

**Untersuchungen zu invasionspezifischen Proteinen von
Holospora obtusa,
einem Bakterium aus dem Makronukleus von
Paramecium caudatum.**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der
Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Steffen Schwarz
aus Böblingen

Hauptberichter: Prof. Dr. H.-D. Götz
Mitberichter: Prof. Dr. R. Gosh
Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2002

Biologisches Institut der Universität Stuttgart

2002

Diese Arbeit wurde von mir selbständig und nur mit Hilfe der angegebenen Mittel durchgeführt.

Abkürzungen.....	8
Zusammenfassung	9
Summary	11
Einleitung.....	13
Bakterien und Symbiosen	13
Vorkommen und Arten der bakteriellen Symbiosen	13
Protozoen als Wirte intrazellulärer Bakterien	13
Endonukleäre Bakterien	14
Die Holospora-Paramecium-Symbiose als Modell	14
Das Zusammenleben von <i>Holospora obtusa</i> und <i>Paramecium caudatum</i>	14
Grundsätzliches zu Infektionsmechanismen	18
Adhäsion.....	18
Internalisierung	18
Umgehen oder Ausschalten der intrazellulären Abwehrmechanismen.....	18
Wachstum und Vermehrung (intrazelluläre Phase).....	19
Freisetzung der Symbionten.....	19
Zielsetzung der Arbeit.....	19
Material und Methoden	20
Experimentelle Phasen	20
Proteinbiochemische und molekularbiologische Untersuchungen zum 15,5 kDa Protein	20
Lokalisation von mRNA des 15,5 kDa Proteins mittels FISH	20
Untersuchungen zu Wechselwirkungen von Wirts- und Bakterienproteinen	20
Organismen und Kultivierung	21
<i>Paramecium caudatum</i> -Kulturen, nicht-infiziert.....	21
<i>Paramecium caudatum</i> -Kultur, infiziert mit <i>Holospora obtusa</i>	21
<i>Pseudomonas putida</i> Kulturen.....	21
<i>Escherichia coli</i> Kultur	22
Waschen der Paramecien Kulturen.....	22
Proteinbiochemische Methoden	22
Isolierung infektiöser <i>Holospora obtusa</i> -Bakterien aus den Makronuklei von <i>Paramecium caudatum</i> ...	22
Isolation der Phagosomen-Proteine aus <i>P. caudatum</i>	23

Phagosomenisolation aus <i>P. caudatum</i>	23
Herstellung der <i>Magnetobeads</i>	24
Proteingewinnung aus Phagosomen	24
Zellaufschluss und Proteingewinnung aus Bakterien	25
Isolation periplasmatischer Proteine aus <i>E. coli</i>	25
Proteinfällung aus dem Mediumsüberstand einer Bakterienkultur mit TCA	25
Herstellung der löslichen und unlöslichen zytoplasmatischen Proteinfraction	25
Gesamtproteingewinnung für die SDS-PAGE	26
Zellaufschluss für die Isoelektrische Fokussierung (IEF)	26
Gelelektrophoresen	26
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
Zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese	27
Färbung von Proteingelen	27
Silberfärbung der Polyacrylamidgele	28
Coomassie-Färbung der Polyacrylamidgele	28
<i>Semi-Dry-Blotting</i> : Proteintransfer auf PVDF-Membranen	28
Herstellung von <i>Dot Blots</i>	28
Färben der Western Blots	29
Amido-Schwarz Färbung	29
Coomassie Brilliant Blue R 250 Färbung	29
Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine	29
Digoxigenin-Markierung von Proteinen	29
Markierungsreaktion	29
Mikrosequenzierung der N-Terminalen Aminosäuresequenz	30
Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen auf Membranen	30
Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	30
Verwendete DNA-Sonden	30
Herstellung der 155-FAS DNA-Sonden	30
FISH an ganzen infizierten <i>P. caudatum</i> -Zellen	32
FISH an isolierten <i>H. obtusa</i> und <i>E. coli</i> Zellen	33
Laser-Scanning-Mikroskopie, Fluoreszenzfarbstoffe und optische Bedingungen	33
Molekularbiologische Arbeitsmethoden	34
Bestimmung des DNA- bzw. RNA-Gehalts einer wässrigen Lösung	34
DNA-Fällung	34
Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	34
Vertikale Agarose-Gelelektrophorese	34
Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
Genomische Phagen-Genbank von <i>H. obtusa</i>	35
Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	36
Plasmid pGEM-T	37
Plasmid pET38b	37
Eingesetzte DNA-Oligonukleotide	38
Genbanksuche mit der PCR	41

Klonierung der Genbank-PCR-Fragmente	42
Isolation und Reinigung der PCR-Fragmente	42
<i>A-Tailing</i> , Ligation und Transformation von <i>E. coli</i>	42
Konstruktion eines pGEM-T Plasmids mit kompletter DNA-Sequenz des 15,5 kDa Proteins	48
Konstruktion eines pGEM-T Plasmids mit DNA-Sequenz des 15,5 kDa Proteins ohne Signalpeptid und Stoppcodon.....	48
Suche nach positiven Klonen (<i>Blue/White-Screening</i>).....	48
Restriktionsverdau und Aufarbeitung behandelter DNA.....	48
Konstruktion des Expressionsvektors pET38b CEB mit dem ganzen ORF des 15,5 kDa Proteins	49
Darstellung der Wirtsplasmide und Einbaufragmente	49
Ligation der Fragmente und Transformation der Wirtszellen	49
Konstruktion des Expressionsvektors pET38b PNB ohne <i>Holospira</i> -eigenes Signalpeptid	51
Darstellung der Wirtsplasmide und Einbaufragmente	51
Ligation der Fragmente und Transformation der Wirtszellen	51
Sequenzierung von DNA mittels <i>Cycle-Sequencing</i>	53
Cycle-Sequencing-Methode	53
Cycle-Sequencing-Reaktion	53
Sequenzier-Gelelektrophorese	54
Methoden für die Elektronenmikroskopie	55
Fixierung und Einbettung.....	55
Einbettung in <i>LR-White</i> -Kunstharz	55
Einbettung in <i>Spurr</i> -Kunstharz	55
Einbettung in <i>Epon</i> Kunstharz	55
Schneiden, Kontrastieren und Betrachtung unter dem Elektronenmikroskop.....	56
Immunologischer Nachweis auf Schnitten.....	56
Ergebnisse - Das 51,5 kDa Protein von <i>H. obtusa</i>	57
Isolation der Phagosomen.....	57
Wechselwirkungen zwischen freien Phagosomen-Proteinen und geblotteten Proteinen aus <i>H. obtusa</i>	60
Proteinisolation und Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenz des 51,5 kDa Proteins.....	61
Phagen-Genbank-Suche mittels PCR und Klonierung der PCR-Produkte.....	61
Konstruktion der pGEM-T 50kDFor und pGEM-T 50kDRev Plasmide	62
Sequenzanalyse und Sequenzvergleich in Nukleinsäure- und Proteindatenbanken.....	62
Lektin-Bindung an phagosomale Proteine von <i>P. caudatum</i>	67

Ergebnisse - Das 15,5 kDa Proteins von <i>H. obtusa</i>	70
Phagen-Genbank-Screening mittels PCR und Klonierung der PCR-Produkte.....	70
Konstruktion des Leserahmens des 15,5 kDa Proteins mit <i>Holospira</i> -Signalpeptid.....	70
Konstruktion des Leserahmens des 15,5 kDa Proteins ohne <i>Holospira</i> -Signalpeptid...	70
Sequenzinformation zum Gen des 15,5 kDa Proteins.....	71
Analyse der Gesamt-DNA-Sequenz des Gens des 15,5 kDa Proteins	71
Konstruktion eines Expressionsplasmids mit komplettem Leserahmen des 15,5 kDa Proteins	73
Konstruktion eines Expressionsplasmids mit Leserahmen des 15,5 kDa Proteins mit plasmideigenem Signalpeptid	73
Expressionsversuche: Transformation und Expression in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	73
Expressionsversuche: Zeit- und IPTG-Reihen	74
Expressionsversuche: Eigenschaften der expremierten Proteine	76
Expressionsversuche: Kompartiment-Verteilung und Antigennachweise.....	78
EM-Immunonachweis und EM-Strukturbilder	81
Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	83
Diskussion	87
Phagosomenisolation	87
Protein-Protein-Wechselwirkungen	88
Sequenzanalyse des 51 kDa Protein	89
Lektin-Bindungen an phagosomale Proteinen von <i>P. caudatum</i>	93
DNA und Aminosäuresequenz des 15,5 kDa Proteins von <i>H. obtusa</i>	93
Expressionversuche des 15,5 kDa Proteins in <i>E. coli</i>	94

Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	96
Schlussfolgerung	98
Literaturverzeichnis	101
Danksagung	114
Lebenslauf	115
Persönliche Daten	115
Ausbildung	115
Praktische Tätigkeiten	115

Abkürzungen

BCIPT	5-Bromo-4-Chloro-Indolyolphosphat
BPB	Bromphenolblau
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> Stamm
CEB	<i>E. coli</i> Stamm BL21 (DE3) mit pET38 Plasmid und <i>H. obtusa</i> Gen für das 15,5 kDa Protein mit Signalpeptid.
DMSO	Dimethylsulfonyloxid
DTT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat-Essigsäure
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
H ₂ O _{demin}	Demineralisiertes Wasser
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IAA	Iodacetamid
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid
KLSM	Konfokales <i>Laser Scanning</i> Mikroskop
MKA14	Monoklonaler Antikörper gegen ein 15 kDa Protein aus <i>H. obtusa</i>
NBT	Nitro Blue Tetrazoliumsalz
p.a.	<i>pro analysi</i> (sehr reine Form einer Substanz)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit 0,1 % (v/v) Detergenz Tween 20
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pfu	<i>plaque forming unit</i> ↔ 1 Bakteriophage
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i> (thermophiles Bakterium)
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluoride
PNB	<i>E. coli</i> Stamm BL21 (DE3) mit pET38 Plasmid und <i>H. obtusa</i> Gen für das 15,5 kDa Protein ohne Signalpeptid.
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RNA	Ribonukleinsäure
TCA	Trichloressigsäure
TE	TRIS / EDTA
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
mRNA	Messenger-RNA
NaPP	Natrium-Phosphatpuffer

Zusammenfassung

Bakterien, die innerhalb anderer Zellen leben, sind aus zellbiologischer wie auch aus medizinischer Sicht interessant. Sie überwinden die äußere Zellmembran ihrer Wirte und überleben innerhalb der Zellen. Dazu sind vielfältige und bislang meist unbekannte Wechselwirkungen mit der Wirtszelle nötig. Weiterhin sind bakterielle Infektionen wieder auf dem Vormarsch. Besonders intrazelluläre Erreger sind schwer zu erkennen und zu behandeln, denn sie entziehen sich der wirtseigenen Immunabwehr. Ein einheitlicher Infektionsmechanismus konnte bei den vielen verschiedenen Bakterien bisher nicht gefunden werden. Umso wichtiger erscheint die Aufklärung der verschiedenen Infektions- und Überlebensmechanismen von intrazellulären Bakterien, zumal dabei vermutlich zellbiologische Mechanismen eine Rolle spielen.

Ziel war es, infektionsrelevante Proteine des endonukleären Bakteriums *Holospira obtusa* zu finden und zu untersuchen. *H. obtusa* lebt ausschließlich im Makronukleus des Ciliaten *Paramecium caudatum*. Um Zellbestandteile von *H. obtusa* zu untersuchen, wurden zytologische, proteinbiochemische und molekularbiologische Methoden eingesetzt. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf Proteinen, die während des Infektionsvorgangs gebildet oder abgebaut werden.

Zunächst wurde nach einer Wechselwirkung zwischen den Oberflächen von *H. obtusa* und *P. caudatum* gesucht. Hier wurden Protein-Proteinwechselwirkungen der inneren Phagosomenmembran und der äußeren Oberfläche von *H. obtusa* untersucht. Dazu wurden Proteine aus ganzen Phagosomen isoliert, mit Digoxigenin markiert und mit geblottetem *H. obtusa* Gesamtprotein im *Overlay-Blotting*-Verfahren zusammengebracht, um wechselseitige Bindungen nachzuweisen. Damit wurde ein 51,5 kDa Protein von *H. obtusa* als bakterielles Bindeprotein identifiziert.

Aufgrund der N-terminalen Aminosäuresequenz wurde ein Satz degenerierter Oligonukleotide hergestellt und für eine Genbanksuche mittels der PCR verwendet. Resultierende Fragmente wurden kloniert, sequenziert und mit Gendatenbanken verglichen. Es konnte ein offener Leserahmen gefunden werden, der Ähnlichkeiten zu mehreren Proteinen aus human- und pflanzenpathogenen Bakterien aufweist. Ein gemeinsames Grundmuster der verwandten Proteine weist auf die Fähigkeit, Zuckerreste auf Oberflächenstrukturen zu erkennen, hin. Daher wurden mit Lectinen phagosomale Proteine untersucht, um mögliche Zielstrukturen für das 51,5 kDa aus *H. obtusa* zu identifizieren. Die Lectine markierten ein Galaktose-haltiges 67 kDa Protein aus Phagosomen von *P. caudatum*.

Ein 15,5 kDa Protein, das hauptsächlich im Periplasma der Bakterien vorliegt, verschwindet während der Infektion aus dem Periplasma. Mittels ein- und zweidimensionaler Gelelektrophorese und einem monoklonalen Antikörper konnte es dargestellt und isoliert werden. N-terminale Sequenzierung und Analyse des Gens in Stuttgart und Montreal (Kanada) ergaben ein saures Protein, dem ein Signalpeptid aus 21 Aminosäuren voraus geht. Gleiche oder ähnliche Aminosäuresequenzen konnten in Gendatenbanken bisher nicht gefunden werden. Die Klonierung und Expression erfolgte mit den Plasmiden pGEM-T und dem pET38b(+) in *E. coli*. Dort wurde das Fusionsprotein nach Expression immunzytologisch im Zytoplasma wie auch im Periplasma nachgewiesen. Die *Holospira* Signalsequenz des 15,5 kDa wurde von *E. coli* zumindest nicht korrekt erkannt, was zu Protein-Konglomeraten im Zytoplasma führte. Anreicherung und Reinigung des Proteins erfolgte über Cellulosesäulen, an welche die *Cellulose Binding Domain*, die im Fusionsprotein dem 15,5 kDa Protein vorangestellt ist, bindet.

Um mehr über die Regulation der Expression des Proteins zu erfahren, wurden basierend auf der DNA-Sequenz Fluoreszenz-markierte DNA-Oligonukleotide verwendet, womit die mRNA mit der

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) in *H. obtusa* nachgewiesen werden konnte. Es wurde ein stadienspezifischer Expressionverlauf beobachtet. In infektiösen Formen konnte keine mRNA des Gens nachgewiesen werden, wogegen in reproduktiven Formen und in Zwischenstufen deutliche Mengen an transkribierter mRNA vorlagen. Dies lässt eine kontrollierte zeitliche Trennung von Transkription und Translation vermuten.

Summary

Bacteria which live inside other organisms are often agents of infections of animals and mammals. These bacteria are able to protect themselves from the host defence mechanisms. Thus, they become hard to fight. Furthermore, the ability to live inside the host cell may increase the resistance against antibiotics because the host cell may inhibit the activity of the antibiotics too. Evidently, the elucidation of the invasion and surviving mechanisms is the most important step for a successful development of therapies and antibacterial drugs directed against the worst bacterial diseases.

The targets of this thesis were to find proteins which are involved in the invasion of the macronucleus of the ciliate *Paramecium caudatum* by the endonuclear bacterium *Holospira obtusa*. Especially proteins which were expressed or degraded in *H. obtusa* as the invasion proceeds were in the focus of interest. Furthermore, the expression of such *Holospira* proteins should be elucidated. Also surface proteins of the host and the symbiont should be investigated concerning possible protein-protein interactions. To get information about proteins of *H. obtusa* and *P. caudatum*, cytological (FISH, electronic microscopy), biochemical (SDS-PAGE and 2D-gel electrophoresis) and molecularbiological (cloning, sequencing, expression in *E. coli*) methods were performed.

An early step of host-symbiont interaction takes place in the phagosome, where bacterial surface structures and phagosome membrane proteins are involved. Both, bacterial total cell protein and total phagosomal protein had to be purified. Therefore, a known method using magnetic dextran beads was optimized to obtain purer proteins. First of all, the size of the magnetic beads was equalized by using ultrasonic sound. As a result, the amount of generated phagosomes was higher. And the phagosomes became more stable. The combination of magnetic separation followed by a centrifugation step brought forth a sufficient amount of pure phagosomes, which could be used for further biochemical investigations. The isolated proteins of food vacuoles of *P. caudatum* were labelled by FITC and used for the detection of specific *H. obtusa* proteins on Western blots. As a result of this detection method, a 51,5 kDa protein of *H. obtusa* was identified. Positive protein spots were cut out and used for the sequencing of the N-terminal amino acids.

Based on these results, a set of degenerated primers was used to screen a genomic phage library of *H. obtusa* by using the polymerase chain reaction (PCR). DNA from positive clones was amplified by PCR. Resulting DNA fragments were cloned into a pGEM-T vectors and were subsequently sequenced. There was only one reading frame resulting in a reasonable amino acid sequence. The complete DNA sequence codes for a 51,5 kDa protein with an extremely high isoelectric point (pH 12,4). A start codon of methionine was not located at the beginning of the DNA sequence. An explanation may be the fact that the purified protein was mainly derived from the periplasm. Such proteins normally contain leader peptides at the N-terminus to get through the inner membrane into the periplasm. Probably, the start amino acid was located at the beginning of the leader peptide.

The amino acid and DNA sequence data were compared to other DNA and protein databases. Similarities to some proteins of human- and plant pathogenic bacteria were found. Mainly proteins possessing the ability to bind and react with carbohydrate structures show amino acid sequences similar to the 51,5 kDa protein of *H. obtusa*. Some proteins of these bacteria are also able to bind to the outer membrane structures of different hosts. Therefore, both protein features are postulated for the 51,5 kDa protein of *H. obtusa*, reminding an important step of invasion of host cells: recognition and adherence to the

host surface. One may see the 51,5 kDa protein of *H. obtusa* as a major protein managing an initial step of invasion.

Another focus was set on a 15.5 kDa protein, which was mainly observed in the periplasm of the bacteria. Using two dimensional gelelectrophoresis and monoclonal antibodies, it was possible to detect and purify the 15.5 kDa protein. The sequencing of the N-terminal amino acid sequence and the corresponding DNA resulted in a acidic protein, which is preceded by a signal peptide of 21 amino acids. No related protein or DNA sequence could be found in databases. Therefore the 15.5 kDa protein was postulated to be a new invasion linked protein, playing a special role in the invasion of *P. caudatum*.

The cloning and expression of the coding sequence of the 15.5 kDa protein was performed in *E. coli* using the pET38b(+) system. The protein coding region of *H. obtusa* was used in combination with a signal peptide encoded on the plasmid. After the successful expression the protein was detected exclusively in the cytoplasm where inclusion bodies could be observed. The signal peptide of *H. obtusa* was obviously not recognized by *E. coli*, which was causing the inclusion bodies inside the zytoplasm of *E. coli*. On the other hand, the *Holospira* specific signal peptide was expressed together with the main protein. Afterwards, the 15,5 kDa protein was found in the periplasm as well as in the zytoplasm of *E. coli*. Remarkably, no inclusion bodies could be found in this case. Furthermore, the periplasm of *E. coli* was expanded, reminiscent of the enlarged periplasm of *H. obtusa*. Obviously, the expression of the 15.5 kDa protein and its translocation into the periplasm occurs during the period inside the host's macronucleus. Neither the transcription takes place in the infectious or activated form. Nor the 15,5 kDa protein could be detected in the reproductive form. To trace the time relation between transcription and translation of the 15.5 kDa protein during the life cycle of *H. obtusa*, some dye labelled DNA oligonucleotides were used to detect genespecific mRNA by using the fluorescent *in situ* hybridisierung (FISH). A stage dependent transcription was observed, limited to the reproductive and intermediate form of *H. obtusa*. However, no gene specific transcript could be observed in infectious or activated forms. It is assumed that transcription started in the reproductive form, continuing in the inactive infectious form. Whereas the translation of the transcripts is limited to the intermediate and early infectious form. This is raising the question, why does transcription occur in the reproductive form when no expressed protein could be detected there.

Furthermore, only starving *Holospira* bacteria develop into the infectious form. An explanation can be given by postulating a temporally stepwise expression. The transcription always occurs on a certain level in the reproductive form but translation is only induced after it is triggered by a starvation signal triggers the further steps. This guarantees a fast reaction on the danger of starvation.

Einleitung

Bakterien und Symbiosen

Vorkommen und Arten der bakteriellen Symbiosen

Bakterien zählen zu den ältesten aber auch einfachsten zellulären Lebensformen. Sie kommen nahezu überall vor und leben mit vielen anderen Lebensformen (z.B. Bacteriophagen, Protisten oder mehrzelligen Organismen) sehr eng zusammen. Dadurch beeinflussen sie ihre Umwelt erheblich. Inwieweit man im Einzelnen von Symbiosen sprechen kann, hängt in hohem Maße von der genauen Kenntnis der Wechselwirkungen ab. Die Definition einer Symbiose soll hier nach DE BARY (1879) erfolgen, der eine Symbiose in jeder Form der Abhängigkeit zwischen den beteiligten Lebewesen sah. Einen Sonderfall bilden hier die intrazellulären Bakterien. Sie sind schon von Natur aus gezwungen, mehr oder weniger enge Wechselwirkungen mit ihrem Wirt einzugehen, da sie ihren Wirt nicht nur erkennen, sondern auch in ihn eindringen und dort überleben müssen. Dabei sind pathogene Bakterien aufgrund ihrer negativen Wirkungen für Mensch und Tier am besten untersucht (COHEN, 2000). Die Untersuchung und Aufklärung der Wechselwirkungen zwischen Wirt und Erreger stehen dabei im Vordergrund, um Ansatzpunkte für Bekämpfung und Prophylaxe zu erhalten. So sind schwere Krankheiten wie zum Beispiel Tuberkulose, Listeriose und die Legionärs Krankheit auf den Befall mit intrazellulären Bakterien zurückzuführen. Sie entziehen sich der Immunabwehr des Wirtes und besiedeln ihn quasi von innen (MOULDER, 1985). Daher sind sie schwer nachzuweisen und noch schwerer zu bekämpfen. Als Beispiele seien hier Mycobakterien (SCHOREY ET AL., 1997), Legionellen (KWAIK, 2000), Listerien (ROUQUETTE, ET AL 1996) oder Chlamydien (EVERETT, 2000) genannt. Andererseits ist die Tatsache, dass Bakterien so eng mit anderen Lebensformen zusammen leben, schon oft als eine Grundvoraussetzung für die evolutionäre Entstehung von höheren Zellen (Eukaryoten) gesehen worden (CORSARO ET AL., 1999; HENZE, 1995; MARGULIS, 1971+1976; TAYLOR, 1979).

Protozoen als Wirte intrazellulärer Bakterien

Auch Protozoen werden von intrazellulären Bakterien befallen (PREER UND PREER, 1984). Dies ist insofern von Interesse, weil diese Wirtszellen nahezu überall im Wasser und im Boden vorkommen und als Zwischenwirte für humanpathogene Bakterien dienen (GAO ET AL, 1997; MICHEL ET AL 1995). Auch indirekt können solche intrazellulären Prokaryonten dem Menschen schaden, so zum Beispiel während toxischer Algenblüten. Hier werden intrazelluläre Bakterien als Produzenten der Toxine vermutet (KODAMA ET AL., 1990; FRANCA ET AL., 1995). Bei Symbiosen zwischen Bakterien und Protozoen (GÖRTZ UND BRIGGE, 1998; HACKSTEIN UND VOGELS, 1997) sind in vielen Fällen noch längst nicht alle Wechselwirkungen bekannt (GÖRTZ, 1983; HECKMANN UND GÖRTZ, 1991), wobei hier die Definition der Symbiose nach DE BARY (1879) erfolgt. Es werden immer wieder neue bakterielle Symbiosen bei Einzellern gefunden (PLATT-ROHLOFF, 1997). Vor allem bieten sie den Vorteil, dass alle Vorgänge während der Infektion als auch alle nötigen Untersuchungen an nur einem Zelltyp untersucht werden können.

Endonukleäre Bakterien

Ein Sonderfall der intrazellulären Bakterien sind die endonukleären Bakterien (GÖRTZ, 1983; 1986), die ausschließlich die Zellkerne ihrer Wirte befallen. Dort leben sie nicht nur unbehelligt von der Immunabwehr, sondern entziehen sich auch den intrazellulären Abwehrmechanismen. Es sind bisher nur wenige Bakterienarten bekannt, die zeitweise oder ständig im Zellkern eines Eukaryoten leben (PLATT-ROHLOFF, 1997; PREER ET AL., 1974; SCHAECHTER ET AL., 1957; STENZEL UND BOREHAM, 1994; HORN ET AL., 2000). Die wohl erfolgreichsten und bekanntesten Bakterien bei der Besiedlung eines Zellkerns ist die Gattung *Holospora*. Diese Gattung besteht aus Gram-negativen, unbeweglichen Bakterien, die der Untergruppe der alpha-Proteobakterien angehören und phylogenetisch mit den Rickettsien verwandt sind (AMANN ET AL., 1991; PREER UND PREER, 1984; SPRINGER ET AL., 1993). Bemerkenswerter Weise findet man bestimmte *Holospora*-Arten entweder nur in Makro- oder Mikronuklei ihrer Wirte aus der Gattung *Paramecium* (FOKIN ET AL., 1996; GÖRTZ ET AL., 1992a; HECKMANN UND GÖRTZ, 1991; OSSIPOV UND PODLIPAEV, 1977; PREER, 1969; PREER UND PREER, 1982; PREER ET AL., 1984; SKOBLO ET AL., 1985; SKOBLO UND LEBEDEVA, 1985; SKOVORODKIN ET AL., 2001).

Die Holospora-Paramecium-Symbiose als Modell

Ähnlichkeiten zwischen der *Holospora-Paramecium*-Infektion und den Chlamydien- oder Rickettsieninfektionen machen die *Holospora-Paramecium*-Symbiose zu einem interessanten Ersatz für Untersuchungen an pathogenen Bakterien-Wirts-Systemen, da *Holospora* Bakterien von sich aus bisher nur Paramecien erfolgreich besiedeln. Die Chlamydien sind obligat intrazelluläre Gram-negative Bakterien, die von ihren Wirtszellen auch phagozytiert werden. Sie weisen ebenfalls einen infektionsabhängigen Dimorphismus auf, der aus infektiöser Form (Elementarkörperchen) und reproduktiver Form (Retikularkörper) besteht (SCHAECHTER, 1988). Sie bleiben während der gesamten Infektion in den Phagosomen, wobei sie die Fusion mit den Lysosomen aktiv unterbinden. Rickettsien hingegen leben im Cytoplasma, sind aber auch schon im Zellkern ihrer Wirte beobachtet worden (SCHAECHTER ET AL., 1957). Sie weisen ebenfalls zwei Lebensformen auf. Eine sich teilende, bewegliche Form und eine ruhende unbewegliche Form (KOKORIN, 1968).

Das Zusammenleben von *Holospora obtusa* und *Paramecium caudatum*

Eine Symbiose besonderer Art ist bei *Paramecium caudatum* und *Holospora obtusa* zu beobachten (ex HAFKINE 1890; OSSIPOV ET AL., 1975). Paramecien kommen nahezu überall im Süß- und Brackwasser vor und weisen wie alle Ciliaten einen Kerndualismus mit Mikro- und Makronukleus auf. *H. obtusa* befällt ausschließlich den polypoiden, somatischen Makronukleus von *P. caudatum*, wobei ein Kern bis zu mehrere Hundert Bakterien enthalten kann. Im Falle von *H. obtusa* ist es bisher nicht gelungen, die Bakterien außerhalb des Wirtskerns zu kultivieren, mit der Folge, dass viele herkömmliche Methoden der Bakteriengenetik nicht anwendbar sind.

Während des Lebenszyklus der Bakterien treten biochemische als auch morphologische Veränderungen auf (FUJISHIMA ET AL., 1990; GÖRTZ ET AL., 1989; GÖRTZ ET AL., 1990), die eng mit dem Infektionsverlauf verbunden sind (GÖRTZ UND WIEMANN, 1989)(Abb. 99). In Anlehnung an diese Unterschiede werden die Bakterien in einzelne Erscheinungsformen unterteilt. Infektiöse Formen (IF) werden vom Wirt aktiv über den Zellmund in ein Phagosom aufgenommen und entwickeln sich dort zu aktivierten Formen

(AF). Fujishima (pers. Mitteilung) postuliert einen Einfluss des niedrigen pH-Werts in den Phagosomen auf die Aktivierung der bislang inaktiven infektiösen Form. Nach Kontakt mit der Phagosomen-Membran legt sich diese eng um das Bakterium. Dabei werden elektronenmikroskopisch nachweisbare Strukturen zwischen Wirtsmembran und Bakterienoberfläche gebildet.

Die Infektion des Paramecien-Makronukleus erfolgt in mehreren Phasen, bei denen Wechselwirkungen zwischen Wirt und Symbiont zu vermuten sind (FUJISHIMA, 1985; GÖRTZ, 1983). Der aktiven Aufnahme des Bakteriums durch den Zellmund folgt der Einschluss in eine Nahrungsvakuole. Nach Berührung mit der inneren Phagosomenmembran legt sich diese, vom Vorderpol beginnend, eng an das Bakterium. Dabei werden elektronenmikroskopisch nachweisbare Strukturen zwischen Wirtsmembran und Bakterienoberfläche gebildet. Diese zweischichtige Hülle wird als primäres Transportvesikel bezeichnet, in dem das Bakterium ins Cytoplasma entlassen wird. Mit Ribosomen besetzte Membranvesikeln, die vermutlich vom Endoplasmatischen Retikulum stammen, lagern sich auf dem Weg zum Makronukleus an das Transportvesikel an und die primären Verbindungen zwischen der Bakterien- und der Vakuolenmembran werden abgebaut. Ähnliche Vorgänge sind auch bei anderen Protozoen und deren intrazellulären Symbionten zu beobachten (KWAİK, 1996).

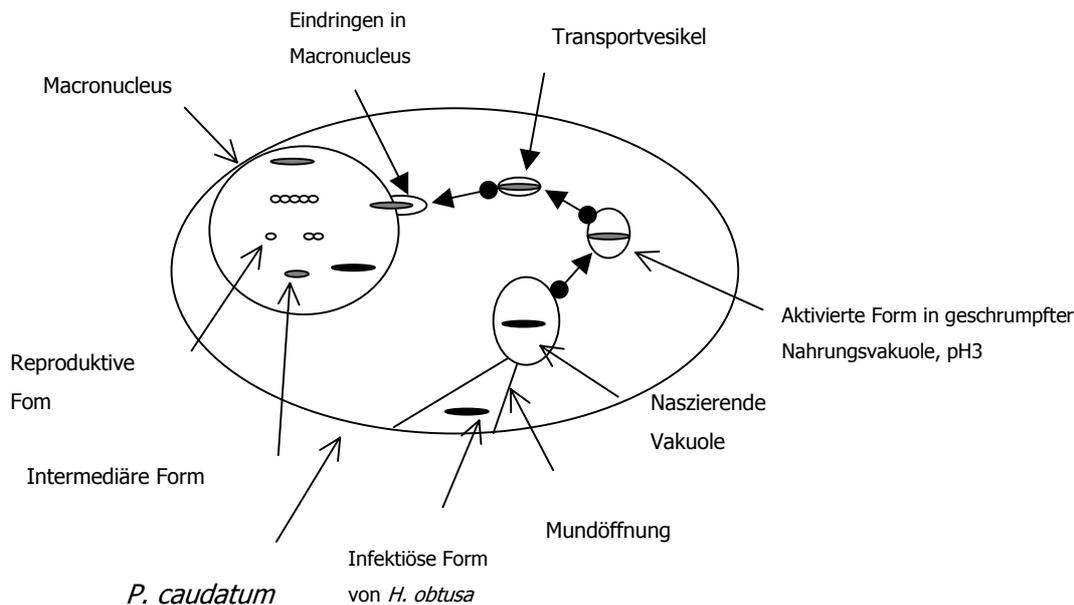
Das neu entstandene, sekundäre Transportvesikel, gelangt schließlich zum Makronukleus, wo die Vesikelmembran mit der Kernhülle verschmilzt und die Bakterien in den Kern überführt werden. Das Erscheinungsbild der Bakterien verändert sich während der Infektion erheblich. Die ingestierte Form ist ohne nachweisbaren Stoffwechsel und weist einen ungewöhnlich großen periplasmatischen Raum auf, der mit elektronendichtem Material gefüllt ist (FUJISHIMA ET AL., 1991; GÖRTZ ET AL., 1989). Diese Form wird als infektiöse Form (IF) bezeichnet und ist ungefähr 15- 20 μm lang. Nur Bakterien in dieser Form sind in der Lage, aus dem Phagosom zu entkommen ohne vorher verdaut zu werden.

Nach Verlassen des Wirtspagosoms verringert sich das Periplasma ständig bis zum Eindringen in den Makronukleus. Parallel dazu nimmt das Cytoplasma an Größe zu. Zu diesem Zeitpunkt wird das Bakterium als aktivierte infektiöse Form (aIF) bezeichnet. Im Makronukleus angekommen zerfällt die aktivierte Form durch Mehrfachteilung in die ca. 2 μm langen reproduktiven Formen (RF). Sie besitzen einen aktiven Stoffwechsel, teilen sich durch Zweiteilung und wandeln sich nach und nach über die intermediäre Form (IMF) in die infektiöse Form um. Nach der Zellteilung des Parameciums wird die infektiöse Form über den Cytoproct in die Umgebung freigesetzt und kann neue Wirte infizieren, während die reproduktiven Formen auf die Tochterkerne verteilt werden (WIEMANN, 1989).

Völlig unklar ist bisher noch, wie es den Bakterien gelingt, in den für sie spezifischen Zellkern in den jeweiligen Wirten zu gelangen, um nur dort zu überleben und sich zu vermehren. Außerdem ist noch nicht bekannt, wie sie die tödlichen Bedingungen im Phagosom umgehen oder abwehren können. Andererseits werden die dort vorherrschenden Bedingungen auch als Auslöser für eine Aktivierung der Bakterien diskutiert (CLEMENS ET AL., 2000, Masahiro Fujishima, pers. Mitteilung). Besonders die Ansäuerung der Nahrungsvakuole (FOK UND ALLEN, 1990) steht bei Paramecien an vorderster Stelle möglicher Auslöser. Sie geht unter anderem mit dem Schrumpfen der Nahrungsvakuole einher, was einen Kontakt zwischen Wirtsmembran und Bakterienoberfläche beschleunigt.

Es ist anzunehmen, dass beim *Holospira-Paramecium*-System, wie auch bei anderen intrazellulären Bakterien und ihren Wirten, proteinbiochemische Wechselwirkungen die Infektionen steuern. Als Beispiele sind hier die Wechselwirkungen mit Zelladhäsions-Molekülen (KERR, 1999), bei *Legionella pneumophila* und *Dictyostelium discoideum* (SOLOMON ET AL., 2000) oder das humanphatogene Bakterium *Listeria monocytogenes* (KUHN UND GOEBEL, 2000) zu nennen. Auch die nächsten Verwandten der Gattung *Holospira*, die Rickettsien, interagieren während der Infektion auf molekularer Ebene mit ihren Wirten (EREMEEVA ET AL., 2000).

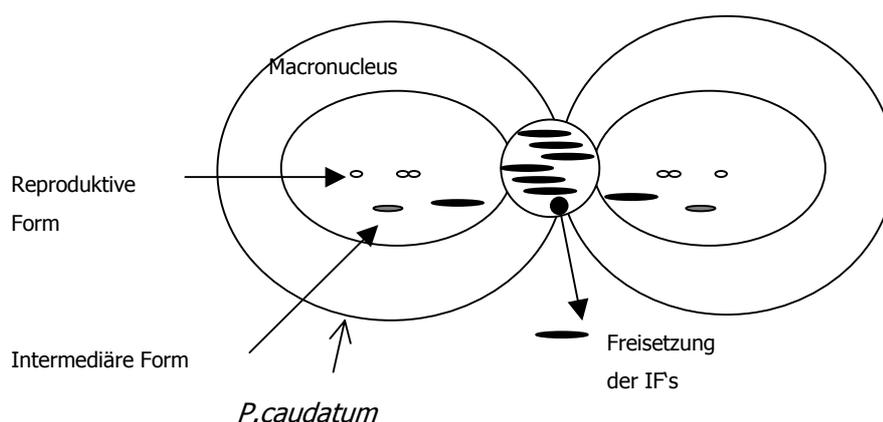
Infektionsvorgang



Insbesondere zuckerbindende Proteine, sogenannte Lektine sind bei einigen Infektionsmechanismen für die Zell-Zell-Erkennung verantwortlich (GILBOA-GARBER ET AL., 1997; VENKATARAMAN ET AL., 1997) und lösen im Wirt als auch im Symbionten infektionsspezifische Reaktionen aus (KWAIK ET AL., 1998; HAN, ET AL., 2000). Die Zerstörung solcher Zuckerreste hat einschneidende Wirkung auf die Infektionsfähigkeit der Bakterien. Die Behandlung von *Klebsiella pneumoniae* mit Concanavalin A verhindert zum Beispiel eine anschließende Infektion potentieller Wirtszellen. (FUMAGALLI ET AL., 1997). Auch bei *H. obtusa* ist zu beobachten, dass nach der Behandlung mit α -Mannosidase ein Eindringen in den

Makronukleus nicht mehr möglich ist (FUJISHIMA ET AL., 1991). Ehrsam und GÖRTZ (1999) konnten ferner eine Wechselwirkung zwischen einem 25 kDa Glykoprotein aus *H. obtusa* und einem Macronucleusprotein aus *P. caudatum* nachweisen. All diesen Erkennungsmechanismen, an denen Lektine beteiligt sind, ist gemeinsam, dass sie an den Oberflächen beteiligter Organismen ablaufen. Dasselbe gilt auch für *H. obtusa* und *P. caudatum*, bei denen der Erstkontakt zwischen Bakterienoberfläche und Innenseite der Nahrungsvakuole stattfindet. FOK UND ALLEN (1990) wiesen in den verschiedenen Stadien der Nahrungsvakuolen unterschiedliche Glykokalyxstrukturen nach, die als mögliche Strukturen in Frage kommen könnten. Die obligate Lebensweise der *Holospora*-Bakterien im Kern ihres Wirts ist sonst nur noch bei den engsten Verwandten, der Gattung *Ceadibacter* zu finden und bei noch nicht genau beschriebenen Arten (BIRTLES et al., 2000; POND ET AL., 1989; SPRINGER ET AL., 1993;). Die anderen bekannten Besiedlungen des Zellkerns sind fakultativer Natur (HARRISON ET AL., 1976 a+b; STENZEL UND BOREHAM, 1994), wobei neben bakteriellen Infektionen auch andere Protozoen die Zellkerne von Cilliaten befallen (GÖRTZ UND DIECKMANN, 1987). Aber bisher konnte noch keine Symbiose nachgewiesen werden, die so zielgerichtet und effektiv im Zellkern eines Eukaryoten etabliert ist wie bei den verschiedenen *Holospora*-Arten (GÖRTZ, 1986). Das Leben innerhalb eines anderen Organismus erfordert einen Grad an Anpassung, der über eine phänotypische Ausprägung deutlich hinausgeht. Ein Austausch von Nukleinsäuren und damit von genetischer Information wurde bereits in *Euglena gracilis* nachgewiesen (HENZE, 1995). Außerdem stellt sich die Frage, ab welchem Zeitpunkt man von Pathogenese und wann von Symbiose spricht (STEINERT ET AL., 2000). Allen intrazellulären Organismen ist daher gemeinsam, dass sie über mehr oder weniger identische Mechanismen verfügen, um sich und den Wirt an die neue Situationen anzupassen (HENTSCHEL ET AL., 2000).

Ausscheidung der IF's



Grundsätzliches zu Infektionsmechanismen

Adhäsion

Um in eine Zelle einzudringen, muss ein Bakterium zuerst seinen Wirt finden und erkennen. Dies kann auf zwei Arten geschehen. Entweder nimmt der zukünftige Wirt von Haus aus Bakterien auf, so wie dies bei professionellen Phagozyten wie Macrophagen und einigen Protozoen (z.B. Paramecium) der Fall ist. Oder es handelt sich um Zellen, die von Natur aus keine Endocytose betreiben (z.B. Epithelzellen). Vor allem fakultativ intrazelluläre Bakterien wie *Salmonella thyphymurium*, *Yersinia pseudotuberculosis* oder *Chlamydia spec.* infizieren meist Zellen, die üblicherweise keine Phagozytose betreiben. Diese Bakterien besitzen Proteine oder Lipopolysaccharide um sich an Oberflächenstrukturen des Wirts zu binden (ISBERG ET AL., 2000; FINLAY UND BRUMELL; 2000, SU ET AL., 1990). Fehlen diese Gegenstücke, so findet keine Anhaftung oder Erkennung statt. Anders sieht es bei Bakterien aus, deren potentieller Wirt sie aktiv aufnimmt, zum Beispiel über die Phagozytose. Hier ist weitaus geringerer Aufwand nötig. *Legionella pneumophila* oder Mitglieder der Gattungen *Rickettsia* und *Holospora* benötigen keinerlei molekülvermittelte Anhaftungshilfen. Sie werden von Natur aus ohne ihr Zutun in Phagosomen aufgenommen. Allerdings stellt die Innenseite solcher Phagosomen ebenfalls eine Oberfläche dar, die eventuell überwunden werden muss, um ins Cytoplasma zu gelangen. Außerdem sind ebenfalls Erkennungsmechanismen mit vorhandenen Oberflächenstrukturen denkbar.

Internalisierung

Ist der richtige Wirt erkannt, erfolgt die passive Aufnahme oder das aktive Eindringen in die Zelle. Aufgrund der oben erwähnten Wege gibt es auch hier Unterschiede. Diesmal jedoch ist es die Wirtsseite, die aktiv werden muss. Hierbei wird das Actin-Myosin-Netzwerk des Wirts aktiv (MOULDER, 1985). Bei professionellen Phagozyten ist das sowieso der Fall. Aber Zellen, die normalerweise keine professionelle Phagozytose betreiben, müssen dieses Netzwerk für eine Aufnahme der Bakterien ins Zellinnere umbauen. Dies geschieht aber wiederum nur nach Anheftung der Bakterien, was den Schluss zulässt, dass die Invasorenseite hier direkten Einfluss auf die Wirtszelle nimmt. Dazu sind natürlich mehr Moleküle notwendig als bei Bakterien, die passiv bleiben können. Letztlich liegen dann alle Bakterien in einem Phagosom oder in sog. parasitophoren Vesikeln.

Umgehen oder Ausschalten der intrazellulären Abwehrmechanismen

Sind die Bakterien erst einmal im Zellinnern, dann erwartet sie dort meist eine lebensfeindliche Umgebung. Vor allem bei Macrophagen und Granulozyten sorgt ein sogenannter *oxidative burst* für eine Abtötung der Bakterien (NEWMAN, 1999). Von vielen Bakterien ist bekannt, dass sie resistenter gegen hohe O_2 Konzentrationen sind als andere und somit länger überleben können (LORENZEN ET AL., 2000; YAMADA ET AL., 1987). Listerien zum Beispiel, sezerniert Katalase und Superoxiddismutase, deren Aufgabe es wahrscheinlich ist, H_2O_2 abzubauen (BORTOLUSSI ET AL., 1987). Bakterien, die in professionelle Phagozyten gelangen, müssen auch mit einer Absenkung des pH-Werts und dem Auftauchen von lysosomalen Enzymen rechnen. Um diese Faktoren zu umgehen, flüchten sie entweder aus dem Phagosom ins Cytoplasma wie das zum Beispiel einige *Shigella spec. tun* (ZYCHLINSKY, 1992). Auch eine direkte Resistenz gegen die schädlichen Einflüsse der neuen Umgebung ist bei *Coxiella burnettii* bekannt (AKPORIAYE, 1983). Eine

weitere Überlebens-Strategie ist die Verhinderung der Fusion von Lysosomen mit dem Phagosom oder dem parasitophoren Vesikel. Vor allem Legionellen sorgen so für ihr Überleben in diesen Zellkompartimenten (GERHARDT, 2000).

Wachstum und Vermehrung (intrazelluläre Phase)

Fast alle intrazellulären Bakterien vermehren sich auch erfolgreich in ihren Wirten. Nur wenige Arten wie zum Beispiel die Gattung *Holospira* zeigen mehrere Formen, von denen nicht alle gleichzeitig vermehrungs- und infektionsfähig sind. Die intrazelluläre Lebensweise von Bakterien zielt hauptsächlich auf eine Ausnutzung der wirtseigenen Stoffwechselprodukte ab. Inwieweit eine Anpassung an Stoffwechselwege des Wirtes erfolgt ist von der Lebensweise der Bakterien abhängig. Eine Anpassung fakultativer Bakterien ist eher unwahrscheinlich, da sie unter ständig wechselnden Bedingungen leben. Obligat lebende Symbionten weisen dagegen vermehrt spezifische Stoffwechselanpassungen auf, da sie schon länger mit dem Wirt zusammenleben und daher auch bereits genetisch eine Anpassung vollzogen haben. Eine sehr weitgehende Anpassung an das Leben im Cytoplasma des Wirtes zeigt *Rickettsia prowazekii*. (ANDERSSON UND DEHIO, 2000).

Freisetzung der Symbionten

Je nachdem, in welchem Teil der Wirtszelle sich die Bakterien befinden, hängt es ab, wie sie ihre Nachkommen weiter verbreiten. Der einfachste Weg wieder aus dem Wirt zu entkommen ist die Zerstörung desselben durch mechanische oder enzymale Prozesse, was einer parasitischen Lebensweise entsprechen würde. Infektiöse Bakterien der Gattung *Holospira* zum Beispiel werden während der Zellteilung in ein besonderes Kompartiment verpackt und im Anschluss an die vollzogene Zellteilung ins umgebende Medium abgegeben. Bakterien der Gattung *Rickettsia* werden, ohne ihren Wirt zu schaden permanent in die Umgebung abgegeben.

Zielsetzung der Arbeit

Bei *Holospira obtusa* sind einige der oben erwähnten Vorgänge untersucht und verstanden, aber viele Fragen bleiben bis heute unbeantwortet. Ziel dieser Arbeit war es, bakterielle Proteine aus *H. obtusa* zu charakterisieren, die während der Infektion von *P. caudatum* eine wichtige Rolle spielen. Die entsprechenden Gene sollten identifiziert und kloniert werden, um die jeweiligen Gene mit einem geeigneten bakteriellen Expressionssystem herzustellen. Im Anschluss daran sollte eine Aufreinigung folgen, um die untersuchten Proteine für weitere Versuche verfügbar zu machen. Dies sollte zu einem besseren Verständnis des Infektionsvorgangs und seiner Regulation führen. Als Zielproteine wurden anhand früherer Ergebnisse diejenigen Proteine ausgewählt, die im Periplasma der infektiösen Formen häufig vorkommen und während der Infektion deutlich abnehmen. Hauptsächlich sollte ein 15 kDa Protein untersucht werden, da hiergegen ein monoklonaler Antikörper (MKA14) von Wiemann (1990) vorlag. Außerdem sollten die Wechselwirkungen zwischen Oberflächenstrukturen von *H. obtusa* und Phagosomen aus *P. caudatum* untersucht werden. Um Protein-Protein Wechselwirkungen ex vivo nachweisen zu können, sollte ein Overlay Verfahren auf Western Blot Basis optimiert werden. Dazu war es notwendig, eine Isolationsmethode für Phagosomen-Proteine aus *P. caudatum* zu optimieren, um saubere Phagosomenproteine zu erhalten.

Material und Methoden

Experimentelle Phasen

Proteinbiochemische und molekularbiologische Untersuchungen zum 15,5 kDa Protein

Gesamtprotein von *H. obtusa* wurde in ein- bzw. zweidimensionalen Gelelektrophoresen aufgetrennt, auf Membranen transferiert und mittels eines monoklonalen Antikörpers identifiziert. Entsprechende Proteinflecken auf den Membranen wurden zur N-terminalen Mikrosequenzierung herangezogen. Eine aus der Aminosäuresequenz abgeleitete degenerierte Basenabfolge war Grundlage für einen Satz degenerierter Primer. Diese Primermischung wurde zur Suche des entsprechenden Gens mittels der PCR in einer genomischen Phagmidbank von *H. obtusa* eingesetzt. Nach der Optimierung der PCR auf bestimmte DNA-Fragmente, wurden diese gereinigt, in einem Plasmid kloniert und selektiert. Es folgte eine DNA-Sequenzierung der Fragmente mittels des *Cycle-Sequencing* und einem halbautomatischen Sequenziersystem. Aus positiven Klonen wurden die Plasmide isoliert und die genkodierende DNA herausgeschnitten. Anschließend wurden diese Fragmente in den Expressionsvector pET38b(+) eingebaut und der *E. coli* Stamm BL21(DE3) damit transformiert. Nach erfolgreicher Expression in *E. coli* wurde Gesamtzellprotein, sezernierte Proteine aus dem Medium, periplasmatische Proteine, lösliche sowie unlösliche zytoplasmatische Proteine isoliert und mittels der SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Herauslösung aus dem Gel auf eine PVDF-Membran. Der immunologische Nachweis erfolgte auf den Membranen mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern. Zur Lokalisation des exprimierten Fusionsproteins in *E. coli* wurden die inkubierten Bakterien fixiert, für die Elektronenmikroskopie eingebettet, mit monoklonalen Antikörpern behandelt und als Ultradünnschnitte betrachtet.

Lokalisation von mRNA des 15,5 kDa Proteins mittels FISH

Mit Hilfe eines Percoll® - Stufengradienten wurden die verschiedenen Formen von *H. obtusa* aus *P. caudatum* isoliert und die reproduktiven, intermediären und infektiösen Formen aufgetrennt. *P. caudatum*, *H. obtusa* und *E. coli* Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und gereinigt. Für die FISH wurden Oligonukleotide verwendet, deren Sequenz sich aus der Basenabfolge des 15,5 kDa Gens ableitet. Es wurden auch eine 16 S RNA *Holospira*-Gattungssonde (Cy5), eine 16 S RNA Eubakteriensonde eingesetzt, die mit den Farbstoffen Cy3, Cy5 und Fluorescein markiert waren. Die behandelten Organismen wurden mit einem *Konfokalen Laser Scanning Mikroskop* (KLSM) betrachtet.

Untersuchungen zu Wechselwirkungen von Wirts- und Bakterienproteinen

Aus *P. caudatum* Kulturen wurden phagosomale Proteine aus isolierten Phagosomen gewonnen und teilweise über Gelelektrophorese aufgetrennt und geblottet. Ebenso wurde mit *H. obtusa* Gesamtprotein verfahren. Die restlichen Proteine wurden mit FITC markiert und in Overlay-Blotting-Experimenten auf den entsprechenden Western-Blot des Symbiose-Partners gegeben, um Wechselwirkungen zwischen phagosomalen Wirtsproteinen und Proteinen von *H. obtusa* zu finden. Potentielle Proteine wurden dann aus den korrespondierenden 2D-Spots ausgeschnitten und N-terminal ansequenziert. Mit den Ergebnissen der

Aminosäuresequenzen wurde weiter gearbeitet. Aus *P. caudatum* Kulturen wurden phagosomale Proteine aus isolierten Phagosomen gewonnen und teilweise über Gelelektrophorese aufgetrennt und geblottet. Ebenso wurde mit *H. obtusa* Gesamtprotein verfahren. Die restlichen Proteine wurden mit FITC markiert und in Overlay-Blotting-Experimenten auf den entsprechenden Western-Blot des Partners gegeben, um Wechselwirkungen zwischen phagosomalen Proteinen und *H. obtusa* Oberflächenproteinen nachzuweisen.

Organismen und Kultivierung

Paramecium caudatum-Kulturen, nicht-infiziert

Der *P. caudatum* Stamm Tü1 C stammt aus einem Teich bei Tübingen, Deutschland. Die gesammelten Zellen wurden gewaschen wie unter 3.1.5. beschrieben. Dann wurde ein einzelnes Paramecium isoliert und vermehrt. Somit handelt es sich bei diesem Stamm um einen Klon. Die Zellen wurden bei 26°C in 5 Liter-Erlenmeyerkolben gehalten, die jeweils mit max. 4 Liter Medium gefüllt waren. Als Medium diente Cerophyll-Lösung, die jeweils 1-3 Tage vor Gebrauch mit dem Futterorganismus angeimpft wurde. Als Futterorganismus diente *P. putida*. Kontaminationen in Form von Pilzen, Bakterien und anderen Einzellern wurden mit Antibiotika (50 µg Penicillin / ml, 50 µg Streptomycin / ml, 50 µg Kanamycin / ml, Merck) und Zytostatika (50 µg Cycloheximid / ml) begegnet.

Grundlage des *P. caudatum* Mediums war die Cerophyll-Stammlösung. Für die Stammlösung wurden jeweils 774 g Cerophyll (gehäckselttes Heu aus Gras, das vor der Blüte gemäht worden war) und 387 g hitzesterilisiertes Stroh in 15 Liter H₂O_{demin} 15 min gekocht. Der noch heiße Sud wurde zum Filtrieren grober Stoffe über 8 Lagen Gaze gegossen und in einem Westfalia Separator (Typ KA 05-00-105, Westfalia Separator AG) bei 12000 Upm zentrifugiert. Diese Lösung wurde anschließend mit H₂O_{demin} auf 14 Liter aufgefüllt und in 1 Liter-Flaschen abgefüllt. Abschließend erfolgte eine 4-stündige Heißdampf-Sterilisation (Autoklavieren) bei 121°C und 1 bar Überdruck.

Paramecium caudatum-Kultur, infiziert mit *Holospira obtusa*

Die Stamm-Kulturen wurden alle sieben Tage verdoppelt. Um eine größere Menge an *Holospira*-Bakterien zu erhalten, wurden die Kulturen alle zwei Tage verdoppelt. Ansonsten wurden die Zellen genauso gehalten wie die nicht-infizierten. Allerdings wurde alle 3 Tage der Infektionsgrad lichtmikroskopisch kontrolliert. Ging der Infektionsgrad (Prozentsatz infizierter Individuen pro Gesamtzahl) zurück, wurden einzelne infizierte Paramecien gewaschen und neu angezogen wie unter 3.1.5. beschrieben. Die *Holospira* Bakterien stammen aus infizierten *P. caudatum*, die aus dem Katzenbachsee bei Stuttgart-Büsnau gesammelt wurden.

Pseudomonas putida Kulturen

P. putida diente als Futterorganismus für *P. caudatum*. Die Bakterien wurden auf King B Agar (KING ET AL., 1954) gehalten. Einzelkolonien wurden auf Schrägagar-Röhrchen mit Standard 1-Nähragar (Merck, Darmstadt) ausgestrichen und bei 26°C gehalten. Frisch ausgestrichene Bakterien wurden bis zur Verfütterung mindestens einen, maximal 7 Tage auf Schrägagar kultiviert. Je nach Bedarf wurde 4 Liter

Cerophyll-Medium mit den Bakterien aus einem Schrägagar-Röhrchen angeimpft und bei 26°C über Nacht kultiviert.

Escherichia coli Kultur

Es wurden folgende *E. coli* Stämme BL21 and JM109 verwendet. LB-Medium (1 % w/v NaCl, 1 % w/v Bacto-Trypton, 0,5 % w/v Hefe-Extrakt) wurde nach Bedarf mit *E. coli*-Bakterien im Verhältnis 1:1000 aus einer Dauerkultur angeimpft und bei 30°C und 100 Upm kultiviert. Die Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben angesetzt, die das 4-5 fache Volumen der jeweiligen Kultur hatten. In regelmäßigen Abständen wurde Kulturmedium entnommen und die optische Dichte OD_{600nm} gemessen. Nach Erreichen einer $OD_{600nm} = 0,6$ wurden die Zellen abgeerntet und eventuell bis zur Weiterverwendung bei -70°C eingefroren. Für längere Lagerzeiten bis zu mehreren Jahren wurden stationäre Kulturen 25:1 mit sterilem 80 %igem Glycerin versetzt und bei -70°C tiefgefroren. Folgende Antibiotika wurden den *E. coli* Kulturen zugesetzt, um bestimmte Resistenzen auf Plasmid zu erhalten: Kanamycinsulfat (30 mg / ml), Tetracyclin (12,5 mg / ml in Ethanol) and Carbenicillin (Dinatriumsalz) (50 mg / ml).

Waschen der Paramecien Kulturen

Aus Kulturen oder Wasserproben isolierte Paramecien wurden durch "Waschen" von Kontaminationen befreit. Dazu wurden jeweils vier Dreiloch-Objektträger verwendet, in deren 4., 8. und 12. Vertiefung je 1 ml angeimpftes Medium pipettiert wurde. In die restlichen Vertiefungen kam je 1 ml steriles *exhausted*-Medium (steriles Filtrat des Überstands einer Paramecien-Kultur). Anschließend wurden 10-15 Paramecien mit einer ausgezogenen, sterilen Glaspasteurpipette an den Rand der 1. Vertiefung pipettiert. Nachdem die ersten Individuen die andere Seite erreicht hatten, wurden sie wie zuvor in die nächste Vertiefung pipettiert. Das ganze wurde dreimal wiederholt. Die Paramecien verweilten in den Vertiefungen mit angeimpftem Medium jeweils 15 Minuten. Die Paramecien entleeren im *exhausted*-Medium ihre Nahrungsvakuolen und nehmen im angeimpften Medium den gewünschten Futterorganismus auf, wodurch Kontaminationen sukzessive ausgedünnt werden. Anschließend wurde jeweils ein *P. caudatum* in 1 ml angeimpftes Medium überführt und dort täglich das Volumen verdoppelt. Kulturen, bei denen nach einer Woche noch alle Individuen infiziert waren, wurden weiter kultiviert, der Rest verworfen.

Proteinbiochemische Methoden

Isolierung infektiöser *Holospira obtusa*-Bakterien aus den Makronuklei von *Paramecium caudatum*

(modifiziert nach SCHMIDT ET AL. 1987)

Aus etwa 30 Liter einer *Paramecium caudatum*-Kultur wurden je nach Infektionsgrad 108-1010 infektiöse Formen von *H. obtusa* isoliert. Um möglichst viele infektiöse Formen und möglichst wenig Futterbakterien im Isolat zu erhalten wurde vor der Isolation die Kultur ohne Fütterung 7 Tage stehengelassen. Zirka 32 Liter Kultur wurden zunächst über 8 Lagen Gaze filtriert und im Anschluss in einem Westfalia Separator (Typ K.A 05-00-105, Westfalia Separator AG) bei 6000 Upm auf 400 ml eingengt. Davon wurden jeweils 100 ml in einen Zentrifugenbecher (ASTM D 96, Brand) überführt und 2 min bei 350 g

zentrifugiert (Laborzentrifuge σ -10, Rotor 11165, Sigma Laborzentrifugen GmbH). Die Paramecien sedimentierten am schmalen Ende des Zentrifugenbechers. Der Überstand wurde abgenommen und die *P. caudatum*-Zellen in Natriumphosphatpuffer (10 mM, pH 7,2) aufgenommen. Mit einem Potter-Homogenisator (B. Braun) wurden die Zellen so lange bearbeitet, bis sie komplett zerstört waren. Das Rohlysat wurde mit einer 90 %igen Percollösung im Verhältnis 1:2 vermischt und auf ein Percollkissen (90%, v / v) in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (PC-F, Sorvall) aufgetragen. Nachfolgend wurde dieser Gradient 20 min bei 4°C und 20000 g ohne Bremse zentrifugiert, um eine Zerstörung des Gradienten beim Abbremsen zu verhindern (Rotor JA-20, Zentrifuge J2-2 1, Beckman).

Der nach der Zentrifugation ausgebildete Dichtegradient beinhaltete im unteren Drittel die infektiösen Formen von *Holospira obtusa*. Die Bakterien wurden in NaPP (10 mM, pH 7,2) aufgenommen und zweimal mit demselben Puffer gewaschen und bei 8000g und 4°C abzentrifugiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Schlussendlich wurden die Bakterien abzentrifugiert und in 1 ml Reaktionsgefäßen aus Polypropylen bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert. Die Isolierung der reproduktiven und intermediären Formen erfolgte vom Ablauf wie bei den infektiösen Formen. Mit dem Unterschied, dass der Überstand aus der ersten Zentrifugation auf einen 80 % Percollgradienten gesetzt wurde und genauso verfahren wurde wie oben beschrieben. Anschließend wurden die entstandenen Überstände noch auf einen 80 %, dann einen 70 % und zum Schluss auf einen 65 % Percollgradient gegeben und entsprechend behandelt. Mit dem 90 % Percollgradient wurden alle infektiösen Formen abgetrennt, der 80 % und der 70 % Gradient beinhalteten die intermediären Formen und im 65 % Percollgradient bandierten die reproduktiven Formen.

Isolation der Phagosomen-Proteine aus *P. caudatum*

Phagosomenisolation aus *P. caudatum*

20 Liter einer *P. caudatum*-Kultur, die drei Tage vorher zum letzten Mal gefüttert wurde, wurden wie unter 3.2.1 beschrieben, gefiltert, abzentrifugiert und in 400 ml sterilem SMB (1,5 mM NaCl, 50 μ M KCl, 0,1 mM MgCl x 6 H₂O, 0,1 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 2,0 mM NaPP, 0,4 mM CaCl x 2 H₂O, pH 7,2) aufgenommen. Um möglichst wenig Futterbakterien im Isolat zu erhalten, wurden je 100 ml Zellsuspension zweimal bei 350 g über ein 10 % Ficollkissen (10 % w/v Ficoll, 15 mM Tris/HCl pH 7,4, 50 mM NaCl) in einem Zentrifugenbecher (ASTM D 96, Brand) zentrifugiert. Die Paramecien bildeten das Pellet, während kleinere Partikel wie Bakterien hauptsächlich im Überstand verbleiben. Zum Schluss wurden die Zellen in 100 ml sterilem SMB aufgenommen. Zur Kontrolle auf Bakterien wurden daraus 1 ml entnommen und 1:10⁴ mit sterilem SMB verdünnt, auf drei Standard-1-Agarplatte ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Aus der Anzahl der Einzelkolonien konnte man dann die Bakterienkonzentration in der Zellsuspension ermitteln. Phagosomen-Isolationen mit mehr als 10⁴ Bakterien / ml Zellsuspension wurden verworfen. So aufgereinigte Paramecien wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Danach wurde, wenn nötig, die Zelldichte auf 10⁵ Paramecium-Zellen pro ml eingestellt. Zu dieser Suspension wurden dann 1 ml *Magnetobeads* (siehe 3.2.2.2) auf 10 ml Zellsuspension gegeben und unter gelegentlichem Schütteln bei RT für 30 min stehengelassen.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Zellsuspension über tiefgekühlte (-70°C) Glasmurmeln geleert und aufgefangen. Durch diesen Kälteschock werfen die Paramecium-Zellen ihre Trichocysten ab, die dann bei der Isolation nicht mehr stören. Außerdem wird die Phagozytose bei solch tiefen Temperaturen sofort

eingestellt. Es wurden dann Paramecien entnommen und unter dem Lichtmikroskop die Zahl der Phagosomen in 25 Zellen bestimmt. Alle nachfolgenden Schritte wurden wenn nicht anders beschrieben auf Eis durchgeführt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde anschließend zweimal bei 4°C über ein Ficoll-Kissen gereinigt und anschließend in Phagosomen-Lysispuffer L1 (15 mM Tris/HCl pH 7,4, 50 mM NaCl, 250 mM Saccharose, 10 mM EDTA, 200 mM KCl, Nonidet P40 (0,04% v/v), Na-Deoxycholat (0,04% w/v), 1 mM PMSF, 1 µM Leupeptin) überführt. Mit einem Potter-Homogenisator (B. Braun) wurden die Zellen dann aufgeschlossen, bis die mit *Magnetobeads* gefüllten Phagosomen unter dem Lichtmikroskop frei vorlagen. Dieses Lysat wurde dann auf ein Pufferkissen aufgebracht, das Separationspuffer S1 (15 mM Tris/HCl pH 7,4, 50 mM NaCl), 1,7 M Saccharose, 200 mM KCl, 15 mM CaCl₂, 10 % w/v Spermidin, 1 mM PMSF, 1 µM Leupeptin) enthielt. Dieser Ansatz wurde für 5 min auf einen Rundmagneten gestellt, damit sich die Phagosomen mit *Magnetobeads* am Boden des Gefäßes sammeln konnten. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Sediment zweimal mit Waschpuffer (15 mM Tris/HCl pH 7,4, 50 mM NaCl, 1 mM PMSF, 100 µg / ml Spermidin, 5 mM CaCl₂) durch schwenken, sedimentieren und abnehmen des Überstands gewaschen. Dann wurde das Gefäß vom Magneten entfernt und die gereinigten Phagosomen in Waschpuffer resuspendiert, bei 300 g abzentrifugiert. Die Phagosomen wurden entweder in einem Reagiergefäß aus Polypropylen bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren oder sofort nach der Isolation zur Einbettung in *Epon* Kunstharz verwendet.

Herstellung der *Magnetobeads*

(modifiziert nach MEYER, 1992)

Dazu wurden 10 g Dextran T 500 (AmershamPharmacia) in 100 ml Wasser unter Rühren bei 60°C gelöst. Dann wurden 15,1 g Fe(II)Cl₂*4 H₂O und 6,4 g Fe(III)Cl₂*6 H₂O in 100 ml demineralisiertes Wasser ebenfalls unter Rühren gelöst. Beide Lösungen wurden mit einer Vakuumpumpe entgast und mit N₂-Gas überschichtet. Beide Lösungen wurden anschließend kräftig miteinander vermischt, nochmals mit N₂-Gas überschichtet, in ein 1 Liter-Becherglas überführt und auf 38°C erwärmt. Es folgte die tropfenweise Zugabe von 300 ml 7,5% (v/v) Ammoniak-Lösung mittels einer Peristaltikpumpe P-1 von Pharmacia-LKB bei einer Flussrate von 0,6 ml / min. Dadurch bildete sich ein paramagnetischer Eisen-Komplex, der in eine vernetzte Dextranhülle eingebettet war. Die Lösung wurde dann für 5 min auf 60°C zur Stabilisierung der Beads erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lösung war, gasdicht verschlossen, bei 4°C unbegrenzt haltbar. Vor Gebrauch wurden die Beads folgendermaßen behandelt, um zell-schädigende Substanzen zu entfernen: 10 g Magnetobead-Dispersion (4,3% (w/v) Beadanteil) wurde 50 ml Reaktionsröhrchen (Becton-Dickensen) für 2 min bei 50 Watt mit der Ultraschallspitze des Sonifiers (Branson, USA) auf Eis beschallt, um verklumpte Beads auf eine einheitliche Größe von 1-2 µm zu bringen. Diese Dispersion wurde bei 400 g 2 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei 20000g / 4°C / 10 min nochmals zentrifugiert. Das Pellet der zweiten Zentrifugation wurde dann in sterilem SMB aufgenommen und der pH-Wert überprüft. Der Sollwert war pH 6,9-7,4. Gegebenenfalls wurden die Schritte wiederholt, bis sich der gewünschte pH-Wert einstellte.

Proteingewinnung aus Phagosomen

Die folgenden Angaben beziehen sich auf 10⁷ Phagosomen. Bei Verwendung anderer Mengen wurden die Lösungsmengen proportional geändert. Alle Schritte erfolgten wenn nicht anders beschrieben auf Eis. Noch tiefgefrorene Phagosomen wurden unter Zugabe von 10 µl eines

Protease-Inhibitoren-Cocktails (10 mM EDTA, 100 μ M PMSF, 1 μ M Leupeptin) aufgetaut. Danach wurden 40 μ l einer Triton X-114 Lösung (63 mM Tris / HCl, pH 6,8, 11 % v/v Triton X-114, 10 % v/v Glycerin) (MEYER, 1992) zugegeben und eine Ultraschallbehandlung (2 min, 50 Watt, auf Eis) durchgeführt. Sofort danach wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (5 min bei 12000 g, Biofuge A, Eppendorf) und der Überstand auf eine Sephadex G25-Gelfiltrationsäule von AmershamPharmacia aufgetragen und nach Herstellerangaben gereinigt. Die Proteine wurden mit Borat-Puffer (pH 9,4) eluiert und das Phagosomen-Protein-Extrakt bei -20°C eingefroren.

Zellaufschluss und Proteingewinnung aus Bakterien

Isolation periplasmatischer Proteine aus *E. coli*

(nach AUSUBEL ET AL. 1989)

Zentrifugierte *E. coli* Bakterien wurden in 30 mM Tris-HI pH8, 20% Saccharose resuspendiert. Dann wurden 60 μ l einer 0,5 M EDTA, pH 8 Lösung zugegeben, um eine EDTA-Endkonzentration von 1 mM zu erhalten. Sofort danach wurde 10 μ l eines Protease-Inhibitorecocktails (Endkonzentration im Ansatz: 10 mM EDTA, 100 μ M PMSF, 1 μ M Leupeptin) zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (10000g, 4°C, 10 min), um die Zellen einzulegen. Der Überstand wurde abgenommen und separat behandelt. Danach wurden die Zellen gründlich in 30 ml eiskaltem 5mM MgSO₄ resuspendiert und für 10 min auf Eis gerührt. Die periplasmatischen Proteine sollten sich dann im Überstand befinden. Die Bakterien wurden wieder abzentrifugiert (10000g, 4°C, 10 min) und für weitere Proteingewinnung verwendet. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und dort mit der 2,5 fachen Menge an 100% TCA versetzt, um die Proteine im Überstand zu fällen. Nach 1 Stunde wurde der Ansatz abzentrifugiert (20000g, 4°C, 10 min) und der Überstand verworfen. Danach folgten drei Waschschrte mit reinem Aceton und anschließender Zentrifugation (20000g, 4°C, 10 min). Das getrocknete Pellet wurde dann in 100 μ l 2 fach Lysispuffer (114 mM Tris / HCl, pH 6,8; 5,4 % w/v SDS, 363 mM DTT, 18,2 % v/v Glycerin) aufgenommen und einem 5 minütigen Hitzedenaturierungsschritt bei 80°C unterzogen.

Proteinfällung aus dem Mediumsüberstand einer Bakterienkultur mit TCA

Die Bakterien wurden abzentrifugiert (10000g, 4°C, 10 min) und für weitere Proteingewinnung verwendet. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und dort mit dem 2,5 fachen Volumen an 100% TCA versetzt, um die Proteine im Überstand zu fällen. Sofort danach wurde 10 μ l eines Protease-Inhibitorecocktails (Endkonzentration im Ansatz: 10 mM EDTA, 100 μ M PMSF, 1 μ M Leupeptin) zugegeben. Nach 1 Stunde wurde der Ansatz abzentrifugiert (20000g, 4°C, 10 min) und der Überstand verworfen. Danach folgten drei Waschschrte mit reinem Aceton und anschließender Zentrifugation (20000g, 4°C, 10 min). Das getrocknete Pellet wurde dann in 100 μ l 2 fach Lysispuffer (114 mM Tris / HCl, pH 6,8; 5,4 % w/v SDS, 363 mM DTT, 18,2 % v/v Glycerin) aufgenommen und einem 5 minütigen Hitzedenaturierungsschritt bei 80°C unterzogen.

Herstellung der löslichen und unlöslichen zytoplasmatischen Proteinfraktion

Der Bakterienniederschlag aus dem Isolationsschritt periplasmatischer Proteine wurde im 1/10 Volumen 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 des vorherigen Kulturmediums aufgenommen und auf Eis resuspendiert.

Sofort danach wurde 10 µl eines Protease-Inhibitorencocktails (Endkonzentration im Ansatz: 10 mM EDTA, 100 µM PMSF, 1 µM Leupeptin) zugegeben. Anschließend gab man Lysozym bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzu und inkubierte dann Ansatz für 15 min bei 30°C. Danach folgte eine Ultraschallbehandlung für 1 min bei 50 Watt auf Eis. Der Ansatz wurde dann zentrifugiert (20000g, 4°C, 10 min). Der Überstand enthielt die wasserlöslichen Proteine, während der Niederschlag die unlöslichen Proteine darstellte. Die wasserlöslichen Proteine wurden wie oben beschrieben mit TCA gefällt und anschließend gereinigt. Das Pellet dagegen wurde mit einem dem Überstand äquivalenten Volumen 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 versetzt und resuspendiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (20000g, 4°C, 10 min), dem ein weiterer Resuspendierungsschritt des Pellets mit einem äquivalenten Volumen 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 folgte. Das Pellet aus einem letzten Zentrifugationsschritt wurde schließlich in 100 µl 2-fach Lysispuffer (114 mM Tris / HCl, pH 6,8; 5,4 % w/v SDS, 363 mM DTT, 18,2 % v/v Glycerin) aufgenommen und einem 5-minütigen Hitzedenaturierungsschritt bei 80°C unterzogen.

Gesamtproteingewinnung für die SDS-PAGE

(modifiziert nach SCHMIDT ET AL. 1987)

Die folgenden Angaben beziehen sich auf 3×10^9 Bakterien. Bei Verwendung anderer Mengen wurden die Lösungsmengen proportional geändert. Alle Schritte erfolgten wenn nicht anders beschrieben, auf Eis. Noch tiefgefrorene Bakterien wurden unter Zugabe von 22,5 µl NaOH (1 M) aufgetaut und mehrmals auf und ab pipettiert. Anschließend folgte ein Neutralisierungsschritt mit 22,5 µl HCl (1 M). Sofort danach wurde 10 µl eines Protease-Inhibitorencocktails (10 mM EDTA, 100 µM PMSF, 1 µM Leupeptin) zugegeben. Anschließend wurden 550 µl Lysispuffer (63 mM Tris / HCl, pH 6,8; 3 % w/v SDS, 200mM DTT, 10 % v/v Glycerin) (BURGESS UND JENDRISAK, 1975) zugegeben. Um den chemischen Aufschluss durch mechanische Zerstörung der Zellen zu unterstützen wurde die Suspension zusätzlich 5 min auf und ab pipettiert. Es folgte eine Hitzedenaturierung bei 80°C für 5 min. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (5 min bei 12000 g, Biofuge A, Eppendorf) und der Überstand mit demineralisiertem Wasser auf 1000 µl gebracht. Der Überstand bestehend aus Gesamt-Protein-Extrakt wurde bei -20°C eingefroren.

Zellaufschluss für die Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Es wurde dieselbe Methode verwendet wie unter „Gesamtproteingewinnung für die SDS-PAGE“ beschrieben, wobei lediglich ein anderer Lysispuffer verwendet wurde: 9 M Harnstoff, 2 % (v/v) Triton X-100, 2 % (v/v) 5 % β-Mercaptoethanol.

Gelelektrophoresen

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (modifiziert nach LAEMMLI, 1970). Dazu wurde das SE 250 Mighty Small System (Hoefer) eingesetzt. Es wurden ausschließlich 12 %ige PAA-Gele mit einer Dicke von 1 mm verwendet. Als Molekulargewichtsstandard dienten Markerproteine des "*Low Molecular Weight Electrophoresis Calibration Kit*" (Pharmacia). Die Proben wurden mit BPB (0,1 % w/v) versetzt und mit einer Hamilton-Spritze aufgetragen. Die Elektrophorese wurde

mit 80 Volt gestartet und nach Erreichen der BPB-Bande auf 120 Volt erhöht. Die Spannung wurde abgestellt, wenn die BPB-Bande den unteren Gelrand erreicht hatte.

Zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese

Zur Analyse einzelner Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt und ihrem Molekulargewicht wurde die von LEHMANN (1998) optimierte Methode nach O'FARRELL (1975) angewandt. Die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde in der 1. Dimension waagrecht mit der Multiphor-II-Anlage (Pharmacia) durchgeführt. Darauf folgte die 2. Dimension als eine denaturierende vertikale SDS-PAGE mit der *SE 600 Dual Cooled Vertical Lab Unit* (Hoefer). Zur Auftrennung durch horizontale IEF: Aus *H. obtusa* wurden IEF Proteinextrakte auf Immobilon Dry Strips (Pharmacia) aufgetragen. Diese 11 cm langen und 0,5 cm breiten PAA-Gelstreifen enthalten einen immobilisierten linearen pH-Gradienten von pH 3 bis pH 10. Die Proteine wandern so lange im angelegten elektrischen Feld, bis sie einen pH-Wert erreicht haben, bei dem ihre Nettoladung Null ist. Zuerst wurden die Gelstreifen über Nacht in der Rehydrierungskassette (Pharmacia) rehydriert (Rehydrierungslösung: 9,61 g Harnstoff / 20 ml, 200 µl 1 M DTT-Lösung, 1 ml 10 %ige Triton X-100 Lösung, 5 mg Orange G). Danach wurden die Streifen laut Herstellerangaben in die Multiphor 11-Apparatur gelegt und die vorbereiteten Proben an der Anode aufgetragen.

Darauf folgte die Elektrophorese für 24 Stunden unter Kühlung der Anlage durch ein Multi-Temp 11 Kühlgerät (Pharmacia), das die Betriebstemperatur konstant auf 15°C hielt. Innerhalb dieser Zeitspanne wurde die Spannung wie folgendermaßen verändert: für 2 Stunden 300 Volt, dann 2 Stunden 600 Volt, gefolgt von 2 Stunden 900 Volt, danach 2 Stunden 1200 Volt, und schließlich 16 Stunden 2500 Volt. Die elektrische Leistung wurde auf 30 W und die Stromstärke auf 2 mA begrenzt. Nach Ende des Laufes wurden die Gelstreifen entweder für die SDS-PAGE vorbereitet oder in Folie eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

Die Gelstreifen wurden vor der SDS-PAGE zweimal unter Schütteln bei 50°C 15 min lang äquilibriert. Im ersten Schritt besteht die Äquilibrierungs-Lösung 1 % w/v DTT, 4 % w/v SDS, 30 % v/v Glycerin, 50 mM Tris/HCl pH 6,8 und 6 M Harnstoff. Beim zweiten Äquilibrieren wurde zusätzlich 8 % w/v Jodacetamid zugegeben, um überschüssiges DTT abzufangen, was den Gellauf gestört hätte. Es folgte dann die Auftrennung in der SDS-PAGE. Im Anschluss an das Äquilibrieren der Streifen wurde eine vertikale SDS-PAGE in 15 %igen PAA-Gelen durchgeführt. Um eine entsprechend große Tasche für die Streifen im Sammelgel zu erzeugen, wurde ein eigens dafür zurecht geschnittener Platzhalter im Sammelgel platziert und die Streifen darin mit 1 %iger Low-Melt Agarose fixiert. Neben den Streifen befanden sich die Taschen für Markerproteine und Proteinextrakte. Die Elektrophorese-Apparatur war an das Multi Temp 11-Kühlgerät (Pharmacia) angeschlossen und auf 15°C gekühlt. Die Elektrophorese wurde mit 160 V gestartet. Nach Eintreffen des BPB an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel, wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Die Stromstärke wurde auf 60 mA und die elektrische Leistung auf 12 Watt begrenzt. Der Lauf wurde beendet, sobald die BPB-Front das Gelende erreichte. Anschließend wurden die Proteine im Gel durch Silber- oder Coomassiefärbung sichtbar gemacht und/oder für einen späteren immunologischen Nachweis bzw. zur Mikrosequenzierung auf PVDF-Membranen geblottet.

Färbung von Proteingelen

Die Proteinmuster wurden nach SDS-PAGE- und 2D-Gelelektrophoresen durch *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) oder Silberfärbung sichtbar gemacht. Coomassie-gefärbte Gele sind nach

ihrer Entfärbung noch für das *Semi-Dry-Blotting* verwendbar. Silberfärbungen sind dagegen irreversibel, aber dafür um den Faktor 10 empfindlicher (Nachweisgrenze 0,1 ng Protein / mm²).

Silberfärbung der Polyacrylamidgele

(nach HEUKESHOVEN ET AL., 1986)

Das Gel wurde mindestens 30 min im Fixierer (30 % v/v Ethanol, 10 % v/v Essigsäure) und anschließend 30 min in Inkubationslösung (25 % w/v Glutaraldehyd, 0,5 % w/v Na₂S₂O₃, 17 % w/v Na-Acetat, 33 % v/v Ethanol) geschwenkt. Danach folgten drei Waschschritte mit demineralisiertem Wasser für je 5 min. Daran schloss sich die 20 minütige Versilberung in der Färbelösung an (0,5 % w/v AgNO₃, 37 % w/v Formaldehyd). Zur abschließenden Entwicklung wurde das Gel 3-7 min im Entwickler (2,5 % w/v Na₂CO₃, 37 % v/v Formaldehyd, mit NaHCO₃ auf pH>11 einstellen) geschwenkt. Die Entwicklung wurde durch kurzes Waschen in Stopplösung (1 % w/v Glycin) beendet. Das Gel blieb bis zur Bilddokumentation im Fixierer.

Coomassie-Färbung der Polyacrylamidgele

(modifiziert nach NEUHOFF ET AL. 1990)

Das Gel wurde eine Stunde in der Färbelösung (0,25 % w/v *Coomassie Brilliant Blue* R250, 45 % v/v Methanol, 10 % v/v Eisessig) geschwenkt und dann mit Entfärber (45 % v/v Methanol, 10 % v/v Eisessig) 2mal 30 min gewaschen. Um Gele aufzubewahren, wurden sie mit etwas Entfärber in Folien eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

Semi-Dry-Blotting: Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Nach einer SDS-PAGE wurde das Gel für 30 min in *Blot*-Puffer (25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % v/v Methanol) geschwenkt und dann seine Länge und Breite ausgemessen. Anschließend wurden 6 Blatt *Blotting*-Papier (3 MM, Whatman) und eine PVDF-Membran (Immobilon, Millipore) auf Gelgröße zugeschnitten und ebenfalls in Methanol geschwenkt, um sie benetzbar zu machen. Es folgte ein Äquilibrationsschritt für 20 min in *Blot*-Puffer. In folgender Reihenfolge wurde der Stapel luftblasenfrei zusammengebaut: 3 Lagen *Blotting*-Papier, PVDF-Membran, Gel und letztlich drei Lagen *Blotting*-Papier. Danach wurde der Stapel auf die mit H₂O_{demin} angefeuchtete Anodenplatte der *Blotting*-Apparatur (*Fast Blot B33*, Biometra) gelegt. Die ebenfalls angefeuchtete Kathodenplatte wurde aufgelegt und anschließend beschwert (4 kg Gewicht). Der Proteintransfer erfolgte eine Stunde lang bei 0,8 mA/cm² Gel mit einer Begrenzung auf 10 Volt und 10 Watt. Die Apparatur stand dabei in einem gekühlten Raum mit 4°C Raumtemperatur.

Herstellung von Dot Blots

Je 2 µl Proteinextrakte (siehe 3.2.4.1) aus den verschiedenen Organismen wurden dazu einfach mit einer Pipette auf eine Nitrocellulose-Membran getropft. Dabei war es wichtig, dass in allen Extrakten die Proteinmenge gleich war, um zu gewährleisten, dass alle Spots gleich viel Protein enthielten. Nachdem die Membran getrocknet war, konnte sie weiter verwendet werden oder einfach im Dunkeln gelagert werden.

Färben der Western Blots

Amido-Schwarz Färbung

Mit dieser Färbemethode wurden Proteinbanden und -spots irreversibel gefärbt. Es war danach nicht mehr möglich, Proteine immunologisch nachzuweisen. Dazu wurden die Membranen 5 min in Färbelösung (0,1 % w/v Amidoschwarz, 25 % v/v Isopropanol, 10 % v/v Eisessig) geschwenkt und anschließend so lange entfärbt (Entfärbelösung: 50 % v/v Isopropanol, 30 % v/v Eisessig), bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Getrocknete Membranen wurden anschließend dokumentiert.

Coomassie Brilliant Blue R 250 Färbung

Sollten einzelne 2D-Spots für die Protein-Mikrosequenzierung ausgeschnitten werden, wurden die Membranen mit *Coomassie Brilliant Blue R 250* (Serva) gefärbt, weil die Färbung die chemischen Reaktionen der Mikrosequenzierung nicht stört. Die Membran wurde dazu 5 min in Färbelösung (0,1 % w/v CBB in 50 %iger Methanol-Lösung) geschwenkt und anschließend so lange entfärbt (Entfärbelösung: 50 % v/v Isopropanol, 30 % v/v Eisessig), bis die Proteine in der gewünschten Stärke sichtbar wurden. Getrocknete Membranen wurden anschließend dokumentiert.

Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die beladenen PVDF-Membranen (0,45 µm) mindestens 30 min Blockpuffer (10 % w/v Magermilchpulver in PBST) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min in PBST (140 mM NaCl, 2,67 mM KCl, 24,3 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, 0,1 % v/v Tween 20) gewaschen. Es folgte die Zugabe des ersten Antikörpers für 1 Stunde bei RT, wobei die Antikörper mit PBST verdünnt wurden, gefolgt von drei Waschschritten wie oben beschrieben. Nachdem überschüssige Antikörper entfernt waren, folgte der zweite, mit alkalischer Phosphatase konjugierte Anti-Maus-Antikörper (Sigma, 1:30000 verdünnt in PSBT). Es wurde auch hier 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach drei abschließenden Waschschrritten mit PBST für je 10 min wurde der *Blot* noch zweimal mit APP (100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5) äquilibriert. Es folgte eine enzymatische Reaktion mit den Substraten NBT / BCIP (SAMBROOK ET AL., 1989), wobei die wasserlöslichen Substrate in wasserunlösliche, lilafarbene Produkte von der Alkalischen Phosphatase umgesetzt wurden. Aus einer 5 %igen w/v Stammlösung NBT bzw. BCIP wurden je 45 µl zu 10 ml Reaktionspuffer APP gegeben. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit H₂O_{demin} abgestoppt, wenn ein deutliches Signal zu sehen war, aber längstens nach 30 min. Die Membran wurde an der Luft getrocknet und zur Dokumentation aufbewahrt.

Digoxigenin-Markierung von Proteinen

Markierungsreaktion

Exemplarisch wird hier die Markierung von 1 mg Protein beschrieben. 1 mg Protein wurde in 1 ml Borat-Puffer (pH 9,4) gelöst. Unter Rühren wurden 0,327 mg Digoxigenin-3-0-methylcarbonyl-F-aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester in 8118 µl DMSO (p.a.) oder Ethanol (p.a.) gelöst. Anschließend wurde dieses Gemisch zur Protein-Lösung gegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Damit ergab sich ein Verhältnis von Antikörper zu Digoxigenin-3-0-methylcarbonyl-E-aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester von 1:70. Um nicht reagierten Digoxigenin-3-0-methylcarbonyl-

E-aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester und Lösungsmittel zu entfernen, wurde die Protein-Lösung über eine Sephadex G25-Säule (AmershamPharmacia) nach Herstellerangaben gereinigt.

Mikrosequenzierung der N-Terminalen Aminosäuresequenz

Zur Mikrosequenzierung wurden Proteinspots auf PVDF-Membranen ausgeschnitten und von ihrem N-Terminus her ansequenziert. Das Verfahren beruht auf dem automatisierten Edman-Abbau, wobei schon 10 pM Protein ausreicht, um zu einem Resultat zu gelangen (MATSUDAIRA, 1987). Die Sequenzierung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart von Dr. Markus Einzelberger durchgeführt.

Die auf PVDF-Membranen geblotteten Proteine aus 2D-Gelelektrophoresen wurden mit CBB gefärbt. Durch Vergleiche mit den Proteinmustern nach dem Immunnachweis auf den Membranen mit den Mustern auf silbergefärbten 2D-Gelen wurde der zu sequenzierende Spot ausgewählt. Aus einer frischen Membran wurden anschließend der CBB gefärbte Spot mit einem Skalpell ausgeschnitten. Diese Membranstücke wurden direkt für das Sequenzieren eingesetzt.

Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen auf Membranen

Western Blots von *H. obtusa*-Proteinen wurden genauso behandelt wie bei einem immunologischen Nachweis von membrangebundenen Proteinen (3.2.10.). Aber anstelle des ersten Antikörpers wurden markierte Proteine der Nahrungsvakuolen eingesetzt, die dann an potentielle Partner auf der Membran binden sollten. Als Markierung für Proteine wurde Digoxigenin verwendet, das laut Hersteller keine Kreuzreaktionen mit anderen Antikörpern zeigt (Roche Diagnostics). Der im Anschluss an die Proteinbindung eingesetzte Antikörper war gegen das Digoxigenin gerichtet und mit einer Alkalischen Phosphatase konjugiert. Die enzymatische Reaktion wurde ebenfalls wie unter 3.2.10. beschrieben durchgeführt. Auf einen *Western Blot* mit *H. obtusa*-Gesamtprotein-Extrakts wurden Digoxigenin markierte phagosomale Proteine aus *P. caudatum* gegeben.

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Verwendete DNA-Sonden

Folgende DNA-Oligonukleotide wurde in markierter Form für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung verwendet: (i) EUB338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') bindet an eine konservierte Region der 16S-rRNA in fast allen Eubakterien (AMANN ET AL., 1990) und war mit Cy 3 am 5' Ende markiert. (ii) H16-23a (5'-TTCCACTTTCTCTACCG-3') bindet an eine stark konservierte Region der 16S-rRNA der Gattung *Holospira* (AMANN ET AL., 1991) und war mit Cy 5 am 5' Ende markiert. (iii) (155-FAS) bindet an die mRNA und den kodierenden Strang des 15,5 kDa Proteins. Die DNA-Sonde wurde mit Hilfe einer LPCR markiert, in der Fluorescein-11 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (F-dUTP) als Ersatz für 2'-deoxythymidine 5'-triphosphate (dTTP) verwendet wurde. Als Ergebnis erhielt man eine mehrfach mit Fluorescein markierte DNA-Sonde.

Herstellung der 155-FAS DNA-Sonden

Zur Herstellung genspezifischer DNA-Sonden gegen die mRNA des 15,5 kDa Proteins wurde eine *Linear Polymerase Chain Reaction* (LPCR) (JOUQUAND UND GALIBERT, 1999) durchgeführt. pET38b

Plasmide, die kodierende Region des 15,5 kDa Proteins von *H. obtusa* trugen, wurden als Matrize für eine LPCR verwendet (Abb. 1). Die gereinigten Plasmide wurden mit dem Restriktionsenzym *Nde* I 1 Stunde bei 37°C in Reaktionspuffer behandelt und anschließend mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (0,8 % w/v Agarose) aufgetrennt. Die linearisierte DNA wurde dann mit Hilfe des *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* von Amersham Pharmacia aufgereinigt.

Dazu wurden die Gelstücke unter UV-Licht ausgeschnitten, die die entsprechenden Banden mit linearer Plasmid-DNA enthielten. Diese Gelstücke wurden mit einem Puffer des Kits vermischt und bei 60°C geschmolzen. Dann wurden sie in eine Säule überführt, die ein absorbierendes Material enthielt und einer Zentrifugation für 1 min bei 13000 g unterzogen. Danach wurde die Säule einmal mit einem mitgelieferten Waschpuffer gewaschen und die gebundene, lineare Plasmid-DNA mit H₂O_{demin} eluiert. Die gereinigte, mit *Nde* I behandelte Plasmid-DNA und ein Primer (5'-GCTATCTTTTATCTTCAAAA-3') wurden dann in der LPCR eingesetzt.

Die LPCR wurde mit einem Denaturierungsschritt mit 3 min bei 95°C begonnen, gefolgt von 50 Amplifikationzyklen [(30 sec / 95°C Denaturierung) (30 sec / 54°C Primerbindung) (30 sec / 72°C Polymerisation)]. Der LPCR Reaktionsmix war folgendermaßen zusammen gesetzt: 1 / 10 Volumen Reaktionspuffer [200 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)SO₄, 1 % Triton[®] X-100 und 1 mg / Nuclease freies BSA], 10 pmol Primer, 100 fmol Plasmid-DNA, 2,5 Units einer *Taq* DNA Polymerase (Promega), 1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 750 nM dTTP und 250 nM Fluorescein-11-dUTP. Daraus resultierende Einzelstrang-DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese vom übrigen Reaktionsansatz getrennt und aufgereinigt wie oben bereits beschrieben. Die so markierten DNA-Sonden wurden in sterilfiltriertem PBS aufgenommen, die Konzentration gemessen (siehe 3.4.1.) und dann bei 4°C im Dunkeln gelagert.

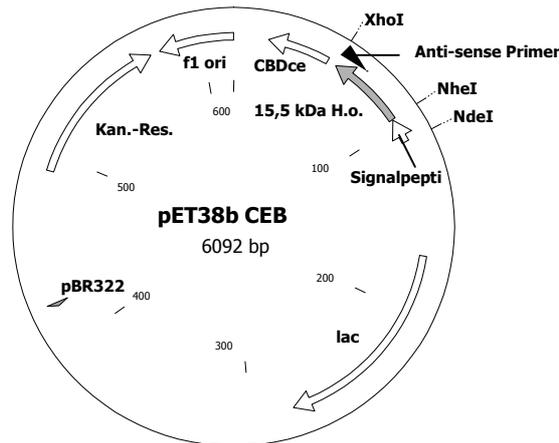


Abb. 1: Lineare PCR zur Herstellung der FISH Sonde FAS 155

Im Schema sind die DNA-Moleküle als Doppelstrang zu verstehen. Zu sehen ist das Expressionsplasmid pET38bCEB. Es enthält als Insert die kodierende Sequenz des 15,5 kDa Proteins von *H. obtusa* (grau unterlegt). Nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym *NdeI* liegt das Plasmid pET38 CEB linear vor. Es dient als Matrize für die lineare PCR. Die Schnittstelle des Restriktionsenzym *NdeI* liegt an der Base 1011. Der *Anti-sense* Primer (Tab. 2), der für die lineare PCR verwendet wurde liegt auf dem Matrizenstrang. Die Herstellung des Plasmids wird in Abb. 17 näher erklärt.

FISH an ganzen infizierten *P. caudatum*-Zellen

Die FISH wurde in Anlehnung an die von CURTENAZ UND BEISSON (1996) entwickelte Methode zur ISH an ganzen Paramecium-Zellen durchgeführt. Zunächst wurden 500 ml einer infizierten *P. caudatum*-Kultur auf 1 ml eingengt wie unter 3.2.1. beschrieben. Die Zellen wurden dann mit einer 2 % PFA / PBS-Lösung (2 % w/v Paraformaldehyd, 140 mM NaCl, 2,67 mM KCl, 24,3 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄) für 2 Stunden auf Eis fixiert und anschließend mit 0,5 % PFA / PBS-Lösung für 30 min permeabilisiert. Es folgten drei Waschschrte für je 10 min in PBS bei RT. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Zellen in eine *Blocking*-Lösung (100 µg tRNA aus *Saccharomyces cerevisiae* / ml Hybridisierungslösung [mM NaCl, mM Na-Citrat, mM EDTA]) überführt. Dort verblieben sie für 30 min bei 46°C und wurden in 1,5 ml Reagiergefäßen aus Polypropylen bei 100 g zentrifugiert. Danach wurden sie in Hybridisierungslösung bei 46°C für 30 min gewaschen und unter gleichen Bedingungen wieder abzentrifugiert. Zur Hybridisierung wurden die Zellen wieder in Hybridisierungslösung aufgenommen. Allerdings enthielt diese Lösung die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA Sonden in einer Konzentration von 1 pmol / 100 µl Lösung. Es wurde für 1,5 Stunden bei 46°C hybridisiert. Anschließend wie oben beschrieben zentrifugiert und zweimal bei 48°C mit der Hybridisierungslösung gewaschen. Am Schluss wurden die Zellen in Hybridisierungslösung aufgenommen und auf einen Glasobjektträger getropft. Dann wurden die Zellen mit 40 µl Phenylendiamin (JOHNSON UND NOGUEIRA ARAUJO, 1981) überschichtet, mit einem Deckglas zugedeckt und rundherum mit Nagellack versiegelt.

FISH an isolierten *H. obtusa* und *E. coli* Zellen

Die FISH an isolierten Bakterien verlief im Prinzip ebenso wie bei ganzen infizierten *P. caudatum*-Zellen, mit dem Unterschied, dass hier für die Zentrifugationsschritte eine höhere Beschleunigung von 13000 g verwendet wurde.

Laser-Scanning-Mikroskopie, Fluoreszenzfarbstoffe und optische Bedingungen

Es wurde ein konfokales *Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 410 invert)* von Zeiss benutzt, das mit drei Anregungswellenlängen zu betreiben war. Ein Argon-Ionen Laser mit der Wellenlänge 488 nm, und zwei Helium-Neon Laser, jeweils mit den Wellenlängen 543 nm und 633 nm. Die verwendeten Farbstoffe wurden entsprechend ihren Anregungs- und Emissionsmaxima angeregt und detektiert, wobei verschiedene Filter unerwünschte Wellenlängen zurück hielten. Cy 3 (max. _{ex.} = 553 nm; max. _{em.} = 575 nm) wurde bei 543 nm angeregt und das emittierte Licht wurde durch einen Bandpass BP 580 ±10 nm begrenzt. Die Anregungswellenlänge für Cy 5 (max. _{ex.} = 651 nm; max. _{em.} = 674 nm) lag bei 633 nm und die Emission wurde ebenfalls durch einen Bandpass BP 670-810 nm gefiltert. Bei Fluorescein (max. _{ex.} = 494 nm; max. _{em.} = 523 nm) wurde eine Wellenlänge von 488 nm zur Anregung verwendet und ein Bandpass BP 515-540 nm filterte das emittierte Licht. Alle Beobachtungen wurden bei 1000facher Vergrößerung (100 Objektiv, Öl-Immersion und 10fach Okular) durchgeführt. Ein digitaler Zoom wurde für virtuelle Vergrößerungen von Bakterienzellen benutzt. Einige der Abbildungen wurden mit Falschfarben dargestellt, das Rot, Grün und Blau entspricht nicht den tatsächlichen Farbverhältnissen. Die Bilder wurden am KLSM als TIFF Format abgespeichert und mit der Bildbearbeitungssoftware Photoshop 5.5 und InDesign von Adobe bearbeitet.

Molekularbiologische Arbeitsmethoden

Soweit nicht anders zitiert, wurden die einzelnen Methoden entweder nach "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", (SAMBROOK ET AL., 1989) oder "Current Protocols in Molecular Biology", (STRUHL ET AL. 1987) durchgeführt.

Bestimmung des DNA- bzw. RNA-Gehalts einer wässrigen Lösung

Entweder wurde eine Abschätzung der DNA- und/oder RNA-Menge mittels einer Agarose-Gelelektrophorese und Referenz-DNA bekannter Konzentration durchgeführt. Oder es wurde die Nukleinsäure-Konzentration photometrisch gemessen. Dazu wurde die Extinktion der Nukleinsäure-Lösung bei 260 nm und bei 280 nm bestimmt (Gene Quant 11, beide Pharmacia). Ein Wert von 1 bei 260 nm entsprach 50 µg / ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg / ml einzelsträngiger RNA. Die Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurde durch den Quotienten aus den Messdaten von 260 nm und 280 nm berechnet. Reine DNA-Lösungen ergaben einen Quotienten von mindestens 1,8 und reine RNA-Lösung hat mindestens einen Quotienten von 1,7-2 (SAMBROOK ET AL., 1989). Kleinere Quotienten wurden bei Verunreinigungen durch Proteine erhalten.

DNA-Fällung

Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen NaAcetat (3 M, pH 4,8) und dem 2,5fachen Volumen Ethanol (p.a.) ausgefällt. Der Ansatz wurde 30 min bei -80°C aufbewahrt. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (10 min, 15000 g) sedimentiert. Um restliche Salze zu entfernen wurde das DNA-Pellet einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, dann für weitere 5 min bei 15000 g zentrifugiert und zum Schluss an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in 20-100 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA) aufgenommen und bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

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

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde ein kommerziell erhältlicher Baukasten mit Säulen und Fertiglösungen zur Aufreinigung von Plasmiden verwendet (MaxiPrep-Kit, Machery & Nagel). Die einzelnen Schritte dieser Methode erfolgten exakt nach den Anleitungen des Herstellers. Aus 100 ml einer *E. coli*-Kultur ($OD_{600\text{ nm}} = 1$) konnten 150 bis 300 µg Plasmid-DNA gewonnen werden. Es wurden Bakterien aus exponentiell wachsenden *E. coli*-Kulturen verwendet. Die Zellen wurden abgeerntet, wenn die $OD_{600\text{ nm}}$ einen Wert von 0,6 erreicht hatte.

Vertikale Agarose-Gelelektrophorese

DNA aus Plasmidisolierungen, PCR-Reaktionen und Restriktionsreaktionen wurden mit Hilfe der Flachbett Agarose-Gelelektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt. Kleine DNA-Stücke (unter 1 kb) wurden in Gelen mit einer Agarose-Konzentration von 1,2-1,5 % aufgetrennt. Bei größeren Molekülen (1-5 kb) dagegen wurde mit 0,8 %igen Agarose-Gelen gearbeitet. Die Agarose (NuSieve® 3:1, FMC) wurde mit TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA) oder TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) unter Erhitzen in Lösung gebracht und anschließend im heißen Zustand in die vorbereiteten

Flachbett-Gelkammern (MWG-Biotech) gegossen. Jeder Probe wurde vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen 6xLadepuffer (0,25 % w/v Bromphenolblau; 0,25 % w/v Xylenanol, 25 % w/v , Ficoll, 50 mM EDTA) versetzt. Als Referenz diente entweder die 1 kb DNA Leiter (Lifetechnologies) oder die 100 bp *Step Ladder* (Promega). Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet, wenn die DNA später ausgeschnitten und weiterverarbeitet werden sollte. Der TBE-Puffer diente ausschließlich für Gele, die für die Analyse und spätere Bilddokumentation vorgesehen waren. Der Puffer bedeckte das Gel maximal 0,5 cm. Während der Elektrophorese lag eine Spannung von 80 bis 130 Volt an, die Stromstärke war auf 250 mA begrenzt. Der Lauf wurde gestoppt, wenn die BPB-Bande das Gelende erreicht hatte. Zum Nachweis der DNA wurde das Gel anschließend in einer Pufferlösung für 30 min gefärbt, die 10 μ g Ethidiumbromid / ml Puffer enthielt. Es folgte ein Entfärbungsschritt mit demineralisiertem Wasser für weitere 30 min. Danach wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet, dokumentiert und eventuell weiterverarbeitet.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen zu isolieren wurde das GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit von Amersham Pharmacia benutzt. Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten. Die weiteren Schritte wurden genau nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die gereinigte DNA wurde anschließend 10 min an der Luft getrocknet, in 20-100 μ l demineralisiertem Wasser aufgenommen und bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

Genomische Phagen-Genbank von *H. obtusa*

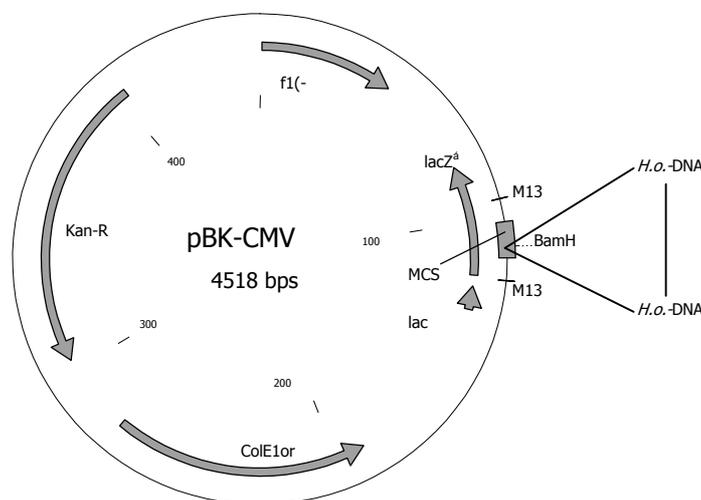


Abb. 2: Das zirkuläre Plasmid pBK-CMV mit *H. obtusa* DNA als Insert.

Das Plasmid liegt linear im Genom des Bakteriophagen Lambda vor. Die Größe des *H. obtusa* Inserts variiert zwischen 3 und 0,5 kb. Das Kanamycinresistenzgen (Kan-R), die beiden Replikationsstartpunkte (f1(-) ori; ColE1 ori), der *lac* Promotor und das *lacZ α* Gen sind entsprechend ihrer Leserichtung eingezeichnet. Die *BamHI* Schnittstellen markieren die Stellen, an denen das *H. obtusa* Insert eingefügt wurde. Die Plasmidgröße ist ohne Inserts berechnet, da deren Länge variierte.

Die verwendete Phagen-Genbank von *H. obtusa* war folgendermaßen hergestellt worden (T. Brigge und M. Dülz, Pers. Mitteilung): Aus frisch isolierten infektiösen Formen von *H. obtusa* wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion die genomische DNA isoliert und anschließend mit dem Restriktionsenzym *SauIII A* behandelt. Dabei wurden Enzymkonzentration und Reaktionsdauer so gewählt, dass DNA-Fragmente in der Größenordnung zwischen 0,5 kb und 5 kb entstanden. Nach Auftrennung in einem 1 % LowMelt-Agarosegel schnitt man diejenigen Banden heraus, die DNA einer Länge zwischen 3 und 5 kb enthielten. Im Anschluss daran ligierte man diese Fragmente mit λ -Phagenarmen, die mit dem Restriktionsenzym *BamHI* verdaut waren, und verpackte sie in λ -Bakteriophagen. Dazu wurde das λ -ZAP-II-System von Stratagene verwendet. Das pBK-CMV-Plasmid mit *H. obtusa* DNA (Abb. 2) liegt zwischen den Phagenarmen. Der mittels Blue / White Screening bestimmte Anteil der Phagen mit Insert lag bei 91%. Es waren 2×10^6 Phagen pro μl vorhanden. Gelagert wurden die Phagen bei -70°C in SM-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,1 %^{w/v} Gelatine, 7 %^{v/v} DMSO, 16,7 mM MgSO_4 , 100 mM NaCl).

Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 1: Aufzählung der *E. coli* Stämme, die für die Klonierung und Expression von *Holospora*-DNA verwendet wurden.

Bakterienstamm	Genotyp	Verwendungszweck	Antibiotika-Resistenz
Nova Blue	<i>endA1 hsdR17(r_{K12}⁻m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1gyrA96 relA1 lac [F⁺ proA⁺B⁺ lacI^qZΔ M15 ::Tn10]</i>	Wirt für Lagerung Expressionsplasmide, die unter der Kontrolle des T7-Promotor liegen. Das Fehlen der T7-RNA-Polymerase verhindert eine ungewollte Expression.	Tetrazyklin
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Wirt für Expressionsplasmide und deren Expression in <i>E. coli</i>	keine
PNB BL21(DE3) Stamm mit dem Expressionsplasmid pET38b PNB	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Für die Expression des 15,5 kDa Proteins als Fusionsproteins mit dem CBD _{ceX} Tag	Kanamycin
CEB BL21(DE3) Stamm mit dem Expressionsplasmid pET38b CEB	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Für die Expression des 15,5 kDa Proteins mit <i>Holospora</i> -eigenem Signalpeptid	Kanamycin

JM109	<i>endA1 hsdR17(r_K⁻m_K⁺)</i> <i>supE44 thi recA1 gyrA96</i> <i>relA1 Δ(lac-proAB)</i> [F' <i>traD36 proA⁺B⁺ lacI^fZΔ M15 ::Tn10</i>]	Wirt für die Klonierungsplasmide pGEM-T CSSr, pGEM-T SfEG, pGEM-T NPSr, pGEM-T SfNG, pGEM-T 15,5kDa(+) pGEM-T 15,5kDa(-)	keine
-------	---	---	-------

Plasmid pGEM-T

Das pGEM-T Plasmid (Abb. 4b) liegt bereits linear vor. Die beiden Enden sind jeweils am 3' Ende mit einem Desoxythymidin-Überhang versehen, der es ermöglicht, lineare DNA mit Desoxyadenosin-Überhang am 3' Ende damit zu verknüpfen (Ligieren). Derartige DNA entsteht dann, wenn eine DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*) zur Strangsynthese eingesetzt wird. Dieses Enzym ist aber auch in der Lage, an einen intakten DNA-Doppelstrang *de novo* einen Desoxyadenosin-Überhang an das 3' Ende anzubringen (Abb. 4a+b). Dieses Plasmid enthält weiterhin einen Teil des Gens für die β -Galactosidase (*lacZΔ*), die in der Lage ist, β -glykosidische Bindungen zu spalten. Mit entsprechenden farbigen Substrat / Produkt Reaktionen lassen sich Klone mit aktiver und inaktiver β -Galactosidase unterscheiden (Blue / White-Screening). Das Plasmidsystem wurde hauptsächlich für die Klonierung von PCR-Produkten verwendet, die aus der *Holospira*-Genbank-Suche stammen. Zur positiven Selektion von Bakterien mit Plasmid, trägt das Molekül auch noch ein Gen für die β -Lactamase. Dieses Enzym spaltet den β -Lactamring bei verschiedenen Penicilin-Derivaten und sorgt so für eine Resistenz.

pGEM-T Sequenz (3003 bp)	
T7 Promotor	2987-6
T7 Transkriptionsstart	1
SP6 Transkriptionsstart	126
SP6 Promotor	121-143
Multiple Cloning Site (<i>ApaI</i> – <i>NsiI</i>)	10-113
<i>lacZΔ</i> Startcodon	165
<i>lac</i> Operator	185-201
<i>lac</i> Operon Sequenzen	2824-2984, 151-380
f1 origin	2368-2823
β -Lactamase kodierende Sequenz	1322-2182

Plasmid pET38b

Dieses Plasmid (Abb. 6a+b) wurde zur Expression des 15,5 kDa Proteins eingesetzt, nachdem das entsprechende DNA-Stück eingebaut wurde. Für die Transkription und Translation notwendigen Kontrollelemente wie Promotor oder Ribosomen Bindungsstelle (RBS) sind ebenfalls so auf dem Plasmid angeordnet, dass ein Einbau von Fremd-DNA an der entsprechenden Stelle zu einer erfolgreichen

Transkription führen kann. Das Plasmid trägt eine Resistenz gegen Kanamycin und verfügt über eine Vielzahl verschiedener potentieller Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Durch die Wahl der Schnittstellen lässt sich die Art des entstehenden Proteins beeinflussen. Wird unter anderem mit dem Enzym *NdeI* geschnitten, so wird dem exprimierten Protein ein Signalpeptid vorangestellt, das für einen Transport in das Periplasma sorgt. Die Verwendung des Restriktionsenzym *NheI* verhindert dies, weil dann die DNA-Sequenz für das Signalpeptid herausgeschnitten wird. Durch die Entfernung des nativen Stopcodons in der zu inserierenden DNA, kann man verschiedene Peptidstrukturen an den C-Terminus des Proteins anhängen. Ein für die Aufreinigung interessanter Anhang (engl.: tag) ist die sogenannte Cellulose-Bindungs-Domäne. Sie bindet an Cellulose und ermöglicht so eine schnelle und spezifische Bindung an cellulosehaltige Säulen oder ähnliches.

pET 38b (+) Sequenz (5821 bp)	
T7 Promotor	818-834
T7 Transkriptionsstart	817
Signalpeptid	621-746
Multiple Cloning Site (<i>NheI</i> – <i>XhoI</i>)	546-620
T7 Terminator	27-72
pBR322 origin	3788
f1 origin	5355-5810
Kanamycin Resistenz Gen	4447-5259
<i>His-Tag</i> kodierende Sequenz	150-173
<i>CBD_{ceX}-Tag</i> kodierende Sequenz	180-503
<i>lacI</i> kodierende Sequence	1225-2304

Eingesetzte DNA-Oligonukleotide

Tab. 2: Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen DNA-Oligonukleotide wurden entweder für Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen oder für eine PCR verwendet. Die Sequenzen sind stets von 5' nach 3' zu lesen. Die jeweilige Hybridisierungs- bzw. *Annealing*-Temperatur wurde nach WU ET AL. (1991) berechnet.

Name	Sequenz	Kompl. Zielregion	Referenz	Markierung / Schnittstellen
T3-Prom	AATTAACCCTCACTA AAGGG	T3-Promotorregion		5'-IRD 800
T7-Prom	GCTAGTTATTGCTCA GCGG	T7-Promotorregion		5'-IRD 800
M13 universe	GTAAAACGACGGCC AGT	Bestandteil des M13- Phagen-genoms / Bestandteil des pBK- CMV Plasmids		
M13 reverse	GGAAACAGCTATGA CCTTG	Bestandteil des M13- Phagen-genoms /		

		Bestandteil des pBK-CMV Plasmids		
EUB338	GCTGCCTCCCGTAG GAGT	6S-rRNA der Eubakterien	AMANN ET AL., 1990	5'-Cy 3
CS	<u>CATATGA</u> AATAAAATC TTTTATAAACTAT	5' Ende Matrizenstrang für das 15,5 kD Proteins mit Signalpeptid		<i>Nde</i> I unterstrichene Sequenz
EG	<u>CTCGAGATTG</u> CTATC TTTTATCTTCAA	3' Ende des kodierenden Strangs für das 15,5 kD Proteins mit Stoppcodon ATT (TAA)		<i>Xho</i> I unterstrichene Sequenz
NG	<u>CTCGAGG</u> CTATCTTT TATCTTCAAAAA	3' Ende des kodierenden Strangs für das 15,5 kD Proteins ohne Stoppcodon ATT (TAA)		<i>Xho</i> I unterstrichene Sequenz
NP	<u>GCTAGCC</u> CAGCCACC TAGACGATA	5' Ende Matrizenstrang für das 15,5 kD Proteins ohne Signalpeptid		<i>Nhe</i> I unterstrichene Sequenz
50kD Rev2	ATGATCTGCTTCAGG CGGG	50 kD Protein, Matrizen- Strang		Ohne und mit 5'-IRD 800
50 kD1	ACNATHGARTAYCAR GARGA	N-Terminus des 50 kD Proteins; Kodierender Strang		Ohne und mit 5'-IRD 800
50 kD2	GARGARAARGARCC NAAR	N-Terminus nahe Aminosäuren des 50 kD Proteins; Kodierender Strang		
Sf	<u>GAGAAGATCT</u> AAAAG AAGTTTCC	15,5 kD Protein, Kodierender Strang		<i>Bgl</i> II Unterstrichene Sequenz
Sr	TTT <u>AGATC</u> ITCTCCG TATAAG	15,5 kD Protein, Matrizen- Strang		<i>Bgl</i> II Unterstrichene Sequenz
Anti-sense Primer	GCTATCTTTTATCTT CAAAAA	5' Ende des DNA-Strangs und der mRNA des 15,5 kD Proteins		
H16-23a	TTCCA <u>CTT</u> CCTCTA CCG	16S-rRNA der Gattung <i>Holospira</i>	AMANN ET AL., 1991	5'-Cy 5

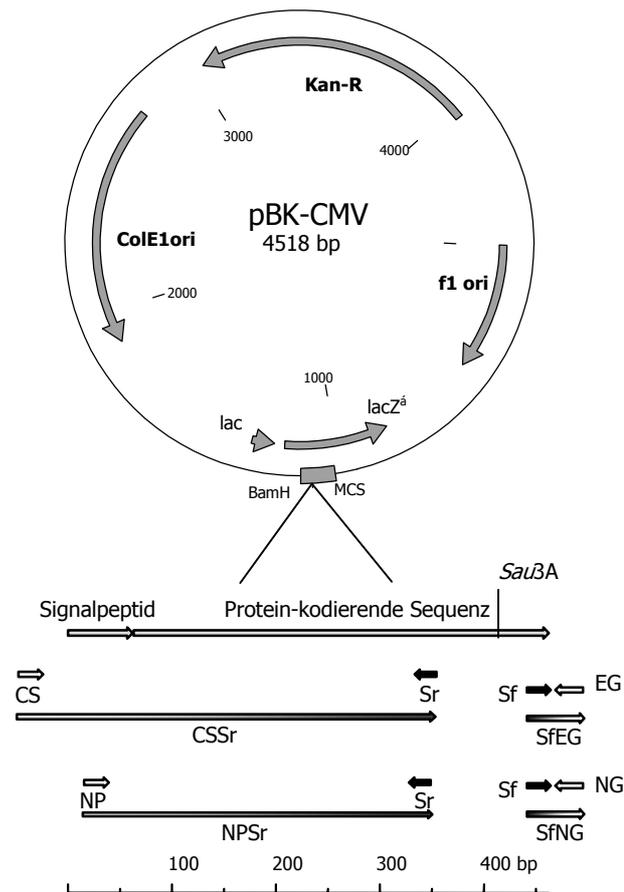


Abb. 3a: Herstellung der überlappenden DNA-Fragmente aus der genomischen Phagengenbank von *H. obtusa*.

Die Abbildung beschreibt das Schema der Herstellung der überlappenden DNA-Fragmente des Gens des 15,5 kDa Proteins. Es wurden insgesamt vier PCR-Ansätze mit vier verschiedenen Primerkombinationen (CS+Sr; Sf+EG, NP+Sr, Sf+NG) zur Reaktion gebracht. Die Pfeilspitzen geben die Richtung des jeweiligen Leserahmens oder eines Primers an. Die Abkürzungen bzw. die DNA-Sequenzen der Primer sind in Tabelle 1 erklärt. Die Fragmente CS/Sr und Sf/EG ergeben das komplette Polypeptid des 15,5 kDa Proteins mit *Holospira*-eigenem Signalpeptid und Stoppcodon. Die Kombination NP/Sr und SfNG stellen den Protein-kodierenden Teil des 15,5 kDa Proteins ohne Stoppcodon dar. Der unten stehende Maßstab zeigt die Länge des Gesamtgens.

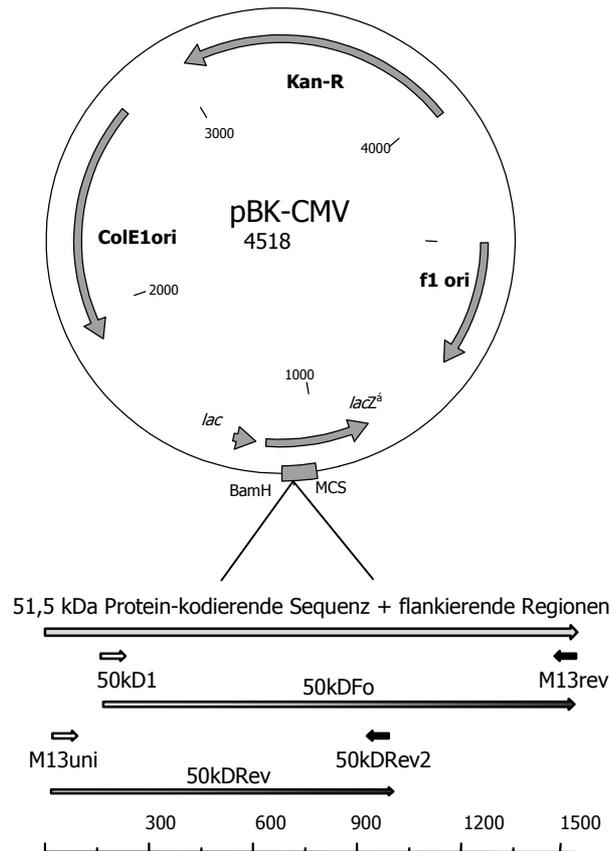


Abb. 3b: Herstellung der überlappenden DNA-Fragmente des Gens des 51,5 kDa Proteins aus der genomischen Phagengenbank von *H. obtusa*.

Bei der Herstellung der überlappenden DNA-Fragmente wurden insgesamt zwei PCR-Ansätze mit zwei verschiedenen Primerkombinationen zur Reaktion gebracht. Die Pfeilspitzen geben die Richtung des jeweiligen Leserahmens oder eines Primers an. Die entstandenen PCR-Produkte 50kDFor und 50kDRev sind unterhalb der Primer zu sehen. Die Abkürzungen bzw. die DNA-Sequenzen der Primer sind in Tabelle 1 erklärt. Die Fragmente 50kDFor und 50kDRev beinhalten Teile der DNA-Sequenz des 51,5 kDa Proteins.

Genbanksuche mit der PCR

Mit Hilfe von komplementären Primern und der *Polymerase-Chain-Reaction* (PCR) sollten aus der Genbank von *H. obtusa* die entsprechenden Gene oder Teilstücke davon amplifiziert und anschließend kloniert werden. Die von MULLIS ET AL. (1986) und SAIKI ET AL. (1985) entwickelte *in vitro*-Amplifikation wurde dafür soweit optimiert, dass unter stringenten Bedingungen nur noch diskrete Einzelbanden im Agarosegel auftauchten (SCHWARZ, 1996). In optimierten Hot-Start-PCR-Reaktionen (BUFFERY, 1993) wurden mit M13 universe bzw. M13 reverse Primern und den degenerierten Oligonukleotidgemische, die aufgrund der ansequenzierten N-Termini von *H. obtusa*-Proteinen synthetisiert worden waren, verschiedene DNA-Fragmente erzeugt (Abb. 3). Diese wurden isoliert wie unter 3.4.5. beschrieben. Ein optimierter Reaktionsansatz bestand aus 10 pmol Primer A, 10 pmol Primer B, 1 µl Phagen-Genbank (Titer: 3×10^6 pfu, denaturiert durch 5 min Erhitzen auf 95°C, dann 2 min auf Eis), 1/10 Volumen Reaktionspuffer (520 mM Tris/HCl pH 8;5; 100 mM MgCl₂, 2 Units *Pfu*-Polymerase (Promega)). Als Reaktionsgefäße dienten

dünnwandige 0,6 ml Ultra-Tubes (Roth). Der Ansatz wurde auf 96 µl mit sterilem demineralisiertem H₂O aufgefüllt, mit 50 µl PCR-Wachs (Chill-out 14™, MJ Research) überschichtet und im *Thermocycler* auf 94°C erhitzt. Kurz darauf wurden 80 nmol dNTPs (4 µl) zugegeben und das Programm gestartet.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Zyklus I	94°C / 3 min	"Annealing"-Temperatur / 2 min	72°C / 2 min
Zyklus II	94°C / 1 min	"Annealing"-Temperatur / 1 min	72°C / 1 min
Zyklus III	72°C / 10 min		

Die Temperatur für die Anlagerung der Primer wurde nach WU ET AL. (1991) für jeden Primer errechnet. Zyklus I wurde 5mal durchlaufen, Zyklus II 30mal und Zyklus III 1mal. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Klonierung der Genbank-PCR-Fragmente

Isolation und Reinigung der PCR-Fragmente

Die aus der Genbank amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese vom restlichen PCR-Ansatz getrennt, nach Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ausgeschnitten und gereinigt.

A-Tailing, Ligation und Transformation von *E. coli*

Die selektierten und gereinigten Genbank-PCR-Fragmente mussten vor der Ligation in das pGEM-T Plasmid zuerst mit einem Desoxyadenosin-Überhang versehen werden, um überhaupt in das Plasmid mit dem Desoxythymidin-Überhang zu passen. Dazu verwendet man eine DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*), die im Gegensatz zur DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) ein Adenin an das 3' Ende der doppelsträngigen DNA hängt. Diesen Vorgang nennt man *A-Tailing*. Die *blunt end* Fragmente aus der vorausgegangenen PCR wurden mit 1 µl 10fach Reaktionspuffer der *Taq*-Polymerase, 1 µl 25 mM MgCl₂, 5 Units *Taq*-Polymerase vermischt und die ATP-Konzentration auf 0,2 mM eingestellt. Das Ganze wurde mit demineralisiertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und für 15 min bei 70°C inkubiert (Abb. 4). Im Anschluss an das *A-Tailing* wurden direkt aus dem Reaktionsansatz 2 µl zu einem Ligationsansatz gegeben, der aus folgenden Komponenten bestand: 5 µl 2fach *Rapid Ligation Buffer* (Promega, Heidelberg) für die T4 DNA Ligase, 50 ng Plasmid-DNA (pGEM-T), 2 µl PCR-Produkt mit Desoxyadenosin-Überhang und 3 Weiss Units der T4 DNA Ligase. Nachdem der Ansatz mit demineralisiertem Wasser auf 10 µl gebracht wurde, stand er über Nacht bei 4°C (Abb. 4b).

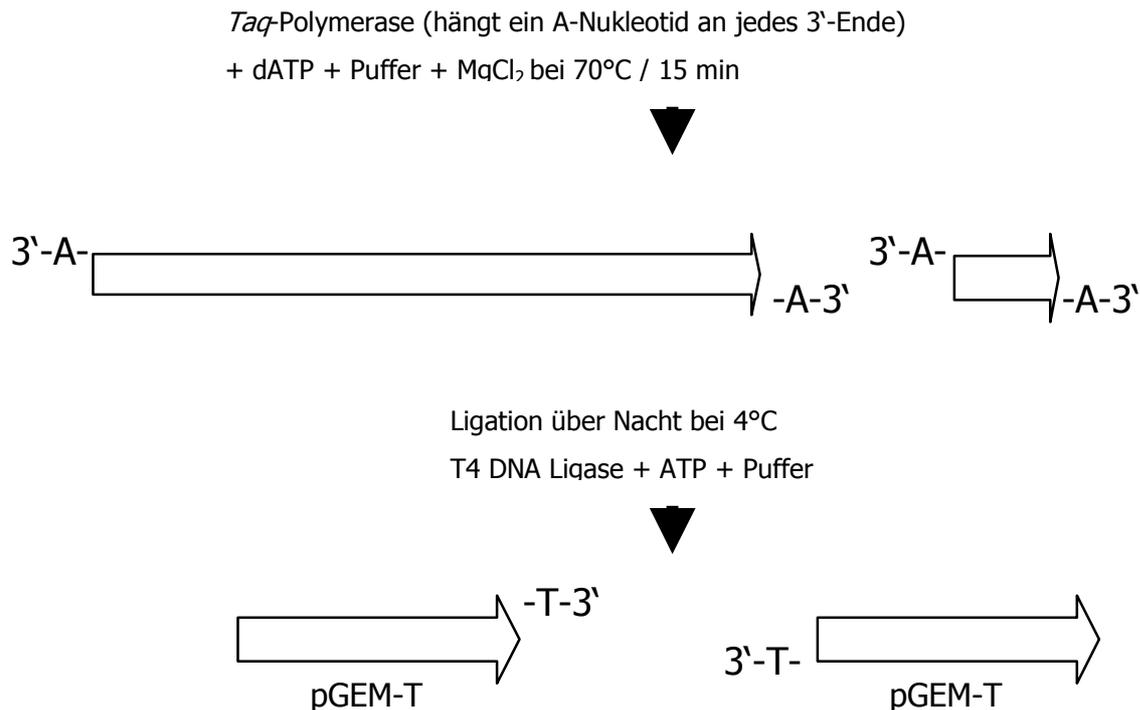


Abb. 4: A-Tailing der Genbank-PCR-Produkte für die anschließende Ligation in das lineare pGEM-T Plasmid.

Im oberen Teil sind die benötigten Substanzen dargestellt. Die vermehrten DNA-Fragmente dienen als Substrate. Ihnen wurde mittels der *Taq*-Polymerase jeweils ein Adenosinmonophosphat an das 3'-Ende angehängt (-A-3'). Damit ist eine Ligation der Moleküle an die Thymidin-Überhänge (-T-3') des linearen pGEM-T Plasmids möglich. Alle Fragmenttypen (SfEG, SfNG, NPSr und CSSr) wurden jeweils in einem Reaktionsansatz behandelt und anschließend mit pGEM-T Plasmiden ligiert. Sie stehen jeweils alternativ über den skizzierten Fragmenten. Die jeweiligen Fragmentgrößen sind in Basenpaaren angegeben (bp).

Aus dem Ligationsansatz wurden 2 µl entnommen und in ein steriles 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Anschließend wurden die bei -70°C tiefgefrorenen *E. coli* JM 109 Zellen im Eisbad aufgetaut und 50 µl davon zu den 2 µl gegeben. Diese Mischung wurde sehr vorsichtig gemischt und für 20 min im Eisbad inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock in einem Heizblock bei 42°C ohne Schütteln für 45 sec. Sofort danach wurde der Ansatz wieder ins Eisbad überführt und verweilte dort für 2 min. Es wurden im Anschluss an diese Schritte 950 µl SOC-Medium (2 % w/v Bacto®-Trypton, 0,5 % w/v Bacto®-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM Glucose, pH 7) dazu pipettiert und das Ganze für eineinhalb Stunden bei 37°C und 150 Upm inkubiert. Aus dieser transformierten Bakterienkultur wurden jeweils 100 µl auf Agarplatten ausgestrichen, die neben LB-Agar (1,5 % w/v Agar, 1 % w/v Bacto®-Trypton, 0,5 % w/v Bacto®-Hefeextrakt, 0,5 % w/v NaCl, pH 7) auch noch 0,5 mM IPTG, 100 µg Carbenicilin pro ml und 80 µg X-Gal pro ml enthielten. Die angeimpften Platten wurden dann über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

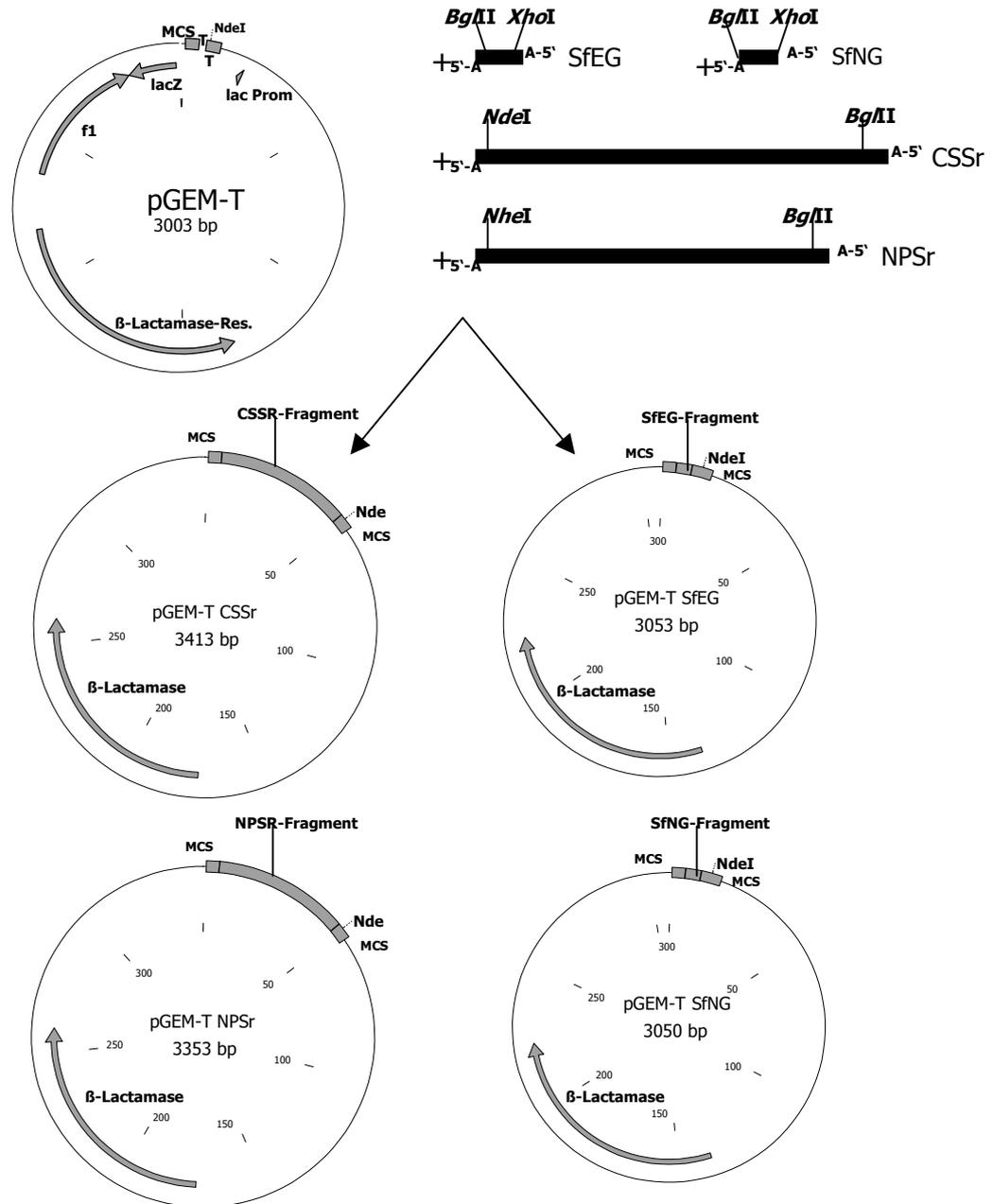


Abb. 4b: Ligationschema der Genbank-PCR-Fragmente des 15,5 kDa Proteins in das Plasmid pGEM-T.

Hier werden die vier möglichen Kombinationen von Genbank-PCR-Fragmenten und dem Wirtsplasmid pGEM-T aufgezeigt. Das Plasmid pGEM-T liegt linearisiert vor (oben links) und besitzt an den 3'-Enden Thymidinüberhänge (T). Die 5' Adenosinüberhänge der PCR-Fragmente (A) passen komplementär dazu, so daß nach erfolgreicher Ligation die Inserts ungerichtet in die dann zirkulär vorliegenden Plasmide eingebaut sind (untere vier Plasmide). Das beiden kurzen Fragmente SfEG und SfNG (oben rechts) befinden sich dann im Plasmid pGEM-T SfEG bzw. im Plasmid pGEM-T SfNG. Die beiden längeren Fragmente CSSr und NPSr (unterhalb der kurzen Fragmente) sind dann in den Plasmiden pGEM-T CSSr und pGEM-T NPSr eingefügt.

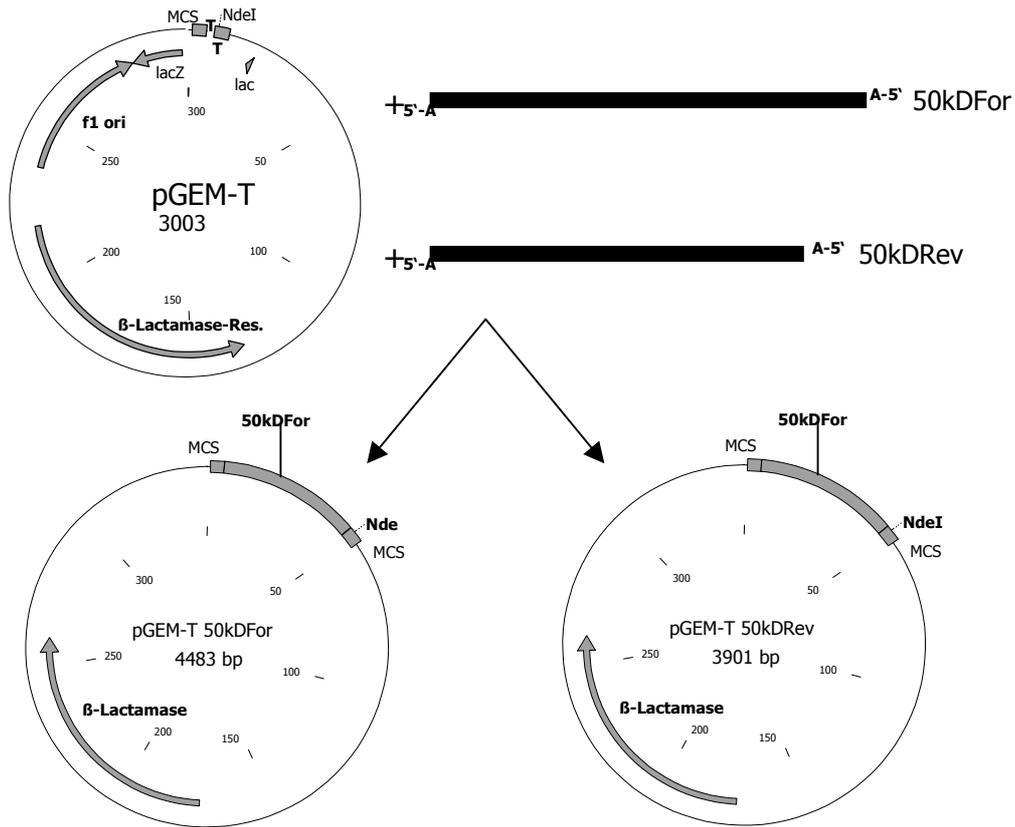


Abb. 4c: Ligationschema der Genbank-PCR-Fragmente des 51,5 kDa Proteins in das Plasmid pGEM-T.

Hier werden die zwei möglichen Kombinationen von Genbank-PCR-Fragmenten und dem Wirtsplasmid pGEM-T aufgezeigt. Das Plasmid pGEM-T liegt linearisiert vor (oben links) und besitzt an den 3'-Enden Thymidinüberhänge (T). Die 5' Adenosinüberhänge der PCR-Fragmente (A) passen komplementär dazu, so daß nach erfolgreicher Ligation die Inserts ungerichtet in die dann zirkulär vorliegenden Plasmide eingebaut sind (untere zwei Plasmide). Das beiden Fragmente 50kDFor und 50kDRev (oben rechts) befinden sich dann im Plasmid pGEM-T 50kDFor bzw. im Plasmid pGEM-T 50kDRev.

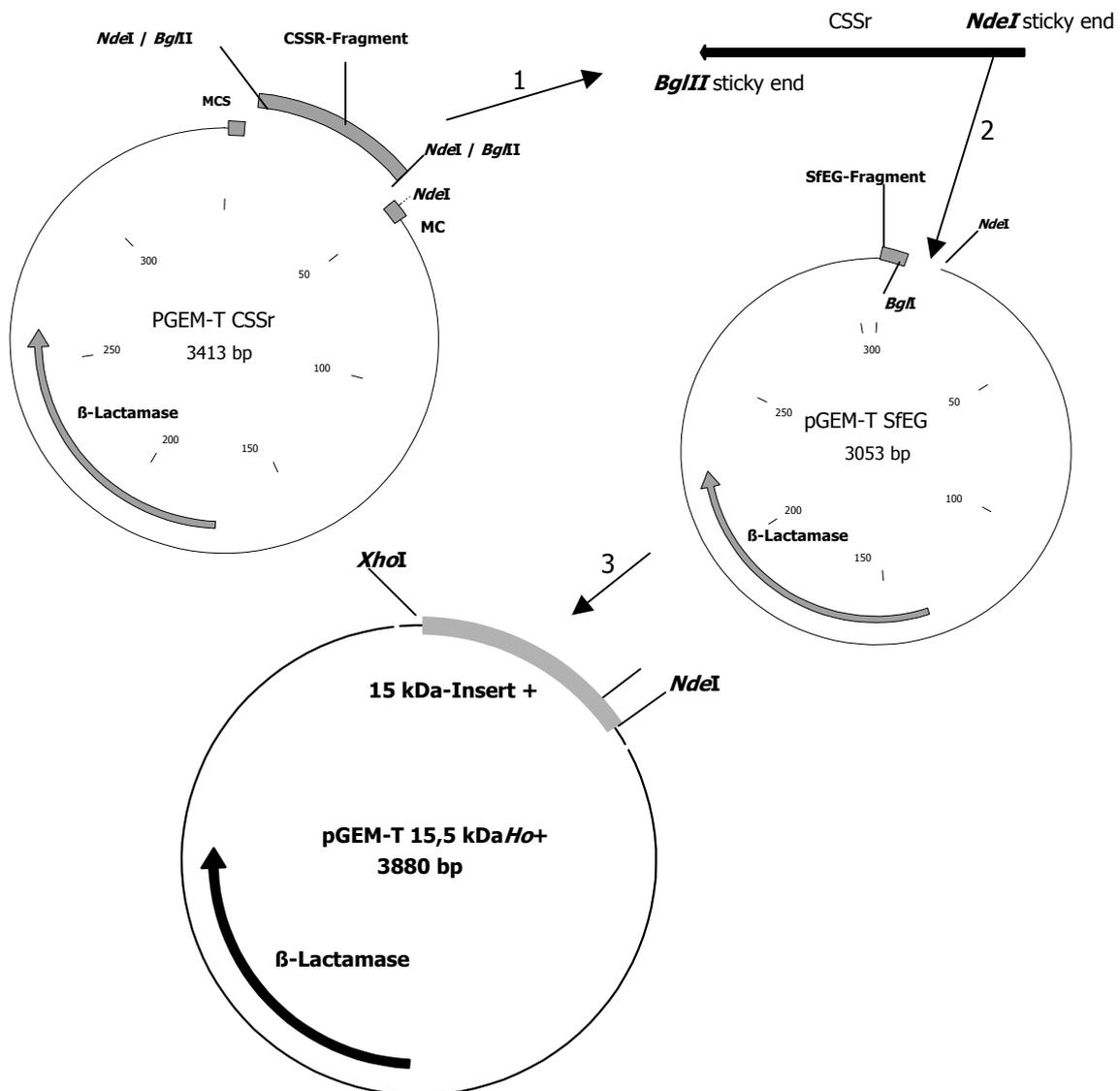


Abb. 5a: Zusammenbau des kompletten Leser Rahmens des 15,5 kDa Proteins.

(1) Zuerst wurde das pGEM-T CSSr Plasmid mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *NdeI* geschnitten. Das daraus entstehende CSSr Fragment wurde gereinigt. (2) Gleichzeitig schnitten die Restriktionsenzyme *BglII* und *NdeI* einen kleinen Abschnitt aus dem Plasmid pGEM-T SfEG, so dass das SfEG-Insert an der potentiellen *XhoI*-Schnittstelle noch immer am Plasmid hing. (3) Zuletzt wurde das CSSr-Fragment mit seinen *sticky ends* in die entstandene Lücke im pGEM-T SfEG Plasmid ligiert. Dabei kam es zu einer Fusion des ersten Teils des Gens des 15,5 kDa Proteins mit dem C-terminalen Ende zur kompletten DNA-Sequenz des Proteins einschließlich des *Holospora*-eigenen Signalpeptids. Außerdem befindet sich ein Stoppcodon an C-Terminus.

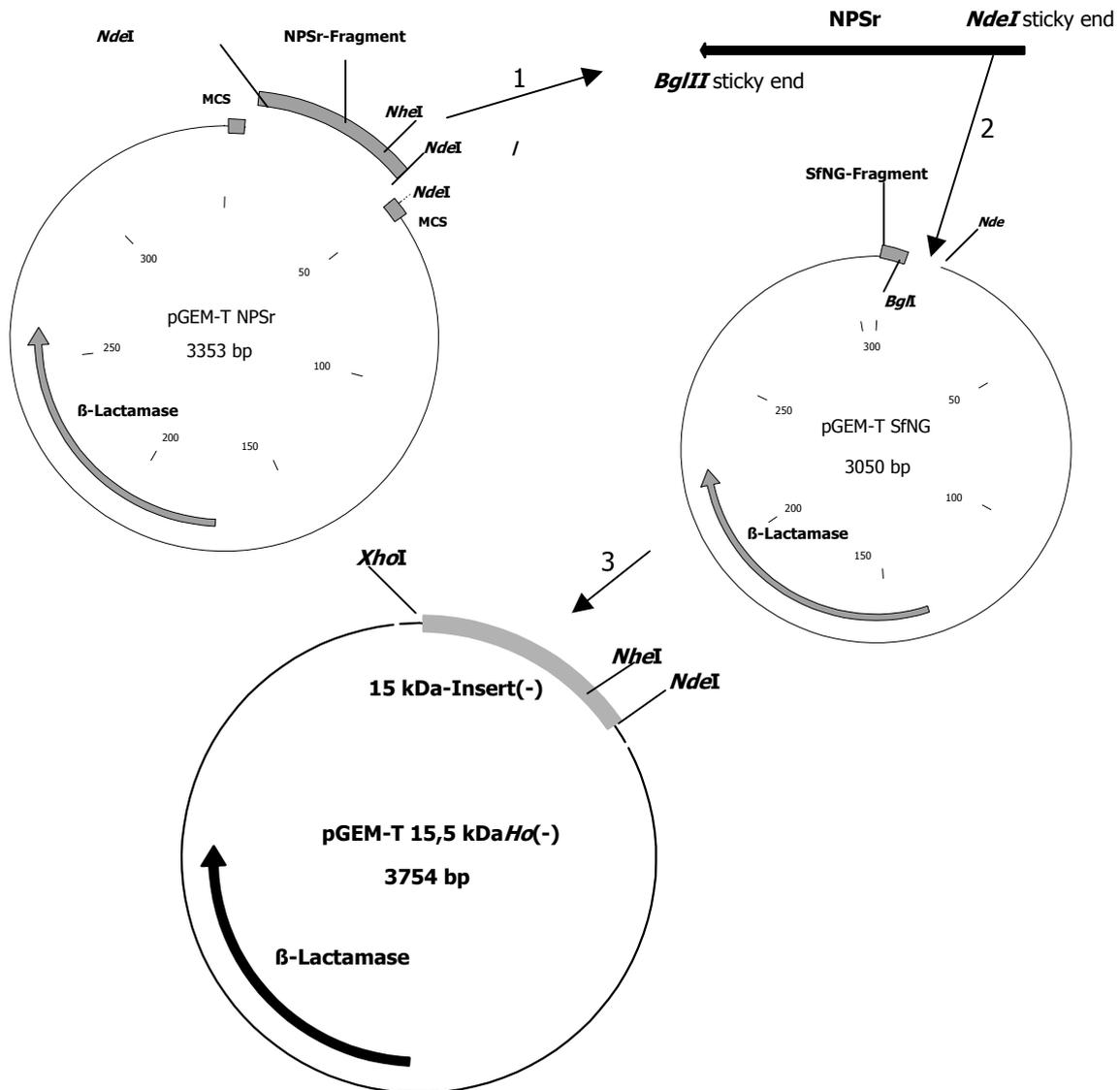


Abb. 5b: Zusammenbau eines Leserrahmens des 15,5 kDa Proteins ohne Signalpeptid.

(1) Zuerst wurde das pGEM-T NPSr Plasmid mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *NdeI* geschnitten. Die *NheI* Schnittstelle liegt in diesem Fragment. Das daraus entstehende NPSr/*NdeI* Fragment wurde gereinigt. (2) Gleichzeitig schnitten die Restriktionsenzyme *BglII* und *NdeI* einen kleinen Abschnitt aus dem Plasmid pGEM-T SfNG, so dass das SfNG-Insert an der potentiellen *XhoI*-Schnittstelle noch immer am Plasmid hing. (3) Zuletzt wurde das NPSr/*NdeI*-Fragment mit seinen *sticky ends* in die entstandene Lücke im pGEM-T SfNG Plasmid ligiert. Dabei kam es zu einer Fusion des Protein-kodierenden Teils des Gens des 15,5 kDa Proteins mit dem C-terminalen Ende ohne das *Holospira*-eigenen Signalpeptids. Es befindet sich kein Stoppcodon an C-Terminus.

Konstruktion eines pGEM-T Plasmids mit kompletter DNA-Sequenz des 15,5 kDa Proteins

Die pGEM-T Plasmide mit dem kurzen Insert (SfEG) wurden mit den Restriktionsenzymen *BglIII* und *NdeI* behandelt. Die pGEM-T Plasmide mit dem großen Insert (CSSr) wurden getrennt davon ebenfalls mit denselben Enzymen behandelt. Die aus beiden Reaktionen entstandenen linearen Moleküle wurde in Agarosegelen aufgetrennt, ausgeschnitten und gereinigt. Im Anschluss daran wurden das linearisierte pGEM-T SfEG Plasmid und das Insert CSSr miteinander ligiert. Durch die Anordnung der Schnittstellen und der daraus resultierenden *sticky ends* führt eine Ligation zur Entstehung des gewünschten Leserahmens (Abb. 5a).

Konstruktion eines pGEM-T Plasmids mit DNA-Sequenz des 15,5 kDa Proteins ohne Signalpeptid und Stoppcodon

Die pGEM-T Plasmide mit dem kurzen Insert (SfNG) wurden mit den Restriktionsenzymen *BglIII* und *NdeI* behandelt. Die pGEM-T Plasmide mit dem großen Insert (NPSr) wurden getrennt davon ebenfalls mit denselben Enzymen behandelt. Die aus beiden Reaktionen entstandenen linearen Moleküle wurde in Agarosegelen aufgetrennt, ausgeschnitten und gereinigt. Im Anschluss daran wurden das linearisierte pGEM-T SfNG Plasmid und das DNA Fragment NPSr/*NdeI* miteinander ligiert. Durch die Anordnung der Schnittstellen und der daraus resultierenden *sticky ends* führt eine Ligation zur Entstehung des gewünschten Leserahmens ohne *Holospira*-eigenes Signalpeptid und ohne Stoppcodon am Schluß (Abb. 5b).

Suche nach positiven Klonen (*Blue/White-Screening*)

Um Bakterien zu finden, die erfolgreich mit einem Plasmid transformiert wurden, war die Bakteriensuspension nach der Transformation auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen worden, die das Antibiotikum Carbenicillin (30 µg / ml) enthielt. Dadurch überlebten nur jene Bakterien, die tatsächlich mit der plasmid-vermittelten Resistenz ausgestattet waren. Durch den zielgerichteten Einbau von Fremd-DNA wurde im Plasmid die Funktion einer β -Galactosidase unterbrochen, mit der Folge, dass deren Fähigkeit einen zugefügten Farbstoff zu spalten, verloren geht. Die Einzelkolonie bleibt daher farblos. Anders bei Bakterien, die zwar das Plasmid und die Resistenz aufweisen, deren Enzym aber nicht durch eine Insertion gestört ist. Einzelkolonien von solchen Bakterien erscheinen dann blau, weil die β -Galactosidase in der Lage ist, den Farbstoff zu spalten. Eine der freigesetzten Komponenten erscheint nach Spaltung blau. So sind die Klone, die eine Insertion im Plasmid aufweisen mit dem *Blue / White-Screening* von anderen Klonen zu unterscheiden. Die positive Klone wurden isoliert, vermehrt und ihre Plasmide isoliert. Diese Plasmide wurden dann direkt zur Sequenzierung mit der *Cycle-Sequencing* Methode verwendet, um diejenigen Moleküle zu erkennen, welche die Inserts in der gewünschten Ausrichtung enthielten.

Restriktionsverdau und Aufarbeitung behandelter DNA

Mit Restriktionsenzymen wurde die gereinigte DNA behandelt, um sie für eine spätere Ligation mit kompatiblen Sequenzen vorzubereiten, zum Beispiel den Einbau in einen Expressionsvektor. Der Reaktionsansatz richtete sich nach dem eingesetzten Enzym und nach der Art und Menge der zu spaltenden DNA. Es wurden in allen Fällen die Empfehlungen des Hersteller befolgt. Alle in dieser Arbeit eingesetzten Restriktionsenzyme stammen von der Firma Promega (Mannheim, D). Inkubiert wurde in der Regel 1 Stunde

bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur. Anschließend wurden die Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und weiterverarbeitet.

Konstruktion des Expressionsvektors pET38b CEB mit dem ganzen ORF des 15,5 kDa Proteins

Darstellung der Wirtsplasmide und Einbaufragmente

Nachdem die eingebauten Fragmente in den pGEM-T Plasmiden sequenziert waren, wurden die entsprechenden Klone vermehrt und die Plasmide im großen Maßstab gewonnen. Im Falle des 15,5 kD Proteins von *H. obtusa* lagen zwei Varianten des kodierenden Gens vor. Hier sollte das Gen mit Signalpeptid von *H. obtusa* verwendet werden. Das DNA-Fragment für die komplette DNA-Sequenz des 15,5 kDa Proteins enthielt am 3'-Ende das Stopp-Codon TAA, womit die Translation vor dem CBD_{ceX} Tag abgebrochen werden sollte. Das Ausgangsplasmid (Abb. 5a, pGEM-T 15,5 kDa H.o.(+)) lieferte die gewünschte DNA-Sequenz. Das gewünschte Fragment wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Xho*I und *Nde*I aus dem pGEM-T Plasmid herausgeschnitten und im Agarosegel aufgetrennt. Eine Bande von entsprechender Größe wurden anschließend isoliert und gereinigt. Es wurden parallel dazu das Zielploid (pET38b) mit denselben Enzymen behandelt, um komplementäre Schnittstellen und DNA Überhänge an den Enden des Doppelstrangs zu erhalten. Dadurch wurde ein gerichteter Einbau der DNA vor den T7 Promotor gewährleistet (Abb. 6a).

Ligation der Fragmente und Transformation der Wirtszellen

Die selektierten und gereinigten Moleküle, hier Insert und linearisiertes Plasmid, wurden in einer Ligationsreaktion mittels einer T4-DNA Ligase miteinander verbunden. Der Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten: 1 µl 10fach Ligationspuffer für die T4 DNA Ligase und 1 Weiss Unit der T4 DNA Ligase. Die Konzentrationen der Plasmid und DNA-Fragmente wurden nach folgender Formel berechnet: $(\text{Masse der Plasmide} \times \text{kb Größe des Inserts}) / (\text{kb Größe des Plasmids}) \times \text{Mengenverhältnis von Insert / Plasmid}$. Nachdem der Ansatz mit demineralisiertem Wasser auf 10 µl gebracht wurde, stand er über Nacht bei 4°C. Aus dem Ligationsansatz wurden 2 µl entnommen und in ein steriles 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Anschließend wurden der *E. coli*-Stamm NovaBlue und BL21(DE3) mit dem Ligationsansatz transformiert. Aus der transformierten Bakterienkultur wurden jeweils 100 µl auf Agarplatten ausgestrichen, die neben LB-Agar (1,5 % w/v Agar, 1 % w/v Bacto®-Trypton, 0,5 % w/v Bacto®-Hefeextrakt, 0,5 % w/v NaCl, pH 7) auch noch 30 µg Kanamycin (für BL21(DE3)) pro ml oder 12,5 µg Tetrazyklin (für NovaBlue) pro ml enthielten. Die angeimpften Platten wurden dann über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

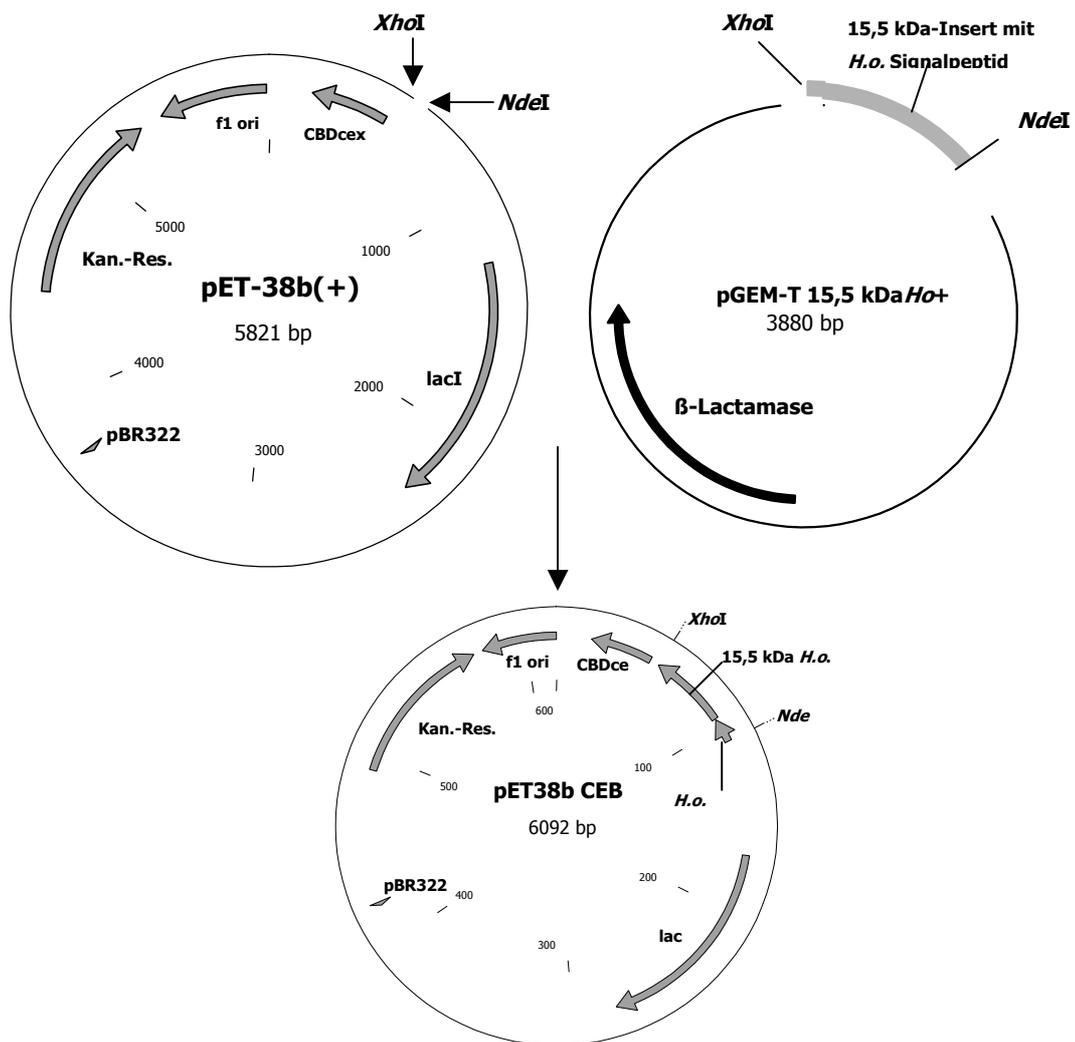


Abb. 6a: Konstruktion des Expressionsvektors pET38b CEB mit dem ganzen ORF des 15,5 kDa Proteins.

In diesem Schema ist das Elternplasmid pET38b mit den Restriktionsenzym-Schnittstellen *XhoI* und *NdeI* zu sehen. Die gleichen Schnittstellen sind auch im anderen Elternplasmid pGEM-T 15,5 kDa *H.o.*(+) zu finden. Beide Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NdeI* behandelt. Die resultierenden DNA-Fragmente ergaben nach erfolgter Ligation der komplementären Schnittstellen das Zielplasmid pET38b CEB, in dem das *Holospora*-eigene Signalpeptid vor der eigentlichen Proteinsequenz steht. Es befindet sich ein Stoppcodon vor der *XhoI* Schnittstelle.

Konstruktion des Expressionsvektors pET38b PNB ohne *Holospora*-eigenes Signalpeptid

Darstellung der Wirtsplasmide und Einbaufragmente

Nachdem die eingebauten Fragmente in den pGEM-T Plasmiden sequenziert waren, wurden die entsprechenden Klone vermehrt und die Plasmide im großen Maßstab gewonnen. Es sollte das Gen ohne Signalpeptid von *H. obtusa* verwendet werden. Das DNA-Fragment für die restliche DNA-Sequenz des 15,5 kDa Proteins enthielt am 3'-Ende kein Stopp-Codon, womit die Translation der CBD_{ceX} ermöglicht werden sollte. Das Ausgangsplasmid (Abb. 5b, pGEM-T 15,5 kDa H.o.(-)) lieferte die gewünschte DNA-Sequenz. Das gewünschte Fragment wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *XhoI* und *NheI* aus dem pGEM-T Plasmid herausgeschnitten und im Agarosegel aufgetrennt. Eine Bande von entsprechender Größe wurden anschließend isoliert und gereinigt. Es wurden parallel dazu das Zielplasmid (pET38b) mit denselben Enzymen behandelt, um komplementäre Schnittstellen und DNA Überhänge an den Enden des Doppelstrangs zu erhalten. Dadurch wurde ein gerichteter Einbau der DNA vor den T7 Promotor gewährleistet (Abb. 6b).

Ligation der Fragmente und Transformation der Wirtszellen

Die selektierten und gereinigten Moleküle, hier Insert und linearisiertes Plasmid, wurden in einer Ligrationsreaktion mittels einer T4-DNA Ligase miteinander verbunden. Der Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten: 1 µl 10fach Ligationspuffer für die T4 DNA Ligase und 1 Weiss Unit der T4 DNA Ligase. Die Konzentrationen der Plasmid und DNA-Fragmente wurden nach folgender Formel berechnet: $(\text{Masse der Plasmide mal kb Größe des Inserts}) / (\text{kb Größe des Plasmids}) \times \text{Mengenverhältnis von Insert / Plasmid}$. Nachdem der Ansatz mit demineralisiertem Wasser auf 10 µl gebracht wurde, stand er über Nacht bei 4°C. Aus dem Ligrationsansatz wurden 2 µl entnommen und in ein steriles 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Anschließend wurden der *E. coli*-Stamm NovaBlue und BL21(DE3) mit dem Ligrationsansatz transformiert. Aus der transformierten Bakterienkultur wurden jeweils 100 µl auf Agarplatten ausgestrichen, die neben LB-Agar (1,5 % w/v Agar, 1 % w/v Bacto®-Trypton, 0,5 % w/v Bacto®-Hefeextrakt, 0,5 % w/v NaCl, pH 7) auch noch 30 µg Kanamycin (für BL21(DE3)) pro ml oder 12,5 µg Tetrazyklin (für NovaBlue) pro ml enthielten. Die angeimpften Platten wurden dann über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

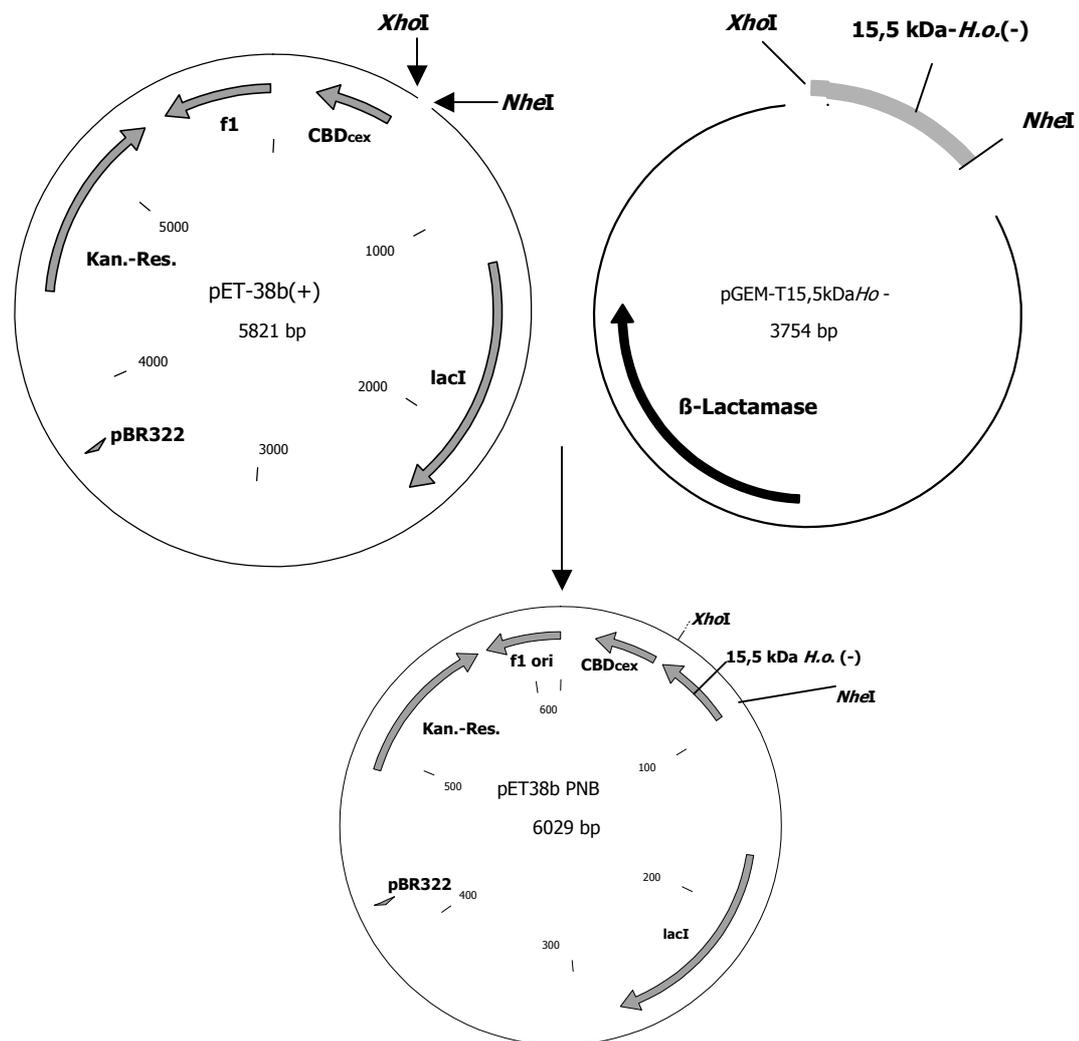


Abb. 6b: Konstruktion des Expressionsvektors pET38b PNB.

In diesem Schema ist das Elternplasmid pET38b mit den Restriktionsenzym-Schnittstellen *XhoI* und *NdeI* zu sehen (oben links). Die gleichen Schnittstellen sind auch im anderen Elternplasmid pGEM-T 15,5 kDa *H.o.*(-) zu finden. Beide Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NheI* behandelt. Die resultierenden DNA-Fragmente ergaben nach erfolgter Ligation der komplementären Schnittstellen das Zielpiasmid pET38b PNB, in dem das vom Plasmid gestellte Signalpeptid vor der eigentlichen Proteinsequenz steht. Vor der *XhoI* Schnittstelle liegt kein Stoppcodon.

Sequenzierung von DNA mittels *Cycle-Sequencing*

Sequenziermethode nach Sanger

Die Methode (SANGER ET AL., 1977) basiert auf dem enzymatischen Einbau von 2', 3'-Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddNTP). Da diesen Molekülen die 3'-OH-Gruppe fehlt, ist ein Anknüpfen weiterer Desoxynukleosidtriphosphate nicht möglich. Neben den Abbruchnukleotiden einer Art, enthält ein Reaktionsansatz auch die herkömmlichen Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP). Die ddNTPs werden, dem Konzentrationsverhältnis von dNTPs zu ddNTPs entsprechend, mehr oder weniger häufig eingebaut. Durch Zugabe nur einer Art von Abbruch-Nukleosid-Triphosphaten in den Reaktionsansatz, z.B. ddATP, bricht das Enzym auch nur an den entsprechenden Stellen die Synthese ab. Ein Abbruch der Elongation an definierter Stelle ist die Folge. Zur Sequenzierung werden dann vier identische Reaktionsansätze mit jeweils einem der vier Dideoxynukleosidtriphosphaten angesetzt.

Cycle-Sequencing-Methode

Eine Modifikation der DNA-Sequenzierung ist das Cycle-Sequencing, welches die Vorzüge der herkömmlichen Sequenzierung mit einem geringen Bedarf an Ausgangs-DNA einer PCR verbindet (ADAMS UND BLAKESLEY, 1991; CAROTHERS ET AL., 1989; CRAXTON, 1991; MURRAY, 1989). Ein daraus resultierender Vorteil ist der mögliche Einsatz von linearer doppelsträngiger DNA (SMITH ET AL., 1990), deren Sequenzierung auch eine erhöhte Genauigkeit der Basenabfolgen mit sich bringt (DUGAICZYK ET AL., 1992). Allerdings können dabei vielfältige Probleme auftreten, wie zum Beispiel verunreinigte DNA (MURPHY UND WARD, 1989). Auch Sekundärstrukturen, die eine Verlängerung des Primers behindern könnten, werden mit dieser Technik reduziert (PETERSON, 1988). Fehlende 3'-5'-Exonucleaseaktivität und das breite Temperaturspektrum machen die Taq-Polymerase zu einem idealen Werkzeug für diese Art der Sequenzierung (TINDALL UND KUNKEL, 1989; INNIS ET AL., 1988).

Cycle-Sequencing-Reaktion

Für die Sequenzierung wurden ausschließlich Plasmide verwendet (pGEM-T, p38ET). Die zu sequenzierenden Plasmide wurden aus *E. coli* isoliert und im Anschluss in der Sequenzierreaktion eingesetzt. Es wurde ein Mastercycler personal (Eppendorf) mit beheizbarem Deckel verwendet. Um überhaupt ein nachweisbares Produkt mit der Cycle-Sequencing-Methode zu erhalten, wurde eine Basisreaktion durchgeführt. Darauf aufbauend wurde eine Optimierung versucht (SCHWARZ, 1996), wobei hauptsächlich die Temperatur optimiert wurde. Alle Reaktionen wurden mit dem Sequenzier-Baukasten der Firma Epicenter Technologies (USA) durchgeführt, wobei alle Vorgaben des Herstellers beachtet wurden, einschließlich der Positivkontrollen. Als Primer wurden synthetische Oligonukleotide verwendet, die am 5' Ende mit einem infrarot-sensitiven Farbstoff markiert waren (Tab. 2)(IRD 800, MWG).

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Zyklus I	94°C / 1 min	"Annealing"-Temperatur / 1 min	72°C / 1 min
Zyklus II	94°C / 30 sec	"Annealing"-Temperatur / 20 sec	72°C / 30 sec
Zyklus III	72°C / 5 min		

Die Temperatur für die Anlagerung der Primer wurde nach WU ET AL. (1991) für jeden Primer errechnet. Zyklus I wurde 5mal durchlaufen, Zyklus II 30mal und Zyklus III 1mal. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Sequenzier-Gelelektrophorese

Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurden die Proben 3 min bei 95°C denaturiert. Aufgetragen wurden jeweils 0,5 bis 1,5 μl pro Tasche. Für die Elektrophorese wurden 6 %ige Sequagele mit einer Dicke von 0,25 mm und einer Länge von 41 cm hergestellt. Die Gellösung bestand aus 32 ml Sequagel™ XR (National Diagnostics), 8 ml Sequagelpuffer (*National Diagnostics*) und 150 μl APS (10 %ig). Das Gießen des Gels und das Montieren an die Apparatur (DNA Sequencer 4000, LI-COR) erfolgte exakt nach den Anleitungen des Herstellers (*LI-COR Sequencing Manual*, Version 2, 1995). TBE-Puffer diente als Laufpuffer. Vor dem Probenauftrag wurde 45 min ein Vorlauf durchgeführt, bei dem die gleichen Strom- und Spannungswerte anlagen wie beim Hauptlauf. Nach dem Vorlauf wurde der Laserstrahl fokussiert, wobei den Anleitungen des Handbuches (*Base Image IR™ Reference Manual*, Version 2, 1993) genau gefolgt wurde. Der computergesteuerte Lauf erfolgte über Nacht bei 35 mA. Die Spannung war auf 1500 Volt und die elektrische Leistung auf 31,5 Watt begrenzt. Nach dem Lauf konnte die Sequenz am Computerbildschirm abgelesen werden. Die Auswertung des Laufs erfolgte halbautomatisch mit Hilfe der Base Image IR™ Software (MWG).

Methoden für die Elektronenmikroskopie

Fixierung und Einbettung

Einbettung in *LR-White*-Kunstharz

Eingebettet wurden mit *H. obtusa* infizierte *P. caudatum*-Zellen, die *E. coli* Stämme CEB, PNB und BL21 (DE3). Je 100 ml einer entsprechenden Kultur wurden 2 min bei 350 g (*P. caudatum*) bzw. 13000 g (Bakterien) abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und mit 10 ml SMB resuspendiert. Nach der Zugabe von 10 ml PFA-Lösung (4 % in SMB) wurden die Ansätze 2 Stunden auf Eis fixiert. Danach wurden die Zellen 2 mal je 10 min in SMB gewaschen und nacheinander je 10 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30 %, 50 %, 70 %, 90 % und abs. Ethanol) inkubiert. Vor jedem Lösungswechsel wurden die Zellen bei 100 g für 5 min mit einer Zentrifuge eingeeengt. Anschließend wurden die Zellen in eine 1:1-Mischung aus *LR-White* und Ethanol abs. überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Tags darauf wurden die Zellen dann 2 mal für 2 Stunden in *LR-White* bei RT inkubiert. Dabei wurden die Zellen ebenfalls durch Zentrifugation eingeeengt (s.o.). Zum Schluss wurden die Zellen jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit *LR-White* überschichtet. Die Proben polymerisierten für 48 Stunden bei 60°C aus.

Einbettung in *Spurr*-Kunstharz

Die *E. coli* Stämme PNB, CEB and BL21 wurden, wie unter 3.5.1.1. beschrieben in 2 % Glutaraldehyd, fixiert und in einer aufsteigenden Acetonreihe (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %) entwässert. Danach wurden die Zellen in eine Mischung aus *Spurr*-Kunstharz (SPURR, 1969) und Aceton im Verhältnis 1:1 überführt und eine Stunde inkubiert. Nachdem die Zellen abgesunken waren, wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 100% *Spurr* versetzt. Darin verblieben die Zellen für etwa 3 Stunden, bis sich die Zellen völlig abgesetzt hatten. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, bevor die Zellen über Nacht in *Spurr*-Kunstharz verblieben. Anschließend wurden die Zellen in *Spurr*-Kunstharz in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 60°C im Trockenschrank für 48 Stunden auspolimerisiert.

Einbettung in *Epon* Kunstharz

Die gereinigten Phagosomen wurden wie unter 3.5.1.1. beschrieben in 2 % Glutaraldehyd, fixiert und in einer aufsteigenden Acetonreihe (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %) entwässert. Danach wurden die Phagosomen in eine Mischung aus *Epon* Kunstharz und Aceton im Verhältnis 1:1 überführt und eine Stunde inkubiert. Nachdem die Phagosomen abgesunken waren, wurde der Überstand abgesaugt und die Phagosomen mit 100% *Epon* versetzt. Darin verblieben die Phagosomen für etwa 3 Stunden, bis sie sich völlig abgesetzt hatten. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, bevor die Phagosomen über Nacht in *Epon* Kunstharz verblieben. Anschließend wurden die Phagosomen in *Epon* Kunstharz in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 60°C im Trockenschrank für 48 Stunden ausgehärtet.

Schneiden, Kontrastieren und Betrachtung unter dem Elektronenmikroskop

Aus den ausgehärteten Kunstharzblöcken wurden mit einem Ultramikrotom (*Leica Ultracut UCT*) Ultradünnschnitte hergestellt, wobei für die eingebetteten Organismen ein Diamantmesser verwendet wurde. Für die Herstellung von Ultradünnschnitten der Phagosomen wurden Glasmesser benutzt, da die eisenhaltigen Dextranpartikel ein Messer sehr stark beschädigen. Die Dünnschnitte wurden im Anschluss auf Nickelnetze überführt, die mit Pioloform (0,8 % w/v) befilmt waren. Je ein Tropfen 1 % Uranylacetat (methanolische Lösung) und Bleicitrat (REYNOLDS, 1963) wurde für jedes einzelne Nickelnetz auf eine mit Parafilm überzogener Glasplatte mit Pipette gegeben. Auf diese Tropfen wurden dann die Nickelnetze für 5 min in Uranylacetat und für 1 min in Bleicitrat inkubiert. Um das Austrocknen des Tropfens zu verhindern, wurde ein nasses Zellstofftuch zur Rolle geformt, über und unter der Tropfenreihe abgelegt und mit einem Styropordeckel zugedeckt. Alle Schnitte wurden unter einem *ZEISS EM 10A* Elektronenmikroskop bei 60 kV betrachtet.

Immunologischer Nachweis auf Schnitten

(nach Michael Schweikert, pers. Mitteilung)

Die Dünnschnitte auf den Nickelnetzen wurden wie unter 3.5.2. beschrieben hergestellt. Vor der Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat wurden sie jedoch behandelt. Zuerst wurden sie für 5 min auf Tropfen mit demineralisiertem Wasser gebracht. Dann folgten weitere Inkubationsschritte wie folgt: 15 min auf PBST mit 3 % Gelatine, 2 Stunden im ersten Antikörper in PBST, je 3 mal 5 min waschen in PBST, dann für 2 Stunden im zweiten Antikörper in PBST, anschließend 4 mal 5 min waschen in PBST, gefolgt von je 3 mal 5 min waschen in demineralisiertem Wasser. Zum Schluss wurden die Nickelnetze an der Luft getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert.

Ergebnisse - Das 51,5 kDa Protein von *H. obtusa*

Isolation der Phagosomen

Um Phagosomen bzw. deren Proteinbestandteile aus *P. caudatum* zu isolieren, wurden die Methoden von MEYER (1992) weiterentwickelt, bei denen die phagosomale Membran als auch der Inhalt der Phagosomen möglichst unbeeinflusst bleiben. Durch die zusätzliche Ultraschallbehandlung der Magnetobeads wurde ihre Größe einheitlicher (Abb. 7). Das führte zu einer stabileren Struktur in den neu gebildeten Phagosomen von *P. caudatum*, die mit den Magnetobeads gefüttert wurden. Die Phagosomen-Membranen blieben weitestgehend erhalten, wie die EM-Aufnahmen zeigen (Abb. 9a+b).

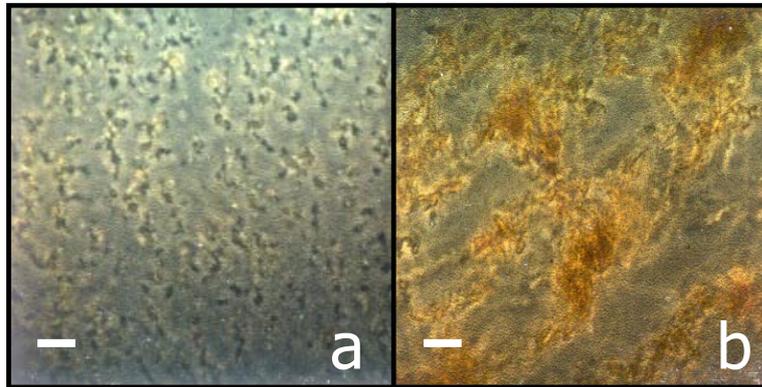


Abb. 7: Auswirkung der Ultraschallbehandlung auf Magnetobeads.

In Abb. 7a sind Magnetobeads zu sehen, die 2 min mit 50 Watt einer Ultraschallbehandlung ausgesetzt waren. Abb. 7b zeigt dagegen Magnetobeads, wie sie ohne Beschallung aussehen. Der Maßstab entspricht einer Länge von 10 μm .

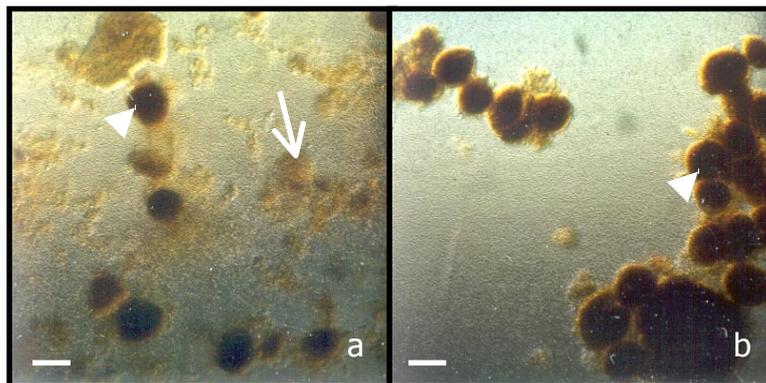


Abb. 8: Wirkung der Zentrifugation auf die Reinheit von isolierten Phagosomen.

Der Maßstab entspricht einer Länge von 10 μm . Abb. 8a: Es liegen die Phagosomen (weiße Pfeilspitze) zusammen mit Zelltrümmern und Magnetobeads vor (weißer Pfeil). Abb. 8b: Phagosomen nach einer Zentrifugation durch einen Saccharose-haltigen Puffer. Es sind fast nur noch Phagosomen sichtbar (weiße Pfeilspitze). Der Maßstab entspricht einer Länge von 1 μm .

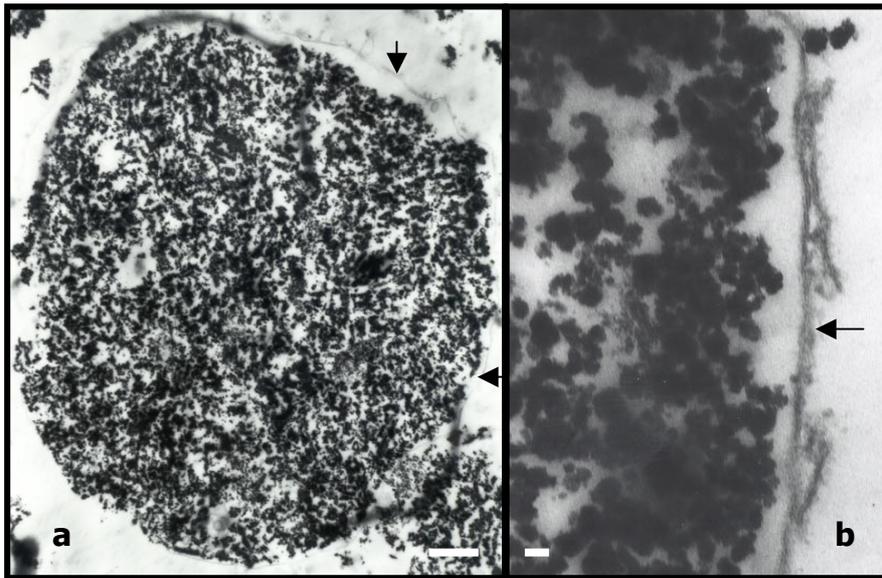


Abb. 9: EM-Aufnahmen von Phagosomen aus *P. caudatum* isoliert mit der *Magnetobead*-Methode.

Abb. 9a: zeigt ein ganzes isoliertes Phagosom, umgeben mit einer intakten Membran (siehe Pfeile). Der Maßstab entspricht einer Länge von 1 μm . An einigen Stellen ist die Membran nicht deutlich zu sehen, weil die Membran schräg angeschnitten wurde. Abb. 9b: Hier (Pfeil) ist die Lipid-Doppelschicht einer solchen Membran zu sehen. Der Maßstab entspricht einer Länge von 0,5 μm .

Ein weiterer Vorteil zeigte sich in der Aufnahmerate der *Magneto-Beads*. Die Paramecien nahmen im Vergleichszeitraum von 10 min mehr *Magnetobeads* auf als die Vergleichsgruppe. Dies wurde in der Anzahl der gebildeten Phagosomen sichtbar. Vor der Ultraschallbehandlung waren es 5 ± 3 Phagosomen pro Paramecium Zelle; danach konnten im Schnitt 9 ± 5 Phagosomen pro Zelle gezählt werden. Nach dem Zentrifugationsschritt, der sich der Auftrennung durch den Magneten anschließt, verringerte sich die Menge der freien *Magnetobeads* und der daran haftenden Zelltrümmer (Abb. 8).

Insgesamt war die Menge der isolierten Phagosomen und die daraus resultierende Proteinmenge ausreichend, um weitere proteinbiochemische Untersuchungen damit durchzuführen. Konzentrationsmessungen der isolierten Proteinmengen aus den Phagosomen wurden nicht durchgeführt, da die Menge zu gering war. Außerdem reduzierte die Reinigung der Paramecien über das 10 % Ficoll-Kissen die Anzahl der *P. putida* Bakterien in der Phagosomensuspension um den Faktor 100 (Von 10^6 / ml auf 10^4 / ml). In der Kontrolle konnten die Proteine von Futterbakterien nicht mehr nachgewiesen werden.

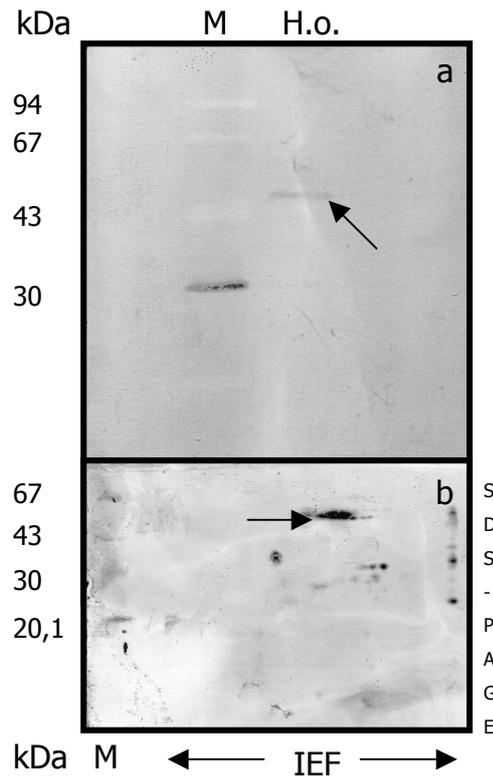


Abb. 10: Western-Blots eines SDS-PAGEs und eines 2D-Gels mit *H. obtusa* Gesamtprotein.

Für den Proteinnachweis wurden Phagosomenproteine von *P. caudatum* verwendet, an die zuvor Digoxigenin gehängt wurde. Mit diesen markierten Proteinen wurden beide Blots im *Overlay-Blotting*-Verfahren behandelt. Anschließend wurde ein Digoxigeninnachweis auf den Blots durchgeführt. Abb. 10a: Der SDS-PAGE *Western-Blot* zeigt die mit Digoxigenin markierten Markerproteine (M). Unter H.o. ist Gesamtprotein von *H. obtusa* aufgetrennt. Die Zahlen an der Seite des Abbildung stellen die relativen Molekülmassen (kDa) der Markerproteine dar. Der Pfeil weist auf eine Proteinbande bei ca. 50 kDa hin. Abb. 10b: Der *Western-Blot* eines 2D-Gels zeigt die mit Digoxigenin markierten Markerproteine (M), die nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden. Das Gesamtprotein von *H. obtusa* wurde zuerst isoelektrisch fokussiert (horizontal, IEF) und anschließend ebenfalls nach Molekulargewicht aufgetrennt (vertikal, SDS-PAGE). Die Zahlen an der Seite der Abbildung stellen die relativen Molekülmassen (kDa) der Markerproteine dar. Der Pfeil weist auf eine Proteinbande bei ca. 50 kDa hin.

Wechselwirkungen zwischen freien Phagosomen-Proteinen und geblotteten Proteinen aus *H. obtusa*

Die geblotteten *H. obtusa* Proteine eines SDS-PAGE *Western-Blots* wurden anstelle des ersten Antikörpers mit Digoxigenin-markierten Phagosomen-Proteinen behandelt. Nach der Zugabe des zweiten, gegen das Digoxigenin gerichteten Antikörpers und der darauffolgenden Enzymreaktion wurde eine Bande im 50 kDa Bereich sichtbar (Abb. 10). Dieser Nachweis wurde auf einem 2D-*Western-Blot* mit Gesamt-*H. obtusa* Protein wiederholt, um das Protein genauer zu identifizieren. Es konnte auch hier ein einzelnes Protein mit dem Molekulargewicht von circa 50 kDa gefunden werden. Der pH-Bereich, in dem der Proteinspot zu finden ist, liegt bei pH 8 bis 9 (Abb. 10).

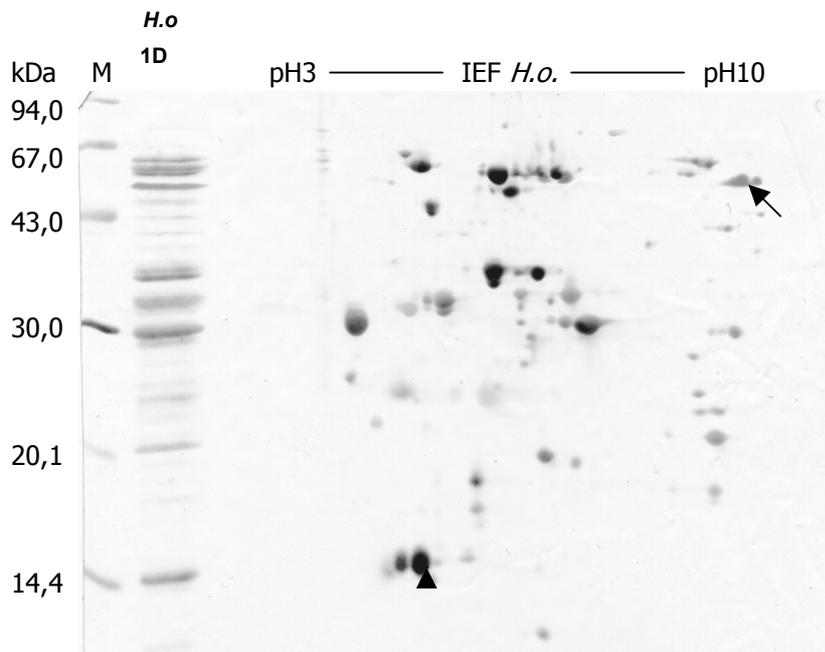


Abb. 11: 2D-*Western-Blot* des Gesamtproteins von *H. obtusa* (infektiöse Formen).

Der Molekulargewichtsmarker ist in Bahn 1 (M) aufgetragen. Das Molekulargewicht der einzelnen Markerproteine steht links von den Proteinbanden. In Bahn 2 wurde das Gesamtprotein nur nach dem Molekulargewicht aufgetrennt (Ho1D). Die isoelektrische Fokussierung (IEF) erfolgte im Bereich von pH3 bis pH10 (HoIEF). Danach wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Pfeilspitze markiert das 15,5 kDa Protein. Der Pfeil zeigt auf den ausgeschnittenen Proteinfleck mit dem Molekulargewicht von 51,5 kDa. Es sind mindestens 110 Proteinspots zu erkennen.

Konstruktion der pGEM-T 50kDFor und pGEM-T 50kDRev Plasmide

Die Plasmide pGEM-T 50kDFor und pGEM-T 50kDRev wurden wie in Abb. 4c beschrieben hergestellt. Nach erfolgreicher Transformation von *E. coli* JM 109 Bakterien wurden die Plasmide in den Bakterien vermehrt und anschließend isoliert. Die Plasmide wurden als Vorlage für das *Cycle-Sequencing* verwendet; die eingefügten DNA-Fragmente wurden nachfolgend sequenziert.

Sequenzanalyse und Sequenzvergleich in Nukleinsäure- und Proteindatenbanken

Die DNA- und die korrespondierende Aminosäuresequenz des 51 kDa Proteins von *H. obtusa* wurde auf verschiedene molekularbiologische Eigenschaften hin untersucht. Der GC-Gehalt der DNA-Sequenz (Abb. 13) des 51,5 kDa Proteins liegt bei 63,3 %. Das relative Molekulargewicht liegt bei 51,5 kD, der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei pH 12,41. Das entspricht den Eigenschaften, die schon von Ehram und Wiemann beschrieben wurden (WIEMANN, 1990; EHRSAM, 1999). Die Aminosäure Cystein kommt dreimal vor und ermöglicht die Bildung Disulfidbrücken. Das Protein ist nach dem Algorithmus von KYTE UND DOOLITTLE (1982) nicht membranständig. Der N-Terminus, der auch für die Primergenerierung verwendet wurde, hat keinen Signalpeptidcharakter. Das ergab die Untersuchung der Aminosäuresequenz nach NIELSEN UND KROGH (1998). Nur die erste N-terminale Teilsequenz ist auf isolierten DNA Fragmenten aus der Genbank zu finden (Abb. 13). Der zweite Teil der N-terminalen Sequenz fehlt. Die DNA Sequenz wurde über das Internet an das Europäische Molekularbiologische Labor geschickt und dort mit dem Suchprogramm "BlastX" mit schon bekannten DNA- und Proteinsequenzen verglichen. Dabei wurden alle sechs möglichen Leserahmen berücksichtigt. Es wurden in Datenbanken mehrere Proteine anderer Organismen gefunden, die ähnliche Aminosäuresequenzen aufweisen (Tab. 3, Tab. 6).

5'

ACTATAGAGTATCAGGAGGAACGACGGCCAGTACCGCAGCTCCGACAACGCGGTGCACAGGCGGACGGCTACACCAACTAC
 T I E Y Q E E N D G Q Y R S S D N A V H K A D G Y T N
 TCCACGTTCTCGCTGTGGGATACCTACCGGGCGCTGCACCCGCTGTTGACCCCTGGTGCAGTCGGAAAAACGCAACAGCGAT
 Y S T F S L W D T Y R A L H P L L T L V Q S E K R N S
 TTCGTCAACTCGATGCTTGCCCATCACGAACACAGCCCGTACGGCATGCTGCCGGTGTGGTCGTTCCACGGCCTGGAAGAC
 D F V N S M L A H H E H S P Y G M L P V W S F H G L E
 TGGTGCATGATCGGCTACCACGCGGTGCCGGTTCATCGCCGATGCGTACGTCAAGGGCATCCCAGGTTTCGACGCCGACAA
 D W C M I G Y H A V P V I A D A Y V K G I P R F R R R
 GGCTTGAAGCGGATGGTTCGAGACCGCAACTACGGTCCCTACGACGGCATCGCGCAGTACCGCGAGCTGGGTTATGTGCCG
 Q G L K A M V E T A N Y G P Y D G I A Q Y R E L G Y V
 ATCGACGAGGAAGGCGAGGCCCGCAGCAAGACGCTGGAGTACGCCCTTCGATGATTGGACCATCGCACGCATGGCGCAGGCC
 P I D E E G E A A S K T L E Y A F D D W T I A R M A Q
 ATGGGCAAGGCTGATGTTGCCGCTACCTTCGACAAGCGCGCCGCAACTGGCGCAATGCTTTTGACAAGGACACCGGCTTC
 A M G K A D V A A T F D K R A G N W R N A F D K D T G
 ATGCGCGCGCAAGCGTATGGCAGCTTCCGCACCCCATTCGATCCCAGCGCCAGCGGCTACGGCACTGACTACACCGAA
 F M R A R K R D G S F R T P F D P S A S G Y G T D Y T
 GGCAACGCCTGGCAATACTCCTGGTACGTGCCGAGGACGTGGCCGGACTGGCCGAGCGCACGGCGGCAGTGACAAGCTG
 E G N A W Q Y S W Y V P Q D V A G L A A A H G G S D K
 CTCGCGCCCTTGACGAGGTGTTCAACGCCAAGTGGATCCGTCCATCTTCGAGCATGAAGACATCACCGGCCCTGATCGGC
 L L A R L D E V F N A K V D P S I F E H E D I T G L I
 TGGTATGCGCATGGCAACGAGCCCAGCCACCACGTGCGCTACCTGTATTGTCACGCCGCCAGCCGTGGCGCACCCACAG
 G W Y A H G N E P S H H V A Y L Y S Y A G Q P W R T P
 CGCCTGAAGCAGATCATGGGACACCCAGTACGCCGACCGTCCCTTGATGGCGCGTGGCAGGCAACCATGATGTCGGCCAGA
 Q R L K Q I M G H P V R P T V L D G A W Q A T M M S A
 TGTCCGGCGTGGTACGTGTTTACCGCGCTGGGTTTCTTATATCCGGTAGCGCCGGGCGAGTGGCGAGTACATMCTGGGCCGT
 R C P A W Y V F T A L G F L Y P V A P G S G E Y I L G
 CCGTTCCTRCCGAAAACCGCGATGCGCCTGCCAACGGCAAGACATTACCATCGTGGCTGATGTGTCTGACGACAAGCAC
 R P F L P K T A M R L P N G K T F T I V A D V S D D K
 ACCTACGTGGCAGCGTGAGCCTCAACGGCAAGCCGTTGCAGCGCACCTTCCTGCGCCATGACGAGATCCTGGCCGGCGGC
 H T Y V G S V S L N G K P L Q R T F L R H D E I L A G
 GAGCTGCGTTTCAGCATGCAGGCCGAGCCGAACAAGGCGTGGCCGGGGCAGGGCGCGCAGGCGCCGTATTTCGATGAGCCAG
 G E L R F S M Q A E P N K A W P G Q G A Q A P Y S M S
 ATGACGATTGGTAGGTGCCGACCTTGGTTGGTACGCAGGACGTTAGCGGGAACGAAACCGCAGCCCCACCGCGCGCCACC
 Q M T I G R C R P W L V R R T L A G T K P Q P H P R A 3'

Abb. 13: Nukleinsäuresequenz des 51,5 kD Proteins von *H. obtusa*.

Die ermittelte Nukleinsäuresequenz des 51,5 kD Proteins von *H. obtusa* besteht aus 1377 Nukleotiden. Der offene Leserahmen beginnt bei der ersten Base am 5' Ende und endet bei der letzten Base am 3' Ende. Es ist der kodierende Strang vom 5'-Ende zum 3'-Ende dargestellt. Unterhalb der ersten Base eines jeden Triplets steht die korrespondierende Aminosäure im Einbuchstabencode. Der N-Terminus der Polypeptidsequenz befindet sich unterhalb des 5' Endes der DNA-Sequenz.

Tab. 3: Aminosäurevergleich 51,5 kD Protein *H. obtusa* mit anderen Bakterien.

Es werden die Aminosäuresequenzen des 51,5 kD Proteins von *H. obtusa* mit ähnlichen Polypeptiden anderer Bakterien verglichen. Hierzu wird der Einbuchstaben-Code zur Darstellung der einzelnen Aminosäuren verwendet. Hellgrün unterlegte Buchstaben sind Aminosäuren, die zumindest bei einem anderen Protein ebenfalls vorkommen. Rosa unterlegte Buchstaben sind verschiedene, aber gleichwertige Aminosäuren, die mindestens bei einem anderen Protein vorkommen. Der ansequenzierte N-Terminus des *Holospira*-Proteins ist umrahmt (Aminosäuren 37-44). Die N-terminalen Aminosäuresequenzen der anderen Bakterien sind aus Platzgründen nicht komplett dargestellt. Sie werden ab der Stelle gezeigt, ab der die Übereinstimmung mit der *H. obtusa* Sequenz beginnt. Die C-terminalen Enden aller Proteine sind dargestellt. Nur bei Eine Funktion ist bisher nur bei einem Protein aus *L. lactis* bekannt.

		10	20	30	40	50
<i>H. obtusa</i>	1	-----	-----	-----	-----	TIEY QEENDGQYRS
<i>X. fastidiosa</i>	1	AWENALARAR	IATDNPAQRR	I-----	FYTS LYHSL LAPTL	FSDVDGGRYRG
<i>P. gingivalis W50</i>	1	EWNAALSRIA	VARRGPGDVD	T-----	FYTC LYRSL LHPNT	FNDVDGGRYIG
<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	1	EWNAALSRIA	VARRGPGDVD	T-----	FYTC LYRSL LHPNT	FNDVDGGRYIG
<i>M. tuberculosis CDC1551</i>	1	QWSDALSKIR	VEGGREEQQR	I-----	FYSA LYRSHTMPHD	LTGENVWWT-
<i>L. lactis, Zuckerhydrolase</i>	1	AWNLF SRIE	IEHHNQEV S	T-----	FYHN LYRSFLFPQT	-----
<i>C. crescentus</i>	1	RWEEALGTVE	VEGGTPDEKT	I-----	FYTA LYHLLIHPNI	LQDANGEYPM
<i>P. gingivalis W50</i>	1	TWEKRLEDVR	VRGGDDTLRR	T-----	FYSS LYRSFLAPNV	GSDVDGGRYTG
<i>S. coelicolor</i>	1	DWENLLHRFD	I IETGEADRT	F-----	FDHC LYRFLFPQT	-----
<i>S. coelicolor</i>	1	QWDRILGKVE	VEGATQDQLT	T-----	LYSG LYRLYLPNA	-----
		60	70	80	90	100
<i>H. obtusa</i>	51	SNNAVHK-AD	GTYNYST-FS	LWDTYRALHP	LTLVQSEKR	NS-DFVNS--
<i>X. fastidiosa</i>	51	MDLQVHALPA	GYHNYST-YS	LWDTYRALHP	LTLVQSD-R	VP-D LLQC-
<i>P. gingivalis W50</i>	51	FDGVIH SVAS	GHTHYAN-FS	DWDTYRSLAP	LQGLLFPQ-R	AS-D MIQS-
<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	51	FDGVIH SVAS	GHTHYAN-FS	DWDTYRSLAP	LQGLLFPQ-R	AS-D MIQS-
<i>M. tuberculosis CDC1551</i>	51	-----S	DEPHYEDFYT	LWDTFRTLHP	LTLIIQPC-R	QR-D MIRS-
<i>L. lactis, Zuckerhydrolase</i>	51	-----	-----FY	EFLQE---HY	D-T---SSK-	-T---VKKGP
<i>C. crescentus</i>	51	MGSG-KTGNT	AHDRTV-FS	LWDTYRNVHP	LLCLLYPEK-	Q-LDMVRT--
<i>P. gingivalis W50</i>	51	WDQEVHR-AK	GFTHYQNW-S	LWDTYRTQSQ	LIALAP--R	EARDMAIS--
<i>S. coelicolor</i>	51	-----	GHEKVDGTYK	YASPF---KE	N-T--PTE-T	GAK--IVDGK
<i>S. coelicolor</i>	51	-----	-----FY	EINES---HM	DLATG-T---	-----VKKPGV
		110	120	130	140	150
<i>H. obtusa</i>	101	-----	-----M	LAHHEHSPYC	MLFVMSFHGL	EDWCMIG---
<i>X. fastidiosa</i>	101	-----	-----L	TRGAAECPDG	V-GIWP LQGV	ETGCMIG---
<i>P. gingivalis W50</i>	101	-----	-----L	VTDAEQS--G	AYERWALANS	ATGMMSG---
<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	101	-----	-----L	VTDAEQS--G	AYERWALANS	ATGMMSG---
<i>M. tuberculosis CDC1551</i>	101	-----	-----L	LDTYKHT--G	WMPDSRIAG-	ANGMTQG---
<i>L. lactis, Zuckerhydrolase</i>	101	LYTNNGFWDT	FRTVYPLYSL	IAVDE---YG	DMLEGFLNSY	RATGF LPKWL
<i>C. crescentus</i>	101	-----	-----L	IDMYRES--G	WLFRLWELYGQ	EFLTMEG---
<i>P. gingivalis W50</i>	101	-----	-----V	TKIDEES--G	WLPKNGYGTV	ETNIMTG---
<i>S. coelicolor</i>	101	VYVNGFWDT	YRTAWPAYSF	LTPSCA--G	ELVDGFVQOY	KDGGWTSRWS
<i>S. coelicolor</i>	101	LFSNNGFWDT	FRTTFPLFA-	LI IPEH--YQ	RFLEGFLNSY	RD TGF LPKWL
		160	170	180	190	200
<i>H. obtusa</i>	151	-----	-----YHA	V--PVIADAY	VKG-I-----	-----PRFRRR
<i>X. fastidiosa</i>	151	-----	-----YHS	A--VALAEGY	TKG-FTGIDY	AAAWPHYRKR
<i>P. gingivalis W50</i>	151	-----	-----D--S	VV-PLIVNLY	AFGA-RDFDL	KSAL-HYMVN
<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	151	-----	-----D--S	VV-PLIVNLY	AFGA-RDFDL	KSAL-HYMVN
<i>M. tuberculosis CDC1551</i>	151	-----	G-----S	NGDILIADA-	VSKKLGDFDV	N--L-AYEAI
<i>L. lactis, Zuckerhydrolase</i>	151	-----LMP	G-LIDA--T	LIDAVIADAA	SKN-T-----	-----RPDLM
<i>C. crescentus</i>	151	-----	-----DP--S	L--IVINDTW	QRG-LRAFDT	ATAYEAMKKN
<i>P. gingivalis W50</i>	151	SPDERG----	-----DP--S	VT-EFLTINAY	QQGLLHGWE E	KA---YRAL
<i>S. coelicolor</i>	151	SPGYAD-LMT	GTSSD----	VV--AFADAY	VKG-V-----	-----DFDAK
<i>S. coelicolor</i>	151	APDERG-MMP	GTLLDG----	-----IADSA	CKD-M-----	-----TPDLE

		210	220	230	240	250
<i>H. obtusa</i>	201	QG-----	-----L	KAMVETANYG	PXD--GIAQY	RE----LGYV
<i>X. fastidiosa</i>	201	-A-----	-----M	QDHAHGLRY-	-----	--YRK-LGYI
<i>P. gingivalis W50</i>	201	AA-----	-----T	QGGV-GLD-G	FLERP-GIAA-	--YLR-LGYG
<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	201	AA-----	-----T	QGGV-GLD-G	FLERP-GIAA-	--YLR-LGYG
<i>M. tuberculosis CDC1551</i>	201	LK-----	-----N	-GEVDSDK--	PFMQGRVLKD	--YLK-LGYV
<i>L. lactis, Zuckerhydrolase</i>	201	PEFLEA----	-----MK	KGATSQSENS	NYGRRGTKDY	---LK-LGYV
<i>C. crescentus</i>	201	AS-----	-----S	AGATHPI---	--RPDND--	--YLT-LGFV
<i>P. gingivalis W50</i>	201	RK-----	-----N	ADGVPP-TDS-	FAVGREAN--	REYLA-DGEFA
<i>S. coelicolor</i>	201	AA-DA----	-----AV	KNATVVPPSS	GVGRKGMETS	PF----LGYA
<i>S. coelicolor</i>	201	-GELFOA----	-----M	ETASKADPLG	INGRHGLAQY	QE----LGYL
		260	270	280	290	300
<i>H. obtusa</i>	251	PIDEE-----	---G---E-	AASKT-----	-----LEY	AFDDWTI--A
<i>X. fastidiosa</i>	251	PSDKV-----	-----DE-	SVSRT-----	-----LEY	AYDDWAC--A
<i>P. gingivalis W50</i>	251	PQTAEFRAN-	---GRIA-	GASVT-----	-----LEW	SVDDFAI--S
<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	251	PQTAEFRAN-	---GRIA-	GASVT-----	-----LEW	SVDDFAI--S
<i>M. tuberculosis CDC1551</i>	251	PFT-----	-----TR	SASRT-----	-----LEY	AYNDFAI--A
<i>L. lactis, Zuckerhydrolase</i>	251	P-----	-----	---LTH---	HESVNHTLDY	AESDYCI--S
<i>C. crescentus</i>	251	PLRE-----	-----QYDN	SVSHA-----	-----LEY	YLADWNL--S
<i>P. gingivalis W50</i>	251	PYVKGRPH--	AKPGDSDYDH	GASAT-----	-----LEY	ALSDAML--S
<i>S. coelicolor</i>	251	G-----	-----	---TET---	HEGLSWSLEG	YLNNDYGI--A
<i>S. coelicolor</i>	251	S-----	-----	---TDH---	HESVSHTLDY	AYSDFCI--A
		310	320	330	340	350
<i>H. obtusa</i>	301	RMAQAMGK-A	DVAAT-----	-FDKRA-----	-----	-----GNWR
<i>X. fastidiosa</i>	301	HLATAAGAHS	E-ARV-----	-LRARS-----	-----	-----RQ-YR
<i>P. gingivalis W50</i>	301	RFADSLGDTA	T-AAV-----	-FQNR-----	-----	-----QYWQ
<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	301	RFADSLGDTA	T-AAV-----	-FQNR-----	-----	-----QYWQ
<i>M. tuberculosis CDC1551</i>	301	VVAKSLGKTE	D-AKR-----	-YLARS-----	-----	-----GNWK
<i>L. lactis, Zuckerhydrolase</i>	301	QVA---KQT	G-DK-----	--EIS-----	---DFYAH---	---Q-AKDYQ
<i>C. crescentus</i>	301	FAHALGHKE	D-AAL-----	-FGKRS-----	-----	-----LGYR
<i>P. gingivalis W50</i>	301	RMARDLGHEA	D-AKR-----	-YAERA-----	-----	-----QSYR
<i>S. coelicolor</i>	301	KMGKLYKET	-----	G-EKRYKDE-	-SAYFLN---	---R-AQDYV
<i>S. coelicolor</i>	301	SCA---KKL	-----ENI--	--EIA-----	---ETYKA---	---A-SQNYR
		360	370	380	390	400
<i>H. obtusa</i>	351	NA---FDKDTG	FMRARKRDGS	FRTP-----	--FDP-SA--	SCYGT-----
<i>X. fastidiosa</i>	351	HV---FNRDSG	FMQFRLNGA	WATP-----	--FD---PRA	LGHKQ W--
<i>P. gingivalis W50</i>	351	NL---FNPTTG	YISPRSAAGF	FPDG-----	--PGFV-AYP	SCFG---QD
<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	351	NL---FNPTTG	YISPRSAAGF	FPDG-----	--PGFV-AYP	SCFG---QD
<i>M. tuberculosis CDC1551</i>	351	NL---WDDAIG	CVRPRYPNGE	WVEN-----	--YSCTYDYP	DRSGPWW-DA
<i>L. lactis, Zuckerhydrolase</i>	351	NI---FDSETG	FMRAKDADGN	FRADFLDIR-	-----	-----W---
<i>C. crescentus</i>	351	HY---YNKEYG	MICPLLPGDS	FLTP-----	--FDP--KQG	ENFEP-----
<i>P. gingivalis W50</i>	351	NV---FDPSTG	FFRARDAGGA	FTGE-----	--ADP-----	AQ-----
<i>S. coelicolor</i>	351	NL---FDAQAG	FFQKDVKGN	WRVDSEKYDP	RV-----	-----W---
<i>S. coelicolor</i>	351	QL---FDAETG	YMRARDNQG	FHPDFSPYS-	-----	-----W---
		410	420	430	440	450
<i>H. obtusa</i>	401	--DYTEGNAW	QYSWYVPQDV	AGLAAAHGGS	-DKLLARL-D	EVEFNA-----
<i>X. fastidiosa</i>	401	-HDFTECNAW	QATFLNQHDV	YCYMALFGGA	-DHFAAKL-D	ALFSA-----
<i>P. gingivalis W50</i>	401	GVD---EGNAE	QYLWVPHNV	AGLVTALGGR	-TAVVKRL-D	R-F-T-----
<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	401	GVD---EGNAE	QYLWVPHNV	AGLVTALGGR	-TAVVKRL-D	R-F-T-----
<i>M. tuberculosis CDC1551</i>	401	VF-Y-EGNSL	QYSFVVPQDV	AGLMANTGGP	-DGFVKWL-D	HLFD-----
<i>L. lactis, Zuckerhydrolase</i>	401	GRDYAEGSAW	QTSWSVLHDF	AGLIKHLG-S	RENFENKL-I	ELCN-Q-----
<i>C. crescentus</i>	401	NPGFHEGSAY	NYAFFVPHDI	QGLARLMGGA	-KVFSERL-Q	KVFE-----
<i>P. gingivalis W50</i>	401	SEGFHEGTSW	QYQWLVPQDL	PGMIDLIGGT	-DAANARL-D	-SFFAY----
<i>S. coelicolor</i>	401	GVDYETETNGW	GMAFTAPQDS	RGLANLYGGR	-DGLGDKL-D	E-YLSTPETA
<i>S. coelicolor</i>	401	GRDYAECSAI	QATLGVLHDI	PGLIQLMGKK	-ETFSNYL--	-L-KACQDA-
		460	470	480	490	500
<i>H. obtusa</i>	451	-K--V--DPS	I-----	---FE-HE---	-DITGL---	---IGWYAHG
<i>X. fastidiosa</i>	451	-PSELP--PG	AP-----PD	MDGM-----	-----	---VGQYAHG
<i>P. gingivalis W50</i>	451	-K-KLNVGPN	-----EP	Y--LWAG---	-----	-----
<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	451	-K-KLNVGPN	-----EP	Y--LWAG---	-----	-----
<i>M. tuberculosis CDC1551</i>	451	-----	-----	-----	-----	---GHYSQS
<i>L. lactis, Zuckerhydrolase</i>	451	-R-----PN	FNVEGYG---	---FEIHE---	MSEMAAIEF-	---QVAIS
<i>C. crescentus</i>	451	-----	-----	-----	-----	---GYDPT
<i>P. gingivalis W50</i>	451	D-Q-LLADPA	-----	AREVWVNG--	-----PYD	YINADKYNPQ
<i>S. coelicolor</i>	451	-----SPD	LKGS-YG---	---GVIHE---	MVE-ARDVRM	---GMYGHS
<i>S. coelicolor</i>	451	-----PL	FETTYG-KT	---YEIHE---	MSEMATAPF-	---GQIAIS

		510	520	530	540	550
<i>H. obtusa</i>	501	NEPSHHVAYL	Y-----S	Y-AGQPWRT	QRI-KQIMGH	-----PVRE
<i>X. fastidiosa</i>	501	NEPSHHIAYL	Y-----V	Y-AGQAYKT	QVMVRR-LLR	---EQYHDGR
<i>P. gingivalis</i> W50	501	NEPFGFVFWL	Y-----N	Y-IGQPWKT	QRTVDRVRG-	----LFGPTP
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	501	NEPFGFVFWL	Y-----N	Y-IGQPWKT	QRTVDRVRG-	----LFGPTP
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	501	NEEDLLAPYL	Y-----I	H-AGRDPRT	HEIVRGLMAK	----HYRLSR
<i>L. lactis</i> , Zuckerhydrolase	501	NQPSFHYPYL	F-----S	Y-IGKPWMA	TPLIKNLLTE	----TFNDS
<i>C. crescentus</i>	501	NEFDIAYPYL	F-----S	YFPKFAWRT	QKLTRELIDK	----HFCNAP
<i>P. gingivalis</i> W50	501	NEEDLIAPYT	Y-----S	--TGQPWKT	TDVVAHALT-	----LFTDTP
<i>S. coelicolor</i>	501	NQVAHHALYM	YD-----	-AAGQPYKT	QKNIREVLQR	----LYTGSD
<i>S. coelicolor</i>	501	NQPSFHIYPYL	-FR-----	Y-SDYDPYT	ALLIKTLRQK	----AFHPSW
		560	570	580	590	600
<i>H. obtusa</i>	551	TVLD---GAW	QA-IMMSARC	PAWYVFTALG	FLYFPVAPGSG	EYIL-GRPFL
<i>X. fastidiosa</i>	551	DGL---SGNE	DCGQM-S---	-AWFVLSALG	-MY-VDPVSG	IYVIAGSP-L
<i>P. gingivalis</i> W50	551	GGA---PGND	DLGAL-S---	-SWYVWAALG	-LYPSTPGTT	ILTV-NTP-L
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	551	GGA---PGND	DLGAL-S---	-SWYVWAALG	-LYPSTPGTT	ILTV-NTP-L
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	551	TGL---PGND	DAGAM-S---	-SWYVWNAMG	-LYPNAGQPF	-YYL-SAP-T
<i>L. lactis</i> , Zuckerhydrolase	551	---KGYPGDE	DNGTM-A---	-AWYIFSSLG	F-YPVTAASN	QYVL-GIP-L
<i>C. crescentus</i>	551	NGI---PGND	DAGTM-S---	-AWLVYSMLG	F-YPDCPGSP	TYTL-TSP-V
<i>P. gingivalis</i> W50	551	TGM---TGND	DLGTM-S---	-AWNVLSSIG	-IFPIQPGYD	TWGL-STP-V
<i>S. coelicolor</i>	551	IG-QGYHGDE	DNGEQ-S---	-AWFLFSSLG	F-YPLVMGSG	EYAV-GSP-L
<i>S. coelicolor</i>	551	---EAYPGDE	DNGSL-S---	-AWYIWSALG	F-YPTCPGPK	SYDL-GIP-L
		610	620	630	640	650
<i>H. obtusa</i>	601	PKT-AM-RL-	-----	---FNGKTFT	IVADV-SD-D	---KHTYVGS
<i>X. fastidiosa</i>	601	-FPYAELDV-	-----	---GRGRKLR	ILARHTSASN	V-----YVQA
<i>P. gingivalis</i> W50	601	-FDRAVIAL-	-----	---FTCKSIQ	ITAPGASGRN	RL-K--YIDG
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	601	-FDRAVIAL-	-----	---FTCKSIQ	ITAPGASGRN	RL-K--YIDG
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	601	-FARSQISLE	-----	---GGKTFV	VSAPTSNDEN	R-----YIVG
<i>L. lactis</i> , Zuckerhydrolase	601	-WDKARINLS	SG-----	---Q-Q-LT	ILAEPNAPQ	V-----FVNQ
<i>C. crescentus</i>	601	-FPRVRIRLN	P-----	QYYPQGEELII	TTNTENQPTD	SI----YIHT
<i>P. gingivalis</i> W50	601	-FDRVDLTL	R-----	RYYFRG-ALT	ITAPGTSDD	R-----YVQS
<i>S. coelicolor</i>	601	-FKKATVHLE	NG-----	---RD--LV	VKAPKNSTKN	V-----YVQG
<i>S. coelicolor</i>	601	-FDHLRVYLA	KE-----	---DKWLD	IHTKQNHNF	N-----FVKE
		660	670	680	690	700
<i>H. obtusa</i>	651	VSLNGKPLQR	T-FLRHDEIL	-A-GGELRFS	MQAEPNKAWP	GQGAQA--PY
<i>X. fastidiosa</i>	651	LRWNGSPMTR	A-WLRHTE-L	-ARGGTLEFE	MGAQPNLAF-	GTHPODL-PP
<i>P. gingivalis</i> W50	651	LTIDRQPSNQ	T-FLPES-IV	RT-GGDLTFS	LAGTPNKVW-	SFGAGSSAVT
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	651	LTIDRQPSNQ	T-FLPES-IV	RT-GGDLTFS	LAGTPNKVW-	GTAASAA-PP
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	651	AKLNGKPLER	A-WISHDE-L	-ARGGVLELT	LAPAPG-AW-	SFGAGSSAVT
<i>L. lactis</i> , Zuckerhydrolase	651	ITFTDKKVN	T-FIKHEE-L	IK-GGTLKFD	LGIVPN---E	GTAASAA-PP
<i>C. crescentus</i>	651	VSLGNKTLPH	GTRHISHADL	V-RCGHLRYE	LSNRPR----	CKSLPKP-PQ
<i>P. gingivalis</i> W50	651	ARTDGSAYAR	T-WLTTDA-L	RS-VRSLAFT	VGPOPS-GW-	LKYTNEQLPY
<i>S. coelicolor</i>	651	LKVNKGRWNS	T-SLPHS-LI	-AKGGVLEFD	MGAKPS-SW-	GTGTEAV-PP
<i>S. coelicolor</i>	651	CRIDKTLVST	---IQHODLL	KA--EQLTFT	LSWLPS----	CTGDNA-PP
		710	720	730	740	750
<i>H. obtusa</i>	701	SM---SQMT-	TGRC-R----	FWLVRRT---	-----	-----LAGT
<i>X. fastidiosa</i>	701	SF-----T-	---AL-----	-----	-----	-----
<i>P. gingivalis</i> W50	701	-VNIA-R---	-----	EIIGIVPGAT	GTVTVDAQYT	VTPTSYYVGI
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	701	-VNIA-R---	-----	EIIGIVPGAT	GTVTVDAQYT	VTPTSYYVGI
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	701	GL	-----	-----	-----	-----
<i>L. lactis</i> , Zuckerhydrolase	701	SLTEN	-----	-----	-----	-----
<i>P. gingivalis</i> W50	701	PLT	-----	-----	-----	-----
<i>S. coelicolor</i>	701	SITQDDE---	-VPAPRTDA-	-ITQGGLFD	NTSATDASVT	SVLDLPSVRTK
		760	770	780	790	800
<i>H. obtusa</i>	751	KPOP--HPRA	T	-----	-----	-----
<i>X. fastidiosa</i>	751	--QP--VPKH	A	-----	-----	-----
<i>P. gingivalis</i> W50	751	AAEP---RMI	DGVDDLSGQF	-----	-----	-----
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	751	AAEP---RMI	DGVDDLSGQF	-----	-----	-----
<i>S. coelicolor</i>	751	APAGWKLOGS	ADGGEGAKTT	WRTLDERSGE	SFAWDRQTRA	FSVKSPGSYA
		810	820	830		
<i>P. gingivalis</i> W50	801	DDGAVSASV	AITVARSVPS	GYPIYVTTT	AGD	
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	801	DDGAVSASV	AITVARSVPS	GYPIYVTTT	AGD	
<i>S. coelicolor</i>	801	-----	-----Q	YAVQYTLTSS	A-D	

Lektin-Bindung an phagosomale Proteine von *P. caudatum*

Der Nachweis von Proteinen mit Zuckerresten auf Paramecium-Phagosomen mit verschiedenen Lectinen ergab eine Reihe von positiven Ergebnissen. Das Lektin WGA (Tab. 5) band in verschiedenen Nahrungsvakuolen und in anderen Teilen von *P. caudatum* (Abb. 15a). Dieses Lektin erkennt vorrangig Strukturen, die (Glukose-Acetat)² enthalten. Eine weitere Gruppe von Zuckerresten in oder auf Phagosomen konnte mit den Lectinen aus PNA und HPA nachgewiesen werden (Abb. 15b,c, Tab. 5). Diese drei Lectine binden hauptsächlich an Galaktose-N-Acetat und D-Galaktose Strukturen. Weitere Lectine wurden eingesetzt, um andere Zuckerstrukturen in oder auf Nahrungsvakuolen zu finden (Tab. 5). Diese Lectine führten aber zu keiner Markierung der Phagosomen. Um die Ergebnisse der Lectinmarkierung abzusichern, wurden isolierte Phagosomenproteine von *P. caudatum* in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Auf einem entsprechenden *Western-Blot* wurden dann mit den Lectinen PNA und WGA ein Nachweis von zuckerhaltigen Proteinen versucht. Es konnte nur mit dem Lektin aus der Erdnuss (PNA) eine Proteinmarkierung beobachtet werden. Das markierte *P. caudatum* Protein lag bei ungefähr 67 kD (Abb. 14).

Tab. 5: Verschiedene pflanzliche Lectine

Spalte 1 benennt die Abkürzungen der Lectine und die lateinischen Namen der dazugehörigen Pflanze. Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lectine sind in der 3. Spalte aufgeführt. Die von ALLEN ET AL. (1988) eingesetzten Lectine sind in der zweiten Spalte aufgelistet. Dabei handelt es sich nur um Lectine, die ebenfalls in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen. Die Spalte mit der Zuckerspezifität beschreibt die Zuckerreste, die von den jeweiligen Lectinen erkannt und gebunden werden.

Lektin Name und Herkunft	Lokalisation ALLEN ET AL. (1988)	Lokalisation Steffen Schwarz	Zuckerspezifität
Con A <i>Canavalia ensiformis</i>	Diffus Markierung im Zytoplasma	Diffus im Zytoplasma. Nicht dargestellt.	Einfach verzweigte Zuckerketten. Vor allem α -D-Mannose - α -D-Glukose -Hybride.
WGA <i>Triticus vulgaris</i>	Nahrungsvakuolen, bei <i>P. multimicronucleatum</i> , Cillien auf Cortex und Schlund, bei Zellteilung ebenfalls	Markiert Nahrungsvakuolen und diffus das Zytoplasma.	Terminale (Glukose-N-Acetat) ² Ketten.
E-PHA <i>Phaseolus vulgaris</i>	nicht durchgeführt	Kein Signal in <i>P. caudatum</i>	Hochspezifisch für doppelt verzweigte Zuckerketten mit Galaktose-N-Acetat; Galaktosyl- β -1,4-Glukose-N-Acetat.

PSA <i>Pisum sativum</i>	nicht durchgeführt	Kein Signal in <i>P. caudatum</i>	Doppelt und dreifach verzweigte Zuckerketten mit Fucose oder α -Mannose.
UEA <i>Ulex europaeus</i>	In <i>P. multimicronucleatum</i> und <i>P. tetraurelia</i> nur Trichozystenspitzen	Kein Signal in <i>P. caudatum</i>	α -L-Fucose.
HPA <i>Helix pomatia</i>	nicht durchgeführt	Markiert Nahrungsvakuolen	Terminale Galaktose-N-Acetatreste; N bzw. +O glykosidisch verbundene Galaktose-N-Acetatreste, die an Serin oder Threonin hängen.
PNA <i>Arachis hypogea</i>	Nur Nahrungsvakuolen markiert	Markiert Nahrungsvakuolen	Vor allem Galaktose-Galaktose-N-Acetat Verbindungen.

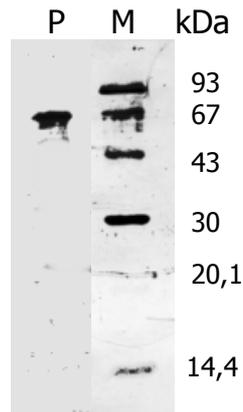


Abb. 14: Nachweis eines Galaktose-Galaktose-N-Acetat Zuckerrestes an einem Phagosomenprotein von *P. caudatum*.

Markerproteine (M) und Phagosomenproteine (P) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Die Proteinbande bei 67 kDa in Bahn P wurde durch die Bindung von Digoxigenin-markierten *H. obtusa* Proteinen erreicht. Das Digoxigenin wurde über Antikörper mit einer alkalischen Phosphatase Reaktion nachgewiesen. Die Markerproteine wurden durch eine Amido-Schwarz Färbung sichtbar gemacht. Die relativen Molekülmassen (kDa) der Markerproteine sind an der Seite aufgeführt.

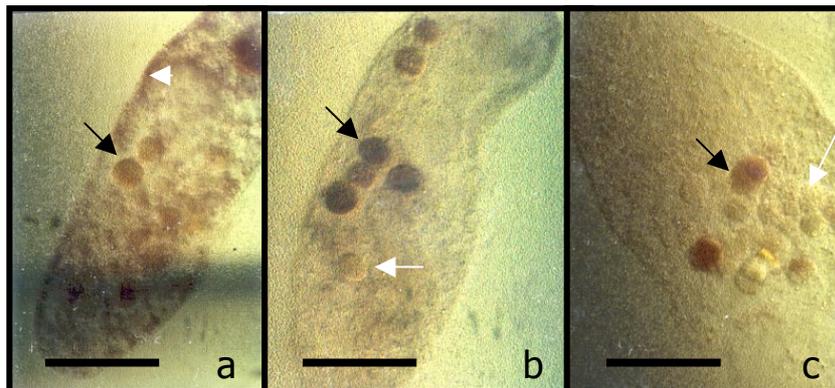


Abb. 15: Lokalisation von Zuckerresten in Phagosomen durch Lectine.

Der Maßstab misst 75 μm . **a:** Hier wurde das Lektin WGA verwendet, um endständige Glukose-N-Acetat² Zuckerreste in ganzen *P. caudatum* nachzuweisen. Der schwarze Pfeil zeigt auf ein dunkel markiertes Phagosom. Die weiße Pfeilspitze zeigt eine Markierung im Zytoplasma. **Abb. b:** Markierung von bestimmten Phagosomen durch das Lektin PNA (schwarzer Pfeil). Einige Phagosomen wurden nicht markiert (weißer Pfeil). **c:** Markierung von einzelnen Phagosomen durch das Lektin HPA (schwarzer Pfeil). Andere Phagosomen wurden nicht markiert (weißer Pfeil).

Ergebnisse - Das 15,5 kDa Proteins von *H. obtusa*

Phagen-Genbank-Screening mittels PCR und Klonierung der PCR-Produkte

Die von der bisher bekannten 15,5 kDa DNA-Sequenz abgeleiteten Primer wurden in einer PCR eingesetzt, um spezifische DNA-Fragmente des Gens des 15,5 kDa Proteins aus der *H. obtusa* Genbank zu amplifizieren (Abb 2, Abb. 3, Abb. 4a+b). Anschließend wurden die einzelnen Fragmente in das pGEM-T Plasmid eingebaut. Mit den Plasmiden wurde der *E. coli* Stamm JM109 transformiert und vermehrt.

Konstruktion des Leserahmens des 15,5 kDa Proteins mit *Holospira*-Signalpeptid

Die Klone, welche die Plasmide mit den beiden gewünschten Inserts (CSSr, SfEG) trugen, wurden vermehrt und die Plasmide im großen Maßstab isoliert. Anschließend folgte die Behandlung des pGEM-T CSSr Plasmids mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Nde*I, um das DNA-Fragment herauszuschneiden und aufzureinigen. Parallel dazu wurde das pGEM-T-SfEG Plasmid ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Nde*I behandelt und danach vom Reaktionsansatz getrennt. Beide lineare DNA-Stücke, CSSr und pGEM-T-SfEG, besaßen komplementäre überhängende DNA-Stränge, die den gerichteten Einbau des Inserts in das Plasmid gewährleisteten (Abb. 5a). Nach Ligation und Transformation von *E. coli* JM 109 konnten mittels des Blue / White Verfahrens positive Klone gefunden werden. Aus ihnen wurden im Anschluss die Plasmide (pGEM-T 15,5 kDa (+)) isoliert und mit der *Cycle Sequencing* Methode sequenziert. Plasmide und die entsprechenden Klone, die das richtige Konstrukt trugen, wurden zum Schluss vermehrt und die Plasmide für die weitere Verwendung isoliert. Dadurch wurde die *Sau*III A Schnittstelle, durch welche die DNA-Sequenz des Proteins in der *Holospira* Genbank geteilt wurde, beseitigt. Außerdem stellte das zusammengefügte Fragment im pGEM-T 15,5 kDa (+) Plasmid die komplette DNA-Sequenz des 15,5 kDa Proteins einschließlich Signalpeptid und Stoppcodon TAA.

Konstruktion des Leserahmens des 15,5 kDa Proteins ohne *Holospira*-Signalpeptid

Ziel war es ein DNA-Fragment zu erhalten, das nur die Region enthielt, die für das eigentliche periplasmatische 15,5 kDa Protein aus *H. obtusa* kodiert. Die Klone, welche die Plasmide mit den beiden gewünschten Inserts (NPSr, SfNG) trugen, wurden vermehrt und die Plasmide im großen Maßstab isoliert. Anschließend folgte die Behandlung des pGEM-T CSSr Plasmids mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Nde*I, um das DNA-Fragment herauszuschneiden und aufzureinigen. Parallel dazu wurde das pGEM-T-SfEG Plasmid ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Nde*I behandelt und danach vom Reaktionsansatz getrennt. Beide lineare DNA-Stücke, NPSr und pGEM-T-SfNG, besaßen komplementäre überhängende DNA-Stränge, die den gerichteten Einbau des Inserts in das Plasmid gewährleisteten (Abb. 5b). Nach Ligation und Transformation von *E. coli* JM 109 konnten mittels des Blue / White Verfahrens positive Klone gefunden werden. Aus ihnen wurden im Anschluss die Plasmide (pGEM-T 15,5 kDa (-)) isoliert und mit der *Cycle Sequencing* Methode sequenziert. Plasmide und die entsprechenden Klone, die das richtige Konstrukt trugen, wurden zum Schluss vermehrt und die Plasmide für die weitere Verwendung isoliert. Dadurch wurde ebenfalls die *Sau*III A Schnittstelle, durch welche die DNA-Sequenz des Proteins in der *Holospira* Genbank geteilt wurde, beseitigt. Weiterhin stellte dieses DNA-Fragment nur die DNA-Sequenz des 15,5 kDa Proteins ohne Signalpeptid und Stoppcodon dar.

Sequenzinformation zum Gen des 15,5 kDa Proteins

Die von Brigge und Biegger gefundene Sequenz des Gens wurde nur bis zur Base Nr. 597 ermittelt. Eine weitere Sequenzierung war nicht möglich, weil am C-terminalen Ende eine SauIIIA Schnittstelle vorlag (pers. Mitteilung Theo Brigge), die bei der Herstellung der Genbank entstanden war. Die in Montreal / Canada gefundene Sequenz stammte aus einer anderen *Holospira*-Genbank. Durch eine größere Überlappung im Schnittstellenbereich konnte ein weiterer Teil der Sequenz ermittelt werden. Somit lag die DNA-Sequenz vom Startcodon bis zum Stopcodon vollständig vor. Nur der Unterschied in einer Base führte zu verschiedenen Aminosäuren an der Position 69. Die von Brigge und Biegger gefundene Sequenz enthält an dieser Stelle ein Glutamin (CAG), während die von Lang und Nickel gefundene Sequenz ein Arginin aufweist (CGG) (Abb. 16). Dieser Unterschied wirkt sich auch auf den isoelektrischen Punkt des Proteins aus. Ein Protein nach der Stuttgarter Sequenz hat einen pI-Wert von 5, wogegen ein Arginin zu einem pI-Wert von 5,2 führt. Aus der Literatur ist bereits ein isoelektrischer Punkt von 5,2 beschrieben (DOHRA ET. AL., 1994; WIEMANN UND GÖRTZ, 1991). Auf Grund der Sequenzdaten wurden Primer von den Randsequenzen hergestellt, um in der Phagen-Genbank nach den entsprechenden Genfragmenten zu suchen.

Analyse der Gesamt-DNA-Sequenz des Gens des 15,5 kDa Proteins

Nach Zusammenfügen aller Sequenzdaten erhielt man eine DNA-Sequenz, die von Position -286 bis Position + 1105 zu lesen war. Unter Berücksichtigung der beiden potentiellen Startcodons (ATG, ATT) (Abb. 16 oder 122) wurde mit geeigneter Software nach Homologien mit anderen Proteinen gesucht. Dabei konnte bisher keine DNA-Sequenz oder Proteinsequenz gefunden werden, die annähernd Ähnlichkeit mit dieser *H. obtusa* Sequenz hatte. Der AT-reiche Bereich vor dem Leserahmen weist einige mögliche regulatorische Sequenzen auf, deren Funktion aber nicht unter Beweis gestellt wurden (Abb. 16 oder 122). Die Startcodons, die am ehesten in Frage kommen, ATG und ATT, liegen 21 bzw. 22 Aminosäuren stromaufwärts von der Aminosäure entfernt, die durch die N-terminale Sequenzierung ermittelt wurde (Abb. 16). Dieses kurze Stück wurde anhand eines speziellen Algorithmus (NIELSEN UND KROGH, 1998) als ein mögliches Signalpeptid erkannt, das zwischen der 21ten und 22ten Aminosäure eine potentielle Schnittstelle aufweist. Alle anderen stromaufwärts liegenden möglichen Startcodons werden entweder durch darauffolgende Stopcodons negiert oder sind soweit vom N-Terminus entfernt, dass die Funktion eines Signalpeptids ausgeschlossen werden kann.

Der AT-Gehalt des Hauptproteins ohne Signalpeptid beträgt 65%, was für das *Holospira* Genom (64,4% AT-Gehalt) typisch ist (B. Franz Lang, persön. Mitteilung). Der AT-Gehalt der Sequenzen stromaufwärts und stromabwärts des Leserahmens ist jedoch deutlich höher. Er liegt bei über 80%. Daraus ergeben sich auch sehr unterschiedliche isoelektrische Punkte für die verschiedenen Sequenzregionen. Der eigentliche Leserahmen des 15,5 kDa Proteins weist einen pI-Wert von 5 auf, während alle drei Leserahmen davor und danach pI-Werte größer oder gleich 9 ergaben. Der nach KYTE und DOOLITTLE (1982) benannte Algorithmus berechnet einen Wert, anhand dessen man abschätzen kann, ob das Protein in einer Membran eingebettet ist oder nicht. Im Falle des 15,5 kD Proteins lag der Wert bei -0,5, was für ein wasserlösliches Protein spricht. Die aus der DNA abgeleitete Aminosäuresequenz enthält zwei Cysteine, die als potentielle Partner für Disulfidbrückenbindungen in Frage kommen (Aminosäure 60 und 125, Abb. 16). Weiterhin stimmt das berechnete Molekulargewicht von 15,5 kDa nicht genau mit dem früherer Untersuchungen überein, die von 14 bzw. 15 kDa ausgehen (DOHRA ET. AL., 1994; WIEMANN UND GÖRTZ, 1991). Allerdings zeigt das aus

H. obtusa isolierte 15,5 kDa Protein im SDS-PAGE tatsächlich ein Laufverhalten, das auf ein niedrigeres Molekulargewicht schließen lässt (Abb. 11).

```

-286          GATGCATCAAATCGATGGAATACTTTTTCTCATACTCAATCTAAAATC
-238 TTCTTTAACTGTATATTTCAAAAAGGGAAAAAATTAACAGAGGAAAAAATTAACAGATACTTTTTTTAA
-71  AAATTTATTTTTTTTTTTATTTTTTTTCCAATATAATAATTGATGTAAGTTAAAAAACATTTTATAAAATT
      -351      -352      -101      -102      SD1      SD2
  1  ATGAATAAAATCTTTTATAAACTATTTTTTGTTCCTTTAATCTGGTTAAATACTTCTTTTTCTCAGCCA
  1  M N K I F Y K L F F V S L I W L N T S F S Q P

70  CCTAGACGATATGCATCTAAACTATATGAGATGACACAATTTGATACTGATACTTCACTAGCTATGCGT
23  P R R Y A S K L Y E M T Q F D T D T S L A M R

139  CGAAAAATTTAGTGAAGATTTTCATGATTTTTTGTTCGGATGTGTGCGTCGTTATATAGAAAATCCAAGG
47  R K F S E D F H D F L F G C V R R Y I E N P R

208  ATTGCGTCTAAGGACGATTTAGAGGAAAATAAAACTCTCGCACTCAACCTTCCTGATGCAGAGAAGGTC
70  I A S K D D L E E I K T L A L N L P D A E K V

277  GTGTTTATTGAATTTTTTATCAGAAAAAATAATAACAGCTTAGGAAATAAAAATGAACTCAATAAGGAA
93  V F I E F L S E K N N N S L G N K N E L N K E

346  ACTTTTGAAATGATTGAAAAAGCGATTTGTGGGCGTATTCTTCCCTTATACGGAGAAGATCTAAAAGAA
116 T F E M I E K A I C G R I L P L Y G E D L K E

415  GTTCCCAAGCTTATAAGGATATTTTTTAA
139 V S Q A Y K D I F *

445  GATAAAAGATAGCTAAAGGATAAAATGATATGTAGATGGGGTCTTAAAAAACTTCTCTACTGATCTCT
517 CAATTTTAAAGCTTTCACTTGAGCCTATTTGTGCTCGATGGGGTTGAGATCGGGGAATAGGGTGGCAA
589 GTAAAAGAGCGTGCATGTTTTTAAACGCACCTGACCATATTTGAGATGTGAGAAAGGTCTGCGTTATCCA
661 TGATGACAACACTGTTTGGAAAGGAAGCTTGGTATCAAATCTTGGATCATTCAAGCGTTGAAATCTGCCA
733 TGTGATGGTGACTTGAAGAAAATTTTTGAGTAAGAAAAACTGAGTCCAAACACGCTGATGATATTCGT
805 TTGTTCCCTAGCTTCCCAATTGTGCCCCCTATAACACCTTCTGTTCTTTCAATTCATCCCTATGTGTTT
877 TTGGCATGCCATGAGCTAATCCACTCTCATCCAAAGATAATAAGACGAACGTCATTCTTGTATCTTTT
949 GAGTTTTTGGTAAAATGTAGCACGCTTTTCGGTGTCTGCTTTGGGATGCTTTAGAGTTTTTTTAAAGGCA
1021 TACCTAAACGTTTTAGAGCTGACCAAGCTTTTCGATACCGATTTTGAACGTTGAAAAATTTCTGAAAAA
1093 CTTAACTTTTCTGTCTCTTTGATCGAAACAACACGATGCATCAAATCGATGAAATACTTTTTCTCATA
1165 TC

```

Abb. 16: Nucleotidsequenz des Gens des 15,5 kDa Protein von *Holospira obtusa* und seine flankierenden Regionen.

Die durch Basentriplets kodierte Aminosäuren stehen unter der jeweiligen ersten Base. Es ist der kodierende Strang dargestellt. Die Aminosäuren des potentiellen Signalpeptids (Aminosäure 1-21) sind fettgedruckt. Die unterstrichenen Bereiche stellen die Aminosäuren dar, die aus dem gereinigten Protein durch die N-terminale Mikrosequenzierung ermittelt wurden. Die vermuteten regulativen Nucleotidsequenzen vor dem Startcodon sind fett gedruckt und unterstrichen. SD stellt die sogenannte Shine-Dalgarno Sequenz dar, die für die Bindung an die ribosomale 16SrRNA von Bedeutung ist. Es sind mehrere potentielle SD-Sequenzen zu sehen. Die Zahlen -10 bzw. -35 sind die Bereiche, die von der RNA-Polymerase als Bindungsstellen erkannt werden. Das * unter dem Triplet TAA markiert das Stopcodon. Die Schnittstelle des Restriktionsenzym *SauIII*A (GATC) ist umrahmt. Ab dieser Schnittstelle stammt die primäre Nucleotidsequenz von B. F. Lang.

Konstruktion eines Expressionsplasmids mit komplettem Leserahmen des 15,5 kDa Proteins

Das Plasmid pGEM-T-15kDa (+) wurde mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NdeI* behandelt, um das Insert in ein anderes Plasmid zu klonieren. Parallel dazu wurde das pET38b Plasmid ebenfalls mit den gleichen Enzymen behandelt, um das Insert mit den komplementären Schnittstellen im korrekten Leserahmen aufzunehmen (Abb. 6a). Die DNA-Fragmente wurden gereinigt und ligiert. Danach folgte eine Transformation der *E. coli* Stämme NovaBlue und BL21(DE3) mit den Ligationsprodukten. Das Plasmid pET38b trägt eine Kanamycin-Resistenz. Das stellt sicher, dass nur transformierte Bakterien auf den Agarplatten wachsen, die auch das gewünschte Plasmid tragen. Einzelkolonien wurden mit Hilfe der PCR direkt von der Platte weg auf die Insertlänge hin überprüft. Positive Kolonien wurden daraufhin vermehrt und deren Plasmide isoliert und sequenziert. Das Produkt dieser Ligation ist das Plasmid pET38b CEB (Abb. 6a).

Konstruktion eines Expressionsplasmids mit Leserahmen des 15,5 kDa Proteins mit plasmideigenem Signalpeptid

Das Plasmid pGEM-T-15kDa (-) wurde mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NheI* behandelt, um das Insert in das pET38b Plasmid zu klonieren (Abb. 6b). Parallel dazu wurde das pET38b Plasmid ebenfalls mit den gleichen Enzymen behandelt, um das Insert mit den komplementären Schnittstellen im korrekten Leserahmen aufzunehmen (Abb. 6b). Die DNA-Fragmente wurden gereinigt und ligiert. Danach folgte eine Transformation der *E. coli* Stämme NovaBlue und BL21(DE3) mit den Ligationsprodukten. Das Plasmid pET38b trägt eine Kanamycin-Resistenz. Das stellt sicher, dass nur transformierte Bakterien auf den Agarplatten wachsen, die auch das gewünschte Plasmid tragen. Einzelkolonien wurden mit Hilfe der PCR direkt von der Platte weg auf die Insertlänge hin überprüft. Positive Kolonien wurden daraufhin vermehrt und deren Plasmide isoliert und sequenziert. Das Produkt dieser Ligation ist das Plasmid pET38b PNB (Abb. 6b).

Expressionsversuche: Transformation und Expression in *E. coli* BL21 (DE3)

Diejenigen NovaBlue Stämme, welche die Expressionplasmide enthielten wurden vermehrt, um anschließend die Plasmide pET38b CEB und pGEM-T-15kDa (-) zu isolieren. Gereinigte Plasmide wurden im Anschluss durch Transformation in den Expressionstamm *E. coli* BL21 (DE3) überführt. Die so entstandenen Stämme wurden als CEB [BL21 (DE3) mit pGEM-T-15kDa (+)] und als PNB [BL21 (DE3) mit pGEM-T-15kDa (-)] bezeichnet. Bei allen drei Stämmen wurden Wachstumsraten ermittelt, um Auswirkungen des exprimierten Proteins zu erkennen (Tab. 3).

Tab. 6: Optische Dichten (OD) der untersuchten *E. coli*-Kulturen.

Die OD-Messungen wurden bei 600 nm vorgenommen. Die Schichtdicke betrug 10 mm. Die Messungen wurden nach jeweils 1, 3, 7 und 14 Stunden (über Nacht) durchgeführt. Die einzelnen Stämme wurden nach 3 Stunden Anzucht auf eine gleiche OD von 0,1 eingestellt und mit 200mM IPTG versetzt. Danach begannen die Messungen in entsprechenden Zeitabständen. In den einzelnen Zellen der Tabelle sind die Durchschnittswerte von drei Messreihen und die dazugehörigen Standardabweichungen aufgeführt. Werte über 3 OD_{600nm} wurden durch Verdünnungsreihen ermittelt. Die Messwerte wurden dann mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

Bakterien Stamm	PNB <i>E. coli</i>	BL21 <i>E. coli</i>	CEB <i>E. coli</i>
1 Stunde	0,18±0,1	0,2±0,06	0,13±0,07
3 Stunden	0,56±0,19	0,97±0,12	0,41±0,15
7 Stunden	4±1,31	10±1,06	2,69±1,19
14 Stunden	2,1±2,4	8±2,23	1,77±2,11
Teilungsrate (h ⁻¹)	0,53	0,66	0,48

Expressionsversuche: Zeit- und IPTG-Reihen

Die Expression des 15,5 kDa Proteins in *E. coli* verlief in den transformierten *E. coli* Stämmen CEB und PNB erfolgreich (Abb. 17), wobei es beide Male durch den monoklonalen Antikörper MKA14 nachgewiesen wurde. Es konnte kein toxischer Effekt wie zum Beispiel eine stark verringerte Wachstumsrate während der Expression beobachtet werden. Das Wachstum war stark verzögert im Vergleich mit dem Kontrollstamm (Tab. 3). Sehr ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Kultivierung ohne Induktors IPTG gefunden. Die Negativ-Kontrolle, der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) zeigte keine positive Reaktion auf dem Immunoblot mit dem monoklonalen Antikörper MKA14 (Abb. 17).

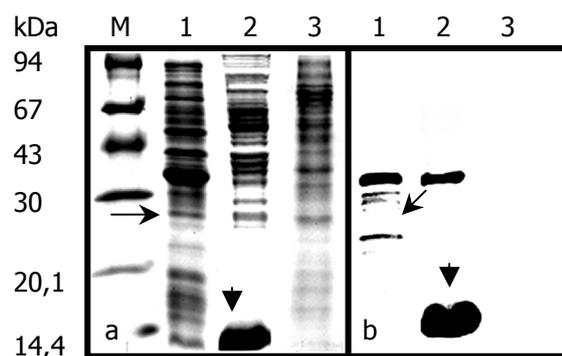


Abb. 17: Expremierte Proteine aus den transformierten *E. coli*-Stämmen.

(a) SDS-PAGE, gefärbt mit Coomassie Brilliant Blue (CBB). Bahnen 1-3 zeigen das Gesamtprotein der transformierten *E. coli*-Stämme PNB, CEB und dem Kontrollstamm BL21 (DE3). Die Bakterien wurden 3 Stunden in Gegenwart des Induktors IPTG bei 30°C unter ständigem Schütteln kultiviert. (b) Immunoblot, die sichtbaren Banden wurden mit dem α -14 kDa monoklonalen Antikörper und dem Anti-Maus-alkalische Phosphatase-Conjugat als zweiten Antikörper nachgewiesen. Die breiten Pfeilspitzen zeigen eine Proteinbande bei 17 kDa, die zu einer intensiven Bande auf dem Gel gehört. Die schlanken Pfeilspitzen markieren eine andere deutliche Proteinbande bei 32 kDa, die auf dem Gel als auch auf dem Immunoblot zu sehen ist.

Die Anwesenheit des Induktors IPTG zeigte in allen transformierten Expressionsstämmen keinerlei Wirkung verglichen mit den Proteinmengen aus den nicht induzierten Stämmen (Abb. 18). Es scheint, als ob das Protein konstitutiv expremiert worden wäre. Im zeitlichen Verlauf einer Inkubation über 24 Stunden sind ebenfalls keine Steigerungen in der Menge des expremierten Proteins zu finden (Abb. 19).

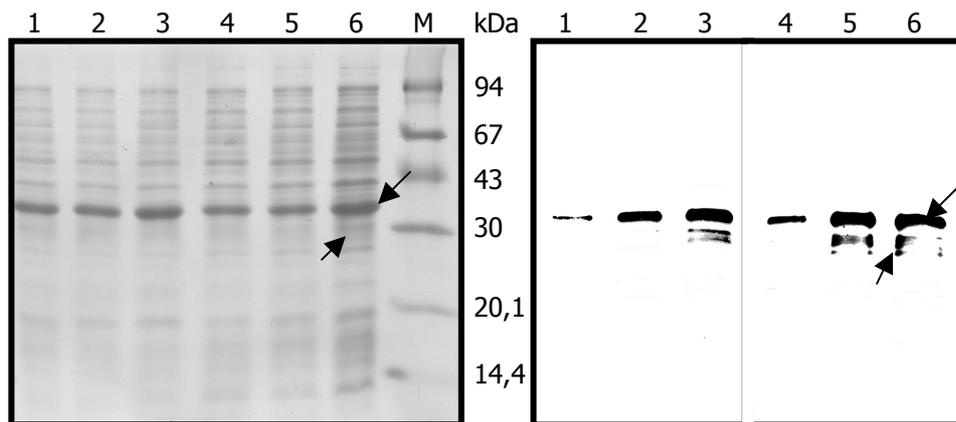


Abb. 18: Auswirkung des Induktors IPTG auf die Expression.

(a) SDS-PAGE, gefärbt mit Coomassie Brilliant Blue (CBB). In Bahn 1-3 ist jeweils Gesamtprotein des transformierten *E. coli* Stamms CEB aufgetrennt. Die Kulturen wurden nach 1 (Bahn 1), 3 (Bahn 2) und 7 Stunden (Bahn 3) geerntet und waren bis dahin alle mit IPTG behandelt. Die Bahnen 4-6 zeigen ebenfalls aufgetrenntes Gesamtprotein des transformierten *E. coli* Stamms CEB. Diese Kulturen wuchsen ohne IPTG. (b) Immunoblot des oben aufgeführten SDS-PAGEs. Die Proteine wurden mit dem monoklonalen Antikörper α -14 kDa und dem Anti-Maus Alkalische Phosphatase Konjugat als zweiten Antikörper nachgewiesen. Die breiten Pfeile zeigen auf eine Bande bei 32 kDa, die auch auf dem Immunoblot zu sehen ist. Die schlanken Pfeile zeigen dagegen auf eine schwache Bande bei 30 kDa, die sowohl auf dem Gel als auch auf dem Blot zu finden ist.

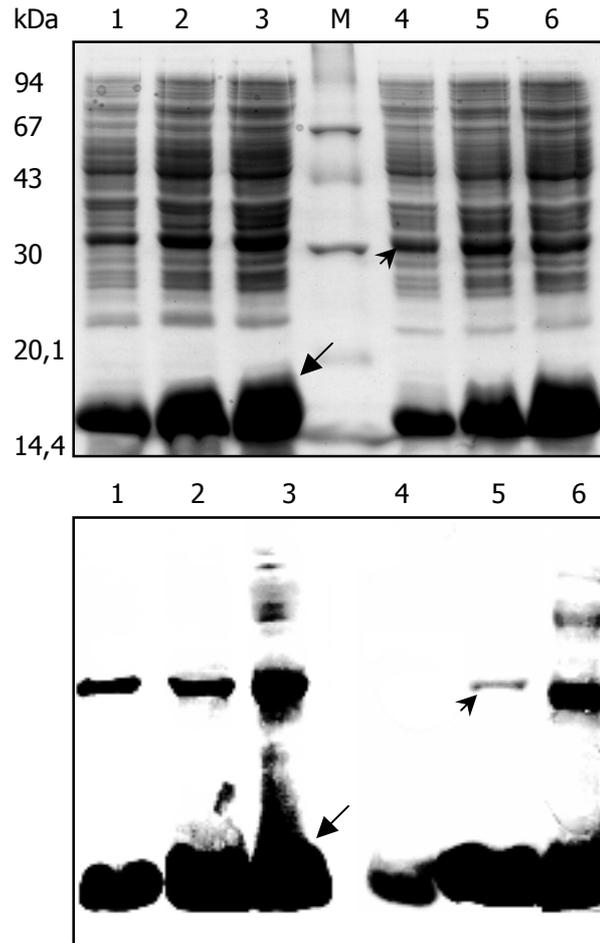


Abb. 19: Zeitreihe der Expression des Fusionsproteins aus PNB *E. coli*.

(a) SDS-PAGE, gefärbt mit Coomassie Brilliant Blue (CBB). In Bahn 1-3 ist jeweils Gesamtprotein des transformierten *E. coli* Stamms PNB aufgetrennt. Die Kulturen wurden nach 1 (Bahn 1), 3 (Bahn 2) und 7 Stunden (Bahn 3) geerntet und waren bis dahin alle mit IPTG behandelt. Die Bahnen 4-6 zeigen ebenfalls aufgetrenntes Gesamtprotein des transformierten *E. coli* Stamms PNB. Diese Kulturen wuchsen ohne IPTG. (b) Immunoblot des oben aufgeführten SDS-PAGels. Die Proteine wurden mit dem monoklonalen Antikörper α -14 kDa und dem Anti-Maus Alkalische Phosphatase Konjugat als zweiten Antikörper nachgewiesen. Die Pfeile mit den schlanken Spitzen zeigen auf eine Bande bei 30 kDa, die auch auf dem Immunoblot zu sehen ist. Die breiten Pfeile zeigen dagegen auf eine Bande bei 17 kDa.

Expressionsversuche: Eigenschaften der expremierten Proteine

Vergleiche der expremierten Proteine unter reduzierenden (mit DTT und IAA) oder oxidierenden (ohne DTT und IAA) Bedingungen förderten unterschiedliche Ergebnisse zu Tage. Durch eine vollständige Reduktion aller Proteine aus dem CEB Stamm ergab sich eine 18,1 kDa Proteinbande (Abb. 20) mit Hilfe des Immunnachweises. Außerdem konnten nach Reduktion der Disulfidbindungen mit dem MKA14 zwei Proteinbanden (33,5 kDa / 29,4 kDa, Abb. 20) aus dem *E. coli* Stamm PNB als Abkömmlinge des 15,5 kDa Proteins bestätigt werden. In *H. obtusa* führte der Immunnachweis wie erwartet zu einer Bande bei 15,5 kDa (Abb. 20). Die leicht erhöhten Molekulargewichte unter reduzierten Bedingungen rühren daher, dass sich

IAA kovalent an die Schwefelreste der Proteine bindet und somit zusätzliche Masse mit einbringt. In allen Fällen, in denen der Immunnachweis an oxidierten Proteinen stattfand, wurden neben den oben beschriebenen Proteinbanden noch andere Proteinbanden nachgewiesen (Abb. 20). Diese Banden stellten meist das doppelte, drei- oder vierfache des kleinsten Molekulargewichts 15,5 kDa dar.

Eine einzelne Proteinbande bei 25 kDa aus der periplasmatischen Fraktion des PNB Stammes erscheint nach Immunnachweis auf dem *Western-Blot* (Abb. 21). Es wird angenommen, dass es sich hierbei um das 15,5 kDa Protein handelt, das mit einem noch unbekanntem Protein über eine Disulfidbrücke verknüpft ist. Eine solche Verbindung ist im Periplasma eines Bakteriums wahrscheinlicher, weil dort das oxidative Umfeld zur Ausbildung solcher kovalenter Bindungen führt (RAINA UND MISSIAKAS, 1997).

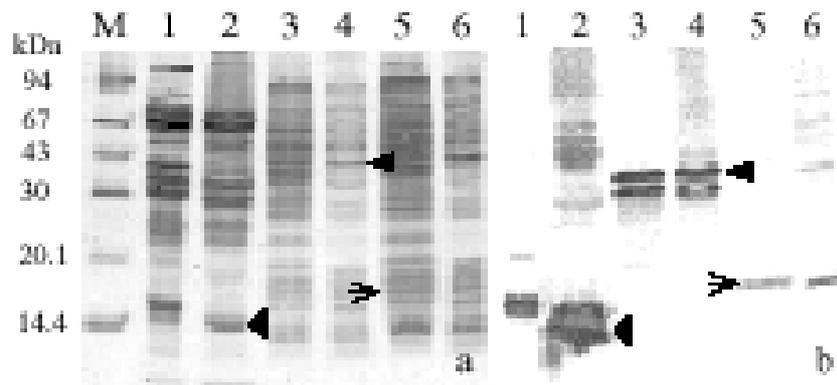


Abb. 20: Mögliche Disulfidbrücken zwischen dem 15,5 kDa und anderen Proteinen.

Die Bakterien wurden 3 Stunden in Gegenwart des Induktors IPTG bei 30°C unter ständigem Schütteln kultiviert. (a) SDS-PAGE, gefärbt mit Coomassie Brilliant Blue (CBB). Bahn 1: Gesamtprotein (reduziert mit DTT) von *H. obtusa* (infektiöse Form). Bahn 2: Gesamtprotein (unreduziert) von *H. obtusa* (infektiöse Form). Bahn 3: Gesamtprotein (reduziert mit DTT) vom PNB *E. coli* Stamm. Bahn 4: Gesamtprotein (unreduziert) vom PNB *E. coli* Stamm. Bahn 5: Gesamtprotein (reduziert mit DTT) vom CEB *E. coli* Stamm. Bahn 6: Gesamtprotein (unreduziert) vom CEB *E. coli* Stamm. (b) Immunoblot des oben aufgeführten SDS-PAGEs. Die Proteine wurden mit dem monoklonalen Antikörper α -14 kDa und dem Anti-Maus Alkalische Phosphatase Konjugat als zweiten Antikörper nachgewiesen. Die breite Pfeilspitze zeigt das 15,5 kDa Protein von *H. obtusa* in Bahn 2. Der Dreifachpfeil zeigt ein 17 kDa Protein in Bahn 5 und 6. Die schlanke Pfeilspitze zeigt ein 32 kDa Protein in Bahn 3 und 4.

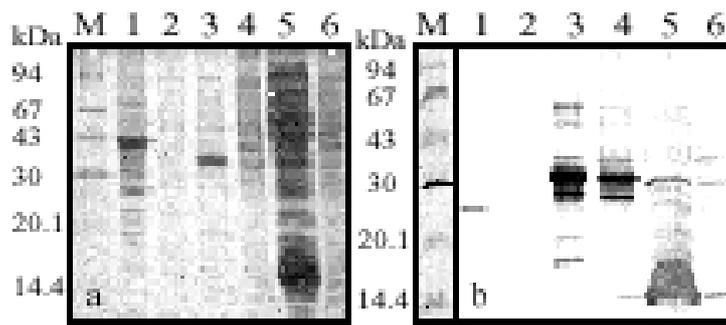


Abb. 21: Verschiedene nachweisbare Abkömmlinge der Fusionsproteine.

(a) SDS-PAGE, gefärbt mit Coomassie Brilliant Blue (CBB). Die PNB *E. coli* Bakterien wurden 3 Stunden bei 30°C unter ständigem Schütteln kultiviert. Bahn 1: Periplasmatische Proteine von PNB *E. coli*. Bahn 2: Mediumsüberstand von PNB *E. coli*. Bahn 3: Gesamtzellprotein aus PNB *E. coli*. Bahn 4: Wasserlösliche zytoplasmatische Proteine aus PNB *E. coli*. Bahn 5: Gesamtzellprotein aus CEB *E. coli*. Bahn 6: Wasserlösliche zytoplasmatische Proteine aus CEB *E. coli*. Bahn 6: Wasserlösliche zytoplasmatische Proteine des CEB *E. coli* Stamms. (b) Immunoblot des oben aufgeführten SDS-PAGEs. Die Proteine wurden mit dem monoklonalen Antikörper α -14 kDa und dem Anti-Maus Alkalische Phosphatase Konjugat als zweiten Antikörper nachgewiesen.

Expressionsversuche: Kompartiment-Verteilung und Antigennachweise

Die räumliche Verteilung des 15,5 kDa Proteins wurde anhand von Immuno-*Dotblots* der verschiedenen Proteinisolationen untersucht und ist in Abbildung (Abb. 22) zu sehen. Die Isolationen aus dem Kontrollstamm BL21 (DE3) waren völlig frei von Proteinen, an welche der Antikörper MKA14 hätte binden können. Ebenso wurde das BSA nicht von den Antikörpern markiert. Gesamtprotein aus den Stämmen CEB und PNB zeigte erwartungsgemäß ein positives Ergebnis. Im Mediumsüberstand aus den verschiedenen Kulturen konnte in keinem Fall das 15,5 kDa Protein nachgewiesen werden. In den löslichen Zytoplasmatischen Proteinfraktionen sowie in den löslichen Zytoplasmatischen Proteinfraktionen beider *E. coli* Stämme konnte das Zielprotein mit Hilfe des MKA14 gefunden werden. Der MKA14 konnte auch in gereinigten Proteineinschlusskörperchen aus dem CEB Stamm und in über Cellulosesäulen gereinigtem Fusionsprotein aus dem PNB Stamm an Protein binden und damit die Existenz des 15,5 kDa Proteins dort bestätigen. Das einzige Signal auf dem Immunoblot, das Protein im periplasmatischen Raum nachweist, kam aus dem PNB Stamm und zeigte ein Protein mit dem Molekulargewicht von 29,4 kDa. Die beiden anderen verwendeten Antikörper, IF-3-2 und CBD_{ceX}, banden ebenfalls an bestimmte Proteinbanden auf Immunoblots. So erkannten die polyklonalen Antikörper (Abb. 23) nur das Fusionprotein aus dem PNB Stamm, dessen Molekulargewicht bei 29,4 kDa lag. Der aus Japan stammende zweite monoklonale Antikörper IF-3-2 markierte ausschließlich Proteine, die vom MKA14 ebenfalls erkannt wurden.

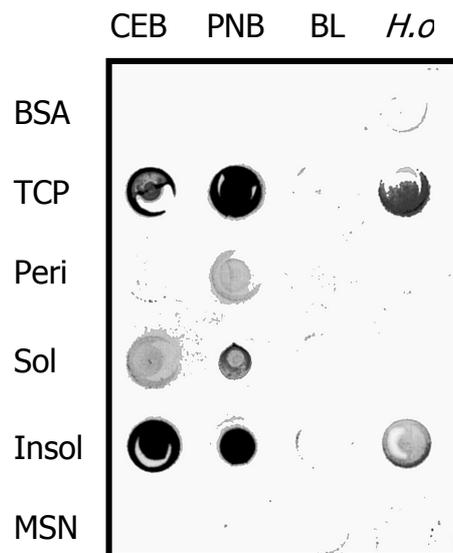


Abb. 22: Lokalisation der Proteine in verschiedenen Zellkompartimenten.

Proteinfraktionen der verschiedenen Zellkompartimente von den *E. coli* Stämmen CEB, PNB, BL21(DE3) und *H. obtusa* wurden auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Aus *H. obtusa* wurde nur Gesamtprotein bzw. die unlösliche Fraktion gewonnen. Die Proteine wurden mit dem monoklonalen Antikörper α -14 kDa und dem Anti-Maus Alkalische Phosphatase Konjugat als zweiten Antikörper nachgewiesen. BSA (Bovine Serum Albumine, 1 mg / ml) wurde als Negativkontrolle in der obersten Zeile verwendet. Die Abkürzungen über den einzelnen Bahnen bedeuten folgendes: TCP (Gesamtzellprotein), Peri (periplasmatische Proteine), Sol (wasserlösliche zytoplasmatische Proteine), Insol (unlösliche zytoplasmatische Proteine), MSN (Mediumsüberstand).

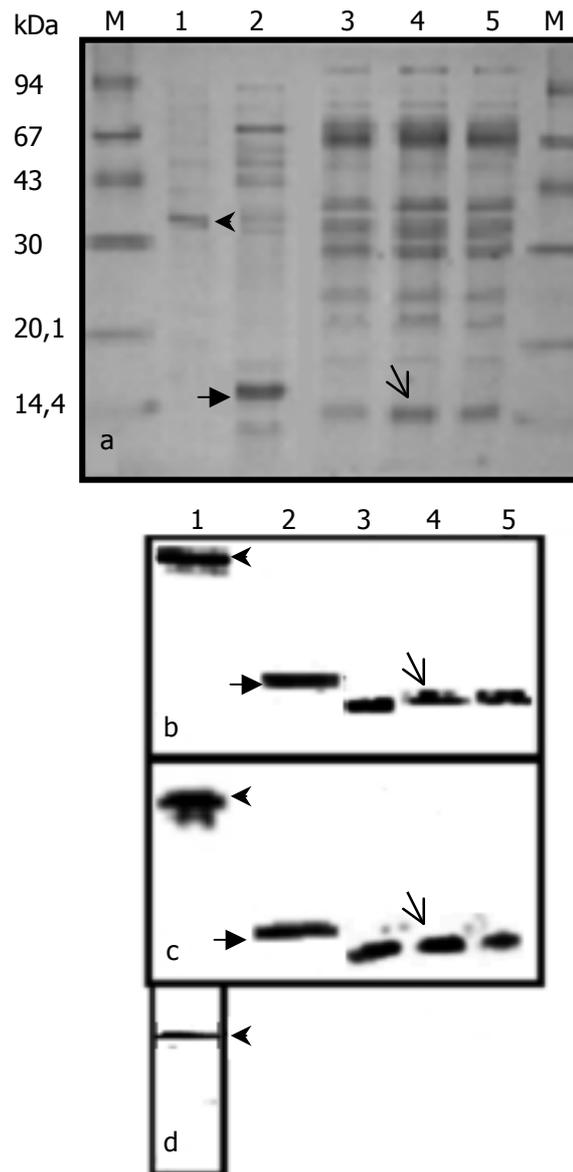


Abb. 23: Vergleich der drei Antikörper anhand des Bindungsspektrums.

(a) SDS-PAGE, gefärbt mit Coomassie Brilliant Blue (CBB). Bahn 1: Gesamtzellprotein von PNB *E. coli*. Bahn 2: Gesamtzellprotein von CEB *E. coli*. Bahn 3: Gesamtzellprotein von *H. obtusa*. Bahn 4: Gesamtzellprotein von *H. obtusa* Intermediäre Form (aus 80% Percollgradient). Bahn 5: Gesamtzellprotein von *H. obtusa* Intermediäre Form (aus 70% Percollgradient). Bahn 6: Die schlangen Pfeile zeigen eine Proteinbande bei 32 kDa in Bahn 1. Die breiten Pfeile zeigen eine weitere Proteinbande bei 17 kDa in Bahn 2. Der Dreifachpfeil zeigt das 15,5 kDa Protein von *H. obtusa* in den Bahnen 3, 4 und 5. (b) Immunoblot des oben aufgeführten SDS-PAGEs. Die Proteine wurden mit dem monoklonalen Antikörper IF-3-2 und dem Anti-Maus Alkalische Phosphatase Konjugat als zweiten Antikörper nachgewiesen. (c) Immunoblot des oben aufgeführten SDS-PAGEs. Die Proteine wurden mit dem monoklonalen Antikörper α -14 kDa und dem Anti-Maus Alkalische Phosphatase Konjugat als zweiten Antikörper nachgewiesen. (d) Immunoblot des oben aufgeführten SDS-PAGEs. Die Proteine wurden mit dem polyklonalen Antikörper CBD_{cex}-Tag und dem Anti-Kaninchen Alkalische Phosphatase Konjugat als zweiten Antikörper nachgewiesen.

EM-Immunonachweis und EM-Strukturbilder

Der immunologische Nachweis an Ultradünnschnitten von den *E. coli* Stämmen PNB, CEB, BL21 (DE3) und *H. obtusa* im Makronukleus von *P. caudatum* zeigen deutlich das Vorkommen des homolog als auch des heterolog exprimierten Proteins. Dabei fungierte *H. obtusa* als Positivkontrolle, in welcher der MKA14 erwartungsgemäß (DOHRA ET. AL, 1994; WIEMANN UND GÖRTZ, 1991) nur das elektronendichte Periplasma markierte (Abb. 24a). Die Verteilung von immunreaktivem Material in den PNB Bakterien war auf die dunkleren Stellen im Zytoplasma und auf die Gebiete an der Zellwand beschränkt (Abb. 24c). Größere, offensichtlich leere periplasmatische Räume (Abb. 24c) konnten in allen PNB Bakterien beobachtet werden. Sie erinnern sehr stark an den riesigen periplasmatischen Raum von *H. obtusa*. Weiterhin entwickelte der PNB Stamm deutliche Strukturen an der Außenseite der Zellen, und zwar unabhängig von der Dauer als auch der Anwesenheit von IPTG (Abb. 24b). Eine zeitliche Zunahme der Proteinmenge in den Bakterien wie bei den CEB-Zellen konnte nicht gefunden werden.

Im Kontrollstamm BL21(DE3) konnte keinerlei Antigen nachgewiesen werden (Abb. 24d). Im Zytoplasma der CEB Bakterien waren große dunkle Bereiche zu finden. Diese sind vermutlich Proteineinschlusskörperchen (Abb. 24f), die auf eine erhöhte Expression und / oder eine verhinderte Ausschleusung des Fusionsproteins hinweisen. Solche Strukturen nahmen mit der Kultivierungsdauer zu. Nach Übernachtskultur der CEB Bakterien konnten wesentlich mehr und vor allem größere Proteinkörperchen nachgewiesen werden (Abb. 24e). Die meiste Bindungsstellen des Antikörpers war auf diese Körperchen beschränkt (Abb. 24e). Im Periplasma konnte kein Fusionsprotein gefunden werden. Der Rest verteilte sich im Zytoplasma. Weitere Untersuchungen an der Feinstruktur der Zellen zeigten, dass die Einschlusskörper nur in den CEB Bakterien vorkamen (Abb. 24e+f) und unter keinen Umständen in den Kontrollzellen auftraten (Abb. 24d).

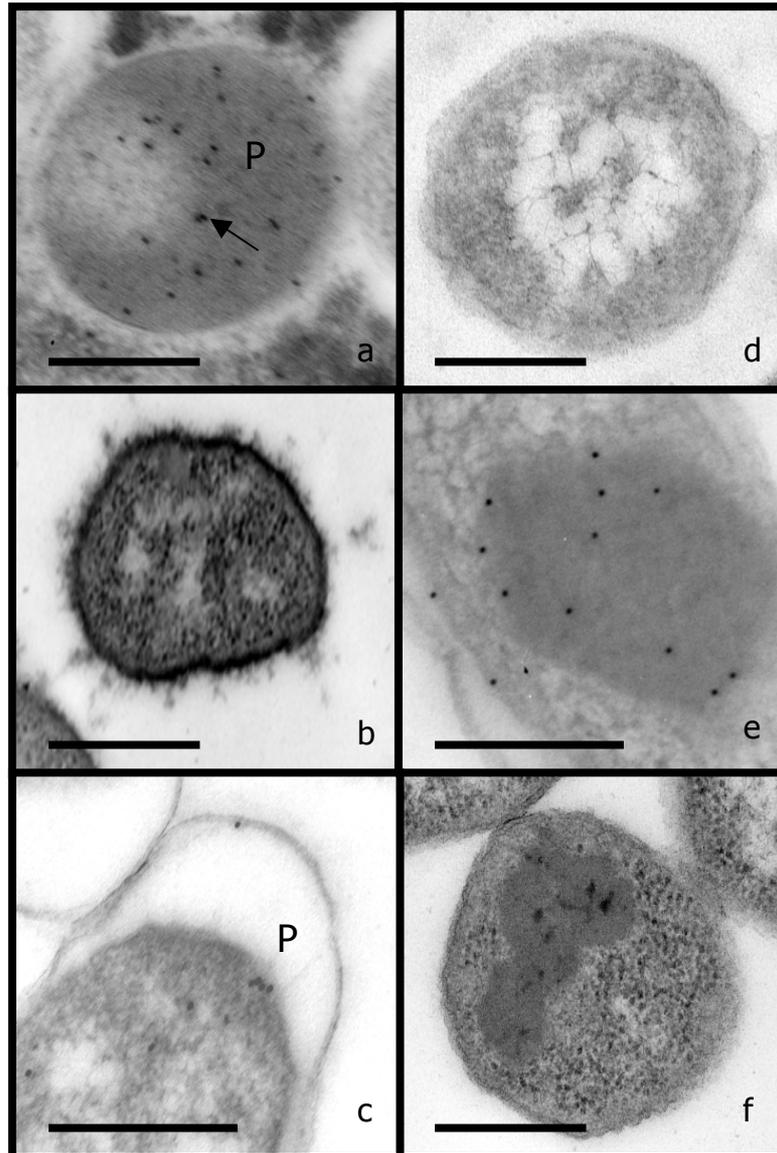


Abb. 24: EM-Immunonachweis des 15,5 kDa Antigens durch monoklonale Antikörper.

Der Maßstab entspricht je 1 μm . P ist das Periplasma, I steht für *Inclusion body* (Proteineinschlusskörperchen). Bakterien in Abb. 24a,c,d,e und f sind in Spurr-Harz eingebettet, Abb. 24b ist in Epon eingebettet. a: Querschnitt durch die infektiöse Form von *H. obtusa* im Makronucleus von *P. caudatum*. Es sind Goldkörner zu sehen, die über einen monoklonalen Antikörper das Antigen markieren. b: Querschnitt durch ein *E. coli* PNB Bakterium. Es sind abstehende Oberflächenstrukturen zu sehen. Es handelt sich um eine Einbettung in Epon-Harz. c: Schnitt durch ein *E. coli* PNB Bakterium. Die Goldkörner markieren das Fusionsprotein über einen monoklonalen Antikörper. d: Schnitt durch ein *E. coli* BL21 Bakterium. e: Längsschnitt durch ein *E. coli* CEB Bakterium. Kultivierungsdauer 16h über Nacht. Goldkörner weisen auf einen großen *inclusion body* im Zytoplasma hin. Goldkörner liegen auch neben dem *inclusion body* im Zytoplasma. f: Querschnitt durch ein *E. coli* CEB Bakterium. Kultivierungsdauer 4h. Es ist ein *inclusion body* im Zytoplasma zu sehen.

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Um die Futterbakterien der Paramecien von den *Holospira*-Bakterien unterscheiden zu können, wurde *Holospira*-spezifische und eubakterien-spezifische fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden für die Fluoreszenz- *in-situ*-Hybridisierung verwendet. Beide Sonden waren gegen die 16S-rRNA gerichtet, wobei die *Holospira* Gattungssonde H16-23a-Cy5 gegen eine für *Holospira*-spezifische Region gerichtet ist und die Eubakterien Sonde EUB338-Cy3 gegen einen allgemein in Eubakterien vorkommenden Abschnitt der 16S-rRNA (AMANN ET AL., 1991). Die Unterscheidung in ganzen Paramecien gelang und die ausschließliche Präsenz von *H. obtusa* im Makronukleus konnte ebenso gezeigt werden wie die der Futterbakterien *P. putida* in den Phagosomen (Abb. 25a). Weiterhin war es möglich, mit den gleichen Sonden zwischen Futterbakterien und *Holospira* in einem Zell-Lysat von *P. caudatum* zu unterscheiden (Abb. 25b). Die *Holospira* genus-spezifische 16S-rRNA wurde in nahezu allen *H. obtusa* Bakterien nachgewiesen. Nur einige der isolierten infektiösen Formen konnten nicht durch die Gattungs-Sonde markiert werden (Abb. 25c).

Für Expressionsstudien des 15,5 kDa Proteins von *H. obtusa* sollte eine mRNA-FISH durchgeführt werden. Um die Methode zu optimieren, wurde zunächst eine Doppelhybridisierung von *Holospira*-16S-rRNA und der mRNA des 15,5 kDa Proteins in *H. obtusa* Bakterien im Makronukleus von *P. caudatum* durchgeführt. Dadurch wurde sichergestellt, dass die genspezifische Sonde auch nur in *H. obtusa* vorkommt (Abb. 25d). Aber nicht alle *H. obtusa* wiesen die erwartete Doppelmarkierung auf (Abb. 25e). Einige lange Formen waren nur mit der *Holospira*-16S-rRNA-spezifischen Sonde markiert. Um zu überprüfen, welche stadienspezifische Form davon betroffen war, wurden zuerst isolierte infektiöse Formen für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung eingesetzt. Es wurden die *Holospira*-spezifische DNA-Sonde H16-23a-Cy5 oder die mRNA-spezifische 155-FAS DNA-Sonde verwendet. Es konnte in den infektiösen Formen kein Signal der mRNA-spezifischen Sonde beobachtet werden. Außerdem waren nicht alle infektiösen Formen mit der H16-23a-Cy5 Sonde markiert (Abb. 25c).

Im Gegensatz dazu ergab der parallele Einsatz beider Sonden (155-FAS, H16-23a-Cy5) in isolierten *H. obtusa* Bakterien ohne infektiöse Formen ein positives Ergebnis. Die kurzen reproduktiven Formen wie auch die langen intermediären Formen wurden doppelt markiert (Abbildung nicht gezeigt). In den intermediären Formen beschränkte sich das Fluoreszenzsignal der 155-FAS Sonde nur auf das Zytoplasma der Bakterien (Abb. 26a). Deswegen konnte man auch zwischen intermediären Formen mit großem Periplasma und solchen mit kaum vorhandenem Periplasma unterscheiden (Abb. 26b). Der *E. coli* Stamm CEB, der das pET38b-CEB Plasmid trug, wurde ebenfalls für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung benutzt, um das Gen auf dem dortigen Plasmid und die transkribierte mRNA nachzuweisen. Es wurde ein Fluoreszenzsignal beobachtet, das nach Gebrauch der 155-FAS Sonde auftrat (Abb. 26c). Der als Negativ-Kontrolle eingesetzte *E. coli* Stamm BL21 (DE3) enthielt keine Nukleinsäuren, an welche die 155-FAS Sonde binden konnte. Die Verteilung der mRNA des 15,5 kDa Proteins und der 16S-rRNA in *H. obtusa* wurde auch zu Beginn und während einer Infektion untersucht. Dazu wurden die Bakterien in den Phagosomen und im Makronukleus beobachtet. In den infektiösen und auch den aktivierten Formen konnte kein Fluoreszenzsignal der 155-FAS Sonde festgestellt werden. Die *Holospira* spezifische 16S-rRNA Sonde allerdings identifizierte nahezu alle Formen sobald sie sich im Kern befanden. (Abb. 26d).

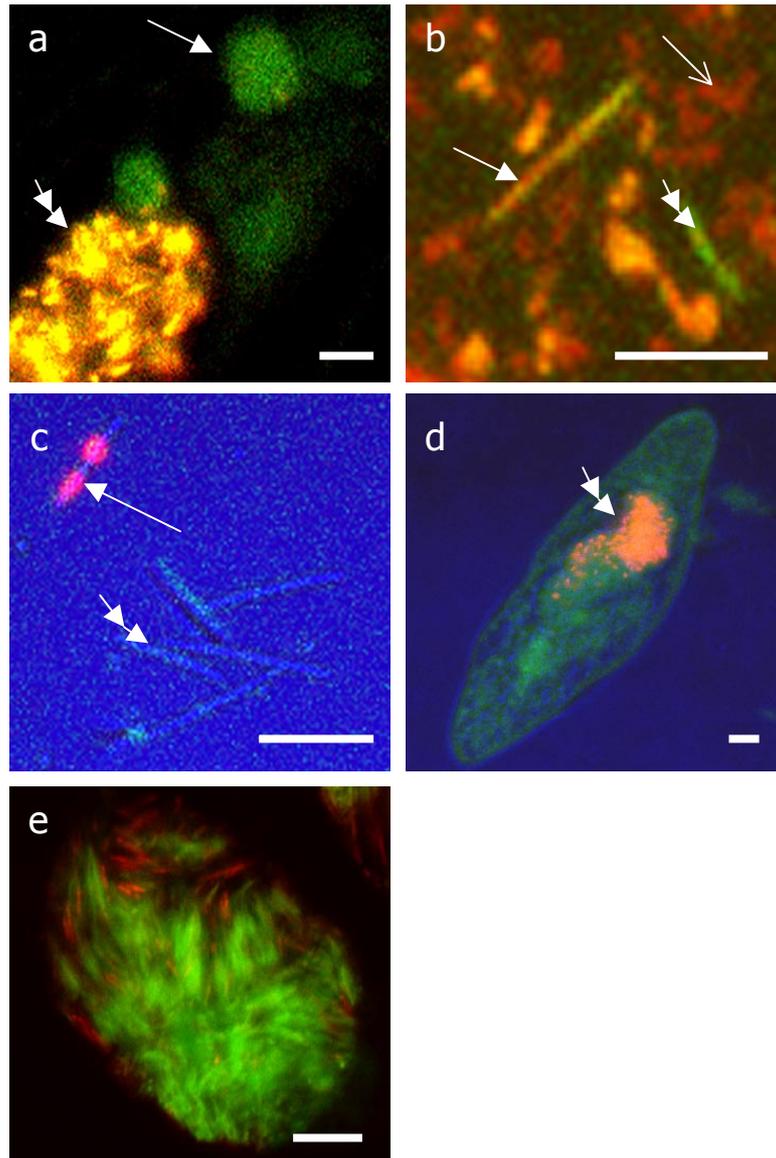


Abb. 25: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung von *H. obtusa*.

Der Maßstab misst 15 μm . Falschfarben-Darstellung. **a** Grün = 16S-rRNA Gattungssonde *H. obtusa*, Rot = 16S-rRNA Eubakteriensonde, Gelb = Beide Sonden. Doppelpfeil: Doppelmarkierung von *H. obtusa* 16S-rRNA mit Eubakteriensonde und Gattungssonde. Pfeil: Futterbakterien *P. putida* in Phagosomen markiert mit Eubakteriensonde gegen 16S-rRNA. **b** Freigesetzte *H. obtusa* und Futterbakterien *P. putida* markiert wie unter a. Doppelpfeil: Grün markierte reproduktive Form von *H. obtusa*. Pfeil: Gelblich markierte infektiöse Form von *H. obtusa*. Offener Pfeil: Rot markiertes Futterbakterium. **c** Isolierte infektiöse Formen von *H. obtusa*. Rot = 16S-rRNA Gattungssonde *H. obtusa*. Doppelpfeil: Infektiöse Form ohne erkennbare Markierung. Pfeil: Markierung einer infektiösen Form. **d** Rote Markierung von *H. obtusa* im Makronukleus von *P. caudatum* durch die 155-FAS Sonde (Doppelpfeil). **e** *H. obtusa* im Makronukleus von *P. caudatum*. Rot = 16S-rRNA Gattungssonde *H. obtusa*. Grün = 155-FAS Sonde.

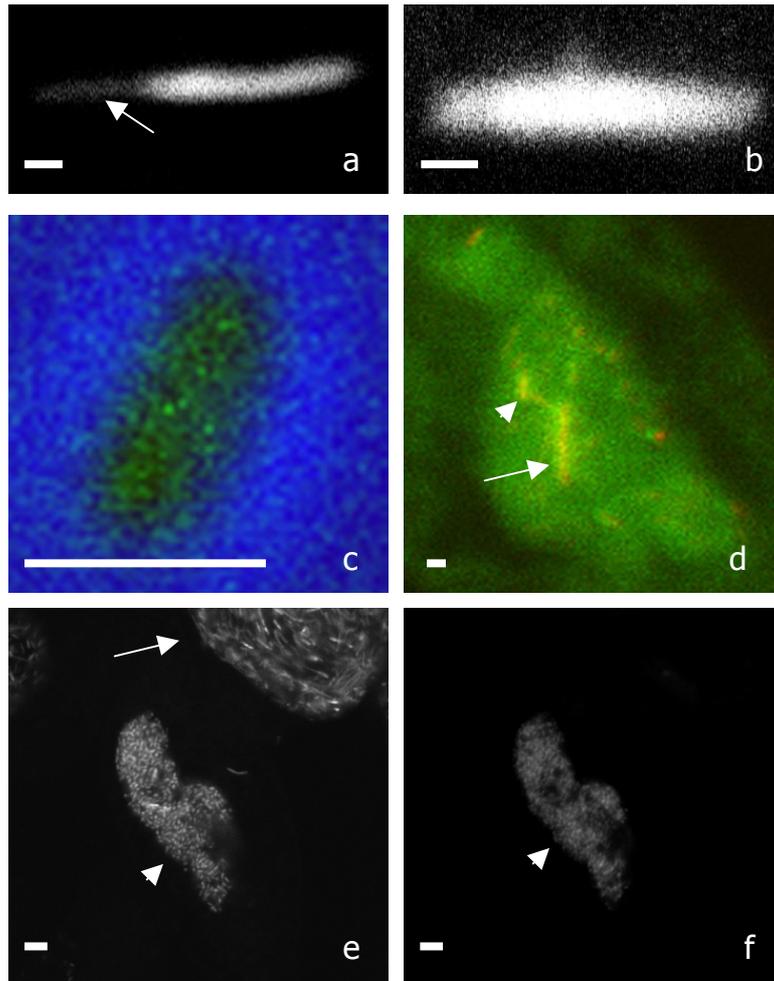


Abb. 26: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung von *H. obtusa* mit der 155-FAS Sonde.

Der Maßstab in Abbildung a, b, c und d misst 2 μm . In Abbildung e und f entspricht er je 15 μm . Falschfarben-Darstellung. **(a)** *H. obtusa*, Zytoplasma einer isolierten intermediären Form markiert mit der 155-FAS Sonde. Pfeil: Nicht markiertes Periplasma. **(b)** Isolierte intermediäre Form von *H. obtusa* markiert mit der 155-FAS Sonde. **(c)** Kontrollstamm *E. coli* CEB mit Expressionsplasmid markiert mit 155-FAS Sonde. **(d)** *H. obtusa* im Makronukleus von *P. caudatum* 2 Tage nach Neuinfektion. Markierung mit der 155-FAS Sonde. Pfeil: Intermediäre Form. Pfeilspitze: Reproduktive Form. **(e)** *H. obtusa* im Makronukleus von *P. caudatum*. Pfeil und Pfeilspitze: Markierung mit der Gattungssonde gegen die 16S-rRNA. **(f)** *H. obtusa* im Makronukleus von *P. caudatum*. Pfeil: Markierung mit der 155-FAS Sonde.

Das erste Fluoreszenzsignal nach der Infektion konnte mit der 155-FAS Sonde im Makronukleus beobachtet werden. Hauptsächlich kurze reproduktive Formen der *Holospira*-Bakterien, die etwa zwei Tage zuvor in die Makronuklei ihrer Wirte eingedrungen waren, konnten identifiziert werden (Abb. 26d). Aber auch einige längere Formen waren zu sehen (Abb. 26d). Je länger die Infektion zurücklag, desto mehr längliche Bakterien waren im Zellkern markiert. Nach ungefähr einer Woche zeigten die *P. caudatum* Zellen Zellkerne, die entweder hauptsächlich reproduktive *Holospira*-Bakterien enthielten oder fast nur lange Bakterien. Die länglichen Bakterien wurden aber von der 155-FAS-Sonde nicht markiert (Abb. 26e1+2). Um das Problem der geringen Signalstärke in der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zu lösen wurden circa 450 Basen lange Sonden mit Hilfe der PCR hergestellt, die im Schnitt 34 Fluoresceinmoleküle pro Sonde enthielten. Das heißt, um die obere Nachweisgrenze von ungefähr 400 Signalmolekülen pro Zelle zu erreichen, mussten mindestens 12 DNA-Sonden pro Zelle gebunden sein. Positive Signale zeigen also die Gegenwart von mindestens 12 mRNA-Molekülen an.

Diskussion

Phagosomenisolation

Der erste Kontakt zwischen den *Holospora* Bakterien und ihren Wirten findet zwischen der inneren Membran der Nahrungsvakuolen und der Oberfläche der Bakterien statt. Um mögliche Wechselwirkungen untersuchen zu können, sollten Nahrungsvakuolen und deren Proteine aus *P. caudatum* isoliert werden. Die bisherige Methode zur Gewinnung von Verdauungsvakuolen bringt folgende Schwierigkeiten mit sich: erstens ist die isolierbare Menge an Vakuolen gering im Verhältnis zur Zellzahl. Proteinbiochemische Versuche in größerem Maßstab sind damit erschwert.

Schon FOK *ET AL.* (1988) fanden einen Zusammenhang zwischen der Größe der Nahrungspartikel und der Vakuolen-Bildungsrate in Paramecien. Es wurde daher versucht, durch eine Optimierung der *Bead*-Größe eine maximale Aufnahmezeit zu erreichen. Dadurch sollte die Anzahl der neugebildeten Nahrungsvakuolen pro Zeiteinheit erhöht werden. Durch eine Ultraschallbehandlung wurden die Magnetobeads hinsichtlich ihrer Größe homogenisiert. Die Paramecien bildeten dann im Vergleichszeitraum 5 ± 8 Nahrungsvakuolen mehr pro Zelle als die Kontrollzellen. Dies wird auf einen optimalen *Bead*-Durchmesser von 0,8 bis 1,2 μm zurückgeführt. Durch die Ultraschallbehandlung ließ sich die Größe und Homogenität der *Beads* steuern und die Ausbeute an Nahrungsvakuolen erhöhen.

Die Nahrungsvakuolen sind anfällig für äußere Kräfte, die während der Aufreinigung auftreten. Eine schonende Isolation war deshalb Voraussetzung für den Erfolg. Andererseits war eine schnelle Isolation der Vakuolen ebenso wichtig, um den Abbau der Proteine zu minimieren. Es wurden verschiedene Puffer mit Detergenzien verwendet, die einen schonenden mechanischen Zellaufschluss erleichtern sollten. Bei stärkeren Detergenzien besteht die Gefahr einer Zerstörung aller Membranstrukturen. Zu milde Detergenzien reichen oft nicht aus, um die Zelle zufriedenstellend aufzuschließen. Durch die Auswahl nicht-ionischer Detergenzien wurden die Paramecien-Membranen soweit destabilisiert, dass eine mechanische Bearbeitung mit einem *Potter* Homogenisator ausreichte, um die Zellen aufzuschließen. Nachträglich zugeführte Calcium-Ionen und Spermidin im Separationspuffer stabilisierten die verbleibenden Membranen. Calcium bindet sich an Membranproteine und verstärkt deren Stützwirkung. Die Zelle wird dadurch stabilisiert. Spermidin bindet ebenfalls an Membranproteine (CUMMINGS, 1972) und vernetzt diese untereinander. Außerdem verursachte eine hohe Saccharosekonzentration im Separationspuffer einen osmotischen Unterdruck in den Vakuolen, der sie vor dem Platzen schützte. Die Phagosomen blieben bei dieser Isolationsmethode weitgehend unbeschädigt (Abb. 9).

Weiterhin musste mit Verunreinigungen durch Futterbakterien gerechnet werden. Diese Gefahr wurde einerseits durch die sterile Herstellung und Lagerung der magnetischen Dextran-*Beads* gebannt. Die Aufbewahrung in einer 7 % (v/v) Ammoniaklösung sorgte für ein lebensfeindliches Milieu, in dem keine Mikroorganismen wachsen konnten. Andererseits wurde die Futterbakterienkonzentration in den Paramecien-Kulturen durch die Zentrifugation über einen sterilen 10 % Ficoll-Gradienten reduziert. In Kontrollexperimenten wurden keine störenden Signale von den Proteinen der Futterbakterien gefunden. Die Abtrennung von nicht-magnetischem Material über einen Magneten und ein darüber liegendes Pufferkissen reichte nicht ganz, um alle Phagosomen von den Zelltrümmern zu trennen. Es wurden Zelltrümmer mit daran haftenden *Magneto-Beads* mitgeschleppt (Abb. 8). Um diese unerwünschten Fragmente zu entfernen, musste ein zweiter Reinigungsschritt eingeführt werden. Die mit dem Magneten gereinigte Fraktion wurde

über einem Gradienten aus Separationspuffer zentrifugiert. Die mit *Beads* gefüllten Vakuolen erwiesen sich als schwerer als die restlichen Bestandteile. Sie wurden durch die Zentrifugalkräfte von einander getrennt (Abb. 8). Zusätzlich beinhaltete der Separationspuffer noch Kaliumchlorid, weil es eine erhöhte Ablösung der Nahrungsvakuolen von den Proteinstrukturen des Zytoskeletts bewirkt (MEYER, 1992). Die so gewonnenen Phagosomen waren ausreichend sauber und konnten für proteinbiochemische Versuche verwendet werden.

Protein-Protein-Wechselwirkungen

Als nächstes sollten Proteine aus den gereinigten Nahrungsvakuolen isoliert werden. Zum einen mit dem Detergenz SDS und einem Hitzedenaturierungsschritt. Zum anderen wurden die membranständigen Proteine mittels Triton X-114 isoliert (MEYER, 1992). Mit der ersten Proteinfraction sollten möglichst alle Proteine erfasst werden, die mit Bakterienproteinen interagieren könnten. Dadurch erhielt man auch eine größere Menge an verwendbarem Protein. Der Nachteil dieser Methode liegt in der weitgehenden Denaturierung der Proteine. Die nachfolgenden Untersuchungen zur wechselseitigen Bindung von Wirts- und Bakterienproteinen wurden dadurch erschwert. Die geringe Signalstärke im Vergleich zum Hintergrundrauschen war dadurch mitverursacht. Nur durch eine Konzentrationserhöhung der markierten phagosomalen Proteine konnte ein geblottetes *Holospira* Protein nachgewiesen werden.

Die Fraktion der membranständigen Proteine sollte diejenigen Proteine enthalten, die als Oberflächenstrukturen in den Innenraum der Nahrungsvakuolen ragen. Mit den so gewonnenen Proteinen waren kaum verwertbare Signale zu erhalten. Ein Grund dafür ist beim nachfolgenden *Overlay Blotting* Verfahren zu suchen. Da membranständige Proteine meist lipophil sind, ist ihre Verwendung in wässrigen Puffersystemen problematisch. Die Micellenbildung während der Präparation mit Triton-X-114 stabilisiert die dreidimensionale Struktur der Proteine. Werden die Micellen aber teilweise oder ganz zerstört, so passen sich die Seitenketten der Proteine an die neue Umgebung an. Es ist anzunehmen, dass die Membranproteine aus den Nahrungsvakuolen sich stark verändert haben. Eine Protein-Protein-Interaktion wird daher unwahrscheinlich. Angesichts der geringen Verwertbarkeit der Ergebnisse, ist eine selektive Gewinnung von Membranproteinen für die *Overla- Blotting* Methode hier unbrauchbar. Vergleicht man beide Nachweismethoden, so ist der Ansatz mit dem Gesamtprotein zu bevorzugen, weil er ein besseres Signal erzeugt. Die Micellen scheinen die Verwendung der *Overlay Blotting* Methode nicht zu überstehen. Außerdem repräsentieren die membranständigen Proteine nur einen Teil phagosomaler Proteine. Das denaturierte Gesamtprotein scheint mehr Zielprotein zu enthalten. Das starke Hintergrundrauschen beim Ansatz mit Gesamtprotein ist in Anbetracht der Alternativen vertretbar.

Um die *Overlay-Blotting*-Methode selber zu verbessern, wurde das Puffersystem optimiert. Stimmen der pH-Wert oder das Ionenspektrum nicht weitestgehend mit der natürlicher Umgebung überein, wird die zu untersuchende Protein-Protein-Wechselwirkung vermutlich stark eingeschränkt sein. Es wurde von der Überlegung ausgegangen, dass der Erstkontakt zwischen Bakterienoberfläche und Wirtsoberfläche wahrscheinlich bei neutralem bis saurem pH-Wert stattfindet. Grund dafür ist der ebenfalls neutrale bis saure pH-Wert in den jungen Nahrungsvakuolen (FOK UND ALLEN, 1990), aus denen *Holospira* Bakterien bereits nach zehn Minuten entkommen. Es wurden daher in dieser Arbeit zwei Puffersysteme verwendet. Zum einen ein neutrales Puffersystem mit pH 7. Zum anderen ein saures Puffersystem mit pH 3. Außerdem wurden beiden Puffern noch Calcium-Ionen zugefügt, weil Calcium oftmals für die Bindung zweier Proteine notwendig ist (ALBERTS ET AL., 1994).

Die *Overlay-Blotting*-Methode mit dem sauren Puffersystem führte zu keinem verwertbaren Resultat. Hauptsächlich dürfte dies auf den hohen pH-Wert des Reaktionspuffers der alkalischen Phosphatase zurück zu führen sein. Er macht die saure Reaktionsumgebung alkalisch und kann so eine im sauren Bereich erfolgte Bindung wieder aufheben. Das neutrale Puffersystem hingegen lieferte brauchbare Ergebnisse in Form einer Proteinbande bei ca. 50 kDa auf dem behandelten *Western-Blot* (Abb. 10). Die Markierung war nur in 60 % aller Versuche reproduzierbar. Das wird mit großer Sicherheit durch die unterschiedlichen Proteinisolationen aus den Nahrungsvakuolen verursacht. Die Proteinkonzentration wurde hier nicht direkt gemessen, sondern indirekt über die Menge der isolierten Vakuolen abgeschätzt. Deshalb kam es wohl zu Konzentrationsschwankungen beim Einsatz der Digoxigenin-markierten Proteine in der *Overlay-Blotting*-Methode. Eine direkte Messung mit den herkömmlichen Methoden hätte einen Großteil der gewonnenen Proteine verbraucht.

Sequenzanalyse des 51 kDa Protein

Mit *Holospira*-Gesamtprotein wurden 2D-Elektrophoresen durchgeführt und die Proteine auf PVDF-Membran geblottet. Die *Western-Blots* wurden anschließend einer *Overlay-Blotting*-Methode unterzogen. Ein markierter Proteinfleck (Abb. 10) auf dem 2D-*Western-Blot* wies ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa auf. Derselbe Proteinfleck konnte durch einen polyklonalen Antikörper markiert werden (Abb. 11), der gegen ein 50 kDa Protein aus *H. obtusa* gerichtet ist (EHR SAM, 1999). Es wurde angenommen, dass es sich um zumindest ein verwandtes Protein handelt. Die Ergebnisse der N-terminalen Mikrosequenzierung (EHR SAM, 1999) wurden daher für weitere Untersuchungen verwendet. Die von EHR SAM (1999) gefundene DNA-Sequenz des 50 kDa Proteins zeigt keinerlei Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit ermittelten *H. obtusa*-Sequenz. Obwohl für die Suche in der Genbank von *H. obtusa* der gleiche Satz an degenerierten Primern verwendet wurde, kamen zwei verschiedene Nukleinsäuresequenzen heraus. Man muss davon ausgehen, dass es sich um zwei verschiedene DNA-Abschnitte von *H. obtusa* handelt. Die Tatsache, dass die N-terminale Sequenz von *H. obtusa* beide Male in den untersuchten DNA-Sequenzen vorkam, bestärkt die Annahme, dass es sich um Proteine von *H. obtusa* handelt. Denn selbst dieser kleine Teil wurde bisher nur bei *H. obtusa* gefunden.

Es besteht die Möglichkeit, dass die zugrunde gelegte N-terminale Aminosäureabfolge mehrfach im Genom vorkommt. Sie könnte eine Proteinfamilie charakterisieren, die mit ähnlichen Aminosäuresequenzen ausgestattet ist. Bekräftigt wird dies durch die Ergebnisse von EHR SAM (1999), wo die diese Möglichkeit ebenfalls angeführt wird. Wie man auch bei *P. gingivalis* (Tab. 7) sehen kann, ist es möglich, dass zwei Proteine aus demselben Organismus teilweise dieselben Aminosäureabfolgen aufweisen. Außerdem befinden sich auf dem 2D-Westernblot von *H. obtusa* mehrere Spots mit demselben Molekulargewicht um die 50 kDa. Allerdings unterscheiden sie sich in ihrem isoelektrischen Punkt, was auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der Aminosäuren schließen lässt. Der hohe, aus der DNA-Sequenz abgeleitete pI-Wert erklärt auch die Position des Proteinspots im 2D-Gel. Dort ist das Protein an der äußeren Grenze des basischen Bereich zu finden. Oder teilweise gar nicht in den pH-Gradienten eingelaufen (Abb. 11).

Das Ergebnis der DNA-Sequenzierung ergab einen GC-Gehalt von 63,3 %, was deutlich über dem für *H. obtusa* typischen Verhältnis von 36% liegt (FRANZ B. LANG, persönliche Mitteilung). Eine mögliche Folge kann der hohe pI-Wert sein, hervorgerufen durch stark basische Aminosäuren-Seitenketten. Ein so hoher pI-Wert könnte ein Hinweis auf die Funktion und Aufgabe des 51,5 kDa Proteins sein. Auf der Oberfläche der infektiösen Form wäre es in einem stark sauren Umfeld wie im Innern einer jungen

Nahrungsvakuole großen Ladungsveränderungen ausgesetzt. Diese Veränderungen könnten eine Formveränderung hervorrufen und die Bindung an bestimmte Oberflächenstrukturen des Wirts begünstigen. Das Molekulargewicht der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz beträgt 51,5 kDa. Damit ist es deutlich leichter als ähnliche Proteine aus anderen Bakterien. Vor allem fehlt im Vergleich zu den verwandten Proteinen ein größerer Abschnitt am N-Terminus. Das lässt vermuten, dass nur ein Teil der Funktion der anderen Proteine vorhanden ist. Zum Beispiel eine zuckerbindende Komponente. Den fehlenden Aminosäuren entsprechen dann Domänen mit anderen Aufgaben, die das 51,5 kDa Protein von *H. obtusa* nicht besitzt. Denkbar ist zum Beispiel eine spaltende Komponente wie bei *L. lactis* (Tab. 7). Das relative Molekulargewicht und der pI-Wert stimmen mit den Werten aus früheren Arbeiten (EHRMANN, 1999; WIEMANN, 1990) überein. Da der N-Terminus des 51,5 kDa Proteins kein Signalpeptid darstellt, handelt es sich bei dem untersuchten Protein wohl um die modifizierte Version, wie sie nur im Periplasma vorkommt. Der Transport dorthin muss über die Zytoplasma-Membran erfolgen. Dazu ist ein Signalpeptid nötig, das bei diesem Vorgang abgespalten wird. Diesen Sachverhalt findet man auch beim 15,5 kDa und 5,4 kDa Protein von *H. obtusa* (DOHRA ET AL., 1997). Somit kann man davon ausgehen, dass beim Transport des 51,5 kDa Protein von *H. obtusa* ins Periplasma das potentielle Signalpeptid abgespalten wird. Dies ist wahrscheinlich der Grund, warum bisher kein Startcodon gefunden wurde. Die N-terminale Sequenzierung erfolgte am periplasmatischen Protein, das ohne Signalpeptid vorliegt.

Die größte Übereinstimmung der *H. obtusa* DNA-Sequenz ist bei *Xylella fastidiosa* zu finden. *X. fastidiosa* ist in der Lage in das Xylem von Pflanzen einzudringen (DOW UND DANIELS, 2000). Dort verändert es dann unter anderem auch die Zellwände der Pflanzenzellen. Cellulose kann von Bakterien nur außerhalb der Zelle abgebaut werden. Deshalb sind dazu Enzyme außerhalb der Zelle nötig, die mit Zuckerverbindungen reagieren können (SCHLEGEL, H., 1985). Auch zwei immunreaktive Proteine (89 kD, 87 kD) aus *Porphyromonas gingivalis* zeigen eine große Ähnlichkeit mit dem *H. obtusa* Protein. *P. gingivalis* ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium, das Mundschleimhautzellen des Menschen befällt (LAMONT UND JENKINSON, 2000). Solche Zellen besitzen eine aus Proteinen und Oligosacchariden bestehende Oberflächenstruktur, die man als Glykokalyx bezeichnet. Diese Strukturen dienen als Ziel für die Erkennung und Bindung an die Wirtszelle. Es ist zu vermuten, dass *P. gingivalis* zumindest ein oberflächenständiges Protein besitzt, das diese Aufgabe erfüllt.

Zwei Stämme von *Mycobacterium tuberculosis* besitzen zwei hypothetische Proteine (COLE ET AL., 1998), die der Aminosäuresequenz des 51,5 kD Proteins von *H. obtusa* ähneln. Beide *M. tuberculosis* Proteine besitzen das Molekulargewicht 93 kD, unterscheiden sich aber in der Aminosäuresequenzen. Bisher konnten sie keiner Funktion zugeordnet werden. *M. tuberculosis* ist in der Lage, in Macrophagen einzudringen. Es überlebt dort in den Phagosomen, indem es diese zu seinen Gunsten verändert (RUSSELL, 2001). Zu möglichen Wirten zählen auch humane Macrophagen. Sie betreiben wie *P. caudatum* sogenannte professionelle Phagozytose. Auch *Lactococcus lactis* besitzt ein Protein, ähnlich dem 51,5 kD Protein von *H. obtusa*. Es handelt sich um das Genprodukt *ypdD*, eine Zuckerhydrolase. Milchsäurebildende Bakterien sind in der Lage, niedermolekulare Zucker zu oxidieren. Die Nutzung von Zuckern aus der Umgebung setzt eine Oberflächenstruktur voraus, die solche Moleküle bindet. Durch die Oxidation von Zuckern gewinnt das Bakterium Energie, erzeugt aber auch ein saures Milieu. Von Natur aus sind solche Bakterien daher säure-resistenter als andere, was sicherlich auch auf ihre Oberflächenproteine zutrifft. *Caulobacter crescentus* ist ein weiteres Bakterium, das ein ähnliches Protein in seinem Genom aufweist. *C. crescentus* ist ein in Gewässern vorkommendes Bakterium, das zwei Formen in seinem Lebenszyklus aufweist. Eine bewegliche

Schwärmerform und eine Festsitzende. Nur die festsitzende Form ist zur Zellteilung in der Lage. Die sessile Form bindet sich mit ihrem Geißelpol an feste Oberflächen. Man findet *C. crescentus* zum Beispiel an Kahmhäuten von Wasserbädern. Erwähnenswert sind auch zwei Genprodukte zweier *Streptomyces coelicolor* Stämme. Eines davon wird vermutlich sezerniert. Ein weiteres ähnliches Proteine ist zum Beispiel ein Zellwand-Antigen von *Streptococcus pneumoniae*, einem humanpathogenen Erreger, der ebenfalls intrazellulär vorkommen kann. Weiterhin existiert eine α -1,2-Mannosidase aus *Bacillus spec.*, einem Gram-positiven Bakterium, das auch eine gewisse Ähnlichkeit mit dem 51,5 kDa Protein von *H. obtusa* aufweist. Es gibt noch andere Proteine, die eine Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz aufweisen. Der Anteil an gleichen oder gleichwertigen Aminosäuren liegt jedoch deutlich unter 30 %. Deshalb werden diese Proteine hier nicht aufgeführt.

Tab. 7: Liste mit den ähnlichen Proteinen

In der unten stehenden Tabelle sind die Bakterien und Proteine aufgelistet, die ein hohes Maß an gleichen oder gleichwertigen Aminosäuren aufweisen. Es sind die Artnamen und Stammbezeichnungen der Bakterien aufgeführt. Die Anzahl der identischen Aminosäuren bezieht sich immer auf den betrachteten Bereich des Proteins. Dasselbe gilt für die gleichwertigen Aminosäuren. Unter gleichwertig versteht man Aminosäuren mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften. So zum Beispiel die Wasserlöslichkeit oder die Struktur der Seitenkette. Gleichwertige Aminosäuren beeinflussen die Sekundär- und Tertiärstruktur eines Polypeptids in gleicher Weise.

Bakterienstamm	Protein	Länge	Identische AS	Gleichwertige AS	Datenbank kürzel
<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	Konserviertes hypothetisches Protein	790 Aminosäuren	180 / 430 Aminosäuren (41%)	227 / 430 Aminosäuren (53%)	Q9PF36
<i>Porphyromonas gingivalis</i> W50	Immunreaktives 89 kD Antigen PG87	781 Aminosäuren	160 / 371 Aminosäuren (43%)	213 / 371 Aminosäuren (57%)	Q9S3R1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Hypothetisches Protein Rv0584	877 Aminosäuren	162 / 429 Aminosäuren (38%)	205 / 429 Aminosäuren (48%)	O86365
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	Konserviertes hypothetisches Protein	877 Aminosäuren	162 / 309 Aminosäuren (38%)	205 / 309 Aminosäuren (48%)	AAK44836
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> IL1403	Zuckerhydrolase	717 Aminosäuren	149 / 414 Aminosäuren (36%)	209 / 414 Aminosäuren (50%)	Q9CFH5
<i>Caulobacter crescentus</i>	Konserviertes hypothetisches Protein CC0533	770 Aminosäuren	133 / 344 Aminosäuren (39%)	180 / 344 Aminosäuren (52%)	Q9AAR3
<i>Porphyromonas gingivalis</i> W50	Immunreaktives 87 kD antigen PG92	771 Aminosäuren	162 / 452 Aminosäuren (36%)	220 / 452 Aminosäuren (49%)	Q9S3Q9

Bakterienstamm	Protein	Länge	Identische AS	Gleichwertige AS	Datenbank kürzel
<i>Streptomyces coelicolor</i> cosmid M11	Vermutetes sezerniertes Protein	772 Aminosäuren	100 / 225 Aminosäuren (44%)	120 / 225 Aminosäuren (53%)	Q9RIU7
<i>Streptomyces coelicolor</i> cosmid BAC1C11	Konserviertes hypothetisches Proteinfragment	676 Aminosäuren	139 / 410 Aminosäuren (34%)	183 / 410 Aminosäuren (45%)	CAC37553
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Zellwand-Oberflächen-anker-Familie, Gen SP2145	694 Aminosäuren	108 / 315 Aminosäuren (34%)	146 / 315 Aminosäuren (46%)	AAK76202
<i>Streptomyces coelicolor</i> cosmid 1A6	Vermutetes sezerniertes Protein	2314 Aminosäuren	142 / 375 Aminosäuren (38%)	185 / 375 Aminosäuren (49%)	O69822
<i>Bacillus spec. M-90</i>	α -1,2-Mannosidase	1976 Aminosäuren	103 / 278 Aminosäuren (37%)	138 / 278 Aminosäuren (50%)	Q9WXI8
<i>Caulobacter crescentus</i>	Konserviertes hypothetisches Protein CC0574	867 Aminosäuren	80 / 290 Aminosäuren (27%)	138 / 290 Aminosäuren (47%)	Q9AAM3

Alle oben aufgeführten Proteine (Tab. 7) stammen von Organismen, die mehr oder weniger Parallelen in der Lebensweise zu *H. obtusa* besitzen. Davon ausgehend, dass Proteine mit ähnlicher Aminosäuresequenz auch ähnliche Aufgaben erfüllen, kann man folgenden Schluss ziehen: Das 51,5 kDa Protein von *H. obtusa* ist ein Galaktose-bindendes Protein, das während der Infektion an die Oberfläche der aktivierten Form transportiert wird (WIEMANN, 1990). Dort ist es dann für die Erkennung und Bindung von galaktose Glykokalyx zuständig, die auch Phagosomen von *P. caudatum* auskleidet. Eine Bestätigung für diese Vermutung findet man bei OBER (1989), wo mit galaktose-haltigen Neoglykoproteinen eine Oberflächendekoration von *H. obtusa* erreicht wurde.

Zuckerhaltige Wirtsstrukturen, die als potentielle Bindungsstellen für das 51,5 kDa in Frage kommen, befinden sich auf der Glykokalyx der Nahrungsvakuolen. Die Dicke als auch die Zusammensetzung der Glykokalyx ist von den jeweiligen Stadien der Cyclose abhängig (FOK UND ALLEN, 1990). Somit ist eine Erkennung und Bindung von spezifischen Zuckerstrukturen zu bestimmten Zeiten der Cyclose denkbar. Eine Bindung der Phagosomen-Membran an das Bakterium wird in der frühen Phase der Cyclose beobachtet (GÖRTZ UND WIEMANN, 1989). In der frühen Phase der Cyclose findet auch ein schneller und umfangreicher Austausch von Membranbestandteilen statt (ALLEN ET AL., 1995). Vorstellbar ist eine Bindung an Membrankomponenten, die sehr bald nach der Entstehung der Nahrungsvakuole von dieser getrennt werden. Das Bakterium wird bei diesem Vorgang dann umhüllt und verlässt so das Phagosom. Erkennung und Bindung von Wirtsstrukturen sind bei vielen bisher bekannten Invasionsmechanismen von Bakterien als die ersten Schritte beschrieben (ISBERG ET AL., 2000; FINLAY UND BRUMELL; 2000, SU ET AL., 1990). Außerdem würde dieses *H. obtusa* Protein die völlige Umhüllung mit phagosomaler Wirtsmembran erklären, wie es auf EM Aufnahme zu sehen ist (GÖRTZ UND WIEMANN, 1989). Wenn galaktose-haltige Glykokalyx in das Lumen eines Phagosomens hineinragt, kann durch Kontakt mit einem galaktose-bindenden Oberflächenprotein eine

Bindung zustande kommen. Befindet sich ein solches Oberflächenprotein überall auf der Bakterienoberfläche, ist eine Umhüllung mit Phagosomen-Membran die Folge. WIEMANN (1990) hat bereits gezeigt, dass sich auf der Oberfläche der aktivierten Form von *H. obtusa* das 51,5 kDa Protein befindet. FOK UND ALLEN (1990) liefern hier konkrete Vorstellungen über die Zusammensetzung der Glykokalyx bei *Paramecium* Arten.

Lektin-Bindungen an phagosomale Proteinen von *P. caudatum*

Um Zuckerreste in oder auf Phagosomen zu finden, haben schon ALLEN ET AL. (1988) mit Lectinen gearbeitet. Diese Proteine sind in der Lage, spezifisch Zuckerreste zu erkennen und daran zu binden. In *P. multimicronucleatum* konnten sie mit dem Lektin aus *Triticum vulgare* (WGA, Kulturweizen) (Tab. 7) teilweise Phagosomen markieren. Allerdings wurden Phagosomen in *P. caudatum* nicht mit WGA markiert. ALLEN ET AL. (1988) geben dafür zwei mögliche Gründe an. Entweder es gibt in den Phagosomen keine terminalen Neu-N-Acetat oder (Glc-NAc)² Reste, die von WGA erkannt werden können. Oder das Lektin konnte nicht bis in das Lumen der Nahrungsvakuolen vordringen. Die zweite Annahme beruht auf der Tatsache, dass die Fixierung für die beiden verwendeten *Paramecium*-Arten unterschiedlich war. ALLEN ET AL. (1988) argumentieren daher mit der schwächeren Fixierungsmethode, die nicht ausreicht, um die Phagosomen von *P. caudatum* durchlässig für das Lektin zu machen.

Die positive Markierung von Nahrungsvakuolen mit WGA in der vorliegenden Arbeit bekräftigt die zweite Annahme (Abb. 15). Außerdem konnten ALLEN ET AL. (1989) mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass WGA auch an alle Nahrungsvakuolen bindet, die man in *Paramecium* findet. Man kann davon ausgehen, dass es Zucker-Protein Strukturen mit terminalen Neu-N-Acetat oder (Glc-NAc)² Resten in oder auf Phagosomen gibt. Ebenso konnten ALLEN ET AL. (1988) mit Hilfe von PNA aus *Arachis hypogea* (Erdnuss) Nahrungsvakuolen in *P. caudatum* und *P. multimicronucleatum* markieren. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen in dieser Arbeit überein. Die in dieser Arbeit verwendeten Lectine PNA, HPA und E-PHA binden hauptsächlich an Galaktose-N-Acetat und D-Galaktose Strukturen (Abb. 15, Tab. 5). Der Nachweis eines ca. 67 kDa Proteins mit PNA auf dem Westernblot phagosomaler Proteine zeigt indirekt Galaktosereste (Abb. 14). Damit ist es wahrscheinlich, dass die Grundstruktur von Galaktose sich auf der Innen- oder Außenseite der Phagosomenmembran befindet. Mit galaktosehaltigen Neoglykoproteinen (GABIUS ET AL., 1988) konnte bereits OBER (1989) eine Dekoration der Oberflächen von verschiedenen Formen von *H. obtusa* erzielen. Eine Bindung von entsprechenden Proteinen, wie dem 51,5 kDa Protein von *H. obtusa* an diese Galaktosestrukturen ist daher möglich. Die Funktion eines solchen Proteins wäre der Wirtserkennung und dem weiteren Invasionsprozess zuzuordnen.

DNA und Aminosäuresequenz des 15,5 kDa Proteins von *H. obtusa*

Die Untersuchung des 15,5 kDa Proteins und dessen Gen ergab eine DNA- und Aminosäuresequenz (Abb. 16), die *H. obtusa* zuzuordnen ist und schon früher von anderen Autoren im Zusammenhang mit der Invasion des Makronucleus von *P. caudatum* untersucht wurde. Der AT-Gehalt der kodierenden Sequenz von 64 % ist für *H. obtusa* typisch (Persönliche Mitteilung; B. F. Lang). Die aus der Aminosäuresequenz abgeleitete relative Molekülmasse von 15,5 kDa stimmt nahezu mit denen aus der Literatur überein (FUJISHIMA ET AL., 1997, WIEMANN UND GÖRTZ, 1991). Ebenso ist der errechnete pI-Wert des 15,5 kDa Proteins von 5,2 identisch mit den Werten aus der Literatur (FUJISHIMA ET AL., 1997, WIEMANN UND GÖRTZ, 1991). Dieselben Autoren wiesen das Protein bereits im freien periplasmatischen Raum von

H. obtusa nach. Eine softwaregestützte Untersuchung der ermittelten DNA-Sequenz bestätigte die Wasserlöslichkeit des Proteins (KYTE UND DOOLITTLE, 1982).

Die Funktion der potentiellen Signalsequenz (Abb. 122) vor der eigentlichen kodierenden Sequenz wird durch den Nachweis des 15,5 kDa Proteins im Periplasma des Bakteriums bestätigt (FUJISHIMA ET AL., 1997, WIEMANN UND GÖRTZ, 1991). Mittels einer Analysesoftware wurde dieser Abschnitt als Signalpeptid erkannt (NIELSEN UND KROGH, 1998). Ein Transport durch die innere Membran ins Periplasma ist daher sehr wahrscheinlich. Die sehr geringe Homologie zu anderen DNA- und Aminosäuresequenzen weist das 15,5 kDa Protein von *H. obtusa* als ein bisher unbekanntes Protein aus. Da die Funktion des Proteins außerdem eindeutig dem Invasionsprozess zugeordnet wird (FUJISHIMA ET AL., 1997, WIEMANN UND GÖRTZ, 1991), handelt es sich um ein neues invasionsspezifisches Protein. Es gibt bisher nur ein weiteres periplasmatisches Protein von *H. obtusa*, ein 5,4 kDa Protein, dessen Signalpeptid aber keinerlei Ähnlichkeit mit dem Signalpeptid des 15,5 kDa Proteins aufweist (DOHRA ET AL., 1997).

Die Sequenz im Vorfeld des protein-kodierenden Abschnitts enthält zwar mögliche ribosomale Bindungstellen und andere regulative Boxen (z.B. TATA-Box, Abb. 16), aber wegen der fehlenden experimentellen Überprüfung kann man keine eindeutigen Schlüsse auf die Regulation der Transkription ziehen. Wenn für das 15,5 kDa Protein von *Holospira* eine polycistronische Transkription annimmt, so kann man folgendes schließen: das Gen des 15,5 kDa Proteins liegt am Ende eines Gencusters, der im Verlauf des Lebenszyklus von *H. obtusa* transkribiert und translatiert wird. Die Ergebnisse der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung weisen hier auf einen Transkriptionsstart in den reproduktiven Formen hin. Dann sind aber regulative Sequenzen für die Transkription nicht nötig. Es handelt sich dann wohl um die kodierenden Bereiche des Vorgängergens.

Anders sollte es aussehen, wenn es sich tatsächlich um die regulativen Regionen des Gens handelt. Dann liegt das 15,5 kDa Gen entweder am Anfang eines Operons oder es ist ein alleinstehendes Gen. Die weit von den bekannten Consensussequenzen abweichenden potentiellen regulativen Elemente wie TATA-Box oder die -35 Region lassen zumindest auf diese Möglichkeit schließen. Diese ungewöhnlichen Sequenzen weisen auf eine schwächere Transkription hin, was im Hinblick auf die invasionsspezifischen Proteine Sinn macht. Sie sollten nur dann stark expremiert werden, wenn die Bakterien durch Nährstoffunterversorgung in Gefahr geraten.

Expressionversuche des 15,5 kDa Proteins in *E. coli*

Die klonierte Nukleinsäuresequenz des 15,5 kDa Proteins wurde erfolgreich in *E. coli* expremiert. Da die Expression des 15,5 kDa Proteins in *E. coli* keine sichtbaren toxischen Wirkungen auf die Bakterien zeigte, sind Auswirkungen auf den bakteriellen Stoffwechsel eher geringer Art. Möglicherweise wird das Protein nur hergestellt und bleibt dann ungenutzt, weil andere Invasionskomponenten fehlen, die nicht von *E. coli* bereitgestellt werden. Da die Nukleinsäure-Sequenz des 15,5 kDa Proteins mit der universellen Codon Tabelle übersetzt wurde, kann man annehmen, dass auch *E. coli* in der Lage ist, die Sequenz sinngemäß zu übersetzen. Die Funktionalität des 15,5 kDa Proteins ist demnach vorhanden. Direkte Veränderungen an *E. coli* konnten keine beobachtet werden. Nur das Wachstumsverhalten der einzelnen Stämme war deutlich verschieden (Tab. 6). Es ist eine Verzögerung der beiden Expressionsstämme CEB und PNB zum Kontrollstamm BL21 zu erkennen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass das expremierte Polypeptid den größten Teil der Sekretionsapparate in *E. coli* belegte und so die eigentlichen *E. coli* Proteine nicht sofort ins Periplasma gelangen konnten. Eine Wachstumsverzögerung wäre der Fall. Man kann aber

davon ausgehen, dass das 15,5 kDa Protein alleine nicht ausreicht um den transformierten Bakterien eine Invasion in den Makronucleus von *P. caudatum* zu ermöglichen.

Die Anwesenheit des Induktors IPTG hatte keine merklichen Auswirkungen auf das konstante Verhältnis von Biomasse zu Proteinmenge (Abb. 18). Auch verschiedene Konzentrationen an IPTG änderten daran nichts. Diese Tatsache, dass IPTG keine Auswirkungen auf die Expression hatte, kann folgendermaßen interpretiert werden: entweder lag eine konstitutionelle Expression vor oder die Unterdrückung des Promotors auf Transkriptionsebene funktionierte nicht. Denkbar ist auch eine Rückkopplung der mRNA bzw. des Proteins auf seine eigene Expression.

Das außergewöhnliche große Periplasma und die große Menge verschiedener Proteine darin, legen den Schluss nahe, dass es in *H. obtusa* einen stark ausgeprägten Transportmechanismus speziell für diese Proteine gibt. Das Signalpeptid scheint für den enormen Transport des 15,5 kDa Proteins ins Periplasma verantwortlich zu sein. Das Signalpeptid von *H. obtusa* wurde von *E. coli* CEB nicht korrekt erkannt, da weder in der periplasmatischen Proteinfraction (Abb. 22) noch an Ultradünnschnitten von transformierten *E. coli* das 15,5 kDa Protein im Periplasma nachgewiesen wurde. Dagegen konnte mit beiden Methoden das Protein im Zytoplasma gefunden werden (Abb. 22). Vor allem auf den Ultradünnschnitten sind sogenannte *inclusion bodies* zu sehen. Dies weist darauf hin, dass das Protein hauptsächlich im Zytoplasma verblieb und nicht ins Periplasma transportiert wurde. Weil das Protein nicht ins Periplasma gelangen konnte, reicherte es sich im Zytoplasma an und bildete unlösliche Proteinaggregate. Das macht deutlich, dass selbst eine hohe Konzentration des 15,5 kDa Proteins im Zytoplasma keine direkten Auswirkungen auf die *E. coli* Bakterien hatte. Damit ist klar, dass es sich nicht um ein allgemein in Bakterien verwendetes Signal handelt, um Proteine ins Periplasma zu transportieren. Der Vergleich des Signalpeptids mit Sequenzen aus Datenbanken brachte ebenfalls keine Ergebnisse, so dass man von einem bislang unbekanntem Signalpeptid ausgehen kann.

Im Gegensatz dazu war das Plasmid-kodierte Transportsignal in der Lage, das 15,5 kDa Protein ins Periplasma zu transportieren. Die im Periplasma von *E. coli* vorliegenden Fusionsproteine zeigen zwei Molekulargewichte (Abb. 22). In einem Fall wurde das Peptid entfernt, im anderen Fall nicht. Proteine ohne Signalpeptid lagen zu einem geringeren Anteil vor. Ein Grund für dieses Missverhältnis kann die Fusion der zwei unterschiedlichen Proteinkomponenten sein. Die Verbindungsstelle zwischen Signalpeptid und *Holospira* Protein war möglicherweise als Substrat nicht so gut für dasjenige Enzym geeignet, das die Peptidbindung zwischen den beiden spalten sollte. Durch die Expressionsversuche in *E. coli* wurden zwei verschiedene Proteine hergestellt, deren Aufenthaltsort und Zusammensetzung Aufschluss über einige Eigenschaften des 15,5 kDa Proteins geben sollte. Das Fusionsprotein 15,5 kDa / CBD_{ceX} ohne das *Holospira* Signalpeptid war in deutlich größerer Menge im Zytoplasma als im Periplasma vorhanden (Abb. 22). Trotz eines auf dem Plasmid kodierten Signalpeptids (Abb. 4) war ein starker Transport vom Zytoplasma ins Periplasma nicht nachzuweisen. Es sei denn, das 15,5 kDa / CBD_{ceX} Protein wurde vom Periplasma sehr schnell ins umgebende Medium befördert. Im Überstand der *E. coli* Kultur konnte mit der beschriebenen Methode aber kein Protein gefunden werden. Im Zytoplasma wurde viel Fusionsprotein nachgewiesen. Deshalb kann man davon ausgehen, dass trotz der künstlichen Signalpeptidsequenz verhältnismäßig wenig Fusionsprotein ins Periplasma transportiert wurde. Daher ist auf Probleme beim Transport durch die Membran von *E. coli* zu schließen.

Das Signalpeptid des Plasmids ist vielleicht nicht ausreichend, um das *Holospira* Protein zu exportieren. Es scheint noch andere Komponenten zu benötigen, um in großen Mengen ins Periplasma zu

gelangen. Eine Möglichkeit bieten hier ein Sekretionskomplex, wie es bei *H. obtusa* bereits postuliert wurde (LEHMANN, 1997). Außerdem ist es denkbar, dass das 15,5 kDa Protein außer seinem Signalpeptid eine sekundäre Struktur aufweist, die es einem speziellen Transportsystem in *H. obtusa* ermöglicht, verstärkt dieses Protein in das Periplasma zu transportieren. Vermutlich besitzt *E. coli* ein solches Transportsystem nicht und kann das 15,5 kDa Protein nur in geringem Umfang exportieren. Es besitzt ja augenscheinlich in keiner Phase seines Daseins ein stark vergrößertes Periplasma. Allerdings wiesen die transformierten *E. coli* auf Ultradünnschnitten erkennbare Hohlräume im Periplasma auf, wenn dort auch das 15,5 kDa Fusionsprotein nachzuweisen war (Abb. 24). Es bleibt die Frage, ob ein vermehrter Transport des Fusionsproteins dies bewirkt hat. Man kann sich vorstellen, dass das 15,5 kDa Protein aktiv an der Entstehung der Hohlräume beteiligt ist.

Der komplette Leserahmen einschließlich Signalpeptid des 15,5 kDa Proteins war in dasselbe Plasmid eingebaut, wie in der ersten Expressionsreihe. Allerdings wurde das auf dem Plasmid mitgelieferte Signalpeptid durch das von *H. obtusa* ersetzt. Außerdem wurde auf eine Fusion mit der BCD verzichtet, um ein eigenständiges Protein zu erhalten. Das in *E. coli* hergestellte Protein wurde mittels Antikörpern eindeutig als 15,5 kDa Protein von *H. obtusa* identifiziert (Abb. 23). Man kann deshalb davon ausgehen, dass sich zumindest das Epitop für den Antikörper in einem nativen Zustand befand. Daher ist zu erwarten, dass die Funktion des 15,5 kDa Proteins auch in diesem Maße vorliegt. In den untersuchten Kulturen und Ultradünnschnitten der transformierten Bakterien konnten im Vergleich zur Kontrolle aber keine Veränderungen beobachtet werden. Das 15,5 kDa Protein von *H. obtusa* wurde zudem nur im Zytoplasma von *E. coli* nachgewiesen und lag hauptsächlich in *inclusion bodies* vor. Das beweist, dass es in großen Mengen hergestellt wurde, aber kaum ins Periplasma transportiert wurde. *E. coli* hat offensichtlich Schwierigkeiten das Signalpeptid von *H. obtusa* zu erkennen. Möglich ist auch eine Blockade der für *E. coli* typischen Transportsysteme. Ein falsches Signalpeptid könnte sozusagen die Transportstellen verstopft haben. Das Wachstumsverhalten der drei *E. coli* Stämme in den Expressionsversuchen deutet darauf hin (Tab. 6). Folge davon wäre eine Störung des gesamten Transportmechanismus und eine Wachstumsverzögerung wie sie beobachtet wurde.

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Ein weiterer Gegenstand der Untersuchungen war der Expressionsverlauf des 15,5 kDa Proteins. Weil die Kultivierung der *H. obtusa* Bakterien bisher nur im Wirt möglich ist, sind größere Mengen an Bakterien nicht verfügbar. Versuche, diese außerhalb des Wirts zu vermehren sind derzeit nicht erfolgreich. Das hat Auswirkungen auf die Ausbeuten an verschiedenen Nukleinsäuren. So sind Expressionsstudien mittels *Messenger*-RNA (mRNA) des 15,5 kDa Proteins wegen zu geringem Ausgangsmaterial kaum durchführbar. Daher wurde nach einer alternativen Methode gesucht, um die Gen-Expression in den einzelnen Stadien der Bakterien zu verfolgen. Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) bietet die Möglichkeit in ganzen Organismen künstliche DNA-Moleküle an die dort vorkommende Nukleinsäure zu binden. Dabei ist es notwendig, mindestens 400 Signalmoleküle pro Zelle unterzubringen, um überhaupt ein Signal zu erhalten (pers. Mitteilung, J. Brenner). Vorrausgesetzt, es wird ein Konfokales *Laser Scanning* Mikroskop (KLSM) verwendet.

Um diese Grenze zu durchstoßen, wurden genspezifische, markierte DNA-Sonden mit Hilfe der *Polymerase Chain Reaction* (PCR) hergestellt. Durch den Einbau von Fluoreszenz-markierten dUTP-Nukleotiden durch die *Taq* DNA-Polymerase erfolgte die Markierung. Der hohe AT-Gehalt des Gens

gewährleistete eine hohe Markierungsdichte und damit eine hohe Signalstärke pro Sonde. Die durchschnittliche Anzahl markierter Bausteine pro DNA-Molekül erforderte mindestens 12 bindende DNA-Sonden pro Zelle, um über die Nachweisgrenze zu kommen. Aus diesem Grund wird auch ausgeschlossen, dass ein einzelnes *single copy* Gen zu einem falsch positiven Nachweis von mRNA führt. Außerdem wurde eine markierte DNA-Kontrollsonde auf gleiche Art und Weise hergestellt und eingesetzt. Im Gegensatz zur mRNA spezifischen DNA-Sonde war diese gegen Matrizenstrang des Gens gerichtet und konnte somit keine mRNA markieren. Mit dieser Kontrollsonde wurde kein Signal erzeugt. Damit war eine störende Markierung des Gens des 15,5 kDa Proteins ausgeschlossen. Andererseits wurden so nur Bakterien markiert, die mindestens 12 mRNA-Moleküle des Gens aufwiesen. Damit ist nur ein qualitativer Nachweis der Transkriptionsaktivität möglich. Sollte die mRNA des Gens in einem Stadium unter der Nachweisgrenze liegen, so wird sie mit dieser Methode nicht nachgewiesen.

Da der Nachweis teilweise in den *Holospira* Bakterien stattfinden sollte, die sich im Zellkern des Paramecien befanden, waren bis zu 4 Zellmembranen zu überwinden. Eine Fixierung und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung der Bakterien im Kern mit gattungsspezifischen DNA-Sonden gegen 16S-rRNA wurde erfolgreich durchgeführt (Abb. 127). Diese Markierung wurde weiterhin als Positivkontrolle eingesetzt. Dieselbe Fixierung und Permeabilisierung wurde dann auch für die Untersuchungen mit den genspezifischen DNA-Sonden durchgeführt. Offensichtlich reicht die Permeabilisierung und Fixierung für die langen genspezifischen Sonden aus, um bis in die Bakterien vorzudringen. Außerdem zeigen die Ergebnisse der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an ganzen Paramecien und isolierten Bakterien keine Unterschiede in der Intensität und Markierungshäufigkeit. Auch die Hybridisierungstemperatur scheint nicht ausschlaggebend zu sein. Da in allen Versuchen parallel immer eine kurze *Holospira*-16S-rRNA spezifische DNA-Sonde mitgeführt wurde, kam auch deren Hybridisierungstemperatur zum Einsatz. Diese liegt bei 46°C und ist für die längere, genspezifische DNA-Sonde sehr niedrig. Zu niedrige Hybridisierungstemperaturen verhindern das Aufschmelzen der Zielsequenz mit der Folge, dass weniger DNA-Sonden binden können. Man musste damit rechnen, dass es mit den genspezifischen Sonden keine Signale gibt. Dies konnte allerdings nicht beobachtet werden. Es trat nur eine störende Hintergrundfluoreszenz auf, die durch Optimierung der DNA-Sonden-Konzentration reduziert wurde. Die Ergebnisse der FISH zeigten ein deutliches Signal in den reproduktiven und den intermediären Formen von *H. obtusa* (Abb. 26). In den infektiösen und aktivierten Formen dagegen wurde kein Signal gefunden. Dies legt den Schluss nahe, dass eine Transkription ausschließlich in den markierten Formen stattfindet. Dass eine Transkription des Gens in den infektiösen Formen nicht stattfindet, bekräftigten die Beobachtungen von FREIBURG (1985), DOHRA UND FUJISHIMA (1999).

Die als inaktiv bezeichnete infektiöse Form von *H. obtusa* betreibt offensichtlich keine Transkription mehr. Sie ist komplett mit allen Proteinen ausgestattet, um einen neuen Wirt zu infizieren. Die Beobachtung, dass bei einem Teil der infektiösen Formen sogar die 16S-rRNA spezifische DNA-Sonde nicht mehr bindet, weist außerdem auf einen deutlichen Unterschied zwischen den einzelnen infektiösen Formen hin. Eine fehlende Markierung mit DNA-Sonden bei infektiösen Formen ist bereits bei AMANN ET AL. (1991) zu beobachten. Ribosomen als Orte der Proteinbiosynthese sind in den infektiösen Formen als Organellen intakt, wie bei GÖRTZ ET AL. (1990) auf Ultradünnschnitten unter dem Elektronenmikroskop zu sehen war. Deshalb ist ein Abbau der Ribosomen in infektiösen Formen als Grund für eine fehlende Markierung auszuschließen. Vielmehr sind eine große Anzahl von Ribosomen für einen Schnellstart der Expression nach erfolgreicher Infektion wichtig.

Denkbar ist eine Inaktivierung der Ribosomen durch eine extreme Verdichtung. Somit ist auch der Zugang für DNA-Sonden erschwert, womit die unzulängliche Bindung der DNA-Sonden an die 16S-rRNA erklärt werden kann. Letztendlich kann der Unterschied zwischen den infektiösen Formen mit zwei verschiedenen infektiösen Formen erklärt werden. Die fortgeschrittene infektiöse Form zeichnet sich durch eine endgültig stillgelegte Translation aus, die durch eine zunehmende Blockade der Ribosomen zustande kommt. In der frühen infektiösen Form sind die Ribosomen noch zugänglich für die mRNA. Ein Vorteil dieses Blockadeprozesses ist die rasche Verfügbarkeit der Ribosomen nach der Aktivierung und während der Infektion. Wären die Ribosomen zuvor abgebaut worden, müssten sie zuerst wieder synthetisiert und zusammengestellt werden.

Auch der nachfolgende Zustand, die aktivierte Form, konnte nicht mit den genspezifischen DNA-Sonden markiert werden. Allerdings wurde die 16S-rRNA der aktivierten Formen markiert, eine Translation könnte also möglich sein. Das könnte bedeuten, dass die Ribosomen während der beginnenden Infektion wieder in ihre ursprüngliche Form gebracht werden. Erste Signale mit der genspezifischen Sonde des 15,5 kDa Proteins konnten in den reproduktiven Formen gefunden werden. Daher lässt sich der Beginn der Transkription der mRNA des 15,5 kDa Proteins auf diesen Zeitpunkt festlegen. Auch in den intermediären Formen von *H. obtusa* ist die genspezifische mRNA nachzuweisen. Dadurch ergibt sich für die Transkription folgender Zyklus: Während des Lebensabschnitts im Zellkern (reproduktive Form) und der Entwicklung zur infektiösen Form (intermediäre Form) wird das Gen des 15,5 kDa Proteins transkribiert. In der infektiösen Form und der aktivierten Form dagegen findet keine nachweisbare Transkription statt. Im Gegensatz dazu steht die Abundanz des 15,5 kDa Proteins. Es ist in der reproduktiven Form nicht zu finden und kann erst in der intermediären Form nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration wird in den infektiösen Formen gefunden, um dann während der Infektion in den aktivierten Formen wieder abzunehmen. Das zeitlich versetzte Vorkommen von mRNA und Protein ist vor allem bei den reproduktiven Formen bemerkenswert. Normalerweise sind in Bakterien Transkription und Translation gekoppelt, was auch die kurze Reaktionszeit des Stoffwechsels begünstigt. Im Falle der reproduktiven Formen und des 15,5 kDa Proteins wird zwar mRNA hergestellt, aber eine Translation in nachweisbarem Maßstab bleibt aus. Aus den Resultaten der FISH und den Ergebnissen aus der Proteinbiochemie (GÖRTZ ET AL., 1988; WIEMANN UND GÖRTZ, 1989) kann eine zeitliche und räumliche Verteilung von mRNA und expremiertem Polypeptid hergeleitet werden. Zusammengefasst ergibt sich ein Modell, dass das Vorkommen von mRNA und Protein in *H. obtusa* beschreibt (Abb. 31).

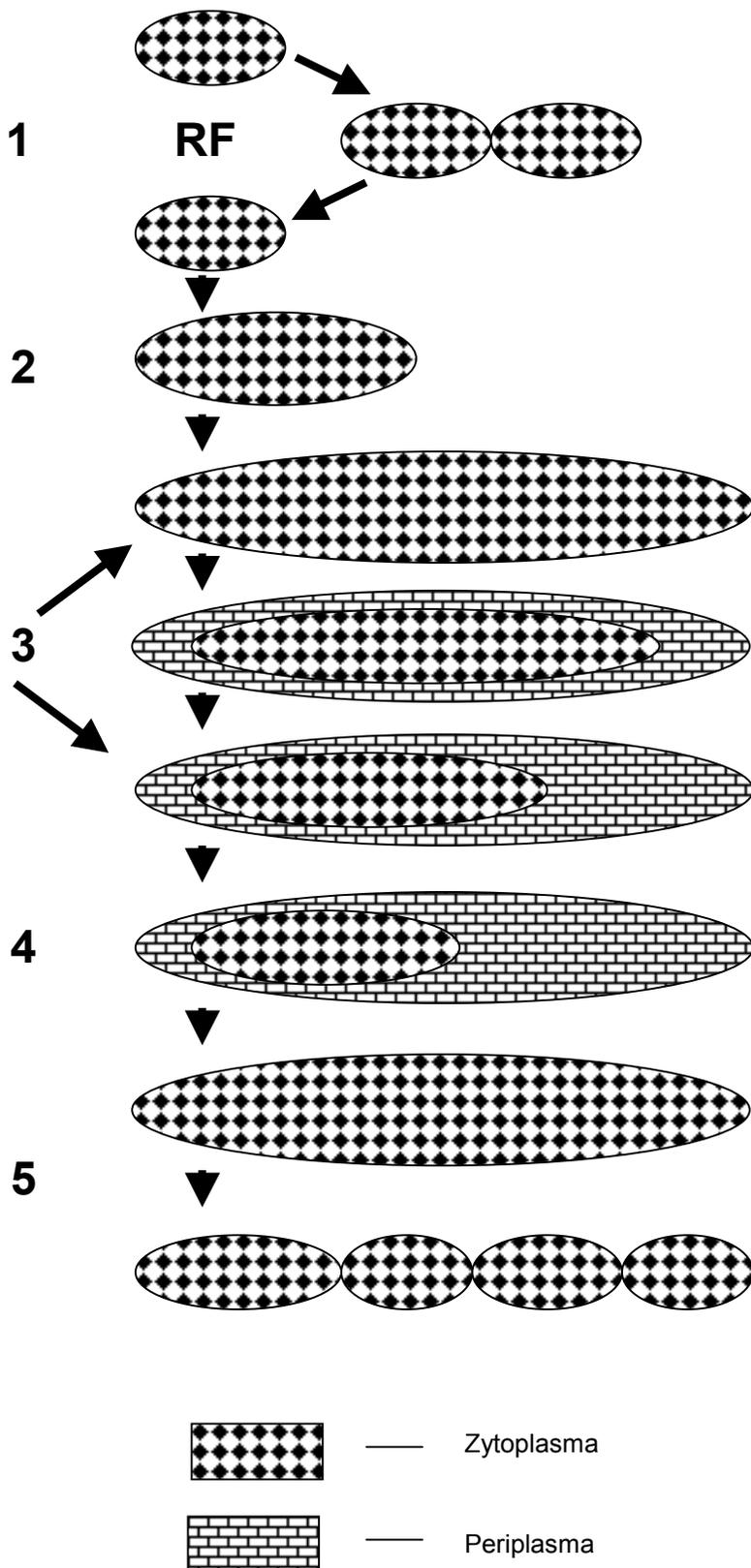
Schlussfolgerung

Die Besiedlung eines eukaryotischen Zellkern durch Bakterien, noch dazu in Abhängigkeit von der Wirtsart, ist ein im Bakterienreich sehr seltenes Phänomen. Die daran beteiligten Proteine sollten demnach besondere Eigenschaften besitzen oder zumindest im Zusammenspiel untereinander neuartig erscheinen.

Im Zusammenhang mit der Infektion des Makronukleus von *P. caudatum* ist eine Wirtserkennung über die Zelloberfläche unumgänglich. Dabei spielen Oberflächenstrukturen des Wirts wie Glykoproteine eine wichtige Rolle. Die Resultate des 51,5 kDa Proteins aus *H. obtusa* lieferten Hinweise, dass das Protein vermutlich an Galaktosereste auf der Phagosomenmembran von *P. caudatum* bindet. Da das Protein in infektiösen Formen im Periplasma und auch auf deren Zelloberfläche vorkommt (WIEMANN, 1990), scheint es sich hier um ein bakterielles Protein zu handeln, das die Wirtserkennung vermittelt. Schon OBER (1989) fand mit Hilfe von Neoglykoproteinen eine Bindung von Galaktoseresten auf der Oberfläche von verschiedenen

Formen von *H. obtusa*. Denkbar ist damit folgendes Szenario: *H. obtusa* wird von *P. caudatum* in ein Phagosom aufgenommen und bindet dort im Laufe der Infektion an die ins Lumen des Phagosomen ragenden Glykoproteine mit Galaktoseresten. Da das Protein vermutlich auf der ganzen Oberfläche des Bakteriums verteilt ist, bewirkt das eine vollständige Umhüllung des Bakteriums mit der Phagosomenmembran, wie das bereits beobachtet wurde (GÖRTZ UND WIEMANN, 1989).

Das 15,5 kDa Protein von *H. obtusa* ist den bisherigen Erkenntnissen nach ein unbekanntes Protein. Es ist aber den Ergebnissen dieser und anderer Arbeiten zur Folge definitiv ein an der Infektion beteiligtes Polypeptid. Die geringe Übereinstimmung seiner Aminosäuresequenz mit anderen bekannten Sequenzen unterstreicht seine besondere Stellung und weist möglicherweise auf einen neuen Infektionsmechanismus bei Bakterien hin. Die gefundene Regulation der Expression auf Translationsebene weist auf ein kompliziertes Gleichgewicht zwischen infektiösen und reproduktiven Formen hin. Einerseits dürfen nicht zu schnell zu viele infektiöse Formen gebildet werden, da sonst die Population ausdünnung bevor sie zunehmen kann. Andererseits müssen die Bakterien bei Nährstoffmangel jederzeit in der Lage sein, infektiöse Formen zu bilden, um denn geschwächten Wirt zu verlassen. Eine gleichbleibender Vorrat an mRNA könnte den Bakterien einerseits eine schnelle Translation im Falle eines hungernden Wirts ermöglichen. Andererseits wäre durch eine kontrollierte Verzögerung der Translation eine latente Bildung von infektiösen Formen vorhanden, um für die Freisetzung während einer Zellteilung genügend infektiöse Formen zur Verfügung zu stellen. Diese Art der Expressionskontrolle ist bei Bakterien als *Attenuation* (dt. Verzögerung) bereits bekannt und findet sich zum Beispiel beim Tryptophan-Operon von *E. coli*.



1: Vermehrung der (RF) Reproduktiven Form durch Zweiteilung. Das Zytoplasma ist vollständig auf die Zelle verteilt. Das 15,5 kDa Protein ist noch nicht nachweisbar. Die mRNA liegt jedoch vor.

2: Umwandlung der RF in die intermediäre Form (IMF). Die Zelle und das Zytoplasma vergrößern sich. Das 15,5 kDa Protein ist zum ersten Mal nachweisbar. Auch die mRNA ist vorhanden.

3: Umwandlung der IMF in die infektiöse Form (IF). Das Zytoplasma verkleinert, das Periplasma vergrößert sich. Das 15,5 kDa Protein ist in größeren Mengen im Periplasma zu finden. Die dazugehörige mRNA ist noch nachweisbar.

4: Inaktive infektiöse Form. Hier kann nur noch das Protein gefunden werden. In dieser Form infiziert das Bakterium seinen neuen Wirt.

5: Die infektiöse Form wandelt sich während der Infektion in die aktive Form um. Das Protein verschwindet allmählich aus dem Periplasma. Messenger-RNA ist nicht zu finden. Im Zellkern angelangt, teilt sich die aktivierte Form mehrfach.

Abb. 31: Präsenz des 15,5 kDa Proteins und dessen mRNA während des Lebenszyklus von *H. obtusa*.

Literaturverzeichnis

- Adams, S., and R. Blakesley. (1991).
Linear amplification sequencing.
Focus **13**:56-57.
- Akporiaye, E. T., J. D. Rowatt, A. A. Aragon, and O. G. Baca. (1983).
Lysosomal response of a murine macrophage-like cell line persistently infected with *Coxiella burnetii*.
Infect. Immun. **40**:1155-1162.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson. (1994).
Molecular Biology of the cell. Third edition. Chapter 16 "Cytoskeleton". Garland Publishing, New York.
- Allen, R., N. P. Bala, R. F. Ali, D. M. Nishida, M. S. Aihara, M. Ishida and A. K. Fok. (1995).
Rapid bulk replacement of acceptor membrane by donor membrane during phagosome to phagoacidosome transformation in *Paramecium*.
J. Cell Science **108**: 1263-1274.
- Allen, R.D., Schroeder, C.C. and A.K. Fok. (1989).
Intracellular Binding of Wheat Germ Agglutinin by Golgi Complexes, Phagosomes, and Lysosomes of *Paramecium multimicronucleatum*.
J.Histochem.Cytochem. **37**(2):195-202.
- Allen, R.; Ueno, M. S. and Fok, A. K. (1988).
A survey of Lektin binding in *Paramecium*.
J. Protozool., **35** (3): 400-407.
- Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. (1990).
Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations.
Appl. Environ. Microbiol. **56**:1919-1925.
- Amann, R., N. Springer, W. Ludwig, H.-D. Görtz, and K. H. Schleifer. (1991).
Identification in situ of uncultured bacterial endosymbionts.
Nature **351**:161-164.
- Ausubel, F. M.; R. Brent; R. E. Kingston; D. D. Moore; J. G. Seidman; J. A. Smith and K. Struhl. (1989).
In: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York.
- Andersson, S. G., and C. Dehio. (2000).
Rickettsia prowazekii and *Bartonella henselae*: differences in the intracellular life styles revisited.
Int. J. Med. Microbiol. **290**:135-141.
- Birtles, R., Rowbotham, T., Michel, R., Pitcher, D., Lascola, B., Alexiou-Daniel, S. and D. Raoult. (2000).
Candidatus Odysseella thessalonicensis gen. nov., sp. nov., an obligate intracellular parasite of *Acanthamoeba* species.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **50**:63-72.

- Bortolussi, R., C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. S. van Asbeck, and J. Verhoef. (1987).
Relationship of bacterial growth phase to killing of *Listeria monocytogenes* by oxidative agents generated by neutrophils and enzyme systems.
Infect. Immun. **55**:3197-3203.
- Buffery, C. (1993).
The Polymerase Chain Reaction.
In: Walker, J. M., Gillingham, E. B., Molecular Biology and Biotechnology, Thomas Graham House, Cambridge, **3**:51-62.
- Carothers, A. M., G. Urlaub, J. Mucha, D. Grunberger, and L. A. Chasin. (1989).
Point mutation analysis in a mammalian gene-rapid preparation of total RNA, PCR amplification for cDNA, and Taq-Sequencing by a novel method.
Bio Techniques **7**:494-499.
- Clemens, D. L., Lee, B. Y., Horwitz, M. A. (2000).
Deviant expression of Rab5 on phagosomes containing the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* is associated with altered phagosomal fate.
Infect. Immun. **68**:2671-2684.
- Cohen, M. L. (2000).
Changing patterns of infectious disease.
Nature **406**:762-767.
- Cole, S. T. R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S V. Gordon, K. Eiglheimer, S. Gas, C. E. 3rd Barry, F. Tekaia, K. Bodcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, and B. G. Barrell. (1998).
Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence.
Nature **393**:537-544.
- Corsaro, D., Venditti, D., Padula, M., and M. Valassina. (1999).
Intracellular life.
Crit. Rev. Microbiol. **25**:39-79.
- Craxton, M. (1991).
Linear amplification sequencing: A powerful method for sequencing DNA.
Methods: A comparison to Method Enzymol. **3**:20-26.
- Cummings, D. J., (1972).
Isolation and partial characterization of macro- and micronuclei from *Paramecium aurelia*.
J.Cell Biol. **53**: 105-115.
- Curtenaz, S., and J. Beisson. (1996).
In situ hybridization as a method to study the regulation of gene expression in *Paramecium*.
J. Euk. Microbiol. **43**:202-212.
- de Bary, A. (1879).
Die Erscheinung der Symbiose.
Verlag von K. J. Trübner, Strassburg.

- Dohra, H., K. Yamamoto, M. Fujishima and H. Ishikawa. (1997).
Cloning and Sequencing of Gene Coding for a Periplasmic 5.4 kDa Peptide of the Macronucleus-Specific Symbiont *Holospira obtusak* of the Ciliate *Paramecium caudatum*.
Zoological Science **14**: 69-75.
- Dohra, H., M. Fujishima, and K. Hoshide. (1994).
Monoclonal Antibodies Specific for periplasmic Materials of the Macronuclear Specific Bacterium *Holospira obtusa* of the Ciliate *Paramecium caudatum*. *Europ. J. Protistol.* 30:288-294.
- Dow, J. M. and M. J. Daniels. (2000).
Xylella genomics and bacterial pathogenity to plants.
Yeast 17(4):263-271.
- Dugaiczky, A., R. Goold, G. diSibio, and R. M. Myers. (1992).
Improved sequencing of cosmids using new primers and linearized DNA.
Nucleic Acids Research **20**:6421-6422.
- Ehram, E. (1999).
Proteinbiochemische, cytologische and molekularbiologische Aspekte bei der Invasion von *Holospira*-Bakterien in den Makronucleus von *Paramecium caudatum*.
Dissertation, Universität Stuttgart, Biologisches Institut, Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart
- Eremeeva, M. E., Dasch, G. A., D.J Silverman. (2000).
Interaction of *rickettsiae* with eukaryotic cells. Adhesion, entry, intracellular growth, and host cell responses.
Subcell. Biochem. **33**:479-516.
- Everett, K. D. (2000).
Chlamydia and *Chlamydiales*: more than meets the eye.
Vet. Microbiol. **75**:109-126
- Finlay, B. B., and J. H. Brumell. (2000).
Salmonella interactions with host cells: in vitro to in vivo.
Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 29; **355**: 623-31.
- Fok, A. K. and R. D. Allen. (1990).
The phagosome-lysosome membrane system and its regulation in *Paramecium*.
Int. Rev. Cytol. **123**: 61-94.
- Fok, A. K., B. C. Sison Jr, M. S. Ueno and R. D. Allen. (1988).
Phagosome formation in *Paramecium*: effects of solid particles.
J. Cell Science **90**, 517-524.
- Fokin, S. I., T. Brigge, J. Brenner and H.-D. Görtz. (1996).
Holospira species infecting the nuclei of *Paramecium* appear to belong into two groups of bacteria.
Europ. J. Protistol. **32**, Suppl. I, 19-24.
- Franca, S., S. Viegas, V. Mascarenhas, L. Pinto and G. Doucette. (1995).
Procaryotes in association with a toxic *Alexandrium lusitanicum* in culture.
In: Lassus P., Arzul G., Erard E., Gentien P., Marcaillou C. (eds.): Harmful marine algal blooms, pp. 45-51. Lavoisier Publishing, Intercept Ltd., Paris, Andover.

Freiburg, M. (1985).

Isolation and characterization of macronuclei of *Paramecium caudatum* infected with the macronucleus-specific bacterium *Holospora obtusa*.

J. Cell Sci. **73**: 389-398.

Fujishima, M. (1986).

Further Studies of the infectivity of *Holospora obtusa*, a Macronucleus Specific Bacterium of the Ciliate *Paramecium caudatum*.

Acta Protozoologica **25**(3):345-350.

Fujishima, M.; K. Nagahara and Y. Kojima. (1990).

Changes in Morphology, Buoyant Density and Protein Composition in Differentiation from the Reproductive Short Form to the Infectious Long Form of *Holospora obtusa*, a Macronucleus-Specific Symbiont of the Ciliate *Paramecium caudatum*.

Zoological Science **7**:849-860.

Fujishima, M., K. Nagahara, Y. Kojima, and Y. Sayama. (1991).

Sensitivity of the infectious long form of the macronuclear endosymbiont *Holospora obtusa* of the ciliate *Paramecium caudatum* against chemical and physical factors.

Europ. J. Protistol. **27**:119-126.

Fujishima, M. (1992).

Control of morphological changes of the endonuclear symbiont *Holospora* of the ciliate *Paramecium*.

Endocytobiology V, 509-514. (editors: S. Sato, M. Ishida and H. Ishikawa).

Fujishima, M., Dohra, H., and M. Kawai. (1997).

Quantitative Changes in Periplasmic Proteins of the Macronucleus-Specific Bacterium *Holospora obtusa* in the infection Process of the Ciliate *Paramecium caudatum*.

J. Euk. Microbiol. **44**(6):636-642.

Fumagalli, O., B. D. Tall, C. Schipper and T. A. Oelschlaeger. (1997).

N-glycosylated proteins are involved in efficient internalization of *Klebsiella pneumoniae* by cultured human epithelial cells.

Gabius, H. J., Rüdiger, H., und G. Uhlenbruck. (1988).

Lektine.

Spektrum der Wissenschaften. **11**:50-60.

Gao, L.Y., O.S. Harb, and Y. Abu Kwaik. (1997).

Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa.

Infect. Immun. **65**(11):4738-4746.

Gerhardt, H., M. J. Walz, M. Faigle, H. Northoff, H. Wolburg, and B. Neumeister. (2000).

Localization of legionella bacteria within ribosome-studded phagosomes is not restricted to *legionella pneumophila*.

FEMS Microbiol. Lett. **192**:145-152.

- Gilboa-Garber, N., D. Avichezer, and N. C. Garber. (1997).
Bacterial Lectins: Properties, Structure, Effects, Function and Applications.
In: H.-J. Gabius, S. Gabius (eds.): Glycosciences, 369-396, Chapman & Wall, Weinheim.
- Görtz, H.-D. (1983).
Endonuclear Symbionts in Ciliates.
Intern. Review of Cytol. Suppl. 14:145-176.
- Görtz, H.-D. (1986).
Endonucleobiosis in ciliates.
Int. Rew. Cytol. **102**:169-213.
- Görtz, H.-D., and J. Dieckmann. (1987).
Leptomonas ciliatorum n.sp in the macronucleus of a hypotrich ciliate.
J. Protozool. **34**:259-265.
- Görtz, H.-D., and M. Wiemann. (1989).
Route of infection of the bacteria *Holospora elegans* and *Holospora obtusa* into the nuclei of *Paramecium caudatum*.
Eur. J. Protistol. **24**:101-109.
- Görtz, H.-D, N. Ahlers, and H. Robenek. (1989).
Ultrastructure of the infectious and reproductive forms of *Holospora obtusa*, a bacterium infecting the macronucleus of *Paramecium caudatum*.
J. Gen. Microbiol. **135**:3079-3085.
- Görtz, H.-D., M. Freiburg, and M. Wiemann. (1988).
Polypeptide differences between infectious and reproductive forms of *Holospora obtusa*, an endonucleobiotic bacterium from the macronucleus of *Paramecium caudatum*.
Europ. J. Protistol. 24:101-109.
- Görtz, H.-D, S. Lellig, O. Miosga, and M. Wiemann. (1990).
Changes in fine structure and polypeptide pattern during development of *Holospora obtusa*, a bacterium infecting the macronucleus of *Paramecium caudatum*.
J. Bacteriol. **172**:5664-5669.
- Görtz, H.-D., and T. Brigge. (1998).
Intracellular bacteria in protozoa.
Naturwissenschaften 85(8):358-368.
- Görtz, H.-D., Benting, J., Freiburg, M., Wiemann, M. and S. Fokin (1992a).
The Infection of the Nuclei of Paramecia by *Holospora* Bacteria.
Endocytobiology V, 509-514. (editors: S. Sato, M. Ishida and H. Ishikawa)
- Hackstein, J. H. and G. D. Vogels. (1997).
Endosymbiotic interactions in anaerobic protozoa.
Antonie Van Leeuwenhoek, **71**(1-2):151-158.
- Hafkine, M. W. (1890).
Maladies Infectieuses des Paramecies.
Ann. Inst. Pasteur **4**:148-162.

- Han, Y. W., Shi, W., Huang, G. T., Kinder Haake, S., Park, N. H., Kuramitsu, H., and R. J. Genco. (2000). Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect. Immun.* **68**(6):3140-3146.
- Harrison, D. N., Dorsey, C. H., and C. A. Brown. (1976a). Studies on a macronuclear endosymbiont of *Spirostomum ambiguum*. II. Ultrastructural comparison of the in situ and the cultivated endosymbiont. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **95**(4):565-568.
- Harrison, D. N., Dorsey, C. H., Finley, H. E. (1976b). Studies on a macronuclear endosymbiont of *Spirostomum ambiguum*. I. Isolation of the microorganism from the macronucleus. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, **95**(4):560-564.
- Heckmann K., and H.-D. Görtz. (1991). Procaryotic symbionts of ciliates. In: Balows A., Truper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer, K. H. (eds.): The procaryotes, 2nd edition, pp. 223-224. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hentschel, U., M. Steinert and J. Hacker. (2000). Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trends Microbiol.* **8**(5):226-231.
- Henze, K., et al. (1995). A nuclear gene of eubacterial origin in *Euglena gracilis* reflects cryptic endosymbioses during protist evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**(20):9122-9126.
- Heukeshoven, J., R. Dernick, and B. J. Radola, (Hrsg.). (1986). In: *Elektrophorese-Forum* '86; pp. 22-27.
- Horn, M., M. Wagner, K. D. Müller, E. N. Schmid, T. R. Fritsche, K. H. Schleifer, and R. Michel (2000). *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology* **146**:1231-1239.
- Isberg, R. R., Z. Hamburger, and P. Dersch. (2000). Signaling and invasion-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes Infect.* **2**:793-801.
- Innis, M. A., K. B. Myambo, D. H. Gelfand, and M. D. Brown. (1988). DNA Sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:9436-9440.
- Johnson, G. D., and G. M. de C. Nogueira Araujo. (1981). A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J. Immunol. Meth.* **43**: 349-350.

- Jouquand, S., A. Cheron, and F. Galibert. (1999).
Microsatellite analysis using a two-step procedure for fluorescence labeling of PCR products.
Biotechniques **26**:902-905.
- Kerr, J. R. (1999).
Celladhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection.
Mol. Pathol., **52**(4):220-230.
- King, E. O., M. K. Ward, and E. De Raney. (1954).
Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescin.
J. Lab. Clin. Med. **44**:301-307.
- Kodama, M, T. Ogata, S. Sakamoto, S. Sato, T. Honda, and T. Miwatani. (1990).
Production of paralytic shellfish toxins by a bacterium *Moroxella sp.* Isolated from *Protogonyaulax tamarensis*.
Toxicon **28**:707-714.
- Kokorin, I. N. (1968).
Biological peculiarities of the development of *rickettsiae*.
Acta Virol. **12**:31-35.
- Kuhn, M., and W. Goebel. (2000).
Internalization of *Listeria monocytogenes* by nonprofessional and professional phagocytes.
Subcell. Biochem. **33**:411-436.
- Kwaik, Y. A. (1996).
The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum.
Appl. and Environ. Microbiol. **62**:2022-2028.
- Kwaik, Y. A., Venkataraman, C., Harb, O. S., Gao, L. Y. (1998).
Signal transduction in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* upon attachment and invasion by *Legionella micdadei*.
Appl. Environ. Microbiol. **64**:3134-3139.
- Kwaik, Y. A. (2000).
Invasion of mammalian and protozoan cells by *Legionella pneumophila*.
Subcell Biochem **33**:383-410.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle. (1982).
A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.
J Mol Biol. **157**:105-32.
- Lamont, R. J. and H. F. Jenkinson. (2000).
Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*.
Oral Microbiol. Immunol. **15**(6):341-349.
- Laemmli, U.K. (1970).
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**:680-685.

Lehmann, H. (1997).

Untersuchungen zu infektionsrelevanten Proteinen and Genen von *Holospira obtusa*, einem intrazellulären Bakterium in *Paramecium caudatum*.

Dissertation, Universität Stuttgart, Zoologisches Institut.

Lorenzen, D. R., D. Gunther, J. Pandit, T. Rudel, E. Brandt, and T. F. Meyer. (2000).

Neisseria gonorrhoeae porin modifies the oxidative burst of human professional phagocytes.

Infect. Immun. **68**:6215-6222.

Margulis, L. (1976).

Genetic and evolutionary consequences of symbiosis.

Exp. Parasitol. **39**(2):277-349.

Margulis, L. (1971).

Symbiosis and evolution.

Sci. Am. **225**(2):48-57.

Matsudaira, P. (1987).

Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes.

J. Biol. Chem. **262**:10035.

Michel, R., Hoffmann, R., Giese, A., and K. D. Mueller. (1995).

Prevalence of *Acanthamoebae*, *Naegleriae* and Other Free-living Amoebae in the Course of Water Treatment in Three Well Waterworks.

Acta Hydrochimica et Hydrobiologica **23**:202-211.

Meyer, E. (1992).

Isolation and Charakterisierung von Phagosomen bei *Paramecium caudatum*.

Diplomarbeit, Universität Münster, Fachbereich Biologie.

Moulder, J. W. (1985).

Comparative biology of intracellular parasitism.

Microbiol. Rev. **49**:298-337.

Mullis, K. B., F. Fallona, S. Scharf, R. Saiki, G. T. Horn, and H. A. Ehrlich. (1986).

Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction.

Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. **51**:263-273.

Murphy, G., and E. S. Ward. (1989).

Sequencing of double-stranded DNA.

In: Nucleic acids sequencing: a practical approach.

Hrsg.: Howe, C. J., Ward, E. S., IRL Press, Oxford University Press, Oxford, pp. 99-115.

Murray, V. (1989).

Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction.

Nucleic Acids Research **17**:8889.

- Neuhoff, V., R. Stamm, I. Pardowitz, N. Arold, W. Ehrhardt, and D. Taube. (1990).
Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution.
Electrophoresis **11**:101-117.
- Newman, S. L. (1999).
Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum*.
Trends Microbiol. **7**:67-71.
- Nielsen, H., and A. Krogh. (1998).
Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model.
In: Proceedings of the 6th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6), AAAI Press, Menlo Park, California, 122-130.
- Ober, Birgit. (1989).
Cytochemische Untersuchungen zur Infektion von Paramecien mit *Holospira obtusa*.
Diplomarbeit Wilhelms-Universität Münster
- O'Farrell, P.H. (1975).
High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.
J. Biol. Chem. **250**(10):4007-4021.
- Ossipov, D. V., and S. A. Podlipaev. (1977).
Electron microscopic examination of early stages of infection of *Paramecium* by bacterial symbionts of the macronucleus (Jota-particles).
Acta Protozool. **16**:289-308.
- Ossipov, D. V., Skoblo, I.I., and M.S. Rautian. (1975).
Iota-particles, Macronuclear Symbiotic Bacteria, of Ciliate *Paramecium caudatum* Clone M-115.
Acta Protozool. **14**:263-280.
- Peterson, M. G. (1988).
DNA sequencing using *Taq* polymerase.
Nucleic Acids Research **16**:10915.
- Platt-Rohloff, L. (1997).
Untersuchungen an bakteriellen Endosymbiosen in neu isolierten Ciliaten aus marinen and aus Brackwasser-Biotopen.
Dissertation, Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie.
- Pond, F. R., Gibson. I., Lalucat, J., and R. L. Quackenbush. (1989).
R-body-producing bacteria.
Microbiol. Rev. **53**(1):25-67.
- Preer, J. R. (1969).
Alpha, an infectious macronuclear symbiont of *Paramecium aurelia*.
J. Protozool. **16**:570-578.
- Preer, J. R., Jr., and L. B. Preer. (1982).
Revival of names of protozoan endosymbionts and proposal *Holospira caryophila* nom. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol. **32**:140-141.

- Preer, J. R., Jr., and L. B. Preer. (1984).
Endosymbionts of Protozoa:
In: N. R. Krieg (ed.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1):795-813.
Williams & Wilkins Baltimore, London.
- Preer, J. R., Jr., L. B. Preer, and A. Jurand. (1974).
Kappa and other endosymbionts in *Paramecium aurelia*.
Bacteriol. Rev. **38**:113-163.
- Raina S, and D. Missiakas. (1997).
Making and breaking disulfide bonds.
Annu. Rev. Microbiol. **51**:179-202.
- Reynolds, E. (1963).
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J. Cell. Biol. **17**:208-212.
- Rouquette, C., and P. Berche. (1996).
The pathogenesis of infection by *Listeria monocytogenes*.
Microbiologia **12**:245-258.
- Russell, D. G. (2001).
Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2**(8):569-577.
- Saiki, R., S. Scharf, F. Fallona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Ehrlich, and N. Arnheim. (1985).
Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science **230**:1350-1354.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989).
Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. (1977).
DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5463-5467.
- Schachter, J. (1988).
The intracellular life of Chlamydia.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **138**:109-139.
- Schaechter, M., F. M. Bozeman, and J.E. Smadel. (1957).
Study on the growth of *Rickettsia*. II. Morphological observations of living *Rickettsiae* in tissue culture cells.
Virology **3**:160-172.
- Schlegel, H. G. (1985).
Allgemeine Mikrobiologie.
14. Abbau von Naturstoffen, pp. 402ff.

- Schmidt, H. J., M. Freiburg, and H.-D. Görtz. (1987).
Comparisons of the infectious forms of two bacterial endonucleobionts, *Holospira elegans* and *Holospira obtusa*, from the ciliate *Paramecium caudatum*.
Microbios **49**:189-197.
- Schorey, J.S., M.C. Carroll, and E.J. Brown. (1997).
A macrophage invasion mechanism of pathogenic *mycobacteria*.
Science **277**:1091-1093.
- Schwarz, S. (1996).
Untersuchung der Telomerase-RNA-Gene von *Paramecium caudatum*.
Diplomarbeit, Universität Stuttgart, Biol. Institut, Abt. Zoologie, pp. 21-32.
- Skoblo, I. I., and N. A. Lebedeva. (1985).
Infection of the nuclear apparatus of *Paramecium bursaria* (ciliata) by the symbiotic bacteria *Holospira curviuscula*.
Cytologica **28**:367-372.
- Skoblo, I. I., O. N. Borchsenius, N. A. Lebedeva, and D. V. Ossipov. (1985).
A new species of symbiotic bacteria of *Paramecium bursaria*, ciliophora, protozoa.
Cytologica **27**:1292-1297.
- Skovorodkin, I. N., S. I. Fokin, and M. Fujishima. (2001).
Fates of the Endonuclear Symbiotic Bacteria *H. obtusa* and *H. undualta* Injected into the Macronucleus of *P. caudatum*.
Europ. J. Protistol. (in press).
- Smith, K. T., C. M. Long, B. Bowman, and M. M. Manos. (1990).
Using cosolvents to enhance PCR amplification.
Amplifications, A forum for PCR users **5**:16-17.
- Solomon, J. M., Rupper, A., Cardelli, J. A., and R. R. Isberg. (2000).
Intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions.
Infect. Immun. **68**:2939-2947.
- Springer, N., W. Ludwig, R. Amann, H. J. Schmidt, H.-D. Görtz, and K. H. Schleifer. (1993).
Occurrence of fragmented 16S rRNA in an obligate bacterial endosymbiont of *Paramecium caudatum*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:9892-9895.
- Spurr, A. R. (1969).
A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.
J. Ultrastructure Res. **26**:31-43.
- Steinert, M., U. Hentschel, and J. Hacker. (2000).
Symbiosis and pathogenesis: evolution of the microbe-host interaction.
Naturwissenschaften **87**(1):1-11.

- Stenzel, D. J., and P. F. Boreham. (1994).
Bacteria-like endosymbionts in *Blastocystis sp.*
Int. J. Parasitol., **24**(1):147-149.
- Struhl, K., J. A. Smith, J. G. Seidmann, D. D. Moore, R. E. Kingston, R. Brent, and F. Ausubel. (1987).
Current Protocols in Molecular Biology. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School;
Wiley & Sons, New York.
- Su, H., N. G. Watkins, Y. X. Zhang, and H. D. Caldwell. (1990).
Chlamydia trachomatis-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as
an adhesin.
Infect. Immun. **58**:1017-1025.
- Stryer, L. (1988).
Biochemie, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, 752-753.
- Taylor, F.J. (1979).
Symbioticism revisited: a discussion of the evolutionary impact of intracellular symbioses.
Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **204**:267-286.
- Tindall, K. R., and T. A. Kunkel. (1988).
Fidelity of synthesis by *Thermus aquaticus* DNA Polymerase.
Biochemistry **27**:6008-6013.
- Venkataraman, C., J. Haack, S. Bondada, and Y. AbuKwaik. (1997).
Identification of a Gal/GalNAc Lektin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential
receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium.
J. Exp. Med. **186**:537-547.
- Wiemann, M. (1990).
Cytologische, immuncytochemische und proteinbiochemische Untersuchungen zur Infektion von
Paramecium caudatum mit *Holospira obtusa*. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität
Münster.
- Wiemann, M. (1989).
The release of *Holospira obtusa* from *Paramecium caudatum* observed with a new device for
extended *in vivo* microscopy.
J. Protozoology **36**:176-179.
- Wiemann, M. and H. D. Görtz. (1991).
Identification and localization of major stage-specific polypeptides of infectious *Holospira obtusa*
with monoclonal antibodies.
J. Bacteriol. **173**(15):4842-4850.
- Wu, D. Y., L. Uggozzoli, B. K. Bak, J. Qian, and B. Wallace. (1991).
The temperature effect and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of
amplification by the polymerase chain reaction.
DNA and Cell Biology **10**:233-238.

Yamada, Y., H. Saito, H. Tomioka, and J. Jidoi. (1987).

Relationship between the susceptibility of various bacteria to active oxygen species and to intracellular killing by macrophages.

J. Gen. Microbiol. **133**:2015-2021.

Zychlinsky, A., M. C. Prevost, and P. J. Sansonetti. (1992).

Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages.

Nature **358**:167-169.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Görtz für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit. Durch seine großzügige Unterstützung und zahlreichen Anregungen hat er wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Robin Gosh danke ich für die Übernahme des Mitberichts, die kritische Durchsicht des Manuskripts und die Hilfe bei der Interpretation von DNA- und Aminosäuresequenzen.

Den Herren Dr. Joachim Brenner, Dr. Theo Brigge, Dr. Thomas Frischmuth und Dr. Michael Schweikert danke ich für die ausdauernde und qualifizierte Hilfe in Sachen *Laser Scanning* Mikroskopie, Molekularbiologie und Elektronenmikroskopie.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Elke Ehram, für die hervorragende Zusammenarbeit und ihre Anregungen zur Proteinbiochemie, die einen wichtigen Beitrag zum Gelingen der Arbeit darstellten.

Allen Mitgliedern der Abteilung Zoologie möchte ich meinen Dank aussprechen für die eine schöne Zeit guter Zusammenarbeit und anregender Diskussionen. Besonders Frau Marion Dülz, Frau Dagmar Biegger und Frau Stefanie Jauch sei ein Dank ausgesprochen für ihre professionelle und fachliche Hilfe.

Weiterer Dank sei den Mitgliedern der Abteilung Biophysik und der Abteilung Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen ausgesprochen, die sich durch Hilfsbereitschaft, Fachkompetenz und Humor auszeichneten.

Außerdem bedanke ich mich bei allen, die in irgendeiner Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und hier nicht namentlich genannt sind.

Nicht zuletzt gilt mein tiefer Dank meiner Frau, meiner Mutter und meiner Schwester, die mir mit Verständnis und Unterstützung stets zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Steffen Michael Schwarz
 Geboren am: 9. Februar 1968
 Geboren in: 71032 Böblingen

Ausbildung

Jan 2001 – Mai 2002	Sparkasseninformatik GmbH, Mitarbeiter im Sparkassen Service
März 1996 - Dez 2000	Arbeiten an der Dissertation in der Abteilung Zoologie, Biologisches Institut der Universität Stuttgart (Betreuer: Prof. Dr. H.-D. Görtz)
Okt. 1989 - Feb. 1996	Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart Abschluss: Diplom Biologe (t.o.)
Juli 1988 - Sept. 1989	Wehrdienst; 2. Kp./ FschJgBtl. 251, Calw
Sept. 1985 - Juni 1988	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am Haushalts- und Ernährungswissenschaftlichen Gymnasium der Mildred-Scheel-Schule / Böblingen
Sept. 1978 - Juli 1985	Max-Planck-Gymnasium, Böblingen
Sept. 1974 - Juli 1978	Eichendorff Grund- und Hauptschule, Böblingen

Praktische Tätigkeiten

Mrz. 1996 – Dez. 2000	Wissenschaftlicher Angestellter am Biologischen Institut der Universität Stuttgart
Mrz. 1995 – Feb. 1996	Geprüfte wissenschaftliche Hilfskraft, Abt. Biophysik und Abt. Zoologie, Biologisches Institut der Universität Stuttgart.