

Charakterisierung des bakteriellen Toxins BsrG aus *Bacillus subtilis*

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Chem. Katharina Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2017

Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

Korreferent: Prof. Dr. Frank Breitling



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz (CC BY-SA 4.0):
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.de>

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2014 bis Dezember 2017 am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT), unter der Leitung von Prof. Dr. Anne S. Ulrich angefertigt.

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorstehende Dissertation selbstständig angefertigt und die benutzten Hilfsmittel, Quellen sowie die befragten Personen und Institutionen vollständig angegeben habe. Darüber hinaus versichere ich, dass ich die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in der gültigen Fassung beachtet habe.

Katharina Becker

Danksagung

Zu Beginn möchte ich die Gelegenheit nutzen, all jenen meinen Dank auszusprechen, die mich während meiner Promotion auf die ein oder andere Weise unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis und die hervorragende Arbeitsatmosphäre. Vielen dank für die vielen Ratschläge, Denkanstöße und das Vertrauen in das BsrG-Projekt.

Frau Dr. Birgid Lange danke ich ebenfalls für die Unterstützung während der Jahre meiner Promotion.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Dirk Windisch für den ein oder anderen wichtigen Denkanstoß, die Hilfe bei der Interpretation meiner Ergebnisse sowie bei wichtigen Fragen zur Strukturanalyse.

Dr. Stephan Grage danke ich herzlich für seine schier endlose Geduld in allen NMR-Fragen.

Bei Dr. Sergii Afonin möchte ich mich herzlich für die Durchführung der Unmengen an MALDI-TOF-Messungen bedanken sowie für wertvolle Denkanstöße.

Christian Weber danke ich für die ständige und freundliche Hilfe im Labor. Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck danke ich herzlich für die freundliche und zuvorkommende Hilfe am Campus Nord.

Dr. Marina Berditsch möchte ich von Herzen dafür danken, dass sie mit mir die ersten MIC-Tests mit BsrG durchgeführt und ausgewertet hat und dass sie stets als Ansprechpartnerin in mikrobiologischen Fragen zur Verfügung stand und ihre Expertise so bereitwillig teilte.

Dr. Parvesh Wadhvani danke ich herzlich für alle Denkanstöße und seine selbstverständliche Hilfe bei allen Fragen.

Dr. Oleg Babii möchte ich für seine Hilfe bei der Durchführung der Hämolysetests danken.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Johannes Reichert, welcher mich geduldig in die Welt der Leakage-Experimente eingelernt und stets kompetent unterstützt hat.

Dr. Jochen Bürck danke ich von Herzen für die Hilfe mit den CD-Experimenten sowie für seine Fachexpertise, die er stets bereitwillig teilte.

Bianca Posselt und Sigmar Roth danke ich für ihre ständige freundliche und selbstverständliche Hilfe und Unterstützung in allen Belangen rund um die CD.

Weiterhin bedanke mich bei der Synchrotron-Strahlungsquelle ANKA am Campus Nord des KIT für die Möglichkeit der Aufnahme von SRCD und SROCD-Spektren am UV-CD12-Strahlrohr.

Dem Graduiertenkolleg (GRK) 2039 - *Molekulare Architekturen für die fluoreszente Bildgebung von Zellen* danke ich für die Möglichkeit als Mitglied an Weiterbildungsmaßnahmen und allem darüber hinaus teilnehmen zu können.

Bei Frau Gabriele Buth möchte ich mich für die freundliche Hilfe bei allen bürokratischen Belangen und sonstigen Problemen danken.

Stefanie Vollmer danke ich für die großartige Hilfe bei den ersten Schritten im BsrG-Projekt und der Herstellung der Mutanten. Danke, dass du nie müde wurdest mir Gentechnik näherzubringen.

Tamta Turdzeladze danke ich von Herzen dafür, dass sie so selbstverständlich als Ansprechpartnerin in allen Belangen zur Verfügung stand.

Einen lieben Dank an Ronja Kammerichs für jede Art von Hilfe im Labor und darüber hinaus.

Meine Kollegen Lena, Samantha, Anni und Timi danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und tolle Arbeitsatmosphäre. Allen Mitgliedern des Arbeitskreises Ulrich am Campus Nord und Süd danke ich für die

freundschaftliche und harmonische Arbeitsatmosphäre. Bei meinen Freunden innerhalb und außerhalb der Uni möchte ich mich ebenfalls herzlich bedanken, weil sie so oft zurückstecken mussten und mich trotzdem so selbstverständlich unterstützt haben.

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön geht an Benny. Danke für alles! Meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Verlobten Stefan danke ich von Herzen für alles was sie in den letzten Jahren und auch davor für mich getan haben. Diese Arbeit ist ihnen gewidmet.

Karlsruhe, November 2017

Katharina Becker

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Motivation	1
1.2	Toxin/Antitoxin-Systeme	3
1.3	Helix-Helix-Interaktionen in Membranen	24
1.4	BsrG als potentieller H-Zipper	43
2	Zielsetzung	47
3	Methoden	49
3.1	Arbeitsmethoden zur Herstellung von Ausgangsmaterial	49
3.1.1	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	49
3.1.2	Mikrobiologische Arbeitsmethoden	55
3.1.3	Proteinbiochemische Arbeitsmethoden	59
3.2	Methoden zur Struktur- und Funktionsanalyse	68
3.2.1	Mikrobiologische Methoden zur Struktur- und Funktionsanalyse	68
3.2.2	Biophysikalische Methoden zur Struktur- und Funktionsanalyse	76
4	Ergebnisse	101
4.1	Herstellung von Ausgangsmaterial	101
4.2	Charakterisierung von BsrG-wt	112
4.2.1	Sekundärstrukturanalyse	112
4.2.2	Orientierung in Modellmembranen	114
4.2.3	Assemblierungsverhalten	117

4.2.4	Funktion und Membranolyse	120
4.3	Untersuchung der BsrG-Mutanten	125
4.3.1	Sekundärstrukturanalyse	125
4.3.2	Orientierung in Modellmembranen	128
4.3.3	Assemblierungsverhalten	130
4.3.4	Funktion und Membranolyse	133
4.4	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	136
5	Diskussion	139
6	Zusammenfassung	151
A	Materialien	153
B	Abkürzungen	169
C	Einheiten und Symbole	173

1 Einleitung

1.1 Motivation

Obwohl sich biologische Membranen hauptsächlich aus Lipiden zusammensetzen, wird deren Funktion maßgeblich durch integrierte Membranproteine bestimmt. Fast 30 % aller ORF (*open reading frame*) des menschlichen Genoms kodieren für diese Proteinklasse, welche als Ionenkanäle, Poren oder Rezeptoren für den Transport von Stoffen oder Informationen über die Membran verantwortlich sind und aufgrund ihrer biologischen Relevanz häufig als Angriffspunkt für eine Vielzahl von Medikamenten fungieren [1, 2].

Maßgeblich für die Funktion von Membranproteinen ist deren korrekte Faltung, Orientierung und Assemblierung in der Membran, welche nicht nur durch Wechselwirkungen mit Liganden oder löslichen Domänen, sondern vielmehr durch spezifische Helix-Helix-Wechselwirkungen deren Transmembrandomänen (TMD) vermittelt wird [3, 4]. Die Erforschung dabei zugrundeliegender spezifischer Interaktionsmotive ist der Schlüssel zum Verständnis der Funktion und des Wirkmechanismus von Membranproteinen und erlaubt darüber hinaus die Formulierung elementarer Interaktionsmotive und deren damit verbundene Manipulation bzw. deren zielgerichteten Einsatz in der Medizin.

Toxin-Antitoxin (TA)-Systeme rücken immer mehr in den Fokus der Antibiotikaforschung. Nahezu alle Toxine aus Typ I TA-Systemen sind kleine, bis zu 60 AS (Aminosäuren) lange α -helikale Membranproteine, welche über spezifische Helix-Helix-Wechselwirkungen Poren oder Kanäle in der

Membran ausbilden können [5,6]. Diese Toxine besitzen zwar einerseits das Potential, Bakterien abzutöten, was sie als alternative antimikrobielle Wirkstoffe interessant macht, sind andererseits aber auch für die hohe Virulenz vieler klinischer Pathogene verantwortlich, da sie die Bildung von Biofilmen und persistenten Zellen bedingen können, welche gegenüber Antibiotika und anderen Umweltbelastungen eine hohe Toleranz aufweisen [7, 8]. Dass die Virulenz eines Bakteriums eng mit der Anzahl an TA-Systemen verknüpft ist, zeigt sich deutlich am Beispiel von *M. tuberculosis*. Dieses Pathogen besitzt erstaunlicherweise 80 TA-Systeme, wohingegen das nicht-pathogene verwandte Bakterium *M. smegmatis* nur drei TA-Systeme aufweist [7]. In *M. tuberculosis* bewirken TA-Systeme die extrem lange Dormanz dieses Pathogens und verantworten damit den chronischen, rezidivierenden Verlauf der Infektion. Alleine in Deutschland sind laut dem „Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland 2016“ 5915 Tuberkulosefälle verzeichnet worden, 100 davon mit tödlichem Ausgang [9]. 2,7 % dieser Erkrankungen wurden durch multiresistente Stämme verursacht, welche generell ein immer größeres Problem in der Behandlung von Infektionskrankheiten darstellen. Die Forschung an TA-Systemen im Allgemeinen ist daher von großer biologischer und medizinischer Relevanz. Ein Kernelement dieser Forschung ist die Aufklärung der Toxin-Mechanismen, deren Schlüssel in der Kenntnis deren Funktion und Struktur bzw. der dabei involvierten Interaktionsmotive liegt.

Das strukturell unerforschte Toxin BsrG ist nicht nur aufgrund seiner großen biologischen Relevanz als Komponente eines Typ I TA-Systems von Interesse. BsrG qualifiziert sich durch seine geringe Größe von 38 AS als eine Art natürliches Modellpeptid zur Charakterisierung von Helix-Helix-Wechselwirkungen. Von besonderem Interesse ist dabei dessen außergewöhnliche AS-Sequenz, welche - unter der Annahme, dass BsrG analog zu anderen Toxinen dieser Klasse fungiert - ein neues Interaktionsmotiv zur Beschreibung von Helix-Helix-Wechselwirkungen aufzeigen könnte [10, 11].

1.2 Toxin/Antitoxin-Systeme

Toxin/Antitoxin (TA)-Systeme sind ubiquitär in Bakterien und finden sich darüber hinaus in Archaea sowie einigen Fungi. Kodiert werden diese Module vorwiegend in einem Operon, der auf Plasmid-, Phagen- oder chromosomaler DNA lokalisiert sein kann. TA-Operons bestehen aus zwei, seltener drei (*hok/sok*, $\omega - \epsilon - \zeta$) benachbarten Genen, die für ein stabiles toxisches Peptid und ein instabiles Antitoxin kodieren, welches den toxischen Effekt seines Gegenspielers neutralisiert [8, 12–16].

Das erste TA-System wurde vor über 30 Jahren auf dem F-Plasmid von *E. coli* lokalisiert (*ccdAB*) [17–19]. Als regulatorisches Element sichert *ccdAB* den Erhalt des F-Plasmids bei der Zellteilung, indem das stabile Toxin CcdB den Zelltod einer plasmid-freien Tochterzelle bedingt, sofern dessen toxische Wirkung nicht durch nachgebildetes Antitoxin neutralisiert werden kann. Dieses Phänomen wird als *post segregational killing* (PSK) bezeichnet und beschreibt eine der wesentlichen und naheliegenden Funktionen von plasmidbasierten TA-Systemen (TA_P).

Obwohl chromosomale TA-Systeme (TA_C) um ein Vielfaches häufiger vertreten sind als TA_P-Systeme, konnte deren Funktion und physiologische Bedeutung lange nicht eindeutig erklärt werden.

Unter Normalbedingungen neutralisiert ein Antitoxin - als Peptid oder nicht-kodierende sRNA - den Effekt seines toxischen Pendantes. Unter Stresssituationen erfolgt dagegen eine rasche Degradation des Antitoxins, wodurch das Toxin frei wirken kann. Die Toxine unterschiedlicher TA-Systeme agieren äußerst divers indem sie Schlüsselmoleküle essentieller zellulärer Prozesse indoktrinieren, selbst direkt in diese Prozesse eingreifen oder die Integrität der Zellmembran zerstören [18]. Trotz ihrer Diversität bewirken sie alle unter bestimmten Bedingungen das Absterben einiger Zellen oder inhibieren so lange das Zellwachstum, bis die externen Bedingungen für den Mikroorganismus wieder günstiger sind. Die damit einhergehende Entstehung von persistenten Zellen sowie Biofilmbildung ist verantwortlich für die Virulenz

einiger klinischer Pathogene und stellt mitunter die größte Herausforderung bei einer effektiven Behandlung von Infektionskrankheiten mit Antibiotika dar [7].

Klassifizierung von TA-Systemen

Je nach Natur und Wirkmechanismus des Antitoxins werden TA-Systeme in sechs Klassen (I - VI) unterteilt (Abb. 1.1-1.6). Eine Auswahl verschiedener Mechanismen von Antitoxinen und Toxinen sowie die Diversität deren Targets werden anhand ausgewählter Beispiele im folgenden Text beschrieben. In Tabelle 1.1 und Abb. 1.7 sind die vorgestellten TA-Systeme sowie deren Mechanismen und Funktionen zusammengefasst.

Typ I TA-Systeme

Antitoxine der Typ I TA-Systeme sind untranslatierte, instabile sRNA von 50-250 nt (Nukleotide) Länge (Abb. 1.1). Die Neutralisierung des Toxins erfolgt durch eine Basenpaar-vermittelte Komplexbildung der Antitoxin sRNA mit der mRNA des Toxins. Antitoxine können dabei direkt die SD-Sequenz (Shine-Dalgarno) in der RBS (Ribosomenbindestelle) blockieren (*symE/symR*) oder durch Basenpaarung am 3'-Ende der Toxin-mRNA eine strukturelle Neuordnung der Toxin-mRNA induzieren, sodass die SD-Sequenz für Ribosomen nicht mehr zugänglich ist und eine Translation inhibiert ist (*bsrG/sR4*). Bei anderen Systemen wird eine Blockierung der RSS (Ribosomen Standby-Stelle) beobachtet (*tisB/istRI*). Eine Translationsinhibition kann zusätzlich von einem RNA-Abbau durch RNasen begleitet sein (*bsrG/sR4*) [20]. Toxin- und Antitoxin-Gene sind entweder wie im Fall von *hok/soc* und *txpA/ratA* überlappend angeordnet und werden konvergent transkribiert (cis-kodierte Antisense Antitoxin sRNA) oder sind wie im Beispiel von *tisB/istRI* divergent transkribierte Gen-Paare (trans-kodierte Antitoxin sRNA). Im Gegensatz zu anderen TA-Systemen werden beide Gene unabhängig voneinander unter ihrem eigenen Promotor transkribiert. Mit der

Ausnahme von SymE handelt es sich bei allen Toxinen dieser Klasse um kleine, max. 60 AS lange, hydrophobe α -helikale Peptide mit einer TMD, welche analog zu Phagenholinen eine porenbildende Funktion aufweisen und so unter anderem in die ATP-Synthase eingreifen. Zu den prominenten Beispielen von Typ I Systemen in *E. coli* zählen die bereits erwähnten TA-Module *tisB/istR1*, *hok/sok* und *symER*.

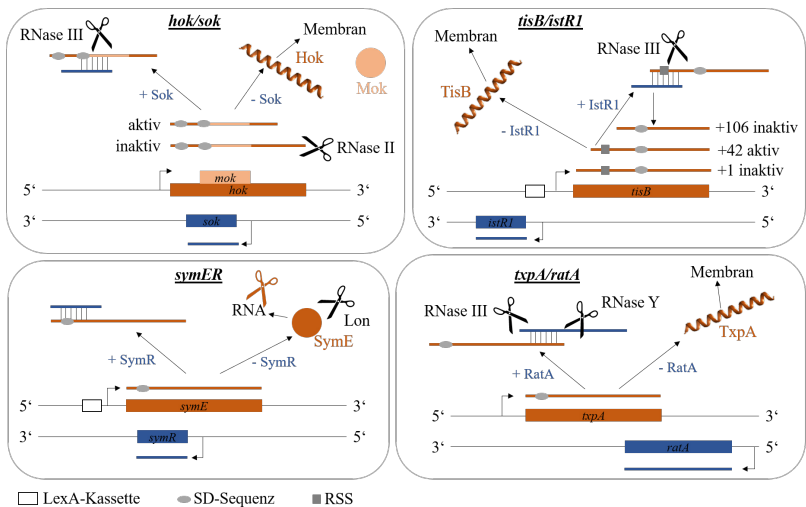


Abbildung 1.1: Typ I TA-Systeme. Antitoxine dieser Klasse sind RNA, welche einen zytotoxischen Effekt durch Komplexbildung mit der mRNA des Toxins neutralisieren. Toxin-Strukturen sind orange und Antitoxine blau gefärbt.

Das erste und bisher am besten charakterisierte System *hok/sok* wurde vor ca. 30 Jahren von Gerdes *et al.* auf dem *E. coli* Plasmid R1 lokalisiert [21, 22]. Die Regulierung dieses Systems ist deutlich komplexer als die anderer Module. *sok*-Antitoxin-RNA besitzt zwar einen deutlich stärkeren Promotor als *hok*, aber auch eine extrem kurze Halbwertszeit von ca. 30 s. Für das Toxin gilt Gegensätzliches: die Transkription der *hok*-mRNA erfolgt unter einem sehr schwachen Promotor, die Halbwertszeit dieses Toxins

ist mit 20 min aber etwa 40 Mal so lang wie die des Antitoxins. Transkribierte *hok*-mRNA bildet eine Sekundärstruktur aus, welche weder Ribosomen noch dem Antitoxin Sok zugänglich ist. Eine Prozessierung des 3'-Endes der *hok*-mRNA bewirkt eine strukturelle Neuordnung, wodurch die Translation, aber auch die Bindung der *sok*-RNA ermöglicht wird. Die SD-Sequenz von *hok* wird bei einer Komplexbildung nicht von der Antitoxin-RNA überdeckt. Interessanterweise findet sich auf dem *hok/sok*-Lokus noch ein drittes Gen - *mok* (*modulator of killing*) - welches beinahe vollständig mit dem *hok*-Gen überlappt. Die ORF von *mok* und *hok* sind folglich translationally gekoppelt. Anstelle, dass Sok mit der SD-Sequenz der *hok*-mRNA eine komplementäre Basenpaarung eingeht, kann *sok*-RNA die Translation von *hok* indirekt unterbinden, indem sie die Translation von *mok* inhibiert. Der *hok*-mRNA/*sok*-RNA-Komplex wird durch RNase III geschnitten, was die mRNA des Toxins zerstört, aber wie beschrieben nicht der essentielle Mechanismus der Regulierung dieses Moduls ist. Bei Überexpression von Hok integriert sich das toxische 52 AS lange Peptid in die innere Zellmembran und verursacht durch den Efflux und Influx kleiner Moleküle die Depolarisierung der Membran, wodurch die ATP-Synthese inhibiert wird und als Konsequenz davon Replikation, Transkription und Translation gravierend gehemmt werden. Eine weitere wichtige Rolle wird diesem System nicht nur als PSK-Faktor, sondern auch bei der Bildung von persistenten Zellen sowie bei der Abwehr einer Invasion durch T4 Phagen zugeschrieben.

Die Promotoren der Module *tisB/istRI* und *symRE* liegen in der Nähe der LexA-Kassette und stehen damit unter SOS-Kontrolle. Maßgeblich für die Regulierung und Induzierung der SOS-Antwort in *E. coli* sind die beiden Proteine LexA und RecA. Das inaktive RecA wird durch DNA-Schädigung stimuliert und lagert sich an DNA-Einzelstränge an, wo es durch ATP aktiviert wird. In diesem Zustand inaktiviert es das Suppressor-Protein der LexA-Kassette LexA, indem es dessen Autoproteolyse induziert. Die folgende Abspaltung des inaktivierten LexA-Proteins von der DNA gibt die Transkription der in der Promotorregion von LexA enthaltenen SOS-Gene frei,

darunter beispielsweise *tisB* bzw. *symE*. Beide Module finden sich auf dem Chromosom von *E. coli*.

Die Translation der SymE-Toxin mRNA wird inhibiert, indem die SymR-Antitoxin RNA an die RBS des Toxins bindet und dabei direkt die SD-Sequenz blockiert [14, 23]. Als einziges Toxin dieser Klasse besitzt SymE keine Transmembrandomäne, dafür aber Endonukleaseaktivität und schneidet vergleichbar zu MazF zelluläre mRNA und nicht-kodierende RNA, mit Ausnahme seines eigenen Antitoxins SymR. Unter SOS-Bedingungen beseitigt SymE geschädigte RNA, die sonst in Bakterien akkumulieren würde. Eine posttranslationale Regulierung von SymE erfolgt durch die Lon-Protease. Analog zu SymE wird die Transkription von *tisB* unter Normalbedingungen ebenfalls durch LexA gehemmt [5, 24, 25].

Das primäre TisB-Transkript (+1) ist inaktiv. Erst nach Prozessierung des 5'-Endes durch eine Endonuklease wird das kürzere aktive +42 mRNA-Transkript erhalten, an dessen RSS sowohl die 30S Untereinheit des Ribosoms als auch das Antitoxin IstR1 binden und so eine Anlagerung des Ribosoms unterbinden kann. Als Folge der Bindung von IstR1 schneidet RNase III das +42 Transkript, wodurch das inaktive +106 Transkript entsteht. Unter SOS-Bedingungen wird das 29 AS lange Toxin TisB exprimiert, das sich rasch in die innere Membran integriert. Zwei TisB-Helices sind in der Membran als antiparalleles Dimer angeordnet und bilden vier Salzbrücken zwischen D⁵-K²⁶, K¹²-D²², D²²-K²⁶ und K²⁶-D⁵ aus (Kapitel 1.3, Seite 28). Durch diesen elektrostatischen Charge-Zipper - welcher in Kapitel 1.3 ausführlich beschrieben ist - wird ein stabiler Ionenkanal errichtet, welcher den Efflux bzw. Influx von Oxonium- und Hydroxidionen durch die hydrophobe Membran erlaubt. Die daraus resultierende Membrandepolarisierung bewirkt eine Inhibition der ATP-Synthese, wodurch letztlich die Replikation, Transkription und Translation von Makromolekülen zum Erliegen kommt. Bei einer Überexpression führen diese Auswirkungen zum Zelltod, was aber nicht der biologischen Relevanz von TisB unter SOS-Bedingungen entspricht. Tatsächlich wird der Zelltod nicht bei einer einzelnen chromoso-

malen TisB-Kopie beobachtet. Eine 1000-fach induzierte Expression von TisB unter SOS-Bedingungen resultiert stattdessen in der Bildung von persistenten Zellen, welche eine hohe Toleranz gegenüber Antibiotika zeigen, wie anhand von Experimenten mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin nachgewiesen wurde [26, 27]. Sobald sich die äußeren Bedingungen wieder normalisieren, agiert LexA erneut als Repressor von *tisB* und IstR1 inaktiviert die noch vorhandene Toxin mRNA.

2005 wurde das Modul *txpA/ratA* als erstes Typ I TA-System auf dem Chromosom von *B. subtilis* lokalisiert [11, 28–30]. Bereits fünf Jahre später waren 13 weitere potentielle Typ I TA_c-Systeme in *B. subtilis* bekannt, die hauptsächlich auf Phagenelementen lokalisiert sind. Die Toxine dieser Module werden entsprechend ihrer AS-Sequenz in die vier Toxinfamilien TxpA/BsrG, BsrH/BsrE, YonT und YheZ untergliedert. Das Modul *txpA/ratA* ist auf der *skin* Prophage von *B. subtilis* lokalisiert und kodiert für ein toxisches 59 AS langes Toxin, welches analog zu den meisten Typ I Toxinen stark hydrophob ist und eine potentielle TMD aufweist. Die Antisense RNA RatA ist 220 nt lang und überlappt um ca. 120 bp (*base pair*, Basenpaar) am 3'-Ende mit der mRNA von *txpA*. RatA neutralisiert den toxischen Effekt von *txpA*, indem es mit der Toxin-mRNA einen RNA-Duplex ausbildet, welcher durch RNase III und RNase Y abgebaut wird. *txpA*-Homologa finden sich nicht nur in *B. subtilis*, sondern auch in anderen Bazillen oder Clostridien. In *E. faecalis* konnte ein regulatorischer Effekt des Typ II TA-Systems *mazEF* auf *txpA/ratA* nachgewiesen werden. Der MazEF-Komplex fungiert wie bereits erwähnt als Autorepressor seines eigenen Operons. In *E. faecalis* reguliert er außerdem durch die Bindung an andere Promotoren die Transkription des Antitoxins RatA.

Der biologische Hintergrund des Typ I TA-Systems *bsrG/sr4* wird aufgrund seiner Relevanz in dieser Arbeit separat beschrieben (Seite 19).

Typ II TA-Systeme

Typ II TA-Systeme bilden die bisher größte und am besten charakterisierte Klasse an TA-Modulen unter Bakterien und Archaeen und sind meist in einem Operon und unter einem gemeinsamen Promotor organisiert (Abb. 1.2) [31, 32]. Das Antitoxin-Gen liegt meistens *upstream* durch einige bp getrennt oder überlappend vor dem Toxin-Gen. Die Antitoxine dieser Systeme sind im Gegensatz zu Typ III und Typ I Antitoxinen Proteine, welche aber im Gegensatz zu Typ IV Antitoxinen direkt mit dem Toxin in Wechselwirkung treten. Die Inaktivierung des Toxins erfolgt posttranslational durch die Ausbildung eines Protein-Protein-Komplexes aus Toxin und Antitoxin. Die meisten Typ II Antitoxine besitzen neben einer Toxin-bindenden (meist C-terminalen) Domäne noch eine zweite (meist N-terminale) DNA-bindende Domäne. Auf diese Weise kann das Antitoxin - alleine oder als Komplex mit dem Toxin als Co-Repressor - beispielsweise an eine palindromische Sequenz in der Promotorregion des eigenen Operons binden und so eine weitere Transkription unterdrücken. In den meisten Fällen verstärkt eine Bindung des Toxins an das Antitoxin eine Repressor-Wirkung [33]. Diese Art der Transkriptions-Autoregulierung wird häufig bei Typ II TA-Systemen beobachtet und ist unter dem Begriff *conditional cooperativity* bekannt. Das stöchiometrischen Verhältnis von Toxin zu Antitoxin in der Zelle beeinflusst diesen Effekt maßgeblich. Die Regulierung von Typ II TA-Systemen erfolgt zusätzlich über die ausgeprägten Unterschiede der Halbwertszeiten von Toxin und Antitoxin. Im Gegensatz zum relativ stabilen Toxin, sind die Antitoxine höchst anfällig für Proteolyse und werden in Stresssituationen rasch durch die Proteasen Clp und Lon degradiert, was eine Akkumulation von freiem Toxin in der Zelle zur Folge hat.

Die Toxine dieser Klasse zeigen ein breites Wirkspektrum. Das Toxin CcdB des *ccdAB*-Moduls (*E. coli* Plasmid F; *V. fischeri* Chromosom) blockiert beispielsweise die DNA-Replikation, indem es als Dimer kovalent an die DNA-Gyrase bindet und einen heterotetrameren (CcdB)₂-(Gyrase)₂-Komplex ausbildet, was die DNA-Transkription unterbindet [17, 19, 32, 34–37].

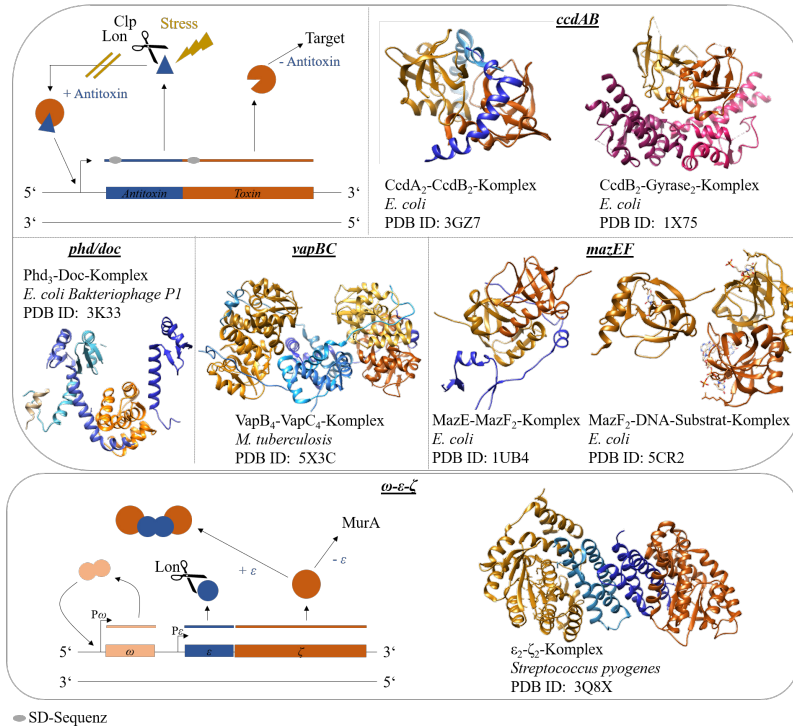


Abbildung 1.2: Typ II TA-Systeme. Die Antitoxine dieser Systeme sind Proteine, welche direkt mit dem Toxin in Wechselwirkung treten und dessen toxischen Effekt posttranslational durch Komplexbildung neutralisieren. Toxine sind orange, Antitoxine blau und Gyrase lila dargestellt.

Gyrasen relaxieren als Topoisomerasen bei der Replikation DNA-*supercoils*. Eine Inhibition der DNA-Gyrase geht folglich auch mit DNA-Doppelstrangbrüchen einher. CcdB wird durch die Bildung eines (CcdB)₂-(CcdA)₂-Komplexes inhibiert, welcher zusätzlich als Repressor des eigenen Operons fungiert.

Andere Typ II Toxine inhibieren die Proteintranslation. MazF ist das erste beschriebene Toxin eines TA Systems, das als ribosomen-unabhängige Endonuklease sequenzspezifisch (ACA-Sequenz) mRNA schneidet und damit

effektiv die zelluläre Proteinsynthese inhibiert. In *E. coli* schneidet MazF zusätzlich spezifisch am 3'-Ende der 16S rRNA der 30S Untereinheit des Ribosoms. Zwei MazF Toxine aus *M. tuberculosis* schneiden ebenfalls spezifisch 16S rRNA und 23S rRNA (UCCU-Sequenz) [38–40]. Neutralisiert wird MazF durch die Komplexbildung mit MazE. Das *mazEF*-Modul scheint außerdem eine Rolle bei der abortiven Bakteriophagen-Infektion durch den Phagen P1 zu spielen [41]. Als eines der am häufigsten vertretenen TA-Module in Mikroorganismen wird *mazEF* für verschiedene Applikationen modifiziert und findet beispielsweise Anwendung als Werkzeug im Bereich der Biotechnologie oder molekularen Biologie zur Optimierung der Proteinexpression (StabyTMCloning) [42, 43]. TA-Module könnten darüber hinaus ein wertvolles Instrument zur gentherapeutischen Behandlung viraler Infektionen wie HIV-1 oder Hepatitis C sein [44, 45]. Zur Behandlung von HIV-1 wurde ein retroviraler Vektor entworfen, auf welchem das *E. coli mazF*-Gen unter der Kontrolle des HIV-1 TAR-Promotors liegt. Der Zyklus einer HIV-Infektion startet mit der Expression des viralen Proteins Tat, welches an die TAR-Sequenz bindet und so die Transkription des gesamten HIV-1 Genoms induziert. In Anwesenheit von HIV-1 starten Zellen, die das TAR-*mazF*-Modul enthalten, die Expression von MazF, welches die virale mRNA schneidet und eine Replikation von HIV-1 damit unterbindet. Ein alternativer Ansatz wurde bei der Behandlung von mit Hepatitis C infizierten Zellen getestet. Dafür wurde eine Expressionskassette entworfen, welche für ein Polypeptid (Zymoxin) kodiert, das aus einem Fragment des Antitoxins MazE und dem Toxin MazF besteht. Toxin und Antitoxin-Fragment sind durch eine NS3-Schnittstelle verbunden. Die virale Serinprotease NS3 ist essentiell für die Prozessierung Hepatitis C kodierter Polypeptide. In Zellen, die mit Hepatitis C infiziert werden, schneidet NS3 spezifisch Zymoxin und aktiviert damit das Toxin MazF. Infolgedessen sterben infizierte Zellen ab.

Obwohl die Interaktionen zwischen Toxin und Antitoxin hoch spezifisch sind, werden auch Interaktionen zwischen Toxinen und Antitoxinen ver-

schiedener Systeme beobachtet. Beispielsweise neutralisiert das Antitoxin VapC in *M. tuberculosis* die toxische Wirkung von MazE durch MazE/VapC-Komplexbildung. *vapBC*-Module zählen zu den häufigsten Vertretern der Typ II TA-Systemen [46, 47]. Alleine in *M. tuberculosis* bilden sie mit 50 bisher identifizierten Subfamilien neben *mazEF* (10 Subfamilien) die größte TA-Familie in diesem Pathogen. Die zellulären Targets verschiedener VapC-Toxine aus unterschiedlichen Organismen wurden ausführlich untersucht. Allen VapC Toxinen gemein ist eine Endoribonuklease-Aktivität, welche je nach Organismus und System auf ein bestimmtes Target spezifiziert ist. VapC Toxine der enterischen Bakterien *S. enterica* und *S. flexneri* schneiden spezifisch Initiator tRNA^{fMet} *in vivo*. Diverse VapC Toxine in *M. tuberculosis* schneiden spezifisch tRNA-Isoakzeptoren an der Anti-Codon-Schleife, GC-reiche Sequenzen in RNA-Einzelsträngen, sowie die 23S rRNA an der Sarcin-Ricin-Schleife [48]. Fluoreszenz-Messungen konnten belegen, dass die Ribonuklease-Aktivität einiger VapC-Toxine in *M. tuberculosis* abhängig von Mg²⁺-Ionen ist, welche von konservierten Aminosäuren koordiniert werden und so eine hydrolytische Spaltung ihrer Zielmoleküle ermöglichen. Ein weiteres VapC Toxin aus *M. tuberculosis* zeigt Aktivität gegenüber dem Bakteriophagen MS2, indem es dessen virale Einzelstrang-RNA schneidet und so eine Immunattacke abwehrt. Die Deletion des *vapBC*-Moduls in *H. influenza* (NTHi) resultiert in einer deutlichen Abnahme der Virulenz dieses Erregers.

Das Toxin Doc des *phd/doc*-TA-System aus dem *E.coli* Bakteriophagen P1 inhibiert die Proteintranslation nicht, indem es mRNA schneidet, sondern die 30S Untereinheit des Ribosoms angreift [49–51]. Als Kinase inaktiviert Doc den Translationselongationsaktivator EF-Tu durch die Phosphorylierung des hoch konservierten T³⁸². Eine Bindung an aminoacylierte tRNA ist damit unterbunden und die Proteinbiosynthese folglich inhibiert, ohne dass weder die Replikation noch die Transkription direkt beeinträchtigt werden. In dieser Klasse von Toxinen findet sich auch das drei-Komponenten-System $\omega - \epsilon - \zeta$, welches sich auf dem Plasmid pSM19035 von *S. pyogenes* be-

findet und einen weiteren Toxin-Mechanismus aufzeigt. Das Toxin ζ zeigt Kinaseaktivität und phosphoryliert den Peptidoglycan Präkursor UDP-N-Acetylglucosamin (UNAG) [52, 53]. Durch dieses phosphorylierte Produkt wird das Enzym MurA inhibiert, welches den initialen Schritt der Peptidoglykansynthese in Bakterien katalysiert. Das Resultat ist die Zerstörung der Membranintegrität. Der zytotoxische Effekt von ζ wird durch die Bildung eines heterotetrameren $\zeta_2\varepsilon_2$ -Komplexes neutralisiert. Im Gegensatz zu den bereits genannten Typ II Systemen regulieren weder ε , ζ noch der $\zeta_2\varepsilon_2$ -Komplex ihre eigene Expression bzw. fungieren als Repressor ihrer Gene. Stattdessen wird die Promotoraktivität des P_ω -Operons durch den dimeren globalen Transkriptionsregulator ω_2 beeinflusst. Eine geringe Basalexpression von ε und ζ erfolgt unter dem konstitutiven aber sehr schwachen Promotor P_ε .

Typ III TA-Systeme

Das TA-Modul *toxIN* wurde erstmals auf dem pECA1039 Plasmid des Gram-negativen pflanzlichen Pathogens *P. atrosepticum* lokalisiert und als erstes Typ III TA-Systems charakterisiert (Abb. 1.3).

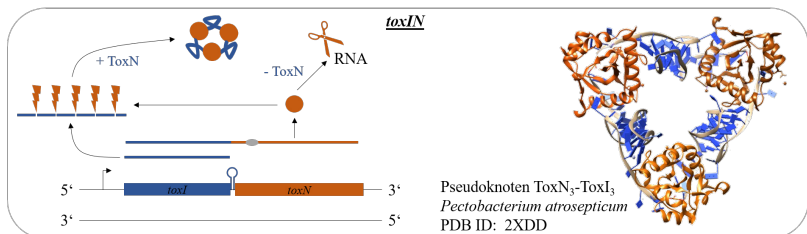


Abbildung 1.3: Typ III TA-System *toxIN*. ToxI neutralisiert als sRNA den toxischen Effekt von ToxN durch Bildung eines Komplexes mit dem Toxin. Toxine sind orange und Antitoxine blau hervorgehoben.

Weitere *toxIN*-Homologa konnten später auch auf anderen Plasmiden und Chromosomen diverser Bakterien identifiziert werden.

Die 200 nt lange Gensequenz des Antitoxins *toxI* weist fünfeinhalb 36 nt lange repetitive palindromische Sequenzen auf und wird mit dem *toxN*-Gen cotranskribiert und -translatiert. Beide Gene sind durch einen Rho-unabhängigen Terminator separiert, was eine Drosselung der Transkription von *toxN* im Vergleich zu *toxI* bewirkt. Das Antitoxin ToxI bindet als sRNA direkt mit dem Toxin einen heterohexameren nichttoxischen RNA-Protein-Komplex aus, dessen Struktur mittels Kristallstrukturanalysen aufgeschlüsselt werden konnte. Dabei sind jeweils 3 ToxN Monomere im Wechsel mit 3 ToxI RNA-Pseudoknoten (36 nt Länge) im Dreieck angeordnet. ToxN fungiert als sequenzspezifische und ribosomen-unabhängige Endoribonuklease und prozessiert den 200 nt Antitoxin-Precursor in aktive 36 nt lange Antitoxin sRNA, welche die Toxizität von ToxN wie beschrieben durch Komplexbildung neutralisieren. ToxN schneidet auch zelluläre mRNA und spielt eine wichtige Rolle bei Phageninfektionen, indem es Phagen RNA schneidet sowie den altruistischen Zelltod von Phagen-infizierten Zellen einleitet [51, 54–56].

Typ IV TA-Systeme

In Typ IV TA-Systemen ist das Antitoxin ebenfalls ein Protein, welches aber im Gegensatz zu anderen TA-Systemen nicht direkt mit dem Toxin oder der mRNA des Toxins in Wechselwirkung tritt, sondern stattdessen die Targets des Toxins stabilisiert (Abb. 1.4). Beispielsweise blockieren die Toxine YeeV und CptA der TA-Module *yeeUV* und *cptAB* aus *E.coli* die Polymerisation bakterieller Zytoskelettproteine wie des Tubulin-ähnlichen FtsZ oder des prokaryotischen Actin-Homologon MreB, welches unter anderem auch eine wichtige Rolle bei der Zellteilung sowie bei der Chromosomensegregation und Zellpolarität spielt und für die typische Stäbchenform einer Zelle verantwortlich ist.

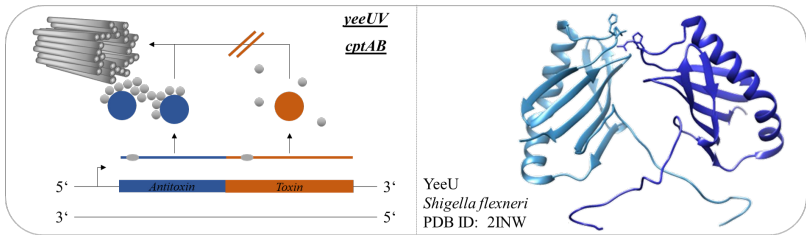


Abbildung 1.4: Typ IV TA-Systeme. Die Antitoxine der Klasse IV treten nicht mit der mRNA des Toxins oder dem Toxin in Wechselwirkung, sondern stabilisieren dessen Targets. Toxine sind orange und Antitoxine blau dargestellt.

Die korrespondierenden Antitoxin-Proteine CptB bzw. YeeU verhindern eine Inhibition der Zellteilung, indem sie die polymeren Filamentproteine stabilisieren [57–60].

Typ V TA-Systeme

Ein Beispiel für ein Typ V TA-System ist das auf dem *E.coli* Chromosom lokalisierte *ghoST*-Modul [61, 62]. Das Antitoxin GhoS schneidet als Endonuklease spezifisch die mRNA des Toxins GhoT und unterbindet so dessen Translation. Interessanterweise wird dieses System auch durch das Typ II TA-System *mqsRA* reguliert, was eine hierarchische Ordnung unter TA-Systemen bei der Regulierung der Zellphysiologie zeigt (Abb. 1.5) [63].

Unter Stressbedingungen wird die mRNA des Antitoxins GhoS durch das Typ II Toxin MqsR geschnitten und damit die Translation des kleinen hydrophoben Toxins GhoT gefördert, das zwei TMD besitzt und bei Überexpression die Membran angreift, was zur Lyse der Zelle sowie zur Inhibition der ATP-Synthese und damit einhergehender Biofilmbildung oder zur Bildung von persisten Zellen führen kann.

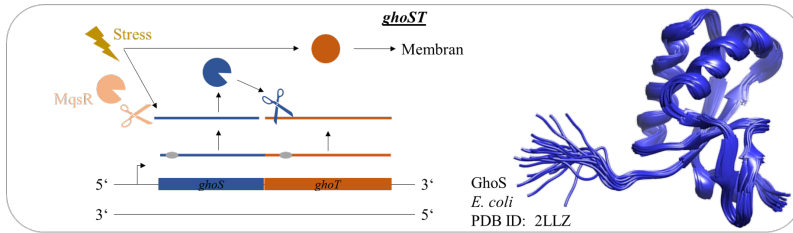


Abbildung 1.5: Typ V TA-System *ghoST*. GhoS schneidet als Endonuklease die mRNA des Toxins GhoT. Toxine sind orange und Antitoxine blau dargestellt.

Typ VI TA-Systeme

Der *socAB*-Operon auf *C. crescentus* wurde als erstes Typ VI TA-System identifiziert. Das Toxin SocB bindet stark an die DNA-Klammer (β *sliding clamp*) von DnaN, wodurch die Replikationselongation und damit die DNA-Replikation blockiert wird. Als Konsequenz induziert SocB die RecA-gesteuerte SOS-Antwort. Das Antitoxin SocA agiert als proteolytisches Adapterprotein, welches das Toxin der zellulären ClpXP Protease zuführt und so den Abbauprozess des Toxins beschleunigt (Abb. 1.6) [64].

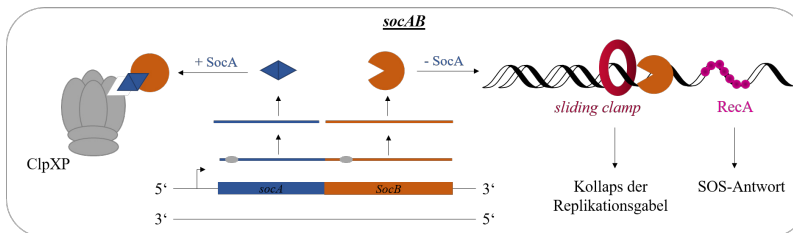


Abbildung 1.6: Typ VI TA-System *socAB*. Das Antitoxin SocA wirkt als Adapterprotein und führt SocB der zellulären Protease ClpXP zu. GhoS schneidet als Endonuklease die mRNA des Toxins GhoT. Toxine sind orange und Antitoxine blau dargestellt.

Typ	TA System (Arrangement)	Antitoxin (molekulare Spezies)	Toxin	Antitoxin-Mechanismus	Toxin Mechanismus	Funktion	Lokalisierung	Ref.																					
I	<i>hok/zoef</i> (konvergent; 64 nt)	Sok (RNA, 64 nt)	Hok (32AS) (mRNA, 361, 398 nt)	TI	Porenbildung Membrandepolarisierung [A]	[I], [II], [IV] SOS-induziert	<i>E. coli</i> R1 Plasmid Homologa auf Chromosom	[21,22]																					
									<i>symER</i> (konvergent; 77 nt)	SymR (RNA, 77 nt)	SymE (113 AS) (mRNA, 454 nt)	TI	RNase	<i>E. coli</i> Chromosom	[14,23]														
																<i>txpA/txpA</i> (konvergent; 118 nt)	RatA (RNA, 222 nt)	TxpA (39 AS) (mRNA, 270 nt)	RD	Lyse der Zellmembran	[28-30]								
																						<i>hstB/hstR1</i> (divergent)	IstR1 (RNA, 75 nt)	IstB (39 AS) (mRNA, 292, 250, 186 nt)	TI	Membrandepolarisierung SOS-induziert [A]	[I], [II], [IV] SOS-induziert	<i>E. coli</i> Chromosom	[5, 23-25]
<i>mazEF</i>	MazE (Protein, 82 AS)	MazF (111 AS)	RE, PPK	RNase	[III], [III], [IV]	<i>E. coli</i> Chromosom	[9-41]																						
<i>vapBC</i>	VapB (Protein, 71 AS)	VapC (155 AS)	RE, PPK	RNase	[III]	<i>M. tuberculosis</i> Chromosom	[46,47]																						
<i>phd/doc</i>	Phd (Protein, 73 AS)	Doc (126 AS)	RE, PPK	Kinase (EF-Tu)	[B]	<i>E. coli</i> Bakteriophage P1	[49-51]																						
<i>o-e-z</i>	e (Protein, 90 AS)	z (287 AS)	PPK	Kinase (UNAG)	[E]	<i>S. pyogenes</i> Plasmid pSM19035	[52,53]																						
III	<i>toxZV</i>	ToxZ (RNA, 200 nt)	ToxN (171 AS)	RPK	RNase	[II]	<i>P. aeruginosa</i> ; Plasmid pECA1039	[54,55]																					
									<i>yeoU7</i>	YeoU (Protein, 125 AS)	YeeV (125AS)	STT	Inhibition von FtsZ, MreB	[D]	<i>S. flexneri</i> Chromosom	[57-59]													
IV	<i>cpdB</i>	CpB (Protein, 88 AS)	CpA (577 AS)	STT	Inhibition von FtsZ, MreB	[D]	<i>S. flexneri</i> Chromosom (<i>E. coli</i> Chromosom)	[57,58]																					
									<i>ghoST</i>	GhoS (Protein, 98 AS)	GhoT (57 AS)	RD	Membrandepolarisierung [A]	[III], [IV]	<i>E. coli</i> Chromosom	[61,62]													
VI	<i>socAB</i>	SocB (237 AS)	SocA (188 AS)	PD	Inhibierung von DnaN	[C]	<i>C. crescentus</i> Chromosom	[64]																					
									Antitoxin-Mechanismen:				Funktionen:																
TI: Translationsinhibierung				[I] PSK-Faktor				Externe Stressfaktoren:																					
RD: RNA-Degradation				[A] ATP-Synthese				Nährmangel, Hitze,																					
PPK: Protein-Protein-Komplexbildung				[B] Translationsinhibition				oxidativer Stress,																					
RPK: RNA-Protein-Komplexbildung				[C] DNA-Replikation				Phagenimmunitäde,																					
RE: Repression der Genexpression				[D] Zellteilung				Antibiotikabehandlung,																					
PD: Protein-Degradation				[E] Peptidoglykansynthese				DNA-Schädigung (SOS-Antwort)																					
STT: Stabilisierung des Toxin-Targets																													

Tabelle 1.1: Übersicht der in diesem Kapitel beschriebenen TA-Systeme. Weiterführende Informationen finden sich in [7,8].

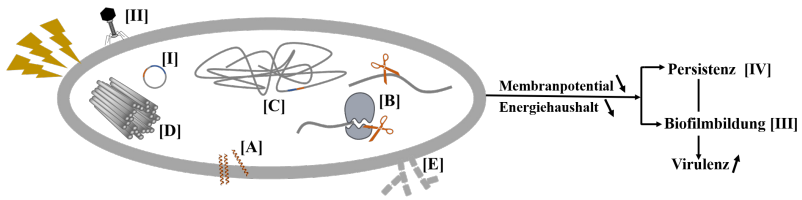


Abbildung 1.7: Graphische Zusammenfassung der Targets, Funktionen und physiologischen Auswirkungen von TA-Systemen. Targets und inhibierte zelluläre Prozesse: [A] ATP-Synthese, [B] Translationsinhibition, [C] DNA-Replikation, [D] Zellteilung, [E] Peptidoglykansynthese. Funktionen von TA-Systemen: [I] PSK-Faktor, [II] Abwehr von Phagenimmunattacken, [III] Biofilmbildung, [IV] Bildung von persistenten Zellen. Externe Stressfaktoren (Antibiotikabehandlung, Hitze, oxidativer Stress, Nahrungsmangel, Phagenimmunattacke, DNA-Schädigung (SOS-Antwort)) sind als gelbe Blitze dargestellt. Die Nummerierung und Zuordnung ist analog zu Tabelle 1.1.

Das Typ I TA-System BsrG/SR4 aus *B. subtilis*

Das Typ I TA-System *bsrG/sr4* befindet sich auf der SP β -Prophagenregion von *B. subtilis*. Toxin- und Antitoxin-Gene dieses Moduls sind überlappend angeordnet und werden unter jeweils eigenem Promotor konvergent transkribiert (Abb. 1.8).

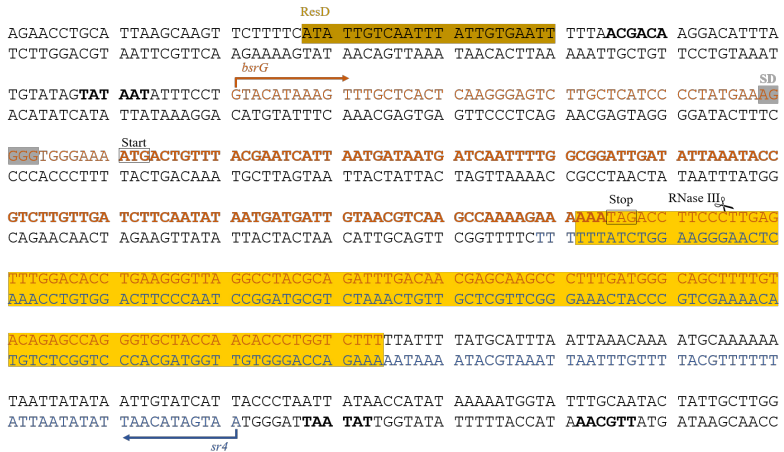


Abbildung 1.8: Nukleotidsequenz des *bsrG/sr4*-Lokus auf der SP β -Prophagenregion von *B. subtilis*. -10 und -35-Boxen der *bsrG*- und *sr4*-Promotoren sind fett hervorgehoben. Die potentielle ResD-Bindestelle ist braun hinterlegt. Start- und Stop-Codons sind mit einem Kasten markiert. Transkriptionsstart und -ende sind für *bsrG* in orange und für *sr4* in blau kenntlich gemacht. Der ORF von *bsrG* ist fett hervorgehoben. Die SD-Sequenz ist grau und komplementäre Bereiche zwischen Toxin- und Antitoxin-RNA sind gelb hinterlegt. Die RNase III-Schnittstelle an Position 185 von *bsrG* ist graphisch markiert.

Die BsrG-mRNA ist 294 nt lang und kodiert für ein stark hydrophobes 38 AS langes toxisches Peptid mit potentieller TMD, das eine große sequentielle Ähnlichkeit mit TxpA aufweist (Abb. 1.9). Die cis-kodierte Antisense sRNA SR4 ist 183 nt lang und überlappt um 123 nt mit dem 3'-Ende von *bsrG* [11, 26, 65]. Wie bei allen Typ I TA-Systemen in *B. subtilis* bindet die Antitoxin-RNA an das 3'-Ende der Toxin-mRNA und neutralisiert so den toxischen Effekt (Abb. 1.10). Durand *et al.* zufolge beruht diese Art der

Regulierung auf unterschiedlichen Mechanismen der RNA-Degradation in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien [11].

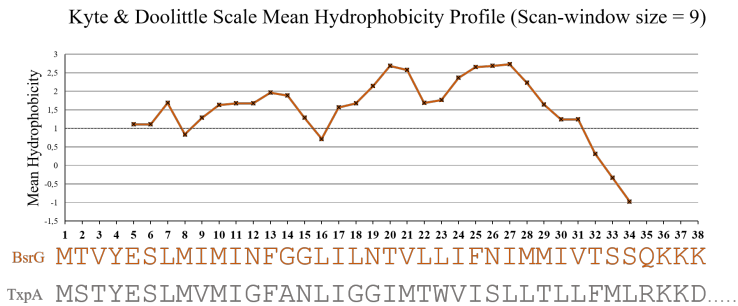


Abbildung 1.9: Kyte & Doolittle-Profil zur Verdeutlichung der durchschnittlichen Hydrophobizität des Toxins BsrG (orange) [66]. Zum Vergleich ist die AS-Sequenz des verwandten Toxins TxpA angegeben (grau). Gemeinsame AS sind in TxpA grau unterstrichen.

Der initiale Kontakt der SR4- und BsrG-RNA erfolgt zwischen Schleife SL4 von SR4 und Schleife SL3 der BsrG-mRNA. Eine Doppelstrangbildung setzt sich von diesem Angriffspunkt über SL3 und SL2 von SR4 bzw. SL4 der BsrG-mRNA fort. SL1 von SR4 sowie SL1 und SL2 von BsrG bleiben aufgrund fehlender Basenkomplementarität erhalten. Die zuvor gepaarten Positionen 1-33 der BsrG-mRNA liegen als Konsequenz der Komplexbildung als Einzelstrang vor (Abb. 1.10). Durch die Interaktion beider RNA an ihren 3'-Enden wird letztlich ein doppelsträngiges RNA-Duplex-Substrat geschaffen, das acht nt *downstream* vom Stop-Codon an Position 185 der BsrG-mRNA von RNase III geschnitten wird [11, 65]. Eine weitere Degradation des Komplexes geschieht hauptsächlich durch die RNasen Endoribonuklease Y und 3'-5'-Exoribonuklease R, welche einzelsträngige RNA schneiden. SR4 erzeugt durch die Komplexbildung mit der BsrG-mRNA nicht nur ein Substrat für den Abbau durch RNasen, sondern induziert gleichzeitig eine strukturelle Neuordnung der BsrG-mRNA um die

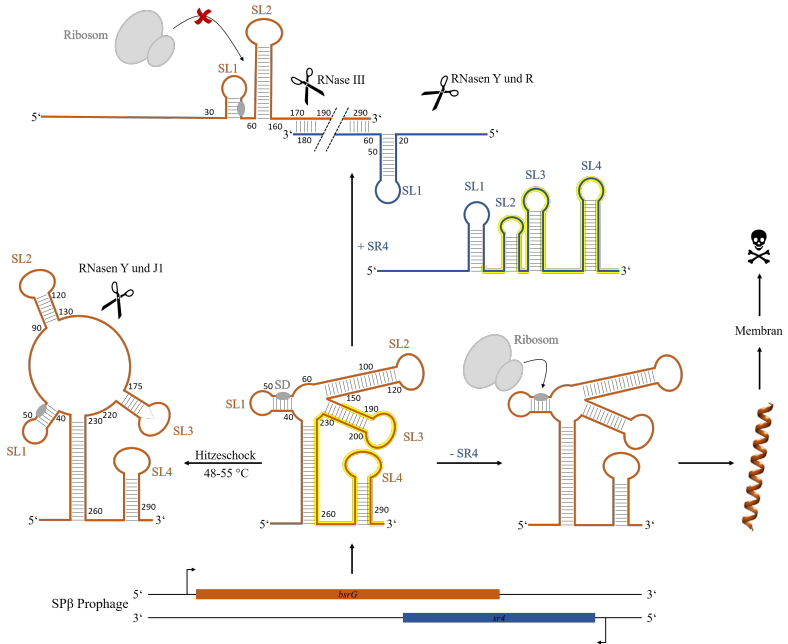


Abbildung 1.10: Regulierung des Typ I TA-Systems *bsrG/sr4*. Toxin-zugehörige Strukturen sind orange, die des Antitoxins blau hervorgehoben. Komplementäre Bereiche sind gelb hinterlegt.

SD-Sequenz (AGGGG) der *BsrG*-mRNA an Position 49-53 in SL1. Diese konformative Änderung blockiert die Bindung von Ribosomen und inhibiert folglich die Translation der *BsrG*-mRNA. SR4 ist damit das erste bekannte Typ I Antitoxin, welches zwei separate Funktionen zur Neutralisierung eines Toxins aufweist [6, 15, 18, 65]. Eine Deletion von SR4 sowie die Überexpression von *BsrG* resultieren in Zellyse auf Agarplatten.

Eine Expression von *BsrG* scheint eng mit der Physiologie sowie dem metabolischen Zustand einer Zelle verknüpft zu sein. *Upstream* vom *bsrG*-Promotor befindet sich eine potentielle Bindestelle des Transkriptionsfaktors ResD, welcher in *B. subtilis* durch Sauerstoffmangel induziert wird und

die Vermutung nahe legt, dass BsrG bakteriostatisch wirken könnte, um den Sauerstoffverbrauch unter Sauerstoffmangel oder oxidativem Stress zu regulieren [11, 26, 67]. Bei Glukosemangel konnte ein deutlicher Konzentrationsanstieg der zellulären BsrG-mRNA nachgewiesen werden. Die Expression des Toxins scheint somit an den Stoffwechszustand der Zelle gekoppelt zu sein. Interessanterweise konnte auch ein Effekt auf die Stabilität der Toxin-mRNA bei Hitzeeinwirkung nachgewiesen werden. Ein Hitzeschock bei 48 °C bzw. 55 °C resultiert in einem raschen Abbau der BsrG-mRNA, was in einer 3,5-fach kürzeren Halbwertszeit der BsrG-mRNA begründet liegt und damit unabhängig vom Antitoxin SR4 ist [68]. Mittels experimenteller Strukturuntersuchungen konnte die Ursache für diese Beobachtung aufgeklärt werden. Demnach bedingt ein Hitzeschock eine Umfaltung der zentralen Region der BsrG-mRNA in eine Struktur mit größerem Anteil an Einzelsträngen, welche insbesondere für die RNasen Y und J1 zugänglich ist (Abb. 1.10). Obwohl die biologische Relevanz der Hitze-induzierten Degradation noch nicht verstanden ist, demonstriert sie eine starke Verbindung zwischen Toxin-Expression und Physiologie der Zelle.

Das Peptid BsrG konnte erwartungsgemäß zwar an der Membran lokalisiert werden, im Gegensatz zu anderen Toxinen dieser Klasse konnte bisher jedoch kein Effekt beobachtet werden, welcher die Membranintegrität angreift. Obwohl das Zellwachstum durch BsrG graduell inhibiert wird, konnte keine Beeinflussung der ATP-Synthese oder ein Eingreifen in die elektrische oder chemische Homöostase aufgrund von Porenbildung oder Ausbildung eines Ionenkanals nachgewiesen werden [69]. Statt dessen scheint BsrG eine Modifikation der Zellmorphologie zu bewirken. Als Folge der Expression von BsrG lassen sich Einstülpungen der zytoplasmatischen Membran feststellen, welche wiederum die Delokalisierung verschiedener Komponenten der Zellwand-Synthese-Maschinerie wie beispielsweise des bakteriellen Aktin-Homologons MreB bedingen und wodurch letztlich die Autolyse der Zelle getriggert werden könnte [69]. Neben diesem Effekt lassen sich außerdem DNA-Kondensation sowie die Inhibition der Proteinbiosyn-

these beobachten. Obwohl die genaue Funktion von BsrG noch nicht gänzlich aufgeschlüsselt ist, scheint dieses Peptid ein breites Wirkungsspektrum aufzuweisen und seinen toxischen Effekt in aktiv wachsenden Zellen zu entfalten. Im Vergleich zu anderen Toxinen dieser Klasse bewirkt es interessanterweise relativ langsam den Zelltod. Eine genauere Beschreibung der AS-Sequenz dieses Toxins und sich daraus ergebende mögliche Struktur motive werden im folgenden Kapitel (Seite 43) diskutiert.

1.3 Helix-Helix-Interaktionen in Membranen

In jedem Organismus kodiert etwa ein Viertel aller ORF für integrale Membranproteine [1, 2]. Mit Ausnahme von β -Barrels, die in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien sowie in Mitochondrien eingebettet sind, besitzen diese Proteine überwiegend α -helikale Sekundärstrukturen. Als Enzyme, Rezeptoren, Kanäle oder Poren erfüllen sie eine Vielzahl biologischer Funktionen, indem sie an essentiellen zellulären Prozessen wie der Zellatmung oder dem Transport von Stoffen und Informationen über die Membran beteiligt sind. Spezifische Interaktionsmuster zwischen einzelnen TM-Helices spielen dabei eine entscheidende Rolle, da sie die Oligomerisierung, Assemblierung und die Orientierung in der Membran beeinflussen und damit für die Funktion und Aktivierung dieser Peptide maßgeblich sind [70–73]. Verdeutlicht wird dies anhand einer Vielzahl von Krankheiten, die auf fehlerhafte Assemblierungen von Membranproteinen zurückzuführen sind [74]. TMD sind damit weitaus mehr als nur Membrananker für cytosolische oder extrazelluläre Domänen.

Neben sequenzspezifischen TM-Helix-Helix-Interaktionen kann das Lipidmilieu entscheidend dazu beitragen, definierte Strukturen und Orientierungen von TM-Helix-Helix-Wechselwirkungen zu induzieren, zu stabilisieren oder zu unterbinden. Parameter wie Membranfluidität, Ladung der Lipidkopfgruppen und der Hydrophobe Mismatch können den Tilt einer Helix in der Membran beeinflussen sowie zu einer Änderung deren Konformation führen (α -, 3_{10} -, π -Helix) oder Aggregation bedingen, worauf im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden soll (Abb. 1.12 [I]) [75, 76]. Die meisten TM-Helices fügen sich einzeln oder in kleinen Einheiten in eine Lipiddoppelschicht ein, wo sie durch spezifische Interaktionen ihre endgültige Struktur annehmen.

In polytopischen TM-Proteinen können benachbarte TM-Helices, Cofaktoren und lösliche Domänen Helix-Helix-Wechselwirkungen stabilisierend oder destabilisierend beeinflussen. Da es schwierig ist, die Beiträge ein-

zerner TM-Helices polytopischer TM-Proteine zu definieren, dienen TM-Helix-Dimere nicht nur allgemein als Modell zur Analyse von Sequenzmotiven, Struktur, Aufbau und Dynamik von Helix-Helix-Wechselwirkungen, sondern liefern auch den Ausgangspunkt zur Beschreibung polytopischer TM-Proteine. Darüber hinaus gibt die Aufschlüsselung sequenzspezifischer TM-Helix-Helix-Wechselwirkungen Einblicke in elementare Prozesse wie Signaltransduktion, Membranfusion oder Kanalaktivität, deren Aktivitäten oft mit einem strukturellen Rearrangement von Helix-Dimeren verknüpft sind [77–80].

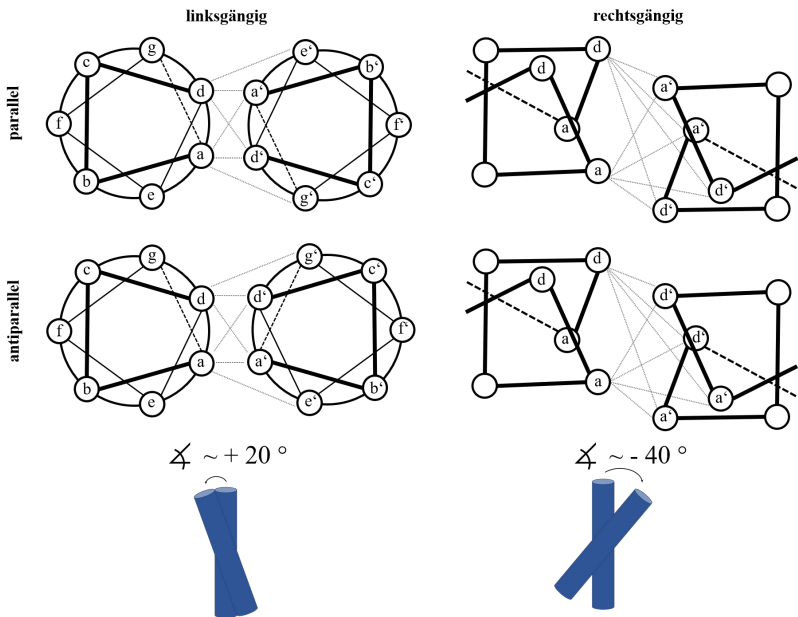


Abbildung 1.11: Interaktionsmotive von TM-Helix-Helix-Dimeren. Zwei Drittel aller TM-Dimere lassen sich einem dieser vier Cluster zuordnen (linksgängig parallel: 9 %, linksgängig antiparallel: 29 %, rechtsgängig parallel: 13 %, rechtsgängig antiparallel: 16 %) [3, 81]. Linksgängige Interaktionsmotive weisen häufig ein Heptadenmotiv $[abcdefg]_n$ und einen Kreuzungswinkel von ca. 20° auf. In rechtsgängigen Interaktionsmotiven finden sich Tetradenmotive $[abcd]_n$ mit Kreuzungswinkeln von ca. 40° .

Interessanterweise lassen sich die Interaktionsmotive von zwei Dritteln aller TM-Helix-Dimere anhand von vier geometrischen Clustern beschreiben, in welchen jedes C_{α} -Atom meist innerhalb von 1,5 Å RMSD (*root mean square deviation*) der Hauptstruktur liegt (Abb. 1.11) [3, 81, 82]. Zwei Helices können linksgängige oder rechtsgängige Geometrie annehmen und parallel oder antiparallel angeordnet sein. Die gleichen Cluster finden sich auch bei löslichen Proteinen, allerdings sind Helices in diesem Fall im Durchschnitt meist etwas weniger eng in Kontakt als bei TM-Helix-Dimeren. Linksgängig angeordnete TM-Helices weisen häufig einen Kreuzungswinkel von ca. 20° auf. In diesem Motiv finden sich oft AS mit kleinen Seitenketten wie Glycin, Serin und Alanin, die sich alle sieben Positionen wiederholen. In diesem sogenannten Heptadenmotiv $[abcdefg]_n$ kann eine Kontaktfläche der Helices (Interface) aus den AS an den Positionen a und d bestehen, welche zusätzlich durch die flankierten AS an Positionen e und g stabilisiert werden können. TM-Helices mit rechtsgängigen Interaktionsgeometrien zeigen meistens einen Kreuzungswinkel von ca. 40° und ein Tetradenmotiv $[abcd]_n$, in welchem an jeder vierten Position kleine AS anzutreffen sind.

Dimerisierungsmotive im Überblick

Nicht-kovalente Assoziationen von TM-Helices können durch mehrere Motive vermittelt werden (Abb. 1.12) [84, 85]. Im Folgenden werden bekannte Wechselwirkungsmotive zusammenfassend dargestellt und anschließend anhand verschiedener Beispiele beschrieben.

Das häufigste Interaktionsmotiv zweier TMD-Helices ist das GxxxG-Motiv, welches erstmals in GpA beschrieben wurde (Abb. 1.12 [III]) [73, 86]. Da Glycin in diesem Motiv durch die kleinen AS Alanin und Serin ausgetauscht werden kann, lässt sich das Motiv auch allgemein als SmxxxSm-Motiv (Sm für *small*) beschreiben. Ausgedehntere Varianten davon - sogenannte

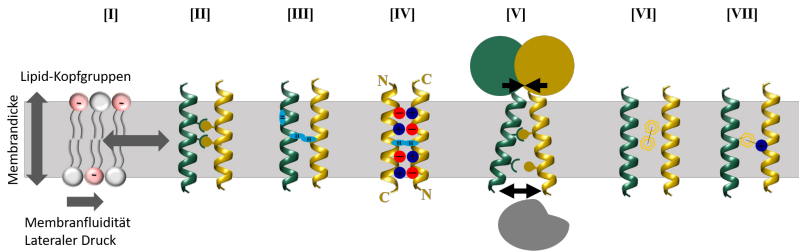


Abbildung 1.12: [I] Membranen nehmen Einfluss auf die Orientierung, Struktur und Funktion von Membranproteinen. [II] Modellsystem für das SmxxxSm-Motiv. [III] Inter- oder intramolekulare polare Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen treten vor allem bei Serinen (Serin-Zipper) und Threoninen auf, aber werden auch zwischen anderen polaren AS wie Asparagin beobachtet. [IV] Interhelikale Salzbrücken können ein Dimer in einer Membran stabilisieren, wie hier am Beispiel des antiparallelen TisB dargestellt. [V] Lösliche Domänen können die Dimerkonformation bei Vorhandensein zweier Interaktionsmotive beeinflussen. π - π - ([VI]) und Kation- π -Wechselwirkungen ([VII]) können ein Dimer in der Membran stabilisieren. Graphik in Anlehnung an [83].

Glycin-Zipper mit GxxxGxxxG-Motiv - finden sich ebenfalls in einigen TMD wie in MSCL oder der TMD des viralen Proteins NS4B, das eine wichtige Rolle in der Organisation und Funktion des Hepatitis-C-Virus-Replikationskomplexes spielt [45, 87–89]. Weitere bekannte Proteine mit SmxxxSm-Motiv sind die Rezeptoren der ErbB-Familie (ErbB1, ErbB2, ErbB4), BNIP3 sowie das Heterodimer α IIb β 3, auf welche noch detailliert eingegangen wird. Dass ein vorhandenes SmxxxSm-Motiv nicht zwangsweise Teil eines Dimerisierungsmotivs sein muss, zeigt sich an PDGFR- β , ErbB3 oder DAP12.

Leucin-Zipper-Motive besitzen ein charakteristisches Heptadenmotiv. Bekannt sind diese Strukturelemente vor allem als linksgängige *coiled-coils*-Strukturen löslicher Proteine und Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise GCN4, finden sich aber auch in TM-Helices wie dem homodimeren PDGF-Rezeptor β (PDGFR- β) oder dem viralen Onkoprotein E5 [4, 76, 82]. Polare Seitenketten, die sich in der TMD befinden, können durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Stabilisierung eines Dimer-

komplexes beitragen (Abb. 1.12 [IV]) [79, 85, 90]. Ein spezifischer Fall ist das QxxS-Motiv des bakteriellen Aspartatrezeptors Tar-1 [91, 92]. Dieses Motiv kann mit den Aminosäuren Serin, Threonin, Asparaginsäure, Glutamin, Glutaminsäure und Asparagin allgemein als (Polare AS)-xx-(Polare AS)-Motiv beschrieben werden [80, 92].

Serin-Zipper-Motive besitzen meist Heptadenmotive in denen zwei Serine durch sechs AS getrennt sind und interhelikale Wasserstoffbrücken ausbilden können. Dieses Motiv findet sich häufig in polytopischen Proteinen wie der Cytochrom c Oxidase, aber auch in dimeren bitopischen Proteinen wie dem Erythropoietin Rezeptor (EpoR) [93–95].

Salzbrücken zwischen negativ und positiv geladenen Resten zweier Helices wurden für das Typ I Toxin TisB als Charge-Zipper-Motiv beschrieben (Abb. 1.12 [V]). Postuliert wurde dieses Charge-Zipper-Modell im Arbeitskreis von Prof. Anne S. Ulrich, KIT Karlsruhe, erstmals für das polytopische TM-Protein TatA [4, 5, 96].

Positiv geladene Aminosäuren, die innerhalb der TMD von Membranproteinen lokalisiert sind, erfüllen darüber hinaus häufig sowohl funktionelle als auch strukturelle Funktionen für die Aktivität diverser Proteine [4, 85].

Aromatische Seitenketten dienen als wesentliche Strukturelemente, welche die molekulare Erkennung und Selbstorganisation vieler Membranproteine durch π - π -Wechselwirkungen (π - π -stacking) vermitteln (Abb. 1.12 [VII]) [97]. Das Motiv kann als (Aromatische AS)-xx-(Aromatische AS) beschrieben werden, wobei Tryptophan meist den stärksten Beitrag zur Stabilisierung leistet [98]. Dieser Beitrag lässt sich anschaulich an Mutationsexperimenten einzelner aromatischer AS in Amyloidpeptiden erkennen, deren Fähigkeit zur Bildung von Amyloidfibrillen durch Mutationen einzelner aromatischer AS drastisch reduziert wird [99, 100].

Kation- π -Wechselwirkungen zwischen aromatischen AS und positiv geladenen AS können das Auftreten ungepaarter Arginine oder positiver Ladungen in TM-Helices erklären 1.12 [VIII]) [101].

Darüber hinaus können lösliche Domänen die Bildung eines thermodyna-

misch günstigeren TM-Helix-Oligomers behindern oder die Konformation eines Dimers beeinflussen, wie es beispielsweise bei humanen ErbB-Rezeptoren oder bei Integrinen der Fall ist (1.12 [VI]) [83, 102].

Das Vorhandensein eines dieser Motive muss per se allerdings nicht zwangsweise eine Dimerisierung bewirken oder zur Stabilisierung eines Dimers beitragen.

Weiterhin treten viele dieser Effekte in Kombination auf und bilden gerade bei Rezeptoren, Integrinen oder Kanalproteinen einen dynamischen und nicht starren Komplex. Konformationsänderungen und strukturelle Rearrangements der TM-Helices dieser Proteine gehen meist mit einer Änderung des Assoziationszustandes sowie der Orientierung in der Membran durch Rotationen einher, bewirken deren Aktivierung oder Inaktivierung und sind so für die physiologische Funktion einiger TM-Proteine von essentieller Bedeutung [83, 103].

Im folgenden Abschnitt werden die vorgestellten Motive anhand der genannten Peptide beschrieben, um Einblicke in die Diversität, Funktion und Dynamik von TM-Helix-Helix-Wechselwirkungen zu geben. Ein Überblick der Peptide und deren strukturellen Eigenschaften findet sich in Tabelle 1.2.

Rechtsgängige Interaktionsmotive

GpA und das GxxxG-Motiv

Das GxxxG-Motiv und dessen Variationen ist nach wie vor das prominenteste und am besten charakterisierte Wechselwirkungsmotiv [86, 104–106]. Als Modellsystem dient das homodimere GpA, dessen Struktur in Mizellen NMR-spektroskopisch (*Nuclear Magnetic Resonance*, Kernspinresonanz) aufgeschlüsselt wurde (Abb. 1.13 [I]). Die beiden TM-Helices bilden ein paralleles rechtsgängiges Dimer mit einem Kreuzungswinkel von ca. 40°. Als Interaktionsmotiv wurde die Sequenz L⁷⁵IxxGVxxGVxxT⁸⁷ mit GxxxG als Kernelement bestimmt. Die zwei kleinen Glycine sind durch

drei AS getrennt und damit übereinander arrangiert, wodurch sich ein Hohlraum bildet, der von den Seitenketten der anderen Helix aufgefüllt wird und so eine enge Packung der Helices erlaubt. Aufgrund dessen können Van-der-Waals-Interaktionen zwischen den AS I⁷⁶-L⁷⁵, V⁸⁰-G⁷⁹/G⁸³ sowie V⁸⁴-G⁸³/T⁸⁷ gebildet werden, wobei die erste Aminosäure auf der einen Helix und die zweite auf der interagierenden Helix liegt. Weiterhin erlaubt die kompakte Helix-Helix-Packung die Ausbildung interhelikaler Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den C_α-H Atomen der einen Helix und den Carbonyl-Sauerstoffatomen der benachbarten Helix, wodurch das Dimer um ca. 0,9 $\frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ stabilisiert werden kann [107, 108]. Bei vielen TM-Proteinen mit diesem Dimerisierungsmotiv haben Mutationsexperimente gezeigt, dass eines oder beide Glycine durch die kleinen AS Alanin oder Serin ersetzt werden können, ohne die Dimerisierung zu beeinflussen [109, 110]. Damit lässt sich das GxxxG auch allgemein als SmxxxSm beschreiben. Bei GpA bewirkt eine Mutation des zweiten G⁸³ zu Alanin dagegen eine deutliche Reduzierung des Dimerisierungsvermögens [111, 112]. Das polare T⁸⁷ im Interface trägt zusätzlich zum dominanten GxxxG-Motiv zur Spezifität und Affinität der Helix-Helix-Interaktion bei [113].

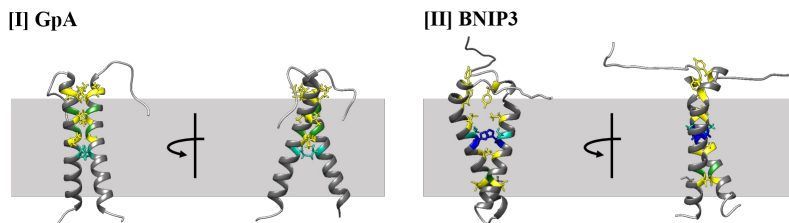


Abbildung 1.13: Strukturen der rechtsgängigen Homodimere GpA (I, PDB-ID: 1AFO) und BNIP3 (II, PDB-ID: 2J5D). Die am Dimerinterface beteiligten AS sind farblich hervorgehoben, wobei polare AS türkis, positiv geladene AS blau, Glycine grün und hydrophobe AS gelb gefärbt sind.

BNIP3

Die identifizierte Dimer-Kontaktfläche des Apoptose-regulierenden TM-Proteins BNIP3 umfasst die AS-Sequenz F²²⁶_{xxx}F_{xxx}F_{xxx}L_{xx}SH_{xx}A_{xxx}G_{xx}IG²⁴⁹ [114–116]. Das Glycin-Zipper-Motiv A_{xxx}G richtet die Seitenketten der beiden polaren AS S²³⁷ und H²³⁸ so aus, dass sich inter- und intrahelikale Wasserstoffbrückenbindungen zwischen diesen AS bilden können, welche die homodimere Struktur von BNIP3 stabilisieren (Abb. 1.13 [II]). Moleküldynamiksimulationen haben gezeigt, dass eine Protonierung von H²³⁸ die Wasserstoffbrückenbildung zu S²³⁷ unterbindet und sich die protonierten S²³⁷ und H²³⁸ in Richtung der polaren Lipidkopfgruppen wenden, was möglicherweise zu einer erhöhten Wasserdurchlässigkeit der Membran führt. Die AS S²³⁷ und H²³⁸ könnten also eine Art säuresensitiven pH-Sensor darstellen, durch welchen die Struktur und Funktion des BNIP3-Dimers beeinflusst und der Zelltod eingeleitet werden könnte [114].

Linksgängige Interaktionsmotive

MHC α und MHC β

TM-Helix-Helix-Wechselwirkungen mit linksgängiger Geometrie weisen oft einen Kreuzungswinkel von ca. 20° und ein Heptadenmotiv auf. Die Klasse II MHC α und β -Ketten besitzen Heptadenmotive, in welchen drei aufeinanderfolgende a-Positionen und zusätzlich mehrere d-Positionen mit Glycinen besetzt sind (Abb. 1.14) [78, 117]. Mutationen mehrerer Glycine in diesem Motiv verhindern die Bildung des Heterdimers.

$\varphi \sim +20^\circ$

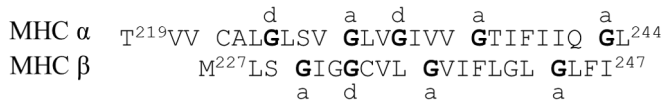


Abbildung 1.14: Interaktionsmotiv des Heterdimers der Klasse II MHC α - und β -Kette.

Der PDGF Rezeptor β und das Onkoprotein E5

In Leucin-Zipper-Motiven ist jede vierte Position (d-Position) im Heptadenmotiv mit Leucin, Isoleucin oder Valin besetzt [118]. Die dimere TM-Struktur von PDGFR- β wurde im Arbeitskreis von Prof. Anne S. Ulrich, KIT Karlsruhe, in Detergenzmizellen NMR-spektroskopisch bestimmt und zeigt ein Leucin-Zipper-Motiv (Abb. 1.15) [76].

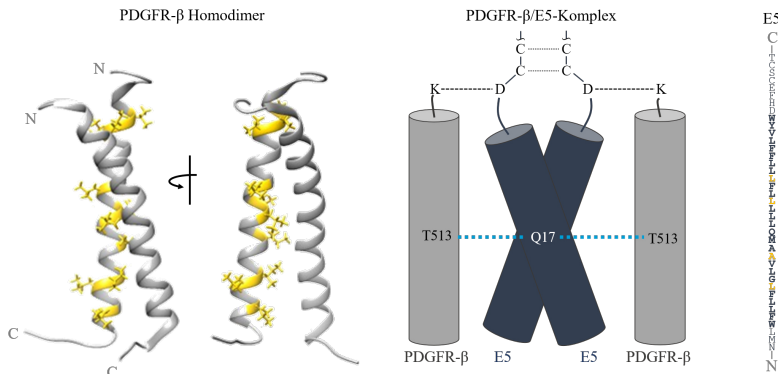


Abbildung 1.15: Darstellung des linksgängigen PDGFR- β Homodimers (PDB-ID: 2L6W). Die AS des Dimerinterface sind gelb hervorgehoben. PDGFR- β kann durch das Onkoprotein E5 aktiviert werden. Der PDGFR- β /E5-Komplex ist in Anlehnung an [119] dargestellt. Die AS-Sequenz von E5 findet sich entsprechend der Orientierung im PDGFR- β /E5-Komplex rechts. Die bei der E5-Homodimerisierung involvierten AS sind gelb hervorgehoben.

In dem linksgängigen Dimer kreuzen sich beide Helices um ca. 20° . An der Kontaktfläche involviert sind die AS $V^{500}VVxxxxxxLxVLxxIxxIILxxL^{523}$. Das E5 Protein des Typ-1 Rinder-Papillomavirus (BPV) ist ein Disulfid-verknüpftes Typ II TM-Protein, das Moleküldynamik-Simulationen zufolge ebenfalls in einer linksgängigen Leucin-Zipper-Struktur dimerisieren könnte [120–123]. Wie andere virale Proteine (Seite 34) bewirkt das dimere E5 eine unkontrollierte und permanente Aktivierung eines Rezeptors, indem es direkt mit dessen TMD interagiert und Zelltransformation bewirkt [75, 124, 125]. Das parallele Dimer E5 ist dabei antiparallel zu PDGFR- β orientiert. Stabilisiert wird der Komplex durch eine Wasser-

stoffbrückenbindung zwischen Q¹⁷ (E5) und T⁵¹³ (PDGFR-β) sowie eventuell S⁵¹⁶ (PDGFR-β) und eine Salzbrücke zwischen D³³ (E5) und K⁴⁹⁹ (PDGFR-β) [119].

Serinzipper und der Erythropoietin Rezeptor EpoR

In einer Vielzahl von Strukturen finden sich repetitive Heptadenmotive mit Serin an den a-Positionen, welche in der Lage sind, interhelikale Wasserstoffbrücken auszubilden. Adamian *et al.* haben antiparallele Serin-Zipper-Motive in polytopischen TM-Proteinen wie der Cytochrom c Oxidase beschrieben, in welchen interagierende Serin-Seitenketten als Heptade angeordnet sind [93].

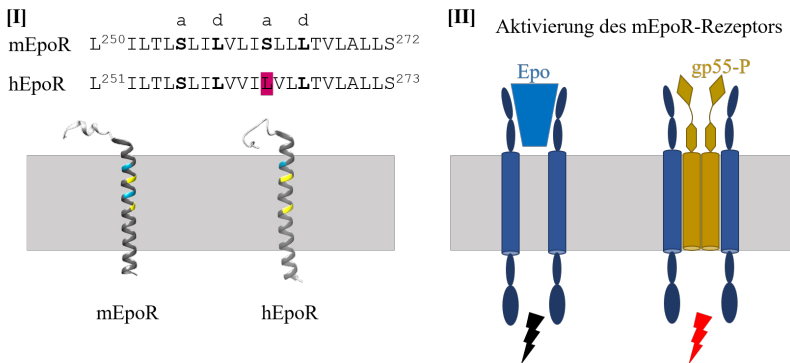


Abbildung 1.16: Dimerisierungsmotive und Aktivierung der Epo-Rezeptoren. [I] Vergleich der Sequenzen von mEpoR und hEpoR. Abgebildet sind die monomeren Strukturen der einzelnen Rezeptoren (PDB-ID: 2MXB und 2MV6). [III] Die Aktivierung der Epo-Rezeptoren erfolgt durch deren natürlichen Liganden Epo und gibt das Signal zur Bildung roter Blutkörperchen. Eine Aktivierung des mEpo-Rezeptors durch das dimere Virusprotein gp55-P verläuft analog zu PDGFR-β und E5 über Wechselwirkungen der Transmembrandomänen und führt zu Erythämie. Zeichnung in Anlehnung an [126].

Bei der Homodimerisierung von EpoR - einem Protein, das die Produktion roter Blutkörperchen reguliert - spielt das Motiv SxxLxxx eine Rolle [70, 78–80, 83, 94]. Im Vergleich zum humanen EpoR (hEpoR) zeigt mu-

rines EpoR (mEpoR) eine erhöhte Aktivität, die anhand des Sequenzmotivs erklärt werden kann (Abb. 1.16). hEpoR fehlt eine $S_{a}xxL_dxxx$ -Heptade, welche ggf. für die erhöhte TM-Dimerisierung von mEpoR verantwortlich ist [78]. Bemerkenswert ist, dass die Signalübertragung in EpoR analog zu PDGFR- β durch ein virales Protein gestört werden kann. Das virale TM-Protein gp55-P des *spleen-focus-forming-virus* (SFFV) kann mEpoR über seine TMD aktivieren, aber nicht das menschliche Pendant, es sei denn, das entsprechende Leucin wird zu Serin mutiert (Abb. 1.16). gp55-P interagiert direkt mit der TMD von mEpoR und dereguliert dadurch dessen Rezeptoraktivität, woraus Erythramie resultiert [126, 127].

North *et al.* haben dagegen Varianten mit repetitiven A_axxL_dxxx -Motiven beschrieben, welche mit ähnlicher Affinität wie Serin-Zipper dimerisieren, woraus geschlossen wurde, dass die Serine intrahelikale Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Carbonylsauerstoff an Position i-4 eingehen könnten und dass nicht deren Polarität, sondern geringe Größe den dominanten Faktor für die Oligomerisierung darstellen könnte [128].

Polare und ionische Wechselwirkungen

Häufig finden sich neben $SmxxxSm$ oder Leucin-Zipper-Motiven auch ionisierbare oder polare AS in der TMD von Helices. Polare AS werden durch $SmxxxSm$ -Motive in enge räumliche Nähe gebracht und können so leicht interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, welche sich stabilisierend auf die Dimerisierung auswirken [129].

Die Exposition von polaren oder geladenen AS in einer TM-Helix gegenüber dem hydrophoben Kern einer Lipiddoppelschicht ist aus thermodynamischer Sicht allerdings sehr ungünstig [130]. Die energetischen Kosten dafür reichen von $0,3 - 1,0 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ für eine einfache polare AS wie Serin oder Threonin und $1 - 6 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ für geladene Seitenkette [131, 132].

Dennoch können polare AS oder geladene amphiphile Helices in die Mem-

bran eintauchen. Die Ausbildung von Salzbrücken zwischen gegensätzlich geladenen Seitenketten und Wasserstoffbrücken zwischen polaren AS innerhalb der hydrophoben Membranumgebung reduzieren diese energetischen Kosten und können so Dimerisierungen von TM-Helices meistens spezifischer als andere Motive vorantreiben [133].

Interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen finden sich häufig zwischen Serin-Serin, Serin-Threonin, Serin-Tyrosin sowie zwischen Threonin-Threonin. Engelman *et al.* konnten feststellen, dass SxxSSxxT- und SxxxSSxxT-Motive häufig in polytopischen TM-Helices vorzufinden sind und für starke Helix-Helix-Interaktionen in bakteriellen Membranen verantwortlich sind [103, 134, 135].

Aminosäuren mit zwei polaren Seitenkettenatomen wie Asparagin oder Glutamin können generell gleichzeitig als Donor und Akzeptor für Wasserstoffbindungen fungieren und eine Dimerisierung tendenziell stärker antreiben als AS mit nur einem polaren Seitenkettenatom wie Threonin oder Serin [134–137]. Lear *et al.* konnten darüber hinaus demonstrieren, dass die Stärke der Oligomerisierung eines Peptids mit einem Asparagin in der TMD durch ein zweites Asparagin im Abstand von 7 AS (also als Heptade) oder durch ein benachbartes Serin oder Threonin durch die Ausbildung eines Netzwerks von Wasserstoffbrückenbindungen potenziert wird [90].

Der *E. coli* Aspartat-Rezeptor Tar

Der *E. coli* Aspartat-Rezeptor Tar ist einer der wichtigsten chemotaktischen Rezeptoren in Bakterien [138]. Die TMD von Tar-1 enthält kein GxxxG-Motiv. Stattdessen ist das Sequenzmotiv Q²²xxS²⁵ essentiell für dessen Homodimerisierung, in welchem die beiden polaren AS übereinander angeordnet sind und eine Dimerisierung durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren können. Interessanterweise wird die Dimerisierung von Tar-1 erheblich gestört, sobald das polare QxxS-Motiv durch das GxxxG-Motiv ersetzt wird [91, 92, 139, 140].

Das Toxin TisB

Die Sequenz des Typ I Toxins TisB beinhaltet drei positiv geladene Lysine und zwei negativ geladene Aspartate, die zusammen mit Glutamin bei α -helikaler Anordnung auf einem schmalen Streifen entlang der Helix orientiert sind (D⁵-K¹²-Q¹⁹-D²²-K²⁶-K²⁹). Im Fall von TisB bilden sich in einem antiparallelen Dimer interhelikale Salzbrücken zwischen D⁵-K²⁶, K¹²-D²², D²²-K²⁶ und K²⁶-D⁵ aus, welche zusätzlich durch die Wasserstoffbrückenbildung zwischen den Q¹⁹ stabilisiert werden (Abb. 1.12 [V]). Ein solches Strukturmotiv, in welchem komplementär geladene Aminosäuren inter- oder intramolekulare Salzbrücken ausbilden, wird als Charge-Zipper bezeichnet [5]. Bekannt ist das Charge-Zipper-Motiv auch aus polytopischen TM-Proteinen wie TatA [4, 96].

T-Zell-Rezeptoren

Das $\zeta\zeta$ -Homodimer ist eine Untereinheit des humanen T-Zellen Rezeptorkomplexes (TCR). Stabilisiert wird $\zeta\zeta$ auch durch polare Interaktionen in der AS-Sequenz D³⁶xxLxxYxxxLTxxF⁵¹ [82, 141]. Die NMR-Struktur des $\zeta\zeta$ -Dimers beschreibt eine linksgängige Geometrie mit einem Kreuzungswinkel von ca. 20° und ähnelt damit stark der *coiled-coils* Struktur löslicher Dimere. Tatsächlich ähnelt die dimere $\zeta\zeta$ -Struktur stark der des Transkriptionsfaktors GCN4 [118]. Beide Helices enthalten analoge Heptadenmotive (NxxLxxx bzw. DxxLxxx) [78, 118, 141]. In $\zeta\zeta$ bilden sich zwischen Y⁴³ und T⁴⁸ der benachbarten Helices interhelikale Wasserstoffbindungen aus und die Homodimerisierung von $\zeta\zeta$ ist deutlich von Asparaginsäure (D³⁶) abhängig (Abb. 1.17 [II]). Mutationsexperimente konnten zeigen, dass eine Mutation von D³⁶ zu Glutamat die Dimerisierung aufrecht erhielt, wohingegen eine starke Reduktion der Dimerisierung beobachtet wurde, wenn D³⁶ durch Asparagin, Serin oder Alanin ersetzt wurde [141].

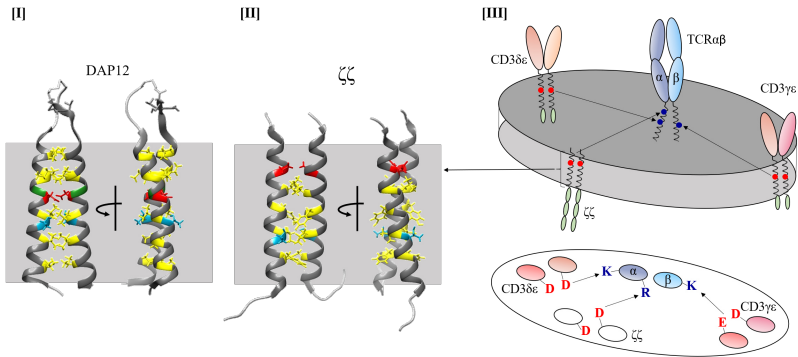


Abbildung 1.17: Strukturen der linksgängigen Homodimere DAP12 ([II], PDB-ID: 2L34) und $\zeta\zeta$ ([III], PDB-ID: 2HAC). Die am Dimerinterface beteiligten AS sind farblich hervorgehoben. [III] Zusammensetzung des TCR-Komplexes. Die Salzbrücken, die sich zwischen den einzelnen Untereinheiten ergeben, sind farblich markiert. Graphik in Anlehnung an [109].

Wechselwirkungen zwischen aziden und basischen AS der einzelnen TM der T-Zellrezeptoren (TCR α , TCR β , $\zeta\zeta$, CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$) sind von großer Wichtigkeit für die funktionale Assemblierung des TCR-Komplexes (Abb. 1.17 [III]). Die positiv geladene Arginin- und Lysin-Reste auf den TCR $\alpha\beta$ TM interagieren mit negativ geladenen Aspartat- und Glutamat-Resten der CD3 $\delta\epsilon$ - und CD3 $\gamma\epsilon$ -Heterodimere sowie mit dem $\zeta\zeta$ -Homo-Dimer [109]. Das Rezeptorsignalmodul DAP12 TM bildet ein linksgängiges Homodimer mit dem Wechselwirkungsmotiv $L^{43}xxIVxGDxxLTxxIxxxV^{61}$ [83, 142, 143] (Abb. 1.17 [I]). Die hydrophoben AS stehen in ausreichend engem Kontakt, um günstige Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu bilden. Die beiden D⁵⁰-Reste der interagierenden Helices bilden interhelikale Wasserstoffbrücken, die für die Stabilisierung der TM-Helix-Dimer-Struktur von entscheidender Bedeutung sind. Bemerkenswert ist, dass die DAP12 TM-Helix ein stark konserviertes GxxxG-artiges Motiv enthält, das allerdings nicht im Interface liegt und nicht an der Dimerisierung beteiligt ist.

Integrine

Integrine sind modulare Signalkomplexe, die verschiedene Liganden erkennen und für die Zelladhäsion von Bedeutung sind. Bisher sind 24 Integrin-Heterodimere bekannt, die sich aus Kombinationen von 18 α und acht β Untereinheiten zusammensetzen [144–148]. Die TM-Helix-Helix-Wechselwirkungen sind hoch dynamisch und beinhalten ein konserviertes GxxxG-Motiv [149]. Im inaktiven Ruhezustand befinden sich die TMD sowie die kurzen cytosolischen Domänen im engen Kontakt. Bei der reversiblen Aktivierung sind cytosolische Proteine beteiligt, welche die Integrine über einen *push/pull*-Mechanismus separieren, was den Komplex aktiviert und die Bindung extrazellulärer Liganden ermöglicht (Abb. 1.18 [II]) [150].

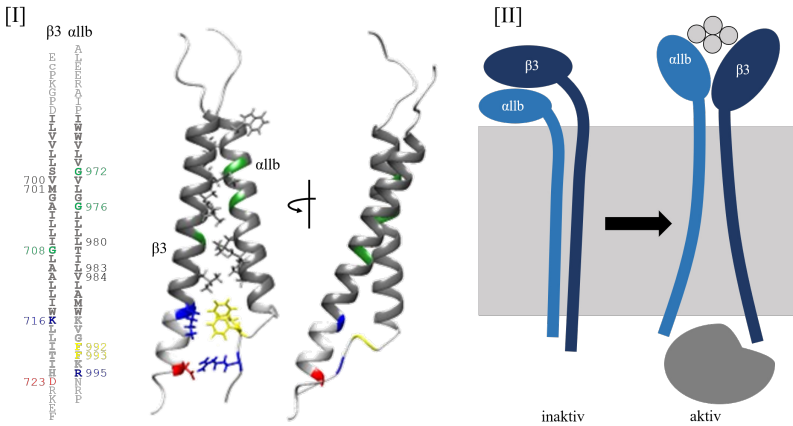


Abbildung 1.18: Struktur und Aktivierung des Integrinkomplexes $\alpha\text{IIb}\beta 3$. [I] Struktur und Sequenz des Komplexes (PDB-ID: 2K9J). [II] Das Heterodimer verharrt durch TM-Helix-Helix-Wechselwirkungen der αIIb - und β -Helix im inaktiven Zustand. Cytosolische Proteine stabilisieren die Separierung der TM-Helices und aktivieren so deren extrazelluläre ligandenbindende Domänen. Graphiken in Anlehnung an [78] und [145].

Die meisten TMD von Integrinen besitzen eine rechtsgängige Interaktionsstruktur.

Im Fall des Thrombozytenintegrins $\alpha\text{IIb}\beta 3$ interagieren die TM Helices

α IIb und β 3 mit einem Kreuzungswinkel von ca. 30° (Abb. 1.18 [I]) [151]. Die Sequenz der α IIb-Helix beinhaltet ein $G^{972}\text{xxx}G^{976}$ -Motiv, das an der Dimerisierung mit β 3 beteiligt ist. Eine weitere Stabilisierung dieser engen Dimerpackung ergibt sich durch das π -stacking der AS F^{992} und F^{993} in α IIb, welche gegen K^{716} von β 3 gepackt sind sowie durch eine Salzbrücke zwischen AS D^{723} (β 3) und R^{995} (α IIb), welche in der Juxtamembranregion des Helix-Dimers ausgebildet wird. Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen D^{723} und R^{995} scheint darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von α IIb β 3 zu spielen und das Dimer im inaktiven Zustand zu halten [145].

ErbB-Rezeptoren

Die Familie der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen besteht aus vier Mitgliedern, die durch kombinatorische Assoziation ein breites Spektrum von Liganden binden können [94, 102, 152–157]. In den TMD der humanen ErbB1, ErbB2 und ErbB4-Rezeptoren finden sich zwei konservierte SmxxxSm-Motive, welche durch drei Helixwindungen voneinander getrennt sind [158]. Eines der beiden Interaktionsmotive repräsentiert den aktiven Zustand des Rezeptors (N-terminales SmxxxSm-Motiv), wohingegen eine Interaktion, die durch das zweite (C-terminale) SmxxxSm-Motiv vermittelt wird, den inaktiven Zustand des Rezeptors repräsentiert [159, 160]. Die Rezeptorfunktion ist demnach schaltbar und aktiver Zustand oder Ruhezustand wird durch jeweils eines der beiden GxxxG-ähnlichen Motive stabilisiert [127]. In Abb. 1.19 sind die Strukturen einiger Erb-Rezeptoren dargestellt. Mittels NMR-Spektroskopie konnte die Struktur des aktivierten ErbB2-Homodimers ermittelt werden [160]. Helix-Helix-Wechselwirkungen werden über das polare Motiv $T^{652}\text{xxxSxxx}G^{660}$ vermittelt und stabilisiert. Die kleinen polaren Reste werden in dieser Anordnung dicht gepackt und sind so zur Ausbildung interhelikaler Wasserstoffbrückenbindungen befähigt. Van-

der-Waals-Wechselwirkungen der hydrophoben AS L⁶⁵³, V⁶⁵⁴ und L⁶⁵⁷ stabilisieren das Dimer weiter. Ein weiteres G⁶⁶⁸xxxG⁶⁷²-Motiv, das sich auf der TMD befindet, war zufolge der NMR-Analyse nicht Teil des Dimerinterfaces, sondern zeigte in die hydrophobe Membranumgebung und dient der Stabilisierung des thermodynamisch weniger günstigen inaktiven Zustands. Eine spezifische Mutation von Valin zu Glutaminsäure innerhalb der TMD des ErbB2 induziert eine unkontrollierte Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors und führt zur Bildung eines Onkogens, das häufig in Brust- und Eierstockkrebs zu finden ist [161, 162].

Einige AS, die bei der Homodimerisierung von ErbB2 beteiligt sind, sind auch bei der Heterodimerisierung von ErbB1/ErbB2 involviert [154]. Der Kern des Dimermotivs bleibt mit T⁶⁵², S⁶⁵⁶ und G⁶⁶⁰ gleich, aber wird weiter auf die AS-Sequenz T⁶⁵²xxISAxVGIxLV⁶⁶⁴ ausgedehnt. An der Dimerkontaktfläche sind die AS I⁶⁴⁶xTGMxGAXLLxxV⁶⁶⁰ der ErbB1 TM-Helix beteiligt. Die kleinen AS T⁶⁴⁸, G⁶⁴⁹, G⁶⁵² und A⁶⁵³ begünstigen eine enge Packung der beiden Helices. Hydrophobe AS tragen durch Van-der-Waals-Kontakte zur Stabilisierung des Heterodimers bei [154].

Dieses Beispiel zeigt anschaulich, dass ein SmxxxSm-Motiv zwar einen Rahmen für eine Helix-Helix-Wechselwirkung bieten kann, aber nicht unbedingt die Bildung nur einer einzigen Dimerstruktur unterstützt. Vielmehr bestimmen auch flankierende und umliegende AS die Spezifität und Stabilität von Helix-Helix-Wechselwirkungen.

Als einziges Mitglied der ErbB-Familie besitzt ErbB3 eine inaktive Kinase-Domäne und nur ein SmxxxSm-Motiv. Obwohl die TMD von ErbB3 das SmxxxSm-Motiv enthält, wird die linksgängige Homodimerisierung über das hydrophobe Sequenzmotiv I⁴⁹xxLVxIFxxLxxxFLxxR⁶⁷ vermittelt. Die AS 49-59 stehen dabei in engem Kontakt und stabilisieren das Dimer durch Van-der-Waals-Interaktionen. Der aromatische Ring von F⁶³ trägt durch π - π -Wechselwirkungen sowie durch Kations- π -Wechselwirkungen mit der Guanidingruppe von R⁶⁷ weiter zur Stabilisierung des Dimers bei [163]. Die Helix-Helix-Kontaktfläche des ErbB3-Homodimers ist im Vergleich zum

ErbB2-Homodimer und ErbB1/ErbB2-Heterodimer deutlich ausgedehnter und durch zusätzliches π -stacking und Kationen- π -Interaktionen in hohem Maße stabilisiert.

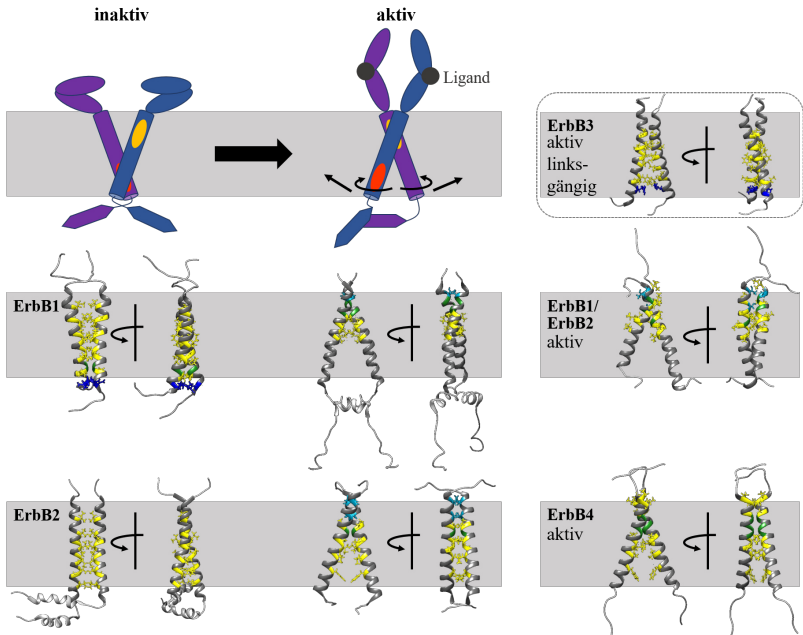


Abbildung 1.19: Strukturen der ErbB-Rezeptoren. Ohne Ligandenbindung liegen ErbB-Rezeptoren als inaktives Dimer vor. TM-Helix-Helix-Wechselwirkungen werden in diesem Fall über das C-terminale Motiv (rot) vermittelt. Das N-terminale Motiv (gelb) zeigt in die Lipidumgebung. Eine Ligandenbindung und Aktivierung bedingt die strukturelle Neuordnung der Dimerkonformation. Die Helices rotieren und wechselwirken nun mit dem N-terminalen Motiv miteinander, wie an den homodimeren ErbB1 und ErbB2 demonstriert ist (PDB-ID: 2M02/2M0B, 2JWA/2N2A). Das ErbB4-Dimer und das heteromere ErbB1/ErbB2 sind im aktiven Zustand dargestellt (PDB-ID: 2LCX, 2KSI). Das einzige Mitglied dieser Familie ohne Kinaseaktivität und mit linksgängiger Geometrie ist ErbB3 (PDI-ID: 2L9U). Abbildung in Anlehnung an [127] und [153].

PDB-ID	Protein	Sequenzausschnitte und Dimerisierungsmotive	∅	Rezeptor-zustand	Ref.
rechtsgängig	1AFO	GpA SEPEITLIIFGVMAGVIGTILLISYGIRRLI <u>I⁷⁵IxxGVxxGVxxT⁸⁷</u>	- 39,2	-	[104-106]
	2J5D	BNIP3 KVFLPSLLLSHLLAIGLGIYIGRR <u>F²²⁶xxxFxkxLxxSHkxLkxkxGxxIG²⁴⁹</u>	- 45	-	[114-116]
	2K9J	α1b ALEERAIPIWWWLVGVLGGLLLLTILVLMWVKVGF <u>G⁹⁷²xxxGxxLL⁹⁸⁰</u>	- 30	-	[152]
		β3 ECPKGPDIILVLLSVMGAILLIGLAALLIWKLLITI <u>V⁷⁰⁰MxxILxxG⁷⁰⁸</u>			
	2M20	ErbB1 KIPSIATGLVGLALLLLVVALGIGLFIARRRHIVRKRTRL <u>T⁶⁴⁸GxxGxxLxxLV⁶⁶⁰</u>	- 44,4	aktiv	[153, 154]
	2M0B	ErbB1 NGKIPS IATGMVGALLLLLVVALGIGLFMRRRHIV <u>M⁶²⁶xxALxxLxxALxxGLxxR⁶⁴⁵</u>	- 26,8	inaktiv	
	2JWA	ErbB2 QRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQKIRK <u>T⁶⁵²xxxSxxVGxxLVxxLxxkF⁶⁷¹</u>	- 41,8	aktiv	[155, 158]
	2N2A	ErbB2 QRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQKIRKY <u>I⁶⁵⁵xxxVxxLxxVLxxVFXxL⁶⁷⁴</u>	- 23,1	inaktiv	
	2KS1	ErbB1/ ErbB2 I ⁶⁴⁶ xTGMxGxxLxxV ⁶⁵⁹ <u>T⁶⁵²xxISAxVGIxLV⁶⁶⁴</u>	- 46	aktiv	[155]
	2LCX	ErbB4 QHARTPLIAAGVIGGLFLLVIVGLTFAVYVRRKSIK <u>P⁶⁵¹LxxAGxxGxxILxxVxxxP⁶⁷¹</u>	- 43,3	aktiv	[156]
linksgängig	2MXB	mEpoR SDLDPILTLTSLIILVLSLLLTVLALLSHRRTL	+ 20	-	[70,94]
	2MV6	hEpoR SDLDPILTLTSLIILVIVLVLTLVALLSHRRALKQKIWP			
	1MUJ	MHC α TVVCALGLSVGLVGVVGTFFIIQGLRS M ¹ SGIGGCVLGVI ¹ FLGLGLFIRERSQK	+ 20	-	[117]
	2L6W	PDGFR HSLPFKVVVISAILALVVTIISLIIILIMLWQKPRYE <u>V⁵⁰⁰VVxxxxxxLxVLxxIxxIILxxL⁵²³</u>	+ 25,4	-	[76]
		E5 MPNLWFLLFLGLVAAQMLLLLFLFLFLVYWDHFECST	-	-	[119]
	2HAC	ζζ DSKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSAD <u>C³²xxxDxxLxxYxxkLTxxFxxV⁵³</u>	+ 23	-	[142]
	2L34	DAP12 CSTVSPGVLAGIVGDVLVTLVLIALAVYFLGRL <u>L⁴³xxIVxGDxxLTxxIxxkV⁵¹</u>	+ 33	-	[143]
2L9U	ErbB3 GKTHLTALTVIAGLVVIFMMLGGTFLYWRGRHHHHHHH <u>I⁶⁴⁹xxLVxIFxxLxxkFLxxR⁶⁷⁷</u>	+ 24,9	-	[164]	

Tabelle 1.2: Zusammenstellung der vorgestellten TM-Helix-Helix-Wechselwirkungsmotive. Die TMD sind unterstrichen und die zugehörigen Dimerisierungsmotive fett hervorgehoben.

1.4 BsrG als potentieller H-Zipper

Die 294 nt lange *bsrG*-mRNA kodiert für ein 38 AS langes hydrophobes Protein der Masse 4336 Da. In der Methionin-reichen Sequenz finden sich vier geladene AS, darunter eine negativ geladene Glutaminsäure (E⁵) sowie drei positiv geladene Lysine am Ende des C-Terminus, welchen vier polare AS vorangestellt sind. Unter der Annahme einer α -helikalen Sekundärstruktur definieren die Programme TMpred, SOSUI und TMHMM für BsrG eine TMD mit einer charakteristischen Länge von 23 AS, welche sich über L⁷-M²⁹ bzw. I⁹-V³¹ erstreckt (Abb. 1.20) [164–166].

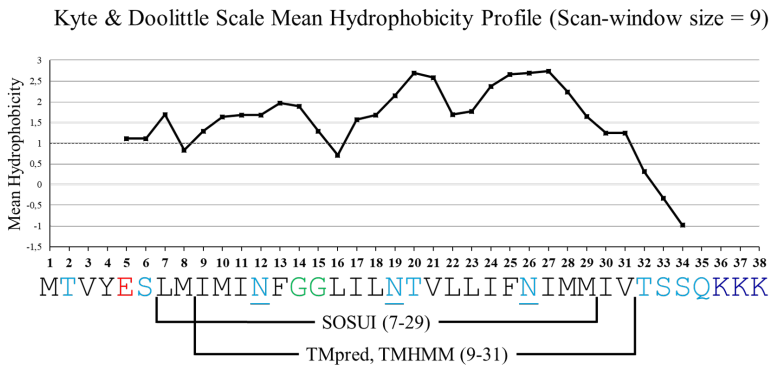
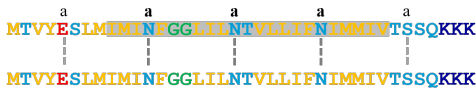


Abbildung 1.20: Kyte & Doolittle-Profil zur Verdeutlichung der durchschnittlichen Hydrophobizität des Toxins BsrG. Die Bereiche der mit den Programmen TMHMM, SOSUI und TMpred vorhergesagten TMD sind unter der AS-Sequenz angezeigt und jeweils 23 AS lang. Polare AS sind türkis, Glycine grün, das negativ geladene Glutamat rot und die positiv geladenen Lysine blau gefärbt.

In der AS-Sequenz von BsrG findet sich ein Heptadenmotiv, in dem die α -Positionen innerhalb der vorausgesagten TMD mit den AS N¹², N¹⁹ und N²⁶ besetzt sind, welche N-terminal von E⁵ und C-terminal von S³³ flankiert werden (Abb. 1.21 [I]). Unter Annahme einer α -helikalen Sekundärstruktur liegen diese AS leiterförmig übereinander und bilden so einen polaren

Streifen entlang der Helixachse, der von hydrophoben AS umgeben ist. Die *helical wheel*-Darstellung in Abb. 1.21 [II] verdeutlicht diese Anordnung graphisch.

[I]



[II]

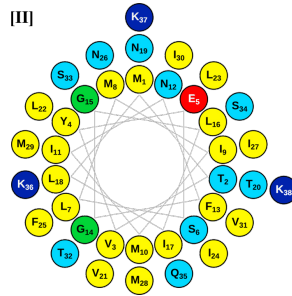


Abbildung 1.21: Aminosäuresequenz (I) und *helical wheel*-Darstellung (II) von BsrG. Polare AS sind türkis, Glycine grün, das negativ geladene Glutamat rot, die positiv geladenen Lysine blau und hydrophobe AS gelb gefärbt. [I] In der AS-Sequenz von BsrG wiederholen sich polare bzw. eine negativ geladene AS im Heptadenmotiv (a-Position). In einer parallelen Anordnung könnten zwei α -Helices über genau gegenüberliegende AS Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und deren Dimerisierung vermitteln. Die TMD nach TMHMM und TMpred ist grau hinterlegt. [II] Unter Annahme einer α -helikalen Sekundärstruktur liegen polare AS leiterförmig übereinander und bilden so einen polaren Streifen entlang der Helixachse.

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, ist der Transfer polarer AS in die hydrophobe Umgebung der Membran energetisch ungünstig [130]. Die Kosten dafür können durch die Ausbildung interhelikaler Salzbrücken oder Wasserstoffbrücken reduziert werden, da auf diese Weise polare helikale Segmente und geladene Reste von der hydrophoben Umgebung der Membran abgeschirmt werden [129]. Auf diese Weise können sich zwischen Helices hoch spezifische Wechselwirkungen ausbilden und eine Dimerisierung bedingen.

Lear *et al.* konnten bereits zeigen, dass die Dimerisierung eines Modellpeptids, das ein Asparagin in seiner TMD besitzt durch ein weiteres Asparagin im Abstand von sieben AS (Heptadenmotiv) verstärkt werden konnte [167]. Die außergewöhnliche AS-Sequenz von BsrG besitzt gleich drei im Heptadenmotiv angeordnete Asparagine in der vermuteten TMD. In Zusammenhang mit dem biologischen Hintergrund von BsrG als Toxin eines Typ I TA-

Systems liegt die Vermutung nahe, dass BsrG aufgrund seiner AS-Sequenz analog zu anderen Typ I Toxinen eine α -helikale Struktur mit TMD besitzen und durch polare Wechselwirkungen ein Dimer in der Membran ausbilden könnte, was die Voraussetzung für die Funktion von Typ I Toxinen als Ionenkanal oder Pore ist.

Die im Folgenden beschriebene hypothetische Struktur von BsrG als Dimer wird im weiteren Verlauf als Wasserstoffbrücken-Zipper bezeichnet und als „H-Zipper“ abgekürzt.

Da der C-Terminus von BsrG durch die drei Lysine L³⁶, L³⁷ und L³⁸ stark positiv geladen ist und sich zusätzlich direkt davor eine Art polare Krone aus den AS T³², S³³, S³⁴ und Q³⁵ bildet, liegt die Vermutung nahe, dass BsrG entsprechend der *positive inside*-Regel in die Membran eingebaut wird, da die positiven Ladungen und polaren Reste schwer an den negativ geladenen Lipidkopfgruppen der bakteriellen Membran vorbei gleiten werden. Auf diese Weise ergäbe sich eine parallele Anordnung miteinander wechselwirkender Helices, was auch die Voraussetzung für hoch spezifische Wechselwirkungen zwischen gegenüberliegenden AS ist, welche im antiparallelen Dimer aus strukturellen Gründen deutlich weniger spezifisch wären. In dieser parallelen Anordnung könnten zwei Helices zwischen den im Heptadenmotiv angeordneten AS interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen in der Membran ausbilden und so Triebkraft einer Dimerisierung sein, die so noch nicht beschrieben wurde (Abb. 1.21 [I] und 1.22). Die drei in der vermuteten TMD lokalisierten Asparagine N¹², N¹⁹ und N²⁶ bilden dabei das Kernelement des postulierten Dimerisierungsmotivs (Abb. 1.22 [I]). Eine weitere Stabilisierung könnte durch die AS E⁵ sowie S³³ erfolgen. In Abb. 1.22 [II] ist die H-Zipper-Hypothese graphisch veranschaulicht. Von Interesse sind ebenfalls die beiden Glycine G¹⁴ und G¹⁵ und die beiden polaren AS S⁶ und T²⁰, welche wie G¹⁴ vom postulierten Interface weg zeigen (Abb. 1.22 [II]).

Die Struktur von BsrG ist bisher noch nicht erforscht worden und soll Gegenstand dieser Arbeit sein. Von besonderem Interesse ist dabei die Untersuchung des hier erstmals postulierten H-Zippers, in welchem eine Dimerisierung durch interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen mehrerer leiterförmig angeordneter polarer AS vermittelt wird und ein neues Dimerisierungsmotiv von TM-Helices darstellen könnte.

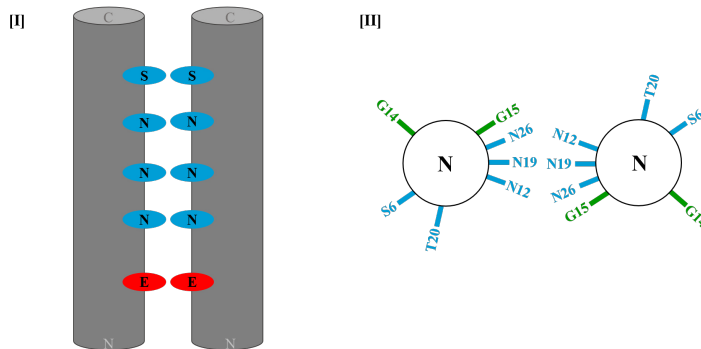


Abbildung 1.22: Graphische Beschreibung der H-Zipper-Hypothese. [I] In einer parallelen Anordnung könnten zwei BsrG- α -Helices durch spezifische interhelikale Wechselwirkungen der im Heptadenmotiv angeordneten polaren AS Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und so eine Dimerisierung bedingen und stabilisieren. Eine eventuelle porenbildende Funktion von BsrG könnte mit dieser Struktur erklärt werden. [II] Räumliche Anordnung der AS aus Sicht des N-Terminus. Das postulierte Dimerisierungsmotiv mit den Asparaginen N^{12} , N^{19} und N^{26} als Kernelement ist angezeigt. Die beiden Glycine G^{14} und G^{15} sind in grün dargestellt. Die beiden polaren AS S^6 und T^{20} sind vom postulierten Interface weg gedreht.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Typ I Toxins BsrG aus *B. subtilis*. Im Rahmen dessen soll die in Kapitel 1.4 aufgestellte H-Zipper-Hypothese geprüft werden, welche ein neuartiges Dimerisierungsmotiv von TM-Helices aufzeigen könnte.

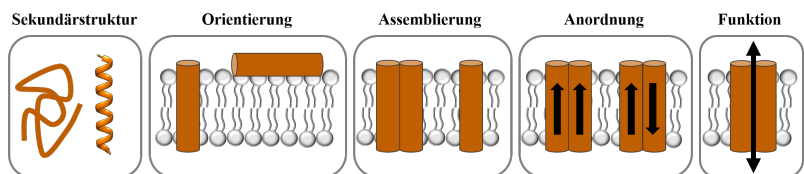


Abbildung 2.1: Strategie zur Charakterisierung von BsrG und der damit einhergehenden Prüfung der H-Zipper-Hypothese.

Erforderlich zur Bestätigung der H-Zipper-Hypothese ist, dass BsrG analog anderer Typ I Toxine eine α -helikale Sekundärstruktur sowie eine transmembrane Orientierung besitzt. Weiterhin dürfte BsrG nicht als Monomer in der Membran vorliegen, sondern muss als paralleles Dimer angeordnet sein, sodass spezifische Helix-Helix-Interaktionen ausgeübt werden können. Diese Bedingung ist darüber hinaus die Voraussetzung zur Bildung eines Ionenkanals oder einer Pore. Das strategische Vorgehen und die dabei elementaren Fragestellungen sind in Abb. 2.1 graphisch dargestellt.

Strategie zur Charakterisierung von BsrG:

- Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Methode zur rekombinanten Proteinexpression von BsrG in *E. coli* und der damit verbundenen Aufreinigung etabliert werden, um unmarkiertes und ^{15}N -vollmarkiertes Peptidpulver für Struktur- und Funktionsanalysen herzustellen
- Mittels CD-Experimenten (*Circular Dichroism*, Zirkulardichroismus) in Detergenzmizellen und Lipidvesikeln soll die Sekundärstruktur von BsrG ermittelt werden
- Zur Analyse der Orientierung soll BsrG in Modellmembranen rekonstituiert und mit komplementären OCD- (*Oriented Circular Dichroism*, Orientierter Zirkulardichroismus) und 1D FK (Festkörper)- ^{15}N -NMR-Experimenten untersucht werden
- Das Oligomerisierungs- und Assemblierungsverhalten von BsrG sowie die Anordnung eventuell assemblierter Helices sollen mit SDS-PAGE und ToxR-Assays eruiert werden
- ANTS/DPX-Leakage-Assays sollen zum Nachweis einer möglichen porenbildende Funktion durchgeführt werden
- Der Einfluss von BsrG auf biologische Membranen soll mittels MIC-Tests (*Minimal Inhibitory Concentration*, Minimale Hemmkonzentration) und Hämolyse-Assays untersucht werden
- Verschiedene Substitutionsmutanten von BsrG sollen hergestellt und analog zum Wildtyp analysiert werden, um den Einfluss verschiedener AS auf die Struktur und Funktion von BsrG zu bestimmen

3 Methoden

In diesem Kapitel werden zuerst die allgemeinen Methoden und Techniken der Laborpraxis beschrieben, welche für die Herstellung von Ausgangsmaterial für die Experimente zum Einsatz kamen (Kapitel 3.1). Anschließend werden alle Methoden aufgezählt, mit denen die Struktur und Funktion von BsrG-wt und Mutanten analysiert wurde, sowie deren theoretische Grundlagen erläutert (Kapitel 3.2).

3.1 Arbeitsmethoden zur Herstellung von Ausgangsmaterial

3.1.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

Mutagenese und Durchführung einer PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PCR und Mutagenesen zur Herstellung von BsrG-wt und Mutanten in folgenden Vektoren durchgeführt:

- **pETZ21 α** zur Gewinnung von Peptidpulver für Struktur- und Funktionsanalysen mittels CD-, OCD-, FK-NMR-, SDS-PAGE-, MIC-, Hämolysen- und Leakage-Experimenten
- **pToxRV** zur Untersuchung der Selbstassemblierung von BsrG-wt und Mutanten mittels ToxR-Assays

Die DNA-Sequenz von *bsrG* ist dabei schon in beide Vektoren kloniert und wird, mit Ausnahme der Herstellung von Mehrfachmutanten, als Matrize für die PCR eingesetzt.

Komponente	Menge
DNA-Templat	2 μL (10 ng)
Primer _{forward}	1,25 μL (125 ng)
Primer _{reverse}	1,25 μL (125 ng)
Quicksolution	3 μL
Reaction Buffer	5 μL
10 mM dNTP mix	1 μL
<i>PfuUltra</i> HF Polymerase	1 μL (2,5 U)
H ₂ O	auf 50 μL auffüllen

Tabelle 3.1: Ingredienzien für einen 50 μL -Reaktionsansatz einer Mutagenese-PCR

Die Durchführung der Mutagenese-PCR erfolgt entsprechend dem Quick-Change II XL Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Agilent. Der Reaktionsansatz einer Mutagenese-PCR ist Tabelle 3.1 zu entnehmen. Beim Pipettieren der Ingredienzien ist darauf zu achten, dass diese währenddessen auf Eis gekühlt werden. Die gewünschte Punktmutation wird über mutagene Primer (siehe Anhang) eingefügt, welche ebenfalls entsprechend dem Kit designt und von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert werden.

Abschnitt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	60	1 \times
Denaturierung	95	50	18 \times
Hybridisierung	56-65	50	
Elongation	68	350	
Finale Elongation	68	350	1 \times
Wahrung	4	-	-

Tabelle 3.2: Programmierung des Thermozyklers für eine Mutagenese-PCR

Die Parameter, unter welchen die Mutagenesen im Thermozykler ablaufen, finden sich in Tabelle 3.2. Nach beendeter Mutagenese wird dem Reaktionsansatz 1 μL der Typ II Restriktionsendonuklease Dpn I zugesetzt, welche die methylierte und nicht mutierte parentale Templat-DNA erkennt und schneidet. Nach dem Verdau durch Dpn I kann das mutierte Plasmid in kompetente *E. coli*-Zellen eingeschleust werden (Seite 55).

Komponente	Menge
DNA-Templat	2 (10 ng)
Primer _{forward}	1 μL (100 ng)
Primer _{reverse}	1 μL (100 ng)
10 \times Standard <i>Taq</i> Reaction Buffer	5 μL
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,25 μL (1,25 U)
10 mM dNTP mix	1 μL
25 mM MgCl_2	3 μL
H_2O	auf 50 μL auffüllen

Tabelle 3.3: 50 μL -Reaktionsansatz für die PCR zur Herstellung des verkürzten *bsrG*-Fragments

Als Vorarbeit für die ToxR-Assays und vor den eigentlichen Mutagenesen der pToxRV-Vektoren wird das *bsrG*-Gen mittels PCR verkürzt und nur ein gewünschtes DNA-Fragment von *bsrG* anstelle des ganzen Plasmids amplifiziert. Die entsprechende Vorschrift dazu ist dem *Taq* PCR Kit der Firma New England BioLabs zu entnehmen. Der Reaktionsansatz für diese PCR findet sich in Tabelle 3.3 und das entsprechende Temperaturprogramm in Tabelle 3.4.

Sobald das DNA-Fragment per PCR amplifiziert ist, wird es aufgereinigt, mit Restriktionsenzymen verdaut und nach anschließender Ligation in kompetente *E. coli*-Zellen eingeschleust (Seite 55).

Abschnitt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	30	1 ×
Denaturierung	95	30	
Hybridisierung	57-60	40	30 ×
Elongation	68	30	
Finale Elongation	68	300	1 ×
Wahrung	4	-	-

Tabelle 3.4: Programmierung des Thermozyklers für die Amplifizierung verkürzter *bsrG*-Fragmente

Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau (Seite 53) auftrennen. Weiterhin lässt sich überprüfen, ob eine PCR oder Mutagenese-PCR erfolgreich verlaufen ist. Die Elektrophorese wird in einem 1 % (*w/v*) Agarosegel durchgeführt. Dazu werden 0,5 g *low gelling* Agarose in 50 mL 1 × TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf 40 - 50 °C mit 2,5 µL des Fluoreszenzfarbstoffs peqGREEN versetzt. Die Lösung wird in einer Gießschale mit Probenkamm aushärten gelassen und anschließend mit 1 × TAE-Puffer überschichtet. Die Proben werden im Volumenverhältnis 1:5 mit 6 × Loading Dye versetzt und nach Entfernen des Probenkamms in die entstandenen Probenaschen eingefüllt. Zur Abschätzung der Größe werden zusätzlich DNA-Marker aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Spannung von 80 V über 2 h durchgeführt. Die Detektion der Banden erfolgt über die Fluoreszenz von peqGREEN. Einzelne Banden können mit dem Skalpell ausgeschnitten und die entsprechenden DNA-Fragmente wieder aus dem Gel isoliert werden.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um PCR-Produkte für einen Restriktionsverdau aufzureinigen oder um DNA-Fragmente sowie Plasmide nach einem Restriktionsverdau für eine anschließende Ligation von Spalt- und Nebenprodukten abzutrennen, werden die entsprechenden identifizierten Banden nach abgeschlossener Agarosegelelektrophorese (Seite 52) mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und analog dem Roti®-Prep Gel Extraction Kit der Firma Roth aus dem Gel eluiert. Dazu wird das Gel mit 650 μL Gel-Solubilizer versetzt und bei 50 °C für 10 min solubilisiert. Die Lösung wird auf eine Silica-Säule aufgetragen und für 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Unspezifische Bestandteile werden durch wiederholtes Waschen mit je 700 μL Washing-Buffer bei 12000 rpm von der Säule gespült. Durch zweiminütiges Zentrifugieren ohne zugegebenes Volumen wird das restliche Ethanol der Waschlösung entfernt. Die Elution der an der Membran gebundenen DNA erfolgt mit sterilem bidest. H₂O und einem Volumen von bis zu 20 μL .

Die Reinheit und Konzentration der eluierten DNA wird UV-spektrometrisch mit dem Programm VersaWave durch Messung der Wellenlängen $\lambda = 260$ nm und 280 nm bestimmt. Ein Quotient von $\frac{A_{260}}{A_{280}} = 1,8 - 2,0$ steht für eine hohe Reinheit der isolierten DNA.

Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Für die Klonierung von zuvor durch PCR amplifizierten DNA-Fragmenten in einen gewünschten Expressionsvektor, müssen sowohl der Vektor wie auch die DNA-Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut werden, um komplementäre Enden für die Ligation zu erhalten. Die DNA-Fragmente sowie der pToxRV-Vektor weisen beide Schnittstellen für die Enzyme BamHI und NheI auf, welche *sticky ends* produzieren. Der Doppelverdau wird mit den FastDigest Enzymen NheI und BamHI der Firma Thermo Scientific und entsprechend den Vorgaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 3.5 aufgelistet.

	Plasmid DNA/Vektor	PCR Produkt
H ₂ O, steril	14 µL	16 µL
10× FastDigest Green Buffer	2 µL	2 µL
DNA	2 µL (1 µg)	10 µL (ca. 0,2 µg)
FastDigest Enzym BamHI	1 µL	1 µL
FastDigest Enzym NheI	1 µL	1 µL
Gesamtvolumen	20 µL	30 µL

Tabelle 3.5: Reaktionsansatz eines Doppelverdau mit den FastDigest Restriktionsenzymen BamHI und NheI

Nachdem die Konzentration der DNA-Fragmente und der Plasmide UV-spektrometrisch quantifiziert ist, werden alle Ingredienzien in ein 0,5 µL Eppendorfgefäß pipettiert und bei 37 °C für 15 min im Wasserbad inkubiert. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgt durch Erhitzen der Lösung für 5 min auf 80 °C.

Ligation

Die Ligation der verdauten und aufgereinigten Konstrukte erfolgt mit einer T4 DNA Ligase. Der Reaktionsansatz besteht aus folgenden Komponenten:

- 2 µL 10× ligation buffer
- 50 ng DNA Templat
- 150 ng DNA Insert
- 2 µL T4 DNA Ligase (2 U)
- H₂O bis zu einem Endvolumen von 20 µL

Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 22 °C wird die T4 DNA Ligase durch Erhitzen für 10 min auf 65 °C deaktiviert. Das fertig ligierte Plasmid kann anschließend in kompetente Zellen eingeschleust werden (Seite 55).

3.1.2 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

Arbeiten unter sterilen Bedingungen

Um Kontaminationen durch Bakterien, Fremd-DNA oder andere Verunreinigungen zu vermeiden, werden alle Arbeiten mit Zellen und Zellkulturen an der Reinraumbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Gerätschaften, Mikroreaktionsgefäße, Spitzen, Zellkulturmedien und Lösungen werden für 20 min bei einer Temperatur von 121 °C und einem Wasserdampfüberdruck von 1 bar autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wie MgCl₂-, CaCl₂- oder Glucose-Lösungen werden durch einen Cellulosefilter der Porengröße 0,22 µm filtriert. Glasgefäße werden mit Aluminiumfolie verschlossen und im Trockenschrank für 3 h bei 200 °C ausgeheizt und sterilisiert. Vor und nach der Entnahme von Flüssigkeiten aus Glasgefäßen werden deren Öffnungen und Deckel über dem Bunsenbrenner abgeflammt.

Herstellung eines Glycerolstocks

Zur Herstellung eines Glycerolstocks werden 500 µL einer Übernachtskultur in einem sterilen 2 mL Eppendorfgefäß mit 500 µL einer sterilen 50 % Glycerin-Lösung versetzt und in flüssigem N₂ tiefgefroren. Die Stocks werden bei –80 °C gelagert.

Hitzetransformation

Im Rahmen dieser Arbeit werden alle Plasmide in die Lagerzellen *E. coli* NEB10β oder *E. coli* XL-10Gold eingeschleust. Für ToxR-Assays erfolgen weiterhin Transformationen von *E. coli* pd28 sowie *E. coli* FHK12. Zur Gewinnung von Peptidpulver mittels rekombinanter Proteinexpression werden *E. coli* Lemo21 Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Dafür werden 1 µL Plasmid aus einer Plasmidisolierung oder 4 µL frisch ligiertes Plasmid in einem 2 mL Eppendorfgefäß mit 50 µL hitzekompetenter Zellen überschichtet und 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation

erfolgt durch einen Hitzeschock bei 42 °C. Entsprechend der eingesetzten Zellen dauert dieser Schritt 10 s (*E. coli* NEB10 β , *E. coli* XL-10Gold, *E. coli* Lemo21) oder 30 s (*E. coli* pd28 sowie *E. coli* FHK12). Der Transformationsansatz wird daraufhin für 5 min auf Eis gekühlt und unter sterilen Bedingungen mit 950 μ L vorgewärmtem SOC-Medium versetzt. Die Lösung wird bei 220 rpm und 37 °C für 1 h inkubiert und anschließend auf zwei Agarplatten mit den entsprechenden Antikioptika ausplattiert (Seite 57), wobei auf eine Platte ein Überschuss von 800 μ L und auf die zweite Platte die restlichen 200 μ L pipettiert werden. Die Agarplatten werden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Darstellung kompetenter Zellen

Für die Darstellung kompetenter *E. coli*-Zellen des Stamms pd28 und FHK12 werden diese aus einem Glycerolstock auf eine Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (Seite 57). Am nächsten Tag wird eine 5 mL Übernachtskultur mit den auf der Agarplatte gewachsenen Kolonien angeimpft (Seite 58). Die Lösung wird am Folgetag 1:80 mit frischem LB-Medium verdünnt (5 mL auf 400 mL) und weiter im Inkubationsschüttler inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 erreicht hat. Die Zellen werden anschließend für 10 min bei 4000 rpm und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wird auf Eis gekühlt und in 50 mL eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Zellen werden wieder unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert, in 50 mM CaCl₂ aufgenommen und für 1,5 h auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 8 min bei 3000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, in 15 mL 50 mM CaCl₂ / 15 % Glycerol resuspendiert und in 100 μ L Aliquots in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Zellen werden bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wird das Roti®-Prep Plasmid Mini-Kit der Firma Roth verwendet. Insgesamt 4 mL einer Übernachtskultur werden dafür in einem 2 mL Eppendorfgefäß bei 14000 rpm für 3 min zentrifugiert und das Zellpellet vorsichtig in 250 µL Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 350 µL Neutralisationspuffer wird das Gefäß sechsmal invertiert und die Lösung für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine zuvor mit 100 µL Aktivierungspuffer behandelte Silica-Säule gegeben und für 30 s bei 9000 rpm zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 500 µL und 750 µL Waschpuffer durch Zentrifugation für 2 min bei 9000 rpm wird die DNA mit 20 µL sterilem bidest. H₂O eluiert. Die Konzentration der DNA wird UV-spektrometrisch mit dem Programm VersaWave ermittelt. Die Sequenzierung und Verifizierung der DNA-Sequenz wird von der Firma GATC-Biotech durchgeführt.

Ausstrich auf Agarplatten

Im Rahmen dieser Arbeit werden Agarplatten für Transformationen, Wachstumstests oder zum Animpfen einer Übernachtskultur für MIC-Tests oder Großexpressionen hergestellt.

Dafür wird frisches LB-, MH- oder CASO-Medium mit 1,5 % Agar (w/v) versetzt und autoklaviert. Zur Verwendung wird das bei Raumtemperatur feste Agarmedium in der Mikrowelle verflüssigt und anschließend im Wasserbad auf 60 °C temperiert. Sofern benötigt, werden die entsprechenden Antibiotika Kanamycin oder Chloramphenicol im Verhältnis 1:1000 (v/v) zugegeben und das Agarmedium anschließend in sterile Petrischalen gegossen und abkühlen gelassen. Das erstarrte Agarmedium kann nun mit Bakterien bestrichen werden. Dazu wird entweder bakterienhaltiges Medium aus einer Übernachtskultur auf die Platte pipettiert und durch Drehen der Platte verteilt oder mithilfe einer sterilen Öse in einem gewünschten Sektor ausgestrichen. Alternativ kann die Platte direkt mit Bakterien aus einem Glyce-

rolstock mittels steriler Pipettenspitze oder Öse bestrichen werden. Abgesehen von Agarplatten für Transformationen, wird dabei darauf geachtet, dass die Bakterienmenge beim Ausstreichen verdünnt wird. Sobald die Platten getrocknet sind, werden sie über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und mit Deckel nach unten inkubiert.

Anfertigen einer Übernachtskultur

Zur Herstellung von Übernachtskulturen wird unter sterilen Bedingungen ein Erlenmeyerkolben auf maximal $\frac{1}{3}$ seines ausgelegten Fassungsvermögens mit LB-, CASO- oder MH-Vollmedium befüllt und gegebenenfalls mit den entsprechenden Antibiotika in einem Volumenverhältnis von 1:1000 versetzt. Angeimpft wird die Lösung je nach Experiment mithilfe einer sterilen Pipettenspitze mit Bakterien, die an einem Cyrokügelchen haften, oder aus einem Glycerolstock oder mithilfe einer sterilen Öse durch Picken von Bakterienkolonien von einer Agarplatte. Die Inkubation der Übernachtskultur erfolgt bei 37 °C und 220 rpm über Nacht im Inkubationsschüttler.

Expression im LB-Vollmedium

Zur Bereitstellung größerer Mengen an unmarkierten Peptiden im mg-Maßstab werden Expressionen im L-Maßstab in LB-Vollmedium durchgeführt. Dafür wird die gewünschte Anzahl an 2 L-Erlenmeyerkolben mit je 500 mL LB-Medium befüllt und mit jeweils 0,5 mL Kanamycin und Chloramphenicol sowie 250 µM L-Rhamnose versetzt. Das Medium wird mit Zellen einer Übernachtskultur bis zu einer $OD_{600} = 0,1$ angeimpft und anschließend bei 220 rpm und 37 °C im Inkubationsschüttler bis zu einer OD_{600} zwischen 0,4 und 0,6 wachsen gelassen. Um die Proteinexpression zu starten, wird jeder Kolben mit 0,5 mL einer 400 mM IPTG-Lösung versetzt. Das Zucker-Analogon IPTG dient als permanenter Induktor des Lac-Operons in *E.coli*. Optimale Ausbeuten an Fusionsprotein wurden erhalten, wenn die Zellen bei 37 °C über Nacht bei 220 rpm geschüttelt und ca. 18 h nach der

Induktion durch IPTG geerntet wurden, indem sie für 15 min bei 7000 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet entweder sofort im Zellaufschluss weiterverarbeitet oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Expression im M9-Minimalmedium

Uniform ^{15}N -isotopenmarkierte Peptide ermöglichen Strukturanalysen mittels NMR-Festkörperspektroskopie. Zur Herstellung größerer Mengen an ^{15}N -isotopenmarkierten Peptiden im mg-Maßstab werden Expressionen im L-Maßstab in M9-Minimalmedium durchgeführt, welches sich aus genau kontrollierbaren Ingredienzien zusammensetzt. Als einzige Stickstoffquelle wird dabei auf $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oder $(^{15}\text{NH}_4)\text{Cl}$ zurückgegriffen. Die Expression verläuft analog der Expression unmarkierter Proteine im LB-Vollmedium (Seite 58). Lediglich die L-Rhamnosekonzentration wird hierbei auf $100\text{ }\mu\text{M}$ herabgesetzt.

3.1.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

Zellaufschluss

Um die Fusionsproteine aus den Zellen zu isolieren, werden diese in Lysepuffer mit 1 % NLS (*v/w*) resuspendiert und für 15 min in einem Ultraschallgefäß auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Bakteriensuspension viermal 3 min bei 65 % Leistung mit Ultraschall behandelt. Die Suspension wird währenddessen mit Eis gekühlt, um die bei der Ultraschallbehandlung entstehende Wärme abzuleiten. Unlösliche Zellrückstände und Membrantrümmer werden abschließend bei 26000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 2 h abzentrifugiert und von dem das Fusionsprotein enthaltenden Überstand abgetrennt. Das Pellet kann verworfen werden und das Fusionsprotein wird mittels Nickel-Affinitätschromatographie aus dem Überstand isoliert.

Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie

Alle in dieser Arbeit hergestellten Proteine werden als Fusionsprotein mit einem N-terminalen His₆-tag exprimiert, welcher eine Isolierung mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie ermöglicht. Die Histidine des His₆-tag bilden dabei mit den immobilisierten zweiwertigen Nickel-Ionen des Ni²⁺-NTA-Agarose-Säulenbetts einen Chelatkomplex und werden so selektiv auf der Säule gehalten und von anderen Proteinen und Zellbestandteilen abgetrennt. Die Elution der Fusionsproteine erfolgt durch einen Überschuss an Imidazol im Elutionspuffer, welches die Fusionsproteine aus ihrer reversiblen Bindung an die Affinitätsmatrix verdrängt.

Zu Beginn wird der abzentrifugierte Überstand des Zellaufschlusses (Seite 59) zusammen mit dem zuvor mit Lysepuffer äquilibriertem Säulenmaterial in einen 50 mL-Falcon gefüllt und über Nacht bei 4 °C unter langsamen Schütteln inkubiert. Pro 1 L-Expression werden 7 mL Säulenmaterial eingesetzt. Anschließend wird die Ni²⁺-NTA-Agarose, an welcher das Fusionsprotein nun haftet, auf eine *gravity-flow* Chromatographiesäule gegeben, wodurch das Säulenmaterial gasblasenfrei in der Vorrichtung verbleibt und die flüssige Phase abläuft und fraktionierend gesammelt sowie mittels SDS-PAGE auf Fusionsprotein getestet werden kann. Um alle Reste des Überstands von der Säule zu entfernen, wird zuerst mit 10 SV Lysepuffer gespült, welchem 10 mM Imidazol zugesetzt sind, um unspezifische Bindungen anderer Proteine zu unterbinden. Anschließend folgt ein Waschschritt mit 5 SV Waschpuffer, welcher eine erhöhte NaCl-Konzentration von 1 M besitzt. Eluiert wird fraktionierend mit ca. 20 SV Elutionspuffer welcher eine Imidazol-Konzentration von 330 mM aufweist. Um zu verhindern, dass das sehr hydrophobe Peptid BsrG auf der Säule präzipitiert, werden alle Puffer mit 0,1 % NLS (*w/v*) versetzt. Alle Fraktionen, welche positiv auf Fusionsprotein getestet werden, werden in einem 3 kDa Centricon auf ca. 3-5 mL pro 1 L-Expression eingeeengt. Zur Lagerung wird die Säule mit 10 SV bidest. H₂O und anschließend mit 5 SV 20 % EtOH gespült.

Proteolytische Spaltung mit Hydroxylamin

Im BsrG-Fusionsprotein befindet sich eine auf DNA-Ebene eingefügte Asparagin-Glycin-Schnittstelle zwischen dem Peptid und der Z21 α -Sequenz bzw. His₆-tag, welche spezifisch mit Hydroxylamin gespalten werden kann (Abbildung 3.1).

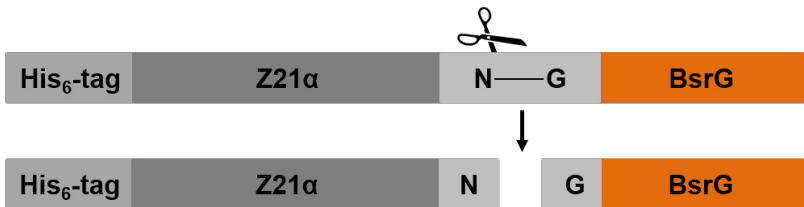


Abbildung 3.1: Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins. Hydroxylamin spaltet das Peptid von der Z21 α -Sequenz zwischen Asparagin und Glycin.

Die Spaltung wird in einer Lösung aus 0,2 M Tris, 2 M Hydroxylamin-Hydrochlorid, 2,5 M NaOH und NLS bei einem stark basischen pH-Wert von ca. 12 durchgeführt. Dafür werden die einkonzentrierten Elutionsfraktionen (Seite 60) im Centricon mit ca. dem 20-fachen Volumen einer 0,4 mM Tris-Lösung umgepuffert. Anschließend wird die umgepufferte und das Fusionsprotein enthaltende Lösung in einen 50 mL-Falcon gegeben und mit demselben Volumen einer 4 M Hydroxylamin-Lösung in 5 M NaOH versetzt. Der pH-Wert wird mit NaOH auf ≥ 12 eingestellt. Die Spaltung findet unter langsamem Schütteln über zwei Tage bzw. bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur statt. Die Verdauungslösung kann anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder per HPLC weiter aufgereinigt werden.

High Performance Liquid Chromatography

Zur Gewinnung von reinem Peptidpulver für Struktur- und Funktionsanalysen muss die Reagenzlösung der Hydroxylamin-Spaltung (Seite 61), welche

das gespaltene Peptid enthält, weiter über die HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*, Hochleistungsflüssigchromatographie) aufgereinigt werden, was eine Abtrennung von Salzen, weiteren Spaltprodukten sowie von anderen Molekülen ermöglicht. Das Prinzip der Trennung beruht auf der Adsorption und anschließender Desorption der zu trennenden Moleküle an einer stationären Phase bzw. auf unterschiedlichen Verteilungskonstanten eines Stoffes in zwei verschiedenen Phasen. Das aufzutrennende Stoffgemisch wird in einem Lösungsmittelgemisch (mobile Phase) durch eine Säule (stationäre Phase) gepumpt. Durch Anlegen eines Lösungsmittelgradienten ändert sich die Polarität des Lösungsmittelgemisches mit der Zeit, sodass unterschiedlich polare Substanzen zu verschiedenen Zeiten von der Säule eluiert werden können. In Abhängigkeit der Polarität der Moleküle, sowie der beiden Phasen, ergeben sich so unterschiedliche Retentionszeiten der einzelnen Komponenten des Gemischs, wodurch Stoffe fraktionierend gesammelt werden können. Andere Parameter wie die Flussrate, Säulentemperatur und die Probenkonzentration beeinflussen zusätzlich zu den chemischen Eigenschaften der verwendeten Materialien die Trennleistung. Bei der in dieser Arbeit eingesetzten RP-HPLC (*Reversed-Phase*, Umkehrphase) besteht die stationäre Phase aus einem apolaren, hydrophoben Material, wie beispielsweise aus einem mit einem C18-n-Alkan modifizierten Kieselgel, und die mobile Phase aus einer relativ polaren Flüssigkeit. Apolare Stoffe sind in der polaren mobilen Phase nur sehr schlecht löslich und werden durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der apolaren Oberfläche der stationären Phase an der Säule zurückgehalten. Aufgrund dessen besitzen hydrophobe Stoffe eine längere Retentionszeit als polare Stoffe wie Salze. Für die Aufreinigung des stark hydrophoben Peptids BsrG werden eine semipräparative C4-Polymersäule und die im Anhang A aufgelisteten Lösungsmittelgemische eingesetzt. Der angelegte Gradient ist Tabelle 3.6 zu entnehmen. Die Temperatur während der Trennung beträgt konstant 35 °C und die Flussrate $4 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$.

Zusätzlich zum Peptidrückgrat, welches Licht der Wellenlänge 220 nm ab-

sorbiert, finden sich die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin in der Aminosäuresequenz von BsrG, welche bei 260-280 nm mittels UV/VIS-Detektor detektiert werden können. Einzelne Fraktionen können so gesammelt und mit MALDI-TOF-Messungen und SDS-PAGE identifiziert, sowie auf Reinheit geprüft werden.

Zeit t [min]	Anteil Lösungsmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0	30	4
3	30	4
10	90	4
11	90	4
13	100	4
15	100	4
17	30	4
20	30	4

Tabelle 3.6: Verwendeter Lösungsmittelgradient der HPLC zur Gewinnung an reinem Peptidpulver zur Struktur- und Funktionsanalyse von BsrG. Die Temperatur während der Trennung beträgt konstant 35 °C.

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

Die Masse und Reinheit aller exprimierten und aufgereinigten Peptide wird mittels hoch sensitiver MALDI-TOF-Spektrometrie (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight*) analysiert und überprüft. Hierfür werden Proteine mit einer Matrix aus organischen Molekülen kokristallisiert und mit einem Laserstrahl bestrahlt. Die auf diese Weise angeregten Moleküle der Matrix, welche im Überschuss vorliegen, gehen in einen gasförmigen, ionisierten Zustand über und reißen die kokristallisierten Proteinmoleküle mit sich. Die ionisierten Probemoleküle werden anschließend in einem elektrischen Feld im Hochvakuum beschleunigt. Im Anschluss dar-

auf passieren die Teilchen eine feldfreie Zone, wo sie entsprechend ihrer Flugzeit aufgetrennt und detektiert werden. Die Dauer der Flugzeit von der Quelle bis zum Detektor ist proportional zur Masse m und der Ladung z der Proteine:

$$TOF \propto \sqrt{\frac{m}{z}} \quad (3.1)$$

Durch Vergleich der erhaltenen Werte mit Standardreferenzproben kann so die Masse von Proteinen oder Peptidgemischen identifiziert und exakt bestimmt werden. Alle Messungen wurden von Dr. Sergii Afonin an einem MALDI-TOF-Massenspektrometer der Firma Bruker durchgeführt.

Dialyse

Die gesammelten HPLC-Fractionen, welche mittels MALDI-TOF und SDS-PAGE positiv auf Masse und Reinheit getestet wurden, werden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt, bis die Proteine beginnen auszufallen oder das Volumen ausreichend reduziert ist. Die eingeeengte Lösung wird anschließend in Dialyseschläuche der Ausschlussgröße 2 kDa gefüllt und 7 Tage gegen 4 L bidest. H₂O, welches täglich ausgewechselt wird, dialysiert. Nach Beenden der Dialyse wird der Inhalt des Dialyseschlauchs bei -80 °C tiefgefroren und anschließend lyophilisiert. Die Reinheit und Masse des lyophilisierten Produkts wird erneut mit MALDI-TOF und SDS-PAGE kontrolliert.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mittels SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wird die Reinheit und Masse der exprimierten Peptide überprüft sowie deren Oligomerisierungsverhalten abgeschätzt. Weiterhin werden SDS-PAGE zur Durchführung eines Western Blots zur Bestimmung des Proteingehalts einer Zelle benötigt (Seite 66).

Zur Vorbereitung der Proben werden diese in denaturierendem Cracking-Buffer gelöst. Pulverisierte Proben werden in einer entsprechenden Men-

ge an Cracking-Buffer resuspendiert und mit Ultraschall behandelt. Bei Zellproben folgt zusätzlich ein Hitzedenaturierungsschritt. Dafür werden die Zellproben für 5 min im Wasserbad bei 95 °C erhitzt und unlösliche Bestandteile anschließend für 5 min bei 12000 rpm abzentrifugiert. Der Cracking-Buffer wird in diesem Fall entsprechend folgender Formel zugegeben:

$$\frac{\text{OD}_{600}}{0,2} \times 75 = \text{Volumen Cracking-Buffer in } \mu\text{L} \quad (3.2)$$

Inhaltsstoffe dieses Puffers sind unter anderem DTT und β -Mercaptoethanol, welche Disulfidbrücken reduzieren, sowie das anionische Detergenz SDS, welches sich mizellenartig an Peptide anlagert und so deren Eigenladung überdeckt. Dadurch ergibt sich für die Proteine eine negative Gesamtladung, wodurch sie im elektrischen Feld zur Anode wandern. Da das Verhältnis von Ladung zu Größe für jedes Protein annähernd gleich ist, wirkt dabei die Matrix, das Polyacrylamidgel, in welche die Peptide für die Elektrophorese eingebettet werden, wie ein Molekularsieb und erlaubt so eine Auftrennung der Peptide in Abhängigkeit von deren Größe und damit Masse, da kleinere Peptide schneller durch die Poren des Polyacrylamidgels zur Anode wandern als größere Peptide, welche zurückgehalten werden. Zur Abschätzung der Peptidmassen wird neben den Proben auch ein Marker mit Referenzproteinen aufgetragen.

Für die SDS-PAGE werden diskontinuierliche 16 % Tris-Tricin-Gele gegossen, welche aus einem Sammel- und Trenngel unterschiedlicher Porengröße bestehen.

Die Inhaltsstoffe der Gele sind im Anhang A aufgelistet und werden bis auf die zwei Komponenten TEMED und APS, welches die Polymerisationsreaktion startet, separat in 50 mL Falcons vorgelegt und gut gemischt. Sobald der Radikalstarter APS der Trenngellösung zugefügt ist, werden ca. 3,4 mL davon zwischen zuvor auf Dichte geprüfte Glasplatten gegossen und mit bidest. H₂O überschichtet, um eine ebene Grenzfläche zu erhalten. Sobald das

Trenngel auspolymerisiert ist, wird die Prozedur mit ca 1,5 mL Sammelgel-lösung wiederholt. Abgeschlossen wird in diesem Fall mit einem Gelkamm, welcher die Probenaschen bildet.

Die Elektrophorese wird in einer Mini-Protean Tetra cell Kammer der Firma Bio-Rad durchgeführt. Die Probenaschen der polymerisierten Gele werden mit den Proben beladen und die Kammern entsprechend mit Anoden- und Kathodenpuffer befüllt. Die Stromstärke der Elektrophorese wird so lange konstant auf 30 mA gehalten, bis die Lauffront die gewünschte Höhe erreicht.

Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden werden die Proteine innerhalb des Gels fixiert. Dazu werden die Gele vorsichtig in bidest. H₂O bis zum Sieden in der Mikrowelle erhitzt. Die Prozedur wird dreimal wiederholt, wobei das bidest. H₂O jeweils ausgetauscht wird. Sobald die Gele abgekühlt sind, werden die Banden mit kolloidaler Coomassie-Färbelösung überschichtet und unter langsamem Schütteln bei Raumtemperatur eingefärbt. Die ersten Banden erscheinen nach 10 min. Ein Entfärben ist bei Verwendung dieser Färbelösung nicht nötig, da der Hintergrund des Gels nicht eingefärbt wird.

Western Blots

Zur Kontrolle der Expressionsraten, sowie zum Nachweis von Fusionsproteinen im Allgemeinen, werden Western Blots durchgeführt, wodurch verschiedene Fusionsprotein-Konstrukte in unterschiedlichen Zelllinien über spezifische Antikörperbindungen, gekoppelt mit einer Farbreaktion, detektiert werden können.

Zum Nachweis des His₆-tag Fusionsproteins, sowie der für die ToxR-Assays verwendeten Fusionsproteine, werden die folgenden Antikörper eingesetzt:

- Primärantikörper
 - Anti-His-tag (monoklonal)
 - Anti-MBP (monoklonal)

- Sekundärantikörper
 - Goat-Anti-Mouse IgG Alkalische Phosphatase Konjugat (polyklonal)

Die primären Antikörper binden dabei spezifisch jeweils an den His₆-tag bzw. das MBP. Der Sekundärantikörper ist gegen den ersten Antikörper gerichtet und mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelt, welche die in der Detektionslösung enthaltenden Substrate NBT und BCIP zu den blauviolett, unlöslichen Produkten Indigo und Formazan umsetzen, die auf einer Nitrocellulosemembran präzipieren und so farbige Banden erzeugen.

Zu Beginn werden die Proben mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Das Sammelgel wird anschließend vom Trenngel abgetrennt und verworfen. Der sandwichartige Aufbau eines *semi-dry* Western Blots ist nachfolgend in Tabelle 3.7 dargestellt. Die Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran werden auf die Größe des SDS-Gels (ca. 9 × 7 cm) zugeschnitten und mit den entsprechenden Puffern getränkt.

Kathode

9 Lagen Filterpapier	Kathodenpuffer
SDS-Gel	Anodenpuffer II
Nitrocellulosemembran	Anodenpuffer II
6 Lagen Filterpapier	Anodenpuffer II
3 Lagen Filterpapier	Anodenpuffer I

Anode

Tabelle 3.7: Schematischer Aufbau eines *semi-dry* Western Blots

Zur Detektion werden die Fusionsproteine bei einer Stromstärke von 150 mA für 45 min elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Um freie Bindungsstellen zu blockieren, wird die Nitrocellulosemembran für 1 h in Milchpulverlösung geschüttelt und dann dreimal à 5 min in Puffer B

gewaschen. Anschließend wird der Primärantikörper in Puffer B auf die Membran gegeben und für 1 h unter Schütteln inkubiert. Zur Entfernung des primären Antikörpers wird die Membran dreimal à 5 min mit Puffer B gewaschen und für 45 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser wird anschließend durch dreimaliges Waschen mit Puffer B entfernt. Zur Vorbereitung der Membran auf die Detektionslösung wird diese zweimal à 10 min in Puffer C gewaschen. Anschließend wird die Membran so lange in Detektionslösung geschüttelt, bis der gewünschte Grad der Färbung eintritt. Durch Waschen mit bidest. H₂O wird die Färbereaktion abgebrochen.

3.2 Methoden zur Struktur- und Funktionsanalyse

3.2.1 Mikrobiologische Methoden zur Struktur- und Funktionsanalyse

ToxR-Assays

Die meisten integralen α -helikalen Membranproteine assemblieren zu nicht-kovalenten funktionalen Di- oder Oligomeren. Triebkraft dieser Assemblierung sind häufig sequenzspezifische Wechselwirkungen α -helikaler TMD. Basierend auf dem ToxR Protein aus dem Gram-negativen Bakterium *V. cholerae* erlauben ToxR-Assays eine Untersuchung des Oligomerisierungsverhaltens von BsrG-wt und Mutanten in einer natürlichen Membranumgebung.

Das ToxR Protein ist ein die innere Zellmembran einfach durchspannendes Membranprotein, welches als Dimer an den Cholera-toxin Promotor *ctx* bindet und damit die Transkription virulenter Gene aktiviert [104, 111, 168].

Bei diesem Assay wird ausgehend vom Wildtyp des ToxR Proteins ein gentechnisch verändertes chirmäres Konstrukt hergestellt, welches aus drei Elementen besteht:

- dem monomeren periplasmatischen MBP
- einer gewünschten TMD
- der N-terminale DNA-bindende Domäne von ToxR, welche im dimeren Zustand als Transkriptionsaktivator agiert

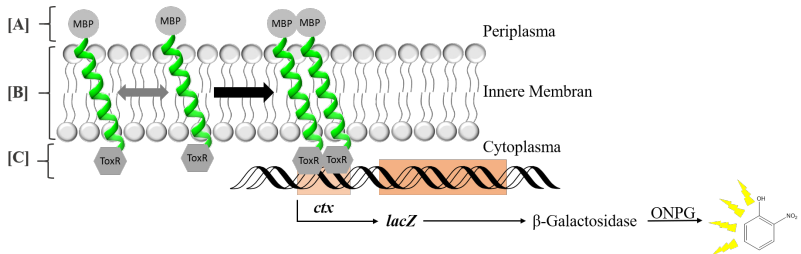


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des ToxR-Assays. Ein chimäres ToxR-Konstrukt besteht aus einem C-terminalen periplasmatischen MBP [A], womit die korrekte Membraninsertion geprüft werden kann. N-terminal befindet sich das ToxR-Protein [B], welches als Dimer als Transkriptionsaktivator agiert und indirekt über die Messung der β -Galactosidase-Aktivität eine Aussage bezüglich des Oligomerisierungsverhaltens eines Proteins ermöglicht. Zwischen diesen beiden Proteinen befindet sich die zu untersuchende TMD [B].

Dieses chimäre Konstrukt kann in *E. coli*-Zelllinien exprimiert werden, welche den Cholera-toxin Promotor *ctx* in sich tragen, an den strangabwärts Reportergene fusioniert sind. Eine Selbstassoziation der TMD-Helices resultiert in einer durch das ToxR-Dimer vermittelten Aktivierung des Reportergens *lacZ*, welches für β -Galactosidase kodiert. Das Expressionslevel dieses Reportergens dient als Indikator für die Stärke einer durch TMD-TMD Wechselwirkungen ausgelösten Assoziation. Eine Quantifizierung erfolgt indirekt über die Messung der β -Galactosidase-Aktivität (Abb. 3.2). Als Referenz und Positivkontrolle dient GpA-tmd, dessen β -Galactosidase-Aktivität auf 100 % gesetzt wird. Als Negativkontrolle dient der Substitutionsmutant GpA-mut, welcher kein stabiles Dimer mehr ausbilden kann. Inwiefern ein bestimmtes Aminosäure-Motiv der TMD von BsrG-wt bei einer Selbstassoziation eine Rolle spielt, wird anhand verschiedener Substitutionsmutanten untersucht.

Konstrukt	Sequenz der TMD
GpA-tmd	LIIFGVMAGVIGTIL
GpA-mut	LIIFGVMAAVIGTIL
Δ -TM	ohne TMD
E5-TMD	LFLGLVAAMQLLLLLLFLLLF
BsrG-wt (8-31)	MIMINFGGLILNTVLLIFNIMMIV
N12A	MIMIAFGGLILNTVLLIFNIMMIV
F13A	MIMINAGGLILNTVLLIFNIMMIV
G14I	MIMINFIGLILNTVLLIFNIMMIV
G15I	MIMINFGILILNTVLLIFNIMMIV
N19A	MIMINFGGLILATVLLIFNIMMIV
T20A	MIMINFGGLILNAVLLIFNIMMIV
N26A	MIMINFGGLILNTVLLIFAIMMIV
N12A/N19A	MIMIAFGGLILATVLLIFNIMMIV
N12A/N26A	MIMIAFGGLILNTVLLIFAIMMIV
N19A/N26A	MIMINFGGLILATVLLIFAIMMIV
N12A/N19A/N26A	MIMIAFGGLILATVLLIFAIMMIV

Tabelle 3.8: Auflistung der hergestellten chimären ToxR-Konstrukte. GpA-tmd dient als Positivkontrolle sowie als Referenz beim ToxR-Assay. GpA-mut dient als Negativkontrolle bei den ToxR-Assays. Δ TM ist die Negativkontrolle der Wachstumstests und das bekannte Peptid E5 (hier E5 TMD-7) dient als weiteres Referenzpeptid.

Die TMD aller analysierten Konstrukte finden sich in Tabelle 3.8.

Ein ToxR-Assay besteht aus drei Teilen:

1. Messung der Stärke der Selbstassoziation
2. Kontrolle der Expression
3. Kontrolle der korrekten Membraninsertion

Die Messung der Stärke der Selbstassoziation erfolgt indirekt über die Messung der β -Galactosidase-Aktivität in FHK12 *E. coli*-Zellen, welche mit

den entsprechenden Plasmiden transformiert wurden. Pro Konstrukt werden 8 Klone von einer zuvor hergestellten Agarplatte gepickt und jeweils in 1 mL LB-Medium mit 0,0025 % Arabinose (*w/v*), 0,4 mM IPTG und 1:1000 (*v/v*) Kanamycin resuspendiert. Die Suspensionen werden in 24-*wells*-Platten pipettiert und für 20 h bei 28 °C in einem Tischschüttler inkubiert. Jeweils 5 µL jeder ÜNK werden in die *wells* einer 96-*well*-Platte in 100 µL gewaschenem Z-Puffer resuspendiert und deren OD bei $\lambda = 650$ nm gemessen. Als *Blank* dient purer Z-Puffer.

Zum Aufbrechen der Zellen und Freisetzen der β -Galactosidase wird in jede *well* 50 µL SDS/Z-Puffer pipettiert und die Zellsuspension für 10 min bei RT auf dem Tischschüttler inkubiert. Die enzymatische Farbreaktion startet unmittelbar nach der Zugabe von 50 µL ONPG/Z-Puffer. Das synthetische Galactosid ONPG wird durch die freigesetzte β -Galactosidase zu Galactose und dem gelben Produkt *o*-Nitrophenol hydrolysiert. Die Intensität der Gelbfärbung hängt von der Enzymaktivität der freigesetzten β -Galactosidase ab und wird alle 48 s photometrisch bei $\lambda = 405$ nm über 15 - 30 min an einem Epoch2 microplate reader der Firma BioTek mit der Software Gen5 3.2 aufgezeichnet. Die β -Galactosidase-Aktivität ergibt sich aus den Daten des linearen Anfangsbereichs der kinetischen Messung mit Formel 3.3:

$$\beta\text{-Galactosidase-Aktivität [Miller Units]} = \frac{(\Delta\text{OD}_{405} \div \Delta t)}{\Delta\text{OD}_{650}} \times 1000 \quad (3.3)$$

Dabei resultieren die ΔOD_{405} -Werte aus der gemessenen Absorption des *o*-Nitrophenols, Δt entspricht der Inkubationszeit in [min] und ΔOD_{650} berücksichtigt die Konzentrationen der Zellen im Testvolumen.

Um eine Aussage über die relative Stärke der Selbstassoziation von BsrG-wt und Mutanten zu treffen, werden die Ergebnisse der Berechnung in Relation zu den Werten für die Positivkontrolle GpA-tmd gesetzt, welcher ein Wert von 100% β -Galaktosidase Aktivität zugeordnet wird.

Die erhaltenen Ergebnisse können verifiziert werden, sobald die Expressi-

onslevel aller Konstrukte vergleichbar und deren korrekter Einbau in die Membran nachgewiesen ist.

Zur Kontrolle der Expressionslevel werden weitere 5 μL der ÜNK entnommen und ein Western Blot durchgeführt (Seite 66).

Die korrekte Membraninsertion wird anhand von Wachstumstests transformierter pd28 *E. coli*-Zellen auf Agarplatten oder in flüssigem maltosehaltigen Minimalmedium geprüft. pd28 Zelle besitzen kein *malE*-Gen, welches für MBP kodiert, und können Maltose nur dann aufnehmen, wenn das chimäre ToxR-Konstrukt so in die innere Membran integriert ist, dass das MBP in den periplasmatischen Raum zeigt. Als Negativkontrolle dient hierbei das Konstrukt $\Delta\text{-TM}$, bei welchem die TMD zwischen ToxR und MBP deletiert wurde.

Die entsprechenden Konstrukte werden auf einer LB-Agarplatte ausplattiert (Seite 57) und im Brutschrank inkubiert. Einzelne Kolonien werden mit einer sterilen Öse von den Platten gepickt und in 300 μL M9-Medium resuspendiert. 10 mL maltosehaltiges M9-Medium werden mit 200 μL dieser Zellsuspension beimpft und die OD_{600} über mind. 48 h 1:5 verdünnt gemessen. Für Wachstumstests auf maltosehaltigen M9-Agarplatten werden 10 μL einer ÜNK auf einem Sektor der Agarplatte ausgestrichen und die Platten für 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

MIC-Tests

Die MIC-Tests (*Minimal Inhibitory Concentration*, Minimale Hemmkonzentration) werden in Anlehnung an das Protokoll aus [169] durchgeführt. Folgende Gram-positive Zelllinien und Peptide werden mittels MIC untersucht:

- Zelllinien
 - *B. subtilis* DSM 347
 - *K. rhizophila* DSM 348
 - *S. xylosus* DSM 20267

- Peptide
 - BsrG-wt und Mutanten
 - Kontrollpeptide: TisB, GS, PmB

Alle verwendeten Zellen werden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ als Cryostock gelagert. 10 mL CASO-Medium werden mit einem Cryokügelchen aus einem Cryostock beimpft und über Nacht bei 200 rpm und $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Um einzelne Kolonien zu erhalten, wird mithilfe einer sterilen Öse eine Probe der Übernachtskultur auf einer CASO-Agarplatte verdünnend ausgestrichen. Die Agarplatte wird über Nacht im Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Am Folgetag wird eine Öse einzelner Kolonien von der Agarplatte entnommen und in einem 2 mL Eppendorfgefäß in $300\text{ }\mu\text{L}$ $1\times$ MH-Medium resuspendiert. Mit dieser Suspension wird eine 10 mL $1\times$ MH Übernachtskultur bis zu einer $\text{OD}_{550} = 0,02$ beimpft. Am nächsten Tag wird eine 10 mL $1\times$ MH-Medium Tageskultur mit der Übernachtskultur bis zu einer $\text{OD}_{550} = 0,2$ beimpft und bis zu einer $\text{OD}_{550} = 1 - 2$ bei 200 rpm und $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wachsen gelassen. Ausgehend von dieser Tageskultur wird 1 mL $1\times$ MH-Medium mit einer $\text{OD}_{550} = 0,2$ hergestellt und davon $200\text{ }\mu\text{L}$ zu $19,8\text{ mL}$ $1\times$ MH-Medium gegeben, sodass sich eine 1:100 Verdünnung ergibt.

Zur Bestimmung der MIC werden $50\text{ }\mu\text{L}$ $2\times$ MH-Medium in die oberste Reihe einer 96-well Mikrotiterplatte der Firma Sarsted (*flat bottom*) pipetiert. Die restlichen wells werden mit $50\text{ }\mu\text{L}$ $1\times$ MH-Medium befüllt. Die Peptide BsrG-wt und Mutanten werden zuerst in 100 % TFE gelöst, aliquotiert und nach Entfernen des Lösungsmittels in 100 % Ethanol aufgenommen. Die Kontrollpeptide PmB, GS und TisB werden direkt in 50 % Ethanol gelöst, sodass sich für alle Peptide eine Stammlösung von $1024\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ ergibt.

50 μL dieser Peptid-Stammlösung werden zu den 50 μL $2\times$ MH-Medium in der obersten Reihe der 96-*wells* Platte gegeben, sodass sich eine $1\times$ MH-Medium-Konzentration ergibt. Im Folgenden wird eine Verdünnungsreihe hergestellt, indem 50 μL aus der obersten *well*, welche Peptid enthält, entnommen werden, zu den 50 μL $1\times$ MH-Medium der nächsten *well* gegeben und entsprechend weiter verfahren wird. Es ist darauf zu achten, dass pures 100 % Ethanol als Kontrolle aufgetragen wird, sowie, dass die beiden letzten Spalten nicht mit Proben befüllt werden, da sie als Negativ- bzw. Positivkontrolle dienen. In die letzte Spalte werden dafür jeweils weitere 50 μL $1\times$ MH-Medium gegeben. Anschließend wird in alle *wells*, mit Ausnahme der letzten Spalte, welche als Negativkontrolle dient, jeweils 50 μL der zuvor beschriebenen verdünnten Bakteriensuspension gegeben. Die Platten werden abgedeckt und steril im Brutschrank bei 37°C für 22 h inkubiert. Um das bakterielle Wachstum zu untersuchen, werden 20 μL einer wässrigen 80 μM Lösung des Redoxindikators Resazurin in jede *well* pipettiert. Nach weiterer zweistündiger Inkubation bei 37°C wird die Aktivität der Respiration jeder *well* bestimmt, indem die Differenz der Absorption von Resorufin bei 570 nm und Resazurin bei 600 nm gemessen wird. Positive Werten bestätigen bakterielles Wachstum, da vitale Zellen Resazurin zu Resorufin reduzieren. Die MIC ergibt sich aus der Konzentration, welche gerade noch einen positiven Wert angibt. Zusätzlich wird die OD_{450} jeder *well* gemessen. Die Messungen werden an einem Epoch2 microplate reader der Firma BioTek mit der Software Gen5 3.2 durchgeführt.

Hämolyse-Tests

Um den Einfluss von BsrG-wt auf rote Blutkörperchen zu untersuchen, werden Hämolyse-Tests durchgeführt. Das Erythrozytenkonzentrat für diese Tests wird vom Städtischen Klinikum Karlsruhe bezogen. Zur Vorbereitung des Bluts werden 5 mL Erythrozytenkonzentrat in 45 mL Puffer 1 (172 mM Tris mit pH 7,6 bei 22°C) resuspendiert und bei 1500 rpm und

4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgetragen und die Prozedur zweimal wiederholt. Anschließend wird 1 mL der sedimentierten Erythrozyten in 9 mL Puffer 1 resuspendiert und auf Eis gelagert. Diese Suspension dient als Erythrozyten-Stammssuspension. 0,5 mL dieser Suspension werden mit 9,5 mL Puffer 2 (172 mM Tris mit pH 7,6 bei 37 °C) verdünnt und in 200 µL-Aliquots in 1,5 mL Eppendorfgefäße pipettiert, in welchen jeweils 200 µL Peptidlösung, Positiv- (Triton X-100) oder Negativkontrollen (ohne Peptid) vorgelegt sind. Zur Herstellung der Peptidlösung wird BsrG-wt in DMSO gelöst und anschließend mit Puffer 2 versetzt, sodass sich eine Startkonzentration von $256 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ bzw. $192 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ in maximal 10 % DMSO (v/v) ergibt. Ausgehend von diesen Stammlösungen werden Verdünnungsreihen hergestellt, sodass sich Konzentrationen von 8 bis 256 µL bzw. 6 bis 192 µL ergeben, was eine Vergleichbarkeit von MIC-Tests (Seite 72) und hämolytischer Aktivität erlaubt. Sobald die Peptidlösungen, Positiv- und Negativkontrollen mit der Erythrozyten-Suspension versetzt sind, werden die Mischungen für 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wird für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. 320 µL des Überstands werden in eine Plastikkuvette überführt und die Absorption bei $\lambda = 540 \text{ nm}$ mittels SmartSpec Spektrophotometer der Firma Bio-Rad gemessen. Als *Blank* dient Puffer 2. Für die Analyse werden die Werte der Negativkontrolle (Autohämolyse) auf 0 % Hämolyse und die der Positivkontrolle auf 100 % Hämolyse gesetzt. Zur Berechnung der hämolytischen Aktivität der Peptidlösungen wird Gleichung 3.4 herangezogen:

$$HC = \frac{E_P - E_N}{E_{\text{Triton X-100}} - E_N} \times 100\% \quad (3.4)$$

Dabei entspricht E_P der gemessenen Extinktion der Probe, E_N der gemessenen Extinktion der Negativkontrolle und $E_{\text{Triton X-100}}$ der Extinktion der Positivkontrolle mit Triton X-100 und damit 100 % Hämolyse. HC entspricht der Hämolytkonzentration und wird in % angegeben.

3.2.2 Biophysikalische Methoden zur Struktur- und Funktionsanalyse

ANTS/DPX-Leakage Experimente

Ein erster Hinweis darauf, dass BsrG ähnlich Phagen-Holinen eine porenbildende Funktion aufweisen und so die Barrierefunktion der Membran unterbrechen könnte, ist durch die Lokalisation der *bsrG*-Gensequenz auf der SP β -Prophage Region von *B. subtilis* gegeben.

Um den Effekt, welchen BsrG tatsächlich auf die Barrierefunktion der Membran ausübt, nachzuweisen, werden BsrG-wt und Mutanten in POPE:POPG (2:1) Vesikel rekonstituiert und mittels ANTS/DPX-Leakage Experimenten analysiert.

Das Prinzip dieses Experiments beruht auf der Messung der Fluoreszenz des Fluorophors ANTS sowie auf der statischen Löschung dieser Fluoreszenz durch den *Quencher* DPX [170]. Als Fluoreszenzlöschung bzw. *Quenching* wird ein Vorgang bezeichnet, bei welchem ein angeregtes Fluorophor keine Strahlung emittiert, sondern seine Anregungsenergie strahlungslos auf ein anderes Molekül, den *Quencher*, überführt. Die Quantenausbeute der Fluoreszenz des Fluorophors wird demnach durch sich in der Umgebung befindliche *Quencher*-Moleküle reduziert, ohne dass der eigentliche Absorptionsprozess des Fluorophors beeinflusst wird. Im Gegensatz zum dynamischen *Quenching*, welches auf der strahlungslosen Energieübertragung aufgrund von Kollisionsprozessen beruht und somit die Lebensdauer des angeregten Zustandes eines Fluorophors verkürzt, bildet sich beim statischen *Quenching* ein nichtfluoreszierender Komplex aus Fluorophor und *Quencher*. Folglich wird in diesem Fall die Anzahl der anregbaren Fluorophore vermindert, nicht aber die Lebensdauer des angeregten Zustands. Die Stern-Volmer-Gleichung gibt die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des Fluorophors in Abhängigkeit von der Konzentration des *Quenchers* an:

$$\frac{\phi_{F_0}}{\phi_F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (3.5)$$

ϕ_{F_0} und ϕ_F entsprechen dabei den Quantenausbeuten der Fluoreszenz eines Fluorophors in Ab- bzw. Anwesenheit eines *Quenchers*. K_{SV} ist die Stern-Volmer-Konstante der Reaktion und lässt sich gemäß dem Massenwirkungsgesetz aus der Gleichgewichtsreaktion der Komplexbildung aus Fluorophor und *Quencher* herleiten. Für das Fluorophor-/*Quencher*-Paar ANTS/DPX besitzt K_{SV} den Wert $490 \frac{1}{M}$ [171]. $[Q]$ gibt die Konzentration des *Quenchers* an.

Induziert BsrG ein Auslaufen von Vesikeln, in deren Innern ANTS und DPX eingeschlossen sind, wird die DPX-Konzentration stark verdünnt und die Fluoreszenz von ANTS wird nicht mehr *gequencht*, sondern kann detektiert werden. Ein solches Ergebnis untermauert die Annahme, dass BsrG analog zu Phagen-Holinen und anderen Toxinen aus TA-Systemen eine porrenbildende Funktion aufweist. Lässt sich keine Fluoreszenz von ANTS detektieren, bleiben die Vesikel intakt, was ein Nachweis dafür wäre, dass BsrG die Barrierefunktion der Membran nicht angreift.

Die Durchführung der ANTS/DPX-Leakage Experimente geschieht in Anlehnung an [5]. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von BsrG in wässrigen Puffern erfolgt die Herstellung der Vesikel durch Cosolubilisierung von Lipiden und Peptid in 1:1 (v/v) MeOH/CHCl₃, ausgehend von folgenden Stammlösungen:

- 20 mM POPE:POPG (2:1), versetzt mit 0,01 mol% Rhodamin-PE
- 400 μ M Peptid

In einem 1,5 mL Eppendorfgefäß werden konstant 200 μ L Lipid-Stammlösung mit den entsprechenden Volumina der Peptid-Stammlösung gemischt, sodass sich definierte P:L-Verhältnisse ergeben. Proben ohne Peptid dienen als *Blank* für die Messungen und zur Demonstration, dass die Vesikel

per se intakt sind. Das Lösungsmittel wird im N₂-Strom evaporiert und anschließend für weitere 3 h unter vermindertem Druck entfernt. Um die Fluorophor- und *Quencher*-Moleküle ANTS und DPX gemeinsam in Proteoliposomen einzuschließen, werden die Vesikel in einer Pufferlösung (Puffer 1) präpariert, welche sich aus 10 mM PIPES-Na₂ (pH 7,0), 12,5 mM ANTS sowie 45 mM DPX zusammensetzt. In dieser Konzentration wird die Fluoreszenz von ANTS nahezu vollständig von DPX *gequencht*.

Die getrockneten Protein-Lipid-Filme werden in jeweils 400 µL Puffer 1 aufgenommen, 10 Gefrier-Tau-Zyklen unterworfen und anschließend 41 × durch eine Polycarbonat-Membran mit einem Porendurchmesser von 100 nm extrudiert. Die entstandene Vesikel-Lösung wird über Nacht bei RT gelagert. Die Messungen erfolgen am Folgetag an einem FluoroMax-2 Spektrofluorimeter der Firma HORIBA Jobin Yvon in Quarzglasküvetten und in einem Gesamtvolumen von 1,5 mL. Der fluorophor- und *quencher*-freie Puffer 2, in welchem die Messungen durchgeführt werden, setzt sich aus 10 mM PIPES-Na₂ (pH 7,0) und 190 mM Saccharose zum Einstellen der Osmolarität zusammen. Die Entfernung des nicht in Vesikeln eingeschlossenen ANTS/DPX-haltigen Puffer 1 erfolgt mittels Größenausschlußchromatographie auf einer mit Puffer 2 äquilibrierten Sephacryl 100-HR Minisäule (*Spin-column*) durch Zentrifugation für 2 min bei 3000 rpm. 25 µL der zentrifugierten Vesikel-Lösung werden zu 1475 µL Puffer 2 in die Quarzglasküvette pipettiert. Beim Auslaufen des eingeschlossenen Puffer 1 in den Außenraum wird die Konzentration des *Quencher*-Moleküls DPX 1500-fach verdünnt, wodurch die *Quenching*-Effizienz sinkt und die Fluoreszenzintensität von ANTS über die Zeit detektiert werden kann. Der Wert für 100 % Leakage wird durch die vollständige Solubilisierung der Vesikel durch Zugabe von 20 µL einer 20 % Triton X-100-Lösung (*w/v*) erhalten. Das Experiment wird mit einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 509 nm mit einer Spaltbreite von je 6 nm durchgeführt. Störungen durch die Anregungsstrahlung werden durch einen 395 nm-Filter vermieden. Während der ca. 2000 s dauernden Messung

wird die Lösung stetig gerührt und auf 33 °C über die Phasentemperatur der Lipidmischung POPE:POPG (2:1) temperiert. In Abbildung 3.3 ist das Leakage-Experiment graphisch veranschaulicht.

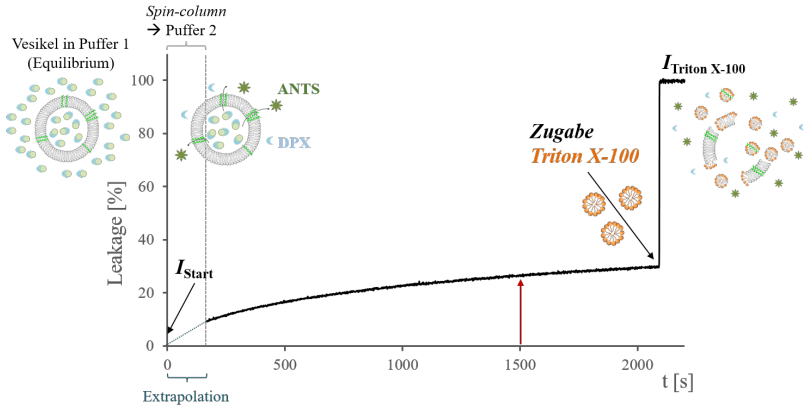


Abbildung 3.3: Vereinfachte schematische Darstellung des im Text erläuterten ANTS/DPX-Leakage-Experiments. Zu Beginn liegen die Proteoliposomen in Puffer 1 vor. Beim Zentrifugationsschritt (Spin-column) wird Puffer 1 durch Puffer 2 ersetzt. Die Detektion erfolgt sobald 25 μL der zentrifugierten Vesikellösung in die Küvette pipettiert werden und wird kurz nach der Zugabe des Detergenz Triton X-100 beendet. Der rote Pfeil gibt den Wert des Leakage nach 1500 s an.

Zur Datenanalyse wird eine Extrapolation zum Startzeitpunkt durchgeführt, da ein eventuelles Auslaufen in dem Moment startet, sobald die Vesikellösung auf die Minisäule aufgetragen und zentrifugiert werden. Die ermittelten Daten werden in Leakage [%] angegeben. Ausgangsgleichung der Berechnungen ist folgende Formel:

$$\text{Leakage [\%]} = \frac{I_{\text{P}} - I_{\text{Startp}}}{I_{\text{Triton X-100p}} - I_{\text{Startp}}} \times 100 \quad (3.6)$$

Dabei entsprechen I_{P} der Fluoreszenzintensität der Probe, I_{Startp} der Fluoreszenzintensität des durch Extrapolation berechneten Startwerts der Probe und $I_{\text{Triton X-100p}}$ der Fluoreszenzintensität des Werts für 100 % Leakage

nach Zugabe von Triton X-100.

Um Pipettierfehler und daraus resultierende abweichende Lipid- bzw. Vesikelkonzentrationen zu berücksichtigen, wird ein Korrekturfaktor K sowie die Daten des *Blanks* in die Rechnung einbezogen:

$$K = \frac{k}{k^*} \quad \text{mit} \quad k = \frac{I_{\text{StartP}}}{I_{\text{Triton X-100P}}} \quad \text{und} \quad k^* = \frac{I_{\text{StartB}}}{I_{\text{Triton X-100B}}}$$

I_{StartB} und $I_{\text{Triton X-100B}}$ entsprechen analog den Werten des *Blanks*.

Die korrigierte Formel ergibt sich durch Umformen zu:

$$\text{Leakage [\%]} = \frac{I_{\text{P}} - (I_{\text{Triton X-100P}} \times k)}{\frac{I_{\text{StartP}}}{k} - (I_{\text{Triton X-100P}} \times k)} \times 100 \quad (3.7)$$

Zur Vergleichbarkeit von BsrG-wt und Mutanten werden die entsprechenden Leakagewerte in % nach 1500 s angegeben.

Zirkulardichroismus

Der Schlüssel zum Verständnis der Funktion eines Proteins liegt in der Kenntnis seiner molekularen Struktur. Obwohl mittels CD-Spektroskopie (*Circular Dichroism*, Zirkulardichroismus) keine hochaufgelösten Strukturen von Proteinen erhalten werden, liefert sie in kurzer Zeit strukturell relevante Informationen unter Einsatz von nur wenigen μg an unmodifiziertem Material. Die konventionelle CD-Spektroskopie ermöglicht die Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen in flüssigen Medien. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Membranproteinen in wässrigen Medien findet deren Analyse in Detergenzmizellen oder Lipidvesikeln statt. Ist die eingesetzte Proteinkonzentration genau bekannt, können Sekundärstrukturanteile sogar quantitativ bestimmt werden. In Abb. 3.4 und 3.5 sind die im folgenden Text erläuterten theoretischen Grundlagen der CD-Spektroskopie graphisch veranschaulicht [125, 172–174].

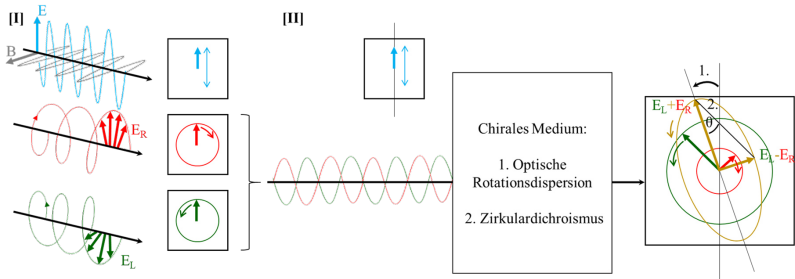


Abbildung 3.4: [I] Dargestellt sind linear polarisiertes Licht mit magnetischem (grau) und elektrischen (türkis) Feldvektor, sowie rechts und links zirkular polarisiertes Licht (hier jeweils nur elektrischer Feldvektor gezeigt). [II] Effekte bei der CD-Spektroskopie. Das resultierende elliptisch polarisierte Licht aus E_L und E_R ist graphisch veranschaulicht.

Licht als elektromagnetische Welle lässt sich als periodische Änderung eines elektrischen Felds \vec{E} und eines magnetischen Felds \vec{B} in Raum und Zeit beschreiben, wobei beide Felder an jedem beliebigen Punkt senkrecht aufeinander stehen. Jedes Feld oszilliert wiederum in einer Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Lichts. Oszilliert der Vektor des elektrischen Felds nur in einer Ebene orthogonal zur Ausbreitungsrichtung, spricht man von linear polarisiertem Licht (Abb. 3.4 [I]). Elektromagnetische Wellen addieren sich gemäß Vektoraddition. Die Eigenschaften der resultierenden Welle ergeben sich aus der Intensität, der Phasendifferenz und der Lage der Polarisations Ebenen der addierten Wellen. Überlagern sich zwei zueinander senkrecht stehende Wellen mit gleicher Amplitude, deren Phase aber um 90° zueinander verschoben ist, ergibt sich zirkular polarisiertes Licht. Der Vektor des elektrischen Feldes rotiert dabei mit konstanter Größe kreisförmig um die Ausbreitungsachse des Lichts im oder gegen den Uhrzeigersinn und wird als rechts bzw. links zirkular polarisiertes Licht definiert. Zirkular polarisiertes Licht lässt sich also durch die Addition zweier senkrecht zueinander stehender linear polarisierter Wellen gleicher Amplitude aber mit einer Phasenverschiebung von 90° erzeugen. Umgekehrt lässt sich jede linear polarisierte Welle auch als Summe einer links und rechts zirkular polarisier-

ten Welle mit gleicher Phase und Amplitude darstellen (Abb. 3.4 [II]). Trifft linear polarisiertes Licht, das aus der Überlagerung einer rechts und links zirkular polarisierten Komponente besteht, auf eine optisch aktive Substanz, lassen sich normalerweise zwei Effekte beobachten. Der Effekt der optischen Rotationsdispersion bzw. zirkularen Doppelbrechung tritt dann auf, wenn Substanzen unterschiedliche Brechungsindices für rechts und links zirkular polarisiertes Licht aufweisen. Dadurch werden die beiden Komponenten unterschiedlich stark abgebremst und infolge dessen die Ebene des auftreffenden linear polarisierten Lichts gedreht. Der Grad der Drehung ergibt sich aus dem Unterschied der Brechungsindices.

Der Effekt des Zirkulardichroismus wird bei Substanzen beobachtet, welche die optische Eigenschaft aufweisen, links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren, also chiral sind. Trifft linear polarisiertes Licht auf eine chirale Substanz, ergibt sich durch die unterschiedliche Absorption der rechts und links zirkular polarisierten Komponente elliptisch polarisiertes Licht. Der Vektor des elektrischen Felds oszilliert dabei nicht mehr in einer Geraden, sondern beschreibt eine Ellipse. Die Rotationsrichtung des elektrischen Feldvektors \vec{E} wird von der schwächer absorbierten Komponente bestimmt und nimmt per Definition positive Werte an, wenn die links zirkular polarisierte Komponente stärker absorbiert wird (Abb. 3.4 [II]). In der CD-Spektroskopie wird die Absorptionsdifferenz bzw. Extinktion ΔA aus der links (A_L) und rechts (A_R) zirkular polarisierten Komponente gemessen. Gleichzeitig zum Zirkulardichroismus tritt auch der Effekt der optischen Rotationsdispersion auf. Das gleichzeitige Auftreten dieser beiden Effekte wird als Cotton-Effekt bezeichnet. ΔA in [mdeg] ergibt sich auch aus den molaren Extinktionskoeffizienten des links (ϵ_L , in [$\frac{\text{mdeg} \times \text{L}}{\text{mol} \times \text{cm}}$]) und rechts (ϵ_R , in [$\frac{\text{mdeg} \times \text{L}}{\text{mol} \times \text{cm}}$]) zirkular polarisierten Lichts, der Peptidkonzentration c_m in [$\frac{\text{mol}}{\text{L}}$] und der Schichtdicke d in [cm] gemäß Formel 3.8.

$$\Delta A = A_L - A_R = (\epsilon_L - \epsilon_R) \times c_m \times d \quad (3.8)$$

In der Praxis wird üblicherweise die Elliptizität θ in [mdeg] angegeben, welche sich aus der trigonometrischen Berechnung der Feldvektoren \vec{E}_L und \vec{E}_R des elliptisch polarisierten Lichts gemäß Formel 3.9 beschreiben lässt.

$$\tan \theta = \frac{\vec{E}_L - \vec{E}_R}{\vec{E}_L + \vec{E}_R} \quad (3.9)$$

In Verknüpfung mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergibt sich die wellenlängenabhängige Elliptizität θ_λ gemäß Formel 3.10.

$$\theta_\lambda = \frac{180 \times \ln 10 \times \Delta A}{4\pi} = 32,98 \times \Delta A = 32,98 \times c_m \times d \times (\epsilon_L - \epsilon_R) \quad (3.10)$$

Dabei ist c_m die molare Konzentration in $[\frac{\text{mol}}{\text{L}}]$. Ist die Proteinkonzentration einer Probe bekannt, wird die Elliptizität als *Mean Residue Ellipticity* (MRE) θ_{MRE} gemäß Formel 3.11 in $[\frac{\text{mdeg} \times \text{cm}^2}{\text{decimol}}]$ angegeben, was der mittleren molaren Elliptizität pro Aminosäurerest bzw. pro Peptidbindung entspricht und eine quantitative Bestimmung von Sekundärstrukturanteilen, sowie den Vergleich verschiedener Spektren erlaubt.

$$\theta_{\text{MRE}} = \frac{\theta}{10 \times c_r \times d} \quad (3.11)$$

c_r in $[\frac{\text{mol}}{\text{L}}]$ ist die molare Konzentration pro Peptidbindung und ergibt sich aus der Anzahl an Peptidbindungen n , der Konzentration der Peptidlösung c_g in $[\frac{\text{g}}{\text{L}}]$ und der molekularen Masse M_W in $[\frac{\text{g}}{\text{mol}}]$.

Neben der Chiralität ist das Vorhandensein eines Chromophors in der Nähe des Chiralitätszentrums eine weitere Voraussetzung für CD-spektroskopische Untersuchungen. Beide Gegebenheiten sind in Proteinen durch die asymmetrischen C_α -Atome sowie die Peptidbindung, welche im fernen UV-Bereich absorbiert, erfüllt. Die Übergänge, welche in einer Peptidbindung angeregt werden, sind in Abb. 3.5 [I] veranschaulicht. Nach Dekonvolution der erhaltenen CD-Spektren ergeben sich für verschiedene Sekundärstruk-

turen charakteristische Spektren aufgrund der unterschiedlichen Orientierung derer Peptidbindungen (Abb. 3.5 [II]). Spektren α -helikaler Peptide zeigen charakteristische Banden bei ~ 220 , 208 und 190 nm, welche ihren Ursprung im elektronischen Übergang des freien Elektronenpaares des Sauerstoffs der Peptidbindung von $n \rightarrow \pi^*$ bzw. des freien Elektronenpaares der Amidbindung von $\pi_{nb} \rightarrow \pi^*$ haben (Abb. 3.5 [I]).

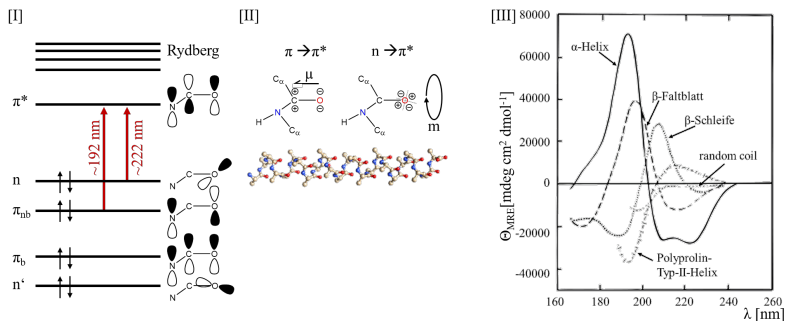


Abbildung 3.5: [I] Darstellung der elektronischen Übergänge einer Peptidgruppe im fernen UV-Bereich. [II] Lage des elektronischen (μ) und magnetischen (m) Dipolübergangsmoments in einer Carbonylgruppe, veranschaulicht an einer α -Helix. Im Gegensatz zur UV/Vis-Absorptionsspektroskopie sind in der CD-Spektroskopie Übergänge elektrisch und magnetisch erlaubt. [III] Typische CD-Basispektren reiner Sekundärstrukturelemente (Graphik modifiziert aus [173]).

Eine Abwandlung der konventionellen CD-Spektroskopie ist die OCD-Spektroskopie [175]. Mit dieser Methode lassen sich die Orientierungen α -helikaler Peptide in makroskopisch orientierten Modellmembranen beschreiben. Der OCD-Spektroskopie liegt die Moffitt-Theorie zugrunde. Diese besagt, dass der elektronische Übergang $\pi_{nb} \rightarrow \pi^*$ der Amidbindung aufgrund von Exzitonen-Splitting dreifach aufgespalten ist, wodurch drei Übergangsdipolmomente resultieren, von denen in α -helikalen Polypeptiden zwei senkrecht und ein parallel zur Helixachse orientierte Dipolmo-

mente resultieren (Abb. 3.5 [II] und 3.6).

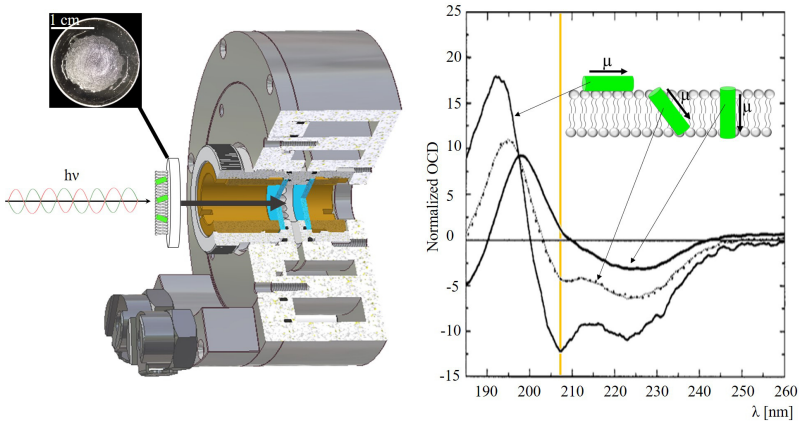


Abbildung 3.6: Prinzip der OCD-Spektroskopie. Der Lichtstrahl trifft senkrecht auf die Probe und kann mit den Übergangsdipolmomenten in Wechselwirkung treten. Angezeigt ist das parallel zur Helixachse orientierte Übergangsdipolmoment [176]. Je nach Orientierung in der Membran ergeben sich charakteristische Spektren. (Graphik der OCD-Zelle von Siegmur Roth, KIT; OCD-Spektren modifiziert aus [176])

Durch die Wechselwirkung des elektrischen Feldvektors \vec{E} des eingestrahlichten zirkular polarisierten Lichts mit diesen Dipolmomenten resultieren charakteristische OCD-Spektren, die den Winkel zwischen der Helixachse und der Normalen der Lipiddoppelschicht widerspiegelt. Das parallel zur Helixachse orientierte Dipolmoment $\vec{\mu}$ beeinflusst im OCD-Spektrum die charakteristische *fingerprint*-Bande bei 208 nm. Liegt eine Helix flach auf der Membran, wechselwirkt der elektrische Feldvektor \vec{E} mit dem parallel zur Helixachse orientierten Dipolmoment $\vec{\mu}$, was eine intensive negative Bande bei 208 nm im Spektrum erzeugt (Abb. 3.6). Die Elliptizität dieser Bande wird positiver, je stärker die Helix in die Membran insertiert, und nimmt bei vollständiger Transmembranorientierung einen Wert größer Null an, da in diesem Fall die Wechselwirkungen zwischen \vec{E} und $\vec{\mu}$ quasi nicht mehr

vorhanden sind. Die beiden anderen aus dem $\pi_{nb} \rightarrow \pi^*$ Übergang resultierenden und senkrecht zur Helixachse liegenden Dipolmomente sind experimentell kaum unterscheidbar und erscheinen im Spektrum als positive Bande bei ~ 190 nm. Der Übergang von $n \rightarrow \pi^*$ zeigt sowohl bei einer transmembranen als auch bei einer nicht insertierten Orientierung eine negative Bande bei ~ 224 nm. Analog zur konventionellen CD-Spektroskopie liefern auch OCD-Spektren Mischspektren aller vorhandenen Orientierungen der Probe, sodass sich zwischen gleichzeitig auftretenden Orientierungen nicht unterscheiden lässt.

Die CD-Proben aller im Kapitel Ergebnisse gezeigten Spektren werden ausgehend von einer Peptid-Stammlösung hergestellt. Dafür werden die Peptide in TFE aufgenommen, mit Ultraschall behandelt und in 0,5 mL LoBind®-Eppendorfgefäßen aliquotiert. Das TFE wird im N_2 -Strom evaporiert und anschließend über Nacht bei vermindertem Druck entfernt und als Stock gelagert.

Zur Herstellung konventioneller CD-Proben werden die aliquotierten Peptid-Stocks mit 100 μ L MeOH/ $CHCl_3$ (v/v) versetzt und mit der Lipidmischung POPE:POPG (2:1) oder dem zwitterionischen Detergenz DPC cosolubiliert. Die Zusammensetzung der Proben kann Tabelle 3.9 entnommen werden. Das organische Lösungsmittel wird im N_2 -Strom evaporiert und für weitere 3 h bei vermindertem Druck entfernt. Zur Herstellung der Liposomen bzw. Detergenzmizellen werden 20 μ L 10 mM PB-Puffer bzw. 20 μ L bidest. H_2O zu dem getrockneten Protein-Lipid-Film pipettiert und die Suspension anschließend bis zu 20 Gefrier-Tau-Zyklen unterworfen, wobei zwischen jedem Zyklus gevortext und sonifiziert wird. Die fertige Liposomen- bzw. Mizellenlösung wird über Nacht bei RT gelagert und am Folgetag direkt vor der Messung für 15 min mit starkem Ultraschall behandelt, um kleine unilamellare Proteoliposomen zu erhalten. Als Referenz dienen entsprechend behandelte Proben ohne Peptid. Die Messung erfolgt in einer CaF_2 -Küvette mit einer Schichtdicke d von 12,4 μ m und einem Volumen

von 3 μL . Es werden jeweils 3 Spektren aufgenommen, die gemittelt und geglättet werden und deren Basislinie so korrigiert wird, dass die Elliptizität θ bei 260 nm gleich Null ist. Für die Umwandlung in MRE-Spektren werden UV/Vis-Spektren von BsrG-wt in Detergenzmizellen aufgenommen und deren Peptidkonzentration nach Lambert-Beer ermittelt:

$$c = \frac{E_{280}}{\epsilon \times d} \quad (3.12)$$

E_{280} entspricht der Extinktion bei 280 nm, c der Konzentration in [$\frac{\text{mol}}{\text{L}}$], d der Schichtdicke in [cm] und ϵ dem molaren Extinktionskoeffizient von BsrG-wt, welcher sich durch das einzige Tyrosin in der Aminosäuresequenz von BsrG-wt zu $1490 \frac{\text{L}}{\text{mol} \times \text{cm}}$ ergibt. Anhand dieser Detergenz-Spektren werden Liposomen-Spektren normiert und so deren Konzentration für die Umwandlung in MRE-Spektren zur quantitativen Analyse deren Sekundärstrukturanteilen bestimmt. Dazu werden die Algorithmen CONTIN LL, CDSSTR und SELCON 3 (Set 7 und SMP180) verwendet, welche auf dem DICHROWEB-Server zur Verfügung gestellt werden [177, 178].

	c (Peptid)	c (POPE:POPG (2:1))	c (DPC)
CD _{Liposomen}	5 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$	41,8 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$	-
CD _{Detergenzmizellen}	2 - 5 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$	-	10 - 50 mM
OCD, 1 \times	5 - 20 μg	167 μg	-

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der CD- und OCD-Proben. Die Menge an Lipid bzw. die Konzentration an Detergenz und Lipid werden für alle Messungen konstant gehalten. Unterschiedliche P:L werden durch Variation der zugegebenen Peptidmenge erhalten. Im Falle der OCD ist die pro Platte aufgetragene Menge angegeben.

In Tabelle 3.9 ist die Zusammensetzung einer 1 \times Probe für die Herstellung orientierter CD-Proben aufgelistet. Im Gegensatz zur konventionellen CD-Spektroskopie in flüssigen Detergenz- oder Vesikel-Lösungen werden

Proteine hierbei in orientierte Lipiddoppelschichten rekonstituiert und auf Quarzglasplättchen appliziert.

Zur OCD-Probenherstellung werden entsprechend vorbereitete 6× Peptid-Stocks in 120 μL MeOH/ CHCl_3 (v/v) aufgenommen und mit der entsprechenden 6-fachen Menge an Lipid cosolubilisiert. Als Referenz werden entsprechend behandelte Proben ohne Peptid hergestellt. Pro Probe werden 20 μL der Lösung homogen auf ein Quarzglas mit dem Durchmesser 20 mm aufgetragen (Abb. 3.6). Der entstandene Protein-Lipid-Film mit dem Durchmesser $\sim 12,5$ mm wird 3 h unter Vakuum getrocknet und anschließend in eine OCD-Messzelle eingebaut und über Nacht über einer gesättigten K_2SO_4 -Lösung rehydratisiert, wodurch sich auf dem Träger orientierte Lipiddoppelschichten ausbilden. Die Probenkammer, in welcher die Messung stattfindet, erlaubt eine Kontrolle von Temperatur und Hydratationszustand der Probe und steht senkrecht zum Lichtstrahl des einfallenden Lichts. Störungen durch Lineardichroismus und Doppelbrechung werden durch die Aufnahme von 8 Spektren in 45° -Schritten um den Lichtstrahl minimiert. Die erhaltenen Spektren werden gemittelt, geglättet und die Basislinie nach Abzug der Referenz so korrigiert, dass die Elliptizität θ bei 260 nm gleich Null ist. Die Spektren werden anschließend so normiert, dass deren globales Minimum einen Wert von -1 aufweist. Eine Abschätzung der Orientierung erfolgt qualitativ anhand der charakteristischen 208 nm *fingerprint*-Bande.

Alle konventionellen oder orientierten CD-Messungen werden an der UV-CD12-Beamline der Ångströmquelle Karlsruhe (ANKA) mit Synchrotronstrahlung durchgeführt. Die Spektren werden im Wellenlängenbereich von 175 - 270 nm mit einem Abstand der Datenpunkte von 0,1 nm und einer Messgeschwindigkeit von 18 $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$ aufgenommen. Die Responsezeit des Detektors beträgt 1,5 s. Während der Messung werden die Proben über der Phasentemperatur der Lipidmischung POPE:POPG (2:1) bzw. des Detergenz DPC auf 30°C temperiert.

Festkörper-NMR-Spektroskopie

Membranproteine nehmen Schlüsselfunktionen bei einer Vielzahl biologischer Prozesse ein und sind damit häufig Angriffspunkt für Medikamente. Im Widerspruch zu deren biologischer und medizinischer Relevanz steht die Tatsache, dass bisher nur ca. 3,5 % aller bis dato publizierten Proteinstrukturen dieser Klasse von Proteinen zugeordnet werden können (Abb. 3.7 [I]).

[I] Statistik der PDB (Stand September 2017)

Methode	Alle Proteine	Membranproteine
Insgesamt	123837	4299
X-Ray	111813	3879
FK-NMR	91	21
Flüssig-NMR	10397	142
andere	Rest	Rest

[II] Mittels FK-NMR-Techniken ermittelte Strukturen von Membranproteinen

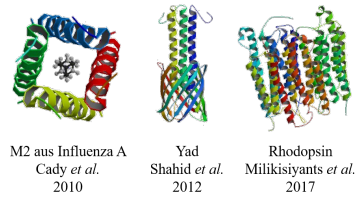


Abbildung 3.7: [I] Statistik der Protein Data Bank (PDB). Dargestellt sind die Einträge aufgeschlüsselter Proteinstrukturen und die dafür angewandten Methoden. Trotz großer biologischer Relevanz beträgt der Anteil an Membranproteinen gerade 3,5 % und nur ein geringer Bruchteil davon wurde mit FK-NMR-Spektroskopie untersucht. [II] Drei der 21 Membranproteinstrukturen, welche mit verschiedenen FK-NMR-Techniken aufgeschlüsselt wurden.

Die meisten dieser Membranproteinstrukturen wurden per Röntgenstrukturanalyse (*X-Ray*) oder Flüssig-NMR-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*, Kernspinresonanz) ermittelt. Diese Methoden erfordern Proteineinkristalle bzw. gutes Löslichkeitsverhalten, wodurch sich Strukturuntersuchungen von Membranproteinen problematisch gestalten. Ein weiterer Nachteil dieser Methoden ist die unnatürliche Umgebung, in welcher die Proteine bei diesen Experimenten vorliegen. Die Funktion von Membranproteinen hängt allerdings entscheidend von deren Orientierung relativ zur Membran ab und kann qualitativ mit 1D ^{15}N FK-NMR-Experimenten bestimmt werden. Auch wenn sich damit im Gegensatz zu anderen NMR-Techniken keine hochaufgelösten 3D Strukturen ermitteln lassen (Abb. 3.7

[II]), handelt es sich um eine leistungsstarke Methode, um biologische Systeme zerstörungsfrei in flüssig-kristallinen Modellmembranen unter quasi-natürlichen Bedingungen zu untersuchen.

Die NMR-Spektroskopie basiert auf dem Kernspindrehimpuls bzw. Eigen-drehimpuls \vec{P} einiger Kerne, welcher sich mit der Kernspinquantenzahl I zu $\vec{P} = \hbar\sqrt{I(I+1)}$ ergibt und wie alle atomaren Drehimpulse eine gequantelte vektorielle Größe darstellt [179] [180] [181]. Da beschleunigte Ladung auch immer ein Magnetfeld erzeugt, ist der Eigendrehimpuls \vec{P} eines Kerns mit einem magnetischen Moment $\vec{\mu}$ verknüpft:

$$\vec{\mu} = \gamma\vec{P} = \gamma\sqrt{I(I+1)}\hbar \quad (3.13)$$

Aus dieser Gleichung geht auch hervor, weshalb gg-Kerne mit $I=0$ NMR-spektroskopischen Untersuchungen nicht zugänglich sind.

Die Nachweisempfindlichkeit eines Kerns in einem NMR-Experiment hängt von der elementspezifischen Proportionalitätskonstante γ , dem gyromagnetischen Verhältnis, ab. \vec{P} und $\vec{\mu}$ sind meist parallel orientiert und besitzen damit einen positiven Wert für γ . Eine Ausnahme ist beispielsweise der in dieser Arbeit verwendete ^{15}N -Kern.

Magnetische Momente sind ebenso wie atomare Drehimpulse in Richtung und Betrag gequantelt, wodurch sich bestimmte Eigenzustände ergeben, welche außerhalb eines Magnetfelds entartet sind. Wird ein Kern mit dem Drehimpuls \vec{P} und dem daraus resultierenden magnetischen Moment $\vec{\mu}$ in ein externes homogenes Magnetfeld B_0 gebracht, wird diese Entartung durch die Wechselwirkung des Magnetfelds B_0 mit dem magnetischen Moment $\vec{\mu}$ aufgehoben. Die resultierende Aufspaltung wird als Zeeman-Effekt bezeichnet (Abb. 3.8 [I]). Die Komponente von \vec{P} entlang der Feldrichtung von B_0 wird als \vec{P}_z bezeichnet und nimmt ganz- oder halbzahlige Vielfache von \hbar an. Beschrieben wird dies mit der Orientierungsquantenzahl m gemäß $\vec{P}_z = m\hbar$, wobei m die Werte $I, I-1, \dots, -I$ annehmen kann.

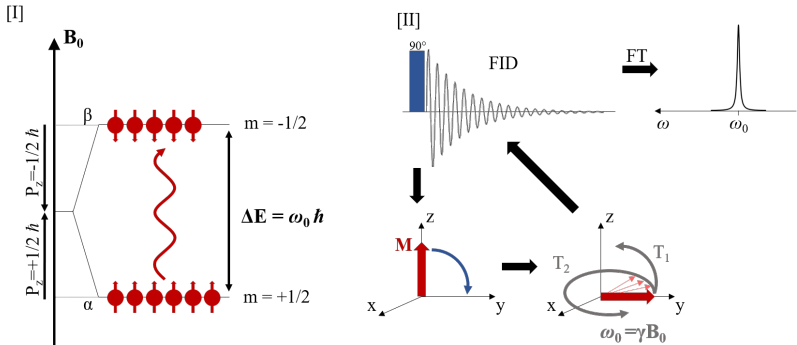


Abbildung 3.8: Graphische Darstellung der im Text erläuterten Grundlagen der NMR-Spektroskopie anhand eines Spin $\frac{1}{2}$ -Kerns mit positivem gyromagnetischen Verhältnis γ . [I] Dargestellt ist die Aufspaltung der Energieniveaus im externen Magnetfeld B_0 (Zeeman-Effekt). Die Besetzungszustände ergeben sich aus der Boltzmann-Gleichung (Gleichung 3.16). Aus der geringen Besetzungsdifferenz resultiert eine Gesamtmagnetisierung M , die im *rotating frame* als statisch entlang der z -Achse orientiert betrachtet werden kann. [II] Die Gesamtmagnetisierung M kann mit einem 90° -Puls geeigneter Länge in die xy -Ebene gekippt werden, wodurch ein Spannungsabfall (FID) detektiert wird, welcher seine Ursache in den Relaxationszeiten T_1 und T_2 hat. Nach einer Fouriertransformation (FT) ergibt sich das frequenzabhängige Spektrum.

Insgesamt ergeben sich so $(2I + 1)$ Eigenzustände bzw. Energiezustände eines Atomkerns mit Kernspin in einem externen Magnetfeld. Die NMR-Spektroskopie unterscheidet sich folglich unter anderem dahingehend von anderen Spektroskopie-Methoden, dass ein Grundzustand und ein angeregter Zustand erst durch ein externes Magnetfeld B_0 generiert werden. Die Energie dieser Zustände ergibt sich aus dem Zeeman-Hamilton-Operator zu $E = \gamma m \hbar B_0$, womit sich die Energiedifferenz zwischen zwei benachbarten Energieniveaus berechnen lässt:

$$\Delta E = \gamma B_0 \hbar \quad (3.14)$$

Um einen Übergang zum energetisch höher liegenden Spinzustand zu erreichen, muss die Resonanzbedingung erfüllt werden. Mit $\Delta E = h \nu$ erhält man

die Larmor-Beziehung, welche eine der Schlüsselfunktionen in der NMR darstellt:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (3.15)$$

Um demnach Übergänge von einem Grundzustand N_α zum nächst höheren angeregten Zustand N_β zu bewirken, muss eine Anregung mit der Larmorfrequenz ω_0 erfolgen (Abb. 3.8).

Die Besetzungszustände dieser Energieniveaus lassen sich mit der Boltzmann-Gleichung beschreiben:

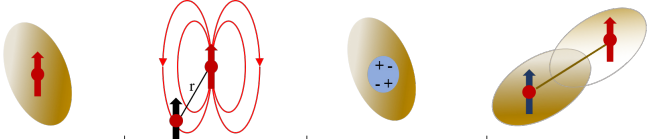
$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = \exp \frac{-\gamma \hbar B_0}{k_B T} \approx 1 - \frac{-\gamma \hbar B_0}{k_B T} \quad (3.16)$$

Obwohl aufgrund der geringen Energiedifferenz ΔE N_α - und N_β -Niveaus nahezu gleich besetzt sind, resultiert aus der geringen Besetzungsdifferenz nach Vektoraddition der mit Larmorfrequenz um die z-Achse rotierenden Einzelspins eine makroskopische Gesamtmagnetisierung M , welche statisch entlang der z-Achse bzw. der Feldrichtung des externen Magnetfelds B_0 orientiert ist, wenn man das System selbst als mit der Larmorfrequenz rotierend (*rotating frame*) betrachtet (Abb. 3.8 [II]).

Durch Einstrahlen eines Magnetfelds B_1 mit der Larmorfrequenz senkrecht zu B_0 kann die Gesamtmagnetisierung M bei geeigneter Dauer der Einstrahlung in die xy-Ebene gekippt werden, wodurch eine Gleichbesetzung der N_α - und N_β -Niveaus resultiert (Abb. 3.8 [III]). In der xy-Ebene induziert die Gesamtmagnetisierung M eine Spannung in den Spulen des Spektrometers, welche mit der Zeit abfällt und als *Free Induction Decay* (FID) bezeichnet wird. Das FID ergibt sich als Folge der Rückkehr des Spinsystems in den Ausgangszustand aufgrund von Relaxationsprozessen. Nach dem 90° -Puls rotiert die Magnetisierung M mit der Larmorfrequenz um die z-Achse. Die T_2 - bzw. transversale oder Spin-Spin-Relaxation beschreibt den Effekt der Auffächerung bzw. des Phasenverlusts der Einzelspins aufgrund von Inhomogenitäten des Magnetfelds B_0 , wodurch die nach

außen wirkende Magnetisierung der xy -Ebene gegen Null geht. Die T_1 -Relaxation wird auch Longitudinal- oder Spin-Gitter-Relaxation genannt und beschreibt die Rückkehr der Magnetisierung in z -Richtung zum thermodynamischen Gleichgewicht.

Das gemessene FID-Signal wird durch Fouriertransformation (FT) von der Zeit- in die Frequenzdomäne übertragen und so ein Spektrum erhalten. Bei der NMR-Spektroskopie wird also das Magnetfeld eines Kerns über dessen Resonanzfrequenz gemessen.



	Chemische Verschiebung δ	Dipolare Kopplung	Quadrupol-Kopplung	Skalare Kopplung
Ursache	Ab- und Entschirmung der Kerne durch deren Elektronenhülle	Magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkungen von Kernspins untereinander	Wechselwirkung des Kernquadrupolmoment bei $I > \frac{1}{2}$ mit elektrischen Feldgradienten	Kopplung zw. 2 Spins, die über Bindungselektronen vermittelt werden
Flüssig-NMR	Isotropes Signal	durch Molekularbewegungen zu Null gemittelt	durch Molekularbewegungen zu Null gemittelt	Aufspaltung der Signale; Identifikation von Spin-Gruppen
FK-NMR	Anisotropie; Abhängigkeit von der Orientierung im Magnetfeld	Aufspaltung der Signale; $1/r^3$ -Abstandsabhängigkeit	Aufspaltung der Signale	Vernachlässigbar im FK

Abbildung 3.9: Übersicht der Wechselwirkungen, welche Signale im Spektrum beeinflussen. Während bei der Flüssig-NMR dipolare und quadrupolare Kopplungen durch Molekularbewegungen zu Null gemittelt werden und nur das isotrope Signal der chemischen Verschiebung δ im Spektrum erscheint, führen diese Wechselwirkungen im FK zu einer starken Verbreiterung der Linien. Lediglich skalare Kopplungen spielen im FK keine Rolle mehr.

Resonanzfrequenzen, bzw. die Signale im Spektrum, werden von verschiedenen Parametern beeinflusst (Abb. 3.9). Quadrupolare Wechselwirkungen treten bei Kernen mit $I > \frac{1}{2}$ auf und führen zu einer Aufspaltung des Signals. Indirekte skalare Kopplungen wirken über Bindungselektronen und

bewirken eine Aufspaltung abhängig von der Anzahl chemisch äquivalenter Nachbaratome. Aufgrund ihrer geringen Größe sind diese Wechselwirkungen in der FK-NMR kaum von Bedeutung.

Die genaue Zuordnung einzelner Signale im Spektrum beruht auf der Kenntnis der chemischen Verschiebungen δ aller detektierten Kerne, welche bezogen auf eine Referenzsubstanz in [ppm] wiedergegeben wird. Im Gegensatz zur Flüssig-NMR-Spektroskopie, wo die Anisotropie der chemischen Verschiebung durch Molekularbewegungen zu einem isotropen Wert und die durch den Raum wirksamen diploaren homo- und heteronuklearen Kopplungen sowie Quadrupolkopplungen zu Null gemittelt werden, dominieren diese anisotropen Wechselwirkungen in FK-NMR-Spektren und führen zu einer starken Verbreiterung der Linien (siehe Abb. 3.9). Die bereits erwähnten dipolaren Kopplungen beruhen auf Wechselwirkungen der Magnetfelder zweier Kernspins untereinander. Die Spins der koppelnden Kerne nehmen das vom jeweils anderen Spin erzeugte Magnetfeld wahr, wodurch sich das lokale, effektive Magnetfeld des Spins und damit dessen Resonanzfrequenz ändert. Die Stärke der Kopplung hängt mit r^{-3} vom Abstand r der koppelnden Kerne ab und kann so zur Ermittlung wichtiger Distanzinformationen herangezogen werden.

Die chemische Verschiebung δ eines Kerns wird stark von der ihn umgebenden elektronischen Umgebung beeinflusst und ist damit auch von der Orientierung eines Moleküls zu einem äußeren Magnetfeld abhängig. Diese Abhängigkeit kann durch den CSA-Tensor (*Chemical Shift Anisotropy*) beschrieben werden (Abb. 3.10 [I]).

Eine Polarkoordinatentransformation erlaubt eine Überführung des *Principal Axes System* (PAS) in das Laborkoordinatensystem (LAB), wodurch die z-Komponente des CSA-Tensors entlang des Magnetfelds B_0 liegt und mit dem winkelabhängigen Term $3\cos^2\theta - 1$ eine qualitative Aussage bezüglich der Orientierung dieser Komponente zum Magnetfeld erlaubt. Je nach chemischer Umgebung eines Kerns wird ein äußeres Magnetfeld entweder verstärkt oder abgeschwächt, wodurch sich dessen Resonanzfrequenz än-

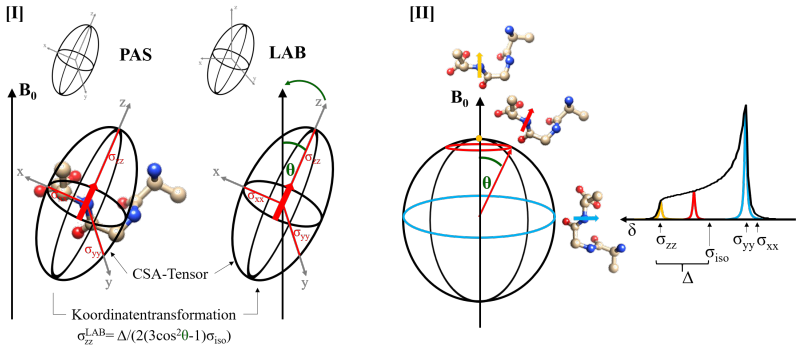


Abbildung 3.10: [I] Veranschaulichung des CSA-Tensors als axialsymmetrisches Ellipsoid. Durch eine Koordinatentransformation vom PAS ins LAB ergibt sich nun die Resonanzfrequenz aus der σ_{zz} -Komponente. Die beiden Koordinatensysteme sind über einen winkelabhängigen Term in Beziehung zueinander gesetzt. [II] In pulverförmigen Proben führt das Vorhandensein vieler Orientierungen zu einem Pulverspektrum.

dert. Da in einer pulverförmigen Probe jede mögliche Orientierung der Moleküle vorhanden ist, sind deshalb auch die Resonanzfrequenzen all dieser Orientierungen in einem Spektrum sichtbar, weshalb man von Pulverspektren spricht (Abb. 3.10 [II]).

Biomoleküle bestehen hauptsächlich aus Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Phosphor. In Tabelle 3.10 sind einige NMR-relevante Parameter dieser Nuklide zusammengefasst. Für FK-NMR-Experimente geeignete Kerne sollten ein möglichst großes gyromagnetisches Verhältnis γ aufweisen und in großer Anzahl in der Probe vorhanden sein. Im Festkörper führen die große natürliche Häufigkeit von Protonen und deren großes gyromagnetisches Verhältnis zu einem Netzwerk starker homonuklearer Kopplungen und folglich zu einer starken Linienverbreiterung. Aus diesem Grund und der zusätzlich geringen spektralen Dispersion von ^1H -Signalen werden Protonen-Spektren nicht zur Bestimmung der Orientierung von Peptiden herangezogen. Verglichen mit Protonen besitzen ^{15}N - Kerne ein deutlich

Isotop	Kernspin I	natürliche Häufigkeit [%]	$\gamma [\frac{rad}{sT}]$
^1H	$\frac{1}{2}$	~ 100	$267,522 \times 10^6$
^2H	1	0,015	$41,066 \times 10^6$
^3H	$\frac{1}{2}$	0	$285,349 \times 10^6$
^{12}C	0	98,9	-
^{13}C	$\frac{1}{2}$	1,1	$67,283 \times 10^6$
^{14}N	1	99,6	$19,338 \times 10^6$
^{15}N	$\frac{1}{2}$	0,37	$-27,126 \times 10^6$
^{16}O	0	~ 100	-
^{17}O	$\frac{5}{2}$	0,04	$-36,281 \times 10^6$
^{31}P	$\frac{1}{2}$	~ 100	$108,394 \times 10^6$

Tabelle 3.10: Auflistung wichtiger NMR-Parameter biologisch relevanter Kerne.

kleineres gyromagnetisches Verhältnis γ und eine signifikant geringere natürliche Häufigkeit. Allerdings können durch den chemisch und funktionell nicht störenden Einbau von Stickstoff-Isotopen selektiv oder nahezu vollständig uniform ^{15}N -markierte Proteine erhalten werden, was die Signalintensität im Spektrum erhöht. Für diesen Zweck werden Proteine in *E.coli*-Zellen exprimiert, die in einem Nährmedium wachsen, welches als einzige Stickstoffquelle ^{15}N -Salz enthält (Kapitel 3.1.2). Zudem kann die kurze T_1 -Relaxationszeit der Protonen in einem Kreuzpolarisationsexperiment (*Cross Polarization*, CP) verwendet werden, um die Intensität der ^{15}N -Signale bzw. das Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich zu verbessern (Abb.3.11 [I]). Dabei findet ein Magnetisierungs- bzw. Polarisierungstransfer von einem NMR-empfindlichen Spinsystem mit großem gyromagnetischem Verhältnis (^1H) zu einem unempfindlicheren Spinsystem mit kleinem gyromagnetischem Verhältnis (^{15}N) statt. Für einen Magnetisierungstransfer ist ein energieneutraler Kontakt beider Spinsysteme, welche mitein-

ander gekoppelt sein müssen, erforderlich. In einem externen Magnetfeld sind die Aufspaltungen der Energieniveaus von Protonen und ^{15}N -Kernen unterschiedlich groß, weshalb spontan kein Magnetisierungstransfer möglich ist. Um einen energieneutralen Austausch zu gewährleisten, muss die Hartmann-Hahn-Bedingung erfüllt werden (Abb. 3.11). Dafür dreht ein anfänglicher 90° -Puls die Magnetisierungsvektoren der Spins auf die y-Achse im rotierenden Koordinatensystem. Durch die Einstrahlung kontinuierlicher Radiofrequenzfelder B_1 mit den Resonanzfrequenzen der entsprechenden Kerne senkrecht zu B_0 , beginnen deren Magnetisierungsvektoren um die Achse der jeweiligen B_1 -Felder zu rotieren. Im rotierenden Koordinatensystem der Spins heißt das, dass das statische B_1 -Feld das einzig wirksame Magnetfeld für den jeweiligen Kern ist. Dieser Zustand wird als *spin-lock* bezeichnet. Wählt man nun die Stärke der B_1 -Felder entsprechend der Hartmann-Hahn-Bedingung, präzedieren die Magnetisierungsvektoren beider Kerne mit der gleichen Geschwindigkeit. Die beiden Spinsysteme sind damit energetisch gekoppelt und die Resonanzfrequenzen und damit die Energiedifferenzen beider Spinsysteme nehmen die gleiche Größe an, was einen Transfer der Magnetisierung von einem NMR-sensitiven Kern auf den anderen, weniger sensitiven Kern, ermöglicht.

Die Bestimmung der Orientierung eines α -helikalen Peptids aus einem Spektrum ist in Abb. 3.11 verdeutlicht. Da in einer α -Helix der Vektor der N-H-Bindung nahezu parallel zur Helixachse liegt, ist die σ_{zz} -Komponente des CSA-Tensors entlang dieser Bindung orientiert, wodurch sich direkt aus der chemischen Verschiebung δ die Orientierung eines Peptids in einer makroskopisch orientierten Probe qualitativ bestimmen lässt. Die Linienbreite gibt außerdem Auskunft darüber, ob das Peptid schnell rotiert (scharfes Signal) oder unbeweglich ist (breites Signal). ^{31}P -Spektren erlauben Aussagen über den Zustand der Lipiddoppelschicht.

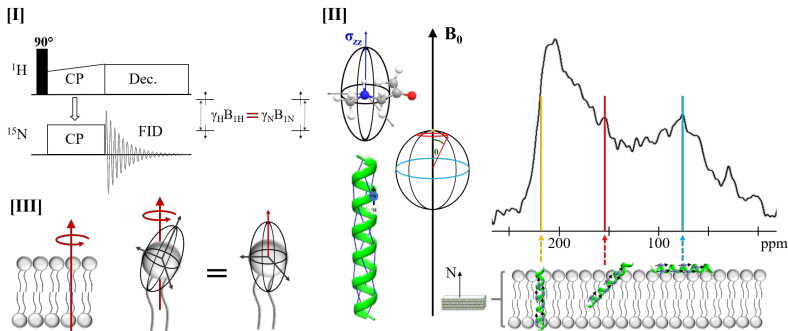


Abbildung 3.11: [I] Einfachstes CP-Experiment am Beispiel einer ^1H - ^{15}N -CP mit rampenförmigem Protonenpuls, um die Hartman-Hahn-Bedingung besser zu erfassen. [II] Bestimmung der Orientierung einer α -Helix in einer Membran. Da das σ_{zz} -Element des CSA-Tensors nahezu parallel zur N-H-Bindung und damit zur Helixachse ausgerichtet ist, lassen sich qualitative Aussagen über die Orientierung einer α -Helix treffen. Bei einer Transmembranorientierung erscheint das Signal bei ~ 220 ppm und für flach auf der Membran liegende Peptide bei ~ 80 ppm. [III] Zur Überprüfung der mechanisch angeordneten Lipiddoppelschichten werden ^{31}P -Spektren aufgenommen. In einer fluiden lamellaren Lipiddoppelschicht sind die Phospholipide sehr dynamisch und rotieren um sich selbst. Durch diese Bewegung kommt es zur Mittelung des CSA-Tensors, sodass im NMR-Spektrum nur der gemittelte Bewegungs-Tensor erscheint.

Für NMR-Experimente wird BsrG-wt wie auf Seite 88 beschrieben aliquotiert und mit dem entsprechende Lipid in $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (v/v) cosolubilisiert. $20 \mu\text{L}$ dieser Lösung werden auf $7,5 \times 12$ mm Glasplättchen pipettiert, wobei maximal $0,8$ mg Lipid pro Glasplatte aufgetragen werden. Nachdem der Protein-Lipid-Film getrocknet ist, werden die Glasplättchen über Nacht unter Vakuum gesetzt, um das restliche Lösungsmittel zu entfernen. Die Rehydratisierung der gestapelten Glasplättchen erfolgt bei 37°C über gesättigter K_2SO_4 -Lösung für mind. 15 h. Die Probe wird anschließend in zwei Schichten Parafilm und eine Schicht Frischhaltefolie gewickelt, um ein Austrocknen während der Messung zu reduzieren.

Alle NMR-Messungen werden an einem 600 MHz-NMR-Spektrometer der Firma Bruker Biospin und über der Phasentemperatur der entsprechenden Lipide durchgeführt.

Die Orientierung der Lipiddoppelschicht jeder Probe wird routinemäßig anhand eines ^{31}P -Spektrums (256 Scans) überprüft. Bei diesem Experiment werden ein HFX-Probenkopf mit Flachspule und eine Hahn-Echo-Pulssequenz verwendet [182]. Die Pulslänge des 90° -Pulses beträgt $4\ \mu\text{s}$. Während der Akquisitionszeit erfolgt eine heteronukleare ^1H -Entkopplung mit einem Puls der Länge $40\ \mu\text{s}$.

Für die 1D ^{15}N -NMR-Messungen wird ein im Arbeitskreis von Frau Prof. Ulrich entwickelter $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -LowE-Probenkopf eingesetzt. Zu Beginn wird der ^1H -Kanal auf $4,7\ \text{ppm}$ für die Wasserlinie referenziert sowie Feldinhomogenitäten an dieser Wasserlinie durch *shimmen* reduziert. Die Pulslängen der ^1H - und ^{15}N -Kerne werden festgelegt, indem der Nulldurchgang durch Einstrahlung eines 360° -Puls bestimmt wird. Die Referenzierung des ^{15}N -Kanals erfolgt mit ^{15}N -Ammoniumsulfat mit einer chemischen Verschiebung δ von $26,8\ \text{ppm}$. Bei den 1D ^{15}N -Experimenten findet die Pulssequenz CP-RAMP Anwendung [183]. Während der Detektion des FID wird ebenfalls wie beim ^{31}P -Spektrum der ^1H -Kanal mit $50\ \text{kHz}$ entkoppelt (SPINAL-16-Pulssequenz [184]). Es werden pro 1D ^{15}N -Spektrum mind. 20.000 Scans aufgenommen. Die Mischzeit wird auf $500\ \mu\text{s}$ eingestellt und die *carrier*-Frequenzen für ^1H auf $9\ \text{ppm}$ und für ^{15}N auf $180\ \text{ppm}$ gesetzt. Die Visualisierung und Analyse der Spektren erfolgt mit dem Programm Topspin 3.2 der Firma Bruker Biospin.

4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Charakterisierung des BsrG Wildtyps (BsrG-wt) und Mutanten entsprechend der in der Zielsetzung beschriebenen Strategie dargestellt. Die Methoden zur Probenpräparation sowie zur Analyse und Auswertung der Daten sind ausführlich in Kapitel 3 beschrieben. Die hier präsentierten Ergebnisse sind in Kapitel 4.4 tabellarisch zusammengefasst und werden in Kapitel 5 übergreifend diskutiert.

4.1 Herstellung von Ausgangsmaterial

Klonierungen und Mutagenesen am pETZ21 α -Vektor

Zur Struktur- und Funktionsanalyse von BsrG-wt und Mutanten mittels CD-, OCD-, FK-NMR-, SDS-PAGE-, MIC-, Hämolyse- und Leakage-Experimenten sollte eine Methode zur rekombinanten Proteinexpression und der damit verbundenen Aufreinigung etabliert werden, um unmarkiertes und ^{15}N -vollmarkiertes Proteinpulver für NMR-Experimente herzustellen.

Da BsrG toxisch ist, wurde es als Z21 α -Fusionsprotein im pETZ21 α -Vektor exprimiert, in welchem die Expression durch IPTG induziert wird (P_{T7lac} -Promotor). Der pETZ21 α -Vektor kodiert außerdem eine Kanamycin-Resistenz sowie einen N-terminalen His₆-Tag, welcher die Isolierung des Fusionsproteins mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie ermöglicht. Um das Fusionsprotein zusammen mit dem His₆-Tag von BsrG abzuspalten, wurde zwischen Z21 α und der C-terminal gelegenen BsrG-Sequenz auf DNA-Ebene eine Hydroxylamin-Schnittstelle (N - G) eingefügt, wobei das Glycin

nach dem Verdau N-terminal an BsrG verbleibt. Die DNA-Sequenz des *bsrG*-Wildtyps wurde von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert und in den pETZ21 α -Vektor kloniert.

Konstrukt	AS-Sequenz	Masse [Da]
pETZ21α-Vektor:		
BsrG-wt	GMTVYESLMIMINFGGLIILNTVLLIFNIMMIVTSSQKKK	4393,4
T2A	GMAVYESLMIMINFGGLIILNTVLLIFNIMMIVTSSQKKK	4363,4
E5A	GMTVYA ^S SLMIMINFGGLIILNTVLLIFNIMMIVTSSQKKK	4335,4
E5K	GMTVYK ^S SLMIMINFGGLIILNTVLLIFNIMMIVTSSQKKK	4392,5
E5Q	GMTVYQ ^S SLMIMINFGGLIILNTVLLIFNIMMIVTSSQKKK	4392,5
S6A	GMTVYE ^A LMIMINFGGLIILNTVLLIFNIMMIVTSSQKKK	4377,4
N12A	GMTVYESLMIMI ^A FGGLIILNTVLLIFNIMMIVTSSQKKK	4350,4
F13A	GMTVYESLMIMIN ^A GGLIILNTVLLIFNIMMIVTSSQKKK	4317,4
G14I	GMTVYESLMIMIN ^F I ^L GILNTVLLIFNIMMIVTSSQKKK	4449,5
G15I	GMTVYESLMIMIN ^F I ^L LILNTVLLIFNIMMIVTSSQKKK	4449,5
N19A	GMTVYESLMIMINFGGLI ^L A ^T VLLIFNIMMIVTSSQKKK	4350,4
T20A	GMTVYESLMIMINFGGLI ^L N ^A VLLIFNIMMIVTSSQKKK	4363,4
N26A	GMTVYESLMIMINFGGLIILNTVLLI ^F A ^I MMIVTSSQKKK	4350,4
T32A	GMTVYESLMIMINFGGLIILNTVLLIFNIMMIV ^A SSQKKK	4363,4
S33A	GMTVYESLMIMINFGGLIILNTVLLIFNIMMIV ^T ASQKKK	4377,4
S34A	GMTVYESLMIMINFGGLIILNTVLLIFNIMMIV ^T SAQKKK	4377,4
Q35A	GMTVYESLMIMINFGGLIILNTVLLIFNIMMIV ^T SSA ^K KKK	4336,4
N12A/N19A	GMTVYESLMIMI ^A FGGLI ^L A ^T VLLIFNIMMIVTSSQKKK	4307,4
N12A/N26A	GMTVYESLMIMI ^A FGGLIILNTVLLI ^F A ^I MMIVTSSQKKK	4307,4
N19A/N26A	GMTVYESLMIMINFGGLI ^L A ^T VLLI ^F A ^I MMIVTSSQKKK	4307,4
N12A/N19A/N26A	GMTVYESLMIMI ^A FGGLI ^L A ^T VLLI ^F A ^I MMIVTSSQKKK	4264,4

Tabelle 4.1: Auflistung der hergestellten BsrG-Mutanten im pETZ21 α -Vektor. Alle 20 geplanten Mutanten konnten erfolgreich hergestellt werden. Angezeigt sind die AS-Sequenzen sowie die zugehörigen Massen (bei Expression in LB-Medium) mit dem Glycin, das nach dem Hydroxylamin-Verdau N-terminal am Protein verbleibt. Dieses Glycin wird bei der Nummerierung nicht mit einbezogen, da sich diese auf die AS-Sequenz des Wildtyps bezieht.

Einführung von Mutationen

In dieser Arbeit sollten Substitutionsmutanten mit dem Wildtyp verglichen werden, um AS, die von essentieller Bedeutung für die Struktur und Funktion des Toxins sind, ausfindig zu machen. Die gewünschte Punktmutation zur Herstellung von Mutanten wurde wie im Kapitel 3.1.1 beschrieben über mutagene Primer eingefügt (siehe Anhang), welche entsprechend dem QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Agilent designt und von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert wurden.

Die Primer wurden so gestaltet, dass jede kodierte polare AS der *bsrG*-Sequenz jeweils einzeln durch hydrophobes Alanin substituiert wurde. Das negativ geladene Glutamat wurde durch Alanin, polares Glutamin und positiv geladenes Lysin ersetzt. Die winzigen Glycine an den Positionen 14 und 15 wurden durch sperrige Isoleucine ausgetauscht. Die Asparagine an den Positionen 12, 19 und 26 wurden in den drei möglichen Kombinationen doppelt durch Alanin substituiert sowie als Dreifach-Substitutionsmutante hergestellt (Abb. 4.1). Die erfolgreich hergestellten Einzel-, Doppel- und Dreifach-Substitutionsmutanten sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Die Sequenzierung erfolgreicher Mutagenesen wurde von der Firma GATC-Biotech durchgeführt und verifiziert.

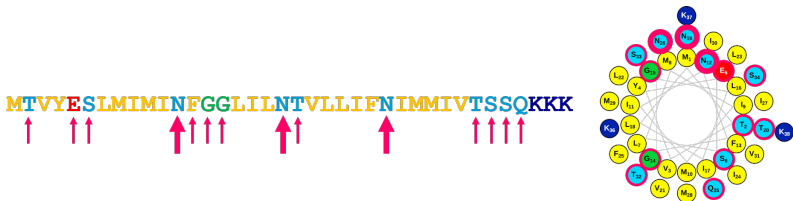


Abbildung 4.1: Einführung von Mutationen. Positionen, die für Mutationen von Interesse sind, sind mit pinken Pfeilen hervorgehoben bzw. in der *helical wheel*-Darstellung eingekreist. Fette Pfeile und Kreise zeigen kombinatorische Doppel- bzw. Dreifachmutationen der Asparagine an. Polare AS wurden durch Alanin substituiert, Glycine durch Isoleucine und die einzige negative AS an Position 5 durch Alanin, Glutamin und Lysin ausgetauscht.

Klonierungen und Mutagenesen am pToxRV-Vektor

Zur Untersuchung der Selbstassemblierung von BsrG mittels ToxR-Assays wurde das *bsrG*-Wildtyp-Gen im pToxRV-Vektor vor der eigentlichen Mutagenese mittels PCR auf den kodierten Bereich M⁸-V³¹ der BsrG-TMD verkürzt und nach anschließender PCR-Amplifikation erneut in den pToxRV-Vektor kloniert. Die Primer wurden dabei so entworfen, dass die BamHI- und NheI-Schnittstellen für die Ligation erhalten blieben, aber die überschüssigen Nukleotide ausgespart und nicht amplifiziert wurden. Die Sequenzen der Primer sind in Abb. 4.2 dargestellt.

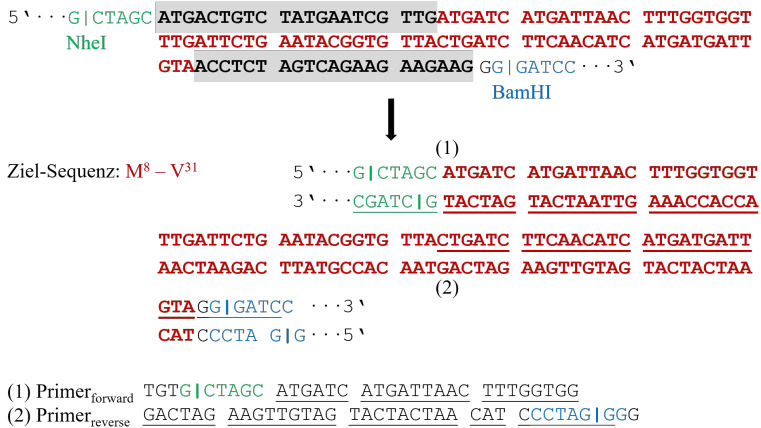


Abbildung 4.2: Strategie zur Verkürzung des *bsrG*-Gens im pToxRV-Vektor auf die TMD des kodierten Bereichs M⁸-V³¹ (rot eingefärbt) mittels PCR. Die Matrize der originalen Wildtyp-Gensequenz ist als Einzelstrang dargestellt. Die grau hinterlegten Sequenzen des *bsrG*-Wildtyp-Gens entsprechen den kodierten Bereichen der Positionen M¹-L⁷ bzw. T³²-K³⁸ und sollten mittels PCR und entsprechend entworfener Primer aus der Gensequenz entfernt werden. Die Schnittstellen BamHI und NheI sind blau bzw. grün markiert. Die eingesetzten Primer sind angezeigt, wobei komplementäre Bereiche mit der *bsrG*-Sequenz unterstrichen und die Bindungsstellen der Primer mit (1) und (2) markiert sind.

Konstrukt	AS-Sequenz der TMD
pToxRV-Vektor:	
BsrG-wt (8-31)	MIMINFGGLILNTVLLIFNIMMIV
N12A	MIMIAFGGLILNTVLLIFNIMMIV
F13A	MIMINAGGLILNTVLLIFNIMMIV
G14I	MIMINFIGLILNTVLLIFNIMMIV
N19A	MIMINFGGLILATVLLIFNIMMIV
T20A	MIMINFGGLILNAVLLIFNIMMIV

Tabelle 4.2: Auflistung der hergestellten BsrG-Mutanten im pToxRV-Vektor. Mutierte AS sind pink hervorgehoben.

Im pToxRV-Vektor sollten analog zum pETZ21 α -Vektor Substitutionsmutationen innerhalb der verkürzten TMD vorgenommen werden. Eine erfolgreiche Mutation gelang nur mit den Mutanten N12A, F13A, G14I, N19A und T20A, welche in Tabelle 4.2 zusammengefasst sind. Zur besseren Übersichtlichkeit wird die verkürzte TMD im pToxRV-Vektor bei der Benennung der Mutanten nicht berücksichtigt. Die Konstrukte wurden anschließend in die *E. coli*-Stämme pd28 und FHK12 eingeschleust.

Herstellung und Aufreinigung von Proteinpulver

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse zur Herstellung von BsrG-Proteinpulver mittels rekombinanter Proteinbiosynthese anhand von BsrG-wt veranschaulicht. Das Protokoll zur Herstellung von BsrG-Proteinpulver ist in Abb. 4.3 dargestellt und wird anhand eines SDS-Gels nachvollzogen.

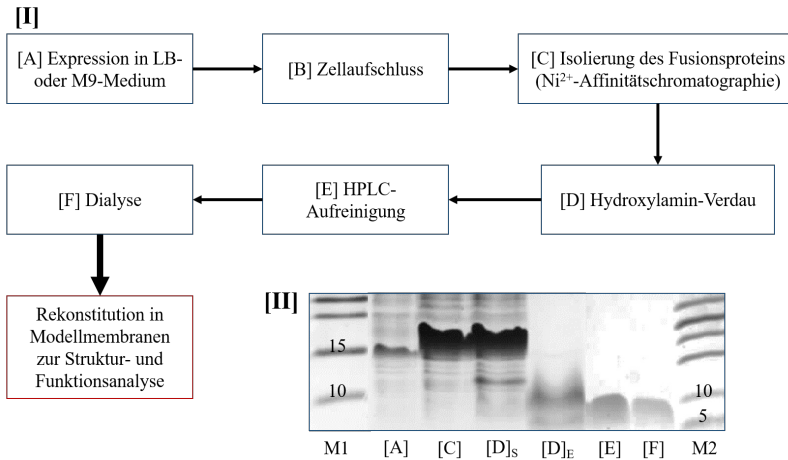


Abbildung 4.3: [I] Strategie zur Herstellung von BsrG-Proteinpulver. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden beschrieben und werden im SDS-Gel ([II]) nachvollzogen. [II]: [A] Zellernete. Das Fusionsprotein erscheint erwartungsgemäß auf Höhe der 15 kDa-Bande der Marker M1 und M2. [C] Elutionsfraktion der Ni²⁺-Affinitätschromatographie mit dem ca. 15 kDa schweren Z21 α -BsrG-Fusionsprotein. [D]_S Start des Hydroxylamin-Verdau. [D]_E Beendeter und vollständig umgesetzter Hydroxylamin-Verdau nach 24 h. Die 15 kDa Bande des Z21 α -BsrG-Fusionsproteins ist nicht mehr sichtbar, dafür zwei Banden, die Z21 α und BsrG zugeordnet werden. [E] HPLC-Fraktion der BsrG-haltigen Elution (Minute 14,5 -15,5). [F] Dialysiertes und lyophilisiertes BsrG-Proteinpulver. Analog zur HPLC-Probe zeigt sich eine einzelne Bande knapp unter der 10 kDa-Bande der Marker M1 und M2, was der Dimermasse von BsrG (ca. 8,8 kDa) entspricht sowie für eine hohe Reinheit spricht (M1: PageRuler Prestained Protein Ladder Nr. 26616 (Thermo Fisher), M2: PageRuler Unstained Protein Ladder Nr. 26632 (Thermo Fisher)).

Expression von BsrG-wt und Mutanten in *E. coli* Lemo21-Zellen

Die pETZ21 α -Vektoren wurden zur Expression im Liter-Maßstab in *E. coli* Lemo21-Zellen eingeschleust, welche einen zweiten Vektor besitzen, der für eine Chloramphenicol-Resistenz sowie für T7-Lysozym kodiert, das als natürlicher Inhibitor der T7-RNA-Polymerase dient. Die Expression des T7-Lysozyms steht unter der Kontrolle eines L-Rhamnose-induzierbaren Promotors (P_{T7lysY}) und erlaubt eine genaue Feinabstimmung zur Optimierung des Expressionslevels. Die Expression von BsrG-wt und Mutanten wurde zur Gewinnung von unmarkiertem Proteinpulver (CD, OCD, MIC, Hämolysetests, Leakage-Assays) in LB-Medium und zur Gewinnung von ¹⁵N-isotopenmarkierten Proteinen in M9-Minimalmedium durchgeführt.

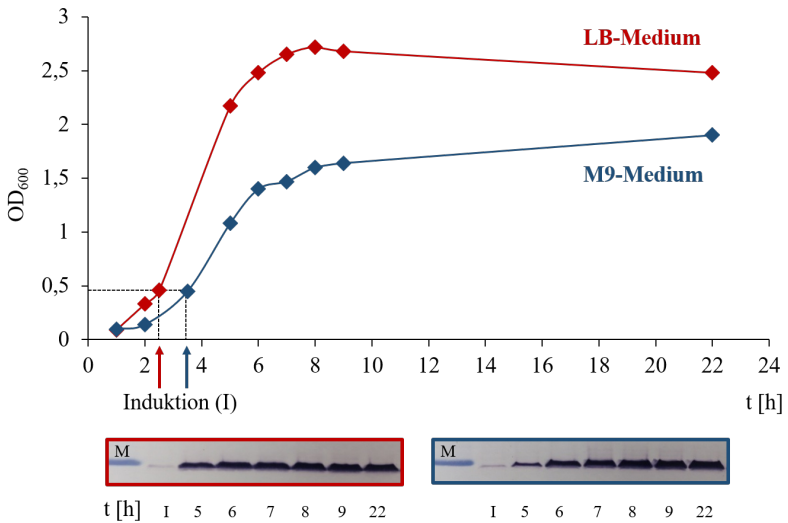


Abbildung 4.4: Expressions- und Wachstumsverlauf. Zur Herstellung von BsrG mittels rekombinanter Proteinbiosynthese wurden die Zellen sowohl in LB- (rot) als auch in M9-Medium (blau) mit 250 μ M bzw. 100 μ M L-Rhamnose bei 37 °C über Nacht wachsen gelassen. Die Westernblots zeigen den Grad der Fusionsprotein-Expression anhand der Stärke der Bande auf Höhe der 15 kDa-Markerbande (M: PageRuler Prestained Protein Ladder Nr. 26616 (Thermo Fisher)). Unter den Banden der Westernblots sind die Zeiten entsprechend dem Wachstumsdiagramm angegeben.

In Abb. 4.4 sind die optimierten Wachstumsbedingungen dargestellt. Das Wachstum im LB-Vollmedium ist aufgrund des größeren Nährstoffgehalts erwartungsgemäß etwas stärker ausgeprägt als im M9-Minimalmedium. Die Expression des Fusionsproteins hatte in beiden Medien keinen toxischen Effekt auf das Zellwachstum. Das Expressionslevel des Fusionsproteins lässt sich anhand der Westernblots nachvollziehen und zeigt eine nahezu kontinuierliche Konzentration an Fusionsprotein pro Zelle. Optimale Ausbeuten wurden demnach erzielt, wenn die Zellen bei 37 °C über Nacht bei 220 rpm geschüttelt und ca. 18 h nach der Induktion durch IPTG geerntet wurden. Die L-Rhamnosekonzentration wurde für die Expression im LB-Medium auf 250 µM und für die Expression im M9-Medium auf 100 µM eingestellt.

Zellaufschluss, Isolierung des Fusionsproteins und Hydroxylamin-Verdau

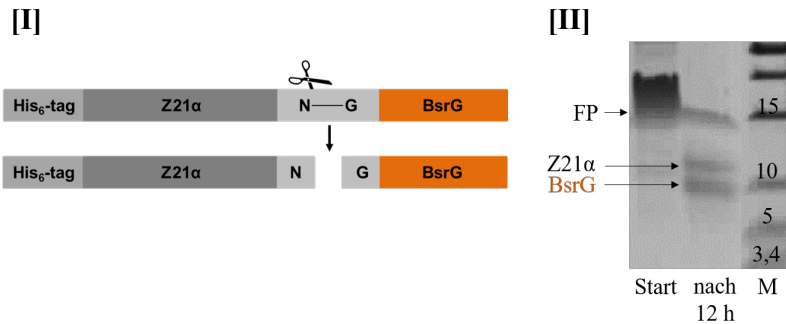


Abbildung 4.5: [I] Proteolytische Spaltung des Z21α-BsrG-Fusionsproteins. [II] Im SDS-Gel aufgetragen wurden jeweils eine Probe zu Beginn des Verdau und nach 12 h. Deutlich zu erkennen ist die Abnahme der intensiven Fusionsprotein-Bande (FP) bei 15 kDa. Die geschnittenen Z21α- und BsrG-Proteine erscheinen knapp oberhalb und unterhalb der 10 kDa-Bande, (M: PageRuler Unstained Protein Ladder Nr. 26632 (Thermo Fisher)).

Im SDS-Gel der Abb. 4.5 [II] ist der Start des Hydroxylamin-Verdau und nach 12 h Verdau angezeigt. Die deutliche Reduzierung der Fusionsprotein-Bande bei 15 kDa und die neu entstanden Banden knapp oberhalb und unterhalb der 10 kDa-Marker-Bande zeigen eine erfolgreiche Umsetzung des Fusionsproteins. In der [D]_E-Spur in Abb. 4.3 [II] ist eine Probe nach 24 h Verdau aufgetragen. Deutlich zu erkennen ist ein erfolgreicher und vollständiger Verdau des Z21 α -BsrG-Fusionsproteins nach 24 h.

HPLC-Aufreinigung und Massenbestimmung mittels MALDI-TOF

Zur Gewinnung reinen Proteinpulvers wurde die Reagenzlösung der Hydroxylamin-Spaltung, welche aus verschiedenen Spaltprodukten und Salzen besteht, über die HPLC aufgereinigt. Der etablierte Gradient ist Tabelle 3.6 in Kapitel 3.1.3 zu entnehmen. Die verwendeten Lösungsmittelgemische setzen sich aus Acetonitril, Isopropanol und TFA zusammen und sind im Anhang aufgelistet. Aufgrund seiner starken Hydrophobizität war es nicht möglich, BsrG von einer C18-Polymersäule zu eluieren. Erfolgreich war eine Auftrennung mittels semipräparativer C4-Polymersäule (250 \times 10 mm). Die Temperatur während der Trennung wurde auf konstant 35 °C und die Flussrate auf 4 $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ eingestellt. Das Chromatogramm einer HPLC-Aufreinigung von uniform ¹⁵N-markiertem BsrG-wt findet sich in Abb. 4.6. Innerhalb der ersten Minuten der Auftrennung wurden polare Substanzen und Salze durch das polare Lösungsmittel A von der Säule gespült. Der Anteil an unpolarem Lösungsmittel B wurde über sieben Minuten linear von 30 % auf 90 % erhöht und eine Minute konstant gehalten. In dieser Zeit (Minute 11,5 - 12 im Chromatogramm) eluierte das Detergenz NLS. BsrG eluierte anschließend zwischen Minute 14,5 und 15,5 im Chromatogramm erwartungsgemäß bei knapp 100 % des unpolaren Lösungsmittels B als Doppelpeak. Eine weitere Separierung dieser Peaks konnte nicht vorgenommen werden.

Beide Elutionen wurden zusammen aufgefangen und mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF auf Reinheit und Masse überprüft. Wie in Abb. 4.3 [II], [E] dargestellt, erscheint nur eine Bande im SDS-Gel bei knapp unter 10 kDa, was der Dimermasse von BsrG (ca. 8,8 kDa) entspricht sowie eine hohe Reinheit aufzeigt. Im MALDI-TOF-Spektrum (Abb. 4.6 [III]) findet sich die Masse 4437,572 Da, welche der Monomermasse von BsrG mit der kalku-

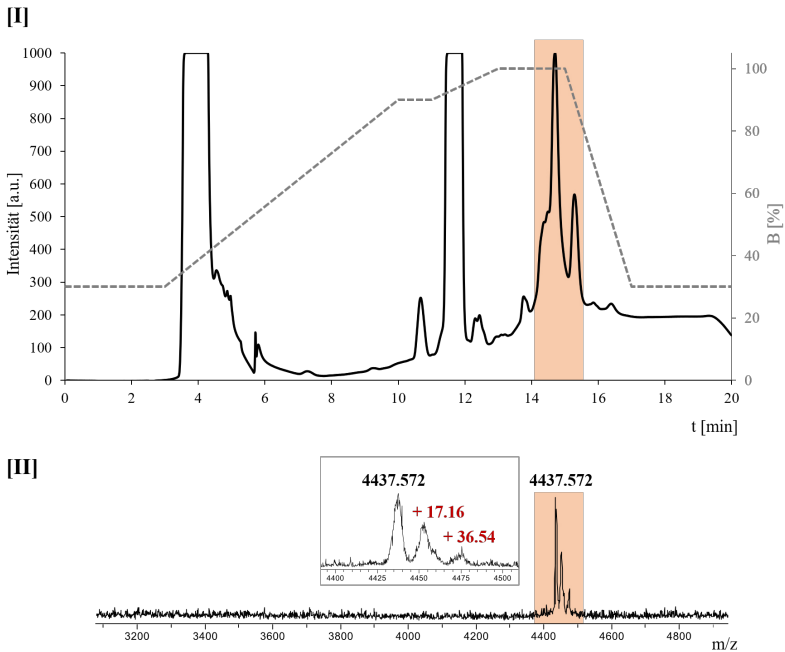


Abbildung 4.6: [I] HPLC-Chromatogramm von uniform ^{15}N -markiertem BsrG-wt. BsrG eluiert als Doppelpeak zwischen Minute 14,5 und 15,5 im Chromatogramm bei knapp 100 % Lösungsmittel B (rot hinterlegt). [II] MALDI-TOF-Analyse von uniform ^{15}N -markiertem BsrG-wt. Die ermittelte Masse beträgt 4437,57 Da und kann damit der Monomermasse von BsrG zugeordnet werden (kalkulierte Monomermasse: 4439,10 Da). Weitere um 17,16 Da und 36,54 Da schwerere Massen könnten durch Oxidationen der Methionin-reichen AS-Sequenz auftreten. Das MALDI-TOF-Spektrum zeigt die Monomermasse von BsrG sowie keine weiteren unspezifischen Massen, die durch Verunreinigungen hervorgerufen werden könnten. Die beiden Elutionen des rot hinterlegten Bereichs können somit BsrG zugeordnet werden.

lierten Masse von 4439,1 Da nahezu übereinstimmt. Zwei weitere um ca. 17 Da und 36 Da schwerere Massen könnten durch Oxidationen der Methionine bedingt werden. Insgesamt zeigt sowohl das SDS-Gel als auch MALDI-TOF eine hohe Reinheit des Proteinpulvers sowie die korrekte Masse an. Die Ausbeute betrug sowohl für die Expression in LB- als auch in M9-Medium zwischen 2,5 - 4 mg pro Liter Expressionsmedium.

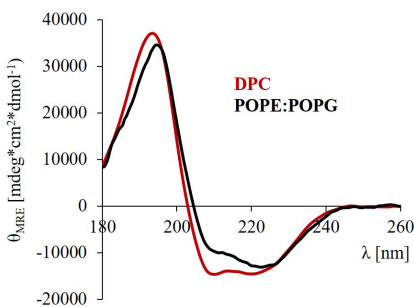
4.2 Charakterisierung von BsrG-wt

Die Ermittlung der Struktur und Funktion von BsrG-wt sollte in einer Membran stattfinden, welche dessen natürliche Umgebung möglichst adäquat imitiert. Bei den Versuchen BsrG-wt in gängige Phosphocholin-Lipide zu rekonstituieren, erschwerte Gelbildung die Probenpräparation und resultierte in Spektren mit hohen Pulveranteilen. Aufgrund der Membranzusammensetzung des Bakteriums *B. subtilis* wurde BsrG-wt und Mutanten für alle CD-, OCD- und NMR-Experimente nicht in neutrale Phosphocholin-Lipide, sondern in POPE:POPG (2:1)-Modellmembranen rekonstituiert [185].

4.2.1 Sekundärstrukturanalyse

Alle Messungen wurden gemäß Kapitel 3.2.2 präpariert und durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Temperatur während der Messungen mit 30 °C über der Phasentemperatur der Lipidmischung gehalten wurde. Für die Umwandlung der CD- in MRE-Spektren wurden UV/Vis-Spektren von BsrG-wt in DPC-Detergenzmizellen aufgenommen und so die Proteinkonzentration aller Proben nach Lambert-Beer ermittelt (Kapitel 3.2.2). Anhand dieser Detergenz-Spektren wurden Liposomen-Spektren normiert und so deren Konzentration für die Umwandlung in MRE-Spektren zur quantitativen Analyse deren Sekundärstrukturanteilen bestimmt. Dazu wurden die Algorithmen CONTIN LL, CDSSTR und SELCON 3 (Set 7 und SMP180) verwendet, welche auf dem DICHROWEB-Server zur Verfügung gestellt werden [177, 178]. Alle im Folgenden angegebenen Werte der Helizität wurden mit dem CONTIN LL (SMP180) Algorithmus ermittelt, wobei mit den anderen Algorithmen ähnliche Ergebnisse erzielt wurden. Bei der Auswertung wurden nur die Ergebnisse berücksichtigt, deren NRMSD-Werte kleiner 0,1 waren [178].

Wie in Kapitel 1.4 vorweggenommen, wurde für BsrG-wt mit den Programmen TMpred, SOSUI und TMHMM eine 23 AS lange TMD vorhergesagt, was eine Voraussetzung der Charakterisierung von BsrG als typisches Typ I Toxin ist sowie im Rahmen dessen die Basis zur Untersuchung der H-Zipper-Hypothese darstellt. Die Ergebnisse der CD-Untersuchungen von BsrG-wt in POPE:POPG (2:1) mit einem P:L von 1:50 sowie von BsrG-wt in DPC-Mizellen sind in Abb. 4.7 dargestellt.



	DPC	POPE:POPG
α-Helix	60,0 %	52,0 %
β-Faltblatt	8,8 %	18,0 %
Schleife	8,4 %	8,0 %
unstrukturiert	22,9 %	22,0 %
NRMSD	0,0200	0,006

Abbildung 4.7: CD-Spektren von BsrG-wt in POPE:POPG (2:1)-Lipidvesikeln (schwarz, P:L = 1:50) und in DPC-Detergenzmizellen (rot). Die Spektren zeigen die typische Linienform eines α -helikalen Proteins mit Minima um 210 bzw. 212 nm und 222 bzw. 224 nm sowie ein Maximum bei 193,5 bzw. 195 nm, wobei das POPE:POPG-Spektrum eine Rot-Verschiebung zeigt, was vermutlich in der Anwesenheit von Proteinaggregaten begründet liegt. Die Ergebnisse der quantitativen Sekundärstrukturanalysen mittels CONTIN LL (SMP180) ergaben helikale Anteile von 60 % in DPC und 52 % in POPE:POPG. Die Spektren wurden bei 30 °C in 10 mM PB-Puffer (Lipide) bzw. Wasser (Detergenz) aufgenommen.

Beide Spektren zeigen die für α -helikale Proteine charakteristischen negativen Banden im Bereich um 210 nm bzw. 212 nm und 222 nm bzw. 224 nm sowie eine positive Bande im Bereich von 193,5 nm bzw. 195 nm. Aus den Spektren geht ein geringerer Wert der Helizität für BsrG-wt in POPE:POPG (2:1) hervor, da die Intensitäten der drei charakteristischen Banden im Vergleich zum DPC-Spektrum etwas weniger ausgeprägt sind. Weiterhin lässt sich für das POPE:POPG-Spektrum eine leichte Rot-Verschiebung um ca. 2 nm im Vergleich zum DPC-Spektrum erkennen, was auf das Vorhanden-

sein von Proteinaggregaten schließen lässt, wodurch vor allem der Bereich der Proteinabsorptionsbande um 190 - 210 nm beeinflusst wird. Neben der Rot-Verschiebung ist die Reduktion der Signalintensitäten vor allem im kurzwelligen Bereich ein deutliches Anzeichen für Aggregation. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung ergaben für BsrG-wt in DPC einen Helixanteil von knapp 60 % und für BsrG-wt in POPE:POPG von 52 %. Im Fall von BsrG entspricht ein α -helikaler Anteil von 60 % 23 AS, also genau der Länge der vorhergesagten TMD. Für POPE:POPG (2:1) entspricht der α -helikale Anteil 20 AS, wobei dieser geringere Wert auch durch das Vorhandensein von Proteinaggregaten bedingt sein kann. Der direkte Vergleich zwischen dem Detergenz- und Lipid-Spektrum zeigt, dass die Rekonstitution von BsrG in Lipiden herausfordernd ist, da das Protein eine hohe Tendenz besitzt Aggregate zu bilden. Rekonstitutionen in anderen Lipidsystemen waren weniger erfolgreich. Dennoch konnte für BsrG erstmals eine α -helikale Sekundärstruktur nachgewiesen werden, deren helikaler Anteil mit der Länge der vorhergesagten TMD übereinstimmt.

4.2.2 Orientierung in Modellmembranen

Zur Analyse der Orientierung von BsrG-wt wurde das Protein in POPE:POPG (2:1) Modellmembranen rekonstituiert und mittels OCD-Spektroskopie untersucht. Da die OCD-Spektroskopie nur globale Informationen darüber liefert, wie eine Helix in der Membran orientiert ist, wurden zusätzlich 1D FK ^{15}N -NMR durchgeführt und mit den Ergebnissen der OCD abgeglichen. Alle gezeigten OCD-Spektren wurden beim globalen Minimum (224 nm) auf -1 normiert.

In Abb. 4.8 sind die Spektren von BsrG-wt in POPE:POPG (2:1) mit einem P:L von 1:50 dargestellt. Das OCD-Spektrum besitzt bei der 208 nm Bande einen Wert von -0,002, also von nahezu Null, und zeigt damit eine transmembrane Orientierung mit leicht geneigter Ausrichtung für BsrG-wt in der

Membran an. An dieser Stelle sei auf Publikationen zur Strukturanalyse von E5 und PDGFR- β verwiesen, aus deren OCD-Spektren positive Werte der 208 nm Bande eine komplett transmembrane Orientierung für E5 sowie eine leicht geneigte Orientierung für $208 \text{ nm} = 0$ ermittelt haben [75, 125, 186]. Das 1D FK ^{15}N -NMR-Spektrum zeigt ein Maximum bei ca. 210 ppm, was ebenfalls für eine transmembrane Orientierung spricht. Signale um 75 ppm resultieren aus einer nicht erfolgreichen Rekonstitution des Proteins. Insgesamt stimmen die Ergebnisse der OCD- und NMR-Spektroskopie überein und bestimmen für BsrG-wt eine nahezu transmembrane Orientierung mit leicht geneigter Ausrichtung.

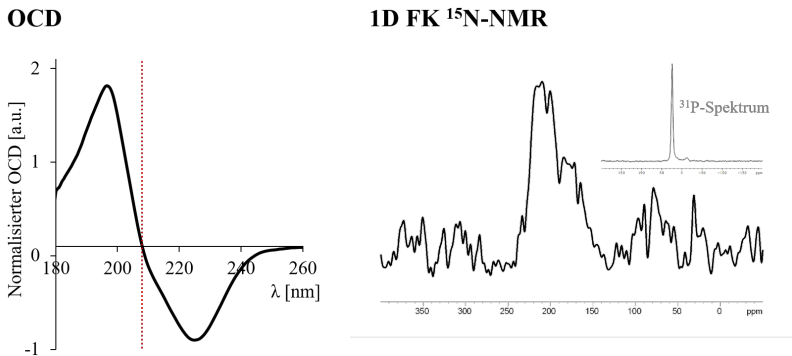


Abbildung 4.8: OCD- und 1D FK ^{15}N -NMR-Spektrum von BsrG-wt in POPE:POPG (2:1). Beide Spektren zeigen eine transmembrane Orientierung. Die gestrichelte Linie im OCD-Spektrum schneidet die x-Achse bei 208 nm.

Um abzuschätzen, inwiefern das P:L-Verhältnis die Orientierung von BsrG-wt beeinflusst, wurden OCD- und NMR-Messungen mit verschiedenen P:L-Verhältnissen durchgeführt, wobei die Menge an eingesetztem Protein aus Sensitivitätsgründen nicht herabgesetzt, sondern die Menge an Lipid angepasst wurde. In Abb. 4.9 sind jeweils drei Spektren mit den P:L-Verhältnissen 1:50, 1:100 und 1:200 dargestellt.

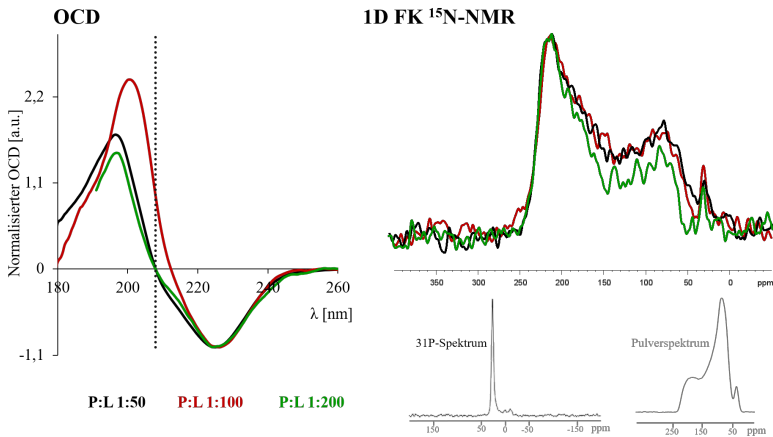


Abbildung 4.9: Einfluss des P:L auf die Orientierung von BsrG-wt. Die Orientierung von BsrG ist weitestgehend unabhängig vom P:L-Verhältnis. [I] Variationen der OCD-Spektren sind auf die Probenpräparation zurückzuführen. Die OCD-Spektren sind beim globalen Minimum auf -1 normiert. [II] Das ^{31}P -Spektrum der 1:50-Probe bestätigt eine gute Qualität der Lipidschichten. Das Pulverspektrum zeigt den nicht rekonstituierten Zustand zum Vergleich.

In den OCD-Spektren zeigt sich für BsrG-wt in der 1:100-Probe eine sehr gute Rekonstitution, woraus auch die Verschiebung der 195 nm Bande zu längeren Wellenlängen resultiert. Das 1:50- und das 1:200-Spektrum besitzen bei 208 nm einen Wert von -0,002 bzw. -0,009 und weisen damit ebenfalls eine transmembrane Orientierung mit leicht geneigter Ausrichtung für BsrG-wt in der Membran auf.

Die NMR-Spektren zeigen unabhängig vom P:L-Verhältnis für jede Probe ein Maximum bei 210 ppm, was eine transmembrane Orientierung anzeigt. Weiterhin demonstriert der Pulveranteil zwischen 75 ppm und 150 ppm, dass BsrG-wt nicht vollständig rekonstituiert ist.

Insgesamt zeigt BsrG-wt die Fähigkeit, eine transmembrane Orientierung mit leicht geneigter Ausrichtung anzunehmen, und das relativ unbeeinflusst vom P:L-Verhältnis, wie sowohl mit OCD- als auch mit NMR-Messungen gezeigt wurde.

4.2.3 Assemblierungsverhalten

Wie bereits in Abschnitt 4.1 demonstriert, erscheint BsrG-wt im SDS-Gel als Dimer (Abb. 4.10). Die Tatsache, dass BsrG-wt selbst unter stark denaturierenden Bedingungen nicht monomer vorliegt, erfüllt neben dessen α -helikaler Sekundärstruktur und der ermittelten transmembranen Orientierung ein weiteres Kriterium der aufgestellten H-Zipper-Hypothese. Da SDS-Gele aber sehr artifiziell sind, wurden ToxR-Assays in lebenden Zellen durchgeführt.

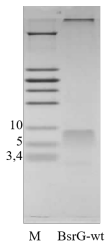


Abbildung 4.10: SDS-Gel von BsrG-wt. Das Protein erscheint als Dimer (Dimermasse ca. 8,8 kDa) knapp unter der 10 kDa-Markerbande. (M: PageRuler Unstained Protein Ladder Nr. 26632 (Thermo Fisher)).

Die chimären ToxR-Konstrukte wurden so designt, dass das cytosolische ToxR-Protein N-terminal vor BsrG liegt. Auf diese Weise gibt ein positives Ergebnis des ToxR-Assays nicht nur Aufschluss darüber, dass BsrG-wt generell in der Membran assembliert, sondern auch, dass das Protein dabei eine parallele Anordnung aufweisen muss, da nur diese Anordnungen im ToxR-Assay detektiert werden.

Ein ToxR-Assay besteht aus drei Teilen:

1. Messung der Stärke der Selbstassoziation
2. Kontrolle der Expression
3. Kontrolle der korrekten Membraninsertion

Die korrekte Membraninsertion wurde anhand von Wachstumstests transformierter pd28 *E. coli*-Zellen auf Agarplatten oder in flüssigem maltosehaltigem Minimalmedium geprüft (Abb. 4.11). Als Negativkontrolle diente dabei das Konstrukt Δ TM, bei welchem die TMD zwischen ToxR und MBP deletiert wurde und damit kein Wachstum beobachtet werden soll. Das gut charakterisierte dimere Onkoprotein E5 wurde neben GpA-tmd als weiteres Referenzprotein gemessen. Die Ergebnisse der Wachstumstest sind in Abb. 4.11 dargestellt. Mit Ausnahme der Negativkontrolle Δ TM zeigten alle Konstrukte ein kontinuierliches Wachstum im Flüssigmedium sowie Kolonien auf den Agarplatten. Negative Ergebnisse aufgrund von fehlerhafter Insertion konnten damit ausgeschlossen werden. Weiterhin ergibt sich durch das Design der Konstrukte, dass die Helices so insertiert sind, dass sich der N-Terminus von BsrG am cytosolischen und der C-Terminus am extrazellulären Bereich befindet und die TM-Helices von BsrG damit parallel angeordnet sind, da eine antiparallele Anordnung sehr unwahrscheinlich ist.

Die Durchführung der ToxR-Assays erfolgte analog des in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Protokolls. Als Positivkontrolle diente GpA-tmd, dessen β -Galactosidaseaktivität auf 100 % gesetzt wird. GpA-mut dient als Kontrolle mit reduzierter β -Galactosidaseaktivität als Folge einer verminderten Selbstassemblierung. Die Ergebnisse der ToxR-Assays finden sich in Abb. 4.12. BsrG-wt zeigt eine stark ausgeprägte Tendenz zur Selbstassemblierung, welche sogar stärker ausgeprägt zu sein scheint als die von GpA-tmd sowie die des Onkoproteins E5. Diese Ergebnisse unterstützen erste Erkenntnisse aus den SDS-Gelen und bekräftigen die Hypothese, dass BsrG in paralleler Anordnung spezifische Helix-Helix-Wechselwirkungen ausbilden und so ein stabiles Dimer bilden könnte.

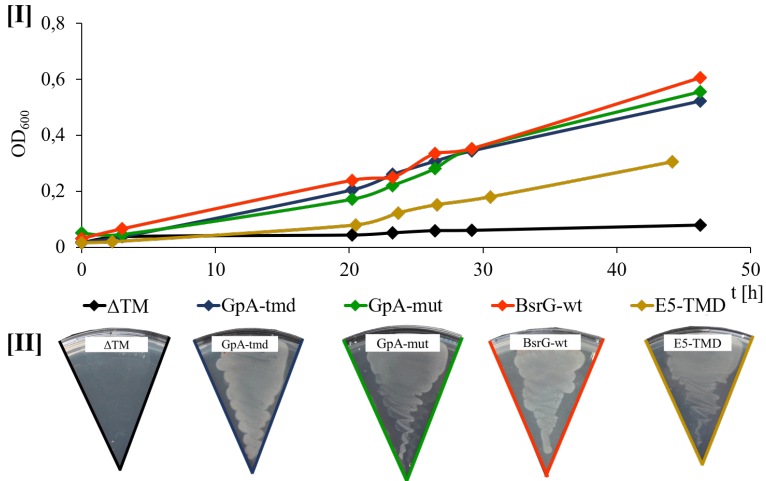


Abbildung 4.11: Wachstumstests transformierter pd28 *E. coli*-Zellen in flüssigem maltosehaltigem Minimalmedium (I) und auf Agarplatten (II). Mit Ausnahme der Negativkontrolle Δ TM weisen alle Konstrukte Zellwachstum auf und bestätigen damit die korrekte Insertion der Konstrukte in der Membran.

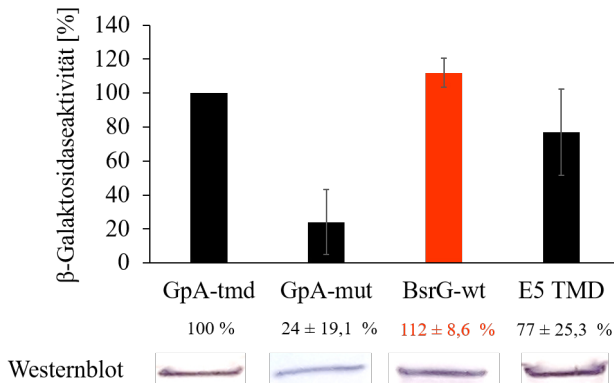


Abbildung 4.12: Ergebnisse der ToxR-Assays. BsrG-wt zeigt eine stärkere Tendenz zur Selbstassemblierung als das dimere Onkoprotein E5 sowie die Positivkontrolle GpA-tmd. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass BsrG nicht monomer in der Membran vorliegt sowie in Kombination mit den Wachstumstests - eine parallele Anordnung der Helices aufweist. Die Westernblots unter den Ergebnissen bestätigen die Expression des Fusionsproteins.

4.2.4 Funktion und Membranolyse

ANTS/DPX-Leakage-Assays

Um herauszufinden, ob BsrG analog zu anderen Typ I Toxinen eine porenbildende Funktion aufweist, wurden Leakage-Assays gemäß dem im Kapitel 3.2.2 beschriebenen Protokoll in POPE:POPG (2:1)-Liposomen durchgeführt. Aufgrund der mangelnden Löslichkeit von BsrG-wt in wässrigen Puffern wurde das Protein mit den Lipiden cosolubilisiert. Bei der Herstellung von Proben mit variierenden P:L-Verhältnissen wurde die eingesetzte Lipidmenge konstant gehalten. Die Datenerfassung und -auswertung sind ausführlich in Kapitel 3.2.2 beschrieben.

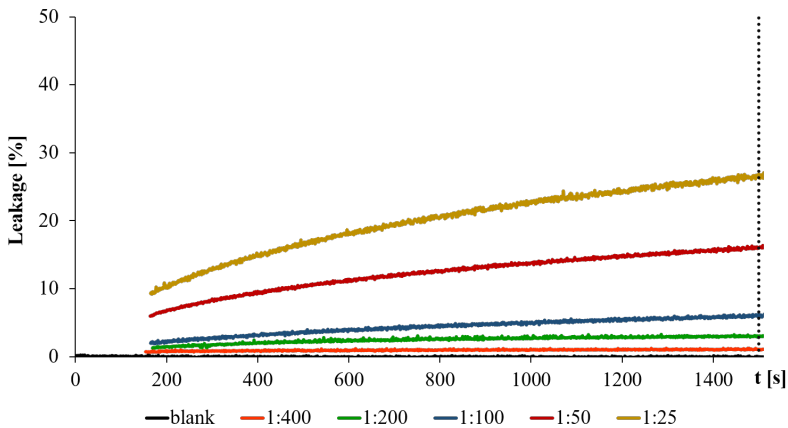
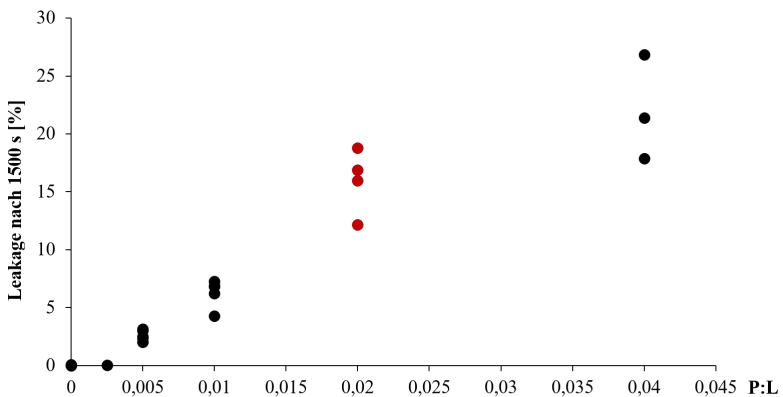


Abbildung 4.13: Verlauf des Leakage-Experiments von BsrG-wt mit verschiedenen P:L-Verhältnissen in POPE:PG-Vesikeln. BsrG-wt zeigt ein Leakage der Vesikel in Abhängigkeit des P:L-Verhältnisses. Insgesamt ist der Effekt sehr schwach ausgeprägt.

In Abb. 4.13 sind die Messdaten des Leakage-Experiments von Proben mit unterschiedlichen BsrG-wt-Konzentrationen dargestellt. Insgesamt zeigt sich, dass BsrG-wt ein Auslaufen von POPE:POPG-Vesikel bedingen kann und bestätigt damit die Vermutung, dass es wie andere Typ I Toxine eine

porenbildende Funktion aufweist. Das Leakage zeigt für jedes gemessenes P:L-Verhältnis einen kontinuierlichen, aber außergewöhnlich schwachen Verlauf im Vergleich zu membranaktiven Proteinen. In Abb. 4.14 sind die Leakage-Werte nach 1500 s in Abhängigkeit vom P:L-Verhältnis dargestellt. Die P:L-Verhältnisse 1:400 bis 1:50 zeigen eine lineare Abhängigkeit zwischen der Stärke des Leakage und der eingesetzten Proteinmenge. Die leichte Abweichung vom linearen Verlauf der 1:25-Probe liegt in der Probenpräparation begründet, da BsrG-wt in hohen Konzentrationen ausfällt. Für ein P:L von 1:50 ergibt sich nach 1500 s ein Leakage von $18,9 \pm 7,9$ %. Dieses P:L-Verhältnis wird später für die Experimente mit Mutanten gewählt.



P:L	0 (Blank)	1:400	1:200	1:100	1:50	1:25
Mittelwert [%]	0	$0,4 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,3$	$5,5 \pm 1,2$	$18,9 \pm 7,4$	$29,9 \pm 13,3$

Abbildung 4.14: Abhängigkeit des Leakage von der eingesetzten BsrG-wt-Konzentration. POPE:POPG-Vesikel ohne BsrG-wt sind dicht und zeigen kein Leakage (blank). Die Daten einzelner unabhängiger Messungen sind als Punkte dargestellt. In rot hervorgehoben ist das Leakage für ein P:L von 1:50. Die im Folgekapitel dargestellten Leakage-Experimente mit Mutanten werden mit einem P:L von 1:50 durchgeführt.

MIC-Tests

Die MIC-Tests wurden, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, in Anlehnung an das Protokoll aus [169] durchgeführt. Aufgrund der stark hydrophoben AS-Komposition von BsrG-wt wurde das Protein zuerst in einem Überschuss TFE gelöst und aliquotiert und das Lösungsmittel erst bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht im Vakuum entfernt. Die Aliquots wurden in 100 % EtOH aufgenommen, sodass sich eine Stammlösung von $1024 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ ergab. Da Gram-negative Bakterien sehr sensibel auf hohe EtOH-Konzentrationen reagiert haben und bei 50 % EtOH abgestorben sind, wurden MIC-Tests ausschließlich in den drei Gram-positiven Stämmen *B. subtilis* DSM 347, *K. rhizophila* DSM 348 und *S. xylosus* DSM 20267 durchgeführt. Als Kontrollpeptide dienten GS, PmB und TisB. Die beiden Peptide GS und PmB zeigen eine hohe Aktivität gegen Gram-positive Bakterien, wohingegen für TisB keine antimikrobielle Wirkung mit den getesteten Konzentrationen bis $256 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ erwartet wird.

Um sicherzustellen, dass ein toxischer Effekt durch BsrG-wt bedingt wird, wurden Lösungsmittel getestet, die bei der Gewinnung von BsrG-Peptidpulver sowie bei der Probenpräparation eingesetzt wurden. Keine der getesteten Lösungsmittel zeigte einen toxischen Effekt auf *B. subtilis* DSM 347.

Die Ergebnisse der MIC-Tests sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Abb. 4.15 zeigt exemplarisch eine Mikrotiterplatte. In allen drei Gram-positiven Stämmen wurde für BsrG-wt eine MIC von $64 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ und damit eine morderante antimikrobielle Wirkung ermittelt. BsrG-wt scheint damit leicht durch die Peptidoglykanschicht Gram-positiver Bakterien translozieren zu können. Die Kontrollpeptide PmB und GS zeigten eine starke antimikrobielle Aktivität mit einer MIC von $8 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ bzw. $4 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$. Diese Werte finden sich auch in der Literatur [187]. TisB zeigte erwartungsgemäß keine antimikrobielle Wirkung gegen *B. subtilis* für die getesteten Konzentrationen.

Protein	MIC in [$\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$]		
	<i>B. subtilis</i> DSM 347	<i>K. rhizophila</i> DSM 348	<i>S. xylosum</i> DSM 20267
BsrG-wt	64	64	64
GS	4 (2 - 4)	4 (4 - 8)	2 - 4
PmB	8 (16)	8 - 16 (8)	8
TisB	nicht toxisch	-	-

Tabelle 4.3: Ergebnisse der MIC-Tests mit BsrG-wt und Kontrollpeptiden. Die grauen Werte in Klammern entsprechen MIC-Werten aus der Literatur [187].

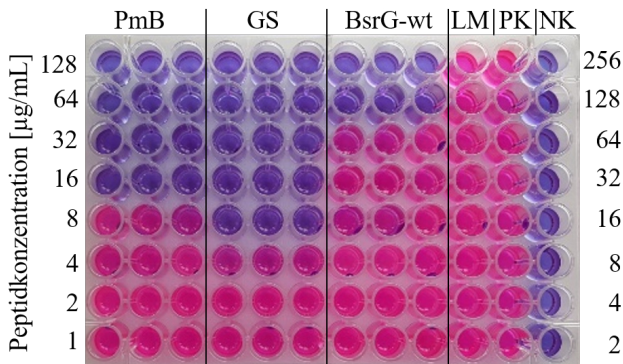


Abbildung 4.15: Beispiel einer Mikrotiterplatte mit PmB, GS und BsrG-wt gegen *B. subtilis* (TisB wird hier nicht aufgeführt). Die jeweiligen Konzentrationen der einzelnen wells sind für PmB und GS links und für BsrG rechts neben der Mikrotiterplatte angegeben. In der Spalte LM ist das verwendete Lösungsmittel aufgetragen, was im Fall von BsrG-wt 100 % EtOH entspricht. Die Positivkontrolle (PK) beinhaltet keine Proteinzusätze. Um eine Kontamination des eingesetzten Mediums auszuschließen, diente die letzte Spalte als Negativkontrolle (NK) ohne Bakterienzusatz. Für BsrG-wt wurde eine MIC von $64 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ und für die Proteine PmB und GS von $8 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ bzw. $4 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ ermittelt, was Werten aus der Literatur entspricht. Die Mikrotiterplatten zum Test der beiden anderen Stämme wurden analog befüllt, inklusive LM, PK und NK.

Hämolysetests

Um den Einfluss von BsrG-wt auf rote Blutkörperchen zu untersuchen, wurden Hämolyse-Tests gemäß dem in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Zur Berechnung der Hämolyse wurde Gleichung 3.4 herangezogen. Die Ergebnisse der Hämolysetests sind in Abb. 4.16 dargestellt. Für BsrG-wt konnte selbst bei hohen Proteinkonzentrationen keine hämolytische Aktivität nachgewiesen werden, was in Anbetracht seiner moderaten antimikrobiellen Wirkung für weiterführende Untersuchungen als antimikrobieller Wirkstoff von Interesse sein könnte.

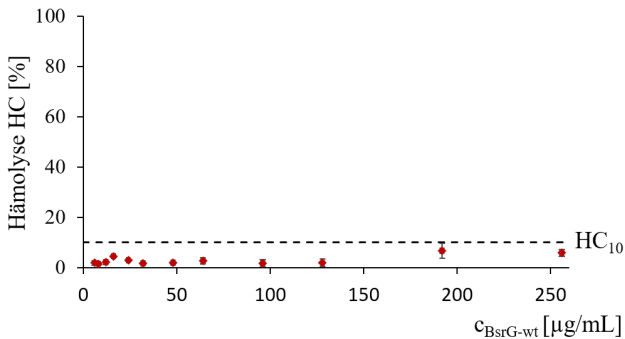


Abbildung 4.16: Ergebnisse der Hämolysetests. Die stärkste Hämolyse entspricht 5 - 6 % bei einer Proteinkonzentration zwischen 192 und 250 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$. Die gestrichelte Linie gibt einen Hämolysewert von 10 % an (HC₁₀).

4.3 Untersuchung der BsrG-Mutanten

4.3.1 Sekundärstrukturanalyse

Die Sekundärstrukturanalyse der BsrG-Mutanten mittels CD-Spektroskopie erfolgte analog zu BsrG-wt in POPE:POPG (2:1)-Vesikeln (P:L = 1:50) in 10 mM PB-Puffer bei 30 °C. Die MRE-Spektren der untersuchten Mutanten sind in Abb. 4.17 dargestellt. Die quantitative Auswertung der MRE-Spektren ist in Tabellen 4.4 [II] - [III] zusammengefasst.

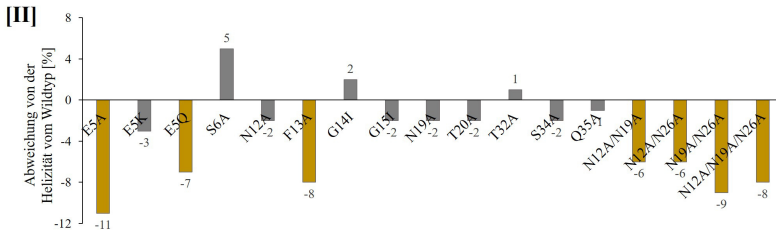
Die MRE-Spektren aller gemessenen Mutanten zeigen wie das BsrG-wt-Spektrum die charakteristische Linienform α -helikaler Proteine, wobei einige der Mutanten eine Rot-Verschiebung des positiven Maximums bei 195 nm aufweisen, was auf Proteinaggregation schließen lässt und vor allem bei den Mutanten F13A, E5A, E5K, E5Q sowie den Doppel- und Dreifach-Asparagin-Mutanten zu erkennen ist.

Eine Messung der Mutanten T2A, N26A und S33A konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Insgesamt lassen sich die Mutanten anhand der CD-Spektren in drei Gruppen einordnen (Abb- 4.4 [I]):

- Mutanten, die keine Unterschiede zu BsrG-wt aufweisen
- Mutanten, die schlechter rekonstituiert sind als BsrG, was aus der positiveren 208 nm Bande im Vergleich zu BsrG-wt sowie aus der Rot-Verschiebung des Maximums oder dessen Reduzierung hervorgeht
- Mutanten, die eine bessere Rekonstitution im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, was aus dem negativeren Wert der 208 nm Bande im Vergleich zu BsrG-wt sowie aus einer Verschiebung des Maximums zu kürzeren Wellenlängen hervorgeht

[I] wie Wildtyp	schlechtere Rekonstitution	bessere Rekonstitution
	(positiverer Wert der 208 nm Bande im Vergleich zu BsrG-wt, Maximum nach links verschoben)	(negativerer Wert der 208 nm Bande im Vergleich zu BsrG-wt, Maximum nach rechts verschoben)
S6A	E5A	N12A
G14I	E5K	N19A
G15I	E5Q	T20A
T32A	F13A	N12A/N19A/N26A
S34A	N12A/N19A	
Q35A	N12A/N26A	
	N19A/N26A	
	N12A/N19A/N26A	



[III]

	α -Helix	β -Faltblatt	Schleife	unstrukturiert	NRMSD
BsrG-wt	52 %	18 %	8 %	22 %	0,006
E5A	41 %	11 %	17 %	32 %	0,022
E5K	49 %	15 %	11 %	25 %	0,017
E5Q	45 %	12 %	20 %	23 %	0,017
S6A	57 %	11 %	8 %	24 %	0,040
N12A	50 %	16 %	17 %	17 %	0,013
F13A	44 %	12 %	17 %	26 %	0,023
G14I	54 %	17 %	9 %	20 %	0,006
G15I	50 %	17 %	8 %	23 %	0,007
N19A	50 %	15 %	17 %	17 %	0,007
T20A	50 %	11 %	16 %	22 %	0,011
T32A	53 %	20 %	7 %	20 %	0,007
S34A	50 %	17 %	16 %	17 %	0,008
Q35A	51 %	19 %	9 %	21 %	0,012
N12A/N19A	46 %	18 %	16 %	21 %	0,008
N12A/N26A	46 %	18 %	18 %	18 %	0,007
N19A/N26A	43 %	15 %	15 %	27 %	0,022
N12A/N19A/N26A	44 %	14 %	15 %	27 %	0,016

Tabelle 4.4: [I] Klassifizierung der Mutanten anhand der LCD-Spektren. [II] Abweichungen von der Helizität des Wildtyps. [III] Quantitative Auswertung aller MRE-Spektren. Mutanten, deren Helizität größer 5 % von der des Wildtyps abweichen, sind gelb hervorgehoben (E5A, E5Q, F13A, N12A/N19A, N12A/N26A, N19A/N26A, N12A/N19A/N26A).

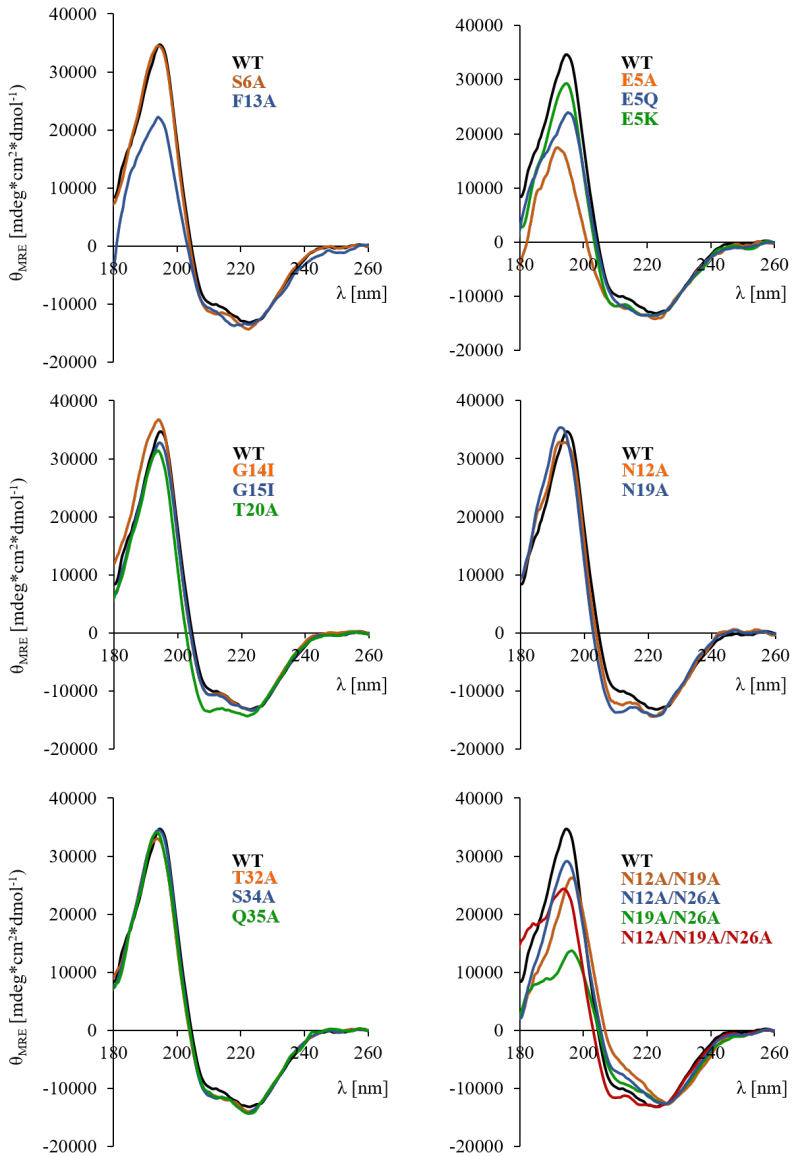


Abbildung 4.17: CD-Spektren der BsrG-Mutanten

4.3.2 Orientierung in Modellmembranen

In Abb. 4.18 sind die OCD-Spektren der untersuchten BsrG-Mutanten dargestellt. Nicht erfolgreich gemessen werden konnten die Mutanten S33A und N12A/N26A.

Insgesamt zeigt sich für alle Mutanten wie für den Wildtyp eine transmembrane Orientierung. Die eingeführten Mutationen bedingen also keine völlige Umorientierung in der Membran.

Die Werte der 208 nm-Bande reichen von -0,2 für G15I bis +0,87 für T2A. Positive Werte ergeben sich für die Mutanten T2A, S6A, N12A, F13A, G14I, N26A, S34A, Q35A, N12A/N19A, N19A/N26A sowie für die Dreifach-Asparagin-Mutante und zeigen eine aufrechtere Orientierung im Vergleich zum Wildtyp an (Abb. 4.5). Die negativen Werte bei der 208 nm liegen meistens im Bereich um -0,05, also nahe Null. Dies trifft auf die Mutanten E5A, E5K, E5Q, G15I, N19A, T20A und T32A zu.

leicht geneigt (wie Wildtyp)	aufrecht (positiver Wert der 208 nm Bande)
E5A	T2A
E5K	S6A
E5Q	N12A
G15I	F13A
N19A	G14I
T20A	N26A
T32A	S34A
	Q35A
	N12A/N19A
	N19A/N26A
	N12A/N19A/N26A

Tabelle 4.5: Klassifizierung der Mutanten anhand der OCD-Spektren

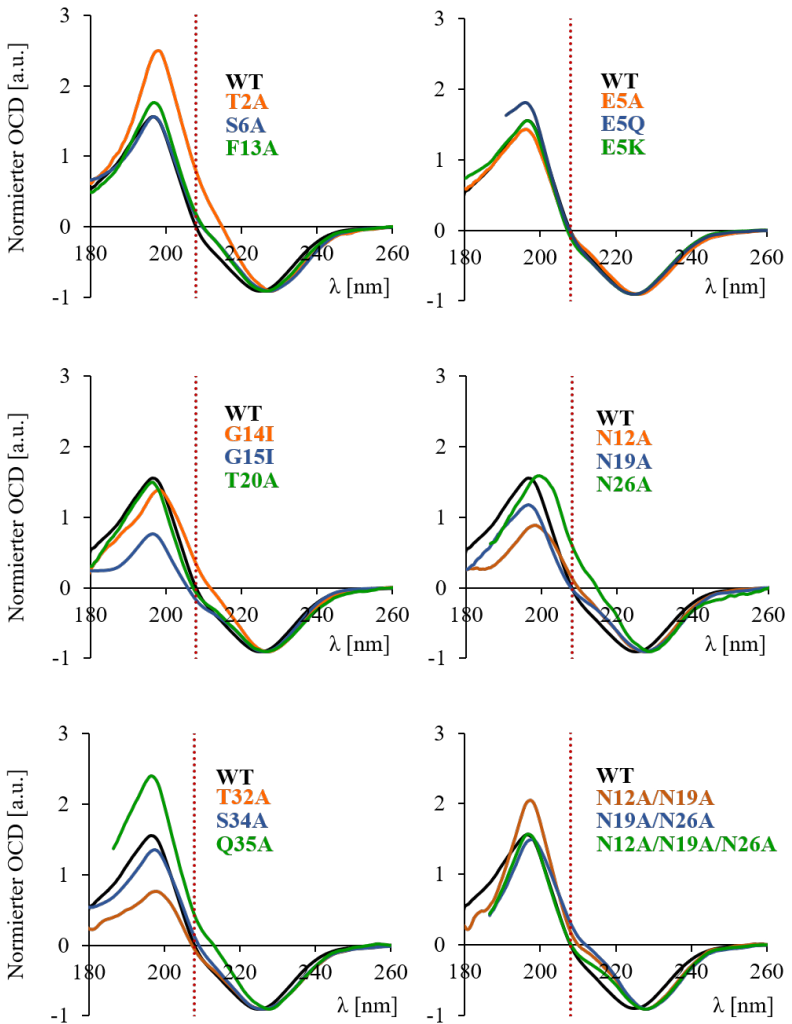
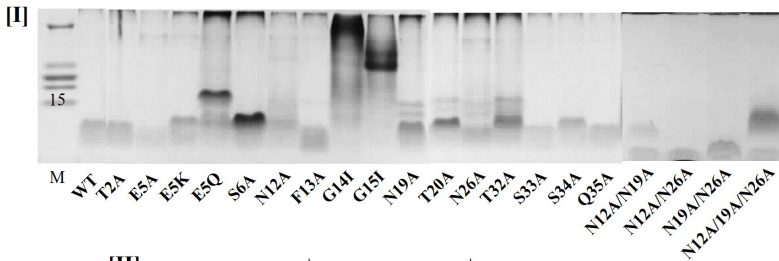


Abbildung 4.18: OCD-Spektren der gemessenen Mutanten. Die 208 nm Bande ist rot markiert.

4.3.3 Assemblierungsverhalten

Zur Abschätzung des Oligomerisierungsverhaltens der BsrG-Mutanten wurden SDS-PAGE durchgeführt und die resultierenden Banden mit der des Wildtyps verglichen. Interessanterweise haben die Mutationen zwar keinen gravierenden Effekt auf die Sekundärstruktur sowie die Orientierung in der Membran, zeigen dafür aber einen deutlichen Einfluss auf den oligomeren Zustand im SDS-Gel (Abb. 4.19 [I]).



[II]

Dimer (Wildtyp)	Höhere Oligomere	Monomer und Dimer
T2A	E5Q	N12A/N19A
E5A	N12A	N12A/N26A
E5K	G14I	N19A/N26A
S6A	G15I	N12A/N19A/N26A
F13A	N19A	
S33A	T20A	
S34A	T32A	
Q35A		

Abbildung 4.19: [I] SDS-PAGE von BsrG-wt und Mutanten. Doppel- und Dreifachmutationen der Asparagine an den Positionen 12, 19 und 26 zeigen ein Aufbrechen des Dimers im SDS-Gel. [II] Klassifizierung der Mutanten anhand des oligomeren Zustands.

Nahezu alle Einfachmutationen von AS, die in der potentiellen TMD lokalisiert sind, resultierten in der Bildung höherer Oligomere im SDS-Gel. Mutationen direkt am N-Terminus (T2A, E5A, E5K, S6A) und am C-Terminus (S33A, S34A, Q35A), die nicht in der TMD lokalisiert sind, waren davon nicht betroffen und zeigten eine Bande auf Höhe des Wildtyps. Höhere Oligomere wurden bei der Mutation der Glycine, sowie bei den Einzelm-

tationen der Asparagine und der beiden Threonine an Position 20 und 32 beobachtet. Interessanterweise zeigen die drei Doppel- und die Dreifach-Asparagin-Mutanten noch eine weitere Bande unterhalb der Dimer-Bande. Werden mindestens zwei der Asparagine, die das Kernelement des postulierten H-Zippers bilden, mutiert, resultiert dies in einem Aufbrechen des Dimers im SDS-Gel. Dagegen scheinen die meisten Einzelmutationen von AS, die in der TMD liegen, unspezifischere Oligomerisierungen durch die hydrophobere Oberfläche (Substitution durch Alanin) zu bedingen, aber nicht zu einem Aufbrechen des Dimers im SDS-Gel zu führen. Lediglich bei den drei Doppel-Asparagin-Mutanten und der Dreifach-Asparagin-Mutante konnte ein Aufbrechen der dimeren Struktur im SDS-Gel beobachtet werden, was die Rolle der Asparagine als Kernelement des postulierten H-Zippers bestätigt.

Um das Assemblierungsverhalten der Mutanten in lebenden Zellen zu untersuchen wurden ToxR-Assays mit den Mutanten N12A, F13A, G14I, N19A und T20A durchgeführt. Die korrekte Insertion wurde analog zum Wildtyp mittels Wachstumstests untersucht und bestätigt (Abb. 4.20).

Die Ergebnisse der ToxR-Assays sind in Abb. 4.21 dargestellt. Eine Mutation der Position 12, 13, 14 und 20 konnte die Selbstassemblierung der Helices nicht unterbinden. Lediglich bei der Mutante N19A konnte eine leichte Reduzierung der Selbstassemblierung beobachtet werden. Diese Ergebnisse sind stimmig mit den SDS-Gelen, welche bei keinem dieser Mutanten eine Monomer-Bande erkennen lassen. Weiterhin scheint die Triebkraft zur Selbstassemblierung in BsrG besonders stark ausgeprägt zu sein. Die Untersuchung weiterer Mutanten war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr möglich.

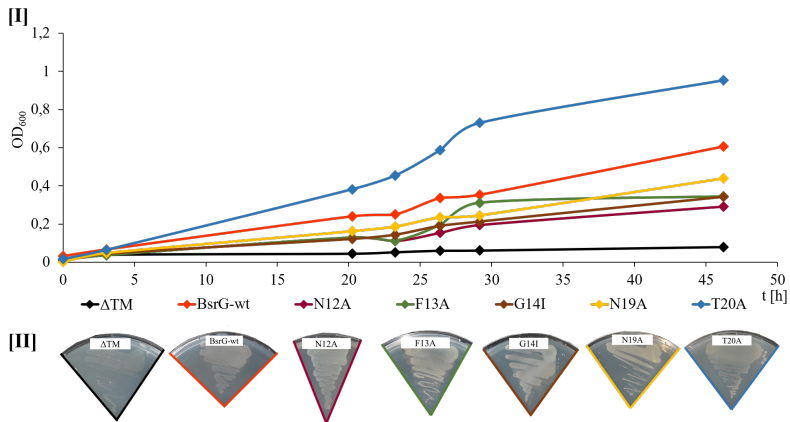


Abbildung 4.20: Wachstumstests transformierter pd28 *E. coli*-Zellen in flüssigem maltosehaltigem Minimalmedium (I) und auf Agarplatten (II). Mit Ausnahme der Negativkontrolle ΔTM weisen alle Konstrukte Zellwachstum auf und bestätigen damit die korrekte Insertion der Konstrukte in der Membran.

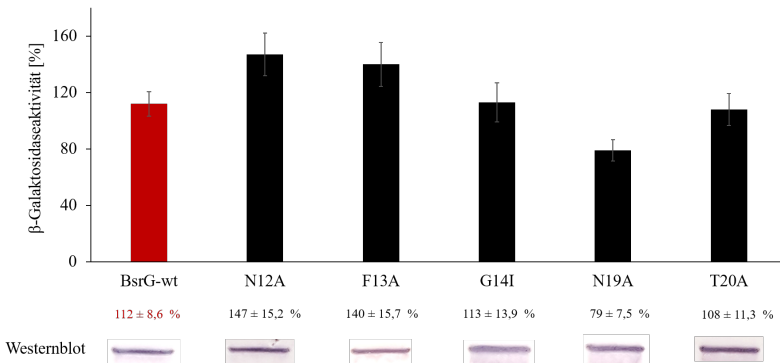


Abbildung 4.21: Ergebnisse der ToxR-Assays an BsrG-Mutanten. Die Mutanten N12A, F13A, G14I und T20A zeigen weiterhin eine ausgeprägte Tendenz zur Selbstassemblierung. Lediglich eine Mutation des Asparagins an Position 19 resultiert in einer leichten Reduzierung des Assemblierungsverhaltens im Vergleich zum Wildtyp (rot).

4.3.4 Funktion und Membranolyse

ANTS/DPX-Leakage Assays

Leakage-Experimente an BsrG-Mutanten wurden, wie in Kapitel 3 beschrieben, analog zum Wildtyp in POPE:POPG (2:1)-Vesikeln mit einem P:L-Verhältnis von 1:50 durchgeführt. Mit diesem P:L-Verhältnis konnte für BsrG-wt ein deutliches Leakage nachgewiesen werden. Zusätzlich liegt das P:L von 1:50 noch im linearen Bereich der für BsrG-wt ermittelten Abhängigkeit von P:L-Verhältnis und Stärke des Leakage (Kaptel 4.2.4, Abb. 4.14).

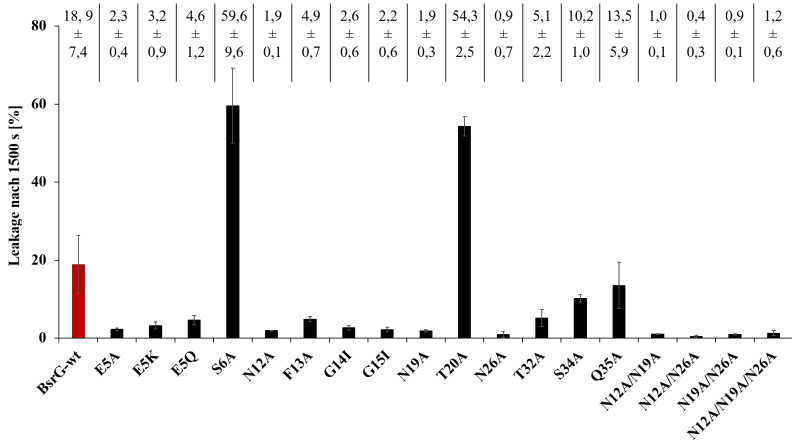


Abbildung 4.22: Ergebnisse der ANTS/DPX-Leakage-Experimente in POPE:POPG (2:1) mit einem P:L von 1:50. Der Wildtyp ist rot gefärbt. Mit Ausnahme der C-terminalen Mutanten nehmen alle Mutationen einen erheblichen Einfluss auf das Leakageverhalten. Die beiden Mutanten S6A und T20A zeigen ein deutlich stärkeres Leakage, alle anderen Mutanten lassen ein massiv reduziertes Leakage beobachten.

Während die eingeführten Mutationen keinen gravierenden Effekt auf die Sekundärstruktur oder die Orientierung der Mutanten in der Membran erkennen ließen, bedingen fast alle Mutationen eine massive Änderung des Leakage-Verhaltens. Mit Ausnahme der C-terminalen Mutationen, welche nicht in der TMD liegen, sowie von S6A und T20A, zeigt sich für alle Mu-

tanten eine drastische Reduzierung des Leakage.

Der deutlichste Effekt zeigt sich bei den Doppel- und Dreifach-Asparagin-Mutanten, welche nahezu kein Leakage mehr verursachen. Die Mutanten, welche unter Berücksichtigung der Standardabweichung ein Leakage unter 2 % bedingen, sind E5A, N12A, G15I, N19A, N26A, N12A/N19A, N12A/N26A, N19A/N26A und N12A/N19A/N26A. Damit scheinen die einzige negativ geladene AS E⁵, das am Interface positionierte G¹⁵ sowie die AS des postulierten H-Zippers N¹², N¹⁹ und N²⁶ für die porenbildende Funktion von BsrG entscheidend zu sein. Trotz allem zeigt sich auch - mit Ausnahme der Mutanten S6A und T20A - eine starke Reduktion des Leakage für die meisten anderen Mutanten. Interessanterweise zeigen Mutationen an S⁶ und T²⁰ ein gegenläufiges Verhalten. Diese beiden Positionen befinden sich vom postulierten Dimer-Interface abgewandt und zeigen ein erheblich stärkeres Leakage von $59,6 \pm 9,6 \%$ bzw. $54,3 \pm 2,5 \%$.

MIC-Tests

Die antimikrobielle Wirkung der Mutanten wurde gegen *B. subtilis* DSM 347 getestet. Abb. 4.23 zeigt exemplarisch eine Mikrotiterplatte zweier Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Interessanterweise konnte für alle Mutanten die gleiche MIC von $64 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ wie für den Wildtyp ermittelt werden (Tabelle 4.6). Die Mutationen scheinen zwar einen massiven Einfluss auf das Leakageverhalten zu haben, aber nicht deren antimikrobielle Wirkung zu beeinflussen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Leakage nicht alleine für die toxische Wirkung von BsrG-wt verantwortlich ist.

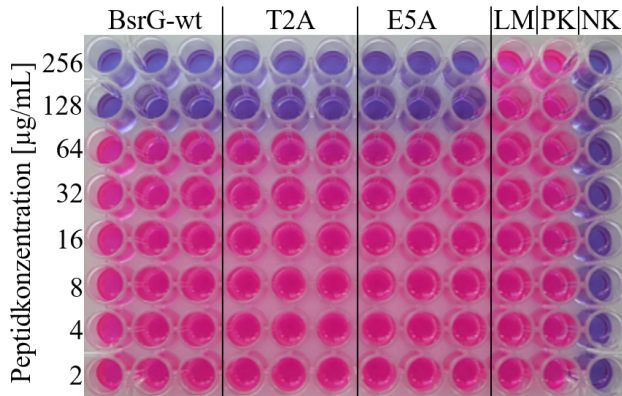


Abbildung 4.23: Beispiel einer Mikrotiterplatte mit BsrG-wt, T2A und E5A gegen *B. subtilis*. Die Mikrotiterplatten zur Untersuchung der anderen Mutanten wurden analog befüllt, inklusive LM, PK und NK. Die jeweiligen Konzentrationen der einzelnen *wells* sind links neben der Mikrotiterplatte angegeben. In der Spalte LM ist das verwendete Lösungsmittel aufgetragen, was im Fall von BsrG-wt 100 % EtOH entspricht. Die Positivkontrolle (PK) beinhaltet keine Proteinzusätze. Um eine Kontamination des eingesetzten Mediums auszuschließen diente die letzte Spalte als Negativkontrolle (NK) ohne Bakterienzusatz. Für BsrG-wt und alle Mutanten wurde eine MIC von $64 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ ermittelt.

	BsrG-wt	T2A	E5A	E5K	E5Q	S6A
MIC [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	64	64	64	64	64	64
	N12A	F13A	G14I	G15I	N19A	T20A
MIC [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	64	64	64	64	64	64
	N26A	T32A	S33A	S34A	Q35A	
MIC [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	64	64	64	64	64	
	N12A/N19A	N12A/N26A	N19A/N26A	N12A/N19A/N26A		
MIC [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	64	64	64	64		

Tabelle 4.6: Ergebnisse der MIC-Tests. Alle Mutanten zeigen eine moderate Aktivität gegen *B. subtilis* DSM 347 mit einer MIC von 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.4 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

In Tabelle 4.7 sind die ermittelten Struktur- und Funktionsdaten zusammenfassend aufgelistet. In Spalte zwei (Helizität) sind die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse angegeben. Abweichungen von der Helizität des Wildtyps größer 5 % sind rot hervorgehoben. Die ermittelten Orientierungen in der Membran sind in Spalte drei (Orientierung) symbolisch dargestellt. Aufrechte Helices stehen für eine bessere Rekonstitution (positiver Wert bei 208 nm) im Vergleich zum Wildtyp. Alle Mutanten und der Wildtyp besitzen eine transmembrane Orientierung, teilweise mit leicht geneigter Ausrichtung. Ergebnisse der SDS-Gele sind in Spalte vier (Assemblierungsverhalten) zusammengefasst. Das Auftreten von Oligomeren wird mit O, von Dimeren mit D und von Monomeren mit M angezeigt. Monomere sind rot hervorgehoben. In der fünften Spalte (Leakage) sind die Werte des Leakage angegeben. Ein Leakage von unter 2 % unter Berücksichtigung der Standardabweichung ist rot markiert. Ein Leakage über 50 % ist zusätzlich unterstrichen. In Spalte sechs (MIC) sind die MIC angegeben. Alle CD-, OCD- und Leakage-Experimente wurden in POPE:POPG (2:1) mit einem P:L von 1:50 durchgeführt.

4.4 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

	Helizität (CD)	Orientierung (OCD)	Assemblierung (SDS-PAGE, ToxR)	Leakage [%] (nach 1500 s)	MIC [$\mu\text{g/mL}$] (<i>B. subtilis</i>)
BsrG-wt	52 %		D	18,9 ± 7,4	64
T2A	-		D	-	64
E5A	41 %		D	2,3 ± 0,4	64
E5K	49 %		D	3,2 ± 0,9	64
E5Q	45 %		O	4,6 ± 1,2	64
S6A	57 %		D	59,6 ± 9,6	64
N12A	50 %		O	1,9 ± 0,1	64
F13A	44 %		D	4,9 ± 0,7	64
G14I	54 %		O	2,6 ± 0,6	64
G15I	50 %		O	2,2 ± 0,6	64
N19A	50 %		O, schwacher Effekt im ToxR-Assay	1,9 ± 0,3	64
T20A	50 %		O	54,3 ± 2,5	64
N26A	-		O	0,9 ± 0,7	64
T32A	53 %		O	5,1 ± 2,2	64
S33A	-	-	D	-	64
S34A	50 %		D	10,2 ± 1,0	64
Q35A	51 %		D	13,5 ± 5,9	64
N12A/N19A	46 %		D + M	1,0 ± 0,1	64
N12A/N26A	46 %	-	D + M	0,4 ± 0,3	64
N19A/N26A	43 %		D + M	0,9 ± 0,1	64
N12A/N19A/N26A	44 %		D + M	1,2 ± 0,6	64

Tabelle 4.7: Zusammenfassung der Struktur- und Funktionsdaten.

5 Diskussion

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Typ I Toxins BsrG aus *B. subtilis* und im Rahmen dessen die Prüfung der in Kapitel 1.4 aufgestellte H-Zipper-Hypothese. Für das Vorgehen ergaben sich verschiedene Fragestellungen:

- Besitzt BsrG eine α -helikale Sekundärstruktur?
- Nimmt es eine transmembrane Orientierung ein?
- Weist BsrG es eine porenbildende Funktion auf?

Für nahezu alle Typ I Toxine werden diese Fragen mit „ja“ beantwortet. Eine porenbildende Funktion setzt voraus, dass BsrG nicht monomer in der Membran vorliegt. Umgekehrt argumentiert: bildet BsrG ein stabiles Dimer oder höhere Oligomere in der Membran, dann könnte es auch eine porenbildende Funktion aufweisen. Wie in Kapitel 1.4 dargelegt, würde eine parallele Anordnung der Helices hoch spezifische Helix-Helix-Interaktionen ermöglichen. In Bezug auf die H-Zipper-Hypothese ergeben sich damit zwei weitere Fragen:

- Kann BsrG ein Dimer oder höhere Oligomere bilden?
(Selbstassemblierung)
- Wenn ja, besitzt ein Dimer dann eine parallele Anordnung?

Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurden die in Abb. 5.1 Methoden und Techniken angewandt.

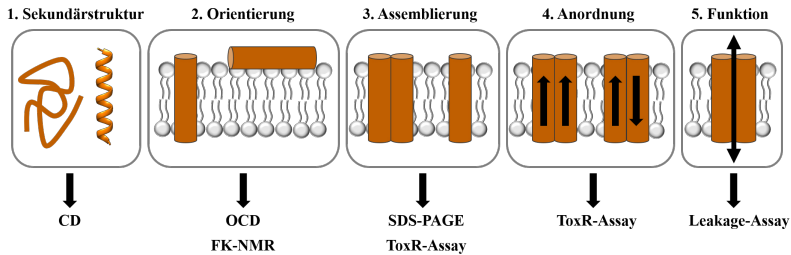


Abbildung 5.1: Fragestellungen zur Charakterisierung von BsrG und der damit einhergehenden Prüfung der H-Zipper-Hypothese. Die eingesetzten Methoden zur Struktur- und Funktionsanalyse sind unterhalb der jeweiligen Graphik angezeigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Protokoll zur rekombinanten Proteinbiosynthese und der damit erforderlichen Aufreinigung erstellt. Das Toxin BsrG konnte somit erstmals erfolgreich und in hoher Reinheit hergestellt werden.

Der hydrophobe Charakter der AS-Sequenz von BsrG erschwerte die Probenpräparation und Rekonstitution des Proteins in Modellmembranen erheblich. Erste Versuche, das Protein in gängige PC-Lipide zu rekonstituieren sind häufig fehlgeschlagen und resultierten in einem hohen Aggregationsanteil in den Spektren. Eine erfolgreiche Rekonstitution gelang in dem Lipid-System POPE:POPG (2:1), was BsrG zur Untersuchung mittels biophysikalischer Messmethoden wie CD, OCD, FK-NMR und Fluoreszenzmessungen zugänglich machte. Darüber hinaus ist die POPE:POPG-Modellmembran gut als adäquate Imitation der natürlichen Membran von *B. subtilis* zu verteidigen [188].

1. BsrG besitzt eine α -helikale Sekundärstruktur

Erste CD-Messungen von BsrG in DPC-Detergenzmizellen konnten einen α -helikalen Anteil von 60 % ermitteln. Dieser Anteil entspricht 23 AS und damit genau der mit den Programmen TMpred, SOSUI und TMHMM vorhergesagten Länge der TMD. Der Helixanteil in POPE:POPG (2:1) war mit 52 % um knapp eine Helixwindung geringer als in DPC. Ein größerer Helixanteil in Mizellen im Vergleich zu Lipiden kann dadurch erklärt werden, dass sich Mizellen im Gegensatz zu Lipidschichten an die Helix anpassen können, wohingegen das Gegenteil bei Lipidschichten der Fall ist: hier passt sich eher die Helix an, was im Fall von BsrG die Differenz der 3 AS erklären könnte. Die nach Marsh *et al.* kalkulierte Membrandicke von POPE:POPG (2:1) beträgt 28,31 Å, was einer 19 AS langen α -Helix entspricht [189]. Die ermittelte Helixlänge (20 AS in POPE:POPG (2:1)) und Membrandicke des Modellsystems sind somit in guter Übereinstimmung mit den gemessenen Werten.

Bei anderen Membranproteinen, wie zum Beispiel E5 und PDGFR- β , wird ein ähnlicher Effekt für die Rekonsitution in Mizellen und Lipiden beobachtet [75, 186].

Ein weiterer interessanter Aspekt der quantitativen Sekundärstrukturanalyse ist, dass es neben dem α -helikalen Anteil kein weiteres vorherrschendes Strukturelement gibt. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die TMD alleine eine funktionelle Eigenschaft aufweist, nicht aber die aus der Membran herausstehenden Bereiche.

2. BsrG besitzt eine transmembrane Orientierung

In ersten Veröffentlichungen über BsrG konnte das Protein in Membrannähe lokalisiert werden, was aufgrund seiner hydrophoben AS-Sequenz plausibel ist [69]. Die in dieser Arbeit durchgeführten FK-NMR und OCD-Messungen konnten für BsrG unabhängig voneinander eine transmembrane Orientierung mit leicht geneigter Ausrichtung ermitteln.

Wie unter Punkt Eins beschrieben stimmen die Länge der TMD sowie die dicke der POPE:POPG (2:1)-Membran überein. Dennoch ist es eher überraschend, dass eine Helix mit mehreren polaren Resten aufrecht in der Membran steht und nicht oberflächengebunden vorliegt. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, könnte eine aufrechte Orientierung aus einer Dimerisierung resultieren, die durch diese polaren AS vermittelt wird und wodurch die polaren AS von der hydrophoben Umgebung der Membran abgeschirmt werden.

3. BsrG bildet SDS-stabile Dimere

Die Vermutung, dass BsrG als Dimer vorliegen könnte, wurde per SDS-PAGE bestätigt. Selbst unter stark denaturierenden Bedingungen erscheint das Protein nur als Dimer im SDS-Gel und zeigt weder das Auftreten von Monomeren, noch von höheren Oligomeren. Dieser Befund unterstützt die Vermutung, dass die Helix-Helix-Interaktionen im BsrG-Dimer hoch spezifisch sind. An dieser Stelle sei auf das Protein GpA verwiesen, welches ebenfalls SDS-stabile Dimere ausbildet und auch nur als Dimer im SDS-Gel erscheint [190]. GpA wurde in den durchgeführten ToxR-Assays als Positivkontrolle eingesetzt.

4. BsrG besitzt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine parallele Anordnung

Die Tendenz zur Selbssassemblierung in Membranen lebender *E. coli* Bakterien ist für BsrG vergleichbar bzw. stärker ausgeprägt als die der parallelen dimeren Proteine GpA und E5. Aufgrund des Designs der ToxR-Konstrukte müssen die BsrG-Helices bei der Assemblierung eine parallele Anordnung aufweisen, da nur diese Anordnungen detektiert werden kann. Antiparallele Anordnungen können beim ToxR-Assay nicht detektiert werden. Dass antiparallele Anordnungen vorliegen wäre zwar denkbar, aber unwahrscheinlich, da die Zellen das ToxR-Konstrukt dann nicht einheitlich in die Membran integrieren würden.

Da der C-Terminus von BsrG durch die drei Lysine K³⁶, K³⁷ und K³⁸ stark positiv geladen ist und sich zusätzlich direkt davor eine Art polare Krone

aus den AS T³², S³³, S³⁴ und Q³⁵ bildet, wurde eine parallele Anordnung bereits vermutet, da die positiven Ladungen und polaren Reste entsprechend der *positive inside*-Regel schwer an den negativ geladenen Lipidkopfgruppen der bakteriellen Membran vorbei gleiten werden.

Im Rahmen der Forschungsaktivitäten an BsrG (Arbeitskreis Ulrich, KIT) wurden bereits erste Versuche unternommen, dieses mittels FRET-Messungen zu untersuchen, um eine genaue Aussage über den oligomeren Zustand und die Anordnung der Helices zu erhalten. Eine Modifikation des Peptids führte allerdings zu forciertem Aggregationsverhalten, sodass keine Messungen möglich waren. Ein anderer Ansatzpunkt für weiterführende Arbeiten könnte der ToxR-Assay ähnliche BLaTM-Assay sein, welcher auf einem Split-Beta-Lactamase Prinzip basiert und ein eindeutiges Ergebnis bezüglich der Anordnung liefern könnte [191].

5. BsrG bewirkt ein Leakage

Fast ausschließlich alle Typ I Toxine weisen eine poren- oder ionenkanalbildende Funktion auf und greifen so unter anderem in die ATP-Synthese ein. Mittels ANTS/DPX-Leakage-Assays konnte nachgewiesen werden, dass BsrG POPE:POPG (2:1)-Vesikel - die *per se* dicht sind - zum Auslaufen bringen kann und dabei eine lineare Abhängigkeit von Proteinkonzentration und Stärke des Leakage beschreibt. BsrG besitzt folglich die Fähigkeit analog zu anderen Typ I Toxinen ein Auslaufen der Zelle zu bedingen. Insgesamt ist der Effekt des Leakage mit $18,9 \pm 7,4\%$ für ein P:L von 1:50 im Vergleich zu porenbildenden antimikrobiellen Proteinen wie GS oder PGLa/Magainin ungewöhnlich schwach ausgeprägt [5].

Diese Forschungsergebnisse stimmen nicht mit dem publizierten Befund von Jahn *et al.* überein, in welchem BsrG eine poren- und ionenkanalbildende Funktion abgesprochen wird [69]. Woraus diese Diskrepanz resultiert, kann nur vermutet werden. Zum einen ermöglichen *in vivo* Experimente, wie sie in der genannten Publikation durchgeführt wurden, keine Kontrolle über das P:L-Verhältnis, sodass ein nicht beobachtetes Leakage durch eine

geringe BsrG-Konzentration in der Zelle bedingt sein könnte. In den hier vorgestellten ANTS/DPX-Leakage-Experimenten wurde beispielsweise ein kaum wahrnehmbarer Effekt von gerade mal 1,5 % nach 5 min bei einem P:L-Verhältnis von 1:200 beobachtet. Ein weiterer Grund dafür, dass *in vivo* keine Porenbildung beobachtet werden konnte, könnte dadurch bedingt sein, dass BsrG nur unter bestimmten Umständen ein Leakage induziert.

In Hinblick auf die SDS-stabilen Dimere könnte vermutet werden, dass sich mehrere Dimere als Pore zusammenlagern und ein höheres Oligomer ausbilden, das aber nicht SDS-stabil ist. Native-Gele oder EM/AFM-Messungen könnten zur Beantwortung dieser Frage im Rahmen weiterführender Forschungen an BsrG beitragen. Dass BsrG aber generell die Fähigkeit besitzt eine Pore auszubilden oder die Barrierefunktion der Membran durch Leckschlagung oder anderweitig zu zerstören, konnte in dieser Arbeit unter kontrollierten Bedingungen nachgewiesen werden.

In Übereinstimmung mit bisherigen Veröffentlichungen konnte für BsrG ein toxischer Effekt mittels MIC-Tests nachgewiesen werden. BsrG besitzt eine moderate antimikrobielle Aktivität gegen die drei getesteten Stämme *B. subtilis* DSM 347, *K. rhizophila* DSM 348 sowie *S. xylosus* DSM 20267. Für alle drei Stämme wurde eine MIC von $64 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ ermittelt. Daraus lässt sich schließen, dass BsrG leicht durch die Peptidoglykanschicht dieser Gram-positiven Bakterien translozieren kann. Interessanterweise konnte aber keine hämolytische Aktivität für BsrG festgestellt werden, was es für Antibiotikaforschungen interessant machen könnte.

Aus dem insgesamt sehr schwach ausgeprägten Leakage-Effekt resultierte die Frage, ob das Leakage alleine bzw. generell für den toxischen Effekt dieses Proteins verantwortlich ist.

MIC-Tests mit Mutanten, welche kein Leakage mehr bedingen können, zeigten dieselbe toxische Wirkung wie der Wildtyp, woraus geschlossen werden kann, dass nicht das Leakage den Zelltod bewirkt, sondern BsrG ein anderes Ziel in der Membran haben könnte. In Publikationen über

BsrG wurden als Folge der Expression von BsrG Einstülpungen der zytoplasmatischen Membran festgestellt, welche wiederum die Delokalisierung verschiedener Komponenten der Zellwand-Synthese-Maschinerie wie beispielsweise des bakteriellen Aktin-Homologons MreB bedingen und wodurch letztlich die Autolyse der Zelle getriggert werden könnte [69].

Analyse wichtiger AS der TMD

Um das Dimerisierungsmotiv von BsrG aufzuschlüsseln wurden 20 Substitutionsmutanten hergestellt. Wie in Kapitel 1.3 dargelegt, sind einzelne polare AS - darunter oft Serin und Threonin - häufig Teil eines Dimerisierungsmotivs und tragen über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierend zur Dimerbildung bei. Lear *et al.* konnten darüber hinaus demonstrieren, dass die Stärke der Oligomerisierung eines Proteins mit einem Asparagin in der TMD durch ein zweites Asparagin im Abstand von 7 AS (also als Heptade angeordnet) potenziert werden kann [90]. In BsrG befinden sich gleich drei heptadisch angeordnete Asparagine an den Positionen 12, 19 und 26.

Um den Einfluss der eingeführten Mutationen auf die Struktur und Orientierung in der Membran zu überprüfen, wurden die Mutanten analog zum Wildtyp mittels CD- und OCD-Experimenten in POPE:POPG (2:1) mit einem P:L von 1:50 untersucht. Wie im Ergebnisteil dargelegt, besitzen alle Mutanten eine α -helikale Sekundärstruktur sowie eine transmembrane Orientierung, teilweise mit leicht geneigter Ausrichtung. Keine der Mutationen hat eine gravierende Änderung der Struktur bedingt, lediglich die Substitution der Glutaminsäure an Position 5 durch hydrophobes Alanin zeigte eine Reduzierung des Helixanteils um 11 %. Ein leichter Effekt konnte für die Doppel- und Dreifach-Asparagin-Mutanten festgestellt werden, welche eine Reduzierung des Helixanteils um 6 - 9 % bedingen und die Vermutung bekräftigen, dass die Asparagine eine besondere Rolle in BsrG zu spielen scheinen.

Dagegen scheint es zwischen der Position der eingeführten Mutation und der Orientierung keine Korrelationen zu geben. Die Mutanten weisen wie der Wildtyp eine transmembrane Orientierung mit leicht geneigter Ausrichtung oder eine vollständige Transmembranorientierung auf.

ToxR-Assays wurden nur mit den Einzel-Substitutionsmutanten N12A, F13A, G14I, N19A und T20A durchgeführt. Lediglich die Mutation der zentral in der TMD gelegenen N¹⁹ - eine der AS des H-Zippers - konnte ein leicht reduziertes Assemblierungsverhalten aufzeigen. Diese Tatsache ist unter der Annahme, dass gleich drei heptadisch angeordnete Asparagine eine Dimerisierung bedingen, nicht verwunderlich und unterstreicht gleichzeitig die bereits ermittelte starke Triebkraft der Assemblierung. Diese Ergebnisse stimmen auch in umgekehrter Argumentation mit den Befunden von Lear *et al.* überein: ein zweites Asparagin im Abstand von sieben AS potenziert eine Dimerisierung. Folglich ist es nicht überraschend, dass eine Dimerisierung nach der Mutation eines einzelnen Asparagins durch die zwei noch vorhandenen Asparagine aufrecht erhalten werden kann. Dass eine Mutation von N¹⁹ stärker ins Gewicht fällt als eine Mutation von N¹², kann dadurch bedingt sein, dass bei N19A eine Heptade übersprungen wird und dadurch eine Lücke zwischen zwei Asparaginen entsteht. Weiterführende ToxR-Assay-Untersuchungen mit Doppel- und Dreifach-Asparagin-Mutanten wären in diesem Zusammenhang besonders interessant.

Im SDS-Gel zeigen dagegen einige Mutationen ein anderes Verhalten als der Wildtyp. Davon ausgenommen sind Mutationen C-terminaler Positionen, wie der AS S³³, S³⁴ und Q³⁵, welche nicht in der TMD liegen, sondern eine Art polare Krone vor den drei positiv geladenen Lysinen bilden und im Gel wie der Wildtyp als Dimer erscheinen.

Mutationen einzelner polarer AS sowie der Glycine, die innerhalb der TMD liegen, zeigen Oligomere im SDS-Gel. Die Tatsache, dass schon kleine Änderungen an einer einzelnen Position in einer Änderung des dimeren Zustands resultiert, zeigt, dass die AS-Sequenz von BsrG sehr fein abgestimmt ist und bekräftigt die Vermutung, dass die Wechselwirkungen in BsrG hoch

spezifisch sind. Ob diese Veränderungen nur dann beobachtet werden, wenn die polaren AS der TMD oder die kleinen Glycine ausgetauscht werden oder auch bei Substitutionen hydrophober AS der TMD auftreten, könnte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Festzuhalten bleibt, dass eine Einfachmutation der kleinen Glycine sowie der polaren AS Asparagin oder Threonin eine Oligomerisierung und die Bildung von Aggregaten zu bewirken scheint.

Interessanterweise resultiert eine Einfachmutation der Asparagine in der Bildung höherer Oligomere, wohingegen bei Doppel- und Dreifach-Asparagin-Mutanten ein gegenläufiger Effekt beobachtet wird, nämlich das Aufbrechen der SDS-stabilen Dimere, was sich an der Monomerbande des SDS-Gels zeigt. Diese Tatsache bekräftigt die wichtige Rolle der Asparagine bei der Dimerisierung von BsrG. Als Kernelement des postulierten H-Zippers scheinen die Asparagine tatsächlich das Dimerinterface von BsrG zu formen (Abb. 5.2).

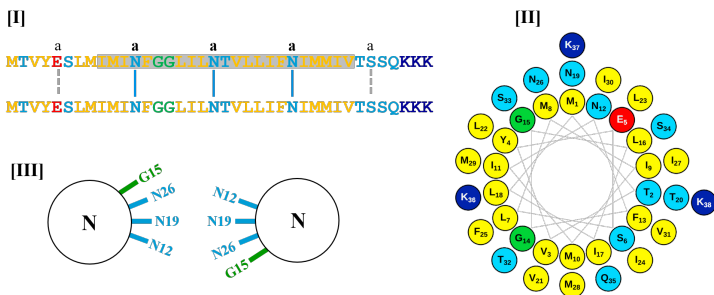


Abbildung 5.2: [I] Die drei in der AS-Sequenz als Heptade angeordneten Asparagine an den Positionen 12, 19 und 26 (a-Positionen) sind leiterförmig angeordnet (III) und essentiell für die Bildung eines stabilen Dimers. [III] Schematische Ansicht des H-Zippers mit Blick vom N-Terminus.

Wie bereits erwähnt hat eine Einfachmutation eines der Asparagine keine großen strukturellen Änderungen verursacht. Dagegen ließ sich ein Effekt bei den Doppel- und Dreifach-Asparagin-Mutanten beobachten: hier wurde ein

reduzierter Helixanteil im Vergleich zum Wildtyp ermittelt. Auch wenn diese Reduktion gerade 6 % beträgt, könnte die kürzere Helixlänge eventuell nicht mehr ausreichen, um ein Dimer zu bilden, da der helikale Bereich eventuell nicht mehr ausreicht, um die 14 AS getrennten Asparagine (N¹², N¹⁹, N²⁶) im heptadenmotiv leiterförmig untereinander anzuordnen bzw. an die für die Dimerisierung notwendige Stelle zu bringen.

Das Auftreten höherer Oligomere im SDS-Gel korreliert auf den ersten Blick nicht mit der Stärke des Leakage, da für höhere Oligomere auch ein stärkeres Leakage erwartet werden könnte. Tatsächlich zeigen alle Einzelsubstitutionsmutanten von AS, die im oder in der Nähe des postulierten H-Zippers liegen, ein deutlich reduziertes Leakage, trotz höherer Oligomere im SDS-Gel. Daraus lässt sich schließen, dass die Oligomere im SDS-Gel nicht spezifisch sind, sondern dass es sich dabei um unspezifischen Aggregate handelt.

Eine interessantes Phänomen tritt bei den Mutanten S6A und T20A auf, also den beiden polaren AS, die vom H-Zipper wegzeigen. Eine Mutation dieser polaren AS resultiert in einem deutlich stärkeren Leakage. S⁶ und T²⁰ scheinen also die Ausprägung des Leakage in BsrG Wildtyp zu drosseln. Warum dies der Fall ist, kann bislang nicht erklärt werden und könnte Ansatzpunkt für weitere Forschungen und Untersuchungen einer S6A/T20A Doppel-Mutante sein.

Alle vier Mehrfach-Asparagin-Mutanten zeigten in Übereinstimmung dazu nahezu kein Leakage mehr.

Diese Befunde bestätigen die aufgestellte H-Zipper-Hypothese. Aufgrund der α -helikalen Struktur, der transmembranen Orientierung, der Ausbildung eines parallelen Dimers und der Fähigkeit ein Leakage zu induzieren, kann in Kombination mit den Mutationsexperimenten angenommen werden, dass zwei BsrG-Proteine einen H-Zipper ausbilden. BsrG weist demnach ein bisher unbekanntes Dimerisierungsmotiv auf, das aus der leiterförmigen

Anordnung heptadisch angeordneter polarer AS besteht. Eine graphische Darstellung des nachgewiesenen H-Zippers ist in Abb. 5.3 dargestellt.

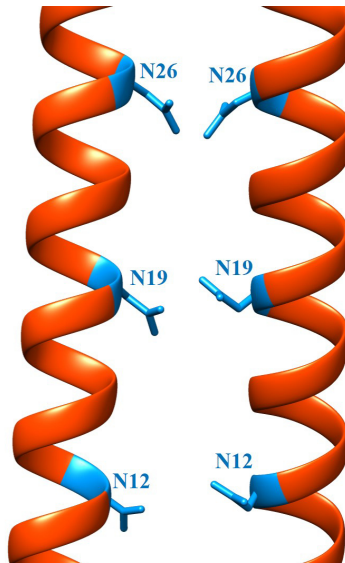
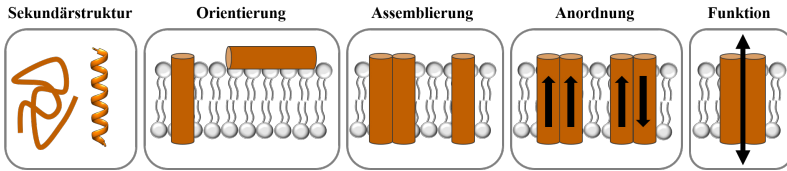


Abbildung 5.3: Graphische Darstellung des H-Zippers. Zwei parallel angeordnete Helices bilden spezifische interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen aus und stabilisieren so das Dimer in der Membran. Das Kernelement des H-Zippers bilden drei heptadisch angeordnete Asparagine.

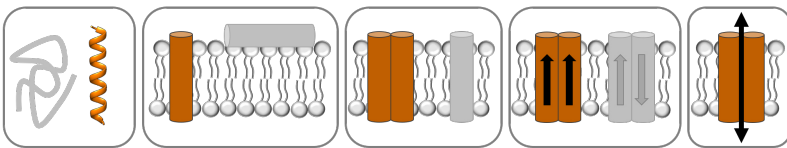
6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Toxin BsrG aus *B. subtilis* erstmals rekombinant hergestellt und mittels biophysikalischer Methoden wie CD-, OCD-, FK-NMR und Fluoreszenzmessungen sowie mikrobiologischer Techniken wie ToxR-Assays und MIC-Tests strukturell und funktionell untersucht. Für BsrG wurde sowohl eine α -helikale Sekundärstruktur als auch eine transmembrane Orientierung nachgewiesen. Weiterhin kann BsrG ein Leakage induzieren, was es zusammen mit seiner α -helikalen Struktur und transmembranen Orientierung als typisches Typ I Toxin charakterisiert. Durch SDS-PAGE und Mutationsexperimente mit 20 BsrG-Mutanten konnte dargelegt werden, dass BsrG über ein polares AS-Motiv dimerisiert und dabei sehr wahrscheinlich eine parallele Anordnung aufweist. Dieses Dimerisierungsmotiv ist hoch spezifisch und beinhaltet als Kernelement drei heptadisch angeordnete Asparagine, welche essentiell für die Aufrechterhaltung des dimeren Zustands und der damit verbundenen Funktion ein Leakage zu induzieren sind. Dieses bisher unbekannte Strukturmotiv wurde als H-Zipper vorgestellt.

Fragestellungen:



Ergebnisse:

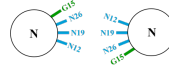
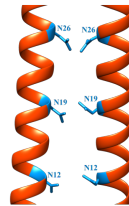


Fazit:

BsrG ist ein typisches Typ I Toxin:

- α -helikale Sekundärstruktur
- transmembrane Orientierung
- porenbildende Funktion

↑
paralleles Dimer
↓



BsrG besitzt ein bisher unbekanntes Dimerisierungsmotiv: H-Zipper

- paralleles Dimer ermöglicht spezifische Helix-Helix-Wechselwirkungen gegenüberliegender leiterförmig angeordneter polarer AS
- drei Asparagine im Heptadenmotiv als Kernelement des H-Zippers (N¹², N¹⁹, N²⁶)

Abbildung 6.1: Charakterisierung von BsrG als Typ I Toxin und H-Zipper.

A Materialien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien

- Aluminiumfolie (Roth)
- Autoklavierband (Comply Indicator Tape, 3M)
- Blotting Papier Gel-Blotting-Papier (Schleicher und Schuell)
- Centricons: Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten, 3 kDa (Merck)
- Deckgläser (7,5 × 12 mm) (Marienfeld)
- Dialysemembran Zellutrans V-Serie 2, kDa MWCO (Roth)
- Einmal-Nitrilhandschuhe (VWR)
- Einmal-Spritzen 1 ml, 10 ml, 20 ml (Inject, B. Braun)
- Einmal-Spritzenfilter steril 0,22 µm (Roth)
- Einmal-Spritzenfilter PDVF unsteril 0,45 µm (Roth)
- Falcon-Tubes 15 ml, 50 ml (Sarstedt)
- Halbmikrokuvetten 1 ml (Sarstedt)
- LoBind®Mikroreaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf)
- Mikroreaktionsgefäße: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf)
- Mikrotiterplatten, 24-wells, 96-wells (Sarsted, flat bottom)
- Nitrocellulosemembran (Whatman)
- Parafilm (Laboratory film, American National Can)
- Pasteur-Pipetten (WU Mainz)
- Petrischalen (Sarstedt)
- Pipettenspitzen 1 ml, 200 µm, 10 µm (Sarstedt) 5 ml (Finnpipette)
- Polycarbonatmembran 100 nm (Whatman)
- Quarzküvetten, 2 ml (Hellma 101 QS Hellma Analytics)
- Rundfilter für Extruder 10 mm (Avanti®Polar Lipids Inc.)
- Rundfilter 90, 150 mm (Whatman, VWR)
- Wägeschälchen Rotilabo-Einmal-Wägeschälchen (Roth)
- Wägepapier MN, 226 (Macherey-Nagel)

Chemikalien

- 2-Mercaptoethanol (Fluka)
- 6-Aminocapronsäure (Roth)
- 8-Aminonaphthalin-1,3,6-Trisulfonäure (Invitrogen)
- Aceton (Merck)
- Acetonitril (Fisher Scientific)
- Acrylamid (Roth)
- Agar (Roth)
- Agarose, *low gelling* Sigma-Aldrich
- Agarose (Sigma)
- Aluminiumsulfat Hexadecahydrat (Roth)
- Ammoniumchlorid (Fluka)
- Ammoniumchlorid (¹⁵N-markiert; Spectra Stable Isotopes)
- Ammoniumpersulfat (Roth)
- Ammoniumsulfat (¹⁵N-markiert; Spectra Stable Isotopes)
- Ammoniumsulfat (Acros Organic)
- BICP/NBT (Invitrogen)
- Bromphenolblau (Merck)
- Calciumchloriddihydrat (Roth)
- CASO-Medium (Roth)
- Chloramphenikol
- Chloroform (Roth)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (SERVA)
- D(+)-Maltose Monohydrat (Roth)
- Dikaliumhydrogenphosphat (AppliChem)
- Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)
- Dinatriumhydrogenphosphat (AppliChem)
- Dinatriumpiperazin-1,4-diethansulfonat (Sigma-Aldrich)
- Deoxycholsäure-Na-Salz (Roth)
- Dinatriumhydrogenphosphat (AppliChem)
- Essigsäure (Roth)
- Ethanol (Merck)
- Ethylendiamintetraessigsäure (Fluka)
- Glucose (Fluka)
- Glycerin (Roth)
- Ethanol (Roth)
- Hefeextrakt (AppliChem)
- Imidazol (Roth)
- Iso-Propanol (Fisher Scientific)
- Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (Roth)
- Kaliumdihydrogenphosphat (Roth)

-
- Kaliumsulfat (Roth)
 - Kanamycin (AppliChem)
 - L(+)-Arabinose (Roth)
 - L-Rhamnose (New England BioLabs)
 - Magnesiumchloridhexahydrat (Sigma-Aldrich)
 - Methanol (Fisher Scientific)
 - Milchpulver (Roth)
 - Müller Hinton-Medium (Mast Group Ltd.)
 - Natriumazid (Roth)
 - Natriumchlorid (Roth)
 - Natriumdihydrogenphosphat (AppliChem)
 - Natriumdodecylsulfat (AppliChem)
 - Natriumhydroxid (Merck)
 - Natriumlauroylsarkosin (Fluka)
 - n-Dodecylphosphocholin (Avanti@Polar Lipids, Inc.)
 - Nickel-Nitriolotriessigsäure (Quiagen)
 - o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (Roth)
 - Phosphorsäure, 85 % (Roth)
 - p-Xylol-bis(N-Pyridiniumbromid) (Invitrogen)
 - Resazurin (Sigma-Aldrich)
 - Saccharose (Sigma-Aldrich)
 - Salzsäure (Roth)
 - Sephacryl 100HR (Sigma-Aldrich)
 - SOC-Medium (New England BioLabs)
 - Stickstoff (Messer Griesheim)
 - Tetramethylethyldiamin (Roth)
 - Thiamin-Hydrochlorid (AppliChem)
 - Tricin (AppliChem)
 - Trifluoressigsäure (Roth)
 - Trifluorethanol (Acros)
 - Tris-Hydrochlorid (Roth)
 - Trypton (Roth)
 - Tris (Roth)
 - Tris-Hydrochlorid (Roth)
 - TritonX-100 (Sigma-Aldrich)
 - bidest. Wasser (Millipore)
 - Tween 20 (Roth)

Lipide	Hersteller: Avanti®Polar Lipids, Inc.
DEiPC	1,2-Dieicosenoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DErPC	1,2-Dierucoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DPPG	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
Rhod-PE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N- (lissamin rhodamin B sulfonyl)
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-3-phosphocholin
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac glycerol)

Geräte

Autoklav

- VX-95 (Systec)
- 2540 EL (Systec)

Avanti Mini-Extruder Avanti Polar Lipids, Alabama, USA

Brutschrank Incucell, MMM Medcenter, Einrichtungen

Geldokumentationssystem Vilber Lourmat

Geldokumentationssystem (Photo-Print) P91, Mitsubishi

Gelelektrophorese Vorrichtungen:

- Agarose: PerfectBlue, PEQLAB Biotechnologie
- SDS-PAGE: Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad

Heizblock (Wealtec Corp., HB-2)

HPLC (Jasco Industries) bestehend aus:

-
- 2 Pumpen 2087-PU
 - Hochdruckmischer 2080-DHD
 - Säulentermostat CO-200
 - Diodenarray-Detektor MD-2010
 - Steuerbox Jasco-LC-Net II
 - manueller Injektor Rheodyne
 - HPLC-Säule: PerfectSil Vydac Semi-Prep, C4 5 μm , 250 \times 10 mm

Inkubationsschüttler:

- G25 (New Brunswick Scientific GmbH)
- Innova 44 (New Brunswick Scientific GmbH)

Kühlschränke:

- 4 °C bzw. -20 °C (Siemens)
- -80 °C (Forma 900 Series, Thermofisher Scientific)

Lyophilisator:

- Alpha I-6 (Christ)
- Alpha 2-4 LD (Christ)

Magnetrührer mit Heizplatte (RCT, IKA Labortechnik)

MALDI-TOF Massenspektrometer Autoflex III (Bruker Daltonics)

Mikrowelle M1712 N, Samsung

NMR-Spektrometer Avance, 600 MHz (Ultrashield) Wide Bore (Bruker Biospin)

NMR Probenköfe:

- HXY Triple Resonance, statisch, austauschbare Spule (Bruker Biospin)
- LowE Black pH-Messgeräte:
- QpH 70 (VWR International GmbH)
- pH 315i (WTW)

Reinraumbank Herasafe (Heraeus Instruments)

Reinstwasseranlage (Millipore)

Rotationsverdampfer:

- Manometer CVC 211 (Vacuumbrand GmbH & Co KG)
- Heizbad 461 (Büchi)
- Kühler cool-care (Heijden-Labortechnik)
- Vakuumpumpe MZ 20C (Vacuumbrand GmbH & Co)

Spektrfluorimetersystem Fluoromax-2 HORIBA Jobin Yvon, Unterhaching, Deutschland

Thermocycler:

- PCR Express, Hybaid
- Progene, Techne

Trockenschrank 600, Memmert

Ultraschallgeräte:

- Ultrasonic cleaner VWR, Darmstadt, Deutschland
- Branson Sonifier 250 (G. Heinemann Ultraschall und Labortechnik)
- Sonorex super RK510 (Bandelin electronic)
- Ultrasonic cleaner (VWR)

Ultrazentrifuge L8-M (Beckmann)

Vortexer Genie K-550-GE (Bender und Hobein AG)

Waagen:

- analytic pB 3001 (Mettler Toledo)
- analytic CP 64 (Sartorius)
- analytic M2P (Sartorius)

Wasserbad Thermostat A100 (Lauda)

UV/VIS-Spektrophotometer SmartSpec Plus, Bio-Rad

Western Blot Apparatur PerfectBlue Semi-Dry Elektrophotter, PEQLAB Biotechnologie

Zentrifugen:

-
- Laborzentrifuge 2-6 Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, Deutschland
 - 3-18 K (Sigma)
 - Avanti Centrifuge J-25 (Beckmann)
 - Centrifuge 5415 C (Eppendorf)
 - Centrifuge 5417 R (Eppendorf)

Zentrifugenrotoren:

- JA14 (Beckmann)
- SWI-28 (Beckmann)
- JLA-9100 (Beckmann)

Software

- CD-Tool
- Chimera
- ChemDraw Professional 16.0
- Datamax Std. v2.20 Software HORIBA Jobin Yvon, Unterhaching, Deutschland
- DICHROWEB
- ExPASy
- Gen3.2
- ProtParam
- Spektra Manager (Jasco)
- Topspin 3.2 (Bruker Biospin)
- VersaWave

Puffer und Lösungen

Nährmedien	LB-Medium	M9-Salzlösung
	10 NaCl	70 g Na ₂ HPO ₄
	10 g Tripton	30 g KH ₂ PO ₄
	5 g Hefeextrakt	5 g NaCl
	ad 1 L H ₂ O; pH 7,5	ad 1 L H ₂ O
	M9-Medium	CASO-Medium
	1 × M9-Salzlösung	30 g
	0,1 mM CaCl ₂	ad 1 L H ₂ O
	1 mM MgSO ₄	pH 7,3 bei 25 °C
	50 mg/mL Thiamin-HCl	
	10 g/L Glukose	
	1 × MH	2x × MH
	1,5 g	3 g
	ad 1 L H ₂ O	ad 1 L H ₂ O
	pH 7,4 bei 25 °C	pH 7,4 bei 25 °C
Stammloesungen	IPTG	Chloramphenicol
Mikrobiologie	0,952 g ad 10 mL H ₂ O	0,3 g ad 10 mL EtOH
	Kanamycin	Thiamin
	0,5 g ad 10 mL H ₂ O	0,5 g ad 10 mL H ₂ O

Agarosegel-	50× TAE-Puffer	
Elektrophorese	242 g Tris-HCl	
	57,1 mL Essigsäure	
	100 mL 0,5 M EDTA	
	ad 1 L H ₂ O; pH 7,0	
SDS-PAGE	Anodenpuffer	Kathodenpuffer
	121,1 g Tris	12,11 g Tris
	ad 1 L H ₂ O; pH 8,5	17,92 g Tricin
		1 g SDS
		ad 1 L H ₂ O
	Cracking-Buffer	Coomassie-Färbelösung
	50 mM Tris-HCl (pH 6,8)	12 g Al ₂ (SO ₄) ₃ *16H ₂ O
	1 % SDS	20 mL EtOH
	25 % Glycerol	5 mL H ₃ PO ₄
	1 % β-Mercaptoethanol	0,05 g Coomassie G250
	Bromphenolblau	ad 200 mL H ₂ O
	4 × Tris-HCl	Tris-Cl
	6,05 g Tris	182 g Tris
	0,4 g SDS	1,5 g SDS
	ad 100 mL H ₂ O	ad 500 mL H ₂ O
	pH 6,8	pH 8,45

	Trenngel	Sammelgel
	5,2 mL 30 % Acrylamid	670 µL 30 % Acrylamid
	3,3 mL Tris-Cl	1,29 mL Tris-HCl
	400 µL H ₂ O	3,2 mL H ₂ O
	70 µL 10 % APS	35 µL 10 % APS
	3,5 µL TEMED	2 µL TEMED
	1,7 mL 87 % Glycerin	
Western Blot	Anodenpuffer I	Anodenpuffer II
	36,34 g Tris	3,03 g Tris
	200 mL MeOH	200 mL MeOH
	ad 1 L H ₂ O; pH 10,4	ad 1 L H ₂ O; pH 10,4
	Kathodenpuffer	Puffer A
	5,24 g 6-Aminocaproat	3,18 g NH ₂ PO ₄
	0,1 g SDS	13,71 g Na ₂ HPO ₄
	ad 1 L H ₂ O; pH 7,6	9,35 g NaCl
		ad 1 L H ₂ O; pH 7,2
	Puffer B	Puffer C
	100 mL Puffer A	6,06 g Tris-Base
	0,5 mL Tween20	2,92 g NaCl
	ad 1 L H ₂ O	5,08 g MgCl*6 H ₂ O
		ad 1 L H ₂ O; pH 9,5

Milchpulverlösung	Detektionslösung
2,5 g Milchpulver	1 mL BCIP
ad 50 mL H ₂ O	1 mL NBT
	8 mL H ₂ O
<hr/>	
Antikörperlösung	
12 µL in 12 mL H ₂ O	

Chromatographie

HPLC

Eluent A

95 % H₂O

3 % iso-Propanol

2 % Acetonitril

0,1 % TFA

Eluent B

5 % H₂O

57 % iso-Propanol

38 % Acetonitril

0,1 % TFA

Nickelaffinitätschromatographie

Lysepuffer

20 mM Tris; pH 8

150 mM NaCl

10 mM Imidazol

0,1 - 1 % NLS

Waschpuffer

20 mM Tris; pH 8

1 M NaCl

10 mM Imidazol

0,1 % NLS

Elutionspuffer

20 mM Tris-Base; pH 8

150 mM NaCl

330 mM Imidazol

0,1 % NLS

Hämolysetests	Puffer 1	Puffer 2
	172 mM Tris pH 7,6 bei 22 °C	172 mM Tris pH 7,6 bei 37 °C
ToxR	Z-Puffer	gewaschener Z-Puffer
	0,63 g NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	45 mL Z-Puffer
	1,06 g Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	5 mL CHCl ₃
	0,075 g KCl	0,5 mL Mercaptoethanol
	100 µL 1 M MgSO ₄	
	ad 100 mL H ₂ O	
	SDS-Z-Puffer	ONPG-Z-Puffer
	0,4 g SDS	0,4 g ONPG
	ad 25 mL Z-Puffer	ad 25 mL Z-Puffer
	0,1 M IPTG	1 % Arabinose
0,24 g ad 10 mL H ₂ O	0,1 g ad 10 mL H ₂ O	
Kanamycin	30 % Maltose	
0,33 g ad 10 mL H ₂ O	3 g ad 10 mL H ₂ O	
ANTS/DPX-Leakage	Puffer 1	Puffer 2
	53,4 mg ANTS	13,007 g Saccharose
	190 mg DPX	693 mg PIPES-Na ₂
	34,6 mg PIPES-Na ₂	ad 200 mL H ₂ O; pH 7,0
	ad 10 mL H ₂ O; pH 7,0	

Kits und Marker für die Molekularbiologie

Kits:

- Roti®-Prep Gel Extraction Kit (Roth, Art.Nr. 8510.2)
- Roti®-Prep Plasmid Mini (Roth, Art.Nr.HP29.2)
- Site-Directed Mutagenesis Kit - QuikChange II (Agilent)
- *Taq* PCR Kit (New England BioLabs)

Marker:

- GeneRuler 1 kb; Plus DNA Ladder SM0312 (Thermo Fischer)
- PageRuler Prestained Protein Ladder Nr. 26616 (Thermo Fisher)
- PageRuler Unstained Protein Ladder Nr. 26632 (Thermo Fisher)

Vektoren

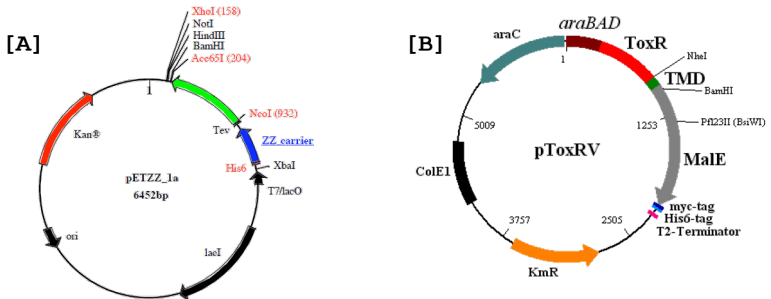


Abbildung A.1: Vektoren für [A] die Herstellung von Peptidpulver und [B] für die ToxR-Assays.

Primer

Mutant	Sequenz	nt	GC [%]
T2A+	5' CTG CAG AAT GGA ATG CGC GTC TAT GAA TCG TTG 3'	33	48
T2A-	5' CAA CGA TTC ATA GAC CGC CAT TCC ATT CTG CAG 3'	33	48
E5A+	5' GGA ATG ACT GTC TAT CGC TCG TTG ATG ATC ATG 3'	33	45
E5A-	5' CAT GAT CAT CAA CGA CGC ATA GAC AGT CAT TCC 3'	33	45
E5Q+	5' GGA ATG ACT GTC TAT CAG TCG TTG ATG ATC ATG 3'	33	42
E5Q-	5' CAT GAT CAT CAA CGA CTG ATA GAC AGT CAT TCC 3'	33	42
E5K+	5' GGA ATG ACT GTC TAT AAA TCG TTG ATG ATC ATG 3'	33	36
E5K-	5' CAT GAT CAT CAA CGA TTT ATA GAC AGT CAT TCC 3'	33	36
S6A+	5' GGA ATG ACT GTC TAT GAA CGC TTG ATG ATC ATG 3'	33	42
S6A-	5' CAT GAT CAT CAA CGC TTC ATA GAC AGT CAT TCC 3'	33	42
N12A+	5' TTG ATG ATC ATG ATT CGC TTT GGT GGT TTG 3'	30	40
N12A-	5' CAA ACC ACC AAA CGC AAT CAT GAT CAT CAA 3'	30	40
F13A+	5' G ATG ATC ATG ATT AAC CGC GGT GGT TTG ATT CTG 3'	34	44
F13A-	5' CAG AAT CAA ACC ACC CGC GTT AAT CAT GAT CAT C 3'	34	44
G14I+	5' CG TTG ATG ATC ATG ATT AAC TTT ATT GGT TTG ATT CTG AAT ACG GTG 3'	47	38
G14I-	5' CA CCG TAT TCA GAA TCA AAC CAA TAA AGT TAA TCA TGA TCA TCA ACG 3'	47	38
G15I+	5' CG TTG ATG ATC ATG ATT AAC TTT GGT ATT TTG ATT CTG AAT ACG GTG 3'	47	34
G15I-	5' CAC CGT ATT CAG AAT CAA AAT ACC AAA GTT AAT CAT GAT CAT CAA CG 3'	47	34
N19A+	5' GGT GGT TTG ATT CTG CGC ACG GTG TTA CTG ATC 3'	33	52
N19A-	5' GAT CAG TAA CAC CGT CGC CAG AAT CAA ACC ACC 3'	33	52
T20A+	5' GGT TTG ATT CTG AAT CGC GTG TTA CTG ATC 3'	30	43
T20A-	5' GAT CAG TAA CAC CGC ATT CAG AAT CAA ACC 3'	30	43
N26A+	5' GTG TTA CTG ATC TTC CGC ATC ATG ATG ATT GTA ACC 3'	36	42
N26A-	5' GGT TAC AAT CAT CAT GAT CGC GAA GAT CAG TAA CAC 3'	36	42
T32A+	5' C ATC ATG ATG ATT GTA CGC TCT AGT CAG AAG AAG AAG TAG 3'	40	40
T32A-	5' CTA CTT CTT CTT CTG ACT AGA CGC TAC AAT CAT CAT GAT G 3'	40	40
S33A+	5' G ATG ATT GTA ACC CGC AGT CAG AAG AAG 3'	28	46
S33A-	5' CTT CTT CTG ACT CGC GGT TAC AAT CAT C 3'	28	46
S34A+	5' G ATT GTA ACC TCT CGC CAG AAG AAG AAG TAG 3'	31	45
S34A-	5' CTA CTT CTT CTT CTG CGC AGA GGT TAC AAT C 3'	31	45
Q35A+	5' GTA ACC TCT AGT CGC AAG AAG AAG TAG 3'	27	44
Q35A-	5' CTA CTT CTT CTT CGC ACT AGA GGT TAC 3'	27	44

Abbildung A.2: Primer für die herstellung von Substitutionsmutanten von BsrG-wt.

Mutant	Sequenz	nt	GC [%]
WT8-31+	5' <u>TGTGCTAGCATGATCATGATTAAC</u> <u>TTGGTGG</u> 3'	32	41
WT8-31-	5' <u>GGGGATCCCTACAATCATCATGATGTTGAAGATCAG</u> 3'	36	44
WT6-29+	5' <u>TCTGCTAGCTCGTTGATGATCATGATTAAC</u> 3'	30	40
WT6-29-	5' <u>TTGGATCCCATCATCATGATGTTGAAGAT</u> 3'	27	42
WT7-30+	5' <u>TCTGCTAGCTTGATCATGATTAAC</u> <u>TTGGTGTGG</u> 3'	34	41
WT7-30-	5' <u>GTGGATCCCAATCATCATGATGTTGAA</u> 3'	27	41
WT9-32+	5' <u>TCTGCTAGCATCATGATTAAC</u> <u>TTGGTGG</u> 3'	29	41
WT9-32-	5' <u>TTGGATCCCGGTTACAATCATCATGAT</u> 3'	27	41
WT10-33+	5' <u>TCTGCTAGCATGATTAAC</u> <u>TTGGTGGTTG</u> 3'	30	40
WT10-33-	5' <u>GGGGATCCAGAGGTTACAATCATCAT</u> 3'	27	48

Abbildung A.3: Primer zur Verkürzung des BsrG-wt Proteins auf seine Transmembrandomäne.

Zelllinien

<i>E. coli</i>	Lemo21
	NEB10β
	XL-10Gold
	pd28
	FHK12
<i>B. subtilis</i>	DSM 347
<i>S. xylosus</i>	DSM 20267
<i>K. rhizophila</i>	DSM 348

B Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMP	Antimikrobielles Peptid
ANTS	8-Aminonaphthalin-1,3,6-Trisulfonsäure
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Arbitrary Units</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	<i>base pair</i> , Basenpaar
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>C. crescentus</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>
CD	<i>Circular Dichroism</i> , Zirkulardichroismus
CM	Cytoplasmatische Membran
CP	<i>Cross Polarization</i> , Kreuzpolarisation
CSA	<i>Chemical Shift Anisotropy</i>
Dec.	<i>Decoupling</i> , Entkopplung
DEiPC	1,2-Dieicosenoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DErPC	1,2-Dierucoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribose Nucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DPC	Dodecylphosphocholine
DPPE	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DPPG	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
DPX	p-Xylol-bis(N-Pyridiniumbromid)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EtOH	Ethanol
FID	<i>Free Induction Decay</i> , Freider Induktionsabfall
FK	Festkörper
FT	Fouriertransformation
GC	Guanin-Cytosin-Gehalt
GS	Gramicidin S
<i>H. influenza</i>	<i>Haemophilus influenza</i>
His-tag	Histidin-Anhang
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungsflüssigchromatographie
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactopyranosid
<i>K. rhizophila</i>	<i>Kocuria rhizophila</i>
LAB	Laborachsenssystem
LB-Medium	Luria Bertani Medium
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-</i>

	<i>Time Of Flight</i>
MBP	Maltosebindeprotein
MD	Moleküldynamik
MeOH	Methanol
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i> , Minimale Hemmkonzentration
MRE	<i>Mean Residue Ellipticity</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
NLS	N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Kernspinresonanz
nt	Nukleotide
NTA	Nitrilotriessigsäure
OCD	Orientierter Zirkulardichroismus
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
P:L	molares Protein-zu-Lipid-Verhältnis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	<i>Principles Axes System</i> , Hauptachsensystem
<i>P. atrosepticum</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
PmB	Polymyxin B
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
pH	<i>pondus/potentia Hydrogenii</i>
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-3-phosphocholin
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin

POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho- (1'-rac glycerol)
Rhod-PE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N- (lissamin rhodamin B sulfonyl)
RP	Reversed Phase , Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SDS	<i>Sodium-dodecyl-sulfate</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>S. xylosus</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
TA-System	Toxin-Antitoxin-System
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> , Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TM	Transmembran
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)methan
U	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
Vis	<i>visible</i>
X-Ray	Röntgenstrahlung

C Einheiten und Symbole

1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
α	alpha
β	beta
γ	gyromagnetisches Verhältnis
δ	chemische Verschiebung
$\delta_{xx}, \delta_{yy}, \delta_{zz}$	Resonanzfrequenzen der zugehörigen Tensorelemente
δ_{iso}	isotroper Wert der chemischen Verschiebung
ΔE	Energiedifferenz
ε	Extinktionskoeffizient
θ	Elliptizität
λ	Wellenlänge
$\vec{\mu}$	(Übergangs-)Dipolmoment
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μmol	Mikromol
μs	Mikrosekunde
π	Kreiszahl
π, π^*, π_{nb}	Molekülorbitale
$\sigma_{xx}, \sigma_{yy}, \sigma_{zz}$	Tensorelemente

ϕ	Quantenausbeute
ω_0	Larmorfrequenz
\hbar	reduziertes Plancksches Wirkungsquantum
$^\circ$	Grad
$^\circ\text{C}$	Grad Celsius
\AA	Ångström
B_0	Magnetfeld in z-Richtung
B_1	Magnetfeld senkrecht zu
B	Magnetfeldvektor
c	Konzentration
c_g	molare Konzentration einer Peptidlösung
cm	Zentimeter
c_r	molare Konzentration pro Peptidbindung
d	Schichtdicke
Da	Dalton
decimol	Dezimol
deg	Grad
E	Elektrischer Feldvektor
E	Extinktion bei den Hämolysetests
E_{280}	Extinktion bei 280 nm
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
I	Kernspinquantenzahl; Intensität
K	Kelvin
k_B	Boltzmann-Konstante
kDa	Kilodalton

kHz	Kilohertz
K_{SV}	Stern-Volmer-Konstant
L	Liter
m	Masse
m	Orientierungsquantenzahl
M	Molar
mA	Milliampere
mdeg	Milligrad
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
ms	Millisekunde
M_w	Molekulargewicht
n	Anzahl Peptidbindungen; Molekülorbital
n'	Molekülorbital
N_α, N_β	Besetzungszustände
nm	Nanometer
\vec{P}	Eigendrehimpuls
ppm	<i>parts per million</i> (ein Millionstel Teil)
r	Abstand
rpm	<i>round per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
s	Sekunde
SV	Sälvolumen
t	Zeit

T	Temperatur
T_m	Schmelztemperatur
V	Volt
z	Ladung

Abbildungsverzeichnis

1.1	Typ I TA-Systeme	5
1.2	Typ II TA-Systeme	10
1.3	Typ III TA-System <i>toxIN</i>	13
1.4	Typ IV TA-Systeme	15
1.5	Typ V TA-System <i>ghoST</i>	16
1.6	Typ VI TA-System <i>socAB</i>	16
1.7	Graphische Zusammenfassung der Targets, Funktionen und phy- siologischen Auswirkungen von TA-Systemen	18
1.8	Nukleotidsequenz des <i>bsrG/sr4</i> -Lokus	19
1.9	Kyte & Doolittle-Profil von BsrG und TxpA	20
1.10	Regulierung des Typ I TA-Systems <i>bsrG/sr4</i>	21
1.11	Interaktionsmotive von TM-Helix-Helix-Dimeren	25
1.12	Dimerisierungsmotive	27
1.13	Strukturen der rechtsgängigen Homodimere GpA und BNIP3	30
1.14	Interaktionsmotiv des Heterodimers der Klasse II MHC α - und β -Kette.	31
1.15	PDGFR- β und E5	32
1.16	Dimerisierungsmotive der Epo-Rezeptoren	33
1.17	Strukturen von DAP12 und $\zeta\zeta$	37
1.18	Struktur und Aktivierung des Integrinkomplexes $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	38
1.19	Strukturen der ErbB-Rezeptoren	41
1.20	Kyte & Doolittle-Profil von BsrG	43
1.21	Aminosäuresequenz und <i>helical wheel</i> -Darstellung von BsrG	44
1.22	Graphische Beschreibung der H-Zipper-Hypothese	46

2.1	Strategie zur Charakterisierung von BsrG und der damit einhergehenden Prüfung der H-Zipper-Hypothese.	47
3.1	Hydroxylaminverdau	61
3.2	Schematische Darstellung des ToxR-Assays	69
3.3	Graphische Darstellung des ANTS/DPX-Leakage-Experiments	79
3.4	Grundlagen und Effekte der CD-Spektroskopie	81
3.5	Grundlagen der CD-Spektroskopie	84
3.6	Prinzip der OCD-Spektroskopie	85
3.7	Statistik der Protein Data Bank (PDB)	89
3.8	Grundlagen der NMR-Spektroskopie	91
3.9	Beeinflussung des NMR-Signals	93
3.10	Veranschaulichung des CSA-Tensors	95
3.11	Prinzipien der FK-NMR-Spektroskopie	98
4.1	Einführung von Mutationen	103
4.2	Verkürzung des <i>bsrG</i> -Gens auf die TMD	104
4.3	Protokoll zur Herstellung von BsrG-Proteinpulver	106
4.4	Expressions- und Wachstumsverlauf	107
4.5	Hydroxylaminverdau von BsrG	108
4.6	HPLC-Chomatogramm und MALDI-Spektren	110
4.7	CD-Spektren von BsrG-wt	113
4.8	Orientierung von BsrG in POPE:POPG (2:1)	115
4.9	Einfluss des P:L auf die Orientierung von BsrG-wt	116
4.10	SDS-Gel von BsrG-wt	117
4.11	Untersuchung der korrekten Membraninsertion (BsrG-wt)	119
4.12	Ergebnisse des ToxR-Assays (BsrG-wt)	119
4.13	Leakage-Verlauf BsrG-wt	120
4.14	Einfluss des P:L auf den Leakage BsrG-wt	121
4.15	Mikrotiterplatte (BsrG-wt)	123
4.16	Hämolyse	124

4.17	CD-Spektren der BsrG-Mutanten	127
4.18	Orientierung der Mutanten in POPE:POPG (2:1)	129
4.19	SDS-PAGE	130
4.20	Untersuchung der korrekten Membraninsertion (Mutanten) . . .	132
4.21	Ergebnisse des ToxR-Assays (Mutanten)	132
4.22	Leakage Mutanten	133
4.23	Mikrotiterplatte (Mutanten)	135
5.1	Methoden zur Charakterisierung von BsrG	140
5.2	Zipper-Motiv	147
5.3	H-Zipper	149
6.1	Charakterisierung von BsrG als Typ I Toxin und H-Zipper . . .	152
A.1	Vektoren für [A] die Herstellung von Peptidpulver und [B] für die ToxR-Assays.	165
A.2	Primer für die herstellung von Substitutionsmutanten von BsrG- wt.	166
A.3	Primer zur Verkürzung des BsrG-wt Proteins auf seine Trans- membrandomäne.	167

Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht der TA-Systeme	17
1.2	Zusammenstellung der vorgestellten TM-Helix-Helix-Wechselwirkungsmotive	42
3.1	Ingredienzien für einen 50 μ L-Reaktionsansatz einer Mutagenese-PCR	50
3.2	Programmierung des Thermozyklers für eine Mutagenese-PCR .	50
3.3	50 μ L-Reaktionsansatz für die PCR zur Herstellung des verkürzten <i>bsrG</i> -Fragments	51
3.4	Programmierung des Thermozyklers für die Amplifizierung verkürzter <i>bsrG</i> -Fragmente	52
3.5	Reaktionsansatz eines Doppelverdaus mit den FastDigest Restriktionsenzymen BamHI und NheI	54
3.6	HPLC-Lösungsmittelgradient	63
3.7	Schematischer Aufbau eines <i>semi-dry</i> Western Blots	67
3.8	Auflistung der chimären ToxR-Konstrukte	70
3.9	Zusammensetzung der CD- und OCD-Proben	87
3.10	Auflistung wichtiger NMR-Parameter biologisch relevanter Kerne.	96
4.1	Auflistung der hergestellten BsrG-Mutanten im pETZ21 α -Vektor	102
4.2	Auflistung der hergestellten BsrG-Mutanten im pToxRV-Vektor .	105
4.3	Ergebnisse der MIC-Tests (BsrG-wt)	123
4.4	Quantitative Auswertung der MRE-Spektren der BsrG-Mutanten	126
4.5	Klassifizierung der Mutanten anhand der OCD-Spektren	128

4.6	Ergebnisse der MIC Tests (Mutanten)	135
4.7	Zusammenfassung der Struktur- und Funktionsdaten	137

Literaturverzeichnis

- [1] J. Liu and B. Rost. Comparing function and structure between entire proteomes. *Protein Science*, 10(10):1970–9, 2001.
- [2] E. Wallin and G. V. Heijne. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Science*, 7(4):1029–1038, 2008.
- [3] S. Q. Zhang, D. W. Kulp, C. A. Schramm, M. Mravic, I. Samish, and W. F. Degradó. The membrane- and soluble-protein helix-helix interactome: Similar geometry via different interactions. *Structure*, 23(3):527–541, 2015.
- [4] T. H. Walther and A. S. Ulrich. Transmembrane helix assembly and the role of salt bridges. *Current Opinion in Structural Biology*, 27(1):63–68, 2014.
- [5] T. Steinbrecher, S. Prock, J. Reichert, P. Wadhvani, B. Zimpfer, J. Bürck, M. Berditsch, M. Elstner, and A. S. Ulrich. Peptide-lipid interactions of the stress-response peptide tisb that induces bacterial persistence. *Biophysical Journal*, 103(7):1460–1469, 2012.
- [6] R. Brielle, M.-L. Pnel-Marie, and B. Felden. Linking bacterial type I toxins with their actions. *Current Opinion in Microbiology*, 30:114–121, 2016.
- [7] L. Fernández-García, L. Blasco, M. Lopez, G. Bou, R. García-Contreras, T. Wood, and M. Tomas. Toxin-antitoxin systems in clinical pathogens. *Toxins*, 8(7):1–23, 2016.

- [8] K. Y. Lee and B. J. Lee. Structure, biology, and therapeutic application of toxin-antitoxin systems in pathogenic bacteria. *Toxins*, 8(10), 2016.
- [9] Robert-Koch-Institut. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2013. 2013.
- [10] N. Jahn, H. Preis, C. Wiedemann, and S. Brantl. BsrG/SR4 from *Bacillus subtilis*- the first temperature-dependent type I toxin-antitoxin system. *Molecular Microbiology*, 83(3):579–598, 2012.
- [11] S. Durand, N. Jahn, C. Condon, and S. Brantl. Type I toxin-antitoxin systems in *Bacillus subtilis*. *RNA Biology*, 9(12):1491–1497, 2012.
- [12] R. Page and W. Peti. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nature Chemical Biology*, 12(4):208–214, 2016.
- [13] K. M. Klimina, E. U. Poluektova, and V. N. Danilenko. Bacterial toxin-antitoxin systems: Properties, functional significance, and possibility of use. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53(5):494–505, 2017.
- [14] Y. Yamaguchi and M. Inouye. Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria and Archaea. *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria*, 1:97–107, 2016.
- [15] J. Wen and E. M. Fozo. sRNA antitoxins: more than one way to repress a toxin. *Toxins*, 6(8):2310–2335, 2014.
- [16] S. J. Unterholzner, B. Poppenberger, and W. Rozhon. Toxin-antitoxin systems. *Bioengineered*, 5(3):1–13, 2014.
- [17] P. Bernard and M. Couturier. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology*, 226(3):735–745, 1992.
- [18] N. Goeders and L. Van Melderen. Toxin-antitoxin systems as multi-level interaction systems. *Toxins*, 6(1):304–324, 2013.

- [19] T. Miki, J. Ae Park, K. Nagao, N. Murayama, and T. Horiuchi. Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress letD (ccdB) product growth inhibition. *Journal of Molecular Biology*, 225(1):39–52, 1992.
- [20] S. Brantl and N. Jahn. SRNAs in bacterial type I and type III toxin-antitoxin systems. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(3):413–427, 2015.
- [21] T. Thisted and K. Gerdes. Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1. Sok antisense RNA regulates hok gene expression indirectly through the overlapping mok gene. *Journal of Molecular Biology*, 223(1):41–54, 1992.
- [22] C. U. Chukwudi and L. Good. The role of the hok/sok locus in bacterial response to stressful growth conditions. *Microbial Pathogenesis*, 79:70–79, 2015.
- [23] M. Kawano, L. Aravind, and G. Storz. An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Molecular Microbiology*, 64(3):738–754, 2007.
- [24] B. A. Berghoff, M. Hoekzema, L. Aulbach, and E. G. H. Wagner. Two regulatory RNA elements affect TisB-dependent depolarization and persister formation. *Molecular Microbiology*, 103(6):1020–1033, 2017.
- [25] E. G. H. Wagner and C. Unoson. The toxin-antitoxin system tisB-istR1. *RNA Biology*, 9(12):1513–1519, 2012.
- [26] S. Brantl. Bacterial type I toxin-antitoxin systems. *RNA biology*, 9(12):1488–90, 2012.
- [27] X. Wang and T. K. Wood. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(16):5577–5583, 2011.

- [28] S. Durand, A. Tomasini, F. Braun, C. Condon, and P. Romby. sRNA and mRNA turnover in gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(3):316–330, 2015.
- [29] J. M. Silvaggi, J. B. Perkins, and R. Losick. Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187(19):6641–6650, 2005.
- [30] J. M. Silvaggi, J. B. Perkins, and R. Losick. Genes for Small , Non-coding RNAs under Sporulation Control in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 188(2):32–41, 2006.
- [31] W. T. Chan, M. Espinosa, and C. C. Yeo. Keeping the Wolves at Bay: Antitoxins of Prokaryotic Type II Toxin-Antitoxin Systems. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3:1–20, 2016.
- [32] C. Baliga, R. Varadarajan, and N. Aghera. Homodimeric *Escherichia coli* Toxin CcdB (Controller of Cell Division or Death B Protein) Folds via Parallel Pathways. *Biochemistry*, 55(43):6019–6031, 2016.
- [33] H. S. Deter, R. V. Jensen, W. H. Mather, and N. C. Butzin. Mechanisms for differential protein production in toxin-antitoxin systems. *Toxins*, 9(7):1–13, 2017.
- [34] N. De Jonge, W. Hohlweg, A. Garcia-Pino, M. Respondek, L. Buts, S. Haesaerts, J. Lah, K. Zangger, and R. Loris. Structural and thermodynamic characterization of *Vibrio fischeri* CcdB. *Journal of Biological Chemistry*, 285(8):5606–5613, 2010.
- [35] M. Simic, N. De Jonge, R. Loris, G. Vesnaver, and J. Lah. Driving forces of gyrase recognition by the addiction toxin CcdB. *Journal of Biological Chemistry*, 284(30):20002–20010, 2009.
- [36] M. H. Dao-Thi, L. Van Melderen, E. De Genst, H. Afif, L. Buts, L. Wyns, and R. Loris. Molecular basis of gyrase poisoning by the addiction toxin CcdB. *Journal of Molecular Biology*, 348(5):1091–1102, 2005.

- [37] S. Maki, S. Takiguchi, T. Miki, and T. Horiuchi. Modulation of DNA supercoiling activity of *Escherichia coli* DNA gyrase by F plasmid proteins. Antagonistic actions of LetA (CcdA) and LetD (CcdB) proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 267(17):12244–12251, 1992.
- [38] S. K. Christensen, K. Pedersen, F. G. Hansen, and K. Gerdes. Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *Journal of Molecular Biology*, 332(4):809–819, 2003.
- [39] H. Engelberg-Kulka. mazEF: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. *Journal of Cell Science*, 118(19):4327–4332, 2005.
- [40] Y. Zhang, J. Zhang, H. Hara, I. Kato, and M. Inouye. Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5):3143–3150, 2005.
- [41] R. Hazan and H. Engelberg-Kulka. *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(2):227–234, 2004.
- [42] M. Bukowski, A. Rojowska, and B. Wladyka. Prokaryotic toxin-antitoxin systems—the role in bacterial physiology and application in molecular biology. *Acta biochimica Polonica*, 58(1):1–9, 2011.
- [43] D. Stieber, P. Gabant, and C. Y. Szpirer. The art of selective killing: Plasmid toxin/antitoxin systems and their technological applications. *BioTechniques*, 45(3):344–346, 2008.
- [44] H. Chono, K. Matsumoto, H. Tsuda, N. Saito, K. Lee, S. Kim, H. Shibata, N. Ageyama, K. Terao, and Y. Yasutomi. Acquisition of HIV-1 Resistance in T Lymphocytes Using an ACA-Specific *E. coli* mRNA Interferase. *Human Gene Therapy*, 22(1):35–43, 2011.

- [45] A. Shapira, S. Shapira, M. Gal-Tanamy, R. Zemel, R. Tur-Kaspa, and I. Benhar. Removal of hepatitis C virus-infected cells by a zymogenized bacterial toxin. *PLoS ONE*, 7(2), 2012.
- [46] D. A. Daines, M. H. Wu, and S. Y. Yuan. VapC-1 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a ribonuclease. *Journal of Bacteriology*, 189(14):5041–5048, 2007.
- [47] K. S. Winther and K. Gerdes. Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(18):7403–7407, 2011.
- [48] K. S. Winther, D. E. Brodersen, A. K. Brown, and K. Gerdes. VapC20 of *Mycobacterium tuberculosis* cleaves the Sarcin Ricin loop of 23S rRNA. *Nature Communications*, 4:1–9, 2013.
- [49] R. Frampton, R. B. M. Aggio, S. G. Villas-Bôas, V. L. Arcus, and G. M. Cook. Toxin-antitoxin systems of *Mycobacterium smegmatis* are essential for cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, 287(8):5340–5356, 2012.
- [50] D. Castro-Roa, A. Garcia-Pino, S. De Gieter, N. a. J. van Nuland, R. Loris, and N. Zenkin. The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu. *Nature chemical biology*, 9(12):811–7, 2013.
- [51] A. Garcia-Pino, S. Balasubramanian, L. Wyns, E. Gazit, H. De Greve, R. D. Magnuson, D. Charlier, N. A. J. van Nuland, and R. Loris. Allosteric and Intrinsic Disorder Mediate Transcription Regulation by Conditional Cooperativity. *Cell*, 142(1):101–111, 2010.
- [52] H. Mutschler, M. Gebhardt, R. L. Shoeman, and A. Meinhart. A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS Biology*, 9(3), 2011.

- [53] A. Meinhart, J. C. Alonso, N. Strater, and W. Saenger. Crystal structure of the plasmid maintenance system epsilon/zeta: functional mechanism of toxin zeta and inactivation by epsilon 2 zeta 2 complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4):1661–1666, 2003.
- [54] P. C. Fineran, T. R. Blower, I. J. Foulds, D. P. Humphreys, K. S. Lilley, and G. P. C. Salmond. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3):894–899, 2009.
- [55] F. L. Short, X. Y. Pei, T. R. Blower, S.-L. Ong, P. C. Fineran, B. F. Luisi, and G. P. C. Salmond. Selectivity and self-assembly in the control of a bacterial toxin by an antitoxic noncoding RNA pseudoknot. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(3):E241–9, 2013.
- [56] T. R. Blower, X. Y. Pei, F. L. Short, P. C. Fineran, D. P. Humphreys, B. F. Luisi, and G. P. C. Salmond. A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(2):185–190, 2011.
- [57] H. Masuda, Q. Tan, N. Awano, K. P. Wu, and M. Inouye. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 84(5):979–989, 2012.
- [58] H. Masuda, Q. Tan, N. Awano, Y. Yamaguchi, and M. Inouye. A novel membrane-bound toxin for cell division, CptA (YgfX), inhibits polymerization of cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB, in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 328(2):174–181, 2012.
- [59] Q. Tan, N. Awano, and M. Inouye. YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Molecular Microbiology*, 79(1):109–118, 2011.

- [60] M. A. Arbing, S. K. Handelman, A. P. Kuzin, G. Verdon, C. Wang, M. Su, F. P. Rothenbacher, M. Abashidze, M. Liu, J. M. Hurley, R. Xiao, T. Acton, M. Inouye, G. T. Montelione, N. A. Woychik, and J. F. Hunt. Crystal structures of Phd-Doc, HigA, and YeeU establish multiple evolutionary links between microbial growth-regulating toxin-antitoxin systems. *Structure*, 18(8):996–1010, 2010.
- [61] H. Y. Cheng, V. W. Soo, S. Islam, M. J. McAnulty, M. J. Benedik, and T. K. Wood. Toxin GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages the cell membrane to reduce adenosine triphosphate and to reduce growth under stress. *Environmental microbiology*, 16(6):1741–1754, 2014.
- [62] X. Wang, D. M. Lord, H.-y. Cheng, D. O. Osbourne, S. Hoon, V. Sanchez-torres, C. Quiroga, K. Zheng, T. Herrmann, W. Peti, M. J. Benedik, R. Page, and T. K. Wood. A Novel Type V TA System Where mRNA for Toxin GhoT is Cleaved by Antitoxin GhoS. *Nature Chemical Biology*, 8(10):855–861, 2013.
- [63] X. Wang, D. M. Lord, S. H. Hong, W. Peti, M. J. Benedik, R. Page, and T. K. Wood. Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS. *Environmental Microbiology*, 15(6):1734–1744, 2013.
- [64] C. D. Aakre, T. N. Phung, D. Huang, and M. T. Laub. A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β sliding clamp. *Molecular Cell*, 52(5):617–628, 2013.
- [65] N. Jahn, H. Preis, C. Wiedemann, and S. Brantl. BsrG/SR4 from *Bacillus subtilis*- the first temperature-dependent type I toxin-antitoxin system. *Molecular Microbiology*, 83(3):579–598, 2012.
- [66] J. Kyte and R. F. Doolittle. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1):105–132, 1982.

- [67] P. Nicolas, U. Mader, E. Dervyn, T. Rochat, A. Leduc, N. Pigeonneau, E. Bidnenko, E. Marchadier, M. Hoebeke, S. Aymerich, D. Becher, P. Bisicchia, E. Botella, O. Delumeau, G. Doherty, E. L. Denham, M. J. Fogg, V. Fromion, A. Goelzer, A. Hansen, E. Hartig, C. R. Harwood, G. Homuth, H. Jarmer, M. Jules, E. Klipp, L. Le Chat, F. Leconte, P. Lewis, W. Liebermeister, A. March, R. A. T. Mars, P. Nanapaneni, D. Noone, S. Pohl, B. Rinn, F. Rugheimer, P. K. Sappa, F. Samson, M. Schaffer, B. Schwikowski, L. Steil, J. Stulke, T. Wiegert, K. M. Devine, A. J. Wilkinson, J. Maarten van Dijl, M. Hecker, U. Volker, P. Bessieres, and P. Noirot. Condition-Dependent Transcriptome Reveals High-Level Regulatory Architecture in *Bacillus subtilis*. *Science*, 335(6072):1103–1106, 2012.
- [68] N. Jahn and S. Brantl. Heat-shock-induced refolding entails rapid degradation of *bsrG* toxin mRNA by RNases Y and J1. *Microbiology*, 162(3):590–600, 2016.
- [69] N. Jahn, S. Brantl, and H. Strahl. Against the mainstream: The membrane-associated type I toxin BsrG from *Bacillus subtilis* interferes with cell envelope biosynthesis without increasing membrane permeability. *Molecular Microbiology*, 98(4):651–666, 2015.
- [70] E. B. Cohen, S. J. Jun, Z. Bears, F. N. Barrera, M. Alonso, D. M. Engelman, and D. DiMaio. Mapping the homodimer interface of an optimized, artificial, transmembrane protein activator of the human erythropoietin receptor. *PLoS ONE*, 9(4), 2014.
- [71] Y. Shai. Molecular recognition within the membrane milieu: Implications for the structure and function of membrane proteins. *Journal of Membrane Biology*, 182(2):91–104, 2001.
- [72] K. R. MacKenzie. Folding and stability of α -helical integral membrane proteins. *Chemical Reviews*, 106(5):1931–1977, 2006.

- [73] W. P. Russ and D. M. Engelman. The GxxxG motif: A framework for transmembrane helix-helix association. *Journal of Molecular Biology*, 296(3):911–919, 2000.
- [74] D. P. Ng, B. E. Poulsen, and C. M. Deber. Membrane protein misassembly in disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(4):1115–1122, 2012.
- [75] D. Windisch, C. Ziegler, S. L. Grage, J. Bürck, M. Zeitler, P. L. Gor'kov, and A. S. Ulrich. Hydrophobic Mismatch Drives the Interaction of E5 with the Transmembrane Segment of PDGF Receptor. *Biophysical Journal*, 109(4):737–749, 2015.
- [76] C. Muhle-Goll, S. Hoffmann, S. Afonin, S. L. Grage, A. A. Polyansky, D. Windisch, M. Zeitler, J. Bürck, and A. S. Ulrich. Hydrophobic matching controls the tilt and stability of the dimeric platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) α transmembrane segment. *Journal of Biological Chemistry*, 287(31):26178–26186, 2012.
- [77] B. J. Bormann and D. M. Engelman. Intramembrane helix-helix association in oligomerization and transmembrane signaling. 21:223–242, 1992.
- [78] D. T. Moore, B. W. Berger, and W. F. DeGrado. Protein-Protein Interactions in the Membrane: Sequence, Structural, and Biological Motifs. *Structure*, 16(7):991–1001, 2008.
- [79] E. Li, W. C. Wimley, and K. Hristova. Transmembrane helix dimerization: Beyond the search for sequence motifs. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(2):183–193, 2012.
- [80] A. Fink, N. Sal-Man, D. Gerber, and Y. Shai. Transmembrane domains interactions within the membrane milieu: Principles, advances and challenges. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(4):974–983, 2012.

-
- [81] R. F. S. Walters and W. F. DeGrado. Helix-packing motifs in membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37):13658–13663, 2006.
- [82] M. Eilers, A. B. Patel, W. Liu, and S. O. Smith. Comparison of Helix Interactions in Membrane and Soluble α -Bundle Proteins. *Biophysical Journal*, 82(5):2720–2736, 2002.
- [83] F. Cymer, A. Veerappan, and D. Schneider. Transmembrane helix-helix interactions are modulated by the sequence context and by lipid bilayer properties. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(4):963–973, 2012.
- [84] K. Bugge, K. Lindorff-Larsen, and B. B. Kragelund. Understanding single-pass transmembrane receptor signaling from a structural viewpoint-what are we missing? *FEBS Journal*, 283(24):4424–4451, 2016.
- [85] A. L. Lomize and I. D. Pogozheva. TMDOCK: An Energy-Based Method for Modeling α -Helical Dimers in Membranes. *Journal of Molecular Biology*, 429(3):390–398, 2017.
- [86] K. R. MacKenzie. A Transmembrane Helix Dimer: Structure and Implications. *Science*, 276(5309):131–133, 1997.
- [87] S. Kim, T.-J. Jeon, A. Oberai, D. Yang, J. J. Schmidt, and J. U. Bowie. Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40):14278–83, 2005.
- [88] S. Sukharev, S. R. Durell, and H. R. Guy. Structural models of the MscL gating mechanism. *Biophysical journal*, 81(2):917–36, 2001.
- [89] A. R. Curran and D. M. Engelman. Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(4):412–417, 2003.

- [90] C. Choma, H. Gratkowski, J. D. Lear, and W. F. DeGrado. Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nature structural biology*, 7(2):161–6, 2000.
- [91] N. Sal-Man, D. Gerber, and Y. Shai. The Composition Rather than Position of Polar Residues (QxxS) Drives Aspartate Receptor Transmembrane Domain Dimerization in Vivo. *Biochemistry*, 43(8):2309–2313, 2004.
- [92] N. Sal-Man, D. Gerber, and Y. Shai. The identification of a minimal dimerization motif QXXS that enables homo- and hetero-association of transmembrane helices in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29):27449–27457, 2005.
- [93] L. Adamian and J. Liang. Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: Polar clamps and serine zippers. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 47(2):209–218, 2002.
- [94] A. Z. Ebie and K. G. Fleming. Dimerization of the Erythropoietin Receptor Transmembrane Domain in Micelles. *Journal of Molecular Biology*, 366(2):517–524, 2007.
- [95] L. Adamian, R. Jackups, T. A. Binkowski, and J. Liang. Higher-order interhelical spatial interactions in membrane proteins. *Journal of Molecular Biology*, 327(1):251–272, 2003.
- [96] T. H. Walther, C. Gottselig, S. L. Grage, M. Wolf, A. V. Vargiu, M. J. Klein, S. Vollmer, S. Prock, M. Hartmann, S. Afonin, E. Stockwald, H. Heinzmann, O. V. Nolandt, W. Wenzel, P. Ruggerone, and A. S. Ulrich. Folding and self-assembly of the TatA translocation pore based on a charge zipper mechanism. *Cell*, 152(1-2):316–326, 2013.
- [97] S. Sun and E. R. Bernstein. Aromatic van der Waals Clusters: Structure and Nonrigidity. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(32):13348–13366, 1996.

- [98] A. Ridder, P. Skupjen, S. Unterreitmeier, and D. Langosch. Tryptophan supports interaction of transmembrane helices. *Journal of Molecular Biology*, 354(4):894–902, 2005.
- [99] E. Gazit. A possible role for p-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB Journal*, 16(1):77–83, 2002.
- [100] R. Azriel and E. Gazit. Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36):34156–34161, 2001.
- [101] R. M. Johnson, K. Hecht, and C. M. Deber. Aromatic and cation- π interactions enhance helix-helix association in a membrane environment. *Biochemistry*, 46(32):9208–9214, 2007.
- [102] C. Escher, F. Cymer, and D. Schneider. Two GxxxG-Like Motifs Facilitate Promiscuous Interactions of the Human ErbB Transmembrane Domains. *Journal of Molecular Biology*, 389(1):10–16, 2009.
- [103] F. X. Zhou, M. J. Cocco, W. P. Russ, A. T. Brunger, and D. M. Engelman. Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nature structural biology*, 7(2):154–160, 2000.
- [104] D. O. M. E. Engelman. TOXCAT : A measure of transmembrane helix association in a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96:863–868, 1999.
- [105] S. O. Smith, R. Jonas, M. Braiman, and B. J. Bormann. Structure and Orientation of the Transmembrane Domain of Glycophorin A in Lipid Bilayers. *Biochemistry*, 33(20):6334–6341, 1994.
- [106] K. S. Mineev, E. V. Bocharov, P. E. Volynsky, M. V. Goncharuk, E. N. Tkach, Y. S. Ermolyuk, A. A. Schulga, V. V. Chupin, I. V. Maslennikov, R. G. Efremov, and A. S. Arseniev. Dimeric structure of the transmembrane domain of glycophorin a in lipidic and detergent environments. *Acta Naturae*, 3(2):90–8, 2011.

- [107] E. Arbely and I. T. Arkin. Experimental Measurement of the Strength of a Ca-H...O Bond in a Lipid Bilayer. *Journal of the American Chemical Society*, 126(17):5362–5363, 2004.
- [108] B. K. Mueller, S. Subramaniam, and A. Senes. A frequent, GxxxG-mediated, transmembrane association motif is optimized for the formation of interhelical C \hat{A} -H hydrogen bonds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(10):E888–E895, 2014.
- [109] A. Senes, D. E. Engel, and W. F. Degrado. Folding of helical membrane proteins: The role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(4):465–479, 2004.
- [110] A. Senes, M. Gerstein, and D. M. Engelman. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with β -branched residues at neighboring positions. *Journal of Molecular Biology*, 296(3):921–936, 2000.
- [111] D. Langosch, B. Brosig, H. Kolmar, and H. J. Fritz. Dimerisation of the glycophorin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator. *Journal of molecular biology*, 263(4):525–530, 1996.
- [112] J. D. Lear, A. L. Stouffer, H. Gratkowski, V. Nanda, and W. F. Degrado. Association of a model transmembrane peptide containing gly in a heptad sequence motif. *Biophysical journal*, 87(5):3421–9, 2004.
- [113] Mylinh T. Duong, T. M. Jaszewski, K. G. Fleming, and K. R. MacKenzie. Changes in apparent free energy of helix-helix dimerization in a biological membrane due to point mutations. *Journal of Molecular Biology*, 371(2):422–434, 2007.
- [114] E. V. Bocharov, Y. E. Pustovalova, K. V. Pavlov, P. E. Volynsky, M. V. Goncharuk, Y. S. Ermolyuk, D. V. Karpunin, A. A. Schulga, M. P.

- Kirpichnikov, R. G. Efremov, I. V. Maslennikov, and A. S. Arseniev. Unique dimeric structure of BNip3 transmembrane domain suggests membrane permeabilization as a cell death trigger. *Journal of Biological Chemistry*, 282(22):16256–16266, 2007.
- [115] E. S. Sulistijo and K. R. MacKenzie. Structural basis for dimerization of the BNIP3 transmembrane domain. *Biochemistry*, 48(23):5106–5120, 2009.
- [116] J. Zhang and P. A. Ney. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death and Differentiation*, 16(7):939–946, 2009.
- [117] Y. Zhu, A. Y. Rudensky, A. L. Corper, L. Teyton, and I. A. Wilson. Crystal structure of MHC class II I-Ab in complex with a human CLIP peptide: Prediction of an I-Ab peptide-binding motif. *Journal of Molecular Biology*, 326(4):1157–1174, 2003.
- [118] E. O’Shea, J. Klemm, P. Kim, and T. Alber. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science*, 254(5031):539–544, 1991.
- [119] K. Talbert-Slagle and D. DiMaio. The bovine papillomavirus E5 protein and the PDGF beta receptor: It takes two to tango. *Virology*, 384(2):345–351, 2009.
- [120] A. Staebler, J. H. Pierce, S. Brazinski, M. A. Heidarani, W. Li, R. Schlegel, and D. J. Goldstein. Mutational analysis of the beta-type platelet-derived growth factor receptor defines the site of interaction with the bovine papillomavirus type 1 E5 transforming protein. *Journal of virology*, 69(10):6507–17, 1995.
- [121] D. Windisch, S. Hoffmann, S. Afonin, S. Vollmer, S. Benamira, B. Langer, J. Bürck, C. Muhle-Goll, and A. S. Ulrich. Structural Role

- of the Conserved Cysteines in the Dimerization of the Viral Transmembrane Oncoprotein E5. *Biophysical Journal*, 99(6):1764–1772, 2010.
- [122] A. Venuti, F. Paolini, L. Nasir, A. Corteggio, S. Roperto, M. S. Campo, and G. Borzacchiello. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Molecular Cancer*, 10(1):140, 2011.
- [123] G. King, J. Oates, D. Patel, H. A. Van Den Berg, and A. M. Dixon. Towards a structural understanding of the smallest known oncoprotein: Investigation of the bovine papillomavirus E5 protein using solution-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(6):1493–1501, 2011.
- [124] D. DiMaio and L. M. Petti. The E5 proteins. *Virology*, 445(1-2):99–114, 2013.
- [125] J. Bu, P. Wadhvani, S. Fangha, and A. S. Ulrich. Oriented Circular Dichroism: A Method to Characterize Membrane- Active Peptides in Oriented Lipid Bilayers. *Accounts of chemical research*, 49:184–192, 2016.
- [126] S. N. Constantinescu, X. Liu, W. Beyer, A. Fallon, S. Shekar, Y. I. Henis, S. O. Smith, and H. F. Lodish. Activation of the erythropoietin receptor by the gp55-P viral envelope protein is determined by a single amino acid in its transmembrane domain. *EMBO Journal*, 18(12):3334–3347, 1999.
- [127] F. Cymer and D. Schneider. Transmembrane helix-helix interactions involved in ErbB receptor signaling. *Cell Adhesion and Migration*, 4(2):299–312, 2010.
- [128] B. North, L. Cristian, X. Fu Stowell, J. D. Lear, J. G. Saven, and W. F. DeGrado. Characterization of a Membrane Protein Folding Motif, the Ser Zipper, Using Designed Peptides. *Journal of Molecular Biology*, 359(4):930–939, 2006.

- [129] A. Senes, I. Ubarretxena-Belandia, and D. M. Engelman. The C – H...O hydrogen bond: A determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16):9056–9061, 2001.
- [130] S. H. White and W. C. Wimley. Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28(1):319–365, 1999.
- [131] W. C. Wimley and S. H. White. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nature Structural & Molecular Biology*, 3(10):842–848, 1996.
- [132] F. Jähnig. Thermodynamics and kinetics of protein incorporation into membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80:3691–3695, 1983.
- [133] W. C. Wimley, K. Gawrisch, T. P. Creamer, and S. H. White. Direct measurement of salt-bridge solvation energies using a peptide model system: implications for protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(7):2985–2990, 1996.
- [134] J. P. Dawson, J. S. Weinger, and D. M. Engelman. Motifs of serine and threonine can drive association of transmembrane helices. *Journal of Molecular Biology*, 316(3):799–805, 2002.
- [135] J. P. Dawson, R. A. Melnyk, C. M. Deber, and D. M. Engelman. Sequence context strongly modulates association of polar residues in transmembrane helices. *Journal of Molecular Biology*, 331(1):255–262, 2003.
- [136] H. Gratkowski, J. D. Lear, and W. F. DeGrado. Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3):880–885, 2001.

- [137] F. X. Zhou, H. J. Merianos, A. T. Brunger, and D. M. Engelman. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5):2250–2255, 2001.
- [138] R. Mesibov and J. Adler. Chemotaxis toward amino-acids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 112(1):315, 1972.
- [139] J. J. Falke and S. H. Kim. Structure of a conserved receptor domain that regulates kinase activity: The cytoplasmic domain of bacterial taxis receptors. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(4):462–469, 2000.
- [140] D. L. Milligan and D. E. Koshland. Site-directed cross-linking. Establishing the dimeric structure of the aspartate receptor of bacterial chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 263(13):6268–6275, 1988.
- [141] M. E. Call, J. R. Schnell, C. Xu, R. A. Lutz, J. J. Chou, and K. W. Wucherpfennig. The Structure of the $\alpha\alpha$ Transmembrane Dimer Reveals Features Essential for Its Assembly with the T Cell Receptor. *Cell*, 127(2):355–368, 2006.
- [142] K. Knoblich, S. Park, M. Lutfi, L. van't Hag, C. E. Conn, S. A. Seabrook, J. Newman, P. E. Czabotar, W. Im, M. E. Call, and M. J. Call. Transmembrane Complexes of DAP12 Crystallized in Lipid Membranes Provide Insights into Control of Oligomerization in Immunoreceptor Assembly. *Cell Reports*, 11(8):1184–1192, 2015.
- [143] M. E. Call, K. W. Wucherpfennig, and J. J. Chou. The structural basis for intramembrane assembly of an activating immunoreceptor complex. *Nature Immunology*, 11(11):1023–1029, 2010.
- [144] T. S. Ulmer. Structural basis of transmembrane domain interactions in integrin signaling. *Cell Adhesion and Migration*, 4(2):243–248, 2010.

- [145] J. Liu, Z. Wang, A. Thinn, Y. Ma, and J. Zhu. The dual structural roles of the membrane distal region of the alpha-integrin cytoplasmic tail during integrin inside-out activation. *Journal of Cell Science*, 128(9):1718–1731, 2015.
- [146] R. Li, R. Gorelik, V. Nanda, P. B. Law, J. D. Lear, W. F. DeGrado, and J. S. Bennett. Dimerization of the transmembrane domain of integrin αIIb subunit in cell membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25):26666–26673, 2004.
- [147] M. Kim. Bidirectional Transmembrane Signaling by Cytoplasmic Domain Separation in Integrins. *Science*, 301(5640):1720–1725, 2003.
- [148] J. S. Bennett. Structure and function of the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. *Journal of Clinical Investigation*, 115(12):3363–3369, 2005.
- [149] D. Schneider and D. M. Engelman. Involvement of Transmembrane Domain Interactions in Signal Transduction by α/β Integrins. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11):9840–9846, 2004.
- [150] W. Li, D. G. Metcalf, R. Gorelik, R. Li, N. Mitra, V. Nanda, P. B. Law, J. D. Lear, W. F. Degrado, and J. S. Bennett. A push-pull mechanism for regulating integrin function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5):1424–9, 2005.
- [151] T.-L. Lau, C. Kim, M. H. Ginsberg, and T. S. Ulmer. The structure of the integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *The EMBO Journal*, 28(9):1351–1361, 2009.
- [152] N. F. Endres, R. Das, A. W. Smith, A. Arkhipov, E. Kovacs, Y. Huang, J. G. Pelton, Y. Shan, D. E. Shaw, D. E. Wemmer, J. T. Groves, and J. Kuriyan. Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor. *Cell*, 152(3):543–556, 2013.

- [153] E. V. Bocharov, D. M. Lesovoy, K. V. Pavlov, Y. E. Pustovalova, O. V. Bocharova, and A. S. Arseniev. Alternative packing of EGFR transmembrane domain suggests that protein-lipid interactions underlie signal conduction across membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(6):1254–1261, 2016.
- [154] K. S. Mineev, E. V. Bocharov, Y. E. Pustovalova, O. V. Bocharova, V. V. Chupin, and A. S. Arseniev. Spatial Structure of the Transmembrane Domain Heterodimer of ErbB1 and ErbB2 Receptor Tyrosine Kinases. *Journal of Molecular Biology*, 400(2):231–243, 2010.
- [155] E. V. Bocharov, K. S. Mineev, M. V. Goncharuk, and A. S. Arseniev. Structural and thermodynamic insight into the process of "weak" dimerization of the ErbB4 transmembrane domain by solution NMR. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(9):2158–2170, 2012.
- [156] C. C. Valley, A. K. Lewis, and J. N. Sachs. Piecing it together: Unraveling the elusive structure-function relationship in single-pass membrane receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1859(9):1398–1416, 2017.
- [157] P. E. Bragin, K. S. Mineev, O. V. Bocharova, P. E. Volynsky, E. V. Bocharov, and A. S. Arseniev. HER2 Transmembrane Domain Dimerization Coupled with Self-Association of Membrane-Embedded Cytoplasmic Juxtamembrane Regions. *Journal of Molecular Biology*, 428(1):52–61, 2016.
- [158] J. M. Mendrola, M. B. Berger, M. C. King, and M. A. Lemmon. The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7):4704–4712, 2002.
- [159] S. J. Fleishman, J. Schlessinger, and N. Ben-Tal. A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25):15937–15940, 2002.
- [160] E. V. Bocharov, K. S. Mineev, P. E. Volynsky, Y. S. Ermolyuk, E. N. Tkach, A. G. Sobol, V. V. Chupin, M. P. Kirpichnikov, R. G. Efremov, and A. S. Arseniev. Spatial structure of the dimeric transmembrane domain of the growth factor receptor ErbB2 presumably corresponding to the receptor active state. *Journal of Biological Chemistry*, 283(11):6950–6956, 2008.
- [161] D. B. Weiner, J. Liu, J. A. Cohen, W. V. Williams, and M. I. Greene. A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature*, 339(6221):230–1, 1989.
- [162] C. I. Bargmann, M. C. Hung, and R. A. Weinberg. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell*, 45(5):649–657, 1986.
- [163] K. S. Mineev, N. F. Khabibullina, E. N. Lyukmanova, D. A. Dolgikh, M. P. Kirpichnikov, and A. S. Arseniev. Spatial structure and dimer-monomer equilibrium of the ErbB3 transmembrane domain in DPC micelles. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(8):2081–2088, 2011.
- [164] A. M. Hall, B. Gollan, and S. Helaine. Toxin-Antitoxin systems: reversible toxicity. *Current Opinion in Microbiology*, 36:102–110, 2017.
- [165] T. Hirokawa, S. Boon-Chieng, and S. Mitaku. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, 14(4):378–379, 1998.
- [166] K. Hofmann and W. Stoffel. TMbase—a database of membrane spanning proteins segments. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 347(166), 1993.

- [167] J. D. Lear, H. Gratkowski, L. Adamian, J. Liang, and W. F. DeGrado. Position-dependence of stabilizing polar interactions of asparagine in transmembrane helical bundles. *Biochemistry*, 42(21):6400–6407, 2003.
- [168] E. Lindner and D. Langosch. A ToxR-Based Dominant-Negative System to Investigate Heterotypic Transmembrane Domain Interactions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65:803–807, 2006.
- [169] M. Berditsch, H. Lux, O. Babii, S. Afonin, and A. S. Ulrich. Therapeutic potential of gramicidin S in the treatment of root canal infections. *Pharmaceuticals*, 9(3):1–14, 2016.
- [170] P. Atkins and J. de Paula. *Physikalische Chemie*. Wiley VCH, Weinheim, 4. edition, 2006.
- [171] A. S. Ladokhin, W. C. Wimley, and S. H. White. Leakage of membrane vesicle contents: determination of mechanism using fluorescence quenching. *Biophysical Journal*, 69(5):1964–71, 1995.
- [172] J. Bürck. Circular dichroism, Vorlesung KIT, 2016.
- [173] S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751:119–139, 2005.
- [174] N. Berova, K. Nakanishi, and R. W. Woody. *Circular Dichroism: Principles and Applications*. Wiley-VCH, New York, 2000.
- [175] J. Bürck, S. Roth, P. Wadhvani, S. Afonin, N. Kanithasen, E. Strandberg, and A. S. Ulrich. Conformation and membrane orientation of amphiphilic helical peptides by oriented circular dichroism. *Biophysical Journal*, 95(8):3872–3881, 2008.
- [176] F.-Y. Chen, M.-T. Lee, and H. W. Huang. Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin. *Biophysical Journal*, 82(2):908–14, 2002.

- [177] L. Whitmore and B. A. Wallace. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers*, 89(5):392–400, 2008.
- [178] L. Whitmore and B. A. Wallace. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research*, 32(WEB SERVER ISS.):668–673, 2004.
- [179] H. Friebolin. *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung*. Wiley-VCH Verlag, 4. edition, 2006.
- [180] G. S. Rule and K. T. Hitchens. *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*. Springer, 5. edition, 2006.
- [181] M. H. Levitt. *Spin Dynamics*. John Wiley & Sons, 2003.
- [182] M. Rance and R. Byrd. Obtaining high-fidelity powder spectra in anisotropic media: Phase-cycled Hahn echo spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 52:221–240, 1983.
- [183] G. Metz, X. L. Wu, and S. O. Smith. Ramped-Amplitude Cross Polarization in Magic-Angle-Spinning NMR. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, 110(2):219–227, 1993.
- [184] N. Sinha, C. V. Grant, C. H. Wu, A. A. De Angelis, S. Howell, and S. Opella. SPINAL modulated decoupling in high field double- and triple-resonance solid-state NMR experiments on stationary samples. *Journal of Magnetic Resonance*, 177(2):197–202, 2005.
- [185] J. Gidden, J. Denson, R. Liyanage, D. M. Ivey, and J. O. Lay. Lipid Compositions in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* During Growth as Determined by MALDI-TOF and TOF/TOF Mass Spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 283(1-3):178–184, 2009.

- [186] A. S. Ulrich, D. Windisch, C. Ziegler, and J. Bürck. Structural characterization of a C-terminally truncated E5 oncoprotein from papillomavirus in lipid bilayers. *Biological Chemistry*, 395(12):1443–1452, 2014.
- [187] S. Ruden, K. Hilpert, M. Berditsch, P. Wadhvani, and A. S. Ulrich. Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8):3538–3540, 2009.
- [188] K. R. M. T A Krulwich and D. S.-Y. S. Clejan. Membrane lipid composition of obligatively and facultatively alkalophilic strains of *Bacillus*. *Journal of Bacteriology*, 168(1):334–340, 1986.
- [189] D. Marsh. Energetics of Hydrophobic Matching in Lipid-Protein Interactions. *Biophysical Journal*, 94(10):3996–4013, 2008.
- [190] M. A. Lemmon, J. M. Flanagan, J. F. Hunt, B. D. Adair, B. J. Borrmann, C. E. Dempsey, and D. M. Engelman. Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices. *Journal of Biological Chemistry*, 267(11):7683–7689, 1992.
- [191] C. Schanzenbach, F. C. Schmidt, P. Breckner, M. G. Teese, and D. Langosch. Identifying ionic interactions within a membrane using BLaTM, a genetic tool to measure homo- and heterotypic transmembrane helix-helix interactions. *Scientific Reports*, 7(2016):43476, 2017.