**Die vollständige Entschlüsselung der Genomsequenz
des Tetanus-Erregers *Clostridium tetani*
und die Analyse seines genetischen Potentials**

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

vorgelegt von
Holger Brüggemann
aus Neuenhaus

Göttingen, 2002

D7

Referent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Korreferent: Prof. Dr. B. Bowien

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2003

meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
-----------------------	-----

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	5
2.1	Organismen und Plasmide	5
2.2	Nährmedien, Puffer und Stammlösungen	6
2.2.1	Komplexmedium für <i>C. tetani</i>	6
2.2.2	Medien für <i>E. coli</i>	7
2.2.2.1	LB (Luria-Bertani)-Medium	7
2.2.2.2	TB-Medium	7
2.2.3	Medienzusätze	7
2.2.4	Stamm- und Pufferlösungen	8
2.3	Zellanzucht und Stammhaltung	8
2.3.1	Zellanzucht von <i>C. tetani</i>	8
2.3.2	Zellanzucht von <i>E. coli</i>	9
2.3.3	Stammhaltung	9
2.3.4	Reinheitskontrolle	10
2.4	Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	10
2.4.1	Behandlung von Geräten und Lösungen	10
2.4.2	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	10
2.4.2.1	Phenol/Chloroform-Extraktion	10
2.4.2.2	Fällung von Nukleinsäuren	10
2.4.2.3	Mikrodialyse von DNA	11
2.4.3	Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von DNA	11
2.4.4	Standard-Agarose-Gelelektrophorese	12
2.4.5	Größenbestimmung von Nukleinsäuren	13

2.5	Isolierung von Nukleinsäuren	14
2.5.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>C. tetani</i> mit dem AquaPure®-Kit	14
2.5.2	Isolierung genomischer DNA nach MARMUR, 1961	15
2.5.3	Isolierung von Plasmid-DNA	16
2.5.3.1	Isolierung von Plasmiden mit sehr niedriger Kopienzahl/Zelle	16
2.5.3.2	Schnellpräparation von Plasmid-DNA	18
2.5.3.3	Robotgesteuerte Plasmidpräparation	18
2.5.4	Robotgesteuerte Cosmidpräparation	19
2.5.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	20
2.5.6	Aufreinigung von PCR-Produkten	20
2.6	Enzymatische Modifikation von DNA	20
2.6.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	20
2.6.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	21
2.6.3	Herstellung von glatten Enden ("blunt ends") und Phosphorylierung von 5'-Hydroxyl-Enden bei DNA-Fragmenten	21
2.6.4	Ligation von DNA-Fragmenten	22
2.7	Übertragung von DNA in <i>E. coli</i> und Selektion rekombinanter Klone	23
2.7.1	Transformation in <i>E. coli</i> durch Elektroporation	23
2.7.2	Blau-Weiß-Test zur Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone	24
2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.9	Herstellung von Genbanken	26
2.9.1	Herstellung einer Plasmid-Genbank	26
2.9.2	Herstellung einer Cosmid-Genbank	28
2.10	Sequenzierung von DNA	31
2.10.1	Sequenzierung mit ABI DNA Sequencer 377	32
2.10.2	Sequenzierung mit dem MegaBACE 1000 Capillar Sequencer	34

2.11	Die Prozessierung von Rohsequenzen	35
2.11.1	Einführung in die Prozessierung von Rohsequenzen mittels des STADEN-Software-Pakets	35
2.11.1.1	Pregap4	36
2.11.1.2	Gap4	37
2.12	Methoden zur Überwindung von Sequenzlücken in einem Genomsequenzierungsprojekt	38
2.12.1	Identifikation von Contigüberlappen mit Gap4 oder BLASTN	38
2.12.2	Primer-Walking	38
2.12.3	PCR-basierte Methoden	39
2.12.4	Lückenschluss unter Zuhilfenahme der Genomannotation	40
2.13	Sequenzanalyse	41
2.13.1	ORF-Vorhersage	41
2.13.2	Genomweite Annotation mit ERGO	42
2.14	Standardtechniken zum Arbeiten mit Proteinen	45
2.14.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	45
2.14.2	Bestimmung der Molekularmassen von Proteinen	45
2.14.3	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Proteinen	46
2.14.4	Silberfärbung (BLUM et al., 1987)	48
2.15	Chemikalien, Enzyme und Gase	50
3.	Experimente und Ergebnisse	52
3.1	Sequenzierung des Plasmids pE88 aus <i>C. tetani</i> E88	52
3.1.1	Isolierung des Plasmids pE88 aus <i>C. tetani</i> E88	52
3.1.2	Strategie der Sequenzierung von pE88	54
3.2	Analyse der Sequenz des Plasmids pE88	55
3.2.1	ORF-Vorhersage für pE88	55

3.2.2	Annotation der Plasmidsequenz: genetische Karte und Annotationstabelle	57
3.2.3	Allgemeine Merkmale der Plasmidsequenz	61
3.2.4	Analyse zur Identifikation des Replikationsursprungs	61
3.2.5	Toxine auf pE88: Tetanus-Toxin und Collagenase	63
3.2.6	Regulatorische Funktionen	64
3.2.6.1	TetR, der Transkriptionsaktivator des Tetanus-Toxins	64
3.2.6.2	Regulatorische Proteine mit Homologien zu RNA-Polymerase-Sigmafaktoren	65
3.2.6.3	Zwei-Komponenten-System	70
3.2.7	Transportfunktionen	73
3.2.8	Replikationsfunktionen und mobile Elemente	77
3.2.8.1	Replikationsproteine	77
3.2.8.2	Mobile Elemente	78
3.2.9	Sonstige Funktionen	79
3.2.9.1	23S rRNA(Guanin-N1)-Methyltransferase	79
3.2.9.2	Aminopeptidasen	79
3.3	Sequenzierung des Chromosoms von <i>C. tetani</i> E88	81
3.3.1	Sequenzierungsstrategie: Die Shotgun-Methode	81
3.3.2	Phase 1: Rohsequenzierung und Assemblierung	82
3.3.3	Phase 2: Editierung und Primer-Walking	85
3.3.3.1	Auflösung fehlerhafter Assemblierungen	86
3.3.3.2	Editierung der Consensus-Sequenz	87
3.3.3.3	Primer-Walking über Sequenzlücken	88
3.3.3.4	Lückenschluss mittels Abgleich der Contigenden	88
3.3.4	Phase 3: Schließen verbleibender Sequenzlücken	88
3.3.4.1	Lückenschluss unter Zuhilfenahme einer Cosmid-Genbank	89
3.3.4.2	Lückenschluss unter Zuhilfenahme der kombinatorischen PCR-Technik	90
3.3.4.3	Lückenschluss unter Zuhilfenahme der genomweiten Annotation	90
3.3.4.4	Die letzten Sequenzlücken in Regionen repetitiver DNA-Abschnitte	91

3.4	Sequenzanalyse des Chromosoms von <i>C. tetani</i> E88	95
3.4.1	Allgemeine Merkmale der Sequenz des Chromosoms	95
3.4.2	ORF-Vorhersage	96
3.4.3	Übersicht über die Annotation des Chromosoms	97
3.4.4	Identifizierung des Replikationsursprungs	99
3.4.5	Toxine und weitere Virulenzfaktoren	103
3.4.5.1	Bekannte Virulenzfaktoren	103
3.4.5.2	Zelloberflächenproteine	104
3.4.6	Metabolismus 1: Substratverwertung	106
3.4.6.1	Vergärung von Zuckern: Glykolyse und Pentosephosphat-Weg	107
3.4.6.2	Vergärung von Aminosäuren	107
3.4.6.3	Verwertung von Lipiden	109
3.4.7	Metabolismus 2: Verstoffwechselung von Pyruvat	110
3.4.7.1	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	110
3.4.7.2	Der Butyrat-Weg	111
3.4.8	Bioenergetik 1: Substratkettenphosphorylierung	112
3.4.9	Bioenergetik 2: Membrangebundene Prozesse	113
3.4.9.1	Das Nqr/Rnf-System	114
3.4.9.2	V-Typ-ATPasen	115
3.4.9.3	Das NatAB-System	116
3.4.9.4	V-Typ- H^+ -Pyrophosphatase	117
3.4.9.5	H^+/Na^+ -Antiporter	117
3.4.9.6	Das Mrp-ähnliche System	117
3.4.9.7	Zwischenfazit	119
3.4.10	Weitere membranassoziierte Komplexe	119
3.4.10.1	Fumarat-Reduktasen	119
3.4.10.2	CO-Dehydrogenase-System und Häm-Oxygenase	120
3.4.11	Transportsysteme	122
3.4.11.1	ABC-Transporter	123
3.4.11.2	Membranpotential-abhängige Transporter	124
3.4.12	Systeme des Proteinexports und exportierte Proteine	125
3.4.13	Regulatorische Funktionen	129
3.4.13.1	Transkriptionsregulatoren	129
3.4.13.2	Zwei-Komponenten-Systeme	130

3.4.13.3	RNA-Polymerase-Sigmafaktoren	133
3.4.14	Mobile Elemente und Prophagen	135
4.	Diskussion	137
4.1	Vergleichende Sequenzanalyse der Genome von pathogenen und nicht-pathogenen Clostridien	137
4.1.1	Stand der Genomforschung von Organismen der Gattung <i>Clostridium</i>	137
4.1.2	Verwandtschaft clostridieller Genome	139
4.1.2.1	Phylogenetische Betrachtungen anhand von 16 S rRNA-Sequenzen	139
4.1.2.2	Phylogenetische Betrachtungen anhand von Triosephosphat-Isomerase- und Elongationsfaktor EF-Tu-Sequenzen	140
4.1.3	Genomweiter Vergleich von <i>C. acetobutylicum</i> und <i>C. perfringens</i> mit <i>C. tetani</i>	143
4.1.3.1	Vergleich der Genome auf Proteinebene	143
4.1.3.2	Kandidaten-Gene für eine pathogene Lebensweise clostridieller Organismen	146
4.1.3.3	Kandidaten-Gene für Tetanus-spezifische Funktionen	148
4.1.4	Natrium-abhängige Prozesse in <i>C. tetani</i>	150
4.1.4.1	Mögliche Involvierung des Nqr/Rnf-Systems in die Na ⁺ -Bioenergetik	151
4.1.4.2	Na ⁺ -Bioenergetik und Virulenz	154
4.2	Aspekte des genetischen Potentials von <i>C. tetani</i>	156
4.2.1	Pathogenitätsfaktoren	156
4.2.1.1	Tetanus-Toxin	156
4.2.1.2	Collagenase	159
4.2.1.3	Tetanolysin O	162
4.2.1.4	S-Layer-Proteine als möglicher Virulenzfaktoren	166
4.2.2	Übersicht über die metabolischen Fähigkeiten sowie andere zelluläre Funktionen	172

4.3	Ausblick	175
5.	Zusammenfassung	176
6.	Literaturverzeichnis	180

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-bindende Kassette, ATP-binding cassette
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
As	Aminosäure(n)
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BD	Big dye [®]
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTN	BLAST auf Nukleotidebene
BLASTP	BLAST auf Proteinebene
BoNT	Botulinus-Toxin(e)
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
C	Cytosin
ca.	circa
cm	Zentimeter
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
CTC	<i>C. tetani</i> -Chromosom
CTP	<i>C. tetani</i> -Plasmid
C-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton
d. h.	das heißt
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
E-Cup	Eppendorf-Reaktionsgefäß

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri, und andere
Fa.	Firma
FAD	Flavinadenindinukleotid
FeS-Cluster	Eisen-Schwefel-Cluster
FMN	Flavinmononucleotid
g	Gramm
G	Guanin
GABA	γ -Aminobutyrat
Gap	Genomassemblierungsprogramm, genome assembly program
GLIMMER	Gene Locator and Interpolated Markov Modeler
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
x g	-fache Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)
h	Stunde
H ⁺	Proton(en)
Hrsg.	Herausgeber
HPLC	high performance liquid chromatography
i. d. R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
IS	Insertionssequenz(en)
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
l	Liter
LB	Luria-Bertani
μ	Mikro
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
M	Molar (Mol pro Liter); Mega (10^6)
m	Meter; milli- (10^{-3})
MCS	multiple Klonierungsstelle, multiple cloning site
min	Minute
mol	Mol
n	Nano

<i>N.</i>	<i>Neisseria</i>
Na ⁺	Natrium
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCTC	National Collection of Type Cultures
Nqr	NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase
Nr.	Nummer
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen, open reading frame
PCR	Polymerasekettenreaktion, polymerase chain reaction
PFAM	Datenbank für Protein-Familien und Hidden-Markov-Modelle
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
Rnf	<i>Rhodobacter</i> specific nitrogen fixation
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Sa.</i>	<i>Salmonella</i>
s.	siehe
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekretion
S-Layer	Zelloberfläche, Surface-Layer
sp.	species
<i>T.</i>	<i>Thermoanaerobacter</i>
T	Thymin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamid
TeTx	Tetanus-Toxin
T _m	Schmelztemperatur
TM	transmembrane Helix/Helices
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan

U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ü. N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
<i>V.</i>	<i>Vibrio</i>
V	Volt
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
V-Typ	vakuolärer Typ
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galactosid
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

Die Entschlüsselung kompletter Genome ist erst seit einigen Jahren durch die Entwicklung neuer, halbautomatischer DNA-Sequenziermaschinen möglich geworden. Die Sequenzierung der Genome humanpathogener Bakterien hat dabei einen besonderen Stellenwert, da die Genomsequenz und das daraus abgeleitete genetische Potential wichtige Erkenntnisse in Bezug auf die Entstehung und Ausprägung der Pathogenität eines Erregers vermitteln. Diese Erkenntnisse können direkt zur Entwicklung effizienter Abwehrstrategien gegen Erreger genutzt werden; sie kommen letztlich über neue Therapien betroffenen Patienten zugute.

Im Rahmen dieser Arbeiten sollte das Genom des humanpathogenen Erregers *Clostridium tetani* vollständig sequenziert werden. *C. tetani* ist der Verursacher der Tetanus-Krankheit, gemeinhin auch Wundstarrkrampf genannt. Diese Erkrankung ist weltweit verbreitet und kann sowohl bei Menschen wie auch bei Wirbeltieren auftreten. Sie ist zudem schon sehr lange bekannt, die ältesten überlieferten Befunde dieser Krankheit stammen aus dem 4. Jahrhundert vor der Zeitrechnung (TIZZONI & CATTANI, 1890). Die Manifestation der Krankheit, die spastische Paralyse, wird durch ein von *C. tetani* gebildetes Gift ausgelöst, dem Tetanus-Toxin, auch Tetanospasmin genannt. Dieses Neurotoxin ist nach dem Botulinus-Toxin - gebildet durch den nah verwandten Organismus *C. botulinum* - die zweitgiftigste aller der Menschheit bekannten Substanzen. Die letale Dosis beträgt etwa 1 ng/kg Körpergewicht (GILL, 1982). Glücklicherweise gibt es seit etwa 1940 einen hochwirksamen Impfstoff, das Tetanus-Toxoid, ein durch Formaldehyd-Behandlung inaktiviertes Tetanus-Toxin, welches in einem Fermentationsprozess aus einer *C. tetani*-Kultur gewonnen wird (WASSILAK et al., 1999). Nahezu jeder Mensch der industrialisierten Welt wird mehrmals in seinem Leben gegen Tetanus geimpft. So treten Tetanus-Fälle in diesen Ländern nur sporadisch auf. In Entwicklungsländern allerdings gibt es laut einer Studie der WHO (Weltgesundheitsorganisation) über 400000 Fälle pro Jahr, in erster Linie Fälle von neonatalem Tetanus (WHO, 2000). Bei dieser Art des Tetanus infizieren sich Neugeborene von nicht geimpften Müttern aufgrund mangelnder Hygiene. Die Tetanus-Krankheit fordert jährlich nach Schätzungen etwa 280000 Todesopfer. Laut WHO ist diese Erkrankung bei Kindern die zweithäufigste

Todesursache unter den durch Vakzination kontrollierbaren Krankheiten weltweit. Sie wird zudem in etwa 90 Entwicklungsländern als endemisch angesehen (WHO, 2000).

Der Tetanus-Erreger *C. tetani* ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges Bakterium, dessen natürliche Habitate der Boden und der Intestinaltrakt vieler Tiere sind. Der Organismus gehört zur Gattung *Clostridium*, deren Vertreter definitionsgemäß Sporen bilden können, hauptsächlich einen anaeroben Gärungsstoffwechsel betreiben und nicht zur dissimilatorischen Sulfatreduktion befähigt sind (BERGEY et al., 1923; GOTTSCHALK et al., 1981). Die sehr heterogene Gattung besteht aus etwa 120 Arten, wobei 35 Vertreter einen pathogenen Phänotyp ausprägen können, darunter der Erreger von Gasgangrän, *C. perfringens*, und der Verursacher des Botulismus, eine durch *C. botulinum* verursachte Lebensmittelvergiftung (STACKEBRANDT & RAINEY, 1997).

Der Kenntnisstand bezüglich *C. tetani* erschöpft sich im wesentlichen in der Erforschung der Tetanus-Krankheit, insbesondere im Hinblick auf den Aufbau und die Wirkungsweise des Tetanus-Toxins. Es ist bekannt, dass die Tetanus-Krankheit meistens als Folge einer Wundinfektion auftritt. Sporen gelangen in die unsaubere Wunde, keimen dort in anaeroben Zonen aus, vegetative Zellen entstehen und vermehren sich (ARNON, 1997). Schließlich wird durch bisher nicht verstandene Prozesse die Bildung des Tetanus-Toxins ausgelöst. Das Toxin bindet spezifisch an Ganglioside neuronaler Membranen, wird internalisiert und gelangt dann retrograd zu seinem eigentlichen Wirkungsort, den Synapsen von inhibitorischen Interneuronen des Knochenmarks sowie des Stammhirns (SCHIAVO & MONTECUCCO, 1997). Dort verhindert das Toxin die Freisetzung von Neurotransmittern wie γ -Aminobutyrat (GABA) und Glycin von der präsynaptischen Membran. Das geschieht durch die proteolytische Spaltung von Synaptobrevin-II, einem essentiellen Protein für die Fusion von Neurotransmitter-enthaltenden Vesikeln mit der präsynaptischen Membran (SCHIAVO et al., 1992). Die daraus resultierende Ausschaltung der Nervenenden verhindert, dass sich angeschlossene Muskeln entspannen können, wodurch also eine kontinuierliche Muskelkontraktion herbeigeführt wird. Die Inkubationszeit einer Tetanus-Erkrankung beträgt in der Regel 2 bis 14 Tage, bevor die ersten Symptome, eine Muskelverhärtung im Kiefer- und im Nackenbereich, auftreten. Schließlich kontrahieren die Muskeln des gesamten Körpers. Im Endstadium verkrampft sich der Körper häufig zur Opisthotonos-Position (Abb. 1).

Erwähnt sei an dieser Stelle, dass das dem Tetanus-Toxin in Struktur und Wirkungsweise sehr ähnliche und etwa 10 mal giftigere Botulinus-Toxin mittlerweile als Medikament (BOTOX[®] bzw. Dysport[®]) zum Einsatz kommt (MOORE, 1995). Da das Botulinus-Toxin auf Nervenenden an der motorischen Endplatte wirkt, wodurch die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin unterbunden wird, hat es die Verhinderung der Muskelkontraktion zur Folge und kann damit - in geringsten Mengen - als muskelkrampflösende Substanz eingesetzt werden. Anwendungsgebiete sind Fälle von Muskelüberreaktionen und verschiedenste Formen der Dystonie bis hin zur kosmetischen Anwendung gegen Altersfalten (ARNON, 1997).

Genetische Informationen über *C. tetani* waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit kaum vorhanden. Es war bekannt, dass das Gen des Tetanus-Toxins, *tetX*, im Stamm Massachusetts auf dem ca. 75 kb großen Plasmid pCL1 liegt (FINN et al., 1984). Im Jahre 1986 konnte schließlich die Nukleotidsequenz von *tetX* entschlüsselt werden (EISEL et al., 1986; FAIRWEATHER & LYNESS, 1986). 12 Jahre später wurde ein weiteres, unmittelbar stromaufwärts zum *tetX* gelegenes Gen des Plasmids pCL1 sequenziert, genannt *tetR* (MARVAUD et al., 1998a). Es konnte experimentell belegt werden, dass es sich bei TetR um den Transkriptionsaktivator des Tetanus-Toxins handelt. Hinsichtlich des Chromosoms war lediglich ein Gen bekannt; es kodiert für das Cholesterol-abhängige Cytolysin Tetanolysin O, ein Protein, das in multimerer Form Poren in cholesterolphaltigen Membranen bildet und damit die Integrität der betreffenden Zelle zerstören kann (TWETEN, 1997; CERRATO et al., 2000).

Auch waren zu Beginn der Arbeiten keine clostridiellen Genomsequenzen bekannt. Das änderte sich aber: so wurde im Jahre 2001 das Genom von *C. acetobutylicum* veröffentlicht, einem nicht-pathogenen Organismus, der Lösungsmittel wie Aceton oder Butanol produzieren kann (NÖLLING et al., 2001). Des weiteren erschien im Jahre 2002 die Genomsequenz von *C. perfringens* (SHIMIZU et al., 2002). So eröffnete sich die Möglichkeit, die im Rahmen dieser Arbeit entschlüsselte Genomsequenz von *C. tetani* mit diesen beiden clostridiellen Genomen zu vergleichen. Zuvor sollten das Genom von *C. tetani* nach kodierender Sequenz abgesucht und die aus den Genen abgeleiteten Proteine mittels bioinformatischer Methoden charakterisiert werden. Die Analyse des genetischen Potentials von *C. tetani* sowie die vergleichende Genomanalyse hatte das Ziel, Informationen hinsichtlich der pathogenen Lebens-

weise von Clostridien im allgemeinen und von *C. tetani* im speziellen zu gewinnen. Dadurch sollten Hinweise dazu erhalten werden, wie sich der Lebenswandel von einem harmlosen Bodenbakterium zu einem potentiell tödlichen Nervensystem-schädigenden Organismus vollzieht. Ein besonderes Augenmerk sollte auf die Identifizierung möglicher Virulenzfaktoren sowie auf regulatorische Systeme geworfen werden, welche die Bildung des Tetanus-Toxins kontrollieren könnten.

Abb. 1: Sir Charles Bells Porträt eines an Tetanus erkrankten Mannes

Zu sehen ist die verkrampfte Haltung des Körpers (Opisthotonos) im Endstadium der Krankheit. Das Original dieses Bildes aus dem Jahre 1821 befindet sich im ‚Royal College of Surgeons‘ in Edinburgh, Schottland.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

Die im Rahmen der experimentellen Arbeiten dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Tabelle 2 listet die verwendeten Klonierungsvektoren sowie die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Plasmide und Cosmide auf.

Tabelle 1: Verwendete Organismen

Stamm	relevanter Geno-/Phänotyp & Kommentare	Referenz/Herkunft
<i>Clostridium tetani</i> E88	toxisch, Derivat des Stammes Massachusetts	Firma Chiron Behring GmbH & Co
<i>Clostridium tetani</i> E4222	nicht-toxisch, Krankenhaus-Isolat	isoliert von G. Schallehn; WILDE et al., 1989 (DSM 11745)
<i>Clostridium tetani</i> NCTC279	NCTC 279 - USA II (ATCC 19406) / Typstamm	isoliert 1920 von G. F. Petrie, Lister Institute, Paris
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80d, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , (r _K -m _K ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , λ^- , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA</i> ⁻ <i>argF</i>)U169	HANAHAN, 1983
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>hsdF</i> , <i>gal</i> (λ CIts857, <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5</i> - <i>T7gene1</i>)	STUDIER & MOFFAT, 1986

Tabelle 2: Vektoren und rekombinante Plasmide und Cosmide

Plasmid/ Cosmid	Größe des Plasmids (kb)	relevante Merkmale	Referenz/ Herkunft
pTZ19R	2,8	<i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r	Fa. Fermentas
pTZ19R ^{Cm}	3	<i>lacZ</i> , MCS, Cm ^r	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Christmann
ctaa01- ctpz96	4-6	Shotgun-Genbanken: genomische DNA aus <i>C. tetani</i> in pTZ19R ^(Cm)	diese Arbeit
superCos1 (sCos1)	7,9	Amp ^r ; Kan ^r ; <i>cos</i>	Fa. Stratagene
ctsa01- ctsd50	35-48	Cosmid-Genbank: genomische DNA aus <i>C. tetani</i> in sCos1	diese Arbeit

2.2 Nährmedien, Puffer und Stammlösungen

Alle aufgeführten Medien wurden durch Autoklavieren für 30 min bei 121 °C sterilisiert. Die C-Quellen, i. d. R. Glucose, wurden separat autoklaviert oder sterilfiltriert und dem Medium unmittelbar vor dem Animpfen steril zugegeben. Anaerobe Medien wurden nach der von COSTILOW (1981) beschriebenen Methode unter Begasung mit sauerstofffreiem Stickstoff hergestellt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar zugefügt.

2.2.1 Komplexmedium für *C. tetani*

Die *C. tetani*-Stämme wurden im Komplexmedium angezogen (MARVAUD et al., 1998).

Trypton	30 g
Hefeextrakt	20 g
Cystein-HCl	0,5 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Dem Medium wurde Glucose in einer Endkonzentration von 5 g/l zugesetzt.

2.2.2 Medien für *E. coli*

2.2.2.1 LB (Luria-Bertani)-Medium (SAMBROOK et al., 1989)

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

2.2.2.2 TB-Medium

Trypton	12 g
Hefeextrakt	24 g
Glycerin (87%, v/v)	4 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

2.2.3 Medienzusätze

Antibiotika-Stammlösungen sowie IPTG und X-Gal wurden dem autoklavierten und auf mindestens 50 °C abgekühlten Medium zur Selektion entsprechender rekombinanter *E. coli*-Stämme zugesetzt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Medienzusätze

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest} ^a	100 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest} ^a	25-50 µg/ml
Chloramphenicol	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest} ^a	100 µg/ml
IPTG	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest} ^b	40 µg/ml
X-Gal	40 mg/ml in N,N-Dimethylformamid ^b	40 µg/ml

^a Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

^b Die Lösung wurde direkt vor Gebrauch frisch angesetzt.

2.2.4 Stamm- und Pufferlösungen

Weitere Puffer und Lösungen, die im Text nicht näher erläutert werden, sind wie folgt zusammengesetzt. Zur Einstellung geringerer Konzentrationen wurde mit H₂O_{bidest.} verdünnt:

<u>20 x TAE-Puffer</u>		<u>10 x TE-Puffer</u>	
Tris	96,9 g	1 M Tris-HCl (pH 8,0)	100ml
Eisessig	22,8 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)	10ml
EDTA	7,5 g	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml		

2.3 Zellanzucht und Stammhaltung

2.3.1 Zellanzucht von *C. tetani*

Für die Anzucht der in Tabelle 1 aufgelisteten *C. tetani*-Stämme mussten aufgrund ihrer nachgewiesenen oder potentiellen Toxizität besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Alle Arbeiten mit den Organismen fanden in einem Sicherheitslabor der Stufe 2 statt. Darüber hinaus wurde zu Beginn der Arbeiten der Tetanus-Impfschutz aller im Institut beschäftigten Mitarbeiter überprüft und gegebenenfalls aufgefrischt.

Die Kultivierung der strikt anaeroben Bakterien erfolgte nach der Hungate-Technik (HUNGATE, 1969) und den modifizierten Methoden von BRYANT (1972). Als Kulturgefäß dienten 16 ml Schraubdeckelröhrchen (Hungate-Röhrchen; Bellco Glass Inc., Vineland, New Jersey, USA) oder Müller-Krempel-Serumflaschen (Fa. Ochs Glasgerätebau, Bovenden). Als Verschluss für diese Glasgefäße dienten gasdichte Stopfen aus Butylgummi bzw. Naturkautschuk. Zur Zugabe sowie Entnahme von Flüssigkeiten wurden sterile Plastikspritzen benutzt. Als Gasatmosphäre diente bei der Anzucht ein N₂/CO₂-Gemisch im Verhältnis 80% zu 20%.

2.3.2 Zellanzucht von *E. coli*

Die aerobe Anzucht von *E. coli* erfolgte bis zu einem Kulturvolumen von 5 ml in Reagenzgläsern, bis 30 ml in 100-ml-Erlenmeyerkolben und bis 300 ml in 1 l-Erlenmeyerkolben (Fa. Ochs, Bovenden). Die Kulturen wurden unter Schütteln bei 30 °C oder 37 °C inkubiert. Angeimpft wurde jeweils 1-5%ig.

2.3.3 Stammhaltung

Für die kurzfristige Stammhaltung wurde *E. coli* auf LB-Agarplatten - gegebenenfalls mit dem Zusatz eines Antibiotikums - bei 4 °C gelagert. Diese Kulturen wurden alle 4 Wochen überimpft. Zur Herstellung von Stammkulturen wurden *E. coli*-Stämme in LB-Medium bei 30 °C angezogen. In der logarithmischen Wachstumsphase wurde 0,75 ml Zellsuspension entnommen, mit 0,25 ml Glycerin (87%, v/v) versetzt und bei -70 °C gelagert.

Die Stammhaltung von *C. tetani* erfolgte im Komplexmedium in Hungate-Röhrchen. Die Kulturen wurden ü. N. bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Im Abstand von 4 Wochen erfolgte eine erneute Anzucht.

2.3.4 Reinheitskontrollen

Die Reinheit der Bakterienkulturen wurde durch Vereinzelungsausstrich auf Agarplatten mit anschließender makroskopischer Kontrolle und durch mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie im Phasenkontrastmikroskop (Fa. Carl Zeiss, Standard RA, Oberkochen) sichergestellt.

2.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.4.1 Behandlung von Geräten und Lösungen

Zur Inaktivierung von Nukleasen wurden alle hitzestabilen Geräte und Lösungen durch Autoklavieren (20 min bei 121°C) sterilisiert. Nicht autoklavierbare Materialien wurden mit 70%igem Ethanol (v/v) gespült oder mit 96%igem Ethanol (v/v) abgeflammt. Hitze labile Substanzen (z. B. Antibiotika, Lysozym) wurden sterilen Lösungen in pulverisierter Form zugegeben, oder entsprechende Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.4.2 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.4.2.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Um Proteine aus DNA-Lösungen zu entfernen, wurden diese mit 1 Vol. Phenol-Lösung versetzt und kräftig gemischt. Das eingesetzte Phenol war mit 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0) gesättigt. Zur Phasentrennung wurde 3 min bei 12000 Upm zentrifugiert. Danach wurde die obere, wässrige Phase mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, bis keine weiße Interphase mehr sichtbar war und anschließend erneut zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit Isopropanol oder Ethanol gefällt.

2.4.2.2 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrierung bzw. Entsalzung von Nukleinsäuren wurde eine Fällung mit 1/10 Vol. (v/v) Natriumacetat (2,5 M; pH 5,2) durchgeführt, um den Gehalt an monova-

lenten Kationen zu erhöhen. Die Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 3 Vol. eiskaltem 99%igen Ethanol (v/v) oder 0,8 Vol. Isopropanol. Nach vorsichtigem Durchmischen wurde die DNA bei der Ethanol-Fällung 1 h bei -20 °C bzw. bei der Isopropanolfällung ca. 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation (15000 Upm, 4 °C, 30 min) wurde das DNA-Pellet zweimal mit 1 ml eiskaltem 70%igen Ethanol (v/v) gewaschen, getrocknet und in H₂O_{bidest.} oder TE-Puffer aufgenommen.

2.4.2.3 Mikrodialyse von Nukleinsäuren

Diese Methode wurde angewandt, wenn störende niedermolekulare Substanzen wie z.B. Salze aus DNA-Lösungen entfernt werden sollten. Die Mikrodialyse erhöht z. B. die Ligationseffizienz bei Verdauansätzen. Auch wurden ganze Ligationsansätze mikrodialysiert, bevor sie zur Elektroporation eingesetzt wurden. 20-50 µl DNA-Lösung wurden vorsichtig auf einen sterilen Membranfilter (0,025 µm Porengröße, Filtertyp „VS“, Millipore GmbH, Eschborn) pipettiert und gegen steriles Wasser dialysiert. Dazu wurde der Filter mit seiner glänzenden Seite nach oben auf die Wasseroberfläche gelegt. Nach 30-60 min wurde die DNA-Lösung abgenommen.

2.4.3 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in 1 ml Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm mit Hilfe eines Photometers (Uvikon 810 Photometer, Kontron Instruments, Eching) ermittelt. Der Nullwert wurde mit Wasser oder TE-Puffer eingestellt, je nachdem, worin die DNA gelöst war. Für eine OD₂₆₀ von 1,0 wurden folgende Konzentrationen angenommen (SAMBROOK et al., 1989):

doppelsträngige DNA	50 µg/ml
einzelsträngige DNA/RNA	40 µg/ml
Oligonukleotide	31 µg/ml

Zusätzlich konnte die Reinheit einer DNA-Lösung durch OD-Bestimmungen bei 230 nm und 280 nm überprüft werden. Für reine DNA gilt:

$$\text{OD}_{260} : \text{OD}_{280} = 1,8$$

$$\text{OD}_{230} : \text{OD}_{260} : \text{OD}_{280} = 0,45 : 1,0 : 0,515$$

Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol sind an einer deutlichen Steigerung der Absorption bei 280 nm erkennbar, Polysaccharide hingegen erhöhen die Absorption bei 230 nm. Konnte diese Methode der Konzentrationsbestimmung aufgrund der geringen Menge an vorhandener DNA nicht durchgeführt werden, wurde die Konzentration anhand der Intensität der Banden in Agarose-Minigelen abgeschätzt.

2.4.4 Standard-Agarose-Gelelektrophorese

Sowohl zur analytischen als auch zur präparativen Auftrennung von DNA und DNA-Fragmenten wurden horizontale Gelelektrophoresen in Kammern der Größe 11,0 x 6,5 cm (kleine Gele) und 14 x 12 cm (große Gele) durchgeführt. Die Agarose wurde in Abhängigkeit der zu untersuchenden Fragmentgrößen in der Regel 0,8%ig (w/v) bzw. 2,0%ig (w/v) in TAE-Puffer angesetzt, welcher gleichzeitig auch als Elektrophoresepuffer diente. Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden die DNA-Proben mit 0,2 Vol. Stop-Mix (= Beschwerer-Lösung) versetzt. Dadurch konnte man während der Elektrophorese die Laufront verfolgen, und eventuell noch vorhandene Proteine wurden denaturiert. Zur späteren Auswertung und Größenbestimmung wurden zusätzlich noch 4 µl (bei einem großen Gel 20 µl) DNA-Längenstandard aufgetragen. Nach der Elektrophorese (40-90 V, 0,5-2 h für Minigele; 40-100 V, 4-6 h für präparative Gele) wurden die Gele für 15 min im Ethidiumbromidbad (1 µg/ml H₂O) angefärbt, dann gewässert und die Nukleinsäurebanden mittels eines UV-Transilluminators (Croma 41, Fa. Vetter, Wiesloch) bei 254 nm sichtbar gemacht. Bei Bedarf wurden die Gele zur Dokumentation mit einer Polaroid-Kamera (Polaroid-Corporation, Cambridge, USA) unter Verwendung eines Orangefilters fotografiert. Wahlweise war auch eine Übertragung des Bandenmusters auf Thermopapier mittels einer Videokamera möglich (Fa. Intas, Göttingen).

50 x TAE-Puffer (SAMBROOK et al., 1989)

Tris	242 g	2 M
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	100 ml	50 mM
Essigsäure (konz.)	57 ml	1 M
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml	
pH 8,5		

Stop-Mix (SAMBROOK et al., 1989)

EDTA	19 mg	1,0 mM
Harnstoff	21 g	7,0 M
Saccharose	25 g	50,0 % (w/v)
Bromphenolblau	50 mg	0,1 % (w/v)
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 ml	
pH 7,0		

Aliquots der autoklavierten Lösung wurden bei -20 °C gelagert.

Ethidiumbromid-Stammlösung

Die Stammlösung wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in Wasser angesetzt und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

2.4.5 Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Größe gelelektrophoretisch aufgetrennter, linearer DNA-Fragmente ermitteln zu können, wurde entweder der GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fa. MBI Fermentas) benutzt oder mit *Hind*III verdaute DNA des Bakteriophagen λ als Längenstandard parallel auf das Gel aufgetragen. Die Größe der erhaltenen Fragmente wurde durch den Vergleich der Laufstrecken mit denjenigen der bekannten λ -Fragmente bestimmt. Nachfolgend sind die zur Bestimmung herangezogenen Fragmentgrößen angegeben (SANGER et al., 1982; Fa. MBI Fermentas):

GeneRuler™-

DNA Ladder Mix

λ -DNA mit *Hind*III verdaut

Fragmente (kb)

27,49^a23,13^{*}

9,42

6,56

4,36^a

2,32

2,03

0,55

0,13

^a Fragment entsteht durch die Zusammenlagerung von Fragmenten mit kohäsiven Enden.

^{*} Fragment mit kohäsiven Enden

Zur Auswertung wurden die bekannten Fragmentgrößen halblogarithmisch gegen ihre Wanderungsstrecke aufgetragen. Diese Eichkurve wurde zur Größenbestimmung herangezogen.

2.5 Isolierung von Nukleinsäuren

2.5.1 Isolierung genomischer DNA aus *C. tetani* mit dem AquaPure®-Kit

Es kamen mehrere Methoden zur Isolierung genomischer DNA aus *C. tetani* zur Anwendung. Ziel dabei war die Isolierung reiner und hochmolekularer DNA, die i. d. R. bessere Klonierbarkeit zeigte als stark fragmentierte DNA. Ein Hauptproblem der DNA-Isolierung lag in der hohen Nuklease-Aktivität der Clostridien; schon nach kurzer Zeit setzte die Fragmentierung der DNA aus lysierten *C. tetani*-Zellen ein. Die Zugabe hoher Mengen EDTA nach Zelllyse konnte diese Fragmentierung partiell stoppen.

Als geeignete Methode erwies sich das AquaPure®-Genomic-DNA-Isolation-Kit (Fa. BioRad), wobei das Protokoll zur Isolierung von DNA aus Gram-negativen Bakteri-

en leicht modifiziert verwendet wurde (für Gram-positive lag kein Protokoll vor). Wichtig war, dass die Arbeitsschritte zügig vonstatten gingen. Nach ü. N.-Anzucht von *C. tetani* wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Nach unverzüglicher Zugabe von 300 µl Genomic-DNA-Lysis-Solution zum Zellpellet (aus 5-50 ml Kulturvolumen), wurde dieses vorsichtig resuspendiert. Bei 80 °C wurden dann die Zellen für 5 min lysiert. Wichtig war, dass die Zellen komplett lysierten. Gegebenenfalls wurden weniger Zellen eingesetzt oder Proteinase K zur Auflösung von Zellklumpen verwendet. Die RNA wurde anschließend durch Zugabe einer RNase-Lösung (4 mg/ml) abgedaut (15-30 min, 37 °C). Nun erfolgte die Zugabe von 100 µl Protein-Precipitation-Solution und die Durchmischung des Ansatzes. Dieser wurde dann abzentrifugiert (13000 Upm, 3 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein E-Cup überführt, das 300 µl Isopropanol enthält. Anschließendes vorsichtiges Mischen und Abzentrifugieren (13000 Upm, 1 min) des Ansatzes ergab ein DNA-Pellet, das schließlich noch mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-100 µl H₂O_{bidest} aufgenommen wurde.

2.5.2 Isolierung genomischer DNA nach MARMUR, 1961

Als weitere Methode wurde die Isolierung genomischer DNA nach MARMUR, 1961 (modifiziert) verwendet. Diese DNA wurde vorrangig für die Herstellung von Plasmid-Genbanken (s. 2.9.1) verwendet. Es wurden i. d. R. 2 bis 3 g Zellen (Feuchtwicht) eingesetzt. Die Zellen wurden zuvor im Komplexmedium ü. N. angezogen und durch Zentrifugation für 20 min bei 6000 x g und 4 °C geerntet. Nach der Suspendierung der Zellen in 10 ml STE-Puffer erfolgte eine Inkubation unter Schütteln bei 37 °C für 15 min. Anschließend wurden 0,5 g Lysozym zugegeben und für weitere 45 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4000 x g und 4 °C für 10 min wurde das Zellpellet in 7 ml EDTA-Tris-Saccharose-Puffer suspendiert und 1 ml SDS-Lösung (25%, w/v) sowie 100 µl Proteinase K-Lösung (80 µg/ml) zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 65 °C. Danach wurden 12 ml 6 M Guanidiniumthiocyanat und 1 ml Glasmilch hinzugefügt und die Lösung durch mehrmaliges Umschwenken vorsichtig gemischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 ml Isobutanol und eine Inkubation bei RT für 10 bis 15 min bis sich die an die Glasmilch gebundene DNA abgesetzt hatte. Der Überstand konnte abge-

nommen und verworfen werden. Das DNA-haltige Glasmilchpellet wurde mit 10 ml NaJ-Lösung versetzt, vorsichtig gemischt und der Überstand nach Inkubation für 15 min bei RT verworfen. Nach Zugabe von 10 ml „new wash“-Puffer wurde die Lösung wiederum vorsichtig gemischt und für 15 min bei RT inkubiert, so dass sich die an die Glasmilch gebundenen DNA absetzen konnte. Die Elution der DNA erfolgte durch die Zugabe von 10 ml TE-Puffer, vorsichtigem Mischen und einer Inkubation für 15 min bei 55 °C. Anschließend wurde die Glasmilch bei 4000 x g und 4 °C für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Fällung der DNA mit 1 ml 7,5 M Ammoniumacetat (pH 7,5) und 30 ml eiskaltem Ethanol (96%, v/v) versetzt und für 5 min bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit eiskaltem Ethanol (70%, v/v) gewaschen und anschließend in 1 bis 2 ml TE-Puffer oder H₂O_{bidest} aufgenommen.

STE-Puffer

Saccharose	200	mM
Tris	50	mM
EDTA	1	mM
pH 8,0		

EDTA-Tris-Saccharose-Puffer

EDTA	120	mM
Tris	50	mM
Saccharose	150	mM

„new wash“-Puffer

Ethanol (96%, v/v)	50	%
NaCl	100	mM
Tris	20	mM
EDTA	1	mM
pH 7,5		

NaJ-Lösung

NaJ	6	M
Na ₂ SO ₃	0,12	M
Die Lösung wurde lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.		

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Isolierung von Plasmid-DNA

2.5.3.1 Isolierung von Plasmiden mit sehr niedriger Kopienzahl pro Zelle

Zur Isolierung des 74 kb großen *low-copy* Plasmids aus *C. tetani* E88 wurden 3-6 g Zellen (Feuchtgewicht) eingesetzt. Die Isolierung erfolgte mit dem Qiagen-Midi-Kit® (Fa. Qiagen), wobei die im Handbuch erwähnten Regeln zur Isolierung von

großen *low-copy* Plasmiden befolgt wurden. Prinzip dieser Methode ist die alkalische Lyse der Zellen, gefolgt von der Präzipitation der Zellproteine zusammen mit der hochmolekularen chromosomalen DNA und der anschließenden Aufreinigung der Plasmid-DNA über Anionenaustauschchromatographie. Nichtsdestotrotz war die mit dem Kit aufgereinigte Plasmid-DNA i. d. R. noch mit chromosomaler DNA verunreinigt. Bei der anschließenden Herstellung einer Genbank sowie deren Sequenzierung wurde dieses Manko in Kauf genommen.

Die Zellen wurden in 4 ml P1-Puffer suspendiert. Es folgte die Zugabe von 4 ml P2-Puffer und eine Inkubation für 5 min bei RT. Anschließend wurden 4 ml P3-Puffer zugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (16000 x g, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und zur vollständigen Aufklärung erneut für 15 min zentrifugiert. Der hierbei erhaltende Überstand wurde auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte „Qiagen-tip-100-Säule“ aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit 20 ml QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 5 ml QF-Puffer eluiert. Die DNA wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (16000 x g, 30 min, 4 °C) pelletiert. Das Sediment wurde anschließend mit eiskaltem Ethanol (70%, v/v) gewaschen, getrocknet und in 100 bis 200 µl H₂O_{dest.} oder TE-Puffer aufgenommen. Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus größeren Kulturvolumina wurde die Menge an P1, P2 und P3 erhöht. Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte dann in mehreren Durchgängen.

P1-Puffer

Tris	50	mM
EDTA	10	mM
RNase A	100	µg/ml
pH 8,0		

P2-Puffer

SDS	1	%
NaOH	200	mM

P3-Puffer

K-Acetat	3	M
pH 5,5		
(pH-Wert mit Eisessig einstellen)		

QBT-Puffer

NaCl	0,75	M
MOPS	50	mM
Ethanol (96%, v/v)	15	%
Triton X-100	0,15	%
pH 7,0		

QF-Puffer

NaCl	1,25	M
MOPS	50	mM
Ethanol (96%, v/v)	15	%
pH 8,2		

QC-Puffer

NaCl	1	M
MOPS	50	mM
Ethanol (96%, v/v)	15	%
pH 7,0		

2.5.3.2 Schnellpräparation von Plasmid-DNA (RIGGS & MCLACHLAN, 1986)

Zum schnellen Nachweis und Charakterisierung rekombinanter Plasmide wurden 1,5 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur von *E. coli* pelletiert (8000 Upm, 5 min). Nach der Resuspendierung des Pellets in 350 µl STET-Puffer und 35 µl Lysozym-Lösung wurde der Ansatz für 50 s auf 100 °C erhitzt. Zellreste und denaturiertes Protein wurden nach 10-minütiger Zentrifugation bei 14000 Upm mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde durch Zugabe von 40 µl Na-Acetat (2,5 M, pH 5,2) und 420 µl Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 14000 Upm wurde das erhaltene Pellet einmal mit 70%igen (v/v) Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung bei 37 °C konnte es schließlich in 50 µl TER-Puffer (20 µg RNase/ml TE-Puffer) aufgenommen werden.

STET-Puffer

NaCl	0,1	M
Tris-HCl	10,0	mM
EDTA	1,0	mM
Triton X-100	5,0	%
pH 8,0		

Lysozym-Lösung

10 mg/ml
einer 10 mM Tris-HCl-Lösg., pH 8,0

Die RNase-Stammlösung (5 mg/ml TE-Puffer) wurde durch 10-minütige Inkubation bei 80 °C von hitzelabilen DNasen befreit.

2.5.3.3 Robotgesteuerte Plasmidpräparation

Die große Menge zu sequenzierender rekombinanter Plasmide in einem Genomsequenzierungsprojekt macht eine Automatisierung der Plasmidpräparation notwendig.

Mittels eines robotgesteuerten Systems (Qiagen-BioRobot 9600[®]) konnte die Präparation von Plasmid-DNA im 96er Maßstab durchgeführt werden (http://www.qiagen.com/literature/handbooks/qp/1019952_QPHB_prot04.pdf). Ausgangsmaterial war dabei ein 96er *Flat-Bottom*-Block, der pro Loch (*Well*) 1,3 ml TB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum enthielt. Der Block wurde manuell mit 96 rekombinanten Klonen der Genbank (s. 2.9.1) beimpft. Dazu wurden entsprechende einzelliegende Kolonien von einer Agarplatte mittels Zahnstocher in die einzelnen *Wells* überimpft. Die Anzucht des mit einem luftdurchlässigen *Aerosheet* abgeklebten Blocks erfolgte ü. N. (mindestens 18 h) bei 37 °C im Schüttelinkubator (350 Upm). Abzentrifugiert wurde der Block für 20 min bei 3300 Upm mit einer Plattenzentrifuge (Heraeus 2.0 Megafuge). Dieser Block wurde dann in das Robotsystem Qiagen-BioRobot 9600[®] eingespannt. Prinzipiell erfolgte die Aufreinigung der Plasmid-DNA, wie in Kapitel 2.5.3.1 erläutert, über Anionenaustauschchromatographie. Die Puffer P1, P2 und P3 wurden automatisch über eine Nadel in die *Wells* des *Flat-Bottom*-Blocks pipettiert. Anschließend transferierte das System das Lysat aus dem Block heraus in eine 96er *TurboFilter*-Platte. Automatisch wurde nun durch Anlegen eines Vakuums das gebildete Präzipitat - bestehend aus Zellproteinen und hochmolekularer DNA - aus dem Lysat herausgefiltert. Die das Präzipitat enthaltende *TurboFilter*-Platte wurde verworfen. Der Durchfluss landete in eine unter der *TurboFilter*-Platte befindlichen 96er *QIAprep*-Platte, welche aus 96 Anionenaustauschchromatographie-Säulchen bestand. Die im Durchfluss enthaltende Plasmid-DNA wurde durch erneutes Anlegen eines Vakuums an die 96 Säulchen der *QIAprep*-Platte gebunden, und anschließend mit den Puffern PB und PE gewaschen. Nach Trocknung der *QIAprep*-Platte erfolgte die Elution der Plasmid-DNA in eine 96er Mikrotiter-Platte mit 100 µl H₂O pro *Well*. Ausbeuten rangierten i. d. R. im Bereich von 100-300 ng/µl.

2.5.4 Robotgesteuerte Cosmidpräparation

Die Cosmid-Präparation erfolgte ebenfalls mit dem Qiagen-BioRobot 9600[®] in Analogie zur in Kapitel 2.5.3.3 beschriebenen Methode. Folgende Abänderungen zum obigen Protokoll trugen der niedrigen Kopienzahl der Cosmide im Anzuchtstamm *E. coli* DH5α Rechnung: Die rekombinanten Klone wurden nicht in einem 96er *Flat-*

Bottom-Block, sondern in 96 einzelnen, 5 ml Medium enthaltenden Röhrchen angezogen. Des weiteren erfolgte die Elution mit 120 µl H₂O, das zur Optimierung der Elution auf 70 °C vorgewärmt worden war.

2.5.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen kam das QIAquick[®]-Kit (Fa. Qiagen) zum Einsatz. Zuerst wurde die DNA enthaltende Bande mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Agarose wurde abgewogen und mit 3 Vol (w/v) QG-Puffer versetzt. Nach Auflösung der Agarose bei 50 °C für 10 min wurde die Lösung auf einen Säule gegeben und abzentrifugiert (13000 Upm, 1 min). Die Säule wurde mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und anschließend mittels erneuter Zentrifugation (13000 Upm, 2 min) getrocknet. Die Elution erfolgte mit 20-50 µl H₂O_{bidest.}

2.5.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten zwecks Abtrennung ungenutzter Nukleotide und Primer sowie zur Abtrennung der *Taq*-DNA-Polymerase (s. 2.8) wurde ebenfalls mit dem QIAquick[®]-Kit (Fa. Qiagen) durchgeführt (s. 2.5.5). Als Abweichungen zum obigen Protokoll wurde der PCR-Ansatz zuerst mit 5 Vol PB-Puffer versetzt und die Mischung dann auf die Säule gegeben und abzentrifugiert. Alle weiteren Schritte sind identisch mit der in 2.5.5 beschriebenen Methode.

2.6 Enzymatische Modifikation von DNA

2.6.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen liefert lineare Fragmente mit definierten Enden. Der Verdau erfolgte in den von den Herstellern der Restriktionsenzyme mitgelieferten Puffersystemen bei den empfohlenen Temperaturen. In analytischen Ansätzen betrug das Gesamtvolumen 20 µl, wobei ca.

1-2 µg DNA und 3-5 U Enzym/µg DNA 2 h inkubiert wurden. In präparativen Ansätzen wurden bis zu 15 µg DNA über Nacht verdaut in einem Volumen von insgesamt 100 µl. Im Endvolumen lag das Enzym mindestens 1 : 10 verdünnt vor, um eine Gesamtkonzentration von 5% Glycerin nicht zu überschreiten, die sich störend auf die Spaltungsreaktion hätte auswirken können. Sollten Fragmente mit zwei verschiedenen Enzymen verdaut werden, die unterschiedliche Pufferbedingungen benötigten, so wurde zuerst ein Verdau in dem System mit niedrigerer Ionenstärke durchgeführt und diese dann anschließend für das zweite Enzym erhöht. Falls eine Inaktivierung der Restriktionsenzyme erforderlich war, wurde der Verdauansatz 20 min bei 65 °C inkubiert. Die Spaltprodukte wurden im Agarosegel überprüft.

2.6.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Vor der Ligation von Vektor-DNA mit den zu klonierenden DNA-Fragmenten (s. 2.6.4) wurde die 5'-Phosphatgruppe der Vektor-DNA oder der Insert-DNA mit alkalischer Phosphatase abgespalten. Dadurch sollte die Ligation von Vektor-Fragmenten mit sich selbst oder mit anderen linearen Vektor-Fragmenten oder die Ligation von diskontinuierlichen, genomischen DNA-Fragmenten verhindert werden (SAMBROOK et al., 1989). Die Dephosphorylierung wurde direkt im Verdauansatz durchgeführt. Nach dem Verdau wurde 1 U alkalische Phosphatase pro 10 µg zu dephosphorylierender DNA zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut 1 U Enzym zugegeben und die Inkubation wiederholt. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Inkubation für 15 min bei 65 °C und die DNA mittels Phenol-Chloroform gereinigt.

2.6.3 Herstellung von glatten Enden (,blunt ends') und Phosphorylierung von 5'-Hydroxyl-Enden bei DNA-Fragmenten

Da thermostabile Polymerasen, die bei Amplifikationsreaktionen eingesetzt werden, als letztes Nukleotid oftmals unspezifisch ein Adenosin-Triphosphat an das amplifizierte DNA-Fragment anfügen, mussten diese Enden geglättet werden, bevor sie zur ,blunt end'-Ligation eingesetzt werden konnten. Außerdem musste sichergestellt

sein, dass die DNA-Fragmente an den 5'-Enden phosphoryliert vorlagen, um eine Ligation über glatte Enden zu ermöglichen. Hierzu wurden die DNA-Polymerase I, die überhängende, einzelsträngige DNA abbauen kann, und die T₄-Polynukleotid-Kinase eingesetzt, die in Anwesenheit von ATP freie 5'-Enden phosphoryliert. Beide Enzyme arbeiten gut in KGB-Puffer, so dass beide Reaktionen in einem Ansatz durchgeführt wurden. Dieser bestand aus folgenden Komponenten:

DNA	0,5-1 µg
KGB-Puffer (10 x)	2 µl
dNTP-Gemisch (10 mM)	2 µl
ATP (10 mM)	2 µl
DNA-Polymerase I (5 U/µl)	1 µl
T ₄ -Polynukleotid-Kinase (2 U/µl)	1 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 20 µl

Der Ansatz wurde 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach 15 min erfolgte die Zugabe der Polynukleotid-Kinase. Anschließend wurde der Ansatz mit Phenol-Chloroform gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

KGB-Puffer (10 x):

K-Glutamat	1,00 M
Tris-Acetat	0,25 M
Mg-Acetat	0,10 M
Rinderserumalbumin	0,50 mg/ml
β-Mercaptoethanol	5,00 mM
pH 7,5	

2.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden Phosphodiesterbindungen zwischen doppelsträngigen DNA-Fragmenten geknüpft, die freie 3'-Hydroxylenden und 5'-Phosphatenden aufweisen. Um die Ligationseffizienz zu erhöhen, wurde in der Regel ein Überschuss an Insert-

DNA eingesetzt (Verhältnis Vektor:Insert-DNA von etwa 1 : 3). Die Ligation erfolgte i. d. R. im 20 µl Ansatz und in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem:

Vektor-DNA (in H ₂ O)	0,2 - 2 µg
Insert-DNA (in H ₂ O)	0,8 - 8 µg
10 x T ₄ -Ligase-Puffer	2 µl
T ₄ -DNA-Ligase (1 U/µl)	1-2 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

Bei der Ligation von kohäsiven, überhängenden Enden erfolgte die Inkubation der Ansätze ü. N. bei 16 °C. Zur Ligation glatter Enden (‚blunt-ends‘) wurden 2 U Ligase eingesetzt und die Ansätze i. d. R. über Nacht bei RT oder 2 h bei 37 °C inkubiert.

2.7 Übertragung von DNA in *E. coli* und Selektion rekombinanter Klone

2.7.1 Transformation in *E. coli* durch Elektroporation

Eine Möglichkeit, Plasmide oder Cosmide in *E. coli* zu transferieren, ist die sogenannte Elektroporation. Dabei werden durch das Anlegen einer hohen Spannung die Membranen kurzzeitig für Plasmid- oder Cosmid-DNA durchlässig gemacht (FIEDLER & WIRTH, 1988). Für die Elektroporation von *E. coli* DH5α wurde folgende Methode verwendet: Der Stamm wurde über Nacht in einer 3 ml Vorkultur angezogen, die dann in 500 ml LB-Medium unter starkem Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,7-0,8 inkubiert wurde. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen geerntet (5000 Upm, 10 min, 4 °C) und anschließend zweimal mit eiskaltem H₂O_{bidest} gewaschen. Das Pellet wurde mit 20 ml einer 10%igen Glycerin-Lösung gewaschen und in 800 µl derselben Lösung aufgenommen. Eine Lagerung erfolgte in Aliquots von 50-80 µl bei –70 °C, oder die Zellen wurden sofort verwendet.

Die Elektroporation wurde an einem „Gene Pulser“ (Fa. BioRad Laboratories, München) durchgeführt. Dazu wurde 0,5-2 µl Plasmid/Cosmid-DNA mit ca. 50 µl kom-

petenter Zellen in vorgekühlten Elektroporationsküvetten gemischt. Es wurde eine Spannung von 2,5 kV, eine Kapazität von 25 μ F und ein Widerstand von 200 Ω gewählt. Direkt nach der Elektroporation wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt, gemischt, der Ansatz in ein E-Cup überführt und 1 h bei 37 °C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Dann wurde dieser Ansatz entweder direkt auf Selektivplatten ausplattiert (5-100 μ l pro Platte), oder aber zuerst abzentrifugiert (4000 Upm, 5 min), in 50 μ l LB-Medium aufgenommen und schließlich ausplattiert.

Nach der beschriebenen Methode wurden auch ganze Ligationsansätze zur Elektroporation eingesetzt. Hierbei wurde aber zuvor der Ligationsansatz inaktiviert (20 min, 65 °C) und einer Mikrodialyse (30-45 min) unterzogen (s. 2.4.2.3).

2.7.2 Blau-Weiß-Test zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

Bei Klonierungen ist es entscheidend, Klone, die nur den Plasmid-Vektor enthalten, von denjenigen, die ein Plasmid mit Insert tragen, zu unterscheiden. Neben den Plasmid-kodierten Antibiotikaresistenzen stellt der Blau-Weiß-Test ein weiteres schnelles Selektionssystem dar. Er beruht darauf, dass Insertionen in die multiple Klonierungsstelle des entsprechenden Vektors die Bildung einer aktiven β -Galactosidase verhindern. Eine aktive β -Galactosidase ist in der Lage, neben dem eigentlichen Substrat Lactose auch 5-Brom-4-Chlor-indoyl- β -D-Galactosid (X-Gal) zu spalten. Es entsteht der Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo, der sich in Anwesenheit von Sauerstoff spontan blau verfärbt (HOROWITZ et al., 1964). Im X-Gal-Test werden *E. coli*-Stämme (z. B. DH5 α) eingesetzt, die durch eine Deletion im Chromosom nur eine inaktive β -Galactosidase ohne Aminoterminus bilden können. Bestimmte Vektoren (z. B. pGEM-7Zf(+)) sind nun in der Lage, diesen Effekt zu kompensieren. Sie tragen neben dem Promoter- und Operatorbereich des *lac*-Operons auch das 5'-Ende des *lacZ*-Gens, welches für das sogenannte α -Peptid kodiert. Dies kann *in vivo* mit der verkürzten β -Galaktosidase zum aktiven Enzym assoziieren (α -Komplementation). Da die multiple Klonierungsstelle des Vektors innerhalb des *lacZ*-Gens liegt, wird die Bildung des α -Peptids verhindert, wenn der Vektor ein Insert trägt. Auf Indikatorplatten, die IPTG (zur Induktion der β -Galactosidase) und X-Gal enthalten, können die Kolonien leicht an ihrer Färbung unterschieden werden.

Blaue Kolonien enthalten nur den Plasmid-Vektor, während weiße Kolonien mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Plasmid mit Insert tragen.

2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Diese Methode der *in vitro*-Amplifikation von DNA wurde für vielerlei Zwecke angewandt. So sollte z. B. an Hand der PCR die Richtigkeit der Assemblierung von Sequenzen überprüft oder Sequenzlücken (*Gaps*) innerhalb eines Genoms geschlossen werden. Näheres dazu wird in Kapitel 2.12. beschrieben. Als Enzym wurde die *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt (Fa. Eppendorf, Hamburg). Als Matrize diente genomische DNA aus *C. tetani*. Die verwendeten Starteroligonukleotide (Primer) waren i. d. R 17-25 Basen lang. Eine optimale Amplifikation war gewährleistet, wenn beide Primer einen ähnlichen Schmelzpunkt (T_m) hatten und in gleicher Konzentration vorlagen. Die Berechnung des Schmelzpunktes erfolgte nach CHESTER & MARSHAK (1993):

$$T_m = 69,3 + 0,41 (\%G+C\text{-Gehalt}) - 650/L$$

$$\%G+C\text{-Gehalt} = \text{prozentualer G+C-Gehalt des Primers}$$

$$L = \text{Länge des Primers}$$

Die Standard-PCR-Reaktionen fanden in 50 µl-Ansätzen statt. Folgende Komponenten wurden - bis auf das Enzym - auf Eis zusammenpipettiert:

Matrizen-DNA	1,0 µg
Primer 1	0,5 µM
Primer 2	0,5 µM
dNTP-Gemisch (10 mM)	1 µl
10 x Reaktionspuffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 49,5 µl
DNA-Polymerase (2U/µl)	0,5 µl

Nach Durchmischung wurde der Ansatz in den PCR-Thermoblock (MWG-Biotech) gestellt. Das entsprechende PCR-Programm wurde entweder nach Zugabe der DNA-Polymerase direkt begonnen oder aber es erfolgte vor Zugabe des Enzyms eine 5-minütige Inkubation bei 95 °C zur Denaturierung und eine 2-minütige Inkubation bei 80 °C. Während des letzten Inkubationsschrittes erfolgte die Zugabe der *Taq*-Polymerase („hot start“). Zur Amplifizierung schlossen sich folgende Temperaturzyklen in 25-35facher Wiederholung an:

PCR-Programm:

Denaturierung	95 °C	30 s
Anlagerung	x °C	30 s
Polymerisierung	72 °C	y s

Die Anlagerungstemperatur war abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und lag idealerweise 5 °C tiefer. Die Dauer y der Polymerisierung betrug 1 min pro 1 kb zu amplifizierender DNA. Zur Optimierung der PCR konnten einzelne Parameter variiert werden wie z.B. die Anlagerungstemperatur und die Anzahl der Zyklen oder auch die Konzentrationen der eingesetzten Primer sowie der Matrizen-DNA. Ferner konnte man die Spezifität durch Zugabe von DMSO (4%,v/v) und Verringerung der MgCl₂-Konzentration steigern. Nach Abschluss der Amplifikation wurde ein Aliquot im Agarosegel überprüft.

2.9 Herstellung von Genbanken

2.9.1 Herstellung einer Plasmid-Genbank

Im folgenden soll der Ablauf zur Herstellung von Genbanken dargelegt werden. Es wurde dabei der sogenannte *Shotgun-Approach* angewandt, der auf die Ermöglichung einer gleichwahrscheinlichen Klonierung aller genomischen DNA-Abschnitte abzielt. Mit anderen Worten: die Klonierung genomischer DNA sollte nach dem Zufallsprinzip ablaufen; keine Genomabschnitte sollten in der Genbank über- oder unterrepräsentiert sein. Die Sequenzierung solch einer Genbank gewährleistete eine

Abnahme der Contig-Zahl in einem Genomsequenzierungsprojekt nach der Formel von LANDER & WATERMAN (1988).

Die Herstellung einer optimalen Genbank war indes immens wichtig für das zügige Voranschreiten des gesamten Genomsequenzierungsprojekts. Optimal bedeutete hier ein günstiges Blau-Weiß-Verhältnis – weiße Kolonien sollten gegenüber den blauen in der Überzahl sein –, eine geringe Vektorkontamination, d. h. es durften nicht mehr als 5% der Klone Plasmide ohne Insert tragen, und konstante Insertgrößen zwischen 2-3 kb.

Herstellung der Insert-Fragmente. Nach der Isolierung genomischer DNA (s. 2.5.1) wurde diese über mechanische Scherkräfte mit Hilfe einer umgebauten HPLC-Pumpe fragmentiert. Diese Methode zur Fragmentierung wurde gewählt, weil es im Gegensatz zum Verdau mit Restriktionsenzymen die Zufälligkeit der DNA-Brüche gewährleisten sollte. Die Fragmentgröße der so geschnittenen DNA konnte mittels Druckänderung und/oder Dauer der Zirkulation der DNA in dem HPLC-Pumpsystem variiert werden. Für die Herstellung von Fragmenten der Größe 1,5-3 kb wurde i. d. R. ein Druck von 0,5 bar und eine Zirkulationsdauer von 10 min gewählt. Allerdings konnte die gewünschte Fragmentgröße nur näherungsweise erreicht werden. Oft erhielt man einen ‚DNA-Schmier‘, so dass eine nachfolgende Gelelektion (s. 2.5.5) unumgänglich war. Die DNA-Fragmente wurden nach der Zirkulation mit H₂O aus dem HPLC-System eluiert, aufgefangen und einer Ethanol-fällung zur Aufkonzentrierung unterzogen (s. 2.4.2.2). Um sicherzustellen, dass die DNA-Fragmente keinen Einzelstrangüberhang aufwiesen, wurde eine Auffüllreaktion mit der T4-DNA-Polymerase zur Herstellung von ‚blunt-end‘- Fragmenten durchgeführt (vgl. 2.6.3). Folgender Ansatz wurde pipettiert:

- 14 µl gescherte genomische Fragmente
- 4 µl 5fach T4-DNA-Polymerase Puffer
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl T4-DNA-Polymerase

Die Inkubation bei 11 °C erfolgte für 20 min. Anschließend wurde das Enzym bei 70 °C für 20 min inaktiviert oder aber der gesamte Ansatz wurde sofort auf ein Aga-

rosegel aufgetragen. Nach ihrer Auftrennung wurde die gewünschte Fragmentgröße (i. d. R. 2-3 kb) aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert (s. 2.5.5).

Behandlung des Klonierungsvektors. Zur Herstellung von Genbanken, deren rekombinante Plasmide im Rahmen der Genomsequenzierung von *C. tetani* sequenziert werden sollten, wurde der Plasmidvektor pTZ19R verwendet. Dieser enthielt das Gen zur Vermittlung einer Ampicillin-Resistenz, die Möglichkeit zu einem Blau-Weiß-Screening (s. 2.7.2) sowie eine ‚multi-cloning-site‘, die eine ‚blunt-end‘ *SmaI*-Schnittstelle enthielt. Somit wurde *SmaI*-geschnittener und dephosphorylierter Vektor (s. 2.6.1 und 2.6.2) mit den aufgefüllten, 2-3 kb großen genomischen Fragmenten ligiert (s. 2.6.4). Bei einigen Genbanken wurde ein modifizierter pTZ19R-Vektor verwendet, der anstelle der Ampicillin- eine Chloramphenicol-Resistenz vermittelt (freundlicherweise bereitgestellt von Andreas Christmann, Göttingen). Anschließend wurde der Ligationsansatz inaktiviert (20 min, 65 °C) und gegen H₂O mikrodialysiert (30 min, RT). Es schloss sich eine Elektroporation (s. 2.7.1) und das Ausplattieren auf Selektivagarplatten an. Die Qualität der Genbank wurde schließlich per Plasmid-Schnellpräparation (s. 2.5.3.2) getestet.

2.9.2 Herstellung einer Cosmid-Genbank

Die Verwendung von Cosmiden zur Erstellung von Genbanken hat gegenüber der Verwendung von Plasmiden oder Bakteriophagen als Klonierungsvektoren verschiedene Vorteile. Die erheblich höhere Klonierungskapazität der Cosmide im Vergleich zu Plasmiden ermöglicht die Klonierung von kontinuierlichen, genomischen DNA-Fragmenten in der Größenordnung von 30 bis 50 kb und vereinfacht dadurch die Erforschung von funktionell zusammengehörigen Genomabschnitten. Damit verbunden ist eine wesentlich geringere Zahl benötigter Klone, um statistisch betrachtet das ganze Genom in einer Cosmid-Genbank zu erfassen. Gegenüber Phagen haben Cosmide den Vorteil der einfacheren Handhabung: es entfällt das bei der Trennung von rekombinanten Phagen benötigte Verfahren der Plaque-Bildung auf Bakterienrasen. Stattdessen lassen sich, wie bei der Genbank-Herstellung mit Plasmiden, rekombinante Cosmide durch die Transformation in Bakterien trennen, die dadurch eine An-

tibiotika-Resistenz erwerben und sich auf Antibiotika-haltigen Agar-Platten über das Wachstum zu getrenntliegenden Kolonien verteilen.

In dieser Arbeit wurde der Cosmid-Vektor superCos1 (Abb. 2; Fa. Stratagene; EVANS et al., 1989) verwendet, der die Gene für die Ausbildung einer zweifachen Antibiotika-Resistenz gegen Ampicillin (Amp^R) und Kanamycin (Neo^R) trägt, was zur Steigerung der Stabilität der Cosmid-Klone während des Koloniewachstums in Nährmedien mit beiden Antibiotika führt (WENZEL & HERRMANN, 1996). Des weiteren besitzt der Vektor eine doppelte Kopie des *Cos*-Elements der DNA des Bakteriophagen Lambda. Das *Cos*-Element wird bei der Verpackung von concatemerer DNA in Phagenköpfe benötigt. Die doppelte Kopie des Elements bewirkt gegenüber Vektoren mit nur einer *Cos-site* eine Erhöhung der Klonierungseffizienz: im Zuge der Vektorpräparation entstehen zwei unterschiedliche Vektor-Arme, jedes mit einer *cos-site*, wodurch sich - nach erfolgter Ligation - die Anzahl an Kolonien reduziert, die sich aufgrund der Verpackung von concatemerer Vektor-DNA ohne klonierte, genomische DNA bilden (WENZEL & HERRMANN, 1996). Die Klonierungskapazität des superCos1-Vektors liegt zwischen 31 und 48 kb, d. h. dass ausschließlich Cosmide mit diesen Insertgrößen erfolgreich verpackt werden.

Abb. 2: Der Cosmid-Vektor SuperCos1 (Fa. Stratagene, EVANS et al., 1989)

Die Vorbereitung zum Einsatz des Vektors in der Ligation bestand in folgenden Punkten:

- Restriktionsverdau mit *Xba*I
- Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase
- Phenol-Chloroform-Reinigung und Ethanol-Fällung

- Restriktionsverdau mit dem Klonierungsenzym *Bam*HI bzw. *Eco*RI (je nach Enzym für den partiellen Verdau)
- Phenol-Chloroform-Reinigung und Ethanol-Fällung

Die Gewinnung hochmolekularer genomischer DNA aus *C. tetani* wurde wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben durchgeführt. Insbesondere wurde auf die Vermeidung von starken Scherkräften geachtet, um DNA-Fragmente von über 200 kb Größe zu erhalten. Anschließend wurde die genomische DNA einem partiellen Verdau mit dem Enzym *Sau*3AI unterworfen, welches die gleichen überstehenden Enden wie *Bam*HI und daher komplementäre Enden produziert. Später wurde zum partiellen Verdau auch das Enzym *Tas*I benutzt, das komplementäre Enden zum alternativen Klonierungsenzym *Eco*RI bildet. Ziel war dabei die Gewinnung von Fragmenten mit durchschnittlichen Größen zwischen 30 und 50 kb. Die Bedingungen zur Herstellung dieser Fragmentgrößen mussten experimentell bestimmt werden. Dabei wurde zum einen die eingesetzte Enzymkonzentration und zum anderen die Inkubationszeit des Verdaus variiert. Die Überprüfung der Ansätze erfolgte über ein 0,4%iges Agarose-Gel. Geeignete Partialverdaus wurden mit Phenol-Chloroform aufgereinigt, mit Ethanol gefällt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um die Ligation von nicht-kontinuierlichen genomischen Fragmenten zu verhindern. Anschließend erfolgte eine erneute Phenol-Chloroform-Reinigung und Fällung mit Ethanol.

Die Ligation wurde mit unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen der beiden Vektorarme zu den genomischen *Sau*3AI- bzw. *Tas*I-Fragmenten durchgeführt. Die anschließende Verpackung des Ligationsansatzes wurde mit dem *in vitro*-Verpackungsextrakt Gigapack® III XL (Fa. Stratagene) durchgeführt, welches die einzelnen Strukturelemente eines Phagenpartikels enthält. Dazu wurden 2-4 µl der ligierten DNA zu dem unmittelbar zuvor aufgetauten Verpackungsextrakt gegeben und kurz durchmischt. Nach 2-stündiger Inkubation bei RT wurden 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform hinzugefügt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der Überstand, welcher die rekombinanten Phagen enthielt, abgenommen und wie nachfolgend beschrieben zur Transduktion weiterverwendet. Als Rezipient der in den Phagenköpfen verpackten, rekombinanten DNA wurde der *E. coli* Stamm DH5α verwendet, der in einem LB-Medium angezogen wurde, welches mit 10 mM MgSO₄ und 0,2% (w/v) Maltose komplementiert wurde. Nach 4-6-stündigem Wachstum bis zu einer OD_{600nm} von maximal 1,0 wurden die Zellen geerntet (4000 Upm, 10 min)

und in $\frac{1}{2}$ Vol. sterilem 10 mM MgSO_4 aufgenommen. Diese Suspension wurde dann bis zu einer OD von 0,5 mit 10 mM MgSO_4 weiterverdünnt. 25 μl dieser Zellsuspension wurden anschließend zu 25 μl des vorher mit SM-Puffer 1:5 bis 1:40 verdünnten Phagen-enthaltenden Überstandes gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 200 μl LB-Medium zum E-Cup und die Inkubation für 1 h bei 37 °C, dabei das E-Cup jede 15 min kurz schüttelnd. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen und der Aufnahme des Pellets in frischem LB-Medium wurden die Zellen auf Selektiv-Platten mit Ampicillin und/oder Kanamycin ausplattiert. Die Klone, die auf Platten mit beiden Antibiotika wuchsen, wurden wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben für die robotgesteuerte Cosmid-Präparation eingesetzt.

SM-Puffer

NaCl	5,8 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2,0 g
1 M Tris-HCl (pH 7,5)	50 ml
2 % (w/v) Gelatine	5 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad 1000 ml

2.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA, sei es die Sequenzierung von rekombinanten Plasmiden/Cosmiden oder die Sequenzierung von PCR-Produkten, wurde an ABI PRISM 337 Geräten (Applied Biosystems, Weiterstadt) oder am MegaBACE 1000 System (Amersham Bioscience, Molecular Dynamics) durchgeführt. Beide Gerätearten sollen im folgenden kurz vorgestellt werden. Allerdings würde es den Rahmen dieser Arbeit sprengen, auf genauere Details einzugehen oder die komplette Prozedur der Sequenzierung zu beschreiben. Für Interessierte verweise ich auf die Internetseiten der beiden Firmen (<http://www.appliedbiosystems.com> und http://www5.amershambiosciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/na_homepage).

2.10.1 Sequenzierung mit ABI DNA Sequencer 377

Der ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer (Fa. Perkin-Elmer/Applied Biosystems) analysiert automatisch DNA-Moleküle, die mit multiplen Fluoreszenzfarbstoffen (Big Dye[®] Terminatoren) markiert sind, wobei für jede DNA-Base ein anderer Farbstoff gewählt wird. Die Markierung der DNA erfolgt dabei nach dem Prinzip der von SANGER et al. (1977) entwickelten Didesoxy- oder Kettenabbruch-Methode. Die zu sequenzierenden markierten Proben werden auf ein vertikal verlaufendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen und durch Anlegen einer Spannung elektrophoretisch aufgetrennt. 96 Proben können dabei gleichzeitig sequenziert werden. Die Farbstoffe werden beim Durchlaufen des unteren Endes des Gels mittels eines Lasers detektiert und die Signale anschließend einer Computeranalyse unterzogen. Die Fluoreszenzsignale werden dabei über das sogenannte *Base calling* (s. 2.11) automatisch in Sequenzdaten umgewandelt. Zur Markierung der DNA wurde das Big Dye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit benutzt, das eine spezielle DNA-Polymerase enthält (Ampli-Taq^R DNA-Polymerase). Ein optimal hergestellter Sequenzierungsansatz (s. u.) konnte so in einem ü. N.-Lauf zu einer auflösbaren DNA-Leseweite von ca. 800 Basen führen. Die Sequenzierungsprozedur mit dem ABI PRISM[®] 377 umfasste folgende Schritte:

- Reinigung der Glasplatten
- Gießen des Polyacrylamid-Gels zwischen die Glasplatten
- Einbau des Gels in das Gerät
- Plattencheck und Vorlauf
- Beladen des Gels mit 96 Proben
- Starten der Elektrophorese

Tabelle 4 gibt einen Einblick in die Zusammensetzung eines Sequenziergels und in die einzustellenden Parameter am ABI PRISM[®] 377 zur Durchführung eines Sequenzierlaufes.

Tabelle 4: Parameter zur Beschaffenheit eines Sequenziergels (4,25%ig) sowie zur Bedienung eines ABI PRISM® 377 bei einem ü. N.-Lauf

Geldicke	0,2 mm
Gellänge	48 cm
Harnstoff 7 M	18 g
Acrylamid (30%, 29:1)	5,3 ml
10x TBE _{long run}	6 ml
H ₂ O _{bidest}	21,5 ml
10% APS	250 µl
TEMED	25 µl
Spannung	3500 V
Stromstärke	60 mA
Leistung	40 W
Temperatur	45 °C
CCD Offset	0
CCD Gain	4
Vorlaufzeit	90 sec
Laufzeit	1,5 h + 14,5 h
Laufpuffer	2x TTE oben, 1x TTE unten
Minimale Anzahl der Scans	22000

Probenbereitung. Die Zusammensetzung eines Sequenzieransatzes variierte je nach Art der DNA (Plasmid, Cosmid oder PCR) sowie nach dessen G+C-Gehalt. Der Ansatz erfolgte normalerweise im 96er Maßstab. Typischerweise wurde zur Sequenzierung von Templates (d. h. Inserts von Plasmiden einer *C. tetani*-Genbank), die aus dem Genom von *C. tetani* stammten, folgender Ansatz pipettiert (im ‚Premix‘ sind dabei die ABI Big Dye® Terminatoren enthalten):

”1/2-half BD-Ansatz”

Premix	2 µl
half BD	2 µl
Betain (5 M)	1 µl
Primer (5 pmol/µl)	1 µl
H ₂ O	x µl
DNA-Template (max. 13 µl)	$\frac{x \mu l}{20 \mu l} = 400 \text{ ng}$

Dieser Ansatz wurde dann in einen 96er PCR-Thermoblock (MWG-Primus 96 plus) gegeben und dort 2 min bei 98 °C denaturiert. Folgendes Programm wurde anschließend gestartet, wobei sich die Anlagerungstemperatur nach den Schmelztemperaturen der verwendeten Primer richtete, die meistens um die 50° C lag:

Denaturierung	96 °C	20 s
Anlagerung	i. d. R. 45 °C	15 s
Polymerisierung	60 °C	4 min

Es schloss sich eine Fällung mit Ethanol (99%) und 3 M Natriumacetat (pH 4,6) an, um überschüssige, nicht eingebaute farbstoffmarkierte Terminatoren zu entfernen, da diese sonst als „Dye-Blobs“ in den ersten 100 Basen der Sequenz erscheinen würden. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurde die gefällte DNA mit 1 µl Stop-Mix (Formamid zu Loading Puffer (50 mg Blue Dextran/ml 25mM EDTA, pH 8,0) im Verhältnis 5:1) versetzt.

2.10.2 Sequenzierung mit dem MegaBACE 1000 Capillar Sequencer

Das MegaBACE 1000 System analysiert wie das ABI PRISM[®] 377 Gerät automatisch DNA-Moleküle, die mit multiplen Fluoreszenzfarbstoffen (DYEnamic ET Dye[®] Terminatoren) markiert sind. Ein Lasersystem übernimmt die Detektion der Fluoreszenzsignale. Im Gegensatz zum ABI Gerät aber benutzt der MegaBACE 1000 die Kapillar-Technik: es muss nicht mehr ein Polyacrylamid-Gel gegossen werden; stattdessen findet die Elektrophorese in winzig kleinen (ca. 100 µm im Durchmesser)

Kapillaren statt, die Polyacrylamid-Matrix enthalten, welches das System über Hochdruck aus 6 Matrix-Tubes in die Kapillaren hineinschießen kann. Diese Kapillaren sind in 6 Arrays mit jeweils 16 Einzelkapillaren angeordnet. Zum Beladen des Systems wird lediglich eine 96er Platte mit den enthaltenden Proben in die Maschine gestellt; mittels des Anlegens einer Spannung gelangt die Probe dann in die Kapillaren, in denen dann die elektrophoretische Auftrennung stattfindet. Die Bedienung des Gerätes folgte dann den auf dem Display erscheinenden Anweisungen. Das System kann im Hochdurchsatz arbeiten und dabei 96 Proben in 2-4 Stunden mit einer Leseweite von ca. 600 Basen sequenzieren. Im Gegensatz zum ABI PRISM[®] 377 zeigt der MegaBACE 1000 eine höhere Empfindlichkeit bei schwankenden DNA-Konzentrationen, so dass diese nach Möglichkeit im Vorfeld angeglichen werden sollten. Alle gewonnenen Rohdaten werden nach Ende eines Laufes automatisch mittels *Base calling* ausgewertet. Die Probenbereitung entsprach weitestgehend der bereits beschriebenen Methode für den ABI PRISM[®] 377 (s. 2.10.1). Abweichend davon wurde das Amersham-DYEnamic-ET-Dye-Terminator-Cycle-Sequencing Kit benutzt.

2.11 Die Prozessierung von Rohsequenzen

Nach einem Sequenzierlauf werden die Rohdaten, die Fluoreszenzsignale und -intensitäten, automatisch analysiert und in DNA-Sequenzen umgerechnet, was als *Base calling* bezeichnet wird. Benutzt wurde der *Basecaller* Phred (EWING et al., 1998). Dieser liest die Rohdaten von den DNA Sequenziermaschinen (*trace files*), rechnet sie in DNA-Basen um und teilt diesen zusätzlich einen Qualitätswert zu. Phred kann sowohl die Rohdaten vom ABI 377 DNA Gerät als auch vom Megabace 1000 lesen. Die Sequenzen und die dazugehörigen Qualitätswerte können dann zur Assemblierung mit Hilfe von Sequenzassemblierungsprogrammen benutzt werden (BONFIELD & STADEN, 1996).

2.11.1 Einführung in die Prozessierung von DNA-Sequenzen mittels des STADEN-Software-Packets

Das STADEN-Software-Packet beinhaltet verschiedene Programme zum Selektieren, Aufbereiten, Assemblieren und Editieren von DNA-Sequenzen (STADEN et al., 2000). Es würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, auf die Struktur und Funktionsweise der einzelnen Programme einzugehen. Hier soll nur ein Überblick über die Anwendung des Software-Paketes im Rahmen des Genomsequenzierungsprojektes *C. tetani* gegeben werden. Eine ausführliche Dokumentation kann unter http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/pubseq/staden_home.html abgerufen werden. Im wesentlichen sind es zwei Programme, die zur Prozessierung der DNA-Sequenzen benutzt wurden: Pregap4 und Gap4.

2.11.1.1 Pregap4

Bevor DNA-Sequenzen in das Genomassemblierungsprogramm Gap4 eingespeist werden können, müssen diese durch diverse Prozesse geleitet werden, welche das Programm Pregap4 leistet (BONFIELD & STADEN, 1996):

- Screening auf Vektor-Kontaminationen: Sequenzen, die den Vektor-Sequenzen (pTZ19R oder superCos1) entsprechen, fallen aus der Datenbank heraus.
- Screening auf Kontamination mit *E. coli* DNA: bei der Herstellung der Genbank kann es zu Kontaminationen mit der DNA des Wirtstammes (*E. coli* DH5 α) kommen. Diese Daten müssen ebenfalls entfernt werden.
- Qualitätskontrolle: Sequenzen mit einer geringen Qualität fallen aus der Datenbank heraus.
- Vektor-Clipping: Es werden die Basen einer Sequenz maskiert, die im Übergang zum Insert der Vektor-Sequenz entsprechen.
- Umformatierung in ein neues Dateiformat: Zur Assemblierung benötigt Gap4 ein anderes Dateiformat (*experiment files*).

Zur Erleichterung der Prozessierung der Rohdaten wurden im Göttinger Genomanalyselabor Computerskripte entwickelt, die hier nicht näher erläutert werden sollen. Prinzipiell bewerkstelligten solche Skripte das Umbenennen von Dateinamen, das

Einleiten der Rohsequenzen in Pregap4 und das Sortieren der Ausgabe von Pregap4 in mehrere Listen (*Failed*, *Passed*, *ScreenVector*, etc.).

2.11.1.2 Gap4

Gap4 ist ein Genomassemblierungsprogramm; es kann aber auch für kleinere DNA-Abschnitte wie Cosmide oder große Plasmide verwendet werden (BONFIELD et al., 1995). Neben der Assemblierung kann das Programm auch zur Editierung der Sequenzen benutzt werden. Gap4 ist des weiteren unerlässlich beim sogenannten *Finishing*, dem Schließen von Sequenzlücken in einem Genomsequenzierungsprojekt.

Assemblierung. Mit Hilfe von Algorithmen (PHRAP, <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>) werden Sequenzüberlappungen ausfindig gemacht. Sequenzläufe (*readings*) die solche Sequenzüberlappungen aufweisen, werden dann passend zueinander ausgerichtet (*Alignment*) und zu zusammenhängenden DNA-Abschnitten, den sogenannten Contigs zusammengefasst. Aus den ‚*alignten*‘ Sequenzen innerhalb eines Contigs bildet das Programm dann eine Consensus-Sequenz.

Editierung. Ziel ist es hierbei, die Qualität der Consensus-Sequenz eines Contigs zu verbessern und Fehler in der Assemblierung zu detektieren und aufzulösen. Dabei wurden entsprechende Einzelsequenzen markiert, aus dem Contig extrahiert und dann manuell in den Datensatz zu passenden Contigs zurücktransferiert. Assemblierungsfehler (*Misassemblies*) treten vor allem in repetitiven Bereichen einer Genomsequenz auf, wie z. B. IS-Elemente oder rRNA-Cluster. Zur Anwendung kommt dabei die Funktion *Contig Editor*, mit dessen Hilfe man u. a. Sequenzschwächen und -fehler finden und reparieren kann. Als Anhaltswert für die Sequenzqualität soll die Fehlerrate nicht höher als 1 in 10000 Basen betragen. Dabei lässt sich die Qualität jeder einzelnen Base in der Consensus-Sequenz über deren *Base Confidence*-Wert überprüfen.

Finishing. In Gap4 können zwei (oder mehrere) Contigs anhand der Lage und Orientierung der enthaltenen *readings* zueinander geordnet werden (s. 2.12.2), was eine Hilfe zur Überwindung von Sequenzlücken zwischen Contigs ist (s. 2.12). Gegebenenfalls können Contigs dann semi-manuell mit Hilfe der Funktion *Join Contigs* miteinander verbunden werden.

2.12 Methoden zur Überwindung von Sequenzlücken in einem Genomsequenzierungsprojekt

2.12.1 Identifikation von Contigüberlappung mit Gap4 oder BLASTN

Nach erfolgter Assemblierung, deren Überprüfung und der ersten Editierung sämtlicher Contigs wurde versucht, überlappende Contigs zu identifizieren. Dies geschah zum einen automatisch über die Funktion *Find Internal Joins* in Gap4. Jeder gefundene potentielle Contigüberlapp bedurfte im *Join Contigs Editor* einer genauen Überprüfung. Zum anderen wurde ‚extern‘ nach überlappenden Contigs gesucht, indem die Enden sämtlicher Contigs gegen den gesamten Datensatz - bestehend aus allen Contig-Consensus-Sequenzen - mit dem BLAST-Algorithmus abgeglichen wurden (ALTSCHUL et al., 1990). Die letztere Methode zeigte eine bessere Trefferquote. Mit dieser Methode wurden auch alle repetitiven Sequenzen im Genom identifiziert, die Kopienzahl bestimmt und jede Kopie im Gap4-Datensatz markiert, da diese die größten Probleme im letzten Stadium eines Genomsequenzierungsprojektes bereiteten. Contigs, die potentiell überlappen sollten, wurden dann in Gap4 manuell über *Join Contigs* zueinander ausgerichtet und gegebenenfalls miteinander verbunden.

2.12.2 Primer-Walking

Mit Hilfe der Gap4-Funktion *Template Display* können einzelne Contigs visuell dargestellt werden: dort sind alle im Contig enthaltenen *Readings* und deren Templates aufgeführt. Ein Template entspricht dabei einem Insert eines rekombinanten Plasmids der *C. tetani*-Genbank. Anzumerken ist, dass die Inserts der Plasmide von beiden Seiten her ansequenziert wurden (*forward* und *reverse*). Da die durchschnittliche Insertgröße bei etwa 2 kb lag und ein typischer Sequenzierlauf etwa 600-700 Basen lang war, bedeutete dies, dass ein Insert (= Template) nicht vollständig sequenziert wurde. Im *Template Display* nun sind die beiden *readings* desselben Templates zueinander angeordnet. Mit Hilfe der Funktion *Order Contigs* ließen sich dann solche Contigs aneinander reihen, die an den Rändern *readings* beinhalteten, die zu demselben Template gehörten:

beispielsweise begann oder endete der Contig A mit dem *forward reading* des Templates X, während Contig B nun mit dem *reverse reading* des Templates X endete oder begann. Damit war es nun möglich, durch ein sogenanntes Primer-Walking die Lücke zwischen diesen beiden Contigs zu schließen: es wurde ein Sequenzierprimer vom Ende eines der beiden *readings* abgeleitet (mit der Orientierung zum Insertinneren), der dann zur Sequenzierung des entsprechenden Templates eingesetzt wurde. So konnte man die überbrückende Sequenz zwischen den Contigs ermitteln, woraufhin die beiden Contigs i. d. R. geschlossen werden konnten.

2.12.3 PCR-basierte Methoden

Der folgende Abschnitt soll kurz aufzeigen, wie PCR-basierte Methoden zur Überwindung von Sequenzlücken in einem Genomsequenzierungsprojekt beitragen können.

War kein Plasmid-Template vorhanden, dass eine Sequenzlücke zwischen zwei Contigs überspannte, mussten weitere Daten herangezogen werden, um Contigs aneinander zu reihen. Wichtig war dabei u. a. eine **Cosmid-Genbank**. Die Größe des Inserts zwischen 30-40 kb eines rekombinanten Cosmids erhöhte im Vergleich zu rekombinanten Plasmiden die Möglichkeit, dass ein solches Cosmid eine Lücke zwischen zwei Contigs überspannte. Wurden solche Cosmide in Gap4 identifiziert, konnten die dazugehörigen Contigs zueinander geordnet werden. Daraufhin wurden Primer von den beiden entsprechenden Contigenden her abgeleitet - mit der Orientierung zur Lücke - und eine PCR entweder mit genomischer DNA oder mit dem die Lücke überspannenden Cosmid durchgeführt.

Des weiteren wurde die Methode der **kombinatorischen PCR** eingesetzt. Hierbei wurden zuerst Primer von allen Contigrändern abgeleitet, mit der Orientierung zum Contigende hin. Nun wurden diese in allen denkbaren Kombinationen miteinander eingesetzt, wobei eine durchschnittliche Lückengröße von nicht mehr als 2 kb angenommen wurde. Da die Anzahl an möglichen Kombinationen entsprechend groß war (z. B. bei 100 Contigs 19900 mögliche Kombinationen), wurden in der Praxis zur Erleichterung der Arbeit nur Subsätze von Primerkombinationen angesetzt. Jedes erhaltende PCR-Produkt wurde sofort sequenziert und die Sequenz zum Lückenschluss eingesetzt.

2.12.4 Lückenschluss unter Zuhilfenahme der Genomannotation

Als sehr effektiv zur Überwindung von Sequenzlücken in einem Genomprojekt hat sich die Hinzunahme von Annotationsdaten erwiesen. Allerdings bedurfte es dazu einer Voraussetzung: es musste ein oder mehrere Genome von (nah) verwandten Organismen bereits – zumindest teilweise - bekannt sein. Für das *C. tetani* Projekt bot sich die Verwendung der Genomdaten von *C. acetobutylicum*, *C. perfringens*, *C. difficile* und *C. botulinum* an. Dabei machte man sich den Umstand zunutze, dass nah verwandte Organismen i. d. R. einen hohen Konservierungsgrad in der genetischen Organisation haben. So ist bei Prokaryonten die genetische Nachbarschaft eines bestimmten ORFs (*open reading frame*) innerhalb einer Gattungen oft ähnlich oder sogar identisch. Für alle Enden der Contigs im *C. tetani*-Projekt wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Die DNA-Sequenz des Endes eines Contigs (1-4 kb) wurde einer ORF-Identifikation (s. 2.13.1) unterworfen.
- Die Proteinsequenz(en) des/der gefundenen ORFs (z. B. ORF X) wurde(n) mittels des BLASTP-Algorithmus gegen die Proteinsequenzen der verwandten Organismen abgeglichen (ALTSCHUL et al., 1990). Dazu wurde i. d. R. ERGO verwendet (OVERBEEK et al., 2000; s. 2.13.2).
- Sollte ein hoch homologes Protein, ORF X', in einem verwandten Organismus gefunden worden sein, wurde mit Hilfe von ERGO die genetische Nachbarschaft dieses ORFs angezeigt.
- Die Proteinsequenz eines direkt benachbarten ORFs, ORF Y', in diesem verwandten Organismus wurde dann mittels tBLASTN (Proteinsequenz-BLAST gegen alle 6 translatierten Leserahmen) gegen das Genom von *C. tetani* abgeglichen.
- Wurde ein BLAST-Treffer mit hoher Homologie, d. h. der ORF Y, in dem Genom von *C. tetani* gefunden und bezog sich dieser auf ein Protein, das in der DNA-Sequenz des Endes eines anderen *Contigs* kodiert vorlag, wurden die beiden *Contigs* - also das ORF X und das ORF Y kodierende - als potentiell zusammengehörig eingestuft.
- Nun wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die von den entsprechenden Enden dieser beiden Contigs abgeleitet wurden. Die Elongationszeit konnte

aus der Größe der ORFs X' und Y' sowie deren Abstand im Genom des verwandten Vergleichsorganismus annäherungsweise abgeleitet werden.

- Zeigte sich ein PCR-Produkt (in der zu erwartenden Größe), wurde dieses sequenziert und die DNA-Sequenz zum Contigschluss verwendet.

2.13 Sequenzanalyse

Nach Beendigung der Sequenzierungsphase und dem Schluss der letzten Lücken in der Genomsequenz wurde versucht, alle in der Sequenz vorkommenden Gene zu identifizieren. Das Vorhersagen von allen potentiellen Genen wird als ORF-Vorhersage bezeichnet, welche mit entsprechenden Computer-Algorithmen durchgeführt wurde. Danach schloss sich die eigentliche Annotation an, welches die Zuweisung von Funktionen zu den abgeleiteten Proteinsequenzen der ORFs meint.

2.13.1 ORF-Vorhersage

Alle ORF-Vorhersageprogramme für Prokaryonten basieren auf das Auffinden von Start (ATG, GTG, TTG)- und Stopcodons (TAA, TGA, TAG) auf allen sechs möglichen Leserahmen. Danach werden solche Sequenzbereiche festgelegt, die zwischen dem Start- und Stopcodon auf *demselben* Leserahmen eine bestimmte *Cutoff*-Größe erreichen (oft 30 Codons). Dieser Bereich wird als ORF bezeichnet, stellt also ein potentielles Gen dar.

Im *C. tetani*-Genomprojekt kamen unterschiedliche ORF-Vorhersage-Programme zum Einsatz. Bei der Plasmidsequenz (pE88) wurde das Programm Frameplot (ISHIKAWA & HOTTA, 1999) angewandt, das besonders für Organismen mit extremen G+C-Gehalt geeignet ist (<http://watson.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot-3.0b.pl>). Mit Frameplot ist es möglich, sich die abgeleiteten Proteinsequenzen der einzelnen vorhergesagten ORFs anzeigen zu lassen und diese direkt mit der NCBI-Sequenz-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) abzugleichen. Dadurch können homologe Proteine aus andern Organismen identifiziert werden, und somit dem betrachteten ORF gegebenenfalls eine Funktion zugewiesen werden.

Für die ORF-Vorhersage auf der chromosomalen DNA-Sequenz wurde das Programm GLIMMER (Gene Locator and Interpolated Markov Modeler; DELCHER et al., 1999) verwendet. Dieses Programm benutzt interpolierende Markov-Modelle (IMM), um kodierende Regionen zu identifizieren und sie von nicht-kodierenden Bereichen zu unterscheiden. Zuerst entwickelt GLIMMER anhand einer Trainingsmenge ein IMM. Typischerweise sollte die Testmenge aus bereits bekannten Genen des Organismus' und – sollten solche nicht vorliegen – aus solchen ORFs bestehen, die sehr lang sind und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit Gene darstellen. Im eigentlichen ORF-Vorhersageprogramm wendet nun GLIMMER dieses IMM an, um alle potentiellen Gene zu identifizieren. GLIMMER löst i. d. R. auch Probleme bei Überlappungen von ORFs, wobei es sich für einen der beiden überlappenden ORFs entscheidet.

Abschließend sei gesagt, dass es bisher kein ORF-Vorhersage-Programm gibt, welches alle Gene richtig vorhersagt. Manuelle Verbesserungen der Gen-Vorhersage sind daher unumgänglich.

2.13.2 Genomweite Annotation mit ERGO

Zur Erleichterung der genomweiten Annotation, d. h. der Zuordnung von Funktionen zu allen potentiellen Genen - sprich ORFs - eines Genoms, gibt es verschiedene Computerprogramme wie PEDANT, MAGPIE oder ERGO. Im Göttinger Genomanalyiselabor wird das ERGO Programm benutzt (Fa. Integrated Genomics; <http://www.integratedGenomics.com>; OVERBEEK et al., 2000), genauer gesagt, eine lokal installierte Version, das ERGO Göttingen. Es soll an dieser Stelle nicht der Versuch unternommen werden, die Vielzahl der Möglichkeiten dieses Programms vorzustellen, was den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Vielmehr soll konkret erläutert werden, wie bei der genomweiten Annotation von *C. tetani* vorgegangen wurde.

Die von GLIMMER vorhergesagten ORFs wurden in das ERGO-Programm eingespeist. Dieses berechnet nun mittels des FASTA-Algorithmus' die Ähnlichkeiten aller *C. tetani*-ORFs - auf Nukleotid- wie auf Proteinebene - zu Sequenzen der internen ERGO-Datenbank. Die nicht-redundante interne ERGO-Datenbank umfasst zur Zeit (Oktober 2002) Sequenzen - i. d. R. vollständige Genome - aus 394 Organis-

men: 25 Archaeen, 81 Eukaryoten, 88 Viren und 200 Prokaryoten. Eine neuere Version des ERGO-Programms, die zum Zeitpunkt der Annotation des *C. tetani*-Genoms noch nicht vorlag, ist auch in der Lage, eine Ähnlichkeitssuche aller ORFs mit der externen NCBI-Datenbank durchzuführen. Der externe NCBI-Sequenzabgleich umfasst eine Vielzahl von Nukleotid- und Proteinsequenz-Datenbanken wie die PDB-, SwissProt-, Pir-, DDBJ-, EMBL- und die GenBank-Datenbank.

Das ERGO-Programm wies also allen *C.tetani*-ORFs automatisch eine Funktion zu, die aus dem Ähnlichkeitsvergleich mit der internen ERGO-Datenbank abgeleitet wurde. Wenn keine Ähnlichkeiten in der Datenbank gefunden wurden, bezeichnete das Programm den entsprechenden ORF als hypothetisch. Diese automatische Annotation musste nun - ORF für ORF - überprüft werden, da sich der interne Datenbank-Abgleich oftmals als ungenügend herausstellte. So z. B. konnte vielen der von ERGO als hypothetisch bezeichneten ORFs durch einen zusätzlichen externen NCBI-Sequenzabgleich eine Funktion zugewiesen werden. Ein externer Sequenzabgleich erwies sich gegenüber dem internen Abgleich i. d. R. als umfassender, aktueller und genauer in der Funktionszuordnung. Als weitere Fehlermöglichkeit der automatischen ERGO-Annotation wurde erkannt, dass ERGO dem betrachteten ORF die Funktion desjenigen Proteins zuwies, das den höchsten Ähnlichkeitswert (Smith-Waterman-Score) zum betrachteten ORF aufwies. Gerade bei geringer Homologie, also einem niedrigen Smith-Waterman-Score, zeigte sich aber oftmals, dass die dem ORF zugewiesene Funktion zu ungenau oder aber auch zu speziell war (WATERMAN, 1984).

Folgende Vorgehensweise wurde bei der Überprüfung der automatischen Annotation eines ORFs angewandt:

- Vergleich der dem ORF zugewiesenen Funktion mit den Funktionen der homologen Proteine; Überprüfung der Ähnlichkeitswerte (eine signifikante Homologie zwischen zwei Proteinsequenzen wird im allgemeinen definiert als eine Proteinidentität größer als 30% bei einer Überlappung (*Alignment*) von mehr als 60% der Eingabe (*query*)- und der Vergleichssequenz). Insbesondere wurde darauf geachtet, ob sich unter den homologen Proteinen eines betrachteten *C. tetani*-ORFs auch eines (oder mehrere) befand, das bereits biochemisch charakterisiert ist; dessen Funktion wurde – bei entsprechend hoher Homologie – dem ORF vorrangig zugewiesen.

- Durchführung eines externen Sequenzabgleichs mit der NCBI-Datenbank; Vergleich des Ergebnisses und gegebenenfalls manuelle Änderung der ORF-Annotation.
- Überprüfung des Startcodons des ORFs: gibt es 6-12 Nukleotide stromaufwärts eine Ribosomen-Bindestelle ?
- Vergleich der genetischen Umgebung des betrachteten ORFs mit der Umgebung homologer ORFs aus (nah) verwandten Organismen mittels der ERGO-Funktionen *Pinned Regions* oder *Contig Regions*. Durch solch einen Vergleich konnte ermittelt werden, wie homolog die genomische Organisation zwischen verwandten Organismen ist und ob ein ORF in *C. tetani* fehlte oder zusätzlich nur in *C. tetani* vorlag, was oft auf einen Fehler der ORF-Vorhersage hindeutet.
- Identifizierung und Entfernung hypothetischer ORFs, die mit solchen ORFs überlappen, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit Gene darstellen.
- bei hypothetischen und konservierten ORFs: kann das abgeleitete Protein mittels Abgleich mit der COG-Datenbank (COG: clusters of orthologous genes) einer Proteinfamilie zugeordnet werden ? Können durch Abgleich mit Domänen-Datenbanken (PFAM, ProSite, PROFILE, ProDom) konservierte Domänen identifiziert werden ? Weist das Protein transmembrane Helices auf (TMpred; http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) ?

Durch die beschriebene Vorgehensweise wurde die Annotation des *C. tetani*-Genoms entscheidend verbessert. Erwähnt werden soll an dieser Stelle auch das Dilemma eines ‚Annotators‘: die Mehrzahl der *C. tetani*-ORFs zeigt die höchsten Homologien zu Proteinen, die biochemisch nicht charakterisiert sind. Diese haben ihre Funktionen nur über Sequenzhomologien zu Proteinen, die ihrerseits oftmals nicht biochemisch charakterisiert sind, zugeordnet bekommen. So können sich Fehler, die an anderer Stelle bei der Annotation von Genen anderer Organismen gemacht wurden, in Datenbanken fortpflanzen und ausbreiten. Deshalb war es dem *C. tetani*-Annotations-Team wichtig, wie bereits oben erwähnt, Homologien zu biochemisch charakterisierten Proteinen besonders anzuerkennen und in die Annotation des *C. tetani*-Genoms einfließen zu lassen.

Das ERGO-Programm hat darüber hinaus noch eine Vielzahl weiterer Funktionen, die hier nur am Rande erwähnt seien, wie etwa der ‚Genome-Walk‘, das genomweite

Abgleichen aller ORFs von ausgewählten Organismen zum Vergleich der genetischen Organisation, oder die Rekonstruktion von Stoffwechsel-Wegen basierend auf dem genetischen Potential eines Organismus’.

2.14 Standardtechniken zum Arbeiten mit Proteinen

2.14.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte nach BRADFORD (1976, mod.). Diese Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffes „Coomassie-Brilliant-Blue“ an Proteine. 20 µl Probe wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte in 1 ml Plastikküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 584 nm gegen H₂O als Leerwert (Spektralphotometer Uvikon 810, Kontron Instruments, Eching). Bei der Proteinbestimmung von ganzen Zellen wurden dem Ansatz vor der Inkubation noch 50 µl 1 M NaOH zugefügt. Die Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin im Bereich von 0-20 µg Protein aufgenommen.

Bradford-Reagenz:

Serva Blau G-250	70 mg
Ethanol (96 % [v/v])	50 ml
H ₃ PO ₄ (85 % [v/v])	100 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Der Farbstoff wurde in Ethanol gelöst, erst mit Phosphorsäure, dann mit Wasser aufgefüllt und filtriert. Das Reagenz hatte eine bräunliche Farbe und wurde lichtgeschützt bei RT aufbewahrt.

2.14.2 Bestimmung der Molekularmassen von Proteinen

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen in SDS-Gelen wurden gleichzeitig entsprechende Standardproteine mitaufgetrennt:

Standardproteine	LMW-Marker [kDa] ^a
Phosphorylase b	94,0
Rinderserumalbumin	67,0
Ovalbumin	43,0
Carboanhydrase	30,0
Trypsin-Inhibitor	20,1
Lactalbumin	14,4

^aFa. Pharmacia GmbH, Freiburg

Nach Anfärbung der Gele konnte die Molekularmasse von Proteinen berechnet werden, indem die Wanderungsstrecke im Gel mit der von den Markerproteinen verglichen wurde. Die Auftragung des Logarithmus der Molekularmassen der Standardproteine gegen deren Rf-Wert ergab eine Eichgerade, aus der die Molekularmasse der unbekannten Proteine abgelesen werden konnten.

$$\text{Rf-Wert} = \frac{\text{Wanderungsstrecke des Proteins}}{\text{Wanderungsstrecke des Farbstoffes}}$$

2.14.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Proteinen

Zur Reinheitskontrolle und Molekularmassenbestimmung wurde das Protein unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE). Das anionische Detergenz SDS zerstört die Quartärstruktur von Proteinen und lagert sich an die hydrophoben Regionen des Proteins an. Dadurch wird die Eigenladung des Proteins überdeckt, und es findet nur noch eine Auftrennung nach der Masse und nicht nach der Ladung statt. Zur besseren Trennungsleistung arbeitet man zusätzlich mit diskontinuierlichen Gelen (Sammel- und Trenngel). Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Minigelkammer (Fa. Biometra, Göttingen) mit 10 x 10 cm Glasplatten und 1 mm Spacern durchgeführt.

Die Lösungen setzten sich folgendermaßen zusammen:

<u>Acrylamid-Lösung</u>	Acrylamid	30,0 g
	Bisacrylamid	0,8 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
	Anschließend erfolgte eine Filtration.	
<u>Trenngelpuffer</u>	Tris/HCl	22,77 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
	pH 8,8 (mit HCl)	
<u>Sammelgelpuffer</u>	Tris/HCl	7,57 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
	pH 6,8 (mit HCl)	
<u>SDS-Lösung</u>	SDS	0,5 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
<u>Ammoniumpersulfat-Lösung</u>	APS	0,1 g
	H ₂ O _{bidest.}	940 µl
<u>Elektrodenpuffer</u>	Tris	3,0 g
	Glycin	14,4 g
	SDS	1,0 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
	pH 8,3 mit Glycin einstellen	
<u>Probenauftragungspuffer</u>	Sammelgelpuffer	2,0 ml
	SDS	0,2 g
	Bromphenolblau (1 % in Ethanol)	0,1 ml
	Mercaptoethanol	0,5 ml
	Glycerin	5,0 ml
	H ₂ O _{bidest.}	ad 10,0 ml

Die Lösungen wurden je nach gewünschter Acrylamidkonzentration folgendermaßen gemischt:

Lösung	Trenngel			Sammelgel
	14 %	10 %	8 %	5 %
Acrylamid-Lösung	2,8 ml	2 ml	1,6 ml	0,33 ml
Trenngelpuffer	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	0,4 ml
SDS-Lösung	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	0,4 ml
H ₂ O _{bidest.}	0,8 ml	1,6 ml	2,0 ml	0,87 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
APS	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

Die einzelnen Komponenten des Trenngels wurden gemischt, zwischen die mit H₂O_{bidest.} und Ethanol (70 % [v/v]) gesäuberten Glasplatten gegossen und mit H₂O_{bidest.} überschichtet, damit eine ebene Geloberfläche entstand. Nach dem Polymerisieren wurde das Wasser mit Filterpapier entfernt, die frisch angesetzte Sammelgellösung über das Trenngel geschichtet und der Kamm zur Taschenformung luftblasenfrei eingesetzt. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Dichtung und der Kamm entfernt und das Gel in die mit Elektrodenpuffer gefüllte Kammer gespannt. 25 µl Probe (Proteingehalt 8-20 µg) wurden mit dem gleichen Volumen Probenauftragspuffer vermischt und für 15 min bei 95 °C inkubiert. Aufgetragen wurden jeweils 20 µl mit einer Hamiltonspritze. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei RT und konstanter Stromstärke von 25 mA und war beendet, wenn die blaue Lauffront das Gelende erreicht hatte.

2.14.4 Silberfärbung (BLUM et al., 1987)

Die Silberfärbung ist eine sehr empfindliche Färbemethode, da selbst geringe Mengen an Protein nachgewiesen werden können. Folgende Schritte wurden durchgeführt:

- mindestens 1 h Inkubation in Fixiererlösung
- 3 x 1 min waschen in 50 % Ethanol (v/v)

- 1 min Inkubation in Thiosulfatlösung
- 3 x 10 sec waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
- 20 min Inkubation in Imprägnierlösung
- 2 x 10 sec waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
- Behandlung mit Entwicklerlösung, bis die Banden im Gel deutlich sichtbar sind
- 2 x 10 sec mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ waschen
- Inkubation in Stopplösung, bis eine leichte Trübung sichtbar wird
- mindestens 15 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ waschen

Die Gele wurden in Plastikfolie eingeschweißt und sofort mit Hilfe eines Scanners dokumentiert, da die Gefahr des Nachdunkelns bestand. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Fixiererlösung:

Methanol	500 ml
Eisessig	120 ml
Formaldehyd (37 % [v/v])	0,5 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad 1000 ml

Thiosulfatlösung:

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad 1000 ml
Lagerung bei 4 °C	

Imprägnierlösung:

AgNO_3	2 g
Formaldehyd (37 % [v/v])	0,75 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad 1000 ml
Lagerung bei 4 °C	

Entwicklerlösung:

Na ₂ CO ₃	60 g
Formaldehyd (37 % [v/v])	0,5 ml
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O	4 mg
H ₂ O _{bdest.}	ad 1000 ml
Lagerung bei 4 °C	

Stopplösung:

EDTA	18,6 g
H ₂ O _{bdest.}	ad 1000 ml
pH 7 - 8 mit NaOH eingestellt	

2.15 Chemikalien, Biochemikalien und Gase

Es wurden z. T. Chemikalien der Fa. Merck, Darmstadt, des höchsten handelsüblichen Reinheitsgrades verwendet. Die Restriktionsendonukleasen stammten von den Firmen New England Biolabs (Schwalmbach) und MBI Fermentas GmbH (St. Leon Rot). Die Bezugsquellen weiterer Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien und Kits sind an den entsprechenden Stellen im Text angegeben. Nicht explizit erwähnte Firmen sind nachfolgend aufgeführt:

Biomol, Hamburg

IPTG, Lysozym, Phenol (äquilibriert mit Tris-Puffer), TEMED, X-Gal, DTE

Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf:

Agarose

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Alkalische Phosphatase, Proteinase K, RNase, T4-DNA-Ligase, ATP, DNase

Canberra Packard GmbH, Frankfurt

Vials

Difco Laboratories, Detroit, USA

Bacto-Agar, Bacto-Pepton

Gerbü Traiding GmbH, Gaiberg

Ampicillin, Acrylamid

Gibco-BRL, Eggenstein

Agarose, Hefeextrakt, Primer

KODAK AG, Stuttgart

Röntgenfilmentwickler LX 24, Röntgenfilmfixierer AL4, Röntgenfilme (X-OMAT)

Pharmacia LKB, Freiburg

LMW-Markerproteine

Qiagen, Hilden

BioRobots, low-copy-Plasmid-Präparationskit (Mini- und Midi-Kit)

Serva, Heidelberg

APS, Acrylamid, Bisacrylamid, BSA, EDTA, Glycin

Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Ethidiumbromid, u.a.

Alle Gase, sowie flüssiger Stickstoff wurden von der Fa. Messer Griesheim, Kassel, bezogen. Die Gase waren von folgender Reinheit:

N₂: 99,99%

N₂-CO₂-Gemisch (80%/20%), Reinheit nicht angegeben

H₂: 99,9%

3 Experimente und Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die vollständige Entschlüsselung des Genoms von *C. tetani* sowie die Analyse seines genetischen Potentials. Als Sequenzierungsstamm wurde dafür *C. tetani* E88 gewählt, der freundlicherweise von der Firma Behring Chiron GmbH & Co (Marburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. Dort wird dieser Stamm zur Produktion großer Mengen des Tetanus-Toxins genutzt, das in inaktiver Form (Tetanus-Toxoid) als Tetanus-Impfstoff eingesetzt wird.

In diesem Teil der Arbeit sollen der Ablauf des Genomsequenzierungsprojektes und dessen Ergebnisse im Detail beschrieben werden. Weiterhin werden allgemeine Sequenzmerkmale des Genoms von *C. tetani* vorgestellt, und es wird ein Einstieg in die Analyse der Sequenz unternommen. Aufgrund der Menge der gewonnenen Sequenzdaten kann sich diese Analyse nur auf ausgewählte Eigenschaften beziehen.

3.1 Sequenzierung des Plasmids pE88 aus *C. tetani* E88

3.1.1 Isolierung des Plasmids pE88 aus *C. tetani* E88

Die Existenz eines extrachromosomalen Elements in *C. tetani* wurde erstmals 1984 beschrieben (FINN et al., 1984): dort konnte für den Stamm Massachusetts gezeigt werden, dass dieser ein etwa 75 kb großes Plasmid - genannt pCL1 - besitzt, welches für das Tetanus-Toxin kodiert. Die enge Verwandtschaft der *C. tetani*-Stämme Massachusetts und E88, welches als Derivat des Stammes Massachusetts bezeichnet wird (Behring Chiron GmbH & Co, persönliche Mitteilung), sowie die Tatsache, dass der Stamm E88 zur Tetanus-Toxin-Produktion genutzt wird, ließ vermuten, dass auch *C. tetani* E88 ein solches Plasmid besitze. Um dies zu überprüfen, wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt, wie sie unter Kapitel 2.5.3.1 für Plasmide mit sehr niedriger Kopienzahl pro Zelle beschrieben ist. Das Eluat der Plasmidpräparation wurde auf ein 0,5%iges Agarose-Gel aufgetragen: es konnten mehrere hochmolekulare DNA-Banden ausgemacht werden (Abb. 3A). Da das

Auflösungsvermögen eines Agarose-Gels in diesem Größenbereich an seine Grenzen stößt und das Laufverhalten intakter chromosomaler DNA in einem Agarose-Gel i. d. R. in derselben Größenordnung liegt wie die untere der beiden beobachteten DNA-Banden, ließen sich zwei vorläufige Schlüsse ziehen: 1. Es konnte mit einiger Sicherheit von der Existenz eines extrachromosomalen Plasmids in *C. tetani* E88 ausgegangen werden. 2. Eine chromosomale Verunreinigung dieser Plasmid-Präparation konnte nicht ausgeschlossen werden.

Abb. 3: Erste Charakterisierung des Plasmids pE88 aus *C. tetani* E88

A) Proben aus der Plasmidpräparation, unverdaut

Spur 1: Längenstandard

Spur 2+3: Probe nach der 1. Fällung der Plasmidpräparation

Spur 4+5: Eluat nach der 2. Fällung der Plasmidpräparation

B) Restriktionsverdaue

Spur 1+5: Längenstandard

Spur 2: *EcoRI*-Verdau

Spur 3: *PstI*-Verdau

Spur 4: *EcoRI/PstI*-Doppelverdau

In einer weitergehenden Untersuchung wurde die DNA des Eluats mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *PstI* verdaut. Hintergrund dieses Experiments war die Überlegung, dass sich bei einer mit *EcoRI* und/oder *PstI*-verdauten Plasmid-DNA distinkte DNA-Banden im Agarose-Gel erkennen lassen sollten - im Gegensatz

zu verdauter genomischer DNA, die aufgrund der hohen Anzahl an *EcoRI/PstI*-Schnittstellen lediglich ein DNA-Schmier im Agarose-Gel zeigen sollte. Abbildung 3B zeigt, dass klare DNA-Banden ausgemacht werden konnten, deren Größen aufaddiert zwischen 70 und 80 kb lagen. Dieses Bandenmuster entsprach zudem dem, welches für *EcoRI/PstI*-verdaute pCL1-Plasmid-DNA beobachtet worden war (FINN et al., 1984). Damit konnte die Existenz eines Plasmids - gemäß den Konventionen als pE88 bezeichnet - in *C. tetani* E88 nachgewiesen werden, das dem pCL1-Plasmid des Stammes Massachusetts sehr ähnlich oder sogar identisch ist.

3.1.2 Strategie der Sequenzierung von pE88

Das Plasmid pE88 wurde nach dem sogenannten *Shotgun*-Prinzip sequenziert (s. 2.9-2.12). Zunächst musste eine Genbank hergestellt werden. Dazu wurde die isolierte Plasmid-DNA (Abb. 3A) mittels einer umgebauten HPLC-Pumpe fragmentiert. DNA-Fragmente aus pE88 in der Größenordnung von 1-3 kb wurden dann in den Vektor pTZ19R kloniert. Damit sollte prinzipiell die Voraussetzung einer *Shotgun*-Sequenzierung gewährleistet sein, nämlich dass jedes pE88-Fragment statistisch gesehen mit gleicher Häufigkeit in der Genbank repräsentiert ist, um dem Entstehen großer Sequenzlücken im spätern Prozess der Assemblierung der Sequenzen vorzubeugen.

Etwa 1700 rekombinante Klone der hergestellten Genbank wurden einer robotergesteuerten Plasmidpräparation unterworfen. Die Inserts der gereinigten rekombinanten Plasmide wurden dann mit Hilfe zweier Primer von beiden Seiten her, jeweils in 5'-3'-Richtung, ansequenziert. Die Sequenzierungsprimer waren dabei von der pTZ19R-Vektorsequenz im Bereich der multiplen Klonierungsstelle abgeleitet. Die eigentliche Sequenzierung erfolgte mit ABI377[®]-DNA-Sequenziermaschinen. Anschließend wurden die Sequenzen, insgesamt ca. 2900, prozessiert und mit Hilfe des Genomassemblierungsprogramms Gap4 assembliert (s. 2.11). Es bildeten sich mehrere größere Contigs in der Größenordnung von 10-25 kb, die in Gap4 editiert wurden. Etwa 36% aller Einzelsequenzen assemblierten jedoch nicht. Es wurde angenommen, dass diese chromosomalen Ursprungs seien, was auch später - im Rahmen der Sequenzierung des gesamten Genoms - bestätigt werden konnte. Somit war die Plasmidpräparation noch mit chromosomaler DNA

kontaminiert. Um die noch verbliebenen Lücken zwischen den Contigs zu schließen, wurden die Methode des Primer-Walkings und PCR-basierte Methoden herangezogen (s. 2.12). Schließlich konnte so ein einziger Contig - bestehend aus insgesamt 1850 assemblierten Einzelsequenzen - gebildet werden, dessen Consensus-Sequenz der kompletten Sequenz des Plasmids pE88 entsprach. Zur Berechnung der durchschnittlichen Abdeckungsrate jeder Base im Consensus wurde folgende Formel benutzt:

$$\frac{N * w}{L},$$

wobei N die Anzahl der Einzelsequenzen, w die durchschnittliche Länge einer Einzelsequenz (~ 600 Basen guter Qualität, d. h. guter Auflösung) und L die Größe des Genoms (hier: 74082 Basenpaare) ist. Es ließ sich so eine etwa 15fache Abdeckung der Plasmidsequenz berechnen.

3.2 Analyse der Sequenz des Plasmids pE88

3.2.1 ORF-Vorhersage für pE88

Nach Abschluss der Sequenzierung sollten alle möglichen Gene auf pE88 identifiziert werden. Die Vorhersage aller offenen Leserahmen (ORFs, open reading frames) erfolgte dabei mit Hilfe des Programms FRAMEPLOT (ISHIKAWA & HOTTA, 1999; s. 2.13.1). Durch Hinzufügen weiterer durch FRAMEPLOT analysierbarer Kriterien wie das Vorkommen einer Ribosomen-Bindestelle in unmittelbare Nähe stromaufwärts des Startcodons eines ORFs sowie eine Häufigkeitsanalyse der benutzten Codone (*Codon-Usage-Analyse*) wurde versucht, die Charakterisierung der ORFs zu verbessern. Ziel war dabei, die Entscheidung zu erleichtern, welche ORFs tatsächlich Gene darstellen könnten. Alle überlappenden ORFs wurden nach den oben genannten Kriterien überprüft und jeweils der ORF gewählt, welcher ausgeprägtere Merkmale eines Gens trägt. Dazu wurde auch die Annotation aller möglichen ORFs dahingehend herangezogen, dass solche ORFs, die für bekannte, d. h. in Datenbanken abgelegte Proteine kodieren aller Wahrscheinlichkeit nach Gene darstellen. So konnten insgesamt 61 ORFs auf pE88 identifiziert werden, die gemäß ihrer Position als CTP01 bis CTP61 (CTP: *C. tetani*

Plasmid) bezeichnet wurden. Diese Bezeichnung soll im folgenden sowohl für das entsprechende Gen als auch für die abgeleitete Proteinsequenz gelten.

Interessant war die Beobachtung, das kodierende Sequenz i. d. R. eine andere G+C-Verteilung als nicht-kodierende Sequenz zeigte. So liegt der G+C-Gehalt der dritten Base eines Codons innerhalb kodierender Sequenz auf pE88 im Durchschnitt bei nur 15%, also 10 Prozentpunkte niedriger als der durchschnittliche G+C-Gehalt der gesamten Plasmidsequenz. Abbildung 4 soll diese Beobachtung anhand zweier ORFs auf pE88 veranschaulichen: so hat der erste ORF (CTP60, *tetX*) in der dritten Base eines Codons einen durchschnittlichen G+C-Gehalt von nur 16,3%. Beim zweiten ORF (CTP61, *tetR*) beträgt dieser Wert sogar lediglich 12,3%.

Abb. 4: Die ORF-Vorhersage mit Frameplot

Im oberen Teil der Abbildung sind alle Start- (als Pfeile) und Stoppcodone (als senkrechte Striche) in allen sechs Leserahmen gezeigt sowie die ORFs CTP61 und CTP60 als durchgezogene grüne bzw. rote Linie gekennzeichnet. Der untere Teil der Abbildung gibt die Verteilung des G+C-Gehalts der dritten Base eines (potentiellen) Codons wieder - mit der gleichen Farbgebung wie die drei jeweiligen Leserahmen. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den durchschnittlichen G+C-Gehalt der betrachteten Sequenz (hier 27,5%).

3.2.2 Annotation der Plasmidsequenz: genetische Karte und Annotationstabelle

Die 61 potentiellen Gene auf pE88 wurden in Proteinsequenzen übersetzt und gegen die NCBI- und die ERGO-Datenbank abgeglichen (s. 2.13), um homologe Proteine zu identifizieren und eine daraus resultierende theoretische Funktionszuordnung machen zu können. In Abbildung 5 sind alle 61 ORFs wiedergegeben und gemäß der gefundenen Homologien in Funktionsklassen eingeordnet. Etwa 41% (25) aller abgeleiteten Proteine haben keine Ähnlichkeiten zu in Datenbanken abgelegten Proteinen; sie werden nachfolgend als hypothetische Proteine bezeichnet. 6 Proteine zeigen Ähnlichkeiten lediglich zu Proteinen unbekannter Funktion; sie werden nachfolgend als konservierte Proteine bezeichnet. 30 Proteinen konnte eine Funktion aufgrund signifikanter Homologien zu Proteinen aus Datenbanken, für die eine Funktion angegeben ist, zugeordnet werden. Eine signifikante Homologie zwischen zwei Proteinsequenzen wurde hierbei definiert als eine Proteinidentität größer als 30% bei einer Überlappung (*Alignment*) von mehr als 60% der Eingabe- und der Vergleichssequenz (s. 2.13.2).

Abb. 5: Zirkuläre Genkarte des Plasmids pE88 aus *C. tetani*

Die Zahlen auf der Außenseite des Ringes geben die Größe in kb an. Der Hauptring zeigt die ORFs - gemäß ihrer DNA-Strang-Orientierung - mit einer Farbgebung, die sich auf die Funktionsklassen der abgeleiteten Proteine bezieht (s. Legende). Die Zahlen auf der Innenseite des Ringes geben die Namen der ORFs an, die in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert werden. Das Gen für das Tetanus-Toxin, *tetX*, und das Gen für die Collagenase, *colT*, sind in rot gekennzeichnet.

In den folgenden Kapiteln sollen interessante ORFs vorgestellt und mit Hilfe bioinformatischer Methoden untersucht werden. Zuvor soll aber eine Gesamtübersicht über alle gefundenen ORFs des Plasmids gegeben werden: Tabelle 5 gibt Auskunft über die Lage der ORFs auf pE88, deren Größen und potentielle Funktionen. Zudem sind zu jedem ORF mit zugewiesener Funktion diejenigen Organismen angegeben, welche die Proteine mit der höchsten Homologie enthalten.

Tabelle 5: Gesamtübersicht aller ORFs auf pE88 und ihre möglichen Funktionen

ORF-Name	Start	Stop	Länge in bp	Höchste Homologien zu Proteinen aus	Annotation	G+C-Gehalt in % *
CTP01	378	1826	1448	<i>Bacillus</i> sp., <i>C. perfringens</i>	Replikationsprotein	24,4
CTP02	3286	2876	410	-	hypothetisches Protein	15,3
CTP03	3646	3428	219	<i>Listeria ivanovii</i>	konserviertes Protein mit LysM-Domäne	15,1
CTP04	3886	3671	216	<i>C. perfringens</i>	UviB-Homologon	11,1
CTP05	4582	4065	517	<i>C. perfringens</i> , <i>C. difficile</i>	Frameshift: UviA/TxeR-Homologon	14,3
CTP06	4870	5223	354	-	hypothetisches Protein	13,6
CTP07	5274	5738	464	-	hypothetisches Protein	12,9
CTP08	6510	6860	350	-	hypothetisches Protein	14,5
CTP09	7792	8292	500	-	hypothetisches Protein	21,6
CTP10	9008	8469	539	<i>C. botulinum</i>	möglicher RNA Polymerase-Sigmafaktor	16,7
CTP11	9564	9010	554	<i>C. acetobutylicum</i> , <i>C. botulinum</i>	möglicher RNA Polymerase-Sigmafaktor	15,1
CTP12	10255	9833	422	-	hypothetisches Protein	10,6
CTP13	10855	11817	962	-	hypothetisches Protein	15,0
CTP14	11832	12173	341	-	hypothetisches Protein	14,0
CTP15	12879	13541	662	viele	ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	14,9
CTP16	13588	16011	2423	<i>C. botulinum</i> , <i>C. difficile</i>	ABC-Transporter assoziierte Permease	13,1
CTP17	17430	16369	1061	<i>B. cereus</i>	Transposase	13,5
CTP18	17836	17429	407	viele	Transposase	20,6
CTP19	20256	21941	1685	-	hypothetisches Protein	23,3
CTP20	22989	21961	1028	<i>C. acetobutylicum</i>	Aminopeptidase	12,5
CTP21	23821	24495	674	viele	Zwei-Komponenten-System Response-Regulator	20,4

CTP22	24529	25473	944	viele	Zwei-Komponenten-System Sensor-Histidin-Kinase	17,1
CTP23	25671	26078	407	-	hypothetisches Protein	11,8
CTP24	26108	26866	758	<i>B. halodurans</i> , <i>B. anthracis</i>	ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	18,6
CTP25	26853	28781	1928	<i>B. halodurans</i>	ABC-Transporter assoziierte Permease	19,3
CTP26	29575	30111	536	<i>C. botulinum</i> , <i>C. difficile</i>	konserviertes Protein	20,1
CTP27	30338	31174	836	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	rRNA(Guanin-N1)-Methyltransferase (Antibiotika-Resistenz-Protein)	18,6
CTP28	31193	31504	311	<i>C. perfringens</i>	Replikationsproteinfragment	29,8
CTP29	32303	32668	365	-	hypothetisches Protein	13,1
CTP30	35057	33162	1895	-	hypothetisches Membranprotein (schwache Homologie zu Hämolyisin)	14,1
CTP31	35994	35521	473	viele	ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	14,6
CTP32	38466	37990	476	-	hypothetisches Protein	15,7
CTP33, ColT	42365	39438	2927	<i>C. perfringens</i> , <i>C. histolyticum</i> , <i>C. botulinum</i>	mikrobielle Collagenase	14,0
CTP34	42761	43603	842	-	hypothetisches Membranprotein	14,6
CTP35	43596	44405	809	-	hypothetisches Membranprotein	15,2
CTP36	44443	45192	749	-	hypothetisches Membranprotein	11,6
CTP37	45189	45830	641	<i>B. stearothermophilus</i>	ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	16,8
CTP38	46895	46386	509	-	hypothetisches Membranprotein	14,1
CTP39	48362	47307	1055	viele	Transposase	13,4
CTP40	48801	48367	434	viele	Transposase	22,8
CTP41	49281	48826	455	-	hypothetisches Protein	19,1
CTP42	50104	49310	794	<i>S. pneumoniae</i>	konserviertes Membranprotein	12,5
CTP43	50368	50796	428	-	hypothetisches Protein	21,0
CTP44	51041	51895	854	<i>C. botulinum</i>	konserviertes Protein	14,4
CTP45	52281	53732	1451	<i>Bacillus</i> sp., <i>C. perfringens</i>	Replikationsprotein	20,9
CTP46	55150	54773	377	<i>C. botulinum</i>	konserviertes Protein	11,1
CTP47	56391	56750	359	-	hypothetisches Protein	15,0
CTP48	56701	57186	485	-	hypothetisches Protein	17,9
CTP49	57954	57241	713	<i>B. anthracis</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>B. cereus</i>	konserviertes Membranprotein	17,2
CTP50	58588	58025	563	viele	Integrase/Rekombinase	18,1
CTP51	58890	59366	476	-	hypothetisches Membranprotein	15,1

CTP52	60158	59451	707	viele	ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	15,7
CTP53	61336	60161	1175	<i>C. acetobutylicum</i>	Membranprotein, mögliche Permease	15,3
CTP54	62486	61356	1130	<i>Desulfitobacterium</i> sp.	Membranprotein, mögliche Permease	11,9
CTP55	63565	62882	683	<i>C. botulinum</i>	mögliche N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase	16,7
CTP56	64009	65337	1328	<i>Bacillus</i> sp.	Aminopeptidase	15,8
CTP57	65829	65527	302	-	hypothetisches Protein	11,9
CTP58	67415	68161	746	-	hypothetisches Protein	12,4
CTP59	68165	68461	296	-	hypothetisches Protein	12,1
CTP60, TeTx	72587	68640	3947	<i>C. botulinum</i>	Tetanus-Toxin	16,3
CTP61, TetR	73354	72818	536	<i>C. botulinum</i>	Transkriptionsaktivator TetR	12,3

* Der G+C-Gehalt bezieht sich auf die dritte Base aller Codone des jeweiligen ORFs.

3.2.3 Allgemeine Merkmale der Plasmidsequenz

Das Plasmid pE88 aus *C. tetani* E88 besteht aus 74082 Basenpaaren. Der G+C-Gehalt ist mit 24,5% sehr niedrig und gehört bei den Prokaryoten zu den niedrigsten Werten überhaupt. Die insgesamt identifizierten 61 ORFs auf pE88 machen 67,1% der gesamten Plasmidsequenz aus, was relativ niedrig im Vergleich zu anderen prokaryotischen Genomen ist. Allerdings sind intergene Regionen auf extrachromosomalen Elementen im allgemeinen größer als auf Chromosomen, wo kodierende Sequenz etwa 80-90% der Gesamtsequenz ausmacht.

3.2.4 Analyse zur Identifizierung des Replikationsursprungs

Um erste Hinweise bezüglich der Lokalisation des Replikationsursprungs auf pE88 zu gewinnen, wurde eine sogenannte kumulative GC-Skew-Analyse durchgeführt (Abb. 6). Dabei handelt es sich um die kumulative Berechnung der GC-Verteilung nach der Formel $(C-G/C+G)$ in einer definierten Fenstergröße und einer definierten Schrittzahl (GRIGORIEV, 1998). Diese Berechnung macht sich das Phänomen bei prokaryotischen Genomen zunutze, dass sich die Nukleotidzusammensetzung zwischen dem *leading*- und dem *lagging*-Strang der Replikation unterscheidet: i. d. R. ist der *leading*-Strang mit den Basen G und T angereichert, wohingegen der

lagging-Strang überwiegend A und C enthält (LOBRY, 1996). Biologisch erklärt man sich dieses Phänomen mit der Annahme, dass der *leading*- und der *lagging*-Strang unterschiedlichen Mutationsdrücken ausgesetzt sind, da die Stränge während der Replikation unterschiedlich lang einzelsträngig vorliegen und so einer DNA-Schädigung unterschiedlich lang ausgesetzt sind (TILLIER & COLLINS, 2000).

Nun lässt sich anhand der Formel $(C-G/C+G)$ der Überschuss von C über G berechnen, welcher im *lagging*- positiv und im *leading*-Strang negativ ist. Die Genompositionen, an denen nach der obigen Formel ein Vorzeichenwechsel stattfindet, entsprechen dem Replikationsursprung und dem Replikationsterminus, welche i. d. R. eine halbe Genomlänge auseinanderliegen. Genau diesen empirisch ermittelten Umstand macht man sich zur Identifizierung möglicher Replikationsursprünge auf Chromosomen mittels der kumulativen GC-Skew-Analyse zunutze (GRIGORIEV, 1998).

Abb. 6: Kumulative GC-Skew-Analyse des Plasmids pE88

Berechnet wurde die Summe von $(C-G/C+G)$ in Fenstern von jeweils 100 bp. Zur besseren Visualisierung eines möglichen Replikationsursprungs wurde die Sequenz so umgestellt, dass sie mit CTP35 begann und mit CTP34 endete. Das lokale Minimum bei etwa 30 kb befand sich demzufolge in der Region der ORFs CTP61 und CTP01.

Allerdings kann man dieses Verfahren nur bedingt auf Plasmidsequenzen anwenden, die i. d. R. keinen ausgeprägten Unterschied in der GC-Verteilung zeigen. Das ist auch bei dem Plasmid pE88 der Fall (Abb. 6), wobei aber dennoch ein lokales

Minimum in der Region stromaufwärts von CTP01, einem Replikationsprotein, auszumachen ist. Dieser Befund und andere Gründe (s. 3.2.8) lassen die Vermutung zu, dass der Replikationsursprung des Plasmids in der Nähe von CTP01 liegt, also in direkter Nachbarschaft zum Tetanus-Toxin und dessen Transkriptionsaktivator TetR.

3.2.5 Toxine auf pE88: Tetanus-Toxin und Collagenase

Bevor die Sequenzierung von pE88 im Rahmen der vorliegenden Arbeit begann, war bekannt, dass das Tetanus-Toxin (TeTx) - zumindest im *C. tetani*-Stamm Massachusetts - Plasmid-kodiert ist (FINN et al., 1984). Des weiteren bestand Zugang zu der bereits bekannten Nukleotidsequenz des Toxins, welche aus drei verschiedenen *C. tetani*-Stämmen bestimmt wurde: aus dem auch in dieser Arbeit verwendeten Stamm E88 (EISEL et al., 1986), aus dem Stamm CN3911, einem Derivat des Stammes Harvard (FAIRWEATHER & LYNESS, 1986) und aus einem nicht näher charakterisierten *C. tetani*-Stamm (SHUMIN & DIANLIANG, 2001).

Die im Rahmen der Sequenzierung von pE88 erhaltende TeTx-Nukleotidsequenz (CTP60) stimmt vollständig mit den bereits bekannten Sequenzen aus E88 und CN3911 überein. Im Gegensatz dazu existieren zur TeTx-Nukleotidsequenz, die von SHUMIN & DIANLIANG (2001) bestimmt wurde, Unterschiede in 26 Basen, die 18 Aminosäure-Austausche zur Folge haben. Ob diese von biologischer Bedeutung sind, kann aufgrund der fehlenden Information zum von SHUMIN & DIANLIANG (2001) verwendeten Stamm nicht geklärt werden. Der derzeitige Wissensstand über die Funktion des Tetanus-Toxins und seines immensen neurotoxischen Potentials im Verlauf einer Tetanus-Erkrankung wird in Kapitel 4.2.1.1 beschrieben.

Bisher war nichts über weitere Plasmid-kodierte Toxine bei *C. tetani* bekannt. Die Sequenzanalyse von pE88 ergab nun, dass das Plasmid auch das Gen (CTP33) einer 114 kDa großen Collagenase trägt, nachfolgend als ColT bezeichnet. Die Proteinsequenz von ColT zeigte hohe Ähnlichkeiten zu den charakterisierten Collagenasen ColH und ColG aus *C. histolyticum* (MATSUSHITA et al., 1999) und ColA aus *C. perfringens* (MATSUSHITA et al., 1994). ColA wird auch als κ -Toxin bezeichnet. Es ist wie das Tetanus-Toxin eine Zink-abhängige Protease, welche die Degradation von Collagen katalysiert, das am häufigsten vorkommende Matrix-

Protein in Vertebraten. ColA wird für die durch *C. perfringens* verursachte Myonekrose mitverantwortlich gemacht (ROOD, 1998).

Eine detaillierte Beschreibung der Collagenase in *C. tetani* sowie deren möglicher Beitrag zur Pathogenität des Organismus wird in Kapitel 4.2.1.2 gegeben.

3.2.6 Regulatorische Funktionen

Die Regulation des Tetanus-Toxins in *C. tetani* sowie der homologen Botulinus-Toxine in *C. botulinum* ist bisher nur ansatzweise verstanden. In Untersuchungen von MARVAUD et al. (1998a/1998b) konnte eine Regulation dieser Toxine auf der Ebene der Transkription festgestellt werden: über ein DNA-bindendes Protein (TetR bzw. BotR) kann die Expression des Toxin-Gens direkt aktiviert werden. Unbekannt ist, ob das Tetanus-Toxin auch auf anderen Ebenen z. B. posttranslational reguliert wird. Des weiteren wurde vermutet, dass es dem Transkriptionsaktivator übergeordnete Regulationssysteme gibt (MARVAUD et al., 2000). Allerdings konnten bisher keine identifiziert werden. So bleibt die wichtigste Frage bis heute unbeantwortet: wie gelingt es einem harmlosen Bodenbakterium, bei Eintritt in den Säugetierwirt sich in einen (zumindest potentiell) tödlichen Organismus zu verwandeln, der eines der stärksten der Menschheit bekannten Nervengifte produziert ? Sind es Faktoren des Wirts, die *C. tetani* zur Produktion des Tetanus-Toxins veranlassen, und wenn ja, welche sind diese ?

3.2.6.1 TetR, der Transkriptionsaktivator des Tetanus-Toxins

Erste Untersuchungen zur Regulation des Tetanus-Toxins konzentrierten sich auf die genetische Umgebung von TeTx. Unmittelbar stromaufwärts wurde von MARVAUD et al. (1998a) ein ORF identifiziert und sequenziert, der für ein 21,6 kDa großes Protein kodiert, genannt TetR, welches typische Merkmale eines DNA-bindenden Proteins aufweist. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass TetR die Transkription von *tetX* positiv reguliert (MARVAUD et al., 1998a). Parallel dazu wurde in *C. botulinum* stromaufwärts vom Botulinus-Toxin A-Gen ein ORF identifiziert, genannt *botR*, dessen Proteinsequenz zu TetR eine 67%ige Identität zeigt (MARVAUD et al., 1998b). Gelretardationsexperimente und weitere Versuche

ergaben, dass BotR an die Promoterregion des Botulinus-Toxin-Gens binden und dessen Transkription positiv regulieren kann. Erst kürzlich wurde die Vermutung aufgestellt, dass TetR und BotR als alternative RNA-Polymerase-Sigmafaktoren und nicht als typische Transkriptionsaktivatoren anzusehen sind (MANI & DUPUY, 2001). Dies wurde aus der Sequenzhomologie des TetR bzw. des BotR zum TxeR aus *C. difficile* abgeleitet (s. Tabelle 6). Die Autoren konnten experimentell nachweisen, dass TxeR als alternativer RNA-Polymerase-Sigmafaktor bei der Regulation der Toxinsynthese von ToxA und ToxB in *C. difficile* wirkt.

Die Sequenzanalyse von pE88 hat nun ergeben, dass TetR (CTP60) auch auf pE88 stromaufwärts von *tetX* kodiert ist. Der Vergleich zur bereits bekannten *tetR*-Sequenz (MARVAUD et al., 1998a), welche aus dem *C. tetani*-Stamm CN655 stammt, offenbarte Unterschiede in 4 Basen, die 2 Aminosäure-Austausche im C-Terminus des Proteins zur Folge haben.

3.2.6.2 Regulatorische Proteine mit Homologien zu RNA-Polymerase-Sigmafaktoren

Neben TetR lassen sich auf pE88 weitere bisher unbekannte regulatorische Elemente ausmachen (Tabelle 6). Besonders interessant ist die Region 4-10 kb stromaufwärts vom *tetX* Gen. Dort sind zwei Proteine kodiert, CTP10 und CTP11, die signifikante Ähnlichkeiten zu RNA-Polymerase-Sigmafaktoren aufweisen. Beide zeigen schwache Homologien zur Sigma-70-Faktor-Domäne PF00140; für CTP10 ergab der Sequenzvergleich mit dem BLASTP-Programm einen E-Wert* von 0.00016, für CTP11 von 5.1e-05.

* Der E (Erwartungs)-Wert in der Ausgabe des BLAST-Programms gibt die Signifikanz des Ergebnisses einer Ähnlichkeitssuche wieder. Z.B. ist ein E-Wert von 1 folgendermaßen zu interpretieren: man kann erwarten, dass der Vergleich der Eingabesequenz mit den Datenbank-Sequenzen einen Treffer mit gleichem Ähnlichkeitswert lediglich durch Zufall liefert.

Tabelle 6: Ähnlichkeiten einiger regulatorischer Elemente von pE88 zu charakterisierten clostridiellen Toxinsynthese-Regulatoren (A) und untereinander (B)

A)

pE88	Annotation	UviA* (185 As)	TxeR* (184 As)	BotR* (178 As)
CTP05 (172 As)	Frameshift; UviA/TxeR-Homologon	32% (48%) über 188 As	31% (49%) über 170 As	26% (43%) über 178 As
CTP10 (179 As)	DNA-bindendes Protein, möglicher RNA Polymerase-Sigmafaktor	24% (43%) über 184 As	28% (47%) über 82 As	nicht signifikant
CTP11 (184 As)	DNA-bindendes Protein, möglicher RNA Polymerase-Sigmafaktor	25% (44%) über 180 As	24% (44%) über 179 As	nicht signifikant
CTP61 (177 As)	TetR, Transkriptionsaktivator von <i>tetX</i>	27% (49%) über 183 As	26% (47%) über 184 As	67% (85%) über 177 As

* UviA stammt aus *C. perfringens* (GARNIER & COLE, 1988a), TxeR aus *C. difficile* (MANI & DUPUY, 2001) und BotR aus *C. botulinum* (MARVAUD et al., 1998b).

B)

pE88	CTP05	CTP10	CTP11	CTP61
CTP05	/	24% (45%) über 178 As	27% (43%) über 180 As	25% (46%) über 162 As
CTP10		/	30% (48%) über 176 As	nicht signifikant
CTP11			/	25% (41%) über 193 As
CTP61				/

Die Prozentzahlen in A und B geben Aminosäureidentitäten (in Klammern: -ähnlichkeiten) wieder. Hier nicht aufgeführt ist CTP04 (71 As), welches eine Homologie zu UviB (64 As) aus *C. perfringens* (40% Identität über 67 As) zeigt.

CTP10 kodiert für ein 179 As großes Protein. Eine potentielle Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz (AGGGTGG) findet man 6 bp stromaufwärts vom ATG-Startcodon. Der Sequenzvergleich mit der NCBI-Datenbank ergab Ähnlichkeiten zu folgenden Proteinen: der als hypothetisch annotierte ORF CPE0507 (24% Proteinidentität über 184 As) aus *C. perfringens* (SHIMIZU et al., 2002) sowie CAP0167 (25% Identität über 175 As) aus *C. acetobutylicum*, der als spezialisierter Sigmafaktor annotiert wurde (NÖLLING et al., 2001). Tabelle 6 listet zudem die Ähnlichkeiten zu charakterisierten regulatorischen Proteinen auf: zu TxeR aus *C. difficile* (MANI & DUPUY, 2001) und zu UviA, einem möglichen positiven Regulator des Bacteriocin-

Gens aus *C. perfringens* (GARNIER & COLE, 1988a). UviA sowie das Bacteriocin sind in *C. perfringens* auf dem 10 kb-Plasmid pIP404 kodiert. Durch den Vergleich von CTP10 mit der *C. botulinum*-Sequenzdatenbank des Sanger-Zentrums (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/cb>) wurden zusätzlich zwei hoch homologe Proteine in diesem Organismus identifiziert (ORF A und ORF B, Abb. 7). Interessanterweise befindet sich ORF A auf dem Chromosom von *C. botulinum* unmittelbar stromabwärts, in umgekehrter Orientierung, vor *colB*, dem Gen für eine Collagenase, die starke Ähnlichkeiten zu ColT aus *C. tetani* zeigt. ORF B in *C. botulinum* ist Teil eines möglichen IS (Insertionssequenz)-Elements und befindet sich in einer genetischen Umgebung, die viele Phagen-verwandte Gene enthält.

ORF A	1	GEESKFPYPCINAIKTNYKALLKGEIKHHREIPDENILNKGNEYMFTIED
ORF B	1	GEENKFIPYCIKTIKTNYKALLKGEIKHHREIPDENISDKGNEYFFTIED
CTP10	1	GNGDNFIPYPCINAIKNNYTALLKGEIKHHREIPDEFILNKAKDYMFTIED
ORF A	51	EIIAYEKTKEIYEALDKLTQEEKQVINDFYIKNNSLNKIAEDTNKTYNSV
ORF B	51	EIIAYENIKELYKALDKLTPEEKEVIDSFYIKNNSLQEIANYTNKSYNSV
CTP10	51	EVIAYEKIEELYKALDKLSSERYIIGSFYIGNKAMGEIACTTNKSYNEV
ORF A	101	RYTKDKAIKKLQKILEEH-
ORF B	101	RYTKDKAIKKLQNMLEH-
CTP10	101	RYAKDKAIKNLQRIKKHI

Abb. 7: Partielles multiples Alignment der Proteinsequenzen von CTP10 aus *C. tetani* mit ORF A und ORF B aus *C. botulinum*

ORF A zeigt eine 67%ige Proteinidentität über 179 As zu CTP10, ORF B eine 65% Identität über 175 As. In schwarz, identische As; in grau, ähnliche As. Die *C. botulinum*-Daten entstammen dem Sequenzierungsprojekt des Sanger-Zentrums (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/cb>).

CTP11 kodiert für ein Protein aus 184 As. Stromaufwärts vom TTG-Startcodon befindet sich eine mögliche SD-Sequenz (AGGAGG). Die Proteinsequenz zeigt höhere Ähnlichkeitswerte zu möglichen Sigmafaktoren als CTP10, z. B. eine 35%ige Identität über 175 As zum oben erwähnten ORF CAP0167 aus *C. acetobutylicum*. Ähnlichkeiten zu TxeR, UviA und TetR sind in Tabelle 6 aufgeführt. Im Genom von *C. botulinum* ließen sich keine zum CTP11 homologen Proteine identifizieren.

Zwei weitere ORFs mit möglicher regulatorischer Bedeutung lassen sich etwa 4 kb stromaufwärts vom *tetX*-Gen ausmachen (CTP04 und CTP05). Die 71 As große Proteinsequenz von CTP04 zeigt eine Homologie (40% Identität über 67 As) zu

UviB aus *C. perfringens*, einem 64 As großen Protein, welches auf pIP404 in unmittelbarer Nachbarschaft zum *uviA* kodiert ist (GARNIER & COLE, 1988a). UviB soll zusätzlich zum UviA an der Regulation der Bacteriocin-Synthese beteiligt sein. Stromaufwärts von CTP04 befindet sich ein durch eine Leserastermutation (*Frameshift*) unterbrochener ORF (CTP05). Die entsprechende Stelle der Nukleotidsequenz wurde in Gap4 dahingehend überprüft, ob diese Leserasterverschiebung auch durch einen Sequenzierfehler entstanden sein könnte. Die Korrektheit der Basenfolge an dieser Stelle konnte aber zweifelsfrei festgestellt werden, so dass davon auszugehen ist, dass CTP05 ein Pseudogen darstellt. Die Proteinsequenz des Pseudogens zeigt Ähnlichkeiten zu UviA, TxeR und BotR sowie zu TetR und CTP10 (Tabelle 6). Abbildung 8 zeigt ein Sequenzalignment von CTP05 mit UviA, wobei das Alignment eine Lücke stromaufwärts der möglichen Leseraster-Mutation aufweist. Es bleibt zu klären, ob diese Leserastermutation in CTP05 spezifisch für den *C. tetani*-Stamm E88 ist.

Abb. 8: Darstellung der Leserasterverschiebung in CTP05 und dessen Sequenzalignment mit UviA aus *C. perfringens*

CTP05 ist durch einen authentischen *Frameshift* unterbrochen, möglicherweise entstanden durch eine Nukleotid-Deletion zwischen den Positionen 120 bis 126 (in grün). Eine Lücke im Alignment zu UviA (grau hinterlegt) befindet sich stromaufwärts zu der potentiellen Position der Leserasterverschiebung. Identische Aminosäuren im Alignment sind rot, ähnliche blau dargestellt. Unterstrichen ist die mögliche SD-Sequenz. * : Stopcodon.

Um die in Tabelle 6 aufgeführten Sequenzähnlichkeiten der beschriebenen regulatorischen Elemente von pE88 untereinander und zu den homologen charakterisierten Proteinen aus anderen Clostridien besser veranschaulichen zu können, wurden deren phylogenetische Beziehungen mit dem *Neighbour-Joining*-Algorithmus berechnet (Abb. 9). Dabei sind zwei getrennte Cluster auszumachen: CTP10 und CTP11 sind deutlich abgesetzt von dem Cluster der anderen regulatorischen Proteine. Darin bilden TetR und BotR eine Untergruppe.

Abb. 9: Phylogenetische Beziehung der regulatorischen Elemente von pE88 untereinander sowie zu TxR aus *C. difficile*, UviA aus *C. perfringens* und BotR aus *C. botulinum*

Der *Neighbour-Joining* (NJ)-Algorithmus wurde auf genetische Distanzen zwischen Paaren von Proteinsequenzen angewandt (1000 *bootstrap*-Iterationen). Die Distanzen wurden mit der Dayhoff PAM Matrix-Methode berechnet. Das darauf basierende multiple Sequenzalignment wurde mit dem ClustalW-Algorithmus erstellt. Als Computerprogramm kam dabei das Phylip (Phylogeny Inference Package) 3.5c-Softwarepaket zur Anwendung (SAITOU & NEI, 1987).

3.2.6.3 Zwei-Komponenten-System

Auf pE88 befinden sich auch die Gene für ein Zwei-Komponenten-System, bestehend aus einem Response-Regulator (CTP21) und einer Sensor-Histidin-Kinase (CTP22). Der Sequenzabgleich dieses Systems mit externen Datenbanken offenbarte starke Ähnlichkeiten zu Zwei-Komponenten-Systemen aus u. a. *B. cereus*, *B. halodurans*, *C. botulinum* und *C. acetobutylicum*. Das 228 As umfassende Response-Regulator-Protein besteht aus einer N-terminalen Empfänger (Receiver)- und einer C-terminalen Transkriptionsregulator-Domäne. Die Sensor-Histidin-Kinase enthält eine den Histidin-Kinasen typische ATPase-Domäne sowie eine Dimerisations- und Phosphatgruppenakzeptor-Domäne. Für einige charakterisierte Zwei-Komponenten-Systeme ist bekannt, dass sie die Transkription des oder der Gene regulieren, die in unmittelbarer genetischer Nachbarschaft auf dem Genom lokalisiert sind (KORETKE et al., 2000). So wurde auch die genetische Umgebung von CTP21/CTP22 betrachtet und mit der von homologen Systemen anderer Organismen verglichen (Abb. 10).

Abb. 10: Genetische Organisation der Region stromabwärts der Gene des Zwei-Komponenten-Systems CTP21/CTP22 sowie homologer Systeme
Auf pE88 befindet sich ein zusätzlicher hypothetischer ORF (CTP23). Ein Transposase-Gen (in gelb) ist innerhalb des Transport-Genclusters in *B. halodurans* lokalisiert.

Es stellte sich heraus, dass die genetische Umgebung der Zwei-Komponenten-Systeme in verschiedenen Organismen konserviert ist. Dabei kodiert das an den Systemen angrenzende genetische Cluster für Proteine mit Transport-Funktionen.

Auf pE88 beispielsweise kodiert CTP24 für ein ABC (ATP-bindende Kasette)-Transportprotein mit einer ATP-bindenden Domäne (Abb. 10). CTP25 kodiert für eine ABC-Transporter-assoziierte Permease mit 10 transmembranen Helices (s. 3.2.7). Zu CTP21/CTP22 homologe Zwei-Komponenten-Systeme, an deren Gene solche angrenzen, die für ähnliche ABC-Transporter und Permeasen kodieren, konnten in *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. halodurans*, *C. acetobutylicum*, *C. botulinum*, *C. difficile*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *St. epidermidis* und *C. perfringens* gefunden werden. Es kann vermutet werden, dass das CTP21/CTP22-System die Transkription der stromabwärts lokalisierten Transport-Gene reguliert.

Allerdings wäre auch denkbar, dass das System die Transkription anderer auf dem Plasmid oder Chromosom liegende Gene reguliert, wie das z. B. beim VirR/VirS-System in *C. perfringens* der Fall ist (ROOD, 1998). Daher sollte überprüft werden, ob das Zwei-Komponenten-System möglicherweise in der Regulation des Tetanus-Toxins involviert ist. Hierzu wurde das Gen CTP21, welches für den Response-Regulator kodiert, über PCR amplifiziert und über *Eco31I*-Schnittstellen in den Vektor IBA3 (pASK) kloniert. Nach Identifikation und Sequenzierung eines positiven Klons wurde das rekombinante Plasmid, genannt pHBRR2, in *E. coli* XL1 transformiert. Schließlich erfolgte das Expressionsexperiment, indem ein transformierter Klon bis zu einer OD von 0,8 angezogen und anschließend Anhydrotetracyclin zugegeben wurde, was die Expression des unter der Kontrolle eines *tetA*-Promoters stehenden klonierten Gens induzierte. Zusätzlich wurde dem exprimierten Protein C-terminal ein ‚Strep-Tag‘ angehängt, was die chromatographische Aufreinigung des heterolog exprimierten Proteins über eine ‚Strep-Tactin[®]‘-Säule ermöglichte. Nach erfolgter Inkubation (3 h) wurden dazu die Zellen geerntet und über Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen. Der gewonnene Rohextrakt wurde dann auf die ‚Strep-Tactin[®]‘-Säule gegeben. Die Elution erfolgte durch Zugabe des spezifischen Kompetitors Desthiobiotin.

Abbildung 11 zeigt, dass schon im Rohextrakt des rekombinanten Klons eine zusätzliche Bande bei 29 kDa erschien, was der theoretisch zu erwartenden Größe des Response-Regulators entsprach. Des weiteren ist ersichtlich, dass durch die Benutzung der Affinitätssäule das heterolog in *E. coli* XL1 produzierte Protein aufgereinigt werden konnte. Die Konzentration des Proteins war allerdings aufgrund des Vorhandenseins von Einschlusskörpern (‚Inclusion bodies‘) nach der Expression

sehr gering und konnte durch Änderung der Induktionsparameter (Dauer, Temperatur) nur geringfügig verbessert werden. Trotzdem wurde der so gereinigte Response-Regulator in Gelretardationsexperimenten eingesetzt, um zu prüfen, ob dieses heterolog produzierte Protein DNA-bindende Eigenschaften zeigte. Als mögliche Ziele einer Bindung wurden DNA-Bereiche von 150-400 bp gewählt, die den Promotorregionen der Gene *tetX*, *tetR*, *colT*, CTP23 und CTP24 entsprachen. In ersten Versuchen konnte keine Bindung des Proteins an die gewählten DNA-Bereiche festgestellt werden. Da Interaktionen zwischen Proteinen und DNA von vielen Faktoren abhängen können, was i. d. R. langwierige Untersuchungen mit sich bringt, wurde entschieden, die begonnenen Arbeiten im Rahmen der Diplomarbeit von Elke Raade fortzusetzen und zu intensivieren.

Abb. 11: Heterologe Expression des Response-Regulators CTP21 aus *C. tetani* in *E. coli* XL1 (10%iges SDS-PAGE-Gel)

Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: gereinigtes Protein aus dem Eluat (3. Stufe)

Spur 3: Rohextrakt aus *E. coli* XL1 + Plasmid IBA3 (Leervektor)

Spur 4: Rohextrakt aus *E. coli* XL1 + Plasmid pHBRR2

Spur 5: gereinigtes Protein aus dem Eluat (4. Stufe)

3.2.7 Transportfunktionen

Die Annotation von pE88 hatte ergeben, dass fast ein Drittel aller auf pE88 kodierten Proteine offensichtlich an Transportprozessen beteiligt sind: 10 Proteine zeigten Homologien zu Transportern aus verwandten Organismen und weitere sieben Proteine schienen aufgrund der Präsenz multipler transmembraner Helices in der Membran verankert zu sein, und somit ebenfalls potentiell Transportfunktionen zu haben.

Bei näherer Betrachtung kann man fünf Transportsysteme identifizieren, die aus jeweils mehreren Proteinen bestehen und dem ABC(ATP-bindende Kassette)-Typ von Transportern zuzuordnen sind: CTP15/CTP16, CTP24/CTP25, CTP30/CTP31, CTP34/CTP35/CTP36/CTP37 und CTP52/CTP53/CTP54. Jedes dieser Systeme besteht aus einem Protein (CTP15, CTP24, CTP31, CTP37 und CTP52), das jeweils mindestens eine ABC-Transporter-Domäne und eine ATP-bindende Domäne beinhaltet, sowie einem oder mehreren Proteinen mit multiplen transmembranen Helices. Offenbar existieren hier Transportsysteme, die jeweils aus einer ATP-hydrolysierenden Untereinheit, welche die benötigte Energie für den Transportprozess liefert, und einer oder mehreren membranintegraler Untereinheiten aufgebaut sind, welche das Substrat im Periplasma oder Cytoplasma - je nachdem, ob es sich um ein Aufnahme- oder Efflux-System handelt - binden und durch die Membran hindurchschleusen. Das in Abbildung 12 gezeigte Hydrophobizitätsdiagramm von CTP25 veranschaulicht dessen mögliche Proteinstruktur und -lokalisierung: das Protein besteht aus einem hydrophilen Bereich im mittleren Teil (etwa zwischen den Aminosäureresten 320-500), der möglicherweise ins Periplasma oder Cytoplasma gerichtet ist und die Substrat-Bindestelle beinhalten könnte, und aus zwei hydrophoben transmembranen Bereichen am N- und C-Terminus, mit deren Hilfe das Substrat durch die Membran transportiert werden könnte.

CTP16: 8 transmembrane Helices **CTP25: 10 transmembrane Helices** **CTP30: 7 transmembrane Helices**

Abb. 12: Hydrophobizitätsdiagramme einiger potentieller, auf pE88 kodierten ABC-Transporter-assoziierten Permeasen

Die Zahlen an der Ordinate geben die relative Hydrophobizität an; ein Kurvenverlauf oberhalb der Nullpunktlinie gibt hydrophobe, einer unterhalb der Linie hydrophile Bereiche des Proteins an. Die Zahlen an der Abzisse zeigen die Positionen der Aminosäurenreste im Protein an.

Die Zusammensetzung der einzelnen Transportsysteme, die auf pE88 kodiert sind, unterscheidet sich leicht von ‚typischen‘ ABC-Transportern der ABC-Superfamilie. Ein solcher ABC-Transporter besteht i. d. R. aus vier Domänen bzw. Untereinheiten: zwei Kopien der ABC-Transporter-Domäne (Pfam00005), welche die ATP-Bindestelle (Walker A und B-Motive) beinhaltet, und zwei Kopien der transmembranen Domäne, welche die Membran mehrere Male in α -helicaler Konformation durchspannt (SAIER, 1999; DAVIDSON, 2002). Diese vier Domänen können in einem Protein vereinigt oder aber auf mehrere Proteine eines Komplexes aufgeteilt sein. Eine Vielzahl von Variationen dieses Typs sind in letzter Zeit insbesondere durch Genomsequenzierungsprojekte identifiziert worden (DASSA et al., 1999). Generell unterscheidet man in der aus derzeit 48 Familien bestehenden ABC-Transporter-Superfamilie folgende zwei Funktionen: solche Komplexe, welche die Aufnahme von Substraten wie z. B. Aminosäuren oder Peptiden katalysieren (hauptsächlich Transportsysteme mit periplasmatischen Bindeproteinen) und solche, die für den Export von z. B. Peptiden, Proteinen, antimikrobiellen Agenzien oder Toxinen verantwortlich sind (i. d. R. Transporter ohne Bindeproteine).

Zur genaueren Charakterisierung der Transportsysteme auf pE88 wurden weitere Vergleiche herangezogen, welche in Tabelle 7 wiedergegeben sind. Beispielsweise offenbarte dabei ein Abgleich der Proteinsequenz des Transportsystems CTP24/CTP25 mit einer speziellen von SAIER entwickelten und gepflegten Datenbank (<http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/>), die nur Transportproteine enthält, welche biochemisch oder zumindest bioinformatisch charakterisiert sind, eine in den anderen Datenbanken bisher nicht erkannte hohe Homologie zu einem System bestehend aus zwei Proteinen aus *Streptococcus mutans*, die bei der Bacitracin-Resistenz eine Rolle spielen (TSUDA et al., 2002). Da es sich bei Bacitracin um ein Peptid-Antibiotikum handelt, ist es möglich, dass das System CTP24/CTP25 als Peptid-Transporter fungiert.

Tabelle 7: Bioinformatische Charakterisierung einiger auf pE88 kodierter Transportfunktionen

ORF-Name	Domänen	Hydrophobizität	Homologes Protein*	Herkunft	- BLAST-E-Wert - identische (ähnliche) As
CTP15	1 ABC-Transporter-Domäne; 1 ATP-Bindedomäne	-	Lipoprotein freisetzendes System - ATP-bindendes Protein LolD	<i>E. coli</i> (233 As)	3e-45; 41% (64%) über 215 As
			Mutans Bacitracin-Resistenz Protein A	<i>St. mutans</i> (250 As)	3e-45
CTP24	1 ABC-Transporter-Domäne; 1 ATP-Bindedomäne	-	Mutans Bacitracin-Resistenz-Protein A	<i>St. mutans</i> (250 As)	8e-60; 48% (69%) über 248 As
			SalX	<i>St. salivarius</i> (245 As)	3e-53; 44% (61%) über 245 As
CTP25	1 DUF214-Domäne	10 TM	Mutans Bacitracin-Resistenz Protein B	<i>St. mutans</i> (667 As)	2e-09; 17% (36%) über 289 As
			SalY	<i>St. salivarius</i> (635 As)	2e-08; 19 % (40%) über 361 As
CTP31	1 ABC-Transporter-Domäne	-	Nodulation ATP-Bindeprotein I	<i>Rhizobium galegae</i> (347 As)	6e-17; 38% (66%) über 100 As
CTP37	1 ABC-Transporter-Domäne + ATP-Bindedomäne	-	SpaF	<i>B. subtilis</i> (247 As)	5e-25; 30% (52%) über 211 As
CTP38	Zink-Transporter-Domäne	2 TM	-	-	-
CTP49	Metall-abhängige Hydrolase	4-7 TM	-	-	-
CTP52	1 ABC-Transporter-Domäne; 2 ATP-Bindedomäne	-	Lipoprotein freisetzendes System - ATP-bindendes Protein LolD	<i>E. coli</i> (233 As)	3e-38 ; 39% (60%) über 213 As

* Die Proteinsequenzen wurden gegen die Transportprotein-Datenbank von SAIER abgeglichen (<http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/>).

Letztendlich können die Substratspezifitäten der auf pE88 kodierten Transportsysteme nicht allein über bioinformatische Methoden geklärt werden. Vieles deutet aber darauf hin, dass es sich bei den meisten der Transportsysteme um solche handelt, die Peptide oder sogar ganze Proteine transportieren. Diese Annahme stellt auch die mögliche Bedeutung der Transportsysteme im Hinblick auf den Export des Tetanus-Toxins und die Regulation der TeTx-Synthese in ein neues Licht. Es wäre durchaus denkbar, dass bestimmte Signalmoleküle des Wirts (z. B. Peptidhormone) über auf pE88 kodierte Systeme in die *C. tetani*-Zelle gelangen und dort die Expression von *tetX* beeinflussen.

3.2.8 Replikationsfunktionen und mobile Elemente

3.2.8.1 Replikationsproteine

Die Suche nach möglichen Replikationsproteinen führte zur Identifikation zweier Proteine, CTP01 (422 As) und CTP45 (423 As), die zueinander eine 93%ige DNA-Homologie bzw. eine 89%ige Proteinidentität besitzen, wobei sich deren Alignment im wesentlichen nur innerhalb der letzten 60 C-terminalen Aminosäureresten unterscheidet. Ein Abgleich dieser Proteinsequenzen mit der NCBI-Datenbank ergab eine hohe Ähnlichkeit (41% Identität über 382 As) zu dem charakterisierten Replikationsprotein des Virulenz-Plasmids pIP404 aus *C. perfringens*, welches u. a. für die Bacteriocin-Synthese und für dessen Regulationssystem UviA/UviB kodiert (GARNIER & COLE, 1998b). Dieses Replikationsprotein wird in einem Shuttle-Vektor genutzt, der sowohl in *E. coli* als auch in *C. perfringens* replizierbar ist (SLOAN et al., 1992). Eine weitere Ähnlichkeit (44% Identität über 384 As) zeigt CTP01/CTP45 zu dem Replikationsprotein eines Plasmids, welches aus dem nicht näher charakterisierten alkaliphilen *Bacillus*-Stamm KSM-KP43 isoliert wurde (HATADA & ITO, 1999). Daneben gibt es zusätzlich zur Duplikation von CTP01/CTP45 ein weiteres Protein auf pE88, CTP28, welches aus nur 103 As besteht, die eine 90%ige Proteinidentität (über 72 As) zu dem mittleren Proteinabschnitt von CTP01 bzw. CTP45 zeigen (Aminosäurereste 220-290). Bei CTP28 handelt es sich offenbar um ein Fragment des Replikationsproteins. Interessant ist der Umstand, dass diese drei Gene (CTP01, CTP28, CTP45) andere Codone benutzen. Der G+C-Gehalt der dritten Base eines Codons dieser Gene liegt im Durchschnitt bei 25% und ist damit weitaus höher als bei den anderen Genen auf pE88 (15%). Das deutet darauf hin, dass das Replikationsprotein über lateralen Gentransfer aus einem Organismus der *Bacillus/Clostridium*-Gruppe akquiriert wurde. Eine weiteres Indiz für diese Hypothese ist die offenbar vorliegende Mobilität dieses Gens ähnlich der eines IS-Elementes: Abbildung 13 zeigt die Abundanz von direkten Sequenzwiederholungen (*direct repeats*) stromaufwärts des Startcodons von CTP45. Direkte Sequenzwiederholungen entstehen bei der Insertion von DNA-Fragmenten (IS-Elementen) in die Empfänger-DNA über die durch den Insertionsmechanismus bedingte Zielstellenverdopplung. Vermutlich hat sich also das Replikationsprotein auf pE88 dupliziert. Da um CTP01 keine direkten Sequenzwiederholungen identifiziert werden konnten, ist davon auszugehen, dass

CTP01 das ursprünglichere Replikationsprotein darstellt und die eigentliche Replikationsfunktion übernimmt. Diese Vermutung korreliert mit der vom GC-Skew abgeleiteten Annahme, dass der Replikationsursprung (*ori*) des Plasmids in der Nähe von CTP01 liegt. Allerdings gibt es auch eine gegensätzliche Erklärung dieser multiplen Sequenzwiederholungen vor CTP45: viele *ori* enthalten Sequenzwiederholungen (z. B. DnaA-Boxen), die Bindestellen für das Replikationsprotein darstellen (KNIPPERS, 1995). Nach dieser Erklärung wäre der *ori* also eher in der Umgebung stromaufwärts von CTP45 lokalisiert.

Abb. 13: Direkte Sequenzwiederholungen stromaufwärts von CTP45.

Drei unterschiedliche Sequenzabschnitte (rot, grün, blau) werden in 2-3 direkt benachbarten Kopien (dargestellt als durchgezogene Pfeile) mit leichter Variation der Basenfolge wiederholt. Folgende Consensus-Sequenzen liegen vor: 23 bp (rot), AGAAGAAGGTATAAAAAAGGTAG; 12 bp (grün), ACAGAAGG^T/A^TAAA; 13 bp (blau), AAGAACTTTAAA.

3.2.8.2 Mobile Elemente

Zusätzlich zu dem eben beschriebenen potentiellen mobilen Element lässt sich ein weiteres IS-Element auf pE88 ausmachen, welches in zweifacher Kopie vorkommt und keine Ähnlichkeit zu bekannten IS-Elementen zeigt (BLAST gegen Datenbank aus IS-Elementen: <http://www-is.biotoul.fr/is.html>). Dieses Element besteht aus jeweils zwei ORFs, einer vollständigen Transposase (CTP17 und CTP39 – 98%ige DNA-Homologie) und einem möglichen Transposase-Fragment (CTP18 und CTP40). CTP17 bzw. CTP39 zeigen hohe Homologien zu einer möglichen Transposase aus *B. cereus* (60% Identität über 355 As), welche genomweit in fünf

Kopien vorkommt, und zu einer möglichen Transposase aus *B. stearothermophilus* (40% Identität über 295 As), die 9fach im Genom vorliegt (unveröffentlichte Daten aus ERGO Göttingen, s. 2.13.2). Der zweite ORF des IS-Elements (CTP18 und CTP40 - 99%ige DNA-Homologie) zeigt starke Ähnlichkeiten zu ORFs in *Anabaena* sp. Stamm PCC 7120 (73% Identität über 132 As) und *Thermomonospora fusca* (60% Identität über 125 As).

3.2.9 Sonstige Funktionen

3.2.9.1 23S rRNA(Guanin-N1)-Methyltransferase

CTP27 kodiert für eine 23S rRNA(Guanin-N1)-Methyltransferase. Das Protein zeigt Ähnlichkeiten (46% Identität über 276 As) zu einer rRNA-Methyltransferase aus *St. pneumoniae* R6 (AAL00715) sowie zu Enzymen aus *V. cholerae*, *P. aeruginosa* (HOSKINS et al., 2001). Für Methyltransferasen diesen Typs wird angenommen, dass sie Resistenzen vermitteln können und zwar zu den Antibiotika der Makrolid-Lincosamid-Streptogramin B-Gruppe wie z. B. Erythromycin oder Mycinamicin (GUSTAFSSON & PERSSON, 1998). Die Methylierung der 23S rRNA durch diese Methyltransferasen hat zur Folge, dass das Antibiotikum eine schwächere Affinität zum Ribosomen hat und dadurch seine Wirkung als Proteinsynthesehemmer nicht mehr entfalten kann.

3.2.9.2 Aminopeptidasen

CTP20 und CTP56 kodieren für Aminopeptidasen mit N-terminalen Signalpeptiden, was den Export dieser Enzyme ins Periplasma ermöglicht. Dabei zeigt CPT20 schwache Homologien zur Aminopeptidase-Domäne von Proteinen aus *C. acetobutylicum* (AAK80787, 32% Identität über 197 As; NÖLLING et al., 2001) und *C. perfringens* (AP003193, 33% Identität über 190 As; SHIMIZU et al., 2002). CTP56 enthält eine Peptidase-Domäne der M20/M25/M40-Peptidase-Familie (Pfam01546, 29% Identität über 179 As). Dieses Protein zeigt außerdem Ähnlichkeiten zu Aminopeptidasen aus *B. halodurans*, *B. subtilis* und *B. licheniformis* (TAKAMI et al., 2000; KUNST et al., 1997).

Es ist denkbar, dass die beiden Peptidasen von pE88 an der Aktivierung des Tetanus-Toxins durch proteolytische Spaltung des Toxins beteiligt sind (s. 4.2.1.1).

3.3 Sequenzierung und Sequenzanalyse des Chromosoms von *C. tetani* E88

3.3.1 Sequenzierungsstrategie: Die Shotgun-Methode

Die Sequenzierung eines gesamten Bakterienchromosoms stellte weitaus höhere Ansprüche an die Methodik und deren Qualitätskontrolle als die eines 74 kb großen Plasmids. Prinzipiell sollte das gleiche Verfahren zur Anwendung kommen, das auch für die Plasmidsequenzierung genutzt wurde: Die Shotgun-Methode (2.9-2.12). Abbildung 14 gibt einen Überblick über die Strategie und den Ablauf der Genomsequenzierung von *C. tetani*.

Abb. 14: Fließschema zur Strategie und zum Verlauf der Sequenzierung des Gesamtgenoms von *C. tetani*.

Abkürzungen: MCS, multiple Klonierungsstelle; Rev, Reverse-Primer; For, Forward-Primer; in rot, *C. tetani*-DNA-Fragment (Insert).

Als erstes wurden Genbanken erstellt. Dazu wurde genomische DNA aus *C. tetani* E88 isoliert, aufgereinigt und mittels einer umgebauten HPLC-Pumpe mechanisch geschert. Die entstandenen Fragmente wurden wie in Kapitel 2.9 beschrieben weiterverarbeitet und solche der Größen 1-3 kb in den Vektor pTZ19R kloniert. Genbanken wurden strengstens auf ihre Qualität überprüft, da die Sequenzierung von Banken mit hohem Anteil ‚leerer‘ Vektoren, d. h. Banken, die über 5% Vektoren ohne *C. tetani*-Inserts enthielten, immense Mehrkosten verursacht hätte und somit inakzeptabel war. Wichtig war bei der Herstellung der Genbanken auch die Verwendung von genomischer DNA aus unterschiedlichen DNA-Präparationen, da sich im Laufe des Sequenzierungsprojektes herausstellte, dass die meisten Genbanken nicht das statistisch zu erwartende gleichwahrscheinliche Vorkommen jedes denkbaren DNA-Abschnitts des *C. tetani*-Genoms gewährleisteten. Nach der Sequenzierung der rekombinanten Plasmide einer Genbank wurden die Einzelsequenzen prozessiert und mittels des Programms Gap4 assembliert (s. 2.11). Die darauffolgenden Schritte sind in den nächsten Kapiteln ausführlich erläutert.

3.3.2 Phase 1: Rohsequenzierung und Assemblierung

Unter Rohsequenzierung versteht man die Sequenzierung möglichst vieler klonierter DNA-Fragmente (Inserts) der rekombinanten Plasmide einer Genbank. Diese wurden von beiden Seiten her mit Hilfe zweier von der Vektorsequenz abgeleiteten Primern ansequenziert (s. Abb. 14). Die Aufgabe des Projektbetreuers in dieser Phase der Genomsequenzierung bestand vor allem in der Kontrolle der Daten. Insbesondere musste die Qualität und Länge der Sequenzläufe und deren *C. tetani*-Spezifität überprüft werden. Es wurden zudem Testassemblierungen nach jeweils etwa 1000 neu hinzugekommenen Einzelsequenzen durchgeführt. Unter Assemblierung versteht man dabei die Suche nach identischen Sequenzabschnitten unter allen Einzelsequenzen und deren Ausrichtungen (*Alignment*) zueinander (s. 2.11). Dabei kam das Assemblierungsprogramm Phrap zum Einsatz, welches in dem Programm Gap4 implementiert ist.

Um die Anzahl benötigter Einzelsequenzen bzw. benötigter rekombinanter Plasmide zur Abdeckung einer Genomsequenz abzuschätzen, kann man sich folgender Formel bedienen:

$$N = \frac{A * L}{w},$$

wobei N die Anzahl der Einzelsequenzen, w die Leseweite, d. h. die durchschnittliche Länge einer Einzelsequenz (~ 600 Basen), A die Abdeckungsrate (i. d. R. wird eine 6-9fache Abdeckung der Genomsequenz angestrebt) und L die Größe des Genoms ist. Wird das Genom von *C. tetani* auf eine Größe von 3 Mb geschätzt, dessen Sequenz man 8fach abzudecken wünscht, werden nach dieser Formel theoretisch 40000 Einzelsequenzen bzw. mindestens 20000 rekombinante Plasmide benötigt.

LANDER & WATERMAN haben eine weiterführende Formel zur Überprüfung der Assemblierung der Einzelsequenzen einer Genomsequenzierung nach dem Shotgun-Prinzip entwickelt (WATERMAN, 1984). Diese berechnet die Anzahl der Contigs, die im Idealfall - gute Qualität der Sequenzen, stabile Leseweiten - bei der Assemblierung einer gegebenen Anzahl an Einzelsequenzen entsteht. Anders ausgedrückt wird die Wahrscheinlichkeit P berechnet, mit der eine beliebige Base des Genoms - bei einer gegebenen Anzahl an Einzelsequenzen - bisher noch nicht sequenziert worden ist:

$$P = e^{\frac{-N * w}{L}},$$

wobei N, w und L den Symbolen aus der obigen Formel entsprechen. Als Beispiel sei die prozentuale Wahrscheinlichkeit P ermittelt, mit der eine Base des Genoms nach der Assemblierung von 40000 Einzelsequenzen noch nicht sequenziert worden ist (Genomgröße 3 Mb, Leseweite 600 bp): sie beträgt 0,03%, mit anderen Worten sind statistisch gesehen 1006 Basen (=L * P) des Genoms noch nicht sequenziert, was mit einer 8fachen (=N * w/L) Abdeckung der Genomsequenz und einer Contiganzahl von etwa 13 (=N * P) korreliert, wobei die durchschnittliche Lückengröße 75 Basen (=Anzahl der noch nicht sequenzierten Basen/Contiganzahl) beträgt.

Mit diese Formel wurde nun der Verlauf der Rohsequenzierungsphase überprüft, indem die theoretisch zu erwartende Contiganzahl (=Lückenanzahl) mit der tatsächlich nach der Assemblierung der Einzelsequenzen erhaltenen Contiganzahl verglichen wurde (Abb. 15).

Abb. 15: Der Verlauf der Rohsequenzierung des *C. tetani*-Genoms

Mittels der LANDER & WATERMAN-Formel wurde der zu erwartende Verlauf unter Idealbedingungen ($f(N) = N \cdot \exp(-N \cdot w/L)$, schwarze Kurve) - Leseweite 600 Basen, Genomgröße 3 Mb - mit dem tatsächlichen Verlauf des Projektes (blaue Punkte) verglichen. Die Messpunkte (Contiganzahl) wurden dabei jeweils durch Neuassemblierung der Einzelsequenzen ermittelt. In rot ist das Ende der Rohsequenzierungsphase eingezeichnet: 39500 Einzelsequenzen assemblierten dabei zu 290 Contigs.

Mehrere Schlüsse konnten aus den Kurvenverläufen gezogen werden: 1. Im Anfangsstadium der Rohsequenzierung steigt die Contiganzahl annähernd proportional an, bis sie schließlich ihr Maximum erreicht (im Idealfall assemblieren 5500 Einzelsequenzen zu 1850 Contigs); danach nähert sich die Contiganzahl mit Zunahme der Menge der Einzelsequenzen asymptotisch dem Nullwert. 2. Der Vergleich der Kurven aus Abbildung 15 zeigt, dass der tatsächlich beobachtete Verlauf nicht dem theoretischen Idealfall entsprach. Hauptsächlich sind dafür drei Gründe zu nennen:

- Qualität der Genbanken: die Banken gewährleisteten nicht das gleichwahrscheinliche Vorkommen eines beliebigen genomischen

Abschnitts. Dadurch waren bestimmte Bereiche des Genoms in einer Genbank über- andere dagegen unterrepräsentiert.

- Qualität der Einzelsequenzen: durch eine schwankende Qualität bei der Sequenzierung assemblierten Einzelsequenzen fehlerhaft.
- repetitive Sequenzen: diese in jedem Genom vorkommenden Bereiche verursachen aufgrund der Gleichartigkeit der DNA-Sequenz fehlerhafte Assemblierungen.

Das Ende der Rohsequenzierungsphase wurde bei einer 8fachen Abdeckung der Genomsequenz festgesetzt. Zu diesem Zeitpunkt sollten zudem durch die Zugabe von 1000 neuen Einzelsequenzen und deren Assemblierung nicht mehr als 5 Lücken zwischen den Contigs geschlossen werden. Im *C. tetani*-Projekt war dieser Zeitpunkt bei 39500 Einzelsequenzen erreicht, die zu 290 Contigs assemblierten. Das entsprach einer theoretischen Abdeckung von 7,9fach. Trotz der hohen Zahl verbliebener Contigs hätte eine Fortführung der Rohsequenzierung nur wenig zur Reduzierung der Contiganzahl beigetragen und wurde daher allein schon aus ökonomischen Gründen nicht in Erwägung gezogen.

3.3.3 Phase 2: Editierung und Primer-Walking

Im Anschluss an die Rohsequenzierung und die Assemblierung aller Einzelsequenzen wurden die entstandenen 290 Contigs überprüft. Wie auch schon zur Assemblierung wurde dazu das Programm Gap4 benutzt (s. 2.11), mit welchem man jeden Contig in zwei unterschiedlichen Darstellungen aufrufen kann: das sogenannte *Template-Display* und der *Contig-Editor*. Abbildung 16 gibt das *Template-Display* eines typischen Contigs wieder. In diesem sind schematisch alle Einzelsequenzen eines Contigs sowie die dazugehörigen Templates (= Plasmidinserts) dargestellt.

Abb. 16: Die Darstellung eines Contigs im *Template-Display-Modus* des Programms Gap4

Gezeigt ist der Contig bctba77f, welcher eine Länge von 22364 bp aufweist und aus 331 Einzelsequenzen besteht. Die Farben bedeuten im einzelnen: blaugüne Pfeile, Vorwärts (*forward*)-Lauf auf dem entsprechenden Template (=Plasmidinsert); hellrosa Pfeile, Rückwärts (*reverse*)-Lauf; rote Striche (zwischen den Pfeilen), Template, das der erwarteten Größe (2-3 kb) entspricht; schwarze Striche (zwischen den Pfeilen), Template, das von der erwarteten Größe abweicht; violette Striche, der Gegenlauf dieses Templates fehlt im Gesamtdatensatz; hellgrüne Striche, der Gegenlauf dieses Templates befindet sich in einem anderen Contig des Gesamtdatensatzes; gelbe Kästchen, an dieser Stelle wurde ein Primer abgeleitet (zwecks Primer-Walking); rote Pfeile, Sequenzlauf, der durch Primer-Walking auf einem Template (oder der durch die Sequenzierung eines PCR-Produktes) erhalten wurde.

3.3.3.1 Auflösung fehlerhafter Assemblierungen

Die Überprüfung der Contigs erfolgte zum einen im Hinblick auf das Vorhandensein von fehlerhaften Assemblierungen, die wie in Kapitel 2.11.1.2 beschrieben aufgelöst wurden. Solche fehlerhaften Assemblierungen entstehen i. d. R. durch repetitive Sequenzen im Genom, wie z. B. IS (Insertionssequenz)-Elemente oder rRNA-Clustern, die in multiplen Kopien im Genom existieren, die entweder identisch oder

ähnlich sein können. Abbildung 17 gibt ein Beispiel für eine offensichtlich fehlerhafte Assemblierung einzelner Sequenzläufe innerhalb eines Contigs.

Abb. 17: Beispiel einer fehlerhaften Assemblierung im Contig gctko08r.esd

Gezeigt ist der Ausschnitt des Contigs zwischen der Nukleotidposition 1370-1450. In dieser Region assemblierten 20 Einzelsequenzläufe. In grün hervorgehoben sind die Unterschiede zum Consensus der 20 Läufe (unterste Sequenz). Betrachtet man diese genauer, so lassen sich bezüglich der Sequenz zwei Gruppen von Einzelsequenzen bilden, die aus 9 bzw. 11 Läufen bestehen. Die hinterlegten Grautöne entsprechen den Qualitätswerten der einzelnen Basen: je dunkler der Grauton, desto unwahrscheinlicher ist die Korrektheit des Nukleotids an dieser Position.

3.3.3.2 Editierung der Consensus-Sequenz

Zum anderen wurde die Consensus-Sequenz aller Contigs auf ihre Korrektheit und Qualität überprüft. Regionen innerhalb der Contigs, die nur durch eine oder wenige Einzelsequenzen abgedeckt waren oder die eine unsichere Consensus-Sequenz aufwiesen (als Indikator dafür diente der sogenannte *Base Confidence Value*; dieser durfte i. d. R. nicht unter 30 fallen), wurden genauer editiert. Zur Verbesserung der Qualität der Consensus-Sequenz wurden entweder Einzelsequenzläufe aus diesen Regionen wiederholt, oder aber solche Plasmidinserts mittels Insert-spezifischen Primern sequenziert, die diese Regionen überspannten. In manchen Fällen, falls keine die Region überspannenden Plasmide vorlagen, wurde der unsichere Contigabschnitt per PCR - mit genomischer DNA als Template - amplifiziert und das entstandene PCR-Produkt von beiden Seiten her (an)sequenziert (s. 2.12.3). Solche

PCR-Amplifikationen dienten auch der Überprüfung der Korrektheit der Assemblierung in unsicheren Bereichen.

3.3.3.3 Primer-Walking über Sequenzlücken

Parallel dazu wurde damit begonnen, erste Schritte im Hinblick auf die Überwindung von Sequenzlücken zwischen den Contigs zu unternehmen: Contigs wurden anhand endständiger Sequenzläufe der beiden Ränder wie in Kapitel 2.12.2 beschrieben einander zugeordnet, um dann über das sogenannte Primer-Walking lückenüberspannende Plasmidinserts zu sequenzieren und mit den gewonnenen Sequenzen die Lücken zwischen den jeweiligen Contigs zu schließen.

3.3.3.4 Lückenschluss mittels Abgleich der Contigenden

Nachdem alle diese Techniken durchgeführt worden waren und keine weiteren lückenüberspannenden Plasmide vorhanden waren, wurden alle Enden (0,2 - 1 kb) der verbleibenden Contigs wie in Kapitel 2.12.1 beschrieben gegeneinander abgeglichen, um endständig überlappende Contigs zu identifizieren. Das wurde zum einen mit der Funktion *Find Internal Joints* des Assemblierungsprogramms Gap4 und zum anderen mit dem BLAST-Algorithmus unternommen. Die letztere Methode stellte sich als die effektivere heraus. Mittels dieser konnte man auch leicht zwischen solchen Contigenden differenzieren, die nur einmal in der Genomsequenz vorkommen und solchen, die repetitive Sequenzen darstellen und daher mehrmals im Genom auftreten.

Zwischenbilanz. Durch die in diesem Kapitel beschriebenen Schritte der Editierung des assemblierten Sequenzdatensatzes und des Lückenschließens konnte die Contiganzahl von 290 auf 120 reduziert werden.

3.3.4 Phase 3: Schließen verbleibender Sequenzlücken (*Gap closure*)

Nun mussten weitere Strategien rekrutiert werden, um die noch verbleibenden 120 Sequenzlücken zu schließen. Dabei kamen im wesentlichen drei Methoden zur

Anwendung: die Herstellung einer Cosmid-Genbank (2.9.2), PCR-basierte Methoden, insbesondere die kombinatorische PCR-Technik (2.12.3) sowie der Lückenschluss unter Zuhilfenahme der Annotationsdaten (2.12.4).

3.3.4.1 Lückenschluss unter Zuhilfenahme einer Cosmid-Genbank

Als erstes wurde in dieser Phase des Projektes versucht, eine Cosmid-Genbank herzustellen, indem *C. tetani*-Fragmente der Größen 30-45 kb, die durch partiellen Restriktionsverdau mit dem Enzym *Sau3AI* erhalten worden waren, mit dem *Bam*HI-geschnittenen Cosmid-Vektor SuperCos1 ligiert wurden. Damit konnten aber keine rekombinanten Cosmide erhalten werden. Als mögliche Ursache wurde der schwierige partielle Verdau der genomischen DNA mit *Sau3AI* vermutet. Die G+C-reiche Erkennungssequenz von *Sau3AI* ($\downarrow$ GATC) ist im *C. tetani*-Genom, welches einen sehr niedrigen G+C-Gehalt von etwa 25% besitzt, nicht so häufig und regelmäßig vorhanden wie in Genomen mit höherem G+C-Gehalt. Daher wurde eine neue Strategie zur Herstellung einer Cosmid-Genbank verfolgt. Der SuperCos1-Vektor enthält in seiner multiplen Klonierungsstelle zwei *Eco*RI-Erkennungssequenzen (G $\downarrow$ AATTC). Nun wurde ein Enzym gesucht, das beim partiellen Verdau der genomischen DNA dazu komplementäre Enden bildete: das Enzym *Tas*I ($\downarrow$ AATT) erwies sich dafür als geeignet. So konnten schließlich rekombinante Klone gewonnen werden. Allerdings war der Erfolg bescheiden: insgesamt ließen sich lediglich etwa 150 rekombinante Klone herstellen, die eine vektorvermittelte Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz aufwiesen. Die Cosmide dieser Klone wurden umgehend isoliert und das *C. tetani*-Insert der Vektoren von beiden Seiten her ansequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden zum Gesamtdatensatz, bestehend aus 190 Contigs, hinzugeladen und assembliert. Ziel dabei war die Identifizierung solcher Cosmidinserts, die eine Lücke zwischen zwei Contigs überspannten. Solche Contigs konnten dann zueinander angeordnet werden, wobei die Größe der Sequenzlücke mittels des Vergleichs mit dem überspannenden Cosmidinsert abgeschätzt wurde. Schließlich wurde die Sequenzlücke über PCR mit endständig abgeleiteten Primern der entsprechenden Contigs amplifiziert, anschließend sequenziert und die erhaltene Sequenz zum Lückenschluss eingesetzt. So konnten weitere 15 Lücken geschlossen werden. Auffällig war, dass die Inserts der Cosmide - entgegen der statistischen Erwartung - keineswegs eine zufällige

Auswahl genomischer Abschnitte darstellten. Einige Bereiche des Genoms waren mit mehreren Cosmiden abgedeckt, wohingegen weite Bereiche des Genoms nicht in den Cosmid-Vektor SuperCos1 zu klonieren waren.

3.3.4.2 Lückenschluss unter Zuhilfenahme der kombinatorischen PCR-Technik

Als weitaus effektiver erwies sich die Methode der kombinatorischen PCR. Hierbei wurden zuerst Primer von allen verbliebenen Contigrändern abgeleitet - mit der Orientierung zum Contigende hin. Wichtig war dabei, dass die Primer spezifisch waren, was hier das einmalige Vorkommen jeder Primersequenz im Gesamtdatensatz meint. Nun wurden diese paarweise in allen denkbaren Kombinationen in einer PCR - mit genomischer DNA als Template - eingesetzt, wobei aufgrund der LANDER & WATERMAN-Berechnung eine durchschnittliche Lückengröße von nicht mehr als 2 kb angenommen wurde. Die Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten beschreibt die Formel

$$\frac{n!}{k! * (n - k)!},$$

wobei hier $k=2$ und n die Anzahl der Primer ist. Das bedeutete, dass bei 105 verbleibenden Contigs 21945 Kombinationsmöglichkeiten existierten. Das überstieg naturgemäß die Möglichkeiten eines kleinen Laborteams. So wurden in der Praxis nur Subsätze von Primerkombinationen genutzt, die zum Teil willkürlich gewählt wurden. Unter Zuhilfenahme der genomweiten Annotation wurden aber auch gewisse Primerkombinationen vorrangig verwendet (s. nächster Abschnitt). Jedes erhaltene PCR-Produkt wurde sofort sequenziert und die Sequenz zum Lückenschluss eingesetzt.

3.3.4.3 Lückenschluss unter Zuhilfenahme der genomweiten Annotation

Parallel dazu wurde eine weitere Methode zur Überwindung von Sequenzlücken entwickelt, die sich als sehr hilfreich herausstellte und Daten lieferte, die zur Identifikation von Contig-Paaren führte, welche direkt benachbarte DNA-Abschnitte des *C. tetani*-Genoms darstellten. Anschließend konnten diese Daten mit Hilfe der kombinatorischen PCR-Technik überprüft und gegebenenfalls zum Sequenzschluss

genutzt werden. Die Methode, die in Kapitel 2.12.4 beschrieben ist, macht sich die Annotation der Contigenden zunutze, was die Identifikation von kodierender Sequenz innerhalb dieser Enden (1-3 kb) meint. Zusätzlich benötigte man die vollständig oder partiell annotierten Genomsequenzen solcher Organismen, die zu *C. tetani* möglichst nah verwandt sind. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit lagen die Genomsequenzen von *C. acetobutylicum*, *C. perfringens* und *B. subtilis* sowie die unvollständigen Genomsequenzen von *C. difficile* und *C. botulinum* vor. Mit diesen Daten konnte die Tatsache genutzt werden, dass Genome nah verwandter Organismen eine ähnliche genetische Organisation besitzen. So konnten nun also die in den endständigen Sequenzen aller *C. tetani*-Contigs gefundenen offenen Leserahmen (ORFs) mit den anderen Genomsequenzen mittels des BLASTP-Algorithmus abgeglichen werden, um nach Homologien zu suchen (ALTSCHUL et al., 1990). Bei erfolgreicher Identifikation von Homologons, was die Regel war, wurde die genetische Umgebung des Homologons im entsprechenden Organismus betrachtet. Direkt benachbarte ORFs wurden anschließend *vice versa* mit dem Gesamtdatensatz von *C. tetani* abgeglichen. Oftmals befand sich das gesuchte Homologon im *C. tetani*-Datensatz am Ende eines anderen Contigs, was die Vermutung nahe legte, dass das ursprünglich betrachtete Contigende und das nun gefundene Contigende direkt benachbarte DNA-Abschnitte des *C. tetani*-Genoms darstellten. Durch eine anschließende PCR-Reaktion mit den entsprechenden endständig abgeleiteten Primern dieser Contigs konnte die Vermutung überprüft und gegebenenfalls zum Lückenschluss eingesetzt werden.

3.3.4.4 Die letzten Sequenzlücken in Regionen repetitiver DNA-Abschnitte

Mittels der besprochenen Techniken konnten viele weitere Contigpaare gebildet und Sequenzlücken geschlossen werden. Am Ende dieser Projektphase existierten noch 12 Contigs, wobei diese an den Enden ausnahmslos repetitive Sequenzen aufwiesen. Dabei konnte man zwei Arten von repetitiven Sequenzen unterscheiden: solche, die Kopien eines IS-Elements darstellten, welches für eine Transposase kodierte, und solche, in denen ribosomale RNA-Gene identifiziert werden konnten. Die Größe der Sequenzwiederholungen konnte bei dem IS-Element auf 3 kb und bei den rRNA-Genregionen auf 4,9 kb festgelegt werden. Alle repetitiven Contigenden wurden

markiert und die Übergänge zu weiter im Contiginnern liegenden Bereiche identifiziert, die ‚spezifische‘ Sequenz darstellten, d. h. solche Sequenz, die nur einmal im Genom von *C. tetani* vorkommt. Dabei kam der BLASTN-Algorithmus zum Einsatz. Von diesen spezifischen Sequenzbereichen wurden Primer abgeleitet, die wie nachfolgend beschrieben zum Einsatz kamen.

1. Die IS-Element-enthaltenden Regionen. Ein kombinatorischer Ansatz mit den wie eben beschrieben abgeleiteten Primern führte bei Contigenden, die Kopien eines IS-Elementes beinhalteten, nicht weiter: es konnten keine PCR-Produkte gewonnen werden. Aber folgende Strategie führte schließlich zum Erfolg: zuerst wurden alle 10 im Gesamtdatensatz gefundenen Kopien des IS-Elements untersucht, welche eine 100%ige DNA-Homologie zueinander aufwiesen. Diese befanden sich nicht nur an den Contigenden, sondern einige auch im Contiginneren. Nun wurde die Korrektheit der Assemblierung der IS-Element-enthaltenden Contigbereiche mittels PCR überprüft. Konnte kein PCR-Produkt gewonnen werden, was in mehreren Regionen - trotz augenscheinlicher Fehlerfreiheit der Assemblierung im *Contig-Editor*-Modus - der Fall war, musste der Contig an der entsprechenden Stelle aufgebrochen werden. Dadurch entstanden neue Contigenden, von denen ‚spezifische‘ Primersequenzen abgeleitet wurden. Benutzte man nun diese zusätzlich im kombinatorischen Ansatz, konnten PCR-Produkte gewonnen, d. h. Contigpaare gebildet und diese verbunden werden.

2. Die rRNA-Operon-enthaltenden Regionen. Anfänglich bestand hier eine große Problematik: auffällig war, dass von vielen Templates, die aus Regionen stammten, welche rDNA-Sequenzen enthielten, nur jeweils ein Sequenzlauf im Datensatz existierte, der dazugehörige Gegenlauf aber fehlte. Schnell stellte sich heraus, dass dieser Umstand auf das Prozessierungsprotokoll zurückzuführen war: die Einstellung des Programms Pregap4 war so konfiguriert, dass die Rohsequenzen u. a. gegen das Gesamtgenom von *E. coli* abgeglichen wurden (2.11.1.1). Alle diejenigen Einzelsequenzen, die eine 90%ige oder höhere Homologie zur *E. coli*-DNA zeigten, wurden nicht in den Gesamtdatensatz geladen, sondern als *E. coli*-Kontaminationen bezeichnet und verworfen. Dabei wurde übersehen, dass die rRNA-Operone verschiedener Genome nahezu identisch sind, auch die von *E. coli* und *C. tetani*. Zur Behebung dieses Fehlers wurden alle entsprechend gekennzeichneten verworfenen Sequenzläufe manuell in den Gesamtdatensatz transferiert. Es zeigte sich tatsächlich, dass diese aus rDNA-Sequenzbereichen stammten. Mittels dieser zusätzlichen

Sequenzen konnte nun ein vollständigeres Bild der rRNA-Operone gewonnen werden, wobei zwischen 6 nahezu identischen Kopien unterschieden werden konnte. Die Zusammensetzung eines typisches rRNA-Operons ist in Abbildung 18 gezeigt. Ein Operon besteht dabei aus einem 16S, einem 23S und einem 5S rRNA-Gen, wobei zwischen den ersten beiden Genen eine variable Spacer-Region existiert, in der in manchen rRNA-Operonen ein tRNA-Gen liegt.

Abb. 18: Aufbau eines typischen rRNA-Operons in *C. tetani*.

Mit sequenzspezifischen Primern wurde nun im kombinatorischen PCR-Ansatz versucht, komplette ribosomale Operone (~ 6 kb) zu amplifizieren. Das war in vielen Fällen erfolgreich. Eine Sequenzlücke verblieb aber. Der Grund dafür wurde durch einen Vergleich mit den rRNA-Operonen aus *C. perfringens* deutlich: das Genom dieses Organismus enthält neben isoliert liegenden rRNA-Operonen auch solche, die direkt benachbart sind, die somit repetitive Bereiche von über 10 kb ergeben. Anschließend durchgeführte Versuche zur Amplifikation von PCR-Produkten über 10 kb blieben auch mit *long-PCR*-DNA-Polymerasen erfolglos. Diese schwierige Situation wurde dann mit anderen Mitteln gelöst. Ins Blickfeld gerieten wieder die rekombinanten Cosmide, welche bei genauerer Analyse der Lokalisation der Cosmidinserts eine interessante Besonderheit zeigten: es stellte sich heraus, dass die genomische Herkunft der Cosmidinserts - entgegen der statistischen Erwartung - nicht dem Zufallsprinzip unterlag. Vielmehr enthielten die meisten Cosmide der Genbank solche Inserts, welche rRNA-Gene enthaltende Bereiche umfassten. Möglicherweise hing dieses Phänomen mit dem in diesen Bereichen im Vergleich zur Gesamtgenomsequenz fast doppelt so hohen G+C-Gehalt zusammen, welcher zu einer besseren Klonierbarkeit solcher DNA-Abschnitte beitragen könnte. Denkbar wäre auch, dass diese DNA-Abschnitte leichter klonierbar waren, weil sie vergleichsweise wenig für Proteine kodierende Sequenz beinhalteten. Das könnte mögliche toxische Effekte durch heterologe Genexpression im Wirtsbakterium *E. coli* DH5 α vorgebeugt haben. Durch den Vergleich mit den Insertgrößen der

Cosmide, welche die letzte Sequenzlücke überspannten, konnte vermutet werden, dass diese letzte Lücke nicht ein rRNA-Operon, sondern zwei direkt hintereinander liegende rRNA-Operone umfassen müsste. Dieses konnte dann mit PCR-Methoden, wobei die DNA der entsprechenden Cosmide als Template verwendet wurde, und anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt werden.

Abschließend wurde noch einmal die Qualität des Consensus der Gesamtsequenz überprüft und gegebenenfalls Sequenzläufe wiederholt. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die durchschnittliche Fehlerrate kleiner als 1 in 10000 Basen war, was allgemein als ausreichend zur Veröffentlichung der Sequenz angesehen wird. Das Gap4-Programm berechnete anhand des sogenannten *Base Confidence Values* die Fehlerrate der Chromosomensequenz auf 1 in 147615 Basen.

Damit war ca. zwei Jahre nach Beginn der Arbeiten die Genomsequenzierungsphase des Projektes abgeschlossen: im Datensatz assemblierten nun 44455 Sequenzläufe (aus 24495 rekombinanten Plasmiden) zu zwei Contigs, welche das *C. tetani*-Genom bestehend aus einem 74082 bp großen Plasmid und einem zirkulären 2799251 bp großen Chromosom darstellten. Die letztendlich erhaltene Abdeckung der Sequenz betrug 9,5fach. Nun folgten die Arbeiten zur Analyse der Sequenz, was vor allem die Identifizierung aller Gene des Genoms von *C. tetani* bedeutet.

3.4 Sequenzanalyse des Chromosoms von *C. tetani* E88

3.4.1 Allgemeine Merkmale der Sequenz des Chromosoms

Im folgenden sollen einige Merkmale der Sequenz des Chromosoms von *C. tetani* vorgestellt und mit den zwei bisher einzigen komplett sequenzierten Genomen von Organismen der Gattung *Clostridium*, *C. perfringens* und *C. acetobutylicum*, verglichen werden (Tabelle 8; SHIMIZU et al., 2002; NÖLLING et al., 2001). Das Chromosom von *C. tetani* besteht aus 2799251 bp. Es ist damit etwas kleiner als das Chromosom von *C. perfringens* (3,03 Mb) und erheblich kleiner als das von *C. acetobutylicum*, welches 3,94 Mb groß ist. Alle drei Organismen enthalten neben dem Chromosom zusätzlich ein Plasmid, welche aber in der Größe und in der kodierenden Sequenz stark variieren. Der durchschnittliche G+C-Gehalt des *C. tetani*-Chromosoms beträgt 28,6%, ist also etwas höher als der des Plasmids pE88 (24,5%). Der G+C-Gehalt des Genoms von *C. tetani* gehört zu den niedrigsten Werten, die bisher von kompletten Genomsequenzen ermittelt wurden. Um erste Hinweise bezüglich einer möglichen evolutiven Akquirierung von Genen anderer Genome mittels lateralem Gentransfer zu erhalten, wurde die G+C-Variation des *C. tetani*-Genoms in DNA-Abschnitten von 1000 bp untersucht (s. Abb. 19). Es zeigte sich genomweit eine geringe Abweichung vom durchschnittlichen G+C-Gehalt. Lediglich sechs Bereiche fielen durch einen G+C-Gehalt von ca. 50% auf, die Mehrheit davon in der Nähe des potentiellen Replikationsursprungs (s. 3.4.4). Diese Bereiche entsprachen DNA-Abschnitten, welche die sechs rRNA-Operone sowie ein Operon für ribosomale Proteine enthielten.

Tabelle 8 gibt weitere Merkmale der Genomsequenz an, die in nachfolgenden Kapiteln im Detail besprochen werden sollen. Auffällig ist, dass das *C. tetani*-Genom im Vergleich zu den anderen Clostridien-Genomen sowohl weniger rRNA-Gene als auch weniger tRNAs enthält. Es konnten lediglich 54 tRNAs mit dem tRNAscan-SE-Programm (LOWE & EDDY, 1997) identifiziert werden: je fünf für Met und Leu; je vier für Arg, Thr, Ser und Gly; je drei für Ala, Asn, Ile und Lys; je zwei für Glu, Cys, Phe, Gln, Tyr und Pro sowie je eine für Asp, Val, Trp und His.

Tabelle 8: Einige Merkmale der Genomsequenzen von *C. tetani*, *C. perfringens* und *C. acetobutylicum*

Merkmale	<i>C. tetani</i> E88	<i>C. perfringens</i> 13	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824
Größe des Chromosoms	2799251 bp	3031430 bp	3940880 bp
Größe des Plasmids (bp)	74082 (pE88)	54310 (pCP13)	192000 (pSOL1)
G+C-Gehalt (%)	28,6 (24,5) ^a	28,6 (25,5) ^a	30,9 (30,9) ^a
kodierende Sequenz	86%	83,1%	88%
Anzahl der identifizierten ORFs ^b	2373 (61)	2660 (63)	3740 (178)
ORFs (%) auf <i>leading</i> -Strang	81,1	83	79
RNA-Gene	72	125	107
rRNA-Operone	6	10	11
tRNAs	54	96	73
(cryptische) Prophagen	3	1	2

^a In Klammern, G+C-Gehalt der Plasmide.

^b In allen drei Genomprojekten wurde eine unterschiedliche Strategie bezüglich der ORF-Vorhersage gewählt. In *C. perfringens* wurden die Programme GAMBLER und GENEHACKER PLUS, in *C. acetobutylicum* UNIORF benutzt.

3.4.2 ORF-Vorhersage

Die Identifizierung kodierender Sequenz wurde wie in Kapitel 2.13.1 beschrieben mit Computerprogrammen durchgeführt. Bei der Genomsequenz von *C. tetani* wurde das Programm GLIMMER (Gene Locator and Interpolated Markov Modeler; DELCHER et al., 1999) ausgewählt, welches mit interpolierenden Markov-Modellen arbeitet. Hiermit wurden 2641 ORFs identifiziert. Allerdings waren darunter etliche (~200), die mit anderen ORFs überlappten. Durch Vergleich mit der Annotation verwandter Genome konnte außerdem festgestellt werden, dass einige ORFs durch GLIMMER nicht erkannt worden waren. Es wurde daher entschieden, die ORF-Vorhersage parallel zur Annotation manuell ORF um ORF zu überprüfen. Dabei wurde bei überlappenden ORFs die Entscheidung für einen der beiden ORFs davon abhängig gemacht, ob und welche dieser ORFs Homologien zu ORFs aus anderen Organismen zeigten und ob eine Ribosomen-Bindestelle unmittelbar stromaufwärts des Startcodons ausgemacht werden konnte. Wesentlich schwieriger als das Löschen war das Hinzufügen von ORFs, was aufgrund des in diesem Punkt unflexiblen Annotationsprogramms ERGO nur auf komplizierte und zeitaufwendige Weise möglich war. Die manuelle Identifizierung aller fehlenden ORFs war zudem nicht in

vollständiger Weise möglich, weil es dazu der Überprüfung der Genom-Annotation der verwandten Organismen bedurft hätte, was aber den Zeitrahmen dieser Arbeit gesprengt hätte.

Der momentane Stand (November 2002) der gefundenen und verifizierten ORFs im *C. tetani*-Chromosom beläuft sich auf 2373.

3.4.3 Übersicht über die Annotation des Chromosoms

Die mit GLIMMER vorhergesagten ORFs wurden dann in das Annotationsprogramm ERGO (OVERBEEK et al., 2000; Integrated Genomics, Inc.) eingespeist. Dieses Programm gleicht die Sequenzen aller ORFs mittels des FASTA-Algorithmus mit der internen ERGO-Datenbank* ab und weist ihnen gegebenenfalls eine Funktion zu. Dieser Prozess und die anschließende manuelle Überprüfung der automatischen Annotation sind in Kapitel 2.13.2 geschildert. Im folgenden werden die Ergebnisse der Annotation des *C. tetani*-Chromosoms ausführlich präsentiert.

Die aus 2373 ORFs bestehende kodierende Sequenz stellt 86% des Chromosoms dar. Diese sind - aufgeteilt nach ihrer DNA-Strang-Lokalisation - in Abbildung 19 dargestellt. Etwa 13% aller ORFs zeigten Homologien zu Proteinen aus anderen Organismen, denen keine Funktionen zugeordnet sind. Diese werden im folgenden als konservierte Proteine bezeichnet. Zu 11% aller ORFs konnten keine homologen Proteine gefunden werden. Diese werden nachfolgend hypothetische Proteine genannt. 76% aller ORFs konnte eine Funktion zugewiesen werden. Zu dieser Gruppe gehörten solche ORFs, deren Proteinsequenzen signifikante Ähnlichkeiten zu Proteinen bekannter Funktion zeigten (s. 2.13.2). Zusätzlich wurden auch solche ORFs zu dieser Kategorie gerechnet, die eine Proteindomäne mit bekannter Funktion aufwiesen, dabei aber nicht notwendigerweise signifikante Homologien über die ganze Proteinsequenz zeigten. Streng genommen könnte man solche ORFs auch als konserviert bezeichnen, allerdings hat das ERGO-Programm solchen ORFs i. d. R. die Funktion der Domäne zugewiesen.

Eine Tabelle der Annotation aller 2373 ORFs soll in dieser Arbeit wegen ihres Umfangs nicht erscheinen. Es soll aber an dieser Stelle auf die Veröffentlichung der

* Die nicht-redundante interne ERGO-Datenbank umfasst Sequenzen - i. d. R. vollständige Genome - aus 394 Organismen: 25 Archaeen, 81 Eukaryoten, 88 Viren und 200 Prokaryoten (Stand: Oktober 2002).

Sequenz in der GenBank-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) hingewiesen werden, wobei sie unter den Zugangsnummern AE015927 (Chromosom) und AF528097 (pE88) abrufbar ist (BRÜGGEMANN et al., 2003).

Abb. 19: Zirkuläre ORF-Karte des Chromosoms von *C. tetani*.

Alle gefundenen ORFs sind in blau bzw. grün eingezeichnet – abhängig davon, auf welchem DNA-Strang sie kodiert sind. Der äußere Ring ist eine Größenskala. Der Nullpunkt entspricht dabei dem potentiellen Replikationsursprung (s. 3.4.4). In orange sind die *C. tetani*-ORFs gekennzeichnet, die Homologons im Genom von *C. perfringens* aber nicht in dem von *C. acetobutylicum* haben (s. 4.1.3.2). In pink sind solche ORFs von *C. tetani* angegeben, die nicht in den beiden anderen Clostridien-Genomen vorkommen (s. 4.1.3.3). Der innere Kreis gibt die lokalen Abweichungen vom durchschnittlichen G+C-Gehalt (28,6%) an.

3.4.4 Identifizierung des Replikationsursprungs

Unter Ausnutzung bioinformatischer Methoden lassen sich Hinweise auf die Lokalisation des Replikationsursprungs eines Chromosoms sammeln. Im folgenden werden drei Hinweise genannt.

1. Die kumulative GC-Skew-Analyse wurde bereits in Kapitel 3.2.4 vorgestellt (GRIGORIEV, 1998). Im Fall des Chromosoms wurde die Sequenz als linear vorliegender Contig in ein entsprechendes GC-Skew-Analyseprogramm eingespeist. Abbildung 20 zeigt, dass es in der Genomsequenz bezüglich der GC-Verteilung nach der Formel $(C-G/C+G)$ einen Vorzeichenwechsel in der Kurvensteigung gibt. Der Wechsel ist mit der unterschiedlichen GC-Verteilung im *leading*- und im *lagging*-Strang der Replikation zu erklären (s. 3.2.4; LOBRY, 1996).

Abb. 20: Kumulativer GC-Skew des Chromosoms von *C. tetani*

Berechnet wurde die Summe von $(C-G/C+G)$ in gleitenden Fenstern von 1000 bp mit einer definierten Schrittzahl. Eingabesequenz war der das gesamte Chromosom umfassende Contig, welcher an der Stelle der letzten Lücke (das zweifache rRNA-Operon) linearisiert vorlag.

Im Bereich des Maximums des Graphen bei etwa 1,4 Mb befindet sich aller Wahrscheinlichkeit nach der Replikationsterminus; etwa eine halbe Genomlänge davon entfernt kann der Replikationsursprung vermutet werden (Kurvenminimum), was durch die Analyse der genetischen Umgebung bestätigt werden konnte (s. u.). Dabei war es Zufall, dass sich der Replikationsursprung des Chromosoms offenbar ziemlich genau im Bereich eines der Contigenden befand.

2. Das Ergebnis der GC-Skew-Analyse wurde mit der Verteilung der kodierenden Sequenz auf den beiden DNA-Strängen verglichen, wie sie in Abbildung 19 zu sehen ist: dabei fallen zwei starke Inflexionspunkte bezüglich des kodierenden Stranges auf, die etwa eine halbe Genomlänge voneinander entfernt sind. Die Lokalisation dieser Punkte stimmt mit den oben erwähnten Genomregionen überein, an denen im kumulativen GC-Skew ein Minimum bzw. Maximum auftritt. Diese Inflexionspunkte sind also offensichtlich der Replikationsursprung und der Replikationsterminus. Mit anderen Worten bedeuten dies, dass Transkription und Replikation codirektional verlaufen: 81,1% der 2373 ORFs werden in der gleichen Richtung transkribiert, in der auch die Replikation verläuft (83,4% der 1256 ORFs des –Stranges und 78,6% der 1117 ORFs des +Stranges). Diese starke Tendenz der Codirektionalität von Transkription und Translation lässt sich auch in den Genomen von *C. perfringens* (83%) und *C. acetobutylicum* (79%) sowie einigen wenigen anderen Gram-positiven Organismen wie *Lactococcus lactis* (81%), *Streptococcus pyogenes* (79,5%), *Bacillus subtilis* (74,1%) und *Staphylococcus aureus* (74,6%) erkennen (SHIMIZU et al., 2002). Im Gegensatz dazu ist diese Tendenz nur sehr schwach in Genomen vieler Gram-negativer Organismen wie *E. coli* (55,1%), *Vibrio cholerae* (52%), *Neisseria meningitidis* (53,7%) oder *Yersinia pestis* sowie bei archaeellen Organismen wie *Methanosarcina mazei* ausgeprägt (MCLEAN et al., 1998; DEPPENMEIER et al., 2002). Der bisher einzige bekannte und sequenzierte Gram-negative Organismus, der ebenfalls diese Codirektionalität zeigt, ist *Thermoanaerobacter tengcongensis* (86,7%; BAO et al., 2002).

3. Als nächstes wurde das Genom nach Proteinen mit Replikationsfunktionen durchsucht. Dabei zeigt sich eine Abundanz solcher ORFs im Bereich des mit den eben vorgestellten Strategien gefundenen potentiellen Replikationsursprungs. Abbildung 21 zeigt das genetische Repertoire dieses Bereichs, der einen Inflexionspunkt bezüglich des kodierenden Stranges beinhaltet.

Abb. 21: Genetische Umgebung des potentiellen Replikationsursprungs des *C. tetani*-Chromosoms

Gezeigt ist der Bereich 8 kb stromabwärts - beginnend mit CTC0090 (*gyrA*) - bis 9 kb stromaufwärts - endend mit CTC0103 - vom potentiellen *ori*. Nicht aufgeführt sind die etwas weiter stromaufwärts vom *ori* liegenden Replikationsgene *dnaC* (CTC0123) und *dnaD* (CTC0124). CTC101 und CTC103 zeigen eine hohe Homologie zueinander.

Dieser DNA-Abschnitt wurde mit der potentiellen *ori*-Region anderer Genome wie *C. perfringens* und *C. acetobutylicum* verglichen (Abb. 22). Es wird deutlich, dass diese Genregion in vielen Organismen hoch konserviert ist. Es soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Lokalisation des *ori* bisher in nur wenigen der in Abbildung 22 aufgeführten Organismen, u. a. in *B. subtilis*, experimentell bestätigt werden konnte. Auffällig ist das Vorkommen einiger sporulationsassoziiierter Gene in diesem Bereich. Es gibt experimentelle Hinweise dafür, dass die Initiation der Sporen-Bildung in *B. subtilis* von der Initiation der DNA-Replikation abhängig ist: es konnte nachgewiesen werden, dass Mutationen in *DnaA* und *DnaD* die Sporulationsfähigkeit inhibieren (LEMON et al., 2000).

Abb. 22: Vergleich der genetischen Umgebung der potentiellen Replikationsursprünge ausgewählter Genome

Die Farbkodierung entspricht der aus Abb. 21. Die Reihenfolge, in der die aufgeführten Organismen erscheinen, orientiert sich an der Ähnlichkeit des Genclusters zu dem von *C. tetani*. Zusätzliche Gene: ◻, konserviertes Protein; ◻, mögliches RNA-Bindeprotein; ◻, ribosomales Protein L34P; ◻, konserviertes Protein; in grau, diverse Funktionen; ?, Sequenz unbekannt.

3.4.5 Toxine und weitere Virulenzfaktoren

3.4.5.1 Bekannte Virulenzfaktoren

Es wurde vermutet, dass *C. tetani* neben den Virulenzfaktoren, welche auf pE88 kodiert sind, weitere, chromosomal-kodierte Virulenz-relevante Proteine besitzt. So wurde das Chromosom systematisch nach solchen Genen durchsucht. Das Ergebnis dieser Suche ist in Tabelle 9 zusammengefasst. Viele der gefundenen Proteine, wie z. B. Hämolysine, Tetanolysin O und Fibronectin-Bindeproteine, zeigen die stärksten Ähnlichkeiten zu Proteinen aus *C. perfringens*.

Tabelle 9: Chromosomal-kodierte Virulenzfaktoren von *C. tetani*

ORF-Name und –Größe (in As)	Produkt	homologe Sequenz in	Kommentar
CTC164 (224) CTC471 (642) CTC1606 (577)	Fibronectin-Bindeprotein	<i>Cp, Cb, Cd, Ba, Lm, Li</i>	ermöglicht die Anheftung an Wund-Gewebe; COG1293; GILOT et al., 2000
CTC440 (391)	α -Clostripain-Homologon	<i>Cp, Ch</i>	Cystein-Proteinase (Clostripain-Familie); DARGATZ et al., 1993
CTC586 (211)	Hämolysin III	<i>Cp, Cb, Ca, B. cereus</i>	COG1272 (Membranproteine); BAIDA & KUZMIN, 1995
CTC594 (291), CTC1503 (317)	mögliche PAF-Acetylhydrolase	<i>Sm, Sp, Spn</i>	Phospholipase, inaktiviert den Thrombocyten-aktivierenden Faktor (PAF); KARASAWA et al., 1994
CTC1574 (272)	Hämolysin	<i>Cp, Cb, Ca, Cd</i>	COG1189 (rRNA-Methylasen)
CTC1814 (216)	periplasm. immunogenes Protein	<i>Ba, Brucella melitensis</i>	Omp (outer membrane protein); LINDLER et al., 1996
CTC1855 (533)	Myosin-crossreaktives Antigen	<i>Cp, Lm, Li, Sm, Cb</i>	homolog zu MHC (major histocompatibility complex)-Klasse II-Antigenen; AJDIC et al., 2002
CTC1888 (527)	Tetanolysin O	<i>Cp, Sp, Lm, u. a.</i>	Thiol-aktiviertes Cytolysin
CTC2255 (518) CTC2261 (514)	Virulenzfaktor MviN	<i>Cb, Ca, Cd</i>	Membranprotein

Abkürzungen: *Ca*, *C. acetobutylicum*; *Cb*, *C. botulinum*; *Cd*, *C. difficile*; *Ch*, *C. histolyticum*; *Cp*, *C. perfringens*; *Ba*, *B. anthracis*; *Lm*, *Listeria monocytogenes*; *Li*, *Listeria innocua*; *Sm*, *Streptococcus mutans*; *Sp*, *Streptococcus pyogenes*; *Spn*, *Streptococcus pneumoniae*. COG, Cluster of orthologous Groups of proteins (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>).

Von den aufgeführten Faktoren aus *C. tetani* ist bisher lediglich das Tetanolysin O untersucht worden (TWETEN, 1997); der derzeitige Wissensstand wird ausführlich in Kapitel 4.2.1.3 wiedergegeben. Die in Tabelle 9 angegebenen Funktionen der übrigen Virulenzfaktoren leiten sich aus den z. T. vorliegenden Charakterisierungen der homologen Proteine ab; für einige der aufgeführten Proteine, wie z. B. Myosin-crossreaktives Antigen und Virulenzfaktor MviN, wird eine Beteiligung an der Pathogenitätsausbildung lediglich vermutet.

Die Gene der in Tabelle 9 aufgeführten Virulenzfaktoren liegen auf dem Chromosom nicht benachbart vor, bilden also keine Pathogenitätsinseln. Der G+C-Gehalt dieser Gene weicht nicht signifikant vom durchschnittlichen G+C-Gehalt des Chromosoms ab. Auch konnten keine mobilen genetischen Elemente in den sie flankierenden DNA-Regionen ausgemacht werden, was bezüglich der evolutiven Pathogenitätsausbildung darauf hinweist, dass diese Gene nicht über lateralen Gentransfer akquiriert wurden, oder zumindest fand diese Akquirierung nicht erst kürzlich statt.

3.4.5.2 Zelloberflächenproteine

Weitere Gene konnten im Genom von *C. tetani* identifiziert werden, deren Proteine möglicherweise bei der Ausbildung der Pathogenität des Organismus' eine Rolle spielen: so wurden 32 Gene ausgemacht, die Zelloberflächen-Proteine kodieren und zwar solche, die möglicherweise in der sogenannten S-Layer (Surface-Layer) angeordnet sind. Der Begriff S-Layer beschreibt eine prokaryotische Zelloberflächen-assoziierte Struktur aus Proteinen, die i. d. R. in parakristalliner einschichtiger Anordnung vorkommt und die Oberfläche der Bakterienzelle umhüllt. Sie ist leicht unter dem Elektronenmikroskop sichtbar (CALABI et al., 2001).

Tabelle 10 stellt die im Genom identifizierten Gene dieser Zelloberflächen- bzw. S-Layer- oder S-Layer-assoziierten Proteine zusammen. Sie sind nach ihren stärksten Homologien in drei Gruppen eingeteilt, wobei aber eine schwache Homologie zwischen den meisten der aufgeführten Proteine festzustellen ist. Die erste Gruppe beinhaltet 19 Proteine, die homolog zum Cwp66-Protein aus *C. difficile* sind. Dieses ist ein charakterisiertes Zelladhäsionsprotein und wird für die Adhäsion von *C. difficile*-Zellen an Zellen des Intestinaltraktes verantwortlich gemacht (s. 4.2.1.4; WALIGORA et al., 2001).

Die zweite Gruppe von Proteinen zeigt Ähnlichkeiten zu Internalin A aus *Listeria monocytogenes* und andern Internalinen aus Listerien. Internaline sind verantwortlich für die Herstellung eines Zellkontaktes zwischen der *Listeria*-Zelle und bestimmten Epithelzellen des Säugetierwirts (CABANES et al., 2002).

Die dritte Gruppe beinhaltet 10 Proteine, die zwar konservierte Zelloberflächen-Domänen aufweisen, ansonsten aber keine signifikanten Ähnlichkeiten zu Proteinen aus Datenbanken zeigen. Auffällig ist die z. T. hohe Ähnlichkeit der Proteine untereinander sowie ein herausragendes Molekulargewicht von bis zu 220 kDa einiger dieser Proteine.

Auf interessante Details der Proteine dieser drei Gruppen wird in Kapitel 4.2.1.4 eingegangen.

Tabelle 10: Mögliche S-Layer und Zelloberflächen-assoziierte Proteine von *C. tetani* und anderen Clostridien

	homolog zum Cwp66/SlpA von <i>C. difficile</i>	homolog zum Internalin A aus <i>L. monocytogenes</i>	weitere Zelloberflächen- proteine
<i>C. tetani</i>	CTC462 (1080), CTC491 (508), CTC504 (592), CTC515 (584), CTC518 (585), CTC520 (871), CTC521 (487), CTC523 (354), CTC691 (505), CTC696 (518), CTC748 (462), CTC774 (667), CTC775 (353), CTC1202 (492), CTC1364 (648), CTC1872 (471), CTC1980 (722), CTC2092 (508), CTC2093 (708)	CTC494 (706), CTC495 (695)	CTC465 (1334), CTC747 (1416), CTC749 (1900), CTC750 (1511), CTC767 (528), CTC769 (568), CTC770 (603), CTC771 (374), CTC772 (360), CTC776 (355), CTC777 (1880)
<i>C. difficile</i>	29 (u. a. Cwp66 und SlpA)	0	n. b.
<i>C. botulinum</i>	8	4	n. b.
<i>C. perfringens</i>	0	0	n. b.
<i>C. acetobutylicum</i>	0	1	n. b.

n. b., nicht bekannt

Alle in Tabelle 10 aufgeführten Proteine besitzen eine typische Signalpeptidsequenz, was den Export dieser Proteine durch die Cytoplasmamembran ermöglicht. Interessanterweise zeigt das Genom von *C. perfringens* keinerlei Homologien zu S-Layer- oder S-Layer-assoziierten Proteinen, was einen anderen Mechanismus

bezüglich der Zelladhäsion an das Gewebe des Wirts vermuten lässt - wenn ein solcher denn überhaupt vorhanden sein sollte.

Auffallend viele Gene der besprochenen Oberflächenproteine kommen im Genom von *C. tetani* geclustert vor. Es können zwei Bereiche ausgemacht werden, die besonders viele solcher Gene beinhalten: 1. Die Region CTC491 bis CTC523 beinhaltet mindestens 10 ORFs für Oberflächenproteine, zusammen mit drei weiteren hypothetischen ORFs, die eine Signalpeptid-Sequenz aufweisen, sieben ORFs für den Katabolismus von Myo-Inositol und einem ORF für eine Zink-Carboxypeptidase (CTC519). 2. Die Region CTC747 bis CTC778 beinhaltet 13 Oberflächenproteine, vor allem solche aus der dritten Gruppe, zusammen mit vier weiteren Signalpeptid-tragenden ORFs und einer Reihe von hydrophoben Proteinen unbekannter Funktion.

3.4.6 Metabolismus 1: Substratverwertung

Die Rekonstruktion metabolischer Wege basierend auf der Genomannotation ist eine sehr umfangreiche Aufgabe. Es soll an dieser Stelle nicht der Versuch unternommen werden, alle stoffwechselrelevanten Gene von *C. tetani* wiederzugeben und daraus ein vollständiges Bild seiner metabolischen Fähigkeiten zu entwerfen. Zum einen bedeutet die Abwesenheit bestimmter Gene für eine metabolische Leistung nicht zwangsläufig, dass diese Leistung nicht vollzogen werden kann; viele Proteine haben neben einer Hauptaktivität häufig auch eine oder mehrerer Nebenaktivitäten, die durch die Genomannotation nicht erkannt werden können. Andererseits sollte berücksichtigt werden, dass die genetische Präsenz nicht zwangsläufig bedeutet, dass die entsprechende Stoffwechselleistung auch tatsächlich ausgeübt wird. Damit zusammenhängend ist es in einigen Fällen aufgrund von zu schwachen oder mehrdeutigen Homologien auch nicht eindeutig ersichtlich, ob für einen bestimmten Stoffwechselweg tatsächlich alle notwendigen Gene vorliegen.

Es soll deshalb im folgenden versucht werden, einen Überblick über die metabolischen Fähigkeiten von *C. tetani* zu gewinnen und insbesondere auf bisher unbekannte Besonderheiten hinzuweisen.

C. tetani gehört zur Gattung *Clostridium*, welche Organismen umfasst, die nur anaerob wachsen können und einen ausgeprägten Gärungsstoffwechsel aufweisen. Je nach der Art der Substrate, welche bevorzugt fermentiert werden, unterscheidet man saccharolytische und peptolytische Clostridien, wobei *C. tetani* zur zweiten Gruppe zugehörig eingeordnet wurde (BERGEY et al., 1923). Als Fermentationsprodukte werden Gase wie NH_3 , CO_2 und H_2 , Säuren wie Butyrat, Acetat, Formiat und Lactat und Alkohole wie Butanol und Ethanol gebildet.

3.4.6.1 Vergärung von Zuckern: Glykolyse und Pentosephosphat-Weg

Die Genomsequenz lässt nun ein genaueres Bild der stoffwechselphysiologischen Leistungen von *C. tetani* erkennen. Auffällig ist, dass vermutlich lediglich Glucose, Galactose und Ribose als Zucker-Substrate abgebaut werden können. Das unterscheidet *C. tetani* deutlich von *C. perfringens* und *C. acetobutylicum*, die zusätzlich Polysaccharide wie Fructose, Maltose, Stärke und Glycogen verwerten können. *C. tetani* besitzt sämtliche Gene für die Glykolyse (CTC378-382, CTC2404, CTC2489, CTC2490). Neben den Genen für die Glykolyse lassen sich die Gene des Pentose-Phosphat-Weges finden. Bemerkenswert dabei ist, dass die Enzyme Glucose-6-Phosphat-1-Dehydrogenase (CTC1864) und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (CTC1865) nicht in den Genomen anderer Clostridien kodiert sind.

3.4.6.2 Vergärung von Aminosäuren

In der Hauptsache scheint *C. tetani* Aminosäuren zu vergären: viele Aminosäure-abbauende Proteine liegen in der Genomsequenz kodiert vor, die nachfolgend vorgestellt werden. Um diese Aminosäuren für die Fermentation bereit zu stellen, gibt es eine ganze Bandbreite von extrazellulären und intrazellulären Proteasen, und viele membranständige Peptid- und Aminosäuretransporter, mehrere davon sind Natrium-abhängige Symporter (s. 4.1.4).

In Tabelle 11 sind solche Aminosäure-abbauenden Proteine genannt, die den ersten Schritt des jeweiligen katabolischen Weges katalysieren. Aus der Genomsequenz lässt sich ableiten, dass *C. tetani* wahrscheinlich folgende Aminosäuren fermentieren kann: Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Glutamin, Glutamat, Histidin, Isoleucin, Leucin, Serin, Threonin, Tryptophan und Tyrosin. Überraschenderweise fehlt in *C.*

tetani - anders als in *C. difficile* und *C. botulinum* - die für die Stickland-Reaktion typische Glycin-Reduktase, welche in Clostridien wie *C. sticklandii* oder *C. sporogenes* identifiziert und untersucht wurde (TURNER & STADTMAN, 1973). So bleibt unklar, ob *C. tetani* eine paarweise Vergärung von Aminosäuren durchzuführen vermag. Bei Betrachtung der Aminosäure-abbauenden Enzyme aus Tabelle 11 fällt auf, dass viele dieser Enzyme nicht in *C. perfringens* und *C. acetobutylicum* sowie anderen Clostridien vorkommen. *C. tetani* scheint also gegenüber diesen Clostridien erweiterte Fähigkeiten bezüglich der Vergärung von Aminosäuren zu besitzen. So z. B. lassen sich die Gene (*mutE*, *mutL*, *mutS*; CTC2565-2568) des Coenzym B12-abhängigen Enzyms Glutamat-Mutase nicht in den Genomen von *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. difficile* und *C. acetobutylicum* finden. Sie existieren aber z. B. in den Genomen von *C. cochlearium* und *C. tetanomorphum* – mit einer 92-94%igen Identität der katalytischen Untereinheit MutE zum Protein aus *C. tetani* (LEUTBECHER et al., 1992).

Erwähnt werden sollte an dieser Stelle auch, dass *C. tetani* weit weniger anabolische Wege der Aminosäure-Biosynthese als *C. acetobutylicum* zur Verfügung stehen.

Tabelle 11: In *C. tetani* identifizierte Enzyme zur Einleitung des Aminosäure-abbaus

Aminosäure	Enzym (ORF-Name)	Reaktion	Kommentar *
Alanin	Alanin-Aminotransferase (CTC1359, CTC1738)	D-Alanin + 2-Oxoglutarat = Pyruvat + D-Glutamat	katalysiert auch die Umsetzung der D-Isomere von Asparagin, Aspartat, Glutamat, Leucin, Aminobutyrat und Norvalin
	Alanin-Dehydrogenase (CTC892)	L-Alanin + H ₂ O + NAD ⁺ = Pyruvat + NH ₃ + NADH+H ⁺	
Arginin	Arginase (CTC1763)	L-Arginin + H ₂ O = L-Ornithin + Harnstoff	Wichtiges Enzym des Harnstoffzyklus; nicht in <i>Cb</i> , <i>Cd</i> und <i>Cp</i> , aber in <i>Ca</i>
	Arginin-Decarboxylase (CTC219, CTC2271)	L-Arginin = Agmatin + CO ₂	
Asparagin	Asparaginase (CTC1877)	L-Asparagin + H ₂ O = L-Aspartat + NH ₃	nicht in <i>Ca</i> , <i>Cb</i> und <i>Cd</i> , aber in <i>Cp</i>
Aspartat	Aspartase (CTC824)	L-Aspartat = Fumarat + NH ₃	nicht in <i>Cp</i> , aber in <i>Ca</i>
	Aspartat-Aminotransferase (CTC825/CTC1294/CTC1309)	L-Aspartat + 2-Oxoglutarat = Oxaloacetat + L-Glutamat	
Cystein	Cystathionin-β-Lyase (CTC2530)	Cystathionin + H ₂ O = L-Homocystein + NH ₃ + Pyruvat	

Glutamin	Glutaminase (CTC566)	$\text{L-Glutamin} + \text{H}_2\text{O} = \text{L-Glutamat} + \text{NH}_3$	in <i>Cp</i> , aber nicht in <i>Ca</i>
Glutamat	Glutamat-Mutase (CTC2565-2568)	$\text{L-Glutamat} = \text{Threo-3-Methylaspartat}$	B12-abhängig; nicht in <i>Ca</i> , <i>Cb</i> , <i>Cd</i> und <i>Cp</i>
	Glutamat-Dehydrogenase (CTC1295)	$\text{L-Glutamat} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+ = \text{2-Oxoglutarat} + \text{NH}_3 + \text{NADH}$	
Histidin	Histidin-Decarboxylase (CTC1478)	$\text{L-Histidin} = \text{Histamin} + \text{CO}_2$	nicht in <i>Ca</i> , <i>Cb</i> , <i>Cd</i> und <i>Cp</i>
	Histidin-Ammonium-Lyase (Histidase) (CTC2318)	$\text{L-Histidin} = \text{Urocanat} + \text{NH}_3$	nicht in <i>Ca</i> und <i>Cp</i>
Ile, Leu	diverse Aminotransferasen		
Lysin	L-Lysin-2,3-Aminomutase (CTC890)	$\text{L-Lysin} = \text{3,6-Diaminohexanoat} (\beta\text{-Lysin})$	nicht in <i>Ca</i> und <i>Cp</i> ; die weiteren Enzyme dieses Abbauweges scheinen zu fehlen
	Lysin-Decarboxylase (CTC219, CTC2271)	$\text{L-Lysin} = \text{Cadaverin} + \text{CO}_2$	
Serin	Serin-Pyruvat-Aminotransferase (CTC695)	$\text{L-Serin} + \text{Pyruvat} = \text{3-Hydroxypyruvat} + \text{L-Alanin}$	katalysiert wahrscheinlich auch: $\text{L-Alanin} + \text{Glyoxylat} = \text{Pyruvat} + \text{Glycin}$
	Serin/Threonin-Dehydratase (CTC1981-1982)	$\text{L-Serin} + \text{H}_2\text{O} = \text{Pyruvat} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$	nicht in <i>Ca</i> , aber in <i>Cp</i> ; deaminiert auch Threonin
Threonin	L-allo-Threonin-Aldolase (CTC1037)	$\text{L-allo-Threonin} = \text{Glycin} + \text{Acetaldehyd}$	nicht in <i>Ca</i> und <i>Cp</i>
	Serin/Threonin-Dehydratase (CTC1981-1982, CTC71, CTC2624)	$\text{L-Threonin} = \text{2-Oxobutanoat} + \text{NH}_3$	
Tryptophan	Tryptophanase (=L-Tryptophan:Indol-Lyase) (CTC1509)	$\text{L-Tryptophan} + \text{H}_2\text{O} = \text{Indol} + \text{Pyruvat} + \text{NH}_3$	nicht in <i>Ca</i> und <i>Cp</i>
Tyrosin	Tyrosin:Phenol-Lyase (CTC818)	$\text{L-Tyrosin} + \text{H}_2\text{O} = \text{Phenol} + \text{Pyruvat} + \text{NH}_3$	nicht in <i>Ca</i> und <i>Cp</i>

* Aufgrund der Homologien einiger dieser Proteine sind multiple Spezifitäten möglich. Auch können einige Enzyme im entsprechenden Biosynthese-Weg eine Rolle spielen. Abkürzungen: *Ca*, *C. acetobutylicum*; *Cb*, *C. botulinum*; *Cd*, *C. difficile*; *Cp*, *C. perfringens*.

3.4.6.3 Verwertung von Lipiden

Zusätzlich können vermutlich weitere Substrate umgesetzt werden. Der Abbau von Lipiden und Phospholipiden wird durch (Phospho-)Lipasen eingeleitet; mehrere Gene für solche Enzyme sind im Genom von *C. tetani* vorhanden: CTC812, CTC947, CTC990, CTC1503 und CTC1505. Dabei entstehen zum einen Fettsäuren. Diese können über die β -Oxidation abgebaut werden, wobei letztendlich Acetyl-CoA entsteht. Enzyme der β -Oxidation wie Acyl-CoA-Dehydrogenase, Enoyl-CoA-Hydratase (synonym: Crotonase, 3-Hydroxyacyl-CoA-Hydrolyase), L-3-

Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und β -Ketothiolase sind offensichtlich in *C. tetani* vorhanden (s. 3.4.7.2). Zum anderen entsteht ein Alkohol, i. d. R. Glycerol. Dieses kann über die Glycerol-Kinase (CTC1758, CTC2462) und die Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (CTC1034, CTC1139, CTC1808, CTC2436) in Dihydroxyacetonphosphat umgesetzt werden, welches dann mit Enzymen der Glykolyse weiterverwertet wird. Das letztere Enzym, die Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, kann auch für die Verwertung des beim Abbau bestimmter Phospholipide anfallenden Glycerol-3-Phosphats eingesetzt werden. Neben Glycerin sind auch andere Alkohole wie Ethanolamin, Inositol oder Serin in Phospholipiden vorhanden. Auch diese kann *C. tetani* offensichtlich als Substrate nutzen. So findet man einen Cluster aus 17 Genen, deren Proteine den Cobalamin-abhängigen Abbau von Ethanolamin katalysieren (CTC2163-CTC2181). Dieses System gibt es z. B. auch in pathogenen Organismen der Gattung *Salmonella* (KOFOID et al., 1999). Des weiteren gibt es sieben Gene (CTC508-514), die für die Aufnahme und den Abbau des Alkohols (Myo-)Inositol kodieren, einem Bestandteil der Inositolphosphatide, die sowohl in eukaryotischen Zellmembranen vorkommen als auch als intrazelluläre Signalmoleküle (Inositoltriphosphat) eine Rolle spielen.

3.4.7 Metabolismus 2: Verstoffwechselung von Pyruvat

3.4.7.1 Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase

Die Glykolyse wie der Abbau vieler Aminosäuren (s. Tabelle 11) führt zur Bildung von Pyruvat. Dieses kann mit der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (CTC2525-2528) zum Acetyl-CoA umgesetzt werden. Die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente können auf Ferredoxin übertragen und anschließend mittels einer Hydrogenase-katalysierten Reaktion (CTC184, CTC2417) als H_2 freigesetzt werden. Daneben kann Pyruvat mittels der Pyruvat:Formiat-Lyase (CTC936) zu Formiat und Acetyl-CoA und mittels der Lactat-Dehydrogenase (CTC1998) zu Lactat umgesetzt werden.

3.4.7.2 Der Butyrat-Weg

Acetyl-CoA kann nicht mittels des Tricarbonsäurezyklus (TCC) zu CO₂ oxidiert werden; sämtliche Gene des TCC fehlen in *C. tetani*. Stattdessen wird Acetyl-CoA auf mehreren Wegen metabolisiert. Es kann mittels der Phosphotransacetylase (CTC1239) und der Acetat-Kinase (CTC1240) zu Acetat umgesetzt oder über die Enzyme des Butyrat-Weges zu Butyrat oder Butanol reduziert werden. Dazu werden einleitend mittels einer Thiolase (CTC312) zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA kondensiert. Anschließend erfolgt die Umsetzung zu Butyryl-CoA über Reaktionen, die von einer β -Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase, einer Crotonase und einer Butyryl-CoA-Dehydrogenase katalysiert werden. Das letztere benötigt die Elektronentransfer-Flavoproteine EtfA und EtfB, welche die zur Reduktion von Crotonyl-CoA benötigten Elektronen bereitstellen (BOYNTON et al., 1996). Das Gencluster des Butyrat-Weges ist in Abbildung 23 gezeigt; eine identische Genordnung kann auch in *C. acetobutylicum* und *C. perfringens* gefunden werden, wobei sich allerdings die Gene unterscheiden, die benachbart zu dem Cluster liegen. In *C. botulinum* und *C. difficile* existiert eine leicht abweichende Genordnung. Zusätzlich zu dem Cluster des Butyrat-Weges gibt es in *C. tetani* offenbar drei partielle Kopien. Wahrscheinlich ist, dass die Gene von einer oder mehrerer dieser partiellen Kopien in der β -Oxidation von Fettsäuren involviert sind (s. 3.4.6.4). So sind die Enzyme Acyl-CoA-Dehydrogenase, Enoyl-CoA-Hydratase, L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und β -Ketothiolase homolog zu den Proteinen des Butyrat-Weges (YOUNGLESon et al., 1989). Benachbart zu diesen drei Clustern in *C. tetani* finden sich sowohl Gene, deren Funktionen in einem stoffwechselphysiologischen Zusammenhang zum Butyrat-Weg bzw. zur β -Oxidation von Fettsäuren stehen (CTC478, CTC482, CTC708, CTC2085, CTC2086, CTC2422) als auch Gene für mögliche Elektronentransferproteine (CTC2424, CTC2425, CTC2421, CTC2079). Analog zum Butyrat-Weg sind auch bei der β -Oxidation von Fettsäuren Elektronentransferproteine involviert: in vielen Organismen werden die bei der Reduktion der FAD-Gruppe der Acyl-CoA-Dehydrogenase anfallenden Elektronen über Etf-Proteine auf Ubichinon übertragen (LEHMAN & THORPE, 1992). Es bleibt zu klären, welchen Akzeptor *C. tetani*, der offensichtlich nicht über Ubichinon verfügt, für die anfallenden Reduktionsäquivalente nutzt.

CTC482: 4-Hydroxybutyrat-Coenzym A-Transferase;
 CTC707: Transkriptionsregulator;
 CTC708/CTC478: Acetyl-CoA:Acetoacetyl-CoA-Transferase oder Propionat-CoA-Transferase;
 CTC709/CTC476: Permease (Butyrat oder Propionat);
 CTC2079: hypothetisches Elektronentransferprotein;
 CTC2080: N-Acetyltransferase;
 CTC2085/CTC2086: Acyl-CoA-Hydrolase;
 CTC2421: mögliches Elektronentransfer-Protein;
 CTC2422: Butanol-Dehydrogenase (NADPH-abhängig);
 CTC2428: DNA-bindendes Protein

Abb. 23: Gencluster des Butyrat-Weges in *C. tetani* und *C. acetobutylicum*

Zusätzlich sind ähnliche Cluster in *C. tetani* und interessante ORFs gezeigt, die direkt benachbart zu den Genclustern liegen. *crt*: Crotonase bzw. Enoyl-CoA-Hydratase (lila); *bcd*: Butyryl-CoA-Dehydrogenase bzw. Acyl-CoA-Dehydrogenase (grün); *hbd*: β -Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase bzw. 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (blau); *etf*, Elektronentransfer-Flavoprotein (gelb/rot); schwarz: diverse Funktionen.

3.4.8 Bioenergetik 1: Substratkettenphosphorylierung

Zur Energiegewinnung nutzt *C. tetani* die Substratkettenphosphorylierung. Das geschieht zum einen in zwei glykolytischen Reaktionen, die durch die Enzyme Phosphoglycerat-Kinase und Pyruvat-Kinase katalysiert werden (Tabelle 12). Des weiteren wird ATP bei der Umsetzung des aus der Glykolyse oder aus der Verstoffwechselung von Aminosäuren entstehenden Pyruvats zum Acetat oder Butyrat mittels der Acetat-Kinase- bzw. der Butyrat-Kinase-Reaktion gebildet. Die in Tabelle 12 erwähnte Pyruvat-Phosphat-Dikinase - ein hoch konserviertes Protein, das sogar zu homologen Proteinen aus Eukaryonten wie *Zea mays* eine Identität von 56% zeigt - ist in *C. symbiosum* gut untersucht (MCGUIRE et al., 1998). Es stellte sich heraus, dass das Enzym unter normalen Bedingungen in Richtung der ATP-Synthese arbeitet.

Tabelle 12: Enzyme der Substratkettenphosphorylierung in *C. tetani*

ORF-Name	Enzym	Reaktion
CTC0379	Phosphoglycerat-Kinase	1,3-Bisphosphoglycerat → 3-Phosphoglycerat
CTC2489	Pyruvat-Kinase	Phosphoenolpyruvat → Pyruvat
CTC1240	Acetat-Kinase	Acetylphosphat → Acetat
CTC2545	Butyrat-Kinase	Butyrylphosphat → Butyrat
CTC1761, CTC1762	Dihydroxyaceton-Kinase	Dihydroxyacetonphosphat → Dihydroxyaceton
CTC2524	Carbamat-Kinase	Carbamoyl-Phosphat = CO ₂ +NH ₃
CTC2014	Pyruvat-Phosphat-Dikinase	Phosphoenolpyruvat+Diphosphat = Pyruvat+Phosphat

3.4.9 Bioenergetik 2: Membrangebundene Prozesse

Energiekonservierende membrangebundene Elektronentransportsysteme sind in *C. tetani* und anderen Clostridien bisher kaum untersucht. Da der Organismus nur anaerob wächst, ist die Verwendung einer typischen aeroben Atmungskette und die damit gekoppelte ATP-Synthese mittels oxidativer Phosphorylierung nicht möglich. Entsprechende Gene sind nicht vorhanden. Auch gibt die Genomsequenz wenig Hinweise auf das Vorhandensein von Cytochromen oder Chinonen. Es konnten lediglich eine periplasmatische Flavocytochrom-haltige Fumarat-Reduktase und eine Cytochrom-haltige Häm-Oxygenase ausgemacht werden (s. 3.4.10). Es wurde auch nach charakteristischen Motiven für Elektronentransportproteine gesucht, vor allem nach Eisen-Schwefel-Clustern (FeS-Cluster) sowie nach FMN- und FAD-Bindemotiven. So konnten 21 Proteine identifiziert werden, die das charakteristische Motiv für das [4Fe4S]-Cluster tragen (CXXCXXCXXXC). Zusätzlich konnten durch einen BLAST-Abgleich mit einer typischen Flavodoxin-Domäne (PFAM00258) mindestens 26 Flavoproteine identifiziert werden. Nachfolgend werden solche in *C. tetani* gefundenen Systeme vorgestellt, die über diese für Elektronentransportprozesse typischen Motive verfügen. Insbesondere soll dabei auf eine mögliche bioenergetische Involvierung dieser Systeme eingegangen werden.

3.4.9.1 Das Nqr/Rnf-System

Bei näherer Betrachtung fiel die Abundanz von FeS-Zentren und Flavodoxin-Domänen in den Proteinen CTC1019 und CTC1024 auf. Die entsprechenden Gene scheinen einem möglichen Operon aus sechs Genen anzugehören (Abb. 24), deren Proteine nicht nur FeS-Cluster und FMN-Bindestellen beinhalten, sondern auch multiple transmembrane Helices ausbilden, was auf ihre Lokalisation in der Cytoplasmamembran hinweist. Das System zeigt zudem starke Ähnlichkeiten zu Nqr (NADH:ubiquinone oxidoreductase)-Systemen aus aeroben pathogenen Bakterien wie *V. cholerae*, *S. typhimurium*, *Y. pestis* und *Haemophilus influenzae* (HAYASHI et al., 1996; HÄSE et al., 2001). Es konnte auch in den Genomsequenzen von *C. perfringens*, *C. botulinum* und *C. difficile*, nicht aber in der von *C. acetobutylicum* identifiziert werden. In einigen der genannten aeroben Organismen konnte gezeigt werden, dass das System als Natriumionen (Na^+)-translozierende NADH-Dehydrogenase fungiert, welche also die membranintegrale Übertragung der Elektronen vom $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf Ubichinon mit der Ausschleusung von Na^+ -Ionen koppelt (STEUBER, 2001; BARQUERA et al., 2002). Zusätzlich liegt eine Homologie zum Rnf (*Rhodobacter* specific nitrogen fixation)-System aus *Rhodobacter capsulatus* vor. In diesem Organismus ist das System an der Übertragung der Elektronen von einem unbekannten Donor über Ferredoxin I auf die Nitrogenase beteiligt (SCHMEHL et al., 1993; JOUANNEAU et al., 1998).

Wie kann nun diese System im Metabolismus von *C. tetani* eingebunden sein – unter Berücksichtigung, dass in *C. tetani* weder Ubichinon noch Nitrogenase-Gene vorkommen ? In Kapitel 4.1.4.1 soll ein Modell entwickelt werden, das dem Umstand Rechnung trägt, dass *C. tetani* seine Energie vor allem durch die Vergärung von Aminosäuren gewinnt.

Abb. 24: Charakteristika der Untereinheiten des membrangebundenen Elektronentransportsystems Nqr/Rnf aus *C. tetani*

Die erste Zeile der Tabelle gibt die Proteinennamen an, die zweite Zeile gibt Informationen über die Hydrophobizität bzw. die mögliche Lokalisation der Proteine, die dritte Zeile listet prosthetische Gruppen der Proteine auf und die vierte Zeile gibt Auskunft darüber, ob die Proteine N-terminal ein Signalpeptid tragen. Abkürzung: TM, transmembrane Helices.

3.4.9.2 V-Typ-ATPasen

Neben dem Nqr/Rnf-System, das die Möglichkeit eröffnet, einen eingeschränkten membrangebundenen Elektronentransport durchzuführen, der mit der Ausbildung eines Na⁺-Gradienten über der Cytoplasmamembran gekoppelt ist, gibt es weitere Systeme in *C. tetani*, die an der Errichtung eines Ionen-Gradienten über der Membran beteiligt sind. Das Genom beinhaltet die Gene einer V(vakuolär)-Typ ATPase, die neun Proteine umfasst (CTC0993-CTC1001; Abb. 25). Diese ATPase zeigt starke Ähnlichkeiten zu gut untersuchten Systemen aus *C. fervidus* und *Enterococcus hirae*, welche primäre Na⁺-Pumpen darstellen: unter ATP-Hydrolyse werden Na⁺-Ionen ins Periplasma befördert (HÖNER ZU BENTRUP et al., 1997, MURATA et al., 1997). Da dieser Prozess sehr energieaufwendig ist, wird das System in *E. hirae* stark reguliert. Die Expression des entsprechenden Operons findet nur bei extremen Bedingungen wie hoher pH-Wert oder hohe intrazelluläre Na⁺-Konzentration statt (IKEGAMI et al., 1999). Interessanterweise fehlen im *C. tetani*-Genom im Gegensatz zu den Genomen von *C. perfringens* und *C. acetobutylicum* die Gene für eine F₀F₁-Typ-ATPase. *C. perfringens* hat beide ATPase-Systeme, während *C. acetobutylicum* nur die F₀F₁-Typ-ATPase besitzt.

Im Gegensatz zu allen anderen bisher sequenzierten Clostridien (*C. acetobutylicum*, *C. perfringens*, *C. difficile* und *C. botulinum*) besitzt *C. tetani* noch ein zusätzliches Gencluster (CTC2326-2332), das Ähnlichkeiten zum V-Typ-ATPase-Gencluster zeigt. Dieses Cluster ist allerdings anders zusammengesetzt, wie aus Abbildung 25 ersichtlich wird. Auch zeigt es andere Homologien: die höchsten Treffer wurden zu Proteinen aus *Petrotoga miotherma* und aus Archaeen wie *Pyrococcus furiosus* und *Methanobacterium thermoautotrophicum* erhalten. Die in diesen Organismen vorhandenen ähnlichen Systemen stimmen auch in der Genordnung mit dem unbekannten System aus *C. tetani* überein. Es bleibt zu ermitteln, welche Funktion diese alternative V-Typ-ATPase in *C. tetani* ausübt.

Abb. 25: Die Gencluster der V-Typ-ATPasen aus *C. tetani* im Vergleich zum Cluster aus *Enterococcus hirae*

Zwischen CTC2329 und CTC2330 ist ‚manuell‘ ein weiterer ORF identifiziert worden, der Homologien sowohl zur F- als auch zur G-Untereinheit der V-Typ-ATPase aus *Enterococcus hirae* zeigt.

3.4.9.3 Das NatAB-System

Es gibt noch ein weiteres Na^+ -Ionen-translozierendes System in *C. tetani*: das NatAB-System (CTC1485/1486), welches einen ABC-Transporter darstellt (CHENG et al., 1997). Dieses System hat wahrscheinlich vorwiegend - oder sogar ausschließlich - die Funktion, eine zu hohe intrazelluläre Na^+ -Konzentration, die toxisch wirken könnte, zu verhindern.

3.4.9.4 V-Typ- H^+ -Pyrophosphatase

C. tetani besitzt auch die Möglichkeit der Errichtung eines Protonengradienten über der Cytoplasmamembran: das Genom enthält das Gen (CTC383) einer stark hydrophoben V(vakuolär)-Typ- H^+ -Pyrophosphatase, ein membrangebundenes Protein, welches die Spaltung von anorganischem Diphosphat zu Monophosphat mit der Translokation von Protonen koppelt. Ähnlichkeiten - eine ca. 45%ige Identität - bestehen in erster Linie zu Systemen aus Archaeen der Gattung *Methanosarcina*. Andere Clostridien-Genome besitzen dieses Gen nicht. Zusätzlich existiert auch eine lösliche anorganische Pyrophosphatase (CTC1649), die Mangan-abhängig ist.

3.4.9.5 H^+/Na^+ -Antiporter

Da es also sowohl primäre Natriumionen- wie Protonen-Pumpen gibt, ist das Vorkommen von H^+/Na^+ -Antiportern in *C. tetani* nicht verwunderlich: mindestens acht aus einer Untereinheit bestehende Antiporter konnten identifiziert werden, die Ähnlichkeiten zur Nha-Antiporter-Familie aus *E. coli* zeigten, welche einen sekundären Antiport durchführen, also einer, der durch einen elektrochemischen Protonengradienten energetisiert wird (CTC567, CTC901, CTC1183, CTC1423, CTC1853, CTC2161, CTC2520, CTC2529).

3.4.9.6 Das Mrp-ähnliche System

Zusätzlich kann ein 7,2 kb großes Gencluster aus 10 Genen identifiziert werden (CTC1337-1342), das nicht in anderen Clostridien auftritt. Einige daraus abgeleitete Proteine zeigen Homologien zu H^+/Na^+ -Antiportern. Bei näherer Betrachtung fällt die deutliche Ähnlichkeit - sowohl der einzelnen Proteine als auch der Genordnung des Clusters - zu bisher nicht charakterisierten Systemen aus Archaeen wie *Halobacterium* sp. und *Pyrococcus abyssi* auf (Abb. 26). Eine gewisse Ähnlichkeit - trotz unterschiedlicher Genordnung - besteht auch zum Mrp (multiple Resistenz und pH-Adaption)-System aus *B. subtilis* sowie zu ähnlichen Systemen in den Organismen *Sinorhizobium meliloti* und *Staphylococcus aureus* (ITO et al., 2001; HIRAMATSU et al., 1998). Dieses besteht aus sieben stark hydrophoben Untereinheiten, welche für die Resistenzausbildung gegenüber hohen Na^+ - und K^+ -

Konzentrationen sowie für eine pH-Regulation verantwortlich sein sollen (ITO et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass der Mrp-Komplex als H^+/Na^+ -Antiporter arbeitet, der aber möglicherweise nicht nur einen sekundären Antiport katalysieren sondern auch als primäre Na^+ -Pumpe fungieren kann, wobei die Hypothese aufgestellt wurde, dass womöglich ein durch den Komplex katalysierter Elektronentransport mit der Na^+ -Translokation gekoppelt ist (ITO et al., 2001). Die 10 Proteine von *C. tetani* zeigen alle eine starke Hydrophobizität (Abb. 26). Auffällig ist die Homologie mehrerer Untereinheiten des potentiellen H^+/Na^+ -Antiporters zu den hydrophoben Komponenten NuoL und NuoN des Komplex I der Atmungskette aus *E. coli*. Diese könnten bei der Na^+ -Translokation oder beim H^+ -Einstrom eine Rolle spielen. Ob sie darüber hinaus auch in membrangebundene Transportprozesse involviert sind, bleibt zu ermitteln, ist aber aufgrund des Fehlens von FeS-Clustern eher unwahrscheinlich.

Abb. 26: Das Mrp-Operon aus *B. subtilis* und verwandte Gencluster in *Halobacterium sp.* und *C. tetani*

Die untere Tabelle gibt die Homologons der Genprodukte aus *C. tetani* zum Mrp-System an (erste Zeile), listet die Anzahl der transmembranen Helices (TM) der *C. tetani*-Proteine auf (zweite Zeile) und gibt über Proteingröße und weitere auffällige Homologien Auskunft (dritte Zeile). Einige Gene in *C. tetani* wurden durch GLIMMER nicht identifiziert und sind ‚manuell‘ zugefügt worden. Abkürzungen: Nuo, NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase; FHL3, Formiat-Hydrogenlyase-Untereinheit 3.

3.4.9.7 Zwischenfazit

Das Genom von *C. tetani* kodiert sicherlich noch weitere (membrangebundene) Systeme, die von metabolischem und bioenergetischem Interesse sind. Leider ist wenig über Gärungsbilanzen bestimmter Substrate und daraus resultierende Energieausbeuten bekannt. Sicher scheint, dass *C. tetani* einen ausgeprägten Gärungsstoffwechsel betreibt. Allerdings schließt das nicht - wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt - das Vorkommen membrangebundener Prozesse mit bioenergetischer Relevanz aus. Im nachfolgenden Kapitel sollen abschließend zwei weitere Systeme vorgestellt werden, die in anderen sequenzierten Clostridien nicht vorhanden sind.

3.4.10 Weitere membranassoziierte Komplexe

3.4.10.1 Fumarat-Reduktasen

Bei der Suche nach membrangebundenen Systemen, die eventuell einen Elektronentransport katalysieren können, wurde auch nach solchen Enzymen in *C. tetani* Ausschau gehalten, die im Rahmen der von vielen Anaerobiern ausgeübten „anaeroben Atmung“ eine Rolle spielen, was die Verwendung von terminalen Elektronenakzeptoren wie z. B. Nitrat, Sulfat oder Fumarat im Zuge eines membrangebundenen Elektronentransports meint. Erwartungsgemäß war diese Suche im Genom von *C. tetani* wenig erfolgreich. Stattdessen konnten einige Enzyme des assimilatorischen Metabolismus gefunden werden wie eine Nitrit-Reduktase (CTC2521) oder eine aus drei Proteinen bestehende anaerobe Sulfid-Reduktase (CTC2484-2486). Interessant ist aber das Auftreten einer Fumarat-Reduktase in vier unterschiedlichen Kopien (CTC811, CTC1488, CTC1522 und CTC1847), wobei die Kopien untereinander eine 45%ige (CTC1522 mit CTC1847 über 468 As) bis 58%ige (CTC811 mit CTC1488 über 578 As) Proteinidentität aufweisen. In allen anderen bisher sequenzierten Clostridien und Bakterien der Gattung *Bacillus* sind Gene für solch eine Fumarat-Reduktase nicht vorhanden. Alle vier Genprodukte aus *C. tetani* zeigen schwache Homologien zur katalytischen Untereinheit der membrangebundenen Fumarat-Reduktase aus *E. coli* und anderen Organismen. Demgegenüber weisen die vier *C. tetani*-Proteine aber starke Ähnlichkeiten (42-47%

Proteinidentität über ~ 510 As) zu einem löslichen Cytochrom c-haltigen Protein auf, welches in Organismen der Gattung *Shewanella* vorkommt. Es konnte in *Shewanella putrefaciens* gezeigt werden, dass es sich dabei um ein periplasmatisch lokalisiertes Flavocytochrom-Protein handelt, das eine Fumarat-Reduktase-Aktivität aufweist und deshalb auch Flavocytochrom c-Fumarat-Reduktase genannt wird (PEALING et al., 1992). Das Protein ist in *Shewanella putrefaciens* unerlässlich für die Verwendung von Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor (GORDON et al., 1998; LEYS et al., 1999). Wie das Protein aus *Shewanella* tragen auch alle vier *C. tetani*-Proteine eine Signalpeptidsequenz, wohingegen die Proteine nur eine kleine schwach hydrophobe Region enthalten. Deshalb kann man davon ausgehen, dass auch *C. tetani* über eine bzw. mehrere periplasmatische Fumarat-Reduktasen verfügt, wodurch Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor genutzt werden kann. In *C. formicoaceticum* wurde zudem eine hohe Fumarat-Reduktase-Aktivität nachgewiesen, die auf ein membranperipheres Enzym zurückzuführen sein soll (DORN et al., 1978). Unbekannt bleibt die Natur des direkten Elektronendonors sowie der Weg, über den die Elektronen an die Außenseite der Cytoplasmamembran gelangen. In *Shewanella oneidensis* wurde CymA, ein membranassoziiertes c-Typ-Cytochrom, als Elektronendonor der Fumarat-Reduktase identifiziert (SCHWALB et al., 2002). Ein CymA-Homologon ist im Genom von *C. tetani* nicht auffindbar, so dass es hier einen anderen Elektronendonor geben muss. Die mögliche Einbindung der Fumarat-Reduktasen in den Stoffwechsel von *C. tetani* wird in Kapitel 4.2.2 diskutiert.

3.4.10.2 CO-Dehydrogenase-System und Häm-Oxygenase

Als letztes soll ein weiteres System beschrieben werden, das lediglich in *C. tetani* und *C. botulinum* nicht aber in anderen sequenzierten Clostridien identifiziert werden konnte. Es handelt sich dabei um ein Gencluster aus drei ORFs (CTC2474-CTC2477), deren Proteine zwei [2Fe2S]-Cluster, ein FAD, sowie eine Molybdän-Bindestelle beinhalten. Diese Proteine zeigen hohe Homologien zu Untereinheiten einer Molybdän-abhängigen CO-Dehydrogenase. Dieser membranassoziierte Enzymkomplex, in *Oligotropha carboxidovorans* ein Selenocystein-haltiges Molybdo-Eisen-Schwefel-Flavoproteinkomplex, katalysiert die Oxidation von CO zu CO₂, wobei ein Elektronenakzeptor reduziert wird (SCHUBEL et al., 1995;

DOBBEK et al., 1999). Die Proteinsequenz der drei ORFs in *C. tetani* zeigt aber auch hohe Homologien zu anderen Molybdän-abhängigen Hydroxylasen wie zur 4-Hydroxybenzoyl-CoA-Reduktase, welche ebenfalls aus drei Untereinheiten besteht und die irreversible Dehydroxylierung von 4-Hydroxybenzoyl-CoA zu Benzoyl-CoA durchführt, ein wichtiger Schritt in der anaeroben Degradation von 4-Hydroxybenzoat. Um erste Hinweise bezüglich der Funktion dieses Komplexes in *C. tetani* zu gewinnen, wurde die genetische Umgebung betrachtet. Direkt stromaufwärts zu dem Gencluster befindet sich ein ORF, der für eine Cytochrom-haltige Häm-Oxygenase kodiert. Solch ein Enzym kommt in einigen aeroben pathogenen Organismen wie *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Corynebacterium diphtheriae* vor und katalysiert den ersten Schritt des Abbaus der Häm-Gruppe nach folgender Gleichung (RATLIFF et al., 2001; CHU et al., 1999):

In dieser Reaktion entsteht also neben dem für die *C. tetani*-Zelle wichtigen Fe^{3+} auch Kohlenmonoxid. Dieses könnte nun direkt anschließend durch die CO-Dehydrogenase zu CO_2 oxidiert werden, wobei die anfallenden Elektronen auf einen Akzeptor übertragen werden. Ob die Häm-Oxygenase-Reaktion nach obiger Formel in *C. tetani* ablaufen kann, ist allerdings fraglich. Schließlich wird dazu Sauerstoff benötigt, was sich mit dem anaeroben Metabolismus von *C. tetani* nicht vereinbaren lässt. Vorstellbar wäre aber, dass die Häm-Oxygenase-Reaktion als eine Art Sauerstoff-Fänger dient. Zu bedenken ist, dass *C. tetani* zur erfolgreichen Kolonisierung der Wunde eines Säugetieres wahrscheinlich geringe Sauerstoff-Konzentrationen tolerieren muss.

Die genauere Betrachtung des Ergebnisses des BLAST-Abgleichs der Häm-Oxygenase-Sequenz aus *C. tetani* lässt aber noch eine andere Vermutung zu. Neben der höchsten Ähnlichkeit zu einer möglichen Häm-Oxygenase aus *C. perfringens* - in *C. botulinum*, *C. difficile* und *C. acetobutylicum* kommt sie nicht vor - zeigt die Sequenz vorwiegend Ähnlichkeiten zu Häm-Oxygenasen aus Eukaryoten, vor allem aus Algen wie *Porphyra purpurea* oder *Rhodella violacea*. Dort ist das Enzym im Chloroplasten-Genom kodiert und katalysiert eine Reaktion nach obiger Formel (RICHAUD & ZABULON, 1997). Es stellt ein Schlüssel-Enzym in der Synthese der Antennenpigmente des Photosynthese-Apparates dar, welche aus Biliverdin gebildet werden. Interessant ist nun das Vorkommen von blauen Gallenpigmenten (Bactobilinen) in *C. tetanomorphum* (BRUMM et al., 1983). Diese Bactobiline sind

Chromophore des Biliverdin-Typs, welche unter anaeroben Bedingungen produziert werden, wenn dem Medium die Tetrapyrrol-Vorstufe δ -Aminolevulinat oder Uroporphyrin I bzw. III zugesetzt wurde (CHEN & FRIEDMANN, 1993). Es wurde in *C. tetanomorphum* weiter beobachtet, dass das (damals unbekannte) Enzym, welches an der Bildung solcher Bactobiline beteiligt ist, obligat anaerobe Bedingungen benötigt - im Gegensatz zu den eukaryotischen Häm-Oxygenasen, welche zur Produktion von Gallenpigmenten Sauerstoff benötigen (CHEN & FRIEDMANN, 1993). Der Reaktionsmechanismus einer ‚anaeroben‘ Häm-Oxygenase kann durch die Verfügbarkeit seiner Sequenz in *C. tetani* nun im Detail untersucht werden. Unklar bleibt, welchen Nutzen *C. tetani* aus der Bildung solcher Pigmente ziehen könnte. Möglicherweise stellen diese lediglich ein Abfallprodukt bei der Verwertung von Häm dar. Es soll aber erwähnt werden, dass ähnliche Pigmente wie z. B. Bilirubin, welches aus Biliverdin gebildet wird, in Eukaryoten als Antioxidanzien wirken können. In der Abwehr schädigender Sauerstoffverbindungen (Peroxide, Radikale) hätte *C. tetani* sicherlich einen Nutzen, zumal solche Sauerstoffverbindungen auch als Teil der Immunantwort des Säugetierwirtes in entzündeten Regionen gebildet werden.

C. tetani scheint im übrigen alle Enzyme zu besitzen, welche die Umsetzung von δ -Aminolevulinat in Uroporphyrinogen III katalysieren können, einem Vorläufer-Molekül des Häms und Schlüssel-Molekül bei der Synthese des Cofaktors B12, dessen Synthese *C. tetani* offensichtlich betreiben kann (CTC726-CTC746): die δ -Aminolevulinat-Dehydrase (CTC729) kondensiert zwei Moleküle δ -Aminolevulinat zu Porphobilinogen, die Porphobilinogen-Deaminase kondensiert vier Moleküle Porphobilinogen zu einem linearen Tetrapyrrol-Molekül und die Uroporphyrinogen III-Synthase katalysiert die Cyclisierung des linearen Tetrapyrrol-Moleküls zum Uroporphyrinogen I oder III (CTC728).

3.4.11 Transportsysteme

Die Annotation ergab, dass auf dem Chromosom von *C. tetani* mindestens 167 Gene liegen, die für Transportproteine kodieren.

3.4.11.1 ABC-Transporter

Zuerst sollten daraus solche selektiert und analysiert werden, die zur ABC (ATP-bindende Cassette)-Transporter-Familie zu rechnen sind. Diese Familie und deren Eigenschaften sind bereits in Kapitel 3.2.7 vorgestellt worden. Um den Anteil von ABC-Transportern zu ermitteln, wurde ein BLAST-Abgleich mit der Consensus-Sequenz der ABC-Transporter-Domäne PFAM00005 sowie der ATPase-Domäne SMART00382 unternommen, welche Domänen eines typischen ABC-Transporters sind: 64 Proteine des Genoms zeigten signifikante Homologien zu der ABC-Transporter-Domäne und 77 Proteine beinhalteten eine ATPase-Domäne. Es zeigte sich bei fast allen der 64 potentiellen ABC-Transporter, dass das entsprechende Gen direkt benachbart zu einem oder mehreren Genen liegt, welche für stark hydrophobe Proteine kodieren; diese stellen ABC-Transporter-assoziierte Permeasen dar. Auch konnten in vielen Fällen unmittelbar benachbarte Gene für DNA-bindende Proteine entdeckt werden, die wahrscheinlich die Transkription der ABC-Transporter-Gene regulieren (vgl. 3.4.13). Nur in einigen Fällen war eine Charakterisierung der Substratspezifität auf der Grundlage der gefundenen Homologien möglich. So konnten ABC-Transporter für Eisen (CTC276-274, CTC1702-1701), Siderophore (CTC783-785, CTC962-960, CTC1197-1195, CTC1370-1372), Natrium (NatA), Kobalt (CTC751-754, CTC2574-2576), Zink (CTC2360-2362), Phosphat (CTC1132-1134), Glycin/Betain (CTC374-373, CTC2342-2340), Glutamin (CTC560-557), Ribose (CTC905-907, CTC2351-2347), Di- und Oligopeptide (CTC1400-1404, CTC1374-1380, CTC1900-1904) und für diverse Antibiotika (CTC625-627 für Subtilin, CTC1357-1358 und CTC1803-1802 für Bacitracin) identifiziert werden. Zusätzlich befanden sich unter den ABC-Transportern mehrere sogenannte Multidrug-Efflux-Systeme (CTC162, CTC425/426, CTC1199/1201, CTC1408/1410, CTC1811), die mehrere Antibiotika aus der Zelle transportieren können. Zur Analyse der restlichen Systeme mit unbekannter Substratspezifität wurden die entsprechenden Proteinsequenzen mit der Transporter-Datenbank von SAIER (<http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/>) abgeglichen (vgl. 3.2.7; SAIER, 1999). Es stellte sich dabei heraus, dass eine erstaunliche Anzahl der unbekannten Systeme aller Wahrscheinlichkeit nach Peptid- oder Protein-Transporter sind: mindestens zehn Transporter-Systeme (CTC394-397, CTC803-800, CTC920-918, CTC1419-1418, CTC1493-1492, CTC1821-1820, CTC1985-1986, CTC1987-

1988, CTC1916-1915 und CTC2098-2097) zeigten hohe Homologien zu Peptidtransportern wie dem Bacitracin-Exportsystem aus *Streptococcus mutans* oder dem Subtilin-Exportsystem aus *B. subtilis* (KLEIN & ENTIAN, 1994; TSUDA et al., 2002). Bestimmte Peptidtransporter können aber auch in Quorum-Sensing-Prozessen involviert sein. Posttranslational produzierte Peptid-Pheromone werden dabei durch solche ABC-Transporter exportiert. Die Peptide fungieren dann als Inputsignale für spezifische Sensor-Elemente von Zwei-Komponentensystemen (KLEEREBEZEM et al., 1997).

Mindestens sechs weitere Transporter (CTC240-241, CTC580, CTC588, CTC633-635, CTC1163, CTC2429-2430) wiesen Ähnlichkeiten zu Streptogramin-Exportern auf, welche Macrolide wie Erythromycin oder Pristinamycin aus der Zelle schleusen. Die Analyse der Transporter ohne ABC-Domäne ergab, dass viele dieser Proteine, wie oben erwähnt, hydrophobe ABC-Transporter-assoziierte Permeasen darstellen, die in direkter genetischer Nachbarschaft zu den entsprechenden ABC-Transportern lokalisiert sind.

3.4.11.2 Membranpotential-abhängige Transporter

Zusätzlich konnten eine Vielzahl Membranpotential-abhängiger Transporter erkannt werden, die meisten davon mit hohen Homologien zu Na^+ -abhängigen Aminosäure-Symportern: so kann *C. tetani* mindestens die folgenden Aminosäuren in die Zelle aufnehmen: Alanin, Glutamin, Glutamat, Histidin, Prolin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Serin. Auch wurden Na^+ -abhängige Symporter zur Aufnahme von Glucose und/oder Galactose (CTC1237) sowie zur Aufnahme von Myo-Inositol (CTC514) und Pantothenat (CTC928) gefunden. Zusätzlich ließen sich mindestens sechs Na^+ -abhängige Multidrug-Efflux-Pumpen (CTC419, CTC443, CTC603, CTC1362, CTC1799, CTC2405) identifizieren. Diese Vielzahl an Na^+ -abhängigen Systemen ist sehr auffällig und soll in Kapitel 4.1.4 diskutiert werden.

3.4.12 Systeme des Proteinexports und exportierte Proteine

Nur wenig ist über die Mechanismen der Proteinsekretion in Clostridien bekannt. Da die Proteinsekretion ein wichtiger Teil des pathogenen Phänotyps ist - schließlich sind viele Virulenzfaktoren Exoenzyme - soll an dieser Stelle der Versuch unternommen werden, die Genomsequenz und -annotation dahingehend zu durchsuchen, welche sekretorischen Systeme *C. tetani* benutzen kann. Hintergrund dieser Suche ist unter anderem, dass bisher nicht verstanden ist, ob und wie das Tetanus-Toxin in den extrazellulären Raum exportiert wird (MUKHERJEE et al., 2002).

Zuvor aber soll eine Identifikation und Klassifikation solcher *C. tetani*-Proteine unternommen werden, die über das Sec-System sekretiert werden, das unter den Prokaryoten am weitesten verbreitete System des Proteinexports (DRIESSEN et al., 1998). Proteine, die diesen sekretorischen Weg gehen, werden entweder in die Cytoplasmamembran inseriert oder aber ins Periplasma abgegeben. Zur Identifikation solcher Sec-abhängig exportierten Proteine wurde ausgenutzt, dass sie eine N-terminale Erkennungssequenz besitzen, das sogenannte Signalpeptid. Alle ORFs wurden auf das Vorhandensein einer typischen Signalpeptidsequenz mit einem Signalpeptid-Vorhersageprogramm überprüft (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). So konnten 419 Signalpeptid-tragende Proteine gefunden werden*. Unter den 419 Proteinen befinden sich mindestens 91 Transporter, darunter auch periplasmatische Substratbindepoteine. Weitere 107 sind entweder konservierte (64) oder hypothetische (52) Proteine unbekannter Funktion - die meisten davon ausgesprochen hydrophober Natur, was auf ihre Membranständigkeit hinweist. Dieser Befund verdeutlicht, dass allgemein viel weniger über membranständige als über cytoplasmatische Proteine bekannt ist. Des weiteren finden sich unter den 419 Proteinen über 28 S-Layer-Proteine, eine ganze Reihe von Virulenzfaktoren wie die Collagenase, Tetanolysin O oder die Fibronectin-Bindeproteine, 19 Zellzyklus- bzw. sporulationsrelevante Proteine, 17 extrazelluläre Peptidasen, 15 Chemotaxis-Proteine und mindestens 18 Sensor-Histidin-Kinasen. Auch einige metabolische Enzyme besitzen offenbar eine Signalpeptidsequenz, wie z. B. Fumarat-Reduktase, β -

* Vermutlich sind mehr Proteine mit typischer Signalpeptidsequenz vorhanden. Oftmals war der exakte Startpunkt eines Gens nicht eindeutig vorherzusagen, was Auswirkungen auf die Ähnlichkeitsberechnung zur Identifikation von Signalpeptiden in N-Termini von Proteinen hatte. Andererseits sind auch Falschpositive denkbar.

Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase, L-Lactat-Dehydrogenase und L-Serin-Dehydratase.

Aufgrund der erstaunlichen Anzahl gefundener Proteine mit Signalpeptiden scheint das Sec-System offensichtlich unter den sekretorischen Systemen in *C. tetani* eine dominante Rolle zu spielen. Es kommt in Gram-negativen wie in Gram-positiven Bakterien vor und ist hochkonserviert (DRIESSEN et al., 1998). In *E. coli* besteht es aus den Proteinen SecABDEFGY (Abb. 27).

Abb. 27: Das Sec-abhängige Protein-Sekretionssystem Gram-negativer Bakterien (Abbildung produziert von Fern Ness)
(<http://byron.biochem.ubc.ca/research2.sec2.htm>)

Auch im Genom von *C. tetani* lassen sich einige der bekannten Sec-Komponenten ausmachen: SecA (CTC327), ein hochkonserviertes Protein mit ATPase-Aktivität (75% Proteinidentität über 830 As zu SecA aus *C. acetobutylicum* und *C. perfringens*), SecD (CTC2205), SecE (CTC2615), SecF (CTC2203) und SecY (CTC2584) konnten identifiziert werden. Das Chaperon SecB und SecG, welches normalerweise Teil des membranintegralen Komplexes SecYEG ist, scheinen aber in *C. tetani* sowie den anderen Clostridien zu fehlen. Auch in anderen Gram-positiven Bakterien wie *B. subtilis* wurde diese Beobachtung gemacht und über die Existenz eines modifizierten Sec-Systems spekuliert (KUNST et al., 1997). Vermutlich können andere Proteine die Funktionen von SecBG übernehmen. Ein Homologon zu YajC (CTC2208) konnte gefunden werden, welches einen membranintegralen Komplex zusammen mit SecD und SecF bilden kann (NOUWEN & DRIESSEN,

2002). Das entsprechende Gen liegt mit den Genen von SecD und SecF in einem Cluster. Ein Protein (CTC0096), dessen Gen in unmittelbarer Nähe zum Replikationsursprung liegt, zeigt Homologie zu YidC aus *E. coli*, welches einen Komplex mit SecDF+YajC eingehen kann (NOUWEN & DRIESSEN, 2002). Des weiteren konnten zwei Proteine (CTC166 und CTC458) identifiziert werden, die ausschließlich in Clostridien vorkommen und Ähnlichkeiten zum C-Terminus von SecA zeigen.

Mindestens zwei Signal-Peptidasen konnten in der Genomsequenz gefunden werden (CTC1253, CTC1615). Eine der beiden ist in einem Gencluster kodiert, welches Gene für einen SRP(Signal Recognition Particle)-ähnlichen Weg der Proteinsekretion enthält, einem Proteintranslokationssystem, das vor allem in höheren Lebewesen vorkommt (LUTCKE, 1995; ZWIEB & SAMUELSSON, 2000). Ob das SRP-System in *C. tetani* unabhängig arbeitet oder aber mit dem Sec-System zusammenarbeitet, wie für Gram-positive-Bakterien vermutet wird, bleibt offen (VAN WELY et al., 2001). Das SRP-System besteht in *C. tetani* - sowie allen anderen bisher sequenzierten Organismen der *Bacillus/Clostridium*-Gruppe - aus dem SRP54-Homologen Ffh (CTC1249) und einer kleinen cytoplasmatischen RNA (7SL RNA, stromaufwärts von CTC75), die wahrscheinlich zusammen den SRP-Komplex bilden, welcher an die im Zuge der Translation am Ribosomen erscheinende Signalpeptidsequenz bindet. Der SRP-Rezeptor besteht u. a. aus der GTPase FtsY (CTC1246). Möglicherweise sind auch das Protein CTC1247 (,SRP-assoziiertes Protein') und die GTPase CTC1254 beteiligt. Eine GTPase spielt auch im eukaryotischen Pendant eine entscheidende Rolle. Der SRP-Rezeptor übernimmt die Annahme des Komplexes aus sekretorischem Protein plus SRP an der Cytoplasmamembran und katalysiert unter GTP-Hydrolyse die Abspaltung des SRP vom Komplex. Im Genom von *C. tetani* sind die Gene des SRP-Systems mit Genen geclustert, die möglicherweise am SRP-System beteiligt sind: neben der bereits erwähnten Signal-Peptidase (CTC1253) lassen sich eine Ribonuklease (CTC1255), ein GTP-bindendes Protein (CTC1254), ein 16S rRNA prozessierendes Protein (CTC1250), zwei ribosomale Proteine (L19P und S16P), eine tRNA(Guanin-N1)-Methyltransferase (CTC1251) und ein RNA-bindendes Protein ausmachen.

Im folgenden wurde nach weiteren Proteintranslokationssystemen gesucht. Es zeigte sich, dass die Gene des Sec-unabhängigen TAT (Twin Arginine Translocation)-Systems nicht in den betrachteten Clostridien-Genomen vorkommen.

Es konnten aber zwei Proteine (CTC1603, CTC1604 mit ATPase-Domäne) identifiziert werden, die sowohl Homologien zu den Gsp (General secretion pathway)-Proteinen E und F (synonym: EpsE und F), welche Teil eines bakteriellen Typ II-Sekretionssystems sind, als auch zu den Pilus-Assembly-Proteinen PilB und PilC zeigten. Das Typ II-Sekretionssystem kommt in vielen Gram-negativen Bakterien vor, wie in *E. coli* oder in *V. cholerae* (SANDKVIST, 2001). Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass einige bakterielle Toxine, wie z. B. das Cholera-Toxin, mittels des Typ II-Sekretionssystems exportiert werden, das in *V. cholerae* aus 12 Untereinheiten besteht, deren Gene geclustert vorkommen (Abb. 28; SANDKVIST et al., 1997). Deshalb wurde die genetischen Umgebung von CTC1603 und CTC1604 genauer analysiert. Erst durch einen Psi-BLAST, der auch schwache Homologien aufdeckt, konnten weitere Komponenten des Typ II-Sekretionssystems in *C. tetani* identifiziert werden, welche zuvor als hypothetisch annotiert wurden (Abb. 28). Ein ORF (CTC1600) zeigte dabei Homologien zu einer Prepilin-Peptidase. Nun konnte in *Legionella pneumophila* gezeigt werden, dass die Prepilin-Peptidase für die Protein-Sekretion mittels des Typ II-Systems benötigt wird (LILES et al., 1998). Eine Inaktivierung des entsprechenden Gens in diesem Organismus hatte nicht nur zur Folge, dass weniger Proteine sekretiert wurden; darüber hinaus ging das Ausschalten dieses Gens mit der Reduktion seiner Pathogenität einher. Insbesondere wurde festgestellt, dass eine bestimmte Zink-Metalloprotease nicht mehr sekretiert werden konnte (LILES et al., 1999). Inwieweit solch ein Typ II-ähnliches Sekretionssystem in *C. tetani* funktionsfähig ist, könnte auch im Hinblick auf die Erforschung des Exports des Tetanus-Toxins von Interesse sein.

Abb. 28: Vergleich des Genclusters für das Typ II-Sekretionssystem in

V. cholerae* mit einem ähnlichen Gencluster in *C. tetani

Die Farben spiegeln die Homologien zwischen *C. tetani* und *V. cholerae* wider. In grau: Proteine mit unbekannter Funktion, die nur in *C. tetani*, *C. acetobutylicum* und *C. botulinum* gefunden wurden.

3.4.13 Regulatorische Funktionen

C. tetani kommt normalerweise als harmloses Bakterium im Boden vor. Der Eintritt des Organismus über Wundinfektionen in den Säugetierwirt kann mit der Ausprägung eines pathogenen Phänotyps einhergehen. Solche Änderungen des Phänotyps werden i. d. R. auf genetischer Ebene reguliert. Daher sollen in diesem Abschnitt mögliche, aus der Genomsequenz abgeleitete Elemente des regulatorischen Netzwerks vorgestellt werden.

3.4.13.1 Transkriptionsregulatoren

Im Genom von *C. tetani* können mindestens 127 Proteine identifiziert werden, die zu Transkriptionsregulatoren homolog sind und über eine DNA-bindende Domäne verfügen. Viele der Gene dieser Transkriptionsregulatoren lassen sich in unmittelbarer genetischer Nähe zu Transport-Systemen ausmachen (CTC163, CTC277, CTC483, CTC527, CTC533, CTC913, CTC1361, CTC1391, CTC1411, etc.). Andere Gene für Transkriptionsregulatoren befinden sich in unmittelbarer Nähe von Operonen, die z. B. für den Fettsäure-Abbau (CTC126), die Glykolyse (CTC377), den Butyrat-Weg (CTC707), einige S-Layer Proteine (CTC762), die Flagellum-Synthese (CTC1655), den Ethanolamin-Katabolismus (CTC2163), die Sec-System-Synthese (CTC2206), eine Citrat-Lyase (CTC2468), eine Sulfid-Reduktase (CTC2488) oder für eine Glutamat-Mutase (CTC2569) kodieren.

3.4.13.2 Zwei-Komponenten-Systeme

29 der DNA-bindenden Proteine sind als Response-Regulatoren Teil von Zwei-Komponenten-Systemen, wobei die zwei Komponenten i. d. R. direkt benachbart kodiert sind. Ein typisches Zwei-Komponenten-System besteht neben dem Transkriptionsregulator noch aus einer Sensor-Histidin-Kinase, die meistens membranständig ist und i. d. R. ein Signal im Periplasma empfängt, was dann über eine Konformationsänderung zur Autophosphorylierung des Sensors führt. Oft ist noch ein periplasmatisches Bindeprotein zwischengeschaltet, das mit dem Signal interagiert und anschließend die Sensor-Histidin-Kinase aktiviert. In einem nächsten Schritt wird eine Phosphoryl-Gruppe des Sensors auf den Response-Regulator übertragen, der dadurch aktiviert wird und z. B. eine Bindung an bestimmte sequenzspezifische Bereiche der DNA eingehen kann. Diese liegen meistens in der Nähe von Promotoren, so dass eine Proteinbindung direkt die Aktivität der RNA-Polymerase und damit den Expressionsspiegel des Gens oder des Operons beeinflussen kann. Mit solchen Zwei-Komponentensystemen führen Bakterien eine adaptive Antwort auf Umweltsignale herbei. Als Beispiele sollen bakterielle Systeme wie Arc (aerobe/anaerobe Umschaltung), EnvZ/OmpR (Osmoregulation), Spo (Sporulation), Lyt (N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase-Biosynthese), Nar (Nitrat-/Nitrit-Metabolismus), Pho (Phosphat-Regulation) und Vir (Virulenz-Ausbildung) genannt werden.

Um erste Informationen darüber zu gewinnen, welche Gene oder Operone in *C. tetani* jeweils von diesen 29 Zwei-Komponenten-Systemen reguliert werden, wurden die gefundenen Homologien zu bereits untersuchten Systemen und die direkte genetische Nachbarschaft dieser Systeme betrachtet (Tabelle 13). Die zuletzt genannte Herangehensweise beruhte auf der empirischen Beobachtung, dass einige Zwei-Komponentensysteme direkt benachbarte Gene regulieren. Neben diesen Systemen gibt es aber auch solche, die mehrere im Genom verstreut liegende Gene regulieren, z. B. das VirR/VirS-System aus *C. perfringens* (BA-THEIN et al., 1996).

Tabelle 13: Die in der Genomsequenz von *C. tetani* identifizierten Zwei-Komponentensysteme, ihre Homologien und ihre genetische Nachbarschaft (RR, Response-Regulator; SHK, Sensor-Histidin-Kinase)

System	Homologie	benachbart-liegende Gene
CTC189/191	RR: ResD (respiratorische Kontrolle)	periplasmatische Endopeptidase
CTC392/393	RR/SHK: BacR/BacS (Peptid-Antibiotika (z. B. Bacitracin)-Synthese und -Resistenz)	ABC-Transporter-System (Peptid- oder Protein-Transporter)
CTC411/412	RR/SHK: VirI/VirJ (Regulation der Toxin-Synthese)	-
CTC455/456	RR ist rRNA-Methylase	-
CTC597/598	RR: BacR (Peptid-Antibiotika (z. B. Bacitracin)-Synthese und -Resistenz)	konserviertes Protein; Glycerin-Dehydrogenase
CTC628/629	RR/SHK: SpaR/SpaK (Subtilin-Biosynthese und -Resistenz)	ABC-Transporter-System SpaEFG (Subtilin-Export)
CTC805/806	RR/SHK: VanR/VanS (Glycopeptid (z. B. Vancomycin)-Resistenz)	Transport-Protein
CTC848/849	RR/SHK: GtcR/GtcS (Peptid-Antibiotika-Biosynthese und Resistenz)	periplasmatische Protease (Hitzeschock-Protein)
CTC872/873	SHK: Arc (Regulation des Switches zwischen aerober/anaerober Respiration)	Efflux-ATPase für Kupfer
CTC924/925	RR: Regulation des Katabolismus von Purinen; SHK ist Chemotaxis-Protein	Zink-abhängige Peptidase
CTC934/935	SHK: LytS (Regulation der Zell-Autolyse)	Pyruvat-Formiat-Lyase; Parathion-Hydrolase
CTC949/950	RR/SHK: VirR/VirS (Regulation von Virulenzfaktoren)	Chemotaxis-Protein; Transkriptionsaktivator
CTC1130/1131	RR/SHK: PhoR/PhoP (Regulation des Phosphat-Haushalts)	ABC-Transportsystem für Phosphat
CTC1211/1212	RR: LytR (Regulation der Zell-Autolyse); SHK ist Chemotaxis-Protein	anaerobe Sulfit-Reduktase
CTC1420/1421	RR/SHK: YycF/YycG (Regulation der Zellteilung)	ABC-Transporter (Peptid-Transporter)
CTC1481/1482	RR/SHK: FeuP/FeuQ (Regulation der Eisen-Aufnahme)	konserviertes Protein mit [4Fe4S]-Cluster mit 4 transmembranen Helices
CTC1490/1491	-	Hitzeschock-Protein HtpG (Chaperon); Membranprotein
CTC1523/1524	RR/SHK: DcuR/DcuS (C4-Dicarboxylat-stimulierte Regulation der Gene für anaerobe Fumarat-Respiration)	lösliche Flavocytochrom c-Fumarat-Reduktase

CTC1804/1805	RR/SHK: BacR/BacS (Peptid-Antibiotika (z. B. Bacitracin)-Synthese und -Resistenz)	ABC-Transporter (Peptid-Transporter)
CTC1818/1819	-	ABC-Transporter; RNA Polymerase-Sigmafaktor
CTC1848/1849	-	lösliche Flavocytochrom c-Fumarat-Reduktase
CTC1857/1858	RR : SinR (Regulation des Eintritts in die stationäre Phase; Antwort auf Nährstoffmangel; Repressor des Spo0A-Gens); SHK ist Chemotaxis-Protein	-
CTC1905/1906	RR: BacR; VanR (Peptid-Antibiotika-Synthese und -Resistenz)	ABC-Transporter (Peptid-Transporter)
CTC1918/1919	RR: BacR; VanR (Peptid-Antibiotika-Synthese und -Resistenz)	ABC-Transporter (Peptid-Transporter)
CTC1951/1953	RR/SHK: PhoR/PhoP (Regulation des Phosphat-Haushalts)	-
CTC1978/1979	RR/SHK: LytR/LytS (Regulation der Zell-Autolyse)	Carbon-Starvation Protein CstA
CTC2155/2156	RR/SHK: VanR/VanS (Glycopeptid (z. B. Vancomycin)-Resistenz)	DNA-Reparaturprotein HexA
CTC2178/2179	RR/SHK: EutR/EutS (Regulation des Abbaus von Ethanolamin)	Ethanolamin-Katabolismus-Proteine EutA/EutP
CTC2322/2323	RR/SHK: AtoC/AtoS (Regulation des Acetoacetat-Metabolismus)	Na ⁺ /Glutamat-Symporter; V-Typ-ATPase-Proteine

Die in Tabelle 13 aufgelisteten Befunde für die Zwei-Komponentensysteme in *C. tetani* offenbarten einige interessante Aspekte. So konnten zwei Systeme, CTC411/412 und CTC949/950, gefunden werden, die Homologien zu Systemen aus *C. perfringens* zeigten, welche die Synthese von Virulenzfaktoren regulieren. VirR/VirS stellt dabei das am besten untersuchte System dar: es reguliert u. a. die Expression von Virulenzfaktoren wie Phospholipase C, Perfringolysin O, Collagenase und eine Sialidase (CHEUNG & ROOD, 2000). Dabei wird die Expression von Perfringolysin O direkt durch Bindung von VirR am entsprechenden Promotor reguliert, während die anderen Toxin-Gene wahrscheinlich durch eine VirR-regulierte RNA reguliert werden (SHIMIZU et al., 2002b). Das VirR/VirS-ähnliche System in *C. tetani* wird derzeit im Göttinger Institut für Mikrobiologie und Genetik durch Elke Raade untersucht. Über das VirI/VirJ-System liegen keine

veröffentlichten Daten vor. Es wird allerdings als negativer Regulator von extrazellulären Toxinen angesehen (OHTANI et al., 1999).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass in einigen Fällen ein Zusammenhang zwischen den Funktionen der homologen Systeme und den Funktionen der benachbart-liegenden Gene hergestellt werden konnte. So konnten sechs Systeme (CTC392/393, CTC628/629, CTC805/806, CTC1804/1805, CTC1905/1906, CTC1918/1919) erkannt werden, die zur BacR/BacS- bzw. VanR/VanS-Familie zu rechnen sind, welche Gene zur Ausbildung einer Resistenz gegen Peptid-Antibiotika regulieren. Stromabwärts der Gene dieser Systeme befinden sich in *C. tetani* Gene für Peptid-ABC-Transporter, die möglicherweise als Peptid-Efflux-Systeme arbeiten können. Ein weiteres Beispiel ist das System CTC1523/1524, dessen Homologon DcuR/DcuS aus *E. coli* Gene für die anaerobe Fumarat-Atmung als adaptive Antwort auf das Vorhandensein von C4-Dicarbonsäuren im Medium reguliert (JANAUSCH, et al., 2002). In Bezug dazu findet man stromabwärts in *C. tetani* das Gen für die Flavocytochrom c-Fumarat-Reduktase. Weitere Beispiele sind das mögliche Phosphat-Regulationssystem CTC1130/1131 sowie das System CTC1481/1482, welches Gene für die Aufnahme von Eisen regulieren könnte.

3.4.13.3 RNA-Polymerase-Sigmafaktoren

Als nächstes wurde nach RNA-Polymerase-Sigmafaktoren gesucht, um zu ermitteln, welche alternativen Sigmafaktoren neben dem Standard-Sigmafaktor (RpoD, Sigma-70) zur Verfügung stehen. Die Verwendung von alternativen Sigmafaktoren ermöglicht die einheitliche Regulation der Expression ganzer Gengruppen (Regulons). Es konnten im Genom von *C. tetani* 19 Sigmafaktoren identifiziert werden. Tabelle 14 zeigt die Ähnlichkeitsvergleiche dieser Faktoren zu Sigmafaktoren aus *B. subtilis* und anderen Organismen. Dadurch konnten erste Hinweise auf die Art der Regulons erhalten werden, welche von den verschiedenen Sigmafaktoren reguliert werden.

Tabelle 14: Die Sigmafaktoren in *C. tetani*, deren Homologien und mögliche regulatorische Bedeutungen

ORF-Name	Homologie zu <i>B. subtilis</i> u. a. / vorhandene Domänen	mögliche regulatorische Bedeutung
CTC376	RpoN (Sigma-54)	primärer alternativer Faktor (Fermentationsmetabolismus, N-Metabolismus)
CTC553, CTC665	SigW, ECF*-Familie (Sigma-70-Faktor-Domäne)	unbekannt
CTC608, CTC618, CTC688, CTC1790	SigV, ECF-Familie (Sigma-70-Faktor-Domäne)	unbekannt
CTC867, CTC2010	RpoD (Sigma-70)	Standard-Sigmafaktor (Housekeeping-Gene)
CTC1066	Sigma-28	Sporulation (Stadium IV)
CTC1126	Sigma-E	Sporulation (Stadium II)
CTC1128	Sigma-G	Sporulation (Stadium III)
CTC1433, CTC1786, CTC1788, CTC1817	ECF-Familie (Sigma-70-Faktor-Domäne)	unbekannt
CTC1653	FliA	Flagellum-Synthese / Motilität / Chemotaxis
CTC2246	Sigma-F	Sporulation (Stadium II)
CTC2617	Sigma-H	Einleitung in stationäre Phase / Sporulation

* ECF: extracytoplasmatische Funktion

Die Anzahl der in *C. tetani* gefundenen Sigmafaktoren stimmt in etwa mit der in den Genomen von *B. subtilis* (18) und *C. acetobutylicum* (17) gefundenen Anzahl überein (KUNST et al., 1997; NÖLLING et al., 2001). Allgemein kann festgestellt werden, dass die Zahl der Sigmafaktoren in Genomen von Sporenbildnern weitaus größer ist als in anderen Genomen wie z. B. in dem von *Staphylococcus aureus*, in dem lediglich 2 Sigmafaktoren identifiziert werden können. Es ist bekannt, dass die Sporulation mittels einer Kaskade von alternativen Sigmafaktoren reguliert wird. An dieser Stelle sollte die Besonderheit erwähnt werden, dass der hier verwendete *C. tetani* Stamm E88 eine nicht-sporulierende Variante des Stammes Massachusetts ist. Anhand der Genomsequenz kann nicht geklärt werden, warum der Stamm E88 die Fähigkeit zur Sporulation eingebüßt hat, da auf genetischer Ebene ein ähnlicher Satz an Sporulationsfaktoren vorhanden ist wie in den sequenzierten Sporenbildnern *C. acetobutylicum* und *C. perfringens*. Kurz erwähnt sei hier auch die Beobachtung, dass sich der Satz an Sporulationsgenen zwischen *B. subtilis* und den drei

sequenzierten Clostridien stark unterscheidet: die Clostridien besitzen viel weniger Sporulationsgene (NÖLLING et al., 2001). Es fehlen u. a. die SpoV-Gene sowie regulatorische Elemente wie das Zwei-Komponenten-System SpoOB/OF, die Histidin-Kinasen KinABCDE und sporulationsrelevante Phosphatasen der Rap-Familie. Die genannten Elemente regulieren in *B. subtilis* erwiesenermaßen den Eintritt in die stationäre Phase und den Beginn der Sporulation.

Die Identifizierung weiterer von *C. tetani* verwendeter Regulationsmechanismen wie Antisense-RNAs oder posttranslationale Mechanismen ist nahezu unmöglich, wenn lediglich die Genomsequenz betrachtet wird. Andere Techniken wie etwa die Microarray-Technik oder Proteomanalysen mittels der 2D-Gelelektrophorese müssen hinzugezogen werden. Dass *C. tetani* auch andere Regulationsmechanismen benutzt, ist bei den Untersuchungen zum Tetanus-Toxin entdeckt worden: zur Aktivierung des Toxins muss es posttranslational modifiziert werden, was durch eine proteolytische Spaltung des 150 kDa großen Toxins in zwei Proteinketten geschieht (s. 4.2.1.1).

3.4.14 Mobile Elemente und Prophagen

Im Genom von *C. tetani* lassen sich im Vergleich zu Genomen von Enterobakterien sehr wenig mobile DNA-Elemente ausmachen. So konnten 19 Genregionen identifiziert werden, die Transposase-ähnliche Proteine kodieren. 9 davon sind 100%ige Kopien desselben Elements. Jede Kopie besteht dabei aus zwei ORFs: ORF A kodiert ein Protein mit der Integrase-Domäne RVE, während ORF B ein Transposase-Fragment zu sein scheint. Ähnliche Systeme gibt es auch in *E. coli* (IS150) und *V. cholerae*. Die höchsten Homologien treten allerdings zu Systemen aus *Marinococcus halophilus* und *Oceanobacillus iheyensis* auf (ERGO, interne Datenbank). Die Mehrzahl dieser Transposasogene ist wahrscheinlich nicht mehr funktionell, da der ORF durch eine Leserasterverschiebung, die von Insertionen, Deletionen und Punktmutationen herrühren könnte, unterbrochen ist.

Des weiteren fallen im Genom drei Bereiche auf, die auffallend viele Phagenrelevante Proteine kodieren, und wahrscheinlich cryptische Prophagen

repräsentieren. Der erste Bereich umfasst etwa 47 kb und enthält 49 ORFs (CTC1067-CTC1116). Dieser potentielle Prophage existiert nicht in den Genomen von *C. acetobutylicum* und *C. perfringens*. Stattdessen zeigen die meisten Proteine Homologien zu hypothetischen oder Phagen-relevanten Proteinen aus *C. botulinum*. Die anderen zwei Bereiche von etwa 39 und 41 kb umfassen 35 (CTC1532-CTC1567) bzw. 47 ORFs (CTC2105-CTC2152). Wiederum kodieren diese ORFs lediglich hypothetische oder Phagen-relevante Proteine. Die Inserierung dieser Phagen ins Genom von *C. tetani* könnte auch die in Abbildung 19 ersichtliche Beobachtung erklären, dass Replikationsursprung und -terminus nicht genau eine halbe Genomlänge voneinander entfernt sind.

4 Diskussion

Im vorangegangenen Ergebnis-Teil dieser Arbeit wurde ein Einstieg in die Sequenzanalyse des Genoms von *C. tetani* versucht. Es wurden das genetische Potential des Organismus in Bereichen wie Virulenz, Stoffwechsel, Bioenergetik, Transport, Regulation und Proteinsekretion vorgestellt und bemerkenswerte Einzelheiten und Besonderheiten erläutert. Dabei ist oft auch der Versuch unternommen worden, einen Vergleich zwischen den in *C. tetani* gefundenen Daten und den Genomdaten anderer Clostridien herzustellen. So z. B. wurden das Vorkommen und die Zusammensetzung verschiedener Gencluster unter den Clostridien verglichen.

Hier soll nun ein genereller, genomweiter Vergleich zwischen verschiedenen Arten der Gattung *Clostridium* durchgeführt und die erhaltenen Ergebnisse diskutiert werden. Im letzten Teil der Diskussion wird dann das genetische Potential von *C. tetani* zusammengefasst.

4.1 Vergleichende Sequenzanalyse der Genome von pathogenen und nicht-pathogenen Clostridien

4.1.1 Stand der Genomforschung von Organismen der Gattung *Clostridium*

Zu Beginn der Arbeiten zur Sequenzierung des Genoms von *C. tetani* lag noch keine komplette Genomsequenz von einem Organismus der Gattung *Clostridium* vor. Erst im August 2001 wurde die Genomsequenz von *C. acetobutylicum* ATCC824 veröffentlicht, einem nicht-pathogenen Organismus, der Lösungsmittel wie Aceton, Butanol und Ethanol produzieren kann (Genome Therapeutics Corporation (GTC)-Sequencing Center; NÖLLING et al., 2001). Es folgte im Januar 2002 die Veröffentlichung der Genomsequenz von *C. perfringens* 13, einem pathogenen Organismus, der im Menschen Gasgangrän (clostridielle Myonekrose) und nekrotische Enteritis und Diarrhö verursachen kann (Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Japan; SHIMIZU et al., 2002).

Als nächstes und bisher letztes konnte das Genom von *C. tetani* im Rahmen dieser Arbeit geschlossen werden, die entsprechende Sequenz ist in der NCBI-Datenbank abgelegt (BRÜGGEMANN et al., 2003). Daten über diese drei Genome sind in Tabelle 8 zusammengefasst (s. 3.4.1).

Zur Zeit werden noch weitere Genome clostridieller Organismen sequenziert. Das Sanger-Zentrum in Cambridge, England, sequenziert die Genome der pathogenen Organismen *C. difficile* Stamm 630 und *C. botulinum* A (ATCC3502).

C. difficile 630 ist einer der am weitesten verbreiteten nosocomialen Erreger, also solcher, die in erste Linie in Krankenhäusern auftreten. Der Organismus kann verschiedene Krankheiten wie Antibiotika-assoziierte Diarrhoe bis hin zu lebensbedrohlicher pseudomembranöser Kolitis verursachen. Das Genomprojekt befindet sich zur Zeit im letzten Stadium (2 verbliebende Sequenzlücken, Stand: 08.11.2002). Die vorläufige Gesamtgenomlänge beträgt 4,298 Mb.

C. botulinum Stamm A (ATCC3502) produziert das Botulinus-Toxin A, das mit dem Tetanus-Toxin in Sequenz, Struktur und Wirkungsweise eng verwandt ist. Das Botulinus-Toxin verursacht die folgenschwerste Lebensmittelvergiftung, den Botulismus, welcher zu einer tödlichen Atemlähmung führen kann. Das Genomprojekt befindet sich derzeit ebenfalls in der letzten Phase: 63114 Einzelsequenzen assemblieren zu 20 Contigs mit einer vorläufigen Gesamtgenomgröße von 3,951 Mb (Stand:08.11.2002). Der aktuelle Stand der Genomsequenzierung ist auf den Web-Seiten (<http://www.sanger.ac.uk>) des Sanger-Zentrums einsehbar. Zusätzlich hat die Öffentlichkeit unter <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/cb/> freien Zugang zu vorläufigen *C. botulinum*-Sequenzdaten.

Ein weiterer pathogener *C. perfringens*-Stamm wird derzeit von TIGR (The Institute of Genomic Research, Rockville, USA) sequenziert. Dabei handelt es sich um *C. perfringens* ATCC13124. Es sind derzeit noch 9 Contigs vorhanden, die zusammen 3,266 Mb ergeben (Stand: 16.05.2002).

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass auch die Rohsequenzierung des Genoms von *C. thermocellum* ATCC27405 durchgeführt wurde, einem thermophilen, Cellulose-abbauenden Organismus (Joint Genome Institute (JGI), California, USA). Der Datensatz besteht aus 469 Contigs, die zusammen eine vorläufige Genomgröße von 3,654 Mb ergeben (Stand: 17.09.2002).

4.1.2 Verwandtschaft clostridieller Genome

4.1.2.1 Phylogenetische Betrachtungen anhand von 16S rRNA-Sequenzen

Die Organismen der Gattung *Clostridium* sind als Gram-positive, anaerobe und Endosporen-bildende Bakterien charakterisiert, die nicht zur dissimilatorischen Sulfat-Reduktion befähigt sind (GOTTSCALK et al., 1981). Die Auflistung der Genomprojekte im letzten Abschnitt deutete es aber bereits an: die Gattung *Clostridium* ist sehr heterogen. Die Genomgrößen unterscheiden sich z. T. erheblich. Während das Chromosom in *C. tetani* nur 2,799 Mb groß ist, besteht z. B. das Genom von *C. difficile* aus 4,298 Mb. Phylogenetische Studien mit 16S rRNA-Sequenzen revidierten das bis dahin diffuse Wissen über die Verwandtschaftsbeziehungen der Clostridien (COLLINS et al., 1994). Es wurde eine extreme Heterogenität der Gattung festgestellt. So konnten 19 verschiedenen Cluster definiert werden. Viele Clostridien sind phylogenetisch gesehen mit Sporenbildenden und Nicht-Sporenbildenden Organismen aus anderen Gattungen verwandt. Trotzdem geht man davon aus, dass die Arten der Gattung *Clostridium* von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen, welcher sehr früh in der Evolution Gram-positiver Bakterien auftrat (STACKEBRANDT & RAINEY, 1997). Die meisten pathogenen Arten, darunter *C. tetani*, *C. perfringens* und *C. botulinum*, aber auch der nicht-pathogene Organismus *C. acetobutylicum* sind im Cluster I eingeordnet, das in Abbildung 29 wiedergegeben ist.

Abb. 29: Dendrogramm der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Organismen des Clostridien-Clusters I
(Abbildung aus COLLINS et al., 1994)

4.1.2.2 Phylogenetische Betrachtungen anhand von Triosephosphat-Isomerase- und Elongationsfaktor EF-Tu-Sequenzen

Nachfolgend sollen nun speziell die sequenzierten Clostridien und verwandte sequenzierte Organismen phylogenetisch anhand anderer Vergleichsmoleküle als der 16S rRNA in Beziehung gesetzt werden. Als Vergleichskriterien wurden die Proteinsequenzen der Triosephosphat-Isomerase (Abb. 30) und des Elongationsfaktors EF-Tu (Abb. 31) gewählt, da diese Proteine sehr konserviert sind und in letzter Zeit des öfteren als Vergleichsmoleküle in phylogenetischen Studien

benutzt wurden (CANBACK et al., 2002; DHALLUIN et al., 2002; JENKINS & FUERST, 2001).

Abb. 30: Phylogenetische Beziehung zwischen *C. tetani* und verwandten Organismen anhand der Proteinsequenzen der Triosephosphat-Isomerase

Ausgewählt wurden diejenigen 10 Organismen, die bezüglich der Triosephosphat-Isomerase die höchsten Sequenzähnlichkeiten zur Proteinsequenz aus *C. tetani* zeigten. Der *Neighbour-joining* (NJ)-Tree wurde wie in der Legende zur Abb. 9 (s. 3.2.6.2) erklärt berechnet. Die Nummern an den Gabelungen bedeuten in % die Häufigkeit, mit der eine solche Gabelung unter 1000 berechneten NJ-Trees erhalten wurde. Abkürzungen: BLI, *B. licheniformis*; BME, *B. megaterium*; BST, *B. stearothermophilus*; BSU, *B. subtilis*; CAC, *C. acetobutylicum*; CBO, *C. botulinum* A; CDI, *C. difficile*; CPE, *C. perfringens*; CTC, *C. tetani*; TTE, *Thermoanaerobacter tengcongensis*.

Abb. 31: Phylogenetische Beziehung zwischen *C. tetani* und verwandten Organismen anhand der Proteinsequenzen des Elongationsfaktors EF-Tu

Ausgewählt wurden diejenigen 12 Organismen, die bezüglich des Elongationsfaktors EF-Tu die höchsten Sequenzähnlichkeiten zur Proteinsequenz aus *C. tetani* zeigten. Der *Neighbour-joining*-Tree wurde wie in der Legende zur Abb. 9 (s. 3.2.6.2) erklärt berechnet. Abkürzungen: siehe Legende Abb. 30; weitere Organismen: CTH, *C. thermocellum*; DHA, *Desulfitobacterium halfniense*; FNU, *Fusobacterium nucleatum*; NME, *Neisseria meningitidis*; TMA, *Thermotoga maritima*.

Ein interessanter Aspekt dieser phylogenetischen Studien ist, dass die Gruppe bestehend aus *C. acetobutylicum*, *C. botulinum* A, *C. perfringens* und *C. tetani* einen relativ großen Abstand vom Rest der Sequenzen zeigt (bei 1000 Replicons 99%ige bzw. 100%ige Separation). Innerhalb dieser Gruppe sind *C. botulinum* A und *C. acetobutylicum* am engsten verwandt, was der von COLLINS et al. (1994) festgelegten Verwandtschaft widerspricht (Abb. 29). Auffallend ist der relativ große phylogenetische Abstand von *C. difficile* zu den anderen betrachteten Clostridien. Bei der relativen Nähe von *C. tetani* zu *C. botulinum* A ist die Frage interessant,

welche zusätzlichen Funktionen *C. botulinum* A auszeichnet, der ein um mehr als 1000 kb größeres Genom als *C. tetani* besitzt. Die Ergebnisse der phylogenetischen Betrachtungen basierend auf multiplen Sequenzalignments der Triosephosphat-Isomerase und des Elongationsfaktors EF-Tu sind kohärent mit den im Laufe der Annotation des *C. tetani*-Genoms beobachteten Ähnlichkeiten. Es wurde dabei deutlich, dass die meisten Proteine die höchste Ähnlichkeit zu Proteinen aus folgenden Organismen hatten - und zwar häufig gemäß der genannten Reihenfolge: *C. botulinum* - *C. perfringens* - *C. acetobutylicum*, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *C. difficile*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *Fusobacterium nucleatum*, *B. licheniformis*, *B. halodurans*, *B. subtilis*, *Xyella fastidiosa*, *L. monocytogenes*, *Enterococcus faecium* und andere.

Überraschend ist die nahe Verwandtschaft zum Gram-negativen und thermophilen Organismus *Thermoanaerobacter tengcongensis*, die auch schon von COLLINS et al. (1994) beobachtet wurde. Der Organismus ist vor kurzem vollständig sequenziert worden (BAO et al., 2002). *Thermoanaerobacter tengcongensis* ist obligat anaerob und bildet keine Sporen. Die optimale Wachstumstemperatur dieses primär saccharolytisch lebenden Bakteriums liegt bei 75 °C.

4.1.3 Genomweiter Vergleich von *C. acetobutylicum* und *C. perfringens* mit *C. tetani*

4.1.3.1 Vergleich der Genome auf Proteinebene

Die zur Verfügung stehenden veröffentlichten Genomsequenzen von *C. acetobutylicum*, *C. perfringens* und *C. tetani* sollen nun genomweit verglichen werden. Die noch nicht geschlossenen Genome von *C. difficile* und *C. botulinum* wurden aufgrund der noch vorhandenen Sequenzlücken und der nicht gesicherten Sequenzqualität an dieser Stelle nicht betrachtet. Der Vergleich wurde auf Proteinebene vollzogen, in dem alle Proteinsequenzen aus *C. tetani* mit denjenigen aus *C. acetobutylicum* und *C. perfringens* abgeglichen wurden. Abbildung 32 gibt nun genomweit die Homologien unter den ORFs der drei Clostridien wieder. Es lassen sich sieben Gruppen von ORFs differenzieren.

Abb. 32: Auftreten homologer ORFs in *C. tetani*, *C. perfringens* und *C. acetobutylicum*

Farbkodierung der vier *C. tetani*-ORF-Gruppen: orange: *C. tetani*-ORFs, die Homologons im Genom von *C. perfringens*, aber nicht in dem von *C. acetobutylicum* haben; pink: *C. tetani*-ORFs, die nicht in den beiden anderen Clostridien-Genomen vorkommen; rot: ORFs, die *C. tetani* und *C. acetobutylicum* gemein haben; weiß: ORFs, die in allen drei Clostridien vorkommen (clostridieller “backbone”). Die Größe der drei Kreise ist proportional zur Anzahl der ORFs der Genome. Als signifikante Homologie zwischen zwei Proteinen wurde ein BLAST-Erwartungswert (e-Wert) von kleiner als 10^{-5} angesehen.

Bezüglich *C. tetani* können vier Gruppen von ORFs unterschieden werden; zwei davon sollen in den nächsten Abschnitten genauer betrachtet und diskutiert werden. Die 516 ORFs, welche nur in *C. tetani* vorkommen, stellen womöglich Gene dar, deren Proteine an der Ausprägung des *C. tetani*-spezifischen Phänotyps beteiligt sind (s. 4.1.3.3). Darunter könnten also auch solche sein, die bei der Ausbildung der Tetanus-Krankheit von Bedeutung sind. Die zweite hier näher betrachtete Gruppe umfasst die 199 ORFs, die nur in den pathogenen Bakterien *C. tetani* und *C. perfringens* vorkommen und für die Ausbildung einer pathogenen Lebensweise der Clostridien eine Rolle spielen könnten (s. 4.1.3.2).

Die hohe Anzahl homologer ORFs unter den Clostridien, vor allem bei *C. perfringens* und *C. tetani*, veranlasste eine weitere Untersuchung mit dem Ziel,

Informationen über den Konservierungsgrad der Genordnung zwischen den verschiedenen Genomen zu erlangen. Zuerst wurde genomweit die DNA-Sequenz von *C. tetani* und *C. perfringens* verglichen. Es konnte aber auf DNA-Basis keine Konservierung zwischen diesen Genomen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die Proteinsequenzen aller ORFs beider Organismen abhängig von der Position der entsprechenden Gene auf den Genomen gegeneinander abgeglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 33 wiedergegeben; es zeigt, dass zwar einzelne homologe Operone und Gencluster zwischen *C. tetani* und *C. perfringens* existieren, eine genomweite Konservierung der Genordnung aber nicht festgestellt werden kann.

Abb. 33: Abgleich der Genome von *C. tetani* gegen *C. perfringens*

Gezeigt ist der BLAST-Abgleich (dargestellt als Dot-Blot) der Proteinsequenzen aller ORFs beider Organismen abhängig von der Position der entsprechenden Gene auf den Genomen. Ein rotes Kreuz bedeutet, dass die homologen Proteine der beiden Organismen einen BLAST-Erwartungswert kleiner als 10^{-5} aufwiesen. Rote Diagonalen, die aus der Überlagerung vieler roten Kreuze entstanden sind, weisen auf eine konservierte Genordnung in diesem Genombereich hin.

Im Gegensatz dazu zeigen Enterobakterien z. B. der Gattungen *Salmonella* oder *Escherichia* aber auch Vertreter der Gattung *Bacillus* wie *B. subtilis* und *B. licheniformis* eine deutlich höhere Konservierung der Genordnung (PARKHILL et al., 2001).

4.1.3.2 Kandidaten-Gene für eine pathogene Lebensweise clostridieller Organismen

Zunächst sollen die 199 ORFs betrachtet werden, die in den pathogenen Bakterien *C. tetani* und *C. perfringens* vorkommen, nicht aber in dem nicht-pathogenen Organismus *C. acetobutylicum*. Diese könnten bei der Etablierung oder der Aufrechterhaltung einer pathogenen Lebensweise in virulenten Clostridien eine Rolle spielen. Tabelle 15 klassifiziert diese ORFs nach ihrer Funktion.

Taballe 15: ORFs von *C. tetani* mit Homologons in *C. perfringens*, aber nicht in *C. acetobutylicum*

Funktionelle Kategorie	Anzahl	Produkt
Virulenz	6	Collagenase, Tetanolysin O, 2 Fibronectin-Bindeproteine, Myosin-crossreaktives Antigen, Clostripain-Homologon
Peptidasen	11	Kreatininase, Cyanophycinase, Di- und Oligopeptidasen mit unbekannter Spezifität, mehrere N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidasen
Transport	48	periplasmatische Eisen(III)-Bindeproteine, Ionen-Aufnahme-Systeme für Zink, Kalium und Chrom, Aminosäure/Na ⁺ -Symporter für Alanin, Glutamat, Glycin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan und Tyrosin; Na ⁺ /Myo-Inositol-Symporter, Na ⁺ /Pantothenat-Symporter, Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter, Transporter (Permeasen) für Ribose, Ethanolamin, Galactosid, Nucleosid, Häm, u. a.
Ethanolamin-Katabolismus	21	homolog zu den <i>eut</i> -Genen der pathogenen Bakterien der Gattungen <i>Salmonella</i> und <i>Listeria</i>
Regulation	9	in erster Linie DNA-bindende Transkriptionsregulatoren
Elektronen-transport	6	Proteine des Na ⁺ -translozierenden Nqr/Rnf-Systems
ATPase	12	V-Typ-ATPase (Na ⁺ -translozierend)

Aminosäure-Metabolismus	5	Threonin-Dehydratase, Glutaminase, Aspartat-Ammonium Ligase, Histidin-Decarboxylase, Glutamin-Synthetase
DNA- oder Nukleotid-modifizierende Enzyme	6	Desoxyguanosintriphosphat-Triphosphohydrolase, Inosin/Uridin-Nucleosid-Hydrolase, Purin-Nucleosid-Phosphorylase, Endonuclease, Uridin-Kinase, Cytosin-Deaminase
konservierte oder hypothetische Proteine	62	18 davon mit Signalpeptid-Sequenz, 13 sind homolog zu Membranproteinen aus <i>L. monocytogens</i>
sonstige	20	Myo-Inositol-Katabolismus, Lipase, Polyglutamat-Synthase, Citrat-Lyase-Komplex (6), Häm-Oxygenase, etc.

Auffällig ist die hohe Anzahl an Transport-Proteinen. Hierbei ist bemerkenswert, dass darunter viele Na^+ -abhängige Symporter - vor allem für Aminosäuren - zu finden sind. Auch andere Na^+ -abhängige Systeme sind in Tabelle 15 aufgeführt, wie die V-Typ-ATPase und das Nqr/Rnf-System. Eine detaillierte Wiedergabe Na^+ -abhängiger Prozesse in *C. tetani* ist in Kapitel 4.1.4 zu finden.

Des weiteren gibt es in *C. tetani* und *C. perfringens* mehrere homologe Eisen(III)-Aufnahmesysteme sowie ein ABC-Transportersystem (CTC959-CTC962), das wahrscheinlich Häm transportieren kann. Die Akquirierung von Eisen ist für die erfolgreiche Kolonisierung und Proliferation des Bakteriums im infizierten Wirt von besonderer Bedeutung, da Eisen im Wirt i. d. R. nur in gebundener und damit schwer zugänglicher Form vorliegt (Ferritin, Hämosiderin, Eisentransferrin). So muss das Bakterium Aufnahmesysteme (Siderophore) mit einer sehr hohen Eisen-Affinität bilden (CLARKE et al., 2001). In diesem Zusammenhang ist auch die Anwesenheit einer Häm-Oxygenase in *C. tetani* und *C. perfringens* interessant, welche die Öffnung des Häm-Ringes katalysieren kann, was zur Freisetzung des Eisen-Ions führt (s. 3.4.10.2). Unter den Transportproteinen, die in *C. tetani* und *C. perfringens* vorkommen, befindet sich auch ein Zink-Aufnahmesystem. Das ist deshalb von Interesse, weil Zink das Schlüssel-Ion in der Funktionalität von Zink-abhängigen Toxinen wie das Tetanus-Toxin und die Collagenase darstellt. Daneben gibt es im Genom 11 weitere Peptidasen, die das Zink-Bindemotiv HEXXH tragen, und somit wahrscheinlich auch Zink-abhängig sind.

Tabelle 15 listet ebenfalls Peptidasen auf, darunter sowohl cytoplasmatische wie auch periplasmatische Proteine. Lediglich zwei davon zeigen Homologien zu

bekannten Peptidasen: die aufgeführte Kreatininase katalysiert die Hydrolyse von Kreatinin zu Kreatin und die Cyanophycinase, eine Exopeptidase, katalysiert die hydrolytische Spaltung von Cyanophycin, einem Wasser-unlöslichen Speicherpolymer (OBST et al., 2002).

Des weiteren sind die 21 Gene aufgeführt, die für den Cobalamin-abhängigen Katabolismus von Ethanolamin kodieren (KOFOID et al., 1999). Ethanolamin fällt z. B. beim Abbau bestimmter Phospholipide an, welcher durch Lipasen katalysiert wird, von denen 5 verschiedene im Genom von *C. tetani* vorkommen (s. 3.4.6.4).

4.1.3.3 Kandidaten-Gene für Tetanus-spezifische Funktionen

Nun sollen die 516 ORFs betrachtet werden, die in *C. tetani* nicht aber in den anderen beiden Clostridien-Genomen vorkommen. Diese ORFs kodieren also Funktionen, die für *C. tetani* spezifisch sind. Somit könnten sie möglicherweise in einem Zusammenhang mit der Ausbildung der Tetanus-Krankheit stehen. Allerdings ist aufgrund der kleinen Vergleichsmenge von lediglich drei Genomen das Vergleichsresultat mit Vorsicht zu genießen. Tabelle 16 fasst die Funktionen der ORFs zusammen.

Tabelle 16: ORFs von *C. tetani* ohne Homologons in *C. perfringens* und *C. acetobutylicum*

(Funktionelle) Kategorie	An- zahl	Produkt
Plasmid pE88	31	25 hypothetische, 6 konservierte Proteine; 2 Replikationsproteine; Tetanus-Toxin
Phagen	38 19 27	3 Prophagen der Größen 47 kb, 39 kb und 41 kb; hypothetische oder Phagen-spezifische Funktionen, N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidasen, Stress-Protein 20U, RecT
Natrium-abhängige Prozesse	17	Mrp-System (Na^+/H^+ -Antiporter-Komplex), 2 weitere Na^+/H^+ -Antiporter, $\text{Na}^+/\text{Glucose}/\text{Galactose}$ -Cotransporter, $\text{Na}^+/\text{Glutamat}$ -Symporter, $\text{Na}^+/\text{Histidin}$ -Symporter, einige Untereinheiten der alternativen V-Typ-ATPase
Virulenz	14	11 S-Layer-Proteine, mögliche Thrombocyten-aktivierender Faktor (PAF)-Acetylhydrolase, periplasmatisches immunogenes Protein

Peptidasen/ Amidasen	16	4 Zink-abhängige Enzyme: CTC401, CTC445, CTC519, CTC612; Cystein-Protease, Protease HtpX (Hitzeschock-Protein); einige N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidasen
Transporter	15	Subtilin-Transportsystem SpaEFG; Cobalt-Transporter; Small-Multidrug-Exportproteine; Homoserin/Homoserinlacton-Effluxprotein; Eisen-Transportsystem
Genereller Metabolismus	8	Glucose-6-Phosphat-1-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (Pentose-Phosphat-Weg); 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase (4-Aminobutyrat- oder Succinat-Abbau); Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase, Phosphonopyruvat-Decarboxylase (Phosphonat-Biosynthese); mögliche Molybdän-abhängige CO-Dehydrogenase
Aminosäure- Metabolismus	19	Glutamat-Mutase, Tryptophanase, Urocanat-Hydratase, Histidin-Ammonium-Lyase (Histidase), Tyrosin-Phenol-Lyase, L-Lysin-2,3-Aminomutase, L-allo-Threonin-Aldolase, Glutamat- und Aspartat-Racemasen, Ornithin-Synthase, Chorismat-Mutase, Glutamat-Formiminotransferase, N-Carbamoyl-L-Aminosäure-Amidohydrolase
Fett-Abbau	7	(Phospho-)Lipasen, Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-Kinase, Lipoat-Protein-Ligase A, Cholin/Ethanolamin-Kinase, Dihydrolipoamidacyl-Transferase
sonstige	61	V-Typ H ⁺ -Pyrophosphatase, Fumarat-Reduktasen (4), Pyrazinamidase, Thymidylat-Kinase, Metallo-beta-Lactamase, Ferredoxin, mögliche Acyl-CoA:6-Aminopenicillanic-Acid-Acyltransferase, ATP-abhängige RNA-Helicase, S-Adenosylmethionin-Decarboxylase, L-2,4-Diaminobutyrate-Decarboxylase (Diaminobutyrate → 1,3-Diaminopropan), u. a.
konservierte/ hypothetische ORFs	242	111 ORFs ausschließlich in <i>C. tetani</i> vorkommend; 94 ORFs auch in <i>C. botulinum</i> oder/und <i>C. difficile</i> vorkommend

Mehrere Aspekte sollen hier hervorgehoben werden:

1. Viele der ORFs des Plasmids und der drei im Chromosom integrierten Prophagen sind nicht in *C. perfringens* und *C. acetobutylicum* vorhanden. Den meisten konnte keine Funktion zugeordnet werden.
2. Wie schon im letzten Kapitel festgestellt, scheint *C. tetani* eine ausgeprägte Na⁺-Bioenergetik zu betreiben. Das Bakterium besitzt dabei erheblich mehr Na⁺-abhängige Systeme als *C. perfringens* (s. 4.1.4).

3. Einige Proteine des Pentosephosphat-Weges sowie interessante membrangebundene oder -assoziierte Systeme wie das Mrp-System, vier Fumarat-Reduktasen, eine V-Typ- H^+ -Pyrophosphatase, eine alternative V-Typ-ATPase und eine CO-Dehydrogenase konnten in *C. tetani* aber nicht in anderen Vertretern der Gattung *Clostridium* identifiziert werden (s. auch 3.4.9).
4. *C. tetani* besitzt eine 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase, ein Enzym, welches für die Umsetzung von 4-Hydroxybutyrat zu Butyrat benötigt wird (s. auch 4.2.2). 4-Hydroxybutyrat fällt als Abbauprodukt von 4-Aminobutyrat, das z. B. durch *C. aminobutyricum* fermentiert werden kann (GERHARDT et al., 2000), oder von Succinat an, welches z. B. durch *C. kluyveri* verwertet wird (SÖHLING & GOTTSCHALK, 1996). Succinat kann mittels der in *C. tetani* vorhandenen Fumarat-Reduktase gebildet werden. 4-Aminobutyrat entsteht bei der Decarboxylierung von Glutamat*. Es liegt aber auch in Vertebraten als Neurotransmitter GABA (γ -Aminobutyrat) vor, dessen Freisetzung von den Synapsen durch das Tetanus-Toxin verhindert wird (s. 4.2.1.1).
5. *C. tetani* besitzt weit mehr Enzyme zur Vergärung von Aminosäuren als *C. perfringens* (s. auch 3.4.6.3 und Abb. 34). Auch gibt es offensichtlich ein Repertoire an Enzymen zum Abbau von Lipiden (s. 3.4.6.4). Diese beiden Feststellungen machen hinsichtlich des Infektionsortes Sinn: *C. tetani* kolonisiert anaerobe Zonen in Wunden des Säugetier-Wirts. Als Nahrungsquelle stehen somit verschiedenste Peptide und Fette zur Verfügung.
6. In *C. tetani* wurden 111 ORFs gefunden, die bisher in keinem anderen Genom identifiziert werden konnten. Interessant hinsichtlich ihrer möglichen Virulenz-unterstützenden Funktionen sind auch die 94 ORFs, die außer in *C. tetani* nur noch in *C. botulinum* und/oder *C. difficile* vorkommen.

4.1.4 Natrium-abhängige Prozesse in *C. tetani*

In vorangegangenen Kapiteln wurde mehrmals über die Existenz von Na^+ -abhängigen Systemen in *C. tetani* berichtet. Auch wurde in der vorliegenden Arbeit an mehreren Stellen die erhebliche Anzahl an Enzymen erwähnt, die an der Vergärung von Aminosäuren beteiligt sind. Hier sollen nun diese Daten gebündelt

* In *C. tetani* konnte allerdings keine Glutamat-Decarboxylase identifiziert werden.

und in einen Zusammenhang gestellt werden. Abbildung 34 zeigt, dass die Na^+ -Abhängigkeit von *C. tetani* offenbar in direktem oder indirektem Zusammenhang mit seiner Fähigkeit steht, eine erhebliche Anzahl von Aminosäuren vergären zu können. Eine Vielzahl von Exoenzymen katalysiert den Abbau von wirtsspezifischem Gewebe. Peptide und Aminosäuren sowie andere Degradationsprodukte können dann über Transportsysteme aufgenommen werden. Dabei geschieht die Aufnahme von Aminosäuren aus dem extrazellulären Raum mittels einer Vielzahl Membranpotential-getriebener Symporter, die größtenteils Na^+ -abhängig sind. Die Frage ist nun, wie die nachfolgend ablaufende Fermentation von Aminosäuren zur Entstehung eines Na^+ -Membranpotentials genutzt werden kann.

4.1.4.1 Mögliche Beteiligung des Nqr/Rnf-Systems an der Na^+ -Bioenergetik

Ein Abbauprodukt bei der Vergärung der meisten Aminosäuren ist Pyruvat. Dieses kann unter ATP-Synthese zu Acetat oder Butyrat umgesetzt werden (s. 3.4.7). Nun könnte das entstandene ATP mittels der V-Typ-ATPase zur Na^+ -Ionen-Translokation eingesetzt werden. Das wäre allerdings für die Zelle ein sehr kostspieliger Prozess. Es wird angenommen, dass Na^+ -abhängige ATPasen nur in extremen Situationen zur Na^+ -Translokation benutzt werden (IKEGAMI et al., 1999; HÄSE et al., 2001). Das ATP wird dringend auch für andere zelluläre Prozesse wie z. B. für die Fortbewegung gebraucht.

Die Genomsequenz offenbarte nun eine energetisch gesehen sinnvollere Alternative, die es *C. tetani* erlaubt, einen membrangebundenen Elektronentransportprozess durchzuführen, der mit einer Na^+ -Ionen-Translokation gekoppelt ist. Gemeint ist das in Kapitel 3.4.9.1 vorgestellte Nqr/Rnf-System. Wie kann nun dieses System in den Aminosäure-fermentierenden Metabolismus von *C. tetani* eingebunden sein, und zwar unter Berücksichtigung der Feststellung, dass das System eine NAD^+ -Bindestelle sowie eine Polyferredoxin-Untereinheit besitzt? Es ist anzunehmen, dass das im Laufe der Fermentation von Aminosäuren anfallende Pyruvat mittels der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA umgesetzt wird. Damit einher geht die Reduktion von Ferredoxin. Dieses wird gewöhnlich durch eine Hydrogenase reoxidiert, wobei molekularer Wasserstoff gebildet wird; die Reduktionsäquivalente gehen hierbei also verloren. Das reduzierte Ferredoxin ($E_0' = -420 \text{ mV}$) könnte aber

alternativ zur Reduktion von NAD^+ ($E_0' = -320 \text{ mV}$) genutzt werden. Diese Reduktion wäre energetisch machbar und könnte durch das Na^+ -Ionen-translozierende Nqr/Rnf-System katalysiert werden (Abb. 34). Ein weiterer Hinweis zur Unterstützung dieser Hypothese ist die Beobachtung, dass eine hohe NADH-Dehydrogenase-Aktivität in gewaschenen Membranen von *C. tetanomorphum*, einem zu *C. tetani* sehr nah verwandten Organismus, detektiert werden konnte (BUCKEL, persönliche Mitteilung). Die nächste daraus resultierende Frage adressiert den Nutzen des reduzierten NAD^+ für *C. tetani*. Bei der Vergärung vieler Aminosäuren entsteht im Gegensatz zur Vergärung von Glucose kein $\text{NADH} + \text{H}^+$. Dieses wird aber für die Reduktion von Acetyl-CoA zu Butyrat in den Reaktionen benötigt, welche durch die Butyryl-CoA-Dehydrogenase und die β -Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase katalysiert werden. In diesem Zusammenhang sind die Gencluster dieser Enzyme interessant (s. 3.4.7.2). Sie enthalten die Elektronentransfer-Flavoproteine EtfA und B. Bisher ist bekannt, dass EtfA und EtfB die für die Reduktion von Crotonyl-CoA benötigten Elektronen bereitstellen (BOYNTON et al., 1996). Somit wäre es auch denkbar, dass das Nqr/Rnf-System nicht NAD^+ sondern eines der Elektronentransfer-Flavoproteine reduziert. Zur genaueren Analyse dieser Hypothese wurde die mögliche NADH-Bindestelle in NqrF betrachtet. Aus NADH-bindenden Proteinen, wie z. B. NuoF im Komplex 1 oder NAD^+ -reduzierende Hydrogenasen, wurde von WEIDNER et al. (1993) eine Consensus-Sequenz für ein mögliches Bindemotiv postuliert: $\text{NADE}^{\text{M}}/\text{GEPGT}$. An der entsprechenden Stelle im multiplen Sequenzalignment zeigt NqrF aus *C. tetani* folgende Sequenz: NAAECEPYL. Das Bindemotiv entspricht also nur zu etwa 55% dem Consensus. Letztendlich können nur experimentelle Versuche die Spezifitäten des Nqr/Rnf-Komplexes in *C. tetani* klären.

4.1.4.2 Na^+ -Bioenergetik und Virulenz

Die meisten Bakterien generieren mittels primärer Pumpen ein Protonenpotential über der Membran und nutzen diesen zur ATP-Synthese und für zelluläre Prozesse wie z. B. die Substrataufnahme oder die Fortbewegung. Nun ist aber seit längerem auch bekannt, dass einige extremophile, vor allem alkalophile und thermophile Bakterien Na^+ -Ionen zur Generierung eines transmembranen elektrochemischen Gradienten nutzen (DIMROTH, 1994; SKULACHEV, 1989). Auch in marinen Bakterien wurde solch eine Na^+ -Abhängigkeit beobachtet (KOGURE, 1998). Analog zu Bakterien, die einen H^+ -Zyklus betreiben, gibt es eine Vielzahl Na^+ -abhängiger Prozesse in solchen Zellen. Dieser Na^+ -Zyklus kann den H^+ -Zyklus sowohl ersetzen aber auch ergänzen. Es wurden mehrere primäre Na^+ -Pumpen in solchen Bakterien gefunden wie z. B. Na^+ -translozierende Decarboxylasen (u. a. Oxalacetat-Decarboxylase und Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase in *Propionigenium modestum*, Glutaconyl-CoA-Decarboxylase in *Acidaminococcus fermentans*), Na^+ -translozierende ATPasen (z. B. in *Enterococcus hirae*, *C. fervidus*), Na^+ -translozierende Methyltransferasen (z. B. Methyltetrahydromethanopterin:CoM-Methyltransferase in methanogenen Archaeen) und das oben erwähnte Na^+ -translozierende Nqr/Rnf-System, das in aeroben Bakterien als NADH-Dehydrogenase fungiert (BOTT et al., 1997; BRAUNE et al., 1999; DEPPENMEIER et al., 1999; STEUBER, 2001; DIMROTH, 1997). Der durch solche primären Na^+ -Pumpen generierte Na^+ -Gradient kann für viele zelluläre Prozesse genutzt werden, wie z. B. zur ATP-Synthese (F_0F_1 -Typ-ATPase von *Propionigenium modestum* und *V. alginolyticus*), zum Substratimport (sekundäre Symporter), zum Antibiotika- und Schwermetall-Export (Multidrug-Efflux-Pumpen) oder zur Na^+ -abhängigen Fortbewegung durch einen Na^+ -abhängigen Flagellenmotor z. B. in *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus* (ASAI et al., 1999; HEYNE et al., 1991; DIMROTH, 1994). Es gibt auch Vermutungen darüber, dass der Export bestimmter Toxine (z. B. Phospholipase YplA in *Y. enterocolitica*) mittels des Flagellen-Exportapparates Δ_{Na^+} -getrieben ablaufen könnte (YOUNG et al., 1999).

Ein genereller Genomvergleich der meisten der bisher vollständig sequenzierten Bakteriengenome offenbarte, dass viele der genannten Na^+ -abhängigen Prozesse vor allem in pathogenen Bakterien wie *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Sa. enterica*, *V. cholerae* oder *Y. pestis* zu finden

sind (HÄSE et al., 2001). Diese Beobachtung konnte nun auch durch die Sequenzierung des Genoms von *C. tetani* bestätigt werden. *C. acetobutylicum* dagegen - obwohl nahe verwandt - besitzt kaum Na^+ -abhängige Systeme; nur die Gene für Na^+ -abhängige Multi-Drug-Effluxpumpen konnten in diesem Genom ausgemacht werden.

Damit kann also festgestellt werden, dass viele pathogene Organismen eine Na^+ -abhängige Bioenergetik betreiben, wobei die meisten davon auch H^+ -abhängige Systeme besitzen. Diese Koexistenz beider Systeme konnte auch in *C. tetani* gefunden werden. Eine Reihe von H^+/Na^+ -Antiportern garantiert die Austauschbarkeit dieser beiden Membranpotentiale.

Welche Gründe könnten die pathogenen Bakterien für die Ausbildung zweier bioenergetischer Zyklen haben? Zum einen ist denkbar, dass dadurch zusätzliche Fähigkeiten gewonnen werden, z. B. bezüglich der Substrataufnahme oder des Exports. Eine gesteigerte ATP-Synthese könnte beim Eintritt in den Wirt den entscheidenden Ausschlag zum Überleben gegen wirtsspezifische Abwehrmaßnahmen und zur erfolgreichen Kolonisierung geben. Eine weitere Erklärung hängt mit der im Vergleich zur H^+ -Konzentration 10^6 -fach höheren Na^+ -Konzentration in den meisten natürlichen Standorten zusammen. Damit könnte die Generierung einer Natriumionen-motorischen Kraft stabiler und verlässlicher durchzuführen sein als die einer Protonen-motorischen Kraft. Auch ist denkbar, dass aufgrund des ähnlichen Salzgehaltes des Meerwassers und des Blutes ein evolutionärer Druck zugunsten der Entwicklung ähnlicher bioenergetischer Systeme in marinen wie in humanpathogenen Bakterien herrschte; oder aber die entsprechenden Gene wurden über horizontalen Gentransfer ausgetauscht.

Zum Abschluss dieses Abschnitts soll erwähnt werden, dass man sich die Existenz Na^+ -abhängiger Systeme in vielen pathogenen Bakterien zur Herstellung von Breitbandspektrum-Impfstoffen zunutze machen könnte. So wäre z. B. NqrA als Impfstoff-Kandidat denkbar, da dieses eine immunogene Antwort in infizierten Schweinen hervorruft (CRUZ et al., 1996). Somit könnte eine Immunisierung gegen einer ganzen Reihe humanpathogener Organismen auf einen Schlag erfolgen.

4.2 Aspekte des genetischen Potentials von *C. tetani*

4.2.1 Pathogenitätsfaktoren

Aufgrund der dominierenden Bedeutung der Toxine und anderer Virulenzfaktoren für die Pathogenität eines Organismus sollen hier einige Pathogenitätsfaktoren von *C. tetani* detailliert vorgestellt werden. Neben dem sehr gut untersuchten Tetanus-Toxin sollen clostridielle Collagenasen und Cytolysine charakterisiert und im Zusammenhang mit den in *C. tetani* gefundenen homologen Toxinen diskutiert werden. Abschließend sollen Zelloberflächenproteine von *C. tetani* als weitere mögliche Virulenzfaktoren vorgestellt werden.

4.2.1.1 Tetanus-Toxin

Die Tetanus-Krankheit manifestiert sich bei betroffenen Menschen meistens als eine spastische Paralyse, d. h. eine krampfartige Starre bzw. Lähmung der Muskeln, beginnend i. d. R. im Kieferbereich und schließlich den gesamten Körper erfassend. Diese Muskelstarre wird durch das neurotoxisch wirkende Tetanus-Toxin verursacht, welches durch *C. tetani*-Zellen produziert wird, die sich in anaeroben Zonen von Wunden ansiedeln konnten (BIZZINI, 1979; ARNON, 1997). Das Toxin bindet zuerst an Nervenzellen der neuromuskulären Verbindungen (motorische Endplatten) und wird anschließend internalisiert. Dann gelangt es durch einen retrograden Transport innerhalb der Axone zum eigentlichen Wirkungsort, den Synapsen von inhibitorischen Interneuronen des Knochenmarks und des Stammhirns (SCHIAVO & MONTECUCCO, 1997). Dort blockiert es die Freisetzung der Neurotransmitter Glycin und γ -Aminobutyrat (GABA) von der präsynaptischen Membran, wodurch die Entspannung der mit den Neuronen vernetzten Muskeln nicht mehr möglich ist. Der molekulare Mechanismus dieses Prozesses besteht darin, dass das Toxin die Hydrolyse des synaptischen Vesikelproteins Synaptobrevin-II katalysiert, welches auch als VAMP, Vesikel-assoziiertes Membranprotein, bezeichnet wird (Abb. 35; SCHIAVO et al., 1992). Synaptobrevin-II ist mit zwei weiteren Proteinen im sogenannten SNARE-Komplex vereinigt, welcher die Fusion der Neurotransmitter-enthaltenden Vesikeln mit der präsynaptischen Membran vermittelt (SUTTON et al., 1998). Durch die Spaltung von Synaptobrevin-II wird eine Fusion unmöglich

gemacht; die Neurotransmitter verbleiben in den Vesikeln und können nicht in den synaptischen Spalt abgegeben werden, wodurch das Signal (Aktionspotential) nicht zum benachbarten Axon weitergetragen werden kann.

Abb. 35: Wirkort und Spezifitäten des Tetanus-Toxins und der Botulinus-Toxine

Die Proteine Synaptobrevin-II (VAMP), Syntaxin und SNAP-25 bilden den sogenannten SNARE-Komplex. Während das Tetanus-Toxin Synaptobrevin-II spaltet, haben die sieben Botulinus-Toxine unterschiedliche Spezifitäten. Zu bemerken ist, dass die Botulinus-Toxine an anderen Neuronen als das Tetanus-Toxin angreifen, und zwar an solchen der motorischen Endplatten, was die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin blockiert; dadurch sind Muskelkontraktionen nicht mehr möglich.

Genauere funktionelle und strukturelle Analysen des Tetanus-Toxins und der sieben homologen Botulinus-Toxine (BoNTs) zeigten, dass die Aktivierung der ca. 150 kDa großen Toxine posttranslational durch proteolytische Spaltung in zwei Polypeptidketten stattfindet (SCHIAVO & MONTECUCCO, 1997). Es entstehen eine schwere (H-Kette, 100 kDa) und eine leichte Kette (L-Kette, 50 kDa), welche über eine Disulfid-Brücke verbunden bleiben. Eine schematische Darstellung des Domänen-Aufbaus ist in Abbildung 36 gezeigt. Die N-terminale L-Kette stellt die katalytische Domäne dar, eine Zink-abhängige Endopeptidase. Die schwere Kette

besteht aus einer Domäne (H_C), die die Bindung an Gangliosiden (z. B. GT1b) vermittelt, welche in neuronalen Membranen zu finden sind, und einer Domäne (H_N), die in der Translokation des Toxins über die neuronale Membran und eventuell auch im retrograden axonalen Transport involviert ist (EMSLEY et al., 2000).

Abb. 36: Schematischer Domänenaufbau des Tetanus-Toxins bzw. der Botulinus-Toxine sowie die Strukturen dieser Domänen

Gezeigt ist die Proteinstruktur des Botulinus-Toxins B (SWAMINATHAN & ESWARAMOORTHY, 2000), welches das zum Tetanus-Toxin ähnlichste Protein ist. In Grün sind α -helikale Regionen, in orange β -Faltblätter gekennzeichnet. In der katalytischen Domäne befindet sich ein Zink-Ion (Zn^{2+}), welches über die zwei Histidin-Reste des Zink-Bindemotivs HELIH sowie über ein Glutamat-Rest koordiniert wird.

Neurotoxine mit Spezifitäten für synaptische Proteine werden ausschließlich durch *C. tetani* und *C. botulinum* sowie durch toxigene Stämme von *C. barati*, *C. argentinense* und *C. butyricum* gebildet. Das 1315 Aminosäuren umfassende Tetanus-Toxin des im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten *C. tetani*-Stammes E88 zeigt die höchsten Ähnlichkeiten zu BoNT B und G (beide 40 % Proteinidentität über 1315 As). Dabei besitzt unter den Botulinus-Toxinen lediglich das BoNT B eine mit dem Tetanus-Toxin identische Substratspezifität: die Spaltung der Glutamin-Phenylalanin-Bindung an Position 67 im Synaptobrevin-II (SCHIAVO et al., 1992). Die meisten clostridiellen Neurotoxine sind auf extrachromosomalen Elementen kodiert. Neben dem Tetanus-Toxin ist auch das BoNT G plasmid-kodiert. Es befindet sich auf einem etwa 114 kb großen Plasmid, das bisher nicht sequenziert wurde (ZHOU et al., 1995). Die Toxine BoNT C und BoNT D sind auf den Genomen von lysogenen Bakteriophagen lokalisiert, die nicht ins Bakterienchromosom integrieren (EKLUND et al., 1972). Auch diese Bakteriophagen-Genome sind bisher nicht sequenziert. Für BoNT E wird angenommen, dass es sich auf einem ins Chromosom integrierten Prophagen befindet. Die restlichen Botulinus-Toxine scheinen chromosomal-kodiert vorzuliegen, wobei allerdings darüber spekuliert wird, ob die Gene der Toxine in einer Transposon-ähnlichen Sequenzumgebung liegen (HENDERSON et al., 1996).

4.2.1.2 Collagenase

Die Sequenzanalyse des Plasmids pE88 ergab, dass neben dem Tetanus-Toxin ein weiteres Toxin, eine Collagenase - hier ColT genannt - kodiert vorlag.

Bakterielle Collagenasen wurden bisher in einer Reihe von pathogenen Organismen identifiziert und charakterisiert, u. a. auch in den Clostridien *C. perfringens* (ColA; MATSUSHITA et al., 1994) und *C. histolyticum* (ColG und ColH; MATSUSHITA et al., 1999). Collagenasen katalysieren die Spaltung des Proteins Collagen, welches ubiquitär im Säugetierreich vorkommt; im Menschen z. B. macht das Collagen ¼ des Gesamtproteins aus. Collagen besteht aus einer vernetzten dreifachen Helix, welche durch drei Proteinketten gebildet wird, wobei jede Kette aus der wiederholten Abfolge dreier Aminosäuren aufgebaut ist. Es wird angenommen, dass Collagenasen einen wichtigen Beitrag zur Pathogenität invasiver Organismen leisten, da die

Spaltung des Collagens - im Bereich der helikalen Region - zum Verlust der Integrität des Gewebes im infizierten Wirt beitragen könnte (HARRINGTON, 1996). Bisher charakterisierte bakterielle Collagenasen bestehen aus drei unterschiedlichen Segmenten (s. Abb. 37). Das Segment 1 ist die katalytische Domäne, wie beim Tetanus-Toxin eine Metalloprotease, welche in ihrer Aminosäuresequenz das Consensus-Motiv für Zink-Proteasen, HEXXH, trägt. Die Funktion des Segments 2 ist bisher nicht verstanden. Es trägt die sogenannte PKD-Domäne. Der Name bezieht sich auf das im Menschen gefundene PKD(Polycystic Kidney Disease)1-Protein, welches die Domäne in mehreren Kopien trägt (THE INTERNATIONAL POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE CONSORTIUM, 1995). Für Segment 3, welches oftmals dupliziert vorliegt, wird angenommen, dass es die Collagen-bindende Domäne darstellt (MATSUSHITA et al., 2001).

Beim Abgleich der ColT-Sequenz aus pE88 mit allen verfügbaren Datenbanken wurde eine weitere, bisher unerkannte Collagenase gefunden: das vom Sanger-Institut (Cambridge, England) sequenzierte Genom von *C. botulinum* A kodiert ebenfalls für eine Collagenase, welche hier nachfolgend ColB genannt werden soll. Zusätzlich wurde eine Collagenase in *B. anthracis* gefunden, hier ColBA genannt (READ et al., 2002). Mit den Aminosäuresequenzen der aus den Clostridien und aus *B. anthracis* stammenden Collagenasen wurde nun ein multiples Sequenzalignment (MSA) gemacht. Eine schematische Repräsentation dieses Alignments ist in Abbildung 37 wiedergegeben. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich ColT von allen bisher identifizierten Collagenasen unterscheidet: das Segment 2, welches die PKD-Domäne enthält, fehlt in ColT. Dies hat wahrscheinlich keine Auswirkungen auf die katalytische Aktivität der Collagenase: MATSUSHITA et al. (2001) haben zeigen können, dass die katalytische Aktivität lediglich von Segment 1 abhängt. Des weiteren vermuteten sie, dass das Segment 2 nicht für die Bindung des Collagens benötigt wird. Vielmehr kann aufgrund der Ähnlichkeit zur PKD-Domäne aus PKD1 - ein integrales Membranprotein, das in Zell-Matrix-Interaktionen involviert ist – angenommen werden, dass mittels Segment 2 weitere Substrate gebunden werden können.

Abb. 37: Schematische Darstellung und Vergleich der Struktur von Collagenasen aus Clostridien und *B. anthracis*
Erklärungen zu den einzelnen Segmenten sind im Text gegeben.

ColT ist als bisher einzige Collagenase Plasmid-kodiert. Darum lohnt sich ein Blick in ihre phylogenetische Abstammung. Um diese zu untersuchen, wurde der Neighbour-joining-Algorithmus auf das MSA der Proteinsequenzen der in Abbildung 37 aufgeführten Collagenasen angewandt. Die so berechnete phylogenetische Distanz der Collagenasen zeigt Abbildung 38. Hier wird die enge Verwandtschaft der Enzyme aus *C. tetani* und *C. botulinum* deutlich. Über das Segment 1 weisen diese Collagenasen eine Proteinidentität von 79% auf. Im Gegensatz dazu zeigen die anderen clostridiellen Collagenasen keine klare Clusterung.

Abb. 38: Phylogenetische Beziehung der Collagenasen einiger pathogener Clostridien und *B. anthracis*

Gezeigt ist ein die Collagenasen verbindender *Neighbour-joining*(NJ)-Tree. Der NJ-Algorithmus wurde auf genetische Distanzen zwischen Paaren von CollagenaseProteinsequenzen angewandt (1000 *bootstrap*-Iterationen; SAITOU & NEI, 1987). Die Herkunft der aufgeführten Collagenasen wird aus Abbildung 37 deutlich.

4.2.1.3 Tetanolysin O

Das Chromosom von *C. tetani* kodiert für ein Cytolysin, das Tetanolysin O, das eine starke Ähnlichkeit zum gut charakterisierten Perfringolysin O, dem sogenannten θ -Toxin aus *C. perfringens* zeigt (ROOD, 1998). Tabelle 17 gibt den Ähnlichkeitsvergleich des Tetanolysin O aus *C. tetani* E88 zu homologen Proteinen wieder, welche alle aus pathogenen Gram-positiven Organismen stammen. Diese Klasse von Toxinen wurde bislang als Thiol (Sulfhydryl)-aktivierte Cytolysin-Familie bezeichnet, was auf die reversible Inaktivierung durch Sauerstoff anspielt.

Diese Sauerstoff-Labilität ist aber nur bei wenigen Cytolysinen dieses Typs feststellbar, so dass die alternative Klassen-Bezeichnung Cholesterol-abhängige Cytolysine (CDC) vorgeschlagen wurde (TWETEN, 1997).

Tabelle 17: Ähnlichkeit des Tetanolysin O aus *C. tetani* E88 zu Cholesterol-abhängigen Cytolysinen Gram-positiver Bakterien

Cytolysin	Proteinidentität (Ähnlichkeit) zu Tetanolysin O (E88) in %
Tetanolysin O (<i>C. tetani</i> Stamm Spanien)*	67 (78) über 471 As
Perfringolysin O (<i>C. perfringens</i>)	55 (72) über 465 As
Alveolysin O (<i>B. alvei</i>)	54 (70) über 484 As
NC_003995 (<i>B. anthracis</i>)	53 (72) über 464 As
Novyilysin (<i>C. novyi</i>)	54 (71) über 465 As
Septicolysin (<i>C. septicum</i>)	53 (69) über 465 As
Streptolysin O (<i>S. pyogenes</i>)	50 (68) über 477 As
Listeriolysin O (<i>L. monocytogenes</i>)	44 (66) über 475 As

* Der *C. tetani*-Stamm ist nicht näher charakterisiert worden (CERRATO et al., 2000).

CDCs sind in der Lage, Löcher in eukaryotischen Cholesterol-haltigen Zellmembranen entstehen zu lassen. Das geschieht durch die Oligomerisierung von bis zu 50 Cytolysin-Monomeren, welche eine transmembrane β -Barrel-Pore bilden, die einen Durchmesser von bis zu 30 nm haben kann, wodurch nicht nur Ionen sondern auch Makromoleküle hindurchgelangen können, was i. d. R. die Integrität der Wirtszelle zerstört (SHATURSKY et al., 1999). Das in vielen eukaryotischen Zellmembranen enthaltene Cholesterol (z. B. in Erythrocyten-Membranen) fungiert dabei sowohl als Cytolysin-Rezeptor als auch als Initiationspunkt der Oligomerisierung der Cytolysin-Monomere sowie als Stabilisator der Pore (HOTZE et al., 2002).

Strukturelle und funktionelle Studien sind in erster Linie mit Perfringolysin O aus *C. perfringens* gemacht worden (ROSSJOHN et al., 1997; RAMACHANDRAN et al., 2002). Man fand, dass der bei allen bisher bekannten Cholesterol-abhängigen

Cytolysinen konservierte C-terminale Sequenzabschnitt ‚ECTGLAW EWWR‘ eine essentielle Funktion hat. Vor allem der Cystein-Rest (sowie die drei Tryptophan-Reste) wurden intensiv untersucht. Eine Modifikation des Cysteins mit Sulfhydryl-spezifischen Agenzien eliminierte die Aktivität des Toxins. Erstaunlicherweise hatte aber eine Substitution des Cysteins durch ein Alanin keine Auswirkungen auf die cytolytische Aktivität (PINKNEY et al., 1989). Durch die Analyse der Struktur des Perfringolysin O konnte festgestellt werden, dass sich der erwähnte C-terminale Sequenzabschnitt in einer β -Faltblatt-reichen Domäne (D4) befindet, welche wahrscheinlich in der Bindung des Cholesterols involviert ist (ROSSJOHN et al., 1997). Die Struktur des Perfringolysin O ist in Abbildung 39 gezeigt.

Abb. 39: Struktur des Perfringolysin O aus *C. perfringens*, einem Homologen von Tetanolysin O aus *C. tetani* (ROSSJOHN et al., 1997)

Die β -Faltblatt-reiche Region stellt den C-Terminus dar. Der für die Proteinaktivität essentielle konservierte Sequenzabschnitt ‚ECTGLAW EWWR‘ ist gelb markiert.

Der Vergleich der Cytolysine aus Tabelle 17 in einem multiplen Sequenzalignment zeigt eine im C-Terminus der Proteine sehr stark ausgeprägte Konservierung. Allerdings unterscheiden sich die bisher kaum untersuchten N-Termini; während sich die von Perfringolysin O, Septicolysin O und Novyilysin O nahezu gleichen, zeigte der N-Terminus von Tetanolysin O des Stammes E88 eine erhebliche Abweichung; die ersten 60 Aminosäurereste wiesen kaum Ähnlichkeit zu den N-Termini der

andern Cytolysine auf, einschließlich des Tetanolysin O eines nicht näher charakterisierten *C. tetani*-Stammes (CERRATO et al., 2000). Zur besseren Visualisierung der Verwandtschaftsverhältnisse unter den CDCs wurden die phylogenetischen Distanzen mit der Neighbour-Joining-Methode berechnet (Abb. 40).

Abb. 40: Phylogenetische Beziehungen homologer Cholesterol-abhängiger Cytolysine pathogener Gram-positiver Organismen

Die Heterogenität der N-Termini hatte keine Auswirkungen auf die Struktur des Baumes. Abkürzungen: TET, Tetanolysin O aus *C. tetani*; NOV, Novyilysin O aus *C. novyi*; SEP, Septicolysin O aus *C. septicum*; PER, Perfringolysin O aus *C. perfringens*; STR, Streptolysin O aus *S. pyogenes*; ALV, Alveolysin O aus *B. alvei*; BAN, Cytolysin aus *B. anthracis*; BCE, Hämolysin aus *B. cereus*.

Es sind drei Cluster erkennbar: das erste Cluster besteht aus den nahezu identischen Cytolysinen von *C. novyi*, *C. septicum* und *C. perfringens*. Das zweite Cluster umfasst Cytolysine aus Organismen der Gattung *Bacillus* (*B. cereus*, *B. anthracis*, *B. alvei*). Überraschend ist die relativ große Distanz der Tetanolysine aus den zwei verschiedenen *C. tetani*-Stämmen, die ebenfalls ein Cluster bilden, obwohl sich die N-Termini dieser beiden Proteine erheblich voneinander unterscheiden. Es bleibt zu klären, warum solche divergierenden N-Termini bestehen und ob diese Divergenz Spezifitäten für unterschiedliche Membrantypen zu Folge hat.

4.2.1.4 S-Layer-Proteine als möglicher Virulenzfaktoren

S (Surface)-Layer-Proteine, auch SLPs genannt, bilden eine einschichtige Hülle um die Bakterienzelle. Diese wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie bei verschiedenen Organismen entdeckt (SARA & SLEYTR, 2000). Die Genomsequenz von *C. tetani* offenbarte nun mindestens 32 verschiedene Zelloberflächenproteine (s. Tabelle 10 in 3.4.5.2). Es ist anzunehmen, dass einige dieser Proteine an der Ausbildung einer S-Layer-Schicht in *C. tetani* beteiligt sind; andere wiederum könnten Zelloberflächen-assoziiert vorliegen und ganz bestimmte Funktionen ausüben, die für die Pathogenität des Organismus von Bedeutung sind. Es wird seit längerem vermutet, dass Zelloberflächenproteine, die Teil der S-Layer oder mit ihr assoziiert sind, als Pathogenitätsfaktoren fungieren, da sie in der Lage sind, die Anheftung der Bakterienzelle an das Gewebe des infizierten Wirts zu vermitteln, welche der Kolonisierung und der Proliferation vorausgeht (BEVERIDGE et al., 1997). Alternativ oder zusätzlich wird ihnen auch die Fähigkeit der Interaktion mit dem Immunsystem des infizierten Wirts zugesprochen.

Daher sollen die 32 in *C. tetani* gefundenen Zelloberflächenproteine genauer analysiert und mit bereits charakterisierten Proteinen verglichen werden. Erst kürzlich wurde die S-Layer des virulenten Stammes C253 sowie anderer Stämme von *C. difficile* analysiert (KARJALAINEN et al., 2001; CALABI et al., 2001). Man identifizierte zwei Protein-Komponenten der S-Layer: das sogenannte *low-MW*-SLP (S-Layer-Protein mit niedrigem Molekulargewicht) und das *high-MW*-SLP (S-Layer-Protein mit höherem Molekulargewicht). Das *low-MW*-SLP ist das am häufigsten gefundene Antigen in Patienten mit einer *C. difficile*-Infektion (CERQUETTI et al., 1992). Des weiteren wurde entdeckt, dass sich das *low-MW*-SLP bei verschiedenen *C. difficile*-Stämmen erheblich unterscheidet (CALABI & FAIRWEATHER, 2002). Beide Komponenten, *low-MW*-SLP und *high-MW*-SLP, werden in *C. difficile* C253 von demselben Gen kodiert, *slpA*. Das SlpA-Protein wird also posttranslational prozessiert. SlpA weist Ähnlichkeiten zu den charakterisierten Zellwand-gebundenen Proteinen N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase (= Autolysin CwlB/LytC) und seinem Verstärker (CwbA/LytB) aus *B. subtilis* auf. Nun konnten im Genom von *C. difficile* 28 weitere ORFs gefunden werden, die eine hohe Homologie zum SlpA zeigten (CALABI & FAIRWEATHER, 2002). Bisher ist lediglich eines der 28

paralogen SlpA-Proteine aus *C. difficile* näher untersucht worden: das Zellwand- und Adhäsionsprotein Cwp66 (WALIGORA et al., 2001).

In *C. tetani* konnten nun 19 zum SlpA bzw. zum Cwp66 homologe Proteine gefunden werden, die alle über eine typische Signalpeptidsequenz verfügen. Eine Analyse der Domänen-Struktur der Proteine aus *C. tetani* und der homologen Proteine SlpA und Cwp66 aus *C. difficile* ist in Abbildung 41 gezeigt.

Abb. 41: Domänenaufbau von 19 Zelloberflächenproteinen aus *C. tetani* sowie homologen Proteinen aus *C. difficile* und *B. subtilis*

SlpA und Cwp66 stammen aus *C. difficile*; CwlB und CwbA stammen aus *B. subtilis*. In Grün sind jeweils die Zellwand-Bindedomänen (PF04122), gekennzeichnet. In rot, Amidase-Domäne PF01520; in blau, Metallo-β-Lactamase-Domäne PF00753; in orange, LRR (Leucin-reiche Wiederholungen)-Domäne PF00560; in violett, BIG (bakterielle Immunglobulin-ähnliche)-Domäne PF02368. Die Größenverhältnisse der Proteine (zwischen 353 und 1080 As) wurden nicht berücksichtigt.

Die Homologie der aufgeführten Proteine basiert auf dem Vorhandensein einer putativen Zellwand-bindenden Domäne (PF04122), die i. d. R. im N-Terminus in mehreren Kopien vorkommt. Die C-Termini der *C. tetani*-Proteine unterscheiden sich z. T. erheblich, was in Zusammenhang mit dem Befund von Interesse ist, dass die C-terminale Domäne von Cwp66 auf der Zelloberfläche exponiert ist (WALIGORA et al., 2001). Es wird angenommen, dass sie für die eigentliche Adhäsion an Gewebezellen des Wirts verantwortlich ist (CALABI et al., 2002). Bezüglich des C-Terminus ließen sich lediglich in drei Proteinen bekannte Domänen identifizieren: CTC1364 besitzt C-terminal eine Zink-abhängige β -Lactamase-Domäne, die wahrscheinlich in den extrazellulären Raum ragt. Diese Domäne wurde z. B. in der Zink-abhängigen β -Lactamase von *B. cereus* gefunden, welche die Hydrolyse von fast allen bekannten β -Lactamen katalysiert (CARFI et al., 1995). CTC2092 enthält C-terminal eine Amidase-Domäne und ähnelt damit im Domänenaufbau dem Autolysin CwlB aus *B. subtilis*, die dominante Zellwand-Hydrolase dieses Organismus (KURODA & SEKIGUCHI, 1991). Interessant ist auch CTC520, welches C-terminal 9 Kopien einer LRR (Leucin-reiche Wiederholungen)-Domäne enthält. Diese kommt auch in Internalinen aus *L. monocytogenes* und in zwei weiteren *C. tetani*-Proteinen vor und wird im folgenden Abschnitt im Detail besprochen.

Zwei Proteine aus *C. tetani*, CTC494 und CTC495, die eine N-terminale Signalpeptidsequenz haben, zeigen Ähnlichkeiten zu Internalin A und anderen Internalinen des invasiven Organismus *Listeria monocytogenes*. Die *C. tetani*-Proteine enthalten wie die Internaline multiple Leucin-reiche Sequenzwiederholungen (LRR-Domäne). Diese sind in den Internalinen in Protein-Protein-Interaktionen involviert. Internaline sind verantwortlich für die Herstellung des Zellkontaktes zu bestimmten Epithelzellen des Säugetierwirts (MENGAUD et al., 1996). Internalin A z. B. bindet an das Epithelzelloberflächenprotein E-Cadherin. Nach Herstellung eines solchen Kontaktes kann die *Listeria*-Zelle ins Epithel eindringen (CABANES et al., 2002).

Die zwei *C. tetani*-Proteine enthalten im Vergleich zum Internalin A mehr Kopien der LRR-Domäne, die über die ganze Proteinsequenz verteilt auftreten (Abb. 42).

Abb. 42: Vergleich der Domänenstruktur von Internalin A aus *L. monocytogenes* mit den *C. tetani*-Proteinen CTC494, CTC495

Zwischen CTC494 und CTC495 besteht bezüglich der Domänenstruktur kein Unterschied. Beide Proteine enthalten eine 79 As große Region (in gelb), die keine Leucin-reichen Sequenzwiederholungen (LRR-Domäne) beinhaltet.

Im Gegensatz zu den Internalinen, die über eine Zellwand-Anker-Domäne verfügen, ist keine bekannte Zellwand-bindende Domäne in den Proteinen CTC494 und CTC495 auszumachen. Im übrigen konnte das in *L. monocytogenes* und anderen Gram-positiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus* vorkommende Zellwand-Anker-Motiv ‚LPXTG‘, worüber die Oberflächenproteine kovalent mit der Zellwand verbunden werden (NOVICK, 2000), im Genom von *C. tetani* nicht gefunden werden.

Zur näheren Betrachtung der 23 LRR-Domänen in CTC494 und CTC495 wurden sie untereinander ausgerichtet (Abb. 43). Jede Domäne besteht aus exakt 22 Aminosäuren. Für das Motiv kann der Consensus $\text{XXNX}^{\text{I/V}}\text{XXLXXLXXLXXLXXLXL}$ gebildet werden. Er unterscheidet sich nicht von der Consensus-Sequenz der LRR-Domänen des Internalins A.

D	D	N	P	V	T	H	I	G	K	L	K	D	M	T	N	L	K	R	L	N	I
S	N	N	T	V	D	D	V	E	P	L	L	T	L	T	N	V	N	K	L	Y	L
E	S	N	G	I	G	N	A	E	D	L	E	E	L	K	Q	V	E	H	L	I	L
G	K	N	S	V	F	Q	P	K	P	L	K	D	L	K	N	L	R	I	L	N	L
R	D	N	K	V	K	N	I	E	G	L	K	G	L	E	K	L	R	E	L	D	L
Y	K	N	K	I	T	D	V	K	A	L	D	G	L	K	N	L	E	K	L	N	L
S	N	N	E	I	K	D	L	G	S	L	S	G	L	K	Y	L	K	E	L	T	L
K	S	K	N	I	K	D	I	S	G	L	E	F	F	E	N	L	Q	S	L	D	L
----- 79 As -----																					
A	D	N	F	I	T	D	A	S	P	A	I	G	L	P	N	L	K	D	I	M	L
G	E	N	M	V	S	N	I	G	P	V	S	G	L	Q	S	L	E	T	L	D	V
G	K	N	N	I	S	D	I	S	A	V	A	N	M	K	N	L	K	T	L	S	I
H	K	N	N	I	G	S	I	A	P	L	A	S	M	E	N	L	T	R	L	Y	V
R	T	N	N	I	S	D	V	S	S	L	S	D	L	T	R	M	K	N	L	Y	L
D	S	N	Q	I	S	D	L	S	S	L	A	N	L	T	S	L	E	T	L	S	L
K	E	N	G	L	T	S	T	V	G	L	Q	N	A	L	K	L	K	E	L	F	L
N	K	N	G	V	T	S	L	G	A	L	A	A	L	P	E	L	E	W	V	T	A
N	E	N	N	V	T	D	L	S	V	V	T	N	L	K	N	L	E	R	I	S	L
N	K	N	N	V	S	N	L	A	S	I	R	D	L	T	N	L	K	S	L	N	I
G	D	N	K	L	V	S	L	A	G	I	E	N	L	V	N	L	E	S	L	D	I
N	E	T	N	V	S	D	L	T	P	I	K	N	L	I	N	L	E	R	L	T	L
T	K	T	K	V	V	S	L	E	P	L	R	G	L	T	N	L	K	A	L	V	I
G	K	N	N	I	S	N	L	E	P	L	K	S	M	D	N	L	E	N	L	Y	L
W	D	K	N	V	T	N	L	A	G	I	E	N	L	I	D	L	R	V	L	N	A

Abb. 43: Die 23 LRR-Domänen des Proteins CTC495

Die Domänen schließen - bis auf eine 79 As große Lücke - unmittelbar aneinander an. In rot sind alle Leucin-Reste hervorgehoben. Gekästelt sind alle Leucin-reichen Positionen dieser Domäne. Leucin wird des öfteren von den ähnlichen Aminosäuren Isoleucin und Valin ersetzt.

Mittlerweile sind die ersten Strukturdaten von Proteinen mit Leucin-reichen Wiederholungen ermittelt worden. Abbildung 44 zeigt die Struktur des N-Terminus von Internalin B, welches dem Internalin A sehr ähnlich ist. Der N-Terminus mit den multiplen LRR-Domänen stellt die funktionelle Region dieses Proteins dar und stellt den Kontakt zu Epithelzelloberflächenproteinen her (MARINO et al., 1999). Auch andere LRR-enthaltende Proteine sind kristallographisch analysiert worden wie das YopM-Effector-Protein aus *Y. pestis* (Abb. 44; EVDOKIMOV et al., 2001), ein essentieller Virulenzfaktor des Pest-Erregers, welcher den Blutgerinnungsfaktor Thrombin binden kann.

Abb. 44: Strukturen des N-Terminus von Internalin B aus *L. monocytogenes* und des YopM-Effektorproteins aus *Y. pestis* (MARINO et al., 1999; EVDOKIMOV et al., 2001)

Deutlich zu erkennen sind die in beiden Proteinen vorhandenen multiplen LRR-Domänen, die jeweils ein β -Faltblatt und ein Loop umfassen.

Die dritte Gruppe von Zelloberflächenproteinen in *C. tetani* beinhaltet 10 Proteine mit typischer N-terminaler Signalpeptidsequenz, die einige Zelloberflächen-Domänen aufweisen, ansonsten aber keine signifikanten Ähnlichkeiten zu Proteinen aus Datenbanken zeigen. Die Proteine CTC747, CTC749, CTC750, CTC770, CTC771, CTC772 und CTC777 besitzen 1-4 Kopien der BIG (bakterielle Immunglobulin-ähnliche)-Domänen PF02368 und PF02369, welche auch in Hüllproteinen von Phagen und bakteriellen Oberflächenproteinen wie Intimin und Invasine vorkommen. Intimine sind Adhäsionsproteine, die vor allem in pathogenen *E. coli*-Stämmen gut charakterisiert sind. Sie bewirken die Anheftung der *E. coli*-Zelle an Zellen des Intestinaltrakts (FRANKEL et al., 2001). Zusätzlich lassen sich in einigen Proteinen noch weitere bekannte Domänen identifizieren: In CTC767, CTC769 und CTC776 findet man 1-3 Kopien der Prenyltransferase- und Squalen-Oxidase-Domäne PF00432. Diese kommt z. B. in Farnesyltransferasen vor und ist in diesem Enzym wahrscheinlich an der Bindung von Peptiden beteiligt. In CTC777 lassen sich neben drei Kopien der BIG-Domäne 5 Kelch-Motive entdecken. Das Kelch-Motiv bildet ein β -Faltblatt; mehrere dieser Motive bilden eine β -Superbarrel-Struktur. Das Motiv findet sich - stets in multiplen Kopien - vor allem in eukaryotischen und viralen

Proteinen wie z. B. in Scruinen, welche Aktin quervernetzen können, oder in Neuraminidasen, die Sialinsäurereste von Glykoproteinen abspalten können.

Der Fülle verschiedener Zelloberflächenproteine in *C. tetani* ist erstaunlich. Neben solchen, die auch in anderen Organismen gefunden wurden, gibt es eine ganze Reihe neuartiger Proteine unbekannter Funktion. Die Analyse der Domänenstruktur zeigte, dass die meisten Zelloberflächenproteine aus *C. tetani* wahrscheinlich an der Herstellung des Kontaktes zu Faktoren der Außenwelt über adhäsive Mechanismen beteiligt sind. Die *C. tetani*-Zelle scheint also in der Lage zu sein, mit Faktoren des Wirts wie z. B. Gewebeoberflächen zu interagieren. Die Analyse der Genomsequenz hat also neue Erkenntnisse über die Interaktion von *C. tetani* mit seinem Wirt ergeben.

4.2.2 Übersicht über die metabolischen Fähigkeiten sowie andere zelluläre Funktionen

Abschließend sollen die aus der Genomsequenz abgeleiteten wichtigsten metabolischen Wege und weitere zelluläre Funktionen von *C. tetani* in einem Schema zusammengefasst werden (Abb. 45). Das Hauptaugenmerk wird dabei auf metabolische Merkmale des Bakteriums gelegt. So sind alle in Kapitel 3.4 erwähnten Systeme enthalten. Weitere Systeme wurden hinzugefügt, wie etwa der offensichtlich nicht vollständig vorhandene Harnstoffzyklus; es konnten zwar die ORFs für Argininosuccinat-Synthetase (CTC561), Argininosuccinat-Lyase (CTC562) und Arginase (CTC1763), aber keine Ornithin-Transcarbamoylase gefunden werden - in *C. perfringens* fehlt dagegen die Arginase. Die Nutzung eines Harnstoffzyklus würde hinsichtlich der metabolischen Präferenzen von *C. tetani* - die Vergärung von Aminosäuren - Sinn machen. Damit könnte sich *C. tetani* der beim Abbau von Aminosäuren anfallenden Mengen von Ammonium in Form von Harnstoff entledigen. Zusätzlich könnte der Harnstoffzyklus für *C. tetani* möglicherweise noch eine zweite vielleicht wichtigere Funktion haben: die Produktion von Fumarat. Das könnte das Vorhandensein der vier verschiedenen Kopien der Fumarat-Reduktase erklären. Das durch die Vergärung von Aminosäuren im Harnstoffzyklus anfallende Fumarat könnte im Rahmen einer Fumarat-Atmung als terminaler

Elektronenakzeptor genutzt werden, was möglicherweise mit einem Energiegewinn einhergehen würde. Zudem könnte das in der Fumarat-Reduktase-Reaktion gewonnene Succinat zu Butyrat umgesetzt werden. Dazu sind die Gene der Enzyme Succinat-CoA-Transferase, Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase und 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase vorhanden. Eine typische 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase wie z. B. aus *C. kluyveri* konnte nicht ausgemacht werden. Deren Funktion kann aber möglicherweise von vorhandenen Enoyl-CoA-Hydratasen übernommen werden (HENNE et al., 1999). Es bleibt zu klären, ob diese beschriebenen metabolischen Wege *in vivo* begangen werden.

Weitere zelluläre Funktionen wie die Flagellensynthese oder Chemotaxis sind in Abbildung 45 eingefügt. Auch sind die 65 gefundenen sporulationsrelevanten Proteine vermerkt, obwohl der sequenzierte *C. tetani*-Stamm E88 eine nicht sporulierende Variante darstellt. Womöglich ist der Verlust der Sporulationsfähigkeit auf den Defekt eines Gens zurückzuführen, dessen Protein regulatorische Funktion hinsichtlich der Weichenstellung zur Sporulation besitzt.

Abschließend sei bemerkt, dass das Genom für viele weitere Funktionen kodiert, die hier nicht näher erläutert werden konnten, wie z. B. Systeme der Proteinbiosynthese, der DNA-Replikation und -Modifikation; diese sagen wenig über die Besonderheiten von *C. tetani* aus, da sie im wesentlichen in allen bakteriellen Organismen vorkommen.

(nächste Seite)

Abb. 45: Übersicht über wichtige zelluläre Funktionen von *C. tetani*

Gezeigt sind in erster Linie metabolische Wege, Transportfunktionen und membranständige Systeme mit möglicher bioenergetischer Relevanz. In rot sind die ORF-Nummern der involvierten Proteine aufgeführt. Durchgezogene Pfeile deuten eine direkte Umsetzungsreaktion an, gestrichelte Linien weisen auf eine Umsetzung in mehreren Schritten oder auf sonstige Interaktionen hin. Abkürzungen: SLP, S-Layer-Protein; ABC, ATP-bindende Kasette; PTS, Phosphotransferasesystem; MDR, Multi-Drug-Resistenz; SRP, Signal recognition particle; V-Typ, Vacuolärer-Typ; ZKS, Zwei-Komponenten-Systeme.

4.3 Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelte Genomsequenz stellt das Fundament zur Erforschung des Potentials von *C. tetani* dar. Zum ersten Mal ist es nun möglich, die gesamten stoffwechselphysiologischen und bioenergetischen Möglichkeiten des Organismus zu studieren. Darüber hinaus bildet die Genomsequenz die Grundlage zur Erforschung des pathogenen Potentials von *C. tetani*. Neben der Identifizierung sämtlicher Virulenzfaktoren können nun auch die regulatorischen Netzwerke analysiert werden, welche die Pathogenitätsausprägung kontrollieren. Ein nächster Schritt wäre eine detaillierte Transkriptionsanalyse z. B. mittels der Mircoarray-Technik, die darüber Auskunft geben könnte, welche Gene des Genoms unter welchen Bedingungen tatsächlich transkribiert werden. Zur Analyse des Expressionsprofils - also aller unter den gewählten Bedingungen tatsächlich gebildeten Proteinen - böten sich Techniken wie die 2D-Gelelektrophorese an.

Die Ermittlung der Genomsequenz bietet aber auch mögliche praktische Anwendungsbezüge von - zumindest potentiell - industrieller Bedeutung. Trotz der Verfügbarkeit eines guten Impfstoffes gegen eine Tetanus-Erkrankung, des Tetanus-Toxoids, ist dessen Herstellung ein kostspieliger und aufwendiger Prozess, der gewisse Risiken mit sich bringt, da mit Wildtyp-Stämmen von *C. tetani* gearbeitet wird. Die Genomsequenz von *C. tetani* und ihr Vergleich mit den Genomen anderer pathogener Organismen bietet nun die Möglichkeit, neue Impfstoffkandidaten zu finden, die billiger herzustellen und leichter handhabbar sind. Denkbar ist auch die Entwicklung eines Impfstoffes mit erweitertem Wirkungsspektrum - auf der Grundlage eines Proteins, das nicht nur in *C. tetani* sondern darüber hinaus in eine Reihe weiterer (clostridieller) Erreger vorkommt. Die Entwicklung solcher Impfstoffe kann in Zukunft angesichts der Erkenntnis, dass sich Antibiotika-Resistenzen unter pathogenen Bakterien rasch verbreiten können, eine wichtige Strategie zur Abwehr humanpathogener Erreger sein.

5. Zusammenfassung

1. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Genom des Tetanus-Erregers *Clostridium tetani* E88 vollständig sequenziert. Es besteht aus einem 74.082 bp (Basenpaare) großen Plasmid, genannt pE88, und einem 2.799.251 bp großen Chromosom. Die Consensus-Sequenz des Genoms lag nach Abschluss der Arbeiten in durchschnittlich 9,5facher Abdeckung vor.
2. Die Sequenz des Plasmids pE88 enthält 61 offene Leserahmen (ORFs) darunter das Gen des Tetanus-Toxins, *tetX*. Die kodierende Sequenz auf pE88 beträgt insgesamt 67,1% der Gesamtsequenz. Auffällig war der niedrige G+C-Gehalt (24,5%) der pE88-Sequenz, wobei der durchschnittliche G+C-Gehalt der dritten Base eines Codons innerhalb der kodierenden Sequenz bei lediglich 15% lag.
3. Das Plasmid kodiert für ein weiteres Toxin, eine Collagenase, genannt ColT, welche die Spaltung des Bindegewebe Proteins Collagen katalysiert. Der Vergleich der Proteinsequenz von ColT mit allen bisher bekannten clostridiellen Collagenasen offenbarte, dass nur in ColT die PKD-Domäne fehlt. Über die Funktion dieser Proteindomäne ist bisher nichts bekannt.
4. Zusätzlich zum bereits charakterisierten Transkriptionsregulator des Tetanus-Toxins, TetR, kodiert das Plasmid für weitere regulatorische Proteine mit unbekannten Spezifitäten. So ließen sich die Gene für ein Zwei-Komponentensystem, für zwei Sigmafaktor-ähnliche Proteine sowie für zwei weitere regulatorische Proteine ausfindig machen. Einige dieser möglichen Regulatoren zeigten signifikante Ähnlichkeiten zu den Toxin-Synthese-Regulatoren TxeR aus *C. difficile*, BotR aus *C. botulinum* und dem UviA/B-System aus *C. perfringens*.
5. Das Plasmid kodiert des weiteren für fünf verschiedene ABC-Transporter, wobei diese Systeme jeweils aus einer ATP-hydrolysierenden Untereinheit und einer oder mehrerer transmembraner Untereinheiten bestehen. Ein Datenbank-Abgleich ergab Ähnlichkeiten einiger dieser Systeme zu Peptid-transportierenden ABC-Transportern.

6. Das Chromosom von *C. tetani* enthält mindestens 2373 ORFs; die kodierende Sequenz macht dabei 86% der Gesamtsequenz aus. Es zeigte sich, dass das Chromosom bezüglich des kodierenden Stranges eine starke Codirektionalität von Replikation und Transkription aufweist: so werden 81,1% der 2373 ORFs in der gleichen Richtung transkribiert, in der auch die Replikation verläuft. Dadurch und mittels der GC-Skew-Analyse konnte der Replikationsursprung des Chromosoms lokalisiert werden. Die Region des *ori* umfasst die Gene einer Vielzahl hoch konservierter Replikationsproteine.
7. Das Genom von *C. tetani* enthält im Gegensatz zu den Genomen vieler Enterobakterien verhältnismäßig wenig mobile Elemente wie z. B. Transposasen. Darüber hinaus lassen sich genomweit signifikante Abweichungen vom durchschnittlichen G+C- Gehalt (28,6%) lediglich in rDNA-Sequenzregionen feststellen. Somit scheint eine Akquirierung von Genen anderer Organismen durch lateralen Gentransfer kaum stattgefunden zu haben, oder aber solche Insertionsereignisse ereigneten sich schon vor langer Zeit.
8. Neben dem bereits bekannten Tetanolysin O konnte eine Reihe weiterer auf dem Chromosom kodierte Virulenzfaktoren wie Hämolyse, Fibronectin-Bindeproteine und eine wahrscheinlich für den Thrombocyten-aktivierenden Faktor spezifische Acetyl-Hydrolase identifiziert werden. Des weiteren konnten viele Exoenzyme wie Lipasen und verschiedenste Peptidasen gefunden werden, die z. T. das Zink-Bindemotiv tragen.
9. Zusätzlich konnten 32 ORFs ausgemacht werden, die möglicherweise an der Virulenzausbildung beteiligt sind. Es handelt sich dabei um Zelloberflächenproteine, die N-terminal ein Signalpeptid tragen. Drei Proteinklassen konnten unterschieden werden: 19 dieser Proteine zeigen Homologien zu charakterisierten Adhäsions- und S-Layer-Proteinen aus *C. difficile*; zwei Proteine besitzen wie die Internaline aus *Listeria monocytogenes* multiple Leucin-reiche Sequenzwiederholungen (LRR-Domänen), die wahrscheinlich an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind. 11 weitere ORFs weisen keine signifikanten Homologien zu bekannten Proteinen auf; sie besitzen allerdings charakterisierte Zelloberflächen-domänen.

10. Der Vergleich des Genoms von *C. tetani* mit den Genomen von *C. perfringens* und *C. acetobutylicum* zeigte, dass die Organismen 1506 ORFs gemein haben. Eine genomweite Konservierung der Genanordnung konnte allerdings nur in einigen Genclustern festgestellt werden. *C. tetani* besitzt 516 ORFs, die keine Homologons in *C. perfringens* und *C. acetobutylicum* haben. Zusätzlich ließen sich 199 ORFs identifizieren, die nur in den pathogenen Clostridien *C. tetani* und *C. perfringens*, nicht aber in *C. acetobutylicum* zu finden waren.
11. Viele der Gene von *C. tetani*, die in *C. acetobutylicum* nicht vorhanden sind, kodieren für Aminosäure-abbauende Proteine. Offenbar hat sich *C. tetani* auf die Degradation von Proteinen bzw. Aminosäuren spezialisiert. Im Gegensatz dazu finden sich wenige Zucker-abbauende Systeme in *C. tetani*; diese sind aber zahlreich in *C. acetobutylicum* und *C. perfringens* vorhanden.
12. Ein weiterer großer Unterschied zu *C. acetobutylicum* ist die offensichtliche Entwicklung einer ausgeprägten Natriumionen (Na^+)-Bioenergetik in *C. tetani*. Es konnte eine Vielzahl Na^+ -abhängiger Substrat-Symporter detektiert werden. *C. tetani* besitzt zudem eine Na^+ -abhängige V-Typ-ATPase, aber keine F_0F_1 -Typ-ATPase, welche in *C. acetobutylicum* und *C. perfringens* vorliegt. Zusätzlich existiert in *C. tetani* ein membrangebundenes Elektronentransportsystem, das Nqr/Rnf-System, welches wahrscheinlich als primäre Na^+ -Pumpe dient.
13. Es konnte eine Reihe weiterer membrangebundener oder -assoziierter Systeme in *C. tetani* identifiziert werden, die nicht in den beiden anderen Clostridien zu finden waren, wie z. B. vier Kopien einer Fumarat-Reduktase, die die anaerobe Atmung mit Fumarat erlauben, einen Na^+/H^+ -Antiporterkomplex, eine V-Typ- H^+ -Pyrophosphatase und ein CO-Dehydrogenase-System.
14. *C. tetani* besitzt 419 Proteine, die ein Signalpeptid tragen und somit über das Sec-System exportiert werden; dazu gehören die meisten der 167 im Genom kodierten Transportproteine. Neben dem Sec-Proteinsekretionssystem lassen sich das SRP (Signal Recognition Particle)-System sowie ein Typ II-ähnliches Sekretionssystem finden, das spezifisch für einige Arten der Gattung *Clostridium* zu sein scheint.

15. Durch die Sequenzierung des Genoms von *C. tetani* und die eingehende Analyse der erhaltenen Daten erscheint dieses Bakterium in einem neuen Licht. So wird der Umfang der vorhandenen Virulenzfaktoren ebenso deutlich wie die Bedeutung von Natriumionengradienten für die Bioenergetik. Zusätzlich konnte eine Reihe von Genen für regulatorische Proteine wie z. B. 29 Zwei-Komponenten-Systeme und 98 DNA-bindende Proteine identifiziert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bilden die Grundlage für Untersuchungen, durch die so wichtige Fragen beantwortet werden können, wie die nach dem regulatorischen Netzwerk, welches die Bildung des Tetanus-Toxins kontrolliert, und nach den Umweltsignalen, die diese Kontrolle beeinflussen.

6 Literaturverzeichnis

Ajdic, D., McShan, W. M., McLaughlin, R. E., Savic, G., Chang, J., Carson, M. B., Primeaux, C., Tian, R., Kenton, S., Jia, H., Lin, S., Qian, Y., Li, S., Zhu, H., Najar, F., Lai, H., White, J., Roe, B. A., Ferretti, J. J., 2002: Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **99**, 14434-14439.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., 1990: Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. **215**, 403-410.

Arnon, S. S., 1997: Human tetanus and human botulism. In Rood, J. I., McClane, B. A., Songer, J. G., Titball, R. W. (Hrsg.). The clostridia; molecular biology and pathogenesis, 95-115. Academic press, San Diego.

Asai, Y., Kawagishi, I., Sockett, R. E., Homma, M., 1999: Hybrid motor with H(+)- and Na(+)-driven components can rotate *Vibrio* polar flagella by using sodium ions. J. Bacteriol. **181**, 6332-6338.

Baida, G. E. & Kuzmin, N. P., 1995: Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. Biochim. Biophys. Acta **1264**, 151-154.

Bao, Q., Tian, Y., Li, W., Xu, Z., Xuan, Z., Hu, S., Dong, W., Yang, J., Chen, Y., Xue, Y., Xu, Y., Lai, X., Huang, L., Dong, X., Ma, Y., Ling, L., Tan, H., Chen, R., Wang, J., Yu, J., Yang, H., 2002: A complete sequence of the *Thermoanaerobacter tengcongensis* genome. Genome Res. **12**, 689-700.

Barquera, B., Hellwig, P., Zhou, W., Morgan, J. E., Häse, C. C., Gosink, K. K., Nilges, M., Bruesehoff, P. J., Roth, A., Lancaster, C. R., Gennis, R. B., 2002: Purification and characterization of the recombinant Na(+)-translocating NADH:quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*. Biochemistry **41**, 3781-3789.

Ba-Thein, W., Lyrstis, M., Ohtani, K., Nisbet, I. T., Hayashi, H., Rood, J. I., Shimizu, T., 1996: The virR/virS locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. **178**, 2514-2520.

Bergey, D. H., Harrison, F. C., Breed, R., Hammer, B. W., Huntoon, F. M. (Hrsg.), 1923: Bergey's manual of determinative bacteriology, 1st Ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Beveridge, T. J., Pouwels, P. H., Sara, M., Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Kari, K., Kerosuo, E., Haapasalo, M., Egelseer, E. M., Schocher, I., Sleytr, U. B., Morelli, L., Callegari, M. L., Nomellini, J. F., Bingle, W. H., Smit, J., Leibovitz, E., Lemaire, M., Miras, I., Salamitou, S., Beguin, P., Ohayon, H., Gounon, P., Matuschek, M., Koval, S. F., 1997: Functions of S-layers. FEMS Microbiol. Rev. **20**, 99-149.

Bizzini, B., 1979: Tetanus toxin. Microbiol. Rev. **43**, 224-240.

Blum, H., Beier, H., Gross, H. J., 1987: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis **8**, 93-99.

Bonfield, J. K., Smith, K., Staden, R., 1995: A new DNA sequence assembly program. Nucleic Acids Res. **24**, 4992-4999.

Bonfield, J. K. & Staden, R., 1996: Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. DNA Sequence **6**, 109-117.

Bott, M., Pfister, K., Burda, P., Kalbermatter, O., Woehlke, G., Dimroth, P., 1997: Methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Propionigenium modestum*-cloning and sequencing of the structural genes and purification of the enzyme complex. Eur. J. Biochem. **250**, 590-599.

Boynton, Z. L., Bennet, G. N., Rudolph, F. B., 1996: Cloning, sequencing, and expression of clustered genes encoding beta-hydroxybutyryl-coenzyme A (CoA) dehydrogenase, crotonase, and butyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. J. Bacteriol. **178**, 3015-3024.

Bradford, M. M., 1976: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. **72**, 248-254.

Braune, A., Bendrat, K., Rospert, S., Buckel, W., 1999: The sodium ion translocating glutacetyl-CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermentans*: cloning and function of the genes forming a second operon. Mol. Microbiol. **31**, 473-487.

Brüggemann, H., Bäumer, S., Fricke, W. F., Wiezer, A., Liesegang, H., Decker, I., Herzberg, C., Martínez-Arias, R., Merkl, R., Henne, A., Gottschalk, G., 2003: The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, in press.

Brumm, P. J., Fried, J., Friedmann, H. C., 1983: Bactobilin: blue bile pigment isolated from *Clostridium tetanomorphum*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **80**, 3943-3947.

Bryant, M. P., 1972 : Commentary on the hungate technique for cultur of anaerobic bacteria. AM. J. Clin. Nutr. **25**, 1324-1328.

Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L., Cossart, P., 2002: Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. Trends Microbiol. **10**, 238-245.

Calabi, E., Ward, S., Wren, B., Paxton, T., Panico, M., Morris, H., Dell, A., Dougan, G., Fairweather, N., 2001: Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. Mol. Microbiol. **40**, 1187-1199.

- Calabi, E. & Fairweather, N.**, 2002: Patterns of sequence conservation in the S-Layer proteins and related sequences in *Clostridium difficile*. J. Bacteriol. **184**, 3886-3897.
- Calabi, E., Calabi, F., Phillips, A. D., Fairweather, N. F.**, 2002: Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. Infect. Immun. **70**, 5770-5778.
- Canback, B., Andersson, S. G., Kurland, C. G.**, 2002: The global phylogeny of glycolytic enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **99**, 6097-6102.
- Carfi, A., Pares, S., Duee, E., Galleni, M., Duez, C., Frere, J. M., Dideberg, O.**, 1995: The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. EMBO J. **14**, 4914-4921.
- Cerquetti, M., Pantosti, A., Stefanelli, P., Mastrantonio, P.**, 1992: Purification and characterization of an immunodominant 36 kDa antigen present on the cell surface of *Clostridium difficile*. Microb. Pathog. **13**, 271-279.
- Cerrato, R., Valle, J., Gonzalez-Zorn, B., Vazquez-Bolabd, J.**, 2000: *tly* gene for tetanolysin. In GenBank abgelegte Nukleotidsequenz mit der Erkennungsnummer AJ276621.
- Chen, C. H. & Friedmann, H. C.**, 1993: Anaerobic breakdown of uroporphyrins I and III to bile pigments by extracts of *Clostridium tetanomorphum*. FEMS Microbiol. Lett. **110**, 77-83.
- Cheng, J., Guffanti, A. A., Krulwich, T. A.**, 1997: A two-gene ABC-type transport system that extrudes Na⁺ in *Bacillus subtilis* is induced by ethanol or protonophore. Mol. Microbiol. **23**, 1107-1120.
- Chester, N. & Marshak, D. R.**, 1993: Dimethyl sulfoxid-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. Anal. Biochem. **209**, 284-290.

- Cheung, J. K. & Rood, J. I.**, 2000: The VirR response regulator from *Clostridium perfringens* binds independently to two imperfect direct repeats located upstream of the pfoA promoter. J. Bacteriol. **182**, 57-66.
- Chu, G. C., Tomita, T., Sonnichsen, F. D., Yoshida, T., Ikeda-Saito, M.**, 1999: The heme complex of Hmu O, a bacterial heme degradation enzyme from *Corynebacterium diphtheriae*. Structure of the catalytic site. J. Biol. Chem. **274**, 24490-24496.
- Clarke, T. E., Tari, L. W., Vogel, H. J.**, 2001: Structural biology of bacterial iron uptake systems. Curr. Top. Med. Chem. **1**, 7-30.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J. A.**, 1994: The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**, 812-826.
- Costilow, R. N.**, 1981: Biophysical factors in growth. In Gerhardt, P., Murray, G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, R., Philips, G. B. (Hrsg.). Manual of methods for general bacteriology, 66-78. ASM, Washington D. C.
- Cruz, W. T., Nedialkov, Y. A., Thacker, B. J., Mulks, M. H.**, 1996: Molecular characterization of a common 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun. **64**, 83-90.
- Dargatz, H., Diefenthal, T., Witte, V., Reipen, G., von Wettstein, D.**, 1993: The heterodimeric protease clostripain from *Clostridium histolyticum* is encoded by a single gene. Mol. Gen. Genet. **240**, 140-145.
- Dassa, E., Hofnung, M., Paulsen, I. T., Saier, M. H.**, 1999: The *Escherichia coli* ABC transporters: an update. Mol. Microbiol. **32**, 887-889.
- Davidson, A. L.**, 2002: Mechanism of coupling of transport to hydrolysis in bacterial ATP-binding cassette transporters. J. Bacteriol. **184**, 1225-1233.

Delcher, A. L., Harmon, D., Kasif, S., White, O., Salzberg, S. L., 1999: Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4636-4641.

Deppenmeier, U., Lienard, T., Gottschalk, G., 1999: Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea. *FEBS Lett.* **457**, 291-297.

Deppenmeier, U., Johann, A., Hartsch, T., Merkl, R., Schmitz, R., Martinez-Arias, R., Henne, A., Wiezer, A., Bäumer, S., Jacobi, C., Brüggemann, H., Lienard, T., Christmann, A., Bömeke, M., Steckel, S., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Overbeek, R., Klenk, H. P., Gunsalus, R. P., Fritz, H. J., Gottschalk, G., 2002: The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**, 453-461.

Dhalluin, A., Lemee, L., Pestel-Caron, M., Mory, F., Lemeland, J.-F., Pons, J.-L., 2002: Genotypic differentiation of twelve *Clostridium* species by polymorphism analysis of the gene *tpi* encoding triosephosphate isomerase. Poster on Congress 'The World of Microbes' by IUMS, 27th July - 1st August, Paris.

Dimroth, P., 1994: Bacterial sodium ion-coupled energetics. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**, 381-395.

Dimroth, P., 1997: Primary sodium ion translocating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 11-51.

Dobbek, H., Gremer, L., Meyer, O., Huber, R., 1999: Crystal structure and mechanism of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selenylcysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 8884-8889.

Dorn, M., Andreessen, J. R., Gottschalk, G., 1978: Fumarate reductase of *Clostridium formicoaceticum*. A peripheral membrane protein. *Arch. Microbiol.* **119**, 7-11.

Driessen, A. J., Fekkes, P. & van der Wolk, J. P., 1998: The Sec system. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 216-222.

Eisel, U., Jarausch, W., Goretzki, K., Henschen, A., Engels, J., Weller, U., Hudel, M., Habermann, E., Niemann, H., 1986: Tetanus toxin: primary structure, expression in *E. coli*, and homology with botulinum toxins. *EMBO J.* **5**, 2495-2502.

Eklund, M. W., Poysky, F. T., Reed, S. M., 1972: Bacteriophage and the toxigenicity of *Clostridium botulinum* type D. *Nat. New Biol.* **235**, 16-17.

Emsley, P., Fotinou, C., Black, I., Fairweather, N. F., Charles, I. G., Watts, C., Hewitt, E., Isaacs, N. W., 2000: The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J. Biol. Chem.* **275**, 8889-8894.

Evans, G. A., Lewis, K., Rothenberg, B. E., 1989: High efficiency vectors for cosmid microcloning and genomic analysis. *Gene* **79**, 9-20.

Evdokimov, A. G., Anderson, D. E., Routzahn, K. M., Waugh, D. S., 2001: Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. *J. Mol. Biol.* **312**, 807-821.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., Green, P., 1998: Base-calling automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* **8**, 175-185.

Fairweather, N. F. & Lyness, V. A., 1986: The complete nucleotide sequence of tetanus toxin. *Nucleic Acids Res.* **14**, 7809-7812.

Fiedler, S. & Wirth, R., 1988: Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal. Biochem.* **170**, 38-44.

Finn, C. W., Silver R. P., Habig, W. H., Hardegree, M. C., 1984: The structural gene for tetanus toxin is on a plasmid. *Science* **224**, 881-884.

Frankel, G., Phillips, A. D., Trabulsi, L. R., Knutton, S., Dougan, G., Matthews, S., 2001: Intimin and the host cell-is it bound to end in Tir(s)? *Trends Microbiol.* **9**, 214- 218.

Garnier, T., & Cole, S. T., 1988a: Studies of UV-inducible promoters from *Clostridium perfringens* in vivo and in vitro. Mol. Microbiol. **2**, 607-614.

Garnier, T. & Cole, S. T., 1988b: Identification and molecular genetic analysis of replication functions of the bacteriocinogenic plasmid pIP404 from *Clostridium perfringens*. Plasmid **19**, 151-60.

Gerhardt, A., Cinkaya, I., Linder, D., Huisman, G., Buckel, W., 2000: Fermentation of 4-aminobutyrate by *Clostridium aminobutyricum*: cloning of two genes involved in the formation and dehydration of 4-hydroxybutyryl-CoA. Arch. Microbiol. **174**, 189-199.

Gill, D. M., 1982: Bacterial toxins: table of lethal amounts. Microbiol. Rev. **46**, 86-94.

Gilot, P., Jossin, Y., Content, J., 2000: Cloning, sequencing and characterisation of a *Listeria monocytogenes* gene encoding a fibronectin-binding protein. J. Med. Microbiol. **49**, 887-896.

Gordon, E. H., Pealing, S. L., Chapman, S. K., Ward, F. B., Reid, G. A., 1998: Physiological function and regulation of flavocytochrome c3, the soluble fumarate reductase from *Shewanella putrefaciens* NCIMB 400. Microbiology **144**, 937-945.

Gottschalk, G., Andreessen, J. R., Hippe, H., 1981: The genus *Clostridium*. In Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G. (Hrsg.). The prokaryotes, 1767-1803. Springer-Verlag, Berlin.

Grigoriev, A., 1998: Analyzing genomes with cumulative skew diagrams. Nucleic Acids Res. **26**, 2286-2290.

Gustafsson, C. & Persson, B. C., 1998: Identification of the *rrmA* gene encoding the 23S rRNA m1G745 methyltransferase in *Escherichia coli* and characterization of an m1G745-deficient mutant. J. Bacteriol. **180**, 359-365.

- Hanahan, D.**, 1983: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**, 557-580.
- Harrington, D. J.**, 1996: Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. Infect. Immun. **64**, 1885-1891.
- Häse, C. C., Fedorova, N. D., Galperin, M. Y., Dibrov, P. A.**, 2001: Sodium ion cycle in bacterial pathogens: evidence from cross-genome comparisons. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **65**, 353-370.
- Hatada, Y., Ito, S.**, 1999: A novel plasmid isolated from an alkaline *Bacillus* strain. EMBL/GenBank/DDBJ-Veröffentlichungsnummer: Q93RK7.
- Hayashi, M., Nakayama, Y., Unemoto, T.**, 1996: Existence of Na⁺-translocating NADH-quinone reductase in *Haemophilus influenzae*. FEBS Lett. **381**, 174-176.
- Henderson, I., Whelan, S. M., Davis, T. O., Minton, N. P.**, 1996: Genetic characterisation of the botulinum toxin complex of *Clostridium botulinum* strain NCTC 2916. FEMS Microbiol. Lett. **140**, 151-158.
- Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R. A., Gottschalk, G.**, 1999: Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. Appl. Environ. Microbiol. **65**, 3901-3907.
- Heyne, R. I., de Vrij, W., Crielaard, W., Konings, W. N.**, 1991: Sodium ion-dependent amino acid transport in membrane vesicles of *Bacillus stearothermophilus*. J. Bacteriol. **173**, 791-800.
- Hiramatsu, T., Kodama, K., Kuroda, T., Mizushima, T., Tsuchiya, T.**, 1998: A putative multisubunit Na⁺/H⁺ antiporter from *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **180**, 6642-6648.

Höner zu Bentrup, K., Ubbink-Kok, T., Lolkema, J. S., Konings, W. N., 1997: An Na⁺-pumping V1V0-ATPase complex in the thermophilic bacterium *Clostridium fervidus*. J. Bacteriol. **179**, 1274-1279.

Horowitz, J. P., Chua, J., Curby, R. J., Thomson, M. A., Da Rooge, M. A., Fischer, B. E., Mauricio, J., Klundt, I., 1964: Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indoyl- β ,D-glycopyranosides. J. Med. Chem. **7**, 547-548.

Hoskins, J., Alborn, W. E., Arnold, J., Blaszcak, L. C., Burgett, S., DeHoff, B. S., Estrem, S. T., Fritz, L., Fu, D. J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J. S., Khoja, H., Kraft, A. R., Lagace, R. E., LeBlanc, D. J., Lee, L. N., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S. M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C. W., Nicas, T. I., Norris, F. H., O'Gara, M., Peery, R. B., Robertson, G. T., Rockey, P., Sun, P. M., Winkler, M. E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, C. A., Baltz, R. H., Jaskunas, S. R., Rosteck, P. R., Skatrud, P. L., Glass, J. I., 2001: Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. J. Bacteriol. **183**, 5709-5717.

Hotze, E. M., Heuck, A. P., Czajkowsky, D. M., Shao, Z., Johnson, A. E., Tweten, R. K., 2002: Monomer-monomer interactions drive the prepore to pore conversion of a beta-barrel-forming cholesterol-dependent cytolysin. J. Biol. Chem. **277**, 11597-11605.

Hungate, R. E., 1969: A roll tube for cultivation of strict anaerobes. In Norris, J. R., Ribbons, D. W. (Hrsg.). Methods in Microbiology **3**, 117-132. Academic Press, London.

Ikegami, M., Kawano, M., Takase, K., Yamato, I., Igarashi, K., Kakinuma, Y., 1999: *Enterococcus hirae* vacuolar ATPase is expressed in response to pH as well as sodium. FEBS Lett. **454**, 67-70.

Ishikawa, J. & Hotta, K., 1999: FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G+C content. FEMS Microbiol. Lett. **174**, 251-253.

Ito, M., Guffanti, A. A., Oudega, B., Krulwich, T. A., 1999: Mrp, a multigene, multifunctional locus in *Bacillus subtilis* with roles in resistance to cholate and to Na⁺ and in pH homeostasis. J. Bacteriol. **181**, 2394-2402.

Ito, M., Guffanti, A. A., Krulwich, T. A., 2001: Mrp-dependent Na(+)/H(+) antiporters of *Bacillus* exhibit characteristics that are unanticipated for completely secondary active transporters. FEBS Lett. **496**, 117-120.

Janausch, I. G., Garcia-Moreno, I., Unden, G., 2002: Function of DcuS from *Escherichia coli* as a fumarate-stimulated histidine protein kinase in vitro. J. Biol. Chem. **277**, 39809-39814.

Jenkins, C. & Fuerst, J. A., 2001: Phylogenetic analysis of evolutionary relationships of the planctomycete division of the domain bacteria based on amino acid sequences of elongation factor Tu. J. Mol. Evol. **52**, 405-418.

Jouanneau, Y., Jeong, H. S., Hugo, N., Meyer, C., Willison, J. C., 1998: Overexpression in *Escherichia coli* of the *rnf* genes from *Rhodobacter capsulatus*-characterization of two membrane-bound iron-sulfur proteins. Eur. J. Biochem. **251**, 54-64.

Karasawa, K., Yato, M., Setaka, M., Nojima, S., 1994: Purification and characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase from peritoneal fluid obtained from guinea pigs after endotoxin shock. J. Biochem. **116**, 374-379.

Karjalainen, T., Waligora-Dupriet, A. J., Cerquetti, M., Spigaglia, P., Maggioni, A., Mauri, P., Mastrantonio, P., 2001: Molecular and genomic analysis of genes encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile*. Infect. Immun. **69**, 3442-3446.

Karjalainen, T., Saumier, N., Barc, M. C., Delmee, M., Collignon, A., 2002: *Clostridium difficile* genotyping based on *slpA* variable region in S-layer gene sequence: an alternative to serotyping. J. Clin. Microbiol. **40**, 2452-2458.

Kleerebezem, M., Quadri, L. E., Kuipers, O. P., de Vos, W. M., 1997: Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. Mol. Microbiol. **24**, 895-904.

Klein, C. & Entian, K. D., 1994: Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Appl. Environ. Microbiol. **60**, 2793-2801.

Knipppers, R., 1995: Molekulare Genetik. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart & New York.

Kofoed, E., Rappleye, C., Stojiljkovic, I., Roth, J., 1999: The 17-gene ethanolamine (eut) operon of *Salmonella typhimurium* encodes five homologues of carboxysome shell proteins. J. Bacteriol. **181**, 5317-5329.

Kogure, K., 1998: Bioenergetics of marine bacteria. Curr. Opin. Biotechnol. **9**, 278-282.

Koretke, K. K., Lupas, A. N., Warren, P. V., Rosenberg, M., Brown, J. R., 2000: Evolution of two-component signal transduction. Mol. Biol. Evol. **17**, 1956-1970.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A., und 126 weitere Autoren, 1997: The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature **390**, 249-256.

Kuroda, A. & Sekiguchi, J., 1991: Molecular cloning and sequencing of a major *Bacillus subtilis* autolysin gene. J. Bacteriol. **173**, 7304-7312.

Lander, E. S. & Waterman, M. S., 1988: Genomic mapping by fingerprinting random clones: a mathematical analysis. *Genomics* **2**, 231-239.

Lehman, T. C. & Thorpe, C., 1992: A new form of mammalian electron-transferring flavoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* **292**, 594-599.

Lemon, K. P., Kurtser, I., Wu, J., Grossman, A. D., 2000: Control of initiation of sporulation by replication initiation genes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**, 2989-2991.

Leutbecher, U., Bocher, R., Linder, D., Buckel, W., 1992: Glutamate mutase from *Clostridium cochlearium*: Purification, cobamide content and stereospecific inhibitors. *Eur. J. Biochem.* **205**, 759-765.

Leys, D., Tsapin, A. S., Nealson, K. H., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., Van Beeumen, J. J., 1999: Structure and mechanism of the flavocytochrome c fumarate reductase of *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 1113-1117.

Liles, M. R., Viswanathan, V. K., Cianciotto, N. P., 1998: Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infect. Immun.* **66**, 1776-1782.

Liles, M. R., Edelstein, P. H., Cianciotto, N. P., 1999: The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **31**, 959-970.

Lindler, L. E., Hadfield, T. L., Tall, B. D., Snellings, N. J., Rubin, F. A., Van De Verg, L. L., Hoover, D., Warren, R. L., 1996: Cloning of a *Brucella melitensis* group 3 antigen gene encoding Omp28, a protein recognized by the humoral immune response during human brucellosis. *Infect. Immun.* **64**, 2490-2499.

Lobry, J. R., 1996: Asymmetric substitution patterns in the two DNA strands of bacteria. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 660-665.

- Lowe, T. M. & Eddy, S. R.**, 1997: tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* **25**, 955-964.
- Lutcke, H.**, 1995: Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. *Eur. J. Biochem.* **228**, 531-550.
- Mani, N. & Dupuy, B.**, 2001: Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5844-5849.
- Marino, M., Braun, L., Cossart, P., Ghosh, P.**, 1999: Structure of the InlB leucine-rich repeats, a domain that triggers host cell invasion by the bacterial pathogen *L. monocytogenes*. *Mol. Cell.* **4**, 1063-1072.
- Marmur, J.**, 1961: A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**, 208-218.
- Marvaud, J.-C., Eisel, U., Binz, T., Niemann, H., Popoff, M. R.**, 1998a: TetR is a positive regulator of the tetanus toxin gene in *Clostridium tetani* and is homologous to BotR. *Infect. Immun.* **66**, 5698-5702.
- Marvaud, J.-C., Gibert, M., Inoue, K., Fujinaga, Y., Oguma, K., Popoff, M. R.**, 1998b: *botR/A* is a positive regulator of botulinum neurotoxin and associated non-toxin protein genes in *Clostridium botulinum* A. *Mol. Microbiol.* **29**, 1009-1018.
- Marvaud, J.-C., Raffestin, S., Gibert, M., Popoff, M. R.**, 2000: Regulation of the toxinogenesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. *Biol. Cell.* **92**, 455-457.
- Matsushita, O., Yoshihara, K., Katayama, S.-I., Minami, J., Okabe, A.**, 1994: Purification and characterization of a *Clostridium perfringens* 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J. Bacteriol.* **176**, 149-156.

Matsushita, O., Jung, C.-M., Katayama, S., Minami, J., Takahashi, Y., Okabe, A., 1999: Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum*. J. Bacteriol. **181**, 923-933.

Matsushita, O., Koide, T., Kobayashi, R., Nagata, K., Okabe, A., 2001: Substrate recognition by the collagen-binding domain of *Clostridium histolyticum* class I collagenase. J. Biol. Chem. **276**, 8761-8770.

McGuire, M., Huang, K., Kapadia, G., Herzberg, O., Dunaway-Mariano, D., 1998: Location of the phosphate binding site within *Clostridium symbiosum* pyruvate phosphate dikinase. Biochemistry **37**, 13463-13474.

McLean, M. J., Wolfe, K. H., Devine, K. M., 1998: Base composition skews, replication orientation, and gene orientation in 12 prokaryote genomes. J. Mol. Evol. **47**, 691-696.

Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.-M., Cossart, P., 1996: E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. Cell **84**, 923-932.

Moore, P., 1995: Handbook of botulinum toxin treatment. Blackwell Science, Oxford.

Mukherjee, K., Karlsson, S., Burman, L. G., Akerlund, T., 2002: Proteins released during high toxin production in *Clostridium difficile*. Microbiology **148**, 2245-2253.

Murata, T., Takase, K., Yamato, I., Igarashi, K., Kakinuma, Y., 1997: Purification and reconstitution of Na⁺-translocating vacuolar ATPase from *Enterococcus hirae*. J. Biol. Chem. **272**, 24885-24890.

Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V., Makarova, K. S., Zeng, Q., Gibson, R., Lee, H. M., Dubois, J., Qiu, D., Hitti, J., Wolf, Y. I., Tatusov, R. L., Sabathe, F., Doucette-Stamm, L., Soucaille, P., Daly, M. J., Bennett, G. N., Koonin, E. V., Smith, D. R., 2001: Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. J. Bacteriol. **183**, 4823-4838.

Nouwen, N. & Driessen, A. J., 2002: SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. Mol. Microbiol. **44**, 1397-1405.

Novick, R. P., 2000: Sortase: the surface protein anchoring transpeptidase and the LPXTG motif. Trends Microbiol. **8**, 148-151.

Obst, M., Oppermann-Sanio, F. B., Luftmann, H., Steinbüchel, A., 2002: Isolation of cyanophycin-degrading bacteria, cloning and characterization of an extracellular cyanophycinase gene (cphE) from *Pseudomonas anguilliseptica* strain BI. The cphE gene from *P. anguilliseptica* BI encodes a cyanophycinhydrolyzing enzyme. J. Biol. Chem. **277**, 25096-25105.

Ohtani, K., Swe, T., Hayashi, H., Shimizu, T., 1999: A novel two-component regulatory system involved in the shutdown of extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. In GenBank abgelegte Nukleotidsequenz mit der Erkennungsnummer AB028738.

Overbeek, R., Larsen, N., Pusch, G. D., D'Souza, M., Selkov, E. Jr., Kyrpides, N., Fonstein, M., Maltsev, N., Selkov, E., 2000: WIT: integrated system for high-throughput genome sequence analysis and metabolic reconstruction. Nucleic Acids Res. **28**, 123-125.

Parkhill, J., Dougan, G., James, K. D., Thomson, N. R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K. L., Bentley, S. D., Holden, M. T., Sebaihia, M., Baker, S., Basham, D., Brooks, K., Chillingworth, T., Connerton, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, R. M., Dowd, L., White, N., Farrar, J., Feltwell, T., Hamlin, N., Haque, A., Hien, T. T., Holroyd, S., Jagels, K., Krogh, A., Larsen, T. S., Leather, S., Moule, S., O'Gaora, P., Parry, C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B. G., 2001: Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**, 848-852.

Pealing, S. L., Black, A. C., Manson, F. D., Ward, F. B., Chapman, S. K., Reid, G. A., 1992: Sequence of the gene encoding flavocytochrome c from *Shewanella putrefaciens*: a tetraheme flavoenzyme that is a soluble fumarate reductase related to the membrane-bound enzymes from other bacteria. *Biochemistry* **31**, 12132-12140.

Pinkney, M., Beachey, E., Kehoe, M., 1989: The thiol-activated toxin streptolysin O does not require a thiol group for cytolytic activity. *Infect. Immun.* **57**, 2553-2558.

Ramachandran, R., Heuck, A. P., Tweten, R. K., Johnson, A. E., 2002: Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 823-827.

Ratliff, M., Zhu, W., Deshmukh, R., Wilks, A., Stojiljkovic, I., 2001: Homologues of neisserial heme oxygenase in gram-negative bacteria: degradation of heme by the product of the pigA gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**, 6394-6403.

Read, T. D., Salzberg, S. L., Pop, M., Shumway, M., Umayam, L., Jiang, L., Holtzapple, E., Busch, J. D., Smith, K. L., Schupp, J. M., Solomon, D., Keim, P., Fraser, C. M., 2002: Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science* **296**, 2028-2033.

Richaud, C. & Zabulon, G., 1997: The heme oxygenase gene (*pbsA*) in the red alga *Rhodella violacea* is discontinuous and transcriptionally activated during iron limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 11736-11741.

Riggs, M. G. & McLachlan, A., 1986: A simplified screening procedure for large numbers of plasmid miniprep. *Bio Techniques* **4**, 310-311.

Rood, J. I., 1998: Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**, 333-360.

Rossjohn, J., Feil, S. C., McKinsty, W. J., Tweten, R. K., Parker, M. W., 1997: Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* **89**, 685-692.

Saier, M. H., 1999: Classification of transmembrane transport systems in living organisms. In Van Winkle, L. (Hrsg.). *Biomembrane transport*, 265-276. Academic Press, San Diego.

Saitou, N. & Nei, M., 1987: The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.

Sandkvist, M., Michel, L. O., Hough, L. P., Morales, V. M., Bagdasarian, M., Koomey, M., DiRita, V. J., Bagdasarian, M., 1997: General secretion pathway (eps) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **179**, 6994-7003.

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

Sanger, F. S., Nicklen, S., Coulson, A. R., 1977: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* **74**, 5463-5467.

Sanger, F. S., Coulson, A. R., Hong, G. F., Hill, D. F., Petersen, G. B., 1982: Nucleotide sequence of bacteriophage Lambda-DNA. *J. Mol. Biol.* **162**, 729-773.

Sara, M. & Sleytr, U. B., 2000: S-Layer proteins. J. Bacteriol. **182**, 859-868.

Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B. R., Montecucco, C., 1992: Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. Nature **359**, 832-835.

Schiavo, G. & Montecucco, C., 1997: The structure and mode of action of botulinum and tetanus toxin. In Rood, J. I., McClane, B. A., Songer, J. G., Titball, R. W. (Hrsg.). The clostridia; molecular biology and pathogenesis, 295-322. Academic press, San Diego.

Schmehl, M., Jahn, A., Meyer zu Vilsendorf, A., Hennecke, S., Masepohl, B., Schuppler, M., Marxer, M., Oelze, J., Klipp, W., 1993: Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*: a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase. Mol. Gen. Genet. **241**, 602-615.

Schubel, U., Kraut, M., Morsdorf, G., Meyer, O., 1995: Molecular characterization of the gene cluster *coxMSL* encoding the molybdenum-containing carbon monoxide dehydrogenase of *Oligotropha carboxidovorans*. J. Bacteriol. **177**, 2197-2203.

Schwalb, C., Chapman, S. K., Reid, G. A., 2002: The membrane-bound tetrahaem c-type cytochrome CymA interacts directly with the soluble fumarate reductase in *Shewanella*. Biochem. Soc. Trans. **30**, 658-662.

Shatursky, O., Heuck, A. P., Shepard, L. A., Rossjohn, J., Parker, M. W., Johnson, A. E., Tweten, R. K., 1999: The mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin: a novel paradigm for pore-forming toxins. Cell **99**, 293-299.

Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S., Hayashi, H., 2002a: Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **99**, 996-1001.

Shimizu, T., Yaguchi, H., Ohtani, K., Banu, S., Hayashi, H., 2002b: Clostridial VirR/VirS regulon involves a regulatory RNA molecule for expression of toxins. Mol. Microbiol. **43**, 257-265.

Shumin, Z. & Dianliang, L., 2001: Cloning and sequence analysis of tetanus toxin gene. GenBank-Veröffentlichungsnummer: AF389424.

Skulachev, V. P., 1989: The sodium cycle: a novel type of bacterial energetics. J. Bioenerg. Biomembr. **21**, 635-647.

Sloan, J., Warner, T. A., Scott, P. T., Bannam, T. L., Berryman, D. I., Rood, J. I., 1992: Construction of a sequenced *Clostridium perfringens*-*Escherichia coli* shuttle plasmid. Plasmid **27**, 207-219.

Söhling, B. & Gottschalk, G., 1996: Molecular analysis of the anaerobic succinate degradation pathway in *Clostridium kluyveri*. J. Bacteriol. **178**, 871-880.

Stackebrandt, E. & Rainey, F. A., 1997: Phylogenetic relationships. In Rood, J. I., McClane, B. A., Songer, J. G., Titball, R. W. (Hrsg.). The clostridia; molecular biology and pathogenesis, 3-19. Academic press, San Diego.

Staden, R., Beal, K. F., Bonfield, J. K., 2000: The Staden package, 1998. Methods Mol. Biol. **132**, 115-130.

Steuber, J., 2001: Na(+) translocation by bacterial NADH:quinone oxidoreductases: an extension to the complex-I family of primary redox pumps. Biochim. Biophys. Acta **1505**, 45-56.

Studier, F. W. & Moffatt, B. A., 1986: Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.

Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., Brunger, A. T., 1998: Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347-353.

Swaminathan, S. & Eswaramoorthy, S., 2000: Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 693-699.

Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., Hiramata, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., Kuhara, S., Horikoshi, K., 2000: Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4317-4331.

The international polycystic kidney disease consortium, 1995: Polycystic kidney disease: the complete structure of the PKD1 gene and its protein. *Cell* **81**, 289-298.

Tillier, E. R. M., Collins, R. A., 2000: Replication orientation affects the rate and direction of bacterial gene evolution. *J. Mol. Evol.* **51**, 459-463.

Tizzoni, G & Cattani, G., 1890: Untersuchungen über das Tetanusgift. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **27**, 432-450.

Tsuda, H., Yamashita, Y., Shibata, Y., Nakano, Y., Koga, T., 2002: Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3756-3764.

Turner, D. C. & Stadtman, T. C., 1973: Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* **154**, 366-381.

Tweten, R. K., 1997: The thiol-activated clostridial toxins. In Rood, J. I., McClane, B. A., Songer, J. G., Titball, R. W. (Hrsg.). The clostridia; molecular biology and pathogenesis, 211-221. Academic press, San Diego.

van Wely, K. H., Swaving, J., Freudl, R. & Driessen, A. J., 2001: Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **25**, 437-454.

Waligora, A. J., Hennequin, C., Mullany, P., Bourlioux, P., Collignon, A., Karjalainen, T., 2001: Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. Infect. Immun. **69**, 2144-2153.

Wassilak, S. G. F. , Orenstein, W. A., Sutter, R. W., 1999: Tetanus toxoid. In Plotkin, S., Orenstein, W. (Hrsg). Vaccines, 441-474. W. B. Saunders Company, Philadelphia.

Waterman, M. S., 1984 : Efficient sequence alignment algorithms. J. Theor. Biol. **108**, 333-337.

Weidner, U., Geier, S., Ptock, A., Friedrich, T., Leif, H., Weiss, H., 1993: The gene locus of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*. Organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex I. J. Mol. Biol. **233**, 109-122.

Wenzel, R. & Herrmann, R., 1996: Cosmid cloning with small genomes. In Birren, B. & Lai, E. (Hrsg.). Nonmammalian genomic analysis: a practical guide. Academic Press Inc.

WHO (World Health Organisation), 2000: Maternal and neonatal tetanus elimination by 2005. Strategies for achieving and maintaining elimination (<http://www.who.int/vaccines/en/tetanus.shtml>). Annual Report 2000.

Wilde, E., Hippe, H., Tosunoglu, N., Schallehn, G., Herwig, K., Gottschalk, G., 1989: *Clostridium tetanomorphum* sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. **39**, 127-134.

Young, G. M., Schmiel, D. H., Miller, V. L., 1999: A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **96**, 6456-6461.

Youngleson, J. S., Jones, D. T., Woods, D. R., 1989: Homology between hydroxybutyryl and hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase enzymes from *Clostridium acetobutylicum* fermentation and vertebrate fatty-acid β -oxidation pathways. J. Bacteriol. **171**, 6800-6807.

Zhou, Y., Sugiyama, H., Nakano, H., Johnson, E. A., 1995: The genes for the *Clostridium botulinum* type G toxin complex are on a plasmid. Infect. Immun. **63**, 2087-2091.

Zwieb, C. & Samuelsson, T., 2000 : SRPDB (signal recognition particle database). Nucleic Acids Res. **28**, 171-172.

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk für die Überlassung des Themas, die Ermöglichung zum selbständigen wissenschaftlichen Arbeiten, seine in vielfältiger Weise gewährte Unterstützung und dafür, dass ich an nationalen wie internationalen Tagungen teilnehmen durfte. Insbesondere möchte ich ihm für sein großes Interesse und Engagement für das *Clostridium tetani*-Genomprojekt danken.

Den ehemaligen und jetzigen Mitgliedern des Göttinger Genomlabors möchte ich für die gute Zusammenarbeit (beim Puzzeln mit Genomsequenzen) danken; vor allem sei dem Sequenzierteam für die hervorragende Arbeit gedankt: Anke Henne (Dankeschön auch für die Korrekturarbeit), Armin Wiezer, Axel Strittmatter, Birgit Veith, Carsten Raasch, Christina (,Kombiniere') Herzberg, Elke Raade, Elzbieta Brzuszkiewicz, Heiko (,ERGO') Liesegang, Iwona Decker (dzi kuje !), Jarek Sobkowiak, Kirsten (,pragmatische Problemlöserin') Hahne, Mechthild Bömecke, Monika Grzywa, Olaf Waase, Olivia Gohl, Rainer Merkl, Ralf Westermann, Rosa Martínez-Arias, Rosalie Bauer, Sebastian Bäumer, Silke Denker, Silke Schlenzeck, Silke Steckel und Thomas Jeffke. Ein besonderes Dankeschön an Florian (,Annotator') Fricke für sein Durchhaltevermögen. Ein großes Dankeschön auch an meine Lehrmeister Andre Johann und Thomas Hartsch, die mich in die Welt der Genomsequenzierung eingearbeitet haben.

Allen weiteren Mitgliedern des Instituts, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei an dieser Stelle gedankt.

De corazón agradezco a Rosa sus consejos (no solamente phylogénéticos), su simpatía y su apoyo en los días oscuros.

Ein herzliches Dankeschön an die ,Welt da draußen' für viele schöne Erlebnisse und gemeinsame Erkenntnisse; insbesondere an Holger (,Ich-Du-Holongi'), Andrea (,Düsenberg'), Tom und Anne sowie an meine Brüder Jürgen, Andreas und Ingo.

Herzlich danke ich meinem Vater für die in vielerlei Hinsicht geleistete Unterstützung.

Meiner Mutter

Lebenslauf

26.12.1972	Geburt in Neuenhaus
1979-1985	Besuch der Grundschule und Orientierungsstufe Neuenhaus
1985-1992	Besuch der KGS Neuenhaus - Schulzweig Gymnasium
Mai 1992	Abitur
September 1992 bis Oktober 1993	Zivildienst im Altenwohncentrum der AWO in Nordhorn
Oktober 1993	Immatrikulation an der Georg August-Universität zu Göttingen für das Studienfach Biologie (Diplom)
Oktober 1995	Diplomvorprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Chemie und Physikalische Chemie
September 1996 bis Juni 1997	Erasmus / Sokrates-Studienjahr an der 'School of Biological Sciences' der University of Birmingham, UK. Prüfungsfächer: Bacterial Genetics, Virology, Immunology, Molecular Cell Biology, Environmental Microbiology.
März 1998 bis Juni 1998	Viermonatiges Industriepraktikum in der Pharmatechnik-Abteilung Mikrobiologie der Bayer AG, Wuppertal; Projekt ,Optimierung der Fermentation und Biotransformation von <i>Gluconobacter oxydans</i> zur Oxidation von Zuckerderivaten im Rahmen der Produktion des Antidiabetikums Miglitol [®] , unter Anleitung von Dr. Schedel
Oktober 1998	Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Immunologie und Chemie
Dezember 1998 bis Dezember 1999	Experimentelle Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. G. Gottschalk mit dem Titel: ,Vergleichende molekularbiologische Untersuchungen zur F ₄₂₀ H ₂ -Dehydrogenase aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i> und <i>Methanosarcina mazei</i> Gö1'
März 2000	Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation