

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere

Rolle polarer und ionisierbarer Aminosäuren  
bei der Interaktion membranständiger  $\alpha$ -Helices

Roswitha Jana Herrmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. D. Frischmann

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. D. Langosch
2. Univ.-Prof. Dr. W. Liebl

Die Dissertation wurde am 23.02.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 03.05.2010 angenommen.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Langosch für die Überlassung des Projekts, seine uneingeschränkte Unterstützung, die anregenden Diskussionen und die gewährten forschersichen Freiräume.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl bedanke ich mich für sein Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. Dr. Dmitrij Frishman gilt mein Dank für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ich bedanke mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Lehrstuhls für Chemie der Biopolymere für die stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors. Insbesondere möchte ich mich bei Stephanie Unterreitmeier, Johanna Panitz und Malte Ahrens für die wissenschaftlichen und darüber hinausgehenden Diskussionen, ihre hilfreichen Ideen sowie die schöne Zeit am Lehrstuhl und die gemeinsamen Erlebnisse bedanken. Stephanie Unterreitmeier gebührt zusätzlich Dank für die schnelle und aufmerksame Korrektur dieser Arbeit.

Barbara Rauscher danke ich für ihre hervorragende technische Hilfe, Ellen Sahmel-Schneider für ihre Unterstützung bei schwer beschaffbaren Artikeln und Angelika Fuchs für ihre exzellente Umsetzung der Datenbankanalyse sowie die fruchtbare Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen lieben Eltern bedanken, die mich auf meinem gesamten Lebensweg mit ihrer immerwährenden Unterstützung, ihrem Vertrauen und Verständnis begleitet haben und diese Arbeit dadurch erst ermöglichen.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Mann Marcus für die unzähligen schönen Momente die er mir schenkt, für sein Vertrauen und seinen Glauben an mich und vor allem für seine unerschöpfliche Liebe mit der er mir immer neue Kraft gibt.

**Vielen Dank!**

*Meinen Lieben*

*„Wer weit reise, sagte er, erfahre viele Dinge.*

*Ein paar davon über sich selbst.“*

*Aimé Bonpland*

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
1.1 Bedeutung von Membranen und Membranproteinen.....	3
1.2 Strukturelle Eigenschaften von Membranproteinen .....	4
1.3 Biogenese von Membranproteinen .....	5
1.4 Wechselwirkungen membranständiger $\alpha$ -Helices .....	8
1.4.1 Energetische Betrachtung der Interaktion von Transmembranhelices .....	9
1.4.2 Grundlegende Interaktionsmotive .....	11
1.4.3 Interagierende bitopische Membranproteine .....	12
1.4.4 Polare und ionisierbare Aminosäuren in Transmembranhelices .....	15
1.5 Interaktionsanalyse membranständiger $\alpha$ -Helices .....	16
<b>2 ZIEL DER ARBEIT</b> .....	<b>22</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>23</b>
3.1 Materialien.....	23
3.1.1 Allgemeine Chemikalien .....	23
3.1.2 Lösungen, Puffer und Medien.....	23
3.1.3 Bakterienstämme .....	23
3.1.4 Plasmide .....	24
3.1.5 Antibiotika .....	25
3.1.6 Enzyme und Antikörper .....	25
3.1.7 Größenstandards.....	26
3.1.8 Kit-Systeme und spezielle Verbrauchsreagenzien/-materialien .....	26
3.1.9 Oligonukleotide .....	26
3.1.10 Geräte und Software.....	28
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	29
3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen .....	29
3.2.2 Hitzeschocktransformation von <i>Escherichia coli</i> .....	30
3.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	30
3.2.4 Restriktionsverdau .....	31
3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	31
3.2.6 Isolierung von DNA aus Agarosegel.....	32

3.2.7	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	32
3.2.8	Kassettenklonierung .....	32
3.2.9	Auffüllen von 5'-Überhängen .....	33
3.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten .....	33
3.2.11	Ortsgerichtete Mutagenese .....	33
3.2.12	DNA-Sequenzierung .....	34
3.3	Protein- und Immunochemische Methoden.....	36
3.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	36
3.3.2	Western-Blotting und immunologische Detektion von ToxR-Proteinen .....	37
3.4	Analyse affiner Transmembrandomänen .....	38
3.4.1	ToxR-Assay zur Interaktionsanalyse von Transmembrandomänen .....	38
3.4.1.1	Analyse homotypischer TMD-TMD-Interaktion .....	38
3.4.1.2	Analyse heterotypischer TMD-TMD-Interaktion.....	38
3.4.1.3	Kultivierung ToxR-Protein exprimierender FHK12-Zellen.....	39
3.4.1.4	Messung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität infolge von TMD-TMD- Interaktion .....	40
3.4.2	PD28-Wachstumsassay zur Kontrolle der Membranintegration .....	41
3.4.3	Western-Blot-Analyse zur Kontrolle des Expressionslevels .....	42
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>43</b>
4.1	Verwendete Referenzkonstrukte .....	43
4.2	ToxR-Systeme zur Analyse heterotypisch interagierender Transmembrandomänen .....	44
4.2.1	Modifikation und Charakterisierung des dominant-negativen ToxR*- Kompetitorsystems .....	44
4.2.2	Positiver ToxR-Assay zur Analyse heterotypisch interagierender Transmembrandomänen .....	52
4.2.3	Zusammenfassung angewandter ToxR-Assays .....	56
4.3	Assoziation von Transmembrandomänen mit polaren und ionisierbaren Aminosäuren .....	59
4.3.1	Analyse der heterotypischen Interaktion von Transmembrandomänen mit Histidin .....	59
4.3.2	Mutationsanalyse hochaffiner Transmembrandomänen mit gegensätzlich ionisierbaren Aminosäuren .....	65
4.3.2.1	Ionisierbare Aminosäuren vermitteln die Interaktion artifiziereller Transmembrandomänen abhängig vom Sequenzkontext .....	65
4.3.2.2	Ionisierbare Aminosäuren fördern die Interaktion einer Oligo-Leucin- Sequenz.....	70
4.3.2.3	Vorkommen von Motiven mit ionisierbaren Aminosäuren und GxxxG in natürlichen Transmembrandomänen .....	73
4.3.2.4	Heterotypische Interaktion von Oligo-Leucin-Sequenzen mit Motiven bestehend aus ionisierbaren Aminosäuren und GxxxG.....	75

---

<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>77</b>
5.1	Analyse heterotypisch interagierender Transmembrandomänen mittels ToxR-basierter Assays .....	77
5.1.1	Das dominant-negative ToxR*-Kompetitorsystem .....	77
5.1.2	Der positive 2-Plasmid gestützte ToxR-Assay .....	82
5.2	Polare und ionisierbare Aminosäuren fördern die Interaktion von Transmembrandomänen .....	85
5.2.1	Histidin-vermittelte Interaktion von Transmembrandomänen .....	85
5.2.1.1	Potentielle Mechanismen der Stabilisierung interagierender Transmembrandomänen durch Histidin .....	85
5.2.1.2	Histidin in natürlichen Transmembrandomänen .....	86
5.2.2	Interaktion von Transmembrandomänen durch Wechselwirkung gegensätzlich ionisierbarer Aminosäuren .....	89
5.2.2.1	Potentielle Mechanismen der Stabilisierung interagierender Transmembrandomänen durch gegensätzlich ionisierbare Aminosäuren .....	89
5.2.2.2	Ionisierbare Aminosäuren in natürlichen Transmembrandomänen .....	91
5.2.3	Zusammenspiel molekularer Kräfte bei der Interaktion von Transmembrandomänen .....	94
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick .....	95
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>98</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>112</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>114</b>
	<b>ANHANG A</b> <b>ABBILDUNGEN</b> .....	<b>115</b>
	<b>ANHANG B</b> <b>TABELLEN</b> .....	<b>121</b>
	<b>EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN</b> .....	<b>125</b>
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>126</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
A <sub>x</sub>	Absorption bei x nm
Å	Angström (1 Å = 0,1 nm)
Abb.	Abbildung
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
APP	Amyloid Precursor Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>araBAD</i>	Promotor des Arabinose-Operons
as; anti	antisense
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-inoxylphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
BNIP3	Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cal	Kalorie (1 cal = 4,19 Joule)
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen
Cm	Chloramphenicol
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
C-terminal	carboxyterminal
<i>ctx</i>	Choleratoxin-Promotor
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ε	Dielektrizitätskonstante
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eph	Erythropoietin producing hepatocellular receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
for	forward
g	Gramm
GP	Glykoprotein
GpA	Glykophorin A
h	Stunde(n)
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
IRD	Infrarotfarbstoff
k	kilo (1 x 10 <sup>3</sup> )

Km <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
l	Liter
LB	Luria-Bertani
<i>lacZ</i>	β-Galaktosidase-Gen
M	molar
MalE	Maltosebindeprotein
MalE <sup>-</sup>	Maltosebindeprotein-Defizienz
MBP	Maltosebindeprotein
MHCII	Major Histocompatibility Complex Class II Proteine
min	Minute(n)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
N-terminal	aminoterminal
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x nm
OmpR	OmpR-Transkriptionsregulator
<i>ompU</i>	Promotor des äußeren Membranproteins OmpU
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid
<i>p</i>	Signifikanz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pc	Kontrollplasmid (plasmid control)
PDB	Protein Daten Bank
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pK <sub>a</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
POSSYCCAT	positive selection system based on chromosomally integrated chloramphenicol acetyltransferase
pToxRI – IX	ToxR(I – IX)-Plasmid
rev	reverse
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR	Signalerkennungspartikel-Rezeptor
SRP	Signalerkennungspartikel (signal reconition particle)
Tab.	Tabelle
TcpP	Toxin koregulierter Pilus Biosyntheseprotein P
TCR	T-Zell Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet <sup>R</sup>	Tetracyclin-Resistenz
TMD	Transmembrandomäne
<i>toxR</i>	konstitutiver Promotor des ToxR-Transkriptionsaktivators
ToxR	ToxR-Transkriptionsaktivator
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan



U	Reaktionseinheiten (Units)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
W	Watt
Wt	Wildtyp
°	Grad
°C	Grad Celsius
Ω	Kreuzungswinkel Omega
%	Prozent (1 % = 0,01)
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

## IUB-Code der Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

## Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

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

## Zusammenfassung

Bei der Faltung und Oligomerisierung integraler Membranproteine spielt die spezifische Interaktion  $\alpha$ -helikaler Transmembrandomänen eine wesentliche Rolle. Die an der Kontaktfläche der Helices befindlichen Aminosäuren können die Assoziation der Transmembrandomänen dabei durch van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und möglicherweise ionische Wechselwirkungen vermitteln. Die Bedeutung der beiden letztgenannten molekularen Kräfte für die Interaktion membranständiger  $\alpha$ -Helices wurde hier mit Hilfe artifizierlicher, hochaffiner Transmembrandomänen, welche aus einer Bank partiell randomisierter Sequenzen stammen, charakterisiert.

Dazu wurden zunächst auf Basis des ToxR-Systems zwei sich ergänzende Methoden etabliert, mit denen die heterotypische Interaktion verschiedener Reste der Partnerhelices untersucht werden kann. Der dominant-negative ToxR\*-Assay beruht auf der Konkurrenz zwischen der homotypischen und heterotypischen Assoziation beteiligter Interaktionspartner. Diese Konkurrenz kann aufgrund der Fusion der einen Transmembransequenz an eine aktive und der zweiten Transmembransequenz an eine inaktive ToxR-Transkriptionsaktivator-Domäne anhand der Reporterexpression nachvollzogen werden. Da nur transkriptionell aktive Homooligomere zur Expression des Reportergens beitragen, äußert sich die Ausbildung von Heteromeren in einer reduzierten Reporterenzymaktivität. Das bestehende ToxR\*-System wurde so modifiziert, dass i) die sequenzspezifische heterotypische Interaktion von Transmembrandomänen detektierbar ist, ii) die Interaktionspartner unabhängig voneinander exprimiert und iii) ihre Expressionslevel durch Western-Blot-Analyse überprüft werden können. Zur Untersuchung von Transmembrandomänen, die nur mit geringer Selbstaffinität interagieren, wurde ein weiterer Assay entwickelt, bei dem beide Transmembransequenzen an eine aktive ToxR-Domäne gekoppelt sind. Weisen die Heteromere eine höhere Affinität als die Homomere auf, kommt es bei der Koexpression der Proteine zu einer höheren Reporterenzymaktivität als bei ihrer getrennten Expression.

Die umfangreiche Mutationsanalyse hochaffiner Transmembrandomänen mit ionisierbaren und/oder polaren Aminosäuren sowie die Rekonstruktion potentieller Interaktionsmotive zeigten, dass Histidin die Interaktion von Transmembrandomänen fördert, indem es mit kleinen, hydroxylierten Aminosäuren der Nachbarhelix in Wechselwirkung tritt. Weiterhin sind gegensätzlich ionisierbare Aminosäuren in der Lage, sowohl die homotypische als auch die heterotypische Assoziation von Transmembranhelices zu vermitteln. Ihre stabilisierende Funktion wird dabei zusätzlich durch angrenzende polare Aminosäuren verstärkt. Die interaktionsfördernde Eigenschaft von Histidin sowie von potentiell gegensätzlich geladenen Resten hängt jedoch maßgeblich von der Präsenz eines GxxxG-Motivs ab. Dies unterstreicht die Bedeutung des Sequenzkontextes für die Regulierung der Affinität

---

und Spezifität der Interaktion. Die Suche von Sequenzmotiven, bestehend aus einer ionisierbaren Aminosäure und einem GxxxG, in natürlichen Transmembrandomänen bitopischer Membranproteine hat bestätigt, dass diese Motive in natürlichen Transmembrandomänen überrepräsentiert sind. Die Analyse der heterotypischen Assoziation Motiv-haltiger Modell-Transmembranhelices legt zudem nahe, dass einige davon auch zu deren Interaktion beitragen können. Ferner gibt es bitopische Membranproteine, deren Transmembrandomänen durch Wechselwirkung von Histidin mit hydroxylierten Aminosäuren assoziieren. Folglich spielen starke elektrostatische Wechselwirkungen bei der Interaktion natürlicher, membranständiger  $\alpha$ -Helices durchaus eine Rolle, vorausgesetzt der Sequenzkontext begünstigt ihre Ausbildung.

# 1 Einleitung

## 1.1 Bedeutung von Membranen und Membranproteinen

Membranen bilden die Begrenzung der grundlegenden Struktur- und Funktionseinheiten von Organismen, den Zellen, und unterteilen deren Inhalt in Kompartimente. Sie gewährleisten die Aufrechterhaltung bestimmter physikochemischer Bedingungen in den geschaffenen Reaktionsräumen und erlauben somit den gleichzeitigen Ablauf zahlreicher verschiedener Prozesse innerhalb einer einzelnen Zelle. Auf diese Weise war die Entwicklung hochkomplexer Lebensformen möglich. Das Grundgerüst biologischer Membranen bilden Lipide. Dabei handelt es sich um Makromoleküle die aus einem unpolaren (Acylketten) und einem polaren Teil (z.B. Glycerin + Phosphatgruppe + Alkohol) bestehen. Aufgrund ihres amphipatischen Charakters ordnen sich Lipide in wässriger Umgebung spontan zu geschlossenen Doppelschichten an. Dort weist ihr unpolarer, hydrophober Teil nach innen und ihr polarer, hydrophiler Teil ist dem Wasser zugewandt. Da sich die Lipide in einer solchen Doppelschicht entsprechend ihrer Freiheitsgrade bewegen, werden Membranen als zweidimensionale, viskose Flüssigkeiten betrachtet [1], deren Dicke etwa 60 Å beträgt. Dabei ist der hydrophobe Kern der Membran mit den Acylketten etwa 30 Å stark und die hydrophilen Grenzregionen mit den hydratisierten Lipidkopfgruppen sind jeweils ca. 15 Å dick [2,3]. Diese Abmessungen sind jedoch keineswegs als starre Größen anzusehen, da die Dicke einer Membran aufgrund thermischer Fluktuationen sowie in Abhängigkeit der Lipidzusammensetzung schwankt. Die Grenzregionen machen demzufolge rund 50 % der gesamten Membran aus und tragen entscheidend zu ihrer chemischen Heterogenität bei. Dies spiegelt sich z.B. in einem Polaritätsgefälle zwischen den Membranrändern und ihrer Mitte wider. Die Polarität eines Milieus kann mit Hilfe der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  beschrieben werden. In der Kopfgruppenregion entspricht  $\epsilon$  einem Wert von etwa 18 [2], und im hydrophoben Kern der Membran ist  $\epsilon$  ca. zwei [4]. Zum Vergleich, Wasser weist ein  $\epsilon$  von 80 auf. Auch in Bezug auf die Verteilung verschiedener Lipidspezies, die sich beispielsweise in ihrer Kopfgruppe unterscheiden, sind biologische Membranen heterogen aufgebaut. So sind in der zytoplasmatischen Einzelschicht zellulärer Membranen vor allem anionische Lipide angereichert [5].

In das sehr komplexe, hochdynamische Lipidgrundgerüst biologischer Membranen ist eine Vielzahl verschiedener Proteine mosaikartig eingelagert, welche durch die Membran flotieren können [1]. Die Genomanalyse verschiedener Spezies ergab, dass 20 % bis 30 % aller bekannten Gene für Membranproteine kodieren [6,7]. Dies unterstreicht die Bedeutung dieser Proteinklasse für die Funktion von Zellen. Membranproteine ermöglichen u. a. den gerichteten Stoff- und Informationsaustausch sowie die Energiegewinnung über die ansonsten relativ undurchlässige Membran. Lediglich hydrophobe Moleküle lösen sich in Membranen und können diese ohne Weiteres passieren. Der Austausch

hydrophiler Stoffe wie Ionen wird durch selektive Ionenkanäle oder -pumpen gesteuert [8,9]. Dies spielt z.B. bei der Weiterleitung von Aktionspotentialen in Nervenzellen eine wichtige Rolle. Membranständige Proteine vermitteln auch die Weitergabe von Signalen über die Membran. Rezeptoren von Wachstumsfaktoren beeinflussen beispielsweise die Entwicklung von Zellen, indem sie an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt sind [10]. Ferner nehmen Zellen über Membranproteine Kontakt zu benachbarten Zellen oder zur extrazellulären Matrix auf. Zu solchen Adhäsionsproteinen gehören u. a. Cadherine [11] und Integrine [12]. Sie liefern Zellen Informationen aus dem umliegenden Gewebe und beeinflussen so Zellmorphologie und -bewegung bzw. tragen zu ihrer Verankerung im Zellverbund bei. Membranen sind außerdem der Ort energieliefernder Stoffwechselwege. Sowohl bei der Photosynthese als auch bei der Zellatmung sind Membranproteine verantwortlich für die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie bzw. die Umwandlung chemischer Energie organischer Verbindungen in für die Zelle nutzbare Energie [13,14]. Diese kleine Auswahl an Beispielen soll verdeutlichen, dass Membranproteine in nahezu alle wichtigen zellulären Abläufe involviert sind. Daher verwundert es auch nicht, dass etwa 70 % aller Targets in der Arzneimittelforschung Membranproteine darstellen [15].

## 1.2 Strukturelle Eigenschaften von Membranproteinen

Generell wird zwischen peripheren und integralen Membranproteinen unterschieden. Periphere Membranproteine assoziieren über hydrophobe Wechselwirkungen (mit den Acylketten) oder durch elektrostatische Interaktion (mit den Lipidkopfgruppen) mit der Membranoberfläche. In manchen Fällen sind solche Proteine auch durch die kovalente Kopplung an ein Lipid oder eine Fettsäure in der Membran verankert. Proteine, die durch Interaktion mit integralen Membranproteinen mit der Membran in Kontakt stehen, werden ebenso zu den peripheren Membranproteinen gezählt. Integrale Membranproteine hingegen durchspannen beide Einzelschichten einer Membran. Ihr in die Membran eingebetteter Teil weist zumeist eine  $\alpha$ -helikale oder eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur auf. Komplette ungefaltete Polypeptide könnten aufgrund des polaren Charakters ihres Rückgrats nicht stabil in den hydrophoben Kern einer Membran integriert werden. Dies würde bei einem 20 Aminosäuren langen Abschnitt einen energetischen Aufwand von 80 bis 100 kcal/mol erfordern [2] und wäre somit energetisch sehr ungünstig. Kürzere ungefaltete Bereiche kommen allerdings durchaus in Membranproteinen vor [16], z.B. bei geknickten Helices und als Unterbrechungen helikaler Strukturen. Sie sind u. a. für die Funktion von Transportern und Kanälen wichtig, indem sie ihnen Flexibilität und Polarität verleihen.

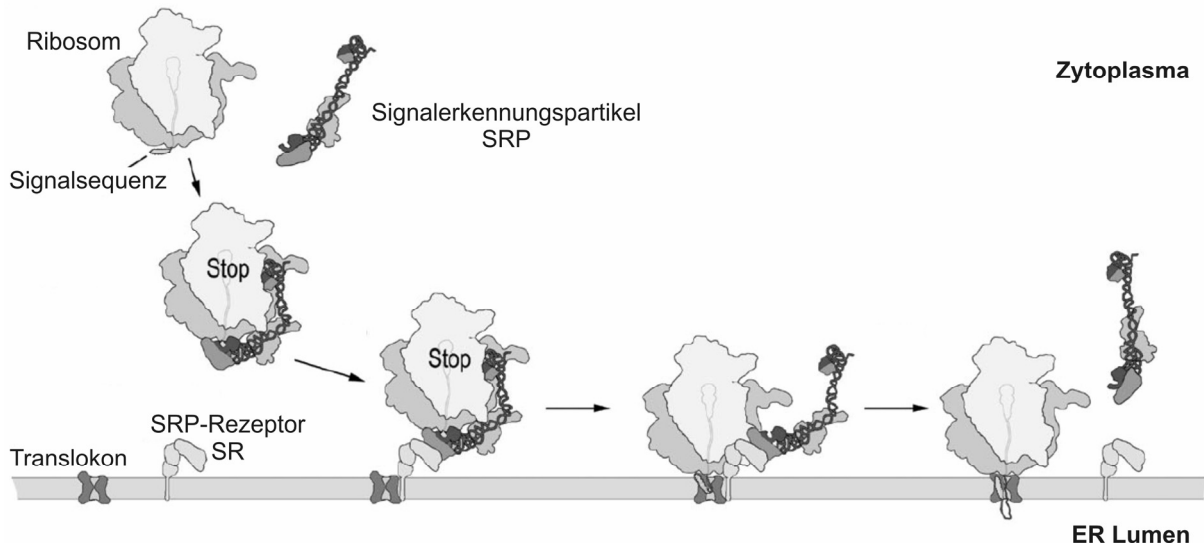
In einer  $\alpha$ -Helix nimmt die Polypeptidkette eine rechtshändige, schraubenförmige Anordnung ein, in der jede Aminosäure zur vorhergehenden um ca.  $100^\circ$  versetzt ist. Eine vollständige Windung umfasst demnach 3,6 Reste und die axiale Verschiebung zwischen zwei Aminosäuren misst  $1,5 \text{ \AA}$ . Die  $\alpha$ -Helix

wird durch intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen dem Carbonylsauerstoff der  $i$ -ten und dem Amidproton der  $(i+4)$ -ten Aminosäure stabilisiert. Dadurch ist das Wasserstoffbrückenpotential des Polypeptidrückgrats maximal abgesättigt und dessen Einbringung in eine hydrophobe Umgebung tolerierbar. Die durchschnittliche Länge einer membranständigen  $\alpha$ -Helix beträgt 20 bis 25 Aminosäuren, die zumeist hydrophob sind [17-20]. Integrale Membranproteine mit einer  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomäne (TMD) werden als bitopisch bezeichnet. Besitzen sie mehrere TMDn gelten sie als polytopisch.

In einem  $\beta$ -Faltblatt verlaufen benachbarte  $\beta$ -Stränge parallel oder antiparallel zueinander und interagieren über intermolekulare Wasserstoffbrücken. Da in einem  $\beta$ -Strang der Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aminosäuren 3,3 Å beträgt [2], könnte ein Abschnitt von ca. zehn Resten eine Membran einmal durchspannen [20]. Um jedoch das Wasserstoffbrückenpotential des Polypeptidrückgrats optimal abzudecken, ordnen sich  $\beta$ -Stränge in Membranen antiparallel zu einer zylindrischen  $\beta$ -Faßstruktur an. In dieser Struktur weisen hydrophobe Aminosäureseitenketten nach außen zu den Lipiden und hydrophile Seitenketten nach innen [20]. Proteine mit einer  $\beta$ -Faß-Faltung bilden auf diese Weise wassergefüllte Kanäle in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien sowie von Chloroplasten und Mitochondrien. Proteine mit  $\alpha$ -helikalen TMDn sind zahlreicher als  $\beta$ -Fässer und kommen in allen zellulären Membranen vor. Auch das Spektrum ihrer Faltungen und Funktionen ist größer.

### 1.3 Biogenese von Membranproteinen

Analog zu löslichen Proteinen findet auch bei Membranproteinen die Synthese der Polypeptidkette am Ribosom statt. Obwohl kleine Membranproteine mit einer TMD auch spontan in die Membran insertieren können [21], werden die meisten Membranproteine nicht direkt in das Zytoplasma freigesetzt. Dies würde aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften zur inkorrekten Faltung und Aggregation führen. Stattdessen werden die  $\alpha$ -helikalen TMDn meist noch während der Synthese des Proteins (kotranslational) mit Hilfe einer komplexen Translokationsmaschinerie in die Membran integriert (Abb. 1.1). Der Prozess der Insertion von Proteinen in die innere Bakterienmembran sowie in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) von Eukaryoten läuft dabei ähnlich ab und ist u. a. in [22-24] ausführlich beschrieben. In einem ersten Schritt bindet ein Signalerkennungspartikel (SRP, *signal recognition particle*) die N-terminale Signalsequenz bzw. die erste TMD, sobald diese das Ribosom verlässt. In Eukaryoten resultiert diese Interaktion im Arrest der Translation. Nach Bindung des SRPs an seinen membranassoziierten Rezeptor (SR; in Prokaryoten: FtsY) wird das Ribosom mit der entstehenden Polypeptidkette zum Translokon transferiert und der Arrest der Translation durch die Freisetzung des SRP aufgehoben. Bei dem Translokon handelt es sich um einen



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der kotranslationalen Translokation einer naszierenden Polypeptidkette.**

Das Signalerkennungspartikel (SRP) bindet an das Ribosom und an die aus dem Ribosom austretende Signalsequenz. In Eukaryoten führt dies zum vorübergehenden Arrest der Translation. Durch Interaktion des SRPs mit seinem membranassoziierten Rezeptor (SR) wird das Ribosom in Membrannähe gebracht. Es folgen der Transfer des Ribosoms inkl. Polypeptidkette zum Translokon und die Dissoziation des SRPs von seinem Rezeptor. Die Translation wird fortgesetzt, so dass sich die Polypeptidkette durch das Translokon auf die andere Seite der Membran bewegt. Die Abb. wurde aus [25] entnommen und modifiziert.

Komplex, der aus drei verschiedenen Untereinheiten besteht und als Sec61 (Eukaryoten) oder SecYEG (Prokaryoten) bezeichnet wird. Es bildet einen Kanal, durch den die wachsende Polypeptidkette auf die andere Seite der Membran transferiert wird. Von oben betrachtet ähnelt die Struktur des Translokons einem „U“, welches sich vermutlich kontinuierlich öffnet und schließt. Somit wird das im wassergefüllten Kanal befindliche Polypeptid während seiner Translokation in regelmäßigen Intervallen direkt mit den Lipiden der Membran in Kontakt gebracht. Ausreichend hydrophobe Segmente (Signalsequenz, TMDn) können das Translokon durch die laterale Öffnung des U-förmigen Gebildes verlassen und in die Membran austreten. Bei der Biogenese polytopischer Membranproteine werden die TMDn vermutlich nacheinander oder paarweise aus dem Translokon freigesetzt.

Entscheidend für die Membraninsertion ist höchstwahrscheinlich nur die Interaktion des betreffenden (bereits gefalteten) Proteinabschnitts mit den Lipiden [26,27]. D.h. das Kriterium, nach dem eine TMD als solche erkannt und in die Membran entlassen wird, ist seine Aminosäuresequenz selbst. Für die Verteilung eines Segments zwischen wässrigem Milieu und Membran spielen vor allem der hydrophobe Effekt (Zusammenlagerung unpolarer Moleküle in polarer Umgebung) sowie der energetische Aufwand für das Abstreifen der Hydrathülle des Polypeptidrückgrats und dessen Einbringung in die Membran eine Rolle. Einen kleineren, aber nicht zu vernachlässigenden Beitrag dazu liefern auch Wechselwirkungen zwischen terminal lokalisierten ionisierbaren Aminosäuren und den Lipidkopfgruppen, die Einschränkung von Freiheitsgraden des Proteins sowie die Beeinflussung der Lipid-

moleküle durch die TMD. Solange der Gewinn freier Energie infolge der Insertion hydrophober Reste in den hydrophoben Kern der Membran die Kosten der Insertion polarer oder ionisierbarer Reste übersteigt, können sogar diese in die Membran integriert werden. Eine detaillierte Beschreibung der jeweiligen energetischen Faktoren, die ausschlaggebend für die Membranintegration von TMDn sind, ist in [2] zu finden.

In Bakterien gibt es neben dem oben beschriebenen, auf SecYEG basierenden Mechanismus auch alternative Wege der Insertion von Proteinen in die innere Membran. Vor allem Membranproteine mit großen periplasmatischen Loops bedürfen der Hilfe des ATP-getriebenen Motorproteins SecA, welches mit dem Translokon interagiert und die treibende Kraft für den Translokationsprozess darstellt [23]. Weiterhin kann YidC im Zusammenspiel mit SecYEG, aber auch vollkommen eigenständig, die Integration von Membranproteinen vermitteln. Der genaue Aktionsmechanismus von YidC ist jedoch noch unklar. Es könnte als membranständiges Chaperon die Faltung und Assemblierung multimerer Komplexe während und nach ihrer Synthese unterstützen [23,28].

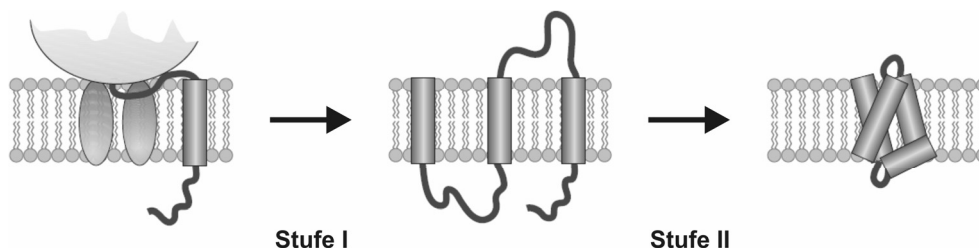
Im Gegensatz zur Signalsequenz, deren N-Terminus sich auf der zytoplasmatischen Seite der Membran befindet [24], kann die Orientierung  $\alpha$ -helikaler TMDn variieren. Maßgeblich für die Ausrichtung einer TMD ist vor allem die Verteilung positiv ionisierbarer Aminosäuren in den die TMD flankierenden Bereichen. Das gehäufte Auftreten positiv geladener Reste in zytoplasmatischen Domänen („*Positive-Inside Rule*“) wurde zuerst bei bakteriellen Membranproteinen beobachtet [29], trifft aber ebenso auf eukaryotische Membranproteine zu [30]. Die topogene Wirkung dieser Aminosäurespezies wird spätestens dadurch verdeutlicht, dass sich die Membranproteintopologie durch Veränderung der Ladungsverteilung umkehren lässt [31,32]. Auch bei negativ geladenen Aminosäuren wurde ein topogener Effekt festgestellt. Dieser fällt allerdings sehr viel schwächer aus, denn nur eine große Anzahl negativ geladener Reste beeinflusst die Richtung der Membraninsertion [33]. Die vorläufige Orientierung einer TMD wird vermutlich durch die Interaktion der wachsenden Polypeptidkette mit dem Translokon bestimmt. Es gibt Hinweise darauf, dass gegensätzlich geladene Reste im Translokon und der TMD miteinander in Wechselwirkung treten und auf diese Weise positiv geladene Aminosäuren auf der zytoplasmatischen Seite zurückgehalten werden [34]. Die endgültige Orientierung eines Membranproteins nach seiner Freisetzung in die Membran wird hauptsächlich durch Protein-Lipid-Interaktionen gefestigt. Anionische Lipide, angereichert in der inneren Einzelschicht, tragen ebenfalls durch elektrostatische Interaktion zur Arretierung positiv geladener Aminosäuren an der zytoplasmatischen Membranoberfläche bei [35]. Gravierende Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der Membran können daher auch zur veränderten Topologie von Membranproteinen führen (zusammengefasst in [36]). Schließlich wird nicht nur der Prozess der Membranintegration, sondern auch die Ausrichtung von Proteinen in der Membran davon getrieben, den energetisch günstigsten Zustand für das Gesamtsystem aus Lipiden und Proteinen zu erreichen.



## 1.4 Wechselwirkungen membranständiger $\alpha$ -Helices

Voraussetzung für die Funktion von Proteinen ist ihre korrekte Faltung, d.h. die Ausbildung der Tertiärstruktur und bei multimeren Komplexen außerdem die Assoziation ihrer Untereinheiten zur intakten Quartärstruktur. Dies ist auch bei Membranproteinen der Fall. Wechselwirkungen zwischen ihren membraneingebetteten Segmenten sind daher oft essentiell für die Assemblierung des gesamten Proteins und haben somit unmittelbaren Einfluss auf dessen Funktionalität. Dabei spielen aber nicht nur permanente, sondern auch temporär auftretende Interaktionen eine Rolle, die z.B. den Aktivitätszustand des Proteins regulieren.

Die Faltung von Membranproteinen mit  $\alpha$ -helikalen TMDn kann im Wesentlichen auf zwei Stufen reduziert werden („*Two-Stage-Model*“ [37,38]). Die erste Stufe beinhaltet die Ausbildung unabhängiger helikaler Faltungseinheiten in der Membran und die zweite Stufe ihre laterale, sequenzspezifische Interaktion, die schließlich zur Assemblierung des funktionellen Proteins führt. Dieser vereinfachten Betrachtungsweise liegt die Annahme zugrunde, dass eine  $\alpha$ -Helix eine sehr stabile Struktur darstellt, sobald sie in die Membran integriert ist. Durch die niedrige Dielektrizität der Membran haben die intrahelikalen Wasserstoffbrücken einen stärkeren stabilisierenden Effekt auf TMDn als auf Helices in wässriger Umgebung (siehe auch Abschnitt 1.4.1). Das Aufbrechen dieser Wasserstoffbrückenbindungen und der damit verbundene Kontakt zwischen hydrophilen Gruppen des Polypeptidrückgrats und Lipiden wäre nur mit hohem Energieaufwand möglich. Daher wird davon ausgegangen, dass sich eine  $\alpha$ -Helix in der Membran nicht entfalten und somit das Polypeptid dort auch keine andere Struktur einnehmen kann. Ebenso scheint der Austritt der Helix in das wässrige Milieu unmöglich, da der hydrophobe Effekt die Einbettung hydrophober Aminosäureseitenketten in die Membran begünstigt. Demnach ist das Faltungsschicksal  $\alpha$ -helikaler TMDn als Konsequenz der Membraneigenschaften stark eingeschränkt.



**Abb. 1.2: Erweitertes „*Two-Stage-Model*“ der Membranproteinfaltung.**

In der ersten Stufe der Membranproteinfaltung kommt es zur Bildung stabiler  $\alpha$ -Helices in der Membran, getrieben durch den hydrophoben Effekt und die Ausbildung intrahelikaler Wasserstoffbrückenbindungen. Die Membraninsertion kann durch das Translokon vermittelt werden oder spontan geschehen. In der zweiten Stufe assemblieren die  $\alpha$ -Helices zu einem funktionellen Protein. Dies schließt die TMD-TMD-Interaktion und ggf. die Umorientierung der Helices sowie die Bindung von Kofaktoren ein. Die Abb. wurde aus [39] entnommen und modifiziert.

In einem erweiterten Modell umfasst die zweite Stufe nicht nur die Assoziation, sondern auch die mögliche Umorientierung der etablierten Helices, das Eintauchen zusätzlicher Abschnitte des Polypeptids in die Membran und gegebenenfalls die Bindung von Kofaktoren (Abb. 1.2) [39,40]. Auf die erste Stufe der Membranproteinfaltung, die Membranintegration, wurde bereits in Abschnitt 1.3 eingegangen. Im Folgenden soll die zweite Stufe betrachtet werden.

#### 1.4.1 Energetische Betrachtung der Interaktion von Transmembranhelices

Die für die TMD-TMD-Interaktion maßgeblichen zwischenmolekularen Kräfte, sind allesamt elektrostatischer Natur. Dazu zählen van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen. Die schwächsten Anziehungskräfte üben van-der-Waals-Interaktionen aus. Diese können zwischen permanenten Dipolen, permanenten und induzierten sowie zwischen induzierten Dipolen ausgebildet werden. Ihre Stärke hängt von der Polarität, der Polarisierbarkeit und dem Abstand der beteiligten Moleküle ab. Da ihre Energie mit der sechsten Potenz ihres Abstands abnimmt, wirken sie nur über kurze Distanzen. Dennoch sind van-der-Waals-Wechselwirkungen überaus wichtig für die Assemblierung von Membranproteinen, da sie zwischen allen Atomen und Molekülen (also auch allen Aminosäuretypen) entstehen und sich ihre Beiträge akkumulieren können [41]. Dies trifft vor allem dann zu, wenn die Oberflächen der TMDn über einen großen Bereich hinweg komplementär sind und somit ein enger Kontakt zwischen den Seitenketten und/oder den Polypeptidrückgraten der gegenüberliegenden Helices möglich ist. Wasserstoffbrückenbindungen sind stärker als van-der-Waals-Wechselwirkungen und entstehen zwischen zwei elektronegativen Atomen, die um ein Wasserstoffatom konkurrieren. Dabei ist das Wasserstoffatom kovalent an den Wasserstoffbrücken-Donor gebunden und trägt aufgrund der höheren Elektronegativität des Donoratoms eine positive Partialladung. Dadurch kann es zur gleichen Zeit mit einem zweiten elektronegativen Atom, dem Wasserstoffbrücken-Akzeptor, in Wechselwirkung treten. Länge und Stärke einer Wasserstoffbrücke hängen von der Elektronegativität von Donor und Akzeptor (Elektronegativität: Sauerstoff > Stickstoff > Kohlenstoff  $\approx$  Schwefel) sowie von ihrer geometrischen Ausrichtung zueinander ab [42]. Je elektronegativer die Atome sind und je optimaler sie (inkl. Wasserstoffatom) auf einer Linie liegen, umso kürzer und stärker ist ihre Bindung. In Membranproteinen können interhelikale Wasserstoffbrücken z.B. zwischen den Seitenketten polarer und/oder ionisierbarer Aminosäuren sowie zwischen  $C_{\alpha}$ -H-Atomen und Carbonylgruppen des benachbarten Polypeptidrückgrats bzw. polaren oder aromatischen Aminosäuren auftreten. Die stärkste nichtkovalente Interaktion findet zwischen Ionen statt. Sind die beteiligten Atome gegensätzlich geladen, ziehen diese sich gegenseitig an. Die Energie dieser Interaktion nimmt laut Coulombschem Gesetz umgekehrt proportional zu ihrem Abstand ab. Somit bestehen ionische Wechselwirkungen über eine größere Distanz als die zuvor beschriebenen Kräfte. Ob ionisierbare Aminosäuren in der Membran geladen oder ungeladen vorliegen, ist unklar

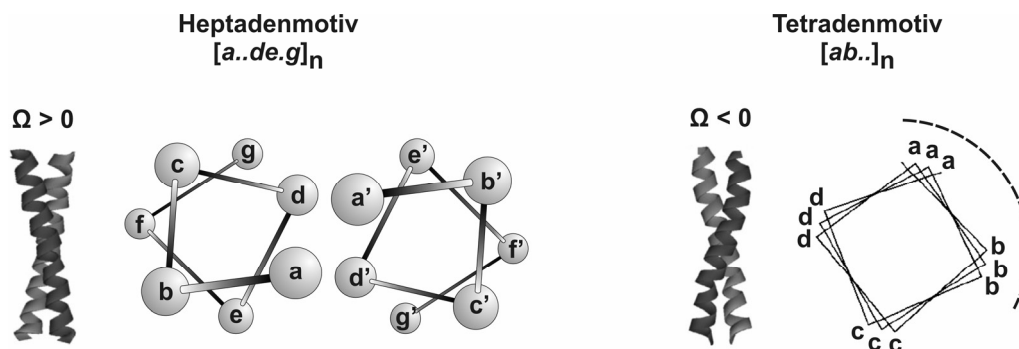
und hängt vermutlich stark von ihrem unmittelbaren Umfeld ab (Position in der Membran, in der Nähe befindliche funktionelle Gruppen). Generell können ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken zur erhöhten Stabilität einer durch van-der-Waals-Kräfte vermittelten TMD-TMD-Interaktion beitragen. Der relative Anteil der zusammenwirkenden Kräfte variiert und wird von der Aminosäurezusammensetzung und -sequenz bestimmt. Weiterhin ist anzumerken, dass sich die Stärke elektrostatischer Wechselwirkungen mit der Polarität (Dielektrizität  $\epsilon$ ) des umgebenden Milieus ändert. Je unpolarer das umgebende Lösungsmittel ist, desto stärker sind diese ausgeprägt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sowohl van-der-Waals-Wechselwirkungen als auch Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungen in der Membran stärker zur Geltung kommen als in wässriger Umgebung [42,43].

Neben den soeben betrachteten enthalpischen Komponenten spielen auch entropische Faktoren bei der Interaktion von TMDn eine entscheidende Rolle. Die Assoziation von Makromolekülen wird aufgrund der damit verbundenen Einschränkung ihrer Freiheitsgrade von einem Entropieverlust begleitet. Dieser wirkt sich energetisch ungünstig auf das Interaktionsgleichgewicht aus. Der Entropieverlust des Polypeptidrückgrats infolge von TMD-TMD-Interaktion ist jedoch relativ gering, da die TMDn bereits vor ihrer Assoziation  $\alpha$ -helikal gefaltet sind und mit einer relativ festgelegten Orientierung in der Membran vorliegen. Ferner wirkt sich der Verlust der Seitenketten-Entropie von Aminosäuren an der Kontaktfläche, durch Einschränkung der möglichen Seitenketten-Rotamere, negativ auf die TMD-TMD-Interaktion aus. Aber auch in diesem Fall ist der beschriebene Entropieverlust bei der Faltung von Membranproteinen geringer als bei löslichen Proteinen, da bereits bei der Ausbildung der Sekundärstruktur, also vor der Interaktion ihrer TMDn, die Anzahl verfügbarer Rotamere bei vielen Aminosäuren reduziert wird [41]. Trotz auftretender entropischer Kosten kann es dennoch zur Assoziation von TMDn kommen, wenn günstige enthalpische Beiträge überwiegen.

Ausschlaggebend für die Energiebilanz des Systems sind aber nicht nur Enthalpie und Entropie der Helix-Helix-Interaktion, sondern auch involvierte Helix-Lipid- und Lipid-Lipid-Interaktionen. Sobald Helix-Helix- und Lipid-Lipid-Interaktion energetisch vorteilhafter sind als die Helix-Lipid-Interaktion, wird die Assoziation von TMDn bevorzugt. Außerdem setzt die Assoziation von TMDn Lipide frei, die sich zuvor an der Stelle der gebildeten Helix-Helix-Kontaktfläche befanden. Dies führt zu einer Entropiezunahme der Lipide und trägt ebenso zur Interaktion membranständiger Helices bei. Der hydrophobe Effekt hingegen scheint, aufgrund des Mangels an Wassermolekülen im hydrophoben Kern der Membran, kaum eine Rolle bei der Interaktion von TMDn zu spielen [44]. Abschließend ist zu erwähnen, dass auch membranextrinsische Domänen und evtl. gebundene Kofaktoren einen Einfluss auf die Faltung von Membranproteinen im transmembranen Bereich haben können.

### 1.4.2 Grundlegende Interaktionsmotive

Die Analyse hochaufgelöster Membranproteinstrukturen zeigt, dass die Mehrheit der regulären membranständigen  $\alpha$ -Helices nach ähnlichen, immer wiederkehrenden Mustern interagiert [17,45,46]. Die am häufigsten beobachteten Helix-Paar-Konformationen zeichnen sich durch die regelmäßige Struktur ihrer Kontaktfläche aus, die wiederum den Kreuzungswinkel ( $\Omega$ ) des Helix-Paars bestimmt. Bei sich linkshändig kreuzenden Helices ist der Winkel zwischen ihren Achsen positiv und die Aminosäuren an der Kontaktfläche greifen entsprechend einer „Knobs-into-Holes“-Packung ineinander (Abb. 1.3 links). Ebenso wie bei „Coiled-coil“-Domänen löslicher Proteine sind die Aminosäuren dort in einem sich wiederholenden Heptadenmotiv ( $[a..de.g]_n$ ) angeordnet, mit den Positionen  $a$ ,  $d$ ,  $e$  und  $g$  an der Kontaktfläche [45,47]. Rechtshändige Helix-Paare hingegen weisen einen negativen Kreuzungswinkel auf und sind durch ein Tetradenmotiv ( $[ab..]_n$ ) charakterisiert, bei dem die Aminosäurepositionen  $a$  und  $b$  die Kontaktfläche ausmachen (Abb. 1.3 rechts) [48].



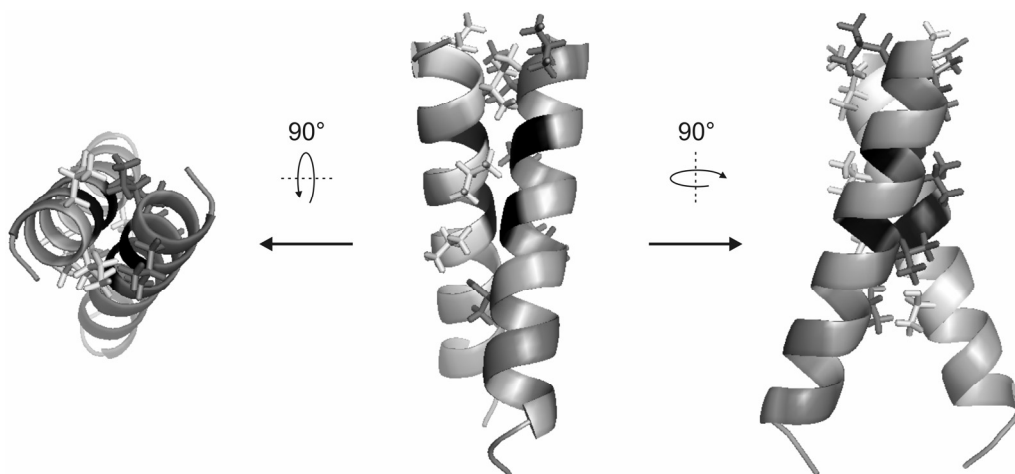
**Abb. 1.3: Grundlegende Interaktionsprinzipien membranständiger Helix-Paare.**

**Links:** Linkshändig interagierendes Helix-Paar mit einem positiven Kreuzungswinkel ( $\Omega > 0$ ). Die Helix-Rad-Darstellung zeigt die Anordnung der Aminosäuren im Heptadenmotiv  $[a..de.g]_n$  mit den Seitenketten der Positionen  $a$ ,  $d$ ,  $e$  und  $g$  an der Kontaktfläche. **Rechts:** In einem rechtshändig ausgerichtetem Helix-Paar kreuzen sich die Monomere unter einem negativen Winkel ( $\Omega < 0$ ). Die Seitenketten an den Positionen  $a$  und  $b$  des Tetradenmotivs  $[ab..]_n$  definieren die Helix-Helix-Kontaktfläche. Abb. verändert nach [49-51].

Nach dem heutigen Wissensstand sind interagierende TMDn bitopischer Membranproteine zumeist parallel ausgerichtet [52]. Bei Homooligomeren ergibt sich die gleiche Topologie der Monomere als Konsequenz aus dem biosynthetischen Insertionsvorgang. Die Monomere heterooligomerer Komplexe haben sich vermutlich in einem koevolutionären Prozess aneinander angepasst und teilen daher eine gemeinsame Orientierung. Aus diesem Grund konzentriert sich diese Arbeit auf parallel angeordnete  $\alpha$ -helikale TMDn.

### 1.4.3 Interagierende bitopische Membranproteine

Glykophorin A (GpA) ist das erste bitopische Membranprotein, von welchem die Struktur seiner interagierenden TMDn aufgeklärt werden konnte (Abb. 1.4) [53,54]. Die intensive Untersuchung des in der humanen Erythrozytenmembran lokalisierten Glykoproteins trug maßgeblich zum Verständnis der strukturellen und thermodynamischen Grundlagen der TMD-TMD-Assoziation bei. Im Homodimer sind die parallelen TMDn rechtshändig, also unter einem negativen Kreuzungswinkel angeordnet (Abb. 1.4). Die Sequenzabhängigkeit dieser Interaktion wurde mehrfach durch Mutationsanalyse gezeigt [55-59] und durch molekulare Modellierung sowie Kernresonanzspektroskopie in Detergenz- und Membranumgebung bestätigt [53,54,60,61]. Demnach ist das Motiv  $L^{75}IxxGVxxGVxxT^{87}$  verantwortlich für die homomere Interaktion der TMDn. Eine zentrale Rolle kommt dabei dem GxxxG zu. Aufgrund des Auftretens von zwei Glycinen im Abstand von vier Resten ( $i, i+4$ ) kommen diese auf der gleichen Seite der Helix zu liegen. Dies führt an dieser Stelle zu einer flachen Helixoberfläche und erlaubt den engen Kontakt der Rückgrate. Dadurch ist wiederum eine dichte Packung der Seitenketten an der Kontaktfläche und infolge dessen die ausgedehnte Etablierung von van-der-Waals-Wechselwirkungen möglich. Der enge Kontakt der Rückgrate kann außerdem die Ausbildung interhelikaler Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den  $C_{\alpha}$ -H-Atomen der Glycine und den Carbonylsauerstoffatomen der Rückgrate begünstigen [62]. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass im membraneingebetteten Dimer eine weitere interhelikale Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenkette des Threonins an Position 87 und dem Rückgratcarbonyl des Valins an



**Abb. 1.4: Strukturmodell der interagierenden TMDn des GpA-Dimers in Membranumgebung.** Das Modell zeigt die parallelen, sich rechtshändig kreuzenden TMDn von Rest 73 bis 95. Die Ansichten auf der linken und rechten Seite wurden durch Drehung der in der Mitte dargestellten Struktur um  $90^\circ$  um die horizontale bzw. vertikale Dimerachse erzeugt. Die zentralen Glycine sind jeweils schwarz hervorgehoben. Des Weiteren sind die unmittelbar an der Kontaktfläche beteiligten Seitenketten der Reste L75, I76, G79, V80, G83, V84 und T87 (von oben nach unten) wiedergegeben. Die Abb. wurde mit PyMOL v0.99 generiert. Dafür verwendete Strukturkoordinaten wurden freundlicherweise von S. O. Smith zur Verfügung gestellt.

Position 84 der Nachbarhelix existiert [59,63]. Neben den Glycinen, die keine Seitenkette aufweisen, befinden sich vornehmlich  $\beta$ -verzweigte Aminosäuren (Isoleucin, Valin und Threonin) in der Helix-Helix-Kontaktfläche. Im Vergleich zu anderen Seitenketten stehen diesen Aminosäuren bereits in den helikal gefalteten Monomeren nur wenige bevorzugte Rotamer-Konformationen zur Verfügung. Dies hat zur Folge, dass bei der Assoziation der TMDn nur minimale entropische Kosten entstehen. Im Ganzen betrachtet resultiert die Stabilität des Dimers daher aus der Kombination großflächig stattfindender van-der-Waals-Interaktionen, interhelikaler Wasserstoffbrücken und einem geringen assoziationsbedingten Entropieverlust.

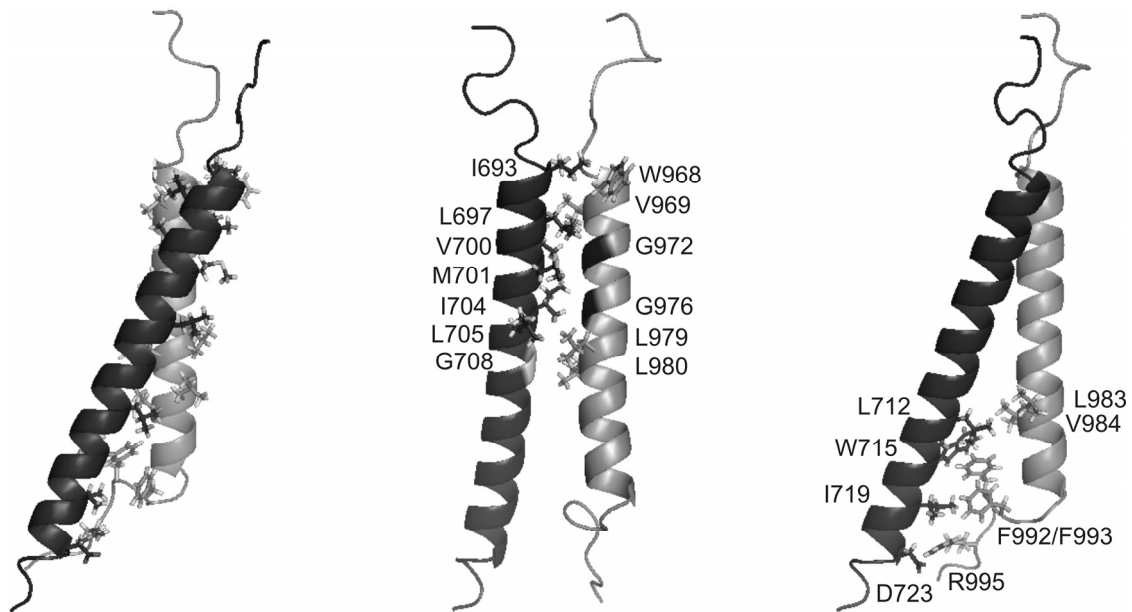
Das häufige Auftreten des GxxxG-Motivs in Transmembranhelices [18,19] spricht dafür, dass es auch bei anderen Proteinen zu deren Assoziation beiträgt. Diese Vermutung wird dadurch bekräftigt, dass ein Großteil hochaffiner TMDn, welche aus Banken mit partiell randomisierten Sequenzen selektiert wurden, dieses Motiv aufweisen [51,64]. Neben GpA wurde auch bei anderen natürlichen bitopischen Membranproteinen die GxxxG-vermittelte Interaktion ihrer TMDn beobachtet. Beispielsweise beruht die TMD-TMD-Assoziation der Rezeptortyrosinkinase EphA1 [65], des pathologisch relevanten *Amyloid Precursor Proteins* [66,67] sowie der Zelladhäsionsproteine Syndecan 2-4 [68] ebenfalls darauf. Doch die Präsenz des GxxxG-Motivs allein scheint keine hinreichende Voraussetzung für die Interaktion von TMDn zu sein. Trotz vorhandenem GxxxG-Motiv konnte mittels analytischer Ultrazentrifugation keine Assoziation der TMDn der Kolonkarzinomkinase 4 (*colon carcinoma kinase 4*, CCK4) detektiert werden [69]. Die Interaktion von TMDn scheint außerdem maßgeblich von den anderen Resten an der Kontaktfläche beeinflusst zu werden [51,58,64,70-72]. Diese können ihre stabilisierende Funktion vermutlich erst durch den engen Kontakt der Helices, der durch die Glycine ermöglicht wird, ausüben. Demnach ist das GxxxG-Motiv notwendig, aber nicht ausreichend, um eine starke Assoziation von TMDn zu bewirken [58].

Eine Vielzahl bitopischer Membranproteine geht auch heterotypische Interaktionen mit TMDn anderer Membranproteine ein. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass die TMDn der zuvor erwähnten Syndecane miteinander auch Heteromere ausbilden [68]. Ebenso wurden bei den vier Mitgliedern der Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren ErbB1-4 in Detergenz und in der Membran neben TMD-Homomeren auch TMD-Heteromere nachgewiesen [73,74]. Die verschiedenen ErbB-Rezeptordimere binden unterschiedliche Liganden mit variierender Affinität und modulieren vermutlich so die Art und Intensität der transduzierten Signale [75]. Eine weitere bedeutende Familie von Zelloberflächenrezeptoren, die in heteromerer Form auftreten, sind die Integrine. Dabei handelt es sich um Zelladhäsionsproteine, die sowohl als strukturelle als auch als signalweiterleitende Einheit das Zellinnere (Zytoskelett, zytoplasmatische Kinasen) mit der Umgebung (andere Zellen, extrazelluläre Matrix, Pathogene) einer Zelle verbinden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellmigration, Differenzierung und Apoptose. Ein Überblick über Struktur und Funktion dieser

Proteinklasse ist u. a. in [12,76-78] zu finden. Integrine sind Heteromere bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit mit jeweils einer großen extrazellulären Domäne, einer helikalen TMD und einer kleinen zytoplasmatischen Domäne. In Säugern wurden bisher 18 verschiedene  $\alpha$ - und acht  $\beta$ -Untereinheiten beschrieben, die wiederum zu 24 bekannten heteromeren Rezeptoren assemblieren. Integrine können in verschiedenen Aktivitätszuständen vorliegen. Im inaktiven Zustand sind die extrazellulären Domänen des Heteromers gebeugt [79] und die Affinität für extrazelluläre Liganden ist gering. Der aktive Zustand ist durch die ausgestreckte Konformation der extrazellulären Domänen [80] und eine hohe Ligandenaffinität geprägt. Biochemische als auch Strukturdaten weisen darauf hin, dass der Rezeptor durch die heterotypische Interaktion der TMDn und benachbarter zytoplasmatischer Reste im inaktiven Zustand gehalten wird [81-83]. Bei der bidirektionalen Übertragung von Signalen über die Membran kommt es zur Dissoziation der TMDn, die mit der konformationellen Umlagerung der extrazellulären Domänen gekoppelt ist [84-86]. Dies unterstreicht die Bedeutung der heterotypischen TMD-TMD-Interaktion für die Funktion des Rezeptors.

Das wohl am intensivsten untersuchte Integrin ist das auf Blutplättchen exprimierte  $\alpha$ IIB/ $\beta$ 3. Erst kürzlich wurde die Struktur seiner heterotypisch assoziierten TMDn in Membranumgebung und in organischem Lösungsmittel durch Kernresonanzspektroskopie aufgeklärt [87,88]. Zur gleichen Zeit publizierte Modelle des  $\alpha$ IIB/ $\beta$ 3-TMD-Heterodimers stimmen sehr gut mit der experimentell ermittelten Struktur überein [89,90]. Während die TMD von  $\beta$ 3 29 Reste umfasst und schräg in die Membran eingebettet ist, durchspannt die helikale TMD von  $\alpha$ IIB mit 24 Aminosäuren die Membran annähernd senkrecht (Abb. 1.5). Die beiden Helices kreuzen sich im N-terminalen Bereich unter einem negativen Winkel. Dort ermöglichen die Reste  $\alpha$ IIB-G972,  $\alpha$ IIB-G976 und  $\beta$ 3-G708 eine enge Packung der Seitenketten an der Kontaktfläche. C-terminal von der  $\alpha$ IIB-Transmembranhelix faltet sich das Rückgrat zurück, so dass außerdem zwei Phenylalanin-Seitenketten ( $\alpha$ IIB-F992, F993) in die Membran eintauchen und in die Helix-Helix-Kontaktfläche gelangen. Diese interagieren vermutlich über van-der-Waals-Wechselwirkungen mit W715 und I719 der  $\beta$ 3-TMD. Starke elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Resten  $\alpha$ IIB-R995 und  $\beta$ 3-D723, die sich in der Lipidkopfgruppenregion der Membran befinden, stabilisieren das Heterodimer zusätzlich. Die Mutation der aufgeführten Aminosäuren stört die Assoziation der TMDn [87,91] und führt zur Aktivierung des Integrins [85,92,93]. Gleichermaßen destabilisieren vermutlich intrazelluläre Liganden durch Bindung an die zytoplasmatischen Domänen die TMD-TMD-Wechselwirkungen und regulieren so die Aktivität des Rezeptors [91,94].

Obwohl die TMDn von  $\alpha$ IIB und  $\beta$ 3 bevorzugt heterotypisch interagieren [87,91] wurde bei  $\alpha$ IIB die Ausbildung von Homodimeren und bei  $\beta$ 3 Homotrimere beobachtet [95]. Mutationsanalysen haben gezeigt, dass auch in diesem Fall die Reste  $\alpha$ IIB-G972,  $\alpha$ IIB-G976 bzw.  $\beta$ 3-G708 wichtig für die Interaktion sind [96,97]. Die Bedeutung der homotypischen TMD-TMD-Assoziation für die Funktion des Rezeptors ist jedoch noch unklar.



**Abb. 1.5: Strukturmodell des  $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3-TMD-Heterodimers in Membranumgebung.**

$\alpha$ IIb (Rest 957 bis 998) ist in grau und  $\beta$ 3 (Rest 685 bis 727) in schwarz dargestellt. **Links:** Die helikalen TMDn sind parallel und unter einem negativen Kreuzungswinkel angeordnet. **Mitte:** Im N-terminalen Bereich erlauben die Aminosäuren  $\alpha$ IIb-G972,  $\alpha$ IIb-G976 (schwarz hervorgehoben) und  $\beta$ 3-G708 (hellgrau hervorgehoben) den engen Kontakt der Monomere und somit die dichte Packung der im Modell eingetragenen Reste an der Kontaktfläche. **Rechts:** Durch die Rückfaltung des  $\alpha$ IIb-Rückgrats im C-terminalen Bereich gelangen die Seitenketten  $\alpha$ IIb-F992 und  $\alpha$ IIb-F993 in die Kontaktfläche und kompensieren den ansonsten großen Abstand zwischen den beiden Helices. Die Abb. basiert auf der PDB-Struktur 2K9J und wurde mit PyMOL v0.99 erstellt.

#### 1.4.4 Polare und ionisierbare Aminosäuren in Transmembranhelices

Polare und ionisierbare Reste machen zusammen etwa 20 % der Aminosäuren in TMDn aus [19] (siehe auch Anhang B Tab. I). Da ihre Integration in die hydrophobe Membran energetisch ungünstig ist [2], ist zu vermuten, dass sie dort eine wichtige Funktion erfüllen. Z.B. sind viele der an TMD-TMD-Kontaktflächen befindlichen Seitenketten polarer oder ionisierbarer Natur und zudem meist konserviert [98]. Dies lässt darauf schließen, dass polare und ionisierbare Aminosäuren u. a. eine Rolle bei der Faltung von Membranproteinen spielen. Aufgrund der geringen Dielektrizität der Membran können durch polare oder ionisierbare Aminosäuren vermittelte Wechselwirkungen erheblich zur Stabilität der Interaktion von TMDn beitragen (siehe 1.4.1). Untersuchungen an Modell-TMDn haben gezeigt, dass aus mehreren Serin- und Threonin-Resten bestehende Motive [99] oder sogar einzelne Asparagin- oder Glutamin-Reste [99-104] die Assoziation von TMDn vermitteln können. Auch einzelne ionisierbare Aminosäuren (Arginin, Lysin, Histidin, Aspartat, Glutamat) können die homotypische Interaktion von TMDn bewirken [99,102,103,105]. Dabei wird die TMD-TMD-Interaktion höchstwahrscheinlich durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Dies konnte auch in hochaufgelösten Strukturen von Membranproteinen beobachtet werden. Beispielsweise kommt es



zwischen den Helices III und IV der bovinen Cytochrom C Oxidase oder zwischen den Helices A und G von Halorhodopsin zur Ausbildung mehrerer Wasserstoffbrücken zwischen Serin-Paaren bzw. einem Serin-Asparagin-Paar an der Kontaktfläche [99,106].

Interhelikale Wechselwirkungen zwischen unterschiedlich ionisierbaren Aminosäuren scheinen für die Faltung von Membranproteinen ebenso von Bedeutung zu sein. So stabilisieren potentielle Ionenpaare z.B. die Struktur des *Light-Harvesting* Komplexes oder des *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance* Regulators (CFTR) [107,108]. Es ist jedoch unklar, ob die beteiligten Aminosäuren dabei geladen oder ungeladen vorliegen, d.h. ob Wasserstoffbrücken oder ionische Wechselwirkungen auftreten.

## 1.5 Interaktionsanalyse membranständiger $\alpha$ -Helices

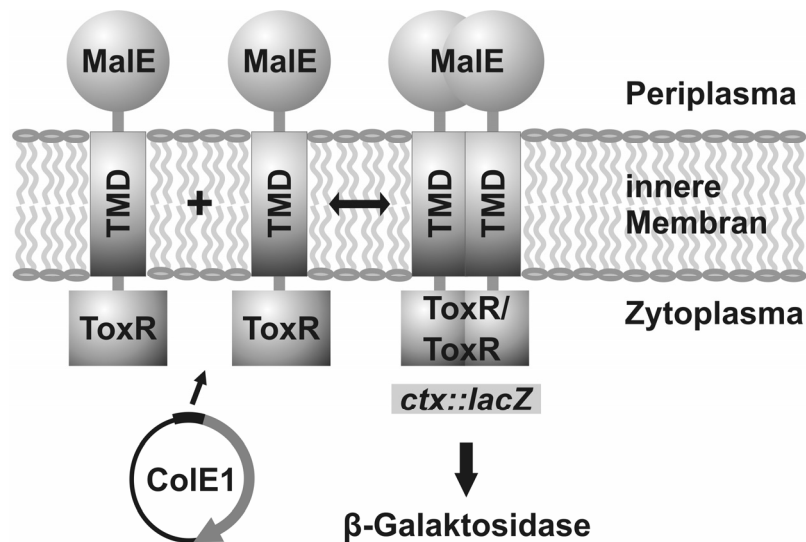
Die Faltung von Membranproteinen und somit die Interaktion ihrer TMDn lässt sich direkt durch strukturauflösende Verfahren, wie z.B. Röntgenkristallographie, Elektronenmikroskopie oder Kernresonanzspektroskopie ermitteln [109]. Allerdings stellen die Aufreinigung ausreichend großer Mengen korrekt gefalteter, funktioneller Membranproteine und/oder deren Kristallisation meist ein großes Hindernis für die Anwendung dieser Methoden dar. Alternativ bzw. ergänzend dazu wird die Interaktion von TMDn daher oft indirekt untersucht. Die Interaktionsstudien erfolgen bei vielen der gängigen biochemischen und biophysikalischen Techniken in Gegenwart von Detergenzien. Dies ist z.B. der Fall bei der milden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), der nichtdenaturierenden PAGE, bei der Gelfiltrationschromatographie oder der analytischen Ultrazentrifugation [41]. Fast alle diese Methoden lassen einen Rückschluss auf die Stöchiometrie der Komplexe zu. Ferner erlaubt die analytische Ultrazentrifugation eine Aussage über die thermodynamische Stabilität der Assoziation [110]. Die Dimerisierungsenergie von TMDn kann ebenso mittels Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Interaktionspartner ermittelt werden. Mit dieser Methode ist TMD-TMD-Interaktion nicht nur in Detergenzmizellen, sondern auch in Liposomen detektierbar [111]. Zur Untersuchung der Assoziation von TMDn in biologischen Membranen wurde eine Reihe genetischer Assays entwickelt, wie z.B. das ToxR-System [57,112], TOXCAT [113], ToxLuc [114] oder GALLEX [115]. Diese haben gemein, dass durch die Oligomerisierung der betrachteten TMD die Expression eines Reportergens reguliert wird. Das TOXCAT- und ToxR/POSSYCCAT-System [116,117] ermöglichen außerdem die Isolierung interagierender TMDn aus kombinatorischen TMD-Banken mit randomisierter Kontaktfläche [51,64,99,116,118] sowie die Charakterisierung zugrunde liegender Interaktionsmotive. Diese wird meist durch umfangreiche Mutationsanalysen vorgenommen. Der Effekt einer oder mehrerer Mutationen auf die Interaktionsfähigkeit einer TMD kann dabei mit jeder der erwähnten Methoden untersucht werden. Ziel und Herausforderung zugleich ist es, mit den gesammelten Daten

eine Vorstellung der grundlegenden Interaktionsprinzipien von TMDn zu erhalten und einen möglichen Zusammenhang mit der Funktion von Proteinen zu erschließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion paralleler TMDn mittels des ToxR-Systems analysiert. Wie der Name des Systems andeutet, basiert es auf dem ToxR-Transkriptionsaktivator, einem bitopischen Membranprotein aus *Vibrio cholerae*, das die Expression mehrerer Virulenzfaktoren kontrolliert [119]. Seine periplasmatische Sensordomäne und die zytoplasmatische Regulator-domäne sind über eine TMD verbunden. Infolge extrazellulärer Signale kommt es zur Dimerisierung des Proteins, vermittelt durch dessen periplasmatische Domäne. Auf diese Weise werden auch die zytoplasmatischen Domänen in Kontakt gebracht, die in dimerer Form mit stark erhöhter Affinität an das repetitive DNA-Element (TTTTGAT)<sub>3-8</sub> des *ctx*-Promotors binden und die Expression des Cholera-toxins aktivieren [120,121].

Aufgrund seines modularen Aufbaus, der den Austausch einzelner Domänen erlaubt [112,122], und seiner oligomerisierungsabhängigen Aktivität eignet sich das ToxR-Protein gut zur Untersuchung interagierender TMDn. Zu diesem Zweck wurde ein chimäres Protein, bestehend aus der ToxR-Transkriptionsaktivator-Domäne, einer heterologen TMD und der periplasmatischen Maltosebindeprotein-Domäne (MalE) konstruiert (Abb. 1.6) [57,112]. Die Assoziation der TMD führt zur Di- oder Oligomerisierung der ToxR-Domäne, die daraufhin an den chromosomal integrierten *ctx*-Promotor des *Escherichia coli* (*E. coli*) FHK12-Indikatorstamms [112,122] bindet und diesen aktiviert. Somit wird in Abhängigkeit der TMD-TMD-Interaktion das nachfolgende *lacZ*-Reporter-gen exprimiert. Die Aktivität des Genprodukts, der  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal), kann im Zellysate durch Messung der Reaktionsgeschwindigkeit der Enzym-katalysierten Hydrolyse von *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (ONPG) quantifiziert werden [123]. Da die Enzymaktivität mit der Menge der exprimierten  $\beta$ -Gal korreliert, spiegelt diese die relative Interaktionsstärke der untersuchten TMD wider. Unterschiede zwischen den  $\beta$ -Gal-Aktivitäten, die aus der Assoziation verschieden affiner TMDn resultieren, können durch die Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) weiter verstärkt werden. IPTG induziert die Expression des verkürzten, inaktiven  $\beta$ -Gal  $\omega$ -Fragments, welches auf dem F'-Plasmid der FHK12-Zellen kodiert ist. Dieses konkurriert mit vollständigen  $\beta$ -Gal-Fragmenten um die Assemblierung funktioneller, tetramerer Enzymkomplexe [124].

Die periplasmatische MalE-Domäne dient zur Kontrolle der effizienten Integration von ToxR-Proteinen in die innere *E. coli*-Membran sowie zu deren Detektion bei der Western-Blot-gestützten Analyse des Expressionslevels.



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Funktionsweise des ToxR-Systems.**

Das chimäre ToxR-Protein, bestehend aus ToxR-Domäne, TMD von Interesse und MaIE-Domäne, wird ausgehend von einem Plasmid mit ColE1-Replikationsursprung (*high copy number*) exprimiert. Durch TMD-TMD-Interaktion in der inneren *E. coli*-Membran kommt es zur Di- oder Oligomerisierung der ToxR-Domäne, die infolge dessen an den chromosomal integrierten *ctx*-Promotor bindet und die Expression des *lacZ*-Reportergens aktiviert. Abb. modifiziert nach [117].

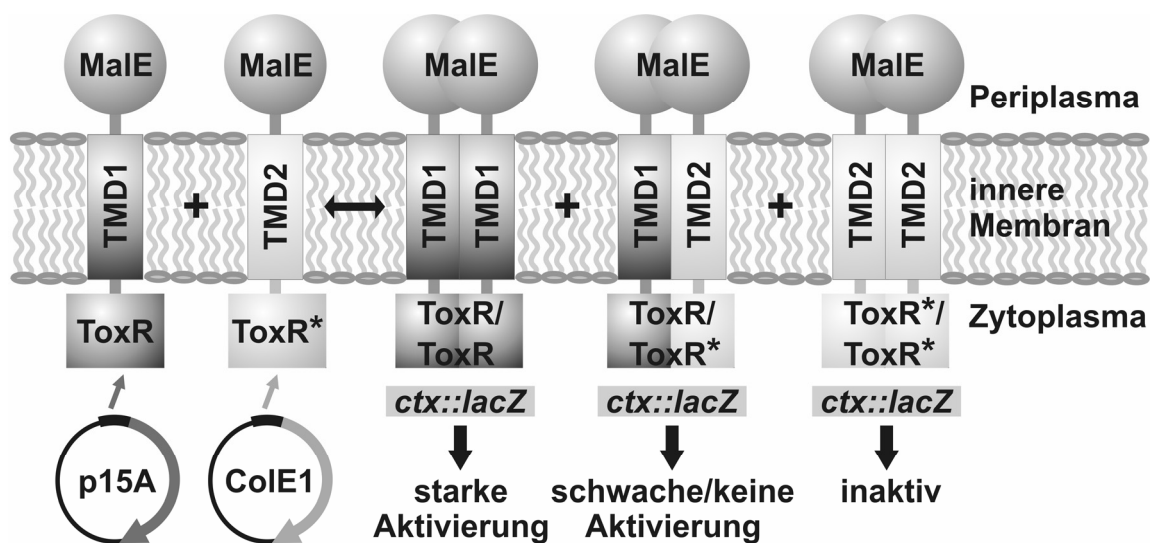
Im Rahmen des ursprünglichen ToxR-Systems mit dem Plasmid pToxRI erfolgt die Expression des ToxR-Proteins durch den konstitutiven *toxR*-Promotor [57,112]. Dadurch wird das Expressionslevel des ToxR-Proteins konstant gehalten. Das Ausmaß seiner Dimerisierung hängt neben der Affinität der TMD auch von dessen Konzentration ab. Ist diese sehr niedrig, liegt das Protein überwiegend als Monomer vor. Mit zunehmender Konzentration erhöht sich auch der Anteil der Proteine, die zu Dimeren assoziiert sind. Schließlich stellt sich ab einem gewissen Expressionslevel eine Sättigung ein, bei der die maximale Dimer-Fraktion erreicht ist. Unterschiedliche Affinitäten von TMDn können daher am besten in einem Konzentrationsbereich detektiert werden, in dem der Unterschied zwischen den Dimer-Anteilen der verschiedenen Proteine am größten ist. Um solche Messbedingungen herstellen zu können, ist die Regulation des Expressionslevels erforderlich. Aus diesem Grund wurde mit dem Vektor pToxRIV der mit Arabinose induzierbare *araBAD*-Promotor und das Gen für das dazugehörige regulatorische AraC-Protein eingeführt [116].

Überdies wurde das ToxR/POSSYCCAT-System zur Selektion selbstaffiner TMDn entwickelt. Dafür wurden spezielle *E. coli*-Selektionsstämme (Chr3 mit *ctx::cat* [116], EL61 mit *ompU::cat* [117]) hergestellt, bei denen anstelle des *lacZ*-Reportergens eine Kopie des *cat*-Gens chromosomal integriert ist. Dies führt zu einer erhöhten Chloramphenicol-Resistenz ( $Cm^R$ ) von Zellen, die ein interagierendes ToxR/TMD/MaIE-Konstrukt exprimieren. Durch Kultivierung unter steigendem Selektionsdruck (zunehmende  $Cm$ -Konzentration) können somit affine TMDn aus Banken mit randomisierter TMD-TMD-Kontaktfläche isoliert werden. Mit diesem System wurde bereits der interaktionsfördernde

Effekt von Tryptophan an bestimmten Helixpositionen [118] oder von Phenylalanin in Kombination mit GxxxG-Motiven [64] aufgedeckt. Zur Herstellung dieser Banken wurden an der Kontaktfläche befindliche Aminosäurepositionen (*a*, *d*, *e*, *g*) eines wiederholten Heptadenmotivs (siehe Abb. 1.3 links) einer 16 Aminosäuren langen TMD randomisiert. Dabei waren entweder alle natürlich vorkommenden Aminosäuren [118] oder ein Set aus zwölf überwiegend hydrophoben und mäßig polaren Aminosäuren [64] zugelassen. Die den Lipiden zugewandten Positionen (*b*, *c*, *f*) wurden mit invarianten Alaninen besetzt, die in der Membran nicht mit sich selbst interagieren [124]. Mit dieser Vorgehensweise konnten jedoch keine bzw. nur wenige interagierende, membranständige Sequenzen mit stark polaren Aminosäuren angereichert werden. Um dennoch die Bedeutung dieser Aminosäuren für die Interaktion von TMDn zu erschließen, wurden in der jüngsten Bank die invarianten Positionen mit Leucin belegt [125]. Dies sollte die durchschnittliche Hydrophobizität der Sequenzen erhöhen und somit bei Randomisierung mit allen 20 natürlich auftretenden Aminosäuren auch die Membraninsertion von Resten mit polarem oder ionisierbarem Charakter begünstigen. Die Charakterisierung der Bank ergab eine positionsspezifische Anreicherung von Histidin in mittel- und hochaffinen, homotypisch interagierenden TMDn. In diesen Sequenzen traten außerdem häufig Glycin, Serin und/oder Threonin in der Nachbarschaft von Histidin auf, und sie enthielten am C-Terminus oft ein GxxxG-Motiv. Dies sowie die Mutationsanalyse dieser Reste deuten darauf hin, dass Histidin in Kooperation mit einem GxxxG-Motiv und Resten, welche die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu ihrer Seitenkette oder dem C<sub>α</sub>-H-Atom bzw. dem Polypeptidrückgrat erlauben, die Interaktion dieser TMDn vermittelt. Trotz der relativen Unterrepräsentation ionisierbarer Aminosäuren in dieser Bank wurden weiterhin elf Sequenzen isoliert, die mehrere solche Reste enthalten und gleichzeitig mit hoher Selbstaffinität interagieren. Auffällig dabei war die abwechselnde Anordnung potentiell positiv geladener und potentiell negativ geladener Aminosäuren an den N-terminalen randomisierten Positionen sowie das Auftreten eines C-terminalen GxxxG-Motivs in allen diesen Sequenzen. Der Einfluss dieser Reste auf die Assoziation der TMDn wurde noch nicht untersucht. Doch die alternierende Abfolge gegensätzlich ionisierbarer Aminosäuren lässt vermuten, dass diese durch Wasserstoffbrücken oder eventuell durch ionische Wechselwirkungen (Salzbrücken) zu der beobachteten hohen Affinität der TMDn beitragen.

Mit Hilfe einer modifizierten Variante des oben beschriebenen ToxR-Systems kann neben der Selbstassoziation einer TMD auch die heterotypische Interaktion zweier verschiedener TMDn analysiert werden. Das Funktionsprinzip dieses dominant-negativen ToxR\*-Systems wurde bereits erfolgreich anhand zweier Referenz-TMDn, einem membranständigen Leucinzipper (AZ2) (siehe Abschnitt 4.1) und einer Oligo-Ala-Sequenz (A16) [124], gezeigt [126]. Dabei werden zwei ToxR-Proteine koexprimiert, die sich neben ihrer TMD auch in der Aktivität ihrer Transkriptionsaktivator-Domäne unterscheiden (Abb. 1.7). Eine der TMDn (TMD1) wird im Kontext eines transkriptionell aktiven und die andere (TMD2) im Kontext eines transkriptionell inaktiven ToxR-Proteins (als ToxR\*

bezeichnet) exprimiert. Die heterotypische Assoziation der beiden TMDn (TMD1+TMD2) konkurriert dabei mit deren Selbstassoziation (TMD1+TMD1 bzw. TMD2+TMD2). Homomerisierung von TMD1 führt zur Ausbildung von aktiven ToxR/ToxR-Komplexen und somit zur Aktivierung der Reporterexpression. Die Heteromerisierung der TMDn ebenso wie die homotypische Interaktion von TMD2 führen hingegen zur Ausbildung transkriptionell inaktiver ToxR/ToxR\*- bzw. ToxR\*/ToxR\*-Komplexe. Infolge dessen wird die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase nur schwach oder gar nicht aktiviert. Aus diesem Grund äußert sich die Heteromerbildung von TMD1 mit TMD2 auf dominant-negative Weise und resultiert im Vergleich zu ungestörter ToxR/TMD1-Interaktion in einer reduzierten  $\beta$ -Gal-Aktivität.



**Abb. 1.7: Schematische Darstellung des dominant-negativen ToxR\*-Systems.**

Das Protein mit der Wildtyp (Wt)-ToxR-Domäne (dunkelgrau dargestellt) wird ausgehend von einem Plasmid mit p15A-Replikationsursprung (*low copy number*) und das Protein mit inaktiver ToxR\*-Domäne (hellgrau dargestellt) von einem Plasmid mit ColE1-Replikationsursprung (*high copy number*) exprimiert. Beide Gene stehen unter Kontrolle des *araBAD*-Promotors. Homotypische Interaktion des Wt-ToxR-Proteins führt zur Bildung von ToxR/ToxR-Komplexen und zur Aktivierung der *ctx*-Promotor-kontrollierten Expression des *lacZ*-Reportergens. Im Gegensatz dazu bewirken Heterodimere, bestehend aus einem ToxR- und ToxR\*-Protein, sowie ToxR\*-Homomere nur eine schwache oder gar keine Aktivierung des *ctx*-Promotors. Somit kommt es infolge heterotypischer TMD-TMD-Interaktion zu einer geringeren  $\beta$ -Gal-Expression als bei alleiniger Wt-ToxR-Protein-Interaktion. Abb. wurde aus [126] entnommen und verändert.

Die Inaktivierung der ToxR-Domäne erfolgte durch Mutation der semikonservierten Aminosäure S87 zu Glycin [126]. Der Vergleich mit der Struktur des homologen OmpR-Transkriptionsregulators lässt vermuten, dass sich diese Aminosäure im so genannten „*helix-turn-helix*“-Motiv der ToxR-Domäne befindet, welches für die DNA-Bindung und die Interaktion mit der RNA-Polymerase verantwortlich ist [127].

Wie bereits erwähnt, ist das Gleichgewicht zwischen Monomer und Di- oder Oligomer u. a. von der Konzentration der Interaktionspartner abhängig. Deshalb sind die von verschiedenen ToxR/TMD/MalE-Proteinen ausgelösten  $\beta$ -Gal-Aktivitäten nur dann direkt miteinander vergleichbar, wenn deren Konzentration in der inneren *E. coli*-Membran ähnlich ist. Zur Kontrolle werden daher zum einen deren Expressionslevel in der Zelle und zum anderen ihre Membranintegration überprüft. Der Nachweis der Expression von ToxR-Konstrukten in FHK12-Zellen erfolgt mittels Western-Blot-Analyse [128] nach vorangegangener elektrophoretischer Auftrennung des Gesamtzelllysats in einem SDS-Polyacrylamid-Gel [129]. Das etwa 66 kDa große chimäre Protein wird dabei mit einem Anti-MalE-Antiserum detektiert. Die effiziente Membranintegration von ToxR-Proteinen mit korrekter Topologie (N-Terminus im Zytoplasma, C-Terminus im Periplasma) wird anhand ihrer Fähigkeit zur Komplementierung der MalE-Defizienz von *E. coli* PD28-Zellen (MalE<sup>-</sup>) abgeschätzt [130]. Bei dem Maltosebindeprotein handelt es sich um ein lösliches, im Periplasma lokalisiertes Protein. Als Teil des Transportsystems zur Aufnahme von Maltose [131] bindet es diesen Zucker und gibt ihn an die membranständigen Komponenten des Systems weiter. Die Deletion des Maltosebindeproteins führt zum Erliegen der Maltoseaufnahme. Demnach können PD28-Zellen mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle nur dann wachsen, wenn sie ein ToxR-Protein exprimieren, das effizient und mit der erforderlichen Topologie in die Membran integriert ist.

Zusammengefasst stehen mit dem ToxR-System mehrere, sich ergänzende Werkzeuge zur Analyse von TMD-TMD-Interaktion zur Verfügung. Mit Hilfe des ToxR/POSSYCCAT-Systems können interagierende TMDn aus einem Pool verschiedener Sequenzen isoliert werden. Aus der statistischen Auswertung der Sequenzen von unter Selektionsdruck angereicherten affinen TMDn lassen sich gemeinsame Interaktionsmotive ableiten. Die isolierten Sequenzen sowie andere TMDn von Interesse können außerdem mit dem klassischen ToxR-Assay bzw. dem dominant-negativen ToxR\*-Assay hinsichtlich ihres homotypischen und heterotypischen Interaktionsverhaltens untersucht und bezüglich ihrer Helix-Helix-Kontaktflächen charakterisiert werden. Das ToxR-System gestattet also, grundlegende Assoziationsmotive aufzudecken und zu verifizieren.

## 2 Ziel der Arbeit

Entsprechend der einleitenden Darstellung, spielt die spezifische Wechselwirkung  $\alpha$ -helikaler TMDn eine wichtige Rolle bei der Faltung und Oligomerisierung von Membranproteinen. Die Interaktion von TMDn kann dabei durch van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und möglicherweise durch ionische Wechselwirkungen vermittelt werden. Vor allem die beiden letztgenannten Wechselwirkungen können in der Membranumgebung erheblich zur Stabilität der Interaktion beitragen. Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungen können vermehrt zwischen polaren und/oder ionisierbaren Aminosäuren auftreten. Die Bedeutung dieser Aminosäuren für die Interaktion von TMDn wird dadurch bestärkt, dass viele Reste an Helix-Helix-Kontaktflächen polar oder ionisierbar und zudem konserviert sind.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle polarer und ionisierbarer Aminosäuren bei der Interaktion membranständiger  $\alpha$ -Helices zu analysieren. In vorangegangenen Studien wurde bereits mehrfach gezeigt, dass bei der homotypischen TMD-TMD-Interaktion Wechselwirkungen zwischen polaren Resten mit gleicher Seitenkette auftreten können. Darüberhinaus untersucht diese Arbeit, ob polare und ionisierbare Aminosäuren überwiegend mit der identischen Seitenkette der Partnerhelix oder auch mit anderen Resten interagieren. Vor allem bei ionisierbaren Resten war von Interesse, inwiefern Wechselwirkungen zwischen potentiell unterschiedlich geladenen Aminosäuren eine Rolle spielen, da nur zwischen diesen die Möglichkeit zur Ausbildung von so genannten Salzbrücken besteht. Weiterhin sollte überprüft werden, welchen Einfluss der Sequenzkontext auf die Interaktion solcher Reste hat. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden Modell-TMDn mit polaren und ionisierbaren Aminosäuren gewählt, die zuvor aus einer Bank mit partiell randomisierten TMDn isoliert worden waren.

Die heterotypische Interaktion verschiedener Helixreste sollte mit dem dominant-negative ToxR\*-System analysiert werden. Zu diesem Zweck war es zunächst erforderlich, das bestehende System so zu modifizieren, dass die Sequenzspezifität von Interaktionen bestmöglich detektierbar ist und das Expressionslevel koexprimierter ToxR/TMD/MalE-Proteine durch Western-Blot-Analyse überprüft werden kann. Überdies sollten die Interaktionspartner unabhängig voneinander mit Hilfe verschiedener Promotoren exprimiert werden können, um ihr Expressionslevel bei Bedarf anpassen zu können. Da der Einsatz des dominant-negativen ToxR\*-Systems mindestens eine selbstaffine TMD voraussetzt, beschränkt sich seine Anwendung auf solche TMDn, die neben Heteromeren auch Homomere ausbilden. Um auch TMDn mit geringer Selbstaffinität in Bezug auf heterotypische Wechselwirkungen untersuchen zu können, bestand das Ziel, eine weitere Variante des ToxR-Systems zu entwickeln, die dies ermöglicht.

Abschließend sollte die Bedeutung der hier charakterisierten Interaktionsmuster für die Interaktion natürlicher TMDn betrachtet werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Allgemeine Chemikalien

Standardchemikalien wiesen Analysequalität auf und wurden, sofern nicht anders angegeben, von Appllichem, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

#### 3.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Alle Lösungen, Puffer und Medien wurden mit destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) oder deionisiertem Wasser (milliQ-Wasser, Millipore) hergestellt. Die Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer ist unter der jeweiligen Methodenbeschreibung zu finden. Wenn nötig, wurden Stammlösungen mittels Einmalspritze durch einen Rundfilter (Porengröße 0,45 µm) sterilfiltriert oder autoklaviert.

<u>Medien:</u>	<b>Luria-Bertani (LB)-Medium (pH 7)</b>	<b>SOB-Medium (pH 7)</b>
	1 % (w/v) Trypton	2 % Trypton
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	171 mM NaCl	8,6 mM NaCl
		2,5 mM KCl

Zur Herstellung fester Medien wurde 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Die hier aufgeführten Medien wurden nach Herstellung autoklaviert. Alle weiteren Medien sind unter der jeweiligen Methode angegeben.

#### 3.1.3 Bakterienstämme

Folgende *E. coli*-Stämme wurden verwendet:

<u>Stamm</u>	<u>Resistenz</u>	<u>relevanter Genotyp</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Referenz/Quelle</u>
FHK12	Amp <sup>R</sup>	<i>ctx::lacZ</i>	Interaktionsanalyse	[112,122]
PD28	Tet <sup>R</sup>	MalE <sup>-</sup>	Integrationskontrolle	[132]



Stamm	Resistenz	relevanter Genotyp	Verwendung	Referenz/Quelle
DH5 $\alpha$	–	<i>supE44 <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\phi</math>80 lacZ<math>\Delta</math>M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Klonierung, Mutagenese, Plasmidpräparation	
XL1-Blue	Tet <sup>R</sup>		Mutagenese	Stratagene (heute Agilent Technologies)

Für die langfristige Lagerung von Bakterienstammkulturen bei -80 °C wurde die jeweilige ü.N.-Kultur mit 15 % wasserfreiem, sterilem Glycerin vermischt und in Form von 50  $\mu$ l-Aliquoten in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren.

### 3.1.4 Plasmide

Folgende ToxR/TMD/MalE-kodierende Plasmide wurden verwendet:

Plasmid	Resistenz	relevanter Genotyp	Verwendung	Referenz/Quelle
pToxRI	Cm <sup>R</sup>	<i>toxR::toxR/tmd/malE(<math>\Delta</math>367-370); ColE1-Replilationsursprung</i>	Klonierung	[57,112]
pToxRIV	Km <sup>R</sup>	<i>araBAD::toxR/tmd/malE(<math>\Delta</math>367- 370)/myc; ColE1-Replikationsursprung</i>	homotypische Interaktionsanalyse	[116]
pToxRV	Km <sup>R</sup>	<i>araBAD::toxR/tmd/malE(<math>\Delta</math>367- 370)/myc/his6; ColE1-Replikationsursprung</i>	homotypische Interaktionsanalyse	[133]
Plasmid- Kontrolle (pc)	Km <sup>R</sup>	<i>araBAD::<math>\Delta</math>(toxR*/tmd/malE(<math>\Delta</math>367- 370)/myc); ColE1-Replikationsursprung</i>	dominant-negativer ToxR*-Assay	[126]
pToxRVI	Km <sup>R</sup>	<i>araBAD::toxR*-S87G/tmd/malE; araBAD::toxR*-S87H/tmd/malE; ColE1-Replikationsursprung</i>	dominant-negativer ToxR*-Assay	[126], diese Arbeit
pToxRVII	Cm <sup>R</sup>	<i>araBAD::toxR/tmd/malE(<math>\Delta</math>367- 370)/myc/his6; p15A-Replikationsursprung</i>	dominant-negativer ToxR*-Assay; heterotypische Interaktionsanalyse	[126], diese Arbeit
pToxRVIII	Cm <sup>R</sup>	<i>toxR::toxR/tmd/malE(<math>\Delta</math>367-370)/ myc/his6; p15A-Replikationsursprung</i>	dominant-negativer ToxR*-Assay	diese Arbeit
pToxRIX	Km <sup>R</sup>	<i>araBAD::toxR/tmd/malE; ColE1-Replikationsursprung</i>	heterotypische Interaktionsanalyse	diese Arbeit

Das Plasmid pToxRVI mit der Mutation S87G (Codonaustausch: AGC→GGC) bzw. S87H (Codonaustausch: AGC→CAC) in der ToxR-Domäne wurde von E. Lindner [133] hergestellt und selektiert.

Weiterführend wurden in dieser Arbeit in das Plasmid pToxRVI die vier zuvor deletierten Aminosäuren R<sup>367</sup>ITK<sup>370</sup> am C-Terminus der MalE-Domäne und ein darauffolgendes Stoppcodon mittels ortsgerichteter Mutagenese eingefügt (siehe Abschnitt 4.2.1). Ebenfalls mittels ortsgerichteter Mutagenese wurde in pToxRVII eine zweite NheI-Schnittstelle entfernt, die sich außerhalb der ToxR/TMD/MalE-kodierenden Region befand. Die dafür verwendeten Primer sind in Abschnitt 3.1.9 aufgelistet.

Zur Herstellung von Vektor pToxRVIII wurde der *araBAD*-Promotor aus Plasmid pToxRVII durch Bsu15I (ClaI)-Verdau, Auffüllen des entstandenen 5'-Überhangs mit dem Klenow-Fragment und anschließendem Verdau mit NheI entfernt. Der *toxR*-Promotor wurde aus Plasmid pToxRI mittels SmaI/NheI-Verdau ausgeschnitten und in den Bsu15I/NheI behandelten pToxRVII-Vektor ligiert.

pToxRIX wurde durch Ligation von XbaI/Pfl23II verdautem pToxRVI-S87H-Vektor und XbaI/Pfl23II verdautem Insert (siehe 3.2.4), aus pToxRV stammend, kloniert.

### 3.1.5 Antibiotika

Antibiotikum	finale Konzentration	Selektion von
Ampicillin	100 µg/ml in dH <sub>2</sub> O	FHK12
Tetracyclin	12,5 µg/ml in Ethanol	PD28, XL1-Blue
Kanamycin	33 µg/ml in dH <sub>2</sub> O	Plasmide pToxRIV, V, VI, IX und pc
Chloramphenicol	30 µg/ml in Ethanol	Plasmide pToxRI, VII und VIII

### 3.1.6 Enzyme und Antikörper

Alle Restriktionsendonukleasen und DNA-modifizierenden Enzyme (T4 DNA-Ligase, Klenow-Fragment) wurden von Fermentas bezogen. Die PfuTurbo-Polymerase stammte von Stratagene (heute Agilent Technologies) und RNase A von Applichem.

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
primärer Antikörper		
Rabbit-Anti-MBP Antiserum	1:10 000	New England Biolabs
sekundärer Antikörper		
Anti-Rabbit IgG-AP-Konjugat	1:7 500	Promega

### 3.1.7 Größenstandards

Größenstandard	Verwendung	Bezugsquelle
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Agarose-Gelelektrophorese	Fermentas
Unstained Protein Molecular Weight Marker	SDS-PAGE	Fermentas

### 3.1.8 Kit-Systeme und spezielle Verbrauchsreagenzien/-materialien

Artikel	Verwendung	Bezugsquelle
<i>Kit-Systeme</i>		
NucleoSpin® Plasmid	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Extract II	DNA-Isolierung aus Agarosegel	Macherey-Nagel
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	ortsgerichtete Mutagenese	Stratagene (heute Agilent Technologies)
SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC	DNA-Sequenzierung	Epicentre Biotechnologies
<i>Verbrauchsreagenzien</i>		
dNTP-Mix (10 mM)	ortsgerichtete Mutagenese; Auffüllen von 5'-Überhängen mit Klenow-Fragment	Fermentas
Long Ranger® Gellösung, 50 %	25-41 cm Sequenziergel	Biozym
Rapidgel-XL-40 % concentrate	66 cm Sequenziergel	Amersham Bioscience (heute GE Healthcare Bio-Sciences)
<i>Verbrauchsmaterialien</i>		
Filterpapier (Sorte: FN 7a; 200 g/m <sup>2</sup> )	Western-Blot	Munktell & Filtrak GmbH
Nitrocellulose Membran	Western-Blot	Amersham Bioscience (heute GE Healthcare Bio-Sciences)

### 3.1.9 Oligonukleotide

Primer zur Sequenzanalyse sind am 5'-Ende fluoreszenzmarkiert (IRD700, IRD800) und wurden von MWG-Biotech bezogen. Diese wurden in dH<sub>2</sub>O gelöst und die Stammlösung mit einer Konzentration von 100 pmol/μl bei -20 °C lichtgeschützt gelagert.

Alle weiteren Oligonukleotide sind entsalzt und unmodifiziert und wurden in einem Maßstab von 25 nmol von Invitrogen bezogen. Von diesen wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 1-2 µg/µl (in dH<sub>2</sub>O) hergestellt und bei -20 °C aufbewahrt.

Hier nicht aufgeführte Mutageneseprimer wurden gemäß der Angaben des Herstellers des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits entworfen und eingesetzt.

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>Verwendung</b>
Tox700up (Toxsequp)	IRD700-CGCAGAATCAAGCAGTGTGCC	Sequenzierung TMD/MalE
Tox800down (Toxseqdown)	IRD800-CCGTTATAGCCTTTATCGCCG	Sequenzierung TMD/ToxR
new pBAD primer	IRD800-TCACGGCAGAAAAGTCCACATTG	Sequenzierung Promotor/ToxR
Myc700down	IRD700-GGTGGTTCAGATCTTCTTCGCTG	Sequenzierung MalE
+ StopMalE for	GACGCGCAGACTTAATCGAGCTCGGTAC	Modifikation von pToxRVI; Mutagenese
+ StopMalE rev	GTACCGAGCTCGATTAAAGTCTGCGCGTC	Modifikation von pToxRVI; Mutagenese
full length MalE	GACGCGCAGACTCGCATCACCAAATAATCG AGCTCGGTAC	Modifikation von pToxRVI; Mutagenese
full length MalE rev	GTACCGAGCTCGATTATTTGGTGATGCGAG TCTGCGCGTC	Modifikation von pToxRVI; Mutagenese
delta NheI pToxRVII	GGACATCAGCGCTGGCGGAGTGTATACTGG	Modifikation von pToxRVII; Mutagenese
delta NheI pToxRVII anti	CCAGTATACACTCCGCCAGCGCTGATGTCC	Modifikation von pToxRVII; Mutagenese
αv mut GP (mit ApaI-Schnittstelle)	CTAGCGTGATCATTCTGGCGGTGGGGCCCG GCCTGCTGCTCCTGGG	Parental-TMD bei Kassettenklonierung
αv mut GP as (mit ApaI-Schnittstelle)	GATCCCCAGGAGCAGCAGGCCGGGCCCCAC CGCCAGAATGATCACG	Parental-TMD bei Kassettenklonierung
anti αIIb (mit ApaI- & XhoI- Schnittstelle)	CTAGCGACGTCGCGTATGTGATGCTGCTGC CGTTTTTCATTGGCCTGCTTCTGGCCTGA TTTTTGGCGGTGCGTTTTGGGGCCCGGCGC GCCATCTGCTCGAGG	Parental-TMD bei Kassettenklonierung
anti αIIb as (mit ApaI- & XhoI- Schnittstelle)	GATCCCCTCGAGCAGATGGCGCGCCGGGCC CCAAAACGCACCGCCAAAATCAGGCCCAG AAGCAGGCCAATGAAAACGGCAGCAGCAT CACATACGCGACGTCG	Parental-TMD bei Kassettenklonierung

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>Verwendung</b>
GpAili 5x mut	CTAGCGTGGGCATTTTCATCGTGATGGCGAT CGTGATCGGCCG	Kassettenklonierung
GpAili 5x mut rev	GATCGCGCCGATCACGATCGCCATCACGATG AAAATGCCACG	Kassettenklonierung
alphaIb TMD/CD	CTAGCTGGGTGCTGGTGGGTGTGCTGGGTGG CCTGCTGCTGCTCACCATCCTGGTCTGGCC ATGTGGAAGGTCGGCTTCTTCAAGCGGAACG G	Kassettenklonierung
alphaIb TMD/CD anti	GATCCCGTTCGGCTTGAAGAAGCCGACCTTC CACATGGCCAGGACCAGGATGGTGAGCAGCA GCAGGCCACCCAGCACACCCACCAGCACCCA G	Kassettenklonierung
beta 3 # 10	CTAGCATCCTGGTGGTCTGCTCTCCGTGAT GGGCGCGATCCTGCTCATCGGCCTGGCGGCC CTGCTCATCTGGAAACTGCTCATCACCATCC ATGATGG	Kassettenklonierung
beta 3 # 10 anti	GATCCCATCATGGATGGTGATGAGCAGTTTC CAGATGAGCAGGGCCGCCAGGCCGATGAGCA GGATCGCGCCCATCACGGAGAGCAGAACCAC CAGGATG	Kassettenklonierung
beta3 delta ILV sense	CTTGGGGAATCGAGCTAGCGTTCTGCTCTCC GTGATG	Mutagenese
beta3 delta ILV as	CATCACGGAGAGCAGAACGCTAGCTCGATTC CCCAAG	Mutagenese
beta3 dILV L712R	CTAGCGTTCTGCTCTCCGTGATGGGCGCGAT CCTGCTCATCGGCCTGGCGGCCCGTCTCATC TGGAAACTGCTCATCACCATCCATGATGG	Kassettenklonierung
beta3 dILV L712R as	GATCCCATCATGGATGGTGATGAGCAGTTTC CAGATGAGACGGGCCGCCAGGCCGATGAGCA GGATCGCGCCCATCACGGAGAGCAGAACG	Kassettenklonierung
L16-D5/R6/C8/Y9/G13	CTAGCCTCCTGTTGTTAGATCGCCTCTGCTA TCTCTTACTTGGCTTACTTCTGGG	Kassettenklonierung
L16-D5/R6/C8/Y9/G13 as	GATCCCCAGAAGTAAGCCAAGTAAGAGATAG CAGAGGCGATCTAACAAACAGGAGG	Kassettenklonierung

### 3.1.10 Geräte und Software

<b>Gerät</b>	<b>Typenbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
ELISA-Reader	Thermomax microplate reader inkl. Softmax Pro 3.0	Molecular Devices
Sequenziergerät	DNA Sequencer LONG READIR 4200 inkl. Base ImageIR Image Analysis 4.0	LI-COR Biosciences
Sequenzeditierung	BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3	[134]
Thermocycler	Mastercycler	Eppendorf

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Elektrophoreseapparatur SDS-PAGE	PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S; PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S	peqlab
Zentrifugen	Zentrifuge Z 513 K	Hermle
	Tischzentrifuge Z 233 MK-2	Hermle
	Vakuumzentrifuge Univapo 100 H	UniEquip
Photometer	Ultrospec 3100 <i>pro</i> Photometer	Amersham Bioscience (heute GE Healthcare Bio-Sciences)

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Bei der Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde nach der Methode von Hanahan [135] verfahren. Dafür wurden 50 ml SOC-Medium mit 1 ml einer ü.N.-Kultur inokuliert und bei 250 rpm sowie 37 °C inkubiert. Sollten Zellen kompetent gemacht werden, die bereits mit einem Plasmid transformiert waren, wurden zur Selektion 30 µg/ml Chloramphenicol (pToxRVII, pToxRVIII) oder 33 µg/ml Kanamycin (pToxRIX) zum SOC-Medium gegeben. Die Kultur wurde in der logarithmischen Wachstumsphase nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,4 - 0,6 (bei 600 nm) in 50 ml-Falconröhrchen überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 4 000 rpm (Hermle Zentrifuge Z 513 K), 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgossen und das Pellet in 15 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert. Nach 10 min auf Eis wurde die Zellsuspension erneut wie oben angegeben zentrifugiert, das Pellet in 5 ml Transformationspuffer resuspendiert und unter leichtem Vortexen mit 175 µl DMSO versetzt. Im Anschluss an eine 5 min Inkubation wurden nochmals 175 µl DMSO (finale Konzentration: 7 % (v/v)) zugegeben und wiederholt für 5 min auf Eis gestellt. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert (je 200 µl), in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80 °C gelagert.

#### SOC-Medium (pH 7)

10 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM MgSO<sub>4</sub>  
 20 mM Glukose  
 in SOB-Medium (siehe 3.1.2)  
 (die 1 M Stammlösungen wurden  
 sterilfiltriert)

#### Transformationspuffer (pH 6,7)

10 mM PIPES  
 15 mM CaCl<sub>2</sub>  
 250 mM KCl  
 55 mM MnCl<sub>2</sub>  
 (MnCl<sub>2</sub> wurde erst nach dem Einstellen  
 des pH-Werts mit KOH zugegeben;  
 der Puffer wurde sterilfiltriert)

### 3.2.2 Hitzeschocktransformation von *Escherichia coli*

200 µl chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (Abschnitt 3.2.1) wurden mit 100 – 1000 ng Plasmid-DNA vermischt und 15 – 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen für 90 s in ein 42 °C warmes Wasserbad getaucht und zum Abkühlen für 2 min auf Eis gestellt. Zu dem Transformationsgemisch wurden 800 µl LB-Medium gegeben und zur Ausbildung der Antibiotikumsresistenz unter ständigem Schütteln für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde entweder auf LB-Agar ausplattiert oder zum Animpfen (1:100) von Flüssigkultur verwendet.

### 3.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

2 ml ü.N.-Kultur wurden bei 13 000 rpm (Hermle Tischzentrifuge Z 233 MK-2) und 4 °C für 1 min zentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt und das Zellpellet unter starkem Schütteln in 100 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer, Vermischen durch fünfmaliges Invertieren und Inkubation bei RT für 2 – 3 min (jedoch nicht länger als 5 min). Anschließend wurden 150 µl gekühlter Neutralisationspuffer zugegeben und durch vorsichtiges Invertieren mit dem Lysat vermischt. Die präzipitierten Proteine und chromosomale DNA wurden daraufhin bei 13 000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert, der abgenommene Überstand 1:1 mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und durch Vortexen vermischt. Nach 2 min Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4 °C wurde der wässrige Überstand frei von Proteinen und organischer Phase abpipettiert, 1:1 mit Isopropanol durch Vortexen gemischt und 2 min bei RT inkubiert. Die gefällte Plasmid-DNA wurde bei 13 000 rpm und 4 °C 30 – 60 min abzentrifugiert und das Pellet, nach vollständigem Entfernen des Isopropanols, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Dabei wurde das Pellet nicht vollständig resuspendiert, sondern das Reaktionsgefäß lediglich mehrfach invertiert. Anschließend wurde die DNA erneut für 10 min bei 13 000 rpm und 4 °C zentrifugiert, Ethanol vollständig abpipettiert und das Pellet entweder bei RT (~20 min bzw. bis kein Ethanol-Geruch mehr wahrnehmbar war) oder für 1 – 2 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde unter 20 min Schütteln bei RT in 25 – 50 µl dH<sub>2</sub>O (*low copy number* Plasmide: 25 µl; *high copy number* Plasmide: 50 µl) mit 40 µg/ml RNase A gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Präparation von sehr reiner Plasmid-DNA wurde das Kit NucleoSpin® Plasmid von Macherey-Nagel gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden alle empfohlenen Waschschriffe durchgeführt, um evtl. vorhandene Nukleasen zu inaktivieren.

#### Resuspensionspuffer (pH 8,0)

50 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

#### Lysepuffer

200 mM NaOH

1 % (w/v) SDS

#### Neutralisationspuffer (pH 5,5)

3 M Kaliumacetat

(pH mit konz. Essigsäure eingestellt)

### 3.2.4 Restriktionsverdau

Sofern nicht anders ausgewiesen, erfolgte der Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen gemäß den Angaben des Herstellers. Für präparative Zwecke wurden 2,5 – 4 µg und für Verdau zu Kontrollzwecken 0,1 – 1 µg DNA eingesetzt und 1 h oder länger inkubiert. Dabei wurden folgende Enzyme verwendet:

<b>Restriktionsendonukleasen</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Besonderheiten</b>
NheI/BamHI-Doppelverdau	Kassettenklonierung; Deletion der TMD	Inkubation für max. 1 h
NheI/Pfl23II-Doppelverdau (Pfl23II = BsiWI)	Austausch der TMD zwischen verschiedenen Vektoren	es wurde zunächst nur die Hälfte der verwendeten Menge Pfl23II eingesetzt, nach der Hälfte der Inkubationszeit wurde die restliche Menge Pfl23II in den Ansatz gegeben
XbaI/Pfl23II-Doppelverdau (Pfl23II = BsiWI)	Austausch ToxR-Domäne (pToxRIX, Abschnitt 3.1.4)	siehe NheI/Pfl23II-Doppelverdau
ApaI	Linearisierung von Parental- Vektor (siehe 3.1.9) bei Kassettenklonierung/TMD- Austausch zwischen Vektoren	nach Ligation/Inaktivierung der Ligase wurde der Ansatz mit BSA versetzt (siehe Abschnitt 3.2.8)
XhoI	Kontrolle, ob Parental-TMD anti $\alpha$ IIb (siehe 3.1.9) entfernt	
ApaI/XhoI-Doppelverdau	Kontrolle, ob Parental-TMD $\alpha$ v mut GP (s. 3.1.9) entfernt	Inkubation bei 30 °C
DpnI	Mutagenese (Abschnitt 3.2.11)	

### 3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die größenabhängige Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1 %-igen (w/v) Agarosegelen inkl. 0,5 µg/ml Ethidiumbromid bei einer Spannung von 120 V. Vor dem Auftragen wurde die DNA mit Ladepuffer (Loading Dye, Fermentas) versetzt und das Gel mit TBE- oder TAE-Puffer überschichtet. TAE-Puffer wurde zur Auftrennung von Fragmenten eingesetzt, die für Klonierungszwecke verwendet und somit wieder aus dem Gel extrahiert werden sollten. Zur Größen- und Konzentrationsabschätzung wurde ein Größenstandard (siehe 3.1.7) mit Fragmenten definierter Länge und Konzentration mitgeführt. Die Visualisierung der DNA erfolgte mit UV-Licht (312 nm).

#### **TBE (pH 8)**

89 mM Tris

89 mM Borsäure

2,5 mM EDTA

#### **TAE (pH 8)**

40 mM Tris-Acetat

1 mM EDTA



### 3.2.6 Isolierung von DNA aus Agarosegel

Zu Klonierzwecken elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente (siehe 3.2.5) wurden mit 70 % UV-Licht-Intensität (312 nm) im Agarosegel visualisiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kits von Macherey-Nagel.

### 3.2.7 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsabschätzung von Phenol/Chloroform extrahierter DNA (Abschnitt 3.2.3) wurden 0,1 – 1 µg Plasmid mit Pfl23II linearisiert (siehe 3.2.4) und zusammen mit einem Größenstandard (Abschnitt 3.1.7) in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Die Plasmid-Konzentration wurde anschließend durch Vergleich der Bandenintensität der Probe mit der Intensität von Marker-DNA bekannter Konzentration und gleicher Größe abgeschätzt.

Die Konzentration Kit-präparierter DNA (Abschnitt 3.2.3) wurde photometrisch durch Messung der Absorption einer 1:50 verdünnten DNA-Lösung bei 260 nm ( $A_{260}$ ) in einer Quarzküvette bestimmt. Ein Absorptionswert von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml. Weiterhin wurde die Absorption der verdünnten DNA-Lösung bei 280 nm ( $A_{280}$ ) gemessen, um eine mögliche Verunreinigung der Probe mit Proteinen festzustellen. Bei einem Verhältnis von  $A_{260}/A_{280}$  zwischen 1,8 – 2 galt die DNA als rein.

### 3.2.8 Kassettenklonierung

Bei komplett neu herzustellenden ToxR/TMD/MalE-Konstrukten wurde die TMD mittels Kassettenklonierung in den entsprechenden Vektor (Abschnitt 3.1.4) inkloniert. Zunächst wurden je 2 µg TMD-kodierender Sense- und Antisense-Oligonukleotide (Abschnitt 3.1.9) in einem Volumen von 10 µl durch 5 min Inkubation bei 80 °C und langsames Abkühlen auf RT zu Doppelsträngen hybridisiert. Die entstandene Oligonukleotidkassette (ca. 1 µg), mit einem einzelsträngigen NheI- und BamHI-Überhang, wurde anschließend in einen NheI/BamHI verdauten Vektor (0,5 – 0,75 µg) ligiert (siehe 3.2.10). Als Ausgangsvektoren wurden dabei Plasmide verwendet, welche entweder die TMD  $\alpha v$  mut GP oder anti  $\alpha I Ib$  enthielten, da bei diesen eine ApaI-Schnittstelle in der TMD-Region vorhanden ist. Somit konnten nach Ligation Vektoren mit parentaler TMD selektiv durch Verdau mit ApaI entfernt werden. Anschließend wurden mit 10 µl des Reaktionsansatzes chemisch kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert und auf LB-Agar inkl. Antibiotikum ausplattiert. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung (siehe 3.2.12) überprüft.

### 3.2.9 Auffüllen von 5'-Überhängen

Zur Deletion der TMD wurde das gewählte Plasmid mit NheI/BamHI verdaut, die generierten 5'-Überhänge mittels Klenow-Fragment aufgefüllt und die doppelsträngigen Enden religiert. Auch der 5'-Überhang des Bsu15I (ClaI) verdauten pToxRVII-Vektors wurde zur Herstellung von pToxRVIII mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Die weiteren Schritte zur Klonierung von pToxRVIII sind unter 3.1.4 angegeben. Für das Auffüllen von 5'-Überhängen wurden folgende Reaktionsbedingungen eingestellt:

0,5 – 4 µg verdaute Plasmid-DNA

1x Reaktionspuffer (Klenow-Fragment ist auch in T4 DNA-Ligase-Puffer und den Standardpuffern der Restriktionsendonukleasen aktiv)

0,1 mM dNTP-Mix

5 U Klenow-Fragment

mit dH<sub>2</sub>O auf 25 µl aufgefüllt und 30 min bei 25 °C inkubiert

Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Inkubation bei 75 °C für 20 min.

### 3.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Erzeugung eines zirkulären Plasmids aus zwei DNA-Fragmenten wurde mindestens ein dreifacher Überschuss an Insert zu 150 – 750 ng linearisiertem Vektor gegeben. Die Reaktion wurde mit 5 – 10 U T4 DNA-Ligase in einem Volumen von 20 µl bei 16 °C (1 – 16 h) durchgeführt und durch Inaktivierung der Ligase infolge von 10 min Inkubation bei 65 °C gestoppt. Zur Eliminierung des Ausgangsvektors mit parentaler TMD ( $\alpha$ v mut GP, anti  $\alpha$ Ib; enthalten ApaI-Schnittstelle) wurde der Ligationsansatz mit BSA (final 100 µg/ml) sowie 7,5 U ApaI versetzt und für 1 – 2 h bei 25 °C inkubiert. Mit 10 µl des Ligationsgemischs wurden 200 µl chemisch kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert und auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum vereinzelt. Nach der Präparation von Plasmid-DNA aus gepickten Klonen wurde durch ApaI und/oder XhoI Verdau (siehe 3.2.4) überprüft, ob die Ausgangs-TMD ersetzt wurde.

### 3.2.11 Ortsgerichtete Mutagenese

Punktmutationen sowie Insertionen und Deletionen von bis zu vier Aminosäuren wurden mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Protokolls von Stratagene (Agilent Technologies) mit speziell entworfenen Mutagenese-Primern (siehe 3.1.9) gemäß Herstellerangaben erzeugt. Das

Reaktionsgemisch mit einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  umfasste neben einfach konzentriertem Reaktionspuffer etwa 20 ng Template-DNA, jeweils 125 ng komplementäre Mutagenese-Primer, 200  $\mu\text{M}$  dNTP-Mix und 2,5 U PfuTurbo-Polymerase. Die Mutagenesereaktion geschah unter folgenden Bedingungen:

Aufheizen des Deckels		105 °C	
Initiale Denaturierung	30 s	95 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	} 16 – 18 Zyklen
Annealing	1 min	55 °C	
Elongation	6 min	68 °C	

Im Reaktionsansatz enthaltene Template-DNA wurde nach Zugabe von 10 U DpnI während einer einstündigen Inkubation bei 37 °C verdaut. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  chemisch kompetente XL1-Blue- oder DH5 $\alpha$ -Zellen mit 10  $\mu\text{l}$  Mutageneseansatz transformiert und auf selektivem LB-Agar ausplattiert. Mittels Sequenzierung wurden die erzeugten Konstrukte überprüft (Abschnitt 3.2.12).

### 3.2.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung hergestellter Konstrukte erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger [136] mit Hilfe des SequiTherm EXCELII DNA-Sequenzierkits der Firma Epicentre Biotechnologies. Dabei wurde zunächst die Kettenabbruchreaktion unter Verwendung eines 5'-fluoreszenzmarkierten Primers (siehe 3.1.9) und vier verschiedener Terminationsgemische (inkl. ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) durchgeführt. Zur Sequenzierung einer Probe wurde folgender Mastermix hergestellt:

7,2  $\mu\text{l}$  3,5x Sequenzierpuffer  
 ca. 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA  
 2 pmol IRD-markierter Primer (siehe 3.1.9)  
 2,5 U DNA-Polymerase  
 mit dH<sub>2</sub>O auf 17  $\mu\text{l}$  aufgefüllt

Je 3,8  $\mu\text{l}$  von diesem Mastermix wurden zu je 2  $\mu\text{l}$  Terminationsgemisch (inkl. ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) gegeben. Somit resultierten für die Analyse einer Probe vier verschiedene Reaktionsansätze. Je nach Länge des zu analysierenden DNA-Abschnitts (siehe unten) wurden entweder Terminationsgemische für kurze Gele (25 – 44 cm) oder für lange Gele (66 cm) verwendet.

Nachfolgende Bedingungen wurden für die Reaktion eingestellt:

Aufheizen des Deckels		104 °C	
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	} 30 Zyklen
Annealing	15 s	58 °C	
Elongation	1 min	70 °C	

Im Anschluss daran wurde jeder Reaktionsansatz mit 3 µl Stop/Loading-Puffer versetzt und für 4 min bei 94 °C denaturiert. Die Auftrennung der erhaltenen IRD-markierten DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte mittels des DNA Sequencers LONG READIR 4200 (LI-COR Biosciences). Mit einer Mehrkanal-Hamilton-Spritze (gas-tight, #1701, abnehmbare Nadel: 0,2 mm Durchmesser) wurde von jedem der vier Reaktionsansätze (A, C, G, T) ca. 1 µl separat auf ein Polyacrylamidgel geladen. Sollten bis zu 300 bp sequenziert werden, handelte es sich dabei um ein 25 cm langes und 0,25 mm starkes Gel, mit welchem die Elektrophorese bei 1200 V, 37 mA, 40 W und 50 °C durchgeführt wurde. Waren 300 – 900 bp zu analysieren, wurde ein 66 cm langes und 0,25 mm starkes Gel hergestellt und die Proben bei 2200 V, 40 mA, 45 W und 45 °C aufgetrennt. Die Fluoreszenzsignale der DNA-Fragmente wurden nach Anregung mit einem Laser detektiert, das aufgenommene Bandenmuster mit Hilfe der Base ImageIR Image Analysis 4.0 Software (LI-COR Biosciences) als Text und Chromatogramm (SCF-Datei) ausgelesen und mit BioEdit (Version 7.0.5.3) ausgewertet.

#### **25 cm Sequenziergel**

4 ml 50 % Long Ranger<sup>®</sup>-Gellösung (Biozym)  
 10,5 g Harnstoff  
 1x Long run TBE-Puffer  
 3,75 ml Formamid  
 mit dH<sub>2</sub>O auf 25 ml aufgefüllt  
 25 µl TEMED  
 175 µl 10 % (w/v) APS

#### **Long run TBE (pH 8,3 – 8,7)**

134 mM Tris  
 45 mM Borsäure  
 2,5 mM EDTA

#### **66 cm Sequenziergel**

5,8 ml Rapid Gel XL 40% (Amersham)  
 21 g Harnstoff  
 1x Long run TBE-Puffer  
 3,05 ml Formamid  
 mit dH<sub>2</sub>O auf 50 ml aufgefüllt und durch  
 Einmalfilter (Porengröße 0,45 µm) filtiert  
 75 µl TEMED  
 350 µl 10 % (w/v) APS

### 3.3 Protein- und Immunochemische Methoden

#### 3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße erfolgte mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese nach Laemmli [129]. Dafür wurden die Zellpellets aus 600 µl Kultur durch kräftiges Schütteln in 150 µl SDS-Probenpuffer solubilisiert, 10 min bei 95 °C denaturiert und 6 – 10 µl auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Während sich die Proben im Sammelgel bewegten, lag eine Spannung von 120 V an. Mit Erreichen des Trenngels wurde eine Spannung von 150 V sowie eine Stromstärke von 25 – 50 mA eingestellt. Die Auftrennung von Proben, die bei der Analyse homotypischer TMD-Interaktion abgenommen wurden, erfolgte in einem Trenngel mit 10 % Polyacrylamid (PAA). Proben aus Kulturen, die zwei verschieden große ToxR-Proteine zur Untersuchung heterotypischer Interaktion exprimierten, wurden in einem Trenngel mit 8 % PAA separiert. Als Größenstandard wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker von Fermentas eingesetzt.

##### Trenngelpuffer (pH 8,5)

1M Tris-HCl  
0,26 % (w/v) SDS

##### Sammelgelpuffer (pH 6,8)

0,25 M Tris-HCl  
0,2 % (w/v) SDS

##### Laufpuffer (pH 8,3)

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,1 % (w/v) SDS

##### SDS-Probenpuffer (pH 6,8)

50 mM Tris-HCl  
5 % (w/v) SDS  
20 % (w/v) Saccharose  
10 % (v/v) β-Mercaptoethanol  
0,02 % (w/v) Bromphenolblau

##### Polyacrylamid-Lösung (PAA)

30 % (w/v) Acrylamid  
0,8 % (w/v) Bisacrylamid

##### Trenngel (10 %)

2,45 ml PAA  
2,8 ml Trenngelpuffer  
2,05 ml dH<sub>2</sub>O  
5 µl TEMED  
50 µl 10 % (w/v) APS

##### Trenngel (8 %)

1,95 ml PAA  
2,8 ml Trenngelpuffer  
2,55 ml dH<sub>2</sub>O  
5 µl TEMED  
50 µl 10 % (w/v) APS

##### Sammelgel (3,75 %)

0,4 ml PAA  
1,6 ml Sammelgelpuffer  
1,2 ml dH<sub>2</sub>O  
5 µl TEMED  
25 µl 10 % (w/v) APS

Die hier angegebenen Mengen dienen zur Herstellung eines etwa 10 cm x 10 cm großen Gels (PerfectBlue Doppeltgelsystem Twin S von peqlab). Für die Herstellung eines Gels mit den Ab-

messungen von etwa 20 cm x 10 cm (PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S von peqlab) wurde das doppelte Volumen eingesetzt.

### 3.3.2 Western-Blotting und immunologische Detektion von ToxR-Proteinen

Der spezifische Nachweis von ToxR-Proteinen im Gesamtzelllysate exprimierender Zellen erfolgte immunologisch nach vorheriger Auftrennung mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.1) und deren Immobilisierung auf einer Membran. Die Proteine wurden dabei unter Anwendung des Semidry-Blotting Verfahrens [128] aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran sowie acht Lagen Filterpapier wurden entsprechend der Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und in Transferpuffer getaucht. Auf der Anode wurden vier der acht vorbereiteten Lagen Filterpapier luftblasenfrei platziert, gefolgt von der Nitrocellulosemembran, dem Trenngel, den vier anderen Lagen Filterpapier und der Kathode. Bei einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> wurden die Proteine über einen Zeitraum von 1,5 h elektrophoretisch auf die Membran übertragen und anschließend mit PonceauS angefärbt. Nach dem Entfernen von überschüssigem Farbstoff durch Waschen mit dH<sub>2</sub>O wurden die Banden des Größenstandards markiert und noch proteinfreie Stellen der Membran für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C mit BSA (3 % (w/v) in TBS-Puffer) blockiert. Die Membran wurde anschließend kurz mit TBS-Puffer gewaschen und für 1 h bei RT mit Rabbit-Anti-MBP Antiserum (New England Biolabs, 1:10 000 Verdünnung in TBS inkl. 3% (w/v) BSA) inkubiert. Dieser primäre Antikörper erkennt spezifisch die Maltosebindeprotein-Domäne der ToxR-Proteine. Durch dreimaliges, 5 min langes Waschen mit TBST-Puffer wurden lose gebundene Antikörper entfernt. Daraufhin folgte eine 1 h Inkubation (bei RT) mit dem sekundären Antikörper Anti-Rabbit IgG-AP-Konjugat (Promega, 1:7 500 Verdünnung in TBS inkl. 3% (w/v) BSA), an den das Indikatorenzym, die Alkalische Phosphatase (AP), gekoppelt ist. Nach drei weiteren fünfminütigen Waschschritten mit TBST erfolgte die Detektion der Antikörperbindung durch Zugabe der Entwicklerlösung inkl. BCIP als Substrat der Alkalischen Phosphatase und NBT als Oxidationsmittel. Beide Reaktionsprodukte fallen als blaugrauer Niederschlag aus und dokumentierten somit die Lokalisation der ToxR-Proteine. Die Farbreaktion wurde durch Waschen der Membran mit dH<sub>2</sub>O gestoppt.

<b>Transferpuffer</b>	<b>PonceauS-Lösung</b>	<b>TBS (pH 7,4)</b>
Laufpuffer (siehe 3.3.1)	0,3 % (w/v) PonceauS	10 mM Tris-HCl
20 % (v/v) Methanol	3 % (v/v) Trichloressigsäure	150 mM NaCl
<b>TBST (pH 7,4)</b>	<b>Entwicklerlösung</b>	<b>AP-Puffer (pH 9,5)</b>
TBS	20 ml AP-Puffer	100 mM Tris-HCl
0,5 % (v/v) Tween 20	60 µl BCIP-Lösung	100 mM NaCl
	120 µl NBT-Lösung	5 mM MgCl <sub>2</sub>

**BCIP-Lösung**

5 % (w/v) BCIP in  
Dimethylformamid

**NBT-Lösung**

5 % (w/v) NBT in  
70 % (v/v) Dimethylformamid

### 3.4 Analyse affiner Transmembrandomänen

#### 3.4.1 ToxR-Assay zur Interaktionsanalyse von Transmembrandomänen

Zur Charakterisierung der Interaktionsfähigkeit von TMDn wurde das ToxR-System verwendet. Parallel dazu wurden das Expressionslevel und die Integration der untersuchten Sequenzen in die innere Membran von PD28-Zellen überprüft. Die Funktionsprinzipien der angewendeten Methoden sind in Abschnitt 1.5 näher erläutert.

##### 3.4.1.1 Analyse homotypischer TMD-TMD-Interaktion

Für die Analyse der relativen Affinität von TMD-Homomeren mit dem klassischen ToxR-System wurden chemisch kompetente FHK12-Zellen mit dem Plasmid pToxRIV oder pToxRV (siehe 3.1.4) transformiert und Kulturen in LB-Medium inkl. 0,0025 % (w/v) L-Arabinose; 0,4 mM IPTG und Kanamycin angeimpft. Die Art und Dauer der Kultivierung transformierter FHK12-Zellen ist in Abschnitt 3.4.1.3 beschrieben.

##### 3.4.1.2 Analyse heterotypischer TMD-TMD-Interaktion

Die heterotypische Interaktion zwischen zwei verschiedenen TMDn wurde entweder mit Hilfe des dominant-negativen ToxR\*-Systems oder mit dem positiven 2-Plasmid gestützten ToxR-Assay untersucht. In beiden Fällen wurden FHK12-Zellen mit zwei genetisch kompatiblen Plasmiden (siehe 3.1.4) mit unterschiedlichem Replikationsursprung transformiert.

Im Rahmen des dominant-negativen ToxR\*-Assays wurden chemisch kompetente FHK12-Zellen, die bereits das *low copy number* Plasmid pToxRVII/pToxRVIII beinhalten, mit dem *high copy number* Plasmid pc/pToxRVI transformiert. Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium mit 0 – 0,01 % (w/v) L-Arabinose und den Antibiotika Chloramphenicol und Kanamycin, aber ohne IPTG.

Bei dem positiven 2-Plasmid gestützten ToxR-Assay wurden FHK12-Zellen in zwei Schritten mit den Plasmiden pToxRVII und pToxRIX transformiert und in LB-Medium mit 0,0025 % (w/v) L-Arabinose und 0,4 mM IPTG kultiviert. Die Selektion doppelt transformierter Zellen erfolgte durch

gleichzeitige Zugabe von Chloramphenicol und Kanamycin in das LB-Medium. Details zur Kultivierung transformierter FHK12-Zellen sind in Abschnitt 3.4.1.3 aufgeführt.

### 3.4.1.3 Kultivierung ToxR-Protein exprimierender FHK12-Zellen

Bei der Analyse von TMD-TMD-Interaktion wurde grundsätzlich zwischen Wt/parentalen TMDn unterschieden, deren Selbstaffinität niedriger/ähnlich der Affinität der Referenz-TMD von Glykophorin A (GpA, siehe Abschnitt 4.1) war, und Konstrukten, die eine stärkere Selbstaffinität als GpA aufwiesen.

Waren Sequenzen mit niedriger/ähnlicher Affinität wie GpA zu untersuchen (wie in Abschnitt 4.2), wurden FHK12-Zellen mit einem oder mehreren Vektoren transformiert und mit dem Transformationsansatz (1:100) eine 5 ml ü.N.-Kultur in LB-Medium inkl. erforderlichem Antibiotikum angeimpft. Mit dieser ü.N.-Kultur wurde wiederum eine neue Kultur in frischem LB-Medium (5 ml, 1:50) mit L-Arabinose und Antibiotikum inokuliert und die  $\beta$ -Gal-Aktivität nach 6 h bei 37 °C viermal (Vierfach-Bestimmung) gemessen.

Handelte es sich um Sequenzen mit höherer Affinität als GpA (wie in Abschnitt 4.3), erfolgte direkt die Inokulation (1:100) von viermal 1 ml LB-Medium inkl. L-Arabinose und Antibiotikum (vier parallele Kulturen pro Konstrukt). Die Kultivierung wurde in 24-Well-Zellkulturplatten (Falcon™, BD Biosciences) bei 37 °C und 200 rpm über einen Zeitraum von 20 h vorgenommen.

Die Art und Anzahl transformierter Plasmide sowie die eingesetzte Konzentration der L-Arabinose und von IPTG sind der Tab. 3.1 sowie den Abschnitten 3.4.1.1 und 3.4.1.2 zu entnehmen.

#### L-Arabinose-Stammlösung

1 % (w/v) L-Arabinose  
sterilfiltriert

#### IPTG-Stammlösung

0,1 M IPTG  
aliquotiert; bei -20 °C aufbewahrt

**Tab. 3.1:** Übersicht über Kultivierungsbedingungen von FHK12-Zellen im Rahmen verschiedener ToxR-Assays

Assay	Plasmid(e)	L-Ara [% (w/v)]	IPTG [mM]	Antibiotika	Kultivierung*	
					Affinität $\leq$ GpA	Affinität $>$ GpA
klassisch	IV/V	0,0025	0,4	Kan		
ToxR*	VII/VIII + pc/VI	0 – 0,01	–	Cm + Kan	mit ü.N.-Kultur neue Kultur angeimpft;	4 parallele Kulturen in 24-Well-Platte;
positiver 2-Plasmid- Assay	VII + IX	0,0025	0,4	Cm + Kan	6 h bei 37 °C	20 h bei 37 °C

\* Kultivierung transformierter FHK12-Zellen, die ToxR/TMD/MalE-Konstrukte mit niedrigerer/gleicher ( $\leq$ ) Affinität oder höherer ( $>$ ) Affinität als die TMD von GpA exprimieren



### 3.4.1.4 Messung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität infolge von TMD-TMD-Interaktion

Im Anschluss an die 6- bzw. 20-stündige Expression von ToxR-Konstrukten wurde die resultierende  $\beta$ -Gal-Aktivität der entsprechenden FHK12-Kulturen gemessen. Dazu wurden von jeder Kultur ein Mal (1 ml Kulturen in 24-Well-Platten) bzw. vier Mal (5 ml Kultur; siehe 3.4.1.3) 5  $\mu$ l in je ein separates Well einer Mikrotiterplatte (96-Well-Mikrotiterplatte, Sarstedt) überführt und jeweils 100  $\mu$ l chloroformhaltiger Z-Puffer zugegeben. Die Zelldichte der Suspension wurde durch Messen der Optischen Dichte bei 650 nm mit dem Thermomax microplate reader (Molecular Devices) ermittelt. Durch Zugabe von 50  $\mu$ l Z-Puffer inkl. 1,6 % (w/v) SDS, Durchmischen der Proben und Inkubation für 10 min bei 28 °C wurden die Zellen lysiert. Unmittelbar nach Zugabe von 50  $\mu$ l Z-Puffer inkl. 0,4 % (w/v) ONPG und Mischen der Proben durch Schütteln wurde die Entstehung des Hydrolyseprodukts bei 28 °C durch Messen der Absorption bei 405 nm ( $A_{405}$ ) über einen Zeitraum von 20 min in Intervallen von 30 s erfasst. Aus der Änderung von  $A_{405}$  (bis maximal zu einem Wert von  $A_{405} = 1$ ) pro Zeiteinheit lässt sich die Geschwindigkeit der Reaktion ableiten, aus der wiederum die Aktivität der  $\beta$ -Gal (in Miller Units, MU) nach folgender Formel ermittelt wurde:

$$[\text{MU}] = \frac{\Delta A_{405} / \Delta t [\text{min}]}{A_{650}} \cdot 1000 \quad [123]$$

Die Erfassung sowie die Berechnung der Rohdaten erfolgte mit der Software Softmax Pro 3.0 von Molecular Devices. Die weiterführende Auswertung der Daten wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Dazu zählten die Berechnung des Mittelwerts und der dazugehörigen Standardabweichung von 12 Datenpunkten aus drei unabhängigen ToxR-Assays. Im Rahmen des positiven ToxR-Assays zur Analyse heterotypischer TMD-TMD-Interaktion (Abschnitt 4.2.2) wurden die Standardabweichungen der mittleren  $\beta$ -Gal-Aktivitäten bei getrennter oder bei Koexpression der Interaktionspartner bzw. bei Bildung der Differenz der  $\beta$ -Gal-Aktivitäten ( $\Delta\beta$ -Gal-Aktivität; siehe Abb. 4.16) mit dem Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz (dargestellt für zwei Messgrößen:  $x_1$  und  $x_2$ ) berechnet:

$$s_y = \sqrt{\left(\frac{\partial y}{\partial x_1} \cdot s_1\right)^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial x_2} \cdot s_2\right)^2}$$

$s_y$  ... Standardabweichung der Zielgröße  
 $s_n$  ... Standardabweichung der n-ten Messgröße  
 $x_n$  ... Mittelwert der n-ten Messgröße

Mittelwert zweier Messgrößen:  $y = \frac{(x_1 + x_2)}{2}$

Differenz zweier Messgrößen:  $y = x_2 - x_1$

daraus folgt:

$$\frac{\partial y}{\partial x_1} = \frac{1}{2} \quad \text{und} \quad \frac{\partial y}{\partial x_2} = \frac{1}{2}$$

daraus folgt:

$$\frac{\partial y}{\partial x_1} = -1 \quad \text{und} \quad \frac{\partial y}{\partial x_2} = 1$$

$$s_y = \sqrt{\left(\frac{1}{2}\right)^2 \cdot s_1^2 + \left(\frac{1}{2}\right)^2 \cdot s_2^2}$$

$$s_y = \sqrt{(-1)^2 \cdot s_1^2 + (1)^2 \cdot s_2^2}$$

$$s_y = \frac{1}{2} \sqrt{s_1^2 + s_2^2}$$

$$s_y = \sqrt{s_1^2 + s_2^2}$$

**Z-Puffer (pH 7)**

60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 10 mM KCl  
 1 mM MgSO<sub>4</sub>

**chloroformhaltiger Z-Puffer**

Z-Puffer  
 10 % (v/v) Chloroform  
 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol  
 durch kräftiges Vortexen gemischt,  
 1 min bei 800 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Z 513 K),  
 wässriger Überstand verwendet

**3.4.2 PD28-Wachstumsassay zur Kontrolle der Membranintegration**

Mit Hilfe des MalE-defizienten *E. coli*-Stamms PD28 wurde die korrekte und effiziente Integration der ToxR/TMD/MalE-Konstrukte in die innere Bakterienmembran überprüft (siehe auch Abschnitt 1.5). Dazu wurden chemisch kompetente PD28-Zellen mit dem entsprechenden *high copy number* Plasmid (siehe 3.1.4) transformiert und mit dem Transformationsgemisch 1:100 eine ü.N.-Kultur in LB-Medium inkl. Antibiotikum angeimpft. Zellen aus 2 ml ü.N.-Kultur wurden durch 10 min Zentrifugation bei 3 500 rpm (Hermle Tischzentrifuge Z 233 MK-2) und 4 °C geerntet und durch Auf-/Abpipettieren in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert. Daraufhin folgten ein zweiter Waschschrift (wie oben) und die anschließende Aufnahme der Zellpellets in 1 ml PBS-Puffer. Die von LB-Medium befreiten PD28-Zellen wurden 1:200 in 5 ml M9-Minimalmedium inkl. 0,4 % (w/v) Maltose und Antibiotikum gegeben (pro Probe zwei parallele Kulturen) und bei 37 °C inkubiert. Nach ~15 h wurden je 200 µl Kultur in eine 96-Well-Mikrotiterplatte transferiert und deren Zelldichte durch Messung der Optischen Dichte bei 650 nm mit dem Thermomax microplate reader bestimmt. Zur Erfassung der Wachstumskinetik wurde dies mehrfach im Abstand von 2 – 3 h wiederholt. Als Referenz für fehlende bzw. effiziente Membranintegration wurden ein Konstrukt ohne TMD (ΔTM) bzw. AZ2 (siehe Abschnitt 4.1) mitgeführt.

**PBS (pH 7,4)**

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 137 mM NaCl  
 2,7 mM KCl  
 autoklaviert

**M9-Minimalmedium [123]**

48 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 9 mM NaCl  
 19 mM NH<sub>4</sub>Cl  
 autoklaviert;  
 vor Gebrauch Zugabe von sterilem  
 2 mM MgSO<sub>4</sub> (finale Konzentration)  
 1 µg/ml Thiamin (finale Konzentration)

---

<b>Maltose-Stammlösung</b>	<b>MgSO<sub>4</sub>-Stammlösung</b>	<b>Thiamin-Stammlösung</b>
10 % (w/v) Maltose	1 M MgSO <sub>4</sub>	1 mg/ml Thiamin
sterilfiltriert	sterilfiltriert	sterilfiltriert; bei 4 °C aufbewahrt

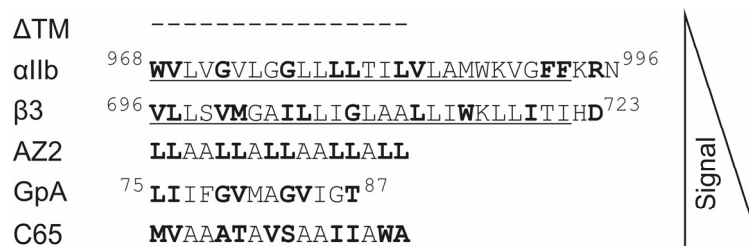
### **3.4.3 Western-Blot-Analyse zur Kontrolle des Expressionslevels**

Um das Expressionslevel verschiedener ToxR-Proteine zu vergleichen, wurden im Anschluss an einen ToxR-Assay pro Probe insgesamt 200 µl FHK12-Kultur abgenommen. Erfolgte die Kultivierung der FHK12-Zellen in je viermal 1 ml LB-Medium in 24-Well-Platten, dann wurden aus jeder der vier parallelen Kulturen 50 µl entnommen und vereinigt. Wurden die Zellen jedoch in 5 ml LB-Medium kultiviert, dann wurden pro Probe einmal 200 µl abpipettiert. Die Aliquote wurden 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert und die Pellets bei -20 °C aufbewahrt. Bei der zweiten und dritten Durchführung eines ToxR-Assays wurden erneut Aliquote exprimierender FHK12-Kulturen abgenommen und auf die zuvor geernteten Zellpellets gleicher Proben gegeben. Somit wurden bei drei ToxR-Assays insgesamt 600 µl Kultur gesammelt, welche für die SDS-PAGE vorbereitet wurden (siehe Abschnitt 3.3.1). Die Proteine im Zelllysate wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und zur spezifischen Detektion der ToxR-Proteine mittels Western-Blotting (siehe Abschnitt 3.3.2) auf eine Membran transferiert. Die Expressionslevel verschiedener ToxR/TMD/MalE-Konstrukte wurde durch Vergleich ihrer Bandenintensitäten abgeschätzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Verwendete Referenzkonstrukte

Die in dieser Arbeit verwendeten Referenzkonstrukte sind in Abb. 4.1 aufsteigend nach ihrer relativen Interaktionsstärke, gemessen mit dem ToxR-System, angeordnet. Anhand der aus ihrer Assoziation resultierenden  $\beta$ -Gal-Aktivität konnte die Selbstaffinität der untersuchten TMDn verglichen werden. Weiterhin dienten einige Referenzkonstrukte als Kontrollen bei der Etablierung der ToxR-Systeme für die Analyse heterotypischer TMD-TMD-Interaktion (siehe Abschnitte 4.2.1 und 4.2.2). Das Konstrukt  $\Delta$ TM ist ein ToxR-Protein mit deletierter TMD [130]. Es liegt in monomerer Form im Zytoplasma exprimierender Zellen vor und repräsentiert das basale Expressionslevel des Reportergens durch den *ctx*-Promotor. Die TMD AZ2 stellt ein Modell eines membranständigen Leucinzippers dar, der ein sich wiederholendes Heptadenmotiv enthält [124]. An den Positionen *a*, *d*, *e* und *g* (siehe Abb. 1.3 links) befinden sich Leucin-Reste, welche die mäßig affine Interaktion der TMD spezifisch vermitteln. Die dabei den Lipiden zugewandten Positionen *b*, *c* und *f* sind mit Alanin besetzt. Durch die Randomisierung dieses Heptadenmotivs mit allen 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren konnte die Sequenz C65 isoliert werden [118]. Die hohe Selbstaffinität von C65 wird maßgeblich durch ein Tryptophan an der C-terminalen *g*-Position verursacht. Als weitere Referenzen wurden TMDn natürlicher bitopischer Membranproteine verwendet, deren Helix-Helix-Kontaktfläche bereits gut charakterisiert ist. Die Affinität mit der die TMD von GpA assoziiert gilt als vergleichsweise hoch



**Abb. 4.1: Überblick über die verwendeten Referenzkonstrukte.**

Aminosäuresequenz der im Kontext von ToxR exprimierten Referenz-TMDn (siehe Text). Die Konstrukte sind aufsteigend nach der  $\beta$ -Gal-Aktivität (Signal) geordnet, die aus ihrer homotypischen Interaktion resultiert. Die Deletion der TMD bei  $\Delta$ TM ist durch Striche verdeutlicht. Fett hervorgehoben sind diejenigen Aminosäuren, die sich sehr wahrscheinlich an der Helix-Helix-Kontaktfläche der Homomere bzw. des  $\alpha$ Ib/ $\beta$ 3-Heterodimers [87] befinden. Im Fall der Modell-TMDn AZ2 und C65 zeigt dies gleichzeitig die Positionen des wiederholten Heptadenmotivs an [117]. Die an den Termini angegebenen Aminosäurepositionen entsprechen denen in den reifen, humanen Proteinen. GpA wurde analog zu [57] verwendet. Außerdem sind die im hydrophoben Kern der Membran lokalisierten Reste von  $\alpha$ Ib und  $\beta$ 3 unterstrichen [137,138].

[139] und liegt hauptsächlich an der engen Packung der Seitenketten an der Kontaktfläche, die das zentrale GxxxG-Motiv ermöglicht (siehe Abschnitt 1.4.3). Im Gegensatz dazu weisen die TMDn der Integrine  $\alpha$ IIb und  $\beta$ 3 eine relativ geringe bis mäßige Selbstaffinität auf [84,97,140]. Sie dienen vor allem als Modellsystem für die heterotypische TMD-TMD-Interaktion (siehe Abschnitt 4.2.2). Bei der Analyse von Heteromerbildung mit Hilfe des dominant-negativen ToxR\*-Systems kam außerdem die so genannte Plasmid-Kontrolle (pc) zum Einsatz. Diese Negativkontrolle repräsentiert ausbleibende heterotypische Interaktion, da auf diesem Plasmid der Leserahmen des Gens entfernt wurde, das sonst einen der beiden Interaktionspartner kodiert [126] (siehe Abschnitt 4.2.1).

## 4.2 ToxR-Systeme zur Analyse heterotypisch interagierender Transmembrandomänen

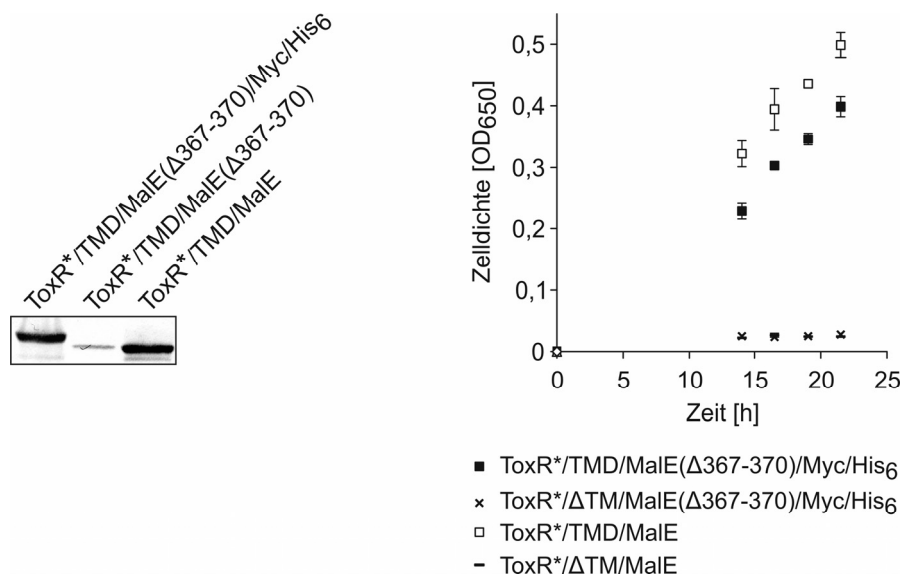
Grundlegendes Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Bedeutung polarer und ionisierbarer Aminosäuren für die homotypische und heterotypische Interaktion von TMDn mit Hilfe des ToxR-Systems. Da die Di- oder Oligomerisierung einer TMD die Assoziation der ToxR-Domäne und somit die Aktivierung der Reporterexpression vermittelt, kann die Interaktion in quantifizierbare Reporterenzymaktivität umgesetzt werden (siehe Abschnitt 1.5, Abb. 1.6). Um auf Basis dieses Prinzips die heterotypische Interaktion von TMDn analysieren zu können, wurden zwei Varianten des ToxR-Systems etabliert. Die dabei vorgenommenen Veränderungen des bestehenden dominant-negativen ToxR\*-Kompetitorsystems und die Konstruktion des neuen positiven ToxR-Systems zur Analyse von TMD-Heteromerisierung sind im Folgenden beschrieben.

### 4.2.1 Modifikation und Charakterisierung des dominant-negativen ToxR\*-Kompetitorsystems

Das dominant-negative ToxR\*-Kompetitorsystem beruht auf der Konkurrenz zwischen der homotypischen Interaktion einer im Wt-ToxR-Protein befindlichen TMD und ihrer heterotypischen Interaktion mit einer zweiten TMD, die mit einer transkriptionell inaktiven ToxR\*-Domäne fusioniert ist (Abb. 1.7). Da Wt-ToxR/ToxR\*-Heteromere den *ctx*-Promotor und dadurch die Expression des *lacZ*-Reportergens nur schwach oder gar nicht aktivieren, führt die erfolgreiche Konkurrenz der Wt-ToxR-Homomerisierung zu einer niedrigeren  $\beta$ -Gal-Aktivität als die ungestörte homotypische Assoziation. Zur Inaktivierung der ToxR-Domäne wurde der semikonservierte Rest S87, der sich vermutlich im DNA-Bindemotiv der Transkriptionsaktivator-Domäne befindet, durch Glycin substituiert [126]. Mit dieser ToxR\*-Mutante konnte gezeigt werden, dass die Selbstinteraktion des Referenzkonstrukts

ToxR-AZ2 durch Koexpression von ToxR\*-AZ2, aber nicht durch ToxR\*-A16 (Oligo-Ala-Sequenz) vermindert wird.

Bei der Durchführung des ToxR\*-Assays werden zwei genetisch kompatible Plasmide eingesetzt. Das Wt-ToxR-Protein ist dabei auf dem *low copy number* Plasmid pToxRVII und das ToxR\*-Protein auf dem *high copy number* Plasmid pToxRVI kodiert [126]. Da sich beide Proteine nur an der Position 87 der ToxR-Domäne und gegebenenfalls in ihrer TMD unterscheiden, weisen sie eine ähnliche Molekülgröße auf. Um ihre Expression dennoch mittels Western-Blot-Analyse eindeutig überprüfen zu können und um die Klonierung von TMDn in dieses System zu vereinfachen, wurden zunächst einige Modifikationen vorgenommen. Durch ortsgerichtete Mutagenese wurde in pToxRVI im Anschluss an das *malE*( $\Delta 367-370$ )-Gen ein Stoppcodon eingebracht und somit der nachfolgende Myc- und His<sub>6</sub>-Tag des ToxR\*-Proteins entfernt. Dies hatte neben der Verringerung der Proteingröße jedoch auch eine drastisch reduzierte Expression von ToxR\* zur Folge (Abb. 4.2 links). Mit der Insertion von vier C-terminalen Aminosäuren (R<sup>367</sup>ITK<sup>370</sup>), die zuvor im *malE*-Gen deletiert worden waren, konnte schließlich ein zu dem originalen Protein vergleichbares Expressionslevel gewährleistet werden (Abb. 4.2 links). Der erzeugte Größenunterschied von ~2,5 kDa ist nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine in einem 8 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gel detektierbar.



**Abb. 4.2: Modifikation der Größe von ToxR\* zur verbesserten elektrophoretischen Auftrennung koexprimierter Wt-ToxR- und ToxR\*-Proteine.**

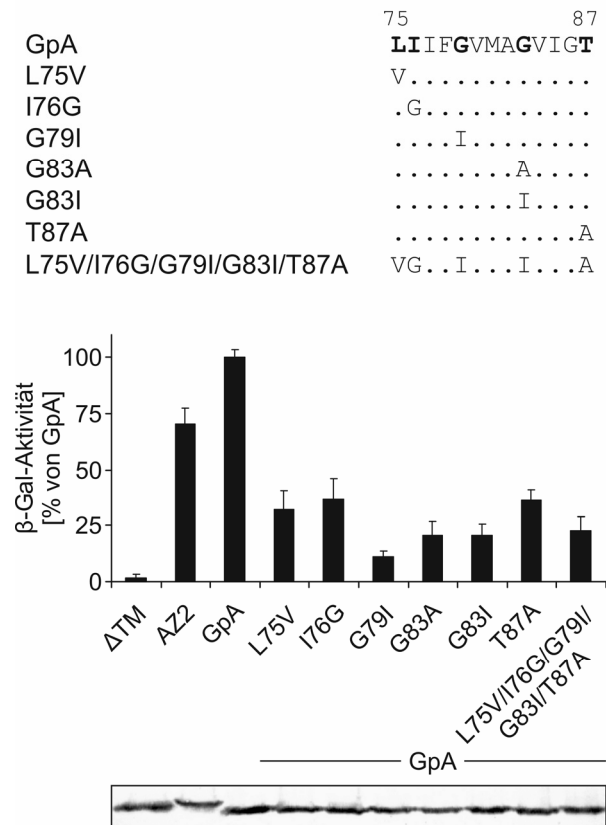
**Links:** 60-70 kDa Region eines Western-Blots lysierter FHK12-Zellen (Kultivierung bei 37 °C, 20 h mit 0,0025 % (w/v) L-Arabinose), welche ToxR\*-Proteine mit unterschiedlichen C-Termini exprimierten. Die Auftrennung des originalen ToxR\*-Proteins (erste Spur) in einem 8 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gel wird mit der von modifizierten ToxR\*-Proteinen verglichen (Beschreibung siehe Text). Die angegebenen Positionen deletierter MalE-Reste entsprechen denen im natürlichen, reifen Protein. Als ToxR\*-Mutante wurde S87H (siehe Erläuterung nachfolgender Text) und als TMD GpA verwendet. **Rechts:** Typische Wachstumskinetiken transformierter PD28-Zellen spiegeln die funktionelle Komplementierung ihrer MalE-Defizienz durch korrekte und effiziente Membranintegration von ToxR\*-Proteinen mit TMD wider. Daten stellen Mittelwerte ( $\pm$  SD) aus zwei parallelen Ansätzen dar.

Anhand der funktionellen Komplementierung der MalE-Defizienz von PD28-Zellen wurde kontrolliert, ob die vorgenommenen Veränderungen die Integration der Konstrukte in die innere Bakterienmembran bzw. die Effizienz der ToxR\*/TMD/MalE-vermittelten Maltoseaufnahme stören. Die Wachstumskinetiken transformierter PD28-Zellen zeigen, dass dies nicht der Fall ist (Abb. 4.2 rechts). Die Entfernung der Tags und die Insertion der vier C-terminalen MalE-Reste scheinen das Wachstum von PD28-Zellen sogar leicht zu begünstigen. Dieser Effekt ist vermutlich auf eine verbesserte Maltosebindung statt auf eine verstärkte Membranintegration zurückzuführen, denn das Wachstum  $\Delta$ TM exprimierender Zellen wird durch die Modifikationen am C-Terminus von MalE nicht zusätzlich gefördert.

Weiterhin wurde im Plasmid pToxRVII durch ortsgerichtete Mutagenese eine NheI-Schnittstelle eliminiert, die sich außerhalb der ToxR/TMD/MalE-kodierenden Region befand. Somit ist die direkte Einklonierung neuer TMD-Sequenzen in dieses Plasmid mittels NheI/BamHI-Verdau und Ligation mit einer entsprechenden Oligonukleotidkassette möglich.

Da in dieser Arbeit die Anwendung des ToxR\*-Systems auf andere als die zuvor verwendeten TMDn (AZ2, A16) ausgeweitet werden sollte, wurde vorab die heterotypische Interaktion der gut charakterisierten GpA-TMD mit ihren Mutanten getestet. Zu diesem Zweck wurden fünf Reste in der Helix-Helix-Kontaktfläche von GpA mutiert (siehe Abschnitt 1.4.3) und zunächst ihre verbleibende Selbstaffinität mit derjenigen der Wt-TMD sowie der Referenzen AZ2 und  $\Delta$ TM verglichen (Abb. 4.3). Mit L75V, I76G, G79I, G83A, G83I und T87A wurden Mutationen gewählt, die sich in unterschiedlichem Maße disruptiv auf die Homodimerisierung der TMD von GpA auswirken [55,57-59,113]. Der stärkste Effekt ist bei der Mutation der Gly-Reste G79 und G83 zu beobachten. Ihre Substitution durch Ile oder Ala führt relativ zur Wt-TMD zu einer um ~80 % reduzierten  $\beta$ -Gal-Aktivität. Auch die Reste L75, I76 und T87 scheinen wichtig für die homotypische Interaktion der GpA-TMD zu sein. Nach Mutation dieser Seitenketten sinkt die  $\beta$ -Gal-Aktivität um ~65 %. Aus der Mutation aller fünf betrachteten Aminosäuren folgt in Bezug auf die Einzelmutanten G79I, G83A und G83I jedoch keine zusätzliche Abnahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität. Dies unterstreicht nochmals ihre Bedeutung für die Assoziation von GpA. In Summe bestätigen die mit dem klassischen ToxR-Assay ermittelten Daten die Literaturangaben.

Um als Ursache für die unterschiedlichen  $\beta$ -Gal-Aktivitäten unterschiedliche Konzentrationen der ToxR-Proteine in der Membran auszuschließen, wurde deren Expression und Membranintegration überprüft. Die Western-Blot-Analyse zeigt, dass das Expressionslevel fast aller Mutanten mit dem von GpA vergleichbar ist (Abb. 4.3 unten). Lediglich Konstrukt G83A scheint etwas schwächer exprimiert zu sein. Dies könnte mit zu der festgestellten Verringerung der  $\beta$ -Gal-Aktivität beigetragen haben. Die Effizienz der Membranintegration der Mutanten ist hingegen mindestens ebenso hoch wie die von GpA und lässt somit vermuten, dass ihre Konzentration in der Membran ähnlich ist (Anhang Abb. Ia).



**Abb. 4.3: Homotypische TMD-TMD-Interaktion von GpA und seinen Mutanten.**

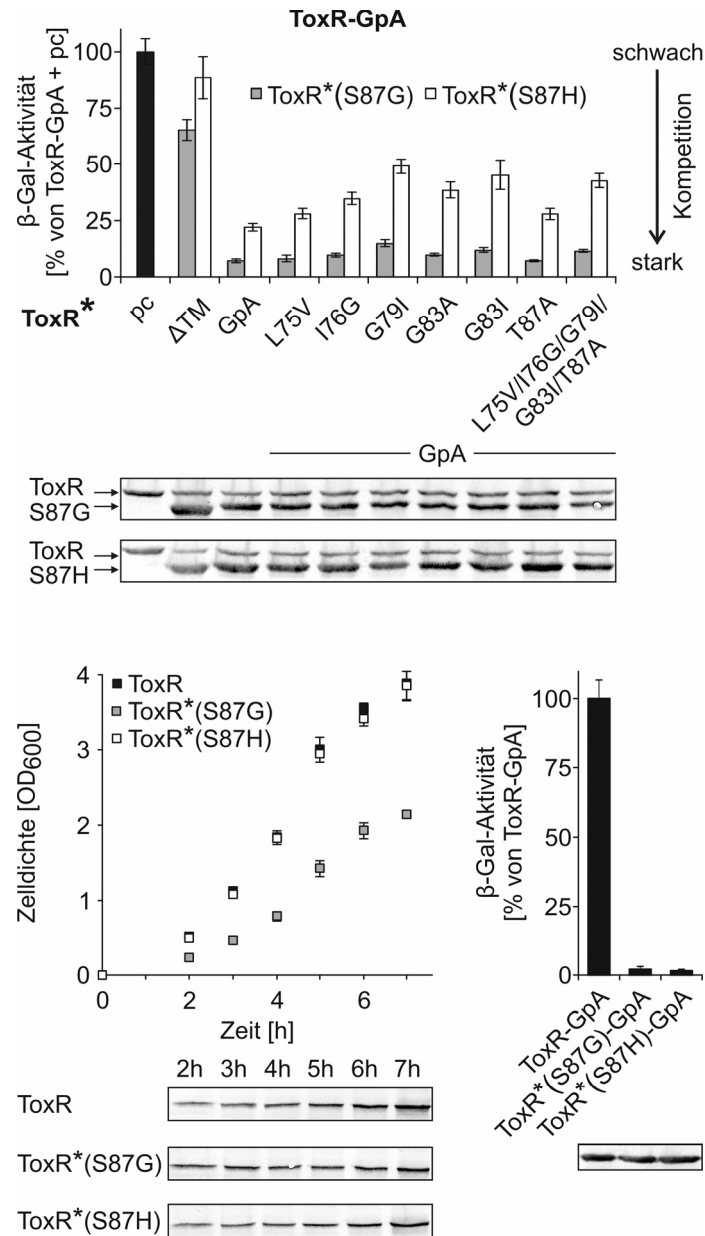
**Oben:** Aminosäuresequenz der GpA-TMD und abgeleiteter Mutanten. Veränderte Reste sind fett dargestellt und die über der Sequenz angegebenen Positionen entsprechen denen im humanen, reifen Protein. Punkte repräsentieren Reste der Wt-TMD. **Unten:** Selbstaffinität mutierter TMDn im Vergleich zu jener von GpA und den Referenzen AZ2 und ΔTM, gemessen im klassischen ToxR-Assay. Balken zeigen β-Gal-Aktivitäten exprimierender FHK12-Zellen relativ zu GpA (= 100 %; 0,0025 % (w/v) L-Arabinose; Mittelwerte ± SD, n = 12). Unterhalb des Diagramms ist die 60-70 kDa Region des dazugehörigen Western-Blots von Lysaten exprimierender FHK12-Zellen wiedergegeben.

Nachdem ein Überblick über die homotypische Affinität von GpA und seinen Mutanten vorlag, wurde deren heterotypische Interaktion im Rahmen des vorliegenden dominant-negativen ToxR\*-Assays untersucht. Wäre mit diesem System die Beeinträchtigung der Oligomerisierung von GpA durch Mutation einzelner Reste einer Helix detektierbar [115], so könnte der Assay möglicherweise auch zur Interaktionsanalyse anderer als der zuvor verwendeten artifiziellen TMDn [126] eingesetzt werden. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die TMD von GpA im Kontext des Wt-ToxR-Proteins (ausgehend von pToxRVII) und die jeweilige mutierte TMD im Kontext des transkriptionell inaktiven ToxR\*(S87G)-Proteins (ausgehend von pToxRVI) exprimiert. Die Transkription beider Gene wurde dabei durch den Arabinose-regulierbaren *araBAD*-Promotor kontrolliert [126]. Ist die mutierte TMD noch in der Lage, mit der GpA-Wt-TMD zu assoziieren, konkurriert diese mit der Ausbildung von GpA-Homomeren. Je nach Affinität der heterotypischen Interaktion entstehen auf diese Weise anstelle von ToxR-Dimeren vermehrt ToxR/ToxR\*(S87G)-Dimere, welche den *ctx*-Promotor kaum oder gar



nicht aktivieren und dadurch verglichen mit ToxR-GpA-Homomeren eine geringere  $\beta$ -Gal-Aktivität nach sich ziehen. Die unbeeinträchtigte Interaktion von ToxR-GpA wurde in Gegenwart der Plasmid-Kontrolle (*plasmid control*, pc) ermittelt (Abb. 4.4 oben). Dies dient der Wahrung vergleichbarer Messbedingungen, wie im Folgenden erläutert wird. Zur Regulation des *araBAD*-Promotors und somit der Expression von ToxR-GpA ist das AraC-Protein erforderlich. In Abwesenheit von Arabinose bindet AraC an die Operatorregionen des Promotors und reprimiert diesen durch Ausbildung einer DNA-Schleife. Ist Arabinose vorhanden, bindet diese an das AraC-Dimer und führt durch eine im Protein induzierte Konformationsänderung zur Auflösung der DNA-Schleife und zur Rekrutierung der RNA-Polymerase. Das Plasmid pToxRVII enthält jedoch kein AraC-kodierendes Gen. Bei Koexpression von ToxR-GpA mit einem ToxR\*(S87G)-Kompetitorprotein wird das *araC*-Gen durch den kotransformierten pToxRVI-Vektor zur Verfügung gestellt. Um die Selbstassoziation von ToxR-GpA in Abwesenheit des Kompetitors messen zu können, wurde der Leserahmen des *toxR\*(S87G)*-Gens in pToxRVI entfernt [126] und dadurch die Expression eines konkurrierenden Proteins unterbunden. Der so hergestellte Vektor wird als Plasmid-Kontrolle bezeichnet. Weiterhin erlaubt die Kotransformation der Plasmid-Kontrolle eine Angleichung der Kultivierungsbedingungen entsprechender FHK12-Zellen, indem alle Zellen dem gleichen Selektionsdruck von zwei Antibiotika ausgesetzt sind und je zwei Plasmide replizieren müssen (pToxRVII und pToxRVI bzw. pc). Dies soll einen möglichen Wachstumsvorteil von Zellen minimieren, welche nur das Wt-ToxR-Protein exprimieren.

Als zweite Negativkontrolle wurde ToxR\*(S87G)- $\Delta$ TM parallel zu ToxR-GpA exprimiert. Da dieses Protein keine TMD besitzt und demzufolge im Zytoplasma vorliegt, sollte bei dessen Koexpression kein kompetitiver Effekt auftreten und die  $\beta$ -Gal-Aktivitäten demzufolge unverändert bleiben. Dennoch ist eine Abnahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität um ~35 % zu verzeichnen (Abb. 4.4 oben: ToxR\*(S87G)- $\Delta$ TM). Überdies kann bei Koexpression von ToxR-GpA mit ToxR\*(S87G)-GpA oder den Mutanten von GpA kein Unterschied in der Verringerung der  $\beta$ -Gal-Aktivität beobachtet werden. In allen Fällen, auch bei den stark interaktionsstörenden Mutanten G79I, G83A und G83I oder der Fünffachmutante (L75V/I76G/G79I/G83I/T87A), kommt es zu einer drastischen Reduktion der  $\beta$ -Gal-Aktivität um ~90 % (Abb. 4.4 oben: ToxR\*(S87G)). Eine mögliche Ursache für die fehlende Sequenzspezifität der Veränderung der  $\beta$ -Gal-Aktivität könnte die evtl. zytotoxische Wirkung von ToxR\*(S87G) sein. Wie den Wachstumskinetiken in Abb. 4.4 (unten links) zu entnehmen ist, steigt die Zelldichte ToxR\*(S87G) exprimierender FHK12-Kulturen sehr viel langsamer an als diejenige Wt-ToxR exprimierender Kulturen und scheint bereits bei einer optischen Dichte von ~2 zu stagnieren. Um ähnliche Expressionslevel zu gewährleisten, wurden die Proteine von Plasmiden mit gleichem Replikationsursprung exprimiert (ToxR\*(S87G) von pToxRVI; Wt-ToxR von pToxRIX: siehe Abschnitte 3.1.4 und 4.2.2). Die Western-Blot-Analyse gibt weiterhin Aufschluss darüber, dass das inhibierte Wachstum ToxR\*(S87G) exprimierender Zellen nicht mit einem erhöhten Expressionslevel des Proteins gegenüber Wt-ToxR exprimierenden Zellen begründet werden kann (Abb. 4.4 unten links).



**Abb. 4.4: Charakterisierung des ToxR\*-Systems anhand der heterotypischen TMD-TMD-Interaktion von GpA mit seinen Mutanten.**

**Oben:** Relative  $\beta$ -Gal-Aktivitäten in Zelllysaten doppelt transformierter und mit 0,0025 % (w/v) L-Arabinose kultivierter FHK12-Zellen (100 % = ToxR-GpA + pc; Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 12). Die Plasmid-Kontrolle (pc) diente zur Erfassung homotypischer Interaktion von ToxR-GpA (siehe Text). Als Kompetitorproteine wurden ToxR\*(S87G) und ToxR\*(S87H) verwendet. Die heterotypische Interaktion von ToxR-GpA mit ToxR\*-Proteinen (Kompetition) äußert sich in einer niedrigen  $\beta$ -Gal-Aktivität. Unterhalb des Diagramms ist der 60-70 kDa Ausschnitt eines Western-Blots von Lysaten exprimierender FHK12-Zellen gezeigt. Bei den oberen Banden handelt es sich um ToxR-GpA und bei den unteren um die ToxR\*-Proteine. **Unten links:** Typische Wachstumskinetiken exprimierender FHK12-Zellen. Mit einer ü.N.-Kultur transformierter Zellen wurde eine frische Kultur 1:100 in LB-Medium mit 0,0025 % (w/v) L-Arabinose inokuliert und deren OD<sub>600</sub> nach der angegebenen Zeit bestimmt (Mittelwerte  $\pm$  SD aus einer Doppelbestimmung). Für die Western-Blot-Analyse wurden die Volumina der abgenommenen Aliquote den Zelldichten der Kulturen angepasst. **Unten rechts:** Relative  $\beta$ -Gal-Aktivität in Zelllysaten exprimierender FHK12-Zellen, normiert auf ToxR-GpA (= 100 %; 0,0025 % (w/v) L-Arabinose; Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 12). Darunter ist die 60-70 kDa Region des dazugehörigen Western-Blots dargestellt.

Da sich ToxR\*(S87G) als ungeeignet für die Umsetzung des dominant-negativen ToxR\*-Assays erwies, wurde eine andere ToxR\*-Mutante getestet, die keinen zytotoxischen Effekt auf *E. coli*-Zellen ausübt. Bei Substitution von S87 durch His (ToxR\*(S87H)) weisen exprimierende FKH12-Zellen ein vergleichbares Wachstum wie Wt-ToxR exprimierende Zellen auf (Abb. 4.4 unten links). Zudem konnte die Ausschaltung der transkriptionellen Aktivität der ToxR-Domäne durch die Mutation S87H bestätigt werden (Abb. 4.4 unten rechts). Aufgrund der Feststellung, dass die Expression von ToxR\*(S87G) auch das Wachstum von PD28-Zellen inhibiert, wurden die Daten in Abb. 4.2 mit ToxR\*(S87H) ermittelt.

Die Wiederholung der Kompetition der homotypischen ToxR-GpA-Interaktion mit ToxR\*(S87H) zeigt, dass die Koexpression von ToxR\*(S87H)- $\Delta$ TM zu keiner signifikanten Verringerung der  $\beta$ -Gal-Aktivität führt (Abb. 4.4 oben). Im Gegensatz zu ToxR\*(S87G) ist bei Koexpression von ToxR\*(S87H)-GpA und Mutanten eine sequenzspezifische Abnahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität zu verzeichnen. Die Homomerisierung von ToxR-GpA wird erwartungsgemäß am stärksten durch ToxR\*(S87H)-GpA kompetiert (Reduzierung der  $\beta$ -Gal-Aktivität um ~80 %), gefolgt von den Mutanten L75V, T87A, I76G und G83A (~70 – 60 % verringerte  $\beta$ -Gal-Aktivitäten). Der schwächste kompetitive Effekt tritt bei Koexpression von ToxR\*(S87H)-G79I, -G83I sowie der Mehrfachmutante auf (~55 % reduzierte  $\beta$ -Gal-Aktivitäten) und repräsentiert vermutlich das Ausmaß unspezifischer Kompetition. Mögliche Ursachen für den relativ hohen Anteil der unspezifischen Verringerung der  $\beta$ -Gal-Aktivität werden im Abschnitt 5.1.1 diskutiert. Der hier beobachtete disruptive Einfluss der Mutanten auf ihre heterotypische Interaktion mit GpA stimmt weitestgehend mit deren Effekt auf die homotypische Interaktion der GpA-TMD überein (siehe Abb. 4.3). In beiden Fällen wirken sich die Mutationen G79I und G83I störender auf die Wechselwirkung aus als die Mutationen L75V, I76G oder T87A. Interessanterweise scheint die Mutante G83A nicht ganz so hinderlich für die heterotypische Interaktion mit GpA zu sein wie für ihre eigene Homomerisierung. Wird G83 in beiden Partnerhelices durch Ala substituiert, unterbindet dies ebenso stark deren homotypische Assoziation wie die Mutation G83I (Abb. 4.3). Wird G83 jedoch nur in einem Monomer gegen Ala ausgetauscht, verbleibt im Vergleich zu G83I ein gewisses, wenngleich geringes Ausmaß heterotypischer Interaktion mit der GpA-Wt-TMD (Abb. 4.4 oben: ToxR\*(S87H)-G83A). Demnach wird ein Ala-Rest an Position 83 in einer Helix besser toleriert als entsprechende Alanine in beiden Helices. Dies bestätigt, dass die Dimerisierung der TMD von GpA auf der engen Packung der Rückgrate an dieser Stelle basiert (siehe Abschnitt 1.4.3). Die Detektion der unterschiedlichen Kompetition der ToxR-GpA Homomerisierung durch ToxR\*(S87H)-G83A und -G83I verdeutlicht, dass der dominant-negative ToxR\*-Assay trotz der auftretenden unspezifischen Kompetition sensitiv genug ist, um auch kleinere Änderungen in der Heteromeraffinität aufzuzeigen. Da dieser Assay jedoch nur mit dem Kompetitor ToxR\*(S87H) und nicht mit ToxR\*(S87G) realisierbar war, wurde für alle nachfolgenden Untersuchungen mit dem ToxR\*-System das ToxR\*(S87H)-Protein verwendet.

Ebenso wie bei der Analyse homotypischer TMD-TMD-Interaktion mit dem klassischen ToxR-Assay, spielt auch bei der Charakterisierung heterotypisch interagierender TMDn deren Expressionslevel eine wichtige Rolle. Die zuvor beschriebene Verkürzung des ToxR\*-Proteins ermöglicht die getrennte Betrachtung seiner Expression und der des Wt-ToxR-Proteins. Die Bande von ToxR\* befindet sich nach elektrophoretischer Auftrennung des FHK12-Lysats zweifach transformierter Zellen unterhalb der von Wt-ToxR (Abb. 4.4 oben). Weiterhin ist ToxR\* aufgrund der höheren Kopienzahl des es kodierenden Plasmids (pToxRVI) stärker in den Zellen exprimiert als das Wt-ToxR-Protein. Dieser ToxR\*-Überschuss soll eine effiziente Konkurrenz homotypischer ToxR-Interaktion gewährleisten. Der Vergleich der verschiedenen ToxR\*-GpA-Konstrukte zeigt ein meist ähnliches Expressionslevel. Die etwas schwächere Expression von ToxR\*(S87H)-G79I lässt vermuten, dass die  $\beta$ -Gal-Aktivität infolge seiner Koexpression mit ToxR-GpA noch geringer sein könnte. Die Membranintegration der verwendeten Proteine scheint wiederum ähnlich effizient zu sein (Anhang A Abb. Ia), so dass mit Ausnahme von ToxR\*(S87H)-G79I von einer vergleichbaren Konkurrent-Konzentration in der Membran ausgegangen werden kann.

Um bei abweichendem Expressionslevel der ToxR\*-Proteine dieses gezielt und vor allem unabhängig von der Expression des Wt-ToxR-Proteins regulieren zu können, wurde der *araBAD*-Promotor in Vektor pToxRVII gegen den konstitutiven *toxR*-Promotor ersetzt. Das somit generierte Plasmid wird als pToxRVIII bezeichnet. Die Kotransformation des pToxRVIII-Vektors (enthält *toxR::wt-toxR*) mit pToxRVI (enthält *araBAD::toxR\*(S87H)*) erlaubt die Veränderung des Expressionslevels von ToxR\* bei konstanter Expression von Wt-ToxR und somit die konzentrationsabhängige Konkurrenz der ToxR-Homomerisierung. Auf die Anwendung dieser Neuerung wird in Abschnitt 4.3.1 eingegangen.

Die TMD von GpA homodimerisiert mit relativ hoher Affinität [139,141]. Dies war für die Untersuchung der heterotypischen Interaktion von GpA mit seinen Mutanten mit Hilfe des ToxR\*-Systems von Vorteil, da der Nachweis von Heteromerbildung dabei auf der Konkurrenz homotypischer TMD-TMD-Interaktion basiert. Es gibt jedoch auch eine Vielzahl von TMDn bitopischer Membranproteine, die mit geringerer Affinität assoziieren [64,68,84,142]. Deshalb war von Interesse, ob das ToxR\*-System auch für die Charakterisierung heterotypisch interagierender TMDn mit niedriger oder mittlerer Homomeraffinität geeignet ist. Aufschluss darüber sollte die Betrachtung der TMD-TMD-Interaktion von Integrinen geben. Diese aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehenden Rezeptoren treten vornehmlich als Heterodimere auf (siehe Abschnitt 1.4.3). Doch auch ihre Homomerisierung wurde beobachtet. Wie bereits angedeutet, ist die Selbstaffinität der meisten Untereinheiten niedriger als diejenige der GpA-TMD [84,97,115,140]. Um zu testen, ob deren heterotypische Assoziation im ToxR\*-Assay detektiert werden kann, wurden sowohl verschiedene  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Untereinheiten mit dem Wt-ToxR-Protein fusioniert. Als Konkurrenten wurden ToxR\*(S87H)-Proteine mit ihrem jeweiligen natürlichen Interaktionspartner sowie mit artifiziellen TMDn koexpri-

miert. Es konnte jedoch kein Unterschied im Ausmaß der Konkurrenz der homotypischen Interaktion der betreffenden Konstrukte festgestellt werden. In allen Fällen kam es zu einer annähernd gleichen, starken Verringerung der  $\beta$ -Gal-Aktivität (Daten nicht gezeigt), die vermutlich auf unspezifischer heterotypischer Interaktion beruht. Dies verdeutlicht, dass als Grundvoraussetzung für die Anwendung des ToxR\*-Systems zur Untersuchung von TMD-Heteromeren eine ausreichend hohe Selbstaffinität von mindestens einem der beiden Interaktionspartner vorliegen sollte.

#### **4.2.2 Positiver ToxR-Assay zur Analyse heterotypisch interagierender Transmembrandomänen**

Die Charakterisierung des dominant-negativen ToxR\*-Kompetitorsystems hat gezeigt, dass es aufgrund seines Funktionsprinzips vor allem zur Untersuchung heterotypisch interagierender TMDn geeignet ist, welche auch mit einer gewissen Selbstaffinität zu Homomeren assoziieren (Abschnitt 4.2.1). Um dennoch TMDn mit niedriger homotypischer Affinität hinsichtlich ihrer Heteromerisierungseigenschaften analysieren zu können, wurde ein weiterer ToxR-basierter Assay entwickelt. Im Rahmen dieses sogenannten positiven 2-Plasmid gestützten ToxR-Assays werden beide TMDn im Kontext transkriptionell aktiver Wt-ToxR-Proteine in FHK12-Zellen koexprimiert. Die resultierende  $\beta$ -Gal-Aktivität wird dabei sowohl durch ihre homotypische als auch durch ihre mögliche heterotypische TMD-TMD-Interaktion verursacht. Zur Differenzierung zwischen den Anteilen der  $\beta$ -Gal-Aktivität, die aus Homomerisierung bzw. Heteromerisierung folgen, werden beide Situationen unabhängig voneinander betrachtet. Dafür werden die Interaktionspartner für eine erste Messung getrennt voneinander (in verschiedenen FHK12-Kulturen) exprimiert, die dadurch entstehenden  $\beta$ -Gal-Aktivitäten erfasst und gemittelt. Für eine zweite Messung werden beide Konstrukte in einer Kultur koexprimiert, um deren Aufeinandertreffen zu ermöglichen. Auch dabei wird die resultierende  $\beta$ -Gal-Aktivität bestimmt und mit der zuvor ermittelten verglichen. Übersteigt die Affinität der heterotypischen Interaktion jene der homotypischen, so kommt es bei Koexpression der Partner (zweite Messung) zu einem Anstieg der  $\beta$ -Gal-Aktivität gegenüber ihrer getrennten Expression (erste Messung). Ist die Affinität der Heteromere jedoch ebenso hoch wie oder niedriger als die der Homomere, ist zwischen den beiden Messungen keine Veränderung der  $\beta$ -Gal-Aktivität zu verzeichnen. Auf diese Weise sind hochaffine heterotypische Interaktionen auch oder gerade bei geringer Homomer-affinität detektierbar.

Die gleichzeitige Expression verschiedener ToxR-Proteine wird auch in diesem Assay durch Verwendung zweier genetisch kompatibler Plasmide mit unterschiedlichem Replikationsursprung realisiert (*low copy number* Plasmid: pToxRVII; *high copy number* Plasmid: pToxRIX). Aufgrund der unterschiedlichen Kopienzahl der Vektoren in einer Zelle folgt daraus ein unterschiedliches Expressionslevel der Proteine. Das wiederum führt zu variierenden  $\beta$ -Gal-Aktivitäten abhängig davon,

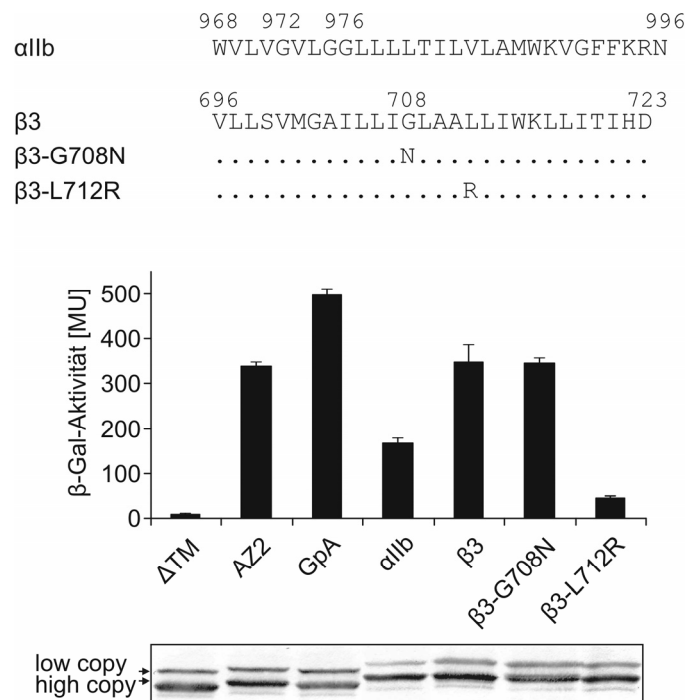
welches Protein auf welchem Plasmid kodiert ist. Um diesen Effekt ausgleichen zu können, wird jedes Protein während der Koexpression einmal durch den *low copy number* und ein anderes Mal durch den *high copy number* Vektor kodiert. Die dabei auftretenden  $\beta$ -Gal-Aktivitäten werden gemittelt und mit der mittleren  $\beta$ -Gal-Aktivität verglichen, die zuvor bei der homotypischen Interaktion der TMDn gemessen wurde (siehe oben). Das Plasmid pToxRIX wurde durch Insertion des Gens der Wt-ToxR-Domäne in pToxRVI hergestellt. Dadurch entsteht ein C-terminal verkürztes Protein (ohne Myc- und His<sub>6</sub>-Tag; siehe Abschnitt 4.2.1) mit aktiver Transkriptionsaktivator-Domäne, das ~2,5 kDa kleiner als das vom pToxRVII-Vektor exprimierte Protein ist. Dieser Größenunterschied erlaubt ihre elektrophoretische Auftrennung und somit die Gegenüberstellung ihrer Expressionslevel.

Als Modellsystem für die Etablierung des positiven ToxR-Assays zur Analyse heterotypisch interagierender TMDn wurden die TMDn des Integrins  $\alpha$ IIB/ $\beta$ 3 verwendet. Diese sind bedeutend länger als die bisher genutzten TMDn (Vergleich Abb. 4.5), um möglichst alle vermeintlich an der heterotypischen Interaktion beteiligten Reste einzuschließen (Abschnitt 1.4.3). Das Fehlen einiger dieser Aminosäuren könnte das Assoziationsgleichgewicht der TMDn auf Kosten der Heteromerisierung in Richtung Homomerisierung verschieben [87]. Weiterhin wurde bei der Klonierung der TMDn in das *toxR/malE*-Gen darauf geachtet, dass ihre Heteromer-Kontaktfläche möglichst optimal zu jener der ToxR-Domäne ausgerichtet ist. Nur so kann stattfindende TMD-TMD-Interaktion im ToxR-System in detektierbare  $\beta$ -Gal-Aktivität übersetzt werden. Führen assoziierende TMDn zwei ToxR-Domänen mit voneinander abgewandter Kontaktfläche zusammen, erfolgt trotz TMD-TMD-Interaktion keine Transkriptionsaktivierung. Die optimale Orientierung der  $\alpha$ IIB-TMD zur ToxR-Domäne war bereits aus [97] bekannt. Dadurch konnte die TMD von  $\beta$ 3 so ausgerichtet werden, dass die in der aufgeklärten Struktur [87,88] sich gegenüberstehenden Reste voraussichtlich auch im ToxR-System zueinander orientiert sind. Dazu wurde der N-Terminus der  $\beta$ 3-TMD so an den der  $\alpha$ IIB-TMD angepasst, dass sich die für den engen Kontakt der Helices maßgeblichen Reste  $\alpha$ IIB-G972 und -G976 bzw.  $\beta$ 3-G708 den Resten  $\beta$ 3-V700/M701,  $\beta$ 3-I704 bzw.  $\alpha$ IIB-L980 im Sequenzvergleich gegenüberliegen (Vergleich Abb. 1.5 und Abb. 4.5). Um die heterotypische Interaktion der TMDn zu stören, wurden Mutationen in der Kontaktfläche der  $\beta$ 3-TMD vorgenommen, welche *in vivo* die Funktion des Rezeptors beeinträchtigen [96,143], vermutlich durch die induzierte Dissoziation der TMDn von  $\alpha$ IIB und  $\beta$ 3.

Wie oben beschrieben, wird in einer ersten Messung zunächst die homotypische Interaktion der einzelnen Interaktionspartner bestimmt. Dazu wird das jeweils betrachtete ToxR-TMD-Protein gleichzeitig von dem *low copy number* Plasmid pToxRVII und dem *high copy number* Plasmid pToxRIX exprimiert. Diese Vorgehensweise soll die Vergleichbarkeit der Daten mit der zweiten Messung sicherstellen, bei der zwei verschiedene ToxR-Proteine von den beiden genannten Vektoren koexprimiert werden. Die  $\beta$ -Gal-Aktivitäten der ersten Messung bestätigen die geringere Selbstaffinität der

TMDn von  $\alpha$ Ib und  $\beta$ 3 im Vergleich zu der von GpA (Abb. 4.5). Außerdem scheint Substitution des Rests  $\beta$ 3-G708 durch Asn keine Auswirkungen auf die homotypische Assoziation der  $\beta$ 3-TMD zu haben. Eine mögliche sterische Behinderung der Interaktion durch die größere Seitenkette an der Position des Gly könnte durch die Ausbildung interhelikaler Wasserstoffbrücken zwischen den Asn kompensiert werden und somit die Affinität der TMD aufrechterhalten. Die Mutation  $\beta$ 3-L712R hingegen hat einen starken Abfall der  $\beta$ -Gal-Aktivität zur Folge. Der Austausch einer hydrophoben durch eine ionisierbare Aminosäure im Kern der TMD könnte die Stabilität und/oder die Lokalisation der Monomere in der Membran beeinflussen und auf diese Weise deren Interaktion inhibieren.

Weiterhin ist der Western-Blot-Analyse zu entnehmen, dass ToxR- $\alpha$ Ib etwas schwächer exprimiert zu sein scheint als ToxR-Proteine mit anderen TMDn. Bei angeglicherer Expression könnte die  $\beta$ -Gal-Aktivität infolge der Assoziation von ToxR- $\alpha$ Ib evtl. etwas höher ausfallen. Neben dem Expressionslevel der Konstrukte wurde auch ihre Membranintegration untersucht. Alle verwendeten Proteine sind

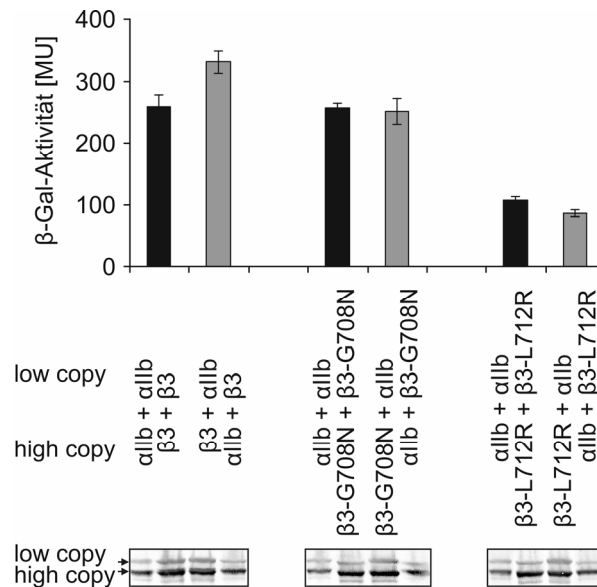


**Abb. 4.5: Homotypische TMD-TMD-Interaktion von  $\alpha$ Ib und  $\beta$ 3 in Relation zu GpA.**

**Oben:** Aminosäuresequenz der TMDn von  $\alpha$ Ib,  $\beta$ 3 und  $\beta$ 3-Mutanten. Die über den Sequenzen angegebenen Positionen entsprechen denen der humanen, reifen Proteine. Punkte stellen Reste der Wt-TMD dar. **Unten:** Affinitäten der  $\alpha$ Ib- und  $\beta$ 3-TMDn sowie der  $\beta$ 3-Mutanten, widergespiegelt durch  $\beta$ -Gal-Aktivitäten exprimierender FHK12-Zellen (in MU; 0,0025 % (w/v) L-Arabinose; Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 12) und verglichen mit den Referenzen  $\Delta$ TM, AZ2 und GpA. Unterhalb des Diagramms ist der 60-70 kDa Bereich des dazugehörigen Western-Blots von Zelllysaten exprimierender FHK12-Zellen gezeigt. Die obere Bande resultiert aus der Expression des entsprechenden ToxR-Proteins vom *low copy number* Plasmid und die untere Bande aus der Expression des Proteins vom *high copy number* Plasmid (Details siehe Text).

in der Lage, die MalE-Defizienz von PD28-Zellen zu komplementieren (Anhang A Abb. Ib).  $\beta$ 3-L712R exprimierende PD28-Zellen wachsen jedoch etwas langsamer als Wt- $\beta$ 3 exprimierende Zellen. Demnach könnte die leicht reduzierte Effizienz der Membranintegration dieser Mutante zu der festgestellten niedrigen  $\beta$ -Gal-Aktivität beigetragen haben.

Die Koexpression verschiedener ToxR-TMD-Paare soll im zweiten Schritt die Ausbildung von Heteromeren ermöglichen. Um die verschiedenen Expressionslevel aufgrund der unterschiedlichen Kopienzahl der Plasmide auszugleichen, wurde jeder der Partner einmal vom *low copy number* und einmal vom *high copy number* Plasmid exprimiert. Die aus der Koexpression resultierenden  $\beta$ -Gal-Aktivitäten wurden gemittelt und den mittleren  $\beta$ -Gal-Aktivitäten gegenübergestellt, die durch die homotypische Interaktion der Partner ausgelöst wurden (siehe Abb. 4.5 und Abb. 4.6). Dieser Vergleich zeigt, dass die parallele Expression von ToxR- $\alpha$ IIb und ToxR- $\beta$ 3 gegenüber ihrer separaten Expression zu einem  $\sim 1,3$ -fachen Anstieg der  $\beta$ -Gal-Aktivität führt. Wenngleich die Zunahme der Enzymaktivität nur moderat ist, kann dennoch daraus geschlossen werden, dass die TMDn von  $\alpha$ IIb und  $\beta$ 3 zu Heteromeren assemblieren, die eine höhere Affinität aufweisen als die entsprechenden



**Abb. 4.6: Heterotypische TMD-TMD-Interaktion von  $\alpha$ IIb mit  $\beta$ 3 und seinen Mutanten.**

Positiver ToxR-Assay zur Analyse der heterotypischen TMD-TMD-Interaktion von  $\alpha$ IIb mit  $\beta$ 3 und seinen Mutanten. Die mittleren  $\beta$ -Gal-Aktivitäten, hervorgerufen durch die homotypische Interaktion der TMDn (schwarze Balken) bei deren getrennter Expression, wurden aus den Werten in Abb. 4.5 ermittelt und mit den mittleren  $\beta$ -Gal-Aktivitäten infolge der Koexpression der Interaktionspartner (graue Balken) verglichen (in MU;  $n = 12$  pro ToxR-TMD Kombination). Die Standardabweichungen wurden entsprechend des Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetzes berechnet. Die Proteine wurden jeweils von einem *low copy number* und einem *high copy number* Plasmid (gekennzeichnet durch low copy bzw. high copy) koexprimiert. Unter dem Diagramm ist die 60-70 kDa Region eines Western-Blot von Lysaten exprimierender FHK12-Zellen abgebildet. Die Banden verschiedener Molekülgröße resultieren aus der Expression der Proteine ausgehend von den angegebenen Plasmiden.



Homomere. Dies bestätigt Literaturangaben, nach denen die heterotypische TMD-TMD-Interaktion von  $\alpha$ IIB und  $\beta$ 3 zwar verhältnismäßig schwach zu sein scheint [87,90], jedoch die homotypische TMD-TMD-Interaktion übertrifft [87,91]. Nach Koexpression von  $\alpha$ IIB mit der Mutante  $\beta$ 3-G708N bzw. -L712R ist keine Zunahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität relativ zu ihrer getrennten Expression detektierbar. Demnach scheinen die substituierten Aminosäuren in der  $\beta$ 3-TMD die heterotypische Interaktion mit  $\alpha$ IIB einzuschränken. Die Asn-Seitenkette in  $\beta$ 3-G708N könnte den erforderlichen engen Kontakt der Helices unterbinden. Da in  $\alpha$ IIB in gleicher Höhe kein weiteres Asn vorhanden ist, kann das Heteromer nicht durch Wasserstoffbrücken zwischen entsprechenden Seitenketten stabilisiert werden. Die Mutation  $\beta$ 3-L712R könnte die Interaktion von  $\beta$ 3 mit  $\alpha$ IIB beeinträchtigen, indem der ionisierbare Rest die Struktur und/oder die Position der  $\beta$ 3-Helix in der Membran verändert und somit die Kontaktfläche zerstört. Deswegen wirkt sich diese Substitution vermutlich gleichermaßen hinderlich auf die heterotypische Interaktion von  $\alpha$ IIB mit  $\beta$ 3 aus wie auf die homotypische Assoziation von  $\beta$ 3 (siehe oben). Durch die festgestellte verminderte Interaktion der TMDn von  $\alpha$ IIB und  $\beta$ 3 könnten die vorgenommenen Mutationen zu der *in vivo* beobachteten Beeinträchtigung der Aktivität des Rezeptors führen [91,96,143].

Bei der Koexpression betrachteter ToxR-TMD-Proteine ist ein reduziertes Expressionslevel von ToxR- $\alpha$ IIB zu verzeichnen (Western-Blot Abb. 4.6). Durch die Mittelung der entsprechenden  $\beta$ -Gal-Aktivitäten sollte sich dies jedoch ähnlich auf die berechneten Daten auswirken. Auf die funktionelle Komplementierung der MalE-Defizienz von PD28-Zellen durch diese Konstrukte wurde bereits bei der Ermittlung ihrer relativen homotypischen Affinitäten eingegangen (siehe oben; Anhang A Abb. Ib). Dort zeigte sich, dass diese effizient in die innere Bakterienmembran integrieren. Allerdings scheint  $\beta$ 3-L712R im Vergleich zum Wt mit leicht reduzierter Effizienz in die Membran integriert zu werden. Aber auch dies müsste sich in vergleichbarem Umfang auf die gemittelten  $\beta$ -Gal-Aktivitäten niederschlagen, welche die homotypische und heterotypische Interaktion widerspiegeln.

Abschließend verdeutlichen die Ergebnisse der Interaktionsanalyse der  $\alpha$ IIB/ $\beta$ 3-TMDn, dass diese Variante des ToxR-Assays zur Detektion heterotypisch assoziierender TMDn bei geringer Homomeraffinität geeignet ist.

#### 4.2.3 Zusammenfassung angewandter ToxR-Assays

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene auf dem ToxR-System basierende Assays für die Untersuchung verschiedener Fragestellungen eingesetzt. Einen Überblick über die Funktionsweise dieser Assays und die dafür benutzten Plasmide gibt Tab. 4.1. Der klassische ToxR-Assay wurde verwendet, um die homotypische Interaktion einzelner TMDn und kritischer Reste mittels Mutationsanalyse zu charakterisieren. Die Selbstassoziation einer TMD vermittelt dabei die Aktivierung der

Tab. 4.1: Übersicht über die verwendeten ToxR-Assays

Assay	Plasmid(e)	Funktionsprinzip
klassischer ToxR-Assay zur Homomerisierungsanalyse <sup>1</sup>	<p>pToxRIV: ohne His6      pToxRV: mit His6</p>	<p>Periplasma innere Membran Zytoplasma</p> <p>β-Galaktosidase</p>
dominant-negativer ToxR*-Assay zur Heteromerisierungsanalyse <sup>2</sup>	<p>ToxR* = S87H</p>	<p>Periplasma Zytoplasma</p> <p>starke      schwache/keine      keine Aktivierung</p>
positiver ToxR-Assay zur Heteromerisierungsanalyse <sup>3</sup>		<p>Periplasma Zytoplasma</p> <p>schwache      starke      schwache Aktivierung</p>

Quellen: <sup>1</sup> [133]; <sup>2</sup> [126] & diese Arbeit; <sup>3</sup> diese Arbeit

*lacZ*-Reporterexpression, so dass die Interaktion in ein quantifizierbares Signal umgesetzt wird. Der dominant-negative ToxR\*-Assay diente dazu, die heterotypische Interaktion verschiedener TMDn in Abhängigkeit von gezielten Mutationen zu verfolgen. Durch Koexpression eines transkriptionell aktiven ToxR- und eines transkriptionell inaktiven ToxR\*-Proteins kann die Konkurrenz zwischen der Homomerisierung des aktiven ToxR-Proteins und der Heteromerisierung des aktiven ToxR- mit dem inaktiven ToxR\*-Protein detektiert werden. Das Ausmaß der dabei stattfindenden Konkurrenz der homotypischen Interaktion korreliert mit der Affinität der Heteromere. Zur Optimierung dieses ToxR\*-Kompetitorsystems wurden einige Modifikationen vorgenommen. Diese Neuerungen erlauben

---

nun die elektrophoretische Auftrennung der Interaktionspartner zur Überprüfung ihrer Expressionslevel. Weiterhin ermöglicht die neu verwendete ToxR\*-Mutante S87H eine verbesserte Sequenzspezifität der Konkurrenz und die Expression beider Proteine kann mittels verschiedener Promotoren unabhängig voneinander reguliert werden. Da mit dem ToxR\*-System vornehmlich TMDn untersucht werden können, die neben ihrer Heteromeraffinität auch ein gewisses Maß an Selbstaffinität aufweisen, wurde schließlich der positive ToxR-Assay zur Analyse heterotypisch interagierender TMDn mit nur geringer Selbstaffinität eingeführt. Dieser Assay beruht ebenfalls auf der Koexpression zweier ToxR-Proteine. Diese sind jedoch beide transkriptionell aktiv. Damit kann die Assemblierung von Heteromeren nachgewiesen werden, wenn deren Affinität diejenige ihrer homotypischen Interaktion übersteigt.

Zusammengefasst stehen damit drei sich ergänzende Systeme mit verschiedenen Anwendungsbereichen zur Verfügung: i) die homotypische Interaktion einer TMD kann mit dem klassischen ToxR-Assay, ii) die heterotypische Interaktion zwischen TMDn, die auch Homomere bilden, kann mit dem dominant-negativen ToxR\*-Assay und iii) die heterotypische Assoziation von TMDn, die eine niedrige Homomeraffinität aufweisen, kann mit dem positiven 2-Plasmid gestützten ToxR-Assay untersucht werden.

### 4.3 Assoziation von Transmembrandomänen mit polaren und ionisierbaren Aminosäuren

Die Grundlage für die Untersuchung der Rolle polarer und ionisierbarer Reste bei der Assoziation von TMDn bildeten selektierte, hochaffine Sequenzen aus der von Johanna C. Panitz hergestellten, partiell randomisierten Plasmidbank JP1 [125]. Die Bank wurde mit dem Ziel konzipiert, auch polare und ionisierbare Aminosäuren in Transmembransequenzen zu erlauben. Zu diesem Zweck wurden acht der zehn *a*, *d*, *e* und *g* Positionen eines sich wiederholenden Heptadenmotivs mit allen 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren randomisiert. Die restlichen Positionen wurden mit invarianten Leucin-Resten belegt. Dadurch sollte die Hydrophobizität der Sequenzen erhöht und somit die Membraninsertion hydrophiler Reste begünstigt werden. Die Besetzung der beiden terminalen *g* Positionen mit Leucin erfolgte außerdem vor dem Hintergrund, die dortige Anreicherung von Tryptophan – dessen positionsabhängiger, interaktionsfördernder Einfluss zuvor nachgewiesen worden war [118] – zu unterdrücken. Die Auswertung der Aminosäurezusammensetzung interagierender TMDn aus der Bank JP1 zeigte eine positionsspezifische Anreicherung von Histidin und Glycin. Zusammen mit dem Glycin der C-terminal angrenzenden Vektorsequenz ergab sich somit bei ~53 % der Histidin-haltigen TMDn das Motiv  $H^6xxxxxxG^{13}xxxG^{17}$ . Weiterhin waren an randomisierten Positionen in der Nachbarschaft von Histidin (Positionen 2 und 5) die Reste Glycin, Serin und/oder Threonin signifikant überrepräsentiert. Durch die anschließende Mutationsanalyse wurde deutlich, dass die hohe Affinität der untersuchten Sequenzen maßgeblich von der gleichzeitigen Präsenz des Histidins und des GxxxG abhängt. Ferner zeigte sich die stabilisierende Wirkung der umliegenden Glycin-, Serin- und/oder Threonin-Reste bei der homotypischen Interaktion der TMDn und ließ die Ausbildung von Wasserstoffbrücken vermuten. Neben diesen TMDn wurden außerdem elf hochaffine Sequenzen selektiert, die in ihrer N-terminalen Hälfte mehrere potentiell geladene Aminosäuren und ein C-terminales GxxxG-Motiv enthielten. Bemerkenswerterweise waren dabei positiv und negativ ionisierbare Reste alternierend angeordnet.

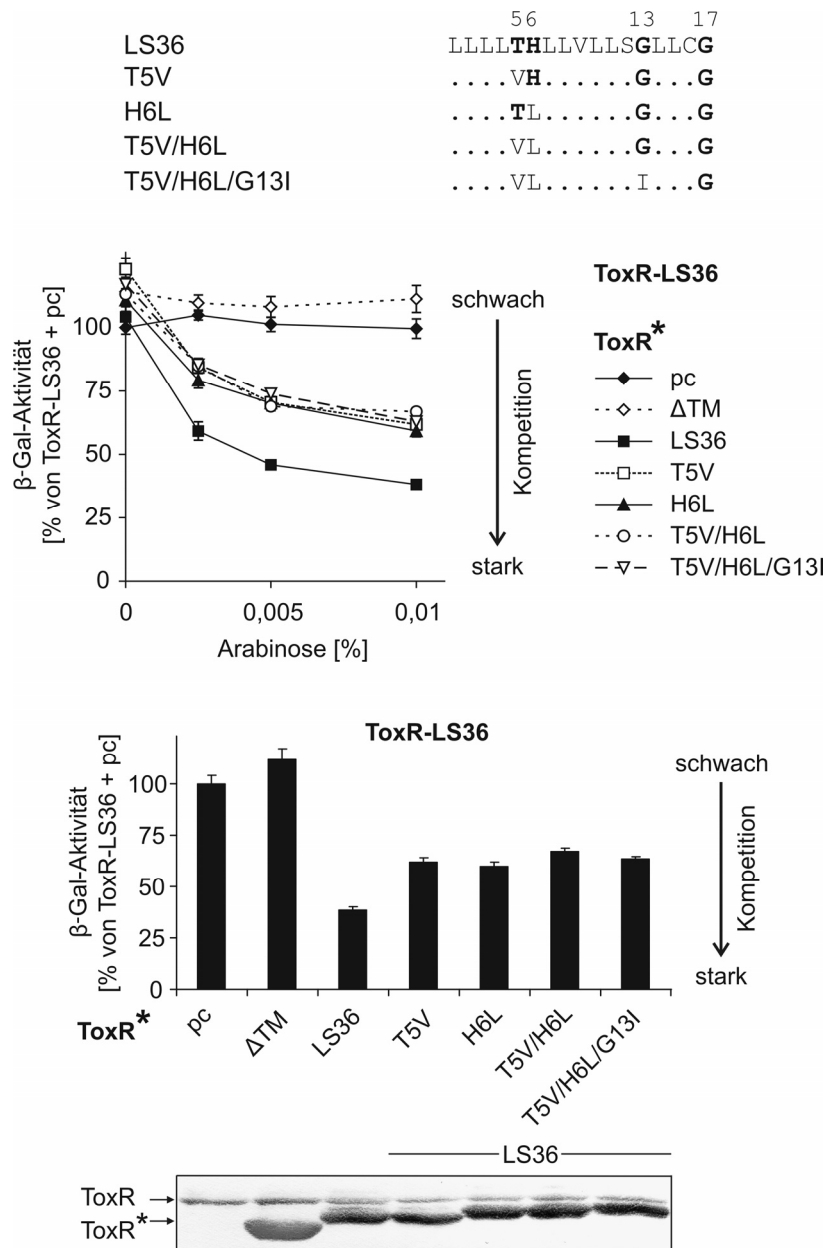
Ziel dieser Arbeit war, festzustellen, ob und nach welchem Mechanismus die beteiligten Aminosäuren die Interaktion der beschriebenen TMDn vermitteln.

#### 4.3.1 Analyse der heterotypischen Interaktion von Transmembrandomänen mit Histidin

Die Interaktion der zentralen Histidin-Seitenkette (His6) mit den Resten der Partnerhelix wurde stellvertretend für die 19 Histidin-haltigen TMDn aus der Bank JP1 [125] anhand zweier ausgewählter Sequenzen untersucht. Dafür wurde aus dieser Gruppe von TMDn zum einen die Sequenz mit der höchsten Selbstaffinität (LS49) verwendet. Zum anderen wurde die Sequenz LS36 gewählt, da diese in

der unmittelbaren Nachbarschaft von Histidin nur eine hydroxylierte Aminosäure aufweist (Abb. 4.7 oben). Durch ortsgerichtete Mutagenese wurden in diese TMDn gezielt Punktmutationen eingeführt, um zu ermitteln, ob und in welchem Ausmaß His6 mit den polaren Resten der angrenzenden randomisierten Positionen interagiert. Die verbleibende heterotypische Interaktion der mutierten TMD mit der parentalen, unveränderten TMD wurde mit Hilfe des in dieser Arbeit weiterentwickelten dominant-negativen ToxR\*-Kompetitorsystems (Abschnitt 4.2.1) gemessen. Die parentale TMD wurden dabei im Kontext des Wt-ToxR-Proteins und die mutierte TMD im Kontext des transkriptionell inaktiven ToxR\*(S87H)-Proteins exprimiert. Können diese trotz Mutation miteinander heteromerisieren, werden je nach Affinität vermehrt ToxR/ToxR\*(S87H)-Komplexe gebildet. Diese wiederum aktivieren die Reportergenexpression nur geringfügig oder gar nicht, so dass gegenüber der alleinigen Assoziation der parentalen TMD eine Abnahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität zu verzeichnen ist. Die getrennte Regulation der Expression des Wt-ToxR-Proteins durch den konstitutiven *toxR*-Promotor und des ToxR\*(S87H)-Proteins durch den induzierbaren *araBAD*-Promotor ermöglicht außerdem die Steigerung des ToxR\*-Expressionslevels bei gleich bleibender Wt-ToxR Expression. Somit kann die Beeinträchtigung der homotypischen durch die heterotypische Interaktion in Abhängigkeit vom ToxR\*-Expressionslevel analysiert werden.

Abb. 4.7 zeigt die  $\beta$ -Gal-Aktivität bei Koexpression von ToxR-LS36 mit verschiedenen ToxR\*-Proteinen, die entweder LS36 oder davon abgeleitete Mutanten enthalten. Als Negativkontrollen wurden parallel dazu die alleinige Expression von ToxR-LS36 in Anwesenheit der Plasmid-Kontrolle (pc; Plasmid ohne Leserahmen des ToxR\*-kodierenden Gens) und die Koexpression von ToxR-LS36 und ToxR\* $\Delta$ TM betrachtet. Wie zu erwarten, beeinträchtigen diese die homotypische TMD-TMD-Interaktion von ToxR-LS36 nicht, d.h. die  $\beta$ -Gal-Aktivität bleibt konstant. Im Gegensatz dazu ist eine drastische konzentrationsabhängige Verringerung der  $\beta$ -Gal-Aktivität bei Koexpression der Positivkontrolle ToxR\*-LS36 zu sehen. Bei einer L-Arabinosekonzentration von 0,01 % (w/v) ist eine Sättigung der Konkurrenz durch ToxR\*-LS36 zu verzeichnen, bei der die  $\beta$ -Gal-Aktivität um ca. 60 % reduziert ist. Dieses Ausmaß an maximaler Konkurrenz wird bereits durch die einzelne Mutation von Thr5 oder His6 ebenso stark beeinträchtigt wie durch die Mehrfachmutanten T5V/H6L und T5V/H6L/G13I (jeweils ~35 %-ige Abnahmen der  $\beta$ -Gal-Aktivität). Der Grad der festgestellten Konkurrenz bei Koexpression von T5V/H6L/G13I repräsentiert vermutlich unspezifische heterotypische Interaktion, da in dieser Sequenz alle vermeintlich an der Interaktion beteiligten Reste mutiert sind und das GxxxG-Motiv zerstört wurde. Zusammenfassend zeigt sich, dass beide Reste, Thr5 und His6, essentiell für die TMD-TMD-Interaktion sind und dass diese dabei gleichermaßen zur Stabilität der Oligomere beitragen, vermutlich durch Ausbildung interhelikaler Wasserstoffbrücken.



**Abb. 4.7: Mutationsanalyse der TMD-TMD-Interaktion der His-haltigen Sequenz LS36.**

**Oben:** Aminosäuresequenz der TMD LS36 und ihrer Mutanten. Putativ interaktionsvermittelnde Reste sind fett hervorgehoben und ihre Positionen über der Sequenz angegeben. Gly17 ist Teil der angrenzenden Vektorsequenz. Innerhalb der Mutanten zeigt der Fettdruck kritische Reste, die nicht mutiert wurden. Punkte repräsentieren parentale Reste der anderen Positionen. **Mitte:** Mit ToxR\*-Kompetitorsystem gemessene Interaktion von LS36 mit seinen Mutanten in Abhängigkeit der ToxR\*(S87H)-Expression. Daten entsprechen der relativen  $\beta$ -Gal-Aktivität exprimierender FHK12-Zellen bei 0 %; 0,0025 %; 0,005 % und 0,01 % (w/v) L-Arabinose (100 % =  $\beta$ -Gal-Aktivität nach Expression von ToxR-LS36 + pc bei 0 % L-Arabinose; Mittelwerte  $\pm$  SE, n = 12). pc steht für die Plasmid-Kontrolle (siehe Text). **Unten:** Überblick über die relativen  $\beta$ -Gal-Aktivitäten infolge der Interaktion von LS36 mit seinen Mutanten, ermittelt im Sättigungsbereich der Kompetition bei 0,01 % (w/v) L-Arabinose (100 % =  $\beta$ -Gal-Aktivität nach Expression von ToxR-LS36 + pc; Mittelwerte  $\pm$  SE, n = 12). Unterhalb des Balkendiagramms ist die 60-70 kDa Region eines Western-Blots von Zelllysaten exprimierender FHK12-Zellen dargestellt. Obere Banden zeigen konstitutiv exprimiertes ToxR-LS36 und untere Banden die Expression der ToxR\*(S87H)-Konstrukte bei 0,01 % (w/v) L-Arabinose.

Die Western-Blot-Analyse von Zellysaten exprimierender FHK12-Zellen zeigt, dass die Expressionslevel der ToxR\*-Konstrukte bei einer L-Arabinosekonzentration von 0,01 % (w/v) das von ToxR-LS36 übersteigen, aber untereinander vergleichbar sind (Abb. 4.7 unten). Lediglich ToxR\*(S87H)- $\Delta$ TM ist gegenüber den anderen Proteinen stärker exprimiert, wahrscheinlich weil es im Zytoplasma vorliegt. Die effiziente Integration der Konstrukte in die innere *E. coli*-Membran konnte anhand der funktionellen Komplementierung der MalE-Defizienz von PD28-Zellen bestätigt werden (Anhang A Abb. Ic). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die verschiedenen  $\beta$ -Gal-Aktivitäten nicht durch unterschiedliche Konzentrationen der ToxR\*-Proteine in der Membran hervorgerufen werden.

Das Muster putativ interaktionsfördernder Reste der Sequenz LS49 ist etwas komplexer als das der TMD LS36. Neben His6 und dem C-terminalen GxxxG-Motiv enthält LS49 außerdem an den Positionen 2, 5 und 8 Aminosäuren mit hydroxylierter Seitenkette (Abb. 4.8 oben). Um den Beitrag dieser Reste für die TMD-TMD-Interaktion von LS49 zu untersuchen, wurde auch hier eine Reihe von Mutanten hergestellt und deren Fähigkeit getestet, die Homomerisierung der parentalen TMD zu kompetieren. Dabei zeigte sich, dass die Mutanten anhand des Ausmaßes ihrer verbleibenden Interaktion mit LS49 in drei Gruppen unterteilt werden können (Abb. 4.8 Mitte, unten): i) Sequenzen, welche die Selbstassoziation von ToxR-LS49 stark vermindern (ToxR\*-LS49, -T2V, -S8A und -T2V/S8A; um ~65 % reduzierte  $\beta$ -Gal-Aktivität), ii) Mutanten, welche die Interaktion der parentalen TMD mäßig beeinträchtigen (ToxR\*-T5V, -H6L, -T5V/S8A, -T2V/T5V und -T2V/T5V/S8A; ~40 % verringerte  $\beta$ -Gal-Aktivität) und iii) Mutanten, die nur schwach mit ToxR-LS49 interagieren (ToxR\*-T5V/H6L/S8A, -T2V/H6L/S8A, -T2V/T5V/H6L, -T2V/T5V/H6L/S8A und -T2V/T5V/H6L/S8A/G13I; ~25 %-ige Reduktion der  $\beta$ -Gal-Aktivität). In Sequenzen, die relativ stark mit ToxR-LS49 interagieren, liegen sowohl Thr5 als auch His6 unverändert vor. Im Fall der mäßig kompetierenden TMDn wurde entweder Thr5 alleine oder in Kombination mit hydroxylierten Resten anderer Positionen bzw. His6 substituiert. Sobald jedoch His6 zusammen mit hydroxylierten Aminosäuren mutiert wurde, wiesen die Sequenzen nur noch eine schwache Affinität zur parentalen TMD auf. Zusammengefasst deutet dies darauf hin, dass die Effizienz der heterotypischen Interaktion der parentalen TMDn mit seinen Mutanten mit der Zahl potentiell ausgebildeter Wasserstoffbrücken korreliert. Je weniger Wasserstoffbrücken zwischen His6 und hydroxylierten Resten der Partnerhelix möglich sind, umso schwächer ist deren Assoziation ausgeprägt. Vor allem die Interaktion zwischen Thr5 und His6 scheint dabei von Bedeutung zu sein (Anhang A Abb. II).

Um diese Vermutung näher zu analysieren, wurde eine Mutante von LS49 (T2V/T5V/S8A), die nur noch His6 enthält, mit anderen Mutanten koexprimiert, bei denen entweder nur Thr2, Thr5 oder Ser8 vorhanden ist (Abb. 4.9). Die Homomerbildung der TMD mit His6 wurde am stärksten durch die Thr5-enhaltende TMD kompetiert. Alle anderen Mutanten taten dies in einem geringeren Maße. Dies bestätigt die zentrale Rolle von Thr5 und His6 bei der Stabilisierung der Interaktion von LS49.

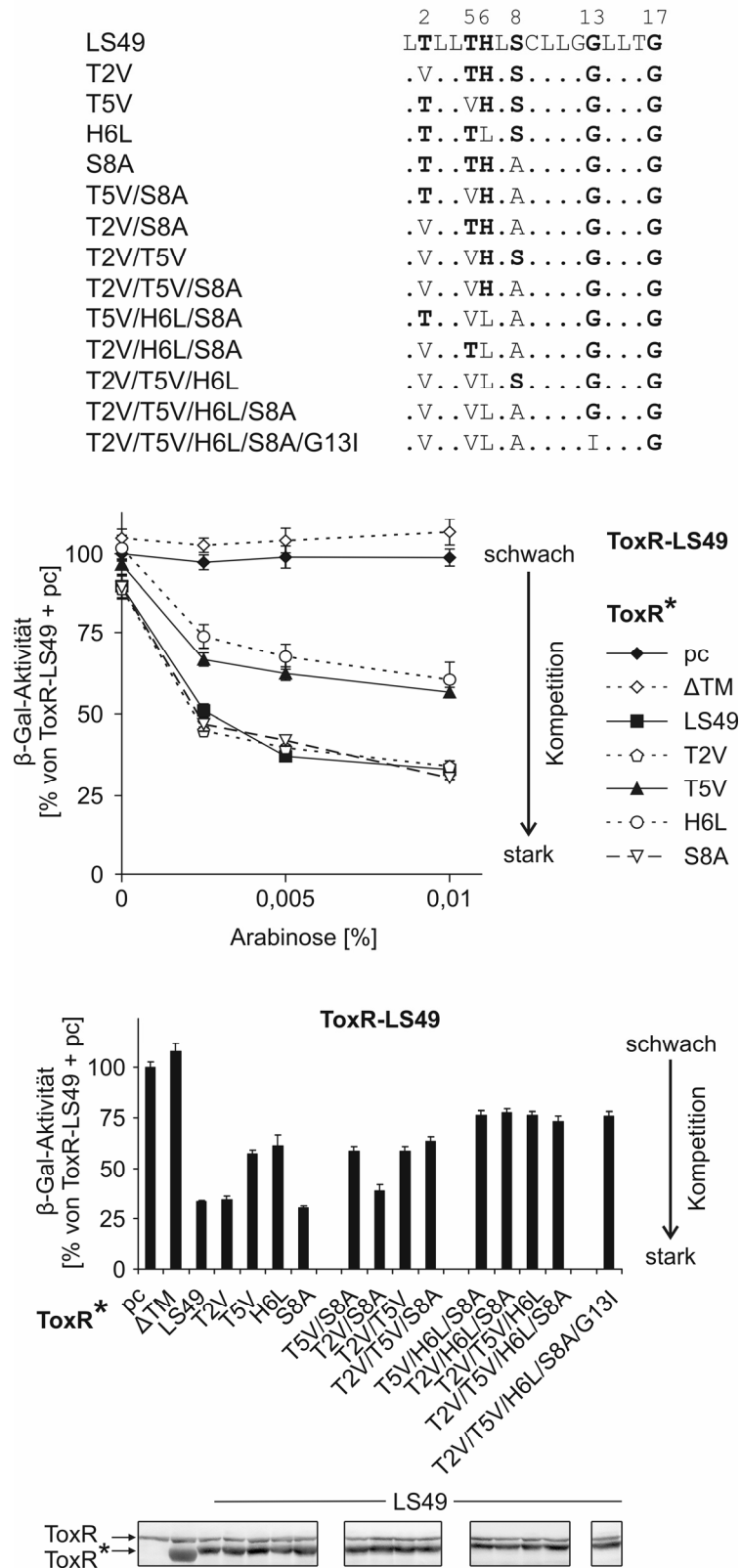


Abb. 4.8: Mutationsanalyse der TMD-TMD-Interaktion der His-haltigen Sequenz LS49. (Legende siehe nächste Seite)

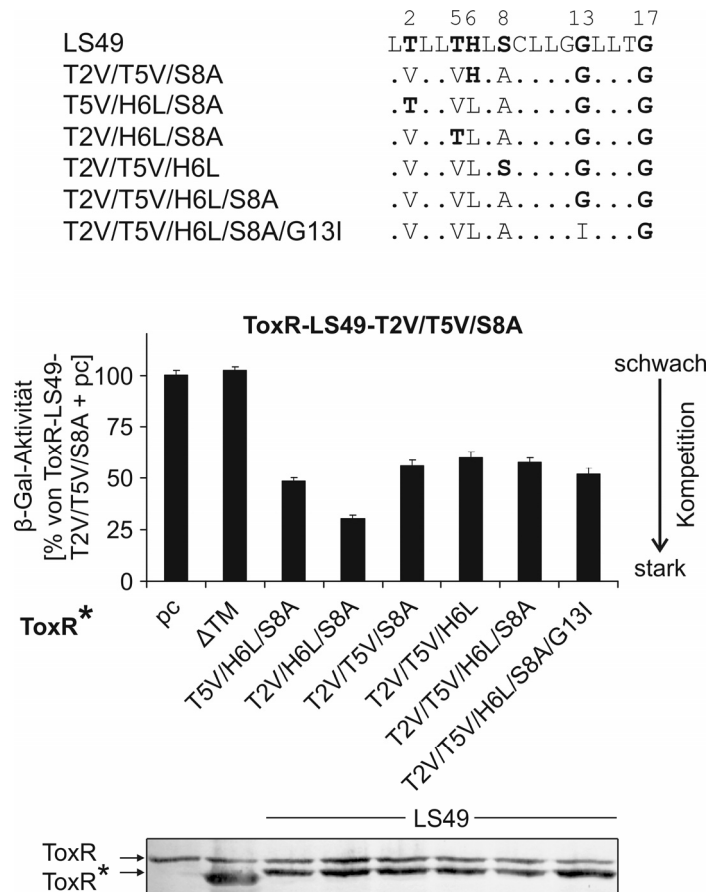


**Abb. 4.8: Mutationsanalyse der TMD-TMD-Interaktion der His-haltigen Sequenz LS49.**

**Oben:** Aminosäuresequenz von LS49 und abgeleiteter Mutanten. Kritische Reste sind fett hervorgehoben und ihre Positionen über der Sequenz angegeben. Nichtmutierte kritische Reste sind in den Sequenzen der Mutanten ebenfalls fett dargestellt. Punkte entsprechen den anderen parentalen Resten. Gly17 gehört zur angrenzenden Vektorsequenz. **Mitte:** Heterotypische Interaktion von LS49 mit Einzelmutanten als Funktion der ToxR\*(S87H)-Expression. Daten repräsentieren relative  $\beta$ -Gal-Aktivitäten exprimierender FHK12-Zellen bei 0 %; 0,0025 %; 0,005 % oder 0,01 % (w/v) L-Arabinose (100 % =  $\beta$ -Gal-Aktivität bei Expression von ToxR-LS49 + pc, 0 % L-Arabinose; Mittelwerte  $\pm$  SE, n = 12). Ungestörte ToxR-LS49 Homomerisierung wurde bei Kotransformation der Plasmid-Kontrolle (pc, siehe Text) ermittelt. **Unten:** Überblick über die Interaktion von LS49 mit jeder der Mutanten, gemessen bei 0,01 % (w/v) L-Arabinose. Balken zeigen  $\beta$ -Gal-Aktivitäten exprimierender FHK12-Zellen relativ zur Negativkontrolle, ToxR-LS49 + pc (= 100 %; Mittelwerte  $\pm$  SE, n = 12). Die 60-70 kDa Region eines Western-Blots exprimierender FHK12-Zellen ist unterhalb des Balkendiagramms gezeigt. Die Bande des konstitutiv exprimierten ToxR-LS49 befindet sich oberhalb der Banden der ToxR\*(S87H)-Proteine, die bei 0,01 % (w/v) L-Arabinose exprimiert wurden.

Auch bei LS49 und Mutanten konnte bestätigt werden, dass ihre Expressionslevel vergleichbar sind (Abb. 4.8 und Abb. 4.9 unten) und die Konstrukte mit ähnlicher Effizienz in die Membran integrieren (Anhang A Abb. Id). Wie bereits bei der Expression von LS36 beobachtet, sind auch ToxR\*-LS49-Proteine bei Kultivierung der Zellen mit 0,01 % (w/v) L-Arabinose im Vergleich zu den Wt-ToxR-Konstrukten überexprimiert. Dies erlaubt eine effiziente Konkurrenz der homotypischen TMD-TMD-Interaktion.

Die Mutationsanalyse der beiden ausgewählten Sequenzen LS36 und LS49 lässt vermuten, dass die hohe Selbstaffinität isolierter Sequenzen mit dem Motiv HxxxxxxGxxxG vor allem auf der Interaktion des His mit benachbarten hydroxylierten Aminosäuren beruht. Der enge Kontakt der Helices am C-terminalen GxxxG könnte eine präzise Ausrichtung der Monomere und somit die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Histidin und den Seitenketten der polaren Reste ermöglichen. Speziell die Interaktion zwischen His6 und einer hydroxylierten Aminosäure an Position 5 scheint dabei kritisch zu sein. Aber auch hydroxylierte Seitenketten an Position 2 und evtl. Position 8 können zusätzlich zur Stabilität der Interaktion beitragen. Die Stabilität der Oligomere scheint wiederum mit der Anzahl möglicher Wasserstoffbrücken zwischen den betreffenden Resten zu korrelieren. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Stärke der Histidin-vermittelten Assoziation betrachteter TMDn maßgeblich von der umgebenden Aminosäuresequenz abhängt.



**Abb. 4.9: Heterotypische Interaktion der von LS49 abgeleiteten Mutanten.**

**Oben:** Aminosäuresequenz von LS49 und verwendeter Mutanten. Kritische, nicht mutierte Reste sind fett gedruckt und ihre Positionen oberhalb der Sequenz wiedergegeben. Punkte repräsentieren parentale Reste. Gly17 gehört zur benachbarten Vektorsequenz. **Unten:** Interaktion von LS49-Mutanten miteinander. Daten zeigen relative  $\beta$ -Gal-Aktivitäten exprimierender FHK12-Zellen bei 0,01 % (w/v) L-Arabinose (100 % =  $\beta$ -Gal-Aktivität ToxR-LS49-T2V/T5V/S8A + pc; Mittelwerte  $\pm$  SE, n = 12). Die 60-70 kDa Region des dazugehörigen Western-Blots zeigt das Expressionslevel von ToxR-LS49-T2V/T5V/S8A (obere Bande) und der angegebenen ToxR\*(S87H)-Konstrukte (untere Banden).

#### 4.3.2 Mutationsanalyse hochaffiner Transmembrandomänen mit gegensätzlich ionisierbaren Aminosäuren

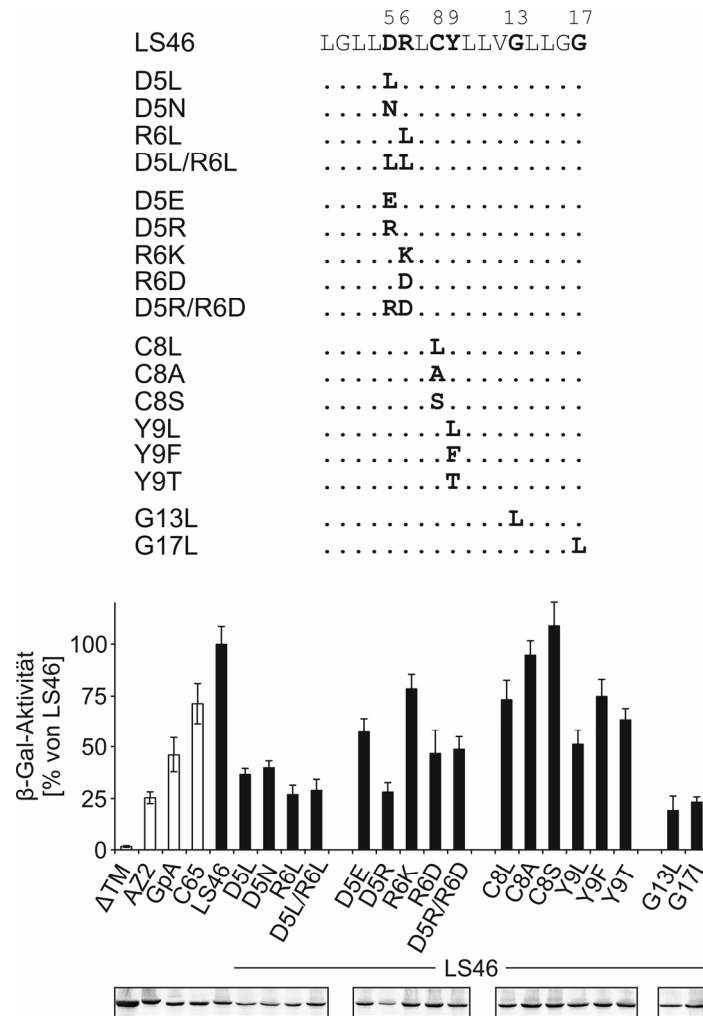
##### 4.3.2.1 Ionisierbare Aminosäuren vermitteln die Interaktion artifizieller Transmembrandomänen abhängig vom Sequenzkontext

Aus der kombinatorischen Plasmidbank JP1 wurden elf hochaffine TMD mit mehreren ionisierbaren Aminosäuren isoliert (siehe Abschnitt 4.3) [125]. Charakteristisch für diese Sequenzen war die abwechselnde Abfolge potentiell positiv und negativ geladener Reste an den randomisierten Positionen im N-terminalen Bereich und ein GxxxG-Motiv am C-Terminus. An den Positionen 2 und 6 trat überwiegend Arginin auf und an den Positionen 5 und 8 befanden sich zumeist die negativ

ionisierbaren Reste Aspartat und Glutamat. Die auffällige Aminosäureverteilung in der N-terminalen Hälfte der TMDn legt nahe, dass die Assoziation der Helices durch Wechselwirkungen zwischen den gegensätzlich ionisierbaren Resten vermittelt wird. Um dies zu untersuchen und um festzustellen, ob das GxxxG-Motiv bei der Interaktion der TMDn eine Rolle spielt, wurden die Sequenzen mit der höchsten Selbstaffinität (LS46, LS52) einer detaillierten Mutationsanalyse unterzogen. Die Substitution ionisierbaren Reste durch neutrale, polare oder andere ionisierbare Aminosäuren sollte dabei Aufschluss über die Ausbildung möglicher Wasserstoffbrücken oder sogar über das Vorhandensein ionischer Wechselwirkungen geben. Weiterhin wurden die polaren (nichtionisierbaren) Reste der TMDn und das GxxxG-Motiv mutiert. Die Selbstaffinität der generierten Mutanten wurde anschließend mit der ihrer parentalen Sequenzen und mit den Referenzkonstrukten  $\Delta$ TM, AZ2, der GpA-TMD sowie C65 verglichen (Beschreibung der Referenzen: siehe Abschnitt 4.1).

Bei LS46 befindet sich das Paar gegensätzlich ionisierbarer Aminosäuren (Asp, Arg) an den Positionen 5 und 6, gefolgt von Cys und Tyr an den Positionen 8 und 9 (Abb. 4.10). Die Substitution von Asp5 oder Arg6 durch eine neutrale Seitenkette (D5L, D5N, R6L, D5L/R6L) hat im Vergleich zur parentalen Sequenz einen drastischen Abfall der  $\beta$ -Gal-Aktivität (um durchschnittlich 67 %) zur Folge. Dies bestätigt, dass beide ionisierbaren Reste zur hochaffinen Interaktion von LS46 beitragen. Ferner verdeutlicht die stark reduzierte  $\beta$ -Gal-Aktivität (~70 %-ige bzw. ~55 %-ige Abnahme) nach Umkehr der potentiellen Ladung an einer der beiden Positionen (D5R, R6D), dass die Interaktion dabei von der Präsenz gegensätzlich ionisierbarer Reste abhängt. Bemerkenswerterweise kann die Selbstaffinität von LS46 nicht durch i) eine Seitenkette mit ähnlicher Struktur (D5N), ii) durch Reste mit gleicher potentieller Ladung (D5E, R6K) oder iii) durch doppelte Ladungsumkehr (D5R/R6D) aufrechterhalten werden. Demnach wird die Stärke der Interaktion neben dem ionisierbaren Charakter auch von der Geometrie der Seitenketten an den Positionen 5 und 6 beeinflusst.

Die TMD-TMD-Interaktion von LS46 wird vermutlich auch zu einem gewissen Grad durch die polaren Reste an den Positionen 8 und 9 stabilisiert, denn deren Substitution durch Leu (C8L, Y9L) führt zu einer um ~27 % bzw. ~50 % verringerten  $\beta$ -Gal-Aktivität. Da die Mutanten C8A und C8S eine vergleichbare  $\beta$ -Gal-Aktivität wie die parentale Sequenz erzeugen, scheinen kleine und polare Aminosäuren an dieser Position die Interaktion zu begünstigen. Die Mutanten, bei denen Tyr9 durch Phe (Y9F) oder Thr (Y9T) ersetzt wurde, erreichen jedoch nicht die  $\beta$ -Gal-Aktivität von LS46. Demnach ist sowohl der aromatische Ring als auch die Hydroxygruppe der Seitenkette für die hohe Affinität von LS46 erforderlich. Schließlich wurden auch die Gly des C-terminalen GxxxG-Motivs mutiert (G13L, G17L). In beiden Fällen trat dadurch eine deutliche Abnahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität auf (~80 % geringere Enzymaktivität). Dies verdeutlicht eindrucksvoll die Bedeutung dieser Reste für die Assoziation der Monomere.

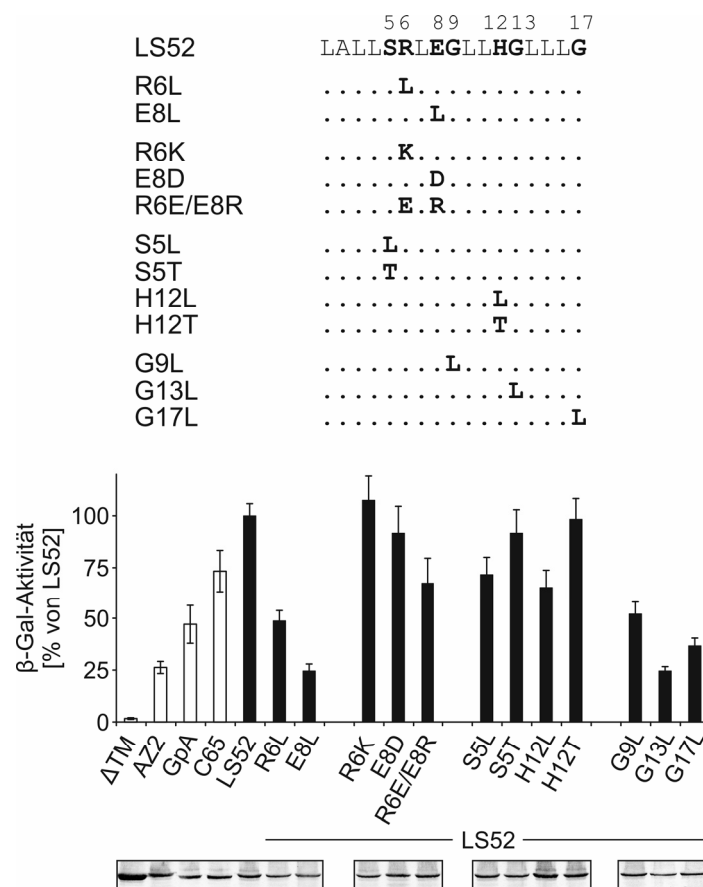


**Abb. 4.10: Mutationsanalyse der TMD-TMD-Interaktion der hochaffinen Sequenz LS46.**

**Oben:** Aminosäuresequenz von LS46 und seiner Mutanten. Veränderte Reste sind fett hervorgehoben und ihre Positionen oberhalb der Sequenz angegeben. Gly17 ist Teil der C-terminalen Vektorsequenz. Punkte entsprechen parentalen Aminosäuren. **Unten:** Affinität hergestellter Mutanten im Vergleich zur parentalen TMD und den Referenzkonstrukten  $\Delta$ TM, AZ2, GpA und C65. Balken repräsentieren relative  $\beta$ -Gal-Aktivitäten exprimierender FHK12-Zellen, bei Kultivierung mit 0,0025 % (w/v) L-Arabinose (100 % = LS46; Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 12). Das Expressionslevel der ~66 kDa großen ToxR-Proteine ist in dem dazugehörigen Western-Blot unter dem Diagramm gezeigt.

Die Sequenz LS52 enthält die gegensätzlich ionisierbaren Seitenketten an den Positionen 6 (Arg) und 8 (Glu) (Abb. 4.11). Verglichen mit LS46 ist das Paar potentiell geladener Aminosäuren somit leicht in die Mitte der TMD verschoben und die betreffenden Aminosäuren sind durch einen Rest getrennt. Weiterhin werden die ionisierbaren Aminosäuren in dieser Sequenz von polaren Resten an den Positionen 5 (Ser) und 12 (His) flankiert. Die Substitution der ionisierbaren Reste mit einer neutralen Seitenkette (R6L, E8L) destabilisiert, ebenso wie bei LS46, auch die homotypische Interaktion von LS52 beträchtlich. Damit wird abermals die Vermutung bekräftigt, dass diese Aminosäuren wesentlich für die Assoziation der betrachteten TMDn sind. Im Gegensatz zu LS46 wird in LS52 der Austausch von Arg und Glu durch Reste gleicher potentieller Ladung (R6K, E8D) toleriert und die doppelte

Ladungsumkehr kann die Affinität der Oligomere zum Teil aufrechterhalten. Die geometrischen Voraussetzungen für die Interaktion von LS52 scheinen demnach weniger restriktiv als bei LS46 zu sein. Polare Seitenketten können auch die Selbstaffinität von LS52 zusätzlich erhöhen, denn diese wird durch Mutation von Ser5 und His12 zu Leu (S5L, H12L), aber nicht durch Mutation zu Thr (S5T, H12T) geschwächt. Die Mutation des GxxxGxxxG (G9L, G13L, G17L) führt erneut zu einem drastischen Einbruch der  $\beta$ -Gal-Aktivität und verdeutlicht die Relevanz dieses Motivs für die Interaktion der TMD.



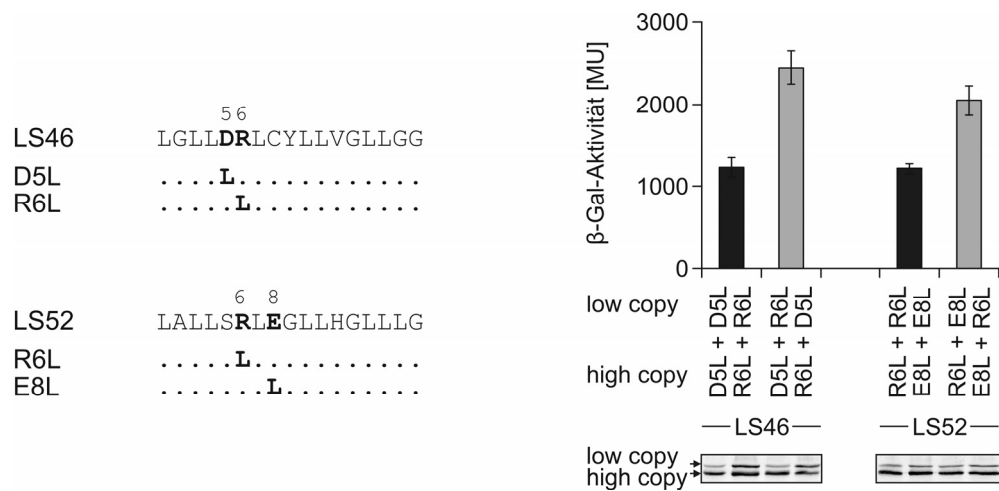
**Abb. 4.11: Mutationsanalyse der TMD-TMD-Interaktion der hochaffinen Sequenz LS52.**

**Oben:** Aminosäuresequenz von LS52 und hergestellter Mutanten. Ausgetauschte Reste sind fett dargestellt und ihre Positionen über der Sequenz wiedergegeben. Gly17 gehört zur flankierenden Vektorsequenz. Punkte entsprechen parentalen Resten. **Unten:** Selbstinteraktion von LS52 und seiner Mutanten, widergespiegelt durch relative  $\beta$ -Gal-Aktivitäten exprimierender FHK12-Zellen bei 0,0025 % (w/v) L-Arabinose (100 % = LS52; Mittelwerte  $\pm$  SD, n=12). Unter dem Diagramm gibt die 60-70 kDa Region des dazugehörigen Western-Blots Auskunft über das Expressionslevel der entsprechenden ToxR-Konstrukte.

Um sicherzustellen, dass die unterschiedlichen  $\beta$ -Gal-Aktivitäten von LS46 bzw. LS52 und ihrer Mutanten nicht aus abweichenden Konzentrationen der Proteine in der Membran resultieren, wurde

zunächst deren Expressionslevel in exprimierenden FHK12-Zellen überprüft (Abb. 4.10 und Abb. 4.11 unten). Das Expressionslevel fast aller Mutanten ist dabei vergleichbar mit dem der parentalen TMDn. Lediglich die Mutation von D5 in LS46 und von G13 in beiden Sequenzen scheint deren stabile Expression etwas zu beeinträchtigen. Dies könnte zu der festgestellten Abnahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität beigetragen haben. Weiterhin wurde die Effizienz der Membraninsertion der Konstrukte anhand ihrer Fähigkeit zur Komplementierung der MalE-Defizienz von PD28-Zellen kontrolliert (Anhang A Abb. 1e und 1f). In der gleichen Zeit erreichten LS46 oder LS52 exprimierende PD28-Kulturen eine geringere Zelldichte als AZ2 exprimierende Kultur. Dies ist vermutlich dem hydrophilen Charakter einiger Aminosäuren von LS46 bzw. LS52 geschuldet. Doch trotz der Präsenz dieser Reste ist die Zelldichte dieser Kulturen deutlich höher als die von  $\Delta$ TM exprimierenden Kulturen. Sequenzen mit mehreren polaren und/oder ionisierbaren Resten können somit, wenn auch mit verringerter Effizienz, in die Membran integriert werden. Die Mutation der hydrophilen Aminosäuren begünstigt wiederum die Membraninsertion der Sequenzen. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die daraufhin beobachtete Abnahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität durch eine reduzierte Konzentration der Proteine in der Membran verursacht wird.

Aus den dargestellten Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Interaktion von LS46 und LS52 maßgeblich durch die ionisierbaren Reste vermittelt wird. Diese üben ihre stabilisierende Funktion jedoch nur in Gegenwart eines C-terminalen (Tandem-) GxxxG-Motivs aus. Weiterhin können polare Reste die Affinität dieser TMDn zusätzlich steigern. Um zu prüfen, ob die Interaktion dabei tatsächlich auf der Wechselwirkung potentiell gegensätzlich geladener Reste beruht, wurde die heterotypische Assoziation zweier Mutanten mit dem positiven 2-Plasmid gestützten ToxR-Assay getestet (Abschnitt 4.2.2). In einer der beiden mutierten Sequenzen wurde die negativ ionisierbare und in der anderen die positiv ionisierbare Aminosäure durch Leu ersetzt (LS46-D5L, -R6L bzw. LS52-R6L, -E8L). Beide Mutanten wurden ausgehend von zwei Plasmiden koexprimiert und die resultierende mittlere  $\beta$ -Gal-Aktivität mit derjenigen verglichen, die bei ihrer getrennten Expression ermittelt wurde (Abb. 4.12). Tatsächlich ist die mittlere  $\beta$ -Gal-Aktivität infolge der Koexpression der Mutante mit positiv ionisierbarer und der Mutante mit negativ ionisierbarer Seitenkette deutlich erhöht gegenüber der mittleren  $\beta$ -Gal-Aktivität, die durch ihre einzelne Expression hervorgerufen wird. Dies bestätigt, dass die TMDn durch die heterotypische Wechselwirkung ihrer unterschiedlich ionisierbaren Reste assoziieren, wenn ein intaktes GxxxG am C-Terminus dies ermöglicht.



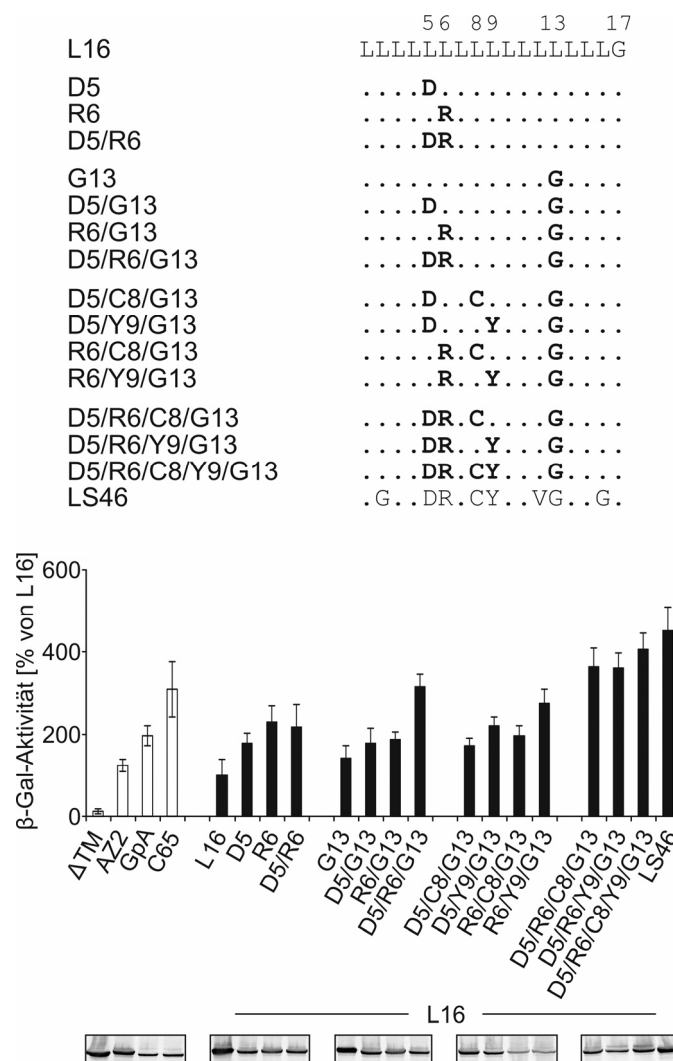
**Abb. 4.12: Heterotypische Interaktion zweier Mutanten von LS46 bzw. LS52 durch Wechselwirkung gegensätzlich ionisierbarer Aminosäuren in *trans*.**

**Links:** Aminosäuresequenzen von LS46 und LS52 sowie verwendeter Mutanten. Ausgetauschte Reste sind fett gedruckt und ihre Positionen über der Sequenz angegeben. Punkte stehen für parentale Reste. **Rechts:** Vergleich der homotypischen (schwarze Balken) und heterotypischen (graue Balken) Interaktion der Mutanten von LS46 bzw. LS52. Diese wurden von zwei genetisch kompatiblen Plasmiden mit unterschiedlichem Replikationsursprung koexprimiert (angedeutet durch low copy und high copy). Jede Mutante wurde sowohl vom *low copy number* als auch vom *high copy number* Plasmid exprimiert und die resultierenden β-Gal-Aktivitäten gemittelt (in MU; 0,0025 % (w/v) L-Arabinose; n = 12 pro ToxR-TMD-Kombination). Resultierende Standardabweichungen wurden mit dem Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz berechnet. Der Western-Blot zeigt die Expression der ToxR-Proteine ausgehend von den angegebenen Plasmiden.

#### 4.3.2.2 Ionisierbare Aminosäuren fördern die Interaktion einer Oligo-Leucin-Sequenz

Die Mutationsanalyse zweier isolierter Sequenzen mit ionisierbaren Aminosäuren hat gezeigt, dass für ihre hochaffine Interaktion sowohl potentiell gegensätzlich geladene Aminosäuren als auch das C-terminale GxxxG von enormer Bedeutung sind. Weiterhin scheinen auch polare Reste zur Stabilität dieser Interaktion beizutragen. Um das minimal erforderliche Aminosäuremotiv zu umreißen, welches der Assoziation dieser TMDn zugrunde liegt, wurden die als relevant identifizierten Reste schrittweise auf die Oligo-Leu-Sequenz L16 aufgesetzt. Dabei wurde der Einfluss von ionisierbaren Seitenketten, von GxxxG-Motiven sowie von polaren Resten auf die mittelmäßig starke Selbstaffinität von L16 [124] betrachtet. In Anlehnung an die Sequenz von LS46 wurde zunächst ein Asp- bzw. Arg-Rest an Position 5 bzw. 6 eingeführt (D5, R6; Abb. 4.13). Dies resultierte in einer Verdopplung der β-Gal-Aktivität und verdeutlicht somit, dass bereits einzelne ionisierbare Aminosäuren homotypische TMD-TMD-Interaktion fördern können. Das Aufsetzen eines D5/R6-Paares hatte gegenüber den einzelnen Resten jedoch keine weitere Erhöhung der Affinität von L16 zur Folge. Erst durch gleichzeitiges Einfügen des D5/R6-Paares zusammen mit einem GxxxG (D5/R6/G13) kommt es zu einer weiteren Verdopplung der β-Gal-Aktivität. Das GxxxG-Motiv (G13) selbst hat dabei nur einen geringen

Einfluss auf die Interaktion von L16. Die höchste Affinität wurde nach Aufsetzen des kompletten Musters aus polaren und ionisierbaren Resten inkl. GxxxG (D5/R6/C8/Y9/G13) gemessen. Die Aminosäuresequenz dieser Hybrid-TMD ist der von LS46 sehr ähnlich. Auch die durch ihre Interaktion ausgelöste  $\beta$ -Gal-Aktivität ist fast auf LS46-Niveau. Cys an Position 8 und Tyr an Position 9 scheinen einzeln aber nur in geringem Maße interaktionsfördernd zu wirken (D5/C8/G13, D5/Y9/G13, R6/C8/G13, R6/Y9/G13, D5/R6/C8/G13, D5/R6/Y9/G13). Nur als Paar tragen sie zu der beschriebenen hohen Affinität bei.

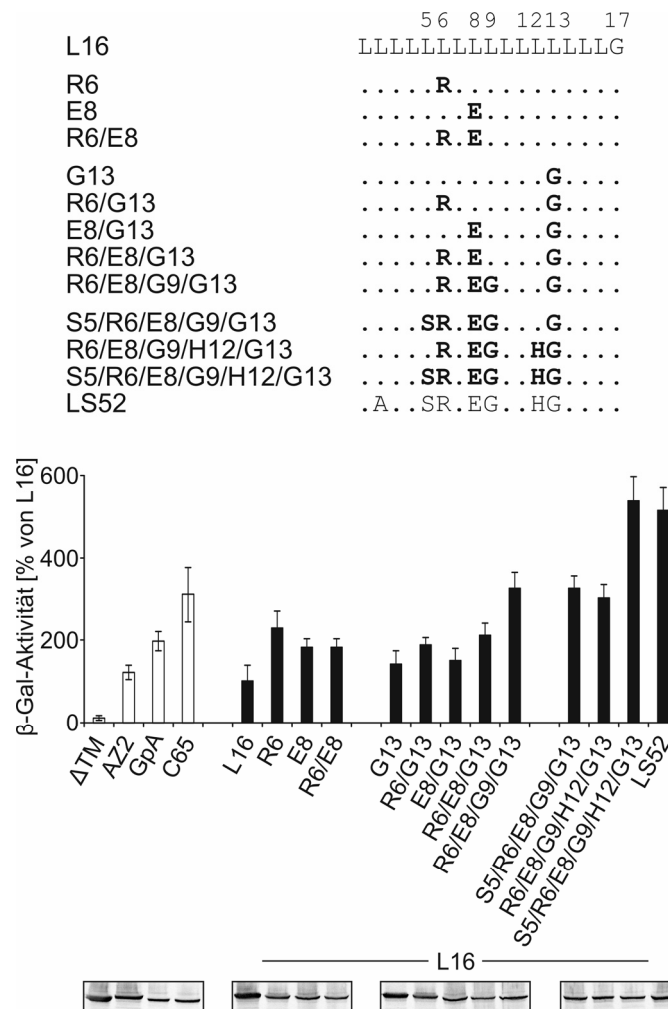


**Abb. 4.13: Verstärkte Interaktion von L16 durch Aufsetzen kritischer Reste von LS46.**

**Oben:** Aminosäuresequenz von L16, erzeugter Hybrid-TMDn und LS46. Aufgesetzte Reste sind fett hervorgehoben und ihre Positionen oberhalb der Sequenz angegeben. Gly17 gehört zur flankierenden Vektorsequenz. Punkte entsprechen parentalen Resten. **Unten:** Affinitäten von L16 und Hybrid-TMDn, verglichen mit LS46 und den Referenzkonstrukten  $\Delta$ TM, AZ2, GpA und C65. Daten zeigen  $\beta$ -Gal-Aktivitäten relativ zu L16, ermittelt bei einer L-Arabinosekonzentration von 0,0025 % (w/v) (Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 12). Die 60-70 kDa Region eines Western-Blots von Zelllysaten exprimierender FHK12-Zellen zeigt das Expressionslevel der analysierten Konstrukte.



Zur Rekonstruktion der Sequenz von LS52 wurden die Reste R6 und E8 erst individuell (R6, E8) und dann zusammen (R6/E8) in die Wirtssequenz L16 eingebracht (Abb. 4.14). Wie schon zuvor beim Aufsetzen der LS46-Sequenz verdoppelte sich dadurch die Affinität von L16. Das Paar gegensätzlich ionisierbarer Aminosäuren hat verglichen mit den einzelnen Resten auch in diesem Fall keinen zusätzlichen affinitätssteigernden Effekt. Im Gegensatz zum vorherigen Beispiel konnte hier durch Hinzufügen eines GxxxG-Motivs (R6/E8/G13) jedoch keine Verdopplung der  $\beta$ -Gal-Aktivität erzielt werden. Eine weitere Erhöhung der  $\beta$ -Gal-Aktivität ermöglichte erst ein GxxxGxxxG-Motiv (R6/E8/G9/G13). Mit diesem Motiv wurden weiterführend auch Ser5 (S5/R6/E8/G9/G13) oder His12 (R6/E8/G9/H12/G13) auf L16 aufgesetzt, doch die  $\beta$ -Gal-Aktivität blieb unverändert. Die Affinität von LS52 konnte nur durch simultanes Einfügen aller kritischen Reste (S5/R6/E8/G9/H12/G13) erreicht werden.



**Abb. 4.14: Verstärkte Interaktion von L16 durch Aufsetzen kritischer Reste von LS52.**

**Oben:** Aminosäuresequenz von L16, hergestellter Hybrid-TMDn und LS52. Eingelegte Reste sind fett gedruckt und ihre Positionen über der Sequenz dargestellt. Punkte stehen für parentale Reste. Gly17 ist Teil der Vektorsequenz. **Unten:** Affinitäten von L16, Hybrid-TMDn, LS52 sowie von Referenzkonstrukten, ermittelt anhand relativer  $\beta$ -Gal-Aktivitäten exprimierender FHK12-Zellen, induziert mit 0,0025 % (w/v) L-Arabinose (100 % = L16, Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 12). Das Expressionslevel der ~66 kDa großen Konstrukte ist im untenstehenden Western-Blot wiedergegeben.

Die durchgeführte Western-Blot-Analyse zeigt die vergleichbare Expression aller verwendeten Konstrukte, mit Ausnahme von R6/C8/G13 und R6/Y9/G13 (Abb. 4.13 und Abb. 4.14 unten). Bei gleicher Expression könnte die durch ihre Interaktion ausgelöste  $\beta$ -Gal-Aktivität etwas höher ausfallen. Die Effizienz der Membranintegration der ToxR-Proteine ist jedoch nicht gleich (Anhang A Abb. Ig und Ih). Sie nimmt mit steigendem Anteil ionisierbarer und polarer Reste ab. Demnach könnte die Zunahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität, die nach schrittweisem Aufsetzen dieser Reste gemessen wurde, tatsächlich noch stärker ausgeprägt sein. Die Zelldichte exprimierender PD28-Kulturen ist bei allen Konstrukten mindestens 3-mal so hoch wie die Zelldichte  $\Delta$ TM exprimierender Kulturen, so dass von überwiegend membranintegrierten Konstrukten ausgegangen werden kann [118].

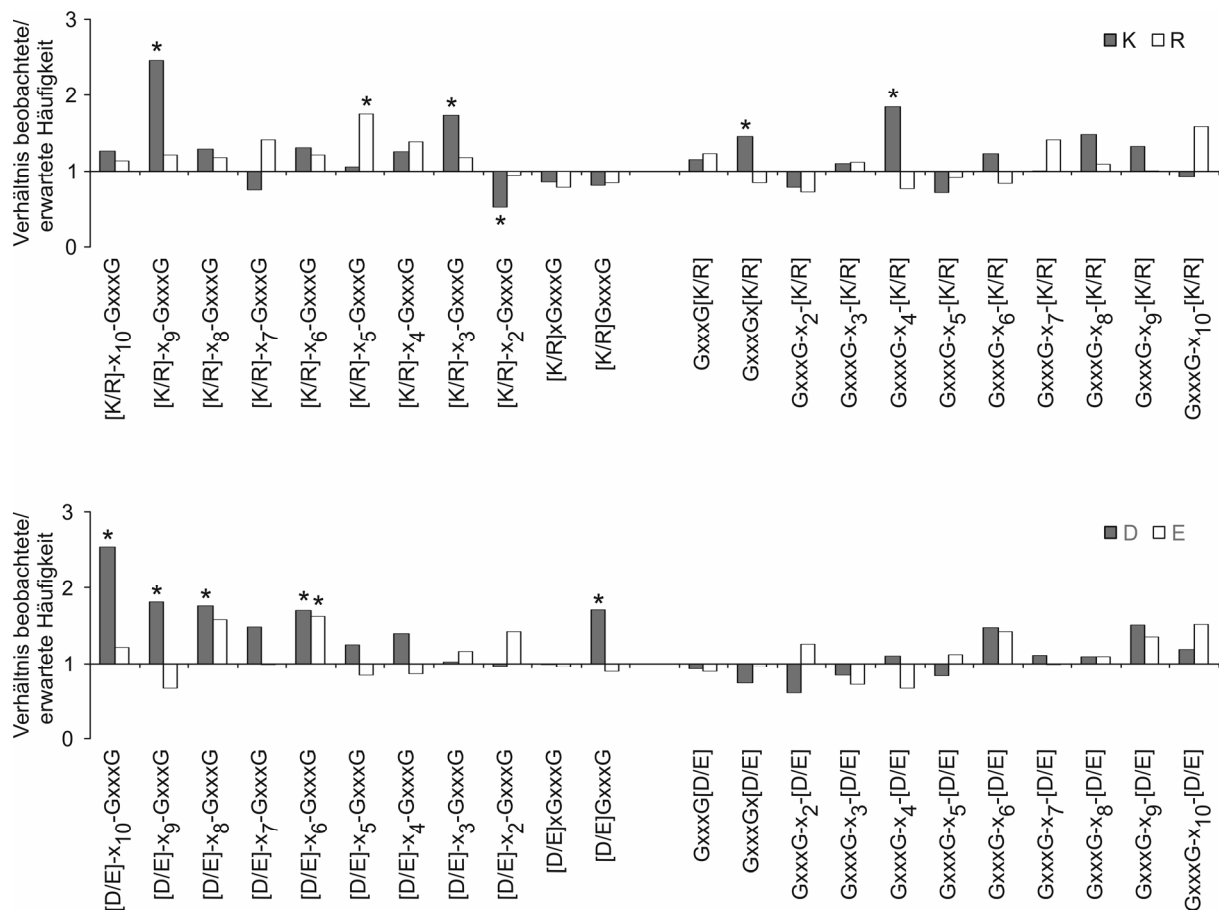
Die Rekonstruktion der Interaktionsmotive von LS46 und LS52 verdeutlicht, dass bereits einzelne ionisierbare Aminosäuren die Affinität einer Modell-TMD beträchtlich erhöhen können. Ein noch größerer interaktionsfördernder Effekt, vermittelt durch die Wechselwirkung potentiell gegensätzlich geladener Reste, trat nur in Gegenwart eines C-terminalen (Tandem-) GxxxG-Motivs auf. Dieser Effekt konnte durch polare Reste nochmals verstärkt werden.

#### **4.3.2.3 Vorkommen von Motiven mit ionisierbaren Aminosäuren und GxxxG in natürlichen Transmembrandomänen**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Assoziation der analysierten TMDn auf der Interaktion unterschiedlich ionisierbarer Seitenketten beruht und diese dabei von einem GxxxG abhängt, wurde nun das gleichzeitige Auftreten von ionisierbaren Aminosäuren und einem GxxxG in natürlichen TMDn untersucht. Für die heterotypische Interaktion der Modell-TMDn war bereits ein potentiell geladener Rest pro Helix ausreichend. Daher wurde in natürlichen TMDn nach Motiven gesucht, bei denen ein Asp, Glu, Lys oder Arg bis zu 11 Positionen N-terminal oder C-terminal von einem GxxxG lokalisiert ist. Zu diesem Zweck wurde von Angelika Fuchs (Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik, TU München) auf Basis von Swiss-Prot und TrEMBL [144] eine nichtredundante Datenbank mit 25.558 nichthomologen TMD-Sequenzen bitopischer Membranproteine erstellt und analysiert. In diesem Zusammenhang wurden die annotierten bzw. vorhergesagten TMDn auf eine einheitliche Länge von 23 Aminosäuren verkürzt oder verlängert. Dies hatte eine durchschnittliche Elongation der Sequenzen um  $\sim 0,5$  Reste und eine nur geringfügig veränderte Aminosäurezusammensetzung zur Folge (Anhang B Tab. I). Die Häufigkeit von Asp, Glu und Lys ist dadurch gegenüber den annotierten/vorhergesagten TMDn leicht erhöht, wohingegen der relative Anteil von Arg etwas zurückging. Durch den Vergleich der beobachteten mit der erwarteten Häufigkeit gesuchter Motive kann abgeschätzt werden, ob diese in der Datenbank über- oder unterrepräsentiert sind. Die detaillierte

Beschreibung der Berechnung dieser Häufigkeiten, der zugehörigen Signifikanzen sowie der Erstellung der Datenbank enthält [145].

Aus dem Verhältnis der beobachteten und der erwarteten Häufigkeit der betrachteten Motive in Abb. 4.15 (siehe auch Anhang B Tab. II) ist ersichtlich, dass die Mehrzahl dieser Motive in den natürlichen TMDn der Datenbank überrepräsentiert ist. Diese kommen bis zu 2,5-mal häufiger als erwartet vor. Weiterhin ist der Unterschied zwischen beobachtetem und erwartetem Auftreten bei einigen Motiven signifikant ( $p < 0,05$ ; in Abb. 4.15 mit \* gekennzeichnet). Interessanterweise treten in manchen Fällen positiv und negativ ionisierbare Aminosäuren, die zu einem signifikant überrepräsentierten Motiv gehören, alternierend auf. Insgesamt wurden die Motive 1179-mal in der Datenbank gefunden. Meist ist die Funktion der betreffenden Proteine jedoch unbekannt.



**Abb. 4.15: Auftreten ionisierbarer Aminosäuren in Kombination mit GxxxG in natürlichen TMDn bitopischer Membranproteine.**

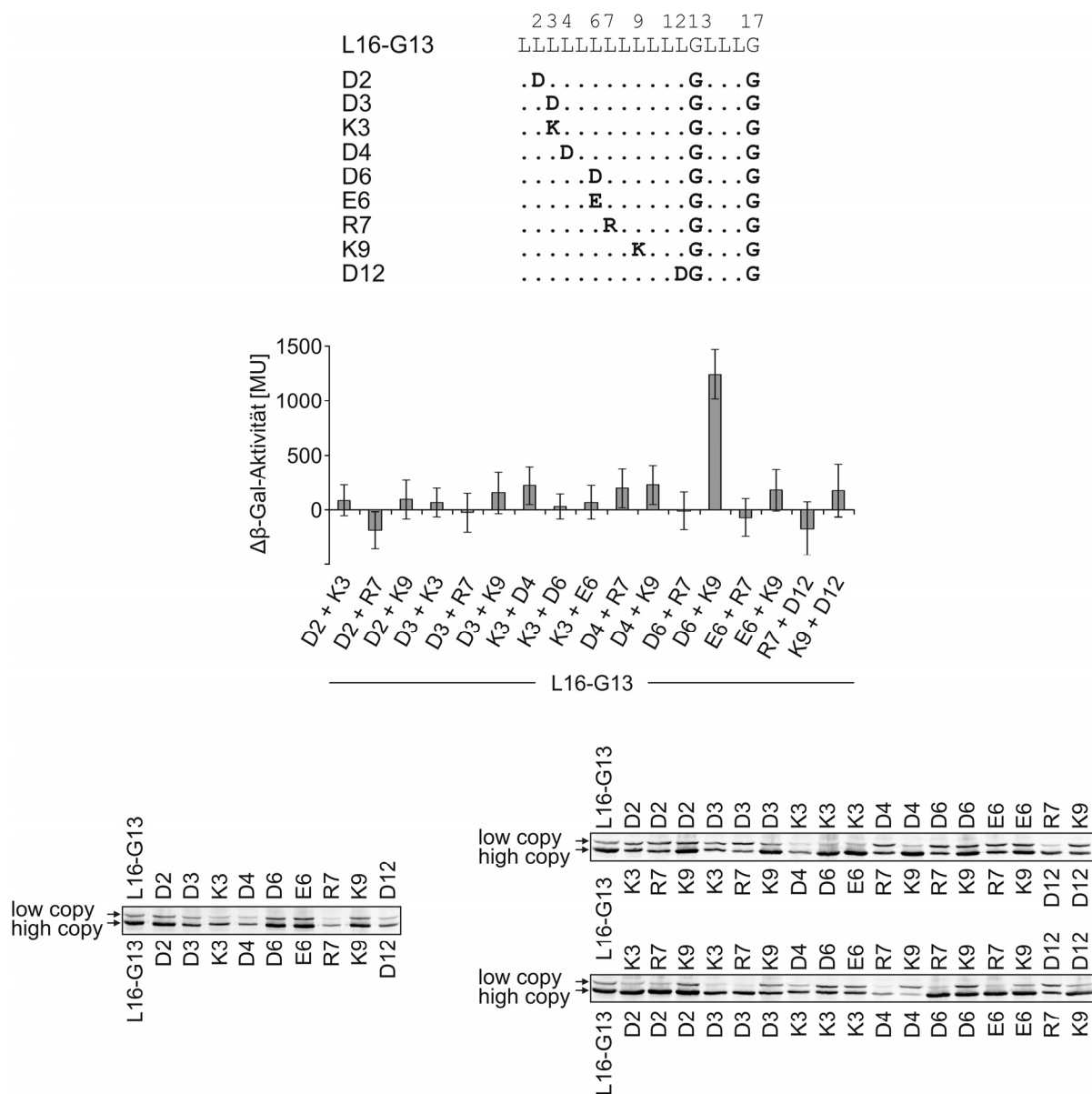
Häufigkeit von Motiven mit einem Arg/Lys (**oben**) oder einem Asp/Glu (**unten**) in verschiedenen Abständen (x bis x<sub>10</sub>) zu einem GxxxG in einer nichtredundanten Datenbank von 25.558 bitopischen TMDn (TMD-Länge = 23 Reste). x steht für variable Aminosäuren. Balken geben das Verhältnis beobachteter und erwarteter Häufigkeit gesuchter Motive wieder und zeigen bei einem Verhältnis >1 ihre Über- und bei einem Verhältnis <1 ihre Unterrepräsentation an. \* kennzeichnet signifikante Über-/Unterrepräsentation ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2.4 Heterotypische Interaktion von Oligo-Leucin-Sequenzen mit Motiven bestehend aus ionisierbaren Aminosäuren und GxxxG

Die Analyse einer Datenbank von natürlichen TMDn bitopischer Membranproteine im vorherigen Abschnitt hat ergeben, dass Motive mit einer ionisierbaren Aminosäure und einem GxxxG häufiger vorkommen als statistisch erwartet. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der beobachteten Überrepräsentation und der Interaktionsfähigkeit der TMDn zu prüfen, wurden signifikant überrepräsentierte Motive auf eine Oligo-Leu-Sequenz aufgesetzt und ihre heterotypische Assoziation analysiert (Abb. 4.16). Zur besseren Vergleichbarkeit mit den zuvor gewonnenen Daten wurden dafür Motive verwendet, bei denen sich der ionisierbare Rest N-terminal vom GxxxG befindet. Außerdem wurde das GxxxG-Motiv jeweils an der gleichen Position in L16 eingefügt, an der es auch bei LS46 und LS52 vorkommt (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Zur Ermittlung der Selbstaffinität, die durch das aufgesetzte Motiv hervorgerufen wird, erfolgte zunächst die getrennte Expression der hergestellten Hybrid-TMDn. Wie bereits bei der Rekonstruktion der LS46- oder der LS52-Sequenz in Abschnitt 4.3.2.2 festgestellt werden konnte, fördern auch in diesem Fall einzelne ionisierbare Reste die Interaktion einer Leu-haltigen Sequenz (Anhang A Abb. III). Anschließend wurden die Konstrukte mit den unterschiedlichen Motiven koexprimiert und die resultierende  $\beta$ -Gal-Aktivität mit derjenigen verglichen, die aus ihrer Selbstassoziation folgte. Dabei wurden nicht nur TMDn koexprimiert, bei denen sich die ionisierbaren Reste in Reichweite befinden, sondern als Negativkontrolle auch TMDn, deren Reste für eine Wechselwirkung zu weit auseinander liegen.

In Abb. 4.16 ist die Differenz zwischen den  $\beta$ -Gal-Aktivitäten dargestellt, welche bei der Koexpression der TMDn und bei ihrer separaten Expression ermittelt wurden. Ein positiver Wert zeigt folglich eine hochaffine heterotypische Interaktion zwischen zwei verschiedenen TMDn an. Dies kann tatsächlich bei einem der TMD-Paare beobachtet werden (D6 + K9, entsprechen den Motiven D-x<sub>6</sub>-GxxxG und K-x<sub>3</sub>-GxxxG). Ihre heterotypische Interaktion löst eine etwa doppelt so hohe  $\beta$ -Gal-Aktivität wie ihre getrennte homotypische Interaktion aus. Die Heteromerisierung dieser TMDn scheint sehr spezifisch zu sein, denn bereits der Austausch von D6 durch E6 in einer der beiden TMDn (E6 + K9) stört ihre Assoziation. Dies ist erneut ein Hinweis darauf, dass die Geometrie der Seitenketten bzw. ihre präzise Ausrichtung extrem wichtig für die Ausbildung einer starken Wechselwirkung ist (Vergleich Abschnitt 4.3.2.1: Konstrukt LS46-D5R/R6D). Bei anderen TMD-Paaren hingegen konnte keine hochaffine heterotypische Interaktion festgestellt werden. Grund dafür ist einerseits der evtl. zu große Abstand ihrer ionisierbaren Seitenketten (z.B. D2 + K9), und andererseits könnte die schwache Expression einiger TMDn die Detektion von Heteromeren verhindert haben (Abb. 4.16 unten). Die effiziente Membraninsertion aller Konstrukte konnte durch Komplementierung der Male-Defizienz von PD28-Zellen bestätigt werden (Anhang A Abb. Ii).

Somit kann zusammengefasst werden, dass mindestens ein Paar statistisch signifikant überrepräsentierter Motive aus natürlichen TMDn zu einer starken heterotypischen Interaktion befähigt ist und dass dies für die anderen Motive nicht ausgeschlossen werden kann.



**Abb. 4.16: Heterotypische TMD-TMD-Interaktion vermittelt durch überrepräsentierte Motive natürlicher TMDn mit ionisierbaren Resten und GxxxG.**

**Oben:** Aminosäuresequenz von L16-G13 und hergestellter Hybrid-TMDn. Kritische Reste sind fett hervorgehoben und ihre Positionen über der Sequenz angegeben. Leucine sind durch Punkte dargestellt. Gly17 gehört zur Vektorsequenz. **Mitte:** Balken geben die mittlere Differenz zwischen den  $\beta$ -Gal-Aktivitäten von Zellen wieder, welche das angegebene TMD-Paar koexprimieren und Zellen, die von beiden Plasmiden (*low copy* und *high copy*) ein und dieselbe TMD exprimieren ( $\Delta\beta$ -Gal-Aktivität in MU; 0,0025 % (w/v) L-Arabinose; Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 12 pro ToxR-TMD-Kombination). Ein positiver Wert zeigt die heterotypische Interaktion der entsprechenden TMDn an. Die resultierenden Standardabweichungen wurden mit dem Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz berechnet. **Unten:** Western-Blot-Analyse von Zellysaten doppelt transformierter, exprimierender FHK12-Zellen. Obere Banden repräsentieren die vom *low copy number* Plasmid und untere Banden die vom *high copy number* Plasmid exprimierten Konstrukte.

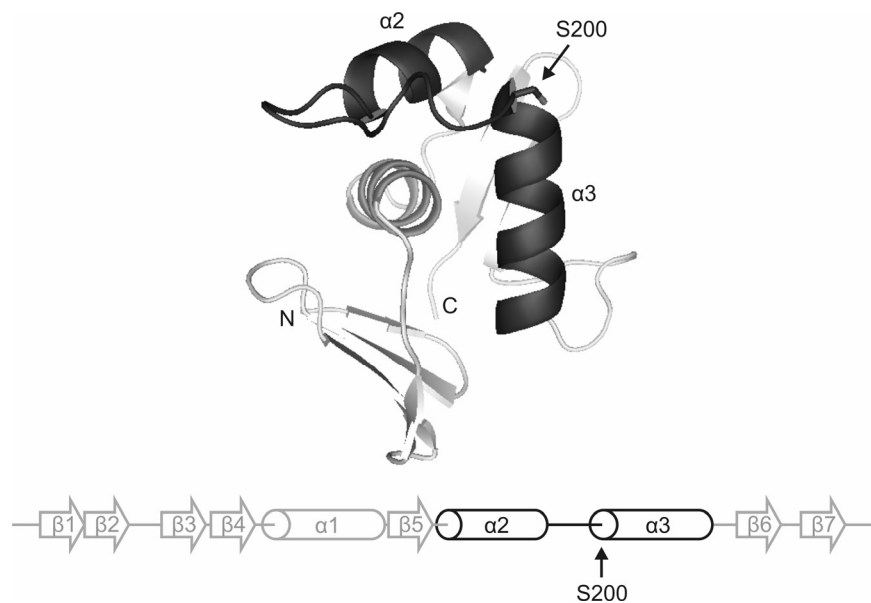
## 5 Diskussion

### 5.1 Analyse heterotypisch interagierender Transmembrandomänen mittels ToxR-basierter Assays

#### 5.1.1 Das dominant-negative ToxR\*-Kompetitorsystem

Bislang wurde das ToxR-System hauptsächlich zur Charakterisierung homotypischer TMD-TMD-Interaktion genutzt [57,64,146]. Doch neben dem generellen Einfluss bestimmter Aminosäurespezies auf die Assoziation von TMDn war in dieser Arbeit vor allem von Interesse, mit welchen Resten der Nachbarhelix die betrachteten Aminosäuren in Wechselwirkung treten – mit der identischen Seitenkette der Partnerhelix oder auch mit anderen umliegenden Resten. Die Untersuchung dieser Fragestellung erforderte einen Assay, mit dem die Interaktion verschiedener TMDn erfasst werden kann. Ein bereits vorhandenes System (das GALLEX-System) zur Analyse heterotypisch interagierender TMDn in natürlicher Membranumgebung beruht auf dem LexA-Transkriptionsfaktor aus *E. coli* [115]. Ähnlich wie die ToxR-Domäne bindet auch die LexA-Domäne nach Di- oder Oligomerisierung an eine spezifische Erkennungssequenz der entsprechenden Operatorregionen und reguliert so die Transkription nachgeschalteter Gene. Durch Verwendung zweier LexA-Domänen (Wt und Mutante), die an unterschiedliche DNA-Elemente binden und einer Hybrid-Operatorregion, die Teile beider Erkennungssequenzen enthält, ist damit die Detektion heterotypisch interagierender TMDn möglich. Eine Mutante der ToxR-Domäne, die ähnlich wie die erwähnte LexA-Mutante eine veränderte DNA-Bindesepezifität aufweist, war jedoch nicht verfügbar. In einem anderen Ansatz wurden synthetische TMD-Peptide zu ToxR-TMD exprimierenden FHK12-Zellen gegeben [147]. Die Interaktion der Peptide mit dem ToxR-Protein steht dabei in Konkurrenz zu dessen Homomerisierung. Die dadurch entstehenden Dimere enthalten nur eine ToxR-Transkriptionsaktivator-Domäne und können somit die Expression des Reportergens nicht aktivieren. Diese Vorgehensweise birgt jedoch auch Nachteile. Zum einen ist fraglich, ob sich mit dieser Methode auch TMDn untersuchen lassen, die zu multimeren Komplexen (Tri-/Tetramere usw.) assemblieren. Möglicherweise reicht beim Vorliegen eines Multimers das Ersetzen einzelner ToxR-Proteine durch ein Peptid nicht aus, um die Transkriptionsaktivierung zu unterbinden. Zum anderen ist die Kompetition der ToxR-Homomerisierung von der spontanen Integration der in das Kulturmedium gegebenen Peptide in die innere *E. coli*-Membran abhängig. Um dies zu vermeiden, wurde das dominant-negative ToxR\*-Kompetitorsystem entwickelt [126]. Dabei werden zwei ToxR-Proteine koexprimiert, die sich in ihrer transkriptionellen Aktivität und nach Bedarf auch in ihrer TMD-Sequenz unterscheiden. Eines der Proteine enthält eine transkriptionell aktive und das andere eine transkriptionell inaktive ToxR-Domäne, welche durch Mutation

des semikonservierten Serins an Position 87 zu Gly erzeugt wurde. In der Annahme, dass die ToxR-Domäne eine ähnliche Struktur wie die homologe OmpR-Transkriptionsregulator-Domäne aufweist, befindet sich Ser87 voraussichtlich am N-Terminus der zweiten  $\alpha$ -Helix des „*helix-turn-helix*“-Motivs (Abb. 5.1) [148]. Diese Helix bindet an die DNA und wird vermutlich durch Ausbildung einer intrahelikalen Wasserstoffbrücke zwischen der Serin-Seitenkette und dem Rückgrat-Amidproton der (i+3)-ten Aminosäure stabilisiert [148]. Demnach könnte die Mutation S87G Einfluss auf die Stabilität dieser Helix und somit auf die DNA-Bindung der Domäne haben. Ser87 grenzt aber auch C-terminal an die die Helices verbindende Schleife, die für die Interaktion mit der RNA-Polymerase verantwortlich zu sein scheint. Der genaue Effekt dieser Mutation auf die Struktur und Funktion der ToxR-Domäne bleibt daher spekulativ, zumal die Substitution des entsprechenden Rests in den homologen Proteinen OmpR und TcpP (zu F oder A) in unterschiedlichen DNA-Bindeeigenschaften resultierte [149,150]. In jedem Fall kann im ToxR\*-Assay die Expression des Reportergens (*lacZ*) infolge von TMD-TMD-Interaktion nur durch Wt-ToxR-Oligomere aktiviert werden. Aufgrund dessen lässt sich die Heteromerisierung des aktiven mit dem inaktiven ToxR-Protein anhand einer reduzierten Reporterenzymaktivität ( $\beta$ -Gal) nachweisen. Auch bei Ausbildung multimerer Komplexe sollte die inaktive ToxR\*-Domäne die Wt-ToxR vermittelte Transkriptionsaktivierung stören, indem sie ein großes sterisches Hindernis für die Ausübung der Funktion beteiligter Wt-ToxR-Domänen darstellt.



**Abb. 5.1: Strukturmodell der DNA-Bindedomäne des OmpR-Transkriptionsregulators.**

**Oben:** Die PDB-Struktur 1OPC wurde mit PyMOL v0.99 bearbeitet und zeigt die OmpR-DNA-Bindedomäne von Rest 137 bis 235. Der N-Terminus ist mit N und der C-Terminus mit C gekennzeichnet und das „*helix-turn-helix*“-Motiv, bestehend aus  $\alpha$ -Helix 2 und 3 sowie der dazwischen befindlichen Schleife, ist schwarz hervorgehoben. Der dem Rest ToxR-S87 entsprechende Rest OmpR-S200 ist mit einem Pfeil markiert. **Unten:** Schematisches Diagramm der Sekundärstrukturelemente der OmpR-DNA-Bindedomäne. Erneut ist das „*helix-turn-helix*“-Motiv schwarz wiedergegeben. Der Pfeil zeigt die Position von OmpR-S200 an. Das Diagramm wurde aus [127] entnommen und modifiziert.

Das Prinzip der Kompetition der homotypischen durch heterotypische TMD-TMD-Interaktion konnte im Rahmen des ToxR\*-Systems erfolgreich mit den Modell-TMDn AZ2 und A16 umgesetzt werden [126]. ToxR\*-AZ2 war in der Lage, mit der Selbstinteraktion von ToxR-AZ2 zu konkurrieren, ToxR\*-A16 jedoch nicht.

Die Anwendbarkeit des ToxR\*-Systems zur Interaktionsanalyse anderer TMDn wurde weiterführend mit Hilfe der intensiv untersuchten GpA-TMD überprüft. Dazu wurden in einer TMD die an der Kontaktfläche befindlichen Reste L75, I76, G79, G83 und T87 mutiert und die verbleibende Interaktion der Mutanten mit der Wt-TMD betrachtet. Bei Koexpression von GpA im Kontext des aktiven Wt-ToxR-Proteins und der GpA-Mutanten im Kontext des inaktiven ToxR\*(S87G)-Proteins konnte jedoch keine sequenzspezifische Veränderung der  $\beta$ -Gal-Aktivität festgestellt werden. Selbst bei der gleichzeitigen Mutation aller vermeintlich wichtigen Aminosäuren kam es zur starken Abnahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität. Parallel dazu war ein gehemmtes Wachstum ToxR\*(S87G) exprimierender Zellen zu beobachten. Die Ursache für die offenbar toxische Wirkung von ToxR\*(S87G) auf *E. coli* ist allerdings unbekannt. Somit bleibt offen, inwiefern sich das veränderte Wachstumsverhalten auf die  $\beta$ -Gal-Aktivität in Wt-ToxR und ToxR\*(S87G) koexprimierenden Zellen auswirkt. Die beschriebene drastisch verringerte  $\beta$ -Gal-Aktivität scheint jedoch nicht ausschließlich von dem verminderten Wachstum der Zellen hervorgerufen worden zu sein, sondern hängt vermutlich auch mit der TMD des ToxR\*(S87G)-Proteins zusammen. Bei Verwendung von ToxR\*(S87G)-A16 trat in der vorangegangenen Studie keine Abnahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität auf [126]. Aus der wahrscheinlich nicht sehr effizienten Integration des Oligo-Ala-Segments in die Membran [27,151], kann geschlossen werden, dass die unspezifische Reduktion der  $\beta$ -Gal-Aktivität vor allem beim Einsatz membranständiger ToxR\*(S87G)-Proteine stattfindet. Sowohl aufgrund seiner wachstumshemmenden Wirkung als auch der fehlenden Differenzierung zwischen putativ interagierenden und nicht interagierenden TMDn stellte sich ToxR\*(S87G) letztendlich als ungeeignet für die Interaktionsanalyse weiterer TMDn heraus. Um dennoch die Heteromerisierung von TMDn auf Grundlage des Kompetitionsprinzips untersuchen zu können, wurde die ToxR\*-Mutante S87H verwendet, die ein normales Wachstum exprimierender Zellen erlaubt. Außerdem zeigte die Koexpression von ToxR-GpA und ToxR\*(S87H)-GpA-Mutanten eine sequenzspezifische Verringerung der  $\beta$ -Gal-Aktivitäten in entsprechender Reihenfolge: GpA > L75V ~ T87A > I76G > G83A > G79I ~ G83I ~ L75V/I76G/G79I/G83I/T87A. Die Substitution von L75, I76 und T87 durch kleinere Seitenketten erzeugt lokale Kavitäten an der Helix-Helix-Kontaktfläche. Da van-der-Waals-Wechselwirkungen nur über kurze Distanzen, d.h. zwischen eng gepackten Seitenketten bestehen, wird die Stabilität des Dimers durch Verlust dieser Wechselwirkungskräfte an den betreffenden Stellen geschwächt. Im Gegensatz dazu unterbinden die Mutationen von G79 und G83 zu größeren Seitenketten den engen Kontakt der Helices insgesamt und verhindern somit die großflächige Ausbildung stabilisierender van-der-Waals-Wechselwirkungen. Dementsprechend hatte die Mutation von L75, I76 und T87 einen geringeren Einfluss auf die heterotypische Interaktion mit Wt-GpA als die Mutation von G79 und G83. Damit stimmen die mit

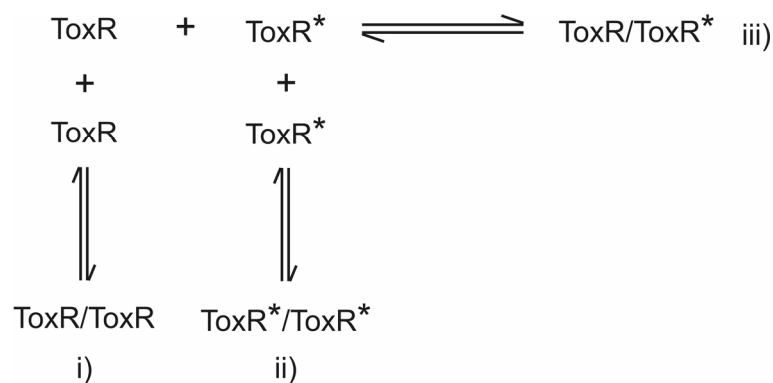


ToxR\*(S87H) ermittelten Ergebnisse weitestgehend mit den Literaturangaben zur Homodimerisierung der GpA-TMD überein [55,57-59]. Eine interessante Ausnahme stellt G83A dar. Wird diese Mutation in beiden Partnerhelices vorgenommen, stört dies ihre Interaktion ebenso stark wie die G83I-Mutante. Wird G83 hingegen nur in einer TMD durch Ala ausgetauscht, verbleibt gegenüber der G83I Mutation ein geringes Maß an heterotypischer Interaktion mit der Wt-TMD. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine Alanin-Seitenkette an der zentralen Kontaktstelle eine verminderte Interaktion der Helices zulässt, zwei Alanin-Seitenketten jedoch nicht.

Bei der Untersuchung der Interaktion von GpA und Mutanten mittels des ToxR\*(S87H)-Kompetitors war zu beobachten, dass die  $\beta$ -Gal-Aktivität nach Koexpression TMD-enthaltender Proteine trotz Substitution aller betrachteten Aminosäuren immer noch beträchtlich reduziert war. Daher stellt sich die Frage, warum die als Negativkontrolle dienende Mehrfachmutante von GpA in der Lage ist, mit der Selbstinteraktion der Wt-TMD zu konkurrieren. Wie bereits erwähnt, ist nur eine der Partnerhelices mutiert. Dies könnte ähnlich wie bei GpA-G83A dazu führen, dass die Interaktion der TMDn nur teilweise inhibiert wird. Bestärkt wird diese Vermutung durch die mit dem GALLEX-System durchgeführte Interaktionsanalyse von GpA [115]. Die Autoren beschreiben dabei einen verminderten disruptiven Effekt von Mutationen auf die heterotypische Assoziation mit der Wt-TMD gegenüber der Selbstassoziation mutierter TMDn. Ferner wurde mit analytischer Ultrazentrifugation gezeigt, dass nicht nur Wt-GpA, sondern auch GpA-Mutanten mit steigender Proteinkonzentration zunehmend als Homodimere vorliegen [58,71]. Aufgrund der hohen lokalen Konzentration der ToxR\*-Konstrukte in der *E. coli*-Membran (vermutlich im mM Bereich [57]) könnte dies auch im Kompetitorsystem der Fall sein. Ebenfalls mit Hilfe analytischer Ultrazentrifugation wurde festgestellt, dass die Destabilisierung des GpA-Dimers durch Mehrfachmutation oft geringer ausfiel, als es aus der Summe der Effekte der Einzelmutanten zu erwarten war [71]. Deswegen muss eine Mehrfachmutante nicht zwangsläufig einen sehr viel stärkeren störenden Einfluss auf die TMD-TMD-Interaktion haben als die entsprechenden Einzelmutanten. Schließlich kann die Abnahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität z. T. auch durch unspezifische Konkurrenz verursacht worden sein. Der Vergleich aller in dieser Arbeit durchgeführten Messungen mit dem ToxR\*-System (mit GpA, Integrienen, LS36, LS49 und Mutanten) lässt schlussfolgern, dass das Ausmaß der unspezifischen Verringerung der Reporterenzymaktivität mit der Selbstaffinität der TMD im Wt-ToxR-Protein zusammenhängt. Je niedriger die Selbstaffinität ist, umso größer ist der Anteil unspezifischer Konkurrenz. Bei einer niederaffinen TMD kann dies dazu führen, dass kein Unterschied mehr zwischen putativ interagierenden und nicht interagierenden TMDn detektierbar ist. Eine sensitivere Analyse der sequenzspezifischen heterotypischen Interaktion von TMDn mit niedriger oder mittlerer Selbstaffinität scheint hingegen mit dem erst kürzlich publizierten dominant-negativen ToxRed-System möglich zu sein [152]. Bei dieser Variante des TOXCAT-Assays [113], welcher ein zum ToxR-Assay vergleichbares Funktionsprinzip aufweist, erfolgte die Inaktivierung der ToxR-Domäne durch die Mutation von Arg96 zu Lys. Überdies wird in diesem System als Reporter für TMD-TMD-Interaktion das rot fluoreszierende Protein „*mCherry*“ exprimiert. Damit ist

die Lyse der Zellen zur Quantifizierung der Reporterexpression nicht mehr erforderlich. Diese sowie einige weitere Unterschiede im Aufbau des ToxRed-Systems – wie die Kodierung beider ToxR-Proteine durch ein bicistronisches Plasmid, die Verwendung des IPTG induzierbaren *T7/lac*-Promotors und eine höhere Kopienzahl des Reportergens durch dessen Lokalisation auf einem Plasmid – könnten mögliche Gründe für die abweichende Sensitivität der beiden Kompetitorsysteme sein.

Bei Koexpression von Wt-ToxR- und ToxR\*-Konstrukten im hier verwendeten ToxR\*-Assay hängt die resultierende  $\beta$ -Gal-Aktivität von mehreren Faktoren ab, die im Folgenden näher aufgeschlüsselt werden sollen. Da in diesem System drei Assoziationsgleichgewichte miteinander gekoppelt sind, wird das letztendliche Ergebnis von i) dem Wt-ToxR-Homomergleichgewicht, ii) dem ToxR\*-Homomergleichgewicht und iii) dem Wt-ToxR/ToxR\*-Heteromergleichgewicht beeinflusst (Abb. 5.2). Diese Gleichgewichte werden wiederum durch die Konzentration der Proteine in der Membran (abhängig von Expressionslevel und Integrationseffizienz) und der Affinität der jeweiligen Oligomere beeinflusst. Nur wenn die Homomergleichgewichte (i und ii) bei der Kombination verschiedener Proteine konstant bleiben, lassen die  $\beta$ -Gal-Aktivitäten direkte Schlüsse auf ihre heterotypischen Affinitäten zu. Das Wt-ToxR-Homomergleichgewicht (i) bleibt bei allen zu vergleichenden TMD-Kombinationen unverändert, da jeweils dasselbe ToxR-TMD-Protein zum Einsatz kommt. Wird dieses stabil exprimiert, effizient in die Membran integriert und weist eine gewisse Selbstaffinität auf, sind diesbezüglich alle Voraussetzungen für den ToxR\*-Assay erfüllt. Das ToxR\*-Homomergleichgewicht (ii) kann jedoch durch Verwendung verschiedener ToxR\*-Proteine schwanken. Um Variationen der ToxR\*-Konzentration in der Membran auszuschließen, werden deren Expressionslevel und ihre effiziente Membranintegration kontrolliert. Nur ToxR\*-Proteine, die mit ähnlicher Konzentration in der Membran vorliegen, können hinsichtlich ihrer heterotypischen Interaktion mit dem Wt-ToxR-Konstrukt direkt miteinander verglichen werden. Aber nicht nur ihre Konzentration in der Membran ist bei dem Vergleich der resultierenden  $\beta$ -Gal-Aktivitäten zu berücksichtigen. Ihre Selbstaffinität darf



**Abb. 5.2: Gekoppelte Assoziationsgleichgewichte im dominant-negativen ToxR\*-Assay.**

Das Resultat im ToxR\*-Assay hängt von i) dem Wt-ToxR-Homomergleichgewicht, ii) dem ToxR\*-Homomergleichgewicht sowie iii) dem Wt-ToxR/ToxR\*-Heteromergleichgewicht ab. Da die Assoziationsgleichgewichte miteinander gekoppelt sind, beeinflussen diese sich gegenseitig (siehe Text).

ebenfalls nicht vernachlässigt werden. Die Selbstaffinität von ToxR\* bestimmt über den Anteil an freien ToxR\*-Monomeren, die für die Ausbildung von Heteromeren zur Verfügung stehen. Um damit verbundene Abweichungen der Monomerkonzentration verschiedener ToxR\*-Proteine bestmöglich auszugleichen, wurde deren Expression unabhängig von Wt-ToxR reguliert. Dies hatte zum Ziel, durch starke Überexpression von ToxR\* gegenüber Wt-ToxR in einen Sättigungsbereich zu gelangen, in dem sich die Fraktion verfügbarer ToxR\*-Monomere nicht mehr ändert. Dennoch sollte die ToxR\*-Selbstaffinität ebenso wie die anderen aufgeführten Faktoren bei der Interpretation der  $\beta$ -Gal-Aktivitäten berücksichtigt werden, um mögliche Artefakte erkennen zu können.

Zusammengefasst zeigt die Interaktionsanalyse von GpA, dass die Anwendung des ToxR\*-Kompetitorsystems unter Verwendung von ToxR\*(S87H) auch auf andere TMDn ausgeweitet werden kann. Da die Konkurrenz zwischen homotypischer und heterotypischer Interaktion nur verfolgt werden kann, wenn auch Wt-ToxR-Homomerisierung stattfindet, eignet sich das Kompetitorsystem vornehmlich zur Charakterisierung von TMDn, die eine ähnlich hohe Selbstaffinität aufweisen wie GpA.

### 5.1.2 Der positive 2-Plasmid gestützte ToxR-Assay

Ergänzend zu dem ToxR\*-System wurde ein positiver ToxR-Assay zur Untersuchung heterotypisch interagierender TMDn entwickelt, der nicht die Homomerisierung der Interaktionspartner voraussetzt. Dabei werden zwei transkriptionell aktive ToxR-Proteine mit unterschiedlichen TMDn eingesetzt und die  $\beta$ -Gal-Aktivitäten infolge ihrer separaten Expression mit der  $\beta$ -Gal-Aktivität nach ihrer Koexpression verglichen. Die getrennte Expression der potentiellen Interaktionspartner soll zunächst Aufschluss über ihre Selbstaffinität geben, um bei ihrer Koexpression abschätzen zu können, welcher Anteil der  $\beta$ -Gal-Aktivität durch homotypische oder durch heterotypische TMD-TMD-Interaktion ausgelöst wurde. Einen ähnlichen Ansatz verfolgte die Arbeitsgruppe um S. Behrens [153]. Allerdings vermittelten dort verschiedene lösliche „Coiled coil“-Domänen die Oligomerisierung des ToxR-Proteins, welche C-terminal an die periplasmatische MalE-Domäne fusioniert waren. Die hier vorliegende Arbeit hatte jedoch zum Ziel, die Interaktion membranständiger statt löslicher Domänen zu detektieren. Daher wurden zur Erprobung des Assays die TMDn des heterodimeren Integrins  $\alpha$ Iib/ $\beta$ 3 verwendet. Da die TMDn von  $\alpha$ Iib und  $\beta$ 3 nur mit einer niedrigen bis mittleren Affinität homomerisieren, kann ihre heterotypische Interaktion nicht mit dem ToxR\*-System erfasst werden. Dies gelang hingegen mit dem neuen positiven 2-Plasmid gestützten ToxR-Assay. Die mittlere  $\beta$ -Gal-Aktivität nach Koexpression von  $\alpha$ Iib und  $\beta$ 3 überstieg jene, die im Mittel durch ihre Selbstassoziation hervorgerufen wurde, und zeigte somit die Ausbildung von Heteromeren an. Die Spezifität der heterotypischen Interaktion konnte durch Mutation von Resten an der Helix-Helix-Kontaktfläche von  $\beta$ 3 bestätigt werden. Nach Koexpression von  $\alpha$ Iib und  $\beta$ 3-Mutanten trat kein Anstieg der  $\beta$ -Gal-Aktivität gegenüber ihrer getrennten Expression ein, d.h. die Mutanten unterstützen die Heteromerisierung von

$\alpha$ IIb und  $\beta$ 3 nicht in gleichem Maße wie die Wt-TMD. Es kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, wie stark die Mutationen die Heteromeraffinität schwächen, da die Ausbildung von Heteromeren nur dann zu einer erhöhten  $\beta$ -Gal Expression führt, wenn ihre Affinität höher ist als die der gleichzeitig entstehenden Homomere. Aus diesem Grund können Heteromere mit gleicher oder niedrigerer Affinität mit diesem System nicht nachgewiesen werden. Die  $\beta$ -Gal-Aktivitäten ließen sich daher am genauesten auswerten, wenn Interaktionspartner ohne homotypische Affinität vorlägen.

Ein noch offenes Problem bezüglich des hier genutzten positiven ToxR-Assays zur Untersuchung heterotypisch interagierender TMDn ist das unterschiedliche Expressionslevel der Interaktionspartner bei deren Koexpression ausgehend von zwei Plasmiden. Um *E. coli*-Zellen stabil mit zwei Vektoren transformieren zu können, müssen diese verschiedene Replikationsursprünge enthalten. Die damit verbundene unterschiedliche Kopienzahl der Plasmide pro Zelle beeinflusst wiederum das Expressionslevel der durch sie kodierten Proteine. Wird ein Protein von einem *low copy number* Plasmid exprimiert, liegt es in einer geringeren Konzentration in der Zelle vor als wenn es von einem *high copy number* Plasmid exprimiert werden würde. Da dies auch in dem 2-Plasmid gestützten positiven ToxR-Assay zum Tragen kommt, werden zur Ermittlung heterotypischer TMD-TMD-Interaktion die in vier verschiedenen FHK12-Kulturen vorherrschenden  $\beta$ -Gal-Aktivitäten betrachtet: i) die  $\beta$ -Gal-Aktivität in einer Kultur, die das ToxR-TMD1-Protein von beiden Plasmiden exprimiert, ii) die  $\beta$ -Gal-Aktivität in Zellen, die das ToxR-TMD2-Protein von beiden Plasmiden exprimieren, iii) die  $\beta$ -Gal-Aktivität in Zellen, die das ToxR-TMD1-Konstrukt von dem *low copy number* und gleichzeitig das ToxR-TMD2-Protein von dem *high copy number* Plasmid exprimieren sowie iv) die  $\beta$ -Gal-Aktivität einer Kultur, die das ToxR-TMD2-Protein von dem *low copy number* und das ToxR-TMD1 von dem *high copy number* Plasmid koexprimiert. Die  $\beta$ -Gal-Aktivitäten aus i) und ii) bzw. iii) und iv) werden gemittelt und sollen Rückschlüsse über die homotypische bzw. heterotypische Affinität der TMDn zulassen. Ein direkter Vergleich der mittleren  $\beta$ -Gal-Aktivitäten ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da die für die betreffende  $\beta$ -Gal-Aktivität verantwortliche Oligomerfraktion von der Konzentration der Monomere (ToxR-TMD1 und ToxR-TMD2) abhängt. In den Situationen iii) und iv) wirkt die Konzentration des vom *low copy number* Plasmid exprimierten Proteins limitierend für die Ausbildung von Heteromeren. Somit ist die Konzentration an Monomeren, die für die Heteromerassemblierung zur Verfügung stehen, niedriger als die Konzentration an Monomeren, die in den Situationen i) und ii) für die Homomerisierung bereit stehen. Dies kann in Fällen, in denen die Heteromeraffinität gegenüber der mittleren Homomeraffinität nur leicht erhöht ist, dazu führen, dass aufgrund der methodisch bedingten verringerten Heteromerkonzentration keine signifikante Zunahme der  $\beta$ -Gal zu verzeichnen ist. Folglich können mit der jetzigen Vorgehensweise nur Heteromere detektiert werden, deren Affinität deutlich höher ist als diejenige der Homomere. Eine gleich bleibende  $\beta$ -Gal-Aktivität könnte daher auch ein falsch negatives Ergebnis widerspiegeln. Dieses Problem könnte durch das Angleichen der Expressionslevel der Interaktionspartner, z.B. durch ihre Expression von einem bicistronischen

Plasmid, behoben werden. Wären diese ähnlich stark exprimiert, hingen die Assoziationsgleichgewichte lediglich von der jeweiligen Homomer- und Heteromeraffinität ab. Bei dem Vergleich verschiedener TMD-Kombinationen mit abweichenden Homomeraffinitäten ist dennoch zu beachten, dass nicht die absoluten  $\beta$ -Gal-Aktivitäten, sondern nur die Differenz bzw. das Verhältnis der  $\beta$ -Gal-Aktivitäten nach Koexpression (iii + iv) und nach separater Expression (i + ii) der Proteine gegenübergestellt werden können.

Ebenso wie im klassischen ToxR-Assay, welcher zur Untersuchung homotypischer TMD-TMD-Interaktion dient, spielt auch im 2-Plasmid gestützten ToxR-Assay die Ausrichtung der TMDn relativ zur ToxR-Domäne eine wichtige Rolle. Nur wenn die Helix-Helix-Kontaktfläche optimal zur ToxR-Domäne ausgerichtet ist, wird die Assoziation der TMDn in quantifizierbare  $\beta$ -Gal-Aktivität übersetzt. Um diese Orientierung ausfindig zu machen, kann die TMD durch schrittweises Einfügen oder Entfernen einzelner Aminosäuren an ihrem N-Terminus um je  $\sim 100^\circ$  gedreht werden. Da die Monomere eines Homooligomers identisch sind, erfährt jedes Monomer dabei die gleiche Drehung. Sobald die Domänen optimal zueinander angeordnet sind, wird die maximale  $\beta$ -Gal-Aktivität erreicht. Die Ausrichtung zweier heterotypisch interagierender TMDn ist jedoch nicht so leicht möglich wie bei einer homotypisch assoziierenden TMD, da dazu jede der beiden Helices separat rotiert werden muss. Dies kann in einer großen Anzahl zu testender Orientierungen resultieren. Die Kontaktflächen, die bei der homotypischen bzw. heterotypischen Interaktion einer TMD involviert sind, müssen nicht zwangsläufig identisch sein. Eine Helix kann über verschiedene Seiten mit einer identischen Helix oder mit einer anderen Helix in Kontakt treten. Je nach Zielsetzung muss eine TMD daher entweder für die Erfassung homotypischer oder für die Betrachtung heterotypischer Interaktion ausgerichtet werden. Weiterhin können Mutationen, welche die Rotation einer oder beider Partnerhelices bewirken, dazu führen, dass es trotz stattfindender Interaktion nicht zur Aktivierung der  $\beta$ -Gal-Expression kommt. Im dominant-negativen ToxR\*-System genügt es, die TMD des transkriptionell aktiven Wt-ToxR-Proteins optimal einzufügen. Die Orientierung der TMD im ToxR\*-Protein ist nicht so kritisch, da dieses inaktiv ist. Lediglich die Ganghöhe potentiell interagierender Reste sollte bei beiden Helices übereinstimmen.

Zusammengefasst können mit dem positiven 2-Plasmid gestützten ToxR-System Heteromere nachgewiesen werden, deren Affinität deutlich höher ist als diejenige der jeweiligen Homomeren. Bei Angleichung der Expressionslevel der Interaktionspartner wäre auch der Nachweis von Heteromeren mit nur leicht erhöhter Affinität denkbar.

## 5.2 Polare und ionisierbare Aminosäuren fördern die Interaktion von Transmembrandomänen

### 5.2.1 Histidin-vermittelte Interaktion von Transmembrandomänen

#### 5.2.1.1 Potentielle Mechanismen der Stabilisierung interagierender Transmembrandomänen durch Histidin

Die Auswertung der Aminosäurezusammensetzung hochaffiner TMDn aus der von Johanna C. Panitz hergestellten Plasmidbank JP1 [125], deutete darauf hin, dass Histidin die Interaktion von TMDn im Zusammenspiel mit hydroxylierten Aminosäuren und einem C-terminalen GxxxG-Motiv begünstigt. Diese Vermutung konnte durch die Mutationsanalyse exemplarischer, homotypisch interagierender TMDn sowie durch schrittweises Aufsetzen kritischer Reste auf eine Oligo-Leu-Sequenz bestätigt werden [125]. Daran anknüpfend lässt die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der heterotypischen Assoziation mutierter TMDn mit der jeweiligen parentalen TMD darauf schließen, dass der interaktionsfördernde Effekt von Histidin auf der Ausbildung potentieller Wasserstoffbrücken mit hydroxylierten Seitenketten der Partnerhelix beruht (Abschnitt 4.3.1). Die Affinität der Interaktion korreliert dabei vermutlich mit der Anzahl möglicher Wasserstoffbrücken zwischen den betreffenden Aminosäuren (Anhang A Abb. II). Vor allem die Wechselwirkung des Histidins an TMD-Position 6 mit einem polaren Rest an Position 5 scheint für die Interaktion eine zentrale Rolle zu spielen. Zu einem geringeren Ausmaß können auch polare Reste an den Positionen 2 und 8 die Stabilität der Oligomere fördern. Die Betrachtung aller Daten verdeutlicht, dass die kooperative, stabilisierende Wirkung von Histidin und Threonin bzw. Serin von der Präsenz eines C-terminalen GxxxG-Motivs abhängt. Durch den engen Kontakt der Helices könnte das GxxxG-Motiv eine optimale Ausrichtung der polaren Reste für die Entstehung von Wasserstoffbrücken ermöglichen.

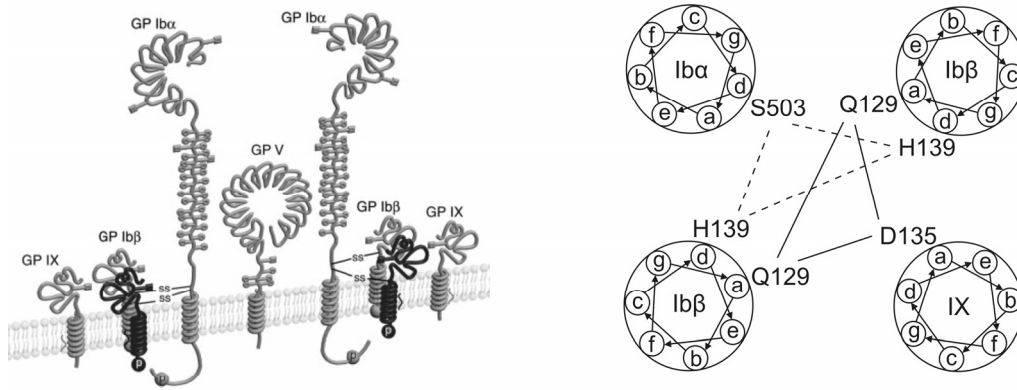
Aufgrund ihres heteroaromatischen Charakters ist die Histidin-Seitenkette in der Lage, sowohl mit aromatischen Resten zu interagieren als auch mit polaren Gruppen Wasserstoffbrücken einzugehen. Dies trifft gleichermaßen auf ihre Interaktion mit einer zweiten Histidin-Seitenkette wie auch auf die Assoziation mit anderen Aminosäuren zu. Die Imidazolringe zweier Histidine könnten in einer parallelen Anordnung überwiegend durch van-der-Waals-Wechselwirkungen in Kontakt treten. Bei einer senkrechten Ausrichtung der Ringe kämen vor allem elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den delokalisierten  $\pi$ -Elektronen und einer partiell positiv geladenen N-H- oder C-H-Gruppe zum Tragen (N-H... $\pi$  oder C-H... $\pi$  Interaktion) [154,155]. Weitere aromatische Aminosäuren, mit denen der kritische Histidin-Rest der selektierten TMDn direkt wechselwirken könnte, kommen jedoch nur selten vor. Die Anreicherung von Resten mit kleinen Seitenketten in der Nachbarschaft von Histidin spricht dafür, dass größere aromatische Seitenketten bei der vorliegenden Histidin-vermittelten TMD-TMD-Interaktion womöglich ein sterisches Hindernis darstellen. Wie eingangs erwähnt, ist Histidin außerdem dazu befähigt, sich an Wasserstoffbrücken zu beteiligen. Da

der Imidazolring nicht nur als Wasserstoff-Donor, sondern auch als Wasserstoff-Akzeptor dienen kann, ist ebenso eine Wasserstoffbrücke zwischen zwei Histidin-Seitenketten möglich. Mit den polaren Gruppen hydroxylierter Aminosäuren könnten vorzugsweise N-H $\cdots$ O oder C-H $\cdots$ O Brücken ausgebildet werden [155]. Neben den Seitenketten anderer Reste stünden weiterhin C $_{\alpha}$ -H-Atome sowie Amid- und Carbonylgruppen des Proteinerückgrats als potentielle Wasserstoffbrückenpartner zur Verfügung. In selektierten TMDn mit einem Glycin-Rest an den Positionen 2 und/oder 5 wäre daher die Stabilisierung der Oligomere durch eine Wasserstoffbrücke zwischen einem C $_{\alpha}$ -H-Atom von Glycin und dem Histidin-Imidazolring denkbar. Durch die vielfältigen Wechselwirkungsmöglichkeiten von Histidin mit anderen Gruppen könnte diese Seitenkette Ausgangspunkt für mehrere, gleichzeitig stattfindende Interaktionen sein, welche die Assoziation selektierter TMDn verstärken. Voraussetzung für das Zustandekommen entsprechender Wechselwirkungen scheint ein C-terminales GxxxG-Motiv zu sein, welches die dafür erforderliche optimale Anordnung der polaren Reste gewährleisten könnte.

### 5.2.1.2 Histidin in natürlichen Transmembrandomänen

Die Analyse gelöster Strukturen polytopischer Membranproteine hat ergeben, dass viele Reste an Helix-Helix-Kontaktflächen einen polaren Charakter aufweisen. Diese sind zudem stärker konserviert als den Lipiden zugewandte Aminosäuren, so auch Histidin, Threonin und Serin [98]. Ihre Beteiligung an mehr als 35 % aller vorgefundenen interhelikalen Wasserstoffbrücken [106] unterstreicht ihre stabilisierende Funktion bei der Faltung von Membranproteinen. Die paarweise Interaktion von Histidin mit einem weiteren Histidin, einem Glycin oder Threonin tritt dabei zwei bis vier Mal häufiger auf als durch Zufall zu erwarten wäre [156].

Die Wechselwirkung von Histidin mit anderen polaren Aminosäuren bzw. mit einer zweiten Histidin-Seitenkette ist auch bei der TMD-TMD-Interaktion bitopischer Membranproteine von Bedeutung. Beispielsweise sind TMD-ständige Histidine für die Assemblierung und folglich für die Expression des intakten Glykoprotein (GP) Ib-IX-V-Komplexes auf der Zelloberfläche von Blutplättchen essentiell. Dieser multimere Komplex besteht aus den vier bitopischen Membranproteinen GP Ib $_{\alpha}$ , GP Ib $_{\beta}$ , GP IX sowie GP V (Abb. 5.3 links) und dient als Rezeptor für Proteine, welche bei der Blutbildung und -gerinnung eine Rolle spielen. Während die Untereinheit GP V nur lose mit den anderen Untereinheiten assoziiert, interagieren GP Ib $_{\alpha}$ , GP Ib $_{\beta}$  und GP IX unter Einbeziehung ihrer TMDn relativ stark miteinander und bilden auf diese Weise den so genannten GP Ib-IX-Subkomplex. Dieser besteht aus einer GP Ib $_{\alpha}$ , zwei GP Ib $_{\beta}$  sowie einer GP IX Untereinheit (Abb. 5.3 rechts). Die TMD von GP Ib $_{\beta}$  scheint bei der Ausbildung des GP Ib-IX-Komplexes eine zentrale Funktion einzunehmen. Zum einen trägt der Histidin-Rest in der TMD von GP Ib $_{\beta}$  vermutlich zu dessen homotypischer Assoziation bei (über His-His-Wechselwirkung) und zum anderen interagieren die Histidine des



**Abb. 5.3: Schematische Darstellung des Glykoprotein Ib-IX-V-Komplexes und putativ interagierender TMDn.**

**Links:** Zusammensetzung des GP Ib-IX-V-Komplexes mit der entsprechenden Stöchiometrie. **Rechts:** Helix-Rad-Repräsentation des Modells interagierender TMDn des GP Ib-IX-Subkomplexes, von der N-terminalen Seite betrachtet. Die TMDn bilden vermutlich ein Bündel linkshändig gekreuzter Helices. Potentiell interagierende Reste sind durch Linien verbunden. Die Abb. wurde aus [158,160] entnommen und verändert.

GP Ib $\beta$ -Dimers heterotypisch mit einem Serin der GP Ib $\alpha$ -TMD. Die Interaktion der GP Ib $\alpha$ - und GP Ib $\beta$ -TMDn ermöglicht den engen Kontakt der Untereinheiten, der für die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen ihren extrazellulären Domänen erforderlich ist. Weitere, ebenfalls polare Aminosäuren stellen den Kontakt von GP Ib $\beta$  zu der TMD von GP IX her. Wird die Interaktion der vier TMDn z.B. durch Mutation des Histidins gestört, kommt es zur intrazellulären Akkumulation bzw. zum Abbau der Untereinheiten. Folge der daraus resultierenden Rezeptor-Defizienz sind schwerwiegende Blutgerinnungsstörungen ([157-159] und Literaturangaben darin).

Auch das proapoptotische Protein BNIP3 (*Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3*) enthält ein Histidin in seiner TMD. Zusammen mit anderen Proteinen der Bcl-2-Familie reguliert es den durch Sauerstoffmangel induzierten Zelltod (u. a. beschrieben in [161,162]). Bei der Unterversorgung von Zellen mit Sauerstoff kommt es zur verstärkten Expression von BNIP3 und zu seiner Integration in die äußere Mitochondrienmembran – vermutlich begünstigt durch die einhergehende Ansäuerung des Zellinneren. BNIP3 bildet sowohl in der Membran als auch in Detergenz stabile Dimere aus. Die Deletion der TMD sowie umfangreiche Mutationsanalysen verdeutlichen, dass die TMD maßgeblich für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich ist [163-165]. Ferner konnte durch die kernresonanzspektroskopische Strukturanalyse interagierender TMD-Peptide gezeigt werden, dass die Helices des Dimers parallel und unter einem negativen Kreuzungswinkel angeordnet sind [166,167]. Ihre hochaffine Assoziation wird dabei vor allem durch das Aminosäuremotiv  $S^{172}HxxAxxxGxxxG^{184}$  vermittelt. Ähnlich wie bei GpA [62] ermöglichen auch hier die kleinen Reste der C-terminalen TMD-Hälfte den engen Kontakt der Rückgrate und könnten so die Ausbildung interhelikaler  $C_{\alpha}-H\cdots O=C$  Wasserstoffbrücken erlauben [167]. In der N-terminalen Hälfte wird das Dimer wahrscheinlich durch interhelikale Wasserstoffbrücken zwischen der Serin- und Histidin-Seitenkette stabilisiert. Günstige



geometrische Voraussetzungen für die Entstehung dieser Wasserstoffbrücken werden vermutlich durch die AxxxGxxxG-vermittelte Ausrichtung der Helices geschaffen. Wird ein Teil des Motivs zerstört, ist der verbleibende Teil nicht in der Lage, die TMD-TMD-Interaktion aufrechtzuerhalten. Da das Motiv der von Johanna C. Panitz isolierten hochaffinen, Histidin-haltigen TMDn [125] dem Motiv von BNIP3 sehr nahe kommt, ist ein ähnlicher Assoziationsmechanismus zu vermuten. Darauf deutet auch die Mutationsanalyse ihrer homotypischen und heterotypischen Interaktion hin. Die Bedeutung der Dimerisierung von BNIP3 für seine Funktion ist aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse noch unklar. Beispielsweise hat die disruptive Mutante H173A keinen signifikanten Einfluss auf die proapoptotische Aktivität von BNIP3 [168]. Bei dem homologen Protein BNIP3L, dessen TMD annähernd identisch zu der von BNIP3 ist, führt diese Mutation hingegen zum Erliegen seiner Zelltod-induzierenden Wirkung [169].

Neben der Stabilisierung interagierender TMDn kann Histidin auch zur Regulation der Aktivität von Membranproteinen beitragen. Dies wird z.B. bei den viralen Protonenkanälen M2 und BM2 von Influenza A und Influenza B angenommen [170,171]. Die TMD der etwa 100 Aminosäuren langen Proteine assoziiert jeweils unter einem positiven Kreuzungswinkel zu einem Homotetramer [172-174]. Die Histidin-Seitenketten der vier Monomere kommen dabei im Inneren der Kanäle zu liegen. Je nach Protonierungszustand des Imidazolrings sind die Kanäle in Abhängigkeit des pH-Werts geöffnet oder geschlossen. Ein zweiter Histidin-Rest in der TMD des BM2-Proteins, der vermutlich in der Lipidkopfguppenregion der Membran lokalisiert ist, scheint die Aktivität des BM2-Kanals weiterhin zu modulieren und könnte ursächlich für die erhöhte Protonenkonduktivität des BM2-Kanals gegenüber des M2-Kanals sein.

Eine Reihe von Studien zur Assoziation von TMDn legt nahe, dass dabei Wasserstoffbrücken zwischen polaren Aminosäureseitenketten eine treibende Kraft darstellen (siehe Abschnitt 1.4.4). Allerdings war in einigen Fällen nur eine moderate stabilisierende Wirkung solcher nichtkovalenten Bindungen zu beobachten [175]. Diese Ergebnisse spiegeln wider, dass die Stärke einer Wasserstoffbrücke durch ihre direkte Umgebung geprägt wird. Beispielsweise ist eine optimale Geometrie der wechselwirkenden Atome nicht immer gewährleistet. Weiterhin kann die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke aufgrund der Einschränkung von Freiheitsgraden der Interaktionspartner mit entropischen Kosten verbunden sein. Polare Gruppen in unmittelbarer Nachbarschaft der beteiligten Seitenketten können außerdem die lokale Dielektrizität erhöhen und somit die Energie der Wechselwirkung beeinflussen [175]. Dies verdeutlicht, dass der energetische Beitrag von Wasserstoffbrücken zwischen polaren Resten bei der Faltung von Membranproteinen erheblich variieren kann.

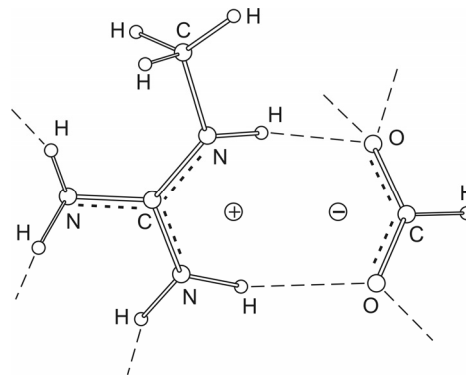
## **5.2.2 Interaktion von Transmembrandomänen durch Wechselwirkung gegensätzlich ionisierbarer Aminosäuren**

### **5.2.2.1 Potentielle Mechanismen der Stabilisierung interagierender Transmembrandomänen durch gegensätzlich ionisierbare Aminosäuren**

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass gegensätzlich ionisierbare Aminosäuren sowohl die homotypische als auch die heterotypische Interaktion von TMDn unterstützen können. Dies deutete sich bereits bei der Betrachtung der Aminosäuresequenzen selektierter hochaffiner TMDn an, welche mehrere Aminosäuren dieses Typs enthalten. Dabei fiel besonders die alternierende Anordnung potentiell gegensätzlich geladener Reste in der N-terminalen TMD-Hälfte auf [125]. Die Rekonstruktion putativer Sequenzmotive zeigte schließlich, dass schon einzelne ionisierbare Aminosäuren, vermutlich durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken, einen interaktionsfördernden Einfluss ausüben. Dies steht im Einklang mit anderen Studien, welche sich ebenfalls mit der Interaktion von Modell-TMDn befassen [102,103,105,176]. In Gegenwart eines C-terminalen (Tandem-) GxxxG-Motivs verstärkt ein Paar gegensätzlich ionisierbarer Reste den stabilisierenden Effekt nochmals. Interessanterweise tritt dies nur bei der Kombination potentiell gegensätzlich geladener Seitenketten auf. Mutanten, welche zwei Aminosäuren mit gleicher potentieller Ladung enthalten, weisen eine niedrigere Affinität auf. Die Analyse der heterotypischen Interaktion einer TMD mit einem positiv ionisierbaren und einer TMD mit einem negativ ionisierbaren Rest bestätigt, dass die festgestellte Zunahme der TMD-TMD-Affinität auf der Wechselwirkung der gegensätzlich ionisierbaren Seitenketten beruht (Abschnitt 4.3.2.1). Weitere polare (nichtionisierbare) Aminosäuren können die Stabilität dieser Interaktion zusätzlich fördern. Die Interaktion gegensätzlich ionisierbarer Reste sowie ihre Kooperation mit anderen polaren Aminosäuren sind jedoch von der Präsenz eines C-terminalen (Tandem-) GxxxG-Motivs abhängig. In Abwesenheit des GxxxG-Motivs vermitteln einzelne und paarweise auftretende ionisierbare Reste gleichermaßen eine jedoch weniger effiziente Assoziation der TMDn.

Bei Aspartat, Glutamat, Lysin und Arginin handelt es sich um Aminosäuren, deren Seitenketten bei physiologischem pH-Wert in wässriger Lösung geladen vorliegen. Wäre dies auch in der Membran der Fall, könnten einander gegenüberliegende gegensätzlich ionisierte Reste aufgrund ihrer starken Anziehungskraft und der niedrigen Dielektrizität der Umgebung (Abschnitt 1.4.1) die hochaffine Interaktion von TMDn vermitteln. Da die Ladung der Seitenketten über mehrere Sauerstoff- (D, E) bzw. Wasserstoffatome (K, R) verteilt ist, können bei ihrer Interaktion nicht nur ionische Wechselwirkungen, sondern auch Wasserstoffbrücken auftreten (Abb. 5.4) [42]. Voraussetzung dafür ist der enge Kontakt ionisierter Reste. Der Ladungszustand dieser Aminosäuren hängt neben dem pH-Wert jedoch auch von der Polarität ihrer unmittelbaren Umgebung ab [42]. So kann der seitenketten-spezifische  $pK_a$ -Wert (entspricht dem pH-Wert, bei dem 50 % der Seitenketten geladen sind) membranständiger Reste z. T. stark von dem in wässriger Lösung befindlicher Reste abweichen [177-

182]. Diese Beobachtung lässt wiederum vermuten, dass Aspartat, Glutamat, Lysin und Arginin in der Membran bei neutralem pH-Wert eher ungeladen sind. Doch auch in neutraler Form könnten diese Aminosäuren durch Ausbildung mehrerer Wasserstoffbrücken zur Assoziation von TMDn beitragen. Da der  $pK_a$ -Wert auch mit unterschiedlicher Lokalisation der Reste in der Membran schwankt [177,179,180], kann keine generelle Aussage über den Ionisierungszustand der Aminosäuren in diesem komplexen Milieu gemacht werden.



**Abb. 5.4: Wechselwirkung einer ionisierten Guanidinium- und Carboxylgruppe.**

Stellvertretend für eine Arg-Seitenkette ist eine Guanidiniumgruppen (links) und für eine Asp-/Glu-Seitenkette eine Carboxylgruppe (rechts) dargestellt. Bei geringem Abstand interagierender Atome kann es neben ionischen Wechselwirkungen auch zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken kommen, welche durch dünne, unterbrochene Linien dargestellt sind. Partielle Doppelbindungen sind durch dickere, unterbrochene Linien wiedergegeben. Die Abb. wurde aus [42] entnommen und modifiziert.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die hochaffine Assoziation der untersuchten TMDn auf ionischen Wechselwirkungen zwischen gegensätzlich geladenen Aminosäuren beruht. Grund für diese Annahme ist die Beobachtung, dass die TMD-TMD-Interaktion stärker durch Mutation ionisierbarer Reste zu neutralen Resten oder zu Resten mit potentiell entgegengesetzter Ladung geschwächt wird als durch Mutation zu Resten, bei denen die Art der Ladung erhalten bleibt. Berechnungen auf Basis experimenteller Daten zeigen, dass die Tendenz zweier gegensätzlich ionisierbarer, interagierender Seitenketten in der Membran geladen vorzuliegen, d.h. eine Salzbrücke einzugehen, umso größer ist, je geringer ihr Abstand ist [183]. Die Abhängigkeit der effizienten Interaktion der TMDn mit entgegengesetzt ionisierbaren Aminosäuren von der Anwesenheit eines C-terminalen (Tandem-) GxxxG-Motivs könnte ein weiterer Hinweis auf die Entstehung einer Salzbrücke sein. Durch den GxxxG-vermittelten engen Kontakt der Helices am C-Terminus könnten die Seitenketten mit einem geringen Abstand optimal zueinander ausgerichtet und so ihre ionische Wechselwirkung begünstigt werden. Dass die optimale Anordnung der Interaktionspartner ihre ionische Wechselwirkung zu fördern scheint, wird nochmals durch den disruptiven Effekt von Mutationen bestärkt, welche (bei gleicher potentieller Ladung) die Seitenkettengeometrie verändern

oder die Position unterschiedlich ionisierbarer Reste invertieren. Ferner können Ionenpaare durch Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrücken zu anderen polaren Gruppen in ihrer Nachbarschaft stabilisiert werden [183,184]. Dies könnte auch auf die Assoziation GxxxG-haltiger TMDn mit unterschiedlich ionisierbaren Aminosäuren zutreffen, da sich ihre Affinität in Gegenwart von Cystein- und Tyrosin- oder Serin- und Histidin-Resten abermals erhöht. Die unzureichende Ausrichtung ionisierbarer Seitenketten sowie das Fehlen stabilisierender polarer Reste könnten mögliche Gründe für das Ausbleiben intensiver TMD-TMD-Interaktionen in einer vorangegangenen Studie sein [185]. Dort führte das Einfügen eines potentiell positiv und eines potentiell negativ geladenen Rests in ein Paar hydrophober Oligo-Leu-Peptide nicht zu ihrer vermehrten Assoziation in Liposomen. Gleiches war auch in der hier vorliegenden Arbeit bei der Rekonstruktion von Interaktionsmotiven zu beobachten (Abschnitt 4.3.2.2). Wie bereits erwähnt, kam es erst in Anwesenheit eines C-terminalen (Tandem-) GxxxG-Motivs zur Erhöhung der TMD-TMD-Affinität, welche durch polare Aminosäuren zusätzlich verstärkt wurde.

Zusammengefasst lassen die hier ermittelten Daten den Schluss zu, dass gegensätzlich ionisierbare Aminosäuren bei geeigneter Positionierung durch ionische Wechselwirkungen und/oder Ausbildung von Wasserstoffbrücken die hochaffine Assoziation von TMDn vermitteln können.

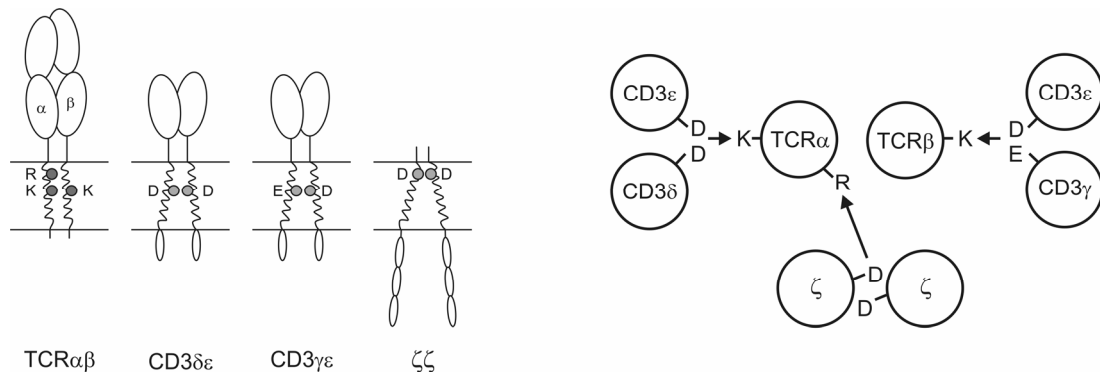
### 5.2.2.2 Ionisierbare Aminosäuren in natürlichen Transmembrandomänen

Gegensätzlich ionisierbare Aminosäuren können unter gegebenen geometrischen Voraussetzungen maßgeblich zu der homotypischen und heterotypischen Assoziation analysierter Modell-TMDn beitragen. Doch in welchem Umfang spielen Wechselwirkungen zwischen potentiell gegensätzlich geladenen Seitenketten eine Rolle bei der Interaktion natürlicher TMDn? Die Analyse der von Angelika Fuchs (Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik, TU München) erstellten nichtredundanten Datenbank mit 25.558 TMDn bitopischer Membranproteine ergab, dass einzelne ionisierbare Aminosäuren in verschiedenen Abständen zu einem GxxxG durchaus häufiger auftreten, als durch Zufall zu erwarten wäre (Abschnitt 4.3.2.3). Insgesamt 51 der 88 betrachteten Motive vom Schema [D/E/K/R]-x<sub>n</sub>-GxxxG und GxxxG-x<sub>n</sub>-[D/E/K/R] ( $0 \leq n \leq 10$ ) sind in der Datenbank überrepräsentiert, elf davon mit statistischer Signifikanz. Durch die Interaktionsanalyse von Oligo-Leu-Sequenzen mit aufgesetzten, signifikant überrepräsentierten Motiven konnte ein Motiv-Paar identifiziert werden, welches die hochaffine heterotypische Interaktion der TMDn induziert. Es ist davon auszugehen, dass noch mehr interaktionsfördernde Motive existieren, da i) nur signifikant überrepräsentierte Motive in die Interaktionsanalyse einbezogen wurden, ii) durch (i) sowie durch den vereinfachten Aufbau der Motive die optimalen Voraussetzungen für eine hochaffine Interaktion (Seitenkettengeometrie, Tandem-GxxxG, stabilisierende polare Reste) möglicherweise eingeschränkt wurden und iii) einige Konstrukte nur schwach exprimiert wurden, so dass in diesen Fällen keine eindeutige Aussage

hinsichtlich ihrer Interaktion möglich war. Weiterhin kann die Überrepräsentation von Motiven, bestehend aus einer ionisierbaren Aminosäure und einem GxxxG, neben der Vermittlung von TMD-TMD-Interaktion durch Ionenpaare noch andere Ursachen haben. So ist bekannt, dass ionisierbare Aminosäuren auch durch Wechselwirkung mit aromatischen [105] oder polaren (nichtionisierbaren) Aminosäureseitenketten bzw. mit den polaren Gruppen des Polypeptidrückgrats zur Assoziation von TMDn beitragen können [103,106,158,186]. Darüber hinaus sind vor allem positiv ionisierbare Reste an den Termini von TMDn ausschlaggebend für deren Orientierung in der Membran (Abschnitt 1.3). Die topogene Wirkung potentiell positiv geladener Seitenketten kann durch die Ausbildung von Salzbrücken abgeschwächt werden [187]. Somit können negativ ionisierbare Aminosäuren die Topologie von TMDn indirekt beeinflussen. Ionisierbare Aminosäuren können aber auch an der Regulation der Aktivität von Rezeptoren beteiligt sein. Beispielsweise befindet sich am N-Terminus der TMD-TMD-Kontaktfläche der dimeren Rezeptortyrosinkinase EphA1 das Sequenzmotiv E<sup>547</sup>xxAxxxGxxxG<sup>558</sup> [65]. Die kleinen Reste ermöglichen dabei die enge Packung der Helices. Der an der Grenzfläche zu den Lipidkopfgruppen befindliche Glutamat-Rest scheint hingegen nicht unmittelbar an der homotypischen Interaktion der TMDn mitzuwirken. Vielmehr beeinflusst er in Abhängigkeit des pH-Werts durch Ausbildung verschiedener intrahelikaler Wasserstoffbrücken die Konformation und/oder die Stabilität des TMD-Dimers und damit möglicherweise die Aktivität des Rezeptors [65]. Schließlich können die untersuchten Motive durch Wasserstoffbrücken zwischen gleichen Seitenketten auch für die mittellaffine homotypische Interaktion von TMDn von Bedeutung sein [188] (siehe auch Anhang A Abb. III).

Wechselwirkungen zwischen gegensätzlich ionisierbaren Aminosäuren scheinen beispielsweise bei der Assemblierung von *Major Histocompatibility Complex Class II*-Molekülen (MHC II) eine Rolle zu spielen. Der heterodimere Glykoprotein-Komplex, bestehend aus einer bitopischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit, wird vornehmlich in Zellen des Immunsystems (z.B. in Makrophagen und B-Lymphozyten) exprimiert. Nach Bindung von Antigen-Peptiden werden diese durch den MHC II anderen Zellen des Immunsystems (T-Lymphozyten) präsentiert und so eine spezifische Immunantwort vorbereitet. Die TMDn der Untereinheiten enthalten auf einer Helixseite je eine konservierte ionisierbare Aminosäure (E bzw. K) am N-Terminus sowie mehrere konservierte Glycin-Reste, welche ein oder mehrere GxxxG-Motive bilden. Die Mutation dieser Reste führt zu einer verminderten heterotypischen Interaktion der TMDn und infolge dessen zur Retention der Proteine im Endoplasmatischen Retikulum. Folglich ist die effiziente TMD-TMD-Interaktion der Untereinheiten, vermittelt durch gegensätzlich ionisierbare Aminosäuren und mehrere Glycine, kritisch für die Expression des Komplexes auf der Zelloberfläche und somit für seine Funktion ([189] und Literaturangaben darin).

Auch bei anderen Rezeptoren des Immunsystems beruht die Assoziation ihrer TMDn auf der Wechselwirkung potentiell gegensätzlich geladener Aminosäuren. Ein intensiv untersuchtes Beispiel ist der T-



**Abb. 5.5: Organisation des T-Zell-Rezeptor-Komplexes vermittelt durch Wechselwirkung ionisierbarer Reste ihrer Transmembrandomänen.**

**Links:** Schematische Darstellung der Module des T-Zell-Rezeptor (TCR)-Komplexes. Die TMDn des TCR $\alpha\beta$ -Heterodimers enthalten zusammen drei positiv ionisierbare und die TMDn der CD3 $\delta\epsilon$ -, CD3 $\gamma\epsilon$ -,  $\zeta\zeta$ -Dimere je ein Paar negativ ionisierbare Aminosäuren. Die Lys-Reste von TCR $\alpha\beta$  sowie die Asp/Glu-Reste von CD3 $\delta\epsilon$  und CD3 $\gamma\epsilon$  sind etwa in der Mitte der Membran lokalisiert. Der Arg-Rest von TCR $\alpha$  und die Asp-Reste von  $\zeta\zeta$  befinden sich im N-terminalen Bereich der jeweiligen TMD. **Rechts:** Die Assoziation der CD3 $\gamma\epsilon$ -, CD3 $\delta\epsilon$ -,  $\zeta\zeta$ -Dimere mit TCR $\alpha\beta$  beruht auf der Interaktion zweier negativ ionisierbarer Reste mit einem bestimmten positiv ionisierbaren Rest von TCR $\alpha\beta$ . Die TMDn sind durch Kreise dargestellt. Die Abb. wurden aus [190,191] entnommen und modifiziert.

Zell-Rezeptor (TCR)-Komplex, welcher die von dem *Major Histocompatibility Complex* präsentierte Antigen-Peptide erkennt und daraufhin die Funktion der T-Lymphozyten maßgeblich beeinflusst. Der TCR-Komplex besteht aus sechs verschiedenen bitopischen Membranproteinen (TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ ,  $\zeta$ -Kette), die vier Module bilden: die heterodimere ligandenbindende Einheit TCR $\alpha\beta$  sowie die drei dimeren signalweiterleitenden Einheiten CD3 $\gamma\epsilon$ , CD3 $\delta\epsilon$  und  $\zeta\zeta$  (Abb. 5.5). Ihre Assemblierung beruht auf der Wechselwirkung von jeweils zwei transmembranen, negativ ionisierbaren Resten der signalweiterleitenden Einheiten mit je einem ganz bestimmten positiv ionisierbaren Rest des TCR $\alpha\beta$ -TMD-Heterodimers (Abb. 5.5). Die präzise geometrische Ausrichtung der ionisierbaren Seitenketten scheint dabei essentiell für die Vermittlung der TMD-TMD-Interaktion zu sein, denn bereits die Mutation zu Resten mit gleicher potentieller Ladung hat eine disruptive Wirkung. Ebenso stört eine veränderte Aufteilung dieser Aminosäuren auf die beteiligten TMDn die Assemblierung funktioneller Komplexe, auch bei Beibehaltung des involvierten positiv ionisierbaren Rests und der beiden negativ ionisierbaren Reste [190-192].

Es wird angenommen, dass die Hydrophobizität eines Segments das primäre Kriterium für seine Integration in die Membran ist. Daher stellt sich die Frage, wie Helices mit ionisierbaren Aminosäuren trotz ihrer z. T. geringen Hydrophobizität in die Membran eingebracht werden können. Experimentelle Daten zeigen, dass dies möglich ist, solange der dafür notwendige energetische Aufwand durch die Insertion einer ausreichend großen Anzahl hydrophober Seitenketten ausgeglichen wird [27]. Die

Verwendung von hydrophoben Leucin-Resten an den nicht randomisierten Positionen der analysierten Modell-TMDn scheint auch deren Membranintegration gefördert zu haben. In einer ähnlich konzipierten Plasmidbank, welche jedoch auf einem Alanin-Grundgerüst basiert, konnten nur wenige TMDn mit einzelnen ionisierbaren Resten selektiert werden [118]. Integrationsstudien polytopischer Membranproteine deuten außerdem darauf hin, dass ihre TMDn bereits während des Insertionsprozesses im Translokon miteinander interagieren können [193,194]. Auf diese Weise könnte die effektive Hydrophobizität ionisierbarer Reste durch Ausbildung von Wasserstoff- und/oder Salzbrücken erhöht und ihre Membranintegration begünstigt werden [194-196]. So ist beispielsweise auch die Integration der S4-Helix spannungsgesteuerter Kaliumkanäle möglich, in welcher vier oder sogar noch mehr positiv ionisierbare Reste lokalisiert sind [197]. Die hier untersuchten Modell-TMDn mit Paaren gegensätzlich ionisierbarer Aminosäuren zeigen jedoch keine verbesserte Effizienz der Membranintegration gegenüber Mutanten, welche nur eine potentiell geladene Seitenkette aufweisen. Dies lässt vermuten, dass zwischen den betreffenden Seitenketten einer TMD keine neutralisierenden, intrahelikalen Wechselwirkungen stattfinden. Solche Wechselwirkungen stünden auch im Widerspruch zu der hohen Affinität der TMDn, da diese mit intermonomeren Wechselwirkungen konkurrieren könnten. Weiterhin weist die verminderte Integrationseffizienz darauf hin, dass die TMDn das Translokon verlassen, bevor eine zweite TMD in dieses eintritt. Computersimulationen geben Grund zur Annahme, dass andere in der Nachbarschaft befindliche (unbeteiligte) TMDn einen ionisierten Rest in der Membran stabilisieren können [198]. So könnten die Kosten für seine Membraneinbettung z.B. durch transiente Wechselwirkungen mit dem Translokon reduziert werden bis ein anderer Interaktionspartner zur Verfügung steht. Ein solches Szenario wird beispielsweise bei der Integration der Komponenten des T-Zell-Rezeptor-Komplexes vermutet [192].

### **5.2.3 Zusammenspiel molekularer Kräfte bei der Interaktion von Transmembrandomänen**

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten sowie die Analyse der homotypischen Assoziation Histidin-haltiger TMDn [125] zeigen, dass TMD-TMD-Interaktion vermittelt durch potentielle Ionenpaare oder Wasserstoffbrücken eine höhere  $\beta$ -Gal-Aktivität auslösen kann als vornehmlich auf van-der-Waals-Wechselwirkungen beruhende TMD-TMD-Interaktion (siehe AZ2 in Abschnitt 4.3.2.1 und [125]). Die Interaktion untersuchter TMDn mit ionisierbaren Resten bzw. mit Histidin und hydroxylierten Aminosäuren resultierte in einer vergleichbaren  $\beta$ -Gal-Aktivität. Unter Berücksichtigung der geringeren Konzentration von TMDn mit ionisierbaren Resten in der Membran kann jedoch vermutet werden, dass Wechselwirkungen zwischen gegensätzlich ionisierbaren Seitenketten unter bestimmten Voraussetzungen (Sequenzkontext: siehe unten) TMDn eine höhere Affinität verleihen als Wasserstoffbrücken zwischen polaren Aminosäuren. Angesichts dessen verwundert es nicht, dass Mutationen in TMDn natürlicher Membranproteine, die ionisierbare, aber auch polare Reste betreffen, häufiger

einen pathogenen Phänotyp zur Folge haben als Mutationen, an denen hydrophobe Aminosäuren beteiligt sind [199]. Doch polare und ionisierbare Reste führen nicht generell zur erhöhten Stabilität von Oligomeren oder gar zur unspezifischen Interaktion von TMDn [176,185]. Beispielsweise hängt die Aktivierung der Tyrosinkinase *neu* durch die vermeintlich interaktionsfördernde TMD-Mutation V664E von den Aminosäuren in dessen unmittelbarer Nachbarschaft ab [200,201]. Die rezeptoraktivierende Wirkung der Mutation kann durch Substitution benachbarter Reste wieder aufgehoben werden. Dies sowie die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des Sequenzkontextes für die Interaktion von TMDn mittels polarer und ionisierbarer Reste (siehe auch [176]). Zur Ausbildung einer starken Wasserstoff- oder Salzbrücke scheinen der enge Kontakt sowie die präzise Ausrichtung der involvierten Seitenketten – und im Fall potentieller Ionenpaare weiterhin ihre Stabilisierung durch benachbarte polare Reste – erforderlich zu sein [42,183]. Der Sequenzkontext, in dem sich diese Aminosäuren befinden, kann durch komplementäre Oberflächen der Helices (z.B. durch GxxxG) die notwendige enge Packung ermöglichen und sich gegenseitig stabilisierende Aminosäuren zusammen führen. Gleichmaßen können sterisch ungünstig platzierte Seitenketten die optimale Anordnung der Interaktionspartner unterbinden. Auf diese Weise reguliert der Sequenzkontext nicht nur das Ausmaß von van-der-Waals-Wechselwirkungen, sondern auch die starke elektrostatische Interaktion polarer und/oder ionisierbarer Gruppen [202]. Die molekularen Kräfte können daher bei der Assoziation von TMDn nicht getrennt voneinander betrachtet werden. Vielmehr wirken diese zusammen und verleihen dadurch Stabilität und Spezifität. Dies scheint ebenso für die heterotypische Assoziation von TMDn zu gelten [90].

### 5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung polarer und ionisierbarer Aminosäuren für die Interaktion von TMDn beleuchtet. Um dabei die Wechselwirkung verschiedener Helixreste in *trans* detektieren zu können, wurden zwei sich ergänzende Varianten des ToxR-Systems etabliert, mit denen die heterotypische Interaktion von TMDn betrachtet werden kann: Der dominant-negative ToxR\*-Assay nutzt die Konkurrenz zwischen der homotypischen und heterotypischen Assoziation koexprimierter Interaktionspartner. Je affiner die gebildeten, transkriptionell inaktiven Heteromere sind, umso geringer ist das messbare Signal, das von verbleibenden, transkriptionell aktiven Homomeren ausgelöst wird. Der positive ToxR-Assay zur Analyse heterotypischer TMD-TMD-Interaktion ist vor allem für TMDn mit geringer Selbstaffinität geeignet. Übersteigt die Heteromeraffinität jene der evtl. entstehenden Homomere, äußert sich dies bei Koexpression der Interaktionspartner in einer Zunahme der Reporterenzymaktivität. Durch Angleichung der Expressionslevel koexprimierter Proteine (z.B. durch Konstruktion eines bicistronischen Plasmids) ließe sich dieser Assay weiterhin optimieren. Dies



könnte die Sensitivität des Systems zur Detektion kleinerer Affinitätsunterschiede zwischen Homo- und Heteromeren verbessern.

Zusammen mit dem klassischen ToxR-System zur Untersuchung homotypischer TMD-TMD-Interaktion erlaubten die beiden neuen bzw. weiterentwickelten Systeme die Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen i) Histidin und kleinen, polaren Aminosäuren sowie ii) zwischen gegensätzlich ionisierbaren Resten bei der Assoziation von Modell-TMDn. Die dabei gewonnenen Ergebnisse unterstreichen, dass polare und ionisierbare Aminosäuren in TMDn nicht nur mit der identischen Seitenkette der Partnerhelix interagieren, sondern auch mit anderen Resten wechselwirken können [106,203]. Dies schließt die Interaktion zwischen polaren Gruppen (an Aminosäureseitenketten oder dem Polypeptidrückgrat), zwischen polaren und ionisierbaren sowie zwischen zwei potentiell gegensätzlich geladenen Resten ein. Die für die Interaktion zentralen Reste (Histidin, ionisierbare Aminosäuren) können dabei gleichzeitig mit mehreren anderen Aminosäuren in Kontakt treten. Das gilt vor allem für ionisierbare Aminosäuren. Ferner lassen die ermittelten Daten den Schluss zu, dass die betrachteten Seitenketten die Stabilität der TMD-Oligomere nur bei präziser Ausrichtung erhöhen, da die hochaffine Interaktion der TMDn nur in Gegenwart eines (Tandem-) GxxxG-Motivs zu beobachten war. Dies sowie die stabilisierende Wirkung polarer Aminosäuren in der Nachbarschaft potentieller Ionenpaare verdeutlichen die entscheidende Rolle des Sequenzkontextes bei der Modulierung der TMD-Affinität. Damit ist dies die bisher erste Arbeit, welche die erforderlichen Rahmenbedingungen für hochaffine Wechselwirkungen zwischen gegensätzlich ionisierbaren Aminosäuren in Modell-TMDn umreißt.

Die hohe Affinität der Modell-TMDn, die mittels polarer und/oder ionisierbarer Reste assoziieren, lässt vermuten, dass solche Aminosäuren überwiegend an der permanenten Interaktion von TMDn, beispielsweise bei der Assemblierung von Membranprotein-Komplexen (z.B. T-Zell-Rezeptor-Komplex [52]), beteiligt sind – vor allem, wenn diese mehrfach in TMDn auftreten. Dynamische TMD-TMD-Interaktionen, bei denen sich die TMDn lateral, vertikal oder rotierend bewegen (z.B. bei der Signaltransduktion dimerer Rezeptoren [52,204]), werden im hydrophoben Kern der Membran vermutlich eher durch van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen unpolaren Aminosäuren mit großen Seitenketten und/oder durch einzelne mäßig polare Aminosäuren (Cystein, Serin, Threonin, Tyrosin) vermittelt. Ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der Aminosäurezusammensetzung der TMDn und der Art der Interaktion besteht, ließe sich anhand einer Bank von TMDn bitopischer Membranproteine mit bekannter Funktion überprüfen. Unter Verwendung des ToxR/POSSYCCAT-Systems könnten durch Positivselektion hochaffine, durch Negativselektion niederaffine und durch die kombinierte Positiv- und Negativselektion mit geringem Selektionsdruck mittelaffine TMDn isoliert werden [116,117]. Dies könnte mit Hilfe der beiden neuen Varianten des ToxR-Systems auch auf die heterotypische Interaktion von TMDn ausgeweitet werden. Dazu wäre lediglich der Austausch der Plasmid-kodierten Cm-Resistenz von pToxRVII/pToxRVIII, z.B. gegen Streptomycin, erforderlich, da

die Selektionsstämme Chr3 (*ctx::cat*; [116]) und EL61 (*ompU::cat*; [117]) ebenfalls eine Cm-Resistenz exprimieren.

Ein weiteres mögliches Anwendungsgebiet der ToxR-Systeme zur Analyse heterotypischer TMD-TMD-Interaktion könnte die Selektion von transmembranen Sequenzen sein, welche spezifisch mit TMDn natürlicher Membranproteine interagieren. Auf diese Weise ließen sich zum einen generelle Interaktionsmechanismen erschliessen und zum anderen die Aktivität der Zielproteine modulieren. Ähnliches wurde bereits erfolgreich bei den Integrin-Untereinheiten  $\alpha$ Ib und  $\alpha$ V [205,206] sowie dem PDGF  $\beta$  (*Platelet-derived Growth Factor  $\beta$* )-Rezeptor durchgeführt [207,208]. Weitere Beispiele dazu sind in [52,209] zusammengefasst. Als potentielle Zielproteine kämen z.B. virale Fusionsproteine (G-Protein des Vesikulären Stomatitis Virus, E1/E2 des Hepatitis C Virus, gp41 von HIV-1) in Frage, welche für die Verschmelzung der Virushülle mit der Wirtsmembran verantwortlich sind. Es gibt Hinweise darauf, dass der Oligomerisierung ihrer TMDn dabei eine wichtige Rolle zukommt ([64,188,210,211] und Literaturangaben darin). Durch Randomisierung der TMD-Sequenz könnten spezifisch und hochaffin bindende Konstrukte isoliert werden, welche die Fusion des Virus mit der Zelle inhibieren. Ein ebenso interessantes Zielprotein könnte das *Amyloid Precursor Protein* (APP) sein. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die GxxxG-vermittelte Assoziation seiner TMDn die Bildung des pathogenen Amyloid- $\beta$  Peptids A $\beta$ 42 begünstigt, indem sie die Prozessierung von APP durch die  $\gamma$ -Sekretase einschränkt [66]. Mit der Identifikation von TMD-Sequenzen, welche durch die mittel-affine Bindung an die APP-TMD mit ihrer Selbstinteraktion konkurrieren, wäre evtl. eine Möglichkeit gegeben, die Entstehung von A $\beta$ 42 zu vermindern. Weitere potentielle Zielproteine sind außerdem in [209,212] aufgeführt.

## 6 Literatur

1. Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
2. White, S.H. and Wimley, W.C. (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, **28**, 319-365.
3. Wiener, M.C. and White, S.H. (1992) Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. III. Complete structure. *Biophys J.*, **61**, 434-447.
4. Dilger, J.P., Fisher, L.R., Haydon, D.A. (1982) A critical comparison of electrical and optical methods for bilayer thickness determination. *Chemistry and Physics of Lipids*, **30**, 159-176.
5. Verkleij, A.J., Zwaal, R.F., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D. and van Deenen, L.L. (1973) The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta.*, **323**, 178-193.
6. Wallin, E. and von Heijne, G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.*, **7**, 1029-1038.
7. Stevens, T.J. and Arkin, I.T. (2000) Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? *Proteins*, **39**, 417-420.
8. Armstrong, C.M. (1974) Ionic pores, gates, and gating currents. *Q Rev Biophys.*, **7**, 179-210.
9. Gouaux, E. and Mackinnon, R. (2005) Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science*, **310**, 1461-1465.
10. Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.*, **103**, 211-225.
11. Takeichi, M. (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, **251**, 1451-1455.
12. Giancotti, F.G. and Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science*, **285**, 1028-1032.
13. Dekker, J.P. and Boekema, E.J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta*, **1706**, 12-39.
14. Vonck, J. and Schafer, E. (2009) Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 117-124.
15. Yildirim, M.A., Goh, K.I., Cusick, M.E., Barabasi, A.L. and Vidal, M. (2007) Drug-target network. *Nat Biotechnol.*, **25**, 1119-1126.
16. Kauko, A., Illergard, K. and Elofsson, A. (2008) Coils in the membrane core are conserved and functionally important. *J Mol Biol.*, **380**, 170-180.

17. Bowie, J.U. (1997) Helix packing in membrane proteins. *J Mol Biol.*, **272**, 780-789.
18. Arkin, I.T. and Brunger, A.T. (1998) Statistical analysis of predicted transmembrane alpha-helices. *Biochim Biophys Acta*, **1429**, 113-128.
19. Senes, A., Gerstein, M. and Engelman, D.M. (2000) Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol.*, **296**, 921-936.
20. Ulmschneider, M.B. and Sansom, M.S. (2001) Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta*, **1512**, 1-14.
21. Wimley, W.C. and White, S.H. (2000) Designing transmembrane alpha-helices that insert spontaneously. *Biochemistry*, **39**, 4432-4442.
22. White, S.H. and von Heijne, G. (2004) The machinery of membrane protein assembly. *Curr Opin Struct Biol.*, **14**, 397-404.
23. Luirink, J., von Heijne, G., Houben, E. and de Gier, J.W. (2005) Biogenesis of inner membrane proteins in Escherichia coli. *Annu Rev Microbiol.*, **59**, 329-355.
24. Driessen, A.J. and Nouwen, N. (2008) Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem.*, **77**, 643-667.
25. Wild, K., Halic, M., Sinning, I. and Beckmann, R. (2004) SRP meets the ribosome. *Nat Struct Mol Biol.*, **11**, 1049-1053.
26. Heinrich, S.U., Mothes, W., Brunner, J. and Rapoport, T.A. (2000) The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Cell*, **102**, 233-244.
27. Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S.H. and von Heijne, G. (2005) Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature*, **433**, 377-381.
28. Samuelson, J.C., Chen, M., Jiang, F., Moller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G.J. and Dalbey, R.E. (2000) YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature*, **406**, 637-641.
29. von Heijne, G. (1986) The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *Embo J.*, **5**, 3021-3027.
30. von Heijne, G. and Gavel, Y. (1988) Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem.*, **174**, 671-678.
31. von Heijne, G. (1989) Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature*, **341**, 456-458.
32. Beltzer, J.P., Fiedler, K., Fuhrer, C., Geffen, I., Handschin, C., Wessels, H.P. and Spiess, M. (1991) Charged residues are major determinants of the transmembrane orientation of a signal-anchor sequence. *J Biol Chem.*, **266**, 973-978.
33. Nilsson, I. and von Heijne, G. (1990) Fine-tuning the topology of a polytopic membrane protein: role of positively and negatively charged amino acids. *Cell*, **62**, 1135-1141.

34. Goder, V., Junne, T. and Spiess, M. (2004) Sec61p contributes to signal sequence orientation according to the positive-inside rule. *Mol Biol Cell.*, **15**, 1470-1478.
35. van Klompenburg, W., Nilsson, I., von Heijne, G. and de Kruijff, B. (1997) Anionic phospholipids are determinants of membrane protein topology. *Embo J.*, **16**, 4261-4266.
36. Bogdanov, M., Xie, J. and Dowhan, W. (2009) Lipid-protein interactions drive membrane protein topogenesis in accordance with the positive inside rule. *J Biol Chem.*, **284**, 9637-9641.
37. Popot, J.L. and Engelman, D.M. (1990) Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry*, **29**, 4031-4037.
38. Popot, J.L. and Engelman, D.M. (2000) Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu Rev Biochem.*, **69**, 881-922.
39. Bowie, J.U. (2005) Solving the membrane protein folding problem. *Nature*, **438**, 581-589.
40. Engelman, D.M., Chen, Y., Chin, C.N., Curran, A.R., Dixon, A.M., Dupuy, A.D., Lee, A.S., Lehnert, U., Matthews, E.E., Reshetnyak, Y.K. *et al.* (2003) Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett.*, **555**, 122-125.
41. Ridder, A.N. and Langosch, D. (2003) In Buchner, J. (ed.), *Handbook of Protein Folding*. Wiley, Vol. 2.
42. Creighton, T.E. (1993) *Proteins: Structure and Molecular Properties*. Freeman, New York.
43. Israelachvili, J.N. (1973) Van der Waals forces in biological systems. *Q Rev Biophys.*, **6**, 341-387.
44. DeGrado, W.F., Gratkowski, H. and Lear, J.D. (2003) How do helix-helix interactions help determine the folds of membrane proteins? Perspectives from the study of homo-oligomeric helical bundles. *Protein Sci.*, **12**, 647-665.
45. Langosch, D. and Heringa, J. (1998) Interaction of transmembrane helices by a knobs-into-holes packing characteristic of soluble coiled coils. *Proteins*, **31**, 150-159.
46. Walters, R.F. and DeGrado, W.F. (2006) Helix-packing motifs in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13658-13663.
47. Crick, F.H.C. (1953) The Packing of alpha-Helices: Simple Coiled-Coils. *Acta Cryst.*, **6**, 689-697.
48. Langosch, D., Lindner, E. and Gurezka, R. (2002) In vitro selection of self-interacting transmembrane segments--membrane proteins approached from a different perspective. *IUBMB Life*, **54**, 109-113.
49. Langosch, D. and Arkin, I.T. (2009) Interaction and conformational dynamics of membrane-spanning protein helices. *Protein Sci.*, **18**, 1343-1358.
50. Anfinsen, C.B. (1988) *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press, **39**.
51. Russ, W.P. and Engelman, D.M. (2000) The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol.*, **296**, 911-919.

52. Moore, D.T., Berger, B.W. and DeGrado, W.F. (2008) Protein-protein interactions in the membrane: sequence, structural, and biological motifs. *Structure*, **16**, 991-1001.
53. MacKenzie, K.R., Prestegard, J.H. and Engelman, D.M. (1997) A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science*, **276**, 131-133.
54. Smith, S.O., Song, D., Shekar, S., Groesbeek, M., Ziliox, M. and Aimoto, S. (2001) Structure of the transmembrane dimer interface of glycophorin A in membrane bilayers. *Biochemistry*, **40**, 6553-6558.
55. Lemmon, M.A., Flanagan, J.M., Treutlein, H.R., Zhang, J. and Engelman, D.M. (1992) Sequence specificity in the dimerization of transmembrane alpha-helices. *Biochemistry*, **31**, 12719-12725.
56. Lemmon, M.A., Treutlein, H.R., Adams, P.D., Brunger, A.T. and Engelman, D.M. (1994) A dimerization motif for transmembrane alpha-helices. *Nat Struct Biol.*, **1**, 157-163.
57. Langosch, D., Brosig, B., Kolmar, H. and Fritz, H.J. (1996) Dimerisation of the glycophorin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator. *J Mol Biol.*, **263**, 525-530.
58. Doura, A.K., Kobus, F.J., Dubrovsky, L., Hibbard, E. and Fleming, K.G. (2004) Sequence context modulates the stability of a GxxxG-mediated transmembrane helix-helix dimer. *J Mol Biol.*, **341**, 991-998.
59. Duong, M.T., Jaszewski, T.M., Fleming, K.G. and MacKenzie, K.R. (2007) Changes in apparent free energy of helix-helix dimerization in a biological membrane due to point mutations. *J Mol Biol.*, **371**, 422-434.
60. Treutlein, H.R., Lemmon, M.A., Engelman, D.M. and Brunger, A.T. (1992) The glycophorin A transmembrane domain dimer: sequence-specific propensity for a right-handed supercoil of helices. *Biochemistry*, **31**, 12726-12732.
61. Adams, P.D., Engelman, D.M. and Brunger, A.T. (1996) Improved prediction for the structure of the dimeric transmembrane domain of glycophorin A obtained through global searching. *Proteins*, **26**, 257-261.
62. Senes, A., Ubarretxena-Belandia, I. and Engelman, D.M. (2001) The Calpha-H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9056-9061.
63. Smith, S.O., Eilers, M., Song, D., Crocker, E., Ying, W., Groesbeek, M., Metz, G., Ziliox, M. and Aimoto, S. (2002) Implications of threonine hydrogen bonding in the glycophorin A transmembrane helix dimer. *Biophys J.*, **82**, 2476-2486.
64. Unterreitmeier, S., Fuchs, A., Schäffler, T., Heym, R.G., Frishman, D. and Langosch, D. (2007) Phenylalanine Promotes Interaction of Transmembrane Domains via GxxxG Motifs. *J Mol Biol.*, **374**, 705-718.
65. Bocharov, E.V., Mayzel, M.L., Volynsky, P.E., Goncharuk, M.V., Ermolyuk, Y.S., Schulga, A.A., Artemenko, E.O., Efremov, R.G. and Arseniev, A.S. (2008) Spatial structure and pH-dependent conformational diversity of dimeric transmembrane domain of the receptor tyrosine kinase EphA1. *J Biol Chem.*, **283**, 29385-29395.
66. Munter, L.M., Voigt, P., Harmeier, A., Kaden, D., Gottschalk, K.E., Weise, C., Pipkorn, R., Schaefer, M., Langosch, D. and Multhaup, G. (2007) GxxxG motifs within the amyloid

- precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *Embo J.*, **26**, 1702-1712.
67. Sato, T., Tang, T.C., Reubins, G., Fei, J.Z., Fujimoto, T., Kienlen-Campard, P., Constantinescu, S.N., Octave, J.N., Aimoto, S. and Smith, S.O. (2009) A helix-to-coil transition at the epsilon-cut site in the transmembrane dimer of the amyloid precursor protein is required for proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 1421-1426.
  68. Dews, I.C. and Mackenzie, K.R. (2007) Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20782-20787.
  69. Kobus, F.J. and Fleming, K.G. (2005) The GxxxG-containing transmembrane domain of the CCK4 oncogene does not encode preferential self-interactions. *Biochemistry*, **44**, 1464-1470.
  70. Melnyk, R.A., Kim, S., Curran, A.R., Engelman, D.M., Bowie, J.U. and Deber, C.M. (2004) The affinity of GXXXG motifs in transmembrane helix-helix interactions is modulated by long-range communication. *J Biol Chem.*, **279**, 16591-16597.
  71. Doura, A.K. and Fleming, K.G. (2004) Complex interactions at the helix-helix interface stabilize the glycophorin A transmembrane dimer. *J Mol Biol.*, **343**, 1487-1497.
  72. Schneider, D. and Engelman, D.M. (2004) Motifs of Two Small Residues can Assist but are not Sufficient to Mediate Transmembrane Helix Interactions. *J Mol Biol.*, **343**, 799-804.
  73. Duneau, J.P., Vegh, A.P. and Sturgis, J.N. (2007) A dimerization hierarchy in the transmembrane domains of the HER receptor family. *Biochemistry*, **46**, 2010-2019.
  74. Escher, C., Cymer, F. and Schneider, D. (2009) Two GxxxG-like motifs facilitate promiscuous interactions of the human ErbB transmembrane domains. *J Mol Biol.*, **389**, 10-16.
  75. Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A. and Hynes, N.E. (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J.*, **19**, 3159-3167.
  76. Hynes, R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, **110**, 673-687.
  77. Bennett, J.S. (2005) Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3. *J Clin Invest.*, **115**, 3363-3369.
  78. Askari, J.A., Buckley, P.A., Mould, A.P. and Humphries, M.J. (2009) Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci.*, **122**, 165-170.
  79. Xiong, J.P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R.G., Dunker, R., Scott, D.L., Joachimiak, A., Goodman, S.L. and Arnaout, M.A. (2001) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha V beta 3. *Science*, **294**, 339-345.
  80. Takagi, J., Strokovich, K., Springer, T.A. and Walz, T. (2003) Structure of integrin alpha(5)beta(1) in complex with fibronectin. *Embo J*, **22**, 4607-4615.
  81. Lu, C., Takagi, J. and Springer, T.A. (2001) Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *J Biol Chem.*, **276**, 14642-14648.
  82. Vinogradova, O., Velyvis, A., Velyviene, A., Hu, B., Haas, T., Plow, E. and Qin, J. (2002) A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell*, **110**, 587-597.

83. Luo, B.H., T., S.A. and Takagi, J. (2004) A Specific Interface between Integrin Transmembrane Helices and Affinity for Ligand. *PLoS Biology*, **2**, 1-11.
84. Li, W., Metcalf, D.G., Gorelik, R., Li, R., Mitra, N., Nanda, V., Law, P.B., Lear, J.D., DeGrado, W.F. and Bennett, J.S. (2005) A push-pull mechanism for regulating integrin function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1424-1429.
85. Luo, B.H., Carman, C.V., Takagi, J. and Springer, T.A. (2005) Disrupting integrin transmembrane domain heterodimerization increases ligand binding affinity, not valency or clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3679-3684.
86. Kim, M., Carman, C.V. and Springer, T.A. (2003) Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science*, **301**, 1720-1725.
87. Lau, T.L., Kim, C., Ginsberg, M.H. and Ulmer, T.S. (2009) The structure of the integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *Embo J*, **28**, 1351-1361.
88. Yang, J., Ma, Y.Q., Page, R.C., Misra, S., Plow, E.F. and Qin, J. (2009) Structure of an integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 transmembrane-cytoplasmic heterocomplex provides insight into integrin activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 17729-17734.
89. Metcalf, D.G., Kulp, D.W., Bennett, J.S. and DeGrado, W.F. (2009) Multiple approaches converge on the structure of the integrin  $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3 transmembrane heterodimer. *J Mol Biol*, **392**, 1087-1101.
90. Zhu, J., Luo, B.H., Barth, P., Schonbrun, J., Baker, D. and Springer, T.A. (2009) The Structure of a Receptor with Two Associating Transmembrane Domains on the Cell Surface: Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Mol Cell*, **34**, 234-249.
91. Kim, C., Lau, T.L., Ulmer, T.S. and Ginsberg, M.H. (2009) Interactions of platelet integrin  $\alpha$ IIb and  $\beta$ 3 transmembrane domains in mammalian cell membranes and their role in integrin activation. *Blood*, **113**, 4747-4753.
92. Hughes, P.E., Diaz-Gonzalez, F., Leong, L., Wu, C., McDonald, J.A., Shattil, S.J. and Ginsberg, M.H. (1996) Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem*, **271**, 6571-6574.
93. Partridge, A.W., Liu, S., Kim, S., Bowie, J.U. and Ginsberg, M.H. (2005) Transmembrane domain helix packing stabilizes integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 in the low affinity state. *J Biol Chem*, **280**, 7294-7300.
94. Anthis, N.J., Wegener, K.L., F., Y., Kim, C., Goult, B.T., Lowe, E.D., Vakonakis, I., Bate, N., Critchley, D.R. and Ginsberg, M.H., Campbell, I.D. (2009) The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *EMBO J*, **28**, 3623-3632.
95. Li, R., Babu, C.R., Lear, J.D., Wand, A.J., Bennett, J.S. and DeGrado, W.F. (2001) Oligomerization of the integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: roles of the transmembrane and cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12462-12467.
96. Li, R., Mitra, N., Gratkowski, H., Vilaire, G., Litvinov, R., Nagasami, C., Weisel, J.W., Lear, J.D., DeGrado, W.F. and Bennett, J.S. (2003) Activation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science*, **300**, 795-798.



97. Li, R., Gorelik, R., Nanda, V., Law, P.B., Lear, J.D., DeGrado, W.F. and Bennett, J.S. (2004) Dimerization of the transmembrane domain of Integrin alphaIIb subunit in cell membranes. *J Biol Chem.*, **279**, 26666-26673.
98. Gimpelev, M., Forrest, L.R., Murray, D. and Honig, B. (2004) Helical packing patterns in membrane and soluble proteins. *Biophys J.*, **87**, 4075-4086.
99. Dawson, J.P., Weinger, J.S. and Engelman, D.M. (2002) Motifs of serine and threonine can drive association of transmembrane helices. *J Mol Biol.*, **316**, 799-805.
100. Zhou, F.X., Cocco, M.J., Russ, W.P., Brunger, A.T. and Engelman, D.M. (2000) Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nat Struct Biol.*, **7**, 154-160.
101. Choma, C., Gratkowski, H., Lear, J.D. and DeGrado, W.F. (2000) Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nat Struct Biol.*, **7**, 161-166.
102. Gratkowski, H., Lear, J.D. and DeGrado, W.F. (2001) Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 880-885.
103. Zhou, F.X., Merianos, H.J., Brunger, A.T. and Engelman, D.M. (2001) Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2250-2255.
104. Ruan, W., Lindner, E. and Langosch, D. (2004) The interface of a membrane-spanning leucine zipper mapped by asparagine-scanning mutagenesis. *Protein Sci.*, **13**, 555-559.
105. Johnson, R.M., Hecht, K. and Deber, C.M. (2007) Aromatic and Cation-pi Interactions Enhance Helix-Helix Association in a Membrane Environment. *Biochemistry*, **46**, 9208-9214.
106. Adamian, L. and Liang, J. (2002) Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: polar clamps and serine zippers. *Proteins*, **47**, 209-218.
107. Kuhlbrandt, W., Wang, D.N. and Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic Model of Plant Light-Harvesting Complex by Electron Crystallography. *Nature*, **367**, 614-621.
108. Cotten, J.F. and Welsh, M.J. (1999) Cystic fibrosis-associated mutations at arginine 347 alter the pore architecture of CFTR - Evidence for disruption of a salt bridge. *J Biol Chem*, **274**, 5429-5435.
109. Lacapère, J.-J., Pebay-Peyroula, E., Neumann, J.-M. and Etchebest, C. (2007) Determining membrane protein structures: still a challenge! *Trends Biochem Sci.*, **32**, 259-270.
110. Burgess, N.K., Stanley, A.M., Fleming, K.G. and Dr. John J. Correia and Dr. H. William Detrich, III. (2008), *Methods Cell Biol.* Academic Press, Vol. 84, pp. 181-211.
111. You, M., Li, E., Wimley, W.C. and Hristova, K. (2005) Förster resonance energy transfer in liposomes: Measurements of transmembrane helix dimerization in the native bilayer environment. *Anal Biochem.*, **340**, 154-164.
112. Kolmar, H., Hennecke, F., Gotze, K., Janzer, B., Vogt, B., Mayer, F. and Fritz, H.J. (1995) Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures. *Embo J.*, **14**, 3895-3904.
113. Russ, W.P. and Engelman, D.M. (1999) TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 863-868.

114. Roth, L., Nasarre, C., Dirrig-Grosch, S., Aunis, D., Cremel, G., Hubert, P. and Bagnard, D. (2008) Transmembrane domain interactions control biological functions of neuropilin-1. *Mol Biol Cell*, **19**, 646-654.
115. Schneider, D. and Engelman, D.M. (2003) GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane. *J Biol Chem.*, **278**, 3105-3111.
116. Gurezka, R. and Langosch, D. (2001) In vitro selection of membrane-spanning leucine zipper protein-protein interaction motifs using POSSYCCAT. *J Biol Chem.*, **276**, 45580-45587.
117. Lindner, E., Unterreitmeier, S., Ridder, A.N. and Langosch, D. (2007) An extended ToxR POSSYCCAT system for positive and negative selection of self-interacting transmembrane domains. *J Microbiol Methods*, **69**, 298-305.
118. Ridder, A., Skupjen, P., Unterreitmeier, S. and Langosch, D. (2005) Tryptophan Supports Interaction of Transmembrane Helices. *J Mol Biol.*, **354**, 894-902.
119. Skorupski, K. and Taylor, R.K. (1997) Control of the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli. *Mol Microbiol.*, **25**, 1003-1009.
120. Miller, V.L. and Mekalanos, J.J. (1984) Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by toxR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 3471-3475.
121. Miller, V.L., Taylor, R.K. and Mekalanos, J.J. (1987) Cholera toxin transcriptional activator toxR is a transmembrane DNA binding protein. *Cell*, **48**, 271-279.
122. Kolmar, H., Frisch, C., Kleemann, G., Gotze, K., Stevens, F.J. and Fritz, H.J. (1994) Dimerization of Bence Jones proteins: linking the rate of transcription from an *Escherichia coli* promoter to the association constant of REIV. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **375**, 61-70.
123. Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*, 352-356.
124. Gurezka, R., Laage, R., Brosig, B. and Langosch, D. (1999) A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments. *J Biol Chem.*, **274**, 9265-9270.
125. Herrmann, J.R., Panitz, J.C., Unterreitmeier, S., Fuchs, A., Frishman, D. and Langosch, D. (2009) Complex Patterns of Histidine, Hydroxylated Amino Acids and the GxxxG Motif Mediate High-affinity Transmembrane Domain Interactions. *J Mol Biol*, **385**, 912-923.
126. Lindner, E. and Langosch, D. (2006) A ToxR-based dominant-negative system to investigate heterotypic transmembrane domain interactions. *Proteins*, **65**, 803-807.
127. Martinez-Hackert, E. and Stock, A.M. (1997) The DNA-binding domain of OmpR: Crystal structure of a winged helix transcription factor. *Structure*, **5**, 109-124.
128. Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.*, **112**, 195-203.
129. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- 
130. Brosig, B. and Langosch, D. (1998) The dimerization motif of the glycophorin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues. *Protein Sci.*, **7**, 1052-1056.
131. Shuman, H.A. (1982) Active-Transport of Maltose in Escherichia-Coli-K12 - Role of the Periplasmic Maltose-Binding Protein and Evidence for a Substrate Recognition Site in the Cytoplasmic Membrane. *J Biol Chem*, **257**, 5455-5461.
132. Duplay, P., Szmelcman, S., Bedouelle, H. and Hofnung, M. (1987) Silent and functional changes in the periplasmic maltose-binding protein of Escherichia coli K12. I. Transport of maltose. *J Mol Biol.*, **194**, 663-673.
133. Lindner, E. (2007) Identifikation heterotypischer TMD-TMD Interaktion. Doktorarbeit. *Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Technische Universität München*, <http://mediatum2.ub.tum.de/node?id=606587>.
134. Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, **41**, 95-98.
135. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol.*, **166**, 557-580.
136. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
137. Lau, T.L., Dua, V. and Ulmer, T.S. (2008) Structure of the integrin alpha IIb transmembrane segment. *J Biol Chem*, **283**, 16162-16168.
138. Lau, T.L., Partridge, A.W., Ginsberg, M.H. and Ulmer, T.S. (2008) Structure of the integrin beta 3 transmembrane segment in phospholipid bicelles and detergent micelles. *Biochem*, **47**, 4008-4016.
139. MacKenzie, K.R. and Fleming, K.G. (2008) Association energetics of membrane spanning alpha-helices. *Curr Opin Struct Biol*, **18**, 412-419.
140. Schneider, D. and Engelman, D.M. (2004) Involvement of transmembrane domain interactions in signal transduction by alpha/beta integrins. *J Biol Chem.*, **279**, 9840-9846.
141. Fleming, K.G., Ackerman, A.L. and Engelman, D.M. (1997) The effect of point mutations on the free energy of transmembrane alpha-helix dimerization. *J Mol Biol.*, **272**, 266-275.
142. Mendrola, J.M., Berger, M.B., King, M.C. and Lemmon, M.A. (2002) The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. *J Biol Chem*, **277**, 4704-4712.
143. Wegener, K.L., Partridge, A.W., Han, J., Pickford, A.R., Liddington, R.C., Ginsberg, M.H. and Campbell, I.D. (2007) Structural basis of integrin activation by talin. *Cell*, **128**, 171-182.
144. UniProt\_Consortium. (2009) The Universal Protein Resource (UniProt) 2009. *Nucleic Acids Res*, **37**, D169-174.
145. Herrmann, J.R., Fuchs, A., Panitz, J.C., Eckert, T., Unterreitmeier, S., Frishman, D. and Langosch, D. (2010) Ionic Interactions Promote Transmembrane Helix-Helix Association Depending on Sequence Context. *J Mol Biol.*, **396**, 452-461.

146. Ruan, W., Becker, V., Klingmuller, U. and Langosch, D. (2004) The interface between self-assembling erythropoietin receptor transmembrane segments corresponds to a membrane-spanning leucine zipper. *J Biol Chem.*, **279**, 3273-3279.
147. Gerber, D. and Shai, Y. (2001) In vivo detection of hetero-association of glycophorin-A and its mutants within the membrane. *J Biol Chem.*, **276**, 31229-31232.
148. Martinez-Hackert, E. and Stock, A.M. (1997) Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J Mol Biol*, **269**, 301-312.
149. Kato, N., Tsuzuki, M., Aiba, H. and Mizuno, T. (1995) Gene activation by the Escherichia coli positive regulator OmpR: a mutational study of the DNA-binding domain of OmpR. *Mol Gen Genet*, **248**, 399-406.
150. Krukonis, E.S., Yu, R.R. and Dirita, V.J. (2000) The Vibrio cholerae ToxR/TcpP/ToxT virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Mol Microbiol*, **38**, 67-84.
151. Chen, H. and Kendall, D.A. (1995) Artificial transmembrane segments. Requirements for stop transfer and polypeptide orientation. *J Biol Chem.*, **270**, 14115-14122.
152. Berger, B.W., Kulp, D.W., Span, L.M., DeGrado, J.L., Billings, P.C., Senes, A., Bennett, J.S. and DeGrado, W.F. (2010) Consensus motif for integrin transmembrane helix association. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 703-708.
153. Hennecke, F., Muller, A., Meister, R., Strelow, A. and Behrens, S. (2005) A ToxR-based two-hybrid system for the detection of periplasmic and cytoplasmic protein-protein interactions in Escherichia coli: minimal requirements for specific DNA binding and transcriptional activation. *Protein Eng Des Sel.*, **18**, 477-486.
154. McGaughey, G.B., Gagne, M. and Rappe, A.K. (1998) pi-Stacking interactions. Alive and well in proteins. *J Biol Chem.*, **273**, 15458-15463.
155. Bhattacharyya, R., Saha, R.P., Samanta, U. and Chakrabarti, P. (2003) Geometry of interaction of the histidine ring with other planar and basic residues. *J Proteome Res*, **2**, 255-263.
156. Adamian, L. and Liang, J. (2001) Helix-helix packing and interfacial pairwise interactions of residues in membrane proteins. *J Mol Biol.*, **311**, 891-907.
157. Mo, X., Lu, N., Padilla, A., Lopez, J.A. and Li, R.H. (2006) The transmembrane domain of glycoprotein Ib beta is critical to efficient expression of glycoprotein Ib-IX complex in the plasma membrane. *J Biol Chem*, **281**, 23050-23059.
158. Luo, S.Z., Mo, X., Lopez, J.A. and Li, R. (2007) Role of the transmembrane domain of glycoprotein IX in assembly of the glycoprotein Ib-IX complex. *J Thromb Haemost*, **5**, 2494-2502.
159. Luo, S.Z. and Li, R.H. (2008) Specific heteromeric association of four transmembrane peptides derived from platelet glycoprotein Ib-IX complex. *J Mol Biol*, **382**, 448-457.
160. Luo, S.Z., Mo, X., Afshar-Kharghan, V., Sirinivasan, S., Lopez, J.A. and Li, R.H. (2007) Glycoprotein Ib alpha forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ib beta subunits in the resting platelet. *Blood*, **109**, 603-609.
161. Mellor, H.R. and Harris, A.L. (2007) The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **26**, 553-566.

162. Chinnadurai, G., Vijayalingam, S. and Gibson, S.B. (2008) BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene*, **27**, S114-S127.
163. Chen, G., Ray, R., Dubik, D., Shi, L., Cizeau, J., Bleackley, R.C., Saxena, S., Gietz, R.D. and Greenberg, A.H. (1997) The E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis. *J Exp Med*, **186**, 1975-1983.
164. Sulistijo, E.S., Jaszewski, T.M. and MacKenzie, K.R. (2003) Sequence-specific dimerization of the transmembrane domain of the "BH3-only" protein BNIP3 in membranes and detergent. *J Biol Chem.*, **278**, 51950-51956.
165. Sulistijo, E.S. and MacKenzie, K.R. (2006) Sequence dependence of BNIP3 transmembrane domain dimerization implicates side-chain hydrogen bonding and a tandem GxxxG motif in specific helix-helix interactions. *J Mol Biol.*, **364**, 974-990.
166. Bocharov, E.V., Pustovalova, Y.E., Pavlov, K.V., Volynsky, P.E., Goncharuk, M.V., Ermolyuk, Y.S., Karpunin, D.V., Schulga, A.A., Kirpichnikov, M.P., Efremov, R.G. *et al.* (2007) Unique dimeric structure of BNip3 transmembrane domain suggests membrane permeabilization as a cell death trigger. *J Biol Chem.*, **282**, 16256-16266.
167. Sulistijo, E.S. and MacKenzie, K.R. (2009) Structural Basis for Dimerization of the BNIP3 Transmembrane Domain. *Biochemistry*, **48**, 5106-5120.
168. Frazier, D.P., Wilson, A., Graham, R.M., Thompson, J.W., Bishopric, N.H. and Webster, K.A. (2006) Acidosis regulates the stability, hydrophobicity, and activity of the BH3-only protein Bnip3. *Antioxid Redox Signal.*, **8**, 1625-1634.
169. Kubli, D.A., Quinsay, M.N., Huang, C.Q., Lee, Y. and Gustafsson, A.B. (2008) Bnip3 functions as a mitochondrial sensor of oxidative stress during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **295**, H2025-H2031.
170. Hu, J., Fu, R., Nishimura, K., Zhang, L., Zhou, H.X., Busath, D.D., Vijayvergiya, V. and Cross, T.A. (2006) Histidines, heart of the hydrogen ion channel from influenza A virus: toward an understanding of conductance and proton selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **103**, 6865-6870.
171. Otomo, K., Toyama, A., Miura, T. and Takeuchi, H. (2009) Interactions between Histidine and Tryptophan Residues in the BM2 Proton Channel from Influenza B Virus. *J Biochem*, **145**, 543-554.
172. Schnell, J.R. and Chou, J.J. (2008) Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature*, **451**, 591-595.
173. Stouffer, A.L., Acharya, R., Salom, D., Levine, A.S., Di Costanzo, L., Soto, C.S., Tereshko, V., Nanda, V., Stayrook, S. and DeGrado, W.F. (2008) Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature*, **451**, 596-599.
174. Wang, J., Pielak, R.M., McClintock, M.A. and Chou, J.J. (2009) Solution structure and functional analysis of the influenza B proton channel. *Nat Struct Mol Biol.*, **16**, 1267-1271.
175. Joh, N.H., Min, A., Faham, S., Whitelegge, J.P., Yang, D., Woods, V.L. and Bowie, J.U. (2008) Modest stabilization by most hydrogen-bonded side-chain interactions in membrane proteins. *Nature*, **453**, 1266-1270.

176. Dawson, J.P., Melnyk, R.A., Deber, C.M. and Engelman, D.M. (2003) Sequence context strongly modulates association of polar residues in transmembrane helices. *J Mol Biol.*, **331**, 255-262.
177. Cymes, G.D., Ni, Y. and Grosman, C. (2005) Probing ion-channel pores one proton at a time. *Nature*, **438**, 975-980.
178. Niemeyer, M.I., González-Nilo, F.D., Zúñiga, L., González, W., Cid, L.P. and Sepúlveda, F.V. (2007) Neutralization of a single arginine residue gates open a two-pore domain, alkali-activated K<sup>+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 666-671.
179. Lew, S., Ren, J. and London, E. (2000) The effects of polar and/or ionizable residues in the core and flanking regions of hydrophobic helices on transmembrane conformation and oligomerization. *Biochemistry.*, **39**, 9632-9640.
180. Lew, S., Caputo, G.A. and London, E. (2003) The effect of interactions involving ionizable residues flanking membrane-inserted hydrophobic helices upon helix-helix interaction. *Biochemistry.*, **42**, 10833-10842.
181. Li, L., Vorobyov, I., MacKerell, A.D. and Allen, T.W. (2008) Is arginine charged in a membrane? *Biophys J.*, **94**, L11-13.
182. Yoo, J. and Cui, Q. (2008) Does arginine remain protonated in the lipid membrane? Insights from microscopic pK(a) calculations. *Biophys J.*, **94**, L61-L63.
183. Honig, B.H. and Hubbell, W.L. (1984) Stability of "salt bridges" in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 5412-5416.
184. Rashin, A.A. and Honig, B. (1984) On the Environment of Ionizable Groups in Globular-Proteins. *J Mol Biol.*, **173**, 515-521.
185. Shigematsu, D., Matsutani, M., Furuya, T., Kiyota, T., Lee, S., Sugihara, G. and Yamashita, S. (2002) Roles of peptide-peptide charge interaction and lipid phase separation in helix-helix association in lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta.*, **1564**, 271-280.
186. Call, M.E., Schnell, J.R., Xu, C., Lutz, R.A., Chou, J.J. and Wuchterpfennig, K.W. (2006) The structure of the zeta-zeta transmembrane dimer reveals features essential for its assembly with the T cell receptor. *Cell*, **127**, 355-368.
187. Andersson, H. and Vonheijne, G. (1993) Position-Specific Asp-Lys Pairing Can Affect Signal Sequence Function and Membrane-Protein Topology. *J Biol Chem.*, **268**, 21389-21393.
188. Kim, J.H., Hartley, T.L., Curran, A.R. and Engelman, D.M. (2009) Molecular dynamics studies of the transmembrane domain of gp41 from HIV-1. *Biochim Biophys Acta*, **1788**, 1804-1812.
189. Cosson, P. and Bonifacino, J.S. (1992) Role of Transmembrane Domain Interactions in the Assembly of Class-II Mhc Molecules. *Science*, **258**, 659-662.
190. Call, M.E. and Wuchterpfennig, K.W. (2005) The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol.*, **23**, 101-125.
191. Call, M.E. and Wuchterpfennig, K.W. (2007) Common themes in the assembly and architecture of activating immune receptors. *Nat Rev Immunol.*, **7**, 841-850.
192. Call, M.E., Pyrdol, J., Wiedmann, M. and Wuchterpfennig, K.W. (2002) The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell*, **111**, 967-979.

193. Hermansson, M. and von Heijne, G. (2003) Inter-helical hydrogen bond formation during membrane protein integration into the ER membrane. *J Mol Biol.*, **334**, 803-809.
194. Meindl-Beinker, N.M., Lundin, C., Nilsson, I., White, S.H. and von Heijne, G. (2006) Asn- and Asp-mediated interactions between transmembrane helices during translocon-mediated membrane protein assembly. *EMBO Rep.*, **7**, 1111-1116.
195. Wimley, W.C., Gawrisch, K., Creamer, T.P. and White, S.H. (1996) Direct measurement of salt-bridge solvation energies using a peptide model system: implications for protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2985-2990.
196. Chin, C.N. and von Heijne, G. (2000) Charge pair interactions in a model transmembrane helix in the ER membrane. *J Mol Biol.*, **303**, 1-5.
197. Zhang, L., Sato, Y., Hessa, T., von Heijne, G., Lee, J.K., Kodama, I., Sakaguchi, M. and Uozumi, N. (2007) Contribution of hydrophobic and electrostatic interactions to the membrane integration of the Shaker K<sup>+</sup> channel voltage sensor domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 8263-8268.
198. Johansson, A.C. and Lindahl, E. (2009) Protein contents in biological membranes can explain abnormal solvation of charged and polar residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 15684-15689.
199. Partridge, A.W., Therien, A.G. and Deber, C.M. (2004) Missense mutations in transmembrane domains of proteins: phenotypic propensity of polar residues for human disease. *Proteins*, **54**, 648-656.
200. Cao, H., Bangalore, L., Bormann, B.J. and Stern, D.F. (1992) A Subdomain in the Transmembrane Domain Is Necessary for P185neu-Star Activation. *Embo J*, **11**, 923-932.
201. Smith, S.O., Smith, C., Shekar, S., Peersen, O., Ziliox, M. and Aimoto, S. (2002) Transmembrane interactions in the activation of the Neu receptor tyrosine kinase. *Biochemistry*, **41**, 9321-9332.
202. Schneider, D. (2004) Rendezvous in a membrane: close packing, hydrogen bonding, and the formation of transmembrane helix oligomers. *FEBS Lett.*, **577**, 5-8.
203. Adamian, L., Jackups, R., Jr., Binkowski, T.A. and Liang, J. (2003) Higher-order interhelical spatial interactions in membrane proteins. *J Mol Biol.*, **327**, 251-272.
204. Matthews, E.E., Zoonens, M. and Engelman, D.M. (2006) Dynamic helix interactions in transmembrane signaling. *Cell*, **127**, 447-450.
205. Yin, H., Slusky, J.S., Berger, B.W., Walters, R.S., Vilaire, G., Litvinov, R.I., Lear, J.D., Caputo, G.A., Bennett, J.S. and DeGrado, W.F. (2007) Computational design of peptides that target transmembrane helices. *Science*, **315**, 1817-1822.
206. Caputo, G.A., Litvinov, R.I., Li, W., Bennett, J.S., DeGrado, W.F. and Yin, H. (2008) Computationally designed peptide inhibitors of protein-protein interactions in membranes. *Biochemistry*, **47**, 8600-8606.
207. Freeman-Cook, L.L., Dixon, A.M., Frank, J.B., Xia, Y., Ely, L., Gerstein, M., Engelman, D.M. and DiMaio, D. (2004) Selection and characterization of small random transmembrane proteins that bind and activate the platelet-derived growth factor beta receptor. *J Mol Biol.*, **338**, 907-920.

- 
208. Ptacek, J.B., Edwards, A.P.B., Freeman-Cook, L.L. and DiMaio, D. (2007) Packing contacts can mediate highly specific interactions between artificial transmembrane proteins and the PDGFRB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 11945-11950.
  209. Freeman-Cook, L.L. and DiMaio, D. (2005) Modulation of cell function by small transmembrane proteins modeled on the bovine papillomavirus E5 protein. *Oncogene*, **24**, 7756-7762.
  210. Shang, L., Yue, L. and Hunter, E. (2008) Role of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in cell-cell fusion and virus infection. *J Virol*, **82**, 5417-5428.
  211. Ciczora, Y., Callens, N., Penin, F., Pecheur, E.I. and Dubuisson, J. (2007) Transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins: Residues involved in E1E2 heterodimerization and involvement of these domains in virus entry. *J Virol*, **81**, 2372-2381.
  212. Cymer, F. and Schneider, D. (2008) Lessons from viruses: Controlling the function of transmembrane proteins by interfering transmembrane helices. *Curr Med Chem*, **15**, 779-785.



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Schematische Darstellung der kotranslationalen Translokation einer naszierenden Polypeptidkette. ....	6
Abb. 1.2:	Erweitertes „ <i>Two-Stage-Model</i> “ der Membranproteinfaltung. ....	8
Abb. 1.3:	Grundlegende Interaktionsprinzipien membranständiger Helix-Paare. ....	11
Abb. 1.4:	Strukturmodell der interagierenden TMDn des GpA-Dimers in Membranumgebung. ....	12
Abb. 1.5:	Strukturmodell des $\alpha$ Ib/ $\beta$ 3-TMD-Heterodimers in Membranumgebung. ....	15
Abb. 1.6:	Schematische Darstellung der Funktionsweise des ToxR-Systems. ....	18
Abb. 1.7:	Schematische Darstellung des dominant-negativen ToxR*-Systems. ....	20
Abb. 4.1:	Überblick über die verwendeten Referenzkonstrukte. ....	43
Abb. 4.2:	Modifikation der Größe von ToxR* zur verbesserten elektrophoretischen Auftrennung koexprimierter Wt-ToxR- und ToxR*-Proteine. ....	45
Abb. 4.3:	Homotypische TMD-TMD-Interaktion von GpA und seinen Mutanten. ....	47
Abb. 4.4:	Charakterisierung des ToxR*-Systems anhand der heterotypischen TMD-TMD-Interaktion von GpA mit seinen Mutanten. ....	49
Abb. 4.5:	Homotypische TMD-TMD-Interaktion von $\alpha$ Ib und $\beta$ 3 in Relation zu GpA. ....	54
Abb. 4.6:	Heterotypische TMD-TMD-Interaktion von $\alpha$ Ib mit $\beta$ 3 und seinen Mutanten. ....	55
Abb. 4.7:	Mutationsanalyse der TMD-TMD-Interaktion der His-haltigen Sequenz LS36. ....	61
Abb. 4.8:	Mutationsanalyse der TMD-TMD-Interaktion der His-haltigen Sequenz LS49. ....	63
Abb. 4.9:	Heterotypische Interaktion der von LS49 abgeleiteten Mutanten. ....	65
Abb. 4.10:	Mutationsanalyse der TMD-TMD-Interaktion der hochaffinen Sequenz LS46. ....	67
Abb. 4.11:	Mutationsanalyse der TMD-TMD-Interaktion der hochaffinen Sequenz LS52. ....	68
Abb. 4.12:	Heterotypische Interaktion zweier Mutanten von LS46 bzw. LS52 durch Wechselwirkung gegensätzlich ionisierbarer Aminosäuren in <i>trans</i> . ....	70
Abb. 4.13:	Verstärkte Interaktion von L16 durch Aufsetzen kritischer Reste von LS46. ....	71
Abb. 4.14:	Verstärkte Interaktion von L16 durch Aufsetzen kritischer Reste von LS52. ....	72
Abb. 4.15:	Auftreten ionisierbarer Aminosäuren in Kombination mit GxxxG in natürlichen TMDn bitopischer Membranproteine. ....	74
Abb. 4.16:	Heterotypische TMD-TMD-Interaktion vermittelt durch überrepräsentierte Motive natürlicher TMDn mit ionisierbaren Resten und GxxxG. ....	76
Abb. 5.1:	Strukturmodell der DNA-Bindedomäne des OmpR-Transkriptionsregulators. ....	78
Abb. 5.2:	Gekoppelte Assoziationsgleichgewichte im dominant-negativen ToxR*-Assay. ....	81
Abb. 5.3:	Schematische Darstellung des Glykoprotein Ib-IX-V-Komplexes und putativ interagierender TMDn. ....	87

---

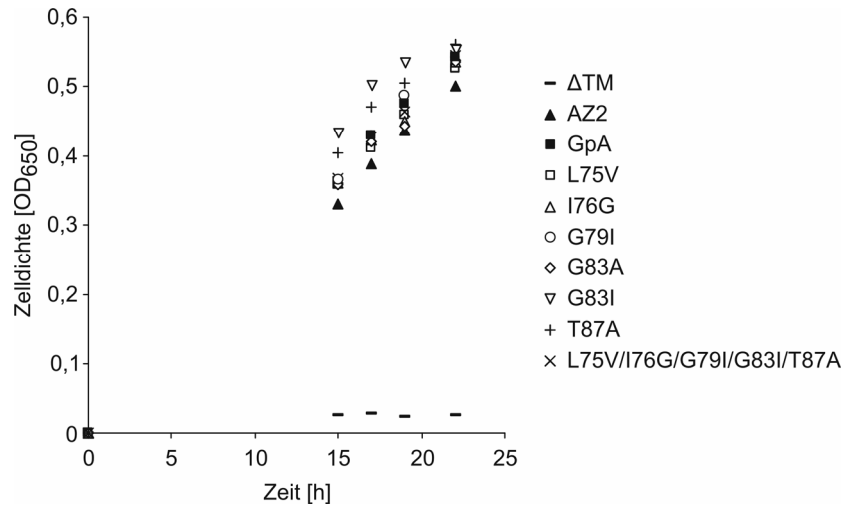
Abb. 5.4:	Wechselwirkung einer ionisierten Guanidinium- und Carboxylgruppe. ....	90
Abb. 5.5:	Organisation des T-Zell-Rezeptor-Komplexes vermittelt durch Wechselwirkung ionisierbarer Reste ihrer Transmembrandomänen. ....	93
Abb. I:	Funktionelle Komplementierung der MalE-Defizienz transformierter PD28-Zellen zur Kontrolle der korrekten Integration ( $N_{\text{innen}} - C_{\text{au\ss}en}$ ) der ToxR-Proteine in die innere Bakterienmembran. ....	115
Abb. II:	Schematische Darstellung von Wasserstoffbrückenbindungen, die His6 in LS49- Dimeren möglicherweise eingehen könnte. ....	119
Abb. III:	Homotypische TMD-TMD-Interaktion vermittelt durch überrepräsentierte Motive natürlicher TMDn mit ionisierbaren Resten und GxxxG. ....	120

## Tabellenverzeichnis

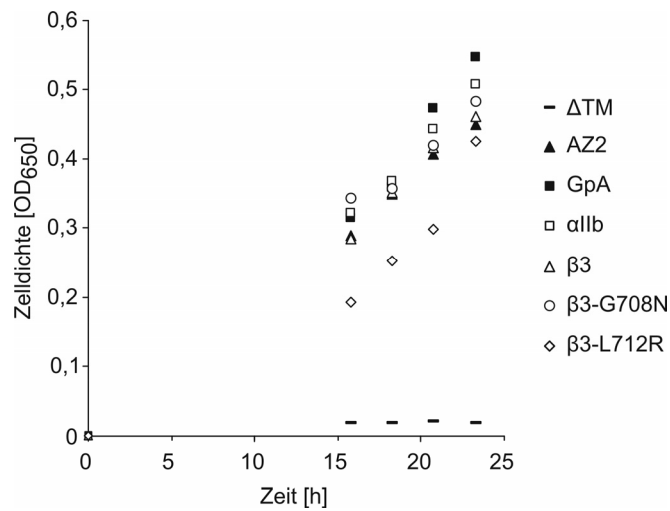
Tab. 3.1:	Übersicht über Kultivierungsbedingungen von FHK12-Zellen im Rahmen verschiedener ToxR-Assays.....	39
Tab. 4.1:	Übersicht über die verwendeten ToxR-Assays.....	57
Tab. I:	Aminosäurezusammensetzung der 25.558 TMD-Sequenzen mit annotierter/vorhergesagter Länge oder mit einer vereinheitlichten Länge von 23 Resten innerhalb des nichtredundanten Datensatzes bitopischer Membranproteine. ....	121
Tab. II:	Häufigkeit von Motiven, bestehend aus einem ionisierbaren Rest und einem GxxxG in verschiedenen Abständen zueinander, in der nichtredundanten Datenbank von 25.558 TMDn bitopischer Membranproteine mit einer TMD-Länge von 23 Aminosäuren.....	122

## Anhang A Abbildungen

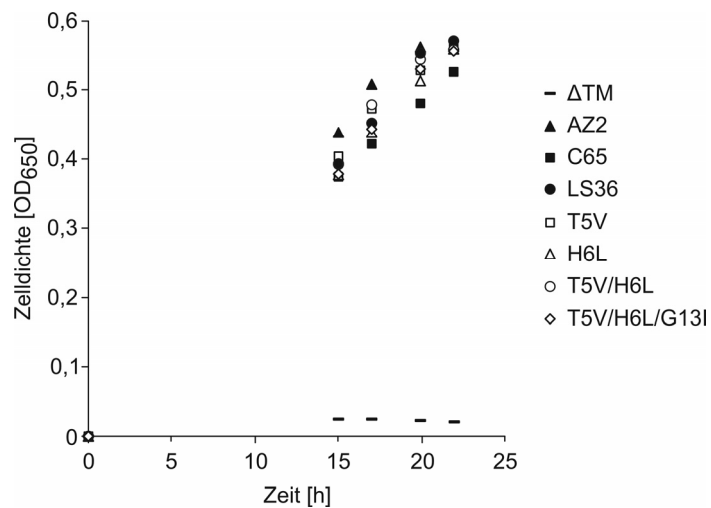
a)



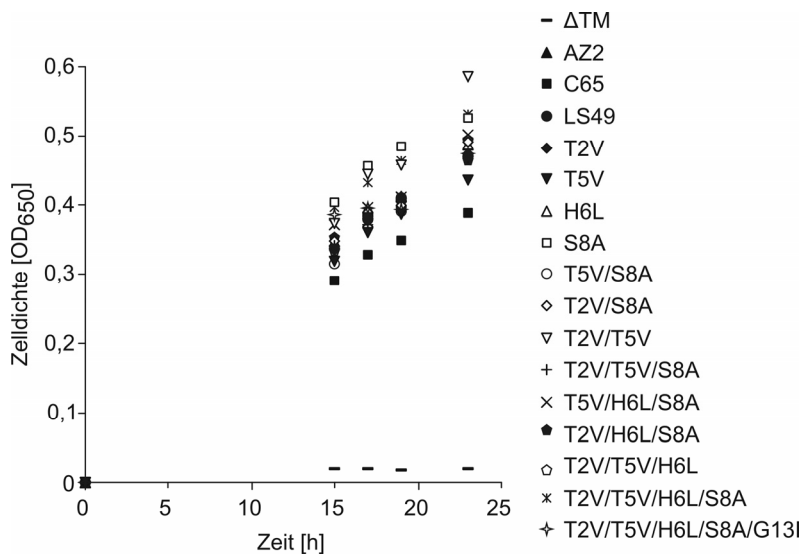
b)



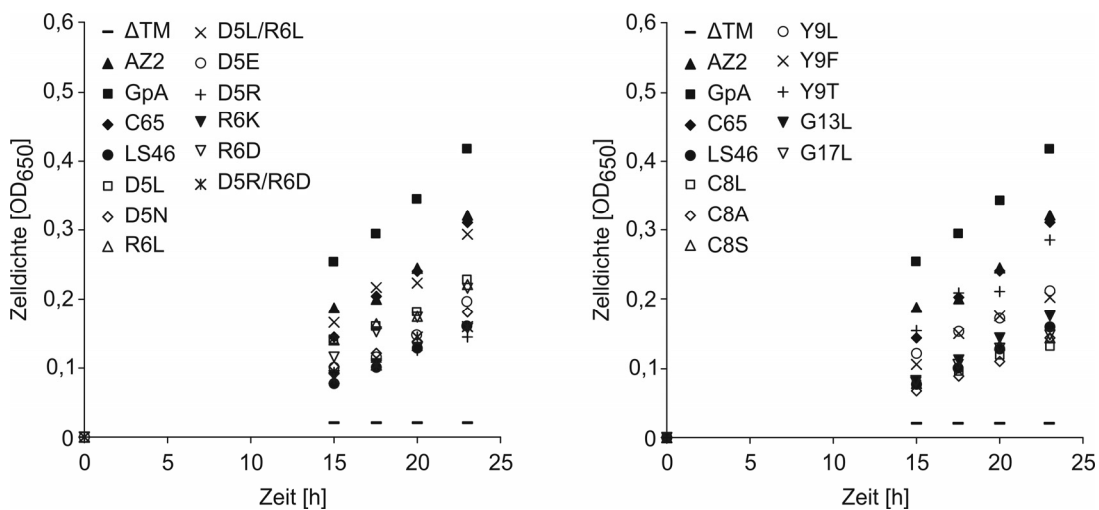
c)



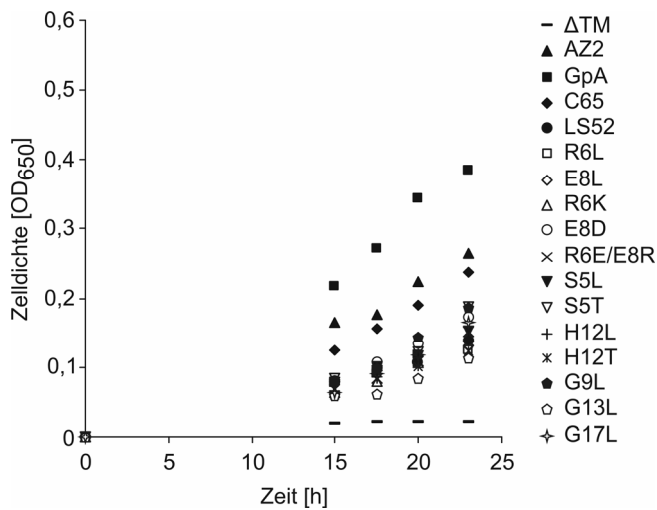
d)



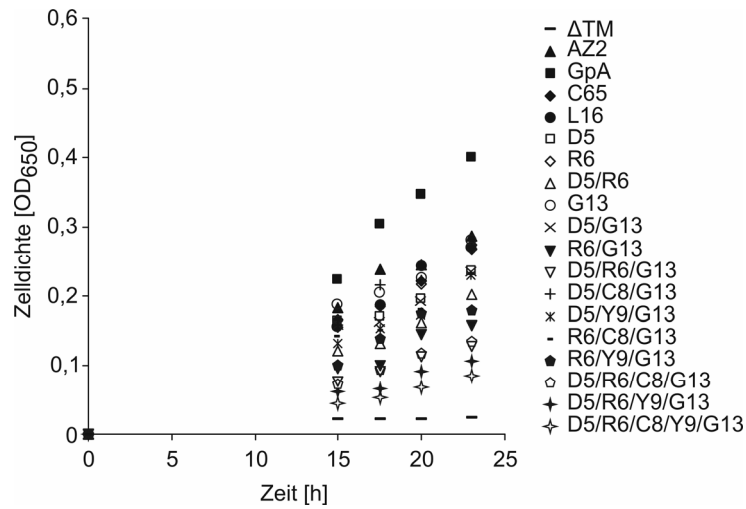
e)



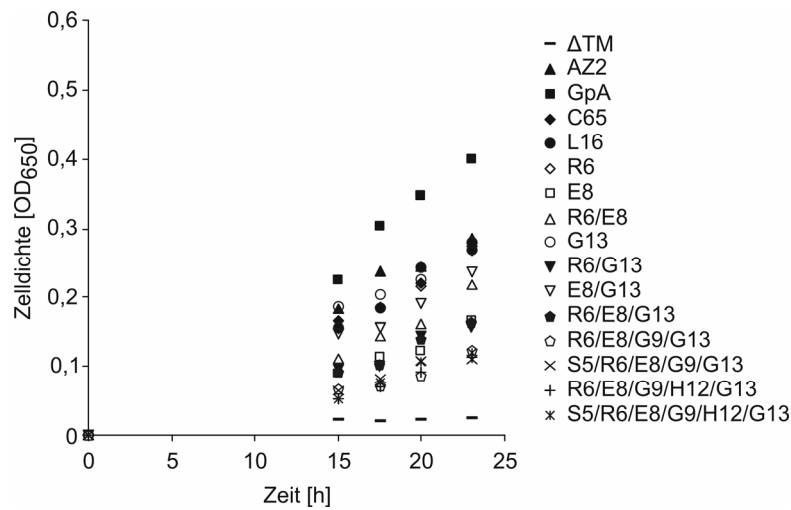
f)



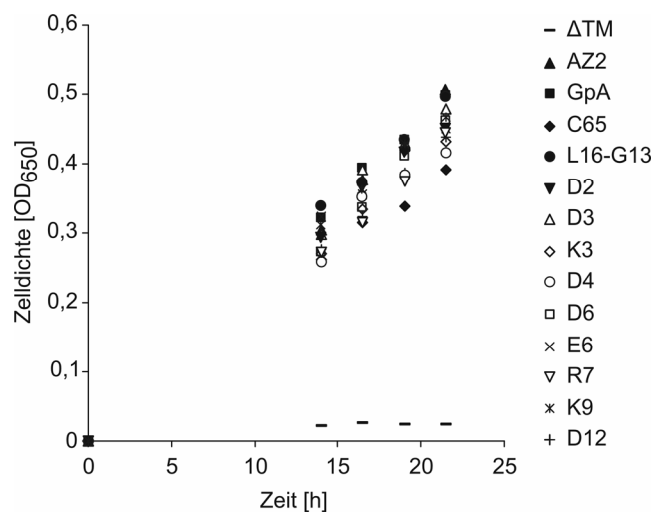
g)



h)

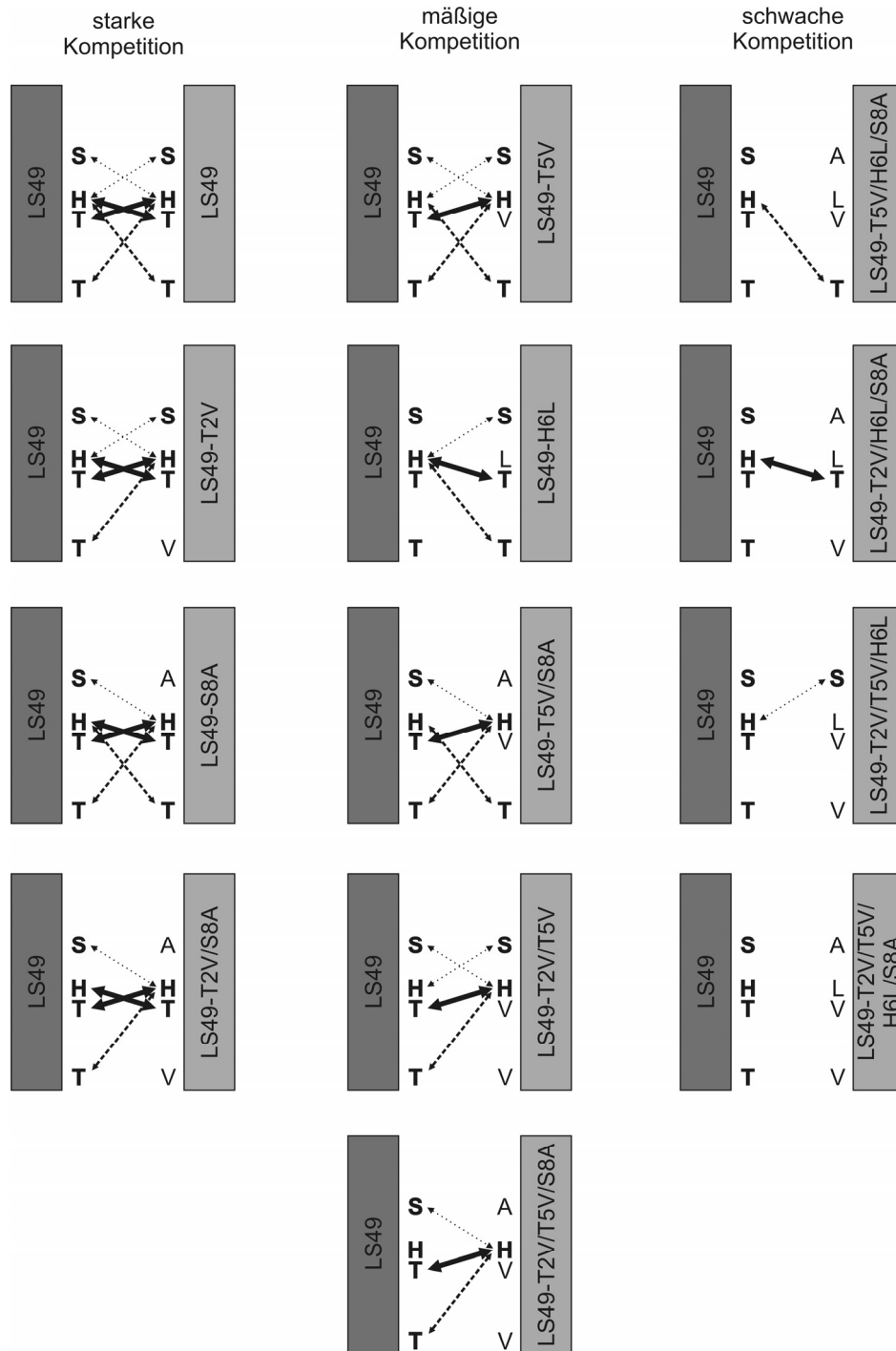


i)



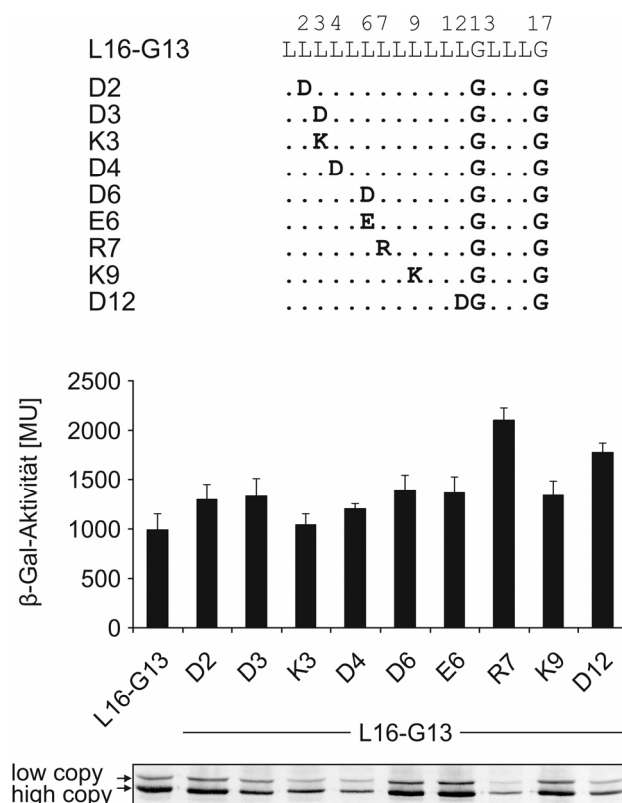
**Abb. I: Funktionelle Komplementierung der Male-Defizienz transformierter PD28-Zellen zur Kontrolle der korrekten Integration ( $N_{\text{innen}} - C_{\text{außen}}$ ) der ToxR-Proteine in die innere Bakterienmembran. (Legende siehe nächste Seite)**

**Abb. I: Funktionelle Komplementierung der MalE-Defizienz transformierter PD28-Zellen zur Kontrolle der korrekten Integration ( $N_{\text{innen}} - C_{\text{außen}}$ ) der ToxR-Proteine in die innere Bakterienmembran.** Datenpunkte repräsentieren die mittlere Zelldichte ( $OD_{650}$ ) zweier parallel angesetzter PD28-Kulturen, welche ein und dasselbe ToxR-Konstrukt exprimieren, gemessen nach den angegebenen Zeitpunkten. Als Referenz diente ein ToxR-Protein ohne TMD ( $\Delta TM$ ) sowie die TMDn AZ2, GpA und C65. **a)** Typische Wachstumskinetiken von PD28-Zellen, welche die TMD von GpA oder Mutanten davon exprimieren. Da alle Konstrukte mit TMD das Wachstum von PD28-Zellen in ähnlichem Maße fördern, kann davon ausgegangen werden, dass diese effizient und mit korrekter Orientierung in die Membran integriert sind. **b)** Wachstumskinetiken ToxR- $\alpha$ IIb, ToxR- $\beta$ 3 und Mutanten exprimierender PD28-Zellen. Alle ToxR-TMD Proteine, mit Ausnahme von  $\beta$ 3-L712R, befähigen PD28-Zellen gleichermaßen zum Wachstum auf Maltose als einziger Kohlenstoffquelle. Dies lässt darauf schließen, dass diese effizient in die Membran integrieren. Nur die Konzentration von  $\beta$ 3-L712R in der Membran scheint etwas unter der aller anderen Konstrukte zu liegen. **c)** Zelldichte von PD28-Kulturen, welche die TMD LS36 oder deren Mutanten exprimieren, über die Zeit. Alle Mutanten unterstützen das Wachstum von PD28-Zellen ebenso stark wie die parentale TMD. Dies bestätigt ihre korrekte und effiziente Membranintegration. **d)** Typische Wachstumskinetiken von PD28-Zellen, die LS49 oder deren Mutanten exprimieren. Mutanten fördern das Wachstum von PD28-Zellen mindestens so effizient wie das parentale Protein, was ihre effiziente Membraninsertion andeutet. **e)** Wachstumskinetiken von PD28-Zellen, die LS46 oder abgeleitete Mutanten exprimieren. LS46 exprimierende PD28-Kulturen erreichten eine bis zu acht mal so hohe Zelldichte wie  $\Delta TM$  exprimierende und eine etwa halb so hohe Zelldichte wie AZ2 exprimierende Kulturen. Dies lässt auf eine etwas verminderte, aber dennoch stattfindende Membranintegration des Konstrukts schließen. Die Mutanten ermöglichen PD28-Zellen ein mindestens so schnelles Wachstum wie das parentale ToxR-Protein. Mit zunehmender Substitution polarer Aminosäuren zu unpolaren Resten steigt die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. **f)** Selbiges trifft auf PD28-Zellen zu, die LS52 oder dessen Mutanten exprimieren. Auf die Auswirkungen variierender Konzentration dieser Konstrukte in der Membran auf die ToxR-Messungen wird in Abschnitt 4.3.2.1 eingegangen. **g)** und **h)** Wachstumskinetiken von PD28-Zellen, die die TMD L16 oder Mutanten davon exprimieren, welche z. T. oder komplett dem Aminosäuremuster von LS46 bzw. LS52 entsprechen. L16 exprimierende Zellen können effizient mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen. Mit zunehmender Anzahl polarer Reste in der L16-Wirtssequenz wird die MalE-Defizienz von PD28-Zellen immer weniger komplementiert. Alle PD28-Kulturen, die Mutanten exprimieren, weisen jedoch nach 23 h eine mindestens dreimal so hohe Zelldichte wie  $\Delta TM$  exprimierende Kulturen auf. Der mögliche Einfluss der Membranintegration dieser Konstrukte auf die im ToxR-Assay ermittelten Daten wird in Abschnitt 4.3.2.2 beschrieben. **i)** Wachstum von PD28-Zellen, welche die TMDn L16-G13 oder davon abgeleitete Modell-TMDn mit einer ionisierbaren Aminosäure exprimieren. Alle TMD enthaltenden Konstrukte fördern das Wachstum von PD28-Zellen mit vergleichbarer Effizienz, was auf ihre effiziente und korrekte Membranintegration hinweist.



**Abb. II: Schematische Darstellung von Wasserstoffbrückenbindungen, die His6 in LS49-Dimeren möglicherweise eingehen könnte.** Es sind die TMD-Kombinationen wiedergegeben, deren heterotypische Interaktion mittels des dominant-negativen ToxR\*-Assays untersucht wurde (siehe Abb. 4.8). Pfeile repräsentieren potentielle interhelikale Wasserstoffbrücken zwischen His6 und hydroxylierten Resten. Die Stärke der Pfeile spiegelt dabei die durch die Mutationsanalyse vorgeschlagene Bedeutung der entsprechenden Wasserstoffbrücke für die Assoziation von LS49 wider. Die Anzahl putativer interhelikaler Wasserstoffbrücken nimmt von der linken zur rechten Seite ab. **Links:** TMD-Paare, die mit relativ hoher Affinität interagieren. **Mitte:** TMDn mit mäßiger heterotypischer Affinität. **Rechts:** TMD-Kombinationen mit schwacher Heteromeraffinität.





**Abb. III: Homotypische TMD-TMD-Interaktion vermittelt durch überrepräsentierte Motive natürlicher TMDn mit ionisierbaren Resten und GxxxG.**

**Oben:** Aminosäuresequenz von L16-G13 und hergestellter Hybrid-TMDn. Kritische Reste sind fett gedruckt und ihre Positionen oberhalb der Sequenz angegeben. Punkte stehen für Leucine. Gly17 gehört zur Vektorsequenz. **Unten:** Selbstaffinitäten von Leu-Sequenzen mit aufgesetztem Motiv, dargestellt anhand der  $\beta$ -Gal-Aktivitäten exprimierender FHK12-Zellen (in MU; 0,0025 % (w/v) L-Arabinose; Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 12). Die Interaktion von L16-G13 löst etwa die 1,4-fache  $\beta$ -Gal-Aktivität wie L16 aus (Abb. 4.13, Abb. 4.14). Um den späteren Vergleich der  $\beta$ -Gal-Aktivitäten nach Koexpression der Konstrukte zu ermöglichen, wurden die hier verwendeten FHK12-Zellen doppelt mit den Plasmiden pToxRVII (*low copy number*) und pToxRIX (*high copy number*) transformiert. Beide Plasmide kodierten dabei die gleiche TMD. Unter dem Diagramm ist der 60-70 kDa Ausschnitt des dazugehörigen Western-Blots exprimierender FHK12-Zellen abgebildet. Pfeile deuten an, von welchem Plasmid das entsprechende Protein exprimiert wurde.

## Anhang B Tabellen

**Tab. I: Aminosäurezusammensetzung der 25.558 TMD-Sequenzen mit annotierter/vorhergesagter Länge oder mit einer vereinheitlichten Länge von 23 Resten innerhalb des nichtredundanten Datensatzes bitopischer Membranproteine. Die Datenbankerstellung und -analyse wurde von Angelika Fuchs (Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik, TU München) durchgeführt.**

Aminosäure	Auftreten von Aminosäuren in	
	annotierten/ vorhergesagten TMDn [%]	23 Reste umfassenden TMDn [%]
A	10,4	10,19
C	2,26	2,36
D	0,43	0,51
E	0,49	0,57
F	9,57	9,65
G	7,52	7,51
H	0,93	0,95
I	11,97	11,76
K	0,57	0,75
L	19,32	18,99
M	2,76	3,07
N	1,27	1,28
P	2,31	2,52
Q	0,85	0,96
R	0,87	0,76
S	5,59	5,94
T	4,34	4,65
V	12,17	11,85
W	2,46	2,31
Y	3,85	3,34
Gesamtzahl der Aminosäuren in TMDn	573.118	587.198

**Tab. II: Häufigkeit von Motiven, bestehend aus einem ionisierbaren Rest und einem GxxxG in verschiedenen Abständen zueinander, in der nichtredundanten Datenbank von 25.558 TMDn bitopischer Membranproteine mit einer TMD-Länge von 23 Aminosäuren (Legende siehe S. 124)**

Motiv	Häufigkeit		beobachtet/ erwartet <sup>3</sup>	Signifikanz <sup>4</sup> ( <i>p</i> )
	beobachtet <sup>1</sup>	erwartet <sup>2</sup>		
K-x <sub>10</sub> -GxxxG	11	8,67	1,27	0,2533
K-x <sub>9</sub> -GxxxG	24	9,76	2,46	0,0001
K-x <sub>8</sub> -GxxxG	14	10,84	1,29	0,2015
K-x <sub>7</sub> -GxxxG	9	11,92	0,75	0,2519
K-x <sub>6</sub> -GxxxG	17	13,01	1,31	0,1625
K-x <sub>5</sub> -GxxxG	15	14,09	1,06	0,4353
K-x <sub>4</sub> -GxxxG	17	13,53	1,26	0,2030
K-x <sub>3</sub> -GxxxG	25	14,49	1,73	0,0071
K-x <sub>2</sub> -GxxxG	8	15,46	0,52	0,0284
KxGxxxG	14	16,42	0,85	0,3272
KGxxxG	14	17,39	0,81	0,2482
GxxxGK	20	17,39	1,15	0,2947
GxxxGxK	24	16,42	1,46	0,0451
GxxxG-x <sub>2</sub> -K	12	15,46	0,78	0,2291
GxxxG-x <sub>3</sub> -K	16	14,49	1,10	0,3795
GxxxG-x <sub>4</sub> -K	25	13,53	1,85	0,0031
GxxxG-x <sub>5</sub> -K	10	14,09	0,71	0,1720
GxxxG-x <sub>6</sub> -K	16	13,01	1,23	0,2340
GxxxG-x <sub>7</sub> -K	12	11,92	1,01	0,5260
GxxxG-x <sub>8</sub> -K	16	10,84	1,48	0,0828
GxxxG-x <sub>9</sub> -K	13	9,76	1,33	0,1835
GxxxG-x <sub>10</sub> -K	8	8,67	0,92	0,6334
R-x <sub>10</sub> -GxxxG	10	8,79	1,14	0,3815
R-x <sub>9</sub> -GxxxG	12	9,89	1,21	0,2874
R-x <sub>8</sub> -GxxxG	13	10,98	1,18	0,3064
R-x <sub>7</sub> -GxxxG	17	12,08	1,41	0,1040
R-x <sub>6</sub> -GxxxG	16	13,18	1,21	0,2494
R-x <sub>5</sub> -GxxxG	25	14,28	1,75	0,0061
R-x <sub>4</sub> -GxxxG	22	15,77	1,39	0,0781
R-x <sub>3</sub> -GxxxG	20	16,90	1,18	0,2538
R-x <sub>2</sub> -GxxxG	17	18,02	0,94	0,4655
RxGxxxG	15	19,15	0,78	0,2025
RGxxxG	17	20,28	0,84	0,2739
GxxxGR	25	20,28	1,23	0,1702
GxxxGxR	16	19,15	0,84	0,2782
GxxxG-x <sub>2</sub> -R	13	18,02	0,72	0,1390
GxxxG-x <sub>3</sub> -R	19	16,90	1,12	0,3348
GxxxG-x <sub>4</sub> -R	12	15,77	0,76	0,2065
GxxxG-x <sub>5</sub> -R	13	14,28	0,91	0,4390
GxxxG-x <sub>6</sub> -R	11	13,18	0,83	0,3384
GxxxG-x <sub>7</sub> -R	17	12,08	1,41	0,1040
GxxxG-x <sub>8</sub> -R	12	10,98	1,09	0,4154
GxxxG-x <sub>9</sub> -R	10	9,89	1,01	0,5244
GxxxG-x <sub>10</sub> -R	14	8,79	1,59	0,0626

Tab. II (fortgesetzt; Legende siehe nächste Seite)

Motiv	Häufigkeit		beobachtet/ erwartet <sup>3</sup>	Signifikanz <sup>4</sup> ( <i>p</i> )
	beobachtet <sup>1</sup>	erwartet <sup>2</sup>		
D-x <sub>10</sub> -GxxxG	15	5,90	2,54	0,0012
D-x <sub>9</sub> -GxxxG	12	6,63	1,81	0,0379
D-x <sub>8</sub> -GxxxG	13	7,37	1,76	0,0375
D-x <sub>7</sub> -GxxxG	12	8,11	1,48	0,1182
D-x <sub>6</sub> -GxxxG	15	8,85	1,70	0,0360
D-x <sub>5</sub> -GxxxG	12	9,58	1,25	0,2541
D-x <sub>4</sub> -GxxxG	14	10,02	1,40	0,1351
D-x <sub>3</sub> -GxxxG	11	10,73	1,02	0,5000
D-x <sub>2</sub> -GxxxG	11	11,45	0,96	0,5000
DxGxxxG	12	12,17	0,99	0,5000
DGxxxG	22	12,88	1,71	0,0120
GxxxGD	12	12,88	0,93	0,4752
GxxxGxD	9	12,17	0,74	0,2256
GxxxG-x <sub>2</sub> -D	7	11,45	0,61	0,1142
GxxxG-x <sub>3</sub> -D	9	10,73	0,84	0,3683
GxxxG-x <sub>4</sub> -D	11	10,02	1,10	0,4193
GxxxG-x <sub>5</sub> -D	8	9,58	0,83	0,3848
GxxxG-x <sub>6</sub> -D	13	8,85	1,47	0,1116
GxxxG-x <sub>7</sub> -D	9	8,11	1,11	0,8378
GxxxG-x <sub>8</sub> -D	8	7,37	1,09	0,4535
GxxxG-x <sub>9</sub> -D	10	6,63	1,51	0,1328
GxxxG-x <sub>10</sub> -D	7	5,90	1,19	0,3746
E-x <sub>10</sub> -GxxxG	8	6,59	1,21	0,3380
E-x <sub>9</sub> -GxxxG	5	7,41	0,67	0,2531
E-x <sub>8</sub> -GxxxG	13	8,24	1,58	0,0747
E-x <sub>7</sub> -GxxxG	9	9,06	0,99	0,5824
E-x <sub>6</sub> -GxxxG	16	9,89	1,62	0,0440
E-x <sub>5</sub> -GxxxG	9	10,71	0,84	0,3760
E-x <sub>4</sub> -GxxxG	9	10,44	0,86	0,4030
E-x <sub>3</sub> -GxxxG	13	11,19	1,16	0,3310
E-x <sub>2</sub> -GxxxG	17	11,93	1,42	0,0958
ExGxxxG	12	12,68	0,95	0,4983
EGxxxG	12	13,42	0,89	0,4160
GxxxGE	12	13,42	0,89	0,4160
GxxxGxE	12	12,68	0,95	0,4983
GxxxG-x <sub>2</sub> -E	15	11,93	1,26	0,2203
GxxxG-x <sub>3</sub> -E	8	11,19	0,72	0,2138
GxxxG-x <sub>4</sub> -E	7	10,44	0,67	0,1812
GxxxG-x <sub>5</sub> -E	12	10,71	1,12	0,2541
GxxxG-x <sub>6</sub> -E	14	9,89	1,42	0,0652
GxxxG-x <sub>7</sub> -E	9	9,06	0,99	0,7058
GxxxG-x <sub>8</sub> -E	9	8,24	1,09	0,3177
GxxxG-x <sub>9</sub> -E	10	7,41	1,35	0,1328
GxxxG-x <sub>10</sub> -E	10	6,59	1,52	0,0760

**Legende Tab. II:**

<sup>1</sup>Beobachtete Häufigkeit eines Motivs in der TMD-Datenbank bitopischer Membranproteine.

<sup>2</sup>Erwartete Häufigkeit eines Motivs die, wenn möglich, mit dem TMSTAT-Formalismus [19] berechnet wurde. Für Motive, deren Aminosäuren um mehr als fünf Positionen getrennt sind, ergibt sich die erwartete Häufigkeit aus der Häufigkeit betreffender Reste in der Datenbank (Tab. I), der Länge der TMD-Sequenzen (23 Reste), der Länge des gesuchten Motivs und der Anzahl von TMD-Sequenzen in der Datenbank (25.558) [145].

<sup>3</sup>Verhältnis aus beobachteter und erwarteter Häufigkeit eines Motivs; ein Wert  $<1$  zeigt die Unter- und ein Wert  $>1$  die Überrepräsentation eines Motivs in der TMD-Datenbank an.

<sup>4</sup>Signifikanz der Abweichung zwischen beobachteter und erwarteter Häufigkeit, ermittelt aus der Binomialverteilung der erwarteten Häufigkeit.

## Eigene Veröffentlichungen

Herrmann, J.R., Fuchs, A., Panitz, J.C., Eckert, T., Unterreitmeier, S., Frishman, D. und Langosch, D. (2010) Ionic interactions promote transmembrane helix-helix association depending on sequence context. *J Mol Biol.*, 396, 452-461.

Poschner, B.C., Fischer, K., Herrmann, J.R., Hofmann, M.W. und Langosch D. (2010) Structural features of fusogenic model transmembrane domains that differentially regulate inner and outer leaflet mixing in membrane fusion. *Mol Membr Biol.*, 27, 1-11.

Herrmann, J.R.\*, Panitz, J.C.\*, Unterreitmeier, S.\*, Fuchs, A., Frishman, D. und Langosch, D. (2009) Complex patterns of histidine, hydroxylated amino acids and the GxxxG motif mediate high-affinity transmembrane domain interactions. *J Mol Biol.*, 385, 912-923.

\* Autoren haben gleichermaßen zum Artikel beigetragen

Herrmann, J.R., Panitz, J.C., Unterreitmeier, S. und Langosch D. (2008) Nature's formula for high-affinity transmembrane domain interaction: histidine and hydroxylated amino acids cooperate with a GxxxG motif. ELSO 2008 – The 7th international congress of the European Life Scientist Organization

Churchward, M.A., Rogasevskaia, T., Höfgen, J., Bau, J. und Coorsen, J.R. (2005) Cholesterol facilitates the native mechanism of Ca<sup>2+</sup>-triggered membrane fusion. *J Cell Sci.*, 118, 4833-4848.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Roswitha Jana Herrmann (geb. Höfgen)  
 Geburtsdatum/-ort: 12.10.1981, Dresden  
 Wohnsitz: Lehnertstrasse 8, 01324 Dresden

## Schulische Ausbildung

1988 – 1992 49. und 55. Polytechnische Oberschule Dresden  
 1992 – 2000 Gymnasium Dresden Plauen  
 Allgemeine Hochschulreife

## Akademische Ausbildung

2000 – 2003 Studium Molekulare Biotechnologie an der TU Dresden  
 Abschluss: Bachelor of Science  
 Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Allgemeine Genetik:  
 „Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen von Enzymen der  
 Ubiquinon-Biosynthese mittels der Tandem-Affinity-Purification Methode“

2003 – 2006 Studium Molekulare Biotechnologie an der TU München  
 Abschluss: Master of Science  
 Masterarbeit am Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere:  
 „Membranfusogene Eigenschaften hydrophober Modellpeptide bei deren  
 Zugabe zu rekonstituierten Liposomen“

seit März 2006 Promotion am Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere  
 von Prof. Dr. D. Langosch, TU München

## Sonstige Tätigkeiten

09/2002 – 10/2002 Praktikum elbion AG, Radebeul (heute: Biotie Therapies Corp.),  
 Bereich Metabolismus/Pharmakokinetik

04/2004 – 07/2004 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik, TU München

01/2005 – 06/2005 Forschungspraktikum am Institut für Physiologie und Biophysik,  
 Universität von Calgary, Kanada

**Sprachkenntnisse** Englisch, Grundkenntnisse Russisch