

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere

**Selektion und Charakterisierung
hochaffiner Transmembrandomänen aus
kombinatorischen Plasmidbanken**

Stephanie Unterreitmeier

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 (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. D. Langosch
2. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Die Dissertation wurde am 31.10.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 01.02.2008 angenommen.

Für meine Familie

*“The unknown is what scientists live for,
And it is clear that membrane proteins
Will provide a wonderful scientific playground
For years to come.”*

(James U. Bowie, 2000)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Langosch für die Überlassung des interessanten Projekts, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, die anregenden Diskussionen und die gewährte forschersiche Freiheit.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer für die Zweitbegutachtung dieser Arbeit.

Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Insbesondere bei Jana Herrmann, Malte Ahrens und Johanna Panitz möchte ich mich für ihre immerwährende Diskussionsbereitschaft, ihre hilfreichen Ratschläge und das überaus angenehme Arbeitsklima bedanken.

Barbara Rauscher danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die technische Unterstützung, Johanna Panitz, Teresa Schäffler und Roland Heym für ihre produktive Mitarbeit an meinem Projekt und Angelika Fuchs vom Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik für die Durchführung der Datenbankanalysen und die gute Zusammenarbeit.

Mein großer Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie für ihre stete Hilfe. Bei meinen Eltern möchte ich mich zudem für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums und somit die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken.

Besonders möchte ich mich jedoch bei Rolf bedanken, der mich durch seine unendliche Geduld, seine Unterstützung in allen meinen Entscheidungen und seine Zuneigung stets aufs Neue für die tägliche Laborarbeit motiviert hat und so wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung	11
Summary	12
1. Einleitung	13
1.1 Membranen und Membranproteine.....	13
1.2 Wechselwirkung α -helikaler TMDn.....	18
1.3 Detektion und Analyse affiner TMDn.....	24
1.4 Erstellung kombinatorischer Plasmidbanken.....	29
2. Ziel der Arbeit	32
3. Material und Methoden	33
3.1 Materialien.....	33
3.1.1 Allgemeine Chemikalien.....	33
3.1.2 Lösungen, Puffer und Medien.....	33
3.1.3 Bakterienstämme.....	33
3.1.4 Plasmide.....	34
3.1.5 Antibiotika.....	34
3.1.6 Enzyme und Antikörper.....	34
3.1.7 Größenstandards.....	34
3.1.8 Kits.....	35
3.1.9 Oligonucleotide.....	35
3.1.10 Geräte und Auswertungssoftware.....	36
3.2. Molekularbiologische Methoden.....	37
3.2.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	37
3.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	37
3.2.1.2. Herstellung elektrokompenter Zellen.....	37
3.2.2 Transformation kompetenter Zellen.....	38
3.2.2.1 Hitzeschocktransformation.....	38
3.2.2.2 Elektroporation.....	38

3.3. Präparative und analytische DNA-Methoden.....	38
3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	38
3.3.2 Restriktionsverdau.....	39
3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	39
3.3.4 Reinigung von DNA-Fragmenten.....	40
3.3.5 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	40
3.3.6 Kassettenklonierung.....	40
3.3.7 Ortsgerichtete Mutagenese.....	41
3.3.8 DNA-Sequenzierung.....	42
3.3.9 Erstellung der kombinatorischen Plasmidbanken.....	43
3.3.9.1 Erstellung der Plasmidbank SU1.....	43
3.3.9.2 Erstellung der Plasmidbank JP1.....	45
3.4 Protein- und immunchemische Methoden.....	46
3.4.1 Überexpression der ToxR-Proteine in TOP10-Zellen.....	46
3.4.2 SDS-PAGE.....	46
3.4.3 Western-Blotting.....	48
3.5 Methoden zur Selektion und Analyse affiner TMDn.....	49
3.5.1 Positivselektion mittels ToxR/POSSYCCAT.....	49
3.5.1.1 Bestimmung der Überlebensraten verschieden affiner TMDn.....	49
3.5.1.2. Selektion affiner TMDn aus kombinatorischen Banken.....	50
3.5.2 Analyse affiner TMDn.....	50
3.5.2.1 ToxR-Assay zur Bestimmung der relativen TMD-TMD-Affinitäten.....	50
3.5.2.2 PD28-Wachstumsassay zur Kontrolle der Membranintegration.....	51
3.5.2.2.1 PD28-Standardtest.....	52
3.5.2.2.2 PD28-Schnelltest.....	52
3.5.2.3 Western-Blot-Analyse zur Kontrolle des Expressionslevels.....	53
4. Ergebnisse.....	54
4.1 Verwendung der Promotoren <i>ctx</i> und <i>ompU</i> zur Selektion affiner TMDn.....	54
4.1.1 Verwendete Referenzkonstrukte.....	54
4.1.2 Abhängigkeit der Überlebensraten von der TMD-TMD-Affinität.....	55
4.1.2.1 Positive Korrelation zwischen TMD-TMD-Affinität und Überlebensfähigkeit in Chr3 (<i>ctx</i>).....	56

4.1.2.2 Positive Korrelation zwischen TMD-TMD-Affinität und Überlebensfähigkeit in EL61 (<i>ompU</i>).....	57
4.2 Selektion affiner TMDn aus den partiell randomisierten Plasmidbanken SU1 und JP1.....	58
4.2.1 Affine TMDn aus der Bank SU1.....	59
4.2.2 Affine TMDn aus der Bank JP1.....	62
4.3 Anreicherung von Phe in hochaffinen TMDn aus SU1 und seine Assoziation mit GxxxG-Motiven.....	64
4.4 Positionsspezifische Anreicherung von His in mittel- bis hochaffinen TMDn aus JP1.....	68
4.5 Alternierendes Auftreten potentiell gegensätzlich geladener Aminosäuren in hochaffinen TMDn aus JP1.....	74
4.6 Mutationsanalyse von FxxGxxxG.....	75
4.6.1 FxxGxxxG fördert die Interaktion aus SU1 selektierter TMDn.....	76
4.6.2 FxxGxxxG-vermittelte Interaktion anderer artifizieller TMDn	78
4.6.3 Phe fördert die GxxxG-vermittelte Selbstassoziation der TMD von GpA.....	80
4.6.4 FxxGxxxG trägt zur Selbstassoziation der G-Protein-TMD des Vesikulären Stomatitis Virus bei.....	82
4.6.5 Die Stabilisierung membranständiger GxxxG-Motive durch Phe hängt vom Abstand zwischen Phe und GxxxG ab.....	83
4.7 Mutationsanalyse von His.....	85
5. Diskussion.....	88
5.1 Funktioneller Vergleich der Promotoren <i>ctx</i> und <i>ompU</i>	88
5.2 Qualität der partiell randomisierten Plasmidbanken SU1 und JP1.....	89
5.3 Phe fördert die Interaktion von TMDn über GxxxG-Motive.....	90
5.3.1 Identifikation des FxxGxxxG-Interaktionsmotivs durch Selektion affiner TMDn aus der Bank SU1.....	90
5.3.2 Das FxxGxxxG-Motiv in natürlichen TMDn.....	91
5.3.3 Potentielle Mechanismen der Stabilisierung GxxxG-vermittelter, homotypischer TMD-TMD-Interaktionen durch Phe.....	94
5.4 His fördert die Interaktion von TMDn.....	98
5.4.1 Identifikation der von His vermittelten Interaktion von TMDn durch Selektion affiner TMDn aus der Bank JP1.....	98

5.4.2 His in natürlichen TMDn.....	99
5.4.3 Potentielle Mechanismen der Stabilisierung homotypischer TMD-TMD-Interaktionen durch His.....	101
5.5 Förderung der Interaktion von TMDn durch gegensätzlich ionisierbare Aminosäuren.....	103
5.6 Schlussfolgerung und Ausblick.....	104
6. Literaturverzeichnis.....	107
Abbildungsverzeichnis.....	124
Tabellenverzeichnis.....	125
Anhang.....	126
A. Tabellen.....	126
B. Abbildungen.....	132
Eigene Veröffentlichungen.....	136
Lebenslauf.....	137

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
A_x	Absorption bei $\lambda = x$ nm
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
Abb.	Abbildung
A. dest.	destilliertes Wasser
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>araBAD</i>	Promotor des Arabinose-Operons
as	antisense
β	Neigungswinkel
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
β -Gal	β -Galactosidase
BNIP3	Bcl-2/19-kDa interacting protein 3
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Cm	Chloramphenicol
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
C-terminal	carboxyterminal
<i>ctx</i>	Choleratoxin-Promotor
d	Tag
Da	Dalton ($1 \text{ Da} = 1,66 \times 10^{-27} \text{ kg}$)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
F	Farad
g	Gramm
GpA	Glycophorin A
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRD	Infrarotfarbstoff
kb	Kilobasen
Km ^R	Kanamycin-Resistenz
l	Liter ($1 \text{ l} = 10^{-3} \text{ m}^3$)
<i>lacZ</i>	β -Galactosidase-Gen

M	molar
<i>malE</i>	Maltosebindeprotein-Gen
MalE	Maltosebindeprotein
MalE ⁻	MalE-Defizienz
MilliQ-H ₂ O	deionisiertes Wasser
min	Minute
MU	Miller Units
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
N-terminal	aminoterminal
OD _x	Optische Dichte bei $\lambda = x$ nm
<i>ompU</i>	Promotor des äußeren Membranproteins OmpU
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
<i>p</i>	Signifikanz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB-ID	Kennnummer eines Eintrags in der Protein Data Bank
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
POSSYCCAT	positive selection system based on chromosomally integrated chloramphenicol acetyltransferase
pToxR(IV)	ToxR(IV)-Plasmid
rATP	Riboadenosintriphosphat
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
s	Sekunde; sense
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SRP	Signalerkennungspartikel
Str ^R	Streptomycin-Resistenz
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
TMD	Transmembrandomäne
<i>tox</i>	Promotor des ToxR-Transkriptionsaktivators
ToxR	ToxR-Transkriptionsaktivator
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TZ	Tischzentrifuge
U	Unit (1 U = 16,67 nkat)
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
V _{max}	maximale Steigung der Reaktionskurve
vs.	versus
VSV-G	G-Protein des Vesikulären Stomatitis Virus

W	Watt
Wt	Wildtyp
ZF	Zentrifuge
Ω	Kreuzungswinkel; Ohm
°	Grad
°C	Grad Celsius
%	Prozent (1 % = 0,01)
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

IUB-Code der Nucleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
S	C/G
B	C/G/T
D	A/G/T
N	A/C/G/T

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

Wechselwirkungen α -helikaler Transmembrandomänen spielen eine wesentliche Rolle bei der Faltung und Oligomerisierung integraler Membranproteine. Um neue Sequenzmotive aufzudecken, die diese Interaktionen vermitteln, wurde eine Oberfläche einer Transmembranhelix mit einem Satz nichtpolarer oder mäßig polarer Aminosäuren oder mit allen natürlich vorkommenden Aminosäuren randomisiert. Sequenzen, die imstande sind, nach Integration in die bakterielle innere Membran mit sich selbst zu interagieren, wurden mittels des ToxR/POSSYCCAT-Systems selektiert.

Ein Vergleich der nieder- bis mittelauffinen und hochaffinen Sequenzen aus der ersten kombinatorischen Bank legt offen, dass Phenylalanin in hochaffinen Sequenzen stark angereichert ist und häufig an der -3 Position von GxxxG-Motiven zu finden ist, was FxxGxxxG-Motive ergibt. Die Mutation von Phe oder GxxxG in selektierten Sequenzen verringert die Selbstinteraktion dieser Transmembrandomänen signifikant, ohne ihre Membraninsertionseffizienz zu beeinträchtigen. Umgekehrt führt das Aufsetzen des FxxGxxxG-Motivs auf andere Transmembrandomänen zu einer deutlichen Verstärkung ihrer Wechselwirkung. Dasselbe Motiv trägt zur Selbstassoziation der G-Protein-Transmembrandomäne des Vesikulären Stomatitis Virus bei. Dies steht im Einklang mit der signifikanten Überrepräsentation von FxxGxxxG in Transmembrandomänen bitopischer Membranproteine. Folglich stabilisiert Phe membranständige GxxxG-Motive.

Ein Vergleich der nicht- bis niederauffinen und mittel- bis hochaffinen Sequenzen aus der zweiten kombinatorischen Bank bringt zum Vorschein, dass Histidin in mittel- und hochaffinen Sequenzen stark angereichert ist und häufig von kleineren, mäßig polaren Aminosäuren flankiert wird. Die Mutation von His in selektierten Sequenzen verringert in zwei aus drei Fällen die Selbstinteraktion dieser Transmembrandomänen signifikant, ohne ihre Membraninsertionseffizienz zu beeinträchtigen. Folglich ist His für ihre Interaktion kritisch. Weiterführende Mutationsanalysen bekräftigen, dass kleine, polare Aminosäuren an benachbarten Positionen mit His in der homotypischen Interaktion von Transmembrandomänen kooperieren. Ein ähnliches Motiv trägt zur Selbstassoziation der BNIP3-Transmembrandomäne bei.

Dies sind zwei Beispiele, die beleuchten, wie der Einfluss bestimmter Seitenketten auf Helix-Helix-Wechselwirkungen vom Sequenzkontext reguliert wird.

Summary

Interactions of transmembrane helices play a crucial role in the folding and oligomerisation of integral membrane proteins. In order to uncover novel sequence motifs mediating these interactions, we randomised one face of a transmembrane helix with a set of non-polar or moderately polar amino acids or with all naturally occurring amino acids. Those sequences capable of self-interaction upon integration into bacterial inner membranes were selected by means of the ToxR/POSSYCCAT system.

A comparison between low/medium-affinity and high-affinity sequences from the first combinatorial library reveals that high-affinity sequences are strongly enriched in phenylalanine residues that are frequently observed at the -3 position of GxxxG motifs, thus yielding FxxGxxxG motifs. Mutation of Phe or GxxxG in selected sequences significantly reduces self-interaction of the transmembrane domains without affecting their efficiency of membrane integration. Conversely, grafting FxxGxxxG onto unrelated transmembrane domains strongly enhances their interaction. The same motif contributes to self-interaction of the Vesicular Stomatitis Virus G protein transmembrane domain. This is in line with the observation that FxxGxxxG is significantly overrepresented in transmembrane domains of bitopic membrane proteins. Thus, Phe stabilises membrane-spanning GxxxG motifs.

A comparison between non-interacting/low-affinity and medium/high-affinity sequences from the second combinatorial library reveals that medium/high-affinity sequences are strongly enriched in histidine residues that are frequently flanked by smaller and moderately polar amino acids. Mutation of His in two out of three selected sequences significantly reduces self-interaction of the transmembrane domains without affecting their efficiency of membrane integration. Thus, His is critical for their interaction. Further mutational studies confirm that small and polar amino acids at adjacent positions cooperate with His in homotypic transmembrane domain interactions. A similar motif contributes to the self-association of the BNIP3 transmembrane domain.

These are two examples illuminating how the role of certain side-chains in helix-helix interfaces is modulated by sequence context.

1. Einleitung

1.1 Membranen und Membranproteine

Membranen sind für lebende Organismen essentiell. Sie grenzen Zellen von ihrer Umgebung ab und schaffen Kompartimente in ihrem Inneren. So ermöglichen sie die Aufrechterhaltung distinkter physikochemischer Bedingungen im Cytoplasma und in den Zellorganellen. Biologische Membranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, deren Fluidität u. a. von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der Phospholipide und, bei eukaryotischen Membranen, vom Cholesterolgehalt abhängt. Die Dicke der Membran beträgt ca. 60 Å. Die Acylketten der Phospholipide bilden die ca. 30 Å dicke, hydrophobe Kernregion der Membran, ihre polareren Kopfgruppen bilden die je ca. 15 Å dicken Membran/Wasser-Grenzflächen. Die Polarität nimmt vom wässrigen Milieu über die Membran/Wasser-Grenzflächen zur Kernregion hin drastisch ab. Die Membran stellt also ein komplexes, heterogenes Milieu dar [1]. Im Fluid-Mosaik-Modell von Singer & Nicolson (1972) ähneln Membranen zweidimensionalen viskosen Flüssigkeiten, in denen Membranproteine in der Membranebene frei diffundieren können [2]. In der heutigen Vorstellung der Membranstruktur sind verschiedene Lipidspezies nicht nur asymmetrisch über das cyto- und exoplasmatische Leaflet des Bilayers verteilt, sondern ebenso auf lateraler Ebene organisiert. So entstehen Membranregionen variabler Zusammensetzung und Dicke, sog. Mikrodomänen oder „Rafts“ [3].

Membranproteine spielen in zellulären Prozessen eine zentrale Rolle. Während Membranen Permeabilitätsbarrieren sind, ermöglichen Membranproteine u. a. einen gerichteten Stofftransport, den Signalaustausch, die Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Erkennung und die Energiegewinnung. Man unterscheidet zwischen peripheren und integralen Membranproteinen, welche also entweder mit der Membran assoziiert oder in sie eingebettet sind. Etwa 20 bis 30 % aller bekannten Gene codieren für integrale Membranproteine [4-6]. Diese sind entweder bi- oder polytopisch, sie besitzen also eine oder mehrere Transmembrandomänen (TMDn). Die Gesamtheit der integralen Membranproteine ist im Wesentlichen auf zwei Bauprinzipien beschränkt: α -Helixbündel und β -Barrel (Abb. 1). Ungefaltete Polypeptidketten können die apolare Membran nicht durchspannen, da eine transmembrane Konfiguration aufgrund der freiliegenden polaren Peptidbindungen

energetisch ungünstig ist. Nur durch Faltung zu α -helikalen oder β -Faltblatt-Strukturen kann das Wasserstoffbrücken-Potential des ins nichtwässrige Milieu der Membran eingebetteten Polypeptidrückgrats maximal abgesättigt werden [1, 7]. Proteine des β -Barrel-Typs findet man in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und in der äußeren Mitochondrien- und Chloroplastenmembran, wo sie meist als Poren der passiven Diffusion kleiner Moleküle dienen. Im Gegensatz dazu findet man α -helikale Membranproteine in allen zellulären Membranen. Sie sind zahlreicher und strukturell sowie funktionell vielfältiger als β -Barrel-Proteine. Zudem beinhalten sie nahezu alle medizinisch relevanten Membranproteine wie z.B. Rezeptoren, Transporter, Kanäle und Enzyme. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit α -helikalen Membranproteinen.

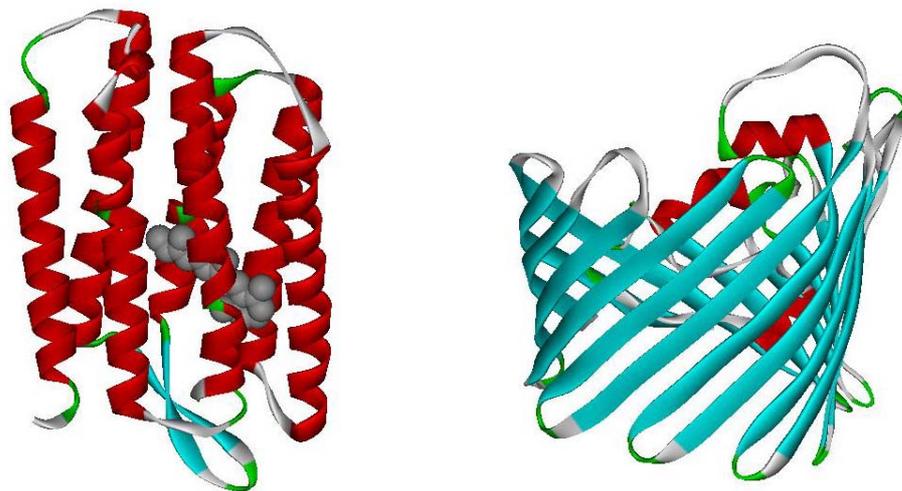


Abb. 1: Repräsentative Strukturen von Membranproteinen. Links: lichtgetriebene Protonenpumpe Bacteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* mit gebundenem Retinal in 1,55 Å Auflösung ([8], PDB-ID 1c3w, α -Helixbündel). **Rechts:** Porin aus *Rhodobacter capsulatus* in 1,8 Å Auflösung ([9], PDB-ID 2por, β -Barrel). Die Abbildung wurde mit DS ViewerPro 5.0 generiert.

Um den ca. 30 Å dicken, hydrophoben Kernbereich einer Membran zu durchspannen, muss eine senkrecht zur Membranebene verlaufende, kanonische α -Helix ca. 20 hydrophobe Aminosäurereste umfassen. Jede Windung dieser rechtsgängigen, schraubenförmigen Struktur umfasst dabei 3,6 Aminosäurereste. Die axiale Verschiebung pro Rest beträgt 1,5 Å, jeder Rest ist gegenüber dem vorangegangenen um ca. 100° verdreht.

Tatsächlich beträgt die Länge einer α -helikalen TMD typischerweise 20 bis 30 Aminosäurereste [10-13]. Weicht die hydrophobe Länge der α -helikalen TMD von der hydrophoben Dicke der umgebenden Membran ab, resultiert daraus ein sog. hydrophober „Mismatch“, welcher u. a. eine Rolle bei der Proteinsortierung spielt. Eine strukturelle Anpassung der Membranproteine an die hydrophobe Dicke des umgebenden Bilayers kann durch eine Konformationsänderung des Proteinrückgrats, durch eine Veränderung der Orientierung der TMDn, d.h. ihres Neigungswinkels bezüglich der Membrannormalen, oder durch eine Rotation der Seitenketten an den helikalen Enden erfolgen. Eine weitere Möglichkeit der strukturellen Reorganisation von Membranproteinen, welche den hydrophoben „Mismatch“ minimiert, ist die laterale Assoziation der TMDn, um ihren Kontakt mit dem umgebenden Lipidbilayer oder wässrigen Milieu einzuschränken [14, 15].

Faltung und Membraninsertion sind miteinander gekoppelt (eine detaillierte Beschreibung des thermodynamischen Formalismus findet sich in [1]). Polypeptidketten ausreichender Länge und Hydrophobizität können spontan in Lipidmembranen insertieren, wenn sie unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen ihrer Peptidbindungen eine α -helikale Konfiguration einnehmen. Die Insertion von TMDn ist stabil, da die Spaltung der entstandenen nichtkovalenten Bindungen energetisch ungünstig ist. Korrekt gefaltete und stabil integrierte Membranproteine befinden sich daher in einem Energieminimum [1, 7, 16].

Die meisten konstitutiven α -helikalen Membranproteine werden mit Hilfe einer Proteintranslokationsmaschinerie unter Aufwendung metabolischer Energie in Membranen integriert. In Bakterien gibt es verschiedene Mechanismen der Membranintegration. Die Faltung und Insertion von Membranproteinen wird in Prokaryoten hauptsächlich vom SecYEG-Translocon vermittelt. Des Weiteren kann sie über einen SecA/SecB-abhängigen Weg oder durch YidC erfolgen [17, 18]. In Eukaryoten wird die Integration von Membranproteinen zumeist vom Sec61-Translocon vermittelt (Abb. 2). Integrale Membranproteine werden dabei in einem cotranslationalen Prozess, d.h. während ihrer Synthese am Ribosom, durch spezifische Wechselwirkung des Signalpeptids oder ihres ersten hydrophoben Segments mit dem Signalerkennungspartikel (SRP, „Signal Recognition Particle“) erkannt. Unter Vermittlung des membrangebundenen SRP-Rezeptors und unter Hydrolyse von GTP erfolgt das Targeting der naszierenden Polypeptidkette zum Translocon-Komplex in der Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER). Dort erfolgt der Translokations-/

Insertionsprozess. Hydrophobe Segmente, d.h. Signalsequenzen (Start-Transfer-Signale) und hydrophobe TMDn (Signalanker-Sequenzen oder Stopp-Transfer-Signale), bewegen sich lateral aus dem Translokationskanal in die Lipidmembran. Ein Überblick über die Proteintranslokation und Biogenese von Membranproteinen findet sich u. a. in [19-23].

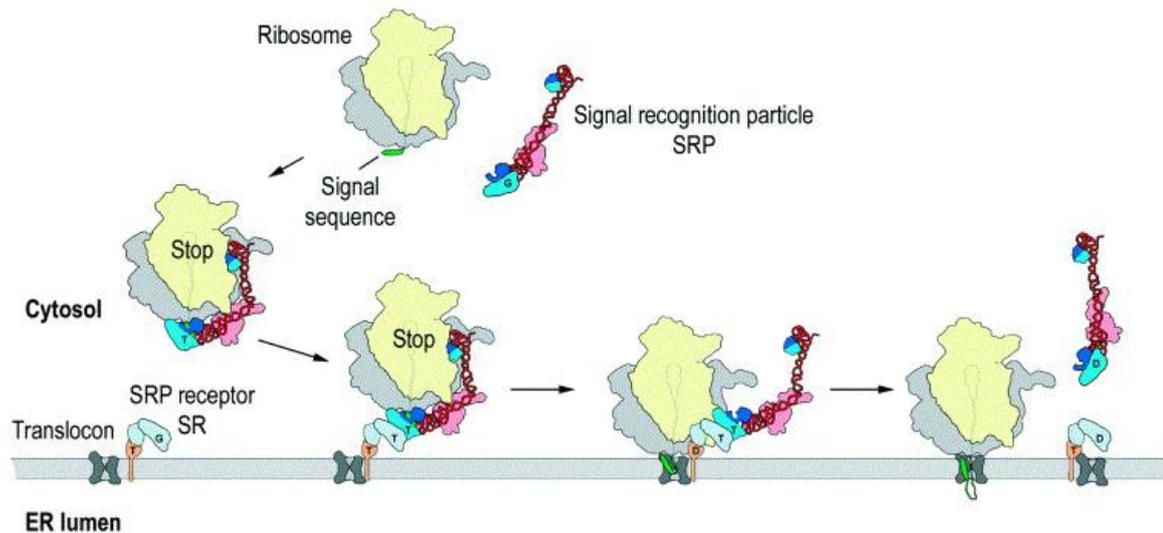


Abb. 2: Schematischer Überblick über das cotranslationale Targeting von Membranproteinen oder sekretorischen Proteinen zur eukaryotischen ER-Membran. Sobald das Signalpeptid aus dem ribosomalen Tunnel austritt, interagiert das Signalerkennungspartikel mit diesem; die Elongation wird verzögert. Das an den Komplex aus Ribosom und naszierender Polypeptidkette gebundene SRP wird durch Wechselwirkung mit dem membrangebundenen SRP-Rezeptor zur ER-Membran gelotst. Der Komplex aus Ribosom und naszierender Kette wird anschließend auf das Translocon übertragen. Die Translation am Ribosom läuft weiter, das SRP dissoziiert von seinem Rezeptor. Abbildung entnommen aus [24].

Die Topologie α -helikaler Membranproteine wird also augenscheinlich durch die Wechselwirkung der naszierenden Polypeptidketten mit der Proteintranslokationsmaschinerie festgelegt. Dabei wird die Orientierung der TMDn von positiv geladenen Aminosäureresten in den die TMDn flankierenden Regionen beeinflusst. Die sog. „Positive-Inside Rule“, die besagt, dass positiv geladene Arg- und Lys-Reste gehäuft auf der cytoplasmatischen (im Ggs. zur periplasmatischen bzw. extrazellulären) Seite von TMDn auftreten, scheint allgemeingültig zu sein; sie trifft vermutlich auf nahezu alle integralen Membranproteine pro- oder eukaryotischer Natur zu [4, 25-27]. Apolare Bereiche des Proteins bewirken somit die Membranintegration, positiv geladene Reste in den flankierenden Bereichen wirken als topogene Signale.

Ebenso scheinen Membranlipide direkt an der Insertion und Translokation von Proteinen beteiligt zu sein. Insbesondere für negativ geladene Phospholipide der inneren Membran von *E. coli* – diese besteht zu ca. 75 % aus dem zwitterionischen Lipid Phosphatidylethanolamin und zu ca. 20 % bzw. 5 % aus den negativ geladenen Lipiden Phosphatidylglycerol bzw. Cardiolipin – wird vermutet, dass sie durch elektrostatische Wechselwirkung mit den positiv geladenen Aminosäureresten zur Richtungsabhängigkeit der Membraninsertion beitragen. Indem sie positive Ladungen auf der *cis*-Seite der Membran zurückhalten, beeinflussen sie die Kinetik bzw. Thermodynamik des Translocon-vermittelten Insertionsprozesses. Auch ein indirekter Einfluss negativ geladener Membranlipide auf die Translokation bzw. Insertion (z.B. durch Steigerung der Insertionseffizienz oder Förderung der Aktivität von SecA oder durch Förderung der Bindung dieser Komponente an SecY) wird in Betracht gezogen [28, 29]. Zudem gibt es Hinweise, dass die Topologie von Membranproteinen durch das elektrochemische Potential der Membran sowie geladene Aminosäurereste des Translocons, welche mit flankierenden Ladungen hydrophober Segmente elektrostatisch wechselwirken, beeinflusst wird [30, 31].

Trotz der Tatsache, dass die Integration von Membranproteinen durch eine komplexe molekulare Maschine bewerkstelligt wird, häufen sich die Hinweise, dass schlichtweg direkte Protein-Lipid-Interaktionen für die Membraninsertion hydrophober Segmente ausschlaggebend sind. In einer vereinfachten Modellvorstellung der Translocon-katalysierten Insertion ermöglicht ein laterales „Gate“ im Translocon hydrophoben Segmenten, mit der hydrophoben Kernregion der Membran in Kontakt zu treten, ohne die Barriere, die die polaren Kopfgruppen des Bilayers darstellen, überwinden zu müssen. Demgemäß können sich putative TMDn je nach ihrer Länge und Hydrophobizität zwischen der wässrigen Phase im Kanal und der Lipidphase der umgebenden Membran verteilen und, sofern der Gewinn an freier Energie, der aus der Insertion hydrophober Reste resultiert, die Kosten der Insertion polarer und geladener Reste sowie des polaren Polypeptidrückgrats übersteigt, stabil in die Membran insertieren [21, 32]. Hinsichtlich der Insertion polytopischer Membranproteine ist es denkbar, dass das Translocon es zwei oder mehreren Helices ermöglicht, vor der Insertion in die Membran miteinander zu interagieren [32, 33]. So könnte beispielsweise die Insertion von TMDn, die polare Reste enthalten und daher nur geringfügig hydrophob sind, durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu benachbarten TMDn und eine damit einhergehende Hydrophobizitätszunahme begünstigt werden.

Dieser Effekt wurde in *in vitro*-Studien an Paaren Asn- oder Asp-haltiger TMDn bereits beobachtet und könnte daher für die Faltung polytopischer Membranproteine von Bedeutung sein [34].

In Anbetracht der Annahme, dass die Translocon-vermittelte Insertion von Membranproteinen größtenteils auf direkten Protein-Lipid-Interaktionen beruht, überrascht es nicht, dass die biologische Hydrophobizitätsskala [35], d.h. der Code, mittels dessen das Translocon Polypeptidsegmente zur Insertion auswählt, gut mit biophysikalischen Hydrophobizitätsskalen (z.B. der Wimley-White-Skala [1, 36]) sowie einer aus Strukturen von Membranproteinen abgeleiteten statistischen Hydrophobizitätsskala [37] übereinstimmt. In jedem Falle hängt die Integrationseffizienz nicht nur von der Aminosäurezusammensetzung der TMDn, sondern auch von ihrer Sequenz, d.h. der spezifischen Position individueller Reste, ab [35]. Kenntnisse über die Hydrophobizität von TMDn und die „Positive-Inside Rule“ ermöglichten die Entwicklung von Algorithmen (z.B. TMHMM [5]) zur Identifizierung von Membranproteinen und Vorhersage ihrer Topologie. Allgemein gebräuchliche Hydrophobizitätsskalen zur Erstellung von Hydropathie-Plots und somit Identifizierung von TMDn sind die Eisenberg-Konsensus-Skala [38], die Kyte-Doolittle-Skala [39], die Goldman-Engelman-Steitz-Skala [7] und die Wimley-White-Skala [1, 36].

1.2 Wechselwirkung α -helikaler TMDn

Wechselwirkungen α -helikaler TMDn spielen eine wichtige Rolle bei der Faltung integraler Membranproteine, ihrer Assoziation zu oligomeren Komplexen und somit ihrer Funktionalität. Der posttranslationale Prozess der korrekten Faltung und Assoziation von Membranproteinen zu ihrer tertiären und quaternären Struktur ist neben posttranslationalen Modifikationen Voraussetzung für ihren Transport vom ER über den Golgi-Komplex zur Plasmamembran. Die Oligomerisierung von TMDn erfolgt also bereits im ER. Dort werden die Proteine einer Qualitätskontrolle unterzogen; nicht oder falsch gefaltete bzw. aggregierte Proteine werden aussortiert.

Das sog. „Two-Stage“-Modell (Zwei-Stufen-Modell) liefert ein konzeptionelles Rahmenwerk für die Faltung und Stabilität von Membranproteinen [40, 41]. Wie in Abb. 3 dar-

gestellt, bilden sich in der ersten Stufe stabile TMDn aus. Diese eigenständigen Faltungseinheiten assoziieren in der zweiten Stufe über sequenzspezifische Helix-Helix-Wechselwirkungen und bilden so die Tertiärstruktur des Proteins aus. Für die Ausbildung der Quartärstruktur und die Entstehung eines funktionellen Proteins müssen meist weitere Ereignisse wie z.B. die Bindung prosthetischer Gruppen folgen [42]. Gestützt wird das „Two-Stage“-Modell u. a. durch die Beobachtung, dass Fragmente von Bacteriorhodopsin spontan assoziieren; die Bindung von Retinal erfolgt erst im Anschluss daran [43]. Nebenbei bemerkt vereinfacht dieser hierarchische Faltungsmechanismus die Modellierung von Membranproteinen, welche sich nun, zumindest in einer ersten Näherung, auf die Assemblierung vorgeformter Helices beschränken kann.

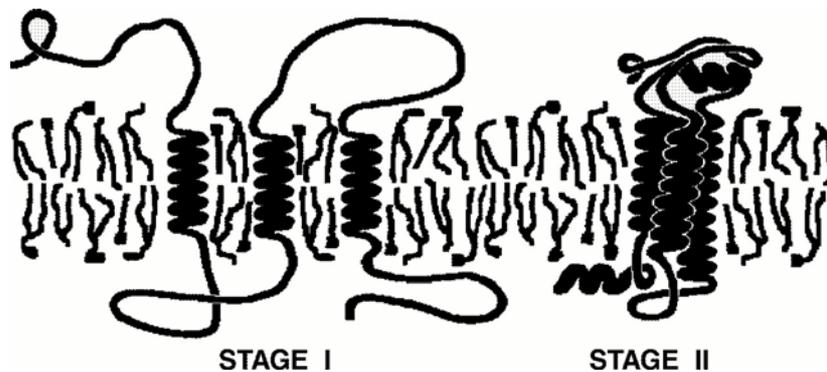


Abb. 3: „Two-Stage“-Modell. Demgemäß falten sich individuelle Transmembranhelices eines polytopischen Membranproteins infolge des hydrophoben Effekts und der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Polypeptidrückgrats in der ersten Stufe (Stage I) zu separaten, stabilen Domänen im Lipidbilayer. In der zweiten Stufe (Stage II) erfolgt über TMD-TMD-Interaktionen die Assoziation dieser α -Helices. Abbildung entnommen aus [41].

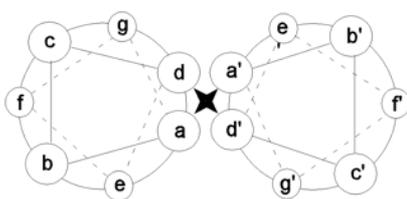
Aus diesem Formalismus folgt weiter, dass hydrophobe Punktmutationen in TMDn die Stabilität der Monomere nicht beeinflussen sollten. Indem sie Helix-Helix- oder Helix-Lipid-Wechselwirkungen beeinflussen, sollten sich solche Mutationen eher auf die Di- oder Oligomerisierung der TMDn auswirken [44]. Tatsächlich scheinen hydrophobe Punktmutationen Helix-Helix-Wechselwirkungen nur dann zu beeinflussen, wenn sie die Packung der Helices oder die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen in der Helix-Helix-Kontaktfläche liegenden Aminosäureresten beeinträchtigen [45]. Durch geeignete Mutationsanalysen können daher Rückschlüsse auf die Art der Kontaktfläche und die an der Wechselwirkung beteiligten Reste gezogen werden.

Der Lipidbilayer sowie der biosynthetische Insertionsprozess sorgen für thermodynamische und geometrische Zwänge, welche die Flexibilität und Orientierung der TMDn einschränken. Die Anzahl zugänglicher Struktur motive ist für Membranproteine daher begrenzt [1]. Paare interagierender α -helikaler TMDn können hinsichtlich ihres Kreuzungswinkels klassifiziert werden. Dieser hängt von der Struktur der Helix-Helix-Kontaktfläche ab [10, 46, 47]. Bei symmetrischen Homodimeren lässt sich der Kreuzungswinkel (Ω), also der Winkel zwischen den Längsachsen der Helices, aus dem Neigungswinkel (β) einer Helix bezüglich der Achse des Bündels berechnen ($\Omega = 2 \times \beta$). Linkshändige Helix-Helix-Paare mit positiven Kreuzungswinkeln erinnern an „coiled-coil“-Domänen oder Leucinzipper löslicher Proteine [48, 49]. Sie sind durch eine „Knobs-into-Holes“-Packung der Seitenketten eines wiederholten Heptadenmusters ($[a..de.g]_n$) charakterisiert, wobei die Seitenketten an den Positionen a , d , e und g in der Helix-Helix-Kontaktfläche liegen (Abb. 4 links) [50]. Im Gegensatz dazu sind interagierende Seitenketten rechtshändiger Helix-Helix-Paare mit negativen Kreuzungswinkeln in einem wiederholten Tetradenmuster ($[ab..]_n$) angeordnet, mit den Seitenketten a und b in der Kontaktfläche der Helices (Abb. 4 rechts) [51].

Linkshändige Helix-Helix-Paare

Heptadenmuster: $[a..de.g]_n$

$\Omega > 0$



Rechtshändige Helix-Helix-Paare

Tetradenmuster: $[ab..]_n$

$\Omega < 0$

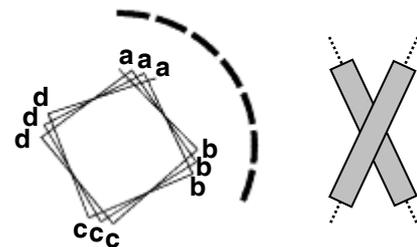


Abb. 4: Packungsarten von Paaren interagierender α -helikaler TMDn. **Links:** Linkshändige Helix-Helix-Paare weisen einen positiven Kreuzungswinkel ($\Omega > 0$) auf. Seitenketten der Positionen a , d , e und g eines wiederholten Heptadenmusters bilden die Helix-Helix-Kontaktfläche. **Rechts:** Rechtshändige Helix-Helix-Paare kreuzen sich unter einem negativen Winkel ($\Omega < 0$). Die Helix-Helix-Kontaktfläche wird durch Seitenketten der Positionen a und b eines wiederholten Tetradenmusters gebildet. Abbildung verändert nach [52, 53].

Die TMDn des M2-Protonenkanals des Influenza A Virus [54], des Phospholambans [55, 56], des Erythropoietin-Rezeptors [52] und des E-Cadherins [57] kreuzen sich vermutlich linkshändig. Hingegen scheinen sich die TMDn des M13-Hüllproteins [58], der SNARE-Proteine (SNARE steht für „soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“) Synaptobrevin II und Syntaxin 1A [59-61] und von Glycophorin A [62, 63] rechtshändig zu kreuzen.

Molekulare Kräfte, die die Assoziation von TMDn bedingen, sind van der Waals' Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen. Diese nichtkovalenten Wechselwirkungen sind allesamt elektrostatischer Natur. Wechselwirkungen vom van der Waals' Typ treten zwischen permanenten und/oder induzierten Dipolen auf. Die Stärke dieser Dipol-Dipol-Kräfte hängt von der Polarität und Polarisierbarkeit der Bindungspartner ab und nimmt mit der sechsten Potenz ihres Abstands ab. Van der Waals' Wechselwirkungen sind daher relativ schwach, treten jedoch gehäuft zwischen dicht gepackten, hydrophoben Kontaktflächen von Transmembranhelices, die sterisch komplementär zueinander sind, auf und sind daher eine treibende Kraft für die spezifische Interaktion von TMDn. Wasserstoffbrückenbindungen werden ausgebildet, wenn zwei passend zueinander orientierte elektronegative Atome um dasselbe Proton konkurrieren, also als Wasserstoff-Donator und -Akzeptor fungieren. H-Brücken können beispielsweise zwischen membraneingebetteten polaren sowie ionisierbaren Aminosäureseitenketten, zwischen Amid- und Carbonylgruppen des Polypeptidrückgrats sowie außerdem zwischen C_{α} -H-Atomen und Carbonylgruppen des Polypeptidrückgrats, Hydroxylgruppen von Ser oder Thr oder delokalisierten π -Elektronen aromatischer Aminosäurereste auftreten, um nur einige zu nennen. Wasserstoffbrückenbindungen sind stärker als van der Waals' Kräfte und im Gegensatz zu diesen gerichtet. Sie erhöhen die Spezifität und Stabilität von TMD-TMD-Interaktionen. Die stärksten nichtkovalenten Wechselwirkungen sind ionischer Natur. Ionische Wechselwirkungen treten zwischen Ladungen wie z.B. ionisierten Aminosäureseitenketten auf. Da sie nach dem Coulomb-Gesetz proportional mit dem Abstand zwischen den entgegengesetzt geladenen Bindungspartnern abnehmen, sind sie über große Entfernungen wirksam. Ob die Seitenketten von Asp, Glu, His, Lys und Arg in der Membran geladen oder in ihrer protonierten bzw. deprotonierten Form vorliegen, ist unklar. Generell sind elektrostatische Wechselwirkungen im apolaren Milieu der Membran stärker als im wässrigen Milieu [51, 64, 65].

Im Gegensatz zur Interaktion löslicher Proteine spielt der hydrophobe Effekt bei der Assoziation von TMDn kaum eine Rolle [66]. Stattdessen fördert ein solvophober Effekt TMD-TMD-Interaktionen, denn sowohl die Acylketten der Membranlipide als auch die Sekundärstrukturelemente der Membranproteine dürften aufgrund einer (im Vergleich zur Helix-Lipid-Packung) effizienteren Lipid-Lipid- sowie Helix-Helix-Packung bevorzugt mit sich selbst interagieren [1]. Energetisch ungünstig wirkt sich der bei der Assoziation auftretende Verlust konformationeller Entropie aus. Dieser ist seitens des Polypeptidrückgrats gering, da die TMDn gemäß dem „Two-Stage“-Modell (s. Abb. 3) vor ihrer Assoziation bereits α -helikal gefaltet vorliegen. Der Entropieverlust der Seitenketten kann jedoch durch die assoziationsbedingte Einschränkung der Anzahl an verfügbaren Rotameren insbesondere für Aminosäurereste, die in der Helix-Helix-Kontaktfläche liegen, beträchtlich sein. In jedem Falle wird das Gleichgewicht zwischen Monomer und Di- oder Oligomer durch die Bilanz der Enthalpie- und Entropieterme, welche aus den Helix-Helix-, Helix-Lipid- und Lipid-Lipid-Wechselwirkungen resultieren, bestimmt [44].

Das wohl am besten charakterisierte Beispiel interagierender α -helikaler TMDn ist Glycophorin A (GpA), ein bitopisches Glykoprotein der menschlichen Erythrozytenmembran. Die sequenzspezifische Dimerisierung von GpA erfolgt durch Bildung paralleler, rechteckig gekreuzter Helix-Helix-Paare (Abb. 5). Durch Mutationsanalysen, molekulare Modellierung und kernresonanzspektroskopische Untersuchungen in Detergenzmicellen sowie in Membranen wurde die Helix-Helix-Kontaktfläche identifiziert. Die TMD-TMD-Interaktion von GpA wird durch das Sequenzmotiv LIxxGVxxGVxxT vermittelt. Dabei spielt das zentrale GxxxG-Motiv (Abb. 5, Glycine in blau) eine Schlüsselrolle bei der Dimerisierung. Dieses GxxxG-Motiv liegt in der dicht gepackten Helix-Helix-Kontaktfläche. Das GpA TMD Dimer wird vornehmlich durch Wechselwirkungen vom van der Waals' Typ stabilisiert. Der bei der Assoziation auftretende Entropieverlust, der aus der Fixierung der Seitenkettenkonformationen resultiert, ist gering und trägt daher indirekt zur Stabilität des Dimers bei. Der nur geringe Entropieverlust ist bedingt durch das vorwiegende Auftreten kleiner und β -verzweigter Aminosäurereste (Gly, Val, Thr und Ile) in der Helix-Helix-Kontaktfläche, deren Seitenketten auch in der monomeren Struktur nur eine begrenzte Anzahl an Konformationen einnehmen. Das GxxxG-Motiv erlaubt einen engen Kontakt der Rückgrate der Partnerhelices und könnte somit die Ausbildung von interhelikalen H-Brücken zwischen C_{α} -H-Atomen der Glycine und Carbonylgruppen der Rückgrate

ermöglichen. Des Weiteren wird vermutet, dass zumindest in der membraneingebetteten Struktur, die sich von der detergenzsolubilisierten Struktur u. a. durch einen etwas geringeren Kreuzungswinkel des Helix-Helix-Paares unterscheidet, interhelikale H-Brücken zwischen der Hydroxylgruppe von Thr87 und der Rückgrat-Carbonylgruppe von Val84 zur Stabilität des Dimers beitragen könnten [62, 63, 67-75].

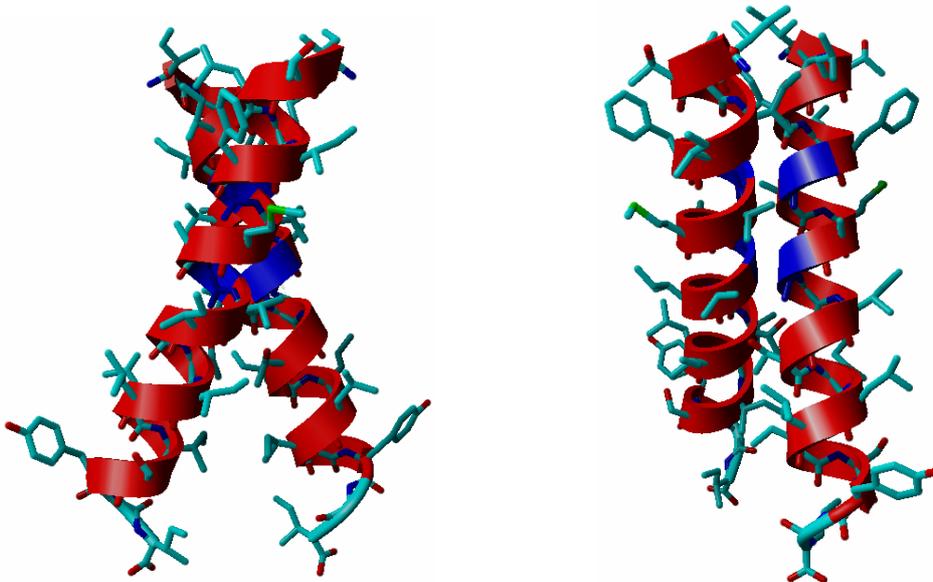


Abb. 5: Struktur des GpA TMD Dimers in Membranen. Die TMDn (Aminosäurereste 73 bis 95 des humanen GpA) bilden rechtshändig gekreuzte Helix-Helix-Paare. Die Glycine der GxxxG-Motive (Gly79 und Gly83) erlauben eine enge Packung der Helices und sind blau markiert. Die rechte Ansicht ist gegenüber der linken um ca. 90° um die y-Achse gedreht. Strukturkoordinaten mit freundlicher Genehmigung von Steven O. Smith. Die Abbildung wurde mit YASARA 7.1.29 generiert.

Statistische Analysen haben gezeigt, dass GxxxG das am stärksten überrepräsentierte Paar von Aminosäureresten in TMD-Sequenzen ist [11, 12]. Dies deutet auf eine weitverbreitete Funktion dieses Sequenzmotivs bei der Assoziation von TMDn hin. Vermutlich bedarf die von GxxxG vermittelte Interaktion von TMDn jedoch der Stabilisierung durch andere Reste der Helix-Helix-Kontaktfläche [76] und ist somit abhängig vom lokalen Sequenzkontext [53, 77-79].

1.3 Detektion und Analyse affiner TMDn

Die Strukturaufklärung α -helikaler Membranproteine mittels Kernresonanzspektroskopie oder Röntgenkristallographie ist aufgrund ihres nativen Lipidmilieus problematisch. Die Kristallisation von Membranproteinen beispielsweise gestaltet sich wegen der benötigten Solubilisierung durch Detergenzien und Rekonstitution erheblich schwieriger als diejenige von löslichen Proteinen [80]. Trotz ihrer großen Bedeutung in zellulären Prozessen und ihrer medizinischen Relevanz gibt es daher kaum hochaufgelöste Strukturen von Membranproteinen [81]. Einen Überblick über Membranproteine bekannter Strukturen findet sich auf der Homepage http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html von Stephen H. White.

Ebenso wenig ist über die Strukturen interagierender TMDn bekannt. Die Identifikation und Charakterisierung affiner TMDn erfolgt daher zumeist indirekt. Zu den gebräuchlichsten biochemischen und biophysikalischen Techniken, die zur Detektion und Analyse affiner TMDn verwendet werden, gehören gelelektrophoretische Methoden, wie z.B. milde Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und „Blue-Native“ Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Gelfiltrationschromatographie, analytische Ultrazentrifugation (Gleichgewichtssedimentation) und Methoden zur Bestimmung des Fluoreszenzresonanzenergie transfers zwischen Fluorophor-markierten TMDn [64]. Überdies stehen genetische Werkzeuge, wie z.B. das ToxR-System [71, 82] und TOXCAT [83], zur Verfügung, welche die Untersuchung von TMD-TMD-Interaktionen in Membranen lebender Zellen ermöglichen, jedoch keine Aussagen über die Stöchiometrie der gebildeten nicht-kovalenten Komplexe zulassen. Untersucht werden native oder rekombinante Membranproteine oder synthetische Peptide, die Untersuchungen erfolgen in Detergenzmicellen, Liposomen, Bicellen oder Membranen. Das Lipidmilieu kann die Assoziation von TMDn beeinflussen, scheint sich jedoch eher auf die Feinstruktur und/oder das Assoziationsgleichgewicht als auf die Identität der Helix-Helix-Kontaktflächen auszuwirken [64]. Dies scheint auch auf die Dimerisierung der GpA TMDn zuzutreffen [62, 63, 67, 68, 71, 72, 83-86]. Unter Berücksichtigung der experimentell gewonnenen Daten können mittels molekularer Modellierung Strukturen interagierender TMDn vorhergesagt werden, welche das Design neuer Experimente anregen könnten.

Schätzungsweise 30 bis 50 % der α -helikalen Membranproteine sind bitopisch [87]. Der hohe Konservierungsgrad ihrer TMDn, der zudem helikale Periodizität zeigt, deutet eine potentielle Rolle dieser stark konservierten Sequenzmotive bei Protein-Protein-Interaktionen an [88]. Diese Motive sind sehr vielfältig. Daher gilt es, sie zu entschlüsseln. Ein Ansatz zur Aufklärung der Sequenzspezifität von TMD-TMD-Interaktionen ist die Randomisierung der potentiellen Helix-Helix-Kontaktflächen und anschließende Selektion interagierender TMD-Sequenzen aus den generierten kombinatorischen Banken [53, 89-91] mittels genetischer Werkzeuge, wie z.B. TOXCAT [83] oder ToxR/POSSYCCAT [89, 92].

In der vorliegenden Arbeit wurden homotypisch interagierende, parallele TMDn unter Verwendung des ToxR-Systems identifiziert und charakterisiert. Wie bereits erwähnt, ist das ToxR-System ein genetisches Werkzeug, das verwendet wird, um TMD-TMD-Interaktionen in einer nativen Membranumgebung zu analysieren [71, 82]. Es macht dabei von einem chimären Protein Gebrauch, welches aus der cytoplasmatischen Domäne des ToxR-Transkriptionsaktivators (ToxR) aus *Vibrio cholerae*, einer heterologen TMD und der periplasmatischen Maltosebindende Protein-Domäne (MalE) besteht. TMD-TMD-Interaktionen in der inneren Membran entsprechend konstruierter *Escherichia coli*-Zellen bewirken die passive Di- oder Oligomerisierung der ToxR-Domäne und somit die Aktivierung des *ctx*-Promotors (*E. coli*-Stämme FHK12 [82, 93] und Chr3 [89]) oder des *ompU*-Promotors (*E. coli*-Stamm EL61 [92]) (Abb. 6). Diese Transkriptionsaktivierung führt letztlich zur Expression eines Reporterenzym, der β -Galactosidase (β -Gal) oder der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT). Die Menge an β -Gal bzw. CAT und somit das Ausmaß der β -Gal-Aktivität bzw. der Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol (Cm) hängen von der Stärke der Transkriptionsaktivierung durch ToxR ab und korrelieren daher mit der Selbstaffinität der untersuchten TMD. Die periplasmatische MalE-Domäne fungiert als Anker, ermöglicht die Kontrolle der Membranintegration und dient als Epitop, um den Expressionslevel des chimären Proteins zu quantifizieren (s. unten).

Die Quantifizierung der TMD-TMD-Affinität, also des Ausmaßes der di- oder oligomerisierungsabhängigen Transkriptionsaktivierung durch ToxR, erfolgt in mit entsprechenden ToxR/TMD/MalE-Konstrukten transformierten FHK12-Zellen, in denen das *lacZ*-Gen unter Kontrolle des *ctx*-Promotors (*ctx::lacZ*) chromosomal integriert ist [71, 82]. Im sog. ToxR-Assay wird die β -Gal-Aktivität der Zelllysate aus der Anfangsgeschwin-

digkeit der β -Gal-katalysierten Hydrolyse des chromogenen Substrats *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) – d.h. aus der maximalen Steigung der Reaktionskurve, die aufgrund der Entstehung des gelben Produkts *o*-Nitrophenol der Enzymreaktion aus der Zunahme der Absorption bei 405 nm über die Zeit bestimmt werden kann – berechnet [94] und auf die Zellkonzentrationen normalisiert. Da die Anfangsgeschwindigkeit der β -Gal-katalysierten Reaktion von der Menge an β -Gal abhängt, welche wiederum aus der di- oder oligomerisierungsabhängigen ToxR-Aktivität resultiert, erlaubt die Bestimmung der spezifischen β -Gal-Aktivität Rückschlüsse auf die relativen TMD-TMD-Affinitäten der ToxR-Konstrukte.

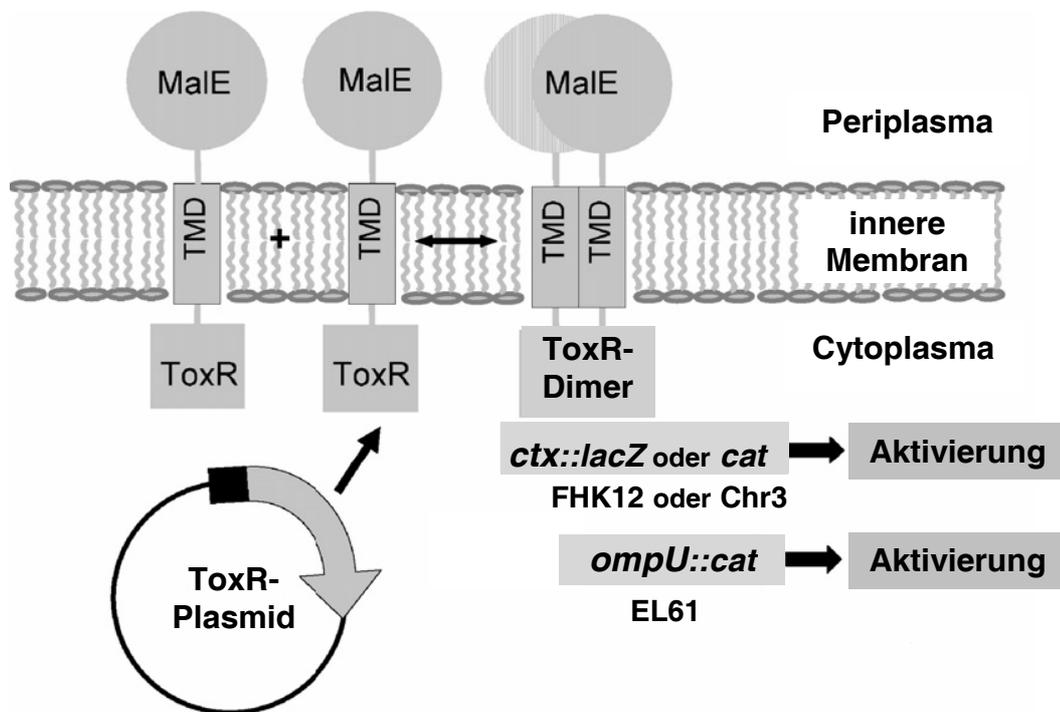


Abb. 6: Überblick über das in dieser Arbeit verwendete ToxR/POSSYCCAT-System. TMD-vermittelte Di- oder Oligomerisierung plasmidcodierter ToxR-Proteine in der inneren Membran von *E. coli* aktiviert die Transkription eines *ctx*- oder *ompU*-Promotor-kontrollierten *lacZ*- oder *cat*-Gens und induziert so die Expression der β -Galactosidase oder Chloramphenicol-Acetyltransferase (vgl. Erläuterungen im Text). Abbildung verändert nach [92].

Durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) zu exprimierenden FHK12-Kulturen wird eine stärkere Differenzierung zwischen den β -Gal-Signalen verschieden affiner TMDn erreicht. Dieser Effekt beruht auf der IPTG-induzierten Expression einer

F-Plasmid-codierten, verkürzten β -Gal-Untereinheit (des sog. ω -Fragments), welche die Bildung funktioneller Tetramere durch Assoziation mit der vollständigen Untereinheit beeinträchtigt [95].

Die *in vivo*-Selektion affiner TMDn (sog. Positivselektion) erfolgt in mit entsprechenden ToxR-Konstrukten transformierten Chr3- oder EL61-Zellen, in denen das *cat*-Gen unter Kontrolle des *ctx*- oder *ompU*-Promotors (*ctx::cat* in Chr3, *ompU::cat* in EL61) steht [89, 92]. Transkriptionsaktivierung durch ToxR führt in diesen Stämmen zur CAT-Expression. Das Ausmaß der Cm-Resistenz, d.h. die Überlebensfähigkeit der ToxR-exprimierenden Zellen in Anwesenheit variabler Cm-Konzentrationen, korreliert somit mit der TMD-TMD-Affinität. Unter Anwendung selektiven Drucks ermöglicht das ToxR/POSSYCCAT-System daher das Screening von TMD-Banken auf affine TMDn.

Im in dieser Arbeit verwendeten System aktiviert TMD-TMD-induzierte Di- oder Oligomerisierung chimärer ToxR-Proteine die Transkription *ctx*- oder *ompU*-kontrollierter Gene. In *V. cholerae* erfolgt die Dimerisierung der cytoplasmatischen ToxR-Domäne – scheinbar bedingt durch Dimerisierung der periplasmatischen Domäne des bitopischen Membranproteins – als Antwort auf Signale aus der Umwelt. Neben der Expression einer Vielzahl anderer Virulenzfaktoren reguliert ToxR die Expression des *ctx*-kontrollierten Cholera-toxins und des *ompU*-kontrollierten Porins OmpU der äußeren Membran dieses Gramnegativen Bakteriums. Nach erfolgter Dimerisierung bindet die cytoplasmatische ToxR-Domäne an das repetitive DNA-Element (TTTTGAT)_n der *ctx*-Promotor-/Operatorregion – dieses liegt in *V. cholerae* in drei bis acht Kopien und im hier verwendeten *E. coli*-Konstrukt FHK12 in sieben Kopien vor – und aktiviert so die Expression nachgeschalteter Gene um mehr als das Hundertfache. In der *ompU*-Promotor-/Operatorregion scheint ToxR an andere A/T-reiche Sequenzen zu binden. Es wird vermutet, dass kooperative ToxR-ToxR-Wechselwirkungen eine Rolle bei der Bindung an und Aktivierung von *ompU* spielen könnten [82, 93, 96-102].

Im ToxR-System sind die chimären ToxR-Proteine plasmidcodiert. Im ursprünglichen ToxR-Vektor befindet sich das entsprechende Gen unter der Kontrolle des konstitutiven *tox*-Promotors [71, 82]. Wie es für alle reversiblen Protein-Protein-Interaktionen der Fall ist, hängen Ausmaß der TMD-TMD-Interaktion und damit Stärke der Reporteragen-

Expression neben der Affinität der TMDn zueinander auch von deren Konzentration in der Membran ab. Um den Expressionslevel und somit die Konzentration der ToxR-Konstrukte in der inneren Bakterienmembran optimieren zu können, so dass Unterschiede in der TMD-TMD-Affinität möglichst große Signalunterschiede nach sich ziehen, wurde der konstitutive *tox*-Promotor im ToxRIV-Vektor durch den regulierbaren *araBAD*-Promotor ersetzt [89]. Außerdem enthält pToxRIV das für das regulatorische Protein AraC codierende Gen. Die Expression der chimären ToxR-Proteine kann in diesem System daher durch L-Arabinose induziert und durch D-Glucose reprimiert werden.

Gemäß dem Massenwirkungsgesetz hängt das Gleichgewicht zwischen Monomer und Di- oder Oligomer von der Konzentration der ToxR-Proteine in der Membran ab. Daraus folgt, dass verschiedene Konstrukte in ähnlichen Konzentrationen in der Membran vorliegen müssen, damit die von ihnen induzierten β -Gal-Aktivitäten und somit ihre relativen TMD-TMD-Affinitäten direkt miteinander verglichen werden können. Daher muss in Kontroll-experimenten überprüft werden, ob die zellulären Konzentrationen der ToxR-Proteine sowie die Membraninsertionseffizienzen für alle untersuchten Konstrukte ähnlich sind. Die Expressionslevel der ToxR-Proteine in FHK12-Zellen werden mittels SDS-PAGE [103] und anschließender Western-Blot-Analyse [104] bestimmt. Die spezifische Detektion der ~66 kDa ToxR/TMD/MalE-Konstrukte erfolgt dabei mit einem Anti-MalE-Antiserum. Die richtige Orientierung der Konstrukte in der inneren Bakterienmembran und ihre relativen Membranintegrationseffizienzen werden anhand ihrer Fähigkeit, die MalE-Defizienz des *E. coli*-Stammes PD28 (MalE⁻) [105] zu komplementieren, beurteilt. Das periplasmatische Maltosebindeprotein spielt in *E. coli* eine essentielle Rolle beim energieabhängigen Transport von Maltose über die innere Membran. MalE bindet Maltose, interagiert mit den membranständigen Komponenten MalF und MalG und initiiert so den Transportprozess des Substrates über die innere Membran [105]. Mit individuellen ToxR/TMD/MalE-Konstrukten transformierte, MalE-defiziente PD28-Zellen können daher nur dann Maltose aufnehmen – und in Medien wachsen, welche als einzige Kohlenstoffquelle Maltose enthalten –, wenn sie ToxR-Proteine exprimieren, die in die innere Membran integriert sind und außerdem eine korrekte Topologie aufweisen, d.h. wenn deren MalE-Domänen im Periplasma vorliegen (s. Abb. 6). Dies wird im sog. PD28-Wachstumsassay ausgenutzt [72].

Zusammenfassend kann also das ToxR/POSSYCCAT-System verwendet werden, um a) affine TMDn aus kombinatorischen Banken zu selektieren, b) die Affinitäten dieser selektierten TMDn anhand ihrer ToxR-Aktivitäten, Expressionslevel und Membranintegrations-effizienzen abzuschätzen und c) selektierte affine TMD-Sequenzen zu charakterisieren. So können durch einen Vergleich der Aminosäurezusammensetzungen hochaffiner TMD-Sequenzen und nieder- oder nichtaffiner Sequenzen An- oder Abreicherungen bestimmter Aminosäuren sowie deren Positionsspezifitäten in hochaffinen TMDn festgestellt werden. In Mutationsanalysen kann anschließend die Bedeutung einzelner Aminosäurereste für die TMD-TMD-Interaktion validiert werden. Das Muster kritischer Reste gibt Aufschluss über die Art der Helix-Helix-Kontaktfläche. So können letztlich neue Oligomerisierungsmotive entschlüsselt werden.

1.4 Erstellung kombinatorischer Plasmidbanken

Wie bereits erwähnt, können unter Verwendung von TOXCAT [83] oder ToxR/POSSY-CCAT [89, 92] affine TMDn aus kombinatorischen Banken [53, 89-91] selektiert werden. Beispielsweise trat das GxxxG-Motiv, das wesentlich zur Dimerisierung der GpA TMD beiträgt, in mehr als 80 % der affinen TMDn auf, welche aus kombinatorischen Banken auf Basis rechtshändig gekreuzter α -Helices isoliert worden waren [53]. Kombinatorische Banken können durch partielle Randomisierung von DNA-Fragmenten mittels einer PCR, in der eine Mischung synthetischer Oligonucleotide als Primer verwendet wird, und anschließender Klonierung der PCR-Produkte in den Expressionsvektor generiert werden.

Die methodischen Strategien zur Erstellung der dieser Arbeit zugrunde liegenden kombinatorischen Plasmidbanken und ihr Design werden im Folgenden kurz erläutert. Die Konstruktion der Banken erfolgte folgendermaßen: Nach Durchführung einer PCR mit einem teilweise degenerierten Sense-Primer, der für die TMD-Region des chimären ToxR-Proteins codierte, wurden die Enden der resultierenden PCR-Produkte geschnitten. 5'-biotinylierte Primer ermöglichten die nachfolgende Entfernung biotinylierter Enden und ungeschnittener Fragmente durch Bindung an immobilisiertes Streptavidin. Anschließend wurden die aufgereinigten PCR-Fragmente über die entsprechenden Schnittstellen in den ToxRIV-Vektor kloniert. In die TMD-codierende Region dieses Vektors war zuvor eine

Schnittstelle eingeführt worden. So konnten nach der Ligation etwaige, noch vorhandene Ausgangsplasmide durch Verdau mit dem entsprechenden Restriktionsenzym entfernt werden. Nach einem Aufreinigungsschritt durch Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol erfolgte eine tRNA- und seeDNA-unterstützte Ethanol-fällung der DNA. Mit der ligierten Plasmid-DNA wurden schließlich *E. coli* TOP10-Zellen durch Elektroporation transformiert. Um hohe Ausbeuten an Bank-DNA zu erzielen, wurden also einerseits die Inserts vor der Ligation von verunreinigenden Fragmenten befreit, andererseits wurde mit Hilfe der in den Vektor eingeführten Schnittstelle die Kontamination durch parentale Plasmide auf ein Minimum reduziert.

Es wurden zwei Banken von chimären ToxR-Proteinen mit partiell randomisierten Heptadenmustern an Stelle der TMDn konzipiert. Dazu wurden jeweils acht der zehn *a*, *d*, *e* und *g* Positionen 16 Aminosäuren langer, kanonischer α -Helices randomisiert (s. Abb. 10 und 11). Die Reste dieser Positionen liegen somit in der potentiellen Helix-Helix-Kontaktfläche linkshändig gekreuzter TMDn (s. Abb. 4 links). Die Randomisierung erfolgte in der Bank SU1 mit dem degenerierten Codon DBB (D = A/G/T, B = C/G/T), wodurch an den randomisierten Positionen zwölf vorwiegend hydrophobe oder mäßig polare Aminosäuren zugelassen sind (s. Abb. 10). Diese Aminosäuren umfassen die häufigsten Aminosäuren in TMDn [11-13, 106, 107]. An den terminalen *g* Positionen befinden sich invariante Leu-Reste, die zur Erhöhung der Hydrophobizität beitragen und damit die Membraninsertion der Zufallssequenzen begünstigen sollten. Außerdem sollte so die Bildung hochaffiner TMDn mit Trp an diesen Positionen, wie es in einer vorherigen Studie beobachtet worden war [91], ausgeschlossen werden. An den potentiell außerhalb der Helix-Helix-Kontaktfläche liegenden *b*, *c* und *f* Positionen befinden sich invariante Ala-Reste, da bekannt ist, dass eine oligo-Ala-Sequenz in Membranen nicht mit sich selbst interagiert [95]. Die theoretische Komplexität der Bank SU1 liegt bei ca. 3×10^{11} Sequenzvarianten. In der Bank JP1 sind an den randomisierten Positionen alle 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren zugelassen (s. Abb. 11). Dadurch, dass das verwendete Codon NNB (N = A/C/G/T, B = C/G/T) das Stopp-Codon TAG mit einschließt, werden mit einer Wahrscheinlichkeit von ~17 % verkürzte ToxR-Konstrukte exprimiert. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Stopp-Codons ist bei Codierung der 20 Aminosäuren durch NNB jedoch geringer als bei Codierung durch NNS (N = A/C/G/T, S = C/G) bzw. NNN (2,1 % statt 3,1 % bzw. 4,7 % Stopps pro randomisierter Position).

Der komplette Aminosäuresatz umfasst neben hydrophoben auch polare sowie ionisierbare, also potentiell geladene, Aminosäuren. Da der Transfer hydrophober Aminosäuren aus dem wässrigen Medium in die apolare Membran energetisch stark begünstigt ist, kann eine hydrophobe TMD eine gewisse Anzahl polarer und/oder ionisierbarer Aminosäuren, deren Transfer energetisch ungünstig ist, enthalten und dennoch stabil in die Membran integriert sein [40, 41]. Ein zu großer Anteil polarer und/oder ionisierbarer Reste erschwert oder gefährdet jedoch die Membraninsertion. Tatsächlich kommen polare und ionisierbare Reste in TMDn nicht besonders häufig vor [11, 12, 37, 106, 107]. Dennoch scheinen sie essentiell für die Funktion vieler Membranproteine zu sein sowie entscheidend zur Stabilität und Spezifität von TMD-TMD-Interaktionen beizutragen [90, 108-113]. Das Potential der Bank JP1 besteht also vor allem darin, von interhelikalen Wasserstoffbrückenbindungen oder ionischen Bindungen vermittelte TMD-TMD-Interaktionen aufdecken zu können. Sofern vorhandene polare und/oder ionisierbare Reste die Hydrophobizität der potentiellen TMDn nicht so sehr verringern, dass sie die Membraninsertion verhindern, könnten sie durch elektrostatische Wechselwirkungen, die im apolaren Milieu der Membran besonders stark sind, einen entscheidenden Beitrag zur Assoziation der TMDn leisten. Um die Hydrophobizität und damit den Anteil membranintegrierter Sequenzen zu erhöhen, sind die acht invarianten Positionen der potentiellen TMDn in der Bank JP1 mit Leu, der häufigsten Aminosäure in TMDn [11-13, 106, 107], besetzt. Eine oligo-Leu-Sequenz interagiert in Membranen zwar mit sich selbst, ist jedoch nur mäßig affin [95]. Die theoretische Komplexität der Bank JP1 liegt bei ca. 3×10^{13} Sequenzvarianten. Die Konstruktion der Bank JP1 sowie die Selektion und anfängliche Charakterisierung affiner TMDn aus dieser Bank wurden von Johanna C. Panitz im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt.

2. Ziel der Arbeit

Wechselwirkungen α -helikaler TMDn spielen eine wesentliche Rolle bei der Faltung und Oligomerisierung integraler Membranproteine. Jedoch ist wenig über die Strukturen interagierender TMDn und die ihrer Assoziation zugrunde liegenden Sequenzspezifitäten bekannt. Was bitopische Membranproteine betrifft, wird vermutet, dass ein signifikanter Anteil ihrer TMDn spezifische Wechselwirkungen eingeht. Diese Vermutung basiert auf der Beobachtung, dass die Oberflächen ihrer α -helikalen TMDn stark konserviert sind. Die beobachteten Muster sind vielfältig. Zudem häufen sich Hinweise, dass die TMDn bitopischer Zelloberflächenrezeptoren homotypisch interagieren und so aktiv an der Transduktion von Signalen über die Membran beteiligt sind. Deshalb ist es wichtig, Sequenzmotive, die die homotypische Interaktion paralleler TMDn vermitteln, zu entschlüsseln.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, solche Interaktionsmotive aufzudecken. Zu diesem Zweck wurden potentielle Helix-Helix-Kontaktflächen mit den häufigsten in TMDn vorkommenden oder allen natürlich vorkommenden Aminosäuren randomisiert. Aus den generierten kombinatorischen Banken sollten anschließend hochaffine TMDn selektiert und charakterisiert werden. In entsprechend konstruierten Bakterienstämmen kann die Detektion und Analyse von TMD-TMD-Interaktionen im nativen Membranmilieu erfolgen. Für diese Zwecke stehen Varianten des ToxR/POSSYCCAT-Systems zur Verfügung, welche TMD-TMD-Affinitäten in Reporterenzym-Aktivitäten übersetzen.

Zur Selektion stehen zwei Stämme zur Auswahl, in denen ToxR die Transkriptionsaktivierung eines Resistenzgens vom *ctx*- oder *ompU*-Promotor aktiviert. Es sollte daher zunächst vergleichend untersucht werden, inwiefern diese Stämme ein differenziertes Überleben verschieden affiner TMDn ermöglichen, ob sie also die effiziente Identifikation hochaffiner TMDn aus einem Pool vorwiegend nicht- oder niederaffiner Sequenzen zulassen.

Darüber hinaus sollten Affinitäten und Aminosäurezusammensetzungen selektierter TMD-Sequenzen analysiert werden. Aus der Anreicherung und ggf. Positionsspezifität einzelner Aminosäuren oder dem Auftreten von Mustern in hochaffinen TMDn sollten potentielle Interaktionsmotive abgeleitet werden. In Mutationsanalysen sollten anschließend Helix-Helix-Kontakte identifiziert und somit Interaktionsmotive verifiziert werden. Zu guter Letzt sollte eine mögliche Rolle hier entschlüsselter Sequenzmotive bei der TMD-TMD-Interaktion natürlicher Membranproteine beleuchtet werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Allgemeine Chemikalien

Standardchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Applichem, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

3.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Lösungen, Puffer und Medien wurden mit destilliertem Wasser (A. dest.) oder deionisiertem Wasser (MilliQ-H₂O, Millipore) hergestellt. Die Zusammensetzungen der benötigten Lösungen und Puffer sind unter den jeweiligen Methoden angegeben. Wenn nötig, wurden sie vor Gebrauch sterilfiltriert (0,45 µm) oder autoklaviert.

<u>Medien:</u>	LB-Medium (pH 7):	SOB-Medium (pH 7):
	1 % (w/v) Trypton	2 % (w/v) Trypton
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	171 mM NaCl	9 mM NaCl
		2,5 mM KCl

Alle weiteren benötigten Medien sind unter den jeweiligen Methoden angegeben. Zur Herstellung fester Medien wurde 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Die Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert.

3.1.3 Bakterienstämme

Folgende Derivate von *E. coli* wurden verwendet:

- FHK12: Amp^R, *ctx::lacZ* [82, 93]
- Chr3: Amp^R, *ctx::cat* [89]
- EL61: Amp^R, *ompU::cat* [92]
- PD28: Tet^R, MalE⁻ [105]
- DH5α: *supE44 ΔlacU169 (ø80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*
- XL1-Blue: Tet^R (Stratagene)
- TOP10: Str^R (Invitrogen)

3.1.4 Plasmide

Folgende für ToxR/TMD/MalE-Konstrukte codierende high-copy Plasmide wurden verwendet:

- pToxR: Cm^R, *tox::toxR/tmd/malE* [71, 82]
- pToxRIV: Km^R, *araBAD::toxR/tmd/malE* [89]

3.1.5 Antibiotika

Zur Selektion von *E. coli* FHK12, Chr3 und EL61 wurde dem Medium Ampicillin in einer finalen Konzentration von 100 µg/ml (FHK12) oder 50 µg/ml (Chr3 und EL61) zugegeben, zur Selektion von *E. coli* PD28 und XL1-Blue wurden 12,5 µg/ml Tetracyclin zugegeben. Zur Plasmidselektion wurden 30 µg/ml Chloramphenicol (pToxR) bzw. 33 µg/ml Kanamycin (pToxRIV) zugegeben. Zur Positivselektion mittels ToxR/POSSYCCAT wurde dem Medium Chloramphenicol in variablen Konzentrationen (bis zu 840 µg/ml) zugegeben (s. 3.5.1).

3.1.6 Enzyme und Antikörper

Alle verwendeten Restriktionsendonucleasen, Taq-Polymerase, T4 Polynucleotid-Kinase und T4 DNA-Ligase wurden von Fermentas bezogen. RNase A wurde von Appllichem, konzentrierte T4 DNA-Ligase von New England Biolabs und PfuTurbo-Polymerase von Stratagene bezogen.

Anti-MalE Antiserum (primärer Antikörper) wurde von New England Biolabs und Anti-Rabbit-IgG-AP-Konjugat (sekundärer Antikörper) von Promega bezogen.

3.1.7 Größenstandards

Agarose-Gelelektrophorese:

- λ-DNA / *EcoRI* + *HindIII* (Fermentas)
- GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas)
- GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)

SDS-PAGE:

- Protein MW Marker (Fermentas)

3.1.8 Kits

- NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel) zur DNA-Isolierung im Mini-Maßstab
- NucleoBond[®] PC100 (Macherey-Nagel) zur DNA-Isolierung im Midi-Maßstab
- NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel) zur Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Extraktion aus dem Agarosegel
- QuikChange[™] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) zur ortsgerichteten Mutagenese
- SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC (Epicentre Biotechnologies) zur DNA-Sequenzierung

3.1.9 Oligonucleotide

5'-biotinylierte Primer zur Erstellung der Plasmidbank SUI (Thermo Hybaid):

SUI.s: 5'-GGAATCGAGCTAGCTTADBBGCAGCTDBBDBBGCADBBDBBGCAGCT
DBBDBBGCAGCTTDBBGGGATCCTGATCAACCCAAG-3'

HPLC-gereinigt; D bzw. B entsprechen äquimolaren Mischungen von A/G/T bzw. C/G/T.

MalE.*Pfl23II*.as:

5'-GTTGTAACGTACGGCATCCCAGG-3'

Primer zur Erstellung der Plasmidbank JP1:

JP1.s: 5'-GGAATCGAGCTAGCCTGNNBCTGCTCNNBNNBCTGNNBNNBCTCTTG
NNBNNBTTGCTCNNBGGGATCCTGATCAACCCAAGCCAATCC-3'

bezogen von Thermo Hybaid; 5'-biotinyliert; PAGE-gereinigt; N bzw. B entsprechen äquimolaren Mischungen von A/C/G/T bzw. C/G/T.

MalE.*Pfl23II*.as.neu (Invitrogen):

5'-CATAACCCCGTCAGCAGCAATCAGC-3'

Oligonucleotide für die Kassettenklonierung (Invitrogen):

α_v13 mutGP

α_v13 mutGP.s:

5'-CTAGCGTGATCATTCTGGCGGTGGGGCCCGGCCTGCTGCTCCTGGG-3'

α_v13 mutGP.as:

5'-GATCCCCAGGAGCAGCAGGCCGGGCCCCACCGCCAGAATGATCACG-3'

LBB.ApaI

LBB.ApaI.s: 5'-CTAGCCTGGTGCTGCTCGTTGTCCTGGGGCCCCTCTTGGTTGTGT
TGCTCGTCGG-3'

LBB.ApaI.as: 5'-GATCCCGACGAGCAACACAACCAAGAGGGGGCCCCAGGACAAC
GAGCAGCACCAGG-3'

L16-L5F/L8G/L12G

L16-L5F/L8G/L12G.s: 5'-CTAGCCTCCTTTTGTATTTCCTTCTCGGCTTGCTCTTAG
GTCTCTTACTTCTGGG-3'

L16-L5F/L8G/L12G.as: 5'-GATCCCCAGAAGTAAGAGACCTAAGAGCAAGCCGAG
AAGGAATAACAAAAGGAGG-3'

AZ2-L5F/L8G/L12G

AZ2-L5F/L8G/L12G.s: 5'-CTAGCTTACTGGCAGCTTTCCTGGCAGGCCTGGCAGC
TGGTCTGGCACTTCTGGG-3'

AZ2-L5F/L8G/L12G.as: 5'-GATCCCCAGAAGTGCCAGACCAGCTGCCAGGCCTGC
CAGGAAAGCTGCCAGTAAG-3'

Primer für die ortsgerichtete Mutagenese:

Alle Mismatch-Primer wurden gemäß den Angaben des Herstellers des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits entworfen und von Invitrogen bezogen.

IRD-markierte Primer zur DNA-Sequenzierung (MWG Biotech):

- ToxR700up: 5'-CGCAGAATCAAGCAGTGTGCC-3' (IRD700)
- ToxR800down: 5'-CCGTTATAGCCTTTATCGCCG-3' (IRD800)

3.1.10 Geräte und Auswertungssoftware

- Elektroporationsgerät: MicroPulser (Bio-Rad Laboratories)
- ELISA-Reader: Thermomax microplate reader incl. Softmax Pro 3.0 (Molecular Devices)
- Sequenziergerät: DNA Sequencer LONG READIR 4200 incl. Base ImageIR Image Analysis 4.0 (LI-COR Biosciences)
- Thermocycler: Mastercycler (Eppendorf)

- Zentrifugen: Zentrifuge (ZF) Z 513 K und Tischzentrifuge (TZ) Z 233 MK-2 (Hermle)

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

3.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen [114, 115]

Mit 1 ml einer Übernachtskultur wurden 50 ml SOC-Medium inokuliert, bei 37 °C und 250 rpm kultiviert und die Kultur in der frühen logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} \sim 0,4$) geerntet. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension 10 min bei 4 °C und 4.000 rpm (ZF) zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet in 15 ml kaltem Transformationspuffer resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert (s. oben) und das Pellet in 5 ml Transformationspuffer resuspendiert. Unter leichtem Vortexen wurden 175 μ l DMSO zugegeben, nach 5 min Inkubation auf Eis wurde dieser Schritt wiederholt (final 7 % (v/v) DMSO). Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die chemisch kompetenten Zellen in 200 μ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Mit Ausnahme der Kultivierung, die bei 17 °C und 90 rpm erfolgte, wurden sog. hochkompetente Zellen ebenso hergestellt.

SOC-Medium (pH 7):

10 mM $MgCl_2$
 10 mM $MgSO_4$
 20 mM Glucose
 in SOB-Medium (s. 3.1.2)

Transformationspuffer (pH 6,7):

10 mM PIPES
 15 mM $CaCl_2$
 0,25 M KCl
 55 mM $MnCl_2$

3.2.1.2. Herstellung elektrokompetenter Zellen

LB-Medium wurde 1:100 mit einer Übernachtskultur inokuliert, bei 37 °C und 200 rpm kultiviert und die Kultur in der mittleren logarithmischen Phase ($OD_{600} \sim 0,6$) geerntet. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension 10 min bei 4 °C und 3.500 rpm (ZF) zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet 1:1 zum Volumen der Ausgangskultur in eiskaltem MilliQ- H_2O resuspendiert. Nach erneutem Ernten (s. oben) wurden die Zellen 1:2 mit MilliQ- H_2O und nach erneuter Zentrifugation (s. oben) 1:50 mit 10 % (v/v) Glycerin gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (s. oben)

wurde das Zellpellet 1:500 zum Volumen der Ausgangskultur in 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und die elektrokompenten Zellen in 40 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Transformation kompetenter Zellen

3.2.2.1 Hitzeschocktransformation

Zu 200 µl chemisch kompetenten Zellen (s. 3.2.1.1) wurden ~100 ng Plasmid-DNA zugegeben und die Suspension ca. 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock (90 s, 42 °C). Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und der Transformationsansatz zur Expression der Antibiotikaresistenz 1 h bei 37 °C im Roller inkubiert.

3.2.2.2 Elektroporation [116]

40 µl elektrokompente Zellen (~10¹⁰ Zellen/ml, s. 3.2.1.2) wurden mit 1,5 µl ligierter DNA (~0,3 µg DNA) vermischt, 1 min auf Eis inkubiert und in eine kalte MicroPulser-Küvette (Elektrodenabstand 0,1 cm) überführt. Unmittelbar nach dem elektrischen Puls (MicroPulser von Bio-Rad Laboratories: 200 Ω; 25 µF; 1,8 kV; Zeitkonstante $\tau = 4-5$ ms) wurde 1 ml SOC-Medium (s. 3.2.1.1) zugegeben und der Transformationsansatz in einem 15 ml Plastikröhrchen zur Expression der Antibiotikaresistenz 1 h bei 37 °C auf dem Roller inkubiert.

3.3. Präparative und analytische DNA-Methoden

3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im Midi-Maßstab wurde das Kit NucleoBond[®] PC100 von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Zur Isolierung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurde das Kit NucleoSpin[®] Plasmid von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Außerdem erfolgte die Minipräparation durch alkalische Lyse der Zellen, anschließende Entfernung von Zellrückständen durch Extraktion mit Phenol/Chloroform und Isopropanolfällung der Plasmid-DNA.

Dazu wurden 2 ml Übernachtskultur 1 min bei 13.000 rpm (TZ) abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 100 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer und Mischen wurde 3 min bei RT inkubiert. Anschließend

wurden 150 µl Neutralisationspuffer zugegeben und gemischt. Nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm (TZ) wurde der Überstand 1:1 mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und nach Mischen erneut 2 min bei 4 °C und 13.000 rpm (TZ) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde 1:1 mit Isopropanol versetzt, gemischt und 30 min bei 4 °C und 13.000 rpm (TZ) zentrifugiert. Nach Entfernung des Isopropanols wurde das Plasmid-DNA-Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 25 µl A. dest. incl. 40 µg/ml RNase A gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

Resuspensionspuffer (pH 8,0):	Lysepuffer:	Neutralisationspuffer (pH 5,5):
50 mM Tris-HCl	0,2 M NaOH	3 M Kaliumacetat
10 mM EDTA	1 % (w/v) SDS	

3.3.2 Restriktionsverdau

Sofern nicht anders angegeben, wurden Restriktionsendonucleasen unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen verwendet. Die benötigte Enzymmenge (in Units) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Enzymmenge} = \frac{\mu\text{g zu spaltende DNA} \times \text{Länge der Referenz-DNA [bp]} \times \text{Anzahl der Schnittstellen}}{\text{Länge der zu spaltenden DNA [bp]} \times \text{Anzahl der Schnittstellen in Referenz-DNA}}$$

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit ihrer Länge erfolgte nach Zugabe von Loading Dye (Fermentas) bei einer Spannung von 120 V in 1 bis 2 % (w/v) Agarosegelen incl. 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Als Puffer wurde TBE oder TAE verwendet. Zur Längen- und Konzentrationsabschätzung wurden Größenstandards (s. 3.1.7) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden im UV-Licht sichtbar gemacht.

TBE (pH 8,0):	TAE (pH 8,0):
89 mM Tris	40 mM Tris-Acetat
89 mM Borsäure	2 mM EDTA
2,5 mM EDTA	

3.3.4 Reinigung von DNA-Fragmenten

Restriktionsansätze wurden elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.3.3), die isolierten Plasmid-DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mit dem Kit NucleoSpin® Extract II von Macherey-Nagel extrahiert. Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte ebenso mit dem Kit NucleoSpin® Extract II von Macherey-Nagel.

3.3.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}). Ist $A_{260} = 1$, ist die Konzentration doppelsträngiger DNA 50 µg/ml.

3.3.6 Kassettenklonierung

Durch Kassettenklonierung wurden die TMDn $\alpha_v13mutGP$, LBB.*ApaI*, L16-L5F/L8G/L12G und AZ2-L5F/L8G/L12G in pToxRIV kloniert. Dazu wurden synthetische Sense- und Antisense-Oligonucleotide (s. 3.1.9) phosphoryliert, zu Doppelsträngen hybridisiert und die entstandenen Oligonucleotidkassetten zwischen die Schnittstellen *NheI* und *BamHI* des Vektors ligiert. Als Vektor zur Kassettenklonierung der TMD $\alpha_v13mutGP$ diente pToxRIV-AZ2, für alle weiteren Klonierungen wurde pToxRIV- $\alpha_v13mutGP$ als Ausgangsplasmid verwendet, da dessen TMD eine *ApaI*-Schnittstelle enthält und so etwaige, noch vorhandene Ausgangsplasmide nach der Ligation durch einen Restriktionsverdau mit *ApaI* entfernt werden können. Chemisch kompetente DH5 α wurden mit 5-10 µl des Ligations- bzw. Restriktionsansatzes transformiert und vereinzelt. Alle Konstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung (s. 3.3.8) verifiziert.

Phosphorylierung der Oligonucleotide:

3 µg Sense- oder Antisense-Oligonucleotid
 1x Polynucleotid-Kinase-Puffer A
 50 µg/ml BSA
 1 mM rATP
 ad 30 µl mit MilliQ-H₂O
 + 5 U T4 Polynucleotid-Kinase
 30 min bei 37 °C

Hybridisierung der phosphorylierten

Oligonucleotide:

phosphorylierte Oligonucleotide vereinigen, 5 min bei 70 °C inkubieren, langsam (über ca. 1 h) auf RT abkühlen lassen

Ligation:

ca. 100 ng mit *NheI* und *BamHI* linearisierter ToxRIV-Vektor
 ca. 100 ng Oligonucleotidkassette (ca. 100-facher molarer Überschuss)
 1x Ligationspuffer
 5 U T4 DNA-Ligase
 ad 20 µl mit MilliQ-H₂O
 2 h bei RT

bei Bedarf: Inaktivierung der T4 DNA-Ligase (10 min bei 70 °C), Restriktionsverdau mit *ApaI*, Inaktivierung von *ApaI* (20 min bei 65 °C)

Das TMD-Konstrukt VSV-Wt war bereits vorhanden. Es war von Bettina Brosig durch Ligation einer Oligonucleotidkassette mit pToxR hergestellt worden, wie es für GpA (hier als GpA-Wt bezeichnet) beschrieben ist [71].

3.3.7 Ortsgerichtete Mutagenese

Punktmutationen wurden unter Verwendung des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene und geeigneten Mismatch-Primern (s. 3.1.9) gemäß Herstellerprotokoll erzeugt. In einem 50 µl-Reaktionsansatz wurden einfach konzentrierter Reaktionspuffer, ~50 ng Template-DNA, je 125 ng der komplementären Mismatch-Primer, 200 µM dNTPs und 2,5 U PfuTurbo-Polymerase vermischt. Das Thermocycling erfolgte gemäß folgendem Protokoll:

Initiale Denaturierung	30 s bei 95 °C	} 18 Zyklen
Denaturierung	30 s bei 95 °C	
Annealing	1 min bei 55 °C	
Elongation	6,5 min bei 68 °C	

Der Verdau der Template-DNA erfolgte durch Zugabe von 10 U *DpnI*, gefolgt von 1 h Inkubation bei 37 °C. Chemisch kompetente XL1-Blue wurden mit 5-10 µl des Reaktionsansatzes transformiert und vereinzelt. Alle Konstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung (s. 3.3.8) verifiziert.

Die Punktmutanten VSV-G6A und VSV-G10A in pToxR waren bereits vorhanden. Sie waren von Bettina Brosig analog zu G83A (hier als GpA-G83A bezeichnet) [71] nach der Methode von Kunkel [117] generiert worden.

3.3.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode [118] unter Verwendung des Kits SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC von Epicentre Biotechnologies. Nach dem Cycle Sequencing mit einem IRD-markierten Primer wurden die vier Ansätze einer DNA-Probe (Termination bei A, C, G oder T) auf ein 25 cm langes Polyacrylamidgel aufgetragen. Unter Verwendung des DNA Sequencers LONG READIR 4200 von LI-COR Biosciences wurden die IRD-markierten DNA-Fragmente elektrophoretisch nach ihren Längen aufgetrennt. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte nach Anregung mit einem Laser. Das Bandenmuster wurde mit Hilfe der Software Base ImageIR Image Analysis 4.0 von LI-COR Biosciences in ein Chromatogramm (SCF-Format) umgewandelt und anschließend ausgewertet.

Mastermix für das Cycle Sequencing einer Probe:

7,2 µl 3,5x Sequenzierpuffer

ca. 1 µg DNA

2 pmol Primer (ToxR700up oder ToxR800down, s. 3.1.9)

2,5 U DNA-Polymerase

ad 17 µl mit H₂O

Von diesem Mastermix wurden je 4 µl mit 2 µl Terminationsmix A, C, G oder T vermischt. Das Cycle Sequencing erfolgte gemäß folgendem Protokoll:

Initiale Denaturierung	5 min bei 95 °C	} 30 Zyklen
Denaturierung	30 s bei 95 °C	
Annealing	15 s bei 58 °C	
Elongation	1 min bei 70 °C	
Finale Elongation	5 min bei 70 °C	

Die Reaktionsansätze aus dem Cycle Sequencing wurden mit 3 µl Stop/Loading-Puffer versetzt und zur Denaturierung der DNA-Fragmente 4 min bei 95 °C inkubiert. Das

Sequenziergel wurde mit 1-2 μl der Reaktionsansätze beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 1200 V, 37 mA, 40 W und 50 °C.

Sequenziergel: 4 ml 50 % Long Ranger-Gellösung (Biozym)
 10,5 g Harnstoff
 1x TBE (s. 3.3.3)
 3,75 ml Formamid
 ad 25 ml mit A. dest.
 25 μl TEMED
 175 μl 10 % (w/v) APS

3.3.9 Erstellung der kombinatorischen Plasmidbanken

Die methodischen Strategien zur Konstruktion der Banken chimärer ToxR-Proteine mit partiell randomisierten TMDn sind in der Einleitung zusammengefasst (s. 1.4).

3.3.9.1 Erstellung der Plasmidbank SU1

Reaktionsansatz für die PCR: 1x Puffer ohne MgCl_2
 1,5 mM MgCl_2
 100-200 ng Template-DNA (pToxRIV-AZ2)
 100 pM Sense-Primer SU1.s (s. 3.1.9)
 100 pM Antisense-Primer MalE.*Pfl*23II.as (s. 3.1.9)
 400 μM dNTPs
 2,5 U Taq-Polymerase
 ad 100 μl mit MilliQ- H_2O

Die PCR erfolgte gemäß folgendem Protokoll:

Initiale Denaturierung	2 min bei 95 °C	
Denaturierung	30 s bei 95 °C	} 35 Zyklen
Annealing	50 s bei 55 °C	
Elongation	30 s bei 72 °C	
Finale Elongation	10 min bei 70 °C	

Die 413 bp langen PCR-Produkte wurden aufgereinigt (s. 3.3.4) und die aufgereinigten PCR-Produkte sowie pToxRIV- α_V13 mutGP (s. 3.3.6) mit *NheI* und *Pfl23II* üN bei 37 °C verdaut.

Beispiele zum Verdau der PCR-Produkte und des Vektors:

1x Puffer Y ⁺ /TANGO™	1x Puffer Y ⁺ /TANGO™
ca. 500 ng aufgereinigte PCR-Produkte (25 µl Eluat)	ca. 10 µg pToxRIV- α_V13 mutGP
18 U <i>Pfl23II</i>	32 U <i>Pfl23II</i>
10 U <i>NheI</i>	40 U <i>NheI</i>
ad 100 µl mit MilliQ-H ₂ O	ad 200 µl mit MilliQ-H ₂ O

Um biotinylierte Enden und ungeschnittene Fragmente zu entfernen, wurden die geschnittenen PCR-Fragmente über Streptavidin-Agarose aufgereinigt. Dazu wurde der Restriktionsansatz mit 30 µl Streptavidin-Agarose, die mit A. dest. gewaschen worden war, vermischt und 1 h bei RT geschüttelt. Nach 15 min Zentrifugation bei 13.000 rpm (TZ) wurde der Überstand (ca. 75 µl) abgenommen und erneut 15 min bei 13.000 rpm (TZ) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand (ohne Agarosekügelchen!) abgenommen und die 392 bp langen Inserts, die für die TMD und einen Teil von MalE codieren, aufgereinigt (s. 3.3.4). Der linearisierte Vektor (~5,8 kb langes Fragment) wurde ebenfalls aufgereinigt (s. 3.3.4). Eluiert wurde in Volumina von 25 µl (Inserts) und 75 µl (Vektor). Der Vektor wurde in einem molaren Verhältnis von 1:2 mit den Inserts ligiert.

Ligation (insgesamt 11x):

ca. 1 µg mit *NheI* und *Pfl23II* linearisiertes pToxRIV- α_V13 mutGP
 ca. 140 ng mit *NheI* und *Pfl23II* verdaute Inserts
 1x Ligationspuffer (New England Biolabs)
 3000 U T4 DNA-Ligase (New England Biolabs)
 ad 30 µl mit MilliQ-H₂O
 16 h bei 15 °C

Anschließend wurde die T4 DNA-Ligase inaktiviert (10 min bei 70 °C) [119] und etwaige, noch vorhandene Ausgangsplasmide durch einen Restriktionsverdau mit *ApaI* entfernt.

ApaI-Verdau:

30 µl Reaktionsansatz aus der Ligation
1x NEBuffer 4 (New England Biolabs)
1x BSA
25 U *ApaI*
ad 50 µl mit MilliQ-H₂O
1 h bei 25 °C

Nach einer Aufreinigung durch Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, erfolgte die tRNA- [120] und seeDNA-unterstützte Ethanol-fällung der ligierten DNA. Der Restriktionsansatz wurde mit 350 µl A. dest. und 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol vermischt, 5 min bei 13.000 rpm (TZ) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde mit 5 µg tRNA aus Hefe (Invitrogen), 2 µl seeDNATM (GE Healthcare, ehemals Amersham Biosciences) und 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) vermischt. Die DNA wurde gemäß dem Protokoll von GE Healthcare mit 99 % (v/v) Ethanol gefällt und mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde getrocknet, die DNA anschließend in 4,5 µl MilliQ-H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

Mit ~13 µg DNA aus elf Ligationen wurden durch 33 Elektroporationen elektrokompente TOP10 transformiert (s. 3.2.1.2 und 3.2.2.2). Dies resultierte in einer Rohbank von $2,1 \times 10^7$ unabhängigen Klonen. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Platten ausplattiert, die gewachsenen Kolonien anschließend in LB-Medium incl. 15 % (v/v) Glycerin aufgenommen, nach guter Durchmischung in 200 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Fraktionen wurden vereinigt, indem von jeder Fraktion der Zelltiter bestimmt und ein Volumen der Fraktion, in welchem die jeweilige Anzahl unabhängiger Klone ca. 10 x enthalten war, in LB-Medium inokuliert wurde. Nach \bar{u} N-Kultivierung wurde die Plasmid-DNA im Midi-Maßstab isoliert (s. 3.3.1). Zur Selektion affiner TMDn wurden die Selektionsstämme Chr3 und EL61 mit der Bank-DNA transformiert (s. 3.5.1.2).

3.3.9.2 Erstellung der Plasmidbank JP1

Die Plasmidbank JP1 wurde von Johanna C. Panitz im Rahmen ihrer Masterarbeit analog zur Plasmidbank SU1 erstellt (s. 3.3.9.1). Einige Optimierungen wurden vorgenommen. Als Template-DNA für die PCR wurde pToxRIV-LBB.*ApaI* (s. 3.3.6) verwendet. Als

Primer wurden der degenerierte Sense-Primer JP1.s, der PAGE-gereinigt und im Vergleich zu SU1.s am 3'-Ende verlängert war, und der ebenfalls längere, nicht biotinylierte Antisense-Primer MalE.*Pfl23II.as.neu* verwendet (s. 3.9.1). Die Annealingtemperatur wurde auf 65 °C erhöht und die Anzahl der Zyklen auf 30 reduziert. Im Vergleich zur Erstellung der Bank SU1 verwendeten Antisense-Primer MalE.*Pfl23II.as* (s. 3.9.1) ist MalE.*Pfl23II.as.neu* komplementär zu einer ca. 200 bp downstream gelegenen Sequenz in *malE*; die PCR-Produkte waren somit 615 bp lang (im Ggs. zu 413 bp bei SU1). Im Agarosegel konnten daher die mit *Pfl23II* verdauten, ca. 400 bp langen Fragmente gut von den am 3'-Ende unverdauten, ca. 600 bp langen Fragmenten getrennt werden, was die Biotinylierung des Antisense-Primers überflüssig machte. Die Transformationsansätze wurden nicht ausplattiert, sondern in LB-Medium inokuliert. Nach üN-Kultivierung wurde die Plasmid-DNA im Midi-Maßstab isoliert (s. 3.3.1) und bei -20 °C gelagert. Die Plasmid-DNA aller Fraktionen wurde anschließend in Volumina, die proportional zur jeweiligen Anzahl unabhängiger Klone (ermittelt aus einem 10 µl-Aliquot des jeweiligen Transformationsansatzes) waren, vereinigt. Dies resultierte in einer Rohbank von $3,3 \times 10^7$ unabhängigen Klonen. Anschließend wurde der Selektionsstamm EL61 mit der Bank-DNA transformiert (s. 3.5.1.2).

3.4 Protein- und immunchemische Methoden

3.4.1 Überexpression der ToxR-Proteine in TOP10-Zellen

Mit den entsprechenden ToxR-Konstrukten transformierte TOP10-Zellen wurden üN kultiviert. Die üN-Kulturen wurden 1:50 in LB-Medium inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 250 rpm, wobei die Expression der ToxR-Proteine in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} \sim 0,5$) durch Zugabe von 0,001 % (w/v) L-Arabinose induziert wurde. Nach weiteren 3 h Kultivierung wurden die Zellen durch Zentrifugation (2 min bei 13.000 rpm, TZ) geerntet. Anschließend wurden Proben für die SDS-PAGE vorbereitet (s. 3.4.2).

3.4.2 SDS-PAGE [103]

Die elektrophoretische Auftrennung denaturierter Proteine in Abhängigkeit ihrer relativen Molekülmasse erfolgte bei einer Stromstärke von 25 bis 50 mA in 12,5 %-igen SDS-haltigen Polyacrylamidgelen. Als Puffer wurde Laemmli-Puffer verwendet. Zur Größen-

abschätzung wurde Protein MW Marker von Fermentas verwendet. Die Proteinbanden wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht oder es erfolgte ein immunchemischer Nachweis spezifischer Proteinbanden durch Western-Blotting (s. 3.4.3).

Die Probenvorbereitung erfolgte folgendermaßen: Zellpellets (aus Kulturvolumina von 400 µl) wurden in 100 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Proteinproben wurden 10 min bei 95 °C erhitzt. Mit 10-20 µl dieser denaturierten Proteinproben (entsprechen Kulturvolumina von 40-80 µl) wurde ein SDS-haltiges Polyacrylamidgel beladen.

SDS-Probenpuffer (pH 6,8):

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

Laemmli-Puffer (pH 8,3):

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

Trenngelpuffer (pH 8,5):

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

Sammelgelpuffer (pH 6,8):

0,25 M Tris-HCl
0,20 % (w/v) SDS

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (1:37,5):

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

	Trenngel (12,5 %):	Sammelgel:
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	6 ml	800 µl
Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer	5,6 ml	3,2 ml
A. dest.	3 ml	2,4 ml
TEMED	5 µl	5 µl
10 % (w/v) APS	100 µl	50 µl

Coomassie-Färbung: Die Proteine wurden nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung durch 15 min Schwenken der Gele in Coomassie-Färbelösung angefärbt und ungebundener Farbstoff durch 3 x 15 min Waschen in Coomassie-Entfärbelösung entfernt.

Coomassie-Färbelösung:

0,2 % (w/v) Coomassie Blue R-250
50 % (v/v) Methanol
5 % (v/v) Essigsäure

Coomassie-Entfärbelösung:

40 % (v/v) Methanol
7 % (v/v) Essigsäure

3.4.3 Western-Blotting [104]

Mittels Western-Blot-Analyse wurden die ToxR-Proteine spezifisch nachgewiesen und ihre Expressionslevel abgeschätzt. Dazu wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (s. 3.4.2) aus den SDS-haltigen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Anschließend wurden die ToxR-Proteine mittels eines polyklonalen Antikörpers, der an die MalE-Domäne der chimären Proteine bindet, detektiert. Der Nachweis erfolgte über einen mit Alkalischer Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörper und die Farbreaktion mit 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT).

Das Western-Blotting erfolgte im Semidry-Verfahren. Fünf Lagen mit Laemmli-Puffer (s. 3.4.2) incl. 20 % (v/v) Methanol getränktem Whatman-Filterpapier (Sartorius) wurden auf die Graphitanode einer Blot-Apparatur gelegt, gefolgt von der Nitrocellulosemembran (GE Healthcare, ehemals Amersham Biosciences), dem Polyacrylamidgel und fünf weiteren Lagen getränkten Filterpapiers. Der Transfer erfolgte bei ca. 1 mA/cm² über 1,5 h. Durch 1 min Schwenken in PonceauS-Lösung wurden die Proteinbanden auf der Membran sichtbar gemacht. Die Banden des Protein-Markers wurden markiert und die Membran durch 2 x 5 min Schwenken in A. dest. entfärbt.

Die Membran wurde üN bei 4 °C in TBS incl. 3 % (w/v) BSA blockiert. Nach kurzem Waschen in TBS wurde die Membran 1 h mit Anti-MalE Antiserum (New England Biolabs) in TBS incl. 3 % (w/v) BSA (1:7.500) inkubiert, um die chimären ToxR-Proteine spezifisch zu markieren. Nach 3 x 5 min Waschen in TBST wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper Anti-Rabbit-IgG-AP-Konjugat (Promega) in TBS incl. 3 % (w/v) BSA (1:7.500) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in TBST wurde die Membran in Entwicklerlösung inkubiert. Sobald die Proteinbanden durch Ablagerung des blauen Farbstoffs, der bei der durch Alkalische Phosphatase katalysierten Dephosphorylierung von BCIP und folgender Oxidation durch NBT entsteht, sichtbar wurden, wurde die Farbreaktion mit A. dest. gestoppt und die Membran getrocknet. Zur Dokumentation wurde der Western-Blot eingescannt.

PonceauS-Lösung:	TBS (pH 7,4):	TBST (pH 7,4):
0,3 % (w/v) PonceauS	20 mM Tris-HCl	TBS incl. 0,5 % (v/v)
3 % (v/v) Trichloressigsäure	150 mM NaCl	Tween 20
Entwicklerlösung:	AP-Puffer (pH 9,5):	NBT-Lösung:
20 ml AP-Puffer	100 mM Tris-HCl	5 % (w/v) NBT in
120 µl NBT-Lösung	100 mM NaCl	70 % (v/v) Dimethyl-
60 µl BCIP-Lösung	5 mM MgCl ₂	formamid
BCIP-Lösung: 5 % (w/v) BCIP in Dimethylformamid		

3.5 Methoden zur Selektion und Analyse affiner TMDn

3.5.1 Positivselektion mittels ToxR/POSSYCCAT

Die Selektion affiner TMDn erfolgte mittels des ToxR/POSSYCCAT-Systems, das in der Einleitung näher erläutert wurde (s. 1.3).

3.5.1.1 Bestimmung der Überlebensraten verschieden affiner TMDn

Die Überlebensfähigkeiten einzelner ToxR-Konstrukte oder einer Plasmidbank in Chr3 oder EL61 wurden folgendermaßen bestimmt:

Zur Bestimmung der Überlebensraten in Chr3 wurden mit individuellen ToxR-Konstrukten oder der Bank-DNA transformierte Chr3-Stammkulturen üN kultiviert. Die üN-Kulturen wurden 1:100 in LB-Medium inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,5. Anschließend wurden die Kulturen in geeigneten Verdünnungen auf LB-Platten, die 0 bis 120 µg/ml Cm, 2 % (w/v) D-Glucose und 0,5 % (w/v) L-Arabinose enthielten, ausplattiert. Nach ca. 20 h Inkubation bei 37 °C wurden die überlebenden Kolonien gezählt und die Anzahlen überlebender Zellen durch Extrapolation ermittelt.

Zur Bestimmung der Überlebensraten in EL61 wurden mit individuellen ToxR-Konstrukten oder der Bank-DNA transformierte EL61-Stammkulturen üN kultiviert. Die üN-Kulturen wurden in geeigneten Verdünnungen auf LB-Platten, die 0 bis 30 µg/ml Cm und 0,0025 % (w/v) L-Arabinose enthielten, ausplattiert. Nach ca. 20 h Inkubation bei 37 °C wurden die überlebenden Kolonien gezählt und die Anzahlen überlebender Zellen durch Extrapolation ermittelt.

3.5.1.2. Selektion affiner TMDn aus kombinatorischen Banken

Zur Selektion affiner TMDn aus der Plasmidbank SU1 wurden elektrokompente Chr3-Zellen bzw. hochkompetente EL61-Zellen (Transformationseffizienzen von $\sim 1 \times 10^8$ bzw. $\sim 5 \times 10^6$ koloniebildenden Einheiten/ μg DNA) mit der Bank-DNA durch Elektroporation bzw. Hitzeschocktransformation transformiert (s. 3.2.1 und 3.2.2). Mit den Transformationsansätzen wurden anschließend selektive Medien beimpft. Zum einen wurden die Zellen in LB-Medium, das 0 bis 2 % (w/v) D-Glucose und 0 bis 1 % (w/v) L-Arabinose (für Chr3-Zellen) bzw. 0 bis 0,0025 % (w/v) L-Arabinose (für EL61-Zellen) und 240 bis 840 $\mu\text{g/ml}$ Cm enthielt, inokuliert. Zum anderen wurden sie auf LB-Platten, die 0 bis 2 % (w/v) D-Glucose und 0 bis 1 % (w/v) L-Arabinose (für Chr3-Zellen) bzw. 0 bis 0,0025 % (w/v) L-Arabinose (für EL61-Zellen) und 180 bis 360 $\mu\text{g/ml}$ Cm enthielten, ausplattiert. Nach μN -Kultivierung und vorheriger Vereinzlung überlebender Zellen aus Flüssigkulturen wurden die Plasmide aus den Überlebenden isoliert (s. 3.3.1) und ihre randomisierten Bereiche sequenziert (s. 3.3.8).

Zur Selektion affiner TMDn aus der Plasmidbank JP1 wurden mit der Bank-DNA transformierte hochkompetente EL61-Zellen (s. 3.2.1 und 3.2.2) auf LB-Platten, die 180 bis 420 $\mu\text{g/ml}$ Cm und keine Arabinose enthielten, ausplattiert und μN kultiviert. Die TMD-codierenden Bereiche der aus den überlebenden Kolonien isolierten Plasmide wurden anschließend sequenziert (s. 3.3.1 und 3.3.8).

3.5.2 Analyse affiner TMDn

In ToxR-Assays wurden die relativen TMD-TMD-Affinitäten der chimären ToxR-Proteine anhand des Ausmaßes der Transkriptionsaktivierung ermittelt. Zur Kontrolle der korrekten Membranintegration sowie der Expressionslevel der ToxR-Proteine wurden PD28-Wachstumsassays sowie Western-Blot-Analysen durchgeführt. Die zugrunde liegenden Theorien sind in der Einleitung erläutert (s. 1.3).

3.5.2.1 ToxR-Assay zur Bestimmung der relativen TMD-TMD-Affinitäten

Chemisch kompetente FHK12-Zellen wurden mit den entsprechenden ToxR-Konstrukten transformiert. Der Transformationsansatz wurde 1:100 in LB-Medium incl. 2 % (w/v) Maltose und 0,4 mM IPTG (für pToxR) oder 0,0025 bis 0,005 % (w/v) L-Arabinose und 0,4 mM IPTG (für pToxRIV) inokuliert (vier parallele Kulturen pro Probe). Die Kulti-

vierung erfolgte in 24-Well-Zellkulturplatten (Falcon™, BD Biosciences) bei 37 °C und 200 rpm über einen Zeitraum von ca. 20 h.

Anschließend wurden die spezifischen β -Gal-Aktivitäten der die ToxR-Proteine exprimierenden FHK12-Kulturen bestimmt. Dazu wurden je 5 μ l Kulturvolumen in je ein Well einer Mikrotiterplatte (96-Well Mikrotiterplatte, Sarstedt) überführt, je 100 μ l chloroform-gesättigter Z-Puffer zugegeben und die Zellkonzentrationen durch Messung der Optischen Dichte der Zellsuspensionen (A_{650}) im ELISA-Reader (Thermomax microplate reader, Molecular Devices) bestimmt. Zur Zellyse wurden je 50 μ l Z-Puffer incl. 1,6 % (w/v) SDS zugegeben, gut durchmischt und 10 min bei 28 °C inkubiert. Die enzymkatalysierte Farb-reaktion wurde durch Zugabe von je 50 μ l Z-Puffer incl. 0,4 % (w/v) ONPG gestartet und die Enzymkinetik bei 28 °C durch Messung der Absorption bei 405 nm (A_{405}) über 20 min in Intervallen von 30 s ermittelt. An die Kinetik (bis zu $A_{405} = 1$) wurde eine lineare Funktion angepasst, die der maximalen Steigung der Reaktionskurve (V_{max}) entspricht. Die β -Gal-Aktivität (in Miller Units, MU) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\beta\text{-Gal-Aktivität [MU]} = 1000 \times V_{max}/A_{650} = 1000 \times (\Delta A_{405}/\text{min})/A_{650} \text{ [94]}$$

Die Daten wurden mit Hilfe der Software Softmax Pro 3.0 von Molecular Devices ausgewertet. Im Allgemeinen wurden zwölf bis 16 Datenpunkte aus drei bis vier unabhängigen ToxR-Assays gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

Z-Puffer (pH 7):

60 mM Na₂HPO₄

40 mM NaH₂PO₄

10 mM KCl

1 mM MgSO₄

chloroformgesättigter Z-Puffer:

Z-Puffer mit 10 % (v/v) Chloroform und

1 % (v/v) β -Mercaptoethanol versetzen, gut

mischen, 1 min bei 800 rpm (ZF) zentrifugie-

ren, Überstand verwenden

3.5.2.2 PD28-Wachstumsassay zur Kontrolle der Membranintegration

In PD28-Wachstumsassays wurde die korrekte Topologie der ToxR-Proteine in der inneren Bakterienmembran überprüft und die relativen Integrationseffizienzen der Konstrukte anhand ihrer Fähigkeit, die Male-Defizienz von PD28-Zellen zu komplementieren, abgeschätzt. Die zugrunde liegende Theorie ist in der Einleitung erläutert (s. 1.3).

3.5.2.2.1 PD28-Standardtest

Im PD28-Standardtest zur Kontrolle der Membranintegration individueller ToxR-Konstrukte wurden mit den entsprechenden Plasmiden transformierte PD28-Zellen in N kultiviert, 2 ml Kultur zweimal mit 1 ml PBS gewaschen (Zentrifugationsschritte: 10 min bei 4 °C und 3.500 rpm, TZ), anschließend in 1 ml PBS resuspendiert und 1:200 in M9-Minimalmedium incl. 0,4 % (w/v) Maltose inokuliert (zwei bis drei parallele Kulturen pro Probe). Die Kultivierung (in Kulturröhrchen in Volumina von 5 ml) erfolgte bei 37 °C auf dem Roller. Nach verschiedenen Wachstumsperioden wurden je 200 µl Kultur in eine Mikrotiterplatte (96-Well Mikrotiterplatte, Sarstedt) überführt, die Zelldichten der Kulturen (A_{650}) im ELISA-Reader bestimmt und die aus den Mittelwerten der parallelen Ansätze berechneten Wachstumskinetiken mit derjenigen eines ToxR-Konstrukts ohne TMD (Δ TM) [72] sowie mit derjenigen der TMD AZ2 [95] verglichen. ToxR-Proteine aus der Bank SU1 bzw. JP1 wurden für membranintegriert erachtet, wenn der A_{650} -Wert exprimierender PD28-Kulturen nach 24 h bzw. 21 h Wachstum stetig mindestens das Dreifache von demjenigen von Δ TM in einem parallelen Experiment betrug.

PBS (pH 7,4):

85 mM Na₂HPO₄
15 mM NaH₂PO₄
100 mM NaCl

M9-Minimalmedium [94]:

48 mM Na₂HPO₄
22 mM KH₂PO₄
9 mM NaCl
19 mM NH₄Cl
2 mM MgSO₄
1 µg/ml Thiamin

3.5.2.2.2 PD28-Schnelltest

Zur Isolierung membranintegrierter ToxR-Konstrukte aus der kombinatorischen Plasmidbank JP1 wurde ein PD28-Schnelltest verwendet. Dazu wurden mit der Bank-DNA transformierte PD28-Zellen auf LB-Platten vereinzelt und gewachsene Kolonien (ohne vorheriges zweimaliges Waschen mit PBS) in 24-Well-Zellkulturplatten (Falcon™, BD Biosciences) in M9-Minimalmedium incl. 0,4 % (w/v) Maltose (s. 3.5.2.2.1) inokuliert oder als Verdünnungsausstriche auf M9-Minimal-Platten incl. 0,4 % (w/v) Maltose ausgestrichen. Die Kultivierung der Flüssigkulturen erfolgte 1 d bei 37 °C und 200 rpm, die Platten wurden 2 d bei 37 °C kultiviert. Nach Bestimmung der A_{650} -Werte (Flüssigkulturen) oder optischer Abschätzung des Wachstums (Plattenkulturen) im Vergleich zu den Referenz-

konstruierten Δ TM und AZ2 in einem parallelen Experiment wurden vermutlich membranintegrierte ToxR-Konstrukte ausgewählt und zur Identifikation tatsächlich membranintegrierter Konstrukte dem PD28-Standardtest unterzogen (s. 3.5.2.2.1).

3.5.2.3 Western-Blot-Analyse zur Kontrolle des Expressionslevels

Zur Abschätzung der Konzentrationen der ~66 kDa ToxR/TMD/MalE-Konstrukte in Ganzzellslysaten exprimierender FHK12-Kulturen wurden nach Auftrennung der Proteinfractionen durch SDS-PAGE Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden nach 20 h Kultivierung Aliquots aus den für den ToxR-Assay vorbereiteten FHK12-Kulturen (s. 3.5.2.1) entnommen und die Zellen durch Zentrifugation (2 min bei 13.000 rpm, TZ) geerntet, wobei gleiche Volumina der vier parallelen Kulturen einer Probe vereint wurden. Anschließend wurden Proben für die SDS-PAGE vorbereitet (s. 3.4.2). Nach SDS-PAGE (s. 3.4.2) und Western-Blotting (s. 3.4.3) der Polyacrylamidgele wurden die Expressionslevel der ToxR-Konstrukte anhand der Bandenintensitäten auf der Membran abgeschätzt.

4. Ergebnisse

4.1 Verwendung der Promotoren *ctx* und *ompU* zur Selektion affiner TMDn

Zur Selektion affiner TMDn aus Banken stehen im Rahmen des ToxR/POSSYCCAT-Systems zwei *E. coli*-Reporterstämme zur Verfügung, in denen das chromosomal integrierte *cat*-Gen unter der Kontrolle von *ctx* (Chr3 [89]) oder *ompU* (EL61 [92]) steht (s. 1.3). Beide Promotoren werden durch ToxR-Di- oder Multimere aktiviert.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Selektion hochaffiner TMDn. Zur Optimierung der Selektionsstrategie wurde daher zunächst untersucht, ob die ToxR-aktivierten Promotoren *ctx* und *ompU* geeignet wären, aus einem Pool von Sequenzvarianten mit hoher Treffsicherheit hochaffine TMDn herauszufiltern. Die Schwierigkeit besteht darin, dass partiell randomisierte Banken oftmals eine Vielzahl von Sequenzen enthalten, die nicht membranintegriert sind oder zwar integriert sind, jedoch nicht oder nur geringfügig interagieren. Eine effiziente Isolierung seltener, hochaffiner TMDn aus einer Mehrzahl nicht- oder niederaffiner Sequenzen ist daher nur möglich, wenn das Selektionssystem deutlich zwischen nicht-/niederaffinen Sequenzen und hochaffinen TMDn differenziert. Diese Differenzierbarkeit wurde für die Selektionsstämme Chr3 und EL61 aus den Überlebensraten unterschiedlich affiner ToxR-Konstrukte bei zunehmendem selektivem Druck abgeschätzt.

4.1.1 Verwendete Referenzkonstrukte

Die verwendeten Referenzkonstrukte sind in Abb. 7 dargestellt. Als Modell-TMDn wurden ein membranständiger Leucinzipper (AZ2), der über ein wiederholtes Heptadenmuster von Leu-Resten auf einem Ala-Grundgerüst mit sich selbst interagiert und mittelaffin ist, und eine oligo-Ala-Sequenz (A16), die membranintegriert, jedoch kaum affin ist, gewählt [95]. Als weitere Referenz diente ein ToxR-Konstrukt, dessen TMD deletiert worden war (Δ TM) [72]. Δ TM ist nicht membranintegriert, sondern liegt als Monomer im Cytoplasma exprimierender Zellen vor und induziert daher höchstens basale Expression. In einem parallelen Experiment wurde der Anteil Überlebender aus einer kombinatorischen Plasmidbank (Bank AR [91]) ermittelt. In dieser Bank wurden alle zehn Positionen eines wiederholten

Heptadenmusters mit den 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren randomisiert, während die restlichen Positionen mit Ala besetzt sind (Abb. 7). Die durchschnittliche Affinität der Bank AR ist sehr gering – die induzierte β -Gal-Aktivität entspricht ungefähr derjenigen von Δ TM –, da schätzungsweise 95 % der ToxR-Proteine dieser Bank nicht membran-integriert sind [92]. Dies ist vermutlich auf das häufige Auftreten geladener Aminosäuren und Stopp-Codons an den randomisierten Positionen und auf Klonierungsartefakte zurückzuführen [92]. Hochaffine TMDn dürften daher nur einen sehr geringen Anteil dieser Bank ausmachen [91].

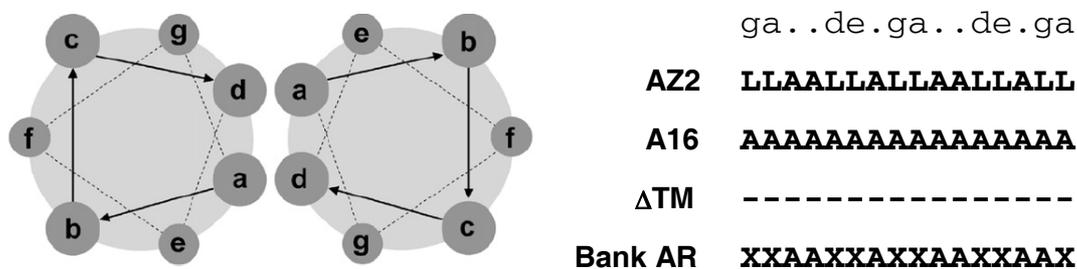


Abb. 7: Überblick über die verwendeten Referenzkonstrukte. **Links:** Helix-Rad-Diagramm eines Leucinzipper-Dimers, das zeigt, dass Reste an den Positionen *a* und *d* des Heptadenmusters den Kern der Helix-Helix-Kontaktfläche bilden, während Reste an den Positionen *e* und *g* an ihrer Peripherie liegen. **Rechts:** Aminosäuresequenzen der TMD-Regionen der ToxR-Konstrukte (vgl. Erläuterungen im Text). In der Bank AR wurden alle zehn Positionen der potentiellen Helix-Helix-Kontaktfläche (mit X bezeichnet) mit den 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren randomisiert, während die *b*, *c* und *f* Positionen mit invariantem Ala besetzt sind. Über den Sequenzen ist das wiederholte Heptadenmuster angegeben. Striche symbolisieren die Deletion der TMD. Abbildung verändert nach [92].

4.1.2 Abhängigkeit der Überlebensraten von der TMD-TMD-Affinität

Um die Abhängigkeit der Überlebensraten von der TMD-TMD-Affinität zu untersuchen, wurden die Überlebensraten der verschiedenen affinen Referenzkonstrukte (s. 4.1.1) in Chr3 (*ctx::cat*) oder EL61 (*ompU::cat*) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden exprimierende Chr3- oder EL61-Zellen auf Medien, die steigende Cm-Konzentrationen enthielten, ausplattiert und der Anteil überlebender Kolonien ermittelt (s. 3.5.1.1).

4.1.2.1 Positive Korrelation zwischen TMD-TMD-Affinität und Überlebensfähigkeit in Chr3 (*ctx*)

Der prozentuale Anteil überlebender Chr3-Zellen bei Variation des Selektionsdrucks und Expression verschieden affiner ToxR-Proteine ist in Abb. 8 dargestellt. Erwartungsgemäß nimmt die Anzahl überlebender Zellen mit zunehmender Cm-Konzentration ab.

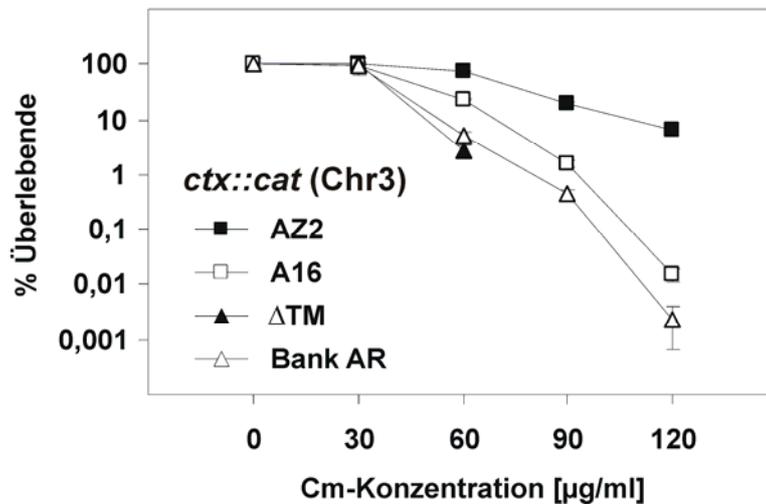


Abb. 8: Positivselektion verschiedener ToxR-Proteine durch Aktivierung des *ctx*-Promotors. Erhöhte Selbstaffinität der ToxR-Proteine äußert sich in zunehmender Stärke der Transkriptionsaktivierung des *cat*-Gens vom *ctx*-Promotor und korreliert daher mit einer steigenden Überlebensrate transformierter Chr3-Zellen auf Cm-haltigen Medien. Die Überlebensfähigkeit der Zellen spiegelt sich in der nach 20 h Wachstum vorhandenen Anzahl an Kolonien auf LB-Platten, die die angegebenen Cm-Konzentrationen enthalten, wider. Ein exemplarisches Experiment ist gezeigt (Chr3-Zellen der Plattenkulturen mit 2 % (w/v) D-Glucose und 0,5 % (w/v) L-Arabinose induziert, Vorkulturen ohne Induktion; Mittelwerte \pm SD, $n = 2-4$ Datenpunkte), Fehlerbalken, die kleiner als die entsprechenden Symbole sind, sind nicht gezeigt.

Es zeigt sich, dass steigende Affinitäten (Δ TM < A16 < AZ2) sich in zunehmender Cm-Resistenz äußern. Während bei 120 µg/ml Cm noch ~10 % der mittellaffinen TMD AZ2 überlebt, überlebt die niederaffine TMD A16 nur noch zu ~0,01 %; die Wahrscheinlichkeit, dass Δ TM diese Cm-Konzentration überlebt, ist gleich Null. Geringe Cm-Konzentrationen (bis zu 30 µg/ml) überlebt Δ TM trotz fehlender TMD und Affinität in gleichem Maße wie die affinen ToxR-Konstrukte, und zwar in seiner Gesamtheit. Erst ab 60 µg/ml Cm tritt eine Differenzierung der Überlebenskurven der verschieden affinen Konstrukte auf.

Bei Cm-Konzentrationen von bis zu 60 µg/ml ähnelt die Überlebenskurve der Bank AR derjenigen von Δ TM. Dies bestätigt, dass die durchschnittliche Affinität der Bank sehr

gering ist; die Gründe dafür wurden bereits diskutiert (s. 4.1.1). Im Gegensatz zu Δ TM überlebt die Bank AR Cm-Konzentrationen von 90 bis 120 $\mu\text{g/ml}$, jedoch mit verhältnismäßig geringer Wahrscheinlichkeit (Abb. 8). Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass die Bank zwar affine TMDn enthält, jedoch nur einen sehr geringen Anteil [91].

Bei 120 $\mu\text{g/ml}$ Cm ist die Überlebenswahrscheinlichkeit der mittelaffinen TMD AZ2 in etwa um den Faktor 1.000 höher als diejenige der niederaffinen TMD A16. Bestünde eine kombinatorische Bank aus gleichen Anteilen affiner und niederaffiner TMDn, bedeutete dies, dass unter den gegebenen Bedingungen die Wahrscheinlichkeit, eine mindestens mittelaffine TMD (wie AZ2) aus Chr3 zu isolieren, ca. 1.000-mal so hoch wäre wie die Wahrscheinlichkeit, eine nichtaffine TMD (wie A16), also eine falschpositive Sequenz, zu selektieren. Da affine TMDn in Zufallsbanken aufgrund des hohen Anteils nichtintegrierter oder inkorrekturer Sequenzen jedoch im Allgemeinen eine Minderheit darstellen, ist die Wahrscheinlichkeit, mit diesem System unter den gegebenen Bedingungen eine falschpositive Sequenz zu selektieren, vermutlich weitaus höher.

Nichtsdestotrotz scheint das auf *ctx* basierende System zur Selektion affiner TMDn geeignet zu sein, da höhere Affinitäten mit steigenden Überlebensraten korrelieren.

4.1.2.2 Positive Korrelation zwischen TMD-TMD-Affinität und Überlebensfähigkeit in EL61 (*ompU*)

Der prozentuale Anteil überlebender EL61-Zellen bei Variation des Selektionsdrucks und Expression verschieden affiner ToxR-Proteine ist in Abb. 9 dargestellt. Auch bei Positivselektion mittels des auf *ompU* basierenden Systems korrelieren steigende Affinitäten mit zunehmender Cm-Resistenz, in der Reihenfolge Δ TM < A16 < AZ2. Eine deutliche Differenzierung der Überlebenskurven der verschieden affinen ToxR-Konstrukte tritt bereits bei sehr geringen Cm-Konzentrationen auf: Bei 10 $\mu\text{g/ml}$ Cm überleben <0,1 % der Δ TM-exprimierenden Zellen, bei 30 $\mu\text{g/ml}$ Cm sind es nur noch ~0,001 %; die mittelaffine TMD AZ2 hingegen verleiht bei 10 bzw. 30 $\mu\text{g/ml}$ Cm ~95 % bzw. ~30 % der exprimierenden Zellen die Fähigkeit zu überleben. Wie in Chr3 (s. Abb. 8) liegt die Überlebenskurve der Bank AR in EL61 zwischen derjenigen von Δ TM und derjenigen von A16 (Abb. 9). In EL61 ist die Überlebensrate der nichtaffinen TMD A16 gegenüber derjenigen von AZ2 bei den verwendeten selektiven Drücken nur um 20 bis 50 % reduziert. Wie in Abb. 9 gezeigt, besteht jedoch ein großer Unterschied zwischen den Überlebensraten von Δ TM und AZ2 oder A16 (Faktor 1.000 bis 10.000). Da der Großteil der Sequenzvarianten partiell

randomisierter Banken (z.B. Bank AR, s. 4.1.1) wahrscheinlich nicht membranintegriert ist und die effiziente Selektion affiner TMDn daher vermutlich größtenteils auf guter Differenzierbarkeit zwischen nichtintegrierten Sequenzen und TMDn beruht, scheint das auf *ompU* basierende Selektionssystem zur Isolierung hochaffiner TMDn sehr gut geeignet zu sein.

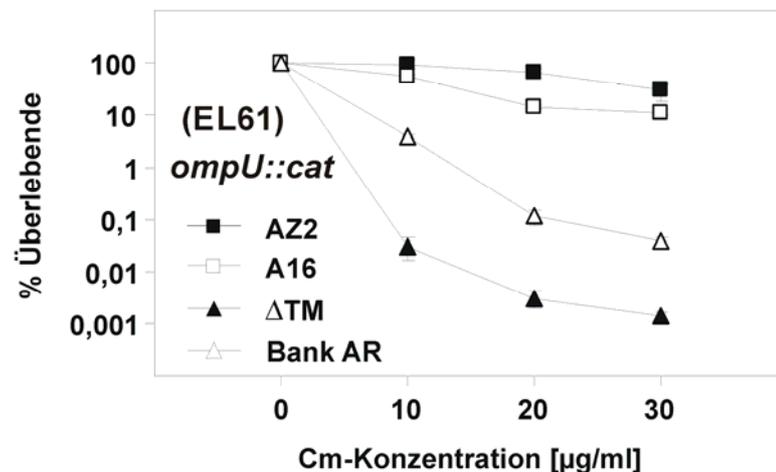


Abb. 9: Positivselektion verschiedener ToxR-Proteine durch Aktivierung des *ompU*-Promotors. Erhöhte Selbstaffinität der ToxR-Proteine äußert sich in zunehmender Stärke der Transkriptionsaktivierung des *cat*-Gens vom *ompU*-Promotor und korreliert daher mit einer steigenden Überlebensrate transformierter EL61-Zellen auf Cm-haltigen Medien. Die Überlebensfähigkeit der Zellen spiegelt sich in der nach 20 h Wachstum vorhandenen Anzahl an Kolonien auf LB-Platten, die die angegebenen Cm-Konzentrationen enthalten, wider. Die Mittelwerte aus drei Experimenten sind gezeigt (EL61-Zellen der Plattenkulturen mit 0,0025 % (w/v) L-Arabinose induziert, Vorkulturen ohne Induktion; Mittelwerte \pm SD, n = 6 Datenpunkte), Fehlerbalken, die kleiner als die entsprechenden Symbole sind, sind nicht gezeigt.

4.2 Selektion affiner TMDn aus den partiell randomisierten Plasmidbanken SU1 und JP1

Grundlegendes Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation von TMD-TMD-Interaktionsmotiven mittels genetischer Selektion affiner TMDn aus großen Banken partiell randomisierter Sequenzen. Zu diesem Zweck wurden kombinatorische Plasmidbanken konstruiert, in denen eine Oberfläche einer TMD-Helix mit Codons randomisiert wurde, welche in vorherigen, ähnlichen Studien noch nicht verwendet worden waren (s. 1.4). Die generierten

Banken SU1 und JP1 enthalten 2 bis 3×10^7 Sequenzvarianten (s. 3.3.9). Nach Überprüfung der Leistungsfähigkeit der etablierten Selektionssysteme (s. 4.1) wurden nun mittels ToxR/POSSYCCAT Sequenzen aus den Banken isoliert, welche in die innere Bakterienmembran insertieren und dort mit sich selbst interagieren können. Alle die Bank JP1 betreffenden experimentellen Arbeiten wurden von Johanna C. Panitz im Rahmen ihrer Masterarbeit unter meiner Anleitung durchgeführt.

4.2.1 Affine TMDn aus der Bank SU1

In der Bank SU1 wurden acht der zehn *a*, *d*, *e* und *g* Positionen eines wiederholten Heptadenmusters mit vorwiegend hydrophoben Aminosäuren randomisiert, welche überdies die häufigsten Aminosäuren in TMDn darstellen; an den terminalen *g* Positionen befinden sich Leu-Reste, die Positionen außerhalb der Helix-Helix-Kontaktfläche sind mit Ala besetzt (Abb. 10).

2 5 6 8 9 12 13 16
 nras L**XAA**X**XA**X**XA**X**AL**X**** gili

X = A, C, F, G, I, L, M, R, S, T, V, W

Abb. 10: Design der Bank SU1. Acht Positionen (mit X bezeichnet) der potentiellen Helix-Helix-Kontaktfläche eines wiederholten Heptadenmusters wurden mit dem unter der Sequenz angegebenen Satz von zwölf Aminosäuren randomisiert. Die Positionen 1 und 15 sind mit Leu besetzt, alle außerhalb der Helix-Helix-Kontaktfläche liegenden Positionen sind mit Ala besetzt. Kleinbuchstaben bezeichnen flankierende Sequenzen der ToxR-Chimäre. Die Nummern der randomisierten Positionen sind über der Sequenz angegeben.

PD28-Wachstumsassays zeigten, dass nur fünf von 43 zufällig aus der Rohbank ausgewählten Plasmiden für membranintegrierte ToxR-Proteine codierten. Daher liegt der prozentuale Anteil membranintegrierter Sequenzen in dieser Bank bei ~10 %. Die Qualität der Rohbank wurde durch Sequenzierung der randomisierten Bereiche dieser 43 zufällig ausgewählten Plasmide beurteilt. Diese ergab, dass 22 Sequenzen korrekt waren, während die übrigen Sequenzen meist kleine Deletionen enthielten, die Leserahmenverschiebungen in den putativen TMD-Regionen zur Folge hatten und somit zu vorzeitigem Translationsstopp führten. Nach Überexpression der ToxR-Proteine in *E. coli* TOP10 (s. 3.4.1) und Auftrennung der Ganzzelllysate mittels SDS-PAGE (s. 3.4.2) konnten verkürzte Varianten von

vollständigen ToxR-Proteinen im Coomassie-gefärbten Gel durch die geringere Größe der am intensivsten angefärbten Bande (entspricht dem überexprimierten ToxR-Konstrukt) unterschieden werden. Die Sequenzierung der 22 korrekten Plasmide deutete an, dass Trp, Arg, Met und Gly in der Rohbank überrepräsentiert sind, während die Häufigkeiten von Phe, Leu, Cys und Ile an den randomisierten Positionen geringer als theoretisch erwartet sind (s. Anhang, Tab. I). Vermutlich ist daher der geringe Anteil membranintegrierter Sequenzen hauptsächlich auf das unerwartet häufige Auftreten des ionisierbaren Restes Arg in den putativen TMD-Sequenzen sowie auf fehlerhafte Sequenzen zurückzuführen. Demnach beinhaltet die Bank SU1 ca. 2×10^6 Sequenzen, die für membranintegrierte, vollständige ToxR-Proteine codieren.

Zur Isolierung affiner TMDn aus SU1 wurden Chr3- oder EL61-Zellen mit der Bank transformiert und auf festen oder in flüssigen Medien, die Cm enthielten, selektivem Druck ausgesetzt (s. 3.5.1.2). Insgesamt wurden 119 verschiedene Plasmide aus überlebenden Zellen isoliert. Um Konstrukte zu identifizieren, die in richtiger Orientierung in die innere Bakterienmembran integriert sind, wurden die Plasmide einzeln in den MalE-defizienten *E. coli*-Stamm PD28 transformiert (s. 3.5.2.2.1). Nur Zellen, die korrekt insertierte ToxR-Proteine (mit periplasmatisch vorliegender MalE-Domäne) exprimieren, können in Medien mit Maltose als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen (s. 1.3). Insgesamt konnten 102 Plasmide die MalE-Defizienz von PD28-Zellen komplementieren. Nur diese wurden detailliert analysiert.

Zur Quantifizierung der TMD-TMD-Affinitäten der plasmidcodierten ToxR-Proteine wurde die Transkriptionsaktivierung in exprimierenden *E. coli* FHK12-Zellen, welche eine *ctx::lacZ*-Fusion im Chromosom enthalten, bestimmt (s. 3.5.2.1). Die in ToxR-Assays ermittelte β -Gal-Aktivität spiegelt folglich die Selbstaffinität der jeweiligen TMD wider. Die aus SU1 selektierten TMDn induzieren ca. 0,5- bis 4-mal so hohe β -Gal-Aktivitäten wie die mittelauffine Referenz-TMD AZ2 (s. 4.1.1) (Tab. 1).

Tab. 1: Aus der Bank SU1 selektierte TMD-Sequenzen und ihre relativen β -Gal-Aktivitäten

– Nieder- und mittelaffine TMDn ¹ –			Hochaffine TMDn ²					
TMD	Sequenz	Signal	TMD	Sequenz	Signal	TMD	Sequenz	Signal
S1	.T..WS.CG..LG..A	0,5	S43	.L..GI.VG..GT..V	1,6	S85	.A..FW.CF..GA..T	2,9
S2	.G..GA.MW..GG..V	0,5	S44	.V..CA.CG..GW..T	1,6	S86	.V..CM.AS..VS..M	3,0
S3	.C..WL.AI..TW..M	0,6	S45	.C..WC.CG..FM..G	1,6	S87	.I..FV.GV..GV..G	3,0
S4	.A..AG.SV..CL..S	0,7	S46	.C..CG.VT..WF..A	1,7	S88	.V..FV.GV..GM..T	3,0
S5	.I..AC.TG..CA..A	0,7	S47	.C..FC.GW..GS..M	1,7	S89	.M..CV.MS..VS..T	3,1
S6	.L..AT.SC..AV..I	0,7	S48	.I..AA.GW..FG..I	1,7	S90	.I..FC.CF..GT..F	3,1
S7	.C..WF.IS..TM..T	0,8	S49	.G..CF.GW..GM..S	1,8	S91	.G..FG.VF..GV..G	3,1
S8	.S..SW.SG..AV..I	0,8	S50	.C..CS.VG..WM..C	1,8	S92	.V..FA.GL..GF..C	3,1
S9	.A..AT.VW..LA..A	0,8	S51	.V..FS.MF..AG..T	1,8	S93	.I..FF.GM..GV..G	3,1
S10	.V..SA.LG..VG..T	0,8	S52	.M..TW.SG..WG..V	1,8	S94	.C..FS.CF..GM..M	3,2
S11	.G..CG.CL..MC..S	0,8	S53	.S..WF.FG..TF..A	1,8	S95	.G..FL.GA..GA..F	3,3
S12	.G..LS.VV..TG..V	0,8	S54	.I..CM.GA..GA..S	1,9	S96	.W..VV.VS..TS..T	3,3
S13	.G..VG.GM..MI..V	0,9	S55	.I..FC.GA..AG..W	1,9	S97	.W..MG.WS..IS..T	3,4
S14	.M..GA.GA..MW..V	0,9	S56	.I..GI.CG..IS..I	1,9	S98	.I..CF.VG..GC..S	3,4
S15	.G..TV.VA..TG..V	0,9	S57	.V..VS.TA..IF..T	2,0	S99	.V..WW.AT..SS..C	3,4
S16	.C..TA.GC..AI..V	1,0	S58	.W..AA.MF..GF..R	2,0	S100	.V..WW.ST..TS..V	3,5
S17	.C..GW.CG..IC..M	1,0	S59	.W..GF.CG..WS..S	2,0	S101	.I..CI.VS..TS..T	3,7
S18	.L..GG.TA..CI..C	1,0	S60	.V..LA.VF..GV..G	2,1	S102	.V..WW.AT..TS..C	3,8
S19	.F..TM.AS..VC..G	1,0	S61	.A..FV.GC..GG..F	2,1			
S20	.F..TT.LS..VG..T	1,1	S62	.F..SL.GC..GC..T	2,1			
S21	.T..AF.VW..LG..S	1,1	S63	.A..CF.GG..CG..F	2,1			
S22	.V..AF.TG..MC..W	1,1	S64	.S..AS.VG..FG..M	2,2			
S23	.W..LC.GL..SG..C	1,1	S65	.I..CI.VG..GG..S	2,2			
S24	.V..FV.SF..GG..S	1,1	S66	.F..GI.CG..MG..T	2,2			
S25	.G..AC.MW..TM..T	1,2	S67	.A..AF.LG..IT..W	2,3			
S26	.I..AA.WS..WG..M	1,2	S68	.F..GC.CG..MC..A	2,3			
S27	.T..IC.TA..WT..I	1,2	S69	.L..WA.GT..GG..I	2,3			
S28	.C..CI.CS..WW..G	1,2	S70	.L..MG.WA..WG..G	2,4			
S29	.T..VS.VV..IS..S	1,2	S71	.G..FL.GC..GC..A	2,4			
S30	.G..MM.CF..GV..G	1,2	S72	.M..IW.SG..WG..V	2,4			
S31	.F..VG.WL..SA..V	1,3	S73	.A..AI.GL..GI..G	2,5			
S32	.M..WA.MG..TG..I	1,3	S74	.V..FF.GI..SC..T	2,5			
S33	.W..SA.TG..VG..V	1,3	S75	.V..FI.GM..GG..V	2,5			
S34	.W..SI.CS..MG..T	1,4	S76	.W..FA.GW..GI..A	2,6			
S35	.C..CC.SG..MG..L	1,4	S77	.A..FV.GV..GC..I	2,6			
S36	.S..SW.AS..IG..V	1,5	S78	.V..FS.GF..AS..F	2,7			
S37	.V..SW.VS..VW..V	1,5	S79	.A..FM.CF..GS..W	2,7			
S38	.V..VS.WA..WG..G	1,5	S80	.G..FA.GL..GM..A	2,7			
S39	.V..AC.GW..SS..F	1,5	S81	.F..GT.FG..TV..L	2,7			
S40	.W..LS.VS..FG..A	1,5	S82	.C..VA.LS..VG..T	2,7			
S41	.F..ST.IS..TS..I	1,5	S83	.A..FI.GC..GF..S	2,7			
S42	.M..WT.WS..TG..V	1,5	S84	.T..IV.SF..GM..G	2,9			

¹nieder-/mittelaffine TMDn (S1 bis S42) induzieren 0,5- bis 1,5-fache relative β -Gal-Aktivitäten (Signale) wie AZ2 (FHK12-Zellen mit 0,005 % (w/v) L-Arabinose induziert; Mittelwerte, n = 8-24 Datenpunkte)

²hochaffine TMDn (S43 bis S102) induzieren mehr als 1,5-fache relative β -Gal-Aktivitäten wie AZ2 (FHK12-Zellen mit 0,005 % (w/v) L-Arabinose induziert; Mittelwerte, n = 8-24 Datenpunkte)

Glycine, die in GxxxG-Motive eingebettet sind (einschließlich der GxxxG-Motive, die durch Einbeziehung des invarianten Gly-Restes der flankierenden Vektorsequenz zustande kommen, s. Abb. 10) sind grau unterlegt, Phe-Reste in weiß auf schwarzem Hintergrund gezeigt und invariante Reste als Punkte dargestellt. Alle Sequenzen wurden auf Membranintegration überprüft.

4.2.2 Affine TMDn aus der Bank JP1

In der Bank JP1 wurden acht der zehn *a*, *d*, *e* und *g* Positionen eines wiederholten Heptadenmusters mit allen 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren randomisiert, die restlichen Positionen sind mit Leu besetzt (Abb. 11).

2 5 6 8 9 12 13 16
 nras L**X**LL**XX**L**XX**LL**XX**LL**X** gili

X = A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y, Stopp

Abb. 11: Design der Bank JP1. Acht Positionen (mit X bezeichnet) der potentiellen Helix-Helix-Kontaktfläche eines wiederholten Heptadenmusters wurden mit allen 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren incl. eines Stopp-Codons randomisiert, wie unter der Sequenz angegeben. Alle außerhalb der Helix-Helix-Kontaktfläche liegenden Positionen sind mit Leu besetzt. Kleinbuchstaben bezeichnen flankierende Sequenzen der ToxR-Chimäre. Die Nummern der randomisierten Positionen sind über der Sequenz angegeben.

Die Qualität der Rohbank wurde durch Sequenzierung der randomisierten Bereiche 44 zufällig ausgewählter Plasmide beurteilt. Diese ergab, dass 21 Sequenzen korrekt waren. Die Sequenzierung dieser 21 Plasmide deutete an, dass Gly, Asp, Lys, Arg, Glu, Trp und Met in der Rohbank überrepräsentiert sind, während His, Leu, Phe, Ile, Cys und Tyr an den randomisierten Positionen seltener als theoretisch erwartet vorkommen (s. Anhang, Tab. II). PD28-Wachstumsassays zeigten, dass nur 22 von 540 zufällig aus der Rohbank ausgewählten Plasmiden für membranintegrierte, korrekte ToxR-Proteine codierten. Der prozentuale Anteil membranintegrierter Sequenzen liegt in dieser Bank folglich bei ~5 %. Dieser geringe Anteil membranintegrierter Sequenzen resultiert vermutlich aus dem unerwartet häufigen Auftreten der ionisierbaren Reste Asp, Lys, Arg, und Glu in den putativen TMD-Sequenzen sowie aus fehlerhaften Sequenzen. Die Bank JP1 beinhaltet demnach ca. $1,5 \times 10^6$ Sequenzen, die für membranintegrierte, vollständige ToxR-Proteine codieren.

Die Selektion affiner TMDn aus JP1 erfolgte auf festen, Cm-haltigen Medien in EL61-Zellen (s. 3.5.1.2). Insgesamt wurden 52 verschiedene, für membranintegrierte ToxR-Proteine codierende Plasmide isoliert, deren TMDn eine mindestens so hohe β -Gal-Aktivität induzieren wie die mittelaffine Referenz-TMD AZ2 (s. 4.1.1). Die β -Gal-Aktivitäten

der aus JP1 selektierten, mittel- bis hochaffinen TMDn sind ca. 1- bis 4-mal so hoch wie diejenige von AZ2 (Tab. 2).

Tab. 2: TMD-Sequenzen aus der Bank JP1 und ihre relativen β -Gal-Aktivitäten

– Nicht- und niederaffine TMDn ¹ –			Mittel- und hochaffine TMDn ²					
TMD	Sequenz	Signal	TMD	Sequenz	Signal	TMD	Sequenz	Signal
J1	.G..TL.QR..SV..T	0	J23	.I..GY.LY..VA..A	1,0	J49	.A..QY.VV..ET..L	2,5
J2	.G..GV.GS..TK..A	0	J24	.T..FH.VL..TW..G	1,2	J50	.G..DR.DM..LG..L	2,5
J3	.M..EQ.GR..GC..A	0,1	J25	.T..AH.SL..WA..A	1,3	J51	.I..NS.TS..TG..L	2,5
J4	.R..CA.PH..TT..G	0,1	J26	.I..GW.AY..NA..W	1,3	J52	.R..ER.TI..TG..G	2,5
J5	.R..TT.GS..MV..N	0,1	J27	.S..GN.YT..TG..I	1,6	J53	.R..VN.TM..VG..L	2,6
J6	.R..NL.SW..GP..N	0,1	J28	.T..GH.VA..TH..V	1,6	J54	.G..ST.AS..KA..V	2,7
J7	.D..HS.KG..GA..G	0,1	J29	.V..AH.TY..CW..W	1,6	J55	.C..GH.SS..AG..L	2,8
J8	.G..TS.RA..GT..V	0,2	J30	.G..GH.IL..IH..V	1,7	J56	.R..TR.EA..GG..I	2,8
J9	.A..FT.YS..ET..N	0,3	J31	.T..GH.AI..EF..I	1,7	J57	.D..DK.DW..AG..L	2,9
J10	.G..TR.TG..TA..S	0,3	J32	.A..AG.AG..VG..S	1,8	J58	.L..TH.LV..SG..C	3,0
J11	.S..PD.VL..LP..L	0,4	J33	.S..GH.SF..WG..T	1,8	J59	.G..TH.SA..IG..T	3,0
J12	.A..VA.GS..GK..G	0,5	J34	.V..ER.AW..NG..M	2,0	J60	.W..CY.VG..SG..T	3,3
J13	.C..GV.TV..PD..R	0,6	J35	.W..CH.TG..LG..A	2,1	J61	.K..YF.TG..AG..S	3,3
J14	.D..AI.RA..SG..V	0,7	J36	.G..AN.GT..TG..L	2,1	J62	.G..SV.SG..GA..M	3,5
J15	.R..EI.KA..LT..V	0,7	J37	.C..KD.ML..GG..I	2,1	J63	.F..VT.AD..AN..S	3,6
J16	.G..VT.LA..PC..A	0,7	J38	.F..NH.SG..FG..L	2,1	J64	.G..SH.SS..GG..L	3,6
J17	.S..II.AS..IG..E	0,7	J39	.V..TN.GC..FG..I	2,1	J65	.R..HT.DG..LG..I	3,6
J18	.N..VR.FT..AV..F	0,8	J40	.V..LH.AL..CN..T	2,2	J66	.R..DR.YD..LG..I	3,6
J19	.C..LG.CG..SN..P	0,8	J41	.T..GF.GG..GE..G	2,3	J67	.V..NF.AG..GG..G	3,7
J20	.R..GR.GL..VI..W	0,8	J42	.V..LR.AL..CY..S	2,3	J68	.G..DR.CY..VG..G	3,7
J21	.S..DG.CC..GS..G	0,8	J43	.T..LH.CY..IM..I	2,3	J69	.S..IY.GG..CG..L	3,7
J22	.A..IY.GG..VN..G	0,9	J44	.R..TH.VA..GG..S	2,3	J70	.I..PC.GS..GG..Q	3,8
			J45	.I..GH.AI..LN..T	2,3	J71	.T..TH.SC..GG..T	3,8
			J46	.Q..GH.VS..AG..W	2,3	J72	.Y..AT.SL..NC..M	4,0
			J47	.V..SG.GS..GN..P	2,4	J73	.N..LF.SG..TG..G	4,1
			J48	.R..ED.EI..AG..A	2,5	J74	.A..SR.EG..HG..L	4,2

¹nicht-/niederaffine (= zufällig ausgewählte) TMDn (J1 bis J22) induzieren höchstens 0,9-fache relative β -Gal-Aktivitäten (Signale) wie AZ2 (FHK12-Zellen mit 0,0025 % (w/v) L-Arabinose induziert; Mittelwerte, n = 12 Datenpunkte)

²mittel-/hochaffine TMDn (J23 bis J74) induzieren 1,0- bis 4,2-fache relative β -Gal-Aktivitäten (Signale) wie AZ2 (FHK12-Zellen mit 0,0025 % (w/v) L-Arabinose induziert; Mittelwerte, n = 12-24 Datenpunkte)

Glycine, die in GxxxG-Motive eingebettet sind (einschließlich der GxxxG-Motive, die durch Einbeziehung des invarianten Gly-Restes der flankierenden Vektorsequenz zustande kommen, s. Abb. 11) sind grau unterlegt, His-Reste in weiß auf schwarzem Hintergrund gezeigt, ionisierbare Asp-, Glu-, Lys- und Arg-Reste durch Fettdruck hervorgehoben und invariante Reste als Punkte dargestellt. Alle Sequenzen wurden auf Membranintegration überprüft.

4.3 Anreicherung von Phe in hochaffinen TMDn aus SU1 und seine Assoziation mit GxxxG-Motiven

Zur statistischen Analyse wurden die TMDn der 102 aus SU1 isolierten, membran-integrierten ToxR-Proteine (s. 4.2.1) je nach den von ihnen in FHK12-Zellen induzierten β -Gal-Aktivitäten in eine Gruppe niedriger bis mittlerer Affinität (β -Gal-Aktivität = 0,5-1,5 x AZ2; 42 Klone) und eine Gruppe hoher Affinität (β -Gal-Aktivität = 1,6-3,8 x AZ2; 60 Klone) unterteilt (s. Tab. 1). Anschließend wurden beide Gruppen hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzungen an den randomisierten TMD-Positionen verglichen (s. Anhang, Tab. I). Die in Abb. 12 dargestellten, normalisierten Häufigkeiten wurden berechnet, indem die Häufigkeit jedes Aminosäuretyps in den hochaffinen Sequenzen durch diejenige in den nieder- bis mittelaffinen Sequenzen dividiert wurde.

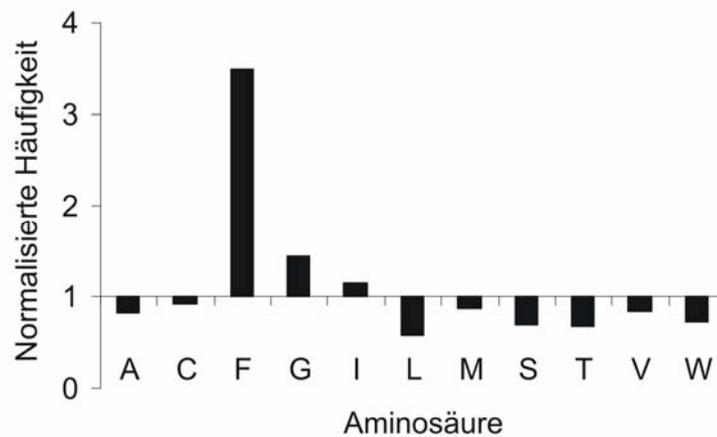


Abb. 12: Allgemeine An- oder Abreicherung von Aminosäuren in hochaffinen TMD-Sequenzen aus der Bank SU1. Die Werte wurden erhalten, indem die Häufigkeit einer bestimmten Aminosäure an den randomisierten Positionen hochaffiner Sequenzen ($n = 60$; relative β -Gal-Aktivitäten $> 1,5 \times AZ2$) durch ihre Häufigkeit in nieder-/mittelaffinen Sequenzen ($n = 42$; relative β -Gal-Aktivitäten $\leq 1,5 \times AZ2$) dividiert wurde. Eine normalisierte Häufigkeit von 1 bedeutet daher, dass die betreffende Aminosäure in hochaffinen Sequenzen, verglichen mit nieder-/mittelaffinen Sequenzen, weder über- noch unterrepräsentiert ist. Die in diesem Diagramm verwendeten Zahlen sind in Tab. I im Anhang zu finden. Arg ist hier nicht aufgeführt, da es in den aus SU1 selektierten TMD-Sequenzen insgesamt nur einmal vorkam.

Interessanterweise ist Phe in hochaffinen TMDn aus SU1 3,5-fach angereichert. Dies deutet an, dass Phe die Interaktion von TMDn begünstigt. Diese Überrepräsentation von Phe ist statistisch hochsignifikant (13 % Phe in hochaffinen vs. 4 % Phe in nieder-/mittelaffinen

Sequenzen; $p < 0,001$).¹ Von den in Tab. 1 gezeigten hochaffinen Sequenzen enthalten 67 % ein oder mehrere Phe-Reste, im Gegensatz zu nur 26 % der nieder-/mittellaffinen Sequenzen. Auch Gly tritt geringfügig, und doch signifikant, häufiger in stark interagierenden TMDn auf (24 % Gly in hochaffinen vs. 16 % Gly in nieder-/mittellaffinen Sequenzen; $p < 0,001$; statistische Signifikanz von A. Fuchs wie für Phe bestimmt, s. oben). Einige andere Aminosäuren (Leu, Ser, Thr und Trp) sind in hochaffinen TMDn scheinbar leicht unterrepräsentiert (Abb. 12). Mit Ausnahme der TMD S58, die einen Arg-Rest an ihrem C-Terminus enthält (s. Tab. 1), enthalten die selektierten TMD-Sequenzen kein Arg; dessen ionisierbare Seitenkette hemmt wahrscheinlich die Membranintegration.

Um festzustellen, ob die überrepräsentierten Phe- und Gly-Reste bevorzugt bestimmte Positionen in der TMD einnehmen, wurde die normalisierte Häufigkeit jedes Aminosäuretyps an jeder randomisierten TMD-Position ermittelt, indem die Häufigkeiten in hochaffinen Sequenzen (s. Anhang, Tab. IV) durch diejenigen in nieder-/mittellaffinen Sequenzen (s. Anhang, Tab. III) dividiert wurden. Die so erhaltene positionsspezifische An- oder Abreicherung von Aminosäuren ist in Abb. 13 dargestellt.

Interessanterweise dominiert Phe an Position 5 der hochaffinen TMDn, während Gly eine deutliche Präferenz für die Positionen 8 und 12 zeigt. Darüber hinaus enthalten 91 % aller hochaffinen Sequenzen, die Phe an Position 5 enthalten, Gly an Position 8. 85 % dieser Sequenzen weisen außerdem einen Gly-Rest an Position 12 auf, was das Sequenzmuster FxxGxxxG ergibt (s. Tab. 1). Obgleich es überwiegend die Positionen 5 bis 12 umfasst, tritt dieses Motiv auch an anderen Positionen in der TMD auf. Insgesamt enthalten ~42 % der hochaffinen TMDn dieses Muster, im Gegensatz zu nur einer nieder-/mittellaffinen TMD (S30). Vier weitere hochaffine Sequenzen enthalten ähnliche Muster, in denen Ala (S55 und S78) oder Ser (S59 und S74) anstelle des zweiten Gly zu finden ist. Zusammengefasst enthält daher etwa die Hälfte aller hochaffinen Isolate aus der Bank SU1 das Konsensmuster FxxGxxx[Sm], wobei [Sm] einen kleinen Rest (Gly, Ala oder Ser) bezeichnet. In 15 weiteren hochaffinen Sequenzen sind GxxxG-Motive zu finden. Wenn man das invariante Gly der flankierenden Vektorsequenz (s. Abb. 10) einbezieht, sind einige davon GxxxGxxxG-Motive (sog. Gly-Zipper-Motive [122]). Sieben weitere Sequenzen,

¹ Die statistische Signifikanz des bevorzugten Auftretens von Phe in hochaffinen vs. nieder-/mittellaffinen Sequenzen wurde von Angelika Fuchs (Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik, TU München) gemäß einer Binomialverteilung, ausgehend von der Aminosäurezusammensetzung der nieder-/mittellaffinen Sequenzen, bestimmt (eine detaillierte Beschreibung der Methode findet sich in [121]).

die in der Lage sind, sehr stark mit sich selbst zu interagieren (relative β -Gal-Aktivitäten $> 3,0 \times AZ2$) zeichnen sich durch Cluster von drei bis vier Ser- und Thr-Reste aus (S96 bis S102). Diese Sequenzen erinnern an Ser/Thr-Cluster-haltige Motive, die zuvor aus einer anderen randomisierten TMD-Bank isoliert worden waren [90].

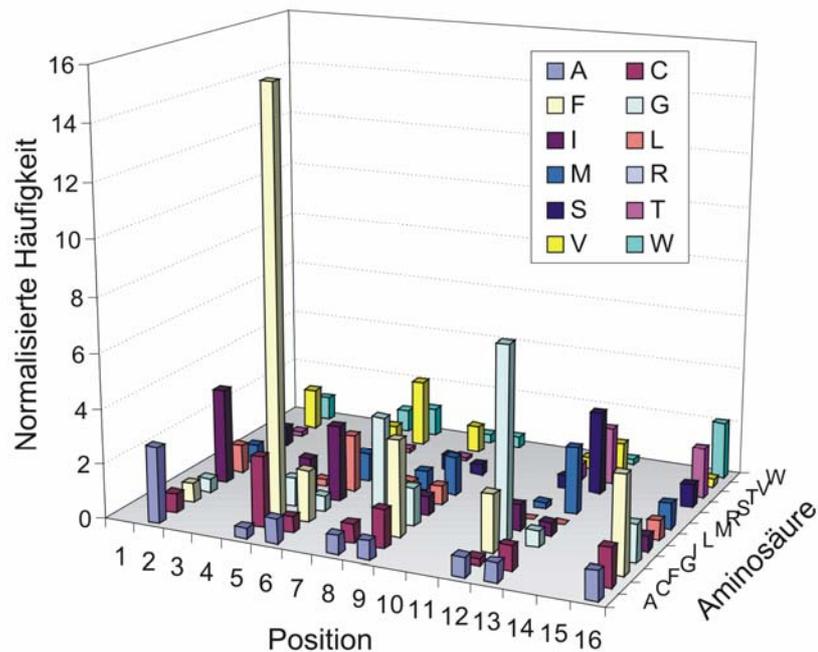


Abb. 13: Positionsspezifische An- oder Abreicherung von Aminosäuren in hochaffinen TMD-Sequenzen aus der Bank SU1. Die Werte wurden erhalten, indem die Häufigkeit jedes Aminosäuretyps an jeder randomisierten Position in hochaffinen Sequenzen (s. Anhang, Tab. IV) durch diejenige in nieder-/mittelfaffinen Sequenzen (s. Anhang, Tab. III) dividiert wurde. Für Phe an den Positionen 8 und 13 sowie für Thr an der Position 9 können keine Werte angegeben werden, da die jeweiligen Reste an diesen Positionen in den aus SU1 selektierten, nieder-/mittelfaffinen Sequenzen nicht vorkamen. Auch für Arg, das nur in einer selektierten TMD-Sequenz vorkam, können keine Werte angegeben werden. Es fällt auf, dass Phe an der TMD-Position 5 stark überrepräsentiert ist, während Gly bevorzugt an den TMD-Positionen 8 und 12 auftritt.

Des Weiteren wurden die relativen Häufigkeiten von Sequenzen, die GxxxG und/oder Phe enthalten, in den nieder-/mittelfaffinen und hochaffinen TMDn verglichen. Zu diesem Zweck wurden die $(GxxxG)_n$ -Motive, verschiedene $F/(GxxxG)_n$ -Motive und isolierte Phe-Reste, die nicht mit den eben genannten Motiven assoziiert sind, gezählt. Die erhaltenen Werte wurden auf die gesamte Anzahl der nieder-/mittelfaffinen bzw. hochaffinen TMD-Sequenzen normalisiert. Außerdem wurde untersucht, wie das Auftreten dieser Motive mit

der durchschnittlichen TMD-TMD-Affinität korreliert (Abb. 14, relative Affinitäten sind durch unterschiedliche Schattierungen wiedergegeben).

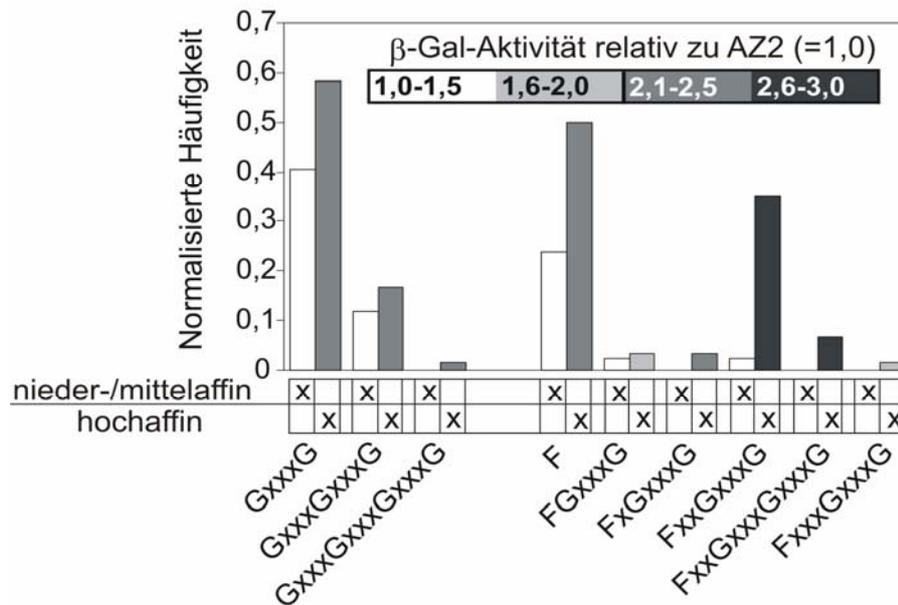


Abb. 14: Auftreten von GxxxG- und/oder Phe-haltigen Motiven in TMD-Sequenzen aus SU1 und ihre durchschnittlichen β -Gal-Aktivitäten. Die Häufigkeiten von GxxxG-Motiven, isolierten Phe-Resten oder Phe-Resten, die mit GxxxG-Motiven assoziiert sind, wurden getrennt für nieder-/mittelaffine (nieder-/mittelaffin) und hochaffine (hochaffin) Sequenzen aus SU1 untersucht. Normalisiert wurde, indem die Häufigkeit, mit der ein bestimmtes Motiv auftritt, durch die gesamte Anzahl der hochaffinen ($n = 60$) bzw. nieder-/mittelaffinen ($n = 42$) Sequenzen dividiert wurde. $(GxxxG)_n$ -Motive umfassen alle GxxxG-Motive, wohingegen $F/(GxxxG)_n$ -Motive nur die GxxxG-Motive umfassen, die mit Phe assoziiert sind, letztere Motive sind also eine Teilmenge der ersteren. Gly- oder Phe-Reste wurden nur einmal gezählt und systematisch mit dem längsten Motiv, in dem sie auftreten, assoziiert (z.B. ein $GxxxGxxxGxxxG$ -Motiv anstelle zweier GxxxG-Motive). Der invariante Gly-Rest der flankierenden Vektorsequenz wurde in die Analyse einbezogen (s. Abb. 10). Verschiedene Schattierungen geben verschiedene mittlere β -Gal-Aktivitäten relativ zu AZ2 (= 1,0) wieder (s. Inset). Es fällt auf, dass $Fxx(GxxxG)_n$ -Motive in hochaffinen Sequenzen aus SU1 stark angereichert sind und die höchsten durchschnittlichen β -Gal-Aktivitäten aufweisen.

Aus diesem Vergleich lassen sich folgende wesentliche Schlüsse ziehen: a) GxxxG-Motive und Vielfache davon sind in der hochaffinen Gruppe mäßig angereichert und induzieren dort eine höhere durchschnittliche β -Gal-Aktivität als in der nieder-/mittelaffinen Gruppe. b) $FxxGxxxG$ - und $FxxGxxxGxxxG$ -Motive sind in hochaffinen Sequenzen stark angereichert und induzieren die höchsten mittleren β -Gal-Aktivitäten. c) Isolierte Phe-Reste sind in der hochaffinen Gruppe ebenfalls angereichert und korrelieren dort mit einer höheren

durchschnittlichen β -Gal-Aktivität als in der nieder-/mittelaaffinen Gruppe. Ihre mittlere β -Gal-Aktivität liegt jedoch unter derjenigen der $F_{xx}(G_{xxx}G)_n$ -Motive.

4.4 Positionsspezifische Anreicherung von His in mittel- bis hochaffinen TMDn aus JP1

Um die 52 aus JP1 isolierten, membranintegrierten ToxR-Proteine, deren TMDn eine mindestens ebenso hohe β -Gal-Aktivität induzieren wie AZ2 (s. 4.2.2 und Tab. 2), statistisch analysieren zu können, wurde dieser Gruppe mittel- bis hochaffiner TMDn eine Vergleichsgruppe, bestehend aus zufällig ausgewählten TMDn, gegenübergestellt. Dazu wurden zunächst mittels des PD28-Schnelltests (s. 3.5.2.2.2) putative TMDn aus JP1 identifiziert, welche anschließend einem PD28-Standardtest (s. 3.5.2.2.1) unterzogen wurden, um die tatsächlich membranintegrierte Sequenzen (22 Klone, entspricht etwa der Hälfte der putativen TMDn) zu ermitteln. Gegenüber der Rohbank sind hydrophobe Aminosäuren (Ile, Leu und Val) in dieser Gruppe zufällig ausgewählter TMDn tendenziell angereichert, wohingegen stark polare Aminosäuren (Asp, Lys und Arg) eher unterrepräsentiert sind (s. Anhang, Tab. II). Wahrscheinlich begünstigen die hydrophoben Aminosäuren die Membranintegration, während ein zu großer Anteil polarer Seitenketten trotz Festlegung invarianter TMD-Positionen als Leu die Membranintegration zu hemmen scheint. Die von den zufällig ausgewählten TMDn in FHK12-Zellen induzierten β -Gal-Aktivitäten sind stets geringer als diejenige von AZ2; daher werden die zufällig ausgewählten TMDn hier auch als nicht-/niederaffine TMDn bezeichnet (s. Tab. 2). Offensichtlich ist also nur ein geringer Anteil der TMDn aus JP1 mittel- bis hochaffin. Die Identifikation dieser TMDn kann daher nicht zufällig erfolgen, sondern muss mittels eines Selektionssystems bewältigt werden. Ihr Anteil in der Rohbank ist nicht bekannt.

Die selektierten, mittel- bis hochaffinen TMDn und die zufällig ausgewählten, nicht- bis niederaffinen TMDn wurden zunächst hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzungen an den randomisierten TMD-Positionen verglichen (s. Anhang, Tab. II). Die in Abb. 15 dargestellten normalisierten Häufigkeiten wurden berechnet, indem die Häufigkeit jedes Aminosäuretyps in mittel-/hochaffinen Sequenzen durch diejenige in nicht-/niederaffinen Sequenzen dividiert wurde.

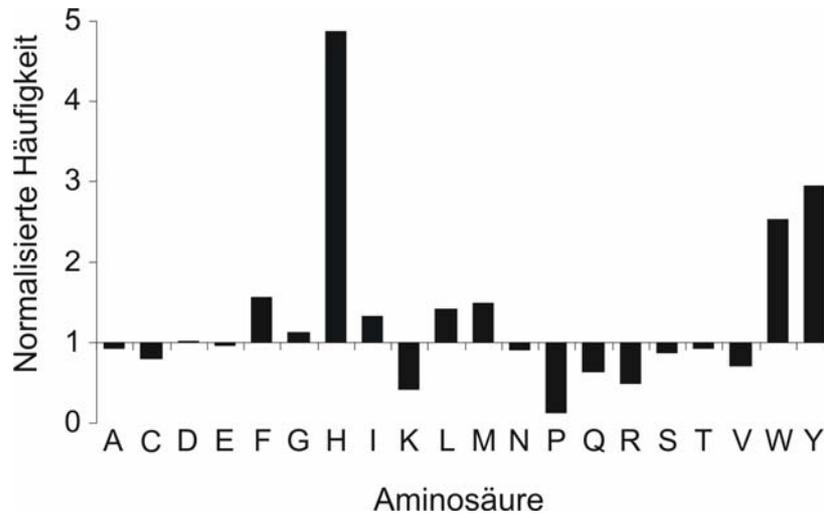


Abb. 15: Allgemeine An- oder Abreicherung von Aminosäuren in mittel- und hochaffinen TMD-Sequenzen aus der Bank JP1. Die Werte wurden erhalten, indem die Häufigkeit einer bestimmten Aminosäure an den randomisierten Positionen mittel-/hochaffiner Sequenzen ($n = 52$; relative β -Gal-Aktivitäten $\geq 1,0 \times AZ2$) durch ihre Häufigkeit in nicht-/niederaffinen Sequenzen ($n = 22$; relative β -Gal-Aktivitäten $< 1,0 \times AZ2$) dividiert wurde. Eine normalisierte Häufigkeit von 1 bedeutet daher, dass die betreffende Aminosäure in mittel-/hochaffinen Sequenzen, verglichen mit nicht-/niederaffinen Sequenzen, weder über- noch unterrepräsentiert ist. Die in diesem Diagramm verwendeten Zahlen sind in Tab. II im Anhang zu finden.

Bemerkenswerterweise ist His in mittel- und hochaffinen TMDn aus JP1 5-fach angereichert ($\sim 6\%$ His in mittel-/hochaffinen vs. $\sim 1\%$ in nicht-/niederaffinen Sequenzen). Dies weist darauf hin, dass His für die Interaktion von TMDn förderlich ist. Auch Trp und Tyr treten in stärker interagierenden TMDn deutlich häufiger auf ($\sim 3\%$ Trp bzw. Tyr in mittel-/hochaffinen vs. $\sim 1\%$ Trp bzw. Tyr in nicht-/niederaffinen Sequenzen). Einige andere Aminosäuren (Phe, Leu und Met) sind in stärker interagierenden TMDn scheinbar leicht überrepräsentiert.

Deutlich unterrepräsentiert sind hingegen Pro, Lys und Arg. Während Lys und Arg bereits in membranintegrierten Sequenzen deutlich seltener auftreten als in der Rohbank (s. oben), kommt Pro in zufällig ausgewählten, nicht-/niederaffinen TMDn ähnlich häufig vor wie in der Rohbank, ist aber in affineren TMDn deutlich abgereichert ($\sim 5\%$ Pro in der Rohbank vs. $\sim 4\%$ Pro in nicht-/niederaffinen vs. $0,5\%$ Pro in mittel-/hochaffinen Sequenzen). Dies weist darauf hin, dass ein zu großer Anteil der stark polaren Reste Lys und Arg sowohl für die Membranintegration als auch für die Interaktion von TMDn hinderlich ist, während Pro

die Insertion offensichtlich nicht gefährdet, scheinbar jedoch die Interaktion der TMDn hemmt. Bedingt durch den Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung des Rückgrats sowie aufgrund sterischer Konflikte mit dem vorangehenden Rest in der Helix, induziert Pro häufig Knicke in TMDn [123]. Eine durch Pro induzierte Deformation der α -helikalen Struktur sowie die mit Pro assoziierte Erhöhung der Flexibilität der Helix könnten die dichte Packung der Helices beeinträchtigen und so die stabile Assoziation von TMDn unterbinden. Bereits in einer vorherigen Studie wurde eine Abreicherung von Pro in affinen TMDn beobachtet, welche aus einer kombinatorischen Bank auf Basis linkshändig gekreuzter α -Helices isoliert worden waren [89]. Auch ein Austausch einzelner Aminosäurereste in der GpA TMD durch Pro führte in den meisten Fällen zur Destabilisierung des Dimers [124].

Um die positionsspezifische Anreicherung von Aminosäuren in mittel-/hochaffinen TMDn bestimmen zu können, müsste man die Häufigkeit jedes Aminosäuretyps an jeder randomisierten TMD-Position in mittel-/hochaffinen Sequenzen durch diejenige in nicht-/niederaffinen Sequenzen dividieren (vgl. Abb. 13). Da in der Bank JP1 alle 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren zugelassen sind, von denen einige nur selten in TMDn zu finden sind, kommt jedoch weder in den nicht-/niederaffinen Sequenzen (s. Anhang, Tab. V) noch in den mittel-/hochaffinen Sequenzen (s. Anhang, Tab. VI) jeder Aminosäuretyp an jeder randomisierten Position vor. Es konnten daher keine positionsbezogenen, normalisierten Häufigkeiten berechnet werden. Um dennoch bevorzugte Positionen der Aminosäuren in stark interagierenden TMDn aufdecken zu können, sind in Abb. 16 die absoluten Anzahlen jedes Aminosäuretyps an jeder randomisierten TMD-Position in mittel-/hochaffinen Sequenzen (s. Anhang, Tab. VI) dargestellt.

Ogleich His in mittel- und hochaffinen Sequenzen aus JP1 stark überrepräsentiert ist (s. Abb. 15), tritt es nur in ca. 40 % dieser Sequenzen auf (s. Tab. 2). Bemerkenswerterweise zeigt His jedoch eine enorme Positionsspezifität; es dominiert in stark interagierenden TMDn an Position 6 (Abb. 16). In 90 % der mittel-/hochaffinen Sequenzen, die His enthalten, tritt es an dieser Position auf (s. Tab. 2). Außerdem fällt auf, dass Gly eine deutliche Präferenz für Position 13 zeigt (Abb. 16). 63 % der mittel-/hochaffinen Sequenzen enthalten Gly an Position 13 (s. Tab. 2), was in Verbindung mit dem invarianten Gly der flankierenden Vektorsequenz (s. Abb. 11) dazu führt, dass derselbe Anteil stark interagierender TMDn über ein C-terminales GxxxG-Motiv verfügt. Keine Positionsspezifität

zeigt Gly in nicht-/niederaffinen Sequenzen (s. Anhang, Tab. V). Trp und Tyr, die in mittel-/hochaffinen TMDn aus JP1 deutlich überrepräsentiert sind (s. Abb. 15), zeigen dort kaum Positionsspezifitäten (Abb. 16).

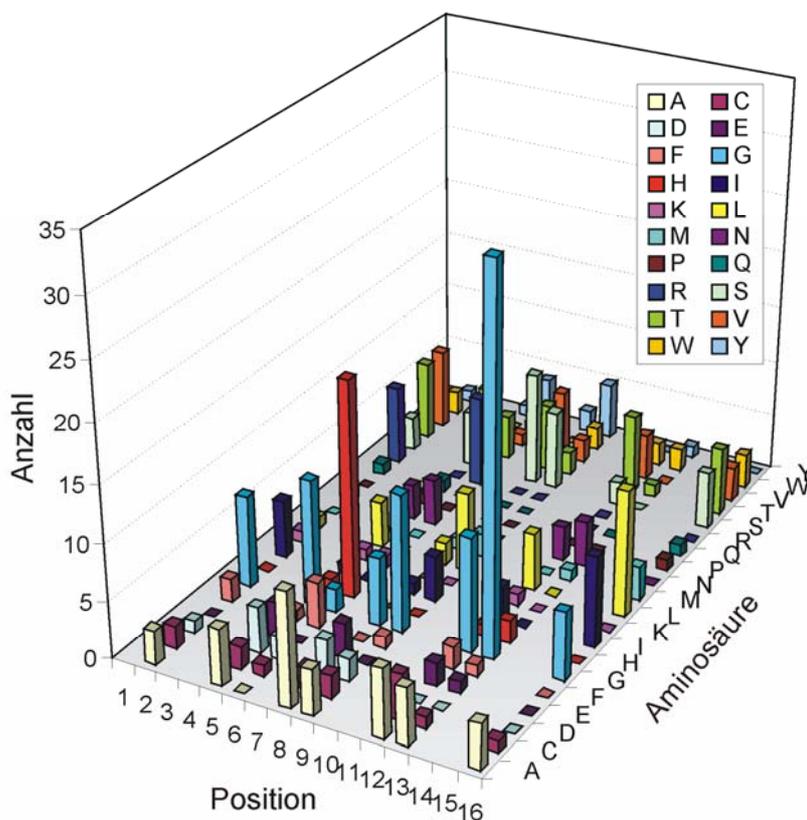


Abb. 16: Positionsspezifisches Auftreten von Aminosäuren in mittel-/hochaffinen TMD-Sequenzen aus JP1. Die Werte geben die absoluten Anzahlen jedes Aminosäuretyps an jeder randomisierten TMD-Position in mittel-/hochaffinen Sequenzen an und sind in Tab. IV im Anhang zu finden. Es fällt auf, dass His an der TMD-Position 6 stark überrepräsentiert ist, während Gly bevorzugt an der TMD-Position 13 auftritt.

Des Weiteren wurden die relativen Häufigkeiten von Sequenzen, die GxxxG enthalten, in den nicht-/niederaffinen und mittel-/hochaffinen TMDn verglichen. Dazu wurden die $(GxxxG)_n$ -Motive gezählt und die erhaltenen Werte auf die gesamte Anzahl der nicht-/niederaffinen bzw. mittel-/hochaffinen TMD-Sequenzen normalisiert. Außerdem wurde untersucht, wie das Auftreten dieser Motive mit der durchschnittlichen TMD-TMD-Affinität korreliert (Abb. 17, relative Affinitäten sind durch unterschiedliche Schattierungen wiedergegeben).

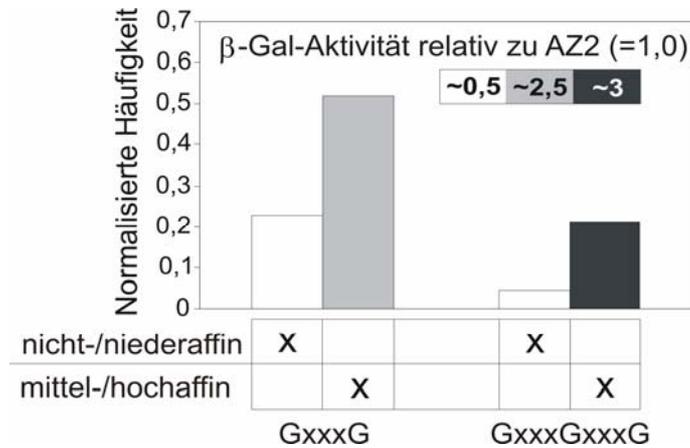


Abb. 17: Auftreten von GxxxG-Motiven in TMD-Sequenzen aus JP1 und ihre durchschnittlichen β -Gal-Aktivitäten. Die Häufigkeiten von GxxxG-Motiven wurden getrennt für nicht-/niederaffine (nicht-/niederaffin) und mittel-/hochaffine (mittel-/hochaffin) Sequenzen aus JP1 untersucht. Normalisiert wurde, indem die Häufigkeit, mit der ein GxxxG- oder GxxxGxxxG-Motiv auftritt, durch die gesamte Anzahl der mittel-/hochaffinen ($n = 52$) bzw. nicht-/niederaffinen ($n = 22$) Sequenzen dividiert wurde. Gly-Reste wurden nur einmal gezählt und, sofern möglich, mit dem längeren GxxxGxxxG-Motiv assoziiert. Der invariante Gly-Rest der flankierenden Vektorsequenz wurde in die Analyse einbezogen (s. Abb. 11). Verschiedene Schattierungen geben verschiedene mittlere β -Gal-Aktivitäten relativ zu AZ2 (= 1,0) wieder (s. Inset). Es fällt auf, dass (GxxxG)_n-Motive in mittel-/hochaffinen Sequenzen aus JP1 angereichert sind und dort wesentlich höhere durchschnittliche β -Gal-Aktivitäten induzieren als in den nicht-/niederaffinen Sequenzen.

Aus diesem Vergleich folgt, dass a) GxxxG-Motive in der mittel-/hochaffinen Gruppe mäßig angereichert sind und b) GxxxGxxxG-Motive in mittel-/hochaffinen Sequenzen deutlich angereichert sind und die höchsten mittleren β -Gal-Aktivitäten induzieren. (GxxxG)_n-Motive treten vorwiegend in der C-terminalen Hälfte der TMDn auf (s. Tab. 2).

Mehr als die Hälfte der mittel-/hochaffinen Sequenzen, die His an Position 6 enthalten, enthalten Gly an Position 13 und somit ein C-terminales GxxxG-Motiv (s. oben); dies sind überwiegend die affineren unter ihnen (s. Tab. 2). Wenn man den weiteren Sequenzkontext von His6 in den mittel-/hochaffinen TMDn betrachtet, fällt auf, dass die benachbarten, randomisierten Positionen häufig mit eher kleineren, apolaren bis mäßig polaren Resten (Ala, Cys, Gly, Ser, Thr oder Val) besetzt sind. Daher wurde untersucht, wie das Auftreten solcher Reste mit dem Auftreten von His an Position 6 korreliert. Dazu wurden die prozentualen Anteile kleinerer, höchstens mäßig polarer Reste an den sieben anderen randomisierten Positionen der His6-haltigen Sequenzen bestimmt und mit denjenigen in

mittel-/hochaffinen Sequenzen, die kein His an Position 6 enthalten, verglichen (s. Tab. 2 und Anhang, Tab. VI). Die Werte wurden erhalten, indem die Summen aus den an jeder Position auftretenden Ala-, Cys-, Gly-, Ser-, Thr- und Val-Resten auf die gesamte Anzahl der mittel-/hochaffinen TMDn mit His6 bzw. der mittel-/hochaffinen TMDn ohne His6 normalisiert wurden (Abb. 18).

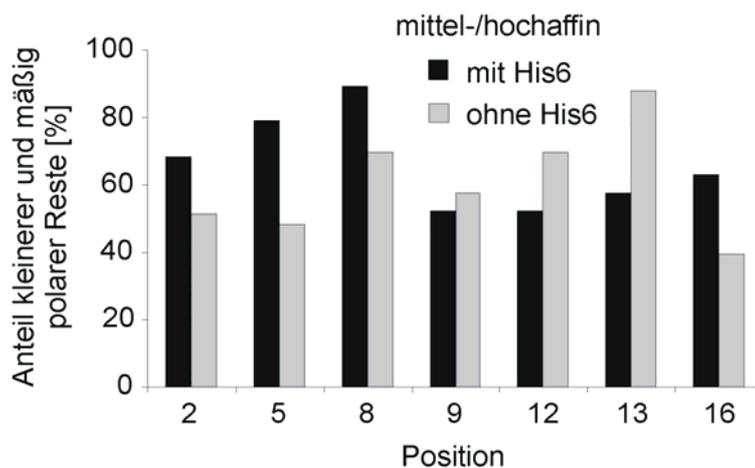


Abb. 18: Positionsspezifisches Auftreten von kleineren und mäßig polaren Aminosäuren in mittel-/hochaffinen TMD-Sequenzen aus JP1 mit bzw. ohne His an Position 6. Die Werte geben die aufsummierten prozentualen Anteile der kleineren, höchstens mäßig polaren Reste Ala, Cys, Gly, Ser, Thr und Val an jeder randomisierten TMD-Position außer Position 6 in mittel-/hochaffinen Sequenzen, die His an Position 6 enthalten (mit His6, n = 19; Mittelwert = 66 %) oder nicht (ohne His6, n = 33; Mittelwert = 61%), an (s. Tab. 2 und Anhang, Tab. VI). Es fällt auf, dass in mittel-/hochaffinen Sequenzen, die His an Position 6 enthalten, kleinere, apolare bis mäßig polare Reste bevorzugt an den flankierenden TMD-Positionen 5 und 8 auftreten und dort, verglichen mit mittel-/hochaffinen Sequenzen, die kein His an Position 6 enthalten, mäßig angereichert sind.

Interessanterweise zeigen kleinere, apolare bis mäßig polare Aminosäuren in mittel-/hochaffinen TMDn, die His an Position 6 enthalten, eine Präferenz für die Positionen 5 und 8; diese liegen Position 6 in der Kontaktfläche linkshändig gekreuzter Helices gegenüber (Positionen 5, 6 und 8 entsprechen den Positionen *d*, *e*, und *g* des Heptadenmusters, s. Abb. 7 links). Hingegen ist der Anteil solcher Reste in mittel-/hochaffinen Sequenzen, die kein His an Position 6 enthalten, an den Positionen 5 und 8 deutlich geringer; dort treten kleinere und mäßig polare Reste (v. a. Glycin, s. Tab. 2) bevorzugt an Position 13 auf (Abb. 18).

79 % bzw. 89 % der Sequenzen, die His an Position 6 enthalten, enthalten Ala, Cys, Gly, Ser, Thr oder Val an Position 5 bzw. 8 (s. Tab. 2). In mehr als der Hälfte der Sequenzen, die His an Position 6 enthalten, tritt Gly an Position 13 auf, wo es mit dem invarianten Gly an Position 17 (s. oben) ein GxxxG-Motiv ausbildet. Als generelles Sequenzmotiv, das die Interaktion stark interagierender TMDn aus JP1 vermitteln könnte, ergibt sich daher (A/C/G/S/T/V)Hx(A/C/G/S/T/V)xxxxGxxxG.

4.5 Alternierendes Auftreten potentiell gegensätzlich geladener Aminosäuren in hochaffinen TMDn aus JP1

Obgleich die ionisierbaren Aminosäuren Lys, Arg, Asp und Glu in mittel-/hochaffinen TMDn aus JP1 eher unterrepräsentiert sind (s. Abb. 15), zeigt sich, dass sie dort bevorzugt in der N-terminalen Hälfte der TMDn auftreten (s. Tab. 2 und Abb. 16). Das Auftreten von Arg ist dabei gänzlich auf die Positionen 2 und 6 beschränkt (s. Abb. 16). Bei näherer Betrachtung der mittel-/hochaffinen Sequenzen, die ionisierbare Reste in der N-terminalen Hälfte der TMD enthalten, fällt auf, dass in elf hochaffinen Sequenzen dieser Gruppe (J34, J37, J48, J50, J52, J56, J57, J65, J66, J68 und J74; β -Gal-Aktivität $\geq 2 \times$ AZ2, s. Tab. 2) potentiell positiv geladene Arg- und Lys-Reste alternierend mit potentiell negativ geladenen Asp- und Glu-Resten auftreten. In Abb. 19 ist der Konservierungsgrad an den einzelnen TMD-Positionen dieser elf Sequenzen dargestellt.

Die am stärksten konservierte, randomisierte TMD-Position in den hochaffinen Sequenzen, in denen potentiell gegensätzlich geladene Aminosäuren abwechselnd auftreten, ist Position 13; sie ist in allen elf Sequenzen mit Gly besetzt. Was die ionisierbaren Reste betrifft, sind interessanterweise die Positionen 2 und 6 bevorzugt mit Arg besetzt, während an den Positionen 5 und 8 Asp- und Glu-Reste dominieren. In linkshändig gekreuzten Paaren interagierender TMDn könnten potentiell positiv geladene Seitenketten an den Positionen 2 und 6 (entsprechen den Positionen *a* und *e* des Heptadenmusters, s. Abb. 7 links) mit potentiell negativ geladenen Seitenketten an den Positionen 5 und 8 (entsprechen den Positionen *d* und *g* des Heptadenmusters, s. Abb. 7 links) elektrostatisch wechselwirken. Die alternierende Anordnung gegensätzlich geladener Reste zeigt sich besonders deutlich in den TMDn J34, J66, J68 und J74 (s. Tab. 2). Ob die Seitenketten ionisierbarer Aminosäurereste jedoch in der Membran geladen oder in ihrer protonierten bzw. deprotonierten

Form vorliegen, ist unklar. Wenn sie ionisiert vorlägen, könnten sie Salzbrücken, in ungeladener Form starke Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden.

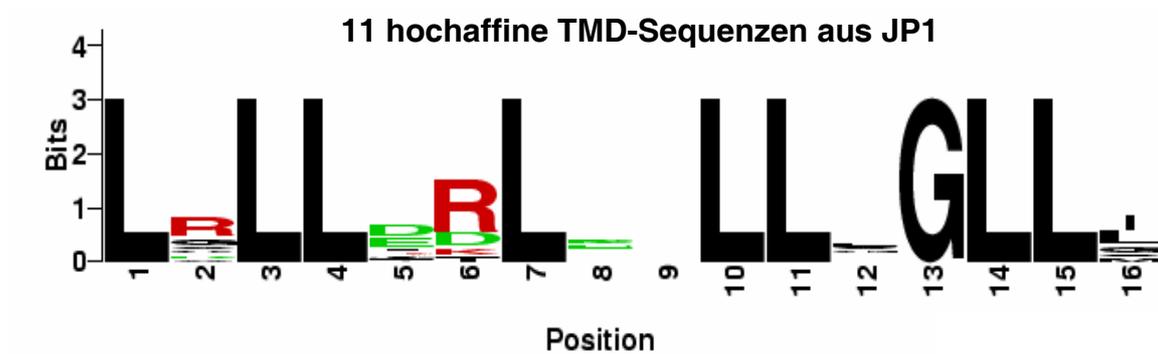


Abb. 19: WebLogo-Darstellung [125] der elf hochaffinen TMD-Sequenzen aus JP1 mit alternierend auftretenden, potentiell gegensätzlich geladenen Aminosäuren. Die in den elf Sequenzen an jeder TMD-Position (x-Achse) auftretenden Aminosäuren sind als Buchstaben angegeben und bilden Stapel. Die Gesamthöhe eines Stapels gibt den Konservierungsgrad (y-Achse, gemessen in Bits) an der jeweiligen Position und die Buchstabenhöhe die relative Häufigkeit der entsprechenden Aminosäure an. Potentiell positiv geladene Arg- und Lys-Reste sind in rot, potentiell negativ geladene Asp- und Glu-Reste in grün und alle anderen in diesen Sequenzen auftretenden Aminosäuren in schwarz dargestellt. Die Abbildung wurde mit WebLogo 2.8.2 generiert. Es fällt auf, dass potentiell positiv geladene Arg-Reste an den Positionen 2 und 6 dominieren, während die Positionen 5 und 8 bevorzugt mit potentiell negativ geladenen Asp- und Glu-Resten besetzt sind. Position 13 ist in allen Sequenzen mit Gly besetzt und daher die am stärksten konservierte, randomisierte Position.

4.6 Mutationsanalyse von FxxGxxxG

Ein Vergleich der aus der Bank SU1 selektierten nieder-/mittelaaffinen und hochaffinen Sequenzen legte offen, dass Phe in hochaffinen Sequenzen stark angereichert ist und häufig an der -3 Position von GxxxG zu finden ist, was FxxGxxxG-Motive ergibt. Diese FxxGxxxG-Motive korrelieren mit β -Gal-Aktivitäten, die weitaus höher sind als diejenige von AZ2, und scheinen daher starke TMD-TMD-Interaktionen zu vermitteln (s. 4.3). Um zu untersuchen, ob Phe tatsächlich spezifisch die von GxxxG-Motiven vermittelte Interaktion von TMDn fördert, wurden Mutationsanalysen durchgeführt.

4.6.1 FxxGxxxG fördert die Interaktion aus SU1 selektierter TMDn

Um den Beitrag individueller Aminosäurereste des FxxGxxxG-Motivs zur TMD-TMD-Interaktion bemessen zu können, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese gezielte Punktmutationen in zwei hochaffine TMDn eingeführt, die dieses Motiv an unterschiedlichen Stellen in der TMD enthalten (Abb. 20 oben). Die TMD-TMD-Affinitäten der Mutanten wurden mit denjenigen der entsprechenden parentalen TMDn, mit AZ2, mit einer hochaffinen TMD, die zuvor aus der Bank AR isoliert worden war (C65) [91], und mit Δ TM verglichen (s. 4.1.1). Phe bzw. Gly wurden durch Reste ähnlicher van der Waals' Volumina und Hydrophobizitäten (Leu bzw. Ala) ersetzt. Dies sollte gewährleisten, dass, falls die FxxGxxxG-Motive tatsächlich die spezifische Interaktion der TMDn vermitteln würden, zwar die Di- oder Oligomerisierung beeinträchtigt wäre, die Stabilität der Monomere jedoch weitgehend unbeeinflusst bliebe (s. 1.2).

Wenn Phe5 in der TMD S77 durch Leu ersetzt wird, fällt die β -Gal-Aktivität auf den Level von AZ2 ab (Abb. 20 unten). Dies bestätigt, dass Phe5 tatsächlich zur TMD-TMD-Interaktion von S77 beiträgt. Ebenso reduziert der Austausch von Phe9 durch Leu in S84 die β -Gal-Aktivität erheblich; verglichen mit S77 jedoch in geringerem Maße. Deutliche Effekte treten auch auf, wenn das erste Gly der entsprechenden GxxxG-Motive mutiert wird. Bei Austausch von Gly8 von S77 oder Gly12 von S84 durch Ala fällt die β -Gal-Aktivität auf den Level von AZ2 ab. Auf den ersten Blick scheint das zweite Gly von GxxxG eine geringere Rolle bei der Assoziation dieser TMDn zu spielen, da sein Austausch durch Ala die Affinitäten von S77 bzw. S84 nur unwesentlich bzw. nicht nachweisbar verringert (Abb. 20 unten). Der Befund, dass Ala an dieser Position teilweise toleriert wird, ist konsistent mit der Beobachtung, dass einige selektierte, hochaffine TMDn FxxGxxx[Sm]-Motive aufweisen (s. 4.3). Die gleichzeitige Mutation von Phe und dem zweiten Gly in der TMD S84 (F9L/G16A) reduziert die β -Gal-Aktivität jedoch stärker als die Mutation F9L alleine (Abb. 20 unten). Dies deutet darauf hin, dass das zweite Gly die Interaktion etwas effizienter fördert als Ala.

Der Austausch von Phe durch die anderen aromatischen Reste (Trp oder Tyr) beeinträchtigt die Interaktion von S77, jedoch nicht in solch einem Ausmaß wie die Mutation F5L (Abb. 20 unten). Da der Austausch von Phe durch die anderen aromatischen Reste mit einem Affinitätsverlust einhergeht, scheint der Einfluss von Phe auf die TMD-TMD-Interaktion in diesen TMDn sehr spezifisch zu sein.

	5	8	12
S77	LAAA F VAG G VAA G CALI		
S77-F5LL.....		
S77-G8AA.....		
S77-G12AA.....		
S77-F5L/G12AL.....A.....		
S77-F5YY.....		
S77-F5WW.....		
	9	12	16
S84	LTAAIVAS F AA G MAL G		
S84-F9LL.....		
S84-G12AA.....		
S84-G16AA.....		
S84-F9L/G16AL.....A.....		

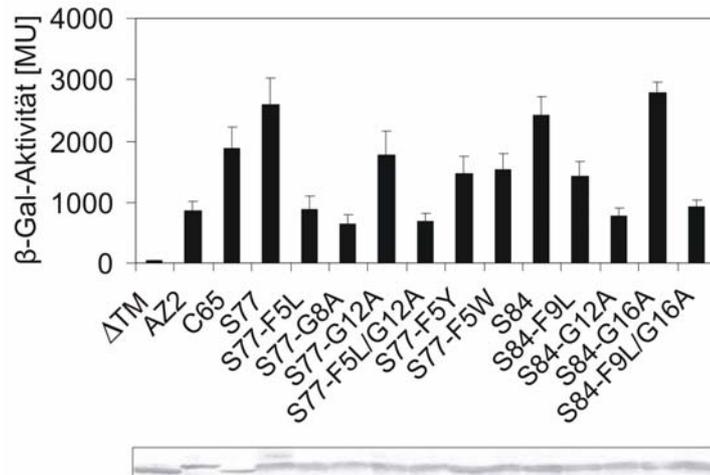


Abb. 20: Mutationsanalyse aus SU1 selektierter TMD-Sequenzen. Oben: Aminosäuresequenzen zweier hochaffiner TMDn und ihrer Mutanten. Phe- und Gly-Reste, die in FxxGxxxG-Motive eingebettet sind, sind durch Fettdruck hervorgehoben und ihre Positionen in der TMD über den Sequenzen angegeben. Punkte entsprechen parentalen Resten. **Unten:** Die in ToxR-Assays ermittelten Affinitäten der selektierten TMDn und ihrer Mutanten. Zahlen entsprechen den β -Gal-Aktivitäten (in MU) exprimierender FHK12-Zellen (0,0025 % (w/v) L-Arabinose; Mittelwerte \pm SD, n = 16 Datenpunkte). Die Referenzkonstrukte sind im Text erklärt. Es fällt auf, dass Phe und GxxxG in den FxxGxxxG-Motiven kritisch für die Interaktion dieser TMDn sind. Die mit Anti-MalE Antiserum detektierte ~66 kDa Bande eines Western-Blots von Zelllysaten exprimierender FHK12-Zellen ist darunter gezeigt. Die Expressionslevel sind für alle hier analysierten Konstrukte ähnlich. S77 zeigt eine schwache Extrabande bei einer scheinbaren Molekülmasse, die etwas über derjenigen der ~66 kDa ToxR-Chimären liegt. Dies könnte auf die Existenz zweier distinkter Proteinpolepopulationen hindeuten, vermutlich infolge unvollständiger Denaturierung, mangelhafter SDS-Bindung oder der Bindung an ein anderes kleines Protein.

Um auszuschließen, dass verschiedene β -Gal-Aktivitäten aus verschiedenen Konzentrationen von ToxR-Proteinen resultieren, wurde mittels Western-Blot-Analyse sichergestellt,

dass ihre Expressionslevel in den FHK12-Indikatorzellen ähnlich waren (Abb. 20 unten). Ebenso fördern alle Mutanten das Wachstum von PD28-Zellen mindestens so effizient wie die zugehörigen parentalen Konstrukte (s. Anhang, Abb. Ia und b), was ihre effiziente Membranintegration und korrekte Topologie bestätigt. Daher kann ausgeschlossen werden, dass verschiedene β -Gal-Aktivitäten auf verschiedene Konzentrationen der ToxR-Proteine in der Membran zurückzuführen sind. Stattdessen kann davon ausgegangen werden, dass unterschiedliche β -Gal-Aktivitäten das Ergebnis unterschiedlicher TMD-TMD-Affinitäten sind.

Das Screening der Bank SU1 ließ auch eine Überrepräsentation von isolierten, nicht in F/(GxxxG)_n-Motive eingebetteten Phe-Resten in hochaffinen TMDn erkennen (s. 4.3). Jedoch hatte die Mutation dieser Phe-Reste zu Leu in vier verschiedenen hochaffinen Sequenzen (S45, S46, S57 und S64) keine signifikant niedrigeren β -Gal-Aktivitäten zur Folge (s. Anhang, Tab. VII). Daher bleibt es unklar, warum Phe-Reste, die nicht in F/(GxxxG)_n-Motive eingebettet sind, in hochaffinen TMDn auch angereichert sind.

4.6.2 FxxGxxxG-vermittelte Interaktion anderer artifizierender TMDn

Nachdem gezeigt wurde, dass die Mutation von Phe oder GxxxG in selektierten Sequenzen eine signifikante Reduktion der TMD-TMD-Affinität nach sich zieht, ohne die Effizienz der Membranintegration zu beeinträchtigen, wurde nun untersucht, ob in TMDn eingeführte Phe-Reste von GxxxG vermittelte Interaktionen fördern würden. Zu diesem Zweck wurde die -3 Position der GxxxG-Motive zweier nieder-/mittelaaffiner TMDn (S35 und S17) zu Phe mutiert (Abb. 21 oben).

Tatsächlich verdoppelt bzw. vervierfacht dies die β -Gal-Aktivität (Abb. 21 unten). Im Gegensatz dazu verstärkt Phe an der -3 Position des GxxG-Motivs von S14 die Interaktion nur mäßig, was darauf hinweist, dass GxxG-Motive weniger effizient von Phe unterstützt werden als GxxxG-Motive. Wie die Western-Blot-Analyse zeigt, sind die Expressionslevel der parentalen und mutierten S14- und S35-Konstrukte vergleichbar (Abb. 21 unten). Die erhöhte β -Gal-Aktivität von S17-C2F könnte zum Teil auf einen erhöhten Expressionslevel der mutierten Sequenz relativ zur parentalen Sequenz zurückzuführen sein, obgleich PD28-Wachstumsassays nahe legen, dass die Konzentrationen der beiden S17-Konstrukte in der inneren Membran ähnlich sind (s. Anhang, Abb. Ic).

	2	5	6	8	9	12	13	16
S35	L	C	A	A	C	C	A	S
								G AAM G ALL
S35-C6F	F .
S17	L	C	A	A	G	W	A	C
								G AAICALM
S17-C2F	.	F
S14	L	M	A	A	G	A	A	G
								AAMWALV
S14-M2F	.	F
				5	8	12		
L16	L	L	L	L	L	L	L	L
	L	L	L	L	L	L	L	L
L16-L5F/L8G/L12G	F .	.	G .	.
	G .	.
AZ2	L	L	A	A	L	L	A	L
	L	L	A	L	L	A	L	L
AZ2-L8G/L12G	G .	.
	G .	.
AZ2-L5F/L8G	F .	.	G .	.

AZ2-L5F/L8G/L12A	F .	.	G .	.
	A .
AZ2-L5F/L8G/L12G	F .	.	G .	.
	G .

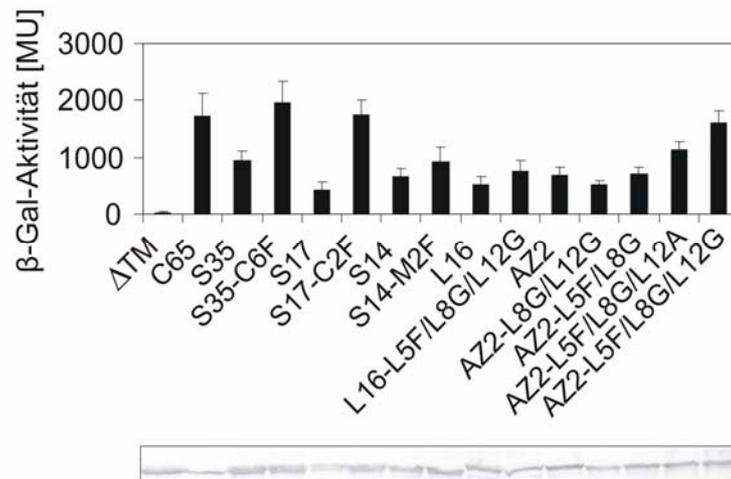


Abb. 21: Verstärkte Interaktion aus SU1 selektierter TMDn mit GxxxG durch Phe sowie der TMD AZ2 durch FxxGxxxG. **Oben:** Sequenzen dreier nieder-/mittelaffiner TMDn und ihrer Mutanten sowie von L16, AZ2 und verschiedener Hybrid-TMDn. Phe- und Gly-Reste, die in FxxGxxxG oder FxxGxxG eingebettet sind, sind durch Fettdruck hervorgehoben. Punkte entsprechen parentalen Resten. **Unten:** Die in ToxR-Assays anhand ihrer β -Gal-Aktivitäten (in MU) ermittelten Affinitäten der Konstrukte (0,0025 % (w/v) L-Arabinose; Mittelwerte \pm SD, n = 16 Datenpunkte). Es fällt auf, dass Phe die Interaktion der Sequenzen, die ein GxxxG-Motiv enthalten (S35 und S17) fördert, jedoch nicht diejenige der Sequenz S14, die ein GxxG-Motiv enthält. Das in die TMD eingeführte FxxGxxxG-Motiv fördert die Interaktion von AZ2, jedoch nicht diejenige von L16. Die ~66 kDa Bande eines Western-Blots exprimierender FHK12-Zellen ist darunter gezeigt. Obgleich die Färbeintensität von S17 etwas geringer ist als diejenige seiner Mutante C2F, sind ihre Konzentrationen in der Membran wahrscheinlich ähnlich (vgl. Erläuterungen im Text). AZ2-L5F/L8G/L12G zeigt aus unbekanntenen Gründen eine schwache zusätzliche Bande einer scheinbaren Molekülmasse, die etwas über derjenigen der ~66 kDa ToxR-Chimären liegt.

Da das FxxGxxxG-Motiv scheinbar die Interaktion aus SU1 selektierter TMDn fördert, wurde nun untersucht, ob dieses Motiv gleichermaßen die Assoziation anderer TMDn verstärken würde. Dementsprechend wurde das FxxGxxxG-Motiv zunächst auf eine oligo-Leu-Sequenz (L16) aufgesetzt, welche selbst nur eine mittelmäßige Affinität aufweist [95]. Überraschenderweise hat dies aus möglichen Gründen, die später diskutiert werden sollen, keinen signifikanten Einfluss auf die β -Gal-Aktivität (Abb. 21). Anschließend wurde das Motiv auf die AZ2 TMD aufgesetzt (Abb. 21 oben); diese ähnelt den randomisierten Sequenzen insofern, dass sechs von 16 Positionen mit Ala besetzt sind. Ein schrittweises Vorgehen ergab zunächst, dass weder GxxxG noch FxxG die Interaktion von AZ2 verbesserte (Abb. 21). Hingegen resultierte das Aufsetzen von FxxGxxxA bzw. FxxGxxxG in einer ~1,5- bzw. ~2,5-fachen Zunahme der β -Gal-Aktivität (Abb. 21 unten). Folglich verstärkt das Muster FxxGxxxG, und in geringerem Maße FxxGxxxA, die Assoziation von AZ2 erheblich.

Abermals bestätigten Kontrollexperimente, dass die Expressionslevel und Membranintegrationseffizienzen für die verschiedenen Konstrukte ähnlich waren (Abb. 21 unten und s. Anhang, Abb. Id). Die Vermutung, dass die oligo-Leu-Sequenz keine Ausbildung rechtshändiger Helix-Helix-Paare zulässt, welche wahrscheinlich für die Interaktion über GxxxG-Motive vonnöten sind, würde erklären, warum das FxxGxxxG-Motiv die Assoziation von L16 nicht fördert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde getestet, ob Phe die Interaktion der GpA TMD unterstützen würde.

4.6.3 Phe fördert die GxxxG-vermittelte Selbstassoziation der TMD von GpA

Kernresonanzspektroskopische Analysen des GpA TMD Dimers im detergenzsolubilisierten [62] und membraneingebetteten Zustand [63] haben gezeigt, dass sich die Helices unter einem negativen Winkel kreuzen und somit ein rechtshändiges Paar bilden (s. 1.2). Der Austausch von Ile76 an der -3 Position des GxxxG-Motivs von GpA durch Phe (Abb. 22 oben) führt tatsächlich zu einer deutlich verstärkten Homomerisierung (Abb. 22 unten). Der Austausch von Ile76 durch Trp oder Tyr hingegen stört die GpA TMD Dimerisierung, jedoch in geringerem Maße als die Mutation G83A (Abb. 22), die das GpA TMD Dimer bekanntermaßen stark destabilisiert [67, 71].

Kontrollexperimente bestätigten, dass die Expressionslevel und Membranintegrationseffizienzen für GpA-Wt und seine Mutanten ähnlich waren (Abb. 22 unten und s. Anhang,

Abb. 1e). Es sei angemerkt, dass das hier verwendete GpA TMD Konstrukt eine im Vergleich zu AZ2 ca. 1,5-fache Transkriptionsaktivierung induziert.

	75	87
GpA-Wt	L I I F G V M A G V I G T	
GpA-I76F	. F	
GpA-I76W	. W	
GpA-I76Y	. Y	
GpA-G83A A	

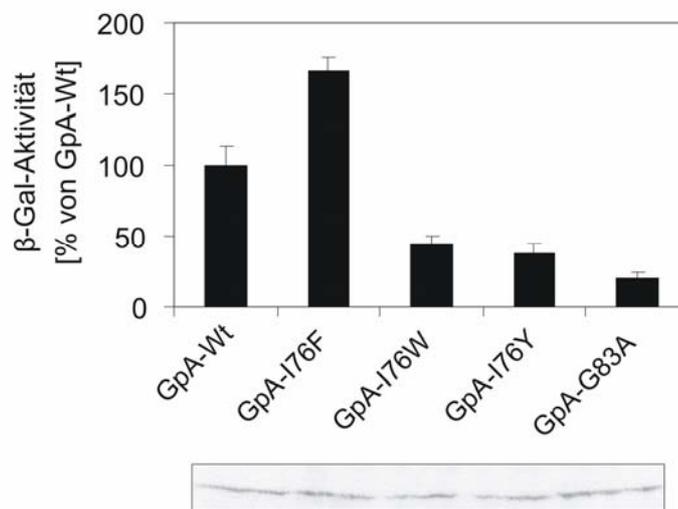


Abb. 22: Stabilisierung der GpA TMD-TMD-Interaktion durch Phe. **Oben:** Sequenzen der GpA TMD, wie im Kontext von ToxR exprimiert [71], und ihrer Punktmutanten. Die über den Sequenzen angegebenen Positionen entsprechen den Aminosäurepositionen in reifem, humanem GpA. Punkte entsprechen Resten des Wt. **Unten:** In ToxR-Assays ermittelte Selbstassoziation der GpA TMD und ihrer Mutanten. Zahlen entsprechen Mittelwerten der β -Gal-Aktivität, die auf GpA-Wt (= 100 %) normalisiert wurden (Mittelwerte \pm SD, n = 16 Datenpunkte). Es fällt auf, dass Phe an Position 76 die Selbstinteraktion fördert, wohingegen Trp oder Tyr an derselben Position die Affinität fast ebenso stark beeinträchtigt wie die Zerstörung des GxxxG-Motivs durch die Mutation G83A. Die in Western-Blot-Analysen detektierten Expressionslevel der verschiedenen ToxR-Chimären in FHK12-Zellen sind darunter gezeigt und für alle hier untersuchten Konstrukte vergleichbar. Alle Konstrukte wurden vom ursprünglichen ToxR-Vektor exprimiert [71].

Ein passend positionierter Phe-Rest unterstützt also die TMD-TMD-Interaktion von GpA. Dies impliziert, dass das FxxGxxxG-Motiv im Rahmen rechtshändiger Helix-Helix-Paare interagiert.

4.6.4 FxxGxxxG trägt zur Selbstassoziation der G-Protein-TMD des Vesikulären Stomatitis Virus bei

Das G-Protein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G), bei dem es sich um ein virales Fusionsprotein handelt, enthält ein FxxGxxxG-Motiv in seiner TMD. Um zu untersuchen, ob die VSV-G TMD unter Vermittlung des FxxGxxxG-Motivs mit sich selbst assoziieren würde, wurde sie im Kontext von ToxR exprimiert. Länge und Orientierung der interagierenden TMD-Oberflächen relativ zu den ToxR-Domänen sind für eine optimale Transkriptionsaktivierung kritisch und müssen daher optimiert werden. Für die TMD von GpA, die wie diejenige von VSV-G ein GxxxG-Motiv enthält, war diese Optimierung bereits früher durchgeführt worden [71]. Um eine optimale Vergleichbarkeit mit GpA zu gewährleisten, wurde daher eine 13 Aminosäuren lange Sequenz, die den wesentlichen Teil der VSV-G TMD umfasst, so in das ToxR-Protein insertiert, dass ihr GxxxG-Motiv dieselbe Orientierung relativ zur ToxR-Domäne hat (Abb. 23 oben).

ToxR-Assays zeigen, dass die VSV-G TMD ~65 % der β -Gal-Aktivität induziert, die von der GpA TMD induziert wird (Abb. 23 unten). Dies weist auf signifikante TMD-TMD-Interaktion hin. Anschließend wurde die TMD-TMD-Kontaktfläche von VSV-G durch Mutationsanalyse untersucht (Abb. 23 oben). Die Zerstörung des GxxxG-Motivs von VSV-G durch die Mutationen G6A oder G10A verringert die β -Gal-Aktivität um ~65 % (Abb. 23 unten). Folglich trägt das GxxxG-Motiv zur Interaktion der VSV-G TMD bei. Der Austausch von Phe an Position 13 bzw. 14 durch Leu reduziert die β -Gal-Aktivität um 50 bzw. 30 %, wohingegen die Mutation F4L keinen nachweisbaren Effekt hat (Abb. 23 unten). Alle VSV-G TMD Konstrukte werden in ähnlicher Stärke exprimiert (Abb. 23 unten) und insertieren ähnlich effizient in die Membran (s. Anhang, Abb. If).

FxxGxxxG, und in geringerem Maße FxxxGxxxG, scheinen daher für die Selbstassoziation dieser natürlich vorkommenden TMD essentiell zu sein. Da Phe sowohl an der -3 als auch an der -4 Position des GxxxG-Motivs zur Homomerisierung der VSV-G TMD beiträgt, wurde nun untersucht, wie die Stabilisierung membranständiger GxxxG-Motive durch Phe vom Abstand zwischen Phe und GxxxG abhängt.

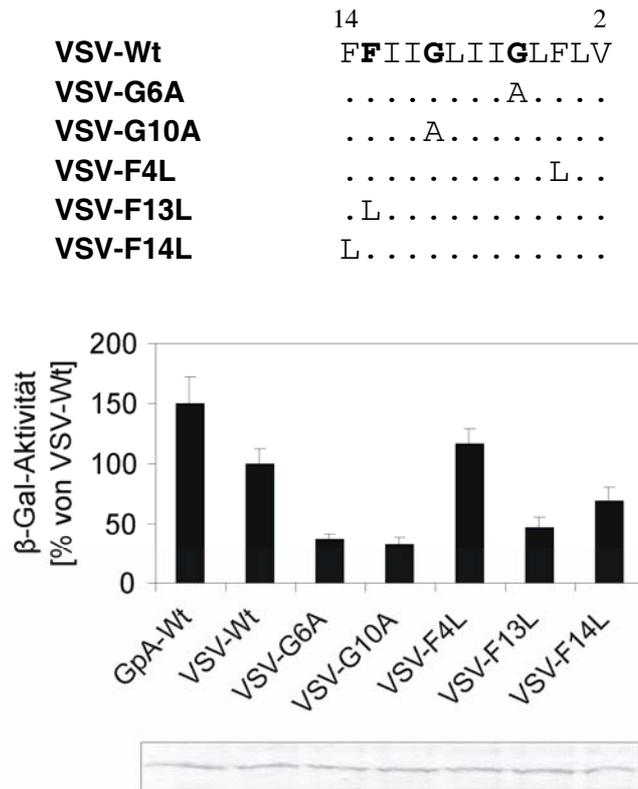


Abb. 23: Mutationsanalyse der TMD-TMD-Interaktion von VSV-G. **Oben:** Sequenzen der VSV-G TMD (VSV-Wt), wie im Kontext von ToxR exprimiert, und ihrer Mutanten. Die hier analysierte TMD-Sequenz entspricht den Aminosäurepositionen 453 bis 465 von reifem VSV-G, die Nummerierung der Positionen, die über den Sequenzen angegeben ist, ist aus [126] übernommen. Punkte entsprechen Resten des Wt. **Unten:** Selbstinteraktion der Varianten der VSV-G TMD im Vergleich zur Selbstinteraktion der GpA TMD. Die Balken entsprechen den β -Gal-Aktivitäten relativ zu VSV-Wt (= 100 %) (Mittelwerte \pm SD, n = 16 Datenpunkte). Mutation der Gly-Reste des GxxxG-Motivs reduziert die Selbstinteraktion drastisch, während der Effekt des Austausches von Phe an der Position 13 am stärksten ist. Die ~66 kDa Bande eines Western-Blots exprimierender FHK12-Zellen zur Kontrolle der Expressionslevel ist darunter gezeigt. Alle Konstrukte wurden vom ursprünglichen ToxR-Vektor exprimiert [71].

4.6.5 Die Stabilisierung membranständiger GxxxG-Motive durch Phe hängt vom Abstand zwischen Phe und GxxxG ab

Um den für die TMD-TMD-Interaktion optimalen Abstand zwischen Phe und Gly aufzudecken, wurden die Met-Reste der Modell-TMD M11 einzeln ausgetauscht. M11 entspricht einer 13 Aminosäure langen oligo-Met-Sequenz, die ein GxxxG-Motiv enthält (Abb. 24 oben) und ebenso effizient mit sich selbst interagiert wie die GpA TMD [72]. Außerdem verfügt Met über eine flexible Seitenkette, die in einer helikalen Struktur je nach lokalem Kontext viele verschiedene Konformationen einnehmen kann [127]. Daher dürfte ein oligo-Met-Grundgerüst auch keine Präferenz für die Ausbildung links- oder rechtshändiger Helix-Helix-Paare zeigen.

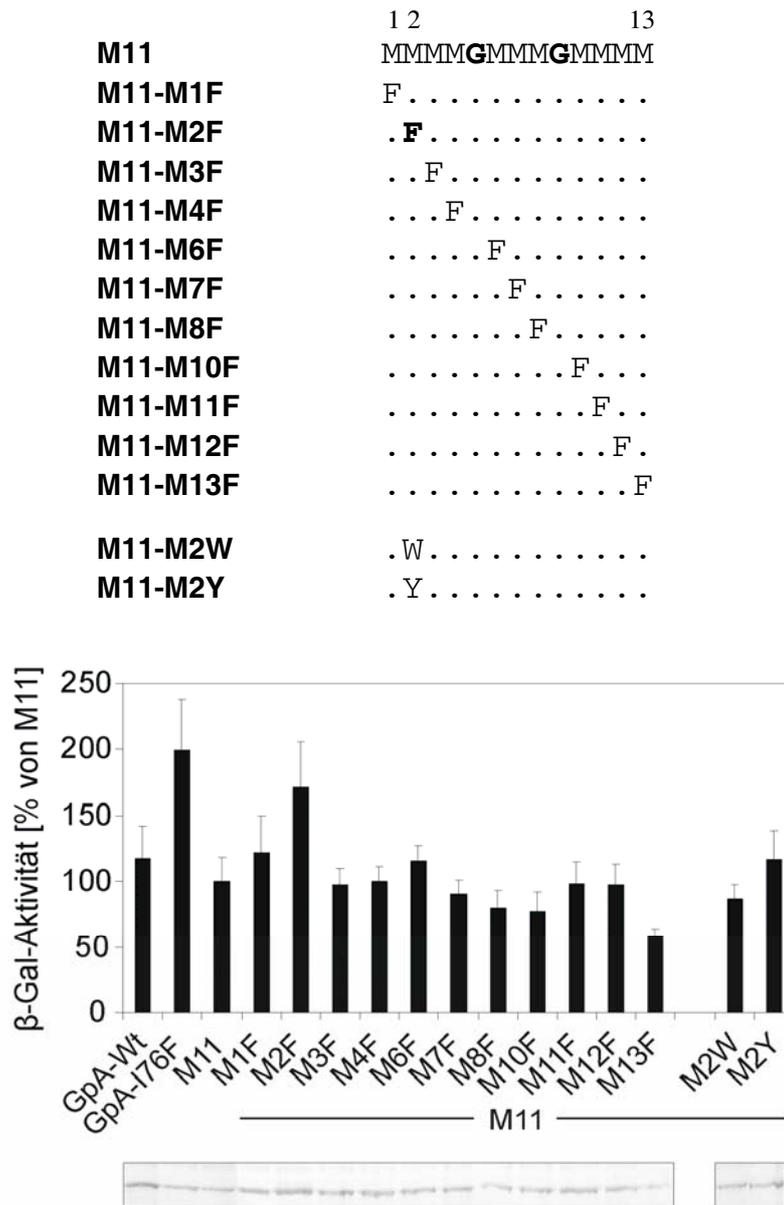


Abb. 24: Abhängigkeit der TMD-TMD-Interaktion vom Abstand von Phe zu GxxxG. Oben: Sequenzen der Modell-TMD M11 [72] und ihrer Punktmutanten. Phe- und Gly-Reste, die in FxxGxxxG eingebettet sind, sind durch Fettdruck hervorgehoben. Punkte entsprechen parentalen Resten. **Unten:** TMD-TMD-Interaktion von M11 und seinen Mutanten im Vergleich zur GpA TMD und ihrer Mutante I76F. Zahlen entsprechen Mittelwerten der β -Gal-Aktivität, die auf M11 (= 100 %) normalisiert wurden (Mittelwerte \pm SD, n = 16 Datenpunkte). Es fällt auf, dass Phe die TMD-TMD-Interaktion nur verstärkt, wenn es die -3 Position von GxxxG besetzt, wodurch sich ein FxxGxxxG-Motiv ausbildet. Keinen Effekt hat die Mutation derselben Position zu Trp oder Tyr. Interessanterweise stabilisiert die Mutation M2F die TMD-TMD-Interaktion von M11 in einem ähnlichen Ausmaß, wie es für die Mutation I76F in der GpA TMD der Fall ist. Dies deutet an, dass FxxGxxxG in beiden Sequenzkontexten funktioniert. Die durch Western-Blotting detektierten Expressionslevel der verschiedenen ToxR-Chimären in FHK12-Zellen sind darunter gezeigt. Mit Ausnahme der Mutante M13F, die eine geringere Expression zeigt, sind die Expressionslevel für alle hier untersuchten Konstrukte vergleichbar. Alle Konstrukte wurden vom ursprünglichen ToxR-Vektor exprimiert [71].

Bei der Untersuchung des Einflusses, den der Abstand zwischen Phe und GxxxG auf die TMD-TMD-Interaktion hat, stellte sich heraus, dass nur die Mutante M2F, die ein FxxGxxxG-Motiv enthält, eine signifikant höhere β -Gal-Aktivität induziert als die parentale TMD M11 (Abb. 24 unten). Die β -Gal-Aktivität von M2F ist 1,7-mal so hoch wie diejenige von M11; dieselbe Zunahme tritt auf, wenn Ile76 in der GpA TMD zu Phe mutiert wird. Der Austausch von Phe an der -3 Position von GxxxG durch Trp oder Tyr (M2W oder M2Y) hat keinen signifikanten Einfluss auf die TMD-TMD-Interaktion von M11 (Abb. 24 unten). Die Expressionslevel aller Konstrukte mit Ausnahme der Mutante M13F sind ähnlich (Abb. 24 unten). PD28-Wachstumsassays bestätigen ähnliche Membranintegrationseffizienzen (s. Anhang, Abb. Ig).

Diese Ergebnisse bekräftigen, dass Phe mit dem GxxxG-Motiv am effizientesten kooperiert, wenn es drei Reste upstream von GxxxG positioniert ist. Die Mutationsanalysen legen den Schluss nahe, dass Phe tatsächlich membranständige GxxxG-Motive stabilisiert.

4.7 Mutationsanalyse von His

Ein Vergleich der aus der Bank JP1 zufällig ausgewählten, nicht-/niederaffinen und der selektierten, mittel-/hochaffinen Sequenzen legte offen, dass His in mittel-/hochaffinen TMDn stark angereichert und fast ausnahmslos an Position 6 zu finden ist. Die dem His benachbarten randomisierten Positionen 5 und 8 sind präferentiell mit kleineren, mäßig polaren Resten besetzt, während an Position 13 bevorzugt Gly auftritt, das mit einem invarianten Gly an Position 17 ein GxxxG-Motiv ausbildet. GxxxG-Motive sind generell in der C-terminalen Hälfte der mittel-/hochaffinen TMDn angereichert und korrelieren mit weitaus höheren β -Gal-Aktivitäten, als sie AZ2 induziert (s. 4.4). Um zu untersuchen, ob His6 tatsächlich zur starken TMD-TMD-Interaktion selektierter Sequenzen beiträgt, wurden Mutationsanalysen durchgeführt.

Um den Beitrag von His zur TMD-TMD-Interaktion bemessen zu können, wurden durch ortsgerechte Mutagenese Punktmutationen in drei hochaffine TMDn, die das Konsensusmuster (A/C/G/S/T/V)Hx(A/C/G/S/T/V)xxxxGxxxG (s. 4.4) enthalten, eingeführt (Abb. 25 oben). Die TMD-TMD-Affinitäten der Mutanten wurden mit denjenigen der entsprechenden parentalen TMDn, mit AZ2, mit C65 und mit Δ TM verglichen (s. 4.1.1 und 4.6.1).

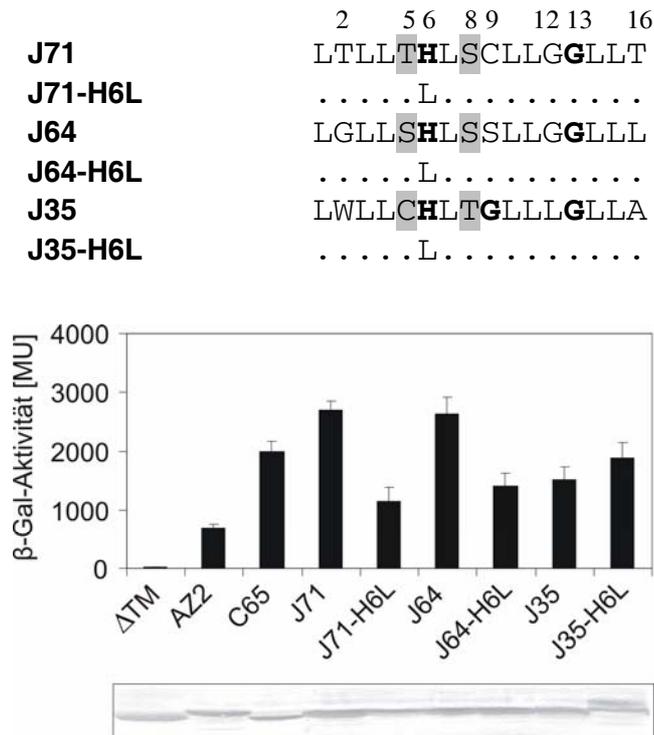


Abb. 25: Mutationsanalyse aus JP1 selektierter TMD-Sequenzen. Oben: Aminosäuresequenzen dreier hochaffiner TMDn und ihrer Mutanten. His-Reste an Position 6 und Gly-Reste, die in $(GxxxG)_n$ -Motive eingebettet sind (einschließlich der $GxxxG$ -Motive, die durch Einbeziehung des invarianten Gly-Restes der flankierenden Vektorsequenz zustande kommen, s. Abb. 11), sind durch Fettdruck hervorgehoben, kleinere, apolare bis mäßig polare Reste (s. Abb. 18) an den Positionen 5 und 8 grau unterlegt und die Nummern der randomisierten TMD-Positionen über den Sequenzen angegeben. Punkte entsprechen parentalen Resten. **Unten:** Die in ToxR-Assays ermittelten Affinitäten der selektierten TMDn und ihrer Mutanten. Zahlen entsprechen den β -Gal-Aktivitäten (in MU) exprimierender FHK12-Zellen (0,0025 % (w/v) L-Arabinose; Mittelwerte \pm SD, n = 12 Datenpunkte). Es fällt auf, dass His kritisch für die Interaktion der TMDn J71 und J64 ist. Die mit Anti-MalE Antiserum detektierte ~66 kDa Bande eines Western-Blots von Zelllysaten exprimierender FHK12-Zellen ist darunter gezeigt. Obgleich die Färbeintensität der Mutante J71-H6L etwas geringer ist als diejenige der parentalen TMD, sind ihre Konzentrationen in der Membran wahrscheinlich ähnlich (vgl. Erläuterungen im Text). J35-H6L zeigt aus unbekanntem Gründen eine Extrabande einer scheinbaren Molekülmasse, die etwas über derjenigen der ~66 kDa ToxR-Chimären liegt.

Überraschenderweise hat der Austausch von His6 durch Leu in der TMD J35 aus möglichen Gründen, die später diskutiert werden sollen, keinen signifikanten Effekt auf die β -Gal-Aktivität (Abb. 25 unten). Daher trägt His6 vermutlich nicht zur Selbstinteraktion dieser TMD bei. Wird jedoch His6 in den TMDn J64 bzw. J71 durch Leu ersetzt, ist die β -Gal-Aktivität um 47 % bzw. 57 % reduziert (Abb. 25 unten). Dies bestätigt, dass His6 die starke TMD-TMD-Interaktion von J71 und J64 unterstützt.

Wie die Western-Blot-Analyse zeigt, sind die Expressionslevel der parentalen und mutierten J64- und J35-Konstrukte vergleichbar (Abb. 25 unten). Die verringerte β -Gal-Aktivität

von J71-H6L könnte zum Teil auf einen geringeren Expressionslevel der mutierten Sequenz relativ zur parentalen Sequenz zurückzuführen sein, obgleich PD28-Wachstumsassays nahe legen, dass die Konzentrationen der beiden J71-Konstrukte in der inneren Membran ähnlich sind (s. Anhang, Abb. Ih).

Die TMDn J64 und J71 zählen zu den höchaffinen, aus JP1 selektierten Sequenzen (s. Tab. 2). Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass die Selbstinteraktion dieser TMDn maßgeblich durch His gefördert wird. Um den Beitrag anderer Aminosäurereste zur TMD-TMD-Interaktion der His-haltigen, hochaffinen Sequenzen aus JP1 ermessen und somit den für die von His vermittelte Interaktion förderlichen Sequenzkontext beleuchten zu können, wurden von Johanna C. Panitz im Anschluss an ihre Masterarbeit weitere Mutationsanalysen durchgeführt, deren wichtigste Ergebnisse in der Diskussion berücksichtigt werden sollen.

5. Diskussion

5.1 Funktioneller Vergleich der Promotoren *ctx* und *ompU*

In den beiden zur Selektion affiner TMDn verwendeten *E. coli*-Reporterstämmen sind unterschiedliche Promotoren mit dem *cat*-Gen fusioniert. In Chr3 wird die CAT-Expression von *ctx* angetrieben, während die Expression des Cm-inaktivierenden Enzyms in EL61 von *ompU* kontrolliert wird. In beiden Stämmen korrelieren die Überlebensraten chimärer ToxR-Proteine positiv mit ihrer TMD-TMD-Affinität (s. 4.1.2). Diese Ergebnisse bestätigen, dass *ctx* und *ompU* durch affine ToxR-Proteine aktiviert werden und daher zur Selektion affiner TMDn aus TMD-Banken geeignet sind. Bei näherer Betrachtung der Überlebensfähigkeiten von Δ TM und AZ2 in den beiden Selektionsstämmen wird deutlich, dass der *ompU*-Promotor (s. 4.1.2.2) im Vergleich zum bisher verwendeten *ctx*-Promotor (s. 4.1.2.1) eine stärkere Differenzierung zwischen nichtintegrierten, monomeren Sequenzen (wie Δ TM) und affinen TMDn (wie AZ2) ermöglicht. Im Gegensatz zur Kontrolle des Resistenzgens durch *ctx* unterscheiden sich die Überlebenschancen von Δ TM und AZ2 bei Kontrolle durch *ompU* bereits bei geringem selektivem Druck erheblich. Die erhöhte Sensitivität des auf *ompU* basierenden Selektionssystems gegenüber Affinitätsunterschieden ist daher vermutlich auf die geringere Basalaktivität von *ompU* zurückzuführen. Zur Selektion affiner TMDn aus kombinatorischen Banken scheint somit insbesondere *ompU* sehr gut geeignet zu sein. Dies ist konsistent mit der hohen Trefferquote, die bei Bankselektionen in EL61 beobachtet wurde.

Das Verhalten von *ompU* und *ctx* in den konstruierten *E. coli*-Stämmen spiegelt die bekannte Regulation dieser beiden Promotoren durch das natürliche ToxR-Protein in *V. cholerae* wider [99, 100, 102]. In *V. cholerae* induziert die Aktivierung von *ompU* durch ToxR die Expression des Porins OmpU, das 30 bis 60 % des Gesamtproteins der äußeren Membran dieses Bakteriums ausmacht [128]. Dabei scheint ToxR in kooperativer Weise an DNA-Sequenzen im *ompU*-Promotor zu binden; diese stimmen nicht mit den für die ToxR-Bindung relevanten Elementen im *ctx*-Promotor überein [98] (s. 1.3). Obgleich sich *ompU* und *ctx* insofern ähneln, dass beide Promotoren durch ToxR aktiviert werden, könnten ihre Effizienzen oder Aktivierungsmechanismen demnach unterschiedlich sein. Neben einer

geringeren Basalaktivität von *ompU* könnten z.B. die vermuteten kooperativen ToxR-ToxR-Wechselwirkungen bei der Bindung an und Aktivierung von *ompU* dazu beitragen, dass das auf *ompU* basierende Selektionssystem eine bessere Differenzierung zwischen monomeren und di- oder oligomeren ToxR-Chimären erlaubt.

5.2 Qualität der partiell randomisierten Plasmidbanken SU1 und JP1

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden partiell randomisierten Plasmidbanken wurden konstruiert, indem zuvor synthetisierte, degenerierte Oligonucleotide über PCR-Amplifikation und Klonierung in den Expressionsvektor integriert wurden. Bekanntermaßen ist diese Methode der Zufallsmutagenese fehlerbehaftet. Erstens funktioniert die chemische Synthese der Oligonucleotide nicht fehlerfrei [129]. Die Qualität der Bank-DNA hängt stark von der Charge verwendeter Oligonucleotide ab, so dass der Anteil fehlerhafter Sequenzen beträchtlich variieren kann [130]. Zweitens laufen PCR und Klonierung nicht fehlerfrei ab. Erwartungsgemäß enthalten die generierten Banken SU1 und JP1 daher einen hohen Anteil fehlerhafter Sequenzen; dieser liegt in beiden Banken bei ~50 % (s. 4.2). Durch Synthese und Klonierung kann die Nucleotidzusammensetzung verzerrt werden, so dass die tatsächliche Aminosäurezusammensetzung stark von der theoretisch erwarteten abweichen kann [131]. In SU1 und JP1 sind die Nucleotide A und G überrepräsentiert, woraus eine Verzerrung der Aminosäurezusammensetzungen der Rohbanken resultiert (s. 4.2). Fehlerhafte Sequenzen, veränderte Nucleotidzusammensetzungen oder durch Codon-Randomisierung entstehende Translationsstopps – die Einbeziehung eines Stopp-Codons in JP1 resultiert in ~15 % verkürzten ToxR-Proteinen – sind vermutlich größtenteils dafür verantwortlich, dass die funktionelle Größe der konstruierten Banken weitaus geringer ist als die Anzahl an Sequenzvarianten. Nichtsdestotrotz liegt der Anteil an TMD-Sequenzen in beiden Banken wahrscheinlich bei $>10^6$ (s. 4.2).

5.3 Phe fördert die Interaktion von TMDn über GxxxG-Motive

5.3.1 Identifikation des FxxGxxxG-Interaktionsmotivs durch Selektion affiner TMDn aus der Bank SU1

In dieser Arbeit erzielte Ergebnisse machen deutlich, dass Phe in homotypischen TMD-TMD-Interaktionen mit GxxxG-Motiven kooperiert. Diese Schlussfolgerung beruht auf einer bemerkenswerten Anreicherung von Phe in hochaffinen TMD-Sequenzen, die *in vivo* aus der kombinatorischen Bank SU1 selektiert wurden (s. 4.2.1 und 4.3). In diesen Sequenzen ist Phe häufig mit GxxxG assoziiert, was FxxGxxxG-Motive ergibt. Während die Selektion homotypisch interagierender TMDn mit GxxxG-Motiven aus kombinatorischen Banken bereits gezeigt wurde [53], ist das gleichzeitige Auftreten von Phe an der -3 Position von GxxxG ein neues Phänomen. Die Bedeutung des FxxGxxxG-Motivs für die TMD-TMD-Interaktion wird durch Mutationsanalysen bestätigt, die darlegen, dass sowohl Phe als auch GxxxG für die homotypische Interaktion der TMDn, die dieses Motiv enthalten, kritisch sind (s. 4.6). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Phe auch die Selbstinteraktion anderer TMDn mit GxxxG fördern kann, wie der GpA TMD oder der auf einer oligo-Met-Sequenz basierenden TMD M11 (s. 4.6).

Dass das FxxGxxxG-Motiv nicht in bisherigen Screenings auf homotypisch interagierende TMDn identifiziert wurde, lässt sich damit erklären, dass einige dieser randomisierten Sequenzen nicht gleichzeitig für Phe und Gly codierten [53, 90]. Die kombinatorische Bank AR hingegen, aus der ebenfalls affine TMDn selektiert werden konnten, bezog tatsächlich Phe und Gly in den zur Randomisierung verwendeten Aminosäuresatz ein (s. 4.1.1). Jedoch enthielten 75 % der aus dieser Bank selektierten, hochaffinen Sequenzen Trp an mindestens einer der N- oder C-terminalen *g* Positionen des wiederholten Heptadenmusters [91]. Das Auftreten von TMDn mit FxxGxxxG könnte daher durch die Fülle an Trp-haltigen Sequenzen unterdrückt worden sein. Umgekehrt wurden in der Bank SU1 Trp-haltige, hochaffine TMDn unterdrückt, indem beide terminalen *g* Positionen als invariante Leu-Reste festgelegt wurden. Ein anderer Grund dafür, dass das FxxGxxxG-Motiv in der Bank AR nicht identifiziert werden konnte, könnte sein, dass diese Bank für Sequenzen codierte, die mit allen natürlich vorkommenden Aminosäuren randomisiert wurden. Aufgrund der Fülle an hydrophilen Resten könnte das gleichzeitige Auftreten mehrerer Gly-Reste oftmals die stabile Membranintegration verhindert haben.

Neben hochaffinen TMDn wurden aus der Bank SU1 mittels der angewendeten Selektionsstrategien auch zahlreiche TMDn von nur niedriger bis mittlerer Affinität isoliert (s. 4.2.1). Dies liegt nicht am Versagen der Selektionsmethoden, sondern betont die hohe Qualität dieser TMD-Bank; diese scheint einen hohen Anteil an membranintegrierten Sequenzen zu enthalten. Obgleich die Mehrheit dieser membranintegrierten Sequenzen vermutlich kaum interagiert – denn die durchschnittliche von der Rohbank SU1 induzierte β -Gal-Aktivität ist vergleichbar mit derjenigen einer oligo-Ala-Sequenz (A16, s. 4.1.1) und daher gering (Daten nicht gezeigt) –, könnte ihre bloße Häufigkeit diesen membranintegrierten, nieder-affinen Sequenzen die Chance eingeräumt haben, den angewendeten selektiven Druck, wenn auch mit geringer Wahrscheinlichkeit, statistisch zu überleben. Zudem wurde der Selektionsdruck stark variiert, einschließlich sehr niedriger Cm-Konzentrationen (minimal 180 μ g/ml), die niederaffine Sequenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit überleben sollten. Nieder- und mittelaffine TMDn wurden größtenteils mittels des auf *ctx* basierenden Selektionssystems isoliert. Hierbei erwies sich die Expressionsinduktion in der Vorkultur als nachteilig, da aus vorinduzierten Chr3-Zellen bei weitaus höherem Selektionsdruck TMDn von nur niedriger bis mittlerer Affinität erhalten wurden als aus Chr3-Zellen, in denen die Expression der ToxR-Chimären erst bei Anwendung des selektiven Drucks induziert wurde. Das auf *ompU* basierende System scheint daher zur Selektion hochaffiner TMDn geeigneter zu sein.

5.3.2 Das FxxGxxxG-Motiv in natürlichen TMDn

Die Identifikation von FxxGxxxG als Sequenzmotiv, das die homotypische Interaktion von TMDn unterstützt, brachte die Idee hervor, die Häufigkeit, mit der dieses und verwandte Motive in TMDn natürlicher Membranproteine auftreten, mittels Datenbankanalyse zu untersuchen. Die Datenbankanalysen wurden von A. Fuchs (Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik, TU München) durchgeführt. Auf Grundlage von Swiss-Prot und TrEMBL [132] wurde eine nichtredundante Datenbank von TMDn bitopischer Membranproteine generiert. Die Häufigkeiten von GxxxG-Motiven und verschiedener F/GxxxG-Motive in dieser 19.854 Sequenzen umfassenden Datenbank nichthomologer, bitopischer TMDn wurden mit den unter Verwendung des TMSTAT-Formalismus [12] berechneten, erwarteten Häufigkeiten verglichen und die Signifikanzen der Unterschiede zwischen dem beobachteten und erwarteten Auftreten dieser Motive berechnet (detaillierte Angaben zur Erstellung und statistischen Analyse der Datenbank finden sich in [121]). Das GxxxG-

Motiv, von dem bereits gezeigt wurde, dass es in α -helikalen TMDn natürlicher Membranproteine signifikant überrepräsentiert ist [11, 12], wurde beispielsweise in 12,4 % aller TMDn der generierten Datenbank gefunden, was perfekt mit den von Senes *et al.* erzielten Ergebnissen aus einer auf Swiss-Prot basierenden Datenbank (12,5 %) übereinstimmt [12]. Die Überrepräsentation von GxxxG in der von A. Fuchs generierten Datenbank ist damit hochsignifikant ($p = 3,32 \times 10^{-23}$).

Ein Vergleich der Häufigkeiten, mit denen die verschiedenen Motive, in denen ein Phe-Rest maximal eine helikale Windung up- oder downstream von GxxxG positioniert ist, in dieser Datenbank auftreten, ergab, dass das FxxGxxxG-Motiv von allen Anordnungen von Phe und GxxxG tatsächlich am stärksten in der Datenbank überrepräsentiert ist (Tab. 3).

Tab. 3: Statistische Analyse der in einer nichtredundanten Datenbank bitopischer Membranproteine auftretenden Häufigkeiten von Motiven, die GxxxG und einen aromatischen Rest (Phe, Trp oder Tyr) in verschiedenen Abständen zueinander enthalten (Tabelle verändert nach [121])

Motiv	Beobachtetes Auftreten ¹	Erwartetes Auftreten ²	beobachtet/erwartet ³	Signifikanz (p) ⁴
FxxxGxxxG	134	134	1,00	1
FxxGxxxG	210	148	1,42	$1,08 \times 10^{-6}$
FxGxxxG	172	161	1,07	0,411
FGxxxG	221	175	1,26	0,001
GFxxG	211	188	1,12	0,100
GxFxG	204	188	1,09	0,255
GxxFG	243	188	1,29	$9,59 \times 10^{-5}$
GxxxGF	226	175	1,29	$1,61 \times 10^{-4}$
GxxxGxF	222	161	1,38	$4,30 \times 10^{-6}$
GxxxGxxF	185	148	1,25	0,003
GxxxGxxxF	159	134	1,19	0,038
WxxGxxxG	32	40	0,80	0,219
YxxGxxxG	32	36	0,90	0,640

¹beobachtete Häufigkeit des betreffenden Motivs in der bitopischen Datenbank

²erwartete Häufigkeit des betreffenden Motivs, die unter Verwendung des TMSTAT-Formalismus [12] berechnet wurde

³Verhältnis beobachtete Häufigkeit/erwartete Häufigkeit

⁴Signifikanz der Abweichung der beobachteten von der erwarteten Häufigkeit, berechnet als beidseitiges Integral der Wahrscheinlichkeitsverteilung der erwarteten Häufigkeit

FxxGxxxG tritt 42 % häufiger als erwartet auf (beobachtet/erwartet = 1,42). Diese Beobachtung ist hochsignifikant ($p = 1,08 \times 10^{-6}$). Das FxxGxxxG-Motiv kommt insgesamt 210 Mal in 207 verschiedenen Proteinen vor. Dies entspricht ~1 % aller TMDn in der Datenbank. Nur das Motiv GxxxGxF ist fast ebenso stark überrepräsentiert, mit einem Verhältnis beobachtet/erwartet von 1,38 ($p = 4,38 \times 10^{-6}$, Tab. 3). GxxFG und GxxxGF treten zwar weniger häufig auf, sind aber immer noch signifikant überrepräsentiert (Tab. 3). Alle anderen Motive sind entweder leicht überrepräsentiert oder treten so häufig wie erwartet auf. Wenn Phe an der -3 Position von GxxxG durch Trp oder Tyr ersetzt wird, ist das beobachtete Auftreten deutlich geringer als erwartet (Tab. 3); dies ist jedoch aufgrund des geringen Auftretens dieser Motive statistisch nicht signifikant.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Motiv FxxGxxxG in TMDn bitopischer Membranproteine signifikant überrepräsentiert ist. Dies deutet darauf hin, dass das FxxGxxxG-Motiv auch für die homotypische Interaktion natürlicher TMDn relevant ist. Die Beobachtung, dass die Motive WxxGxxxG und YxxGxxxG in der Datenbank nicht überrepräsentiert sind, unterstreicht die spezifische Rolle von Phe bei der Stabilisierung GxxxG-vermittelter TMD-TMD-Interaktionen. Dies ist konsistent mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten experimentellen Ergebnissen, wo weder Trp noch Tyr Phe im FxxGxxxG-Motiv ersetzen können (s. 4.6). Neben FxxGxxxG sind einige andere F/GxxxG-Motive in der Datenbank bitopischer TMDn signifikant überrepräsentiert. Diese anderen Motive fördern jedoch weder TMD-TMD-Interaktionen im Kontext einer oligo-Met-Sequenz (s. 4.6.5) noch sind sie in aus der Bank SU1 selektierten, hochaffinen TMDn angereichert (s. 4.2.1 und 4.3). Ihre Überrepräsentation könnte daher andeuten, dass diese Motive a) nur heterotypische TMD-TMD-Interaktionen unterstützen, b) weiterer Reste bedürfen, die in den hier untersuchten Sequenzen nicht enthalten sind, oder c) funktionelle Vorteile verleihen, die nichts mit der Interaktion von TMDn zu tun haben.

Analysen von Membranproteinstrukturen legten bereits nahe, dass Phe auch zu heterotypischen TMD-TMD-Interaktionen in polytopischen Membranproteinen beiträgt. Dort gehört Phe zu acht der 20 am häufigsten auftretenden, interagierenden Paaren [133] sowie zu acht von 66 überrepräsentierten Triplets, welche auch kleine Aminosäuren, wie Ala, Cys, Ser und Gly, und Met enthalten [127].

Eines der 207 bei der Datenbanksuche identifizierten, bitopischen Membranproteine, die FxxGxxxG in ihrer TMD enthalten (s. oben), ist das virale Fusionsprotein VSV-G (während die meisten anderen Treffer hypothetische Proteine mit unbekannt Funktionen sind). VSV-G ist ein Glykoprotein der Virushülle, das für die Virus-Membran-Fusion verantwortlich ist und bekanntermaßen über seine lösliche Domäne zu nichtkovalenten Trimeren assoziiert [134-137]. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse implizieren, dass die TMD von VSV-G ebenfalls zur Assoziation beiträgt, und Mutationsanalysen bestätigen, dass ihre Interaktion von den in FxxGxxxG- und möglicherweise FxxxGxxxG-Motive eingebetteten Phe- und Gly-Resten abhängt (s. 4.6.4). Angesichts der derzeitigen Diskussion über die Rolle von TMDn bei der Membranfusion [138] ist es gut vorstellbar, dass die Selbstinteraktion der VSV-G TMD zur Vermischung der Lipide beiträgt. Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass die Mutation des GxxxG-Motivs in der VSV-G TMD die Fusion von Säugerzellen im Hemifusionszustand abstoppt [126] und die Fusogenität von TMD-Peptidmimetika verringert [139, 140]. Hemifusion bezeichnet den bei der Membranfusion auftretenden Zwischenzustand, in dem sich die äußeren Lipidschichten vermischen, während die inneren Lipidschichten noch getrennt vorliegen. Der Stillstand im Hemifusionszustand wurde bereits in früheren Studien an anderen fusogenen Membranproteinen mit homotypischer TMD-TMD-Interaktion in Verbindung gebracht. Und zwar nahm die Hemifusion nach Verringerung der Konzentration von Hefe-SNARE-Proteinen in der Membran [141] und nach Mutation einer SNARE TMD-TMD-Kontaktfläche [142, 143] zu. TMD-TMD-Interaktionen von Membranproteinen könnten daher zur Membranfusion beitragen.

5.3.3 Potentielle Mechanismen der Stabilisierung GxxxG-vermittelter, homotypischer TMD-TMD-Interaktionen durch Phe

Welcher Typ der Helix-Helix-Paarung wird von FxxGxxxG unterstützt? Das FxxGxxxG-Motiv fördert TMD-TMD-Interaktionen von GpA, AZ2 und einer oligo-Met-Sequenz, jedoch nicht der oligo-Leu-Sequenz L16 (s. 4.6). Die GpA TMDn kreuzen sich unter einem negativen Winkel [62, 63] (s. 1.3) und wahrscheinlich behält die stabilisierende Mutante I76F diese Packungsgeometrie bei. Daher soll von der Annahme ausgegangen werden, dass FxxGxxxG eine rechtshändige Helix-Helix-Paarung fördert. Entsprechend induziert das Motiv wahrscheinlich negative Kreuzungswinkel der aus der Bank SU1 selektierten, hochaffinen Sequenzen, der AZ2 Hybrid-TMD, welche mehrere invariante Ala-Reste enthält, und der oligo-Met-Hybridsequenz mit ihren flexiblen Seitenketten. Umgekehrt könnte die

auf L16 basierende Hybridsequenz auf eine linkshändige Packungsgeometrie beschränkt sein. Daher soll hier die Vermutung geäußert werden, dass die Interaktion über FxxGxxxG entscheidend vom Helix-Helix-Kreuzungswinkel abhängt. Dies steht in Einklang mit einer Analyse von Helix-Helix-Packungsmotiven in Membranproteinen, die ergab, dass in Kontaktflächen rechtshändiger, paralleler Helices häufig kleine Reste auftreten; dies wurde für linkshändige Helix-Helix-Paare nicht beobachtet [47].

Über welchen Mechanismus trägt Phe zur TMD-TMD-Interaktion bei? Erstens könnte Phe aromatische Wechselwirkungen eingehen. Diese Art von Wechselwirkungen ist in Proteinen weitverbreitet; sie trägt dort zur Stabilisierung der tertiären und quartären Struktur bei. Die aromatischen Ringe sind dabei bevorzugt parallel versetzt oder T-förmig angeordnet (Abb. 26); es treten sowohl elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den partiell positiv geladenen C-H-Gruppen am Rand des einen und den delokalisierten π -Elektronen auf der Oberfläche des anderen aromatischen Rings als auch van der Waals' Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Oberflächen der aromatischen Ringe auf, letztere insbesondere in der parallel versetzten Anordnung [144-148]. Möglicherweise bringt also das GxxxG-Element des FxxGxxxG-Motivs die Phe-Reste in eine für $\pi \dots \pi$ -Wechselwirkungen günstige Orientierung zueinander.

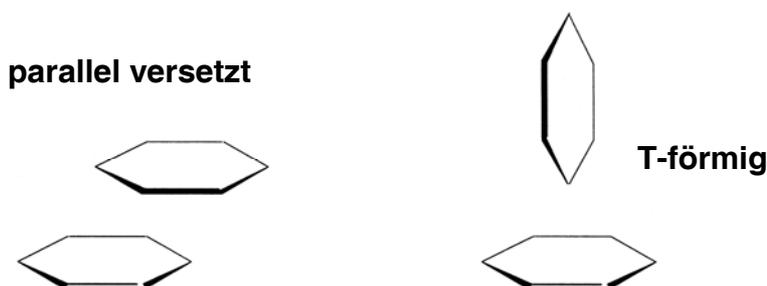


Abb. 26: Bevorzugte π -Stacking-Geometrien aromatischer Aminosäureseitenketten. Schematisches Diagramm der in Proteinen häufig vorgefundenen, relativen Orientierungen aromatischer Systeme. Diese interagieren vorzugsweise in parallel versetzter oder T-förmiger Anordnung. Abbildung verändert nach [148].

Zweitens könnten Phe und Gly interhelikale Wechselwirkungen eingehen. So könnte das erste Gly von GxxxG mit dem Phe-Rest der Partnerhelix beispielsweise über eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem C_{α} -H-Atom von Gly und der aromatischen Seiten-

kette von Phe interagieren. Solche C_{α} -H... π -Wechselwirkungen sind häufig an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt [149-151]. Eine umfangreiche Analyse von Strukturen löslicher Proteine legte tatsächlich nahe, dass ungefähr die Hälfte aller aromatischen Ring-systeme als Akzeptoren von C-H... π -Bindungen fungieren; als hauptsächlicher Donator fungiert offensichtlich das C_{α} -Atom von Gly [149]. In Abb. 27 sind die für solche Bindungen typischen, stereochemischen Charakteristika am Beispiel einer C_{α} -H... π -Wechselwirkung, die in der hochaufgelösten Struktur von Rubisco aus Spinat gefunden wurde [151], dargestellt. Obgleich es sich bei C_{α} -H... π -Interaktionen um relativ schwache Wechselwirkungen handelt, könnten sie infolge des in der apolaren Membranumgebung erhöhten Wasserstoffbrücken-Potentials einen deutlich stabilisierenden Effekt haben. Die postulierte C_{α} -H... π -Wechselwirkung zwischen Phe und dem ersten Gly der Partnerhelix ist mit den hier erzielten experimentellen Ergebnissen insofern vereinbar, dass a) das erste Gly des Interaktionsmotivs scheinbar sensitiver gegenüber Mutation ist als das zweite (s. 4.6.1), b) die TMD-TMD-Interaktion von AZ2 auch durch FxxGxxxA deutlich gefördert wird (s. 4.6.2) und c) einige selektierte, hochaffine TMDn anstelle des zweiten Gly einen anderen kleinen Rest enthalten (s. 4.2.1 und 4.3). Auf jeden Fall bedarf die Ausbildung von π ... π - oder C_{α} -H... π -Wechselwirkungen wahrscheinlich des definierten Abstands zwischen Phe und Gly im FxxGxxxG-Motiv.

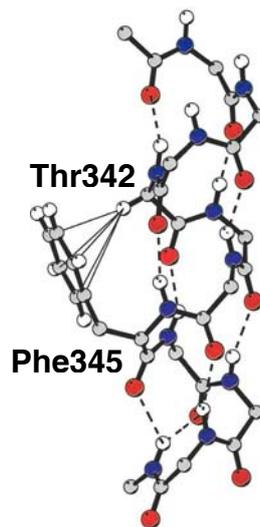


Abb. 27: Exemplarische C_{α} -H... π -Wechselwirkung in einer α -Helix. Intrahelikale Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem C_{α} -H-Atom von Thr342 und dem π -System von Phe345 der A-Kette von Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase aus *Spinacia oleracea* in 1,6 Å Auflösung ([152], PDB-ID 8ruc). Abbildung entnommen aus [151].

Warum kann Phe nicht durch Trp oder Tyr ausgetauscht werden, ohne dass dies zu einem Affinitätsverlust führt? Dazu ließe sich mutmaßen, dass die sperrige Seitenkette von Trp den engen Kontakt der Rückgrate der Partnerhelices über das GxxxG-Motiv erschweren könnte, während Tyr als Wasserstoff-Donator eine H-Brücke mit der Rückgrat-Carbonylgruppe an der -3 oder -4 Position derselben Helix ausbilden könnte anstatt interhelikale Wechselwirkungen zu begünstigen. Diese Art von intrahelikalen Wasserstoffbrückenbindungen wird häufig für die Seitenketten-Hydroxylgruppen von Thr und Ser beobachtet, die dadurch ihr Wasserstoffbrücken-Potential im apolaren Membranmilieu absättigen können [153]. Darüber hinaus könnte die Vorliebe von Trp- und Tyr-Resten für Konformationen, die es erlauben, ihre teils hydrophilen Seitenketten in die polare Kopfgruppenregion der Lipide auszustrecken (sog. „Snorkelling“) und dort Wechselwirkungen einzugehen, in Konkurrenz zur Beteiligung dieser Reste an Helix-Helix-Wechselwirkungen stehen [16, 154, 155]. In Übereinstimmung damit sind Phe und Trp oder Tyr bekanntermaßen unterschiedlich über TMDn verteilt. Während sich Phe ähnlich verhält wie die anderen hydrophoben Aminosäuren und bevorzugt in der hydrophoben Kernregion der Membran auftritt, zeigen Trp und Tyr eine Präferenz für die Membran/Wasser-Grenzflächen und kommen daher größtenteils an den Enden von TMDn vor [11, 37, 107, 156]. Aus anderen Studien ist bekannt, dass sowohl Phe als auch Trp und Tyr zu TMD-TMD-Interaktionen beitragen [157, 158].

Phe ist eine Aminosäure, die in TMDn häufig auftritt [12, 106]. Tatsächlich enthalten 83 % der TMDn in der von A. Fuchs generierten, nichtredundanten Datenbank bitopischer Membranproteine (s. 5.3.2) mindestens ein Phe. Die Beobachtung, dass die Beteiligung von Phe an TMD-TMD-Interaktionen von der Anwesenheit von GxxxG abhängt, könnte daher als ein weiteres Beispiel angesehen werden, das beleuchtet, wie der Einfluss bestimmter Seitenketten auf Helix-Helix-Wechselwirkungen vom Sequenzkontext reguliert wird [53, 76-79, 159]. Eine derartige Kontextabhängigkeit dürfte unspezifische Wechselwirkungen bei der Faltung und Oligomerisierung von Membranproteinen unterdrücken.

5.4 His fördert die Interaktion von TMDn

5.4.1 Identifikation der von His vermittelten Interaktion von TMDn durch Selektion affiner TMDn aus der Bank JP1

In dieser Arbeit erzielte Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass His homotypische TMD-TMD-Interaktionen begünstigt. Diese Schlussfolgerung beruht auf einer bemerkenswerten Anreicherung von His in mittel- und hochaffinen TMD-Sequenzen, die aus der kombinatorischen Bank JP1 selektiert wurden (s. 4.2.2 und 4.4). In diesen Sequenzen ist His an Position 6 stark überrepräsentiert, wo es häufig von kleineren, mäßig polaren Resten flankiert und mit einem C-terminalen GxxxG-Motiv assoziiert ist, was das generelle Motiv (A/C/G/S/T/V)Hx(A/C/G/S/T/V)xxxxGxxxG ergibt (s. 4.4). Die Bedeutung von His für die TMD-TMD-Interaktion wird durch Mutationsanalysen bestätigt, die zeigen, dass His in zwei von drei Fällen für die homotypische Interaktion der TMDn kritisch ist (s. 4.7). Die TMD-TMD-Interaktion von J35 wird offensichtlich nicht von His unterstützt (s. 4.7). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Interaktion dieser TMD stattdessen von Trp oder dem GxxxGxxxG-Motiv gefördert wird. Andere Studien legten bereits nahe, dass Trp [91, 157, 158] und sog. Gly-Zipper-Motive [122] zur TMD-TMD-Interaktion beitragen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit soll später diskutiert werden.

Dass His nicht in bisherigen Screenings auf homotypisch interagierende TMDn identifiziert wurde, lässt sich damit erklären, dass einige dieser randomisierten Sequenzen nicht für His codierten [53, 90]. Die kombinatorische Bank AR hingegen bezog His in den zur Randomisierung verwendeten Aminosäuresatz ein (s. 4.1.1). Jedoch enthielten 84 % der aus dieser Bank selektierten, hochaffinen Sequenzen mindestens ein Trp [91]. Dass in affinen TMDn aus dieser Bank keine Anreicherung von His beobachtet wurde, könnte daher daran liegen, dass das Auftreten von TMDn mit His durch die Fülle an Trp-haltigen, affinen Sequenzen unterdrückt wurde. Ein anderer Grund dafür, dass der für die TMD-TMD-Interaktion förderliche Effekt von His in dieser Bank nicht gefunden wurde, könnte sein, dass diese Bank für Sequenzen codierte, die mit allen natürlich vorkommenden Aminosäuren randomisiert wurden und gleichzeitig zu ~1/3 invariante Ala-Reste beinhalten. Aufgrund der Fülle an hydrophilen Resten sowie der geringen Hydrophobizität des Grundgerüsts könnte das Auftreten von His die stabile Membranintegration unterbunden haben. Dafür spricht, dass in membranintegrierten Sequenzen dieser Bank stark polare Reste weitgehend abwesend waren.

Weitere Mutationsanalysen, die von Johanna C. Panitz nach Abschluss ihrer Masterarbeit durchgeführt wurden, bekräftigen, dass His zur Interaktion von TMDn beiträgt. Darüber hinaus zeichnet sich ab, dass das C-terminale GxxxG-Motiv, das in der Mehrheit der His-haltigen Sequenzen auftritt (s. 4.2.2 und 4.4), die TMD-TMD-Interaktion wesentlich unterstützt. Des Weiteren scheinen kleinere, polare Reste an Position 5 sowie kleine Reste an Position 8 (s. 4.4) die von His vermittelte Assoziation der TMDn tatsächlich zu unterstützen (Johanna C. Panitz, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Beobachtung, dass His in J35 offensichtlich nicht zur TMD-TMD-Interaktion beiträgt (s. oben), lässt sich daher damit erklären, dass die Positionen 5 und 8 in dieser TMD von Cys und Thr besetzt sind (s. 4.7); das kaum polare Cys und das größere Thr kooperieren möglicherweise nicht mit His in homotypischen TMD-TMD-Interaktionen. Umgekehrt verbessert His alleine die Interaktion der Modell-TMDn AZ2 und L16 kaum; hingegen resultiert das Aufsetzen des Sequenzmotivs THxSxxxxGxxxG auf AZ2 bzw. die oligo-Leu-Sequenz L16 in einer Verdoppelung bzw. Verdreifachung der β -Gal-Aktivität (Johanna C. Panitz, unveröffentlichte Ergebnisse). Die von Johanna C. Panitz erzielten Ergebnisse deuten an, dass His die Assoziation von L16, und in geringerem Maße AZ2, nur dann erheblich fördert, wenn es von kleineren, polaren Resten flankiert wird und die Sequenzen zudem über ein C-terminales GxxxG-Motiv verfügen.

5.4.2 His in natürlichen TMDn

His ist in TMDn natürlicher Membranproteine stark konserviert [160]. Dies deutet an, dass His eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität und/oder Funktionalität von Membranproteinen spielt. Beispielsweise ist His in TMDn von Ionenkanälen weitverbreitet [161]. So verfügt das bitopische Membranprotein, das den homotetrameren M2-Protonenkanal des Influenza A Virus bildet, über ein His in seiner TMD. Die His-Reste der vier TMD-Untereinheiten sind im Inneren der Kanalpore lokalisiert und scheinen für die Funktion des Ionenkanals essentiell zu sein [54, 161, 162]. Transiente Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den ionisierbaren Seitenketten-Imidazolringen von His könnten am pH-sensitiven „Gating“-Mechanismus beteiligt sein [162].

Ein weiteres bitopisches Membranprotein mit His in seiner TMD ist BNIP3 (BNIP3 steht für „Bcl-2/19-kDa interacting protein 3“). BNIP3 ist ein proapoptisches Protein der Bcl-2-Familie, das den durch Sauerstoffmangel induzierten Zelltod einleitet. Es ist bereits

gezeigt worden, dass die C-terminale TMD von BNIP3 für seine proapoptotische Aktivität sowie seine Wechselwirkung mit Bcl-2 von Bedeutung ist ([163, 164] sowie Literaturangaben darin). Interessanterweise interagiert die α -helikale TMD von BNIP3 sehr effizient mit sich selbst. Die sequenzspezifische Dimerisierung von BNIP3 erfolgt durch Bildung paralleler, rechtshändig gekreuzter Helix-Helix-Paare (Abb. 28).

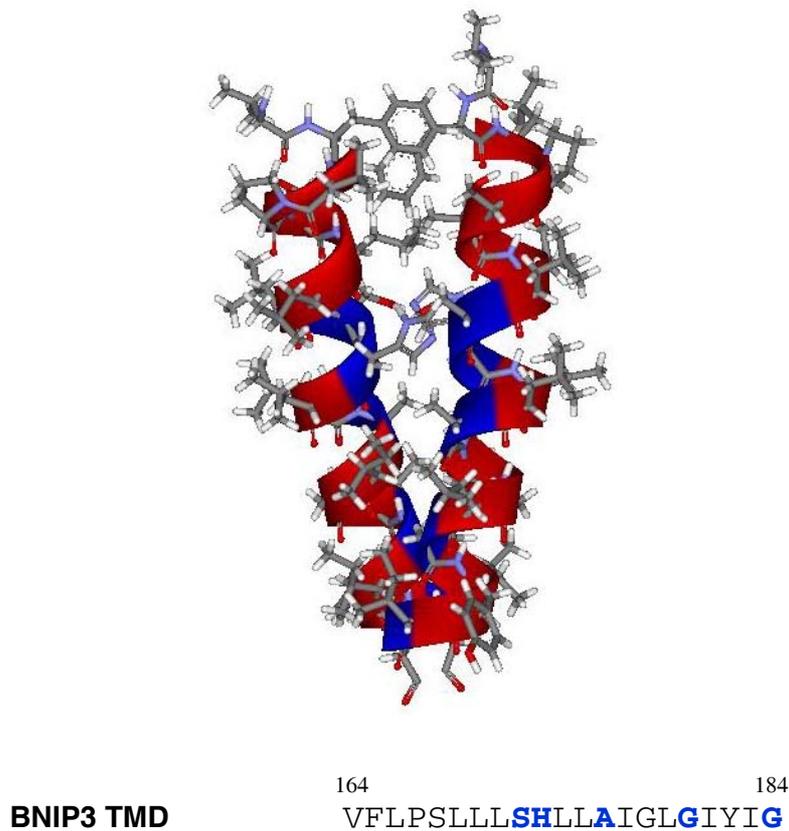


Abb. 28: Struktur des BNIP3 TMD Dimers in Bicellen. Die TMDn (Reste 164 bis 184 der Aminosäuresequenz von humanem BNIP3, wie darunter gezeigt) bilden rechtshändig gekreuzte Helix-Helix-Paare. Die in der Helix-Helix-Kontaktfläche liegenden Reste, die in besonderem Maße zur Stabilisierung des Dimers beitragen, sind blau markiert. Die Seitenketten von His173 und Ser172 bilden interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen zueinander aus und Ala176, Gly180 und Gly184 des AxxxGxxxG-Motivs erlauben eine dichte Packung der Helices ([164], PDB-ID 2j5d). Die Abbildung wurde mit DS ViewerPro 5.0 generiert.

Durch Mutationsanalysen, molekulare Modellierung und kernresonanzspektroskopische Untersuchungen in Bicellen wurde die Helix-Helix-Kontaktfläche identifiziert. Die TMD-TMD-Interaktion von BNIP3 wird größtenteils vom Sequenzmotiv SHxxAxxxGxxxG vermittelt (Abb. 28, Motiv in blau). Die Seitenketten von His und Ser bilden vermutlich interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen zueinander aus und tragen so zur Stabilisierung des

Dimers bei. Das C-terminale AxxxGxxxG-Motiv, das einen engen Kontakt der Rückgrate der Partnerhelices erlaubt und die Ausbildung interhelikaler C_α-H-Bindungen zu Rückgrat-Carbonylgruppen ermöglichen könnte, ist für die TMD-TMD-Interaktion von BNIP3 ebenfalls essentiell; es wird vermutet, dass es die Seitenketten von His und Ser in eine für elektrostatische Wechselwirkungen günstige Orientierung zueinander bringt und so die Spezifität der Interaktion vermittelt [45, 163-165].

Analysen von Membranproteinstrukturen legten bereits nahe, dass His auch zu heterotypischen TMD-TMD-Interaktionen in polytopischen Membranproteinen beiträgt. His, Ser und Thr sind zusammen an mehr als einem Drittel der dort gefundenen interhelikalen Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt [112]. In heterotypisch interagierenden Paaren tritt His bevorzugt mit Gly und Thr in Wechselwirkung [133]. Daneben gehört His zu vier von 66 überrepräsentierten Triplets, welche auch die kleineren, mäßig polaren Aminosäuren Gly, Ala, Ser und Thr enthalten; insbesondere scheint der Seitenketten-Imidazolring von His bevorzugt interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen mit der Seitenketten-Hydroxylgruppe von Thr einzugehen [127].

5.4.3 Potentielle Mechanismen der Stabilisierung homotypischer TMD-TMD-Interaktionen durch His

Die von His vermittelte Interaktion der aus der Bank JP1 selektierten, hochaffinen TMDn wird wesentlich von flankierenden Sequenzelementen unterstützt (s. 5.4.1). Das His-haltige Motiv fördert TMD-TMD-Interaktionen von AZ2 und, weitaus effizienter, der oligo-Leu-Sequenz L16 (s. 5.4.1). Molekulardynamische Simulationen in Membranen haben gezeigt, dass eine oligo-Leu-Sequenz bevorzugt linkshändige Helix-Helix-Paare bildet [166]. Die auf L16 basierende Hybridsequenz könnte ebenso auf eine linkshändige Packungsgeometrie beschränkt sein. Es wäre daher vorstellbar, dass das Motiv positive Kreuzungswinkel der aus der Bank JP1 selektierten, hochaffinen Sequenzen induziert. Dagegen spricht, dass ein ähnliches Motiv für die starke Selbstinteraktion der BNIP3 TMD essentiell ist, welche rechtshändige Helix-Helix-Paare bildet (s. 5.4.2). Deshalb wäre es auch vorstellbar, dass das His-haltige Motiv negative Kreuzungswinkel der hochaffinen TMDn aus JP1 sowie der auf L16 basierenden Hybridsequenz induziert. Es ist durchaus denkbar, dass ausreichend starke, interhelikale Wechselwirkungen eine rechtshändige Konformation erzwingen.

Über welchen Mechanismus könnte His zur TMD-TMD-Interaktion beitragen? Die Seitenkette von His kann als Wasserstoff-Donator und -Akzeptor fungieren. Erstens könnten die Seitenketten-Imidazolringe von His über interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen miteinander interagieren. Zweitens könnten die aromatischen Seitenketten von His $\pi\cdots\pi$ -, N-H... π - oder C-H... π -Wechselwirkungen eingehen. Möglicherweise bringt das häufig auftretende, C-terminale GxxxG-Element die His-Reste der Partnerhelices in eine für aromatische oder Wasserstoffbrückenbindungen günstige Orientierung zueinander. Drittens könnten die Seitenketten von His mit Amid- oder Carbonylgruppen des Rückgrats, C $_{\alpha}$ -H-Atomen von Gly oder Seitenketten-Hydroxylgruppen von Ser oder Thr interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Analysen von Membranproteinstrukturen deuteten bereits an, dass His häufig H-Brücken zu den polaren Gruppen der Peptidbindungen ausbildet [112]. Eine umfangreiche Analyse löslicher Proteinstrukturen legte zudem nahe, dass ein Viertel der Seitenketten-Imidazolringe von His als Akzeptoren von C-H... π -Bindungen fungieren; das C $_{\alpha}$ -Atom von Gly wurde dabei als häufigster Donator identifiziert [149]. Die Selbstassoziation der BNIP3 TMD, deren Sequenz den His-haltigen, hochaffinen TMD-Sequenzen aus JP1 ähnelt, wird scheinbar durch interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen zwischen His und einem benachbarten Ser gefördert [164]. Ferner beeinträchtigt die Mutation dieses Ser-Restes zu Thr die Dimerisierung von BNIP3 offensichtlich nicht [45]. Heterotypische Interaktionen zwischen His und dem Proteinrückgrat oder einem Gly-, Ser- oder Thr-Rest der Partnerhelix würden erklären, warum die flankierenden Positionen in den His-haltigen, affinen Sequenzen aus JP1 häufig von kleineren und/oder mäßig polaren Aminosäuren besetzt sind. Die GxxxG-Motive könnten den für Helix-Helix-Wechselwirkungen günstigen, engen Kontakt der C-terminalen TMD-Oberflächen ermöglichen und die Wasserstoffbrückenbindungspartner in den N-terminalen Regionen der Partnerhelices in eine für Wechselwirkungen günstige Orientierung zueinander bringen.

Wasserstoffbrückenbindungen und andere elektrostatische Wechselwirkungen sind im apolaren Milieu der Membran stärker als im wässrigen Milieu. Dies ist auf die weitgehende Abwesenheit von Ionen und Wassermolekülen zurückzuführen; diese stehen daher nicht als alternative Bindungspartner zur Verfügung. Aus demselben Grund sind elektrostatische Anziehungskräfte in Membranen über größere Entfernungen wirksam [41, 51, 167]. 25 % aller TMDn bitopischer Membranproteine enthalten mindestens einen stark polaren Ami-

nosäurerest [159]. Die Beobachtung, dass die Beteiligung von His an TMD-TMD-Interaktionen von flankierenden Sequenzen abhängt, deckt beispielhaft auf, wie der Einfluss polarer Seitenketten auf Helix-Helix-Wechselwirkungen vom Sequenzkontext moduliert wird. Die Kontextabhängigkeit der von His vermittelten TMD-TMD-Interaktion dürfte die Gefahr unspezifischer Assoziation verringern.

5.5 Förderung der Interaktion von TMDn durch gegensätzlich ionisierbare Aminosäuren

Aus der Bank JP1 selektierte, hochaffine TMDn, in denen gegensätzlich ionisierbare Aminosäuren alternierend auftreten, lassen mutmaßen, dass diese potentiell gegensätzlich geladenen Aminosäuren zur starken Interaktion dieser TMDn beitragen (s. 4.2.2 und 4.5). Obgleich der Transfer einzelner, geladener Reste vom wässrigen Milieu in die apolare Umgebung der Membran aufgrund des hohen Energieaufwands unwahrscheinlich ist [7], ist die Insertion von TMDn, in denen sich gegensätzlich geladene Reste durch elektrostatische Wechselwirkungen neutralisieren können, teilweise sogar begünstigt [168-171]. Dies gilt insbesondere für die Insertion von TMDn, die Arg/Asp- oder Arg/Glu-Paare enthalten [168, 169]. Genau diese Arg/Asp- und Arg/Glu-Paare finden sich in den hochaffinen Sequenzen aus JP1, die ionisierbare Reste enthalten.

Es ist denkbar, dass diese Ionenpaare ebenfalls die stabile Assoziation dieser TMDn vermitteln. In der Tat dürften Salzbrücken erheblich zur Stabilisierung von TMD-TMD-Interaktionen beitragen [172]. So scheinen Salzbrücken beispielsweise zur Stabilisierung des T-Zell-Rezeptorkomplexes [173] und der Lactose-Permease aus *E. coli* [174] beizutragen. In den aus JP1 selektierten Sequenzen sind die ionisierbaren Reste mit einem C-terminalen GxxxG-Motiv assoziiert, das die Assoziation dieser TMDn unterstützen könnte.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse werfen die Frage auf, ob TMDn natürlicher, biotopischer Membranproteine ähnliche Muster gegensätzlich ionisierbarer Aminosäuren enthalten. Da die zur Vorhersage von Membranproteinen gebräuchlichen Algorithmen wie TMHMM [5] vorwiegend Hydrophobizitäten berücksichtigen (s. 1.1), überrascht es nicht, dass die aus JP1 selektierten TMDn, die mehrere potentiell geladene Reste enthalten, nicht als solche identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Würden Vorhersageprogramme den Ladungsausgleich durch Ionenpaarung berücksichtigen, dürften auch derartige TMDn als

solche erkannt werden. Daher ist es durchaus denkbar, dass bitopische Membranproteine mit ähnlichen Aminosäuremustern in ihren TMDn existieren.

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei große Banken partiell randomisierter TMDn entworfen, deren durchdachtes Design die erfolgreiche Aufdeckung neuer TMD-TMD-Interaktionsmotive ermöglichte. Die aus diesen Banken selektierten TMDn weisen mindestens so hohe Affinitäten auf wie zuvor charakterisierte, natürliche oder artifizielle TMDn, die mit sich selbst interagieren.

Erstmalig wurde aufgedeckt, dass die Interaktion von TMDn über GxxxG-Motive, deren weitreichende Bedeutung bei der Assoziation von TMDn offenkundig ist, durch Phe an der -3 Position gefördert wird. Dieses FxxGxxxG-Motiv wurde in einer mit einem hydrophoben Aminosäuresatz randomisierten Bank identifiziert und durch systematische Mutationsanalysen als Interaktionsmotiv verifiziert. Zudem wurde aufgedeckt, dass die Interaktion von TMDn über dieses Motiv vom Helix-Helix-Kreuzungswinkel abhängt und des definierten Abstands zwischen Phe und GxxxG bedarf. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse implizieren, dass FxxGxxxG im Rahmen rechtshändiger Helix-Helix-Paare interagiert. Studien an anderen hydrophoben Banken, die die linkshändige Paarung von TMDn begünstigen, sollten die Entschlüsselung weiterer Interaktionsmotive ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde erstmalig eine Bank entworfen, die den kompletten Satz natürlich vorkommender Aminosäuren einbezog und gleichzeitig über einen hydrophoben Hintergrund verfügte. Selektion dieser Bank ließ erkennen, dass stark polare Aminosäuren die Interaktion von TMDn vermitteln. Zur starken Interaktion von TMDn aus dieser Bank trägt ein von kleineren, polaren Aminosäuren flankiertes His bei. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse führten zu Mutationsanalysen, die die Bedeutung von His und seiner flankierenden Sequenzelemente für die Interaktion dieser TMDn bestätigten. Für einige besonders hochaffine TMDn aus dieser Bank sind potentiell gegensätzlich geladene Aminosäuren charakteristisch, was sehr darauf hindeutet, dass diese ionisierbaren Aminosäuren für die starke Interaktion dieser TMDn kritisch sind. Nur dreimal wurde in affinen TMDn aus dieser Bank das FxxGxxxG-Motiv gefunden. Ein Grund für die weitgehende Abwesenheit dieses Motivs in interagierenden TMDn aus dieser Bank könnte sein, dass FxxGxxxG

allem Anschein nach rechtshändige Helix-Helix-Paarung induziert. Während der invariante Ala-Hintergrund wahrscheinlich negative Kreuzungswinkel der Sequenzen aus der Bank SU1 begünstigt, könnte das invariante Leu eine linkshändige Packungsgeometrie der Sequenzen aus der Bank JP1 favorisieren. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten an, dass die auffindbaren Interaktionsmotive maßgeblich vom Design der kombinatorischen Banken beeinflusst werden. Neben dem zur Randomisierung verwendeten Aminosäuresatz scheinen hierbei Anzahl und Lokalisation der variablen Positionen sowie der invariante Sequenzkontext eine bedeutende Rolle zu spielen. Auch das invariante Gly der C-terminal flankierenden Vektorsequenz ist in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung, da es offensichtlich erheblich zur Identifikation GxxxG-haltiger TMDn beigetragen hat. Zur weiteren Aufklärung der Sequenzspezifität von TMD-TMD-Interaktionen ist es daher unerlässlich, weitere Banken zu konstruieren. Eine Verringerung des Anteils hydrophiler Aminosäuren in diesen Banken, verbunden mit der Variation des hydrophoben Sequenzkontexts, dürfte zur weiteren Klärung der Funktion polarer Aminosäuren bei der TMD-TMD-Interaktion beitragen. Auch eine Deletion des invarianten Gly der flankierenden Vektorsequenz könnte die Identifizierung neuer Sequenzmotive erleichtern.

Mittels des in dieser Arbeit durchgeführten, artifiziellen Ansatzes der Randomisierung und Selektion konnten neue Erkenntnisse über die Interaktion natürlicher TMDn gewonnen werden. Das FxxGxxxG-Motiv wurde in einer Bank gefunden, die mit dem Ziel erstellt wurde, natürliche TMD-Sequenzen nachzuahmen. Daher überrascht es nicht, dass dieses Motiv tatsächlich zur Selbstassoziation der TMD eines natürlichen, bitopischen Membranproteins beiträgt. Durch Förderung der Interaktion der VSV-G TMD könnte das FxxGxxxG-Motiv zur Virus-Membran-Fusion beitragen. Die in dieser Arbeit erzeugten experimentellen Daten motivierten eine Datenbankanalyse, die die Rolle des vorgeschlagenen Motivs bei der TMD-TMD-Interaktion bitopischer Membranproteine bekräftigte. Zur Klärung des Mechanismus der Stabilisierung GxxxG-vermittelter TMD-TMD-Interaktionen durch Phe sind weitere Studien erforderlich. Die Analyse bekannter Strukturen polytopischer Membranproteine, die FxxGxxxG in ihren TMDn enthalten, könnte Hinweise liefern, ob dieses Motiv auch heterotypische TMD-TMD-Interaktionen unterstützt. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob Phe im Rahmen dieses Motivs über $\pi\cdots\pi$ - oder C_{α} -H... π -Wechselwirkungen interagiert. Auch His könnte zur Interaktion natürlicher TMDn beitragen. Dafür spricht, dass das aus selektierten, affinen TMDn abgeleitete Kon-

sensuspuster eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zu dem His-enhaltenden Aminosäuremotiv aufweist, welches maßgeblich zur Stabilisierung des BNIP3 TMD Dimers beiträgt. Der in dieser Arbeit gewählte, methodische Ansatz hat gegenüber Untersuchungen an einzelnen Modell-TMDn den entscheidenden Vorteil, dass Positions- und Kontextabhängigkeiten berücksichtigt werden. Der Einfluss bestimmter Aminosäuren auf die Wechselwirkungen natürlicher TMDn muss vom Sequenzkontext reguliert werden, um unspezifische Assoziation zu vermeiden. Die Kooperation von Phe mit GxxxG oder von His mit kleinen, polaren Aminosäuren sind Beispiele, die dies eindrucksvoll unterstreichen. Die Selektion kombinatorischer Banken ist also ein effizientes Verfahren zur Identifikation solch komplexer Interaktionsmotive.

Die derzeitige Etablierung eines dominant-negativen ToxR-Systems legt die Basis zur Untersuchung heterotypischer TMD-TMD-Interaktionen. Dieses Messsystem dürfte es ermöglichen, Bindungspartner von His in der Partnerhelix zu identifizieren, und so zur Klärung des Mechanismus der His-vermittelten Stabilisierung von TMD-TMD-Interaktionen beizutragen. Zum weiteren Erkenntnisgewinn über die Förderung von TMD-TMD-Interaktionen durch stark polare Aminosäuren sollten Mutationsstudien an den im Rahmen dieser Arbeit selektierten, hochaffinen TMDn, die gegensätzlich ionisierbare Aminosäuren enthalten, durchgeführt werden. Dies ist die bisher erste Arbeit, in der hochaffine TMDn mit derartigen Mustern gegensätzlich ionisierbarer Aminosäuren identifiziert wurden. Es ist denkbar, dass die potentiell gegensätzlich geladenen Reste sowohl die Insertion als auch die Interaktion dieser TMDn begünstigen. Möglicherweise ist die stabile Insertion dieser TMDn nur möglich, weil sich die Ladungen durch intrahelikale Wechselwirkungen neutralisieren. Andere Studien deuten an, dass die Insertion mehrerer TMDn kooperativ erfolgen kann. Würden zwei TMDn, die unterschiedlich geladene Reste enthalten, vor ihrer Membraninsertion interagieren, so dass die Ladungen sich aufgrund interhelikaler Wechselwirkungen neutralisieren könnten, könnte dies die Insertionseffizienz erhöhen. Daher wäre es aufschlussreich zu untersuchen, ob der Austausch eines positiv oder negativ geladenen Rests durch eine ungeladene Aminosäure die Insertion selektierter TMDn mit potentiell ionengepaarten Resten beeinträchtigt. Könnte die Insertionseffizienz durch gleichzeitige Transformation mit beiden Punktmutanten wiederum erhöht werden, würde dies auf interhelikale Wechselwirkungen und den Ladungsausgleich infolge von Ionenpaarung hindeuten. Dies wäre ein wichtiger Ausgangspunkt zur Weiterentwicklung der Programme zur Vorhersage von Membranproteinen.

6. Literaturverzeichnis

1. White, S. H. & Wimley, W. C. (1999). Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **28**: 319-365.
2. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731.
3. Simons, K. & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.
4. Wallin, E. & von Heijne, G. (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* **7**: 1029-1038.
5. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* **305**: 567-580.
6. Stevens, T. J. & Arkin, I. T. (2000). Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? *Proteins* **39**: 417-420.
7. Engelman, D. M., Steitz, T. A. & Goldman, A. (1986). Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Chem.* **15**: 321-353.
8. Luecke, H., Schobert, B., Richter, H. T., Cartailler, J. P. & Lanyi, J. K. (1999). Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J Mol Biol.* **291**: 899-911.
9. Weiss, M. S. & Schulz, G. E. (1992). Structure of porin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol.* **227**: 493-509.
10. Bowie, J. U. (1997). Helix packing in membrane proteins. *J Mol Biol.* **272**: 780-789.
11. Arkin, I. T. & Brunger, A. T. (1998). Statistical analysis of predicted transmembrane α -helices. *Biochim Biophys Acta* **1429**: 113-128.

12. Senes, A., Gerstein, M. & Engelman, D. M. (2000). Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with β -branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol.* **296**: 921-936.
13. Ulmschneider, M. B. & Sansom, M. S. (2001). Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta* **1512**: 1-14.
14. Killian, J. A. (1998). Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta* **1376**: 401-415.
15. Lee, A. G. (2003). Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta* **1612**: 1-40.
16. Wimley, W. C. & White, S. H. (1996). Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol.* **3**: 842-848.
17. Müller, M., Koch, H. G., Beck, K. & Schäfer, U. (2001). Protein traffic in bacteria: multiple routes from the ribosome to and across the membrane. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **66**: 107-157.
18. Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Moller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G. J. & Dalbey, R. E. (2000). YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* **406**: 637-641.
19. Rapoport, T. A. (1992). Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* **258**: 931-936.
20. Wild, K., Halic, M., Sinning, I. & Beckmann, R. (2004). SRP meets the ribosome. *Nat Struct Mol Biol.* **11**: 1049-1053.
21. White, S. H. & von Heijne, G. (2004). The machinery of membrane protein assembly. *Curr Opin Struct Biol.* **14**: 397-404.
22. Wickner, W. & Schekman, R. (2005). Protein translocation across biological membranes. *Science* **310**: 1452-1456.
23. Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 1496-1500.

-
24. Halic, M. & Beckmann, R. (2005). The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr Opin Struct Biol.* **15**: 116-125.
25. 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.
26. von Heijne, G. & Gavel, Y. (1988). Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem.* **174**: 671-678.
27. von Heijne, G. (1992). Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol.* **225**: 487-494.
28. van Klompenburg, W., Nilsson, I., von Heijne, G. & de Kruijff, B. (1997). Anionic phospholipids are determinants of membrane protein topology. *Embo J.* **16**: 4261-4266.
29. van Dalen, A. & de Kruijff, B. (2004). The role of lipids in membrane insertion and translocation of bacterial proteins. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 97-109.
30. Goder, V., Junne, T. & Spiess, M. (2004). Sec61p contributes to signal sequence orientation according to the positive-inside rule. *Mol Biol Cell.* **15**: 1470-1478.
31. Andersson, H. & von Heijne, G. (1994). Membrane protein topology: effects of $\Delta\mu\text{H}^+$ on the translocation of charged residues explain the 'positive inside' rule. *Embo J.* **13**: 2267-2272.
32. Heinrich, S. U., Mothes, W., Brunner, J. & 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.
33. Hermansson, M. & von Heijne, G. (2003). Inter-helical hydrogen bond formation during membrane protein integration into the ER membrane. *J Mol Biol.* **334**: 803-809.
34. Meindl-Beinker, N. M., Lundin, C., Nilsson, I., White, S. H. & von Heijne, G. (2006). Asn- and Asp-mediated interactions between transmembrane helices during translocon-mediated membrane protein assembly. *EMBO Rep.* **7**: 1111-1116.

35. Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S. H. & von Heijne, G. (2005). Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature* **433**: 377-381.
36. Wimley, W. C., Creamer, T. P. & White, S. H. (1996). Solvation energies of amino acid side chains and backbone in a family of host-guest pentapeptides. *Biochemistry* **35**: 5109-5124.
37. Ulmschneider, M. B., Sansom, M. S. & Di Nola, A. (2005). Properties of integral membrane protein structures: derivation of an implicit membrane potential. *Proteins* **59**: 252-265.
38. Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. & Wall, R. (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol.* **179**: 125-142.
39. Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* **157**: 105-132.
40. Popot, J. L. & Engelman, D. M. (1990). Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry* **29**: 4031-4037.
41. Popot, J. L. & Engelman, D. M. (2000). Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu Rev Biochem.* **69**: 881-922.
42. 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., Senes, A. & Popot, J. L. (2003). Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett.* **555**: 122-125.
43. Popot, J. L., Gerchman, S. E. & Engelman, D. M. (1987). Refolding of bacteriorhodopsin in lipid bilayers. A thermodynamically controlled two-stage process. *J Mol Biol.* **198**: 655-676.
44. MacKenzie, K. R. (2006). Folding and stability of α -helical integral membrane proteins. *Chem Rev.* **106**: 1931-1977.

-
45. Sulistijo, E. S. & 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.
46. Bowie, J. U. (1997). Helix packing angle preferences. *Nat Struct Biol.* **4**: 915-917.
47. Walters, R. F. & DeGrado, W. F. (2006). Helix-packing motifs in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 13658-13663.
48. Crick, F. H. C. (1953). The Packing of α -Helices: Simple Coiled-Coils. *Acta Cryst.* **6**: 689-697.
49. O'Shea, E. K., Klemm, J. D., Kim, P. S. & Alber, T. (1991). X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* **254**: 539-544.
50. Langosch, D. & Heringa, J. (1998). Interaction of transmembrane helices by a knobs-into-holes packing characteristic of soluble coiled coils. *Proteins* **31**: 150-159.
51. Langosch, D., Lindner, E. & Gurezka, R. (2002). In vitro selection of self-interacting transmembrane segments - membrane proteins approached from a different perspective. *IUBMB Life* **54**: 109-113.
52. Ruan, W., Becker, V., Klingmüller, U. & 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.
53. Russ, W. P. & Engelman, D. M. (2000). The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol.* **296**: 911-919.
54. Pinto, L. H., Dieckmann, G. R., Gandhi, C. S., Papworth, C. G., Braman, J., Shaughnessy, M. A., Lear, J. D., Lamb, R. A. & DeGrado, W. F. (1997). A functionally defined model for the M2 proton channel of influenza A virus suggests a mechanism for its ion selectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 11301-11306.
55. Arkin, I. T., Adams, P. D., MacKenzie, K. R., Lemmon, M. A., Brunger, A. T. & Engelman, D. M. (1994). Structural organization of the pentameric transmembrane α -helices of phospholamban, a cardiac ion channel. *Embo J.* **13**: 4757-4764.

56. Adams, P. D., Arkin, I. T., Engelman, D. M. & Brunger, A. T. (1995). Computational searching and mutagenesis suggest a structure for the pentameric transmembrane domain of phospholamban. *Nat Struct Biol.* **2**: 154-162.
57. Huber, O., Kemler, R. & Langosch, D. (1999). Mutations affecting transmembrane segment interactions impair adhesiveness of E-cadherin. *J Cell Sci.* **112**: 4415-4423.
58. Deber, C. M., Khan, A. R., Li, Z., Joensson, C., Glibowicka, M. & Wang, J. (1993). Val → Ala mutations selectively alter helix-helix packing in the transmembrane segment of phage M13 coat protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11648-11652.
59. Laage, R. & Langosch, D. (1997). Dimerization of the synaptic vesicle protein synaptobrevin (vesicle-associated membrane protein) II depends on specific residues within the transmembrane segment. *Eur J Biochem.* **249**: 540-546.
60. Fleming, K. G. & Engelman, D. M. (2001). Computation and mutagenesis suggest a right-handed structure for the synaptobrevin transmembrane dimer. *Proteins* **45**: 313-317.
61. Laage, R., Rohde, J., Brosig, B. & Langosch, D. (2000). A conserved membrane-spanning amino acid motif drives homomeric and supports heteromeric assembly of presynaptic SNARE proteins. *J Biol Chem.* **275**: 17481-17487.
62. MacKenzie, K. R., Prestegard, J. H. & Engelman, D. M. (1997). A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science* **276**: 131-133.
63. Smith, S. O., Song, D., Shekar, S., Groesbeck, M., Ziliox, M. & Aimoto, S. (2001). Structure of the transmembrane dimer interface of glycophorin A in membrane bilayers. *Biochemistry* **40**: 6553-6558.
64. Ridder, A. N. & Langosch, D. (2003). Transmembrane domains in membrane protein folding, oligomerization, and function. In: *Handbook of Protein Folding* (Buchner, J., Kiefhaber, T., eds.), Wiley-VCH, Weinheim. Bd. 2.
65. Creighton, T. E. (1993). *Proteins: Structure and Molecular Properties*. W. H. Freeman & Co., New York. 2. Aufl.

66. DeGrado, W. F., Gratkowski, H. & 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.
67. Lemmon, M. A., Flanagan, J. M., Treutlein, H. R., Zhang, J. & Engelman, D. M. (1992). Sequence specificity in the dimerization of transmembrane α -helices. *Biochemistry* **31**: 12719-12725.
68. Lemmon, M. A., Treutlein, H. R., Adams, P. D., Brunger, A. T. & Engelman, D. M. (1994). A dimerization motif for transmembrane α -helices. *Nat Struct Biol.* **1**: 157-163.
69. Treutlein, H. R., Lemmon, M. A., Engelman, D. M. & Brunger, A. T. (1992). The glycoporphin A transmembrane domain dimer: sequence-specific propensity for a right-handed supercoil of helices. *Biochemistry* **31**: 12726-12732.
70. Adams, P. D., Engelman, D. M. & Brunger, A. T. (1996). Improved prediction for the structure of the dimeric transmembrane domain of glycoporphin A obtained through global searching. *Proteins* **26**: 257-261.
71. Langosch, D., Brosig, B., Kolmar, H. & Fritz, H. J. (1996). Dimerisation of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator. *J Mol Biol.* **263**: 525-530.
72. Brosig, B. & Langosch, D. (1998). The dimerization motif of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues. *Protein Sci.* **7**: 1052-1056.
73. Smith, S. O., Eilers, M., Song, D., Crocker, E., Ying, W., Groesbeek, M., Metz, G., Ziliox, M. & Aimoto, S. (2002). Implications of threonine hydrogen bonding in the glycoporphin A transmembrane helix dimer. *Biophys J.* **82**: 2476-2486.
74. Senes, A., Ubarretxena-Belandia, I. & Engelman, D. M. (2001). The C α -H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9056-9061.
75. Arbely, E. & Arkin, I. T. (2004). Experimental measurement of the strength of a C α -H...O bond in a lipid bilayer. *J Am Chem Soc.* **126**: 5362-5363.

-
76. Melnyk, R. A., Kim, S., Curran, A. R., Engelman, D. M., Bowie, J. U. & 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.
77. Schneider, D. & 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.
78. Doura, A. K., Kobus, F. J., Dubrovsky, L., Hibbard, E. & Fleming, K. G. (2004). Sequence context modulates the stability of a GxxxG-mediated transmembrane helix-helix dimer. *J Mol Biol.* **341**: 991-998.
79. Doura, A. K. & Fleming, K. G. (2004). Complex interactions at the helix-helix interface stabilize the glycophorin A transmembrane dimer. *J Mol Biol.* **343**: 1487-1497.
80. Seddon, A. M., Curnow, P. & Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* **1666**: 105-117.
81. White, S. H. (2004). The progress of membrane protein structure determination. *Protein Sci.* **13**: 1948-1949.
82. Kolmar, H., Hennecke, F., Gotze, K., Janzer, B., Vogt, B., Mayer, F. & 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.
83. Russ, W. P. & Engelman, D. M. (1999). TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 863-868.
84. Fleming, K. G. & Engelman, D. M. (2001). Specificity in transmembrane helix-helix interactions can define a hierarchy of stability for sequence variants. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14340-14344.
85. Fleming, K. G., Ackerman, A. L. & Engelman, D. M. (1997). The effect of point mutations on the free energy of transmembrane α -helix dimerization. *J Mol Biol.* **272**: 266-275.

-
86. Fisher, L. E., Engelman, D. M. & Sturgis, J. N. (1999). Detergents modulate dimerization, but not helicity, of the glycophorin A transmembrane domain. *J Mol Biol.* **293**: 639-651.
87. Arkin, I. T. (2002). Structural aspects of oligomerization taking place between the transmembrane α -helices of bitopic membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1565**: 347-363.
88. Zviling, M., Kochva, U. & Arkin, I. T. (2007). How important are transmembrane helices of bitopic membrane proteins? *Biochim Biophys Acta* **1768**: 387-392.
89. Gurezka, R. & Langosch, D. (2001). In vitro selection of membrane-spanning leucine zipper protein-protein interaction motifs using POSSYCCAT. *J Biol Chem.* **276**: 45580-45587.
90. Dawson, J. P., Weinger, J. S. & Engelman, D. M. (2002). Motifs of serine and threonine can drive association of transmembrane helices. *J Mol Biol.* **316**: 799-805.
91. Ridder, A., Skupjen, P., Unterreitmeier, S. & Langosch, D. (2005). Tryptophan Supports Interaction of Transmembrane Helices. *J Mol Biol.* **354**: 894-902.
92. Lindner, E., Unterreitmeier, S., Ridder, A. N. & Langosch, D. (2007). An extended ToxR POSSYCCAT system for positive and negative selection of self-interacting transmembrane domains. *J Microbiol Methods* **69**: 298-305.
93. Kolmar, H., Frisch, C., Kleemann, G., Gotze, K., Stevens, F. J. & 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.
94. Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York: 352-356.
95. Gurezka, R., Laage, R., Brosig, B. & 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.

-
96. Miller, V. L., Taylor, R. K. & Mekalanos, J. J. (1987). Cholera toxin transcriptional activator toxR is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* **48**: 271-279.
97. Skorupski, K. & Taylor, R. K. (1997). Control of the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli. *Mol Microbiol.* **25**: 1003-1009.
98. Crawford, J. A., Kaper, J. B. & DiRita, V. J. (1998). Analysis of ToxR-dependent transcription activation of ompU, the gene encoding a major envelope protein in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* **29**: 235-246.
99. Li, C. C., Crawford, J. A., DiRita, V. J. & Kaper, J. B. (2000). Molecular cloning and transcriptional regulation of ompT, a ToxR-repressed gene in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* **35**: 189-203.
100. Miller, V. L. & Mekalanos, J. J. (1984). Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by toxR. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 3471-3475.
101. Ottemann, K. M. & Mekalanos, J. J. (1996). The ToxR protein of *Vibrio cholerae* forms homodimers and heterodimers. *J Bacteriol.* **178**: 156-162.
102. Miller, V. L. & Mekalanos, J. J. (1988). A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol.* **170**: 2575-2583.
103. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
104. 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.
105. Duplay, P., Szmelcman, S., Bedouelle, H. & 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.

106. Liu, Y., Engelman, D. M. & Gerstein, M. (2002). Genomic analysis of membrane protein families: abundance and conserved motifs. *Genome Biol.* **3**: research0054. Epub 2002 Sep 0019.
107. Landolt-Marticorena, C., Williams, K. A., Deber, C. M. & Reithmeier, R. A. (1993). Non-random distribution of amino acids in the transmembrane segments of human type I single span membrane proteins. *J Mol Biol.* **229**: 602-608.
108. Choma, C., Gratkowski, H., Lear, J. D. & DeGrado, W. F. (2000). Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nat Struct Biol.* **7**: 161-166.
109. Zhou, F. X., Merianos, H. J., Brunger, A. T. & Engelman, D. M. (2001). Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 2250-2255.
110. Zhou, F. X., Cocco, M. J., Russ, W. P., Brunger, A. T. & Engelman, D. M. (2000). Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nat Struct Biol.* **7**: 154-160.
111. Gratkowski, H., Lear, J. D. & DeGrado, W. F. (2001). Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 880-885.
112. Adamian, L. & Liang, J. (2002). Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: polar clamps and serine zippers. *Proteins* **47**: 209-218.
113. Ruan, W., Lindner, E. & Langosch, D. (2004). The interface of a membrane-spanning leucine zipper mapped by asparagine-scanning mutagenesis. *Protein Sci.* **13**: 555-559.
114. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**: 557-580.
115. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
116. Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145.

-
117. Kunkel, T. A., Roberts, J. D. & Zakour, R. A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**: 367-382.
118. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
119. Ymer, S. (1991). Heat inactivation of DNA ligase prior to electroporation increases transformation efficiency. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6960.
120. Zhu, H. & Dean, R. A. (1999). A novel method for increasing the transformation efficiency of Escherichia coli-application for bacterial artificial chromosome library construction. *Nucleic Acids Res.* **27**: 910-911.
121. Unterreitmeier, S., Fuchs, A., Schäffler, T., Heym, R. G., Frishman, D. & Langosch, D. (2007). Phenylalanine Promotes Interaction of Transmembrane Domains via GxxxG Motifs. *J Mol Biol.* **374**: 705-718.
122. Kim, S., Jeon, T. J., Oberai, A., Yang, D., Schmidt, J. J. & Bowie, J. U. (2005). Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 14278-14283.
123. Senes, A., Engel, D. E. & DeGrado, W. F. (2004). Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol.* **14**: 465-479.
124. Orzaez, M., Salgado, J., Gimenez-Giner, A., Perez-Paya, E. & Mingarro, I. (2004). Influence of proline residues in transmembrane helix packing. *J Mol Biol.* **335**: 631-640.
125. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**: 1188-1190.
126. Cleverley, D. Z. & Lenard, J. (1998). The transmembrane domain in viral fusion: essential role for a conserved glycine residue in vesicular stomatitis virus G protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3425-3430.
127. Adamian, L., Jackups, R., Jr., Binkowski, T. A. & Liang, J. (2003). Higher-order interhelical spatial interactions in membrane proteins. *J Mol Biol.* **327**: 251-272.

128. Chakrabarty, S. R., Chaudhuri, K., Sen, K. & Das, J. (1996). Porins of *Vibrio cholerae*: purification and characterization of OmpU. *J Bacteriol.* **178**: 524-530.
129. Hecker, K. H. & Rill, R. L. (1998). Error analysis of chemically synthesized polynucleotides. *Biotechniques* **24**: 256-260.
130. Odegrip, R., Coomber, D., Eldridge, B., Hederer, R., Kuhlman, P. A., Ullman, C., FitzGerald, K. & McGregor, D. (2004). CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 2806-2810.
131. Palfrey, D., Picardo, M. & Hine, A. V. (2000). A new randomization assay reveals unexpected elements of sequence bias in model 'randomized' gene libraries: implications for biopanning. *Gene* **251**: 91-99.
132. Bairoch, A., Apweiler, R., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M. J., Natale, D. A., O'Donovan, C., Redaschi, N. & Yeh, L. S. (2005). The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* **33**: D154-159.
133. Adamian, L. & Liang, J. (2001). Helix-helix packing and interfacial pairwise interactions of residues in membrane proteins. *J Mol Biol.* **311**: 891-907.
134. Doms, R. W., Keller, D. S., Helenius, A. & Balch, W. E. (1987). Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly and transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers. *J Cell Biol.* **105**: 1957-1969.
135. de Silva, A., Braakman, I. & Helenius, A. (1993). Posttranslational folding of vesicular stomatitis virus G protein in the ER: involvement of noncovalent and covalent complexes. *J Cell Biol.* **120**: 647-655.
136. Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F. A. & Gaudin, Y. (2006). Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* **313**: 187-191.
137. Roche, S., Rey, F. A., Gaudin, Y. & Bressanelli, S. (2007). Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* **315**: 843-848.

138. Langosch, D., Hofmann, M. & Ungermann, C. (2007). The role of transmembrane domains in membrane fusion. *Cell Mol Life Sci.* **64**: 850-864.
139. Langosch, D., Brosig, B. & Pipkorn, R. (2001). Peptide mimics of the vesicular stomatitis virus G-protein transmembrane segment drive membrane fusion in vitro. *J Biol Chem.* **276**: 32016-32021.
140. Dennison, S. M., Greenfield, N., Lenard, J. & Lentz, B. R. (2002). VSV transmembrane domain (TMD) peptide promotes PEG-mediated fusion of liposomes in a conformationally sensitive fashion. *Biochemistry* **41**: 14925-14934.
141. Xu, Y., Zhang, F., Su, Z., McNew, J. A. & Shin, Y. K. (2005). Hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol.* **12**: 417-422.
142. Roy, R., Peplowska, K., Rohde, J., Ungermann, C. & Langosch, D. (2006). Role of the Vam3p Transmembrane Segment in Homodimerization and SNARE Complex Formation. *Biochemistry* **45**: 7654-7660.
143. Hofmann, M. W., Peplowska, K., Rohde, J., Poschner, B. C., Ungermann, C. & Langosch, D. (2006). Self-interaction of a SNARE transmembrane domain promotes the hemifusion-to-fusion transition. *J Mol Biol.* **364**: 1048-1060.
144. Burley, S. K. & Petsko, G. A. (1985). Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science* **229**: 23-28.
145. Singh, J. & Thornton, J. M. (1985). The interaction between phenylalanine rings in proteins. *FEBS Lett.* **191**: 1-6.
146. Hunter, C. A. & Sanders, J. K. M. (1990). The Nature of π - π Interactions. *J Am Chem Soc.* **112**: 5525-5534.
147. Hunter, C. A., Singh, J. & Thornton, J. M. (1991). π - π interactions: the geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins. *J Mol Biol.* **218**: 837-846.
148. McGaughey, G. B., Gagne, M. & Rappe, A. K. (1998). π -Stacking interactions. Alive and well in proteins. *J Biol Chem.* **273**: 15458-15463.

149. Brandl, M., Weiss, M. S., Jabs, A., Suhnel, J. & Hilgenfeld, R. (2001). C-H... π -interactions in proteins. *J Mol Biol.* **307**: 357-377.
150. Weiss, M. S., Brandl, M., Suhnel, J., Pal, D. & Hilgenfeld, R. (2001). More hydrogen bonds for the (structural) biologist. *Trends Biochem Sci.* **26**: 521-523.
151. Steiner, T. & Koellner, G. (2001). Hydrogen bonds with π -acceptors in proteins: frequencies and role in stabilizing local 3D structures. *J Mol Biol.* **305**: 535-557.
152. Andersson, I. (1996). Large structures at high resolution: the 1.6 Å crystal structure of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase complexed with 2-carboxy-arabinitol bisphosphate. *J Mol Biol.* **259**: 160-174.
153. Gray, T. M. & Matthews, B. W. (1984). Intrahelical hydrogen bonding of serine, threonine and cysteine residues within α -helices and its relevance to membrane-bound proteins. *J Mol Biol.* **175**: 75-81.
154. Chamberlain, A. K., Lee, Y., Kim, S. & Bowie, J. U. (2004). Snorkeling preferences foster an amino acid composition bias in transmembrane helices. *J Mol Biol.* **339**: 471-479.
155. Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K. & White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* **37**: 14713-14718.
156. Senes, A., Chadi, D. C., Law, P. B., Walters, R. F., Nanda, V. & Degrado, W. F. (2007). E_z , a Depth-dependent Potential for Assessing the Energies of Insertion of Amino Acid Side-chains into Membranes: Derivation and Applications to Determining the Orientation of Transmembrane and Interfacial Helices. *J Mol Biol.* **366**: 436-448.
157. Sal-Man, N., Gerber, D., Bloch, I. & Shai, Y. (2007). Specificity in transmembrane helix-helix interactions mediated by aromatic residues. *J Biol Chem.* **282**: 19753-19761.
158. Johnson, R. M., Hecht, K. & Deber, C. M. (2007). Aromatic and Cation- π Interactions Enhance Helix-Helix Association in a Membrane Environment. *Biochemistry* **46**: 9208-9214.

159. Dawson, J. P., Melnyk, R. A., Deber, C. M. & Engelman, D. M. (2003). Sequence context strongly modulates association of polar residues in transmembrane helices. *J Mol Biol.* **331**: 255-262.
160. Tourasse, N. J. & Li, W. H. (2000). Selective constraints, amino acid composition, and the rate of protein evolution. *Mol Biol Evol.* **17**: 656-664.
161. Kass, I. & Arkin, I. T. (2005). How pH opens a H⁺ channel: the gating mechanism of influenza A M2. *Structure* **13**: 1789-1798.
162. Hu, J., Fu, R., Nishimura, K., Zhang, L., Zhou, H. X., Busath, D. D., Vijayvergiya, V. & 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 USA* **103**: 6865-6870.
163. Sulistijo, E. S., Jaszewski, T. M. & 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.
164. 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., Maslennikov, I. V. & Arseniev, A. S. (2007). Unique dimeric structure of BNip3 transmembrane domain suggests membrane permeabilization as a cell death trigger. *J Biol Chem.* **282**: 16256-16266.
165. Metcalf, D. G., Law, P. B. & DeGrado, W. F. (2007). Mutagenesis data in the automated prediction of transmembrane helix dimers. *Proteins* **67**: 375-384.
166. Ash, W. L., Stockner, T., MacCallum, J. L. & Tieleman, D. P. (2004). Computer modeling of polyleucine-based coiled coil dimers in a realistic membrane environment: insight into helix-helix interactions in membrane proteins. *Biochemistry* **43**: 9050-9060.
167. Engelman, D. M. (2003). Electrostatic fasteners hold the T cell receptor-CD3 complex together. *Mol Cell.* **11**: 5-6.

-
168. Wimley, W. C., Gawrisch, K., Creamer, T. P. & White, S. H. (1996). Direct measurement of salt-bridge solvation energies using a peptide model system: implications for protein stability. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2985-2990.
169. Jayasinghe, S., Hristova, K. & White, S. H. (2001). Energetics, stability, and prediction of transmembrane helices. *J Mol Biol.* **312**: 927-934.
170. Zhang, L., Sato, Y., Hessa, T., von Heijne, G., Lee, J. K., Kodama, I., Sakaguchi, M. & Uozumi, N. (2007). Contribution of hydrophobic and electrostatic interactions to the membrane integration of the Shaker K⁺ channel voltage sensor domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 8263-8268.
171. Chin, C. N. & von Heijne, G. (2000). Charge pair interactions in a model transmembrane helix in the ER membrane. *J Mol Biol.* **303**: 1-5.
172. Honig, B. H. & Hubbell, W. L. (1984). Stability of "salt bridges" in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 5412-5416.
173. Call, M. E., Pyrdol, J., Wiedmann, M. & Wucherpfennig, K. W. (2002). The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* **111**: 967-979.
174. Guan, L. & Kaback, H. R. (2006). Lessons from lactose permease. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **35**: 67-91.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Repräsentative Strukturen von Membranproteinen.....	14
Abb. 2: Schematischer Überblick über das cotranslationale Targeting von Membranproteinen oder sekretorischen Proteinen zur eukaryotischen ER-Membran.....	16
Abb. 3: “Two-Stage”-Modell.....	19
Abb. 4: Packungsarten von Paaren interagierender α -helikaler TMDn.....	20
Abb. 5: Struktur des GpA TMD Dimers in Membranen.....	23
Abb. 6: Überblick über das in dieser Arbeit verwendete ToxR/POSSYCCAT-System.	26
Abb. 7: Überblick über die verwendeten Referenzkonstrukte.....	55
Abb. 8: Positivselektion verschiedener ToxR-Proteine durch Aktivierung des <i>ctx</i> -Promotors.....	56
Abb. 9: Positivselektion verschiedener ToxR-Proteine durch Aktivierung des <i>ompU</i> -Promotors.....	58
Abb. 10: Design der Bank SU1.....	59
Abb. 11: Design der Bank JP1.....	62
Abb. 12: Allgemeine An- oder Abreicherung von Aminosäuren in hochaffinen TMD-Sequenzen aus der Bank SU1.....	64
Abb. 13: Positionsspezifische An- oder Abreicherung von Aminosäuren in hochaffinen TMD-Sequenzen aus der Bank SU1.....	66
Abb. 14: Auftreten von GxxxG- und/oder Phe-haltigen Motiven in TMD-Sequenzen aus SU1 und ihre durchschnittlichen β -Gal-Aktivitäten.....	67
Abb. 15: Allgemeine An- oder Abreicherung von Aminosäuren in mittel- und hochaffinen TMD-Sequenzen aus der Bank JP1.....	69
Abb. 16: Positionsspezifisches Auftreten von Aminosäuren in mittel-/hochaffinen TMD-Sequenzen aus JP1.....	71
Abb. 17: Auftreten von GxxxG-Motiven in TMD-Sequenzen aus JP1 und ihre durchschnittlichen β -Gal-Aktivitäten.....	72
Abb. 18: Positionsspezifisches Auftreten von kleineren und mäßig polaren Aminosäuren in mittel-/hochaffinen TMD-Sequenzen aus JP1 mit bzw. ohne His an Position 6.....	73
Abb. 19: WebLogo-Darstellung der elf hochaffinen TMD-Sequenzen aus JP1 mit alternierend auftretenden, potentiell gegensätzlich geladenen Aminosäuren...	75
Abb. 20: Mutationsanalyse aus SU1 selektierter TMD-Sequenzen.....	77
Abb. 21: Verstärkte Interaktion aus SU1 selektierter TMDn mit GxxxG durch Phe sowie der TMD AZ2 durch FxxGxxxG.....	79
Abb. 22: Stabilisierung der GpA TMD-TMD-Interaktion durch Phe.....	81
Abb. 23: Mutationsanalyse der TMD-TMD-Interaktion von VSV-G.....	83
Abb. 24: Abhängigkeit der TMD-TMD-Interaktion vom Abstand von Phe zu GxxxG..	84
Abb. 25: Mutationsanalyse aus JP1 selektierter TMD-Sequenzen.....	86
Abb. 26: Bevorzugte π -Stacking-Geometrien aromatischer Aminosäureseitenketten....	95
Abb. 27: Exemplarische C_{α} -H... π -Wechselwirkung in einer α -Helix.....	96
Abb. 28: Struktur des BNIP3 TMD Dimers in Bicellen.....	100
Abb. I: Funktionelle Komplementation der Male-Defizienz von PD28-Zellen zur Kontrolle der korrekten Integration ($N_{\text{innen}} - C_{\text{außen}}$) der ToxR-Proteine in die bakterielle innere Membran.....	132

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Aus der Bank SU1 selektierte TMD-Sequenzen und ihre relativen β -Gal-Aktivitäten.....	61
Tab. 2:	TMD-Sequenzen aus der Bank JP1 und ihre relativen β -Gal-Aktivitäten....	63
Tab. 3:	Statistische Analyse der in einer nichtredundanten Datenbank bitopischer Membranproteine auftretenden Häufigkeiten von Motiven, die GxxxG und einen aromatischen Rest (Phe, Trp oder Tyr) in verschiedenen Abständen zueinander enthalten.....	92
Tab. I:	Aminosäurestatistik der randomisierten TMD-Positionen in der Bank SU1.	126
Tab. II:	Aminosäurestatistik der randomisierten TMD-Positionen in der Bank JP1..	127
Tab. III:	Absolute Aminosäureanzahlen an jeder randomisierten Position in nieder- und mittelaffinen TMD-Sequenzen aus der Bank SU1.....	128
Tab. IV:	Absolute Aminosäureanzahlen an jeder randomisierten Position in hochaffinen TMD-Sequenzen aus der Bank SU1.....	128
Tab. V:	Absolute Aminosäureanzahlen an jeder randomisierten Position in zufällig ausgewählten, nicht- und niederaffinen TMD-Sequenzen aus der Bank JP1.....	129
Tab. VI:	Absolute Aminosäureanzahlen an jeder randomisierten Position in mittel- und hochaffinen TMD-Sequenzen aus der Bank JP1.....	130
Tab. VII:	Mutationsanalyse isolierter Phe-Reste in hochaffinen TMDn aus SU1.....	131

Anhang

A. Tabellen

Tab. I: Aminosäurestatistik der randomisierten TMD-Positionen in der Bank SU1

Aminosäure	% bei Codierung durch DBB ¹	Anzahl an Resten in der Rohbank ²	% in der Rohbank	Anzahl an Resten in nieder- und mittelaffinen TMDn ³	% in nieder- und mittelaffinen TMDn	Anzahl an Resten in hochaffinen TMDn ⁴	% in hochaffinen TMDn	Verhältnis hochaffine/nieder- und mittelaffine TMDn
A	11,1	20	11,7	36	10,7	42	8,8	0,82
C	7,4	10	3,1	32	9,5	42	8,8	0,92
F	7,4	3	2,3	12	3,6	60	12,5	3,50
G	11,1	31	18,0	55	16,4	113	23,5	1,44
I	7,4	6	4,7	19	5,7	31	6,5	1,14
L	3,7	5	1,6	16	4,8	13	2,7	0,57
M	3,7	8	6,3	21	6,3	26	5,4	0,87
R	3,7	15	6,3	0	0	1	0,2	-
S	18,5	27	14,1	41	12,2	40	8,3	0,68
T	11,1	24	12,5	32	9,5	31	6,5	0,68
V	11,1	16	11,7	41	12,2	49	10,2	0,84
W	3,7	11	7,8	31	9,2	32	6,7	0,72

¹DBB = (A/G/T) (C/G/T) (C/G/T)

²geschätzt durch Sequenzierung von 22 zufällig aus der Rohbank ausgewählten Plasmiden

³geschätzt durch Sequenzierung von 42 nieder- und mittelaffinen TMDn

⁴geschätzt durch Sequenzierung von 60 hochaffinen TMDn

Tab. II: Aminosäurestatistik der randomisierten TMD-Positionen in der Bank JP1

Aminosäure bzw. Stopp	% bei Codierung durch NNB ¹	Anzahl an Resten in der Rohbank ²	% in der Rohbank	Anzahl an Resten in zufällig ausgewählten TMDn ³	% in zufällig ausgewählten TMDn	Anzahl an Resten in mittel- und hochaffinen TMDn ⁴	% in mittel- und hochaffinen TMDn	Verhältnis mittel- und hochaffine/ zufällig ausgewählte TMDn
A	6,3	12	7,1	17	9,6	37	8,9	0,92
C	4,2	3	1,8	8	4,5	15	3,6	0,79
D	4,2	18	10,7	5	2,8	12	2,9	1,02
E	2,1	4	2,9	4	2,3	9	2,2	0,95
F	4,2	2	1,2	3	1,7	11	2,6	1,55
G	6,3	29	17,3	33	18,8	88	21,2	1,13
H	4,2	1	0,6	2	1,1	23	5,5	4,87
I	4,2	2	1,2	7	4,0	22	5,3	1,33
K	2,1	8	4,8	4	2,3	4	1,0	0,42
L	8,3	3	1,8	9	5,1	30	7,2	1,41
M	2,1	5	3,0	2	1,1	7	1,7	1,48
N	4,2	8	4,8	7	4,0	15	3,6	0,91
P	6,3	8	4,8	7	4,0	2	0,5	0,12
Q	2,1	3	1,8	2	1,1	3	0,7	0,63
R	8,3	19	11,3	13	7,4	15	3,6	0,49
S	10,4	14	8,3	16	9,1	33	7,9	0,87
T	6,3	11	6,5	18	10,2	39	9,4	0,92
V	6,3	8	4,8	15	8,5	25	6,0	0,71
W	2,1	5	3,0	2	1,1	12	2,9	2,54
Y	4,2	2	1,2	2	1,1	14	3,4	2,96
Stopp	2,1	3	1,8	0	0	0	0	-

¹NNB = (A/C/G/T) (A/C/G/T) (C/G/T)

²geschätzt durch Sequenzierung von 21 zufällig aus der Rohbank ausgewählten Plasmiden

³geschätzt durch Sequenzierung von 22 zufällig ausgewählten, nicht- und niederaffinen TMDn

⁴geschätzt durch Sequenzierung von 52 mittel- und hochaffinen TMDn

Tab. III: Absolute Aminosäureanzahlen an jeder randomisierten Position in nieder- und mittelaaffinen TMD-Sequenzen aus der Bank SU1

Aminosäure	TMD-Position							
	2	5	6	8	9	12	13	16
A	2	9	7	3	5	3	3	4
C	6	3	6	6	2	3	4	2
F	4	1	3	0	2	1	0	1
G	7	4	5	5	9	3	18	4
I	2	1	2	2	1	3	3	5
L	2	3	1	2	3	3	1	1
M	3	1	2	3	1	6	2	3
R	0	0	0	0	0	0	0	0
S	2	7	5	5	11	3	3	5
T	4	4	5	5	0	8	1	5
V	6	4	2	7	3	5	3	11
W	4	5	4	4	5	4	4	1

Tab. IV: Absolute Aminosäureanzahlen an jeder randomisierten Position in hochaffinen TMD-Sequenzen aus der Bank SU1

Aminosäure	TMD-Position							
	2	5	6	8	9	12	13	16
A	8	5	9	3	5	3	3	6
C	6	11	5	6	4	1	5	4
F	4	22	8	2	10	3	6	5
G	5	6	4	27	18	30	15	8
I	10	2	8	0	1	4	2	4
L	3	1	3	2	3	0	0	1
M	3	2	3	3	2	2	7	4
R	0	0	0	0	0	0	0	1
S	2	1	6	4	6	2	13	6
T	1	1	1	1	5	6	3	13
V	13	3	7	10	3	3	5	5
W	5	6	6	2	3	6	1	3

Tab. V: Absolute Aminosäureanzahlen an jeder randomisierten Position in zufällig ausgewählten, nicht- und niederaffinen TMD-Sequenzen aus der Bank JP1

Aminosäure	TMD-Position							
	2	5	6	8	9	12	13	16
A	3	1	2	1	4	1	2	3
C	2	1	0	2	1	0	2	0
D	2	1	1	0	0	0	1	0
E	0	2	0	0	0	1	0	1
F	0	1	0	1	0	0	0	1
G	5	3	2	6	4	6	2	5
H	0	1	0	0	1	0	0	0
I	0	2	3	0	0	1	1	0
K	0	0	0	2	0	0	2	0
L	0	1	2	1	2	2	0	1
M	1	0	0	0	0	1	0	0
N	1	1	0	0	0	0	2	3
P	0	1	0	1	0	2	2	1
Q	0	0	1	1	0	0	0	0
R	5	0	3	2	2	0	0	1
S	3	0	2	1	5	3	1	1
T	0	4	3	2	1	3	4	1
V	0	3	2	1	1	2	3	3
W	0	0	0	0	1	0	0	1
Y	0	0	1	1	0	0	0	0

Tab. VI: Absolute Aminosäureanzahlen an jeder randomisierten Position in mittel- und hochaffinen TMD-Sequenzen aus der Bank JP1

Aminosäure	TMD-Position							
	2	5	6	8	9	12	13	16
A	3	5	0	10	4	6	5	4
C	2	2	1	2	2	4	1	1
D	1	4	2	3	2	0	0	0
E	0	3	0	3	0	2	1	0
F	2	1	4	0	1	2	1	0
G	8	11	2	6	12	10	33	6
H	0	1	19	0	0	1	2	0
I	5	1	0	1	4	3	0	8
K	1	1	1	0	0	1	0	0
L	1	4	0	2	7	5	0	11
M	0	0	0	1	2	0	1	3
N	1	3	4	0	0	3	4	0
P	0	1	0	0	0	0	0	1
Q	1	1	0	0	0	0	0	1
R	7	0	8	0	0	0	0	0
S	3	5	1	10	7	2	0	5
T	7	6	4	6	2	7	1	6
V	7	2	1	6	2	4	0	3
W	2	0	1	0	2	2	2	3
Y	1	1	4	2	5	0	1	0

Tab. VII: Mutationsanalyse isolierter Phe-Reste in hochaffinen TMDn aus SU1

TMD	Sequenz	β -Gal-Aktivität ¹		Expressionslevel der Mutante relativ zum Wt ²	Membranintegrationseffizienz der Mutante relativ zum Wt ³
		Wt	Mutante		
S45	.C..WC.CG..FM..G	1,8	3,5	+	0
S46	.C..CG.VT..WF..A	1,7	1,5	+	0
S57	.V..VS.TA..IF..T	2,1	1,8	0	-
S64	.S..AS.VG..FG.LM	2,3	2,4	0	0

¹durch parentale TMD (Wt) oder Mutante induzierte β -Gal-Aktivität exprimierender FHK12-Zellen relativ zu AZ2 (= 1,0) (mit 0,0025 % (w/v) L-Arabinose induziert; Mittelwerte \pm SD, n = 8-16 Datenpunkte)

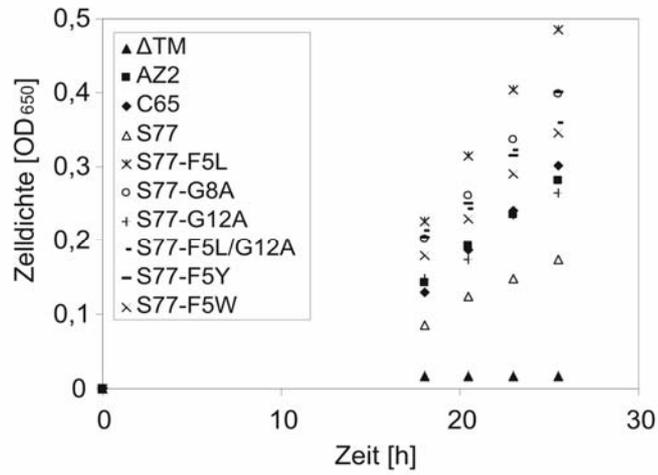
²Expressionslevel der Mutante relativ zur parentalen TMD (Wt) in exprimierenden FHK12-Zellen (0 = ähnlicher Expressionslevel, + = höherer Expressionslevel)

³Membranintegrationseffizienz der Mutante relativ zur parentalen TMD (Wt), gefolgt aus der funktionellen Komplementation der MalE-Defizienz in PD28-Zellen (0 = ähnliche Integrationseffizienz, - = geringere Integrationseffizienz)

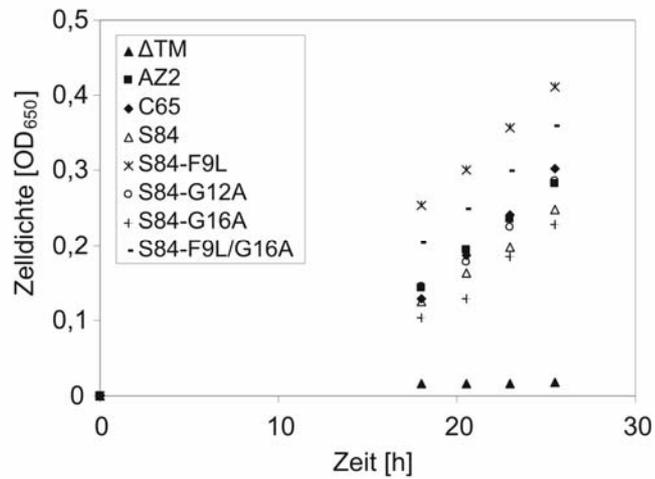
Nicht in F/(GxxxG)_n-Motive eingebettete Phenylalanine der parentalen TMDn (Wt), die in den entsprechenden Mutanten durch Leu ausgetauscht wurden, sind in weiß auf schwarzem Hintergrund gezeigt und invariante Reste als Punkte dargestellt. In der TMD S45 erhöht der Austausch von Phe durch Leu die β -Gal-Aktivität. Während die entsprechende Mutation in den TMDn S46 und S57 höchstens zu einer geringen Reduktion der β -Gal-Aktivität führt, hat sie in der TMD S64 keinen Einfluss auf die β -Gal-Aktivität. Zusammenfassend führt die Mutation isolierter Phe-Reste in diesen vier hochaffinen Sequenzen aus SU1 daher nicht zu signifikant verringerten β -Gal-Aktivitäten.

B. Abbildungen

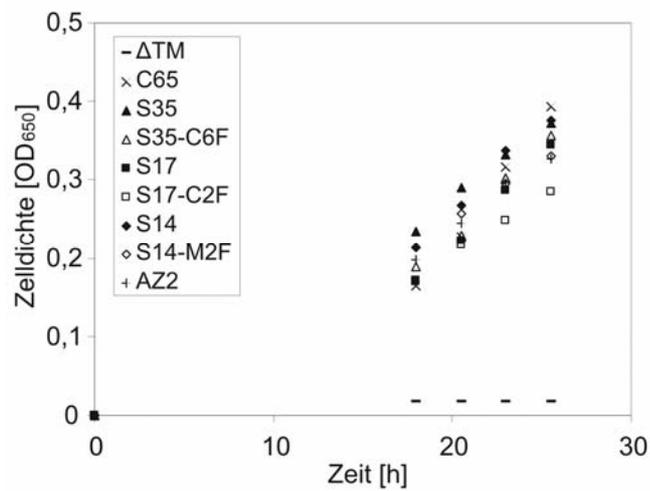
a)



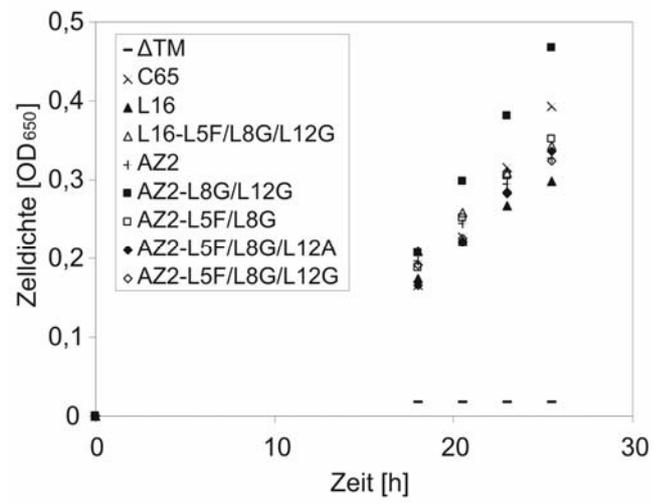
b)



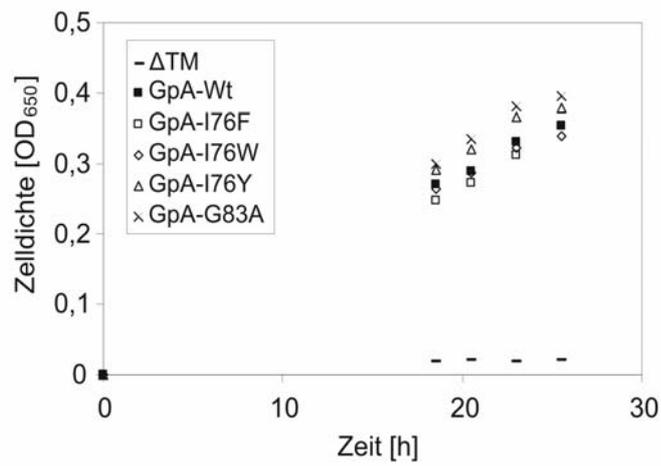
c)



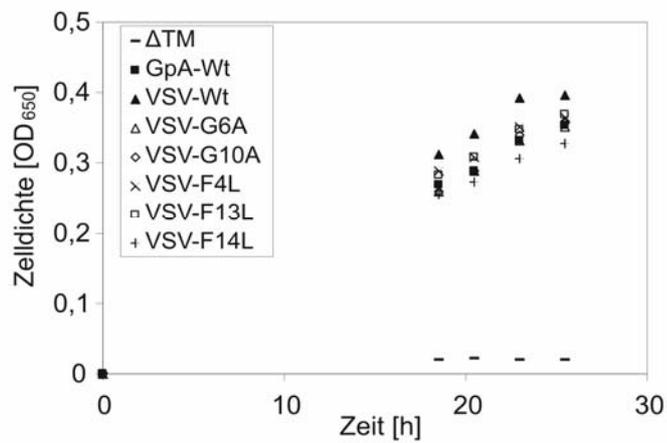
d)



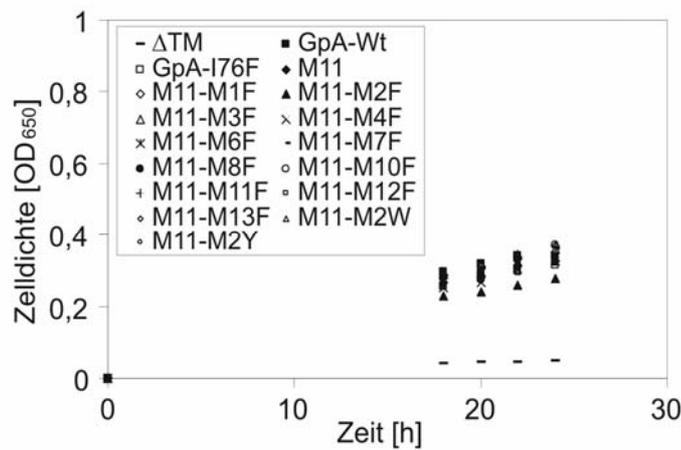
e)



f)



g)



h)

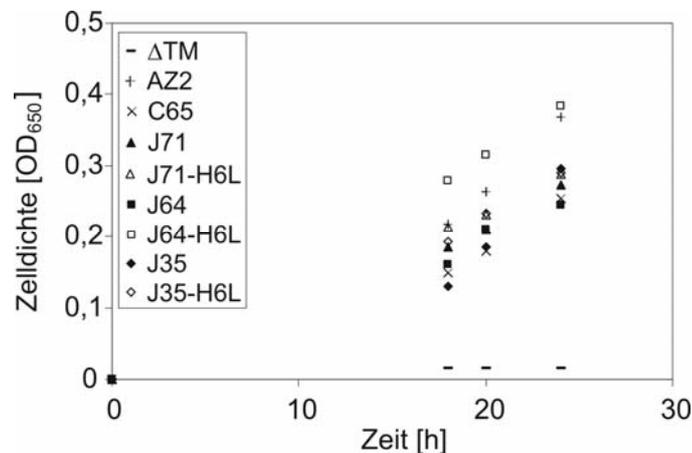


Abb. I: Funktionelle Komplementation der MalE-Defizienz von PD28-Zellen zur Kontrolle der korrekten Integration ($N_{\text{innen}} - C_{\text{außen}}$) der ToxR-Proteine in die bakterielle innere Membran. a) Typische Wachstumskinetiken von PD28-Zellen, die die TMD S77 oder Mutanten davon exprimieren. Als Vergleich dienen ein Konstrukt ohne TMD (Δ TM) und die TMDn AZ2 und C65. Zahlen stellen Mittelwerte aus drei Ansätzen dar. Mutanten förderten das Wachstum von PD28-Zellen mindestens so effizient wie das parentale Konstrukt. Dies bestätigt ihre effiziente Membranintegration und korrekte Orientierung. b) Wachstumskinetiken von PD28-Zellen, die die TMD S84 oder Mutanten davon exprimieren. Zahlen stellen Mittelwerte aus drei Ansätzen dar. Mutanten förderten das Wachstum von PD28-Zellen mindestens so effizient wie das parentale Konstrukt, was auf ihre korrekte Membraninsertion hinweist. Offensichtlich gehen affinitätsverringende Mutationen mit erhöhter Effizienz der Maltoseverwertung einher. Möglicherweise schränkt die enge räumliche Nähe der MalE-Domänen in den stark interagierenden parentalen Konstrukten S77 und S84 die Fähigkeit der Maltosehandhabung in den PD28-Zellen ein. c) Wachstumskinetiken von PD28-Zellen, die die TMDn S35, S17, S14 oder Mutanten davon exprimieren. Zahlen stellen Mittelwerte aus drei Ansätzen dar. Alle Konstrukte mit Ausnahme des Kontrollkonstrukts ohne TMD (Δ TM) ermöglichten ähnliche Wachstumsraten, woraus geschlossen werden kann, dass die Konzentrationen der parentalen Konstrukte und ihrer Mutanten in der bakteriellen inneren Membran ähnlich sind. d) Wachstumskinetiken von PD28-Zellen, die die TMDn L16, AZ2 oder Mutanten davon exprimieren. Zahlen stellen Mittelwerte aus drei Ansätzen dar. Mutanten förderten das Wachstum von PD28-Zellen mindestens so effizient wie die parentalen Konstrukte, was ihre korrekte Membraninsertion andeutet. e) Wachstumskinetiken von PD28-Zellen, die die GpA TMD (GpA-Wt) oder Mutanten davon exprimieren. Zahlen stellen Mittelwerte aus drei Ansätzen dar. Mit Ausnahme von Δ TM ermöglichten alle Konstrukte ähnliche Wachstumsraten der PD28-Zellen. Dies lässt auf

ähnlich effiziente Membranintegration der GpA TMD und ihrer Mutanten schließen. **f)** Wachstumskinetiken von PD28-Zellen, die die VSV-G TMD (VSV-Wt) oder Mutanten davon exprimieren. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle dient GpA-Wt bzw. Δ TM. Zahlen stellen Mittelwerte aus drei Ansätzen dar. Ähnliche Wachstumsraten der PD28-Zellen weisen auf ähnliche Membranintegrationseffizienzen der VSV-G TMD und ihrer Mutanten hin. **g)** Wachstumskinetiken von PD28-Zellen, die die TMD M11 oder Mutanten davon exprimieren. Als Vergleich dienen Δ TM, die GpA TMD und ihre Mutante I76F. Zahlen stellen Mittelwerte aus drei Ansätzen dar. Alle Konstrukte außer Δ TM ermöglichten ähnliche Wachstumsraten, was auf ähnliche Konzentrationen der parentalen Konstrukte und Mutanten in der bakteriellen inneren Membran schließen lässt. Offensichtlich verringert die Mutation M11-M2F, die die Affinität erhöht, die Effizienz der Maltoseverwertung in PD28-Zellen. Möglicherweise erschwert die enge räumliche Nähe der MalE-Domänen in diesem stark interagierenden Konstrukt die Maltosebindung oder die Interaktion mit dem Maltosetransporter. **h)** Wachstumskinetiken von PD28-Zellen, die die TMDn J71, J64, J35 oder Mutanten davon exprimieren. Zahlen stellen Mittelwerte aus zwei Ansätzen dar. Mutanten förderten das Wachstum von PD28-Zellen mindestens so effizient wie die parentalen Konstrukte, was ihre effiziente Membranintegration und korrekte Orientierung bestätigt.

Eigene Veröffentlichungen

Unterreitmeier, S., Fuchs, A., Schäffler, T., Heym, R. G., Frishman, D. & Langosch, D. (2007). Phenylalanine promotes interaction of transmembrane domains via GxxxG motifs. *J Mol Biol.* **374**: 705-718.

Lindner, E., Unterreitmeier, S., Ridder, A. N. & Langosch, D. (2007). An extended ToxR POSSYCCAT system for positive and negative selection of self-interacting transmembrane domains. *J Microbiol Methods* **69**: 298-305.

Ridder, A., Skupjen, P., Unterreitmeier, S. & Langosch, D. (2005). Tryptophan supports interaction of transmembrane helices. *J Mol Biol.* **354**: 894-902.

Unterreitmeier, S., Nachtkamp, M. & Berthe-Corti, L. (2003). Studies on the biosynthesis of wax esters by *Fundibacter jadensis* T9^T. Océanos III Milenio / II Congreso International de Ciencia y Tecnología Marina, Alicante, 22 a 26 de abril de 2003. – Alicante. – 2003. – ISBN 8497584651.

Nachtkamp, M., Unterreitmeier, S. & Berthe-Corti, L. (2003). Metabolism of *n*-alkane in cell-free systems of *Fundibacter jadensis* under oxic and anoxic conditions. Océanos III Milenio / II Congreso International de Ciencia y Tecnología Marina, Alicante, 22 a 26 de abril de 2003. – Alicante. – 2003. – ISBN 8497584651.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stephanie Ricarda Unterreitmeier
 Geburtsdatum/-ort: 17.11.1975, München
 Wohnsitz: Bruderhofstr. 46, 81371 München

Schulbildung

1982 – 1986: Grundschule Petershausen
 1986 – 1995: Schyren-Gymnasium Pfaffenhofen a. d. Ilm
 Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

1995 – 2003: Studium der Biologie an der LMU München und
 Carl v. Ossietzky-Universität Oldenburg
 Studienabschluss: Diplom
 Schwerpunkte: Mikrobiologie, Zellbiologie, Ökologie, Biochemie
 Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Biosynthese von Wachsestern in
Fundibacter jadensis“
 (AG Mikrobiologie, ICBM der Universität Oldenburg)
 seit März 2004: Promotion am Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere
 von Prof. Dr. D. Langosch, TU München
 seit 2001: Geprüfte Forschungstaucherin

Sonstige Tätigkeiten

März/April 1999: Ökologie, Nordsee-Projekt in Büsum, Universität Hamburg
 März – Juni 2000: Humangenetik und Molekulare Diagnostik, Zentrum für
 Humangenetik und Laboratoriumsmedizin in Martinsried
 Sept. – Dez. 2000: Instituto Euroamericano de Educação, Ciência e Tecnologia,
 Faculdade Euro-Americana; Empresa Brasileira de Pesquisa
 Agropecuária, Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília,
 Brasilien

Sprachkenntnisse: Englisch, Französisch, Latein; Grundkenntnisse Spanisch,
 Portugiesisch

Hobbys: Gleitschirmfliegen, Klettersteiggehen, Wandern, Tauchen, Skifahren,
 Aquaristik