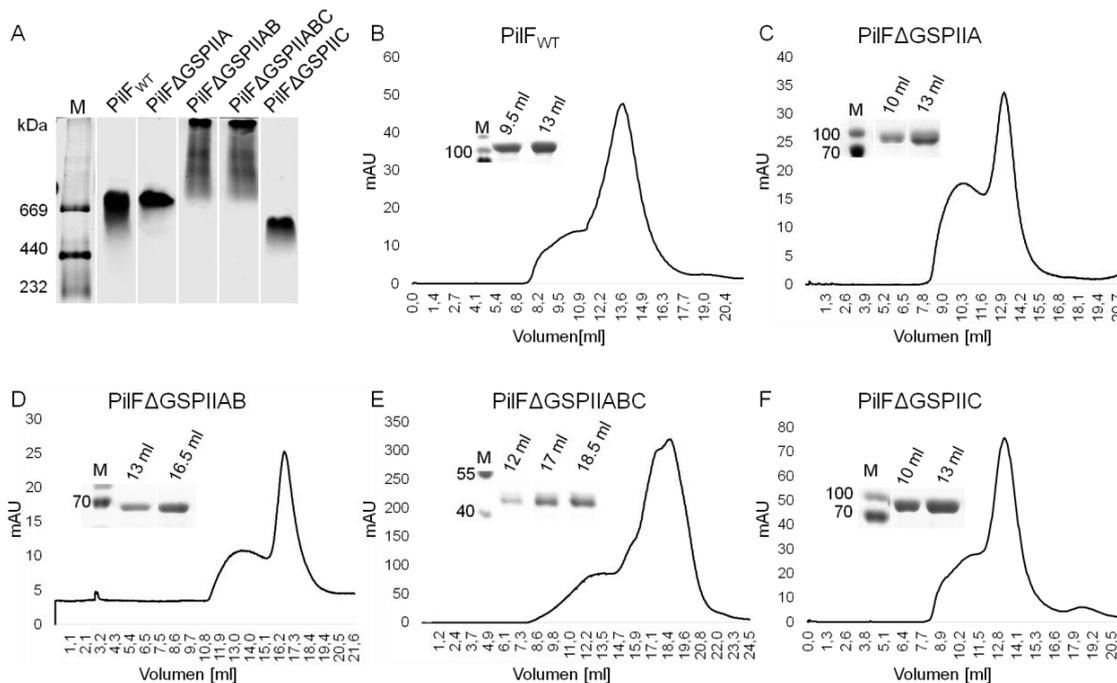
Zu Beginn dieser Arbeit lagen bereits PilF-Deletionsderivate vor, bei denen eine oder mehrere GSPII-Domänen deletiert waren. Die Proteinvarianten PilF $\Delta$ GSPIIA (AS 1-147 deletiert), PilF $\Delta$ GSPIIAB (AS 1-298 deletiert), PilF $\Delta$ GSPIIABC (AS 1-479 deletiert) und PilF $\Delta$ GSPIIC (AS 369-479 deletiert) wurden in *E. coli* BL21 (DE3) produziert und wie für PilF Wildtyp-Protein beschrieben aufgereinigt, wobei die Hitzeinkubation auf ca. 10 - 15 min verkürzt wurde, um die Fällung der z. T. instabileren PilF-Varianten zu verhindern (persönliche Kommunikation, R. Salzer, Goethe-Universität Frankfurt). Alle Varianten zeigten ATPase-Aktivitäten, die der Wildtyp-Aktivität entsprachen und formten hochmolekulare Komplexe, wie durch native PAGE gezeigt wurde (persönliche Kommunikation, R. Salzer, Goethe-Universität Frankfurt) (Kruse *et al.* 2018). Allerdings migrierten die Deletionsderivate als Schmier im nativen Gel, was auf Aggregation der Proteine hinweisen könnte.



**Abb. 3.36. Die konservierte Faltung der GSPII-Domänen in Assemblierungs-ATPasen.** Die Sequenzen der GSPIIA-, GSPIIB- und GSPIIC-Domänen von *T. thermophilus*-PilF wurden mit den N-terminalen Domänen von PilB-, XpsE- und EpsE-Typ ATPasen verglichen. Dafür wurde das IBIVU PRALINE „multiple sequence alignment tool“ (Simossis und Heringa 2003) mit integrierter Sekundärstruktur Vorhersage mittels „SSPRO v4“ verwendet (Pollastri *et al.* 2002).  $\alpha$ -Helices sind rot,  $\beta$ -Faltblätter sind blau dargestellt. Die in Klammern aufgeführten Nummern geben die jeweils erste Aminosäure der verwendeten Proteinsequenz an. Tt, *T. thermophilus*; Pa, *P. aeruginosa*; Nm, *N. meningitidis*; Mx, *M. xanthus*; Xc, *X. campestris*; Tm, *T. maritima*; Vc, *V. cholerae*.

Um die Rolle der GSPII-Domänen bei der Komplexbildung/-stabilität zu analysieren, wurde die Autrennung der PilF $\Delta$ GSPII-Varianten in der native PAGE wiederholt und analytische Gelfiltrationen (GF) mit einer „Superose 6“-Säule durchgeführt (Abb. 3.37). Alle GF-Elutionsprofile zeigten eine Schulter vor dem Elutionsmaximum. SDS-PAGE der entsprechenden Fraktionen zeigte allerdings, dass sich sowohl in den Schulter- als auch den Maximumfraktionen nur die entsprechenden PilF-Varianten befanden (Abb. 3.37 B-F). Bei den in der Schulter eluierenden Proteinkomplexen könnte es sich eventuell um eine weniger stark vertretene Konformation des PilF-Komplexes handeln. Wildtyp-PilF eluierte in einem deutlichen Peak, der einem Proteinkomplex von ~ 615 kDa entspricht (Abb. 3.37 B). Dies stimmt mit der abgeleiteten molekularen Masse von 600 kDa für ein PilF-Hexamer und mit dem Migrationsverhalten von Wildtyp-PilF im nativen Gel überein (Abb. 3.37 A, Spur 2). Auch PilF $\Delta$ GSPIIA und PilF $\Delta$ GSPIIC bildeten distinkte Proteinkomplexe in der nativen PAGE und der GF (Abb. 3.37 A, Spur 3 und 6, C, F). Die daraus ermittelten apparenten molekularen Massen von 547 kDa bzw. 534 kDa entsprechen den abgeleiteten molekularen Massen von PilF $\Delta$ GSPIIA- bzw. PilF $\Delta$ GSPIIC-Hexameren (510 kDa bzw.

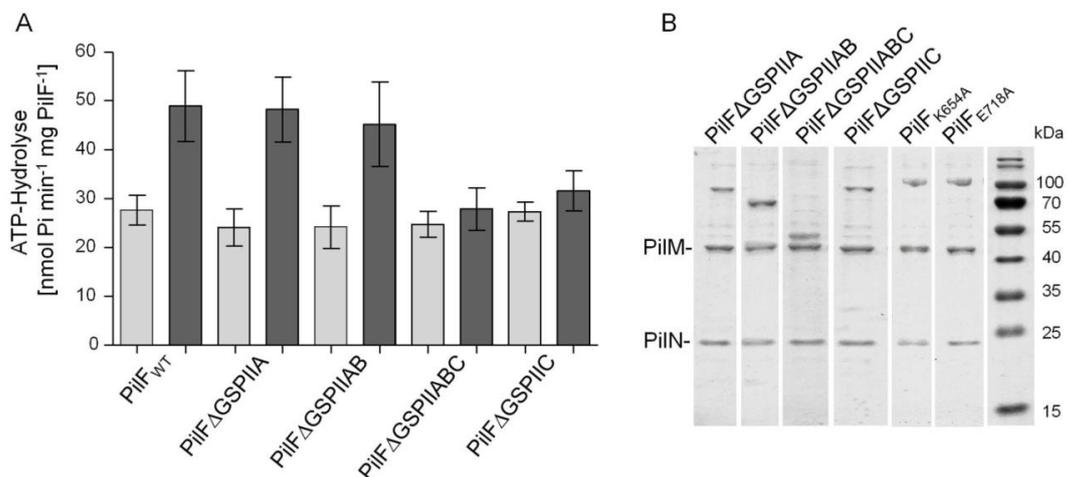
534 kDa). PiIFΔGSPIIAB eluierte in der GF als scharfer Peak, der einem ~ 161-kDa-Komplex entspricht (Abb. 3.37 D). Dies weicht signifikant von den abgeleiteten 408 kDa eines PiIFΔGSPIIAB-Hexamers ab. Die PiIFΔGSPIIABC-Variante zeigte im GF-Elutionsprofil keinen scharfen, symmetrischen Peak (Abb. 3.37 E), was darauf hindeutet, dass die Deletion aller drei GSPII-Domänen zur Instabilität des PiIF-Komplexes führt. Zudem migrierten die PiIF-Varianten ΔGSPIIAB und ΔGSPIIABC als Schmier in der nativen PAGE und liefen z. T. nicht in das Gel ein (Abb. 3.37 A, Spur 4 und 5). Das deutet darauf hin, dass die Proteine während der Probenvorbereitung aggregierten. Die Deletion der ersten zwei oder aller drei GSPII-Domänen führte also zu einer veränderten Komplexbildung und/oder -stabilität von PiIF.



**Abb. 3.37. Komplexbildung/-stabilität der PiIFΔGSPII-Varianten.** 30 µg gereinigtes PiIF<sub>WT</sub>, PiIFΔGSPIIA, PiIFΔGSPIIAB, PiIFΔGSPIIABC und PiIFΔGSPIIC wurden in einem 3-15 %igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit „InstantBlue“ gefärbt (A). Mit den gereinigten Proteinen PiIF<sub>WT</sub> (B), PiIFΔGSPIIA (C), PiIFΔGSPIIAB (D), PiIFΔGSPIIABC (E) und PiIFΔGSPIIC (C) wurde eine analytische Gelfiltration auf einer „Superose 6“-Säule durchgeführt. Die Säule wurde mit Bicine-Puffer (50 mM Bicine, 200 mM NaCl, pH 8,5) equilibriert und die Durchflusgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Alle Elutionskurven zeigten eine Schulter vor dem eigentlichen Elutionsmaximum. Proben aus den Schulter- und Maximum-Fractionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (eingelassene Gelbilder) und enthielten nur die jeweilige PiIF-Variante. M, Proteinmarker. Als Größenstandard für die Gelelektrophoresen wurden das „Amersham HMW Calibration Kit for native Electrophoresis“ (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) (A) und die „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet (B, C, D, E, F, eingelassene Gelbilder). Proteine aus dem Gelfiltrations-Kalibrierungskit „HMW“ (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) dienen als Größenstandard für die Gelfiltrationen.

Trotz der Deletion von GSPII-Domänen und, im Fall von PilFΔGSPIIAB und PilFΔGSPIIABC, damit einhergehender veränderter Komplexassemblierung/-stabilität, zeigten alle Deletionsderivate Wildtyp-artige ATPase-Aktivität (Wildtyp:  $22.7 \pm 2.2 \text{ nmol P}_i \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ , PilFΔGSPIIA:  $19.7 \pm 5.6 \text{ nmol P}_i \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ , PilFΔGSPIIAB:  $23.8 \pm 1.1 \text{ nmol P}_i \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ , PilFΔGSPIIABC:  $21.9 \pm 4.2 \text{ nmol P}_i \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  und PilFΔGSPIIC:  $20.8 \pm 5.8 \text{ nmol P}_i \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ) (Kruse *et al.* 2018; Aderhold 2010). Deshalb stellte sich nun die Frage, ob diese Aktivität auch durch PilMN stimuliert werden könnte, oder ob für die Stimulation die GSPII-Domänen von PilF notwendig sind. Um diese Frage zu beantworten wurde die ATPase-Aktivität der PilFΔGSPII-Varianten in Anwesenheit und Abwesenheit von His<sub>6</sub>-PilMN-Strep-Komplexen analysiert (Abb. 3.38 A). Die PilF-Varianten, bei denen nur die erste oder die ersten beiden GSPII-Domänen deletiert waren, wurden durch die Zugabe von PilMN in gleicher Weise stimuliert, wie das Wildtyp-Protein. Im Gegensatz dazu kam es bei den Varianten PilFΔGSPIIABC und PilFΔGSPIIC zu keiner signifikanten Änderung der ATPase-Aktivität durch Zugabe von PilMN. Die GSPIIC-Domäne scheint somit eine wichtige Rolle bei der Stimulation der ATPase-Aktivität von PilF durch PilMN zu spielen.

Um zu untersuchen, ob die GSPIIC-Domäne notwendig für die Bindung von PilF an PilMN ist, wurden an Strep-Tactin-Säulen gebundene His<sub>6</sub>-PilMN-Strep-Komplexe mit den PilFΔGSPII-Varianten koinkubiert (siehe Kapitel 2.7). Bei der anschließenden Affinitätschromatographie zeigte sich, dass alle vier PilFΔGSPII-Varianten mit PilMN interagierten (Abb. 3.38 B, Spuren 1 - 4). Somit scheint die GSPIIC-Domäne zwar wichtig für die Stimulation von PilF durch PilMN zu sein, aber keine der GSPII-Domänen ist unter den getesteten Bedingungen notwendig für das Binden von PilF an PilMN.

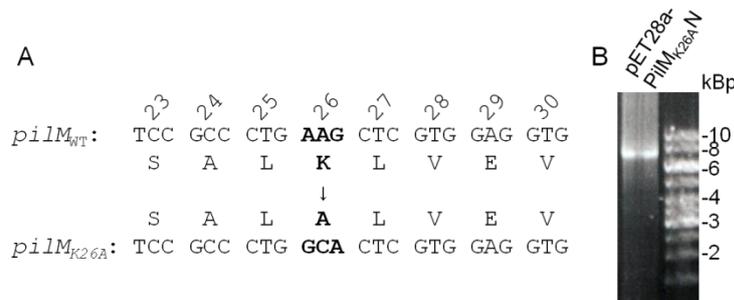


**Abb. 3.38. Interaktion verschiedener PilF-Varianten mit PilMN.** ATPase-Aktivität der PilFΔGSPII-Varianten ohne (hellgrau) oder mit (dunkelgrau) Zugabe von PilMN in einem Verhältnis von 1:20 (PilF:PilMN) (A). Die Messung wurde wie für Abbildung 3.34 beschrieben durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. An Strep-Tactin-Säulen gebundene His<sub>6</sub>-PilMN-Strep-Komplexe wurden mit den PilFΔGSPII-Varianten bzw. PilF<sub>K654A</sub> oder PilF<sub>E718A</sub> koinkubiert und nach Waschen der Säule mit zehnmal einem Säulenvolumen MN-Puffer inkl. 0,4 mM DDM koeluiert (B). Proteine wurden durch SDS-PAGE und Färben mit „InstantBlue“ analysiert. Die „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) diente als Größenstandard (B, Spur 7).

Für die T2SS Motor-ATPase XpsE aus *X. campestris* wurde gezeigt, dass die Bindung von ATP notwendig für die Interaktion mit dem PilM-Strukturhomolog EpsL ist (Shiue *et al.* 2006). Die in Kapitel 3.3 beschriebenen PilF-Variante PilF<sub>K654A</sub> ist defekt in der ATP-Bindung und zeigt ein leicht verändertes Laufverhalten in der nativen PAGE (Abb. 3.21). Diese Variante, ebenso wie PilF<sub>E718A</sub>, wurden durch Koinkubation und Koelution mit His<sub>6</sub>-PilMN-Strep-Komplexen auf ihre Interaktion mit PilMN untersucht (siehe Kapitel 2.7). Beide PilF-Varianten koeluierten mit PilMN (Abb. 3.38 B, Spur 5 und 6), was zeigt, dass die ATP-Bindung und -Hydrolyse durch PilF nicht für die Bindung an PilMN benötigt wird.

### 3.5.5 Die ATP-Bindung von PilM ist nicht notwendig für die Interaktion mit PilF

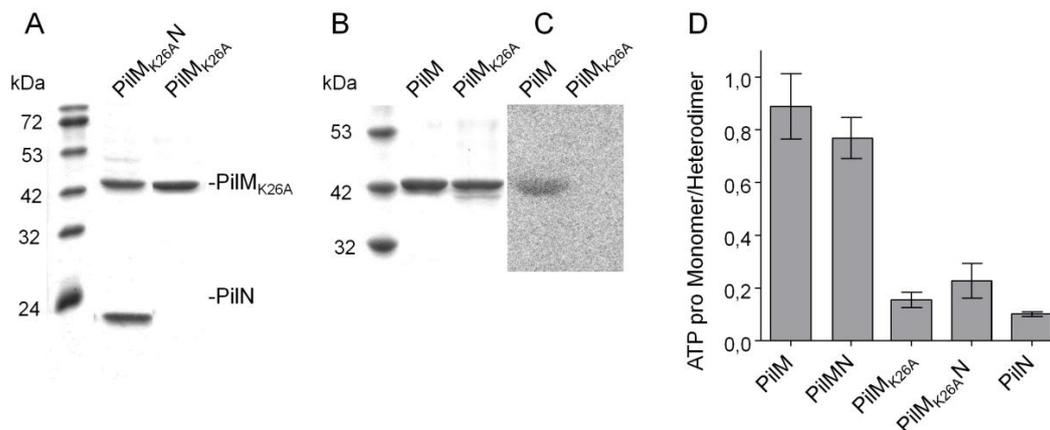
PilM ist ein Actin-Homolog und bindet als solches auch ATP (Karupiah und Derrick 2011; McCallum *et al.* 2016). Kristallstruktur-Analysen haben gezeigt, dass in *T. thermophilus*-PilM das Lysin 26 (K26) direkt neben dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphat des gebundenen ATP lokalisiert ist (Karupiah und Derrick 2011). Dieses Lysin ist in PilM-Homologen hochkonserviert. Um die Rolle von K26 bei der ATP-Bindung von PilM zu untersuchen, wurde es durch ortsgerechte Mutagenese durch ein Alanin ausgetauscht (Abb. 3.39). Dafür wurde eine PCR an dem Plasmid pET28a-PilMN unter Verwendung der Starteroligonukleotide pilM-K26A-for und pilM-K26A-rev (Tab. 2.5) durchgeführt. Das dabei entstandene PCR-Produkt der Größe 7082 Bp konnte im Agarosegel detektiert werden (Abb. 3.39 B) und wurde anschließend durch Inkubation mit T4 DNA-Ligase ligiert. Das so erstellte Plasmid pET28a-PilM<sub>K26A</sub>N wurde durch Sequenzierung überprüft und dann zur Proteinproduktion in *E. coli* BL21 (DE3) eingebracht.



**Abb. 3.39. Erstellung des Plasmides pET28a-PilM<sub>K26A</sub>N.** Vergleich der Sequenzen von *pilM*<sub>WT</sub> und *pilM*<sub>K26A</sub> (A). Das ausgetauschte Codon und die daraus resultierende Aminosäure sind fett hervorgehoben. Die Zahlen geben die Position der Aminosäuren in PilM an. PCR zur Erstellung des Plasmides pET28a-PilM<sub>K26A</sub>N mit den Starteroligonukleotiden pilM-K26A-for und pilM-K26A-rev (Tab. 2.5) (B). Das Plasmid pET28a-PilMN wurde als Matrize verwendet. Erwartet wurde ein PCR-Produkte der Größe 7082 Bp. Die DNA wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben, wurde die *E. coli* BL21 (DE3)-Kultur in LB-Medium bei 37 °C inkubiert und bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1 wurde die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach weiteren 4 h Wachstum bei 37 °C wurden die Zellen geerntet. Sie wurden mit der „French Pressure Cell“ (American Instrument Company, Maryland) bei 16000 psi aufgeschlossen und durch Ultrazentrifugation wurden die Membranen von löslichen Zellbestandteilen abgetrennt. His<sub>6</sub>-PilM<sub>K26A</sub> wurde durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus der löslichen Fraktion isoliert. Zudem konnte His<sub>6</sub>-PilM<sub>K26A</sub> zusammen mit PilN-Strep aus mit 1 % (w/v) DDM solubilisierten Membranen durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie koisoliert werden (Abb. 3.40 A). Die Punktmutation beeinträchtigte die Interaktion von PilM mit PilN also nicht.

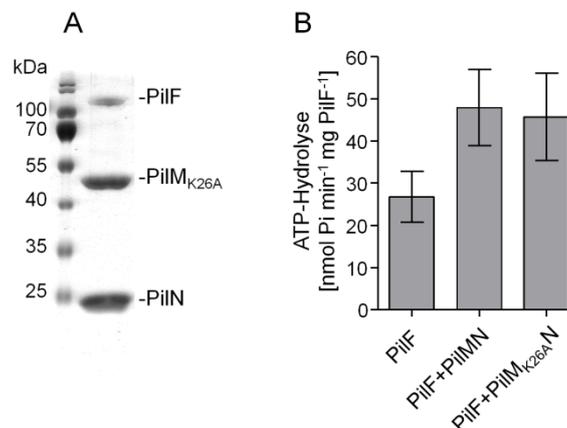
Die Rolle von K26 bei der ATP-Bindung an PilM wurde analysiert, indem Wildtyp-His<sub>6</sub>-PilM und His<sub>6</sub>-PilM<sub>K26A</sub> mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP quervernetzt wurden (siehe Kapitel 2.9.1). Anschließend wurden die Proteine gefällt und in einem SDS-Gel aufgetrennt. Die dann detektierte Radioaktivität zeigte, dass [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP an Wildtyp-PilM gebunden war. Im Gegensatz dazu wurde kein ATP in der PilM<sub>K26A</sub>-Probe detektiert (Abb. 3.40 B, C). Dies deutet darauf hin, dass K26 eine wichtige Rolle bei der ATP-Bindung von PilM spielt.



**Abb. 3.40. PilM<sub>K26A</sub> bindet PilN, aber kein ATP.** His<sub>6</sub>-PilM<sub>K26A</sub> wurde mit PilN-Strep aus solubilisierten Membranen durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie koisoliert. His<sub>6</sub>-PilM<sub>K26A</sub> wurde auch aus löslichen Zellfraktionen durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert. 2 µg der gereinigten Proteine wurden in einem 16 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit „Coomassie Brilliant Blue“ gefärbt (A). Je 2 µg gereinigtes His<sub>6</sub>-PilM Wildtyp-Protein und His<sub>6</sub>-PilM<sub>K26A</sub> wurden in einem 16 %igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert (B). Die ATP-Bindung der beiden PilM-Varianten wurde analysiert, indem 2 µg gereinigtes Protein mit 15 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP durch Bestrahlung mit UV-Licht für 10 min quervernetzt wurden. Proteine wurden dann mit 10 % (w/v) TCA auf Eis gefällt, und durch SDS-PAGE (16 %iges Polyacrylamidgel) aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und die Radioaktivität wurde auf einer Speicherleuchtstofffolie detektiert (siehe Kapitel 2.9.1) (C). Um den ATP-Gehalt gereinigter Proteine zu bestimmen, wurden diese durch Zugabe von 10 % (w/v) TCA auf Eis gefällt. Mit Na-TES-Puffer (0,4 M, pH 7,4) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wurde der pH-Wert neutralisiert und die Proteine wurden abzentrifugiert. Der ATP-Gehalt im Überstand wurde wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben durch Luciferase-Luciferin-Reaktion bestimmt (D). Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichung von mindestens 5 Experimenten.

Um dies zu bestätigen, wurde der ATP-Gehalt in gereinigten Proteinen gemessen. Dazu wurden Wildtyp-His<sub>6</sub>-PilM und His<sub>6</sub>-PilMN-Strep, ebenso wie His<sub>6</sub>-PilM<sub>K26A</sub> und His<sub>6</sub>-PilM<sub>K26A</sub>N-Strep nach der Isolation durch Zugabe von 10 % (w/v, Endkonzentration) TCA gefällt und dann abzentrifugiert. Das im Überstand enthaltene ATP wurde durch Luciferase-Luciferin-Test quantifiziert (siehe Kapitel 2.9.2) (Abb. 3.40 D). Gereinigtes PilN-Strep diente als Negativkontrolle. Das PilM Wildtyp-Protein enthielt  $0,89 \pm 0,35$  ATP pro Monomer und der PilMN Wildtyp-Komplex  $0,77 \pm 0,17$  ATP pro Heterodimer. Gereinigtes PilN-Strep wies  $0,10 \pm 0,02$  ATP pro Protein auf. Die detektierten Mengen an ATP in PilM<sub>K26A</sub> und PilM<sub>K26A</sub>N unterschieden sich nicht signifikant von denen in der Negativkontrolle (Abb. 3.40 D). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass K26 wichtig für die ATP-Bindung von PilM ist.

Die Rolle des an PilM gebundenen ATP bei der Interaktion von PilF mit PilMN wurde analysiert indem His<sub>6</sub>-PilM<sub>K26A</sub>N-Strep an eine Strep-Tactin-Säule gebunden und dann mit His<sub>6</sub>-PilF koinkubiert wurde (siehe Kapitel 2.7). Nach der Affinitätschromatographie eluierte PilF zusammen mit dem PilM<sub>K26A</sub>N-Komplex (Abb. 3.41 A). Wurde die durch PilF katalysierte ATP-Hydrolyse in Anwesenheit eines 20-fachen Überschusses an PilM<sub>K26A</sub>N-Komplexen gemessen, wurde eine doppelt so hohe Aktivität wie für PilF alleine gemessen (Abb. 3.41 B). PilM<sub>K26A</sub>N ist also trotz des Defekts in der ATP-Bindung weiterhin in der Lage, die ATPase-Aktivität von PilF zu stimulieren.



**Abb. 3.41. PilM<sub>K26A</sub>N stimuliert PilF ATPase-Aktivität.** His<sub>6</sub>-PilM<sub>K26A</sub>N-Strep wurde mit His<sub>6</sub>-PilF-Komplexen auf einer Strep-Tactin-Säule koinkubiert. Nach dem Waschen der Säule kam es zu Koelution von PilM<sub>K26A</sub>, PilN und PilF (A). His<sub>6</sub>-PilF wurde mit His<sub>6</sub>-PilM<sub>K26A</sub>N-Strep, ebenso wie mit dem Wildtyp-PilMN-Komplex, im Verhältnis 1:20 gemischt und die ATP-Hydrolyse wurde wie oben beschrieben, analysiert (B). Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.5.6 Lysin 26 in PilM ist nicht essentiell für die natürliche Transformation und „twitching motility“

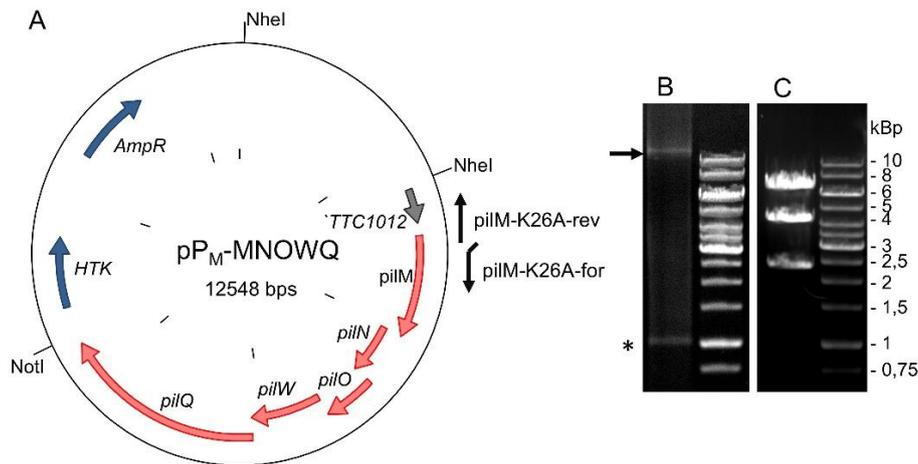
Die ATP-Bindung von PilM ist konserviert in T4P-Systemen, deshalb erschien es überraschend, dass der durch die K26A-Mutation hervorgerufene Defekt in der ATP-Bindung weder die Interaktion von PilM mit PilN noch mit PilF beeinflusste. Die Experimente wurden allerdings mit

heterolog produzierten Proteinen *in vitro* durchgeführt, was keinen eindeutigen Schluss auf die Effekte *in vivo* zulässt. Im Folgenden sollte deshalb der Effekt der K26A-Mutation in PilM auf die natürliche Transformierbarkeit und die „twitching motility“ von *T. thermophilus* untersucht werden. Zunächst sollte eine  $\Delta pilMNO::bleo$ -Mutante erstellt werden, die die Gene *pilMNO* *in trans* unter Kontrolle des nativen *pilM*-Promoters exprimiert. Auf diese Weise wäre es zu einem späteren Zeitpunkt möglich, Punktmutationen wie die K26A-Mutation in das Plasmid einzufügen, oder Sequenzen für Protein-Tags an die *pilMNO* Sequenz anzuhängen, was für Folgeexperimente von Vorteil wäre.

Die Mutante  $\Delta pilMNO::bleo$  wurde erfolgreich erstellt. Sie zeigte keine natürliche Kompetenz und keine „twitching motility“ (Daten nicht gezeigt). Das Plasmid pMKE2\_ *pilMNO* wurde erstellt und in die  $\Delta pilMNO$ -Deletionsmutante eingebracht. Die Expression der Gene *pilM*, *pilN*, *pilO*, ebenso wie *pilW* und *pilQ* konnte mittels quantitativer RT-PCR nachgewiesen werden. Western Blot-Analysen zeigten zudem, dass die Proteine PilM und PilN in Mengen vorlagen, die mit den Mengen im Wildtyp vergleichbar waren. Die mit pMKE2\_ *pilMNO* komplementierte  $\Delta pilMNO::bleo$ -Mutante zeigte aber keine „twitching motility“, es handelte sich also um keine funktionale Komplementation (Daten nicht gezeigt).

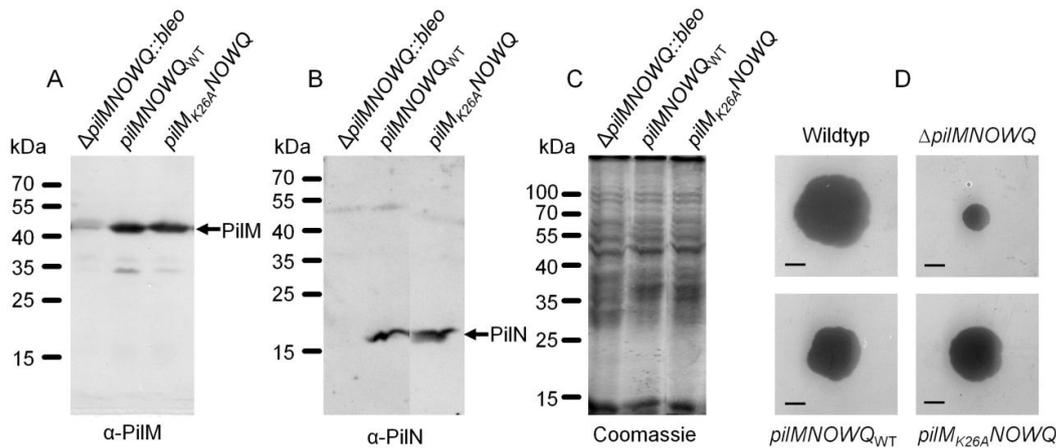
Ähnliches wurde auch für das T4P-System aus *P. aeruginosa* beobachtet (Ayers *et al.* 2009). Eine *pilO*-Mutante zeigte trotz Expression des *pilO*-Gens *in trans* keine „twitching motility“. Die Autoren vermuteten, dass die Stöchiometrie der Proteine PilM, PilN, PilO eine Rolle spielt und/oder dass die Koexpression von *pilN* und *pilO* entscheidend für die richtige Faltung der Proteine ist. Wurde die *pilO*-Mutante durch Einbringen der Operongene *pilMNOP* komplementiert, konnte die „twitching motility“ wieder hergestellt werden.

Somit scheint auch für *T. thermophilus* die Komplementation des gesamten *pilMNOWQ* Operons erfolgsversprechend. Eine *T. thermophilus*  $\Delta pilMNOWQ::bleo$ -Deletionsmutante wurde von I. Rose (AK Averhoff, Goethe-Universität Frankfurt a. M.) erstellt. Dafür wurde das in Abb. A6 im Anhang dargestellte Plasmid pUC19- $\Delta pilMNOWQ$  erzeugt, welches dann als Matrize für eine PCR mit den Starteroligonukleotiden *pilM\_up\_for* und *pilQ\_down\_rev2* (Tab. 2.5) diente. Das 2481 Bp lange PCR-Produkt wurde anschließend in *T. thermophilus* transformiert, wodurch das *pilMNOWQ*-Operon durch eine *bleo*<sup>R</sup>-Resistenzkassette ausgetauscht wurde. Ebenfalls von I. Rose erstellt wurde das Plasmid pP<sub>M</sub>-*pilMNOWQ*, welches auf dem *E. coli/Thermus*-„Shuttle“-Vektor pDM12 basiert und das *pilMNOWQ*-Operon unter Kontrolle des nativen *pilM* Promoters (P<sub>M</sub>) trägt (Abb. 3.42 A). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun die K26A-Mutation (Codonaustausch siehe Abb. 3.39 A) durch ortsgerichtete Mutagenese mit den Starteroligonukleotiden *pilM-K26A-for* und *pilM-K26A-rev* (Tab. 2.5) in *pilM* eingefügt (Abb. 3.42 A, B). Das erstellte Plasmid pP<sub>M</sub>-*pilM*<sub>K26A</sub>*NOWQ* wurde aus dem zur Klonierung verwendeten *E. coli* 10-beta-Stamm isoliert und durch Verdau mit NheI und NotI überprüft, wobei die erwarteten DNA-Fragmente der Größen 2331 Bp, 4076 Bp und 6141 Bp entstanden (Abb. 3.42 C). Zudem wurde der Bereich des Plasmides sequenziert, der die Punktmutation aufweisen sollte. Da dadurch die Identität des Plasmides bestätigt wurde, wurde es durch Elektrotransformation in *T. thermophilus*  $\Delta pilMNOWQ::bleo$  eingebracht. Ebenso wurde pP<sub>M</sub>-*pilMNOWQ*, welches das Wildtyp-Operon trägt, in die Deletionsmutante transformiert.



**Abb. 3.42. Erstellung des Plasmides *pP<sub>M</sub>-pilM<sub>K26A</sub>NOWQ* und Überprüfung im Agarosegel.** Das Plasmid *pP<sub>M</sub>-pilMNOWQ* (erstellt von I. Rose, AK Averhoff, Goethe-Universität Frankfurt a. M.) enthält das *pilMNOWQ* Operon, sowie ~ 500 Bp, die stromaufwärts davon gelegen sind und die den nativen Promoter beinhalten (A). Die Bindestellen der für die in B gezeigten PCR verwendeten Starteroligonukleotide *pilM-K26A-for* und *pilM-K26A-rev* und die der für den in C überprüften Kontrollverdau verwendeten Restriktionsenzyme *NheI* und *NotI* sind gezeigt. *AmpR*, Ampicillinresistenz-Kassette; *HTK*, hitzeresistente Kanamycinresistenz-Kassette; *TTC1012*, stromaufwärts von *pilM* lokalisiertes Gen. Überprüfung der PCR zur Erstellung von *pP<sub>M</sub>-pilM<sub>K26A</sub>NOWQ* (B). Erwartet wurden ein PCR-Produkt der Größe 12548 Bp (B, Pfeil). Es entstand ein weiteres, unspezifisches Produkt (\*). Kontrollverdau von *pP<sub>M</sub>-pilM<sub>K26A</sub>NOWQ* mit *NheI* und *NotI*. Erwartet wurden DNA Fragmente der Größen 2331 Bp, 4076 Bp und 6141 Bp (C). Die DNA wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Western Blot-Analysen der mit *pP<sub>M</sub>-pilMNOWQ* (*pilMNOWQ<sub>WT</sub>*) und mit *pP<sub>M</sub>-pilM<sub>K26A</sub>NOWQ* (*pilM<sub>K26A</sub>NOWQ*) komplementierten  $\Delta$ *pilMNOWQ::bleo*-Mutante mit anti-PilM-Antiserum führten in beiden Stämmen zur Detektion eines Proteins mit einer apparenten molekularen Masse von ~ 44 kDa (Abb. 3.43 A, Spur 2 und 3). Das entspricht in etwa der abgeleiteten molekularen Masse von PilM und PilM<sub>K26A</sub> (41,4 kDa). Auch in der Deletionsmutante  $\Delta$ *pilMNOWQ::bleo* wurde ein Protein der gleichen molekularen Masse schwach detektiert (Abb. 3.43 A, Spur 1), was darauf hindeutet, dass noch geringe Mengen an PilM produziert werden. Da *T. thermophilus* polyploid ist (Ohtani *et al.* 2010), könnte der Austausch des *pilMNOWQ*-Operons gegen die *bleo<sup>R</sup>*-Kassette nicht in allen Kopien des *T. thermophilus*-Chromosoms stattgefunden haben. Darauf deuten auch PCR-Analysen mit Oligonukleotiden hin, die spezifisch in Genen des *pilMNOWQ*-Operons binden (persönliche Kommunikation, I. Rose, Goethe-Universität Frankfurt). Dies könnte die geringe detektierte Menge an PilM in der  $\Delta$ *pilMNOWQ::bleo*-Mutante erklären. Da diese Deletionsmutante jedoch nicht zur natürlichen Transformation oder „twitching motility“ in der Lage war (siehe dieses Kapitel), kann davon ausgegangen werden, dass keine funktionalen DNA-Translokatoren oder T4P in  $\Delta$ *pilMNOWQ::bleo* gebildet werden. Die Produktion von PilN in  $\Delta$ *pilMNOWQ::bleo*, *pilMNOWQ<sub>WT</sub>* und *pilM<sub>K26A</sub>NOWQ* wurde ebenfalls im Western Blot analysiert. Hier wurde mit anti-PilN-Antiserum nur in *pilMNOWQ<sub>WT</sub>* und *pilM<sub>K26A</sub>NOWQ* ein Protein mit einer apparenten molekularen Masse von ~ 20 kDa detektiert (Abb. 3.43 B). Dies entspricht in etwa der abgeleiteten molekularen Masse von PilN (23 kDa). Somit konnte gezeigt werden, dass die mit *pilMNOWQ<sub>WT</sub>* und mit *pilM<sub>K26A</sub>NOWQ* komplementierten  $\Delta$ *pilMNOWQ::bleo*-Mutanten vergleichbare Mengen an PilM/PilM<sub>K26A</sub> und PilN enthalten (Abb. 3.43 A-C).



**Abb. 3.43. Western Blot- und „twitching motility“-Analysen der  $\Delta pilMNOWQ$ -Mutante und der Komplementanten  $pilMNOWQ_{WT}$  und  $pilM_{K26A}NOWQ$ .** Jeweils 10  $\mu$ g Gesamtzellextrakt der  $\Delta MNOWQ::bleo$ -Mutante und der Mutante komplementiert mit  $pP_M-pilMNOWQ$  bzw.  $pP_M-pilM_{K26A}NOWQ$  wurden in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgten Western Blot-Analysen unter Verwendung von polyklonalem anti-PilM-Antiserum (1:5000) (A) bzw. polyklonalem anti-PilN-Antiserum (1:5000) (B). Als Ladekontrolle wurde ein weiteres, gleich beladenes Gel mit „Coomassie Brilliant Blue“ gefärbt (C). Zur Untersuchung der „twitching motility“ der drei Stämme und des Wildtyps wurden Zellen stationärer Kulturen auf Minimalmedium mit 0,1 % BSA aufgetropft und anschließend bei 68 °C für 72 h inkubiert. Die Agarplatten wurden mit Coomassie-Lösung gefärbt. Farbstoff und Zellen wurden abgewaschen, die Färbung der Bilder wurde invertiert. Die Abbildungen sind repräsentativ für 3 biologische Replikate. Größenstandard = 0,5 cm.

Wie bereits erwähnt, zeigte die Deletionsmutante  $pilMNOWQ::bleo$  keine „twitching motility“ (Abb. 3.43 D). Die Komplementation mit dem  $pilMNOWQ_{WT}$ -Operon stellte die „twitching motility“ wieder her. Allerdings waren die „twitching“-Höfe mit einem Durchmesser von  $1,45 \pm 0,16$  cm kleiner als die des *T. thermophilus*-Wildtyps ( $1,98 \pm 0,17$ cm) (Abb. 3.43 D). Die  $pilM_{K26A}NOWQ$  exprimierende Mutante bildete ebenfalls „twitching“-Höfe mit einem Durchmesser von  $1,43 \pm 0,17$  (Abb. 3.43 D). Die K26A-Punktmutation führte also zu keiner Beeinträchtigung der „twitching motility“ in *T. thermophilus*.

Der Einfluss der K26A-Mutation in PilM auf die natürliche Transformation wurde ebenfalls untersucht. Dafür wurden die  $\Delta pilMNOWQ::bleo$ -Mutante, die mit  $pP_M-pilMNOWQ_{WT}$  und die mit  $pP_M-pilM_{K26A}NOWQ$  komplementierte Mutante mit genomischer DNA eines Streptomycin-resistenten *T. thermophilus*-Stammes inkubiert und auf Streptomycin-haltigem  $TM^+$ -Medium ausplattiert. Die Deletionsmutante  $\Delta pilMNOWQ::bleo$  war nicht transformierbar. Die Komplementation der  $\Delta pilMNOWQ::bleo$ -Mutante mit  $pilM_{K26A}NOWQ$  führte zu einer Transformationsfrequenz von  $5,75 \times 10^{-4} \pm 4,89 \times 10^{-4}$  Transformanden/Lebendzellzahl, was mit der Transformationsfrequenz der  $pilMNOWQ_{WT}$  exprimierenden Mutante ( $4,59 \times 10^{-4} \pm 3,01 \times 10^{-4}$  Transformanden/Lebendzellzahl) vergleichbar war.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die K26A-Mutation in PilM keinen Effekt auf die „twitching motility“ oder die natürliche Transformation von *T. thermophilus in vivo* hat. Somit bleibt die Frage offen, welche Funktion das in PilM gebundene ATP übernimmt.

### 3.6 Interaktion von PilF mit dem Sekundärbotenstoff c-di-GMP

#### 3.6.1 Überprüfung von PilF auf potentielle c-di-GMP-Bindemotive

Cyclisches di-GMP (c-di-GMP) spielt als Sekundärbotenstoff in diversen zellulären Prozessen eine Rolle, so z.B. bei der Zell-Zyklus-Regulation, Motilität, Virulenz, Oberflächenadhäsion und Biofilmbildung (Jenal *et al.* 2017; Hengge 2009). Erst vor Kurzem wurde ein bisher unbekanntes c-di-GMP Bindemotiv in T4P und T2SS Assemblierungs-ATPasen beschrieben, wie z. B. in MshE aus *V. cholerae*, PA14\_29490 aus *P. aeruginosa*, PilB2 aus *C. perfringens* und GspE aus *Moorella thermoacetica* ATCC 39073 (Roelofs *et al.* 2015; Jones *et al.* 2015; Hendrick *et al.* 2017; Wang *et al.* 2016). Es besteht aus einem Tandem mit der Konsensussequenz RLGxx(L/V/I)(L/V/I)xxG(L/V/I)xxxxLxxxLxxQ und ist in der sogenannten MshEN-Domäne lokalisiert (Wang *et al.* 2016). Die MshEN-Domäne beinhaltet die GSPII-Domäne der entsprechenden ATPasen (siehe Abb. 3.46).

Im außergewöhnlich langen N-Terminus von *T. thermophilus*-PilF wurde das c-di-GMP-Bindemotiv dreimal identifiziert (Aminosäuren 10 – 62, 167 – 218 und 335 – 387) (Wang *et al.* 2016). Bei genauerer Betrachtung fällt allerdings auf, dass die c-di-GMP-Bindesequenz sogar viermal vorhanden ist (Abb. 3.44). Allerdings bildet die zweite Hälfte des dritten Tandems (Aminosäuren 335 – 359) die erste Hälfte des vierten. Diese beiden potentiellen Bindemotive überlagern sich also, weshalb die Bindung von bis zu drei c-di-GMP-Molekülen pro PilF-Monomer denkbar wäre. Die tatsächliche Zahl der Bindungsstellen, die Bindungskinetik und die Spezifität sollten nun mittels isothermer Titrationskalometrie (ITC) bestimmt werden. Die Durchführung und Auswertung der ITC-Experimente erfolgt in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Jens Wöhnert (Goethe-Universität Frankfurt).

		1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	53										
Konsensus		RLG	xxLL	xxGLV	xxxxL	xxxL	xxQ	xxxxx	RLG	xxLL	xxGLV	xxxxL	xxxL	xxQ									
PilF_1	10	RLG	AALL	DAGLL	TDEEL	GRALER	HRE	VGGSLA	EV	LD	MGLL	SERR	IAQT	IEDR	62								
PilF_2	167	KL	GELL	LKQ	GWIS	REAL	EEAL	VEQ	EKT	GD	LLGR	ILVR	KGL	PEE	-AL	YRAL	AEQ	218					
PilF_3	304	RL	GE	VL	VE	QEK	L	SREAL	KEAL	EVQ	KGL	P3	PL	GE	IL	VEL	GLA	RPED	VEEAL	LQ	Q	358	
PilF_4	335	PL	GE	IL	VEL	GLA	RPED	VEEAL	LQ	Q	RR	GG	RLE	DT	LV	Q	S	GKL	RPEAL	LAQ	AVAT	Q	387

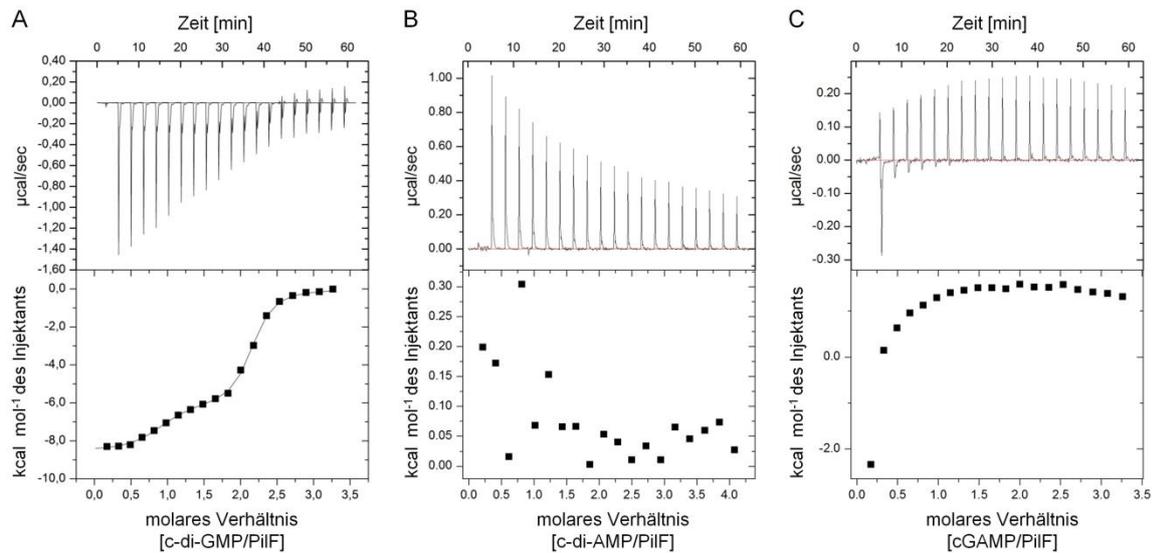
**Abb. 3.44. Sequenz der vier putativen c-di-GMP-Bindestellen in *T. thermophilus*-PilF.** Vergleich der Konsensussequenz des c-di-GMP-Bindemotivs (Wang *et al.* 2016) mit den vier möglichen Bindestellen in PilF aus *T. thermophilus* HB27. Die Aminosäuren des c-di-GMP-Bindemotivs sind fett dargestellt, konservierte hydrophobe Aminosäuren sind zusätzlich gelb und positiv geladene blau hervorgehoben. Konservierte Glycine und Glutamine sind ebenfalls farbig hinterlegt. Die PilF\_3 und PilF\_4 Motive überschneiden sich bei den Aminosäuren 335 bis 359. Der Abstand zwischen den beiden Hälften der Tandemsequenz von PilF\_3 ist um 3 Aminosäuren größer als in den anderen Sequenzen.

### 3.6.2 Untersuchung der c-di-GMP-Bindung mittels ITC

Interagieren Moleküle miteinander, so kann die dabei verbrauchte oder frei werdende Energie als Temperaturänderung mittels ITC gemessen werden. Dabei wird ein Molekül, z. B. ein Protein, in die Messzelle vorgelegt. Der Ligand, z. B. der sekundäre Botenstoff, wird dann Tropfenweise injiziert. Nach jedem Tropfen kommt es durch die Interaktion des Liganden mit dem Protein zu einer Temperaturänderung in der Messzelle. Die Temperatur wird dann mit der stets gleichbleibenden Temperatur der Referenzzelle abgeglichen und auf diese angepasst. Ist die Interaktion in der Messzelle exotherm, so muss Wärme entzogen werden, was im Thermogramm als negativer Ausschlag sichtbar wird. Durch jede weitere Ligandeninjektion nähert sich die Proteinlösung der Sättigung, weshalb die frei werdende Energie und somit die Ausschläge im Thermogramm geringer werden. Durch Integration der pro Injektion frei werdenden Energie und Anpassen einer Bindungskurve, kann die Zahl der Bindestellen pro Protein und die jeweilige Dissoziationskonstante ermittelt werden.

Gereinigtes His<sub>6</sub>-PilF wurde in einer Konzentration von 50 µM in Bicine-Puffer (50 mM Bicine, 200 mM NaCl, pH 8,5) in die Messzelle gegeben, c-di-GMP (erhalten von H. Keller, Goethe-Universität Frankfurt a. M.) lag als 800 µM Lösung in Bicine-Puffer vor. Wie in Abbildung 3.45 A zu sehen ist, bindet c-di-GMP unter Freisetzung von Wärme an PilF. Die Hälfte der Bindestellen sind bei einem molaren Verhältnis von 2:1 c-di-GMP:PilF besetzt und es sind zwei unterschiedliche Steigungen ersichtlich. Zum einen zeigt dies, dass jedes PilF-Monomer zwei Moleküle c-di-GMP bindet, zum anderen wird daraus deutlich, dass die beiden Bindestellen unterschiedliche Affinitäten für den Liganden aufweisen. Die Dissoziationskonstante der ersten Bindestelle mit  $N_1 = 1,38$  betrug  $K_{D1} = 7,94 \times 10^{-7}$ . Die berechneten Werte für die zweite Bindestelle waren  $N_2 = 0,915$  und  $K_{D2} = 3,86 \times 10^{-8}$ . Ein N-Wert von 1 gibt dabei an, dass ein Ligand pro Bindestelle gebunden wird. Aus den Dissoziationskonstanten kann geschlossen werden, dass auf das erste, schwächere Bindungsereignis ein zweites, stärkeres folgt. Dies kann z. B. dann auftreten, wenn die erste Bindung Konformationsänderungen im Protein hervorruft, die die Interaktion mit höherer Affinität an der zweiten Bindestelle erst ermöglichen.

Um die Spezifität der PilF-c-di-GMP Interaktion zu untersuchen, wurde der Versuch mit einer 1 mM c-di-AMP Lösung statt c-di-GMP wiederholt. Dabei kam es zu endothermen Reaktionen (Abb. 3.45 B). Zum Vergleich wurde Bicine-Puffer (50 mM Bicine, 200 mM NaCl, pH 8,5) zu gereinigtem PilF titriert und die Werte wurden von dem c-di-AMP-Thermogramm abgezogen. Es zeigte sich keine Bindungskurve (Abb. 3.45 B, unten), c-di-AMP bindet also nicht an PilF. Bei der Zugabe von cyclischem GAMP (cGAMP) war ebenfalls keine klare Interaktion zu erkennen (Abb. 3.45 C). Hier kam es allerdings bei der ersten Injektion zu einer exothermen Reaktion, bevor, ähnlich wie bei der Zugabe von c-di-AMP, Wärme abgegeben wurde. Dieses Experiment müsste wiederholt werden, um zu zeigen, ob PilF, wie das von Wang *et al.* (2016) beschriebene MshE aus *V. cholerae*, cGAMP mit geringer Affinität binden kann.



**Abb. 3.45. Interaktion zwischen PilF und sekundären Botenstoffen.** Zu einer 50 µM PilF-Lösung wurde eine 800 µM c-di-GMP-Lösung hinzugetropft (A). Der Bindungskurve wurden zwei Bindungsereignisse zugrunde gelegt. Die Abbildung ist beispielhaft für vier Wiederholungen. Bei der Injektion einer 800 µM c-di-AMP-Lösung in die PilF-Probe wurde keine Interaktion detektiert (B). Die für die Titration von Bicine Puffer in die PilF-Lösung gemessenen Werte wurden abgezogen. Die Wiederholung des Versuchs ergab ein vergleichbares Ergebnis. Eine 1 mM cGAMP-Lösung wurde injiziert (C). Bei allen Versuchen erfolgte alle 120 s die Injektion von jeweils 2 µl der Ligandenlösung über einen Zeitraum von 4 s. PilF und die Liganden waren in Bicine-Puffer (50 mM Bicine, 200 mM NaCl, pH 8,5) gelöst.

Diese ITC-Messungen zeigen, dass nur zwei der vier potentiellen c-di-GMP Bindestellen in PilF tatsächlich c-di-GMP binden. Dieser Ligand wird spezifisch, aber mit zwei unterschiedlichen Affinitäten gebunden. Dabei erfolgt zunächst die Bindung an die Bindestelle mit der schwächeren Affinität, bevor c-di-GMP mit höherer Affinität mit der zweiten Bindestelle interagiert. Welche der potentiellen Bindemotive mit c-di-GMP interagieren und inwieweit sich die Bindungen auf die Funktion von PilF bei der T4P-Assemblierung und der natürlichen Transformation auswirkt, werden zukünftige Untersuchungen zeigen.

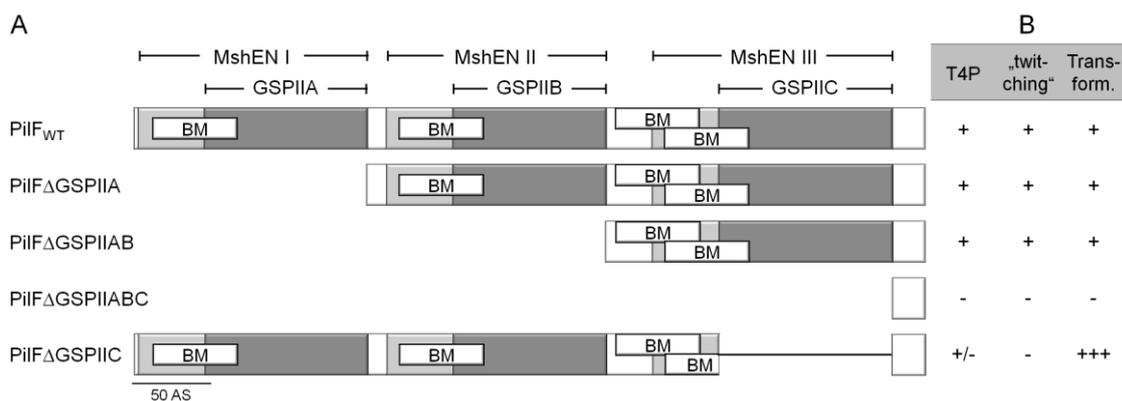
### 3.6.3 Verknüpfung der c-di-GMP-Bindestellen von PilF mit den GSPII-Domänen und ihren Funktionen

Die von Wang et al. (Wang *et al.* 2016) beschriebene c-di-GMP bindende MshEN-Domäne setzt sich aus vier N-terminalen  $\alpha$ -Helices und einer C-terminalen  $\alpha/\beta$ -Domäne zusammen. Letztere entspricht der GSPII-Domäne. PilF aus *T. thermophilus* weist drei GSPII-Domänen auf (GSPIIA, B und C), die Teil von drei MshEN-Domänen sind (Abb. 3.46 A). Die Sequenzen von drei der vier putativen c-di-GMP-Bindestellen beginnen jeweils im N-terminalen Bereich der MshEN-Domäne und erstrecken sich bis in die GSPII-Domäne. Eines der Bindemotive (Aminosäuren 335 – 359) befindet sich zwischen der GSPIIB- und der GSPIIC-Domäne und überschneidet sich mit dem vierten Bindemotiv.

*T. thermophilus*-Mutanten mit Deletionen der GSPII-Domänen wurden bereits in vorangegangenen Arbeiten erstellt und auf Pilierung, „twitching motility“ und natürliche Transformierbarkeit untersucht (Kruse *et al.* 2018) (Abb. 3.46 B). Die Ergebnisse dieser Arbeiten lassen Schlüsse auf die Rolle der potentiellen c-di-GMP-Bindemotive zu, da diese in den *pilFΔGSPII*-Mutanten ebenfalls ganz oder teilweise deletiert vorliegen (Abb. 3.46 A).

In den Mutanten *pilFΔGSPIIA* und *pilFΔGSPIIAB* sind die erste, bzw. die ersten beiden MshEN-Domänen inklusive c-di-GMP-Bindemotiven komplett deletiert. Dennoch weisen diese Mutanten eine Wildtyp-artige T4P-Assemblierung und „twitching motility“ auf. Auch die natürlichen Transformationsfrequenzen sind mit denen des Wildtyps vergleichbar (Abb. 3.46 B). Dies lässt darauf schließen, dass die MshEN I- und die MshEN II-Domäne nicht essentiell für diese Funktionen sind. Möglicherweise ist die MshEN III-Domäne und die Bindung nur eines c-di-GMP-Moleküls in PilF ausreichend um T4P-Assemblierung und natürliche Transformation zu ermöglichen.

Durch die Deletion der GSPIIC-Domäne ( $\Delta 369 - 479$ ) in der Mutante *pilFΔGSPIIC* wurde die  $\alpha/\beta$ -Faltung der dritten MshEN-Domäne entfernt und die Bindesequenz des vierten c-di-GMP-Bindemotivs ist unvollständig. Die *pilFΔGSPIIC*-Mutante weist nur sehr wenige Pili (21 % pilierte Zellen mit  $2 \pm 1$  Pili) im Vergleich zum Wildtyp (75 % pilierte Zellen mit  $6 \pm 3$  Pili) auf und ist nicht zur twitching motility in der Lage (Abb. 3.46 B) (Kruse *et al.* 2018). Dies führt zur Vermutung, dass die potentiell c-di-GMP bindende MshEN III-Domäne sehr wichtig für die T4P-Assemblierung ist. Interessanterweise ist die Transformationsfrequenz der Mutante *pilFΔGSPIIC* deutlich höher als die des Wildtyps. Die GSPIIC-Domäne und das vierte, potentielle c-di-GMP-Bindemotiv sind also nicht essentiell für die natürliche Transformation. Wie die Hypertransformierbarkeit der Mutante erklärt werden könnte, wird später diskutiert (Kapitel 4.5).



**Abb. 3.46. Anordnung der N-terminalen Domänen von PilF und der PilFΔGSPII-Varianten (A) und Phänotypen der pilFΔGSPII-Mutanten (B).** Schematische Darstellung der Domänen des N-Terminus (Aminosäure 1 - 500) von PilF aus *T. thermophilus* HB27 und der PilFΔGSPII-Varianten (A). MshEN-Domänen sind hellgrau, GSPII-Domänen sind dunkelgrau dargestellt. Die c-di-GMP-Bindemotive (BM) sind als weiße Kästen eingelassen. Die T4P-Assemblierung (T4P), „twitching motility“ („twitching“) und natürliche Transformierbarkeit (Transform.) der entsprechenden *T. thermophilus*-Mutanten *pilFΔGSPIIA*, *pilFΔGSPIIAB*, *pilFΔGSPIIABC* und *pilFΔGSPIIC*, sowie des Wildtyps wurden analysiert (Kruse *et al.* 2018) (B). +, Wildtyp-artig; -, nicht vorhanden; +/-, geringer als im Wildtyp; +++, stark erhöht. Die Abbildung basiert auf Daten von P. Aderhold und R. Salzer (AK Averhoff, Goethe-Universität Frankfurt a. M.).

Die Deletion aller MshEN-Domänen in der *pilF*Δ*GSPIIABC*-Mutante hat zur Folge, dass keine T4P gebildet werden und keine natürliche Transformation stattfindet (Abb. 3.46 B). Ob für diesen Phänotyp ausschlaggebend ist, dass kein c-di-GMP gebunden werden kann, oder der mit der Deletion einhergehende Verlust des gesamten N-Terminus, müssen zukünftige Experimente zeigen.

Dafür könnten Aminosäuresubstitutionen in den konservierten Aminosäuren der c-di-GMP-Bindesequenzen eingefügt werden, die die Struktur des N-Terminus von PilF nicht beeinträchtigen, aber zum Verlust der c-di-GMP-Bindung führen. Beispielsweise könnten die Aminosäuren R/K, L und G zu Beginn der c-di-GMP-Bindesequenzen mutiert werden, da Austausch der entsprechenden Aminosäuren in MshE aus *V. cholerae* zu einer starken Verminderung der c-di-GMP-Bindung geführt haben und die Pilus- und Biofilmbildung reduziert haben (Wang *et al.* 2016; Roelofs *et al.* 2015). Substitutionen dieser konservierten Aminosäuren in den vier putativen c-di-GMP-Bindestellen in PilF aus *T. thermophilus* könnten Aufschluss darüber geben, welche der Bindemotive tatsächlich c-di-GMP binden und welchen Einfluss sie auf die natürliche Transformation, die T4P-Biogenese und die T4P-vermittelten Funktionen haben.

## 4 Diskussion

Der DNA-Translokator und die T4P-Maschinerie von *T. thermophilus* sind miteinander verknüpfte Systeme, die identische Proteine beinhalten. Es sind neun Proteine bekannt, die eine duale Funktion als Komponenten beider Systeme haben. Daneben gibt es weitere Komponenten, die nur in einem der beiden Systeme, dem DNA-Translokator oder dem T4P, eine Rolle spielen. In dieser Arbeit wurde die Rolle der Präpilin-ähnlichen Proteine TTC1836, TTC1842, TTC1651, TTP0075 und TTP0077 und des ComZ-Proteins bei der natürlichen Transformation und der Funktionalität der T4P geklärt.

Zudem stand die Motor-ATPase PilF im Fokus dieser Arbeit. PilF stellt sowohl für die DNA-Aufnahme, als auch für die T4P-Assemblierung Energie bereit. Die Analysen im Rahmen dieser Arbeit geben Einblicke in die Funktionen konservierter Domänen von PilF bei der Transformation und der Pilus-Biogenese. Bisher war weitestgehend unklar, wie die cytoplasmatische ATPase PilF die durch ATP-Hydrolyse gewonnene Energie nutzt, um die Aufnahme extrazellulärer DNA durch die äußere Membran oder die Pilus-Assemblierung zu ermöglichen. Diese Arbeit liefert Hinweise darauf, dass die membranassoziierten Proteine PilM, PilN und PilO Kupplungsproteine sind, die PilF mit den periplasmatischen Komponenten des T4P/DNA-Translokators verbinden.

### 4.1 Interaktionen der Komponenten des DNA-Translokators und T4P

DNA-Translokatoren und T4P Gram-negativer Bakterien zeichnen sich durch konservierte Proteine aus, die für die Funktionalität beider Systeme essentiell sind: Piline, die Präpilinpeptidase PilD, das Sekretin PilQ, die in der inneren Membran lokalisierten Proteine PilC, PilN und PilO, das cytoplasmatische, membranassoziierte Protein PilM und die cytoplasmatische Motor-ATPase PilF (Peabody *et al.* 2003; Averhoff 2004). In *T. thermophilus*, ebenso wie in vielen anderen Bakterien, haben diese Proteine eine duale Funktion bei der natürlichen Transformation und der T4P-Biogenese. Dies führte zu dem Schluss, dass die Zellperipherie-durchspannende Assemblierungsplattform der T4P und des DNA-Translokators in Gram-negativen Bakterien weitestgehend identisch sind. Die Komponenten zahlreicher Transporter und Pilus-Systeme sind bereits untersucht worden, allerdings ist nicht geklärt, wie sie miteinander interagieren und wie die von PilF bereitgestellte Energie an die periplasmatischen Komponenten und äußeren Membranproteine beider Systeme übertragen wird.

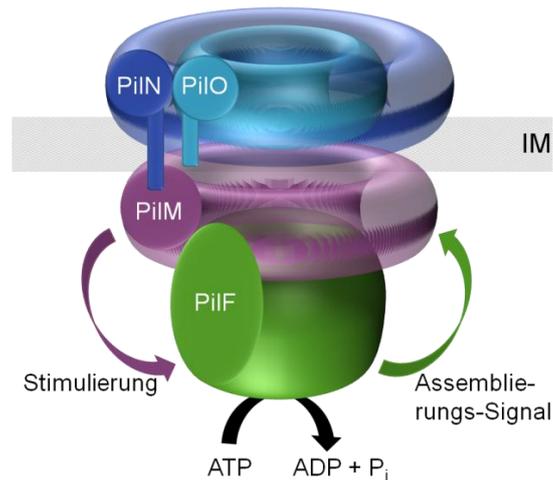
#### 4.1.1 Der PilMNO-Komplex bildet die Plattform des T4P und DNA-Translokators in der inneren Membran

##### Modell der Interaktionen von PilM, PilN, PilO und PilF

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben bestätigt, dass PilM, PilN und PilO aus *T. thermophilus* einen membrangebundenen Komplex bilden und erstmals gezeigt, dass dieser Komplex mit PilF interagiert. Es konnte gezeigt werden, dass PilMNO-Komplexe eine 2:2:2 Stöchiometrie aufweisen, was mit früheren Beobachtungen übereinstimmt (Karrupiah *et al.* 2013). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Karrupiah *et al.* entsprachen die in dieser Arbeit untersuchten PilMN-Komplexe allerdings keiner 2:2 Stöchiometrie, sondern eher 1:1 und 3:3 Stöchiometrien. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass hier ein anderer *E. coli*-Expressionsstamm und ein anderes Aufreinigungsprotokoll verwendet wurde. Ob der in *T. thermophilus* vorliegende PilMNO-Komplex tatsächlich eine 2:2:2 Stöchiometrie aufweist ist unklar. Die ermittelten Verhältnisse resultieren aus Interaktionsstudien heterolog produzierter PilM-, PilN- und PilO-Proteine. Die *in vivo* Assemblierungsmaschinerie und die Membranumgebung in *T. thermophilus* könnten zu einer anderen Stöchiometrie des PilMNO-Komplexes führen. Verschiedene Untersuchungen an T4P-Assemblierungskomplexen und T2SS deuten darauf hin, dass PilM-, PilN- und PilO-Homologe ringartige Strukturen bilden (Tammam *et al.* 2013; Chang *et al.* 2016; Chang *et al.* 2017; Korotkov *et al.* 2011b; McLaughlin *et al.* 2012) und Untersuchungen an PilN und PilO aus *P. aeruginosa* weisen darauf hin, dass die beiden Proteine dynamische Komplexe bilden, die zwischen Homodimeren und Heterodimeren wechseln (Leighton *et al.* 2016).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich unter Berücksichtigung der Analysen von Karrupiah *et al.* (2011; 2013) das in Abbildung 4.1 dargestellte Modell der Assemblierungsplattform an der inneren Membran von *T. thermophilus*:

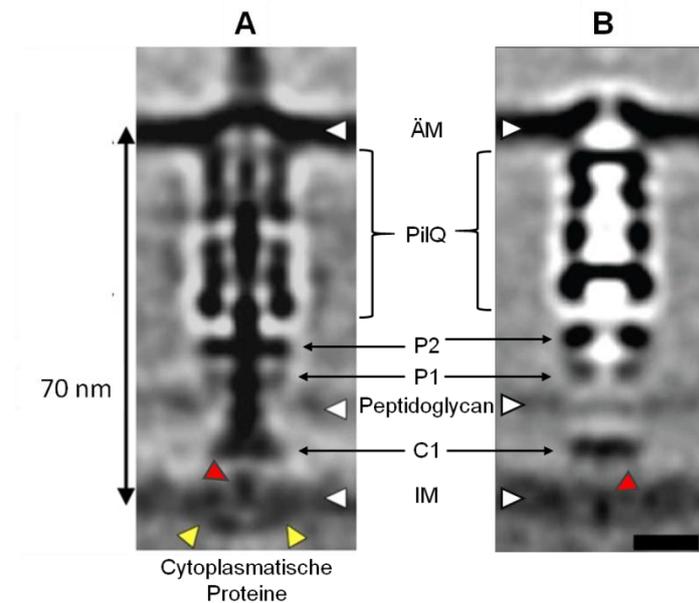
- PilM bindet an den konservierten N-Terminus von PilN, wodurch ein Komplex mit einer 2:2 Stöchiometrie an der inneren Membran entsteht.
- PilO bindet in einem äquimolaren Verhältnis an PilN, wodurch ein periplasmischer Ring entsteht, in dem dynamische Bewegungen der PilN- und PilO-Proteine relativ zueinander stattfinden (können).
- PilM bildet auf der cytoplasmatischen Seite der inneren Membran ebenfalls einen Ring, der die hexamere Motor-ATPase PilF bindet.
- Diese Bindung führt zur Stimulation der ATPase-Aktivität von PilF.
- Die ATP-Hydrolyse führt zu Konformationsänderungen in PilF, die über den PilMNO-Komplex als Signal zu den weiteren Komponenten des T4P/DNA-Translokators weitergeleitet werden.



**Abb. 4.1. Modell der Interaktionen von PilMNO und PilF an der inneren Membran.** PilN und PilO bilden eine ringartige Struktur im Periplasma und sind in der inneren Membran (IM) verankert. PilM ist an den cytoplasmatischen N-Terminus von PilN gebunden und bildet ebenfalls einen Ring. Der PilMNO-Komplex bindet und stimuliert die Motor-ATPase PilF. Die durch die ATP-Hydrolyse bereitgestellte Energie wird von PilF als Signal an den PilMNO-Komplex weitergeleitet. Von dort aus wird das Signal schließlich an weitere Komponenten des DNA-Translokators/T4P übertragen, was dann die DNA-Aufnahme oder Pilus-Assemblierung ermöglicht.

#### Das Modell des PilMNO-PilF-Komplexes stimmt mit der *in situ* Struktur des T4P-Assemblierungs-Komplexes überein

Cryo-EM-Tomographien von *T. thermophilus*-Zellen offenbarten 2015 erstmals die *in situ* Struktur des T4P-Assemblierungsapparates am Zellpol (Abb. 4.2) (Gold *et al.* 2015). Es wurden sowohl geöffnete Komplexe detektiert, die einen T4P beinhaltenen (~ 6 pro Zelle, Abb. 4.2 A), als auch geschlossene Komplexe (~ 33 pro Zelle, Abb. 4.2 B). Bei diesen geschlossenen Komplexen könnte es sich sowohl um T4P-Assemblierungsapparate handeln, die gerade keine Pilus-Struktur beinhalten, als auch um DNA-Translokatoren, für die eine identische Struktur angenommen wird. Auffällig, sowohl in der Struktur des geöffneten Komplexes, als auch in der des geschlossenen, sind die ringartigen Strukturen des PilQ-Komplexes, der die ÄM und etwa die Hälfte des Periplasmas durchspannt. Der PilQ-Komplex bildet einen Kanal, der hoch dynamisch ist und zwei Tore aufweist, die im geschlossenen Zustand deutlich erkennbar sind (Abb. 4.2 B). Im geöffneten Zustand sind diese Tore nicht zu sehen und der assemblierte T4P durchspannt den PilQ-Kanal und die ÄM (Abb. 4.2 A). Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass dieser Kanal auch den Transport der DNA durch die ÄM und das Periplasma während der natürlichen Transformation vermittelt. In der *in situ*-Struktur befinden sich unterhalb von PilQ zwei periplasmatische Proteindichten (P1 und P2 in Abb. 4.2) außerhalb der Peptidoglycanschicht und eine weitere zwischen Peptidoglycan und innerer Membran (C1 in Abb. 4.2). Im geöffneten Zustand des Assemblierungsapparates wurden Proteindichten im Cytoplasma, nahe der inneren Membran detektiert, die im geschlossenen Zustand, ohne T4P Struktur, nicht sichtbar waren (gelbe Pfeile in Abb. 4.2 A)



**Abb. 4.2. *In situ*-Struktur des T4P-Assemblierungsapparates in *T. thermophilus* im geöffneten (A) und geschlossenen Zustand (B) (modifiziert nach Gold *et al.* (2015)).** Subtomogramm-Mittelungen des geöffneten Pilus-Apparates mit assembliertem T4P (A) und des geschlossenen Apparates (B). Ausgehend von der äußeren Membran (ÄM) bildet PilQ einen Kanal, der etwa die Hälfte des 70 nm weiten Periplasmas durchspannt. Zwischen PilQ und der Peptidoglycanschicht befinden sich zwei ringförmige Proteindichten, P1 und P2. An der Außenseite der inneren Membran (IM) befindet sich eine weitere Dichte, C1, bei der es sich um die Proteine PilN und PilO handeln könnte. An der cytoplasmatischen Seite der IM sind weitere Proteindichten sichtbar (gelbe Pfeile), bei denen es sich um PilF und/oder PilM handeln könnte. Bei der Proteindichte in der inneren Membran (roter Pfeil) könnte es sich um PilC handeln. Im geschlossenen Zustand (B) befindet sich kein Pilus im Assemblierungsapparat. Die zwei geschlossenen Tore in PilQ sind zu erkennen, die Abstände zwischen den Ringdomänen von PilQ sind geringer als im geöffneten Zustand und die cytoplasmatischen Proteindichten sind nicht detektierbar. Größenstandard = 50 nm.

Der Vergleich des in Abbildung 4.1 dargestellten Modells mit der *in situ*-Struktur (Abb. 4.2) zeigt, dass der postulierte PilMNO-PilF-Komplex mit Teilen der in der Cryo-EM-Tomographien detektierten Dichten übereinstimmt. Die Proteine PilN und PilO könnten den periplasmatischen Ring C1 nahe der inneren Membran bilden. Die cytoplasmatische Dichte direkt unterhalb der inneren Membran (gelbe Pfeile in Abb. 4.2) könnte dem PilM-Ring und/oder der daran gebundenen Motor-ATPase PilF entsprechen.

Diese Hypothese wird auch durch cryo-EM-Tomographien des T4P-Systems von *M. xanthus* unterstützt (Chang *et al.* 2016). Chang *et al.* verglichen T4P-Komplexe von Wildtyp-Zellen mit denen von Mutanten, die entweder GFP-Fusionen einzelner T4P-Komponenten bildeten oder denen einzelne Gene fehlten. Diese Vergleiche zeigten, dass die Assemblierungs-ATPase und PilM tatsächlich cytoplasmatische Dichten nahe der inneren Membran bilden und dass PilO Teil eines periplasmatischen Ringes nahe der inneren Membran ist (Chang *et al.* 2016).

### Interaktionen von PilMNO und PilF mit weiteren Komponenten des T4P und DNA-Translokators

Untersuchungen von T4P-Systemen verschiedener Bakterien haben gezeigt, dass der PilMNO-Komplex mit dem Lipoprotein PilP interagiert und dass über PilP eine direkte Verbindung mit dem Sekretinkomplex PilQ besteht (Ayers *et al.* 2009; Tammam *et al.* 2013; Georgiadou *et al.* 2012; Friedrich *et al.* 2014; Li *et al.* 2013). Für *M. xanthus* konnte gezeigt werden, dass PilP im cryo-EM-Tomogramm eine periplasmatische Proteindichte bildet (Chang *et al.* 2016), die mit dem P1- oder P2-Ring in der Struktur des T4P-Assemblierungsapparates von *T. thermophilus* vergleichbar ist (Abb. 4.2 B). *T. thermophilus* weist kein PilP-Ortholog auf, enthält aber das in anderen Phyla nicht auftretende Protein PilW. Das Gen *pilW* ist in *T. thermophilus* im *pilMNOWQ*-Operon codiert, wohingegen in anderen Bakterien *pilP* die analoge Position im *pilMNO PQ*-Operon einnimmt. PilW ist kein Lipoprotein, interagiert aber ebenfalls mit PilQ. Zudem wird PilW für die Lokalisation des PilQ-Komplexes in der äußeren Membran von *T. thermophilus* benötigt (Rumszauer *et al.* 2006). Die Vermutung liegt nahe, dass PilW mit PilMNO interagiert und, ähnlich wie PilP in *M. xanthus*, einem der Proteinringe P1 oder P2 entspricht. Die Identität des zweiten Ringes, welcher nicht in *M. xanthus* auftritt, ist bisher völlig unbekannt.

Es konnte gezeigt werden, dass PilNO aus *T. thermophilus* und *P. aeruginosa* mit dem Hauptpilin (PilA4 bzw. PilA) interagiert (Karuppiah *et al.* 2013; Tammam *et al.* 2013). Diese Interaktion könnte die lokale PilA(4)-Konzentration an der Basis des Pilus bzw. Pseudopilus erhöhen, wodurch die (Pseudo-)Pilus-Assemblierung ermöglicht oder beschleunigt würde.

Der Pilus wird durch den PilQ-Kanal geleitet (Abb. 4.2 A) (Gold *et al.* 2015; Chang *et al.* 2016; Chang *et al.* 2017), wobei er vermutlich die Tore im PilQ-Komplex öffnet und so die Extrusion des Pilus bzw. die Aufnahme von DNA durch den PilQ-Kanal ermöglicht. Alternativ oder zusätzlich könnte auch eine Interaktion von PilW oder des PilMNOW-Komplexes mit PilQ zur Öffnung der Tore führen.

In *M. xanthus* gibt es Hinweise darauf, dass sich das polytopische Membranprotein PilC direkt an der Basis des (Pseudo-)Pilus in der inneren Membran befindet und dass dieses Protein den Einbau der Piline katalysiert (Chang *et al.* 2016). PilC aus *T. thermophilus* bildet ein Tetramer (Karuppiah *et al.* 2010), das ebenfalls an der Basis des Pilus lokalisiert sein könnte (roter Pfeil in Abb. 4.2). Die N-Termini von PilC aus *T. thermophilus* befinden sich im Cytoplasma (Karuppiah *et al.* 2010) und könnten somit PilF binden und so, neben dem PilMNO-Komplex, eine weitere Verbindung zwischen PilF und der inneren Membran und dem Periplasma herstellen. In zukünftigen Versuchen sollte analysiert werden, mit welchen weiteren Proteinen des T4P/DNA-Translokators die hier untersuchten Proteine PilF und PilMNO interagieren und ob diese Interaktionen die ATPase-Aktivität von PilF beeinflussen.

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit und den Ergebnissen von Gold *et al.* (2015), Chang *et al.* (2016) und Karuppiah *et al.* (2010; 2013) ergibt sich das folgende Modell der Assemblierung des T4P bzw. des DNA-Translokators: PilMNO bildet eine Assemblierungsplattform an der inneren Membran, die PilF mit den periplasmatischen und äußeren Membranproteinen verbindet und die Piline zu PilC und der Basis des wachsenden

(Pseudo-)Pilus rekrutiert. PilF wird dabei durch die Bindung an PilMNO fixiert und stimuliert und gibt dann die durch ATP-Hydrolyse entstehenden Konformationsänderungen an PilC weiter. PilC könnte dadurch eine schaufelartige Bewegung ausführen, die zum Einbau von Pilinen in den wachsenden (Pseudo-)Pilus führt, ähnlich wie von Chang *et al.* (2016) vorgeschlagen.

#### 4.1.2 Die Stimulierung der ATPase-Aktivität von PilF

Isolierte PilF-Komplexe weisen mit etwa  $25 - 30 \text{ nmol P}_i \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  eine relativ geringe ATPase-Aktivität auf. Ähnlich niedrige Aktivitäten wurden auch für andere Assemblierungs- und Deassemblierungs-ATPasen beschrieben, z. B.  $3 \text{ nmol P}_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  bei PilB aus *M. xanthus*,  $7,4 \text{ nmol P}_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  bei PilT aus *P. aeruginosa* und  $62 \text{ nmol P}_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  bei BfpD aus EPEC (Jakovljevic *et al.* 2008; Chiang *et al.* 2008; Crowther *et al.* 2005; Sakai *et al.* 2001; Herdendorf *et al.* 2002; Nakasugi *et al.* 2007). Dies mag zunächst widersprüchlich erscheinen, da Motor-ATPasen in der Lage sind T4P-Assemblierung bzw. -Deassemblierung mit Geschwindigkeiten von etwa  $0,50 \pm 0,18 \text{ } \mu\text{m/s}$  ( $\sim 650 \text{ Piline} \times \text{s}^{-1}$ ) anzutreiben (Skerker und Berg 2001). Allerdings würde eine dauerhaft höhere ATP-Hydrolyse durch die Motor-ATPasen einen hohen Energieverlust für die Zelle bedeuten. Erst wenn PilF an den T4P-Assemblierungsapparat bzw. den DNA-Translokator gebunden ist, sollte die ATP-Hydrolyse gesteigert werden, so dass die Energie direkt weitergeleitet werden kann. Wie hier gezeigt wurde, liefert in *T. thermophilus* die Bindung von PilF an den PilMN-Komplex ein Signal für die Stimulierung der ATPase-Aktivität von PilF. Dabei ist die GSPIC-Domäne entscheidend für die Weiterleitung dieses Signals.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Interaktion von PilF mit PilMN zu einer Verdopplung der ATPase-Aktivität von PilF führt, was einer nur recht schwachen Stimulierung entspricht. Diese Verdopplung der Aktivität stimmt aber mit Beobachtungen an Proteinen der T2SS aus *V. cholerae* und *X. campestris* überein. Dort wurde für die Assemblierungs-ATPasen EpsE und XspE gezeigt, dass die Bindung an die PilMN-Strukturhomolge EpsL bzw. XspL ebenfalls nur zu einer zweifachen Steigerung der ATP-Hydrolyse führt. Die ATPase-Aktivität von EpsE aus *V. cholerae* konnte jedoch durch Zugabe von sauren Phospholipiden, wie Cardiolipin oder Phosphatidylcholin, zusätzlich zu EpsL 130-fach gesteigert werden (Camberg *et al.* 2007). Auch für andere Motor-ATPasen wurde gezeigt, dass sie durch Membranlipide stimuliert werden können (siehe Tab. 4.1).

Es ist also möglich, dass Membranlipide zusätzlich zu PilMN der Motor-ATPase signalisieren, dass diese an ihrem Bestimmungsort angekommen ist und sich die ATPase-Aktivität durch Membranlipide deutlich steigern lässt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb ebenfalls der Effekt von Cardiolipin auf die ATPase-Aktivität von PilF untersucht. Unter den getesteten Bedingungen stimulierte Cardiolipin die Aktivität von PilF nicht, auch nicht in Anwesenheit von PilMN. Cardiolipin ist allerdings nur eines der Membranlipide von *T. thermophilus*. Möglicherweise ist ein Gesamtmembran-Lipidextrakt erforderlich, um die ATPase-Aktivität von PilF zu stimulieren. Auch wäre es möglich, dass für eine Erhöhung der Stimulation von PilF PilMN in eine Phospholipid-Membran eingebettet sein müssten. Dafür müsste eine Rekonstitution in

Membranvesikel erfolgen. Es wurde bereits in vorangegangenen Analysen versucht, Vesikel herzustellen, die bei einer Temperatur von 68 °C stabil bleiben, jedoch ohne Erfolg (persönliche Kommunikation, R. Salzer, Goethe-Universität Frankfurt).

**Tab. 4.1. Stimulierung von Assemblierungs-ATPasen durch Interaktionspartner.**

Organismus	System	ATPase	Interaktionspartner	Stimulierung	Referenz
<i>X. campestris</i>	T2SS	XspE	XspL, saure Phospholipide	130-fach	(Camberg <i>et al.</i> 2007)
<i>V. cholerae</i>	T2SS	EpsE	EpsL	2-fach	(Shiue <i>et al.</i> 2006)
<i>S. acidocaldarius</i>	archaelles Flagellum	FlaI	Tetraetherlipide	4-fach	(Ghosh <i>et al.</i> 2011)
<i>S. typhimurium</i>	Flagellum	FliI	saure Phospholipide	10-fach	(Auvray <i>et al.</i> 2002)
<i>E. coli</i>	Sec-Proteinexport	SecA	SecY, saure Phospholipide	7-fach	(Lill <i>et al.</i> 1990)
<i>M. xanthus</i>	T4P	PilB	PilC	*	(Bischof <i>et al.</i> 2016)
EPEC	BFP	BfpD	BfPE, BfpC	1200-fach	(Crowther <i>et al.</i> 2005)

\* Für PilB aus *M. xanthus* konnte nur in Anwesenheit von PilC eine ATPase-Aktivität detektiert werden, in Abwesenheit von PilC nicht.

PilF aus *T. thermophilus* ist die erste Motor-ATPase mit einer dualen Funktion in T4P und im DNA-Translokator, für die eine Stimulation durch PilMN gezeigt wurde. Eine Stimulierung einer Motor-ATPase durch ein inneres Membranprotein des T4P-Assemblierungskomplexes konnte allerdings schon für die Assemblierungs-ATPase PilB aus *M. xanthus* gezeigt werden (Bischof *et al.* 2016). Diese T4P Assemblierungs-ATPase wurde durch die Zugabe des integralen Membranproteins PilC stimuliert. Hier führte die Koinkubation von PilB mit einer PilM-PilN<sub>1-16</sub>-Fusion zu keiner Steigerung der ATPase-Aktivität. Entweder wird also das Voll-längen-PilN für die Stimulierung der ATPase-Aktivität benötigt oder in *M. xanthus* erfolgt die Stimulation nur durch die Bindung an PilC und nicht an PilMN (Tab. 4.1).

Die Aktivität der Assemblierungs-ATPase BfpD der „bundle forming pili“ (BFP) aus EPEC wurde durch die Inkubation mit BfpE- und BfpC-Fragmenten auf ein 1200-faches gesteigert (Crowther *et al.* 2005) (Tab. 4.1). BfpE zeigt Ähnlichkeiten zu PilC und BfpC ist ähnlich zu PilMN. Für die Motor-ATPase PilF aus *T. thermophilus* müssen zukünftige Analysen zeigen, ob sie mit PilC interagiert und ob diese Interaktion die Stimulierung der ATPase-Aktivität weiter steigern kann.

## 4.2 Funktion der Domänen der Motor-ATPase PilF

### Strukturbasierte Modelle der Dynamik von PilF-Komplexen

Die Strukturen verschiedener T2SS- und T4P-ATPasen in ihren hexameren Formen sind bekannt. Dabei wurde häufig eine ovale Anordnung der Protomere mit einer Symmetrieachse beobachtet (Misic *et al.* 2010; Satyshur *et al.* 2007; Lu *et al.* 2013; Mancl *et al.* 2016; McCallum *et al.* 2017). Dies wurde zum Teil dadurch erklärt, dass jeweils zwei der Protomere ATP(-Analoga) und zwei ADP gebunden hatten, während zwei Protomere in einer geöffneten Form vorlagen (Mancl *et al.* 2016; McCallum *et al.* 2017; Misic *et al.* 2010). Durch ATP-Bindung und -Hydrolyse kommt es zu einem geordneten Wechsel der Formen und somit zu einer kreisartigen Bewegung. Es wurde vorgeschlagen, dass diese Bewegung schließlich zur helikale Assemblierung der Pili führt (Mancl *et al.* 2016; McCallum *et al.* 2017; Tsai und Tainer 2016).

Ein Nachteil der von Mancl *et al.* (2016) und McCallum *et al.* (2017) veröffentlichten Strukturen von PilF/PilB aus *T. thermophilus* und *G. metallireducens* ist, dass sie jeweils die N-terminalen Domänen nicht beinhalten. Diese N-terminalen Domänen könnten aber einen erheblichen Einfluss auf die Komplexstruktur und Funktionsweise der Motor-ATPasen haben, wie anhand der PilF $\Delta$ GSPII-Varianten aus *T. thermophilus* deutlich wurde (diese Arbeit und (Kruse *et al.* 2018)).

Untersuchungen von PilF aus *T. thermophilus*, die Röntgenstrukturanalysen und EM-Einzelpartikelanalysen kombinierten, zeigten ein anderes Modell der Funktionsweise der Motor-ATPase (Collins *et al.* 2018). Hier hatten alle sechs PilF-Untereinheiten im Proteinkristall zeitgleich ATP gebunden. Die cryo-EM-Strukturdaten zeigten, dass die C-terminalen ATPase-Domänen von PilF, ebenso wie die N-terminalen MshEN/GSPII-Domänen, ein weiter nach außen ausgedehntes Oval bildeten, wenn das ATP-Analogon AMP-PNP gebunden war. Zudem wurde deutlich, dass sich die MshEN/GSPII-Domänen durch AMP-PNP-Bindung um 10 - 13 Å von der ATPase-Domäne entfernten. Es kommt also durch ATP-Bindung zur Bewegung der PilF-Domänen relativ zueinander.

### Funktion der GSPII-Domänen in PilF bei der Interaktion mit PilM

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PilM direkt mit PilF interagiert. Da die Deletion der drei N-terminalen GSPII-Domänen von PilF die Bindung an PilM nicht beeinträchtigte, kann daraus geschlossen werden, dass PilM nicht ausschließlich an eine der GSPII-Domänen bindet (Abb. 3.38). Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen an Proteinen der T2SS aus *V. cholerae* und *X. campestris*. Dort wurde für die Assemblierungs-ATPasen EpsE und XspE gezeigt, dass die Bindung an die PilMN Strukturhomologe EpsL bzw. XspL durch den N-Terminus der jeweiligen Motor-ATPase erfolgt, der eine GSPII-Domäne enthält (Abendroth *et al.* 2005; Chen *et al.* 2005). In diesen Systemen führte die Interaktion ebenfalls zur Stimulierung der ATPase-Aktivität von EpsE bzw. XspE (Camberg *et al.* 2007; Shiue *et al.* 2006).

Collins *et al.* (2018) postulierten, dass die GSPIIC-Domäne von PilF aus *T. thermophilus* in der Nähe der ATPase-Domäne lokalisiert ist, auch wenn keine direkten Interaktionsflächen vorhanden sind. Diesem Modell folgend, wäre es denkbar, dass die in dieser Arbeit gezeigte Bindung von PilM an PilF im Bereich zwischen der ATPase-Domäne und der GSPIIC-Domäne des N-terminalen Ringes von PilF erfolgt. Dies würde erklären, warum der PilF $\Delta$ GSPIIABC-Komplex in der Lage ist, an PilM zu binden, obwohl er keinen N-terminalen Ring aufweist. Eine zusätzliche direkte Interaktion von PilM mit der GSPIIC-Domäne könnte erklären, warum die PilF $\Delta$ GSPIIC-Variante nicht durch PilMN stimuliert wurde. Eine durch PilMN-Bindung hervorgerufene Konformationsänderung in GSPIIC könnte eventuell die Beweglichkeit des N-terminalen PilF-Ringes oder die Zugänglichkeit der C-terminalen ATPase-Domäne für ATP erleichtern.

Das führte zu der Hypothese, dass PilM als Teil des membrangebundenen PilMNO-Komplexes PilF bindet und so fixiert und die ATPase-Aktivität stimuliert. Die GSPII-Domänen von PilF bewegen sich durch ATP-Bindung und -Hydrolyse relativ zu der fixierten C-terminalen Domäne von PilF. Diese Bewegung könnte an andere Komponenten des DNA-Translokators/T4P weitergeleitet werden. Wie bereits erwähnt, könnte PilC dabei ein Interaktionspartner sein.

In der cryo-EM-Struktur von PilF aus *T. thermophilus* konnte die Struktur der GSPIIA-Domäne nicht aufgelöst werden, weshalb die Autoren vermuteten, dass diese Domäne direkt mit anderen Proteinen interagiert (Collins *et al.* 2018). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die GSPIIA-Domäne keine Rolle bei der Interaktion mit PilMN spielt, wäre PilC der wahrscheinlichere Interaktionspartner der GSPIIA-Domäne. Allerdings waren die *pilF* $\Delta$ GSPIIA- und *pilF* $\Delta$ GSPIIAB-Mutanten weiterhin in der Lage T4P zu assemblieren und DNA aufzunehmen (Kruse *et al.* 2018). Somit scheint die GSPIIA-Domäne bei diesen Funktionen keine zentrale Rolle zu spielen. Genauerem Aufschluss über die Interaktionen von PilF mit Komponenten des DNA-Translokators und T4P könnten Strukturdaten von Kokristallen liefern, die PilF bzw. Domänen von PilF beinhalten, sowie PilM oder PilC.

### **Die Rolle der ATP-Bindung und -Hydrolyse bei der Komplexbildung und Funktion von PilF**

Für einige Motor-ATPasen wurde gezeigt, dass sie erst durch ATP-Bindung zu Komplexen assemblieren (Ghosh *et al.* 2011; Krause *et al.* 2000; Crowther *et al.* 2005). Im Fall von XpsE aus *X. campestris* führte erst diese ATP-abhängige Multimerisierung zur Bindung an das membrangebundene XpsL (Shiue *et al.* 2006). Andere Motor-ATPasen, wie die vom konjugativen Plasmid R64 codierte T4P-ATPase PilQ in *E. coli* und HP0525 des T4SS von *H. pylori* bilden hingegen Komplexe unabhängig von der ATP-Bindung (Krause *et al.* 2000; Sakai *et al.* 2001).

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass isoliertes PilF aus *T. thermophilus* auch ohne Zugabe von ATP Hexamere bildet (Salzer *et al.* 2014a). In dieser Arbeit konnte nun mit PilF<sub>K654A</sub> eine Variante erstellt werden, die kein ATP bindet, aber dennoch hochmolekulare Komplexe bildet. Diese migrierten in der nativen PAGE etwas langsamer als der Wildtyp-Komplex (Abb. 3.21). Es könnte sich dennoch um einen hexameren Komplex handeln, der eine

andere Konformation angenommen hat, als der Großteil der Wildtyp-Komplexe. Dieser würde vermutlich dem von Collins *et al.* (2018) beschriebenen Apoprotein-Komplex entsprechen, der kürzer, aber breiter als der mit dem ATP-Analogon AMP-PNP beladene Komplex ist. Die Tatsache, dass ein geringer Anteil der PilF-Wildtyp-Komplexe das gleiche Migrationsverhalten in der nativen PAGE zeigte wie PilF<sub>K654A</sub>, unterstützt die Hypothese, dass PilF<sub>K654A</sub> eine veränderte hexamere Konformation annimmt. Der Verlust der ATP-Bindung von PilF<sub>K654A</sub> hat keinen Einfluss auf die Bindung an PilMN, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Dies steht im Gegensatz zu der ATP-abhängigen Interaktion von XpsE und XpsL des T2SS aus *X. campestris* (Shiue *et al.* 2006).

Viele Mutantenstudien haben bereits gezeigt, dass das ATP bindende Walker A-Motiv und das ATP-hydrolysierende Walker B-Motiv absolut essentiell für die Funktionen von Motor-ATPasen bei der Proteinsekretion, T4P-Assemblierung, „twitching motility“ und DNA-Aufnahme sind (Chiang *et al.* 2008; Jakovljevic *et al.* 2008; Sandkvist *et al.* 1995; Seitz und Blokesch 2013; Shiue *et al.* 2006; Turner *et al.* 1993). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass auch die DNA-Aufnahme, T4P-Assemblierung und „twitching motility“ von *T. thermophilus* abhängig vom konservierten Lysin des Walker A-Motivs (K654) und vom katalytischen Glutamat des Walker B-Motivs (E718) sind.

Interessanterweise waren die in den Walker-Motiven defekten Mutanten *pilFK654A* und *pilFE718A* weiterhin in der Lage an Plastikoberflächen zu adhären. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass unpilierte *T. thermophilus*-Mutanten Defekte in der Adhäsion zeigen (Salzer *et al.* 2015; Burkhardt *et al.* 2012; Salzer *et al.* 2014b). Eine unpilierte  $\Delta pilF$ -Mutante zeigte kaum Adhäsion an Plastikoberflächen (Abb. 3.26) (Salzer *et al.* 2014a). Die *pilFK654A*- und *pilFE718A*-Mutanten zeigten zwar eine im Vergleich zum Wildtyp geringere Adhäsion, adhärten aber stärker als die  $\Delta pilF$ -Deletionsmutante. Dies deutet darauf hin, dass PilF neben der enzymatischen Funktion als T4P Assemblierungs-ATPase auch eine Rolle bei der Adhäsion spielt. Bei dieser PilF-abhängigen Adhäsionsfunktion könnten die c-di-GMP-Bindedomänen von PilF, die in den *pilFK654A*- und *pilFE718A*-Mutanten noch vorhanden sind, eine entscheidende Rolle spielen, denn c-di-GMP ist als Sekundärbotenstoff bekannt, der die Antwort auf Oberflächenkontakte, die Adhäsion und die Biofilmbildung reguliert (Xu *et al.* 2013; Jenal *et al.* 2017).

### 4.3 Die Bindung von c-di-GMP an PilF

#### PilF bindet zwei Moleküle c-di-GMP

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass PilF aus *T. thermophilus* HB27 den Sekundärbotenstoff c-di-GMP bindet. Dabei ist PilF auch die erste Motor-ATPase, für die nachgewiesen wurde, dass sie zwei Moleküle c-di-GMP pro Monomer bindet. Die Bindungen erfolgen dabei vermutlich an zwei der drei MshEN-Domänen von PilF. Die Bindungskinetik zeigt, dass c-di-GMP zunächst mit einer geringeren Affinität an PilF bindet, bevor dann das zweite Bindungsereignis mit einer höheren Affinität erfolgt. Dies deutet daraufhin, dass es durch die erste Bindung zu Konformationsänderungen in PilF kommt, die die zweite Bindungsstelle leichter zugänglich für c-di-GMP machen. Dies könnte eventuell eine differenziertere Regulation des T4P/DNA-Translokators erlauben.

#### Die ATPase-Aktivität von PilF wird nicht durch c-di-GMP-Bindung stimuliert

Wang *et al.* (2016) beschrieben, dass die ATPase-Aktivität von MshE aus *V. cholerae* durch c-di-GMP Bindung um etwa 10 % zunimmt. Dies steht im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen und zu Untersuchungen an der Motor-ATPase PilB2 aus *C. perfringens*, welche nicht durch c-di-GMP stimuliert werden (Hendrick *et al.* 2017). Dies, zusammen mit der nur sehr geringen Stimulierung von MshE, legt die Vermutung nahe, dass c-di-GMP nicht primär eine Rolle bei der ATP-Hydrolyse spielt.

#### Konservierte c-di-GMP bindende Proteindomänen

Die MshEN-Domäne tritt in den N-terminalen Domänen zahlreicher Assemblierungs-ATPasen von T2SS und T4P-Systemen auf, so auch in PilF aus *T. thermophilus*, wo drei MshEN-Domänen identifiziert wurden (Abb. 3.46) (Wang *et al.* 2016). MshEN ist eine erst kürzlich entdeckte c-di-GMP Bindedomäne, sie weist die Faltung  $\alpha\alpha\alpha\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$  auf und ein c-di-GMP-Bindemotiv mit der Konsensussequenz RLGxx(L/V/I)(L/V/I)xxG(L/V/I)xxxxLxxxLxxQ (Wang *et al.* 2016). Neben dieser erst vor Kurzem beschriebenen Domäne gibt es vier c-di-GMP-Bindedomänen, die schon länger bekannt sind: GGDEF, EAL, HD-GYP und PilZ. Das GGDEF-Motiv ist an der c-di-GMP-Synthese durch Diguanilatcyclasen beteiligt, während das EAL- und das HD-GYP-Motiv in Phosphodiesterasen zu finden sind, die mit dem c-di-GMP-Abbau assoziiert sind (Hengge 2009). PilZ-Domänen, benannt nach dem T4P-Protein PilZ aus *P. aeruginosa*, sind c-di-GMP-Rezeptoren, die in sehr diversen Proteinen zu finden sind. Diese Proteine haben Funktionen bei z. B. der Cellulose-Synthese, Alginat-Synthese, in der Zelldifferenzierung, Motilität oder T4P-Assemblierung (Ross *et al.* 1990; Amikam und Galperin 2005; Merighi *et al.* 2007; Muñoz-Dorado *et al.* 1991; Alm *et al.* 1996a). Die PilZ-Domäne zeigt eine  $\beta\beta\beta\beta\beta\alpha$ -Faltung und enthält die konservierten Aminosäuresequenzen RxxxR und (D/N)hSxxG (wobei x für eine beliebige AS steht und h für eine hydrophobe AS) (Amikam und Galperin 2005; Habazettl *et al.* 2011; Ryjenkov *et al.* 2006).

### **Die c-di-GMP bindenden Proteine PilZ und FimX interagieren mit Motor-ATPasen, treten in *T. thermophilus* aber nicht auf**

Das namensgebende Protein der PilZ-Domäne, PilZ aus *P. aeruginosa*, ist essentiell für die T4P-Biogenese in *P. aeruginosa* (Alm *et al.* 1996a). Neben PilZ wurde ein weiteres c-di-GMP bindendes Protein mit einer Funktion bei der T4P-Biogenese von *P. aeruginosa* identifiziert: FimX. FimX weist eine GGDEF- und eine EAL-Domäne auf, zeigt allerdings keine Diguanylatcyclase- oder Phosphodiesterase-Aktivität (Navarro *et al.* 2009; Huang *et al.* 2003). *P. aeruginosa* *fimX*-Mutanten bilden weniger Pili und zeigen eingeschränkte „twitching motility“ im Vergleich zum Wildtyp (Huang *et al.* 2003; Kazmierczak *et al.* 2006). Auch in verschiedenen *Xanthomonas*-Spezies wurden *pilZ*- und *fimX*-Homologe identifiziert, deren Mutationen zu Defekten in der Pilierung, „twitching motility“ und Biofilmbildung führten (Guzzo *et al.* 2009; Guzzo *et al.* 2013; McCarthy *et al.* 2008). Die genaue Funktion der Proteine PilZ und FimX ist aber noch nicht geklärt.

Die Strukturen der PilZ-Domäne von PilZ und der EAL-Domäne von FimX aus *P. aeruginosa* und *Xanthomonas*-Spezies sind beschrieben (Guzzo *et al.* 2009; Li *et al.* 2009; Chin *et al.* 2012; Ramelot *et al.* 2007; Navarro *et al.* 2009). Aus Analysen an Proteinen aus *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ging zudem hervor, dass PilZ zeitgleich sowohl mit der EAL-Domäne von FimX interagiert, als auch mit der T4P-Assemblierungs-ATPase PilB (Guzzo *et al.* 2009). Eine solche Interaktion von c-di-GMP bindenden Proteinen mit einer T4P-ATPase ist auch aus *X. campestris* bekannt, wobei dort die Bindung von PilZ an die Retraktions-ATPase PilT erfolgt (Römling *et al.* 2013).

*T. thermophilus* weist keine FimX- oder PilZ-Homologe auf. Tatsächlich sind in *T. thermophilus* keine Proteine bekannt, die eine PilZ-Domäne beinhalten (Wang *et al.* 2016). Es wäre also denkbar, dass die Bindung von zwei c-di-GMP Molekülen an PilF eine ähnliche Funktion hat, wie die Bindung von PilZ und FimX an PilB in *X. axonopodis* pv. *citri*. Diese Funktion ist bisher unbekannt, es wird jedoch eine regulatorische Rolle bei der T4P-Biogenese vermutet, die die zellulären c-di-GMP-Level direkt mit dem T4P verknüpft (Huang *et al.* 2003; Guzzo *et al.* 2013). Um einen Vergleich zwischen den Systemen in *T. thermophilus* und *X. axonopodis* pv. *citri* anstellen zu können, muss erst mehr über die Funktion der c-di-GMP-Bindung in PilF und der FimX-PilZ-PilB Interaktion bekannt werden.

### **Zukünftige Untersuchungen der c-di-GMP-Bindedomänen von PilF**

Da PilF vier potentielle c-di-GMP-Bindemotive aufweist, aber nur zwei Moleküle des Sekundärbotenstoffs bindet, ergibt sich die Frage, an welche der Motive diese Bindung erfolgt. Um dies zu beantworten, sollten PilF-Varianten produziert, gereinigt und auf c-di-GMP-Bindung untersucht werden, die Defekte in den einzelnen Bindedomänen aufweisen. Dafür eignen sich auch die bereits vorliegenden PilF-Varianten  $\Delta$ GSPIIA,  $\Delta$ GSPIIAB und  $\Delta$ GSPIIABC, denen jeweils das erste, die ersten beiden oder alle c-di-GMP-Bindemotive fehlen.

Desweiteren sollen zukünftig Punktmutationen in PilF eingefügt werden, bei denen gezielt einzelne, konservierte Aminosäuren der Bindemotive ausgetauscht werden. Bei Studien an MshE aus *V. cholerae* führten Mutationen der konservierten Aminosäuren Arg, Leu oder Gly zu Be-

ginn des Motives zu reduzierten c-di-GMP-Affinitäten der Motor-ATPase. Mutanten, die diese MshE-Varianten bildeten, zeigten reduzierte Pilierung und reduzierte oder keine Biofilmbildung (Wang *et al.* 2016; Roelofs *et al.* 2015). *T. thermophilus* PilF-Varianten, die Punktmutationen in einem oder mehreren c-di-GMP-Bindemotiven aufweisen, könnten zum einen daraufhin untersucht werden, ob sie den Sekundärbotenstoff weiterhin binden, zum anderen könnte ihre Komplexbildung und -Stabilität untersucht werden. Dies könnte zeigen, ob die c-di-GMP-Bindung die Komplexstruktur stabilisiert bzw. die Komplexassemblierung ermöglicht. Auch die ATPase-Aktivität von PilF-Varianten mit Defekten in der c-di-GMP-Bindung könnte analysiert werden. Allerdings ist dabei zu erwarten, dass sie nicht durch die Mutationen beeinflusst wird, da die PilF $\Delta$ GSPIIABC-Variante trotz fehlender N-terminaler c-di-GMP-Bindedomänen weiterhin Wildtyp-artige ATP-Hydrolyse zeigt (Kruse *et al.* 2018).

Neben diesen beschriebenen PilF-Varianten sollten auch Peptide analysiert werden, die jeweils nur die c-di-GMP-Bindedomänen, einzeln oder als Kombinationen, enthalten. Solche kürzeren Proteine ließen sich einfacher mittels ITC untersuchen und könnten ein genaueres Bild über die kooperative c-di-GMP-Bindung an die einzelnen Domänen liefern. Zudem könnten die Strukturen dieser Domänen in An- oder Abwesenheit von c-di-GMP mittels Röntgenkristallstrukturanalysen aufgeklärt werden, vorausgesetzt die Peptide bilden stabile, nicht zu flexible Faltungen. Zukünftige Analysen werden also zeigen, wie PilF aus *T. thermophilus* c-di-GMP bindet und Hinweise darauf geben, welche Rolle diese Ligandenbindung *in vivo* spielt.

## 4.4 Die Funktionen der Pilin-ähnlichen Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der Präpilin-ähnlichen Proteine TTC1836, TTC1842, TTP0075, TTP0076, TTP0077 und TTC1651 durch Mutantenstudien untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Proteine mit Ausnahme von TTC1651 und TTP0076 für die „twitching motility“ von *T. thermophilus* benötigt werden. Bei der Adhäsion an Plastikoberflächen spielen die Präpiline mit Ausnahme von TTC1842 und TTP0076 eine Rolle. Da für beide Prozesse T4P benötigt werden, stellt sich die Frage, ob die Präpilin-Mutanten in der Lage sind, Pili zu assemblieren. Für *T. thermophilus*-Stämme mit Mutationen in den Genen *TTC1836*, *TTP0075*, *TTP0076* und *TTP0077* wurde bereits durch EM-Analysen gezeigt, dass sie T4P bilden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass TTC1836, TTP0075 und TTP0077 nicht essentiell für die T4P-Biogenese sind, aber einen Einfluss auf die Funktionalität der Pili haben.

### 4.4.1 Funktion der Pilin-ähnlichen Proteine in dicken und dünnen Pili

Für die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Mutanten  $\Delta TTC1842::bleo$  und  $\Delta TTC1651::bleo$  liegen noch keine vergleichbaren EM-Analysen der Pilierung der Zellen vor. Allerdings wurden abgescherte Pili elektronenmikroskopisch untersucht. Die Analyse von Präparationen von *T. thermophilus* HB27 Wildtyp-Zellen zeigte dabei zwei unterschiedlich dicke Formen von T4P (persönliche Kommunikation, V. Gold, University of Exeter). Es lagen etwa 96 % dickere (~ 6 nm) und etwa 4 % dünnere (~ 3,5 nm) Pili vor, wenn die *T. thermophilus*-Zellen bei 68 °C kultiviert wurden.

Die abgescherten Pili der  $\Delta TTC1842::bleo$ -Mutante waren vergleichbar mit denen des Wildtyps (94 % dicke Pili) (persönliche Kommunikation, V. Gold, University of Exeter). Dies stimmt mit dem Befund überein, dass diese Mutante weiterhin zur Adhäsion in der Lage ist (Abb. 3.9). Im Gegensatz dazu konnten in den Präparationen der  $\Delta TTC1651::bleo$ -Mutante, die bei 68 °C kultiviert wurde, keine T4P-Strukturen detektiert werden. Allerdings traten in Präparationen, für die  $\Delta TTC1651::bleo$  bei 58 °C kultiviert wurde, beide T4P-Formen auf. Dies deutet darauf hin, dass TTC1651 nicht essentiell für die T4P-Biogenese ist, aber bei der (Thermo-)Stabilität der Pili eine Rolle spielt. *In vivo* scheinen diese Pili allerdings stabil genug zu sein, um zur „twitching motility“ genutzt zu werden (Abb. 3.8).

Die dünnen T4P waren bisher unbekannt und ihre Funktion ist ungeklärt. Interessanterweise weisen die Mutanten  $\Delta TTP0075::bleo$ ,  $\Delta TTP0076::bleo$  und  $TTP0077::km$  keine und *TTC1836::km* kaum (1 % bei 58 °C) dünne Pili auf. Da  $\Delta TTP0076::bleo$  sowohl Adhäsion als auch „twitching motility“ zeigt und da alle vier Mutanten natürlich transformierbar sind, scheinen die dünnen Pili für keine dieser Funktionen essentiell zu sein. Die Analyse der dünnen T4P wird im Fokus zukünftiger Arbeiten stehen. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass das Abscheren der Pili bestimmte Formen begünstigen könnte und dass mit dieser Methode keine Aussage über die Gesamtzahl der Pili getroffen werden kann. Erst die Kombination mit EM-

Analysen der ganzen Zellen und funktionalen Untersuchungen werden Aufschluss über die unterschiedlichen T4P-Formen geben.

#### 4.4.2 Rolle Präpilin-ähnlicher Proteine bei der natürlichen Transformation und der Funktionalität der T4P

Durch die Analysen der Präpilin-Mutanten in dieser und in vorausgegangenen Arbeiten (Friedrich *et al.* 2003) konnten den Präpilin-ähnlichen Proteinen verschiedene Rollen in *T. thermophilus* zugewiesen werden (siehe auch Tab. 3.2): PilA1, PilA2 und PilA3 sind essentiell für die natürliche Transformation, TTC1836, TTP0075 und TTP0077 sind essentiell für die Adhäsion und „twitching motility“, TTC1842 ist notwendig für die „twitching motility“ und TTC1651 für die Adhäsion.

Es wird deutlich, dass einige der Präpilin-ähnlichen Proteine ausschließlich eine Rolle bei der natürlichen Transformation spielen, während andere nur bei T4P-vermittelten Funktionen eine Rolle spielen. In Übereinstimmung damit weisen auch die Piline ComP, PilV und PilX aus *N. meningitidis* solche dedizierte Funktionen bei der Kompetenz, Aggregation, Adhäsion und „twitching motility“ auf (Brown *et al.* 2010).

#### Mögliche Funktionsweise von PilA1, PilA2 und PilA3

PilA1, PilA2 und PilA3 aus *T. thermophilus* sind essentiell für die natürliche Transformation (Friedrich *et al.* 2003), wobei eine  $\Delta pilA1-3$ -Deletionsmutante eine mit dem Wildtyp vergleichbare DNA-Bindung zeigt und eine reduzierte Aufnahme der DNA in einen DNase-resistenten Zustand (Schwarzenlander *et al.* 2009). Dies deutet darauf hin, dass PilA1, 2 und 3 in den Transport der DNA durch die äußere Membran involviert sind.

PilA1, PilA2 und PilA3 aus *T. thermophilus* spielen keine Rolle bei der T4P-Biogenese (Friedrich *et al.* 2003). Dies ist vergleichbar mit dem Nebenspilin ComP aus *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis*, welches ebenfalls essentiell für die natürliche Transformation ist, aber nicht für die T4P-Assemblierung (Wolfgang *et al.* 1999; Brown *et al.* 2010). Die natürliche Transformation von *T. thermophilus* und von Neisserien unterscheiden sich allerdings in einigen Punkten. So wird für die DNA-Aufnahme in *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* ein retraktierbarer T4P benötigt und die DNA-Aufnahme in Neisserien erfolgt sequenzspezifisch, wobei DNA, die durch eine DUS („DNA uptake sequence“) als Art-spezifisch gekennzeichnet ist, bevorzugt aufgenommen wird (Wolfgang *et al.* 1999; Goodman und Scocca 1988; Berry *et al.* 2016). ComP wurde in Pilus-Präparationen von *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* detektiert (Aas *et al.* 2002a; Brown *et al.* 2010), wohingegen PilA1, PilA2 und PilA3 nicht in abgescherten Pili von *T. thermophilus* detektiert werden konnten (persönliche Kommunikation, J. Langer, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.). Sowohl für ComP aus *N. meningitidis*, als auch aus *Neisseria subflava* konnte gezeigt werden, dass diese Piline direkte DNA-Rezeptoren sind (Berry *et al.* 2016; Cehovin *et al.* 2013). Für PilA1, PilA2 und PilA3 aus *T. thermophilus* wurde die DNA-Bindung noch nicht untersucht.

### Die Nebenpiline könnten einen Assemblierungskern an der Spitze des Pilus bilden

Bisher erwies sich keines der Nebenpiline aus *T. thermophilus* als essentiell für die Assemblierung der T4P. Einige Nebenpiline in anderen Bakterien, wie z. B. FimU, PilV, PilW, PilX und PilE aus *P. aeruginosa* oder TcpB aus *V. cholerae* sind dagegen notwendig für die Assemblierung stabiler, Oberflächen-exponierter T4P (Giltner *et al.* 2010; Ng *et al.* 2016). Eine Hypothese ist, dass diese Nebenpiline einen Assemblierungskomplex, auch Assemblierungskern genannt, bilden, an den weitere Piline binden, so dass die Nebenpiline schließlich die Spitze des T4P bilden (Burrows 2012). Dies wurde sowohl für TcpB aus *V. cholerae*, PpdAB, YgdB und PpdC aus *E. coli* (Ng *et al.* 2016; Cisneros *et al.* 2012b), als auch für die Nebenpiline GspK, GspI und GspJ aus enterotoxischem *E. coli* (ETEC) vorgeschlagen (Korotkov und Hol 2008). Letztere bilden dabei einen Komplex an der Spitze des Pseudopilus des T2SS. Cisneros *et al.* (2012b) koproduzierten die Nebenpiline PulH, PulI, PulJ und PulK des *Klebsiella oxytoca* T2SS heterolog in *E. coli*. Dadurch wird die Assemblierung des *E. coli*-Hauptpilins PpdD zu einem T4P ermöglicht. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die Nebenpiline einen Assemblierungskern bilden.

### Mögliche Funktion von TTC1836, TTP0075 und TTP0077

Die Nebenpiline aus *T. thermophilus* HB27 sind zwar nicht essentiell für die T4P-Assemblierung, aber die Mutanten  $\Delta TTP0075-0077$  und  $TTC1836::km$  bilden keine oder kaum dünne Piline (persönliche Kommunikation, V. Gold, University of Exeter). Diese Nebenpiline könnten also Teil eines Assemblierungskerns sein, der die Assemblierung der dünnen Pili einleitet, die wiederum bei der Adhäsion und „twitching motility“ eine Rolle spielen.

### Mögliche Funktion von TTC1842

Durch Mutantenstudien konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TTC1842 wichtig für die „twitching motility“ von *T. thermophilus* ist, aber nicht für die Adhäsion an Plastikoberflächen notwendig ist. Dies führt zu der Vermutung, dass TTC1842 regulatorisch auf die Pilusdynamik einwirkt. Für das T2SS aus *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass das Nebenpilin XcpX die Länge des Pseudopilus reguliert, wobei das Verhältnis von XcpX zum Hauptpilin XcpT ausschlaggebend ist (Durand *et al.* 2005). Durand *et. al* stellten die Hypothese auf, dass XcpX die Deassemblierung der Piline auslöst oder fördert. Eine ähnliche Funktion wird auch dem Nebenpilin PapH des Pap-Pilus von *E. coli* zugesprochen (Båga *et al.* 1987).

Falls TTC1842 die Retraktion der T4P von *T. thermophilus* einleitet, könnte die Deletion von *TTC1842* zu dem beobachteten Defekt in der „twitching motility“ führen, da die koordinierte Pilus-Retraktion notwendig für die Bewegung auf festen Oberflächen ist. In zukünftigen Untersuchungen sollte deshalb analysiert werden, ob die  $\Delta TTC1842::bleo$ -Mutante eine erhöhte Zahl an T4P oder besonders lange T4P aufweist. Außerdem könnten die Mengenverhältnisse von Pila4 und den Nebenpilinen verändert werden, um die Auswirkungen auf die Pilus-Länge und

-Dynamik zu untersuchen. Dafür wäre allerdings ein regulierbares Expressionssystem für *T. thermophilus* nötig.

### Mögliche Funktion von TTC1651

Das Protein TTC1651 wurde in Pilus-Präparationen von *T. thermophilus* detektiert (persönliche Kommunikation, J. Langer, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M). TTC1651 trägt nicht die konservierte Aminosäure G<sub>-1</sub> des Klasse-III-Signalpeptids und enthält nur wenige hydrophobe Aminosäuren innerhalb des N-terminalen Bereiches (13 hydrophobe Aminosäuren innerhalb der ersten 30 Aminosäuren). Da beim Abscheren der T4P auch andere, extrazelluläre Proteine angereichert werden, ist bisher unklar, ob TTC1651 tatsächlich Teil des T4P ist. Auf eine Assoziation von TTC1651 mit dem T4P weisen jedoch die Tatsachen hin, dass eine  $\Delta$ TTC1651::bleo-Mutante defekt in der Adhäsion ist und dass die relative Menge von TTC1651 in Pilus-Präparationen erhöht ist, wenn die Zellanzucht bei 58 °C erfolgte, was bei den anderen Nebencilinen ebenfalls der Fall war (persönliche Kommunikation V. Gold, University of Exeter).

Da TTC1651, wie in dieser Arbeit gezeigt, eine Rolle bei der Adhäsion spielt, könnte es sich um ein Adhäsine handeln. Bakterielle Adhäsine sind Proteine an der Zellaußenseite, die an Oberflächen oder Wirtszellen anhaften (Soto und Hultgren 1999; Berne *et al.* 2015). Piline können selber Adhäsine sein, (Berne *et al.* 2015; Piepenbrink und Sundberg 2016), daneben sind auch andere Adhäsine bekannt, wie z. B. PilC aus *Neisseria*-Spezies oder PilY1 aus *P. aeruginosa* und *Legionella pneumophila* (Rudel *et al.* 1995; Scheuerpflug *et al.* 1999; Alm *et al.* 1996b; Hoppe *et al.* 2017). Diese Proteine haben Größen von 1000 bis 1200 Aminosäuren und sind an T4P gebunden. PilY1 aus *P. aeruginosa* wird dabei durch die Nebenciline PilV, PilW und PilX mit dem T4P verbunden. Es ist denkbar, dass TTC1651 aus *T. thermophilus* ein Adhäsine ist oder ein Kupplungsprotein, welches ein bisher unbekanntes Adhäsine mit dem T4P verknüpft und so zur Adhäsion an Plastikoberflächen beiträgt. Um genauere Informationen über die Funktion von TTC1651 zu erhalten, müsste zunächst geklärt werden, wo dieses Protein lokalisiert ist und ob es in oder am T4P gebunden ist. Außerdem sollte TTC1651 erneut sequenziert werden, um zu überprüfen, ob das G<sub>-1</sub>[F/L/V/I/M]<sub>+1</sub>E<sub>+5</sub>-Motiv des Klasse-III-Signalpeptids eventuell doch vorhanden ist.

### Die Pilin-ähnlichen Proteine könnten im T4P integriert vorliegen

Neben der Lokalisation der Pilin-ähnlichen Proteine an der Spitze des Pilus, ist auch eine Lokalisation an mehreren Stellen entlang des Pilus denkbar (Piepenbrink und Sundberg 2016). Dies wurde z. B. für die Nebenciline FimU, PilV, PilW und PilX aus *P. aeruginosa* und für PilJ aus *Clostridium difficile* gezeigt (Giltner *et al.* 2010; Piepenbrink *et al.* 2014). Der Nachweis erfolgte dabei mit Immunogold-Sekundärantikörpern, die an spezifische Nebencilin-Antikörper binden.

Die Nebenciline aus *T. thermophilus* HB27 könnten ebenfalls in den T4P integriert vorliegen. Um die genaue Lokalisation zu untersuchen, könnten ebenfalls Versuche mit Immunogold-

makierten Antikörpern durchgeführt werden. Da bisher keine spezifischen Antikörper gegen die meisten der Nebenpiline vorliegen, könnten stattdessen *T. thermophilus*-Mutanten erstellt werden, die Nebenpiline mit Protein-Tags bilden. Anschließend könnte die Bindung von Tag-spezifischen Antikörpern an die T4P im Elektronenmikroskop untersucht werden.

#### 4.4.3 Mögliche Funktion von ComZ im Pseudopilus des DNA-Translokators

Das Gen *comZ* befindet sich im Genom von *T. thermophilus* direkt stromabwärts der Gene *pilA1*, *pilA2* und *pilA3* und ist, ebenso wie diese, essentiell für die natürliche Transformation, aber nicht für die T4P-Biogenese (Friedrich *et al.* 2003). Der N-Terminus von ComZ ist der Präpilin-Signalsequenz ähnlich. Die Präpilin-Signalsequenz zeichnet sich durch einen kurzen, positiv geladenen, N-terminalen Bereich aus, auf den die konservierten Aminosäuren  $G_{-1}[F/L/V/I/M]_{+1}E_{+5}$  und ein ~ 20 Aminosäuren langer hydrophober Bereich folgen (Hobbs und Mattick 1993; Strom und Lory 1993). Zwischen den Aminosäuren  $G_{-1}$  und  $F_{+1}$  schneidet die Präpilinpeptidase. Der N-Terminus von ComZ aus *T. thermophilus* beginnt mit den Aminosäuren  $M_{-5}N_{-4}A_{-3}K_{-2}G_{-1}I_{+1}A_{+2}L_{+3}V_{+4}A_{+5}$  gefolgt von einem etwa 17 Aminosäuren langen, hydrophoben Bereich (Abb. 3.2). Somit weist ComZ einige der Charakteristika eines Präpilins auf. Dennoch handelt es sich um kein typisches Präpilin, da das  $E_{+5}$  der Präpilin-Signalsequenz durch ein Alanin ( $A_{+5}$ ) ausgetauscht ist und da ComZ mit 554 Aminosäuren wesentlich größer ist als typische Präpiline. Allerdings gibt es durchaus Präpilin-ähnliche Proteine, für die beschrieben wurde, dass sie ebenfalls kein  $E_{+5}$  aufweisen. Diese Proteine werden dennoch durch die Präpilinpeptidase prozessiert, können aber nicht in den wachsenden Pilus integriert werden. Dies ist z. B. der Fall bei den Pilin-ähnlichen Proteinen GspK, PulK und XcpX der T2SS von ETEC, *K. oxytoca* bzw. *P. aeruginosa* und bei PilK des T4P von *C. difficile* (Korotkov und Hol 2008; Cisneros *et al.* 2012a; Durand *et al.* 2005; Maldarelli *et al.* 2014). Diese Proteine sind, in Übereinstimmung mit CofB und LngB des CFA/III bzw. des Longus-Pilus (beides T4P) von ETEC (Kolappan *et al.* 2015) und mit ComZ aus *T. thermophilus*, ebenfalls deutlich größer als die Hauptpiline der entsprechenden Systeme (GspK: 327 Aminosäuren, PulK: 326, XcpX: 333, PilK: 500, CofB: 518, LngB: 523, ComZ: 554).

Es wird vermutet, dass das  $E_{+5}$  eines Pilins eine Salzbrücke mit dem  $F_{+1}$  des zuvor in den Pilus eingebauten Pilins bildet (Craig *et al.* 2006; Bleves *et al.* 1998). Wenn diese Interaktion essentiell für die Assemblierung oder Stabilität des T4P ist, würde der Austausch des  $E_{+5}$  den Pilin-Einbau in den wachsenden Pilus verhindern. Deshalb ist es gut möglich, dass die Piline, die kein  $E_{+5}$  aufweisen, an der Spitze des T4P oder Pseudopilus lokalisiert sind. Dort würde auch die Größe der Pilin-Kopfdomäne eine untergeordnete Rolle spielen.

Auch für ComZ ist denkbar, dass es die Spitze eines Pseudopilus bildet, der spezifisch für den DNA-Translokator ist. Dabei würde die Größe und das fehlende  $E_{+5}$  zu keinen sterischen Hindernissen bei der Assemblierung führen, da keine Piline „oberhalb“ von ComZ lokalisiert wären. Die Analyse der Größe von ComZ-Komplexen in dieser Arbeit hat gezeigt, dass aus *T. thermophilus* isoliertes ComZ-His<sub>9</sub> Tetramere bildet. Der große, tetramere ComZ-Komplex (~ 232 kDa) könnte sich an der Pseudopilus-Spitze befinden. Dies würde vermutlich zu einer

Blockade der Pore in der äußeren Membran führen. Es ist aber wahrscheinlich, dass ComZ *in vivo* keine Homo-Tetramere bildet. Darauf weist die Western Blot-Analyse von *T. thermophilus*-Membranen in dieser Arbeit hin, in der ComZ-haltige Komplexe der Größen ~ 159 und ~ 206 kDa detektiert wurden. Es ist möglich, dass ComZ *in vivo* mit anderen Pilinen interagiert, so wie es z. B. für den GspK-GspI-GspJ-Komplex und den PulK-PulI-PulJ-Komplex der T2SS aus ETEC bzw. *K. oxytoca* gezeigt wurde (Korotkov und Hol 2008; Cisneros *et al.* 2012a). Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren kann ComZ aus *T. thermophilus* aufgereinigt werden, um zu untersuchen, ob und in welchem Verhältnis es mit anderen Pilinen interagiert. Auch könnte analysiert werden, ob ComZ DNA bindet und auf diese Weise zur natürlichen Transformation beiträgt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Deletion von *comZ* kaum Auswirkungen auf die „twitching motility“ von *T. thermophilus* hat. Allerdings zeigte die mit pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> komplementierte Mutante keine „twitching motility“. Der Grund dafür könnte der His<sub>9</sub>-Tag sein, der möglicherweise die Dynamik des T4P beeinträchtigt. Um dies zu überprüfen, sollte eine *comZ*-Komplementante erstellt werden, in der *comZ* ohne Tag exprimiert wird. Ein weiterer Grund könnte eine erhöhte *comZ*-Expression durch den konstitutiven *bcI*-Promotor des pDM12-Plasmides sein, die, ähnlich wie die Überexpression von *xcpX* in *P. aeruginosa*, zu einer verminderten Pilus-Assemblierung führen könnte (Durand *et al.* 2005). Zwar war keine deutlich erhöhte ComZ-Menge im SDS-Gel oder Western Blot sichtbar, aber es ist bekannt, dass bereits geringe Änderungen der Stöchiometrie von T4P-Proteinen einen starken Einfluss auf die Funktionalität des Systems haben können (Alm und Mattick 1995; Alm *et al.* 1996b). Durch EM-Analysen der mit *comZ*-His<sub>9</sub> komplementierten Mutante könnte überprüft werden, ob diese eine veränderte Pilierung aufweist.

Da die Erhöhung der XcpX-Menge im Vergleich zum Hauptpilin des T2SS von *P. aeruginosa* zu verkürzten Pseudopili führte, vermuteten Durand *et al.* (2005), dass XcpX an der Basis des Pseudopilus lokalisiert ist und dass der Einbau dieses großen Pilin-ähnlichen Proteins zum Abbruch der Elongation oder Destabilisierung des Pseudopilus führt. Neben einer Lokalisation von ComZ an der Spitze eines DNA-Translokator-spezifischen Pseudopilus, ist also auch eine Lokalisation an der Basis denkbar. In beiden Fällen würde der Einbau von ComZ in Konkurrenz zur Ausbildung Oberflächen-exponierter T4P stehen. Dies würde erklären, warum die konstitutive *comZ*-Expression *in trans* die „twitching motility“ beeinträchtigt, während die Deletion von *comZ* keinen Einfluss auf die T4P-Funktionen hat, sondern nur auf die Transformierbarkeit.

### **Zukünftige Analysen an ComZ**

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass gereinigtes ComZ-His<sub>9</sub> Komplexe mit einer molekularen Masse von etwa 232 kDa bilden, eignen sich die isolierten Proteine prinzipiell auch für Strukturuntersuchungen mittels Einzelpartikel-EM (persönliche Kommunikation Edoardo D'Imprima, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.). Bei ersten Versuchen waren jedoch Verunreinigungen als Hintergrund sichtbar, so dass keine einzelnen Proteinkomplexe deutlich wurden. Hier müsste das Reinigungsprotokoll also erweitert und optimiert werden.

---

Durch Western Blot-Analysen der subzellulären Zellfraktionen unterschiedlicher *T. thermophilus*-Mutanten mit Mutationen in den Kompetenzgenen könnte gezeigt werden, ob sich diese Mutationen auf die Lokalisation und Menge von ComZ auswirken. Dies könnte Hinweise auf die Interaktionen von ComZ mit anderen Komponenten des DNA-Translokators liefern.

## 4.5 Konkurrenz des DNA-Translokators und der T4P von *T. thermophilus* um Komponenten mit dualer Funktion

In dieser und in früheren Arbeiten konnten mehrere Hinweise darauf gewonnen werden, dass es sich bei dem DNA-Translokator und dem T4P von *T. thermophilus* um unterschiedliche Systeme handelt, die unabhängig voneinander funktionieren können, auch wenn viele der Proteinkomponenten duale Rollen in beiden Systemen spielen, wie z. B. PilM, PilN, PilO, PilW, PilQ, PilF, PilC, PilD und PilA4.

Eine *T. thermophilus*-Mutante, deren Retraktions-ATPasen, PilT1 und PilT2, mutiert waren und die keine T4P-Retraktion zeigte, war dennoch natürlich transformierbar (Salzer *et al.* 2014b), was zeigt, dass die Dynamik der T4P nicht essentiell für die DNA-Aufnahme ist. Außerdem konnten *T. thermophilus*-Mutanten erstellt werden, die nur wenige Pilus-Strukturen bildeten, aber dennoch natürlich transformierbar waren. Bei diesen Mutanten waren jeweils einzelne Ring-Domänen des PilQ-Sekretin-Komplexes deletiert, woraus geschlossen werden konnte, dass diese einzelnen Domänen nicht essenziell für die natürliche Transformation sind (Burkhardt *et al.* 2012; Salzer *et al.* 2016a). In Kapitel 3.2 dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Expression von *comZ-His<sub>9</sub>* *in trans* zu einem Defekt in der „twitching motility“ führt, aber eine Wildtyp-ähnliche natürliche Transformation erlaubt. Auch dies stimmt mit dem Schluss überein, dass keine voll funktionalen T4P für die DNA-Aufnahme benötigt werden.

Desweiteren konnte Ralf Salzer eine Reihe von *pilF*-Mutanten erstellen, die keine oder nur sehr wenige T4P aufweisen, die aber dennoch transformierbar sind (Salzer *et al.* 2014a). In diesen Mutanten sind Cysteine des Tetracysteinmotifs von PilF gegen Alanine ausgetauscht, was zu einer geringeren Zinkionen-Bindung an PilF führt. Interessanterweise zeigte die Mutante *pilFC4A*, in der das C819 durch ein Alanin ausgetauscht war, mit einer Transformationsfrequenz von  $9,8 \times 10^{-1}$  Transformanden/Lebendzellzahl eine Hypertransformierbarkeit, wies aber keine Pili auf. Diese Ergebnisse zeigt eindeutig, dass die Oberflächen-exponierten T4P-Strukturen nicht für die Transformation benötigt werden.

Auch die in dieser Arbeit verwendete Mutante *pilFΔGSPiIC* weist nur sehr wenige T4P und keine „twitching motility“ auf, ist aber hypertransformierbar (Kruse *et al.* 2018). Interessant ist, dass PilFΔGSPiIC nicht durch die Interaktion mit PilMN stimuliert wird, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Die PilMN-vermittelte Stimulation von PilF scheint also keine essentielle Rolle bei der natürlichen Transformation zu spielen. Interessanterweise scheint die GSPiIC-Domäne die natürliche Transformation zu hemmen, da die Deletion der Domäne zu einer gesteigerten Transformierbarkeit führte, auf der anderen Seite ermöglicht die GSPiIC-Domäne die natürliche Transformation, wenn die GSPiIA und GSPiIB-Domänen deletiert wurden (Kruse *et al.* 2018).

Wie ist dies zu erklären? Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen an PilFΔGSPiIABC mittels Gelfiltration und nativer PAGE weisen darauf hin, dass diese Variante im Gegensatz zu PilFΔGSPiIC sehr instabile Komplexe bildet. Dies indiziert, dass die GSPiIC-Domäne eine Rolle bei der Stabilität der PilF-Komplexe spielt. Das könnte sowohl Auswirkungen auf die

T4P-Assemblierung als auch auf die natürliche Transformation haben. Dass die Deletion von GSPIIC zur Hypertransformierbarkeit von *T. thermophilus* führt, könnte dadurch erklärt werden, dass der DNA-Translokator und der T4P in Konkurrenz um Komplex-Komponenten wie PilF stehen, was in Kapitel 4.5.2 diskutiert wird. Dieser Hypothese folgend könnte PilFΔGSPIIC möglicherweise nicht mehr funktional bei der T4P-Assemblierung sein und stünde deshalb im höheren Maße für den DNA-Translokator zur Verfügung, weshalb die Transformierbarkeit steigt.

Während bei *T. thermophilus* die T4P-Struktur keine Rolle bei der DNA-Aufnahme spielt, gibt es bei anderen natürlich transformierbaren Bakterien Hinweise darauf, dass die Oberflächen-exponierten T4P DNA binden und bei der Retraktion die DNA in das Periplasma transportieren. Für *N. gonorrhoeae* und *V. cholerae* konnte z. B. die Bindung der DNA an den Pilus nachgewiesen werden (Aas *et al.* 2002b; Seitz und Blokesch 2013). Für *P. stutzeri*, *Synechocystis* sp. Stamm PCC 6803 und *Acinetobacter baumannii* konnte gezeigt werden, dass für die natürliche Transformation die T4P-Retraktions-ATPase benötigt wird, woraus geschlossen wurde, dass die DNA-Aufnahme vermutlich an die T4P-Retraktion gekoppelt ist (Nakasugi *et al.* 2006; Graupner *et al.* 2001; Wilharm *et al.* 2013). Der DNA-Translokator und der T4P lassen sich also nicht immer voneinander abgrenzen und die Art, wie DNA während der natürlichen Transformation aufgenommen wird, weicht in verschiedenen kompetenten, Gram-negativen Bakterien von der DNA-Aufnahme in *T. thermophilus* ab.

#### 4.5.1 Vergleich des DNA-Translokators mit dem T4P

Die Analysen des DNA-Translokators und des T4P in *T. thermophilus* haben zu den in Abbildung 4.3 gezeigten Modellen des DNA-Translokators (Abb. 4.3 A) und des T4P (Abb. 4.3 B) geführt, wobei die Unterschiede der beiden Systeme hervorgehoben werden.

##### DNA-Translokator-spezifische Komponenten

Proteine, die Teil des DNA-Translokators sind, aber (vermutlich) nicht für die Assemblierung und Funktionen der T4P benötigt werden sind:

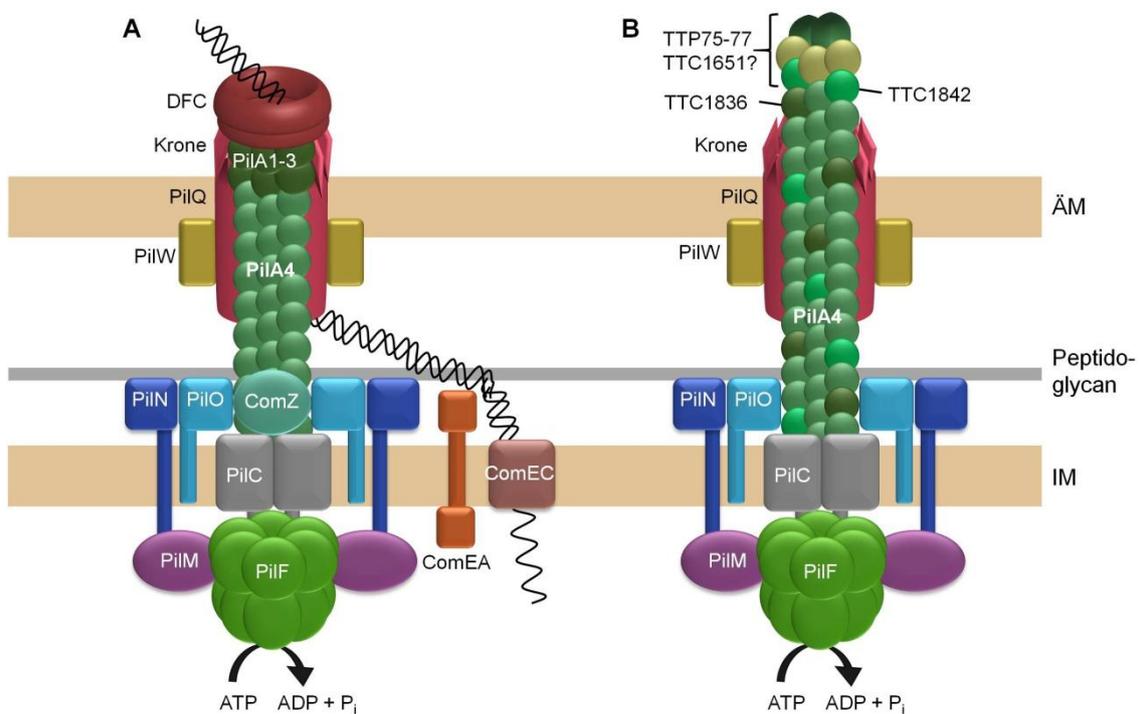
ComEA und ComEC - Diese Proteine sind charakteristisch für natürlich kompetente Gram-negative und Gram-positive Organismen. Sie sind nicht an der Assemblierung des Pilus oder Pseudopilus beteiligt, sondern am Transport aufgenommener DNA im Periplasma und durch die innere Membran.

„DNA funneling complex“ (DFC) – In PilQ-Präparationen, die elektronenmikroskopisch untersucht wurden, wiesen etwa 30 % der Partikel zwei zusätzliche Ringstrukturen oberhalb der Sekretin-Domäne auf (Drechsler 2015). Durch Koinkubation mit DNA konnte gezeigt werden, dass DNA an diese Ringstrukturen bindet. Es ist unbekannt, welche Proteine diese als DFC bezeichneten Ringstrukturen bilden. Es ist denkbar, dass extrazelluläre DNA zunächst an den DFC bindet und von diesem durch den PilQ-Kanal geleitet wird. Bisher wurde nicht

untersucht, ob der DFC auch bei der T4P-Biogenese eine Rolle spielt. Da aber nur 30 % der gereinigten PilQ-Komplexe einen DFC aufweisen und da dieser DNA bindet, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um einen DNA-Translokator-spezifischen Komplex handelt.

PilA1, 2 und 3 – Diese Pilin-ähnlichen Proteine werden vermutlich in einen Pseudopilus, möglicherweise an dessen Spitze, eingebaut. Sie sind notwendig für die natürliche Transformation und es könnte sich um DNA bindende Pseudopilus-Untereinheiten handeln, die direkt am Transport der DNA beteiligt sind.

ComZ – Bei ComZ handelt es sich um ein Präpilin-ähnliches Protein, dass aber aufgrund der fehlenden Aminosäure E<sub>+5</sub> und aufgrund der Größe von 554 Aminosäuren vermutlich nicht in einen wachsenden Pilus integriert werden kann. Es ist jedoch möglich, dass ComZ in die Basis des Pseudopilus eingebaut wird, wo es durch sterische Hinderung die weitere Assemblierung des Pseudopilus verhindert.



**Abb. 4.3. Modell des DNA-Translokators (A) und des T4P (B) aus *T. thermophilus* HB27.** Beide Multiproteinkomplexe durchspannen die innere (IM) und äußere Membran (ÄM) sowie die Peptidoglycanschicht. Proteine, die eine duale Rolle in beiden Komplexen spielen sind: Die Motor-ATPase PilF, PilM, PilN, PilO, PilC, das Hauptpilin PilA4, PilW und das Sekretin PilQ mit „Kronen“-Struktur. Die Funktion und die Zusammensetzung der „Krone“ sind bisher unbekannt. DNA-Translokator-spezifische Komponenten sind: ComEA, ComEC, ComZ, PilA1, PilA2, PilA3 und der „DNA funnelling Complex“ (DFC). Bei letzterem handelt es sich um bisher unbekannte Proteine, die DNA und den PilQ-Komplex binden. Die Nebepiline PilA1, 2 und 3 könnten in der Spitze des Pseudopilus integriert und an der Weiterleitung der DNA beteiligt sein. ComZ könnte als Präpilin-ähnliches Protein in den Pseudopilus integriert werden und eine weitere Pilus-Assemblierung verhindern. Proteine, die spezifisch für den T4P und dessen Funktionen sind, sind die Präpilin-ähnliche Proteine TTP0075, TTP0076, TTP0077, TTC1836, TTC1842 und TTC1651. Diese Proteine sind vermutlich Bestandteile des T4P, entweder an dessen Spitze oder über die Länge verteilt.

### T4P-spezifische Komponenten

Proteine, die nicht für die natürliche Transformation benötigt werden, die aber bei der Assemblierung und/oder den Funktionen der T4P eine Rolle spielen sind:

PilT1 und PilT2 (nicht in Abb. 4.3 dargestellt) – Als Retraktions-ATPasen werden sie für die Deassemblierung der T4P während der Bewegung auf festen Oberflächen benötigt.

TTP0075, TTP0076 und TTP0077 – Diese Pilin-ähnlichen Proteine könnten einen Komplex an der Spitze von dünnen T4P bilden, der die Pilus-Assemblierung einleitet. TTP0075 und TTP0077 sind essentiell für die „twitching motility“ und die Adhäsion an Plastikoberflächen.

TTC1651 – Dieses Protein weist keine klassische Präpilinpeptidase-Erkennungssequenz auf, könnte aber trotzdem im T4P gebunden sein. Da TTC1651 für die Adhäsion von *T. thermophilus* an Plastik benötigt wird, könnte es als Adhäsion an der Spitze des T4P fungieren oder dort ein bisher unbekanntes Adhäsion binden.

TTC1836 – Dieses Pilin-ähnliche Protein ist vermutlich an der Bildung dünner T4P beteiligt und wird für die „twitching motility“ und die Adhäsion benötigt. Da die relative Menge von TTC1836 in Pilus-Präparationen deutlich höher ist als die von TTP0075, 0076 und 0077 (persönliche Kommunikation, J. Langer, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.), liegt die Vermutung nahe, dass TTC1836 an mehreren Positionen im T4P lokalisiert ist.

TTC1842 – Hierbei handelt es sich um ein Pilin-ähnliches Protein mit spezifischer Funktion bei der „twitching motility“. Möglicherweise reguliert TTC1842 die Retraktion der T4P oder leitet ein Retraktions-Signal weiter.

Die in Abbildung 4.3 dargestellten Komponenten PilF, PilM, PilN, PilO, PilC, PilA4, PilW und PilQ (mit „Krone“) sind sowohl für die natürliche Transformation, als auch für die T4P-Assemblierung und T4P-vermittelten Funktionen wichtig. Hier stellt sich die Frage, wie reguliert wird, ob die Proteine einen DNA-Translokator oder einen T4P-Assemblierungsapparat bilden. Zukünftige Untersuchungen der Gene und Proteine, die nur spezifisch für eines der Systeme benötigt werden, werden Aufschluss darüber geben.

#### 4.5.2 Konkurrenz zwischen T4P und DNA-Translokator

Wenn es sich beim DNA-Translokator und dem T4P, wie oben beschrieben, um voneinander abzugrenzende Systeme handelt, dann stehen diese in Konkurrenz zueinander um die Komponenten, die eine duale Rolle in beiden Systemen spielen.

##### **Bestimmte Mutationen in *pilF* haben einen gegensätzlichen Einfluss auf natürliche Transformation und T4P-Assemblierung**

Auf eine Konkurrenz zwischen DNA-Translokator und T4P deuten der Phänotyp der *pilF*-Mutanten *pilFC4A* und *pilFΔGSPiIC* hin, die jeweils Defekte in der Pilierung, aber eine stark erhöhte Transformierbarkeit aufweisen (Salzer *et al.* 2014a; Kruse *et al.* 2018). Hierbei scheint die jeweilige Mutation in *pilF* dazu zu führen, dass die ATPase nicht für die Pilus-Assemblierung genutzt werden kann, dies hat aber keinen negativen Einfluss auf die DNA-Aufnahme. Durch die defekte Pilus-Assemblierung könnten mehr PilF-Komplexe für den DNA-Translokator zur Verfügung stehen, was zu der beobachteten Hypertransformierbarkeit führen könnte. Im Fall der PilFΔGSPiIC-Variante konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die GSPiIC-Domäne notwendig für die Stimulierung von PilF durch PilMN ist. Ohne diese Stimulierung ist die ATPase-Aktivität eventuell nicht stark genug, um die Assemblierung langer T4P voranzutreiben und der Retraktion entgegenzuwirken, für die DNA-Aufnahme ist sie jedoch ausreichend.

##### **Der Zusammenhang zwischen Pilierung und Expression von *pilA1*, 2, 3 und *comZ***

Ein weiterer Hinweis auf die Konkurrenz von DNA-Translokator und T4P bietet die Expression von *pilA1*, *pilA2*, *pilA3* und *comZ* bei 55 °C. Bei dieser Temperatur weist *T. thermophilus* deutlich mehr T4P als bei 68 °C auf und zeigt eine stark erhöhte Adhäsion an Plastikoberflächen (Salzer *et al.* 2014c; Salzer *et al.* 2014a). Analysen des Transkriptoms zeigten, dass bei dieser niedrigeren Temperatur die Expression der DNA-Translokator-spezifischen Gene *pilA1*, *pilA2*, *pilA3* und *comZ* reduziert ist (Kirchner 2018). Möglicherweise wird durch diese Regulation der DNA-Translokator-spezifischen Gene sichergestellt, dass mehr Komponenten mit dualer Funktion für die T4P-Biogenese zur Verfügung stehen, da bei 55 °C scheinbar eine höhere Anzahl an T4P benötigt wird.

Auch die Untersuchungen an der mit pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> komplementierten Δ*comZ*::*bleo*-Mutante im Rahmen dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Expression des DNA-Translokator-spezifischen Gens *comZ* die T4P-Dynamik beeinflusst. Die konstitutive Expression von *comZ*-His<sub>9</sub> unter Kontrolle des *bc1*-Promotors führte zum Verlust der „twitching motility“. Entweder wurde dieser Defekt durch den His<sub>9</sub>-Tag ausgelöst, der aber keinen Einfluss auf die Funktion von ComZ bei der Transformation hatte, oder möglicherweise führte eine leicht erhöhte Menge von ComZ zum Einbau von ComZ-His<sub>9</sub> in T4P-Assemblierungskomplexe und verhinderte dadurch die korrekte Assemblierung oder Deassemblierung der T4P. Da dies

aber nicht zu einer erhöhten Transformationsrate führte, ist anzunehmen, dass ComZ kein limitierender Faktor für die natürliche Transformation ist.

Dies sind erste Hinweise darauf, dass T4P und DNA-Translokatoren um Komponenten mit dualer Funktion in beiden Systemen konkurrieren. Um dies zu überprüfen, müssen Analysen zur Interaktion weiterer Komponenten erfolgen, die Lokalisation der Nebenpiline muss ermittelt werden. Zudem müssen die Funktionen der Komponenten des DNA-Translokators und T4P geklärt werden, sowie die Regulation ihrer Assemblierung.

## 5 Zusammenfassung

- Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gene der Präpilin-ähnlichen Proteine TTC1842, TTC1651, TTP0075 und TTP0076 in *T. thermophilus* deletiert.
- Durch Mutantenstudien wurde die Funktion von sechs Präpilin-ähnlichen Proteinen ermittelt. Die Gene *TTC1842* und *TTP0075*, ebenso wie *TTC1836* und *TTP0077* werden für die kriechende Fortbewegung auf Oberflächen benötigt. Die Gene *TTP0075*, *TTP0077*, *TTC1836*, sowie *TTC1651* werden für die Adhäsion von *T. thermophilus* an Plastikoberflächen benötigt. Keine der hier untersuchten Mutanten,  $\Delta$ *TTC1842::bleo*,  $\Delta$ *TTC1651::bleo*,  $\Delta$ *TTP0075::bleo* und  $\Delta$ *TTP0076::bleo*, zeigte einen Defekt in der natürlichen Transformation.
- Es wurde eine  $\Delta$ *comZ::bleo*-Mutante erstellt, die mit pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> erfolgreich komplementiert werden konnte. Die Deletionsmutante ist nicht natürlich transformierbar, zeigt aber eine T4P-abhängige Bewegung auf Oberflächen und Adhäsion. Die mit pDM12-*comZ*-His<sub>9</sub> komplementierte Mutante weist eine mit dem Wildtyp vergleichbare Transformierbarkeit und Adhäsion, aber keine „twitching motility“ auf.
- Durch Western Blot-Analysen des *T. thermophilus*-Wildtyps und der mit *comZ*-His<sub>9</sub> komplementierten  $\Delta$ *comZ::bleo*-Mutante konnte gezeigt werden, dass ComZ Teil eines Proteinkomplexes in der inneren Membran ist.
- Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein ComZ-His<sub>9</sub>-Komplex mit einer molekularen Masse von ~ 232 kDa aus *T. thermophilus* gereinigt werden. Der gereinigte Proteinkomplex ist Ausgangspunkt für biochemische und strukturelle Analysen von ComZ.
- Es wurden Varianten der Assemblierungs-ATPase PilF erstellt und aufgereinigt, die im Walker A- bzw. im Walker B-Motiv mutiert waren. Die im Walker A-Motiv mutierte Variante PilF<sub>K654A</sub> ist defekt in der ATP-Bindung. Die im katalytischen Glutamat des Walker B-Motivs mutierte Variante PilF<sub>K654A</sub> zeigt keine ATP-Hydrolyse.
- PilF<sub>K654A</sub> und PilF<sub>E718A</sub> bilden hexamere Komplexe. Das Laufverhalten des PilF<sub>K654A</sub>-Komplexes in der nativen PAGE ist etwas langsamer als das des Wildtyp-Komplexes, was auf eine veränderte Form des Komplexes hinweist. PilF<sub>E718A</sub>-Hexamere haben eine im Vergleich zum Wildtyp-Komplex um ~ 2,6 °C erhöhte Thermostabilität.
- Das Lysin 654 im Walker A-Motiv und das katalytische Glutamat 718 im Walker B-Motiv von PilF sind essentiell für die natürliche Transformation, die T4P-Assemblierung und die T4P-abhängige „twitching motility“. Sie spielen zudem eine Rolle bei der Adhäsion an Plastikoberflächen.

- Die Fusionsproteine His<sub>6</sub>-PilM, Strep-PilM, sowie PilN-Strep wurden heterolog in *E. coli* produziert und aufgereinigt. Durch Koproduktion und Koaufrreinigung von His<sub>6</sub>-PilM und PilN-Strep, bzw. His<sub>6</sub>-PilM, PilN und PilO-Strep konnte gezeigt werden, dass PilM und PilN, bzw. PilM, PilN und PilO membrangebundene Komplexe bilden.
- PilF bindet *via* PilM an PilMN- und PilMNO-Komplexe.
- Durch die Interaktion von PilF mit PilMN- und PilMNO-Komplexen wird die ATPase-Aktivität von PilF stimuliert. Es kommt dabei maximal zu einer Verdopplung der Aktivität bei einem molekularen Verhältnis von 1:20 (PilF-Hexamer:PilMN(O)-Komplexen).
- Die GSPII-Domänen im N-Terminus von PilF spielen eine Rolle bei der Bildung stabiler PilF-Hexamere. Zudem ist die GSPIIC-Domäne notwendig für die PilMN-vermittelte Stimulierung der ATPase-Aktivität von PilF. Sie wird allerdings nicht für die Bindung von PilF an PilMN benötigt.
- Die PilF-Varianten PilF<sub>K654A</sub> und PilF<sub>E718A</sub> binden an PilMN-Komplexe. Die ATP-Bindung und -Hydrolyse von PilF sind somit nicht notwendig für die Bindung von PilF an PilMN.
- Lysin 26 in PilM ist konserviert und wird für die ATP-Bindung an PilM benötigt, ist aber nicht notwendig für die PilMN-Komplexbildung oder für die Bindung und Stimulierung von PilF durch PilMN-Komplexe. Die Mutation *pilM*<sub>K26A</sub> hat keinen Einfluss auf die natürliche Transformation oder die „twitching motility“ von *T. thermophilus*.
- PilF aus *T. thermophilus* weist vier potentielle c-di-GMP-Bindemotive (Tandem der Konsensussequenz: RLGxx(L/V/I)(L/V/I)xxG(L/V/I)xxxxLxxxLxxQ) am N-Terminus auf.
- Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PilF zwei Moleküle c-di-GMP bindet. Diese Bindung ist spezifisch für c-di-GMP. Es erfolgt zunächst eine Bindung mit schwächerer Affinität ( $K_{D1} = 7,94 \times 10^{-7}$ ), auf die eine zweite Bindung mit höherer Affinität folgt ( $K_{D2} = 3,86 \times 10^{-8}$ ).

## 6 Literaturverzeichnis

- Aas FE, Lovold C und Koomey M (2002a) An inhibitor of DNA binding and uptake events dictates the proficiency of genetic transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: mechanism of action and links to Type IV pilus expression. *Mol Microbiol* **46**:1441-1450
- Aas FE, Wolfgang M, Frye S, Dunham S, Lovold C und Koomey M (2002b) Competence for natural transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: components of DNA binding and uptake linked to type IV pilus expression. *Mol Microbiol* **46**:749-760
- Aas FE, Egge-Jacobsen W, Winther-Larsen HC, Lovold C, Hitchen PG, Dell A und Koomey M (2006) *Neisseria gonorrhoeae* type IV pili undergo multisite, hierarchical modifications with phosphoethanolamine and phosphocholine requiring an enzyme structurally related to lipopolysaccharide phosphoethanolamine transferases. *J Biol Chem* **281**:27712-27723
- Abendroth J, Murphy P, Sandkvist M, Bagdasarian M und Hol WG (2005) The X-ray structure of the type II secretion system complex formed by the N-terminal domain of EpsE and the cytoplasmic domain of EpsL of *Vibrio cholerae*. *J Mol Biol* **348**:845-855
- Abràmoff MD, Magalhães PJ und Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* **11**:36-42
- Aderhold P (2010) Charakterisierung der AAA-ATPase PilF aus *Thermus thermophilus* HB27. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main
- Alm RA und Mattick JS (1995) Identification of a gene, *pilV*, required for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*, whose product possesses a pre-pilin-like leader sequence. *Mol Microbiol* **16**:485-496
- Alm RA, Boderer AJ, Free PD und Mattick JS (1996a) Identification of a novel gene, *pilZ*, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **178**:46-53
- Alm RA, Hallinan JP, Watson AA und Mattick JS (1996b) Fimbrial biogenesis genes of *Pseudomonas aeruginosa*: *pilW* and *pilX* increase the similarity of type 4 fimbriae to the GSP protein-secretion systems and *pilY1* encodes a gonococcal PilC homologue. *Mol Microbiol* **22**:161-173
- Amikam D und Galperin MY (2005) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**:3-6
- Aravind L, Tatusov RL, Wolf YI, Walker DR und Koonin EV (1998) Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles. *Trends Genet* **14**:442-444
- Arts J, De Groot A, Ball G, Durand E, El Khattabi M, Filloux A, Tommassen J und Koster M (2007) Interaction domains in the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretory apparatus component XcpS (GspF). *Microbiology* **153**:1582-1592
- Auvray F, Ozin AJ, Claret L und Hughes C (2002) Intrinsic membrane targeting of the flagellar export ATPase FliI: interaction with acidic phospholipids and FliH. *J Mol Biol* **318**:941-950
- Averhoff B und Friedrich A (2003) Type IV pili-related natural transformation systems: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria. *Arch Microbiol* **180**:385-393
- Averhoff B (2004) DNA transport and natural transformation in mesophilic and thermophilic bacteria. *J Bioenerg Biomembr* **36**:25-33

- Averhoff B (2009) Shuffling genes around in hot environments: The unique DNA transporter of *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol Rev* **33**:611-626
- Ayers M, Sampaleanu LM, Tammam S, Koo J, Harvey H, Howell PL und Burrows LL (2009) PilM/N/O/P proteins form an inner membrane complex that affects the stability of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin. *J Mol Biol* **394**:128-142
- Babst M, Wendland B, Estepa EJ und Emr SD (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J* **17**:2982-2993
- Båga M, Norgren M und Normark S (1987) Biogenesis of *E. coli* Pap pili: PapH, a minor pilin subunit involved in cell anchoring and length modulation. *Cell* **49**:241-251
- Berne C, Ducret A, Hardy GG und Brun YV (2015) Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbiol Spectr* **3**:MB-0018-2015
- Berry JL und Pelicic V (2015) Exceptionally widespread nanomachines composed of type IV pilins: the prokaryotic Swiss Army knives. *FEMS Microbiol Rev* **39**:134-154
- Berry JL, Xu Y, Ward PN, Lea SM, Matthews SJ und Pelicic V (2016) A comparative structure/function analysis of two type IV pilin DNA receptors defines a novel mode of DNA binding. *Structure* **24**:926-934
- Bettermann K (2007) Funktionsanalyse und Lokalisation der Piline PilA1, PilA2 und PilA3 in *Thermus thermophilus* HB27. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main
- Bischof LF, Friedrich C, Harms A, Søggaard-Andersen L und van der Does C (2016) The type IV pilus assembly ATPase PilB of *Myxococcus xanthus* interacts with the inner membrane platform protein PilC and the nucleotide-binding protein PilM. *J Biol Chem* **291**:6946-6957
- Bitter W (2003) Secretins of *Pseudomonas aeruginosa*: large holes in the outer membrane. *Arch Microbiol* **179**:307-314
- Blesa A, César CE, Averhoff B und Berenguer J (2015) Noncanonical cell-to-cell DNA transfer in *Thermus* spp. is insensitive to argonaute-mediated interference. *J Bacteriol* **197**:138-146
- Blesa A, Baquedano I, Quintáns NG, Mata CP, Castón JR und Berenguer J (2017) The transjugation machinery of *Thermus thermophilus*: Identification of TdtA, an ATPase involved in DNA donation. *PLoS Genet* **13**:e1006669
- Blesa A, Averhoff B und Berenguer J (2018) Horizontal gene transfer in *Thermus* spp. *Curr Issues Mol Biol* **29**:23-36
- Bleves S, Voulhoux R, Michel G, Lazdunski A, Tommassen J und Filloux A (1998) The secretion apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of a fifth pseudopilin, XcpX (GspK family). *Mol Microbiol* **27**:31-40
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254
- Bradley DE (1980) Morphological and serological relationships of conjugative pili. *Plasmid* **4**:155-169
- Brouns SJ, Wu H, Akerboom J, Turnbull AP, de Vos WM und van der Oost J (2005) Engineering a selectable marker for hyperthermophiles. *J Biol Chem* **280**:11422-11431
- Brown DR, Helaine S, Carbonnelle E und Pelicic V (2010) Systematic functional analysis reveals that a set of seven genes is involved in fine-tuning of the multiple functions mediated by type IV pili in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **78**:3053-3063
- Brown JR (2003) Ancient horizontal gene transfer. *Nat Rev Genet* **4**:121

- Burkhardt J, Vonck J und Averhoff B (2011) Structure and function of PilQ, a secretin of the DNA transporter from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *J Biol Chem* **286**:9977-9984
- Burkhardt J, Vonck J, Langer JD, Salzer R und Averhoff B (2012) Unusual N-terminal  $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$  fold of PilQ from *Thermus thermophilus* mediates ring formation and is essential for piliation. *J Biol Chem* **287**:8484-8494
- Burrows LL (2005) Weapons of mass retraction. *Mol Microbiol* **57**:878-888
- Burrows LL (2012) *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol* **66**:493-520
- Camberg JL und Sandkvist M (2005) Molecular analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretion ATPase EpsE. *J Bacteriol* **187**:249-256
- Camberg JL, Johnson TL, Patrick M, Abendroth J, Hol WG und Sandkvist M (2007) Synergistic stimulation of EpsE ATP hydrolysis by EpsL and acidic phospholipids. *EMBO J* **26**:19-27
- Carbonnelle E, Hélaïne S, Nassif X und Pelicic V (2006) A systematic genetic analysis in *Neisseria meningitidis* defines the Pil proteins required for assembly, functionality, stabilization and export of type IV pili. *Mol Microbiol* **61**:1510-1522
- Castan P, Zafra O, Moreno R, de Pedro MA, Valles C, Cava F, Caro E, Schwarz H und Berenguer J (2002) The periplasmic space in *Thermus thermophilus*: evidence from a regulation-defective S-layer mutant overexpressing an alkaline phosphatase. *Extremophiles* **6**:225-232
- Caston JR, Carrascosa J, de Pedro MA und Berenguer J (1988) Identification of a crystalline layer on the cell envelope of the thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **51**:225-230
- Caston JR, Berenguer J, de Pedro MA und Carrascosa JL (1993) S-layer protein from *Thermus thermophilus* HB8 assembles into porin-like structures. *Mol Microbiol* **9**:65-75
- Cava F, Hidalgo A und Berenguer J (2009) *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles* **13**:213-231
- Cehovin A, Simpson PJ, McDowell MA, Brown DR, Noschese R, Pallett M, Brady J, Baldwin GS, Lea SM und Matthews SJ (2013) Specific DNA recognition mediated by a type IV pilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:3065-3070
- Chang YW, Rettberg LA, Treuner-Lange A, Iwasa J, Søgaaard-Andersen L und Jensen GJ (2016) Architecture of the type IVa pilus machine. *Science* **351**:aad2001
- Chang YW, Kjær A, Ortega DR, Kovacicova G, Sutherland JA, Rettberg LA, Taylor RK und Jensen GJ (2017) Architecture of the *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus machine revealed by electron cryotomography. *Nat Microbiol* **2**:16269
- Charpentier X, Kay E, Schneider D und Shuman HA (2011) Antibiotics and UV radiation induce competence for natural transformation in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **193**:1114-1121
- Chen I und Gotschlich EC (2001) ComE, a competence protein from *Neisseria gonorrhoeae* with DNA-binding activity. *J Bacteriol* **183**:3160-3168
- Chen I und Dubnau D (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol* **2**:241-249
- Chen Y, Shiue SJ, Huang CW, Chang JL, Chien YL, Hu NT und Chan NL (2005) Structure and function of the XpsE N-terminal domain, an essential component of the *Xanthomonas campestris* type II secretion system. *J Biol Chem* **280**:42356-42363

- Chiang P, Sampaleanu LM, Ayers M, Pahuta M, Howell PL und Burrows LL (2008) Functional role of conserved residues in the characteristic secretion NTPase motifs of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus motor proteins PilB, PilT and PilU. *Microbiol* **154**:114-126
- Chin KH, Kuo WT, Yu YJ, Liao YT, Yang MT und Chou SH (2012) Structural polymorphism of c-di-GMP bound to an EAL domain and in complex with a type II PilZ-domain protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**:1380-1392
- Cisneros DA, Bond PJ, Pugsley AP, Campos M und Francetic O (2012a) Minor pseudopilin self-assembly primes type II secretion pseudopilus elongation. *EMBO J* **31**:1041-1053
- Cisneros DA, Pehau-Arnaudet G und Francetic O (2012b) Heterologous assembly of type IV pili by a type II secretion system reveals the role of minor pilins in assembly initiation. *Mol Microbiol* **86**:805-818
- Clausen M, Jakovljevic V, Sogaard-Andersen L und Maier B (2009) High-force generation is a conserved property of type IV pilus systems. *J Bacteriol* **191**:4633-4638
- Claverys JP und Håvarstein LS (2002) Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci* **7**:1798-1814
- Collins R, Karupiah V, Siebert CA, Dajani R, Thistlethwaite A und Derrick JP (2018) Structural cycle of the *Thermus thermophilus* PilF ATPase: the powering of type IVa pilus assembly. *Sci Rep* **8**:14022
- Collins RF, Hassan D, Karupiah V, Thistlethwaite A und Derrick JP (2013) Structure and mechanism of the PilF DNA transformation ATPase from *Thermus thermophilus*. *Biochem J* **450**:417-425
- Costa TR, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M und Waksman G (2015) Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* **13**:343-359
- Costerton JW, Stewart PS und Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318-1322
- Craig L, Pique ME und Tainer JA (2004) Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **2**:363-378
- Craig L, Volkman N, Arvai AS, Pique ME, Yeager M, Egelman EH und Tainer JA (2006) Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Mol Cell* **23**:651-662
- Craig L und Li J (2008) Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr Opin Struct Biol* **18**:267-277
- Crowther LJ, Yamagata A, Craig L, Tainer JA und Donnenberg MS (2005) The ATPase activity of BfpD is greatly enhanced by zinc and allosteric interactions with other Bfp proteins. *J Biol Chem* **280**:24839-24848
- D'Imprima E, Salzer R, Bhaskara RM, Sánchez R, Rose I, Kirchner L, Hummer G, Kühlbrandt W, Vonck J und Averhoff B (2017) Cryo-EM structure of the bifunctional secretin complex of *Thermus thermophilus*. *eLife* **6**:14448-14456
- Davison J (1999) Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**:73-91
- De Souza GA, Leversen NA, Målen H und Wiker HG (2011) Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway. *Journal of proteomics* **75**:502-510
- Deich RA und Smith HO (1980) Mechanism of homospesific DNA uptake in *Haemophilus influenzae* transformation. *Mol Gen Genet* **177**:369-374
- Doolittle WF (1999) Lateral genomics. *Trends Cell Biol* **9**:M5-8

- Dorer MS, Fero J und Salama NR (2010) DNA damage triggers genetic exchange in *Helicobacter pylori*. PLoS Path **6**:e1001026
- Drechsler M (2015) Molekulare Analysen des DNA-Translokators und Etablierung eines markerlosen Mutagenesesystems in *Thermus thermophilus* HB27. Bachelorarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main
- Dubnau D (1999) DNA uptake in bacteria. Annu Rev Microbiol **53**:217-244
- Durand É, Michel G, Voulhoux R, Kürner J, Bernadac A und Filloux A (2005) XcpX controls biogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT-containing pseudopilus. J Biol Chem **280**:31378-31389
- Egelman EH (2007) The iterative helical real space reconstruction method: surmounting the problems posed by real polymers. J Struct Biol **157**:83-94
- Erzberger JP und Berger JM (2006) Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. Annu Rev Biophys Biomol Struct **35**:93-114
- Forest KT, Dunham SA, Koomey M und Tainer JA (1999) Crystallographic structure reveals phosphorylated pilin from *Neisseria*: phosphoserine sites modify type IV pilus surface chemistry and fibre morphology. Mol Microbiol **31**:743-752
- Friedrich A, Hartsch T und Averhoff B (2001) Natural transformation in mesophilic and thermophilic bacteria: Identification and characterization of novel, closely related competence genes in *Acinetobacter* sp. strain BD413 and *Thermus thermophilus* HB27. Appl Environ Microbiol **67**:3140-3148
- Friedrich A (2002) Molekulare Analysen der Transformationsapparate von mesophilen und extrem thermophilen Bakterien. Dissertation, Georg August Universität Göttingen
- Friedrich A, Prust C, Hartsch T, Henne A und Averhoff B (2002) Molecular analyses of the natural transformation machinery and identification of pilus structures in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* strain HB27. Appl Environ Microbiol **68**:745-755
- Friedrich A, Rumszauer J, Henne A und Averhoff B (2003) Pilin-like proteins in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27: Implication in competence for natural transformation and links to type IV pilus biogenesis. Appl Environ Microbiol **69**:3695-3700
- Friedrich C, Bulyha I und Søgaaard-Andersen L (2014) Outside-in assembly pathway of the type IV pilus system in *Myxococcus xanthus*. J Bacteriol **196**:378-390
- Frost LS, Leplae R, Summers AO und Toussaint A (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. Nat Rev Microbiol **3**:722
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD und Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: The proteomics protocols handbook. Springer, 571-607
- Georgiadou M, Castagnini M, Karimova G, Ladant D und Pelicic V (2012) Large-scale study of the interactions between proteins involved in type IV pilus biology in *Neisseria meningitidis*: characterization of a subcomplex involved in pilus assembly. Mol Microbiol **84**:857-873
- Ghosh A, Hartung S, Van Der Does C, Tainer JA und Albers SV (2011) Archaeal flagellar ATPase motor shows ATP-dependent hexameric assembly and activity stimulation by specific lipid binding. Biochem J **437**:43-52
- Giltner CL, Habash M und Burrows LL (2010) *Pseudomonas aeruginosa* minor pilins are incorporated into type IV pili. J Mol Biol **398**:444-461
- Giltner CL, Nguyen Y und Burrows LL (2012) Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. Microbiol Mol Biol Rev **76**:740-772

- Gold VA, Salzer R, Averhoff B und Kühlbrandt W (2015) Structure of a type IV pilus machinery in the open and closed state. *eLife* **4**:e07380
- Goodman SD und Scocca JJ (1988) Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:6982-6986
- Goosens VJ, Busch A, Georgiadou M, Castagnini M, Forest KT, Waksman G und Pelicic V (2017) Reconstitution of a minimal machinery capable of assembling periplasmic type IV pili. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**:E4978-E4986
- Graupner S, Weger N, Sohni M und Wackernagel W (2001) Requirement of novel competence genes *pilT* and *pilU* of *Pseudomonas stutzeri* for natural transformation and suppression of *pilT* deficiency by a hexahistidine tag on the type IV pilus protein PilAI. *J Bacteriol* **183**:4694-4701
- Griffith F (1928) The significance of pneumococcal types. *J Hyg* **27**:113-159
- Guglielmini J, De La Cruz F und Rocha EP (2012) Evolution of conjugation and type IV secretion systems. *Mol Biol Evol* **30**:315-331
- Guzzo CR, Salinas RK, Andrade MO und Farah CS (2009) PILZ protein structure and interactions with PILB and the FIMX EAL domain: implications for control of type IV pilus biogenesis. *J Mol Biol* **393**:848-866
- Guzzo CR, Dunger G, Salinas RK und Farah CS (2013) Structure of the PilZ–FimXEAL–c-di-GMP complex responsible for the regulation of bacterial type IV pilus biogenesis. *J Mol Biol* **425**:2174-2197
- Habazettl J, Allan MG, Jenal U und Grzesiek S (2011) Solution structure of the PilZ domain protein PA4608 complex with c-di-GMP identifies charge clustering as molecular readout. *J Biol Chem* **286**:14304-14314
- Hamoen LW, Venema G und Kuipers OP (2003) Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology* **149**:9-17
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580
- Hanson PI und Whiteheart SW (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:519-529
- Hegge FT, Hitchen PG, Aas FE, Kristiansen H, Lovold C, Egge-Jacobsen W, Panico M, Leong WY, Bull V, Virji M, Morris HR, Dell A und Koomey M (2004) Unique modifications with phosphocholine and phosphoethanolamine define alternate antigenic forms of *Neisseria gonorrhoeae* type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:10798-10803
- Heinonen JK und Lahti RJ (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal Biochem* **113**:313-317
- Helaine S, Carbonnelle E, Prouvensier L, Beretti JL, Nassif X und Pelicic V (2005) PilX, a pilus-associated protein essential for bacterial aggregation, is a key to pilus-facilitated attachment of *Neisseria meningitidis* to human cells. *Mol Microbiol* **55**:65-77
- Hendrick WA, Orr MW, Murray SR, Lee VT und Melville SB (2017) Cyclic-di-GMP binding by an assembly ATPase (PilB2) and control of type IV pilin polymerization in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*:e00034-00017
- Hengge R (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**:263
- Henkel RD, VandeBerg JL und Walsh RA (1988) A microassay for ATPase. *Anal Biochem* **169**:312-318

- Herdendorf TJ, McCaslin DR und Forest KT (2002) *Aquifex aeolicus* PilT, homologue of a surface motility protein, is a thermostable oligomeric NTPase. *J Bacteriol* **184**:6465-6471
- Hidaka Y, Hasegawa M, Nakahara T und Hoshino T (1994) The entire population of *Thermus thermophilus* cells is always competent at any growth phase. *Biosci Biotech Bioch* **58**:1338-1339
- Hobbs M und Mattick JS (1993) Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol Microbiol* **10**:233-243
- Hoppe J, Ünal CM, Thiem S, Grimpe L, Goldmann T, Gaßler N, Richter M, Shevchuk O und Steinert M (2017) PilY1 Promotes *Legionella pneumophila* infection of human lung tissue explants and contributes to bacterial adhesion, host cell invasion, and twitching motility. *Front Cell Infect Microbiol* **7**:63
- Hu J, Worrall L, Hong C, Vuckovic M, Atkinson C, Caveney N, Yu Z und Strynadka N (2018) Cryo-EM analysis of the T3S injectisome reveals the structure of the needle and open secretin. *Nat Commun* **9**:3840
- Huang B, Whitchurch CB und Mattick JS (2003) FimX, a multidomain protein connecting environmental signals to twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**:7068-7076
- Huynh K und Partch CL (2015) Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Curr Protoc Protein Sci* **79**:28.29. 21-28.29. 14
- Imhaus AF und Dumenil G (2014) The number of *Neisseria meningitidis* type IV pili determines host cell interaction. *EMBO J* **33**:1767-1783
- Inamine GS und Dubnau D (1995) ComEA, a *Bacillus subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport. *J Bacteriol* **177**:3045-3051
- Israel DA, Lou AS und Blaser MJ (2000) Characteristics of *Helicobacter pylori* natural transformation. *FEMS Microbiol Lett* **186**:275-280
- Itaya K und Ui M (1966) A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. *Clin Chim Acta* **14**:361-366
- Iyer LM, Leipe DD, Koonin EV und Aravind L (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol* **146**:11-31
- Jain R, Rivera MC, Moore JE und Lake JA (2002) Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. *Theor Popul Biol* **61**:489-495
- Jakovljevic V, Leonardy S, Hoppert M und Sjøgaard-Andersen L (2008) PilB and PilT are ATPases acting antagonistically in type IV pilus function in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **190**:2411-2421
- Jarrell KF und Albers SV (2012) The archaeellum: an old motility structure with a new name. *Trends Microbiol* **20**:307-312
- Jenal U, Reinders A und Lori C (2017) Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol* **15**:271
- Jeon B und Zhang Q (2007) Cj0011c, a periplasmic single- and double-stranded DNA-binding protein, contributes to natural transformation in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* **189**:7399-73407
- Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P und Claverys JP (2014) Bacterial transformation: Distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol* **12**:181-196

- Jones CJ, Utada A, Davis KR, Thongsomboon W, Sanchez DZ, Banakar V, Cegelski L, Wong GC und Yildiz FH (2015) C-di-GMP regulates motile to sessile transition by modulating MshA pili biogenesis and near-surface motility behavior in *Vibrio cholerae*. PLoS Path **11**:e1005068
- Kahn ME und Smith HO (1984) Transformation in *Haemophilus*: a problem in membrane biology. J Membr Biol **81**:89-103
- Karuppiah V, Hassan D, Saleem M und Derrick JP (2010) Structure and oligomerization of the PilC type IV pilus biogenesis protein from *Thermus thermophilus*. Proteins **78**:2049-2057
- Karuppiah V und Derrick JP (2011) Structure of the PilM-PilN inner membrane type IV pilus biogenesis complex from *Thermus thermophilus*. J Biol Chem **286**:24434-24442
- Karuppiah V, Collins RF, Thistlethwaite A, Gao Y und Derrick JP (2013) Structure and assembly of an inner membrane platform for initiation of type IV pilus biogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A **110**:E4638-4647
- Karuppiah V, Thistlethwaite A und Derrick JP (2016) Structures of type IV pilins from *Thermus thermophilus* demonstrate similarities with type II secretion system pseudopilins. J Struct Biol **196**:375-384
- Kazmierczak BI, Lebron MB und Murray TS (2006) Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol **60**:1026-1043
- Kimmich GA, Randles J und Brand JS (1975) Assay of picomole amounts of ATP, ADP, and AMP using the luciferase enzyme system. Anal Biochem **69**:187-206
- Kirchner L (2018) Der DNA-Translokator in *Thermus thermophilus* HB27: Analysen der Funktion und Regulation. Masterarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main
- Kolappan S, Ng D, Yang G, Harn T und Craig L (2015) Crystal structure of the minor pilin CofB, the initiator of CFA/III pilus assembly in enterotoxigenic *Escherichia coli*. J Biol Chem **290**:25805-25818
- Koo J, Lamers RP, Rubinstein JL, Burrows LL und Howell PL (2016) Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* type IVa pilus secretin at 7.4 Å. Structure **24**:1778-1787
- Koonin EV (1997) Genome sequences: genome sequence of a model prokaryote. Curr Biol **7**:656-659
- Koonin EV, Makarova KS und Aravind L (2001) Horizontal gene transfer in Prokaryotes: quantification and classification. Annu Rev Microbiol **55**:709-742
- Korotkov KV und Hol WG (2008) Structure of the GspK–GspI–GspJ complex from the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system. Nat Struct Mol Biol **15**:462
- Korotkov KV, Gonen T und Hol WG (2011a) Secretins: Dynamic channels for protein transport across membranes. Trends Biochem Sci **36**:433-443
- Korotkov KV, Johnson TL, Jobling MG, Pruneda J, Pardon E, Héroux A, Turley S, Steyaert J, Holmes RK, Sandkvist M und Hol WG (2011b) Structural and functional studies on the interaction of GspC and GspD in the type II secretion system. PLoS Pathog **7**:e1002228
- Koyama Y, Hoshino T, Tomizuka N und Furukawa K (1986) Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. J Bacteriol **166**:338-340
- Krause S, Bárcena M, Pansegrau W, Lurz R, Carazo JM und Lanka E (2000) Sequence-related protein export NTPases encoded by the conjugative transfer region of RP4 and by the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* share similar hexameric ring structures. Proc Natl Acad Sci U S A **97**:3067-3072

- Kruse K, Salzer R, Joos F und Averhoff B (2018) Functional dissection of the three N-terminal general secretory pathway domains and the Walker motifs of the traffic ATPase PilF from *Thermus thermophilus*. *Extremophiles* **22**:461-471
- Lämmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685
- Lang E, Haugen K, Fleckenstein B, Homberset H, Frye SA, Ambur OH und Tønnum T (2009) Identification of neisserial DNA binding components. *Microbiology* **155**:852-862
- Laurenceau R, Pehau-Arnaudet G, Baconnais S, Gault J, Malosse C, Dujeancourt A, Campo N, Chamot-Rooke J, Le Cam E, Claverys JP und Fronzes R (2013) A type IV pilus mediates DNA binding during natural transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog* **9**:e1003473
- Leighton TL, Dayalani N, Sampaleanu LM, Howell PL und Burrows LL (2015) A novel role for PilNO in type IV pilus retraction revealed by alignment subcomplex mutations. *J Bacteriol* **197**:2229-2238
- Leighton TL, Yong DH, Howell PL und Burrows LL (2016) Type IV pilus alignment subcomplex components PilN and PilO form homo- and heterodimers *in vivo*. *J Biol Chem* **291**:19923-19938
- Leipe DD, Koonin EV und Aravind L (2003) Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins. *J Mol Biol* **333**:781-815
- Li C, Wallace RA, Black WP, Li YZ und Yang Z (2013) Type IV pilus proteins form an integrated structure extending from the cytoplasm to the outer membrane. *PLoS One* **8**:e70144
- Li TN, Chin KH, Liu JH, Wang AHJ und Chou SH (2009) XC1028 from *Xanthomonas campestris* adopts a PilZ domain-like structure without a c-di-GMP switch. *Proteins: Struct Funct Bioinform* **75**:282-288
- Lill R, Dowhan W und Wickner W (1990) The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* **60**:271-280
- Llosa M, Gomis-Rüth FX, Coll M und Cruz Fdl (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* **45**:1-8
- Lorenz MG und Wackernagel W (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* **58**:563-602
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL und Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275
- Lu C, Turley S, Marionni ST, Park YJ, Lee KK, Patrick M, Shah R, Sandkvist M, Bush MF und Hol WG (2013) Hexamers of the type II secretion ATPase GspE from *Vibrio cholerae* with increased ATPase activity. *Structure* **21**:1707-1717
- Luke NR, Howlett AJ, Shao J und Campagnari AA (2004) Expression of type IV pili by *Moraxella catarrhalis* is essential for natural competence and is affected by iron limitation. *Infect Immun* **72**:6262-6270
- Maier B, Potter L, So M, Long CD, Seifert HS und Sheetz MP (2002) Single pilus motor forces exceed 100 pN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:16012-16017
- Maldarelli GA, De Masi L, von Rosenvinge EC, Carter M und Donnenberg MS (2014) Identification, immunogenicity, and cross-reactivity of type IV pilin and pilin-like proteins from *Clostridium difficile*. *Pathogens and disease* **71**:302-314
- Mancl JM, Black WP, Robinson H, Yang Z und Schubot FD (2016) Crystal structure of a type IV pilus assembly ATPase: Insights into the molecular mechanism of PilB from *Thermus thermophilus*. *Structure* **24**:1886-1897

- Mandel M und Higa A (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**:159-162
- McCallum M, Tammam S, Little DJ, Robinson H, Koo J, Shah M, Calmettes C, Moraes TF, Burrows LL und Howell PL (2016) PilN binding modulates the structure and binding partners of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IVa Pilus protein PilM. *J Biol Chem* **291**:11003-11015
- McCallum M, Tammam S, Khan A, Burrows LL und Howell PL (2017) The molecular mechanism of the type IVa pilus motors. *Nat Commun* **8**:15091
- McCarthy Y, Ryan RP, O'Donovan K, He YQ, Jiang BL, Feng JX, Tang JL und Dow JM (2008) The role of PilZ domain proteins in the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Plant Pathol* **9**:819-824
- McLaughlin LS, Haft RJ und Forest KT (2012) Structural insights into the Type II secretion nanomachine. *Curr Opin Struct Biol* **22**:208-216
- McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, Cowley AP und Lopez R (2013) Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* **41**:W597-W600
- Meibom KL, Blokesch M, Dolganov NA, Wu CY und Schoolnik GK (2005) Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* **310**:1824-1827
- Merighi M, Lee VT, Hyodo M, Hayakawa Y und Lory S (2007) The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **65**:876-895
- Merz AJ und So M (2000) Interactions of pathogenic *Neisseriae* with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**:423-457
- Misic AM, Satyshur KA und Forest KT (2010) *P. aeruginosa* PilT structures with and without nucleotide reveal a dynamic type IV pilus retraction motor. *J Mol Biol* **400**:1011-1021
- Moreno R, Haro A, Castellanos A und Berenguer J (2005) High-level overproduction of His-tagged *Tth* DNA polymerase in *Thermus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **71**:591-593
- Mortier-Barrière I, Velten M, Dupaigne P, Mirouze N, Pietrement O, McGovern S, Fichant G, Martin B, Noirot P, Le Cam E, Polard P und Claverys JP (2007) A key presynaptic role in transformation for a widespread bacterial protein: DprA conveys incoming ssDNA to RecA. *Cell* **130**:824-836
- Muñoz-Dorado J, Inouye S und Inouye M (1991) A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell* **67**:995-1006
- Nakasugi K, Svenson CJ und Neilan BA (2006) The competence gene, *comF*, from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is involved in natural transformation, phototactic motility and piliation. *Microbiology* **152**:3623-3631
- Nakasugi K, Alexova R, Svenson CJ und Neilan BA (2007) Functional analysis of PilT from the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *J Bacteriol* **189**:1689-1697
- Navarro MV, De N, Bae N, Wang Q und Sondermann H (2009) Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX. *Structure* **17**:1104-1116
- Needleman SB und Wunsch CD (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* **48**:443-453
- Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Nelson WC, Ketchum KA, McDonald L, Utterback TR, Malek JA, Linher KD, Garrett MM, Stewart AM, Cotton MD, Pratt MS, Phillips CA, Richardson D, Heidelberg J, Sutton GG, Fleischmann RD, Eisen JA, White O, Salzberg SL, Smith HO, Venter JC

- und Fraser CM (1999) Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**:323-329
- Ng D, Harn T, Altindal T, Kolappan S, Marles JM, Lala R, Spielman I, Gao Y, Hauke CA und Kovacikova G (2016) The *Vibrio cholerae* minor pilin TcpB initiates assembly and retraction of the toxin-coregulated pilus. *PLoS Path* **12**:25805-25818
- Ng SY, Chaban B und Jarrell KF (2006) Archaeal flagella, bacterial flagella and type IV pili: a comparison of genes and posttranslational modifications. *J Mol Microbiol Biotechnol* **11**:167-191
- Nguyen Y, Sugiman-Marangos S, Harvey H, Bell SD, Charlton CL, Junop MS und Burrows LL (2015) *Pseudomonas aeruginosa* minor pilins prime type IVa pilus assembly and promote surface display of the PilY1 adhesin. *J Biol Chem* **290**:601-611
- Niesen FH, Berglund H und Vedadi M (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* **2**:2212-2221
- O'Toole G, Kaplan HB und Kolter R (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**:49-79
- Ochman H, Lawrence JG und Groisman EA (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**:299-304
- Ohtani N, Tomita M und Itaya M (2010) An extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, is a polyploid bacterium. *J Bacteriol* **192**:5499-5505
- Omelchenko MV, Wolf YI, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Daly MJ, Koonin EV und Makarova KS (2005) Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: Divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance. *BMC Evol Biol* **5**:57
- Oshima T und Imahori K (1974) Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. *Int J Syst Bacteriol* **24**:102-112
- Pahl V (2017) Analysen der Funktion unterschiedlicher Piline bei der natürlichen Transformation und Biogenese von Typ-IV-Pili in *Thermus thermophilus* HB27. Bachelorarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main
- Palmen R, Vosman B, Buijsman P, Breek CK und Hellingwerf KJ (1993) Physiological characterization of natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Gen Microbiol* **139**:295-305
- Parge HE, Forest KT, Hickey MJ, Christensen DA, Getzoff ED und Tainer JA (1995) Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. *Nature* **378**:32-38
- Peabody CR, Chung YJ, Yen MR, Vidal-Ingigliardi D, Pugsley AP und Saier MH, Jr. (2003) Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiol* **149**:3051-3072
- Pellicic V (2008) Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol* **68**:827-837
- Pestova EV und Morrison DA (1998) Isolation and characterization of three *Streptococcus pneumoniae* transformation-specific loci by use of a *lacZ* reporter insertion vector. *J Bacteriol* **180**:2701-2710
- Piepenbrink KH, Maldarelli GA, De La Peña CFM, Mulvey GL, Snyder GA, De Masi L, Von Roseninge EC, Günther S, Armstrong GD und Donnenberg MS (2014) Structure of *Clostridium difficile* PilJ exhibits unprecedented divergence from known type IV pilins. *J Biol Chem* **289**:4334-4345
- Piepenbrink KH und Sundberg EJ (2016) Motility and adhesion through type IV pili in Gram-positive bacteria. *Biochem Soc Trans* **44**:1659-1666

- Planet PJ, Kachlany SC, DeSalle R und Figurski DH (2001) Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread *tadA* subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:2503-2508
- Pohlschroder M, Ghosh A, Tripepi M und Albers S-V (2011) Archaeal type IV pilus-like structures — evolutionarily conserved prokaryotic surface organelles. *Curr Opin Microbiol* **14**:357-363
- Pollastri G, Przybylski D, Rost B und Baldi P (2002) Improving the prediction of protein secondary structure in three and eight classes using recurrent neural networks and profiles. *Proteins: Struct Funct Bioinform* **47**:228-235
- Porollo AA, Adamczak R und Meller J (2004) POLYVIEW: a flexible visualization tool for structural and functional annotations of proteins. *Bioinformatics* **20**:2460-2462
- Porstendörfer D, Gohl O, Mayer F und Averhoff B (2000) ComP, a pilin-like protein essential for natural competence in *Acinetobacter* sp. strain BD413: regulation, modification, and cellular localization. *J Bacteriol* **182**:3673-3680
- Postel EH und Goodgal SH (1966) Uptake of "single-stranded" DNA in *Hemophilus influenzae* and its ability to transform. *J Mol Biol* **16**:317-327
- Proft T und Baker E (2009) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci* **66**:613-635
- Provedi R und Dubnau D (1999) ComEA is a DNA receptor for transformation of competent *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **31**:271-280
- Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, Martin B und Claverys JP (2006) Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **313**:89-92
- Py B, Loiseau L und Barras F (2001) An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO Rep* **2**:244-248
- Quintela JC, Pittenauer E, Allmaier G, Aran V und de Pedro MA (1995) Structure of peptidoglycan from *Thermus thermophilus* HB8. *J Bacteriol* **177**:4947-4962
- Ramelot TA, Yee A, Cort JR, Semesi A, Arrowsmith CH und Kennedy MA (2007) NMR structure and binding studies confirm that PA4608 from *Pseudomonas aeruginosa* is a PilZ domain and a c-di-GMP binding protein. *Proteins: Struct Funct Bioinform* **66**:266-271
- Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, Paxinos EE, Sebra R, Chin C-S und Iliopoulos D (2011) Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *New Engl J Med* **365**:709-717
- Ray S, Lukyanov P und Ochieng J (2003) Members of the cystatin superfamily interact with MMP-9 and protect it from autolytic degradation without affecting its gelatinolytic activities. *Biochim Biophys Acta* **1652**:91-102
- Roelofs KG, Jones CJ, Helman SR, Shang X, Orr MW, Goodson JR, Galperin MY, Yildiz FH und Lee VT (2015) Systematic identification of cyclic-di-GMP binding proteins in *Vibrio cholerae* reveals a novel class of cyclic-di-GMP-binding ATPases associated with type II secretion systems. *PLoS Path* **11**:e1005232
- Römling U, Galperin MY und Gomelsky M (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**:1-52
- Rose I, Biukovic G, Aderhold P, Müller V, Grüber G und Averhoff B (2011) Identification and characterization of a unique, zinc-containing transport ATPase essential for natural transformation in *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* **15**:191-202
- Ross P, Mayer R, Weinhouse H, Amikam D, Huggirat Y, Benziman M, De Vroom E, Fidder A, De Paus P und Sliedregt L (1990) The cyclic diguanylic acid regulatory system of

- cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotide dimer, trimer, and phosphothioate derivatives. *J Biol Chem* **265**:18933-18943
- Rudel T, Scheurerpflug I und Meyer TF (1995) *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin. *Nature* **373**:357-359
- Rumszauer J, Schwarzenlander C und Averhoff B (2006) Identification, subcellular localization, and functional interactions of PilMNOWQ and PilA4 involved in transformation competency and pilus biogenesis in the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *FEBS J* **273**:3261-3272
- Ryjenkov DA, Simm R, Römling U und Gomelsky M (2006) The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* **281**:30310-30314
- Sakai D, Horiuchi T und Komano T (2001) ATPase activity and multimer formation of PilQ protein are required for thin pilus biogenesis in plasmid R64. *J Biol Chem* **276**:17968-17975
- Salzer R (2009) Analysen des DNA-Transporters in dem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* HB27. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main
- Salzer R, Herzberg M, Nies DH, Biukovic G, Grüber G, Müller V und Averhoff B (2013) The DNA uptake ATPase PilF of *Thermus thermophilus*: a reexamination of the zinc content. *Extremophiles* **17**:697-698
- Salzer R, Herzberg M, Nies DH, Joos F, Rathmann B, Thielmann Y und Averhoff B (2014a) Zinc and ATP binding of the hexameric AAA-ATPase PilF from *T. thermophilus*: Role in complex stability, piliation, adhesion, twitching motility and natural transformation. *J Biol Chem* **289**:30343-30354
- Salzer R, Joos F und Averhoff B (2014b) Type IV pilus biogenesis, twitching motility, and DNA uptake in *Thermus thermophilus*: Discrete roles of antagonistic ATPases PilF, PilT1, and PilT2. *Appl Environ Microbiol* **80**:644-652
- Salzer R, Kern T, Joos F und Averhoff B (2014c) Environmental factors affecting the expression of type IV pilus genes as well as piliation of *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **357**:56-62
- Salzer R, Joos F und Averhoff B (2015) Different effects of MglA and MglB on pilus-mediated functions and natural competence in *Thermus thermophilus*. *Extremophiles* **19**:261-267
- Salzer R (2016) The DNA translocator and the type IV pilus of *Thermus thermophilus* HB27: Structure, regulation and biochemical characterization of two linked systems. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main
- Salzer R, Edoardo D, Gold VA, Rose I, Drechsler M, Vonck J und Averhoff B (2016a) Topology and structure/function correlation of ring-and gate-forming domains in the dynamic secretin complex of *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem* **291**:14448-14456
- Salzer R, Kern T, Joos F und Averhoff B (2016b) The *Thermus thermophilus* *comEA/comEC* operon is associated with DNA binding and regulation of the DNA translocator and type IV pili. *Environ Microbiol* **18**:65-74
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Sampaleanu LM, Bonanno JB, Ayers M, Koo J, Tammam S, Burley SK, Almo SC, Burrows LL und Howell PL (2009) Periplasmic domains of *Pseudomonas aeruginosa* PilN and PilO form a stable heterodimeric complex. *J Mol Biol* **394**:143-159

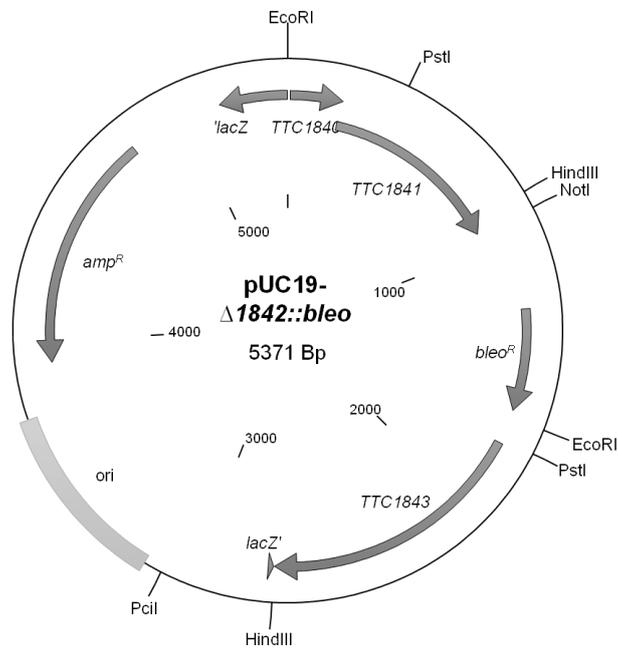
- Sandkvist M, Bagdasarian M, Howard SP und DiRita VJ (1995) Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*. *EMBO J* **14**:1664-1673
- Satyshur KA, Worzalla GA, Meyer LS, Heiniger EK, Aukema KG, Mistic AM und Forest KT (2007) Crystal structures of the pilus retraction motor PilT suggest large domain movements and subunit cooperation drive motility. *Structure* **15**:363-376
- Schägger H und von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**:368-379
- Scheuerpflug I, Rudel T, Ryll R, Pandit J und Meyer TF (1999) Roles of PilC and PilE proteins in pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* to human erythrocytes and endothelial and epithelial cells. *Infect Immun* **67**:834-843
- Schwarzenlander C (2003) Regulation der Transformation und strukturelle sowie funktionelle Analysen von Komponenten des Transformationsapparates in *Thermus thermophilus* HB27. Diplomarbeit, Ludwig Maximilians Universität, München
- Schwarzenlander C und Averhoff B (2006) Characterization of DNA transport in the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *FEBS J* **273**:4210-4218
- Schwarzenlander C (2008) Der DNA-Translokator in *Thermus thermophilus* HB27: Charakterisierung des DNA-Transports und funktionelle Analysen der Kompetenzproteine. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main
- Schwarzenlander C, Haase W und Averhoff B (2009) The role of single subunits of the DNA transport machinery of *Thermus thermophilus* HB27 in DNA binding and transport. *Environ Microbiol* **11**:801-808
- Seitz P und Blokesch M (2013) DNA-uptake machinery of naturally competent *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:17987-17992
- Seitz P, Pezeshgi Modarres H, Borgeaud S, Bulushev RD, Steinbock LJ, Radenovic A, Dal Peraro M und Blokesch M (2014) ComEA is essential for the transfer of external DNA into the periplasm in naturally transformable *Vibrio cholerae* cells. *PLoS Genet* **10**:e1004066
- Shiue SJ, Kao KM, Leu WM, Chen LY, Chan NL und Hu NT (2006) XpsE oligomerization triggered by ATP binding, not hydrolysis, leads to its association with XpsL. *EMBO J* **25**:1426-1435
- Simossis VA und Heringa J (2003) The PRALINE online server: optimising progressive multiple alignment on the web. *Comput Biol Chem* **27**:511-519
- Singh RN (1972) Number of deoxyribonucleic acid uptake sites in competent cells of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **110**:266-272
- Skerker JM und Berg HC (2001) Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6901-6904
- Smith H, Wiersma K, Venema G und Bron S (1985) Transformation in *Bacillus subtilis*: further characterization of a 75,000-dalton protein complex involved in binding and entry of donor DNA. *J Bacteriol* **164**:201-206
- Smith HO, Danner DB und Deich RA (1981) Genetic transformation. *Annu Rev Biochem* **50**:41-68
- Soto GE und Hultgren SJ (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* **181**:1059-1071
- Strom MS und Lory S (1993) Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu Rev Microbiol* **47**:565-596

- Suzuki DT und Griffiths AJ (1976) An introduction to genetic analysis. WH Freeman and Company, New York
- Szabó Z, Stahl AO, Albers S-V, Kissinger JC, Driessen AJ und Pohlschröder M (2007) Identification of diverse archaeal proteins with class III signal peptides cleaved by distinct archaeal prepilin peptidases. *J Bacteriol* **189**:772-778
- Takhar HK, Kemp K, Kim M, Howell PL und Burrows LL (2013) The platform protein is essential for type IV pilus biogenesis. *J Biol Chem* **288**:9721-9728
- Tammam S, Sampaleanu LM, Koo J, Manoharan K, Daubaras M, Burrows LL und Howell PL (2013) PilMNOPQ from the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus system form a transenvelope protein interaction network that interacts with PilA. *J Bacteriol* **195**:2126-2135
- Tønjum T und Koomey M (1997) The pilus colonization factor of pathogenic neisserial species: organelle biogenesis and structure/function relationships. *Gene* **192**:155-163
- Tsai C-L und Tainer JA (2016) The ATPase motor turns for type IV pilus assembly. *Structure* **24**:1857-1859
- Turner LR, Lara JC, Nunn DN und Lory S (1993) Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **175**:4962-4969
- van Dam V, Roussel-Jazédé, V., Arenes, J., Bos, M.P., Tommassen, J. (2014) Outer membrane-embedded and -associated proteins and their role in adhesion and pathogenesis In: *Bacterial Membranes*. Norfolk, UK, 415-448
- von Heijne G (1994) Signals for protein targeting into and across membranes. *Subcell Biochem* **22**:1-19
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ und Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**:945-951
- Wall D und Kaiser D (1999) Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* **32**:1-10
- Wall D, Kolenbrander PE und Kaiser D (1999) The *Myxococcus xanthus pilQ* (*sglA*) gene encodes a secretin homolog required for type IV pilus biogenesis, social motility, and development. *J Bacteriol* **181**:24-33
- Wallden K, Rivera-Calzada A und Waksman G (2010) Microreview: Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol* **12**:1203-1212
- Wang F, Coureuil M, Osinski T, Orlova A, Altindal T, Gesbert G, Nassif X, Egelman EH und Craig L (2017) Cryoelectron microscopy reconstructions of the *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria gonorrhoeae* type IV pili at sub-nanometer resolution. *Structure* **25**:1423-1435
- Wang X, Huang J, Mukherjee A, Cao C und Lutkenhaus J (1997) Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP, and FtsA. *J Bacteriol* **179**:5551-5559
- Wang YC, Chin KH, Tu ZL, He J, Jones CJ, Sanchez DZ, Yildiz FH, Galperin MY und Chou SH (2016) Nucleotide binding by the widespread high-affinity cyclic di-GMP receptor MshEN domain. *Nat Commun* **7**:12481
- Wendler P, Ciniawsky S, Kock M und Kube S (2012) Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket. *Biochim Biophys Acta* **1823**:2-14
- Werner C, Richter OMH und Ludwig B (2010) A novel heme a insertion factor gene cotranscribes with the *Thermus thermophilus* cytochrome  $ba_3$  oxidase locus. *J Bacteriol* **192**:4712-4719

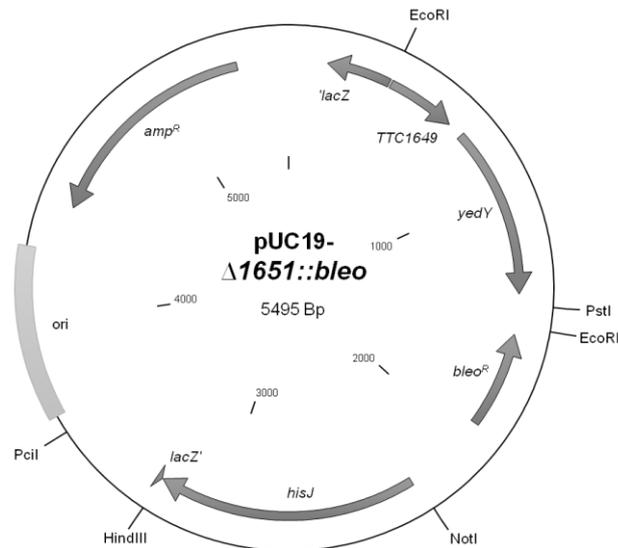
- Wilharm G, Piesker J, Laue M und Skiebe E (2013) DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *J Bacteriol* **195**:4146-4153
- Winther-Larsen HC, Hegge FT, Wolfgang M, Hayes SF, van Putten JP und Koomey M (2001) *Neisseria gonorrhoeae* PilV, a type IV pilus-associated protein essential to human epithelial cell adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:15276-15281
- Winther-Larsen HC, Wolfgang M, Dunham S, van Putten JP, Dorward D, Lovold C, Aas FE und Koomey M (2005) A conserved set of pilin-like molecules controls type IV pilus dynamics and organelle-associated functions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **56**:903-917
- Wittig I und Schägger H (2005) Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* **5**:4338-4346
- Wolfgang M, van Putten JP, Hayes SF und Koomey M (1999) The *comP* locus of *Neisseria gonorrhoeae* encodes a type IV prepilin that is dispensable for pilus biogenesis but essential for natural transformation. *Mol Microbiol* **31**:1345-1357
- Worrall L, Hong C, Vuckovic M, Deng W, Bergeron J, Majewski D, Huang R, Spreter T, Finlay B und Yu Z (2016) Near-atomic-resolution cryo-EM analysis of the *Salmonella* T3S injectisome basal body. *Nature* **540**:597-601
- Xu J, Kim J, Koestler BJ, Choi JH, Waters CM und Fuqua C (2013) Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* unipolar polysaccharide production reveals complex integrated control of the motile-to-sessile switch. *Mol Microbiol* **89**:929-948
- Yamagata A und Tainer JA (2007) Hexameric structures of the archaeal secretion ATPase GspE and implications for a universal secretion mechanism. *EMBO J* **26**:878-890
- Yan Z, Yin M, Xu D, Zhu Y und Li X (2017) Structural insights into the secretin translocation channel in the type II secretion system. *Nat Struct Mol Biol* **24**:177
- Yanisch-Perron C, Vieira J und Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119
- Zhou M, Morgner N, Barrera NP, Politis A, Isaacson SC, Matak-Vinković D, Murata T, Bernal RA, Stock D und Robinson CV (2011) Mass spectrometry of intact V-type ATPases reveals bound lipids and the effects of nucleotide binding. *Science* **334**:380-385
- Zinder ND und Lederberg J (1952) Genetic exchange in *Salmonella*. *J Bacteriol* **64**:679-699

## 7 Anhang

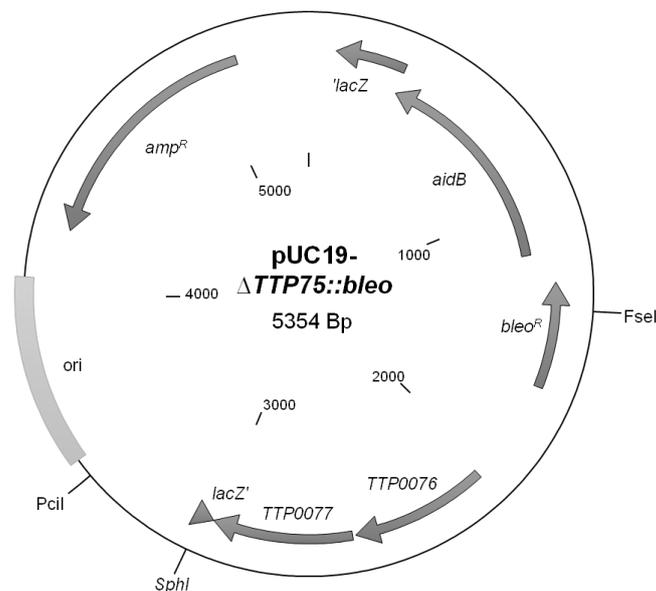
### 7.1 Plasmidkarten



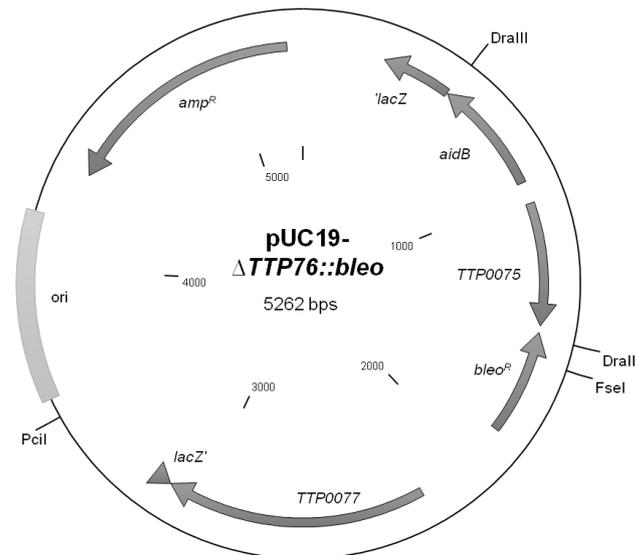
**Abb. A1. Plasmidkarte von pUC19- $\Delta$ TTC1842::bleo.** Die Plasmidkarte wurde mit Clone Manager 7, Version 7.11 erstellt. Die Restriktionsschnittstellen der in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind eingezeichnet. *TTC1840*, *TTC1841*, Gene im UP-Bereich des zu deletierenden Gens *TTC1842*; *TTC1843*, Gen im DW-Bereich von *TTC1842*; *bleo<sup>R</sup>*, Bleomycin-Resistenzkassette; *lacZ'* und *'lacZ*, in pUC19 enthaltenes Gen, das für die  $\beta$ -Galactosidase codiert und das durch Einbringen von *bleo<sup>R</sup>*, UP- und DW-Bereich unterbrochen wurde; ori, Replikationsursprung; *amp<sup>R</sup>*, Ampicillin-Resistenzkassette.



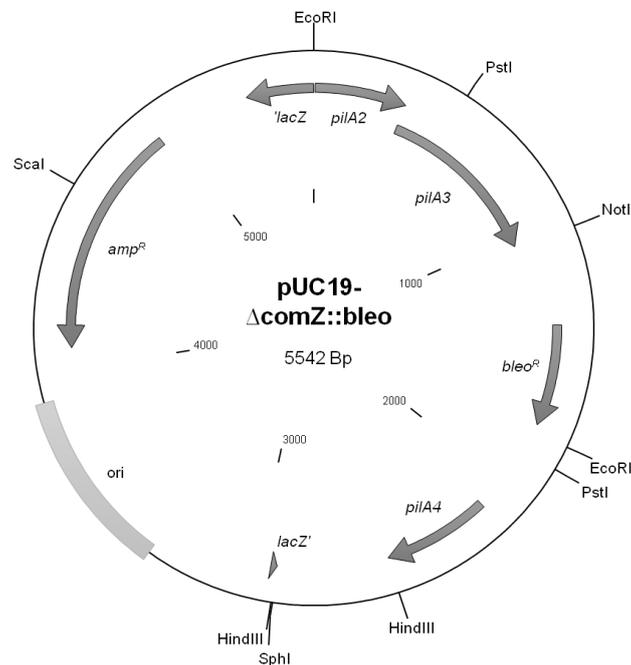
**Abb. A2. Plasmidkarte von pUC19- $\Delta$ TTC1651::bleo.** Die Plasmidkarte wurde mit Clone Manager 7, Version 7.11 erstellt. Die Restriktionsschnittstellen der in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind eingezeichnet. *TTC1649*, *yedY*, Gene im UP-Bereich des zu deletierenden Gens *TTC1651*; *hisJ*, Gen im DW-Bereich von *TTC651*; *bleo<sup>R</sup>*, Bleomycin-Resistenzkassette; *lacZ'* und *'lacZ*, in pUC19 enthaltenes Gen, das für die  $\beta$ -Galactosidase codiert und das durch Einbringen von *bleo<sup>R</sup>*, UP- und DW-Bereich unterbrochen wurde; ori, Replikationsursprung; *amp<sup>R</sup>*, Ampicillin-Resistenzkassette.



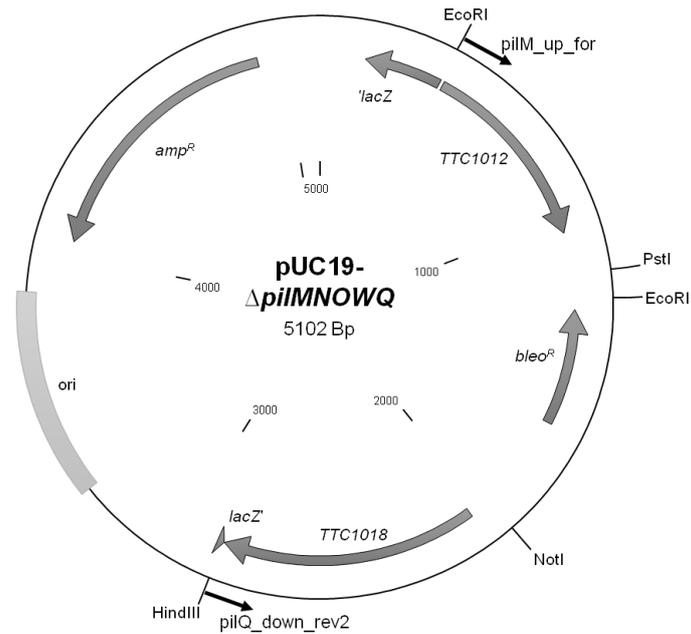
**Abb. A3. Plasmidkarte von pUC19- $\Delta$ TTP75::bleo.** Die Plasmidkarte wurde mit Clone Manager 7, Version 7.11 erstellt. Die Restriktionsschnittstellen der in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind eingezeichnet. *aidB*, Gen im UP-Bereich des zu deletierenden Gens *TTP0075*; *TTP0076* und *TTP0077*, Gene im DW-Bereich von *TTP0075*; *bleo<sup>R</sup>*, Bleomycin-Resistenzkassette; *lacZ'* und *'lacZ*, in pUC19 enthaltenes Gen, das für die  $\beta$ -Galactosidase codiert und das durch Einbringen von *bleo<sup>R</sup>*, UP- und DW-Bereich unterbrochen wurde; ori, Replikationsursprung; *amp<sup>R</sup>*, Ampicillin-Resistenzkassette.



**Abb. A4. Plasmidkarte von pUC19- $\Delta$ TTP76::bleo.** Die Plasmidkarte wurde mit Clone Manager 7, Version 7.11 erstellt. Die Restriktionsschnittstellen der in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind eingezeichnet. *aidB*, *TTP0075*, Gene im UP-Bereich des zu deletierenden Gens *TTP0076*; *TTP0077*, Gen im DW-Bereich von *TTP0076*; *bleo<sup>R</sup>*, Bleomycin-Resistenzkassette; *lacZ'* und *'lacZ*, in pUC19 enthaltenes Gen, das für die  $\beta$ -Galactosidase codiert und das durch Einbringen von *bleo<sup>R</sup>*, UP- und DW-Bereich unterbrochen wurde; ori, Replikationsursprung; *amp<sup>R</sup>*, Ampicillin-Resistenzkassette.

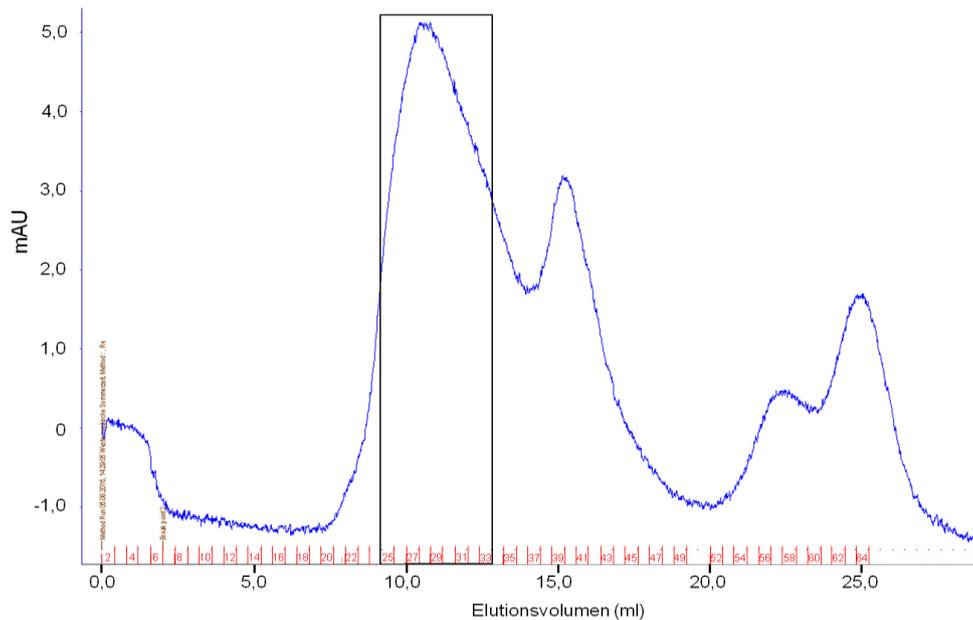


**Abb. A5. Plasmidkarte von pUC19- $\Delta$ comZ::bleo.** Die Plasmidkarte wurde mit Clone Manager 7, Version 7.11 erstellt. Die Restriktionsschnittstellen der in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind eingezeichnet. *pilA2* und *pilA3*, Gene im UP-Bereich des zu deletierenden Gens *comZ*; *pilA4*, Gen im DW-Bereich von *comZ*; *bleo<sup>R</sup>*, Bleomycin-Resistenzkassette; *lacZ'* und *'lacZ*, in pUC19 enthaltenes Gen, das für die  $\beta$ -Galactosidase codiert und das durch Einbringen von *bleo<sup>R</sup>*, UP- und DW-Bereich unterbrochen wurde; ori, Replikationsursprung; *amp<sup>R</sup>*, Ampicillin-Resistenzkassette.

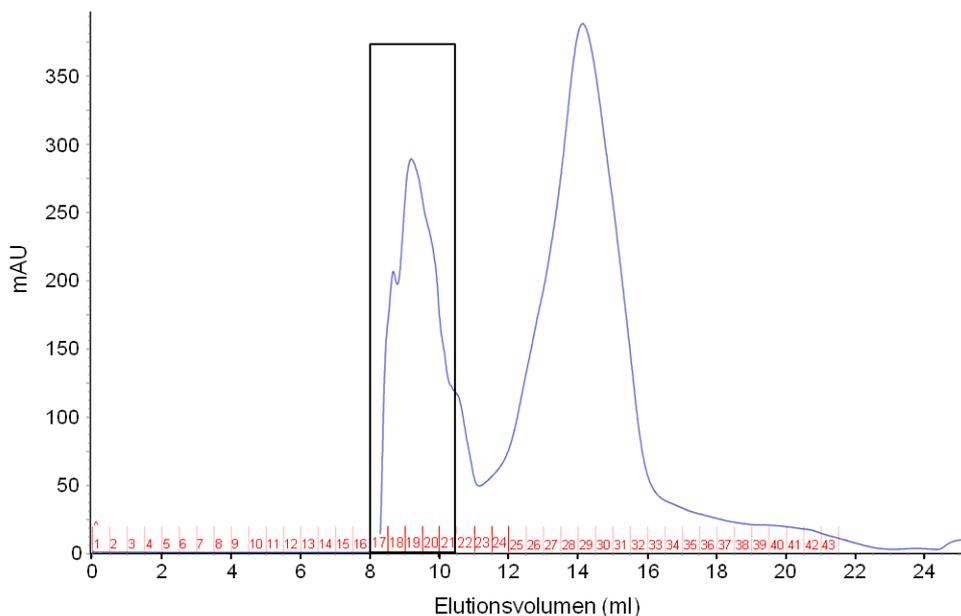


**Abb. A6. Plasmidkarte von pUC19- $\Delta$ *pilMNOWQ*.** Das Plasmid wurde von I. Rose (AK Averhoff, Goethe-Universität Frankfurt a. M.) erstellt. Die Plasmidkarte wurde mit Clone Manager 7, Version 7.11 erstellt. Die Restriktionsschnittstellen der für die Erstellung des Plasmides verwendeten Restriktionsenzyme sind eingezeichnet. Die Bindestellen der Starteroligonukleotide *pilM\_up\_for* und *pilQ\_down\_rev2* sind durch schwarze Pfeile markiert. *TTC1012*, Gen im UP-Bereich des zu deletierenden Operons *pilMNOWQ*; *TTC1018*, Gen im DW-Bereich von *pilMNOWQ*; *bleo<sup>R</sup>*, Bleomycin- Resistenzkassette; *lacZ'* und *'lacZ*, in pUC19 enthaltenes Gen, das für die  $\beta$ -Galactosidase codiert und das durch Einbringen von *bleo<sup>R</sup>*, UP- und DW-Bereich unterbrochen wurde; *ori*, Replikationsursprung; *amp<sup>R</sup>*, Ampicillin-Resistenzkassette.

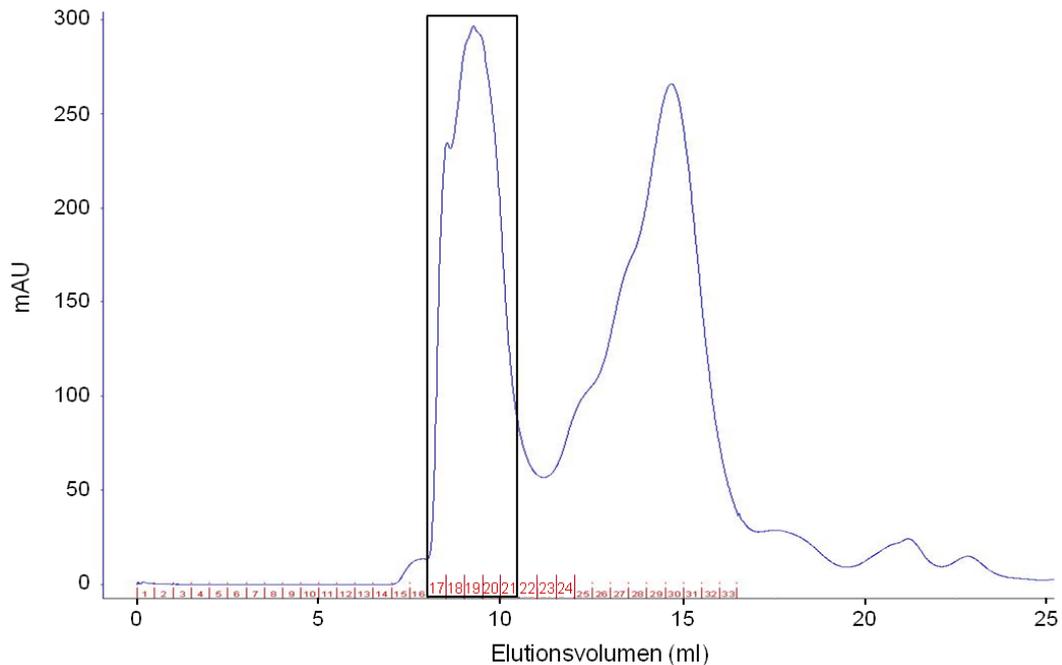
## 7.2 Elutionsprofile von Gelfiltrationen



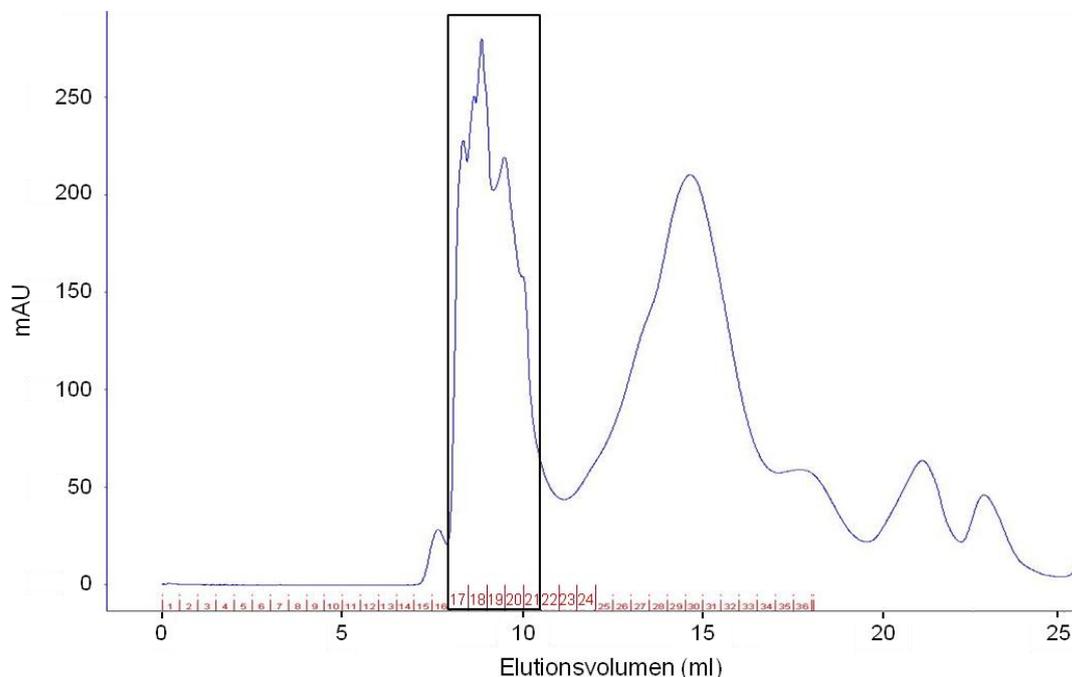
**Abb. A7. Repräsentatives Elutionsprofil der Gelfiltration zur Aufreinigung von ComZ-His<sub>9</sub> aus *T. thermophilus*.** Nachdem ComZ-His<sub>9</sub> aus solubilisierten Membranen mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie angereichert wurde (siehe Kapitel 2.6.4 und 3.2.2), erfolgte eine Gelfiltration mit einer „Superdex 200 (10/300)“-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg). Die Equilibrierung und Elution erfolgte mit ComZ-Puffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM CaCl, pH 8,4) mit 0,4 mM DDM, die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Die 0,4-ml-Fractionen sind rot nummeriert. Die Fractionen 25 - 33 (Kasten) enthielten ComZ-His<sub>9</sub> (siehe Abb. 3.15 C), wurden vereinigt und für weitere Analysen verwendet.



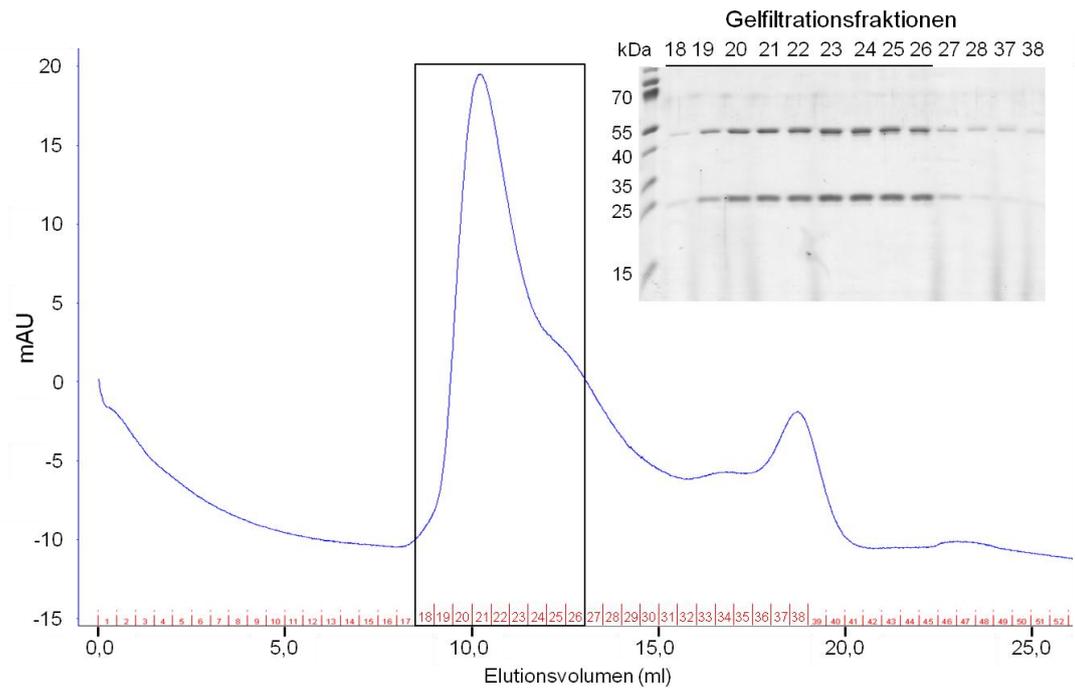
**Abb. A8. Repräsentatives Elutionsprofil der Gelfiltration zur Aufreinigung von PilF<sub>WT</sub> aus *E. coli* BL21 (DE3).** Nach Hitzeinkubation und Ni-NTA-Affinitätschromatographie der His<sub>6</sub>-PilF-haltigen Proben (siehe Kapitel 2.6.1 und 3.3.1), erfolgte eine Gelfiltration mit einer „Superdex 200 (10/300)“-Säule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg). Die Equilibrierung und Elution erfolgte mit Bicine-Puffer (50 mM Bicine, 200 mM NaCl, pH 8,5), die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Die Fractionen 17 - 21 (Kasten) enthielten His<sub>6</sub>-PilF (siehe Abb. 3.19 A), wurden vereinigt und für Analysen verwendet.



**Abb. A9. Repräsentatives Elutionsprofil der Gelfiltration zur Aufreinigung von PilF<sub>K654A</sub> aus *E. coli* BL21 (DE3).** Nach Hitzeinkubation und Ni-NTA-Affinitätschromatographie der His<sub>6</sub>-PilF-haltigen Proben (siehe Kapitel 2.6.1 und 3.3.1), erfolgte eine Gelfiltration mit einer „Superdex 200 (10/300)“-Säule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg). Die Equilibrierung und Elution erfolgte mit Bicine-Puffer (50 mM Bicine, 200 mM NaCl, pH 8,5), die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Die 0,5-ml-Fractionen sind rot nummeriert. Die Fractionen 17 - 21 (Kasten) enthielten His<sub>6</sub>-PilF (siehe Abb. 3.19 B), wurden vereinigt und für weitere Analysen verwendet.



**Abb. A10. Repräsentatives Elutionsprofil der Gelfiltration zur Aufreinigung von PilF<sub>E718A</sub> aus *E. coli* BL21 (DE3).** Nach Hitzeinkubation und Ni-NTA-Affinitätschromatographie der His<sub>6</sub>-PilF-haltigen Proben (siehe Kapitel 2.6.1 und 3.3.1), erfolgte eine Gelfiltration mit einer „Superdex 200 (10/300)“-Säule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg). Die Equilibrierung und Elution erfolgte mit Bicine-Puffer (50 mM Bicine, 200 mM NaCl, pH 8,5), die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Die 0,5-ml-Fractionen sind rot nummeriert, die Fractionen 17 - 21 (Kasten) enthielten His<sub>6</sub>-PilF (siehe Abb. 3.19 C), wurden vereinigt und für weitere Analysen verwendet.



**Abb. A11. Repräsentatives Elutionsprofil der Gelfiltration zur Aufreinigung von His<sub>6</sub>-PilMNO-Strep aus *E. coli* T7 Express** Nachdem der His<sub>6</sub>-PilMNO-Strep-Komplex aus solubilierten Membranen mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie angereichert wurde (siehe Kapitel 2.6.3 und 3.5.1), erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt mittels Gelfiltration mit einer „Superdex 200 (10/300)“-Säule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg). Die Equilibrierung und Elution erfolgte mit MNO-Puffer (25 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % (v/v) Glycerin, pH 8,0) mit 0,4 mM DDM, die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Proben der Peak-Fractionen wurden in einem 16 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit „Coomassie Brilliant Blue“ gefärbt (eingelassenes Gelbild). Die 0,5-ml-Fractionen sind rot nummeriert. Die Fraktionen 18 - 26 (Kasten) enthielten His<sub>6</sub>-PilMNO-Strep-Komplexe, wurden vereinigt und für weitere Analysen verwendet.

---

# Lebenslauf

## Kerstin Kruse

### Ausbildung

- Seit 02/2014      **PhD, Molekulare Mikrobiologie**  
Goethe-Universität Frankfurt am Main, AK Prof. Dr. Averhoff  
Der DNA-Translokator und Typ-IV-Pilus von *Thermus thermophilus* HB27: Funktion und Interaktion von Komponenten der verknüpften Systeme.
- 01/2013 - 04/2013      **Praktikum am Centre for Bacterial Cell Biology**  
Newcastle University, Vereinigtes Königreich, AK Prof. Dr. Hamoen  
Untersuchungen zur Lokalisierung membrangebundener Proteine in *E. coli* und *B. subtilis* mittels verschiedener Fluoreszenzmikroskopie-Techniken.
- 10/2011 - 11/2013      **Master of Science Microbiology and Biochemistry**  
Georg-August Universität Göttingen,  
Allgemeine Mikrobiologie, AK Prof. Dr. Stülke  
The link between the enzymatic activity of YmdB and its role in biofilm formation in *Bacillus subtilis*.  
Note: **1.0** mit Auszeichnung
- 10/2008 - 08/2011      **Bachelor of Science Biologie**, Schwerpunkt molekulare Biowissenschaften, Georg-August Universität Göttingen,  
Molekularbiologie und Physiologie der Pflanze, AK Prof. Dr. Gatz  
Analyse des Zusammenspiels des Transkriptionsfaktors MYC2 mit dem TGA/SCL14 Komplex an synthetischen Promotoren mit unterschiedlichen Kombinationen von MYC2- und TGA-Bindestellen.  
Note: **1.2** mit Auszeichnung

---

## Publikationen

**Kruse K**, Salzer R, Averhoff B. 01/2019

The traffic ATPase PilF interacts with the inner membrane platform of the DNA translocator and type IV pili from *Thermus thermophilus*.

*FEBS open bio.* **9**: 4-17

Kampf J, Gerwig J, Kruse K, Cleverley R, Dormeyer M, Grünberger A, Kohlheyer D, Commichau FM, Lewis R J, Stülke J. 09/2018

Selective pressure for biofilm formation in *Bacillus subtilis*: Differential effect of mutations in the master regulator SinR on bistability.

*mBio.* **9**: e01464-18

**Kruse K**, Salzer R, Joos F, Averhoff B. 02/2018

Functional dissection of the three N-terminal general secretory pathway domains and the Walker motifs of the traffic ATPase PilF from *Thermus thermophilus*.

*Extremophiles.* **22**: 461-471

Köster J, Thurow C, **Kruse K**, Meier A, Iven T, Feussner I, Gatz C. 05/2012

Xenobiotic- and jasmonic acid-inducible signal transduction pathways have become interdependent at the Arabidopsis CYP81D11 promoter.

*Plant Physiol.* **159**: 391-402