

**Der Nachweis eines
Typ IV Sekretionssystems
in Wolbachien aus *Brugia malayi***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Anne Mechtild Belting

aus Bergisch Gladbach

2016

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Achim Hörauf
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Tanja Schneider

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.04.2016

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie
Direktor: Prof. Dr. med. Achim Hörauf

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	9
2.	Einleitung	12
2.1	Filariosen.....	12
2.1.1	<i>Brugia</i> -Filariosen	14
2.2	<i>Wolbachia</i> - Endosymbionten der Filarien.....	15
2.2.1	Endosymbiose zwischen Wolbachien und <i>B. malayi</i>	16
2.2.2	Histologische Lokalisation der Wolbachien in <i>B. malayi</i>	17
2.2.3	Wolbachien als Ziel einer medikamentösen Therapie der Filariosen	20
2.3	Das Typ 4 Sekretionssystem.....	21
2.3.1	Komponenten des T4SS aus <i>A. tumefaciens</i>	22
2.3.2	Aufbau des T4SS und exemplarischer Ablauf des Substrattransports in Gram-negativen Bakterien.....	23
2.3.3	Genetische Organisation des T4SS in <i>A. tumefaciens</i>	25
2.4	Das T4SS in Wolbachien.....	26
2.4.1	Genetische Organisation des T4SS in Wolbachien aus <i>B. malayi</i>	27
2.5	Ziele der Arbeit	29
3.	Material und Methoden	30
3.1	Material.....	30
3.1.1	Reaktionskits	30
3.1.2	Chemikalien.....	30
3.1.3	Enzyme	32
3.1.4	<i>E. coli</i> Bakterienstämme.....	32
3.1.5	Plasmide.....	33
3.1.6	Nährmedien.....	33
3.1.7	Erworbene Puffer	34

3.1.8	Sonstige Puffer	34
3.1.9	Antikörper	36
3.1.10	Würmer.....	36
3.2	Methoden	37
3.2.1	DNA Extraktion aus <i>B. malayi</i>	37
3.2.2	RNA Extraktion aus <i>B. malayi</i>	38
3.2.3	cDNA Synthese	39
3.2.4	Transkriptionsanalyse.....	40
3.2.5	Klonierung, Expression und Aufreinigung von VirB4	42
3.2.6	Optimierte VirB4 Aufreinigung im Rahmen der Phosphatassays	48
3.2.7	Nukleotidhydrolyse durch VirB4	50
3.2.8	Histologie.....	52
4.	Ergebnisse	56
4.1	Transkriptionsanalyse.....	56
4.1.1	Transkription der T4SS Komponenten	57
4.1.2	Polycistronische Transkription des T4SS	58
4.1.3	Co-Transkription des T4SS mit Oberflächenproteinen	59
4.1.4	T4SS in Wolbachien anderer Filarienspezies.....	59
4.2	Expression und Standardaufreinigung von rekombinantem VirB4	61
4.2.1	Bradford Assay	61
4.2.2	Nachweis von rekombinantem VirB4.....	62
4.2.3	Optimierte Aufreinigung von rekombinantem VirB4.....	64
4.3	ATPase Aktivität von VirB4.....	66
4.3.1	Ergebnis der Datenbankanalyse eines Walker A Bindungsmotivs in VirB4... 66	
4.3.2	Phosphatassays	66
4.4	Translationsnachweis von VirB10 aus <i>wBm</i> in vivo.....	69

4.4.1	Histologischer Nachweis von VirB10.....	69
4.4.2	Ergebnis der Datenbankanalyse einer Ähnlichkeit zwischen VirB10 aus <i>wBm</i> und VirB10 aus <i>A. tumefaciens</i>	69
4.4.3	Ergebnis der Datenbankanalyse einer Ähnlichkeit zwischen VirB10 aus <i>wBm</i> und Proteinen aus <i>B. malayi</i>	69
4.4.4	APAAP-Färbung Längsschnitte.....	70
4.4.5	Färbeartefakte.....	73
5.	Diskussion	75
5.1	Genexpression des T4SS in Wolbachien aus <i>B. malayi</i>	75
5.1.1	Komponenten des T4SS in <i>wBm</i>	75
5.1.2	Die Bedeutung mehrerer VirB6 Komponenten für das T4SS in <i>wBm</i>	76
5.1.3	Polycistronische Transkription des T4SS.....	77
5.1.4	Das T4SS in Wolbachien verschiedener Filarienarten.....	79
5.2	Co-Transkription des T4SS mit Oberflächenproteinen.....	80
5.3	<i>In vitro</i> Funktionalitätsanalyse.....	81
5.3.1	Optimierung der Expression und Aufreinigung von VirB4.....	81
5.3.2	Funktionalität von rekombinantem VirB4 <i>in vitro</i>	83
5.4	<i>In vivo</i> Expression des T4SS.....	84
5.4.1	Histologische Detektion von VirB10 in <i>B. malayi</i>	84
5.4.2	Färbeartefakte.....	86
5.5	Die Bedeutung des T4SS als potentiell Ziel einer medikamentösen Therapie der Filariose.....	88
6.	Zusammenfassung	91
7.	Anhang	92
7.1	Primerdaten.....	92
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	95

7.3	Tabellenverzeichnis.....	96
8.	Literaturverzeichnis	97
9.	Danksagung.....	105

1. Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
APAAP	alkalische Phosphatase – anti-alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
Bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
DEC	Diethylcarbamazin
cDNA	komplementäre DNA
gDNA	genomische DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fab	Fragment Antigen Binding
g	Gramm
G	Gravitationskonstante
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HF	High Fidelity
His-tag	Histidin Anhang
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
l	Liter
LB-Medium	Luria Broth Medium
LOD	Limit of Detection
M	Molar

mA	Milliampere
MDA	Mass Drug Administration
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
Mpf	Mating Pair Formation
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NTA	Nitroltriessigsäure
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (Revolutions per Minute)
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS-PAGE	Sodium- Dodecyl- Sulfate Polyacrylamid- Electrophoresis
SOC -Medium	Super Optimal Broth Medium
T4CP	Typ 4 Coupling Protein
T4SS	Typ 4 Sekretionssystem
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -Polymerase
TBE-Puffer	Tris-Borat EDTA Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	Tetramethylendiamin
TLR	Toll-Like Rezeptor
U	Unit
UV	Ultraviolettstrahlung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
V	Volt
WSP	<i>Wolbachia</i> Surface Protein

2. Einleitung

2.1 Filariosen

Eine Infektion mit parasitären Rundwürmern wird Filariose genannt. Zu den Filarien, „Fadenwürmern“, gehören die Familien der *Filariidae* und *Onchocercidae*, welche im Menschen verschieden lokalisiert sind und jeweils unterschiedliche Krankheitsbilder auslösen.

Die Gruppe der *Onchocercidae* besteht aus den Arten *Loa Loa* (*L. loa*), *Onchocerca volvulus* (*O. volvulus*) und *Mansonella perstans* (*M. perstans*). Sie sind hauptsächlich im subkutanen oder peritonealen Bindegewebe lokalisiert. Bei einer chronischen Infektion mit der Filarie *Onchocerca volvulus* entwickelt sich das Krankheitsbild der Onchozerkose. Die adulten Würmer leben in subkutanen Bindegewebsknoten und die Weibchen entlassen ihre Nachkommen, genannt Mikrofilarien, in das umliegende Gewebe. Dabei können die Mikrofilarien unter anderem auch in das Augengewebe einwandern. Sterben Mikrofilarien bei diesem Prozess im Gewebe, kommt es zu immunologischen Vorgängen, die oft eine schwere ophthalmologische und dermatologische Symptomatik auslösen. Der Überträger der Onchozerkose ist die Kriebelmücke. Sie ist bei ihrer Eiablage an fließende Gewässer gebunden, sodass die Onchozerkose im Wesentlichen auf die Bewohner von Flussgebieten beschränkt ist. Die mit der Onchozerkose einhergehende Sichtbeeinträchtigung und Erblindung wird daher auch „Flussblindheit“ genannt. Weltweit sind etwa 37 Millionen Menschen in 34 Ländern aus Afrika und Südamerika an einer Onchozerkose erkrankt (Basáñez et al., 2006). Im Jahr 2012 sind alleine in 27 afrikanischen Ländern 130 Millionen Menschen gefährdet, eine Onchozerkose zu entwickeln (WHO, 2014)

Eine Infektion mit den Filarien *Brugia malayi* (*B. malayi*), *Brugia timori* (*B. timori*) und *Wuchereria bancrofti* (*W. bancrofti*) führt hingegen zu einer Infektion der Lymphknoten und Lymphgefäße. Diese Ausprägung wird lymphatische Filariose genannt. Schätzungen aus dem Jahre 2012 gehen davon aus, dass weltweit 120 Millionen Menschen aus 73 Ländern mit einer Lymphatischen Filariose infiziert sind; weltweit leben 1,403 Milliarden Menschen in endemischen Gebieten (WHO, 2013). Die Lymph-

atische Filariose geht mit rezidivierenden Entzündungen des Lymphgefäßsystems, Lymphendothelproliferation und Lymphgefäßdilatation einher. Es schließt sich bei chronischer Infektion der fibrotische Umbau des Lymphgefäßsystems an, der zu einer vollständigen Blockade und einem chronischen Lymphödem führen kann. In seiner extremen Ausprägung kann sich aus dem Lymphödem das Krankheitsbild der Elephantiasis entwickeln (Hörauf und Burchard, 2010) (Abbildung 1).



Abb. 1: Patient mit lymphatischer Filariose. Unterschenkel eines mit *B. malayi* infizierten Patienten, dessen chronisches Lymphödem sich zu einer Elephantiasis entwickelt hat (The Australian Society for Parasitology, 2015)

Bei einer Infektion mit *W. bancrofti* sind zudem oft die Lymphgefäße der Genitalregion betroffen, was zur Hydrozelenbildung beim Mann führen kann. Die Infektion mit *B. malayi* und *B. timori* manifestiert sich dagegen meist an den Lymphgefäßen der Extremitäten, vor allem der Beine.

Filariosen stellen ein ernstes Problem für die Bewohner endemischer Gebiete dar. Die Beeinträchtigung und Krankheitsrate von Patienten mit lymphatischer Filariose und Onchozerkose haben sowohl wirtschaftliche, als auch gesellschaftliche Auswirkungen.

Im Jahr 2003 waren 150 Millionen Menschen weltweit durch Filariosen beeinträchtigt, dennoch gehören die Filariosen bis heute zu den vernachlässigten Tropenerkrankungen (Kyelem et al., 2003; Addiss, 2010).

2.1.1 *Brugia*-Filariosen

Die durch die Filarie *B. malayi* ausgelöste Form der Filariose wird als *Brugia*-Filariose bezeichnet. Die Filarie *B. malayi* ist in Süd-, Südost- und Ostasien sowie im westlichen Pazifikraum endemisch (Hörauf und Burchard, 2010). Die adulten männlichen Würmer können eine Länge von 2,2 cm, adulte weibliche Würmer bis zu 55 mm erreichen (Pschyrembel, 2004). Zum Verständnis der Krankheit ist es wichtig, den Lebenszyklus von *B. malayi* zu kennen. Dieser besteht aus zwei Lebensphasen. Eine Phase findet in der krankheitsübertragenden Mücke, auch Zwischenwirt genannt, statt, die zweite im Menschen.

Durch infizierte Mosquitos werden infektiöse L3-Larven vom Zwischenwirt auf den Menschen als Endwirt übertragen. Innerhalb des Lymphgefäßsystems des menschlichen Wirtes reifen die L3-Larven zu adulten Filarien heran. Durch die Lokalisation innerhalb des Lymphgefäßsystems kann es dann zur Entwicklung des Krankheitsbildes der lymphatischen Filariose kommen. Der Lebenszyklus setzt sich in der Vermehrung der Filarien fort. Die adulten weiblichen Würmer gebären Larven, sogenannte Mikrofilarien, welche in das Blutgefäßsystem einwandern. Die sich in der Blutbahn befindenden Mikrofilarien können nun bei der nächsten Blutmahlzeit durch den Zwischenwirt aufgenommen werden. Im Zwischenwirt reifen die Mikrofilarien vom L1-Stadium über zwei Häutungen zum infektiösen L3-Stadium heran, wandern in die Kopfkapsel des Zwischenwirtes und werden während eines Saugaktes auf den Menschen übertragen. Somit schließt sich der Lebenszyklus von *B. malayi* (Abbildung 2).

Auch in Gliederfüßern sind Endosymbiosen mit Wolbachien bekannt. Bei den Gliederfüßern hat die Endosymbiose jedoch einen parasitären Charakter. Die Wolbachien beeinflussen die Fortpflanzung ihres Wirtes dahingehend, dass vermehrt weibliche Nachkommen geboren werden. So können sie ihre maternale Übertragung verstärken (Werren, 1997). In Filarien hingegen sind sie von großem Nutzen für ihren Wirt. Sie sind unabdingbar für die Fertilität der Weibchen und das Überleben der Larven (Bandi et al., 2001; Hoerauf et al., 2000; Taylor et al., 2005; Taylor und Hoerauf, 1999).

2.2.1 Endosymbiose zwischen Wolbachien und *B. malayi*

Wolbachien und ihr Wirt *B. malayi* besitzen eine Wechselbeziehung, in der keiner der Partner ohne einander überleben kann. Eine Depletion der Wolbachien sterilisiert weibliche Würmer und führt langfristig zum Tod adulter Filarien (Scott et al., 2012). Auffällig ist, dass im Genom der Wolbachien aus *B. malayi* Gene für Proteine einiger Stoffwechselwege nicht vorhanden sind. Eine Reduzierung derartiger Gene wird häufig in den Genomen von Endosymbionten beobachtet (Scott et al., 2012). Vergleichende Analysen der Genome von Wolbachien und *B. malayi* haben ermöglicht, potentielle biochemische Prozesse zu identifizieren, die zur Symbiose zwischen Wolbachien und *B. malayi* beitragen. So konnten die kompletten Synthesewege für Riboflavin, Flavin Adenin Dinukleotide (FAD), Häm sowie Purin und Pyrimidin in Wolbachien aus *B. malayi* nachgewiesen werden (Foster et al., 2005). Im Genom von *B. malayi* sind diese Synthesewege nicht, oder nur anteilig vorhanden (Ghedini et al., 2007). Fenn und Blaxter (2006) postulierten, dass Wolbachien ihren Wirt mit Riboflavin, FAD, Häm, Purin- und Pyrimidin sowie Glutathion versorgen. Diese Substanzen sind wichtig als Co-Enzyme, in der Steroidhormonsynthese, beim Schutz vor oxidativem Stress und zur Auffüllung der Wirtsvorräte an Nukleotiden. Fallen diese Substanzen durch eine Depletion der Wolbachien weg, können adulte Würmer nur unzureichend heranreifen (makrofilarizide Effekte) und die Embryogenese und Mikrofilarienproduktion werden blockiert (mikrofilarizide Effekte) (Hoerauf et al., 1999). Mikrofilarizide Effekte könnten beispielsweise durch die Unterbrechung des Nukleotidtransfers erreicht werden. Foster et al. (2005) nehmen an, dass die Versorgung von *B. malayi* mit den Nukleotiden Purin und Pyrimidin besonders zu Zeiten einer erhöhten Zellteilung und DNA-Replikation während der Oogenese und Embryogenese wichtig ist. Dies könnte unter anderem den

Effekt einer Wolbachien-Depletion auf die Fortpflanzung der Filarien erklären.

Die Depletion von Wolbachien führt außerdem zur Beeinträchtigung vieler Stoffwechselprozesse der Filarien, die im Zusammenhang mit einem Häm-Mangel stehen. In einer Studie mit dem Inhibitor der Hämsynthese in Wolbachien aus *B. malayi*, N-Methyl Mesoporphyrin (NMMP), konnten Effekte auf die Beweglichkeit von adulten Filarien und Mikrofilarien *ex vivo* gezeigt werden (Hotopp et al., 2006; Wu et al., 2009). Des Weiteren wurde nach Depletion von Wolbachien eine Hochregulierung von mitochondrialen Genen in *B. malayi* beobachtet, die für Häm-abhängige Komplexe der Atmungskette stehen (Lentz et al., 2013; Strübing et al., 2010).

Sehr wahrscheinlich findet der Stoffaustausch in beide Richtungen statt, sodass Wolbachien sowohl Substanzen sezernieren als auch aufnehmen können. Die Stoffwechselwege zur Synthese von NAD, Biotin, Lipoat, Ubiquinon, Folsäure, Co-Enzym A und fast aller Aminosäuren sind nämlich im Wesentlichen nur im Genom von *B. malayi* kodiert (Slatko et al., 2010). Eine Bereitstellung von Aminosäuren könnte demnach durch *B. malayi* erfolgen, da Wolbachien ausschließlich in der Lage sind, eine einzige Aminosäure selbst zu synthetisieren (Foster et al., 2005). Ein wechselseitiger Austausch von Substanzen, die entweder *B. malayi* oder Wolbachien nicht selbst synthetisieren können, lässt sich postulieren.

2.2.2 Histologische Lokalisation der Wolbachien in *B. malayi*

Im folgenden Kapitel wird die histologische Lokalisation der Wolbachien in *B. malayi* beschrieben. Da für die histologischen Untersuchungen in dieser Arbeit weibliche *B. malayi* Würmer verwendet wurden, wird nur auf die Verteilung in weiblichen Wurmern eingegangen. Am Querschnitt eines weiblichen *B. malayi* Wurms (vgl. Landmann et al., 2010) sieht man, dass das Körperäußere durch die Cuticula gebildet wird. Von innen liegt ihr die Hypodermis an, die vier nach innen ragende Hypodermalstränge ausbildet. Einen dorsalen Längsstrang mit dem dorsalen Nervenstrang, einen ventralen Längsstrang, welcher den ventralen Nervenstrang enthält und zwei Lateralstränge, die je einen Exkretionskanal enthalten. Dazwischen befinden sich vier Muskelquadranten mit längsausgerichteter Muskulatur. Mittig befindet sich ein Uterusast mit sich entwickelnden

Embryonen, daneben ein angeschnittenes Ovar mit mehreren Eizellen. Im ventralen Anteil liegt der Darm. Das Innere des Wurmes wird Pseudocoel genannt und ist mit Flüssigkeit gefüllt. Die Wolbachien sind in den Lateralsträngen, Eizellen und sich entwickelnden Embryonen nachweisbar.

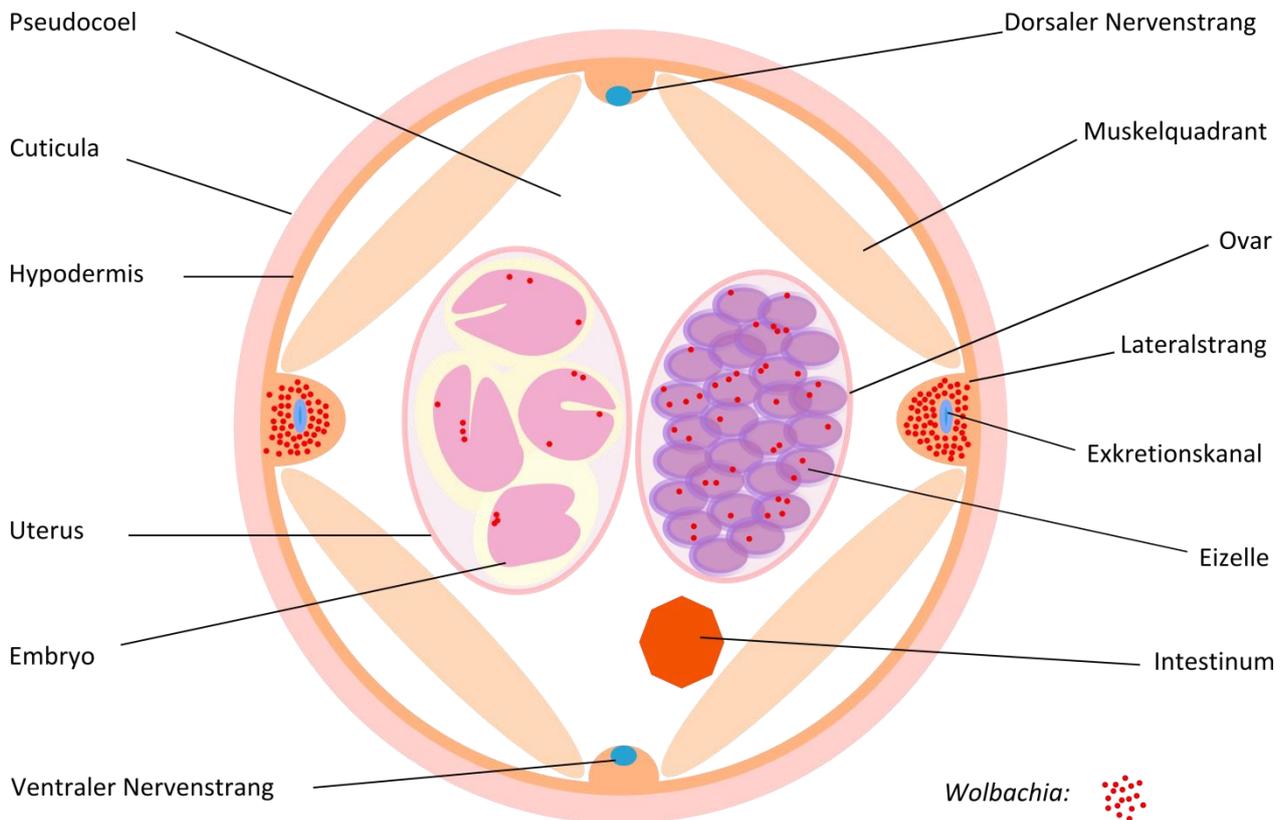


Abb. 3: Querschnitt durch ein adultes *B. malayi* Weibchen. Wolbachien befinden sich in den Lateralsträngen der Hypodermis, in Embryonen im Uterus und in den Eizellen des Ovars. In Darm und Muskulatur lassen sich keine Wolbachien nachweisen (modifiziert nach Landmann et al., 2010).

Im Längsschnitt durch einen adulten weiblichen *B. malayi* Wurm kann die Schichtung der Hypodermis ebenfalls gut nachvollzogen werden (vgl. Fischer et al., 2011). Die äußere Schicht wird durch die Cuticula gebildet. Ihr liegen die Hypodermis und die von ihr ausgebildeten Lateralstränge an. Der Darm ist ebenfalls im Anschnitt enthalten. Er erstreckt sich nahezu über die komplette Länge des Wurmes und lässt sich daher in einem Längsschnitt oft mitdarstellen. Je nach Lage des Anschnittes befinden sich im Inneren des Wurmes die beiden Ovarien oder auch die beiden Uterusäste.

2.2.3 Wolbachien als Ziel einer medikamentösen Therapie der Filariosen

Die Abhängigkeit der Filarien von ihren Endosymbionten machen diese zu einem effektiven Angriffspunkt in der Therapie der Filariosen. In Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Therapie mit Tetracyclinen zur Degeneration und Sterilität der adulten Filarien führt (Hoerauf et al., 1999; Taylor und Hoerauf, 1999). Diese Erkenntnisse konnten auf die Behandlung der humanen Onchozerkose übertragen werden. Der Einsatz von Doxycyclin in der Behandlung der Onchozerkose führt zur Sterilität der adulten Würmer und zu einer verkürzten Lebensdauer der Filarien (Hoerauf et al., 2000; Hoerauf et al., 2001). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von Onchozerkosepatienten über 4 oder 6 Wochen mit 200 mg Doxycyclin pro Tag das Überleben der adulten Würmer deutlich reduziert. Der Effekt auf adulte weibliche Würmer fiel dabei deutlich stärker aus (Hoerauf et al., 2008). Auch in einer niedrigeren Dosis von 100 mg Doxycyclin wurden die gleichen Effekte auf das Überleben der adulten Filarien beobachtet (Hoerauf et al., 2008). In der Therapie der Lymphatischen Filariose lassen sich durch den Einsatz von Doxycyclin ebenfalls positive Ergebnisse erzielen. Studien an Patienten mit Lymphatischer Filariose, ausgelöst durch *W. bancrofti*, zeigten, dass sich unter Doxycyclintherapie die Weite der Lymphgefäße reduzierte und die lymphatische Pathologie besserte. Auch das Überleben der adulten Würmer wurde durch die antibiotische Behandlung beeinflusst (Mand et al., 2009; Debrah et al., 2011).

Lange Zeit wurden Filariosen mit den mikrofilarizid wirkenden Medikamenten Diethylcarbamazin (DEC) oder Ivermectin behandelt. Von einer solchen Behandlung sind nur die Mikrofilarien betroffen, daher muss die Behandlung über Jahre hinweg erfolgen. Dazu werden meist sogenannte jährliche „Massenbehandlungen“ (MDA = Mass Drug Administration) angewandt, an denen alle Bewohner eines endemischen Gebietes teilnehmen sollten. Diese Maßnahme reduziert die Zahl der Mikrofilarianträger und somit auch deren Transmission. Die mikrofilarizide Therapie wird jedoch begleitet von einer systemischen und lokalen Immunreaktion auf sich anhäufende Fremdantigene aus Filarien und Wolbachien. Wolbachien können eine Aktivierung der Toll-like Rezeptor vermittelten angeborenen Immunantwort hervorrufen und tragen so zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion bei (Cross et al., 2001; Hörauf und Burchard, 2010; Keiser et al.,

2002). Greift man nun zu Medikamenten, die eine Depletion der Endosymbionten zum Ziel hat, werden mehrere Vorteile im Vergleich zur herkömmlichen Therapie vereint. Unter der Therapie mit dem bakteriostatisch wirkenden Doxycyclin sterben adulte Filarien und Mikrofilarien langsamer ab, was das rapide Anschwellen von Fremdantigenen verhindert. Bei Patienten, die an einer lymphatischen Filariose erkrankt sind, führt der Einsatz von Doxycyclin zur Reduktion der urogenitalen Pathologie und des Lymphödems. Gleichzeitig kann eine durch Wolbachien und Wolbachien-Produkte ausgelöste inflammatorische Nebenwirkung der Behandlung reduziert werden (Taylor et al., 2010). Diese Erkenntnisse sprechen für den Einsatz von Antibiotika in der Behandlung der Filariosen und untermauern die Rolle der Wolbachien in der Pathogenese der Erkrankungen. Ein neuer Therapieansatz könnte eine Blockade des Stoffaustausches innerhalb der Endosymbiose sein. In vielen Bakterien wird für den Stoffaustausch ein Sekretionssystem verwendet, so möglicherweise auch in Wolbachien aus *B. malayi*. Im Genom der Wolbachien aus *B. malayi* konnten unter anderem Gene für ein funktionsfähiges Typ 4 Sekretionssystem entdeckt werden. Untersuchungen, ob dies exprimiert und translatiert wird, sind Gegenstand dieser Arbeit.

2.3 Das Typ 4 Sekretionssystem

Für die symbiotische Beziehung zwischen Wolbachien und ihrem Wirt ist ein wechselseitiger Stoffaustausch von großer Bedeutung. Es ist noch nicht verstanden, wie dieser Austausch abläuft. Eine Möglichkeit der Kommunikation und des Substrataustausches innerhalb der Endosymbiose stellt das Typ 4 Sekretionssystem (T4SS) dar. Das T4SS ist ein Proteinkomplex, der die Zellwand von Bakterien durchspannt und darüber den Austausch von DNA und/oder Proteinen zwischen zwei Zellen ermöglicht. Man findet T4SS sowohl in Gram-negativen als auch Gram-positiven und zellwandlosen Bakterien (Alvarez-Martinez und Christie, 2009). Es gibt mehrere Möglichkeiten, T4SS zu unterteilen. Eine gängige Einteilung unterscheidet die T4SS nach ihren Funktionen in drei Gruppen: (1) Konjugationssysteme, (2) Effektor-Translokationssysteme, (3) DNA Aufnahme und Abgabe Systeme. Das bekannteste Beispiel der Konjugationssysteme ist das F-Transfer System aus *Escherichia coli* (*E.coli*). Über dieses System erfolgt ein Austausch genetischen Materials zwischen zwei *E. coli* Bakterienzellen in Form des F-Plasmids. Die zweite Gruppe der T4SS transportieren Effektorproteine und Makro-

moleküle in das Zytosol ihrer Zielzellen. Medizinische Bedeutung haben beispielsweise die Effektor–Translokationssysteme Ptl aus *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) und die VirB Systeme aus *Brucella* Spezies erlangt (Alvarez-Martinez und Christie, 2009). In *B. pertussis* wird das A/B Pertussis Toxin durch ein T4SS in das extrazelluläres Millieu transportiert (Burns, 2003). *Brucella* Spezies benötigen das T4SS, um ihr intrazelluläres Überleben zu sichern und die Infektion aufrecht zu erhalten (Hong et al., 2000; O’Callaghan et al., 1999). Kürzlich wurden die Effektorproteine VceA und VceC identifiziert, die von *Brucella* Spezies über das T4SS in die Wirtszelle transferiert werden (de Jong et al., 2008). Bekannte Vertreter der dritten Gruppe sind das ComB T4SS aus *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) und das *Neisseria gonorrhoeae* gonococcal genetic island (GGI) aus *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*). Über das ComB System kann *H. pylori* DNA aufnehmen, in *N. gonorrhoeae* wird über das T4SS DNA an das extrazelluläre Millieu abgegeben (Cascales und Christie, 2003).

Das T4SS in *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) ist eines der am besten untersuchten T4SS und stellt einen Modellorganismus für die Erforschung von T4SS dar. Durch die Ausbildung eines Pilus kann das T4SS aus *A. tumefaciens* Kontakt zu einer Pflanzenzelle herstellen und über den Translokationskanal DNA in die Pflanzenzelle transferieren. Die so in die Pflanzenzelle gelangte DNA führt zur Ausbildung eines Pflanzentumors, auch genannt „Wurzelhalsgallentumor“ (crown galls disease).

2.3.1 Komponenten des T4SS aus *A. tumefaciens*

Der gesamte Komplex setzt sich aus verschiedenen Proteinen zusammen, die zunächst in zwei Gruppen unterteilt werden können. Proteine, die den Translokationskanal bilden, werden zur Gruppe der Mating Pair Formation (Mpf) Komponenten gezählt (VirB1, VirB2, VirB3, VirB4, VirB5, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9, VirB10, VirB11). Die zweite Gruppe besteht aus einem einzigen Protein, dem T4 Coupling Protein (T4CP), welches das Substrat erkennt und mit dem Translokationskanal interagiert.

Die Mpf-Komponenten lassen sich wiederum nach ihrer Lokalisation innerhalb der Zellwand von *A. tumefaciens* einordnen. Zu den Komponenten der inneren Membran gehören die Proteine VirB3, VirB6, VirB8 und VirB10. Die Gruppe der drei energetischen

Komponenten des T4SS besteht aus den Mpf-Komponenten VirB4 und VirB11 sowie dem T4CP VirD4 und ist ebenfalls an der inneren Zellmembran lokalisiert.

Zu den Untereinheiten des Periplasma und der äußeren Membran gehören VirB1, VirB2, VirB5, VirB7, und VirB9.

Obwohl sich T4SS in ihrer Anzahl an Untereinheiten und deren Zusammensetzung in verschiedenen Bakterien unterscheiden, sind sie doch ähnlich dem T4SS in *A. tumefaciens* aufgebaut.

Anhand des Modellorganismus *A. tumefaciens* soll der Aufbau und Substrattransport des T4SS erläutert werden.

2.3.2 Aufbau des T4SS und exemplarischer Ablauf des Substrattransports in Gram-negativen Bakterien

Der Ablauf des DNA Transportes aus *A. tumefaciens* soll im Folgenden exemplarisch aufgezeigt und Besonderheiten der einzelnen Komponenten des T4SS erläutert werden (Abbildung 5). An der inneren Membran wird das Substrat zunächst über das T4CP VirD4 erkannt, und an VirB11 weitergeleitet. Die energetischen Komponenten des Sekretionssystems VirB4, VirB11 und VirD4, welche die Energie für den Aufbau des Sekretionssystems und Substrattransfer über ATP Hydrolyse zur Verfügung stellen, sind jeweils an der inneren Membran lokalisiert. Gemeinsam koordinieren sie nach der Substraterkennung durch das T4CP die Übergabe des Substrates an VirB6 und VirB8, damit das Substrat über die innere Membran transportiert werden kann. Die Besonderheit der Komponente VirB6 liegt hierbei in einer vermuteten Schlüsselrolle für die Durchlässigkeit des Sekretionskanals. Da sie mit mehreren Transmembrandomänen an der inneren Membran der Bakterienzelle verankert ist und eine große periplasmatische Domäne besitzt, kann sie möglicherweise wichtig sein für eine Substratselektion am distalen Anteil des Sekretionskanals (Jakubowski et al., 2005; Alvarez-Martinez und Christie, 2009).

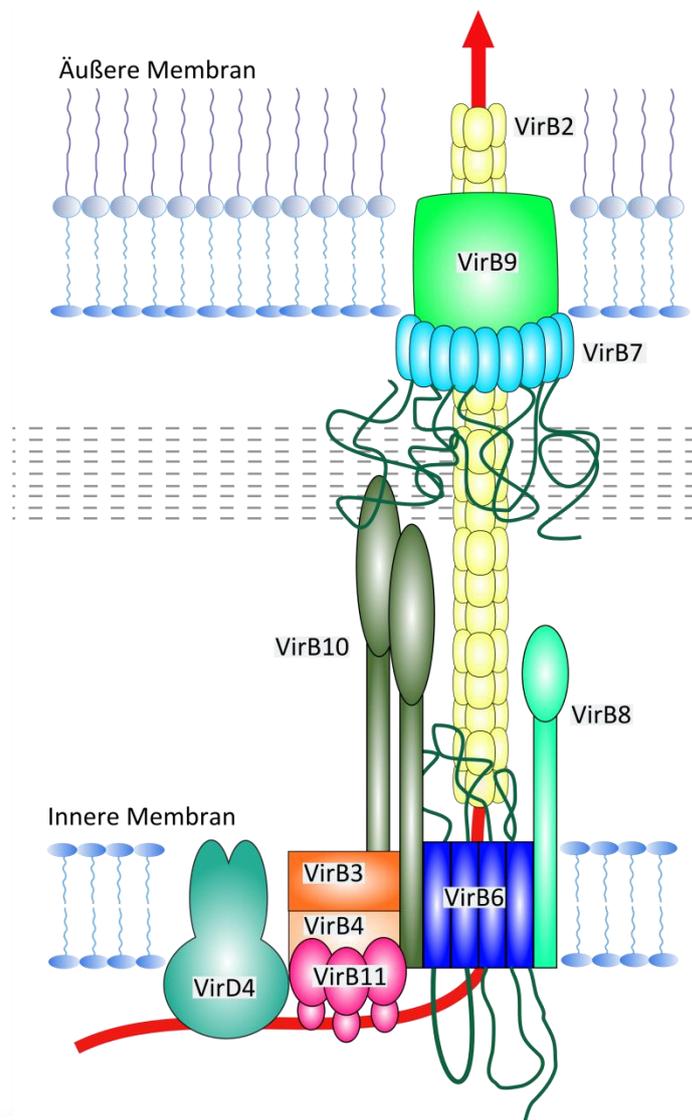


Abb. 5: Aufbau des T4SS aus *A. tumefaciens*. Der Substrattransfer wird durch die rote Linie symbolisiert (modifiziert nach Alvarez-Martinez und Christie, 2009)

Nach Erreichen des zentralen Sekretionskanales wird das Substrat durch den Kanal geschleust. Das Gerüst des Sekretionskanals wird von der Untereinheit VirB10 gebildet und ermöglicht nach ATP-Umsatz der energetischen Untereinheiten über eine Konformationsänderung die Passage des Substrates (Atmakuri et al., 2004; Cascales und Christie 2004b; Jakubowski et al., 2004; Jakubowski et al., 2005). Der zentrale Anteil des Sekretionskanals wird durch die Komponenten VirB7, VirB9 und VirB10 gebildet. Er durchspannt die gesamte Zellwand der Bakterien (Alvarez-Martinez und Christie, 2009). Anteilig besteht der Sekretionskanal aus der Komponente VirB2, welche zugleich den Konjugationspilus ausbildet (Alvarez-Martinez und Christie, 2009). Das

äußere Ende des Sekretionskanals setzt sich aus den Komponenten VirB9 und Vir10 zusammen. Durch VirB7 wird die Komponente VirB9 stabilisiert (Spudich et al., 1996), sie ist aber kein zwingend notwendiger Bestandteil eines funktionsfähigen T4SS (den Hartigh et al., 2008a).

Im letzten Schritt des Substrattransfers ist zur Kontaktaufnahme und Substrattransfer in die Zielzelle die Ausbildung eines Pilus notwendig. Dieser wird von den Untereinheiten VirB2 und VirB5 ausgebildet. Über den Pilus gelangt das Substrat dann in die Zielzelle.

Man vermutet, dass der Transport von Proteinen ähnlich abläuft, jedoch stehen klärende Untersuchungen in diesem Bereich aus.

2.3.3 Genetische Organisation des T4SS in *A. tumefaciens*

Die Gene der Mpf-Untereinheiten liegen im Genom gewöhnlich in einem Operon hintereinander angeordnet. Gene des T4CP und von Proteinen, die die DNA für den Transport prozessieren, sind entweder dem Operon der Mpf-Untereinheiten angegliedert oder bilden ein weiteres Operon. Obwohl es Ausnahmen gibt, zeigen die meisten T4SS in Gram-negativen Bakterien starke Ähnlichkeit mit dem VirB/D4 T4SS des Modellorganismus *A. tumefaciens*. In *A. tumefaciens* liegen die Gene für das T4SS auf dem Ti Plasmid. Die Gene für VirB1 bis VirB11 befinden sich innerhalb eines Operons. Das Gen für VirD4, das Coupling Protein, liegt außerhalb des Operons (Abbildung 6).

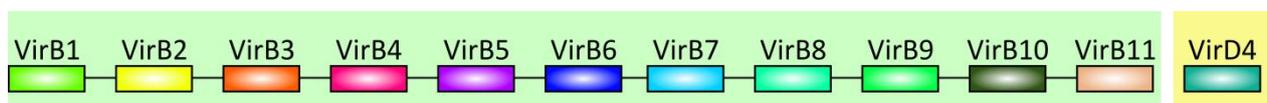


Abb. 6: Genetische Anordnung der T4SS Komponenten in *A. tumefaciens*. Die Komponenten VirB1-VirB11 des T4SS aus *A. tumefaciens* liegen in einem Operon auf dem Ti-Plasmid. Das VirD4 Gen liegt außerhalb des Operons (modifiziert nach Christie, 2004)

Viele T4SS anderer Bakterien besitzen nur eine Teilmenge der Komponenten des T4SS aus *A. tumefaciens* und können in der genetischen Anordnung sowie Anzahl der Komponenten variieren. Gemeinsam ist jedoch ein VirB/D4 Subkomplex mit struktureller bzw. auch funktioneller Bedeutung (Christie et al., 2005).

2.4 Das T4SS in Wolbachien

Im Jahr 2000 wurden zum ersten Mal Gene für ein T4SS in Wolbachien beschrieben. In den Genomen aus Wolbachien der Taiwangrille (*Teleogryllus taiwanema*) und der Mehlmotte (*Ephestia kuehniella*) konnten die essentiellen Komponenten für ein funktionsfähiges Sekretionssystem und deren gemeinsame Transkription in einem Operon nachwiesen werden (Masui et al., 2000). Wolbachien der Wespenart *Asobara tabida*, *wAtab3*, und Wolbachien aus *Drosophila simulans*, *wRi*, besitzen hingegen zwei Operone der VirB/D4 Genorte (Rancès et al., 2008). Ein Operon besteht aus den Komponenten VirB8, VirB9, VirB10, VirB11 und VirD4 sowie dem angegliederten WSP Genort. Das zweite Operon enthält die Komponenten VirB3, VirB4 und VirB6. In derselben Arbeit konnte die polycistronische Transkription der Komponenten innerhalb des jeweiligen Operons gezeigt werden. Mittels Antikörpern, gerichtet gegen die Komponente VirB6, ließ sich VirB6 in den Ovarien der mit Wolbachien infizierten Insekten detektieren. Somit gelang ein Translationsnachweis, der eine Funktionalität des Systems nahelegt (Rancès et al., 2008).

In den Wolbachien der Asseln *Armadilidium vulgare*, *Oniscus asellus* und *Porcellionides pruinosus*, *wVul*, *wAse* und *wPru*, ließen sich ebenfalls zwei Operone des T4SS und deren polycistronische Transkription nachweisen (Félix et al., 2008).

2.4.1 Genetische Organisation des T4SS in Wolbachien aus *B. malayi*

Die erste komplette Sequenzierung und Analyse eines Genoms von Wolbachien parasitärer Nematoden erfolgte am Genom der Wolbachien aus *B. malayi* (*wBm*). Anhand dieser Daten konnten zwei Operone mit Genen für ein T4SS identifiziert werden (Foster et al., 2005) (Tabelle 1).

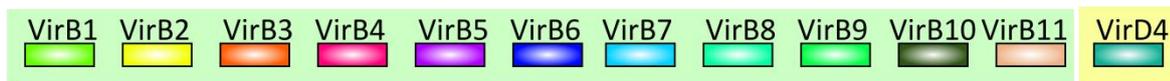
Tab. 1: Einteilung der T4SS Komponenten in 2 Operone

Operon 1	Gene: WBm0793- WBm0798 Genprodukte: VirB6 1, VirB6 2, VirB6 3 VirB6 4, VirB4, VirB3
Operon 2	Gene: WBm0279- WBm0283 Genprodukte: VirB8, VirB9, VirB10, VirB11, VirD4

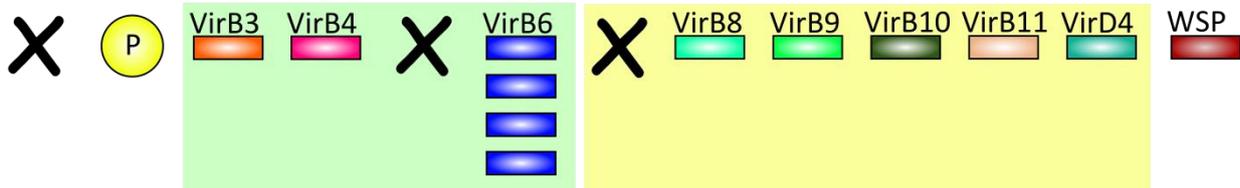
Der Aufbau ist dem Vergleichssystem in *A. tumefaciens* zwar ähnlich, unterscheidet sich jedoch in Anzahl der Komponenten und Anordnung. Abbildung 7 zeigt den Aufbau des T4SS in *wBm*, *Wolbachia pipientis* (*W. pipientis*) und *A. tumefaciens*.

Auffallend ist, dass in den T4SS der Wolbachien die Komponenten VirB1, VirB5 und VirB7 fehlen. Eine Erklärung ist deren intrazelluläre Lage, die eine Pilusausbildung nicht notwendig macht. Interessanterweise wird die Komponente VirD4 aus Operon 2 in beiden Wolbachienarten von einem Homolog des *Wolbachia Surface Protein* (WSP) flankiert wird. Eine Zugehörigkeit zu Operon 2 im Sinne einer Co-Transkription ist bislang nicht bekannt (Pichon et al., 2009).

T4SS in *A. tumefaciens*



T4SS in Wolbachien aus *B. malayi*



T4SS in *Wolbachia pipientis*

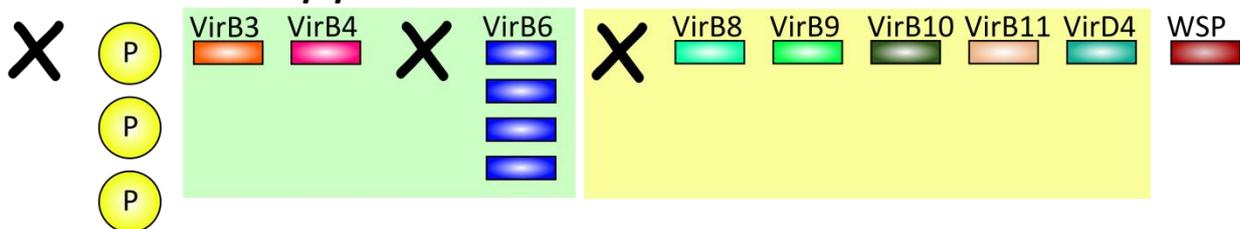


Abb. 7: Genomische Anordnung der T4SS Komponenten in *A. tumefaciens*, *wBm* und *W. pipientis*. In *A. tumefaciens* liegen die Gene VirB1-VirB11 innerhalb eines Operons im Genom hintereinander, das VirD4 Gen liegt außerhalb dieses Operons. Im Vergleich dazu sind die Komponenten des T4SS in *wBm* und *W. pipientis* in 2 genomische Organisationseinheiten angeordnet. Die Komponenten VirB1, VirB5 und VirB7 sind im Genom von Wolbachien aus *B. malayi* und *W. pipientis* nicht vorhanden und werden durch ein X markiert. Ein Paralog (P) der Komponente VirB2 aus *A. tumefaciens* ist im Genom von Wolbachien aus *B. malayi* enthalten, liegt jedoch nicht in unmittelbarer genomischer Nähe der beiden Operone. In *W. pipientis* lassen sich mehrere VirB2 Paraloge nachweisen (Alvarez-Martinez und Christie, 2009). In beiden Wolbachienarten liegt WSP in unmittelbarer genomischer Nähe zu einem der Operone (Pichon et al., 2009) Um die Zugehörigkeit der Komponenten zu einem Operon zu demonstrieren wurden diese jeweils farbig hinterlegt (grün bzw. gelb)

Die Existenz der Gene für ein funktionsfähiges T4SS im Genom von Wolbachien aus *B. malayi* konnte somit bereits gezeigt werden, es gibt bislang jedoch noch keine Studien zur Expression und Funktionalität des T4SS in *wBm*.

2.5 Ziele der Arbeit

Im ersten Teil der Arbeit soll die Transkription des T4SS in Wolbachien aus *B. malayi* gezeigt werden. Hierzu wurde mRNA der einzelnen Komponenten vervielfältigt. Der Nachweise einer polycistronischen Transkription der Komponenten innerhalb ihres Operons soll über die Vervielfältigung der mRNA der Verbindungsregionen zwischen den einzelnen Komponenten erfolgen.

Erste Hinweise auf die Funktionalität des Systems sollen über den Einsatz der rekombinanten ATPase VirB4 in einem Enzymassay überprüft werden. Hierbei wird die Menge an freiem Phosphat bestimmt, welche nach der Inkubation mit Enzym und Substrat (ATP) freigesetzt wird. Der Einfluss von Enzymmenge und Substratmenge sowie die Substratspezifität wurden untersucht.

Zum Expressionsnachweis des T4SS soll unter Verwendung der APAAP-Methode exemplarisch die Komponente VirB10 in histologischen Schnitten von weiblichen *B. malayi* Würmern immunhistochemisch nachgewiesen werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reaktionskits

Tab. 2: Verwendete Reaktionskits

Verwendetes Reaktionskit	Herkunft
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNeasy Min Elute Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
HotStar Taq Polymerase	Qiagen, Venlo, Niederlande
High Fidelity Phusion Taq Polymerase	Finnzymes, Waltham, MA, USA
pBAD Directional TOPO Expression Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Nickel-NTA Fast Start Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Malachite Green Phosphate Assay Kit	Bio Assay Systems, Hayward, CA, USA

3.1.2 Chemikalien

Tab. 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Herkunft
TRIzol Reagenz	Ambion, Carlsbad, CA, USA
Bromchloropropan	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lineares Acrylamid	Ambion, Carlsbad, Deutschland
Random Decamer Primer Mix	Ambion, Carlsbad, Deutschland
TopVision LE GQ Agarose	Fermentas, Waltham, MA, USA
RedSafe	iNtRON, Gyeonggi-do, Korea

100 bp DNA Größenstandard	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
6 x TriTrack Ladepuffer	Fermentas, Waltham, MA, USA
Calciumchlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kanamycin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Arabinose	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ni-NTA Agarose	Ni-NTA Fast Start Kit, Qiagen, Venlo, Niederlande
Bradford Farbreagenz	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Polyacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magic Mark XP Western Protein Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Novex Sharp Protein Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Immun-Star AP Substrat	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Rotiblock	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
ATP	Merck, Darmstadt, Deutschland
GTP	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Roti-Histol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fast Red TR-Salt	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aquatex Mounting Medium	Merck, Darmstadt, Deutschland

3.1.3 Enzyme

Tab. 4: Verwendete Enzyme

Enzym	Herkunft
DNase	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Reverse Transkriptase	Omniscript, Qiagen, Venlo, Niederlande
RNase Inhibitor	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Benzonase Nuclease	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lysozym	Merck, Darmstadt, Deutschland

3.1.4 *E. coli* Bakterienstämme

Tab. 5: Verwendete *E.coli* Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Firma
C43 (DE3)	F- ompT gal dcm hsdSB (rB- mB- (DE3))	OverExpress Chemically Competent Cells; Lucigen, Middleton, WI, USA
DH5 α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, hsdR17(rK- mK+), λ -	MAX Efficiency-DH5 α Competent Cells; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL (StrR) endA1 λ -	One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i> ; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

3.1.5 Plasmide

Tab. 6: Verwendete Plasmide

Plasmid	Antibiotika-resistenz	Größe	Induktion	Eigenschaft	Firma
pBAD202/D-TOPO	Kanamycin	4448 bp	L-Arabinose	- Ara-Operon - <i>His-tag</i> - 16 kDa Peptidanhang	Invitrogen, Carlsbad, CA,USA
pBAD202/VirB4	Kanamycin	4448 bp + 2355 bp	L-Arabinose	- Ara-Operon - <i>His-tag</i> - 16 kDa Peptidanhang -VirB4 Expression	Invitrogen, Carlsbad, CA,USA
pBAD202/Laktamase	Kanamycin	4448 bp + 1665 bp	L-Arabinose	- Ara-Operon - <i>His-tag</i> - 16 kDa Peptidanhang - Laktamase Expression	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA bearbeitet durch Dr. Andrea Schiefer, Bonn, Deutsch- land

3.1.6 Nährmedien

Tab. 7: Verwendete Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
LB Flüssigmedium	10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Bacto-Trypton in 950 ml H ₂ O (pH 7)
LB Agarplatten	10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Bacto-Trypton, 10 g Agar in 950 ml H ₂ O (pH 7)
SOC Medium	10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto- Hefeextrakt, 5 g NaCl, 10 mM Mg SO ₄ , 10 mM MgCl ₂ , 20 mM filtrierte Glukose in 1000 ml H ₂ O (pH 7)

3.1.7 Erworbene Puffer

Tab. 8: Verwendete erworbene Puffer

Puffer	Herkunft
DNase Puffer	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA

3.1.8 Sonstige Puffer

Tab. 9: Verwendete sonstige Puffer

Puffer	Zusammensetzung
TBE Puffer	10,8 g TRIS Base, 5,5 g Borsäure, 0,7 g EDTA-Na ₂ in 1 l Aqua dest.
Lysispuffer A	50 mM Tris/HCl (pH 8), 25 mM MgCl ₂ , 50 mM KCl, 10 mM Imidazol
Waschpuffer A	50 mM Tris/HCl (pH 8), 25 mM MgCl ₂ , 50 mM KCl, 20 mM Imidazol
Elutionspuffer A	50 mM Tris/HCl (pH 8), 25 mM MgCl ₂ , 50 mM KCl, 250 mM Imidazol
Lysispuffer B	100 mM Tris/HCl (pH 7,6), 100 mM NaCl, 10 % Glycerol
Waschpuffer B 1	100 mM Tris/HCl (pH 7,6), 100 mM NaCl, 10 % Glycerol + 30 mM Imidazol
Waschpuffer B 2	100 mM Tris/HCl (pH 7,6), 100 mM NaCl, 10 % Glycerol + 40 mM Imidazol
Elutionspuffer B	100 mM Tris/HCl (pH 7,6), 100 mM NaCl, 10 % Glycerol + 250 mM Imidazol

Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, 0,4 % SDS
5 x Laemmli Puffer	25 mM Tris/HCl, 25 % Glycerol, 7,5 % SDS, 0,04 % Bromphenolblau, 12,5 % β -Mercaptoethanol
1 x Laufpuffer	1,2 g TRIS Base, 17,9 g Tricin, 1 g SDS in 1 l Aqua dest., pH 6,8
1 x Transferpuffer	3 g TRIS Base, 14,4 g Glycin, 200 ml 1 % Methanol in 1 l Aqua dest.
Coomassie Blau	0,5 g Coomassie, 500 ml Methanol, 100 ml Acidum aceticum, 400 ml Aqua dest.
PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g NaH ₂ PO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄ in 1 l Aqua dest.
PBS/Tween	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄ in 1 l Aqua dest. + 0,5 ml Tween 20
TBS stock solution (Histologie)	60,75 g Tris HCl, 87,66 g NaCl in 1 l Aqua dest.
TBS working solution (Histologie)	100 ml stock solution, 40 ml 1 M HCl in 1 l Aqua dest., pH 7,6

3.1.9 Antikörper

Tab. 10: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Rabbit-Anti-His-tag Antikörper	1:1000	MBL, Nagoya, Japan
Goat-Anti-Rabbit Antikörper	1:2000	Bio-Rad, Hercules, CA USA
Polyklonales Anti-VirB10 Kaninchenserum (Immunisierung erfolgte mit VirB10 aus <i>A. tumefaciens</i>)	1:2000	Dr. Peter Christie, Houston, TX, USA
Polyklonales Anti-WSP Kaninchenserum (Immunisierung erfolgte mit WSP aus <i>Dirofilaria immitis</i>)	1:2000	Dr. Claudio Bandi, Mailand, Italien
Mouse-Anti-Rabbit Antikörper, Clone MR12/53	1:25	Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland
Rabbit-Anti-Mouse Antikörper	1:25	Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland
APAAP Mouse-Anti-Rabbit Antikörper	1:50	Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland

3.1.10 Würmer

Mit *B. malayi* infizierte Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) wurden vom Filariasis Research Reagent Resource Center (Athens, GA, USA) erworben und unter speziellen, pathogen-freien Bedingungen im Versuchszentrum der Case Western Reserve University gehalten. Im Verlauf der chronischen Infektion der Rennmäuse wurden erwachsene *B. malayi* Würmer entnommen und für die Versuche zur

Transkriptionsanalyse eingesetzt. Die weiblichen *B. malayi* Würmer, welche für die immunhistologischen Versuche verwendet wurden, wurden freundlicherweise von Rick Maizels (Edinburgh, Großbritannien) zur Verfügung gestellt.

3.2 Methoden

3.2.1 DNA Extraktion aus *B. malayi*

Adulte *B. malayi* Würmer in PBS wurden mit einem Glasmörser zerkleinert und anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die DNA Extraktion erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben. 50 μl Wurmextrakt wurden mit 150 μl PBS versetzt. Dem Ausgangsvolumen von 200 μl wurden zunächst 20 μl Proteinase K (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) zugefügt. Die Inkubationszeit bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ betrug bis zum Auflösen des Gewebes zwischen 1 und 3 Stunden. Im Anschluss wurden 200 μl Puffer AL (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) zugegeben, die Probe gevortext und bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min inkubiert. Danach wurde die Probe einmalig zentrifugiert, um die DNA-Lösung von Gewebestrümmern zu trennen. Daraufhin wurden 200 μl 96-100 % Ethanol zugefügt, das Gemisch gevortext und erneut zentrifugiert. Die DNA Lösung wurde dann auf eine Spin-Säule (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) in ein 1,5-2,0 ml großes Reaktionsgefäß überführt, welches dann für 1 min bei 6000 x G zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt. Im ersten Waschschrift wurden 500 μl AW1 Puffer (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) auf die Säule pipettiert und für 1 min bei 6000 x G zentrifugiert. Die Säule wurde danach für den zweiten Waschschrift auf ein leeres Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μl AW2 Puffer (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) versetzt sowie 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß überführt, es wurden 100 μl AE Puffer (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) zugegeben und eine Inkubationszeit von 1 Minute eingehalten. Im Anschluss erfolgte die Lösung der DNA aus der Säule über eine 1 minütige Zentrifugation bei 6000 x G. Die erhaltene DNA Menge wurde im Anschluss mit einem Spektrophotometer (NanoVue Spectrophotometer, GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) ermittelt.

3.2.2 RNA Extraktion aus *B. malayi*

Alle RNA-Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt, falls nicht anders angegeben. Es wurden ausschließlich RNase freie Lösungen und Arbeitsgeräte verwendet. RNA der Wolbachien aus *B. malayi* wurde mit TRIzol Reagent (Ambion) extrahiert. Jeweils 3 Würmer wurden in 800 µl TRIzol überführt und in ein Reaktionsgefäß mit Glasperlen (Precellys, Montigney le Bretonneux, Frankreich) pipettiert. Es erfolgte eine Homogenisierung des Gemisches durch die mechanische Zerstörung der Würmer durch die Glasperlen in einem Homogenisator (Peqlab Precellys). Dazu wurden die Würmer 2 x 15 s bei 5000 rpm geschüttelt. Dieses Programm wurde 1 x wiederholt und die Proben zwischen beiden Durchgängen für 20 Sekunden auf Eis gelagert um eine Überhitzung der Proben zu vermeiden. Die Lösung wurde abgenommen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu jeder Probe wurden dann 80 µl Bromchloropropan (Sigma-Aldrich) zur Optimierung der Phasenseparation hinzupipettiert; es folgte ein 15 s langes Invertieren der Probe und eine Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur. Nach dem Zentrifugieren der Proben bei 4 °C und 12.000 x G für 15 min (Eppendorf Centrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg) wurde die obere wässrige Phase abgenommen, die die RNA enthielt. Der RNA wurden 400 µl Isopropanol (Merck) und 2 µl lineares Acrylamid (Ambion) zur verbesserten Präzipitation zugefügt. Anschließend wurden die Proben 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei 4 °C und 12.000 x G für 15 min wurde der Überstand abgenommen und ein Pellet mit der gefällten RNA wurde sichtbar. Dieses wurde mit 75 % Ethanol in einem Zentrifugationsschritt von 5 min, 8000 x G und 4 °C gewaschen. Nach dem vorsichtigen Abpipettieren des Alkohols wurde das Pellet für 5-10 min getrocknet und dann in 90 µl nukleasefreiem Wasser gelöst.

3.2.2.1 DNase Verdau

Nach der RNA-Aufreinigung wurde zur Entfernung von genomischer DNA ein DNase Verdau angesetzt. Zu der in 90 µl nukleasefreiem Wasser gelösten RNA wurden 9 µl DNase Puffer (Applied Biosystems) und 1 µl der DNase (Applied Biosystems) hinzugefügt und der Ansatz für 60 min bei 37 °C inkubiert (Eppendorf Thermomixer comfort). Die RNA wurde mit dem RNeasyMin Elute Kit (Qiagen) aufgereinigt und konzentriert. Zunächst wurden dazu 100 µl RLT Puffer (RNeasyMin Elute Kit, Qiagen) und 250 µl 96-

100 % Ethanol mit dem Ansatz durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Das Gemisch wurde dann auf die RNAeasy MinElute Spin Säule aufgetragen und für 15 Sekunden bei 8000 x G zentrifugiert. Zwischen den folgenden Schritten wurde die Säule jeweils nach der Zentrifugation auf ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gesteckt und der Durchfluss verworfen. Der erste Waschvorgang erfolgte mit 500 µl RPE Puffer (RNeasyMin Elute Kit, Qiagen) unter 15 s Zentrifugation. Darauf folgte der zweite Waschvorgang mit 500 µl 80 % Ethanol für 2 min bei 8000 x G. Danach wurde erneut zentrifugiert bei geöffnetem Deckel des Reaktionsgefäßes und maximaler Geschwindigkeit für 5 min. Um die RNA aus der Säule zu lösen, wurden 14 µl RNase freies Wasser auf die Membran pipettiert und die Säule auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt. Die Abzentrifugation erfolgte für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit. Im Anschluss daran konnte mit dem Spektrometer (NanoVue Spectrophotometer, GE Healthcare) die Konzentration bestimmt werden. Dabei ließen sich RNA Mengen zwischen 660 ng und 1944 ng mit einer durchschnittlichen Reinheit von 2,198 OD260/OD 280 gewinnen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

3.2.3 cDNA Synthese

Mit Hilfe eines Random Decamer Primer Mixes (Ambion) und der Reversen Transkriptase (Omniscript, Qiagen) wurde die gewonnene mRNA in cDNA umgeschrieben. Es wurde bis zu 1 µg (max. Volumen 10,67 µl) RNA eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne Reverse Transkriptase angesetzt. Die Reaktionsansätze sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die Reaktionsansätze wurden für 75 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

Tab. 11: Reaktionsansätze cDNA Synthese

	Reverse Transkriptase	ohne Reverse Transkriptase
<i>Reagenz</i>	<i>Volumen</i>	<i>Volumen</i>
RNA	max 1,0 µg	bis zu 10,67 µl
RNAse freies Wasser	Ausgleichvolumen	Ausgleichvolumen
10 x Puffer	2,0 µl	2,0 µl
Random Decamer Primer	4,0 µl	4,0 µl
dNTPs	2,0 µl	2,0 µl
RNAse Inhibitor	0,33 µl	0,33 µl
Reverse Transkriptase	1,0 µl	1,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl	20,0 µl

3.2.4 Transkriptionsanalyse

3.2.4.1 Primerdesign

Für das Primerdesign zur Transkriptionsanalyse und zur Untersuchung einer polycistronischen Transkription der VirB/D4 Gene wurde die Software VectorNTI (Invitrogen) verwendet. Daten zu Sequenz, Produktgröße und Schmelztemperatur der einzelnen Primer finden sich im Anhang.

3.2.4.2 Expressionsanalyse

Die Expressionsanalyse der T4SS Gene erfolgte mittels PCR. Für jedes Gen wurden 4 PCR Proben angesetzt. Der Negativkontrolle wurde keine DNA hinzugefügt. Probe 2 wurde genomische DNA als Positiv- und Größenkontrolle zugefügt. Probe 3 wurde cDNA zugefügt, Probe 4 wurde RNA zugesetzt, die nicht mit RT umgeschrieben wurde und dient somit der Kontrolle einer Kontamination durch genomische DNA. Die PCR-Reaktionen wurden mit cDNA aus 2 Aufreinigungen durchgeführt.

3.2.4.3 PCR Reaktionsansatz

Die PCR Reaktionen (Reaktionsansatz siehe Tabelle 12) wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt und die Reaktionsansätze unter der Sterilbank pipettiert.

Tab. 12: PCR Reaktionsansatz HotStarTaq Polymerase

Reagenz	Volumen
milliQ Wasser	12,4 µl
10 x Puffer	2,0 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,0 µl
dNTPs (25 mM)	0,4 µl
Primer Forward (20 mM)	0,5 µl
Primer Reverse (20 mM)	0,5 µl
HotStar Taq Polymerase (Qiagen, 5 U/µl)	0,2 µl
DNA Template	2,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

Das Programm im Thermocycler (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) wurde für die HotStarTaq Polymerase wie in Tabelle 13 beschrieben programmiert (Tabelle 13).

Tab. 13: Gewähltes Reaktionsprogramm im Thermocycler für die HotStarTaq Polymerase

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	15 min	1
94 °C	30 s	} 35
*	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	1

*abhängig von der spezifischen Primeranlagerungstemperatur (siehe Anhang)

3.2.4.4 Agarosegelelektrophorese

Die Darstellung der vervielfältigten PCR Produkte erfolgte durch Größenaufftrennung in der Agarosegelelektrophorese. Zur Herstellung der Gele wurde TBE Puffer und 2 % TopVision LE GQ Agarose (Fermentas) verwendet. Außerdem wurde dem Agarosegel RedSafe (iNtRON) zugefügt (2,5 µl RedSafe auf 50 ml Agarosegel), welches nach Anlagerung an vorhandene DNA fluoresziert und unter UV-Licht die nach Größe aufgetrennten PCR Produkte sichtbar macht. Als Größenstandard wurden 6 µl eines 1 kb DNA-Größenstandards (New England BioLabs Quick Load 100 bp DNA Ladder) aufgetragen. Die einzelnen Proben wurden mit 6 x TriTrack DNA Ladepuffer (Fermentas) versetzt.

3.2.5 Klonierung, Expression und Aufreinigung von VirB4

3.2.5.1 Klonierung und Transformation

Das VirB4 Gen der Wolbachien aus *B. malayi* wurde durch eine PCR mit der High Fidelity Phusion Taq Polymerase (Finnzymes) und den Primern VirB4FpBAD und VirB4RpBAD vervielfältigt (Sequenz und Annealing Temperatur im Anhang). Die PCR Bedingungen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tab. 14: PCR Reaktionsansatz VirB4

Reagenz	Volumen
milliQ Wasser	12,4 µl
5 x HF Puffer	4,0 µl
dNTPs (200 µM)	0,4µl
VirB4FpBAD (20 mM)	0,5 µl
VirB4RpBAD (20 mM)	0,5 µl
High Fidelity Phusion Taq Polymerase (Finnzymes, 2 U/µl)	0,2 µl
DNA Template	2,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

Die einzelnen Reaktionsansätze wurden unter einer Sterilbank pipettiert und nach Zugabe der High Fidelity Phusion Taq Polymerase bis zur Überführung in den Thermocycler (MGW Biotech) auf Eis gelagert. Das gewählte Programm wird in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tab. 15: Gewähltes Reaktionsprogramm im Thermocycler für die VirB4 PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
98 °C	15 min	1
98 °C	10 s	} 35
58 °C	30 s	
72 °C	120 s	
72 °C	10 min	1

Als Expressionsvektor wurde das Plasmid pBAD 202/D-TOPO (Life Technologies) ausgewählt, da hierbei eine direkte Insertion von PCR Amplifikaten in das Vektorsystem ohne vorangegangene enzymatische Modifikation erfolgen kann. Das vervielfältigte Gen wurde nach Herstellerangaben in den Vektor kloniert. Hierzu wurden 1 µl des PCR Produktes und 1 µl des TOPO Vektors in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß zusammengeführt und mit sterilem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 5 µl ergänzt. Es erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. Zunächst wurden DH5α *E. coli* Zellen mit dem Plasmid transformiert, um eine optimale Plasmidaufnahme zu gewährleisten. Es erfolgte die Selektionskontrolle über selektives Wachstum auf kanamycinhaltigen Agarplatten. Nach Plasmidaufreinigung wurde die Sequenzierung durch das Labor SeqLab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Aus positiv selektierten Kolonien mit korrekt sequenzierter Insertion wurden erneut Plasmide aufgereinigt und in C43 *E.coli* OverExpress Zellen (Lucigen) transformiert, da diese eine bessere Produktion von Membranproteinen ermöglichen.

3.2.5.2 Anzucht der Expressionszellen in Flüssigkultur

Zum Anzüchten wurde eine C43 *E. coli* Bakterienkolonie verwendet, bei welcher das Vorhandensein von VirB4 mit der korrekten Basensequenz zuvor durch Sequenzierung überprüft wurde. Diese Kolonie wurde mit einer Impföse aufgenommen, in 15 ml LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Kanamycin überführt und als Übernachtskultur bei 37 °C und 150 rpm in einem 100 ml Glaskolben angezchtet. Gleichzeitig wurde ein 2 l Kolben mit 1 l LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Kanamycin im Brutraum bei 37 °C über Nacht erwärmt. Aus diesem Volumen wurden am nächsten Morgen 10 ml als Referenzwert (Leerwert ohne Bakterienwachstum) für die Optische-Dichte-Messung (OD-Messung) entnommen. Aus der Bakterienkultur wurden 3 ml entnommen und in den 2 l Kolben transferiert. Das weitere Wachstum der Bakterien erfolgte bei 37 °C und unter Schütteln bei 150 rpm.

3.2.5.3 Induktion der Expression

Die Flüssigkultur wurde einer kontinuierlichen OD-Wert Messung (600 nm) mit einem Photometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) unterzogen. Bei OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Kultur mit 10 mM L-Arabinose induziert und weitere 3 Stunden bei 37 °C und 150 rpm

inkubiert. Die Inkubation über Nacht erfolgte bei Raumtemperatur und 150 rpm. Anschließend wurde die Probe bei 4 °C und 8000 rpm zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, Thermo Scientific). Die Pellets wurden in 20 ml LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Kanamycin gelöst. Die Bakterien wurden erneute bei 4 °C und 4400 rpm zentrifugiert (Heraeus Zentrifuge, Thermo Scientific). Das Pellet wurde anschließend bei -20 °C gelagert. Zur Kontrolle der Induktion wurden Proben vor Induktion, 3 Stunden nach Induktion sowie nach der Kultur über Nacht entnommen.

3.2.5.4 Zellaufschluss

Das Bakterienpellet wurde in 20 ml Lysispuffer A resuspendiert. Anschließend wurden 4,5 U/ml Benzonase Nuclease (Merck) zum Abbau von Nucleinsäuren und 66,5 µg/ml Lysozym (Merck) zugefügt und das Reaktionsgemisch für 1 h auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen bei 4 °C 6 x für jeweils 10 s mit einer Ultraschallfrequenz von 20 kHz behandelt (Sonopuls, Bandelin; Berlin, Deutschland). Zwischen den 10 s der Ultraschallbehandlung wurden die Proben 1 min lang auf Eis abgekühlt um eine Überhitzung der Suspension zu vermeiden. Der Zellaufschluss wurde dann bei 4 °C mit 13 000 rpm für 5 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C).

3.2.5.5 Aufreinigung von rekombinantem VirB4 über Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie geht ein Protein in einer mobilen Phase zunächst eine reversible Wechselwirkung mit einem Liganden in einer stationären Phase ein. Diese Verbindung wird kompetitiv gelöst und ermöglicht so die gezielte Aufreinigung einer spezifischen Substanz aus einem Stoffgemisch heraus.

Das rekombinante VirB4 Protein besitzt einen Histidin-tag (His-tag) (6 aufeinanderfolgende Histidinreste) und kann darüber eine Bindung zu zweiwertigen Nickel-Ionen eingehen, welche über Nitrioltriessigsäure (NTA) an eine Agarosematrix gebunden sind. Durchläuft das Stoffgemisch die Säule mit der Agarosematrix, kann das rekombinante VirB4 über den His-tag eine stabile Verbindung mit zweiwertigen Nickel-Ionen eingehen, die übrigen Stoffe durchlaufen die Säule. Die Elution des Nickel-Histidin Komplexes erfolgt durch eine kompetitive Verdrängung mit Imidazol, welches stärker an Nickel bindet als Histidin.

Alle Aufreinigungsschritte erfolgten bei 4 °C. Das Zelllysate wurden unter leichter Bewegung für 90 min mit 1 ml Ni-NTA Agarose (Ni-NTA Fast Start Kit, Qiagen) inkubiert, um eine stabile Bindung von VirB4 an die Ni-Ionen zu erreichen. Die Säule wurde vor der Aufreinigung zunächst mit 5 ml Aqua dest. und mit 5 ml Lysispuffer A equilibriert. Überstände und Agarose wurden auf die Säule gegeben. Zunächst setzte sich die Agarose am Säulenboden ab. Danach passierte die wässrige Phase die Säule, wurde gesammelt und als Durchfluss bezeichnet. Anschließend wurde die Agarose mit 2,4 ml Lysispuffer A und 2,4 ml Waschpuffer A gewaschen. Die beiden Waschfraktionen wurden aufgefangen und als Waschfraktion 1 und 2 benannt. Die Auswaschung der rekombinanten VirB4 Proteine erfolgte in 5 Elutionsschritten mit jeweils 500 µl Elutionspuffer A (250 mM Imidazolkonzentration). Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen wurden bei -20 °C gelagert.

3.2.5.6 Bradford Assay

Die Proteinkonzentration von Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen wurde spektrometrisch mit Hilfe eines Bradford Assays bestimmt. In einer 96-Loch-Platte (Brand Plates, Wertheim, Deutschland) wurden 4 µl jeder Probe im Triplikate aufgetragen und 200 µl des 1:5 verdünnten Bradford Farbreagens (Bio-Rad) zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 5 min. Die Auslesung erfolgte an einem ELISA Reader (Spectra MAX, Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien). Anhand einer Standardkurve konnte die Proteinkonzentration mit dem Computerprogramm Softmax Pro (Molecular Devices) ermittelt.

3.2.5.7 Western Blot

Um Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen wurde das SDS-PAGE (Natriumdodecylphosphat-Polyacrylamidelektrophorese) Verfahren angewandt. Die Größenaufftrennung erfolgt hierbei innerhalb eines Gels. Im Sammelgel erfolgt zunächst die Sammlung der Proteine und im Anschluss daran wird das Proteingemisch im Trenngel aufgetrennt. Die Zusammensetzung der Gele wird in Tabelle 16 wiedergegeben.

Tab. 16: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel

	Sammelgel 4 %	Trenngel 10 %
<i>Reagenz</i>	<i>Volumen</i>	<i>Volumen</i>
Sammelgelpuffer	1,25 ml	-
Trenngelpuffer	-	6,0 ml
Polyacrylamid (Carl Roth)	750,0 µl	8,0 ml
Aqua dest.	3,0 ml	10,0 ml
10 % APS (Sigma Aldrich)	15,0 µl	120,0 µl
TEMED (Carl Roth)	4,0 µl	12,0 µl

APS: Ammoniumperoxidsulfat; TEMED: Tetramethylendiamin

Es wurde eine Proteinmenge von insgesamt 10 µg pro Probe eingesetzt. Es wurden 7,5 µl 5 x Laemmli-Puffer zu jeder Probe hinzugefügt und die Suspension mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 30 µl aufgefüllt. Durch 5-minütiges Erhitzen im Heizblock auf 95 °C (Eppendorf Thermomixer comfort) wurde die Denaturierung der Proteine erreicht. Der Größenvergleich erfolgte anhand eines Proteingrößenstandards (Magic Mark XP Western Protein Standard, Invitrogen). Die Gelkammern wurden in eine mit 1 x Laufpuffer befüllte Elektrophoresevorrichtung (Bio-Rad Mini PROTEAN-Tetra System) überführt und die Proteine für 1 h bei einer Spannung von 125 V getrennt.

Der Proteintransfer erfolgte auf eine PVDF-Membran (Roche, Basel, Schweiz). Vor dem eigentlichen Blot wurde die PVDF-Membran zunächst 15 s in Methanol befeuchtet und dann gemeinsam mit dem SDS-Gel und den Filterpapieren 2 x für 5 min in 1 x Transferpuffer eingeweicht.

Zum Transfer wurden die Komponenten in folgender Reihenfolge in der Transferapparatur (Bio-Rad TransBlot SD) übereinandergelegt: Filter, Membran, Gel, Filter.

Die Proben wurden für 1 h bei 15 V und 500 mA auf die PVDF-Membran übertragen. Nach abgeschlossenem Proteintransfer wurde die Membran 1 h in 1 x Rotiblock (Carl

Roth) geblockt, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu reduzieren. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit 1:1000 verdünntem Anti-His-tag Primärantikörper (MBL) in 1 x Rotiblock inkubiert. Nach 3-maligem Waschen in PBS/Tween wurde die Membran mit 1:2000 verdünntem Goat Anti-Rabbit IgG-AP (Bio-Rad) in 1 x Rotiblock lichtgeschützt für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem 3-maligem Waschen in PBS/Tween wurde die Membran mit 1 ml Immun-Star AP Substrate (Bio-Rad) betropft. Danach wurde ein Fotofilm (Thermo Scientific CL-Xposure Film) zur Visualisierung der Proteine in einer Dunkelkammer belichtet und entwickelt.

3.2.5.8 Coomassie Färbung

Die Anwesenheit des aufgereinigten Proteins in den Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen sowie die Reinheit der Elutionsfraktionen wurde nach Durchführung des SDS-PAGE-Verfahrens durch den Farbstoff Coomassie-Blau nachgewiesen. Zum Größenvergleich lief ein Proteingrößenstandard (Novex Sharp Protein Standard, Invitrogen) im selben Gel mit. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel über Nacht in der Farblösung inkubiert und unter Schütteln für 2 h in einer 30 % Methanol-Lösung entfärbt. Es handelt sich hierbei um einen unspezifischen Proteinnachweis, da nur eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob ein Protein in der gesuchten Größe vorhanden ist und wie stark die Proben mit weiteren Proteinen kontaminiert sind.

3.2.6 Optimierte VirB4 Aufreinigung im Rahmen der Phosphatassays

Im Rahmen der Funktionsanalyse von VirB4 wurde das Aufreinigungsprotokoll in Zusammenarbeit mit Florian Kratz in Anlehnung an ein Protokoll von Rangrez et al. optimiert (Rangrez et al., 2010). Dieses Protokoll wurde zur Aufreinigung von ATPasen des T4SS aus *Aeromonas veronii* (*A. veronii*) angewendet, deren Aktivität im Anschluss in einem Phosphatassay bestimmt worden ist. Unter anderem wurde in dieser Studie die homologe Komponente zu VirB4, TraE, auf ihre Funktionalität analysiert. Die Aufreinigung erfolgte auch hier mittels Ni-NTA-Agarose durch Affinitätschromatographie. Im Wesentlichen unterscheidet sich die abgeänderte Aufreinigung in der Induktionsdauer und den verwendeten Puffern. Die Dauer der Induktion wurde im abgeänderten Aufreinigungsprotokoll auf 3 h reduziert. Außerdem erfolgte die Induktion nicht mehr bei Raumtemperatur, sondern bei 37 °C. Die eingesetzten Puffer unterschieden sich in der

Zusammensetzung und der zugefügten Menge an Imidazol. So setzte sich die Pufferbasis bei der Standardmethode aus 50 mM Tris/HCl (pH 8), 25 mM MgCl₂, und 50 mM KCl zusammen, wohingegen die Basis der Puffer in der optimierten Methode aus 100 mM Tris/HCl (pH 7,6), 100 mM NaCl und 10 % Glycerol bestand. Im Lysispuffer A war bei der Standardaufreinigung eine Imidazolkonzentration von 10 mM enthalten, Lysispuffer B enthält kein Imidazol. Auch die Waschpuffer unterscheiden sich in ihrem Imidazolgehalt. Waschpuffer A enthält 20 mM Imidazol, in der optimierten Aufreinigung werden zwei Waschpuffer eingesetzt, welche 30 mM bzw. 40 mM Imidazol enthalten. Die Elutionspuffer enthalten die gleiche Imidazolkonzentration von 250 mM.

3.2.6.1 Expression

Zur Expression wurde eine 1 l Flüssigkultur einer zuvor sequenzierten Kolonie mit pBAD202/VirB4 in LB-Medium mit einer Konzentration von 50 µg/ml Kanamycin bei 37 °C hochgeschüttelt. Bei einem OD-Wert (600 nm) von 0,6 wurde L-Arabinose (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 10 mM zugegeben, gefolgt von der Induktion für 3 h bei 37 °C. Die Kultur wurde danach bei 4 °C und 4400 rpm für 10 min zentrifugiert und die gewonnenen Pellets bei -20 °C gelagert.

3.2.6.2 Zellaufschluss

Die Pellets wurden mit 10 ml Lysispuffer B (100 mM TrisHCL (pH 7,6), 100 mM NaCl, 10 % Glycerol) resuspendiert. Anschließend wurden der Suspension 4,5 U/ml Benzonase Nuclease (Merck) und 66,5 µg/ml Lysozym (Merck) für 30 min auf Eis zugefügt. Es folgte eine 8-malige Ultraschallbehandlung von 20 kHz für jeweils 15 s bei 4 °C Raumtemperatur. Der Zellaufschluss wurde dann bei 4 °C mit 16500 rpm für 30 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C) und die Überstände zusammengeführt.

3.2.6.3 Aufreinigung von rekombinantem VirB4

Der Überstand wurde mit 1 ml Ni-NTA Agarose für 90 min bei 4°C inkubiert. Die Equilibrierung der Säule (Ni-NTA Fast Start Kit, Qiagen) erfolgte mit Aqua dest. und Lysispuffer B. Überstände und Agarose wurden auf die Säule aufgetragen und nach dem Durchfluss passierte die wässrige Phase weitere 3 x die Säule. Zum Waschen der Säule durchliefen Waschpuffer B 1 und Waschpuffer B 2 die Säule. Die Elution wurde in 5 Schritten mit je 500 µl Elutionspuffer B durchgeführt.

Als Negativkontrolle für die Phosphatassays wurde das Gen einer Laktamase in den pBAD Vektor kloniert, der Vektor ebenfalls in C43 *E. coli* Zellen transformiert und unter gleichen Bedingungen exprimiert und aufgereinigt.

Die Proteinkonzentration von Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen wurde mit Hilfe eines Bradford Assays (Bio-Rad) bestimmt. Der Nachweis von rekombinantem VirB4 wurde durch Coomassiefärbung und im Western Blot erbracht.

3.2.7 Nukleotidhydrolyse durch VirB4

3.2.7.1 Datenbankanalyse eines Walker A Bindungsmotivs in VirB4

Proteine, die eine Phosphatbindung eingehen können, besitzen oft eine Walker A Bindungsdomäne (GxxGxGKT/S). Es handelt sich dabei um ein von Walker et al. beschriebenes Motiv, das ähnlich gefaltete Strukturen in Proteinen definiert, worüber Phosphat gebunden werden kann (Walker et al., 1982). Zur Detektion eines Walker A Bindungsmotivs in VirB4 wurde die Aminosäuresequenz in das Analyseprogramm Motif Scan, SIB Bioinformatics Resource Portal, eingegeben.

3.2.7.2 Phosphat Assay

Zum Nachweis der ATPase Aktivität des rekombinanten VirB4 wurde das Malachite Green Phosphate Assay Kit (BioAssay Systems) verwendet. Nach Inkubation einer potentiellen ATPase mit einem NTP kann mit dem Assay freigesetztes Phosphat quantifiziert werden. Das freigesetzte Phosphat bildet einen Komplex mit Malachit Green und Molybdat, welcher eine grüne Farbe annimmt. Der Farbumschlag kann photometrisch gemessen werden.

Der Assay wurde auf einer 96-Loch Platte (Brand Plates) ausgeführt. Zunächst wurde eine Standardreihe mit Phosphatkonzentrationen von 4 μ M - 40 μ M in Duplikaten auf die Platte pipettiert. Als Leerwert diente Aqua dest.. Alle zu testenden Proben wurden in Triplikaten aufgetragen. Die Standardreaktionsbedingungen für den Assay wurden in Anlehnung an das Protokoll von Rangrez et al., 2010 und die Herstellerangaben des Phosphatassay Kits bestimmt (Tabelle 17).

Tab. 17: Standardbedingungen Phosphatassay

Menge an rekombinantem VirB4	2,5 µg
ATP Konzentration (Merck)	0,25 mM
MgCl ₂ Konzentration (Sigma- Aldrich)	10 mM
Lysispuffer (100 mM TrisHCl (pH 7,6), 100 mM NaCl, 10 % Glycerol)	Ausgleichsvolumen
Gesamtvolumen	80,0 µl
Inkubationszeit	60 min
Inkubationstemperatur	37 °C

Als Negativkontrolle wurden Proteine eingesetzt, die durch Aufreinigung aus C43 *E.coli* Zellen mit dem pBAD/Laktamase Plasmid gewonnen wurden. Diese sollten eine Beeinträchtigung des Assays durch unspezifische *E.coli*-Proteine oder die Chemikalien aus der Proteinaufreinigung ausschließen. Es wurde jeweils das gleiche Volumen an Proteingemisch nach pBAD/Laktamase Aufreinigung eingesetzt wie an Elutionsfraktion des rekombinanten VirB4, wobei die Proteinkonzentration in den Laktamaseelutionsfraktionen höher war. Um einen Effekt durch den bei der Aufreinigung verwendeten Elutionspuffer auszuschließen, wurde zur Etablierung des Assays zusätzlich eine Kontrolle mit Elutionspuffer verwendet.

Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurde der ATP-Abbau durch Zugabe von 20 µl einer Farbreagenzlösung gestoppt. Bei Raumtemperatur inkubierte die Farbreagenzlösung für weitere 30 min bei leichtem Schütteln. Danach wurde die optische Dichte bei 620 nm in einem ELISA Reader (SpectraMax) bestimmt und mit dem Computerprogramm SoftMax Pro (Molecular Devices) die Phosphatkonzentration bestimmt. Diese Konzentrationsangabe macht es möglich, die spezifische Aktivität des Enzyms zu berechnen, welche in der Einheit nmol/min/mg Protein angegeben wird.

3.2.7.3 Statistische Auswertung

Es erfolgte eine statistische Auswertung der gemessenen Phosphatkonzentrationen mit einem ungepaarten T-Test (Student-t-Verteilung) über das Programm Graph Pad Prism 6 (Graph Pad, Kalifornien). Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler des Mittelwertes dar.

3.2.7.4 Einfluss von Enzymmenge, Substratmenge und Substratquelle auf den Phosphatassay

Der Effekt von unterschiedlichen Mengen an rekombinantem Protein auf die Phosphat- ausbeute wurde mit 1,25 µg, 2,5 µg und 5 µg Protein getestet. Der Einfluss unterschiedlicher Substratmengen wurde unter Standardbedingungen mit ATP-Konzentrationen von 0,25 mM, 1 mM und 2 mM gemessen. Die Substratspezifität wurde in einem Versuchsansatz mit den beiden Substratquellen ATP (Merck) und GTP (Merck) untersucht.

3.2.8 Histologie

3.2.8.1 Würmer

Weibliche, adulte *B. malayi* Würmer wurden in Ethanol fixiert und in Paraffin eingebettet. 5 µm starke Schnitte wurden für die histologische Untersuchung verwendet.

3.2.8.2 Antikörper

Zur Anfärbung von VirB10 wurde polyklonales Kaninchenserum verwendet, welches gegen VirB10 aus *A. tumefaciens* gerichtet ist und von Dr. Peter Christie aus Houston zur Verfügung gestellt wurde. Die Positivkontrolle, ein Kaninchenserum gegen das *Wolbachia* Surface Protein (WSP) aus *Dirofilaria immitis*, stammt von Dr. Claudio Bandi (Bazzocchi et al., 2000).

3.2.8.3 Datenbankanalyse der Ähnlichkeit von VirB10 aus *wBm* und VirB10 aus *A. tumefaciens*

Zur Färbung wurde ein gegen VirB10 aus *A. tumefaciens* gerichtetes, polyklonales Serum verwendet. Es wurde daher die Ähnlichkeit der beiden Proteine VirB10 aus *A. tumefaciens* und VirB10 aus *wBm* überprüft. Beide Aminosäuresequenzen wurden in

ein Analyseprogramm eingegeben, wodurch der E-Wert berechnet werden konnte (NCBI, BLAST, blastp). Der E-Wert gibt die Anzahl der zu erwartenden Übereinstimmungen in zufällig ausgewählten Sequenzen der beiden Vorlagen an. Ein niedriger E-Wert spricht für eine hohe Übereinstimmung.

3.2.8.4 Datenbankanalyse der Ähnlichkeit von VirB10 aus wBm mit Proteinen aus *B. malayi*

Es erfolgte die Eingabe der Aminosäuresequenz von VirB10 aus wBm in das Analyseprogramm NCBI BLAST, blastp. Der Vergleich mit Proteinen aus *B. malayi* erfolgte über die Eingabe des zu untersuchenden Organismus als Referenz.

3.2.8.5 APAAP-Verfahren

Dieses Verfahren der Immunhistochemie verwendet einen löslichen Enzym-/Anti-Enzym Immunkomplex, um Antigene in histologischen Präparaten zu detektieren. Der Enzym-/Anti-Enzym Immunkomplex setzt sich hierbei aus Alkalischer Phosphatase und einem Antikörper, gerichtet gegen die Alkalische Phosphatase, zusammen: Alkalische Phosphatase - Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP). Das Verfahren besteht aus 3 Schritten: Der erste Schritt beinhaltet die Bindung des Antigens im Präparat durch einen unkonjugierten Primärantikörper. Im zweiten Schritt bindet ein Fab (Fragment antigen binding)-Arm eines unkonjugierten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper. Der zweite Fab-Arm kann dann im dritten Schritt an den Enzym-Immunkomplex binden (siehe Abbildung 8). Der Sekundärantikörper stellt eine Art „Brückenantikörper“ zwischen Primärantikörper und dem APAAP-Komplex dar. Durch die Zugabe eines chromogenen Enzymsubstrates und dessen Umsatz kann der gesamte Komplex sichtbar gemacht werden. Da in diesem Prozess mehrere Etagen von Antikörpern angewandt werden, kann das Detektionssignal verstärkt und selbst geringe Mengen an Antigen im Gewebe nachgewiesen werden.

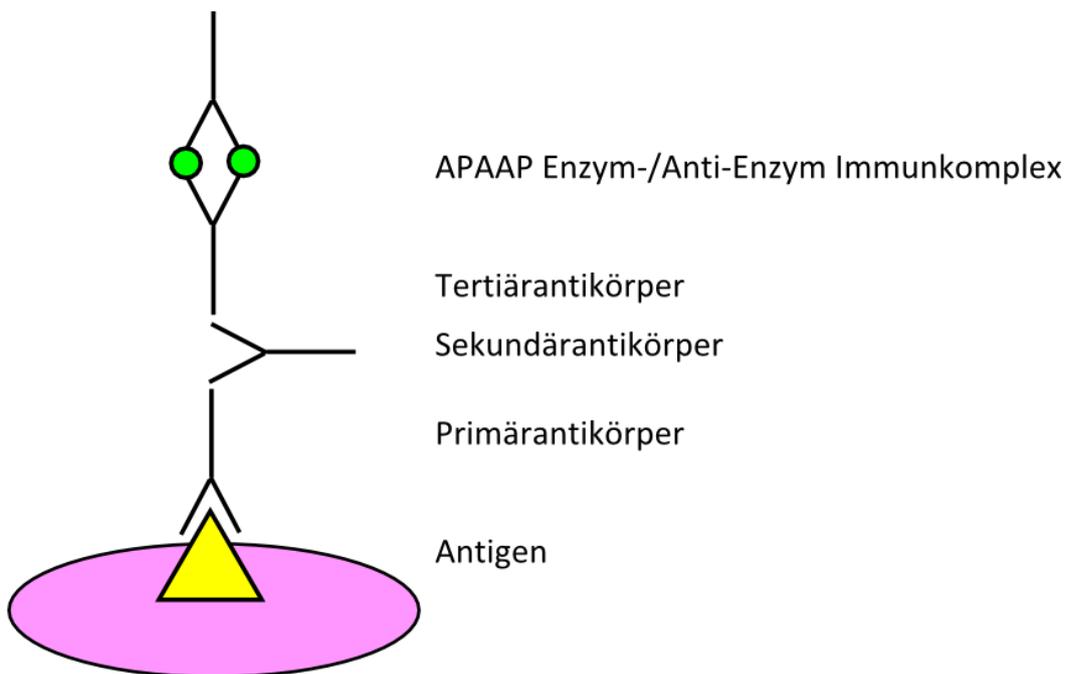


Abb. 8: Schematische Darstellung des APAAP-Verfahrens

3.2.8.6 APAAP Färbung

Vor dem Färbeprozess wurden die Schnitte mit einem Glasschreiber auf dem Objektträger umrandet. Dieser kratzt die Glasoberfläche leicht an um das Volumen der benötigten Antikörperlösung gering zu halten. Danach folgte die Entparaffinierung der Schnitte. Dazu wurden die Objektträger je dreimal für 10 min in Roti-Histol (Carl Roth) inkubiert und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe wie folgt entwässert. In 96 % Ethanol 3-malig für 2 min, in 80 % Ethanol einmalig für 2 min, in 70 % Ethanol einmalig für 2 min und in 50 % einmalig für 2 min. Anschließend wurde der Objektträger bis zur weiteren Bearbeitung in Aqua dest. überführt.

Zwischen den nachfolgenden Schritten wurden die Objektträger auf einem trockenen Papiertuch an einer Kante abgeklopft und überschüssige Flüssigkeit auf dem Objektträger mit einem trockenen Tuch aufgenommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte nicht austrocknen. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer ausgeführt.

Nach der Entwässerung wurden die Objektträger in TBS (Tris-Buffered-Saline) überführt. Die folgenden Schritte wurden zur Minimierung unspezifischer Bindungen

durchgeführt. Verwendet wurde dazu in einem ersten Schritt 0,1 % BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma-Aldrich) in TBS. Diese Lösung wurde auf die Schnitte pipettiert und für 5 min inkubiert. Durch Abklopfen der Objektträger wurde die Lösung entfernt und in einem zweiten Schritt wurde 10 % BSA/TBS auf die Schnitte aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min und dem Abklopfen der Lösung wurde erneut 0,1 % BSA/TBS für 5 min auf die Schnitte gegeben. Die Objektträger wurden noch einmal abgeklopft und sofort der Primärantikörper bzw. die Positivkontrolle in einer Verdünnung von 1:2000 in 0,1 % BSA/TBS auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht.

Am zweiten Tag wurden die Objektträger für 5 min in TBS gewaschen und danach wurde der monoklonale Mouse-Anti-Rabbit Antikörper (Clone MR12/53, DakoCytomation) als Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:25 auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Anschließend wurden die Objektträger für 5 min in TBS gewaschen. Es folgte die Zugabe des Rabbit-Anti-Mouse Antikörpers (DakoCytomation) als Tertiärantikörper in einer Verdünnung von 1:25 und einer Inkubationszeit von 30 min. Danach wurde der Tertiärantikörper durch 5 minütiges Waschen in TBS wieder entfernt und der APAAP-Maus Antikörper (DakoCytomation) in einer Verdünnung von 1:50 auf die Schnitte gegeben. Dieser wirkte ebenfalls 30 min ein und wurde dann für 5 min in TBS entfernt. Um die Detektionssensitivität zu steigern, wurden die Schritte ab der Zugabe des Tertiärantikörpers zweimal wiederholt.

Im Anschluss daran wurde das chromogene Substrat Fast Red TR Salt (Sigma Aldrich) für etwa 5 min auf die Schnitte gegeben. Die Reaktion wurde in TBS gestoppt und die Objektträger danach in Aqua dest. überführt. Für 15 min wurden die Objektträger dann in Hämatoxylin (Merck) gegengefärbt um Zell- und Gewebestrukturen im Schnitt ebenfalls sichtbar zu machen. Es folgte ein 10 minütiges Eintauchen in Leitungswasser und darauf das Eindeckeln der Schnitte mit dem Eindeckmittel Aquatex (Merck).

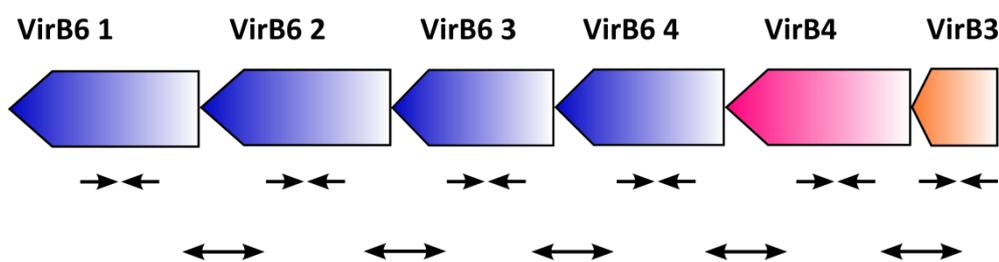
Die Auswertung der Schnitte wurde unter dem Mikroskop (Leitz DMR, Leitz, Wetzlar, Deutschland) mit integrierter Kamerafunktion vorgenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Transkriptionsanalyse

Die Genomsequenz von Wolbachien aus *B.malayi* (wBm) wurde vor wenigen Jahren vollständig sequenziert und annotiert (Foster et al., 2005). Die Expression der in 2 Operonen organisierten Gene wurde bisher nicht untersucht. Für die Transkriptionsanalyse wurde DNA und RNA von Wolbachien aus adulten *B. malayi* Würmern extrahiert und die mRNA durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. In der PCR sollte der Nachweis der Genexpression der einzelnen Komponenten erbracht werden. Die Lage der Primer für die Transkriptionsanalyse wird in Abbildung 9 dargestellt.

Operon 1



Operon 2

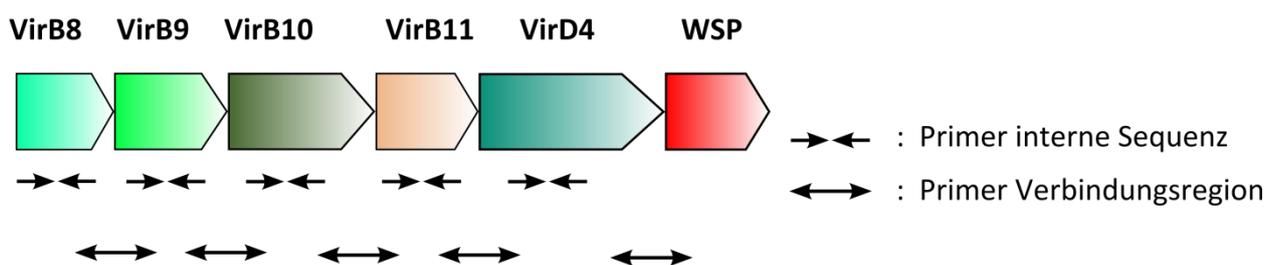


Abb. 9: Schematische Anordnung des T4SS im Genom von Wolbachien aus *B. malayi*. Die Komponenten sind hintereinander in 2 Operonen angeordnet. Am 3'-Ende von Operon 2 liegt eine Genkopie des *Wolbachia* surface Protein (WSP). Die Pfeile geben die Primerlage für die Transkriptionsanalyse wieder.

4.1.1 Transkription der T4SS Komponenten

Im ersten Teil der Transkriptionsanalyse sollte die Anwesenheit von genomischer DNA der einzelnen Komponenten und zusätzlich deren Transkription in Form eines cDNA Nachweises überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden in einer konventionellen PCR Primer verwendet, die eine etwa 200 bp große interne Gensequenz der jeweiligen Komponente vervielfältigen. Die Lage der Primer wird in Abbildung 9 schematisch dargestellt. Anwesenheit und Transkription aller Komponenten aus Operon 1 (VirB3, VirB4, VirB6 4, VirB6 3, VirB6 2, VirB6 1) und aller Komponenten aus Operon 2 (VirB8, VirB9, VirB10, VirB11, VirD4) konnten bestätigt werden (Abbildung 10). Die PCR-Produkte aus der PCR mit genomischer DNA und der PCR mit cDNA hatten die gleiche Größe. In den Negativkontrollen ließen sich keine PCR-Produkte nachweisen.

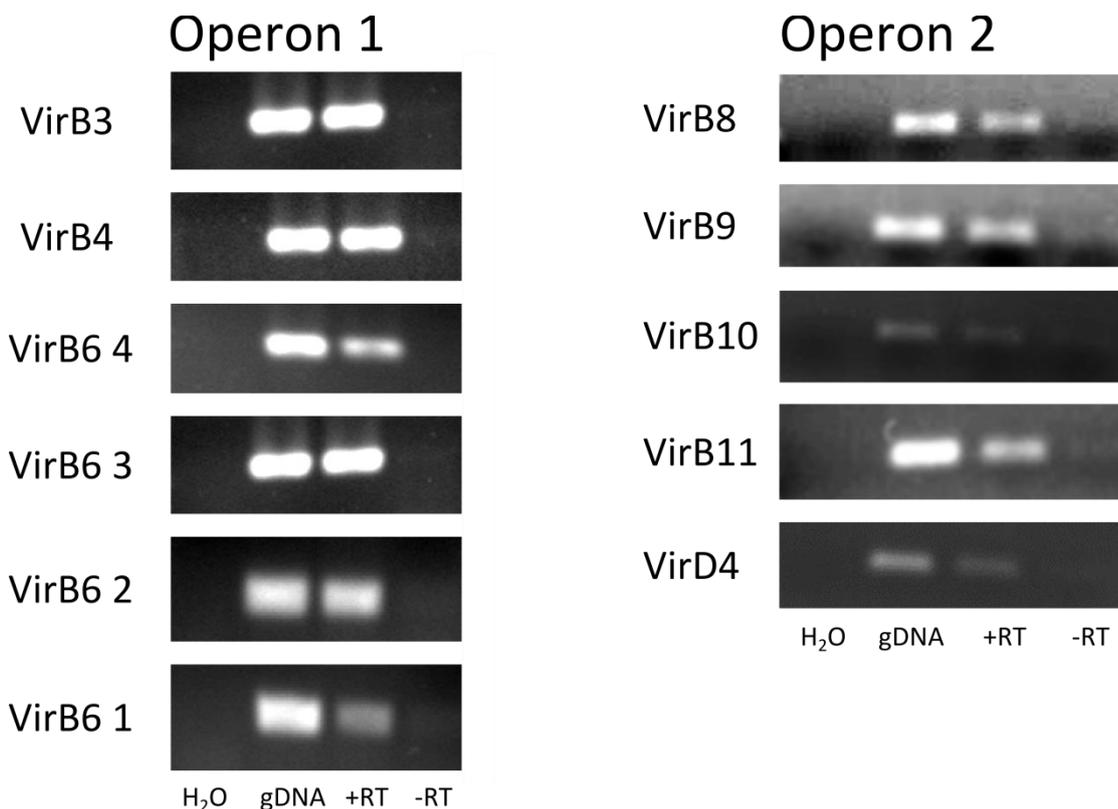


Abb. 10: Transkriptionsnachweis der T4SS Komponenten. Genomische DNA (gDNA) und RNA wurde aus adulten *B. malayi* Würmern extrahiert. Die mRNA wurde mit Reverser Transkriptase (+RT) und ohne Reverse Transkriptase (-RT) in cDNA umgeschrieben. Interne Sequenzen der einzelnen T4SS Komponenten wurden mittels konventioneller PCR zum Nachweis ihrer Transkription vervielfältigt und in einem 2 % Agarose Gel analysiert. Die PCR Produkte besitzen eine Größe zwischen 100 und 200 bp. Das Experiment wurde mit cDNA aus einer zweiten Aufreinigung wiederholt.

4.1.2 Polycistronische Transkription des T4SS

Das Zusammenwirken der einzelnen Komponenten beim Aufbau eines funktionsfähigen T4SS und die Anordnung der Komponenten in 2 Operonen ließ eine gemeinsame Transkription innerhalb ihrer Organisationseinheit vermuten. In Prokaryonten wird dazu eine einzige, polycistronische mRNA der Gene eines Operons erstellt und davon die einzelnen Proteine translatiert. Der Nachweis einer polycistronischen Transkription der T4SS Komponenten sollte durch PCR Reaktionen erbracht werden, in denen die genomische DNA und cDNA der Verbindungsregion zwischen den Genen beider Operone vervielfältigt wurden (Primerlage siehe Abbildung 9). Es konnte eine erfolgreiche Vervielfältigung von genomischer DNA und von cDNA der Verbindungsregionen von Operon 1 (VirB6 2/VirB6 1; VirB6 3/VirB6 2; VirB6 4/VirB6 3; VirB4/VirB6 4, VirB3/VirB4) und von Operon 2 (VirB11/VirD4; VirB10/VirB11; VirB9/VirB10; VirB8/VirB9) gezeigt werden (Abbildung 11).

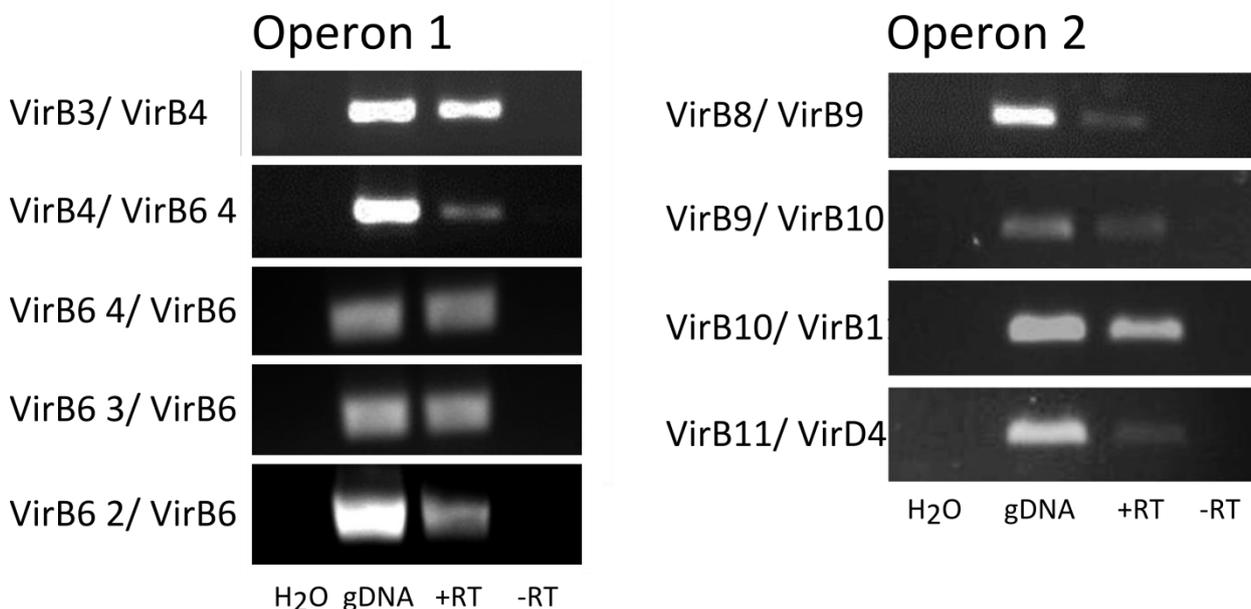


Abb. 11: Nachweis der polycistronischen Transkription des T4SS. DNA und RNA wurde aus Wolbachien aus *B. malayi* extrahiert und die mRNA in einer RT-PCR mit Reverser Transkriptase (+RT) und ohne (-RT) in cDNA umgeschrieben. Genomische DNA und cDNA der Verbindungsregionen zwischen den einzelnen Komponenten wurde in der PCR vervielfältigt und die Produkte mit einer Größe von 200-300 bp in einem 2 % Agarosegel dargestellt. Das Experiment wurde mit cDNA aus einer zweiten Aufreinigung wiederholt.

PCR-Produktgrößen aus genomischer DNA und cDNA waren auch hier identisch. Somit konnte gezeigt werden, dass das T4SS in *wBm* polycistronisch transkribiert wird und die Operone jeweils eine Funktionseinheit bilden.

4.1.3 Co-Transkription des T4SS mit Oberflächenproteinen

Vielfach liegen Gene, die für Oberflächenproteine kodieren, in unmittelbarer Nähe zu den T4SS Genorten. In *Wolbachia pipientis* aus *D. melanogaster* flankiert beispielsweise das *Wolbachia* Surface Protein B (*wspB*) Operon 2 und wird polycistronisch transkribiert (Wu et al., 2004). Auch in Wolbachien aus *B. malayi* grenzt ein WSP-Homolog an *VirD4* aus Operon 2 (Abbildung 9). Um eine gemeinsame Transkription mit *VirD4* nachzuweisen, wurden Primer gewählt, die die Verbindungsregion zwischen *VirD4* und WSP einschließen. In der PCR-Reaktion konnte zwar die genomische DNA vervielfältigt werden, aber nicht die cDNA dieser Region. Eine Co-Transkription des WSP-Homologs mit Operon 2 konnte nicht gezeigt werden (Abbildung 12).

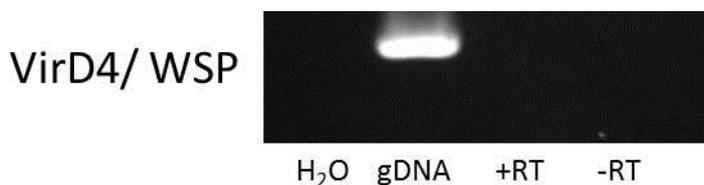


Abb. 12: Co-Transkription von Operon 2 mit WSP. DNA und RNA von Wolbachien aus *B. malayi* wurde extrahiert und die mRNA mit Reverser Transkriptase (+RT) und ohne (-RT) in cDNA umgeschrieben. In einer konventionellen PCR wurde die Transkription der Verbindungsregion zwischen *VirD4* und WSP untersucht. Mit einem 2 % Agarosegel konnte nur die vervielfältigte genomische DNA nachgewiesen werden.

4.1.4 T4SS in Wolbachien anderer Filarienspezies

Auch andere Filarienspezies besitzen Wolbachien als intrazelluläre Endosymbionten. Die in einem Mausmodell der Filarieninfektion verwendete Filarienspezies *Litomosoides sigmodontis* (*L. sigmodontis*) enthält Wolbachien, *wLs*, genauso wie die Filarie *O. volvulus*, welche die Erkrankung der Flussblindheit verursacht. Im Gegensatz zu Wolbachien aus *B. malayi* sind die Genome von *wLs* und Wolbachien aus *O. volvulus* *wOV* bisher nicht vollständig sequenziert worden.

Unter der Annahme einer engen genetischen Verwandtschaft der Filarien, wurde vermutet, dass eine ebenso große genetische Ähnlichkeit der Wolbachien untereinander besteht.

Mit dem gleichen Versuchsaufbau und den zuvor für Wolbachien aus *B. malayi* verwendeten Primern wurde untersucht, ob im Genom von wLs und wOv einT4SS enthalten ist und ob dieses gleichfalls polycistronisch transkribiert wird. Für wLs konnte gezeigt werden, dass die T4SS Komponenten im Genom enthalten sind und transkribiert werden (Abbildung 13). Deren polycistronische Transkription konnte mit den vorhandenen Primern nicht gezeigt werden. Die Ähnlichkeit der Gene des T4SS aus wOv war nicht ausreichend, um sie mit den für Wolbachien aus *B. malayi* eingesetzten Primern zu vervielfältigen.

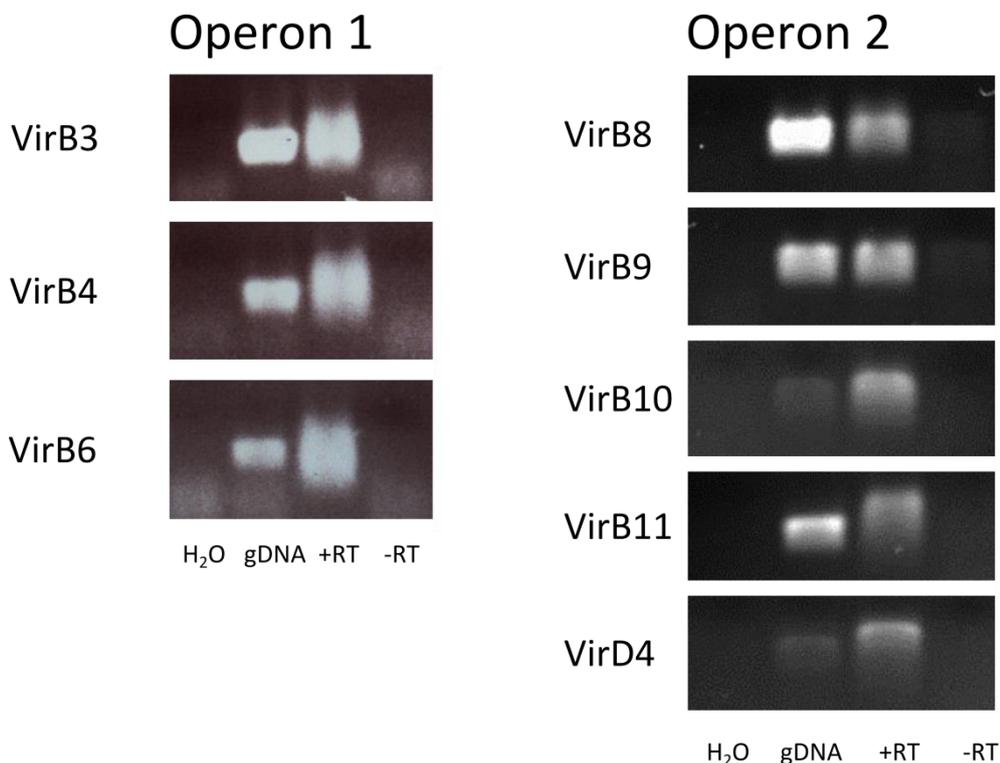


Abb. 13: Transkriptionsnachweis der T4SS Komponenten in *L. sigmodontis*. Genomische DNA (gDNA) und RNA wurde aus adulten *L. sigmodontis* Würmern extrahiert. Die mRNA wurde mit Reverser Transkriptase (+RT) und ohne Reverse Transkriptase (-RT) in cDNA umgeschrieben. Interne Sequenzen der einzelnen T4SS Komponenten wurden mittels konventioneller PCR zum Nachweis ihrer Transkription vervielfältigt und in einem 2 % Agarose Gel analysiert. Die PCR Produkte besitzen je eine Größe zwischen 100 und 200 bp. Das Experiment wurde mit cDNA aus einer zweiten mRNA Aufreinigung wiederholt.

4.2 Expression und Standardaufreinigung von rekombinantem VirB4

In Gram-negativen Bakterien sind entweder zwei oder drei Komponenten mit ATPase - Aktivität Bestandteil des T4SS und liefern unter anderem die Energie für den Substrattransport. Im Modellorganismus *A. tumefaciens* sind dies die Komponenten VirB4, VirB11 und VirD4 (Atmakuri et al., 2004a). Homologe der ATPasen aus *A. tumefaciens* wurden unter anderem in den T4SS aus *Brucella suis*, *Helicobacter pylori* und *Aeromonas veronii* gefunden (Hare et al., 2006; Hilleringmann et al., 2006; Rangrez et al., 2010; Rashkova et al., 2000). Auch das T4SS in Wolbachien aus *B. malayi* enthält die drei mutmaßlichen ATPasen VirB4, VirB11 und VirD4.

Für einige VirB4 Homologe aus dem T4SS anderer Bakterien wurde bereits ihre Funktionalität *in vitro* nachgewiesen (Arechaga et al., 2008; Dang und Christie, 1997). Die Komponente VirB4 aus *wBm* sollte in dieser Arbeit auf ihre mögliche Funktion als ATPase untersucht werden. Dazu wurde VirB4 in den Expressionsvektor pBAD202/D-TOPO kloniert und mit einem C-terminalen 6 x Histidin-tag versehen, welcher zur späteren Aufreinigung durch Affinitätschromatographie benötigt wurde. Der Expressionsvektor pBAD/VirB4 wurde anschließend in C43 *E. coli* Zellen transformiert, welche eine nicht weiter charakterisierte Mutation besitzen, die die Bakterienzellen vor dem Zelltod nach Expression von toxischen rekombinanten Proteinen schützt (A. Schiefer, persönliches Gespräch). Die Expression wurde mit L-Arabinose induziert. Die Aufreinigung von VirB4 wurde zunächst nach einem Standardprotokoll mit der Nickel-Affinitätschromatographie versucht. Die Standardaufreinigung beinhaltet die Verwendung von Lysispuffer A, Waschpuffer A und Elutionspuffer A. Diese enthielten 50 mM Tris/HCl (pH 8), 25 mM MgCl₂, 50 mM KCl und entsprechend 10 mM, 20 mM und 250 mM Imidazol.

4.2.1 Bradford Assay

Im Anschluss an die Proteinaufreinigung erfolgte die photospektrometrische Proteinkonzentrationsbestimmung im Bradford Assay anhand einer Standardkurve (LOD 7,5 – 2000 µg/ml). Die gemessenen Proteinkonzentrationen sind in Tabelle 18 wiedergegeben.

Tab. 18: Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford Assay

Probe	Mittelwert der Proteinkonzentration in µg/ml	Standardabweichung	Triplikatomessung der Proteinkonzentration in µg/ml
Vor Induktion	587	89,096	539 665 x
Pellet nach 3 h Induktion	722	77,468	807 705 655
Probe nach Induktion über Nacht	519	34,122	558 497 501
Pellet nach Induktion	>2000		
Durchfluss	>2000		
Waschfraktion 1	>2000		
Waschfraktion 2	931	112,93	883 850 1060
Elutionsfraktion 1	>20000		
Elutionsfraktion 2	602	27,465	610 571 624
Elutionsfraktion 3	745	70,074	809 670 755
Elutionsfraktion 4	413	79,563	540 383 354
Elutionsfraktion 5	114	x	x 114 x

4.2.2 Nachweis von rekombinantem VirB4

Die auf Grundlage der DNA Sequenz errechnete Proteingröße von VirB4 beträgt 90,7 kDa. Durch die Klonierung in den Expressionsvektor erhielt das rekombinante VirB4 einen 16 kDa großen Thioredoxin- Anhang und den 6 x Histidin-tag mit einer Größe von 3 kDa. Die Gesamtgröße des rekombinanten Proteins liegt daher ungefähr bei 110 kDa.

Der Nachweis von rekombinantem VirB4 wurde in einem ersten Schritt in der Coomassie-Färbung erbracht.

4.2.2.1 Coomassie-Färbung

Durch das SDS-Verfahren wurden die Proteine der einzelnen Proben in einem Gel der Größe nach aufgetrennt. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau konnte während des Färbeverfahrens unspezifisch an die sich im Gel befindenden Proteine binden. Dieses Verfahren kann zum einen die Anwesenheit des rekombinanten Proteins anhand einer Bande in der erwarteten Größe zeigen und zum anderen die Reinheit der einzelnen Proben, da nicht nur ein bestimmtes Protein angefärbt wird, sondern alle sich in der Probe befindlichen Proteine (Abbildung 14).

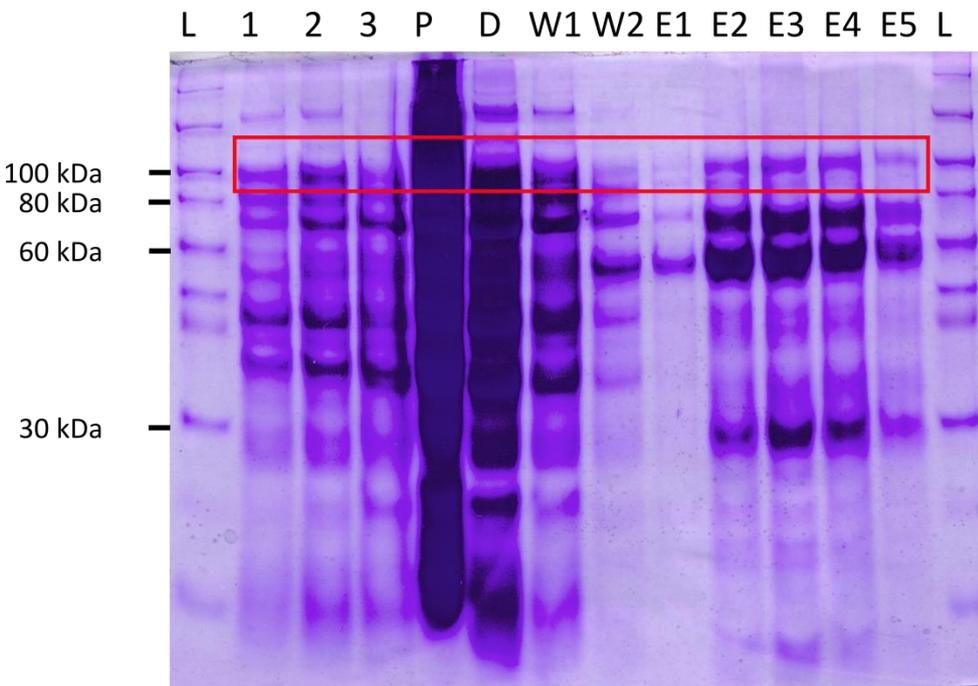


Abb. 14: Coomassie Färbung nach VirB4 Standardaufreinigung. Auf einer Höhe von 110 kDa lässt sich eine Bande nachweisen, die der Größe von VirB4 (106,7 kDa) entspricht. Um den Bereich der zu erwarteten Höhe der Bande mit VirB4 wurde ein rotes Rechteck in die Abbildung eingefügt. L= Proteingrößenstandard; 1= Vor Induktion; 2= nach 3 h Induktion; 3= nach Induktion über Nacht; P= Pellet nach Induktion; D= Durchfluss; W1= Waschfraktion 1; W2= Waschfraktion 2; E1-E5= Elutionsfraktionen 1-5

Im Pellet vor Aufreinigung, in der Durchflussfraktion und Waschfraktion 1 ist eine sehr hohe Proteinkonzentration vorhanden, sodass kaum einzelne Banden voneinander

unterschieden werden können. In den Durchfluss- und Waschfraktionen werden Proteine, die nicht an Nickel-NTA Agarose gebunden sind, ausgewaschen, was die hohe Proteinkonzentration dieser Fraktionen erklärt. In den Elutionsschritten werden dann die über einen His-tag gebundenen rekombinanten Proteine aus der Verbindung mit Nickel kompetitiv durch eine hohe Imidazolkonzentration verdrängt.

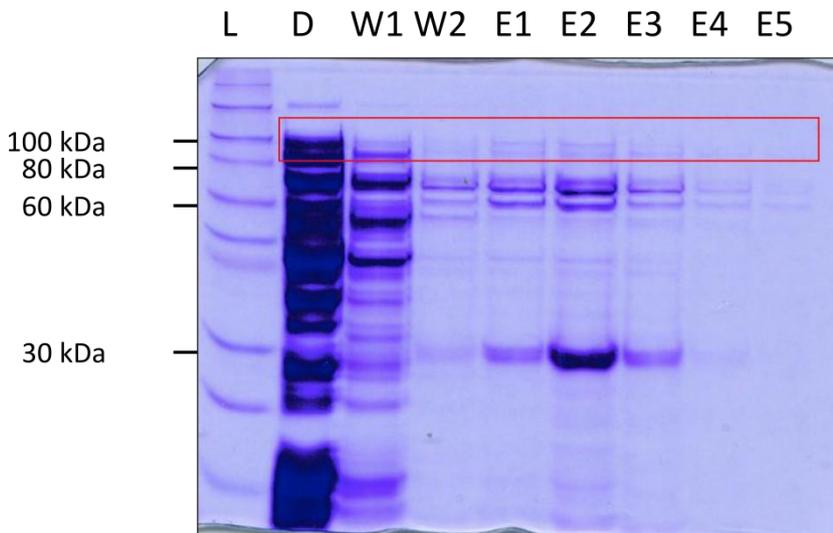
Mit einem roten Rechteck ist der Bereich um 110 kDa markiert, in dem eine Bande des rekombinanten VirB4 zu erwarten ist. In den Elutionsfraktionen 2-5 wird eine starke Bande auf Höhe von 110 kDa sichtbar, die der Größe des rekombinanten VirB4 entsprechen. Die Elutionsfraktionen enthalten jedoch zudem viele Sekundärbanden, was für das Vorhandensein anderer Proteine außer VirB4 oder degradiertes rekombinantes VirB4 in den Fraktionen spricht. Die Reinheit der Elutionsfraktionen ist somit gering. Das Aufreinigungsverfahren nach dem Standardprotokoll war in seinem Ergebnis nicht zufriedenstellend.

4.2.3 Optimierte Aufreinigung von rekombinantem VirB4

Unter Verwendung des Standardaufreinigungsprotokolls gelang keine erfolgreiche Aufreinigung von rekombinantem VirB4, sodass eine Optimierung des Protokolls vorgenommen wurde. Im Hinblick auf die weitere Verwendung von VirB4 in einem Phosphatassay wurde in der Optimierung zudem auf den Einsatz Phosphat-freier Puffer geachtet. Das Protokoll der optimierten Aufreinigung von VirB4 wurde in Zusammenarbeit mit Florian Kratz entwickelt. Die Veränderungen basieren auf einem Protokoll zur Aufreinigung von ATPasen aus dem T4SS von *A. veronii* (Rangrez et al., 2010).

Die Proteine nach der optimierten Aufreinigung von VirB4 wurden im SDS-Page Verfahren ihrer Größe nach aufgetrennt. Es erfolgte die Färbung mit Coomassie Blau (Abbildung 15 A) und ein spezifischer Nachweis des rekombinanten VirB4 im Western Blot mit einem Anti-His tag Primärantikörper (Abbildung 15 B). Eine bessere Aufreinigung konnte erzielt werden.

A Coomassie Färbung



B Western Blot

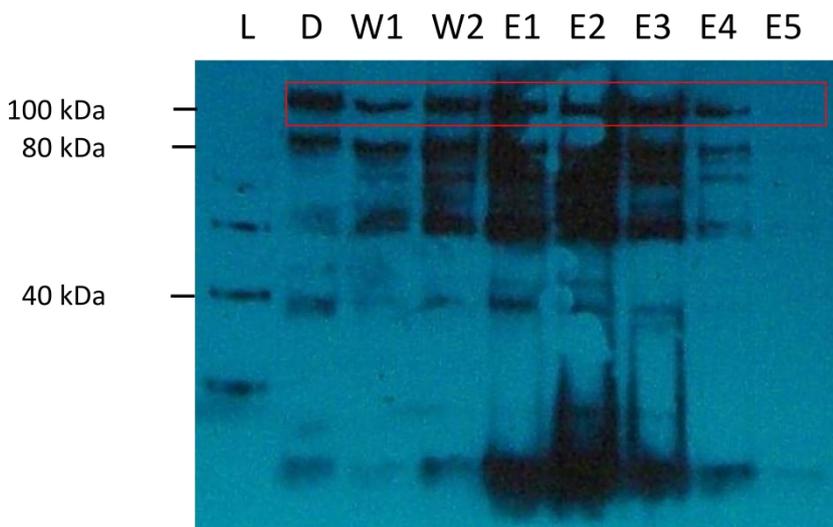


Abb. 15: Coomassie Färbung (A) und Western Blot (B) nach optimierter Standardaufreinigung. Nachweis des aufgereinigten rekombinanten Proteins VirB4 nach der optimierten Aufreinigungsmethode. Auf einer Höhe von 110 kDa lässt sich eine Bande nachweisen, die der Größe von VirB4 (106,7 kDa) entspricht. Um den Bereich der zu erwartenden Höhe der Bande mit VirB4 wurde ein rotes Rechteck in die Abbildung eingefügt. (vgl. Kratz, 2011 mit freundlicher Genehmigung des Autors) D= Durchfluss; W1= Waschfraktion 1; W2= Waschfraktion 2; E1-E5= Elutionsfraktionen 1-5

4.3 ATPase Aktivität von VirB4

4.3.1 Ergebnis der Datenbankanalyse eines Walker A Bindungsmotivs in VirB4

Viele Adenosin- und Guanosin- bindenden Proteine besitzen ein Walker A Bindungsmotiv. Es handelt sich dabei um eine Sequenz von Aminosäuren, die mit der Bindung von Phosphat assoziiert ist. Die Abfolge der Aminosäuren lautet: GxxGxGKT/S, wobei G, K, T und S für Glycin, Lysin, Threonin und Serin stehen; das X steht für eine beliebige Aminosäure. Das Vorhandensein eines solchen Motivs in VirB4 wurde anhand einer *in silico* Analyse überprüft. Nach Eingabe der Aminosäuresequenz in das Programm Motif Scan, SIB Bioinformatics Resource Portal, konnte eine solche Sequenz an Position 449-467 nachgewiesen werden, die VirB4 zu einer ATP Bindung befähigt.

4.3.2 Phosphatassays

Es wurde der Einfluss der Proteinmenge, der angebotenen ATP Konzentration und der Phosphatquelle auf die Phosphatfreisetzung getestet.

Es konnte eine dosisabhängige Freisetzung von Phosphat beobachtet werden, die bei einer Proteinmenge von 2,5 µg ihren statistisch größten Aussagewert im Vergleich zur Negativkontrolle mit dem Proteinmix nach Laktamaseaufreinigung hat (Abbildung 16 A).

Zwar wird bei einer größeren Menge an rekombinantem Protein auch mehr Phosphat freigesetzt, jedoch ist eine größere Menge nicht notwendig, um einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Probe und Kontrolle messen zu können. Die spezifische Aktivität von VirB4 in einer Konzentration von 2,5 µg beträgt $17,98 \pm 0,1597$ nmol/min/mg und steigt bei einer Konzentration von 5 µg auf $22,46 \pm 3,621$ nmol/min/mg an.

Bei unterschiedlichem Einsatz an Substratmenge zeigten sich signifikante Unterschiede in den Proben, zu denen 0,25 mM ATP und 2 mM ATP als Substrat zugegeben worden sind. Gleichmaßen lässt sich aber auch eine Zunahme an freiem Phosphat in der Negativkontrolle Laktamase feststellen (Abbildung 16 B).

Viele NTPasen besitzen die Fähigkeit, sowohl Phosphat von ATP als auch von GTP

abzuspalten. Um VirB4 auf diese Funktion zu überprüfen, wurde der Phosphatassay unter Standardbedingungen durchgeführt und anstatt ATP wurde GTP in einer Konzentration von 0,25 mM eingesetzt. Der Einsatz von GTP als Phosphatquelle zeigte keine signifikante Phosphatfreisetzung im Assay, die Menge an freigesetztem Phosphat entspricht dem Niveau der Negativkontrolle. In der Kontrollprobe mit ATP als Substrat ist aber im Vergleich eine deutliche Phosphatfreisetzung sichtbar (Abbildung 16 C). Die berechnete Aktivität von rekombinantem VirB4 lässt sich nach Zugabe von ATP mit $17,98 \pm 0,1597$ nmol/min/mg angeben; berechnet man die Aktivität nach Zugabe von GTP, erhält man einen Wert von $7,18 \pm 0,2585$ nmol/min/mg. Beide Proben wurden unter den gleichen Bedingungen im Assay inkubiert, aber nur mit ATP als Substrat konnte ein signifikanter Anstieg von freiem Phosphat gemessen werden.

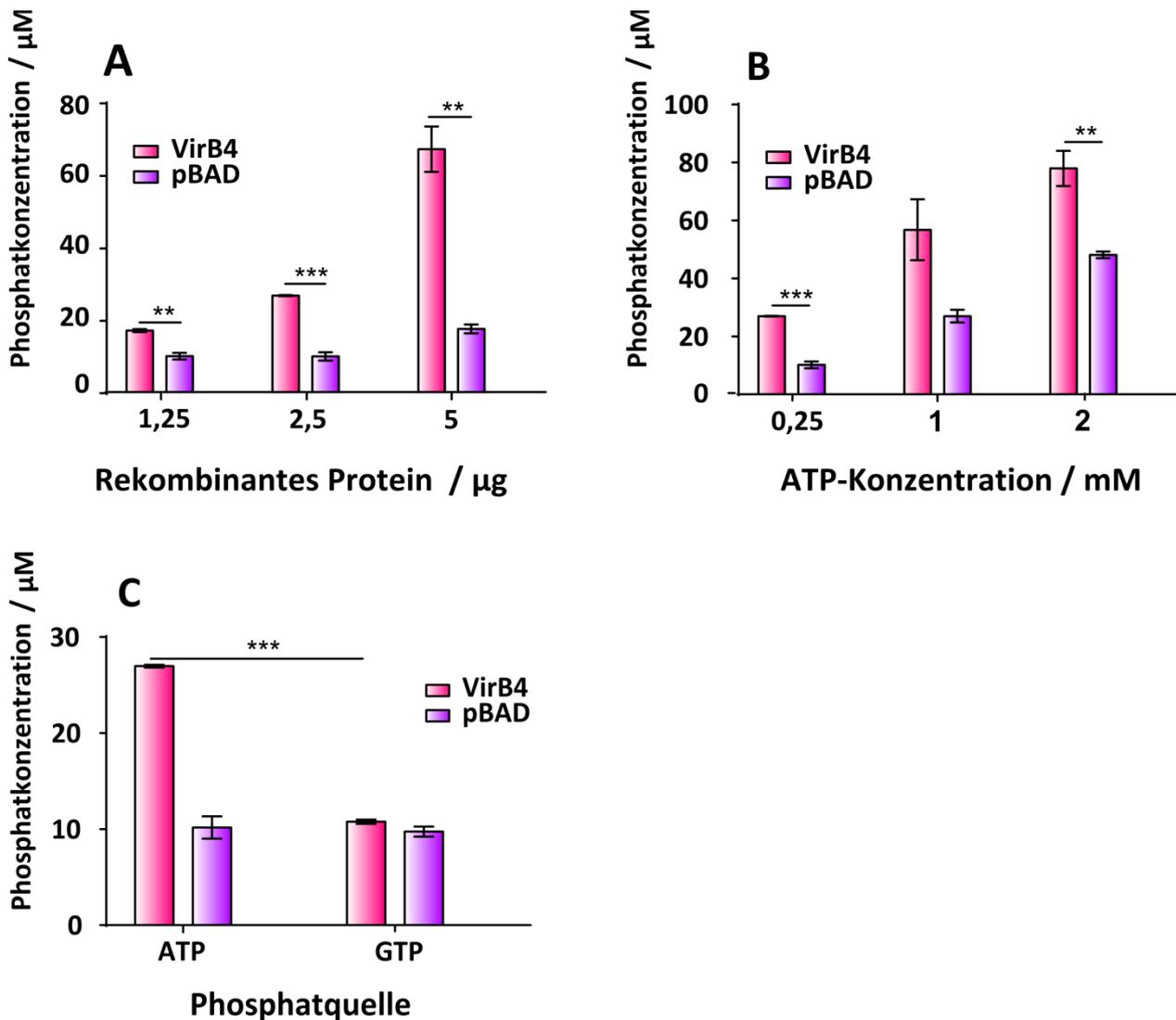


Abb. 16: Nachweis der ATPase Aktivität von rekombinatem VirB4 in einem Malachite Green Phosphatassay. Negativkontrolle: Proteine nach Laktamaseaufreinigung, bezeichnet als pBAD. (A): Testung der optimalen VirB4 Konzentration; (B): Testung der optimalen ATP-Konzentrationen; (C): Testung der Substratspezifität durch Einsatz von GTP als Phosphatquelle. Der Phosphatumsatz im Assay wurde photospektrometrisch gemessen und als Phosphatkonzentration aufgetragen. Alle Proben wurden im Triplikate untersucht und der Versuch mit Proteinen aus einer zweiten Aufreinigung wiederholt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden folgendermaßen markiert: *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,0001$. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes dar.

4.4 Translationsnachweis von VirB10 aus *wBm* in vivo

4.4.1 Histologischer Nachweis von VirB10

Der Translationsnachweis der Komponente VirB10 des T4SS in Wolbachien aus *B. malayi* wurde anhand immunhistochemischer Methoden erbracht. In adulten *B. malayi* Weibchen erwartet man Wolbachien in oder nahe des reproduktiven Systems, insbesondere in den Lateralsträngen, den Ovarien und in sich entwickelnden Embryonen im Uterus (Fischer et al., 2011; Landmann et al., 2010). Somit geht man auch von einer Detektion der VirB10-Proteine an diesen Stellen aus. Als Kontrolle wurde die Färbung mit einem Serum durchgeführt, welches gegen das Wolbachia Surface Protein (WSP) gerichtet ist. Sowohl VirB10 als auch WSP sollte an derselben Lokalisation im Wurmgewebe, an den für Wolbachien typischen Lokalisationen, detektiert werden. Um unspezifische Reaktionen durch den Sekundärantikörper auszuschließen, wurden Schnitte ohne Einsatz eines Primärantikörpers gefärbt und im Vergleich zu Probe und Kontrollserum analysiert.

4.4.2 Ergebnis der Datenbankanalyse einer Ähnlichkeit zwischen VirB10 aus *wBm* und VirB10 aus *A. tumefaciens*

Als Antikörper wurde ein Serum gegen VirB10 aus *A. tumefaciens* verwendet. Zur Überprüfung der Ähnlichkeit zwischen VirB10 aus *A. tumefaciens* und VirB10 aus *wBm* wurde eine Datenbankanalyse durchgeführt. Anhand des Vergleiches der Aminosäuresequenzen von VirB10 aus *wBm* und VirB10 aus *A. tumefaciens* mit dem Programm NCBI, BLAST, blastp suite- 2sequences konnte ein E-Wert von 3×10^{-21} zwischen *wBm* VirB10 und *A. tumefaciens* VirB10 bestimmt werden. Je kleiner der E-Wert, desto größer die Homologie der zu vergleichenden Vorlagen. Da ein kleiner E-Wert errechnet wurde, liegt eine deutliche Homologie der beiden Proteine vor.

4.4.3 Ergebnis der Datenbankanalyse einer Ähnlichkeit zwischen VirB10 aus *wBm* und Proteinen aus *B. malayi*

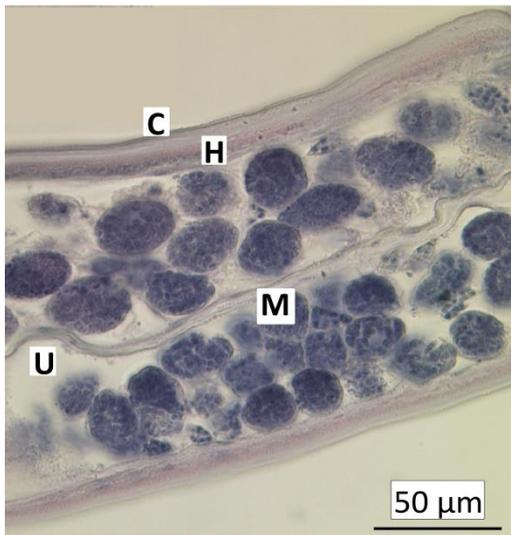
Es sollte die Möglichkeit einer unspezifischen Anfärbung von VirB10 ähnlichen Proteinen aus *B. malayi* durch den verwendeten Antikörper mittels Datenbankanalyse überprüft werden. Vergleicht man die Aminosäuresequenz von VirB10 aus *wBm* mit

bekannten translatierten Aminosäuresequenzen aus *B. malayi*, können über das Programm BLASTP 2.2.29 mehrere Übereinstimmungen erkannt werden. Die niedrigsten E-Werte erzielten das Protein BM-RBC-2, Isoform c (E-Wert von 0,57) und das Protein Rab connectin related protein 2 (E-Wert 0,64). Die Größe des erreichten E-Wertes lässt auf eine Ähnlichkeit der Proteine schließen. Im Vergleich zu erreichbaren, wesentlich kleineren E- Werten beispielweise zwischen VirB10 aus *wBm* und VirB10 aus *A. tumefaciens*, muss man hier jedoch von einer nicht signifikanten Ähnlichkeit ausgehen.

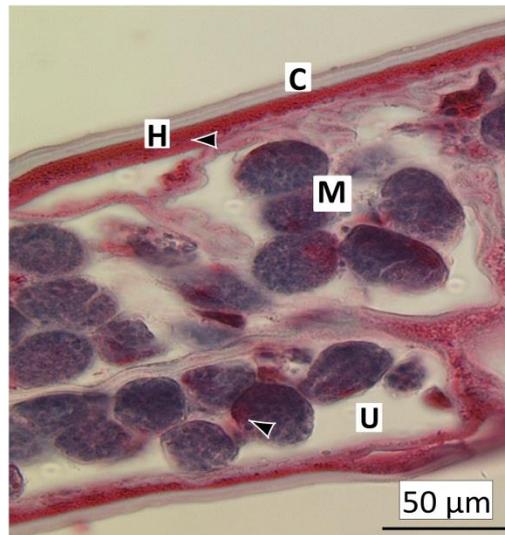
4.4.4 APAAP-Färbung Längsschnitte

In der Hämatoxylinegegenfärbung ohne Verwendung eines Primärantikörpers lassen sich keine spezifischen Strukturen anfärben (Abbildung 17 A). In der Kontrolle konnten die Wolbachien durch die Färbung mit einem Antiserum gegen WSP an ihrer typischen Lokalisation in der Hypodermis (H) des adulten Wurmes und den Morulastadien (M) im Uterus (U) detektiert werden (Abbildung 17 B). Die Anfärbung von VirB10 in Abschnitt C zeigt, dass sich die Proteine an den gleichen Lokalisationen befinden, an denen mit dem Kontrollserum Wolbachien detektiert wurden (Abbildung 17 C). Der Nachweis von VirB10 im histologischen Schnitt deutet darauf hin, dass VirB10 in Wolbachien aus *B. malayi* translatiert wird.

In der 100fachen Vergrößerung kann man die Lokalisation der angefärbten Wolbachienproteine noch eindeutiger bestimmen (Abbildung 18). Ohne den Primärantikörper kann auch in der Vergrößerung weder eine Anfärbung spezifischer, noch unspezifischer Strukturen ausgemacht werden (Abbildung 18 A). Besonders eindrücklich zeigt sich in Abschnitt B der Übergang zwischen Hypodermis (H), in welcher Wolbachien angefärbt werden, und der angeschnittenen Muskulatur (Mu), in der sich keine Wolbachien befinden. Innerhalb der Morulastadien der Embryonen sind die Wolbachien mit dem WSP Antiserum markiert worden und sind auf dem Schnitt als einzelne rote Punkte auszumachen (Abbildung 18 B). Abschnitt C zeigt, dass das Anti-VirB10 Serum ebenfalls wolbachieneigene Proteine erkennt. Es resultiert ein übereinstimmendes Färbemuster wie nach Anfärbung mit dem Kontrollserum. Die Wolbachien sind auch hier in der Hypodermis (H) und den Morulastadien (M) erkennbar (Abbildung 18 C).

A

Vergrößerung 1:40
kein Primärantikörper

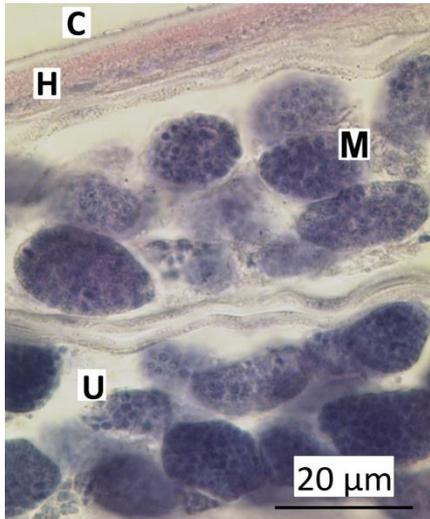
B

Vergrößerung 1:40
Primärantikörper: Anti-WSP

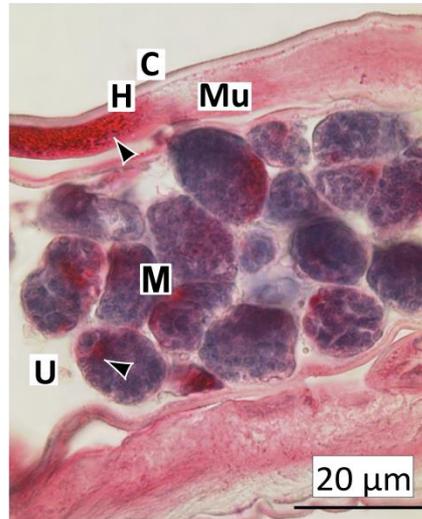
C

Vergrößerung 1:40
Primärantikörper: Anti-VirB10

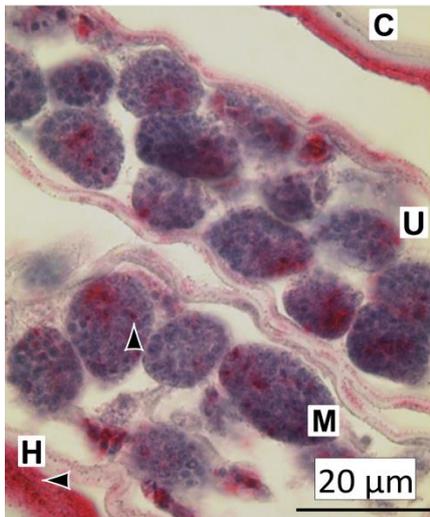
Abb. 17: APAAP Färbung von Längsschnitten weiblicher *B. malayi* Würmer, Vergrößerung 1:40. Es wurden unterschiedliche Primärantikörper verwendet. Es resultiert ein übereinstimmendes Färbemuster zwischen der Färbung mit Anti-WSP Serum (B) und Anti-VirB10 Serum (C). C= Cuticula; H= Hypodermis; M= Morulastadien; U= Uterusast; Pfeile= markieren die Lokalisation der Wolbachien

A

Vergrößerung 1:100
kein Primärantikörper

B

Vergrößerung 1:100
Primärantikörper: Anti-WSP

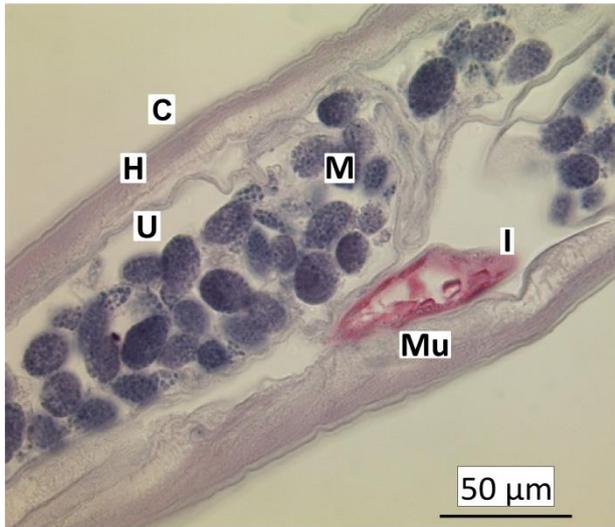
C

Vergrößerung 1:100
Primärantikörper: Anti VirB10

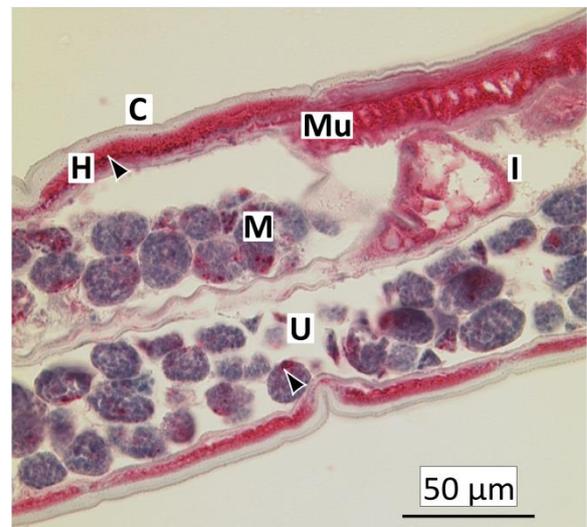
Abb. 18: APAAP Färbung von Längsschnitten weiblicher *B. malayi* Würmer, Vergrößerung 1:100. Es wurden unterschiedliche Primärantikörper verwendet. Es resultiert ein übereinstimmendes Färbemuster zwischen der Färbung mit Anti-WSP Serum (B) und Anti-VirB10 Serum (C). C= Cuticula; H= Hypodermis; M= Morulastadien; U= Uterusast; Pfeile= markieren die Lokalisation der Wolbachien, Mu: Muskulatur

4.4.5 Färbeartefakte

Die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase - Anti-Alkalische Phosphatase) bedient sich eines Verstärkungsverfahrens. Zunächst bindet ein Primärantikörper, der gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist. In den folgenden Schritten wird der Primärantikörper von einem zweiten Antikörper gebunden und dieser wiederum von einem Tertiärantikörper, der an einen Enzym-Anti-Enzymkomplex gekoppelt ist. Im letzten Schritt wird das Substrat der Alkalischen Phosphatase zugegeben und umgesetzt. Diese Umsetzung wird dann im histologischen Anschnitt farblich sichtbar. Die Darmzellen von *B. malayi* besitzen eine endogene Alkalische Phosphatase Aktivität, sodass mit dem APAAP-Färbeverfahren auch der Darm (I) unspezifisch markiert wird. Dass es sich dabei um ein Artefakt durch die Färbemethode handelt, kann man daran erkennen, dass die Färbung auch in Anschnitt A sichtbar wird, der ohne Verwendung eines Primärantikörpers angefärbt wurde (Abbildung 19 A). Längsschnitt B wurde mit dem Anti-VirB10 Serum gefärbt. VirB10 lässt sich an den für Wolbachien typischen Stellen in der Hypodermis (H) und den Morulastadien (M) detektieren. Auch im Bereich des Darmes lässt sich Aktivität der alkalischen Phosphatase nachweisen (I). Nebenbei zeigt sich eine Anfärbung der mutmaßlichen Muskulatur (Mu), wobei es sich hierbei auch um eine vergrößerte Hypodermis handeln könnte (Abbildung 19 B).

A

Vergrößerung 1:40
kein Primärantikörper

B

Vergrößerung 1:40
Primärantikörper: Anti-VirB10

Abb. 19: Färbeartefakte nach APAAP Färbung von Längsschnitten weiblicher *B.malayi* Würmer, Vergrößerung 1:40. Bild A zeigt die Anfärbung des Darmes ohne Verwendung eines Primärantikörpers. In Bild B zeigt sich dieselbe Anfärbung des Darmes nach Verwendung des Primärantikörpers Anti-VirB10. C= Cuticula; H= Hypodermis; M= Morulastadien; U= Uterusast; Pfeile= markieren die Lokalisation der Wolbachien, Mu: Muskulatur; I= Intestinum

5. Diskussion

Es ist bislang nicht geklärt, wie die Endosymbiose zwischen Wolbachien und *B. malayi* im Detail abläuft und welche Vorgänge daran beteiligt sind. Es sind jedoch potentielle Substrate bekannt, die die Wolbachien im Rahmen der Symbiose *B. malayi* zur Verfügung stellen können. Dazu gehören Häm, Purin und Riboflavin, für deren Biosynthese keine bzw. nur ein Enzym im Genom von *B. malayi* codiert sind (Ghedini et al., 2007). In Wolbachien aus *B. malayi* hingegen sind die kompletten Synthesewege vorhanden (Foster et al., 2005), eine Bereitstellung dieser Komponenten durch die Wolbachien ist möglich. Prinzipiell könnten aber auch nur die für die Synthese benötigten Enzyme sezerniert werden. Der Transport der Moleküle aus den Wolbachien in die Wirtszelle könnte über das T4SS ablaufen. In dieser Arbeit wurde das Vorhandensein der Gene für ein T4SS im Genom von Wolbachien aus *B. malayi* und ihre Expression bestätigt. Es konnte die Funktion der energetischen Komponente VirB4 *in vitro* gezeigt werden und Hinweise auf die Translation der Komponente VirB10 erbracht werden. Diese Tatsachen lassen vermuten, dass das T4SS funktionsfähig ist und zum Substrataustausch zwischen Wurm und Bakterium beitragen kann.

5.1 Genexpression des T4SS in Wolbachien aus *B. malayi*

5.1.1 Komponenten des T4SS in *wBm*

Das T4SS von *A. tumefaciens* ist der Prototyp eines T4SS, zu dem die meisten T4SS Gram-negativer Bakterien Ähnlichkeiten aufweisen. Allerdings sind je nach Bakterium nur Teile des „vollständigen“ T4SS vorhanden, so dass der Aufbau eines T4SS stark variieren kann.

Im Vergleich mit dem Aufbau des T4SS in *A. tumefaciens* sind die Untereinheiten VirB1, VirB2, VirB5 und VirB7 kein Bestandteil des T4SS in Wolbachien aus *B. malayi*. Die Hauptfunktion der Untereinheiten VirB2 und VirB5 in *A. tumefaciens* ist die Ausbildung eines Pilus zur Anhaftung an die zu infizierende Wirtszelle. Die Pilusbildung ist jedoch wahrscheinlich für die sich bereits intrazellulär befindenden Wolbachien nicht notwendig. Das T4SS ist in diesem Fall wichtig für das intrazelluläre Überleben der Wolbachien und nicht für die Infektion an sich (Félix et al., 2008). Auch im T4SS der

obligat intrazellulären Bakterien *Ehrlichia chaffeensis* und *Anaplasma phagocytophilum* fehlen die Komponenten VirB1, VirB2, VirB5 und VirB7 (Ohashi et al., 2002). Gemeinsam ist diesen Bakterien unter anderem eine intrazelluläre Lebensweise. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass intrazellulär lebende Bakterien nicht notwendigerweise auf die pilusbildenden Komponenten angewiesen sind.

In *A. tumefaciens* wird die Komponente VirB1 für den Pilusaufbau benötigt, die Zusammensetzung eines funktionsfähigen Sekretionskanals ist jedoch nicht von VirB1 abhängig (Berger und Christie, 1994; Höppner et al., 2004). Da Wolbachien aus *B. malayi* keinen Pilus ausbilden können, ist ein Vorhandensein der Komponente VirB1 im Genom für diesen Zweck nicht notwendig. Der Aufbau des Sekretionskanals kann auch ohne VirB1 erfolgen. Ebenso ist die in *wBm* fehlende Komponente VirB7, die in *A. tumefaciens* über eine Disulfidbrücke die Komponente VirB9 stabilisiert (Anderson et al., 1996), nicht zwingend für ein funktionsfähiges T4SS notwendig. Dies konnte am Beispiel des T4SS aus *Brucella abortus* gezeigt werden (den Hartigh et al., 2008b).

5.1.2 Die Bedeutung mehrerer VirB6 Komponenten für das T4SS in *wBm*

Im Vergleich zu dem Modellorganismus *A. tumefaciens* lassen sich in *wBm* mehrere Paraloge der Komponente VirB6 nachweisen. Das Genom von *A. tumefaciens* enthält nur eine Kopie der T4SS Komponente VirB6 (Ward et al., 1988). VirB6 ist mit mehreren Transmembransegmenten an der inneren Membran von *A. tumefaciens* verankert und bildet einen Teil des Sekretionskanals der inneren Membran (Alvarez-Martinez und Christie, 2009; Jakubowski et al., 2004; Judd et al., 2005a). *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* und *Wolbachia* besitzen jedoch jeweils drei oder vier VirB6 Paraloge in ihrem Genom, die alle an Operon 1 angrenzen (Hotopp et al., 2006; Pichon et al., 2009). Bao et al. (2009) zeigten, dass die VirB6 Paraloge in *E. chaffeensis* polycistronisch transkribiert werden. Auch im Genom der Wolbachien aus *B. malayi* flankieren drei VirB6 Paraloge Operon 1. Für die paralogen VirB6 Gene (VirB6 4, VirB6 3, VirB6 2, VirB6 1) aus *wBm* konnte demonstriert werden, dass sie polycistronisch mit Operon 1 transkribiert werden (Abbildung 11). Die Funktion der einzelnen VirB6 Paraloge muss noch geklärt werden. Bisher wurde eine Interaktion der VirB6 Paraloge in *E. chaffeensis* untereinander und mit der Komponente VirB9 demonstriert (Bao et al.,

2009). Es lässt sich spekulieren, dass sie einen eigenen funktionellen Komplex des T4SS bilden, der in intrazellulären Bakterien eine besondere Bedeutung hat. Mehrere Paraloge von VirB6 ermöglichen außerdem die strukturelle und funktionelle Variation des Sekretionskanals und damit möglicherweise in unterschiedlicher Konstellation eine verstärkte Substrattranslokation (Alvarez-Martinez und Christie, 2009).

Für die Komponente VirB6 4 konnte zudem eine immunogene Bedeutung nachgewiesen werden. Sie wurde anhand Proteomanalysen von *wBm* als Lipoprotein identifiziert, welches eine Aktivierung des menschlichen Immunsystems hervorrufen kann (Voronin et al., 2014). Hierzu muss der humane Wirt jedoch in Kontakt zu den sich intrazellulär im Wurm befindenden Wolbachien und Wolbachienproteinen gelangen. Dies ist beim Tod des Wurmes der Fall oder wenn der Wurm Wolbachien bzw. Wolbachien-Proteine freisetzt. Eine Sekretion von Wolbachien über den Exkretions-Sekretionskanal in der lateralen Hypodermis von *B. malayi* wurde demonstriert (Landmann et al., 2010). Hierbei kommt es zum Kontakt mit dem menschlichen Immunsystem. Das Vorhandensein mehrerer VirB6 Komponenten, die entsprechend der Strukturanalysen nicht alle immunogenes Potential besitzen, kann demzufolge auch für die Immunevasion von Vorteil sein.

5.1.3 Polycistronische Transkription des T4SS

Im Genom der Wolbachien aus *B. malayi* sind die Komponenten des T4SS in zwei Genkomplexen angeordnet. Operon 1 enthält die Komponenten VirB3, VirB4 und VirB6; Operon 2 die Komponenten VirB8, VirB9, VirB10, VirB11 und VirD4 (Foster et al., 2005). Die genomische Organisation in zwei Operone wurde bisher für Wolbachien aus insgesamt 27 verschiedenen Wirtsorganismen nachgewiesen, wobei sich die Größe der Operone und die Reihenfolge der Gene in den meisten Fällen gleichen (Pichon et al., 2009). Nicht nur in Wolbachien ist das T4SS in zwei Operonen angeordnet, sondern auch in Rickettsien. In *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia prowazekii* und *Rickettsia conorii* sind die Komponenten des T4SS ebenfalls in mindestens zwei Operonen organisiert (Ohashi et al., 2002). Im Gegensatz dazu liegen die Gene für das T4SS in Wolbachien aus *Teleogryllus taiwanema* (Taiwanische Grille) und *Ephesia kuehniella* (Mehlmotte) (Yokohama Stamm) in nur einem

Genkomplex hintereinander (Masui et al., 2000). In *A. tumefaciens* sind die Komponenten VirB1-VirB11 ebenfalls in einem einzigen Cluster organisiert, die Komponente VirD4 liegt jedoch außerhalb dieses Clusters (Alvarez-Martinez und Christie, 2009). Ihr kommt damit möglicherweise eine Sonderrolle in *A. tumefaciens* zu, die in Wolbachien nicht benötigt oder sogar von Nachteil wäre.

Durch eine Gruppierung der T4SS Gene an zwei verschiedenen Genorten im Wolbachien Genom ergibt sich die Möglichkeit einer unabhängigen Transkriptionskontrolle der beiden Genkomplexe. Dies kann sicherstellen, dass das komplette T4SS nur dann zusammengesetzt wird, wenn bestimmte Bedingungen erfüllt sind (Ohashi et al., 2002). Die Wachstumsphase des Wirtes (*B. malayi*) mit einem hohen Substratverbrauch kann eine derartige Situation darstellen. Möglicherweise könnten auch Signale von sich in der Entwicklung befindenden Mikrofilarien in den Uterusästen einen Zusammenbau des T4SS bedingen.

In *E. chaffeensis* konnte das Protein EcxR als alleiniger Regulator der Transkription beider T4SS Operone identifiziert werden (Cheng et al., 2008). Im Genom der Wolbachien aus *B. malayi* wurden kürzlich zwei Orthologe des EcxR identifiziert. WBmxR1 und WBmxR2 regulieren die T4SS Transkription. Gleichzeitig konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *ribA*, welches vor der Komponente VirB8 liegt, polycistronisch mit Operon 2 transkribiert wird (Li und Carlow, 2012). In Wolbachien katalysiert *ribA* zwei Schritte der Riboflavinbiosynthese, welche in *B. malayi* nicht stattfinden kann, da nicht alle Enzyme des Syntheseweges im Genom kodiert sind (Foster et al., 2005). Die Versorgung von *B. malayi* mit Riboflavin erfolgt wahrscheinlich durch die Wolbachien. Eine funktionell gekoppelte Expression der zur Synthese und Sekretion erforderlichen Gene ist in diesem Zusammenhang sinnvoll. Die Therapie von Doxycyclin-behandelten, Wolbachien-freien Würmern mit Riboflavin kann zum Überleben der behandelten Würmer führen. Dies unterstützt die These, dass Wolbachien den Wurm mit Riboflavin versorgen (Li und Carlow, 2012).

Eine breite Konservierung der Gene für ein T4SS in Wolbachien spricht dafür, dass das T4SS eine Bedeutung für das Überleben der Wolbachien in ihrer Wirtszelle hat (Pichon et al., 2009). Vermutlich ist dies auch ein Zeichen dafür, dass das T4SS in Wolbachien

funktionsfähig ist, da eine Konservierung des T4SS in Wolbachien vieler verschiedener Spezies (in Insekten und Würmern) von funktionslosen Strukturen wenig wahrscheinlich ist.

5.1.4 Das T4SS in Wolbachien verschiedener Filarienarten

Wolbachien aus *B. malayi* und aus *L. sigmodontis* gehören beide der Wolbachien-Übergruppe D an, zu welcher auch Wolbachien aus *Wuchereria bancrofti* gehören (Lo et al., 2002). Beide Wolbachienarten sind eng miteinander verwandt. Das Genom der Wolbachien aus *L. sigmodontis* ist bisher nicht vollständig sequenziert, sodass in dieser Arbeit für Transkriptionsanalysen von *L. sigmodontis* die Primer für *wBm* verwendet wurden. Es konnte gezeigt werden, dass auch in Wolbachien aus *L. sigmodontis* Gene für das T4SS vorhanden sind. Die Organisation in zwei Genkomplexe konnte anhand der bislang durchgeführten Experimente nicht gezeigt werden. Hierzu sind Untersuchungen zur Transkription der Randregionen der beiden vermuteten Operone notwendig. Die Transkription der Gene konnte mit den vorhandenen Primern zwar gezeigt werden, jedoch nicht deren polycistronische Transkription. Ein möglicher Grund hierfür kann eine unterschiedliche Anordnung der Komponenten im Genom darstellen. Für mögliche Studien zur Funktionalität des T4SS oder zur Testung von Hemmstoffen des T4SS *in vivo* kann die Information des Vorhandenseins eines T4SS von Nutzen sein, da das Tiermodell mit *L. sigmodontis* etabliert ist. Die Verwendung der Primer zur Transkriptionsanalyse des T4SS in Wolbachien aus *O. volvulus* verlief ergebnislos. Dies kann durch eine genetische Zugehörigkeit der Wolbachien aus *O. volvulus* zu Übergruppe C und damit einer entfernteren Verwandtschaft erklärt werden (Lo et al., 2002).

Seit Kurzem liegt auch das sequenzierte Genom der Wolbachien-freien Nematodenart *Loa loa* (*L. loa*) vor (Desjardins et al., 2013). Im Genom dieser Nematoden zeigte sich zwar ein länger zurückliegender Transfer kleinerer Mengen *Wolbachia*-DNA in das Genom; größere Mengen an Wolbachien-DNA ließen sich jedoch nicht nachweisen. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass *L. loa* einmal Wolbachien besaßen, diese aber im Verlauf der Zeit verloren haben (Desjardins et al., 2013).

Interessanterweise sind auch im Genom von *L. loa* keine Gene für die Stoffwechselwege von Häm, Riboflavin, FAD, Glutathion und Nukleotiden vorhanden. Da sie keine Wolbachien besitzen, lag die Vermutung nahe, dass eine Integration der für diese Synthesewege notwendigen Gene in das Genom von *L. loa* stattgefunden hätte. Da dies nachweislich nicht der Fall ist, muss die Rolle dieser Stoffwechselwege für die Endosymbiose zwischen Wolbachien und ihrem Wirt eventuell neu überdacht werden.

In Bezug auf das T4SS lassen sich im Genom von *L. loa* Homologe von beinahe allen Komponenten des T4SS aus dem Modellorganismus *A. tumefaciens* mit Ausnahme der Komponenten VirB7 und VirB8 nachweisen (Desjardins et al., 2013). Auch die pilusformenden Komponenten VirB2 und VirB5 sind im Genom vorhanden. Es könnte sich hierbei also um Wolbachien Gene handeln, die in das *L. loa* Genom integriert worden sind. Welche Funktion sie in *L. loa* erfüllen, bleibt offen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass es sich mittlerweile nur noch um Pseudogene handelt, die nicht mehr transkribiert werden und daher im Laufe der Zeit aus dem Genom verschwinden werden.

5.2 Co-Transkription des T4SS mit Oberflächenproteinen

Vergleicht man bei verschiedenen Wolbachienarten die Gene, die direkt an die beiden Operone angrenzen, so entdeckt man eine auffällige Übereinstimmung. In 19 Wolbachienarten wird die Komponente VirD4 aus Operon 2 von einem Homolog des *Wolbachia* Surface Protein (WSP) flankiert (Pichon et al., 2009). Eine Co-Transkription mit Operon 2 konnte bislang nur für das WSP aus Wolbachien aus den Wirtsorganismen *D. melanogaster*, *D. simulans* und *A. tabida*, gezeigt werden (Rancès et al., 2008; Wu et al., 2004). In dieser Arbeit konnte keine gemeinsame Transkription des WSP der Wolbachien aus *B. malayi* gezeigt werden. Die polycistronische Transkription der T4SS Komponenten aus Operon 2 endet bei VirD4. Im Gegensatz zu Wolbachien, die Insektenzellen infizieren, stellen Wolbachien in Filarien obligate, intrazelluläre Endosymbionten dar. Als Endosymbionten sind sie unter anderem wichtig für das Überleben der Würmer und die Fertilität weiblicher Würmer (Chirgwin et al., 2003; Coulibaly et al., 2009; Hoerauf et al., 2008; Mand et al., 2009). Es wurde sogar vermutet, dass das WSP der Wolbachien aus *D. melanogaster* ein neuer Bestandteil des T4SS dieser Spezies ist

(Wu et al., 2004). In Wolbachien der Filarienspezies *B. malayi* ist das WSP, welches an Operon 2 angrenzt, kein Bestandteil des T4SS, spielt aber eventuell trotzdem eine wichtige Rolle für die Endosymbiose. Interessanterweise konnte eine Interaktion des an Operon 2 angrenzenden WSP (WSP_0284) und einem Protein aus *B. malayi* durch Melnikow et al. nachgewiesen werden (Melnikow et al., 2011). Es konnte mittels ELISA eine Bindung zwischen WSP_0284 und dem hypothetischen *B. malayi* Protein Bm1_46455 nachgewiesen werden. Dass diese Bindung von Bedeutung ist, lässt sich durch eine im Elektronenmikroskop nachgewiesene, gemeinsame Lokalisation sowohl innerhalb der Wolbachienzelle als auch im Wurmgewebe zeigen. Es ist bislang noch unklar, welche Funktion diese Interaktion hat (Melnikow et al., 2011). Möglicherweise stellt die gemeinsame bzw. getrennte Transkription von WSP und T4SS auch einen Unterschied zwischen Wolbachien aus Insekten und Wolbachien aus Filarien dar.

5.3 In vitro Funktionalitätsanalyse

Der Aufbau des T4SS und der Substrataustausch zwischen Wolbachien und *B. malayi* ist energieabhängig. Energielieferanten für die Sekretion via T4SS sind die ATPasen des T4SS (Walldén et al., 2012; Yuan et al.; 2005). Die Komponenten VirB4, VirB11 und VirD4 des T4SS in *A. tumefaciens* besitzen eine ATPase Aktivität (Atmakuri et al., 2004; Alvarez-Martinez und Christie, 2009), sodass in Analogie hierzu auch für dieselben Komponenten aus *wBm* eine ATPase Aktivität vermutet wird.

In dieser Arbeit wurde die ATPase Aktivität einer dieser potentiellen ATPasen *in vitro* untersucht. Es wurde die Komponente VirB4 ausgewählt, da diese über ein Walker A Motiv verfügt, welches für gewöhnlich bei ATP-bindenden Proteinen nachweisbar ist.

5.3.1 Optimierung der Expression und Aufreinigung von VirB4

Zunächst wurde die VirB4 Expression und Aufreinigung nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Es sollte gezeigt werden, dass sich rekombinantes VirB4 aufreinigen lässt. Mit der Standardaufreinigung ließen sich jedoch nur wenig reine Elutionsfraktionen nachweisen; außerdem kam es zur Proteinfragmentierung.

Um die Proteindegradation zu minimieren und eine höhere Reinheit der Elutionsfraktionen zu erreichen, wurde das Standardprotokoll in Zusammenarbeit mit Florian Kratz optimiert. Gleichzeitig musste berücksichtigt werden, dass das rekombinante Protein im Anschluss an die Aufreinigung in einen Phosphatassay eingesetzt werden sollte. Zur Optimierung der VirB4 Induktion und Aufreinigung wurde daher ein Protokoll in Anlehnung an die Aufreinigung der T4SS ATPasen aus *A. veronii* entwickelt (Rangrez et al., 2010). Rangrez et al. führten mit den aufgereinigten ATPasen ebenfalls Phosphatassays durch, sodass die Pufferzusammensetzungen im optimierten Protokoll angeglichen wurde. Dies war auch deshalb von Vorteil, da so eine direkte Verwendung der Elutionsfraktionen im Phosphatassay möglich wurde. Zur Minimierung der Proteinfragmentierung nach Aufreinigung mit dem Standardprotokoll wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurde die Induktionszeit von über 12 h auf 3 h reduziert. Gleichzeitig wurde die Induktionstemperatur auf 37 °C erhöht, was zu einer möglichst großen Ausbeute an Protein in der reduzierten Zeitspanne führen sollte. Außerdem wurde auch durch die geänderte Pufferzusammensetzung Einfluss auf die Stabilität des Proteins genommen. Die Zusammensetzung der Puffer der Standardaufreinigung und der optimierten Aufreinigung unterscheidet sich in der Auswahl und Konzentration der Salze, der Hinzunahme von Glycerol und dem eingestellten pH-Wert. In der optimierten Aufreinigung wird anstatt 50 mM Tris/HCL 100 mM Tris/HCL eingesetzt. Anstatt 25 mM MgCl₂ und 50 mM KCL wird in der optimierten Aufreinigung 100 mM NaCl verwendet. Der pH-Wert wurde von pH 8 auf pH 7,6 erniedrigt. Ein weiterer Unterschied ist die Zugabe von 10 % Glycerol zum Puffer der optimierten Aufreinigung.

Anstatt der Salze MgCl₂ und KCl in der Standardaufreinigung wurde zur optimierten Aufreinigung NaCl verwendet. Die Notwendigkeit dieser Veränderung erklärt sich dadurch, dass innerhalb des Phosphatassays MgCl₂ als Co-Faktor der ATPase eingesetzt wird. Im Assay wird jeder Probe eine definierte Konzentration von 10 mM MgCl₂ zugefügt, da sich herausgestellt hat, dass Magnesium der wirkungsvollste Co-Faktor der ATPasen aus *A. veronii* ist (Rangrez et al., 2010). Enthält der Elutionspuffer der Aufreinigung bereits MgCl₂, kann die MgCl₂-Konzentration nicht mehr kontrolliert werden und es kann keine definierte Konzentration mehr eingestellt werden.

Außerdem wurde den Puffern der optimierten Aufreinigung 10 % Glycerol zugesetzt, um

eine längere Haltbarkeit der Proteine auch bei tiefen Temperaturen zu gewährleisten. Dies trägt zusätzlich zu einer Reduzierung von Degradationsprozessen des Proteins bei.

Ein weiterer Unterschied stellt der Imidazolgehalt der verwendeten Puffer für Lyse, Waschschriffe und Elution dar. Der in der optimierten Aufreinigung verwendete Lysispuffer enthält kein Imidazol, im Vergleich zu 10 mM Imidazol im Lysispuffer der Standardaufreinigung. Zur Zelllyse wird Imidazol nicht benötigt, jedoch befindet sich im Lysispuffer der Standardaufreinigung mit Imidazol bereits ein Antagonist der Proteinbindung an die Nickel-Agarose im aufzureinigenden Proteingemisch. Die Bindung der rekombinanten Proteine an die Nickel-Agarose über den His-tag könnte dadurch im ersten Bindungsschritt verringert sein. Auch die Waschschriffe unterscheiden sich. Nur ein Waschschriff wird in der Standardaufreinigung durchgeführt, wohingegen zwei in der optimierten Aufreinigung angewandt werden. Gleichzeitig steigt die Imidazolkonzentration der Waschpuffer vom ersten (30 mM) zum zweiten (40 mM) Waschschriff an. Zwei Waschschriffe der optimierten Aufreinigung erhöhen die Auswaschung *E. coli* eigener Proteine. Die langsam steigende Imidazolkonzentration führt dazu, dass sich unspezifisch gebundene Proteine bereits in den Waschschriffen lösen. Nach Zugabe des Elutionspuffers mit einer deutlich höheren Imidazolkonzentration werden dann hauptsächlich die rekombinanten Proteine verdrängt und eluiert.

Die verringerte Induktionsdauer, eine Verwendung von NaCl anstatt $MgCl_2$ und KCl als Puffersalze und die Verdopplung der Waschschriffe sorgten für ein verbessertes Ergebnis der Aufreinigung von rekombinatem VirB4. Die Ergebnisse nach der optimierten Aufreinigung zeigten reinere Elutionsfraktionen und weniger Sekundärbanden im Western Blot (Kratz, 2011). Zudem konnten die Elutionsfraktionen durch die veränderte Pufferzusammensetzung direkt in den Phosphatassay eingesetzt werden.

5.3.2 Funktionalität von rekombinatem VirB4 *in vitro*

Die Funktionalität von rekombinatem VirB4 wurde durch die Analyse in Phosphatassays belegt. Je mehr Protein in den Assay eingesetzt wurde, desto mehr Phosphat konnte durch die ATPase Aktivität freigesetzt werden. In unseren Versuchen erreichte das rekombinante VirB4 eine ähnlich hohe spezifische Aktivität wie die VirB4 Homologe

TraE aus *A. veronii* und TrwK des konjugativen Plasmids R388 (Arechaga et al., 2008; Rangrez et al., 2010). Unter der Verwendung einer höheren ATP Konzentration konnte eine Zunahme der Phosphatkonzentration und auch innerhalb der Probe mit der aufgereinigten Laktamase festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass nun auch unspezifisch vermehrt Phosphat durch potentielle kontaminierende ATPasen aus *E.coli* freigesetzt wird, da ein sehr viel höheres Angebot an Substrat besteht. Zwar könnte man durch die Verwendung einer höheren ATP-Konzentration mehr freies Phosphat erzeugen, die Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Phosphatfreisetzung fällt jedoch mit steigender Konzentration immer schwerer. Als Standardkonzentration wurde daher eine ATP Konzentration von 0,25 mM ATP eingesetzt. Um die Beeinflussung durch kontaminierende *E. coli* Proteine zu verringern, sollten weitere Optimierungen der Aufreinigung vorgenommen werden. Außerdem könnte als Negativkontrolle eine punktmutierte, rekombinante VirB4 ATPase eingesetzt werden.

Es zeigte sich zudem die Substratspezifität von VirB4 für ATP. Unter Einsatz von GTP konnte kein signifikanter Anstieg der freien Phosphatkonzentration gemessen werden. Man kann also davon ausgehen, dass VirB4 eine spezifische ATPase-Aktivität besitzt.

Die Funktionalität der Komponente VirB4 *in vitro* liefert einen weiteren Hinweis, dass das T4SS in Wolbachien aus *B. malayi* funktionsfähig sein kann.

5.4 In vivo Expression des T4SS

5.4.1 Histologische Detektion von VirB10 in *B. malayi*

Für die Komponente VirB6 konnte durch Voronin et al. 2014 bereits eine Expression histologisch nachgewiesen werden. Es wurde der Nachweis eines einzelnen Clusters pro Wolbachienzelle erbracht, was darauf schließen lässt, dass jede Wolbachienzelle ein einzelnes, funktionsfähiges T4SS besitzt (Voronin et al., 2014). In dieser Arbeit wurde mit dem APAAP Verfahren die *in vivo* Expression von VirB10 in *B. malayi* Würmern demonstriert. Hierfür wurde polyklonales VirB10 Antiserum verwendet, das ursprünglich für die Detektion von VirB10 aus *A. tumefaciens* hergestellt wurde. Bei VirB10 handelt es sich um eine stark konservierte Komponente des T4SS mit einem E-

Wert von 3^{e-21} zwischen wBm VirB10 und Vir B10 aus *A. tumefaciens* (NCBI, BLAST, blastp suite- 2sequences). Dies deutet auf eine starke Homologie hin und erlaubte es, mit dem Antiserum wBm VirB10 in histologischen Schnitten zu detektieren.

Wolbachien finden sich v.a. in adulten weiblichen Würmern. Hier sind sie meist in Uterus und Ovarien sowie in embryonalem Gewebe lokalisiert. Die histologische Färbung erfolgte an Längs- und Querschnitten adulter, weiblicher *B. malayi* Würmer. In diesen Anschnitten sollte eine Anfärbung der Wolbachien in der Hypodermis der Lateralstränge, in den Ovarien, innerhalb der Oozyten und in sich entwickelnden Embryonen in den Uterusästen erfolgen. An diesen Lokalisationen wird auch eine Anfärbung mit VirB10 erwartet. Wolbachien befinden sich weder in Darmzellen, der Muskulatur oder den somatischen Keimdrüsen (Fischer et al., 2011; Landmann et al., 2010). In dieser Arbeit konnte VirB10 in der Hypodermis und in sich entwickelnden Morulastadien nachgewiesen werden, Regionen im Wurmgewebe, an denen sich typischerweise Wolbachien befinden. Die Spezifität der Färbung wurde mit einem Kontrollserum gegen WSP überprüft. Beide Färbungen zeigten Wolbachien in der Hypodermis und den Morulastadien.

Die Lokalisation von Wolbachien in der Hypodermis der Lateralstränge im Bereich von Ovarien und Uterus kann von Bedeutung für die Entwicklung der *B. malayi* Embryonen sein. Es ist bekannt, dass die Lateralstränge der Hypodermis eine wichtige Rolle in der Regulierung der Kohlenhydratspeicher, der Proteinsynthese und der Aufnahme von Nährstoffen von *B. malayi* spielen (Chen und Howells, 1981). Die enge räumliche Verbindung der Lateralstränge mit den Ovarien und den Uterusästen legt die Vermutung nahe, dass die Lateralstränge an der Bereitstellung von Produkten beteiligt sind, die von sich in der Entwicklung befindenden Embryonen benötigt werden. Produkte, die der Wurm nicht selbst synthetisieren kann, können möglicherweise über das T4SS zur Verfügung gestellt werden. Wolbachien-Produkte werden möglicherweise direkt in Hypodermiszellen sezerniert und gelangen dann durch aktiven oder passiven Substrataustausch in Uterus oder Ovarien.

WSP und VirB10 lassen sich auch direkt in sich entwickelnden Embryonen und Mikrofilarien nachweisen. Dabei nimmt die Anzahl der Wolbachien ab, je weiter

entwickelt der Embryo ist (Fischer et al., 2011) So finden sich in Morulastadien sehr viele Wolbachien, in Mikrofilarien hingegen nimmt die Anzahl ab. Es wird angenommen, dass Wolbachien eine Voraussetzung für die rasche Zellteilung der Würmer, u.a. während der Embryonalentwicklung, sind (Fischer et al., 2011). Dementsprechend kann auch in dieser Arbeit eine starke Expression von WSP und VirB10 in Embryonalgeweben gezeigt werden. Die Tatsache, dass in diesem Entwicklungsstadium beide Proteine vermehrt nachgewiesen werden können spricht für ein ähnliches Expressionsmuster. Indirekt ist dies auch ein Zeichen dafür, dass die Expression des T4SS in der gleichen Häufigkeit wie die eines ubiquitären Oberflächenproteins vorliegt und somit von Bedeutung ist. Während der Embryonalentwicklung liegt die Vermutung nahe, dass der Substrataustausch zwischen Wolbachien und ihrem Wirt für das Wachstum wichtig ist und eventuell über das T4SS stattfindet.

5.4.2 Färbeartefakte

Es ist bekannt, dass die Anwendung des APAAP Verfahren im Darm von *B. malayi* unspezifische Färbeartefakte erzeugt (Fischer et al., 2011). Ein Vorkommen der Wolbachien in Zellen des Gastrointestinaltraktes ist bisher nicht nachgewiesen worden, sodass auch keine Anfärbung von VirB10 oder WSP zu erwarten ist. Sowohl mit der Verwendung von Anti-VirB10 Serum als auch mit der Verwendung von Anti-WSP Serum ließ sich dieses Artefakt nachweisen. Dass es sich hierbei um ein Artefakt handelt, konnte anhand einer Färbung ohne Verwendung des Primärantikörpers überprüft werden. Ohne Primärantikörper kann es zu keiner spezifischen Bindung eines Antigens kommen und somit auch zu keiner Färbung im Gewebe. Gleichwohl wurden ohne Verwendung des Primärantikörpers Darmzellen markiert. Man erklärt sich diese Tatsache dadurch, dass Darmzellen endogene alkalische Phosphatasen besitzen, die nach Substratzugabe im letzten Schritt des APAAP Verfahrens genauso wie die gebundenen Enzym-Anti-Enzym-Komplexe das chromogene Substrat umsetzen können und dies durch einen Farbumschlag sichtbar wird.

Bei den APAAP-Färbungen mit dem Anti-VirB10 Serum fiel eine Anfärbung im Bereich der mutmaßlichen Muskulatur von *B. malayi* auf. Nach Literaturangaben (Fischer et al., 2011; Landmann et al., 2010) befinden sich keine Wolbachien in den Muskelquadranten

der Würmer. Auch mit dem Kontrollserum (Anti-WSP) ließ sich in diesen Arealen keine Anfärbung, und damit auch keine Wolbachien, beobachten. Die Muskelzellen von *B. malayi* werden von einer dünnen Schicht Hypodermis überzogen, die von den Lateralsträngen ausgeht und den dorsalen und ventralen Hypodermisstrang verbinden (Landmann et al., 2010). Auch in der dünnen Hypodermissschicht um die Ovarien weiblicher *B. malayi* Würmer ließ sich elektronenmikroskopisch eine Gewebeflockung mit Degenerationsprozessen und Vakuolenbildung nachweisen (Fischer et al., 2011). Innerhalb dieser Vakuolen konnten mit einem monoklonalen Antikörper, gerichtet gegen WSP aus *B. malayi*, Wolbachien detektiert werden (Fischer et al., 2011). Auffällig oft zeigte sich auch in den durch Anti-VirB10 Serum gefärbten Bereichen um die Muskulatur aufgelockertes Gewebe und kleine Vakuolen. In der Muskulatur selbst befinden sich zwar keine Wolbachien, aber eventuell in der sie umgebenden Hypodermissschicht. Unter der Annahme, dass sich Wolbachien in der Hypodermissschicht um die Muskulatur befinden, ließe sich eine mögliche Detektion von VirB10 innerhalb der Wolbachien erklären. Allerdings konnten nach Anti-WSP Färbung keine Wolbachien im Muskelgewebe oder in den Vakuolen des degenerierten Hypodermisgewebes nachgewiesen werden. Eine Erklärungsmöglichkeit stellt die Überlegung dar, dass das Muskelgewebe ein Protein exprimiert, welches eine Ähnlichkeit zu VirB10 aufweist und daher unspezifisch angefärbt wird. Das polyklonale VirB10-Serum bindet also eine Struktur im Wurmgewebe, die VirB10 ähnlich ist. Hierbei handelt es sich möglicherweise um das Protein BM-RBC-2, isoform c oder um das Rab connectin related Protein 2 aus *B. malayi*. Für diese beiden Proteine konnte eine gewisse Ähnlichkeit mit VirB10 aus *wBm* über eine *in silico* Analyse nachgewiesen werden. Die Verwendung von spezifischem Anti-*wBm*-VirB10 Antiserum reduziert möglicherweise die unspezifische Anfärbung im *B. malayi* Muskelgewebe. In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse muss man bei den Anfärbungen im Bereich der mutmaßlichen Muskulatur eher von einer unspezifischen Färbung durch das polyklonale Serum ausgehen.

Um den Nachweis der translatierten Proteine spezifischer zu gestalten, sollte ein monoklonales Serum, gerichtet gegen *wBm* VirB10 oder weitere T4SS Komponenten, generiert und getestet werden.

5.5 Die Bedeutung des T4SS als potentielles Ziel einer medikamentösen Therapie der Filariose

Klassische Antibiotika werden bereits seit einiger Zeit erfolgreich zur Behandlung von Filariosen eingesetzt. In vielen Studien wird die Wirkung von Doxycyclin, welches bakteriostatisch auf die Wolbachien aus *B. malayi* wirkt, untersucht. Doxycyclin und andere Antibiotika greifen in die Endosymbiose zwischen *B. malayi* und Wolbachien ein, indem sie einen Symbiosepartner aus dem wechselseitigen Verhältnis entfernen. Dies führt zu zwei wichtigen Effekten: 1. Die Embryogenese in *B. malayi* wird aufgehoben und 2. adulte Würmer sterben (Hoerauf, 2003; Hoerauf et al., 2000, 2003). Es bestehen jedoch Einschränkungen in der Verwendung von Doxycyclin. So ist es bei Kindern und schwangeren Frauen kontraindiziert, da es sich unter anderem in wachsende Knochen einlagert. Eine neue potentielle Therapieoption könnte in der Blockade des T4SS liegen. Dadurch würden die Bakterien zwar nicht getötet oder am Wachstum gehindert werden, allerdings könnte der für das Überleben der Filarien wichtige Substrataustausch eingeschränkt werden. Ein möglicher Angriffspunkt des T4SS sind seine energetischen Komponenten. Gelingt es, eine oder mehrere der energetischen Komponenten zu inhibieren, wird keine Energie mehr für den Aufbau des T4SS und den Substrattransport zur Verfügung gestellt. Es wurde bereits eine Studie veröffentlicht, in der der Hemmstoff einer energetischen Komponente des T4SS in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) erprobt wurde (Hilleringmann et al., 2006). Durch ein High-Throughput Screening konnte das Molekül CHIR-1 identifiziert werden, welches die ATPase Aktivität von Cag α , einem VirB11 Homolog, inhibiert. Das Effektorprotein Cag A kann dadurch nicht mehr in die Zellen der Magenschleimhaut transloziert werden. Nach einer Vorbehandlung von *H. pylori* mit CHIR-1 konnte im Tierversuch eine beeinträchtigte Besiedlung der Magenschleimhautzellen mit *H. pylori* beobachtet werden. Von einer erfolgreichen Inhibierung des T4SS kann daher ausgegangen werden (Hilleringmann et al., 2006) (Abbildung 20). Die Hemmung des T4SS anstelle einer klassischen Antibiotikatherapie ist von Vorteil, da keine Strukturen betroffen sind, die das direkte Überleben des Bakteriums gefährden. Stattdessen werden der Transport von Virulenzfaktoren und der Stoffaustausch blockiert. Dadurch wird der Entstehung eines Selektionsdruckes vorgebeugt und die Resistenzentwicklung verringert (Baron, 2006).

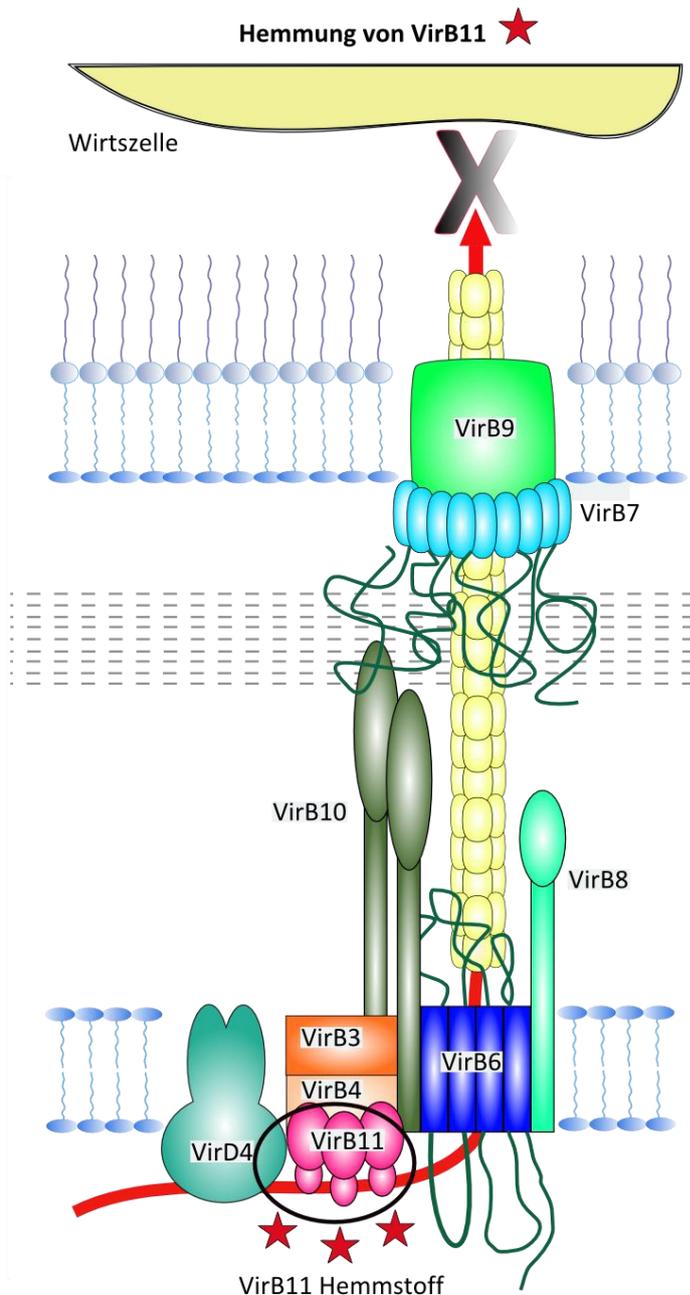


Abb. 20: Inhibition des T4SS durch Hemmung von VirB11. Die Beschriftung der Komponenten basiert auf der Nomenklatur des T4SS aus *A. tumefaciens*. Ohne Anwesenheit eines Inhibitors erfolgt der Transfer von Effektorproteinen (roter Pfeil) folgendermaßen: ATPasen VirB4, VirB11 und VirD4 liefern Energie für den Substrattransport. Die Komponenten VirB3, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 und VirB10 bilden den Sekretionskanal, welcher die innere und äußere Membran durchspannt. Die pilusausbildenden Komponenten stellen den Kontakt zur Zielzelle her. In dieser Abbildung wird die Hemmung der ATPase VirB11 gezeigt. Virulenzfaktoren können nicht mehr transportiert werden und die Pilusausbildung wird aufgehoben.

Eine Hemmung des T4SS in Wolbachien aus *B. malayi* würde einen wichtigen Bestandteil der Endosymbiose unterbinden. Dies könnte unter anderem auch Auswirkungen auf Stoffwechselprozesse der Filarien haben. Geht man von einer Häm-Versorgung der Filarien durch Wolbachien aus, könnte dessen Transport möglicherweise über das T4SS erfolgen. Eine medikamentöse Hemmung des T4SS würde unter der Annahme, dass das T4SS Häm sezerniert, den Transport von Wolbachienproteinen in die Wirtszelle blockieren. Die Versorgung mit Häm ist für *B. malayi* jedoch von großer Bedeutung. Wird diese Versorgung über eine Hemmung des T4SS unterbunden, könnten ähnliche Effekte wie nach der medikamentösen Depletion der Bakterien durch Antibiotikabehandlung erwartet werden. Für den Fall der Depletion der Bakterien nach Antibiotikabehandlung konnte bereits eine kompensatorische Hochregulation der Häm-enhaltenen Enzyme in *B. malayi* nachgewiesen werden (Strübing et al., 2010).

Das T4SS stellt einen Angriffspunkt dar, über den der Stoffaustausch innerhalb der Endosymbiose blockiert werden kann. Alle Faktoren, die die Endosymbiose beeinträchtigen, haben auch eine Auswirkung auf das Überleben von *B. malayi*. Die Überlegungen zur Inhibierung des T4SS könnten somit neue Therapiestrategien der lymphatischen Filariose ermöglichen.

6. Zusammenfassung

Die Lymphatische Filariose gehört zu einer der vernachlässigten Tropenerkrankungen. Etwa 120 Millionen Menschen in 73 Ländern sind hiervon betroffen. Hervorgerufen wird sie unter anderem durch die Filarie *Brugia malayi* (*B. malayi*). Über eine Infektion des Lymphgefäßsystems und der Lymphknoten durch die Filarien kann sich im chronischen Stadium das Krankheitsbild einer Elephantiasis ausbilden. *B. malayi* leben wie beinahe alle humanpathogenen Filarienarten in Endosymbiose mit einem obligat intrazellulären Bakterium. Es handelt sich hierbei um Wolbachien, Rickettsien-artige α -Proteobakterien, welche für die Fertilität und das Überleben der Filarie von großer Bedeutung sind. Der Austausch zwischen Wolbachien und ihrem Wirt erfolgt möglicherweise über ein Typ 4 Sekretionssystem (T4SS). Als Proteinkomplex durchspannt es die Zellwand und kann einen Stoffaustausch zwischen zwei Zellen ermöglichen. In dieser Arbeit konnte mittels Vervielfältigung der mRNA der T4SS Komponenten die Transkription eines T4SS in Wolbachien aus *B. malayi* nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Komponenten polycistronisch transkribiert werden.

Exemplarisch wurde die Expression der Komponente VirB10 in *B. malayi* gezeigt. Hierzu wurde Immunhistochemie an weiblichen *B. malayi* Würmern durchgeführt.

Um neben dem Nachweis der Proteinexpression auch die Funktionalität zu überprüfen, wurde die enzymatische Aktivität einer einzelnen Komponente untersucht. Hierzu wurde wBm VirB4 aus *E. coli* isoliert und die ATPase Aktivität in einem Enzymassay nachgewiesen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das T4SS in Wolbachien aus *B. malayi* transkribiert und translatiert wird. Erste Hinweise auf die Funktionalität des Systems lieferte der Nachweis der erwarteten enzymatischen Aktivität der Komponente VirB4 *in vitro*. Es wird daher eine Rolle des T4SS im Substrataustausch zwischen Wolbachien und *B. malayi* postuliert und machen es zu einem potentiellen neuen Therapieansatz in der Behandlung der lymphatischen Filariose.

7. Anhang

7.1 Primerdaten

Gen	Gen ID	Name	Primersequenz (5' - 3')	Größe (bp)	Schmelztemperatur (°C)
VirB3	Wbm 0798	VirB3F	AGTCCATGTATCCCTGGTAACATC	112	60°C
		VirB3R	GGTGTGAGTTACATGTTTGCAATAC		
VirB4	Wbm 0797	VirB4F	GTGTGCTTGATTAGTATGTACTIONCGC	104	60°C
		VirB4R	AGCAAACGGCAACACAGATT		
VirB6-4	Wbm 0796	VirB6-4F	AGCTTCTCCAGTAGCATTAGCAGC	106	60°C
		VirB6-4R	GCAAGGGATGACTCTAGAGCTCTT		
VirB6-3	Wbm 0795	VirB6-3F	CGAAGTTAGATCAAGATGAGG	160	47°C
		VirB6-3R	GAAGCAAATTTACATATACGTCCGC		
VirB6-2	Wbm 0794	VirB6-2F	CCACAGCTCAGCAAAGAAAATATG G	131	51°C
		VirB6-2R	CGAACCGTGCATCCATGGGC		
VirB6-1	Wbm 0793	VirB6-1F	CAGGTTGTGATAAGCATGATATGCC	153	51°C
		VirB6-1R	CGCCAGTATCAGGGTCAATAATCTC		
VirB8	Wbm 0279	VirB8F	GATTAGCACTAGCAGCACTATTGAA	110	60°C
		VirB8R	CCTCATCCGCAGAATATTGTTT		
VirB9	Wbm 0280	VirB9F	TGTACAGCCCTAACGAAGTGTTT	109	60°C
		VirB9R	GATGCGTCTCCAACAGCAAT		
VirB10	Wbm 0281	VirB10F	CAAGAGTTGAAAGGAAAGTTGGAA C	105	60°C
		VirB10R	TTGTGGCATAGTAAGAGGAGGTAA A		

VirB11	Wbm 0282	VirB11F	CTGCACTTGACACATATTTAGAGCC	108	60°C
		VirB11R	CACTGCGATTTTCAATCCAGAC		
VirD4	Wbm 0283	VirD4F	TTCTGCATTGCCTGTTGTTG	109	60°C
		VirD4R	TTTTGAGTCTCCGTGGAGTGA		
VirB3- B4		VirB3- B4F	ACTTGGTTATATAGCTTCTG	223	52°C
		VirB3- B4R	GCAAGAATAAGGAATAAATT		
VirB4- B64		VirB4- B64F	GGACGTGCAGAGAGTGTCAT	224	60°C
		VirB4- B64R	GCTAACAAATTCCGTCTTGT		
VirB64- -B63		VirB64- B63F	GCTCTTGCATCTGGAAATGCTG	266	55°C
		VirB64- B63R	CAGCGATCTTCACAACCAG		
VirB63- -B62		VirB63- B62F	GGGTTAGACGAGGAAAGCGTTC	266	55°C
		VirB63- B62R	GGAACATCCACATTAACACTAG		
VirB62- -B61		VirB62- B61F	CCTGATGATGGGAAAGATGC	576	47°C
		VirB62- B61R	CGCCAGTATCAGGGTCAATAATCTC		
VirB8- B9		VirB8- B9F	TATAAGGAAAAACAAGATAG	220	52°C
		VirB8- B9R	TTTATTCTACTGTCTACGGA		
VirB9- B10		VirB9- B10F	TGGTAAACTAGACTGCCTT	220	60°C
		VirB9- B10R	TGATTAGAGCCAACTGTTAC		
VirB10- -B11		VirB10- B11F	CGAGATATAGTCAACAGATC	220	60°C
		VirB10- B11R	TTCTTTGGCTTATTTATTG		
VirB11- -D4		VirB11- D4F	CATATATTAGAAATGTGATT	220	48°C

VirD4- WSP	VirB11- D4R	AATAGAAACAAAATTCTAGT	525	60°C
	VirD4- WSPF	AAGATGTTGACGGGTTTGATG		
	VirD4- WSPR	ATAACCAAATGCCATGTTTGC		
VirB4	VirB4F pBAD	CACCTTGAAATTCAGAGCCATT	2355	52°C
	VirB4R pBAD	AACATTTTTTACCTTCTGATAA		

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Patient mit lymphatischer Filariose	13
Abb. 2: Lebenszyklus der Filarie <i>B. malayi</i>	15
Abb. 3: Querschnitt durch ein adultes <i>B. malayi</i> Weibchen	18
Abb. 4: Längsschnitt durch einen weiblichen <i>B. malayi</i> Wurm	19
Abb. 5: Aufbau des T4SS aus <i>A. tumefaciens</i>	24
Abb. 6: Genetische Anordnung der T4SS Komponenten in <i>A. tumefaciens</i>	25
Abb. 7: Genomische Anordnung der T4SS Komponenten in <i>A. tumefaciens</i> , <i>wBm</i> und <i>W. pipientis</i>	28
Abb. 8: Schematische Darstellung des APAAP-Verfahrens	54
Abb. 9: Schematische Anordnung des T4SS im Genom von Wolbachien aus <i>B. malayi</i>	56
Abb. 10: Transkriptionsnachweis der T4SS Komponenten	57
Abb. 11: Nachweis der polycistronischen Transkription des T4SS	58
Abb. 12: Co-Transkription von Operon 2 mit WSP	59
Abb. 13: Transkriptionsnachweis der T4SS Komponenten in <i>L. sigmodontis</i>	60
Abb. 14: Coomassie Färbung nach VirB4 Standardaufreinigung	63
Abb. 15: Coomassie Färbung und Western Blot nach optimierter Standardaufreinigung	65
Abb. 16: Nachweis der ATPase Aktivität von rekombinantem VirB4 in einem Malachite Green Phosphatassay	68
Abb. 17: APAAP Färbung von Längsschnitten weiblicher <i>B. malayi</i> Würmer, Vergrößerung 1:40	71
Abb. 18: APAAP Färbung von Längsschnitten weiblicher <i>B. malayi</i> Würmer, Vergrößerung 1:100	72
Abb. 19: Färbeartefakte nach APAAP Färbung von Längsschnitten weiblicher <i>B. malayi</i> Würmer, Vergrößerung 1:40	74
Abb. 20: Inhibition des T4SS durch Hemmung von VirB11	89

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilung der T4SS Komponenten in 2 Operone	27
Tab. 2: Verwendete Reaktionskits	30
Tab. 3: Verwendete Chemikalien	30
Tab. 4: Verwendete Enzyme	32
Tab. 5: Verwendete <i>E.coli</i> Bakterienstämme	32
Tab. 6: Verwendete Plasmide	33
Tab. 7: Verwendete Nährmedien	33
Tab. 8: Verwendete erworbene Puffer	34
Tab. 9: Verwendete sonstige Puffer	34
Tab. 10: Verwendete Antikörper	36
Tab. 11: Reaktionsansätze cDNA Synthese	40
Tab. 12: PCR Reaktionsansatz HotStarTaq Polymerase	41
Tab. 13: Gewähltes Reaktionsprogramm im Thermocycler für die HotStarTaq Polymerase	42
Tab. 14: PCR Reaktionsansatz VirB4	43
Tab. 15: Gewähltes Reaktionsprogramm im Thermocycler für die VirB4 PCR	43
Tab. 16: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel	47
Tab. 17: Standardbedingungen Phosphatassay	51
Tab. 18: Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford Assay	62

8. Literaturverzeichnis

Addiss D. The 6th Meeting of the Global Alliance to Eliminate Lymphatic Filariasis: A half-time review of lymphatic filariasis elimination and its integration with the control of other neglected tropical diseases. *Parasit Vectors* 2010; 3: e100

Alvarez-Martinez C, Christie P. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; 73: 775–808

Anderson LB, Hertzler V, Das A. *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 and VirB9 form a disulfide-linked protein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8889–8894

Arechaga I, Pen A, Zunzunegui S, Ferna C. ATPase Activity and Oligomeric State of TrwK, the VirB4 Homologue of the Plasmid R388 Type IV Secretion System. *J Bacteriol* 2008; 190: 5472–5479

Atmakuri K, Cascales E, Christie PJ. Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol* 2004; 54: 1199–1211

Bandi C, Trees AJ, Brattig NW. *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Vet Parasitol* 2001; 98: 215–238

Bao W, Kumagai Y, Niu H, Yamaguchi M, Miura K, Rikihisa Y. Four VirB6 paralogs and VirB9 are expressed and interact in *Ehrlichia chaffeensis*-containing vacuoles. *J Bacteriol* 2009; 191: 278–286

Baron C. VirB8: a conserved type IV secretion system assembly factor and drug target. *Biochem Cell Biol* 2006; 84: 890–899

Basáñez MG, Pion SDS, Churcher TS, Breitling LP, Little MP, Boussinesq M. River Blindness: A Success Story under Threat? *PLoS Med* 2006; 3: 1454 – 1460

Bazzocchi C, Jamnongluk W, O'Neill SL, Anderson TJ, Genchi C, Bandi C. *wsp* gene sequences from the *Wolbachia* of filarial nematodes. *Curr Microbiol* 2000; 41: 96–100

Berger BR, Christie PJ. Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* *virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *J Bacteriol* 1994; 176: 3646–3660

Burns DL. Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 29–34

Büttner DW, Wanji S, Bazzocchi C, Bain O, Fischer P. Obligatory symbiotic *Wolbachia* endobacteria are absent from *Loa Loa*. *Filaria J* 2003; 2: e10

Cascales E, Christie PJ. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1: 137–149

Cascales E, Christie PJ. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* 2004; 304: 1170–1173

Chen SN, Howells RE. *Brugia pahangi*: uptake and incorporation of nucleic acid precursors by microfilariae and macrofilariae in vitro. *Exp Parasitol* 1981; 51: 296–306

Cheng Z, Wang X, Rikihisa Y. Regulation of type IV secretion apparatus genes during *Ehrlichia chaffeensis* intracellular development by a previously unidentified protein. *J Bacteriol* 2008; 190: 2096–2105

Chirgwin SR, Coleman SU, Porthouse KH, Nowling JM, Punkosdy GA, Klei TR. Removal of *Wolbachia* from *Brugia pahangi* is closely linked to worm death and fecundity but does not result in altered lymphatic lesion formation in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Infect Immun* 2003; 71: 6986–6994

Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* 2005; 59: 451–485

Christie PJ. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1694: 219–234

Coulibaly Y, Dembele B, Diallo AA, Lipner EM, Doumbia SS, Coulibaly SY, Konate S, Diallo DA, Yalcouye D, Kubofcik J, Doumbo OK, Traore AK, Keita AD, Fay MP, Traore SF, Nutman TB, Klion AD. A randomized trial of doxycycline for *Mansonella perstans* infection. *N Engl J Med* 2009; 361: 1448–1458

Cross HF, Haarbrink M, Egerton G, Yazdanbakhsh M, Taylor MJ. Severe reactions to filarial chemotherapy and release of *Wolbachia* endosymbionts into blood. *Lancet* 2001; 358: 1873–1875

Dang T, Christie PJ. The VirB4 ATPase of *Agrobacterium tumefaciens* is a cytoplasmic membrane protein exposed at the periplasmic surface. *J Bacteriol* 1997; 179: 453–462

Debrah AY, Mand S, Marfo-Debrekyei Y, Batsa L, Albers A, Specht S, Klarmann U, Pfarr K, Adjei O, Hoerauf A. Macroparasiticide Activity in *Wuchereria bancrofti* after 2 Weeks Treatment with a Combination of Rifampicin plus Doxycycline. *J Parasitol Res* 2011; 2011: e201617

Desjardins C, Cerqueira GC, Goldberg JM, Dunning Hotopp JC, Haas BJ, Zucker J, Ribeiro JMC, Saif S, Levin JZ, Fan L, Zeng Q, Russ C, Wortman JR, Fink DL, Birren BW, Nutman TB. Genomics of *Loa loa*, a *Wolbachia*-free filarial parasite of humans. *Nat Genet* 2013; 45: 495–500

Félix C, Pichon S, Braquart-Varnier C, Braig H, Chen L, Garrett R, Martin G, Grève P. Characterization and transcriptional analysis of two gene clusters for type IV secretion machinery in *Wolbachia* of *Armadillidium vulgare*. *Res Microbiol* 2008; 159: 481–485

Fenn K, Blaxter M. *Wolbachia* genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism. *Trends Parasitol* 2006; 22: 60–65

Fischer K, Beatty WL, Jiang D, Weil GJ, Fischer PU. Tissue and stage-specific distribution of *Wolbachia* in *Brugia malayi*. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1174

Foster J, Ganatra M, Kamal I, Ware J, Makarova K, Ivanova N, Bhattacharyya A, Kapatral V, Kumar S, Posfai J, Vincze T, Ingram J, Moran L, Lapidus A, Omelchenko M, Kyrpides N, Ghedin E, Wang S, Goltsman E, Joukov V, Ostrovskaya O, Tsukerman K, Mazur M, Comb D, Koonin E, Slatko B. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biol* 2005; 3: 599–614

Ghedin E, Wang S, Spiro D, Caler E, Zhao Q, Crabtree J, Allen JE, Delcher AL, Guiliano DB, Miranda-Saavedra D, Angiuoli SV, Creasy T, Amedeo P, Haas B, El-Sayed NM, Wortman JR, Feldblyum T, Tallon L, Schatz M, Shumway M, Koo H, Salzberg SL, Schobel S, Perteua M, Pop M, White O, Barton GJ, Carlow CK, Crawford MJ, Daub J, Dimmic MW, Estes CF, Foster JM, Ganatra M, Gregory WF, Johnson NM, Jin J, Komuniecki R, Korf I, Kumar S, Laney S, Li BW, Li W, Lindblom TH, Lustigman S, Ma D, Maina CV, Martin DM, McCarter JP, McReynolds L, Mitreva M, Nutman TB, Parkinson J, Peregrín-Alvarez JM, Poole C, Ren Q, Saunders L, Sluder AE, Smith K, Stanke M, Unnasch TR, Ware J, Wei AD, Weil G, Williams DJ, Zhang Y, Williams SA, Fraser-Liggett C, Slatko B, Blaxter ML, Scott AL. Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science* 2007; 317: 1756–1760

Grobusch MP, Kombila M, Autenrieth I, Mehlhorn H, Kremsner PG. No evidence of *Wolbachia* endosymbiosis with *Loa loa* and *Mansonella perstans*. *Parasitol Res* 2003; 90: 405–408

Hare S, Bayliss R, Baron C, Waksman G. A large domain swap in the VirB11 ATPase of *Brucella suis* leaves the hexameric assembly intact. *J Mol Biol* 2006; 360: 56–66

Den Hartigh AB, Rolán HG, de Jong MF, Tsolis RM. VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system. *J Bacteriol* 2008; 190: 4427–4436

Hilleringmann M, Pansegrau W, Doyle M, Kaufman S, MacKichan ML, Gianfaldoni C, Ruggiero P, Covacci A. Inhibitors of *Helicobacter pylori* ATPase CagAlpha block CagA transport and cag virulence. *Microbiology* 2006; 152: 2919–2930

Hoerauf A, Mand S, Adjei O, Fleischer B, Buettner DW. Depletion of *wolbachia* endobacteria in *Onchocerca volvulus* by doxycycline and microfilaridermia after ivermectin treatment. *Lancet* 2001; 357: 1415–1416

Hoerauf A, Mand S, Volkmann L, Büttner M, Marfo-Debrekeye Y, Taylor M, Adjei O, Büttner DW. Doxycycline in the treatment of human onchocerciasis: Kinetics of *Wolbachia* endobacteria reduction and of inhibition of embryogenesis in female *Onchocerca* worms. *Microbes Infect* 2003; 5: 261–273

Hoerauf A, Nissen-Pähle K, Schmetz C, Henkle-Dührsen K, Blaxter ML, Büttner DW, Gallin MY, Al-qaoud KM, Lucius R, Fleischer B. Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Invest* 1999; 103: 11–17

Hoerauf A, Specht S, Büttner M, Pfarr K, Mand S, Fimmers R, Peter YM, Alexander K, Debrah Y, Bandi C, Brattig N, Albers A, Larbi J, Batsa L, Taylor MJ, Adjei O, Büttner DW. *Wolbachia* endobacteria depletion by doxycycline as antifilarial therapy has macrofilaricidal activity in onchocerciasis: a randomized placebo-controlled study. *Med Microbiol Immunol* 2008; 197: 295–311

Hoerauf A, Volkmann L, Hamelmann C, Adjei O, Autenrieth IB, Fleischer B, Büttner DW. Endosymbiotic bacteria in worms as targets for a novel chemotherapy in filariasis. *Lancet* 2000; 355: 1242–1243

Hoerauf A. Control of filarial infections: not the beginning of the end, but more research is needed. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 403–410

Hong PC, Tsolis RM, Ficht TA. Identification of Genes Required for Chronic Persistence of *Brucella abortus* in Mice. *Infect Immun* 2000; 68: 4102–4107

Höppner C, Liu Z, Domke N, Binns AN, Baron C. VirB1 orthologs from *Brucella suis* and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for efficient type IV secretion from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 2004; 186: 1415–1422

Hörauf A, Burchard GD. Filariose und Drakunkulose. In: Löscher T, Burchard GD, HRSG, *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. Stuttgart: 2010: 740–769

Hotopp JCD, Lin M, Madupu R, Crabtree J, Angiuoli SV, Eisen J, Seshadri R, Ren Q, Wu M, Utterback TR, Smith S, Lewis M, Khouri H, Zhang C, Niu H, Lin Q, Ohashi N, Zhi N, Nelson W, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sundaram J, Daugherty SC, Davidson T, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Selengut JD, Sullivan SA, Zafar N, Zhou L, Benahmed F, Forberger H, Halpin R, Mulligan S, Robinson J, White O, Rikihisa Y, Tettelin H. Comparative Genomics of Emerging Human Ehrlichiosis Agents. *PLoS Genet* 2006; 2: 208–223

Jakubowski SJ, Cascales E, Christie PJ, Krishnamoorthy V. *Agrobacterium tumefaciens* VirB9, an Outer-Membrane-Associated Component of a Type IV Secretion System, Regulates Substrate Selection and T-Pilus Biogenesis. *J Bacteriol* 2005; 187: 3486–3495

Jakubowski SJ, Krishnamoorthy V, Cascales E, Christie PJ. *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion System. *J Mol Biol* 2004; 341: 961–977

De Jong MF, Sun YH, den Hartigh AB, van Dijl JM, Tsolis RM. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol* 2008; 70: 1378–1396

Judd PK, Kumar RB, Das A. Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus. *PNAS* 2005;102: 11498–11503

Keiser PB, Reynolds SM, Awadzi K, Ottesen EA, Taylor MJ, Nutman TB. Bacterial endosymbionts of *Onchocerca volvulus* in the pathogenesis of posttreatment reactions. *J Infect Dis* 2002; 185: 805–811

Kozek WJ. Transovarially-transmitted intracellular microorganisms in adult and larval stages of *Brugia malayi*. *J Parasitol* 1977; 63: 992–1000

Kratz F. Klonierung und Untersuchung der Wolbachia Proteine VirB4, VirB11 und VirD4 auf ihre ATPase Funktion, Bachelorarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2011

Kyelem D, Sanou S, Boatin B, Medlock J, Coulibaly S, Molyneux DH. Impact of long-term ivermectin (Mectizan) on *Wuchereria bancrofti* and *Mansonella perstans* infections in Burkina Faso: strategic and policy implications. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 69: 509–514

Landmann F, Foster JM, Slatko B, Sullivan W. Asymmetric Wolbachia segregation during early *Brugia malayi* embryogenesis determines its distribution in adult host tissues. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4: e758

Lentz CS, Halls V, Hannam JS, Niebel B, Strübing U, Mayer G, Hoerauf A, Famulok M, Pfarr KM. A selective inhibitor of heme biosynthesis in endosymbiotic bacteria elicits antifilarial activity in vitro. *Chem Biol* 2013; 20: 177–187

Li Z, Carlow CKS. Characterization of Transcription Factors That Regulate the Type IV Secretion System and Riboflavin Biosynthesis in Wolbachia of *Brugia malayi*. *PLoS One* 2012; 7: e51597

Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C, Bandi C. How Many Wolbachia Supergroups Exist? *Mol Biol Evol* 2002; 19: 341–346

Mand S, Pfarr K, Sahoo PK, Satapathy AK, Specht S, Klarmann U, Debrah AY, Ravindran B, Hoerauf A. Macroparasiticide Activity and Amelioration of Lymphatic Pathology in Bancroftian Filariasis after 3 Weeks of Doxycycline Followed by Single-Dose Diethylcarbamazine. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81: 702–711

Masui S, Sasaki T, Ishikawa H. Genes for the Type IV Secretion System in an Intracellular Symbiont, *Wolbachia*, a Causative Agent of Various Sexual Alterations in Arthropods. *J Bacteriol* 2000; 182: 6529–6531

McGarry HF, Egerton GL, Taylor MJ. Population dynamics of *Wolbachia* bacterial endosymbionts in *Brugia malayi*. *Mol Microbiol Parasitol* 2004; 135: 57–67

McLaren DJ, Worms MJ, Laurence BR, Simpson MG. Micro-organisms in filarial larvae (Nematoda). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1975; 63: 992–1000

Melnikow E, Xu S, Liu J, Lin L, Oksov Y, Ghedin E, Unnasch TR, Lustigman S. Interaction of a *Wolbachia* WSP-like protein with a nuclear encoded protein of *Brugia malayi*. *Int J Parasitol* 2011; 41: 1053–1061

O'Callaghan D, Cazevieille C, Allardet-Servent A, Boschioli ML, Bourg G, Foulongne V, Frutos P, Youri K, Ramuz M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol* 1999; 33: 1210–1220

Ohashi N, Zhi N, Lin Q, Rikihisa Y. Characterization and Transcriptional Analysis of Gene Clusters for a Type IV Secretion Machinery in Human Granulocytic and Monocytic Ehrlichiosis Agents. *Infect Immun* 2002;70: 2128–2138

Pichon S, Bouchon D, Cordaux R, Chen L, Garrett RA, Grève P. Conservation of the Type IV Secretion System throughout *Wolbachia* evolution. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385: 557–562

Pschyrembel. *Brugia malayi*. In: de Gruyter W, Dörner T, Feldkamp J, Kunze J, Pfitzmann R, Radke M, Schönberger B, Springer G, Straube E, Straube W HRSG. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch* 260. Auflage. Berlin: Walter de Gruyter, 2004: 268

Rancès E, Voronin D, Tran-Van V, Mavingui P. Genetic and functional characterization of the type IV secretion system in *Wolbachia*. *J Bacteriol* 2008; 190: 5020–5030

Rangrez AY, Abajy MY, Keller W, Shouche Y, Grohmann E. Biochemical characterization of three putative ATPases from a new type IV secretion system of *Aeromonas veronii* plasmid pAC3249A. *BMC Biochem* 2010; 11:e10

Rashkova S, Zhou X, Chen JUN, Christie PJ. Self-Assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 Traffic ATPase. *J Bacteriol* 2000; 182: 4137–4145

Scott AL, Ghedin E, Nutman TB, Reynolds LAMC, Poole CB, Slatko BE, Foster JM. Filarial and *Wolbachia* genomics. *Parasite Immunol* 2012; 34: 121–129

Slatko BE, Taylor MJ, Foster JM. The *Wolbachia* endosymbiont as an anti-filarial nematode target. *Symbiosis* 2010; 51: 55–65

Spudich GM, Fernandez D, Zhou XR, Christie PJ. Intermolecular disulfide bonds stabilize VirB7 homodimers and VirB7/VirB9 heterodimers during biogenesis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus. *PNAS* 1996; 93: 7512–7517

Strübing U, Lucius R, Hoerauf A, Pfarr KM. Mitochondrial genes for heme-dependent respiratory chain complexes are up-regulated after depletion of *Wolbachia* from filarial nematodes. *Int J Parasitol* 2010; 40: 1193–1202

Taylor MJ, Bandi C, Hoerauf A. *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv Parasitol* 2005; 60: 245–284

Taylor MJ, Hoerauf A, Bockarie M. Lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Lancet* 2010; 376: 1175–1185

Taylor MJ, Hoerauf A. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitol Today* 1999; 15: 437–442

The Australian Society for Parasitology, 2015: *Brugia malayi* (Pathologie). http://parasite.org.au/pugh-collection/Brugia_malayi_28pathology%29_08.jpg_Index.html (Zugriffdatum: 01.06.2015)

Voronin D, Guimarães AF, Molyneux GR, Johnston KL, Ford L, Taylor MJ. *Wolbachia* lipoproteins: abundance, localisation and serology of *Wolbachia* peptidoglycan associated lipoprotein and the Type IV Secretion System component, VirB6 from *Brugia malayi* and *Aedes albopictus*. *Parasit Vectors* 2014; 7: e462

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha and beta subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1982; 1: 945–951

Walldén K, Williams R, Yan J, Lian PW, Wang L, Thalassinou K, Orlova EV, Waksman G. Structure of the VirB4 ATPase, alone and bound to the core complex of a type IV secretion system. *PNAS* 2012; 109: 11348–11453

Ward JE, Akiyoshi DE, Regier D, Datta A, Gordon MP, Nester EW. Characterization of the *virB* operon from an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J Biol Chem* 1988; 263: 5804–5814

Werren JH. Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol* 1997; 42: 587–609

World Health Organisation, 2014: Weekly epidemiological record meeting of the international task Force for disease eradication, January 2014. <http://www.who.int/wer/2014/wer8915.pdf> (Zugriffdatum: 24.07.2014)

World Health Organization, 2013: Weekly epidemiological record- global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report for 2012. <http://www.who.int/wer/2013/wer8837.pdf> (Zugriffdatum: 24.07.2014)

Wu B, Novelli J, Foster J, Vaisvila R, Conway L, Ingram J, Ganatra M, Rao AU, Hamza I, Slatko B. The heme biosynthetic pathway of the obligate *Wolbachia* endosymbiont of *Brugia malayi* as a potential anti-filarial drug target. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3: e475

Wu M, Sun L V., Vamathevan J, Riegler M, Deboy R, Brownlie JC, McGraw EA, Martin W, Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C, Madupu R, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, Durkin AS, Kolonay JF, Nelson WC, Mohamoud Y, Lee P, Berry K, Young MB, Utterback T, Weidman J, Nierman WC, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, O'Neill SL, Eisen JA. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biol* 2004; 2: e69

Yuan Q, Carle A, Gao C, Sivanesan D, Aly KA, Höppner C, Krall L, Domke N, Baron C. Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J Biol Chem* 2005; 280: 26349–26359

9. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Hörauf für die Überlassung des Themas bedanken.

Vielen Dank auch an das BONFOR Forschungsförderprogramm, das meine Promotion in diesem Rahmen erst ermöglicht hat.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Betreuerin Frau Dr. Dr. Gentil, welche mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat und für mich immer ein großes Vorbild war und ist. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Gentil für die schöne und angenehme Zeit im Labor.

Mein Dank gilt auch meiner Familie, Sebastian und meinen Freunden: ohne euch wäre ich nicht an diesen Punkt gelangt! Es ist ein Glück, dass ihr in meinem Leben seid!