

# Unilaterale Konserviertheit und homotypische Interaktion von Transmembranhelices im humanen bitopischen Membranproteom

Christian L. Ried



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

*Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt*

*Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere*

# Unilaterale Konserviertheit und homotypische Interaktion von Transmembranhelices im humanen bitopischen Membranproteom

Christian Lothar Ried

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dmitrij Frischman

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dieter Langosch
2. Univ.-Prof. Dr. Michael Groll
3. Univ.-Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 17.12.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 01.04.2014 angenommen.



*Für meine Mutter*

## Zusammenfassung

Membranproteine stellen einen beträchtlichen Teil des Proteoms. Die hydrophobe Natur ihrer Transmembrandomänen (TMDn) erschwert die Handhabung unter vielen experimentellen Bedingungen. Daher sind sie trotz ihrer Bedeutung für zelluläre Prozesse und als pharmazeutische Zielmoleküle im Vergleich zu löslichen Proteinen deutlich weniger verstanden. Trotzdem hat sich in den letzten Jahrzehnten herausgestellt, dass ihre TMDn verschiedene Aufgaben erfüllen und nicht nur der Verankerung in der Lipidmembran dienen. Selbst die kurze Transmembranhelix bitopischer Proteine ermöglicht nicht-kovalente Protein-Protein Interaktionen innerhalb der apolaren Umgebung der Membran. Die Vorhersage von Transmembran- (TM) Helix-Helix Interaktionen wird durch die geringe Anzahl der beteiligten Aminosäurereste und den Mangel an gelösten Molekülstrukturen nicht-kovalenter TMDn Komplexe erschwert.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die Fähigkeit zu TM Helix-Helix Interaktionen mittels evolutionärer Daten vorhersagen lässt. Es wurde angenommen, dass überdurchschnittlich konservierte Helixseiten putative Helix-Helix Kontaktflächen darstellen. Fast die Hälfte aller analysierten menschlichen bitopischen Proteine besitzt eine signifikante einseitige (unilaterale) Konserviertheit. Mit Hilfe des etablierten ToxR-Assays in *Escherichia coli* konnte gezeigt werden, dass es eine Korrelation zwischen unilateraler Konserviertheit und TMD Interaktion gibt. Durch diese systematische Analyse wurde erstmals eine Schätzung der an TM Helix-Helix Interaktionen beteiligten TMDn ermöglicht. Dies ist von grundlegender Bedeutung für die zukünftige gezielte Untersuchung bislang unbekannter TMDn Wechselwirkungen.

Im Zuge der Untersuchungen wurden bisher unbekannte homotypisch interagierende TMDn identifiziert. Die stärkste homotypische Wechselwirkung dieser neuen Kandidaten zeigte die TMD des menschlichen Sulfhydroxidase 2 (QSOX2) Proteins. Eine Mutationsanalyse zeigte, dass die Aminosäurereste  $Y_{668}xxSSxxLMxxY_{679}$  für die Interaktion notwendig sind. In dieser Arbeit durchgeführte MD Simulationen legen nahe, dass die QSOX2 TMD nicht-kovalente Dimere bildet. Experimentell konnte gezeigt werden, dass das Dimer zusätzlich durch eine Disulfidbrücke innerhalb der Lipidmembran stabilisiert werden kann. Dies setzt eine Topologie des Typs I wie im natürlichen QSOX2 Protein voraus. Bioinformatische Analysen deuten darauf hin, dass möglicherweise eine Vielzahl von Plasmamembranproteinen derart quervernetzt werden. Dass nicht-kovalente Wech-

selwirkungen die Spezifität der kovalenten Vernetzung von TMDn sicherstellen, könnte ein neues generelles Prinzip darstellen.

Bestehende Methoden untersuchen TM Helix-Helix Interaktionen *in vitro* im Beisein von Detergenzien oder *in cellula* im Rahmen von Fusionsproteinen, die relativ zum Ursprungsprotein häufig eine invertierte Topologie besitzen. Um dies zu umgehen, wurde in dieser Arbeit ein neuer Assay auf Basis der Fluoreszenzanisotropie entwickelt. TMDn werden dabei im Rahmen eines fluoreszierenden Fusionsproteins mit Typ I Topologie in *E. coli* exprimiert. Die TMD-vermittelte Oligomerisierung ermöglicht die strahlungsfreie Übertragung von Energie zwischen gleichartigen Fluorophoren (homo-FRET). Dies verursacht eine Depolarisation des emittierten Lichts. Die Methode wurde anhand von TMD Sequenzen mit bekanntem Oligomerisierungsgrad validiert. Im Gegensatz zu bestehenden Methoden ist hiermit sowohl der Nachweis von TM Helix-Helix Interaktionen als auch die Bestimmung der Stöchiometrie und des Monomer-Oligomer Verhältnisses *in cellula* möglich. Die Methode kann in multi-well Platten durchgeführt werden und eignet sich daher für den Einsatz im Hochdurchsatzverfahren.

## Summary

Membrane proteins constitute a significant part of the proteome. The hydrophobic nature of their transmembrane domains (TMDs) makes them difficult to handle during many experimental procedures. As a result, they are less understood than soluble proteins, despite their importance in cellular processes and as pharmaceutical targets. Although many details remain unknown, in the past decades it has become clear that their TMDs serve a number of roles beyond their function as anchors to the lipid membrane. Even the short transmembrane helices of single-pass (bitopic) membrane proteins allow for non-covalent protein-protein interactions in the apolar environment of the membrane. Prediction of TM helix-helix interactions is hampered by the low number of amino acid residues involved and the lack of available structures derived from such non-covalent complexes.

In this study, predictability of the propensity for TM helix-helix interactions was tested using evolutionary data. It was assumed that high conservation on one particular side of a TM helix signifies a putative helix-helix interface. In an analysis of all human bitopic proteins, almost half of them possessed a transmembrane helix with significant one-sided (unilateral) conservation. Using the established ToxR-assay in *Escherichia coli*, it could be shown that unilateral conservation is correlated to TMD interaction. For the first time, this systematic analysis gives an estimate of the number of TMDs taking part in TM helix-helix interactions. This is of fundamental importance for future targeted studies of previously unknown TMD interactions.

In the course of this analysis, novel homotypically interacting TMDs were identified. The TMD of the human sulfhydryl oxidase 2 (QSOX2) protein exhibited the strongest interaction of the new candidates. A mutation analysis revealed amino acids  $Y_{668}xxSSxxLMxxY_{679}$  to be necessary for the interaction. MD simulations performed here suggest the QSOX2 TMD forms non-covalent dimers. It could be shown experimentally that dimers can be further stabilized via an intramembraneous disulfide bond. A prerequisite is a type I topology as found in the natural QSOX2 protein. Bioinformatical analysis revealed numerous plasma membrane proteins potentially being crosslinked in a similar manner. The specific covalent crosslinking of TMDs in the membrane as guided by non-covalent interactions might represent a new general principle.

Current methods to measure TM helix-helix interactions require detergents for *in vitro* assays or frequently use fusion proteins with inverted topology relative to the original protein for assays *in*



*cellula*. To solve these problems, in this study a new assay based on fluorescence anisotropy was developed. TMDs are expressed in *E. coli* as part of a fluorescent fusion protein with type I topology. TMD-mediated oligomerization allows for radiation-free energy transfer between identical fluorophores (homo-FRET). This results in a measurable depolarisation of emitted light. The assay was validated using TMDs with a known degree of oligomerization. In contrast to existing methods, this allows for detection of TM helix-helix interactions as well as stoichiometry and monomer-oligomer ratio *in cellula*. This assay is compatible with multi-well plates, and could therefore be used for high-throughput screening.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>II</b>
<b>Summary</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Lipidmembranen . . . . .	1
1.2. Membranproteine . . . . .	3
1.2.1. Entstehung und Struktur . . . . .	4
1.2.2. Selbstinteragierende TMDn . . . . .	6
1.2.3. Nachweis von TM Helix-Helix Interaktionen . . . . .	11
1.3. homo-FRET . . . . .	13
<b>2. Ziel der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1. Mikrobiologische Methoden . . . . .	19
3.1.1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> Zellen . . . . .	19
3.1.2. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen . . . . .	20
3.1.3. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen . . . . .	20
3.2. Molekularbiologische Methoden . . . . .	21
3.2.1. Präparation von Plasmiden aus <i>E. coli</i> . . . . .	21
3.2.2. Restriktionsendonukleaseverdau . . . . .	22
3.2.3. Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	22
3.2.4. DNA Extraktion aus Agarose-Gelen . . . . .	22
3.2.5. Ligation von DNA Fragmenten . . . . .	23
3.2.6. Herstellung der <i>ToxR-TMD-MalE</i> Konstrukten . . . . .	23
3.2.7. Herstellung der <i>MalE-TMD-sfGFP</i> Konstrukte . . . . .	25
3.2.8. Herstellung weiterer Mutanten . . . . .	27
3.2.9. Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	30

3.3.	Protein- und Immunochemische Methoden . . . . .	31
3.3.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	31
3.3.2.	Western-Blotting und Immundetektion . . . . .	33
3.4.	Analyse selbstinteragierender Transmembrandomänen . . . . .	34
3.4.1.	Selbstinteraktion (ToxR-Assay) . . . . .	34
3.4.2.	Membraninteraktion (PD28-Assay) . . . . .	34
3.4.3.	Fluoreszenzanisotropie . . . . .	35
3.5.	Bioinformatische Methoden . . . . .	37
3.5.1.	Sequenzdaten . . . . .	37
3.5.2.	Konserviertheitsmoment . . . . .	38
3.5.3.	Positionsabhängige Aminosäurehäufigkeiten . . . . .	38
3.5.4.	Moleküldynamiksimulation . . . . .	39
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
4.1.	Unilaterale Konserviertheit von Transmembranhelices bitopischer Proteine . . . . .	43
4.1.1.	Häufigkeit im Proteom von <i>H. sapiens</i> . . . . .	43
4.1.2.	Zusammenhang mit homotypischer Interaktionsfähigkeit . . . . .	47
4.1.3.	Chemische Eigenschaften konservierter und nicht-konservierter Helixseiten . . . . .	51
4.2.	Homotypische Interaktion der QSOX2 TMD . . . . .	57
4.2.1.	Mutationsanalyse . . . . .	57
4.2.2.	Putative Struktur . . . . .	59
4.3.	Verwendung von homo-FRET als neue Nachweismethode . . . . .	69
4.3.1.	Design des Assays . . . . .	71
4.3.2.	Lokalisation und Topologie des homo-FRET Fusionsproteins . . . . .	72
4.3.3.	Messung und Datenauswertung . . . . .	75
4.3.4.	Bestimmung des Oligomerisierungsgrads . . . . .	78
4.3.5.	Kovalente Dimerisierung der QSOX2 TMD . . . . .	83
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>86</b>
5.1.	Unilateral konservierte TM-Helices bitopischer Proteine . . . . .	87
5.1.1.	Häufigkeit im Proteom von <i>H. sapiens</i> . . . . .	87
5.1.2.	Chemische Eigenschaften konservierter TM Helixseiten . . . . .	88
5.1.3.	Homotypische Wechselwirkungen <i>in cellula</i> . . . . .	91
5.2.	Homotypische Interaktion der Sulphydryloxidase 2 TMD . . . . .	93
5.2.1.	Struktur des Oligomers . . . . .	93
5.2.2.	Grundlagen der Interaktion . . . . .	94

5.2.3. Funktion der TMD-Wechselwirkung . . . . .	95
5.3. Nachweis TMD-vermittelter Oligomerisierung durch Fluoreszenzanisotropie . . . . .	101
5.3.1. Design des Fusionsproteins . . . . .	101
5.3.2. Oligomerisierung führt zu homo-FRET . . . . .	104
5.3.3. Einfluss posttranslational translozierter Proteine . . . . .	105
5.3.4. Bestimmung der Oligomerstruktur . . . . .	109
5.4. Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	110
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>136</b>
A.1. DNA Sequenzen . . . . .	136
A.1.1. sfGFP Gensynthese . . . . .	136
A.1.2. <i>malE</i> -TMD-sfGFP Vektor . . . . .	137
A.2. homo-FRET . . . . .	142
A.3. MD Simulationen . . . . .	143
A.3.1. Vorbereitung . . . . .	143
A.3.2. Auswertung . . . . .	146
<b>Danksagung</b>	<b>156</b>
<b>Publikationen</b>	<b>157</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>158</b>

# 1. Einleitung

Im vergangenen Jahrhundert hat die Bedeutung der Forschung auf molekularer Ebene in der Biologie stetig zugenommen. Technologischer Fortschritt wie beispielsweise Hochdurchsatzverfahren haben die Entwicklung verschiedener sogenannter „-omik“ Bereiche wie etwa „Genomik“ und „Proteomik“ beflügelt. Dabei stellte sich u.a. heraus, dass die apparente Komplexität von Organismen nicht gut mit der Anzahl ihrer Gene korreliert. Beispielsweise unterscheiden sich der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und der Mensch (*Homo sapiens*) nur wenig in der Anzahl ihrer Gene<sup>[1,2]</sup>. In *Eukaryota* tragen Phänomene wie das alternative Splicen der mRNA<sup>[3]</sup> und verschiedene posttranslationale Veränderungen der Proteine<sup>[4]</sup> zu einer erhöhten Diversität des Proteoms bei. Allerdings spiegelt sich die Komplexität der Organismen deutlich besser in der Größe ihres Interaktoms, der Gesamtheit aller Wechselwirkungen in einer Zelle, wider. Das Interaktom von *H. sapiens* ist mit etwa 650000 Protein-Protein Interaktionen (PPIs) dreimal so groß wie das von *C. elegans*<sup>[5]</sup>. Existierende Techniken zur Bestimmung von PPIs sind häufig auf die Analyse löslicher Protein beschränkt. Entsprechend ist über die Interaktion zwischen Membranproteinen vergleichsweise wenig bekannt. Im folgenden wird ein zusammenfassender Überblick der Besonderheiten biologischer Lipidmembranen und der in ihr befindlichen Membranproteine gegeben. Damit wird ersichtlich, warum diese bisher deutlich weniger untersucht wurden. Ihre bedeutende Rolle für alle Organismen motiviert die Fragestellung dieser Arbeit.

## 1.1. Lipidmembranen

Noch vor Entdeckung der Zellmembran wurden Phänomene beobachtet, welche auf die Eigenschaften eine Lipidmembran zurückzuführen sind. Im Jahr 1748 wurde zunächst die Existenz semipermeabler Membranen gezeigt<sup>[6]</sup>. Diese sind nur für bestimmte Moleküle durchlässig. Im ursprünglichen Experiment wurde eine Zylinder mit Ethanol gefüllt, mit einer Schweinsblase verschlossen und in Wasser getaucht. Wasser strömte durch die Schweinsblase in den Zylinder, wohingegen das Ethanol nicht austreten konnte. Dadurch erhöhten sich Volumen und Druck im Zylinder, sodass sich die Schweinsblase ausdehnte. Diese makroskopischen Effekte wurden 1773 mit Hilfe eines Mikroskops auch an Zellen beobachtet<sup>[7]</sup>. Dabei wurden Erythrozyten in unterschiedlichen Lösungen inkubiert, wodurch diese schrumpften oder anschwellten und im Extremfall sogar platzten. Daraus konnte ge-

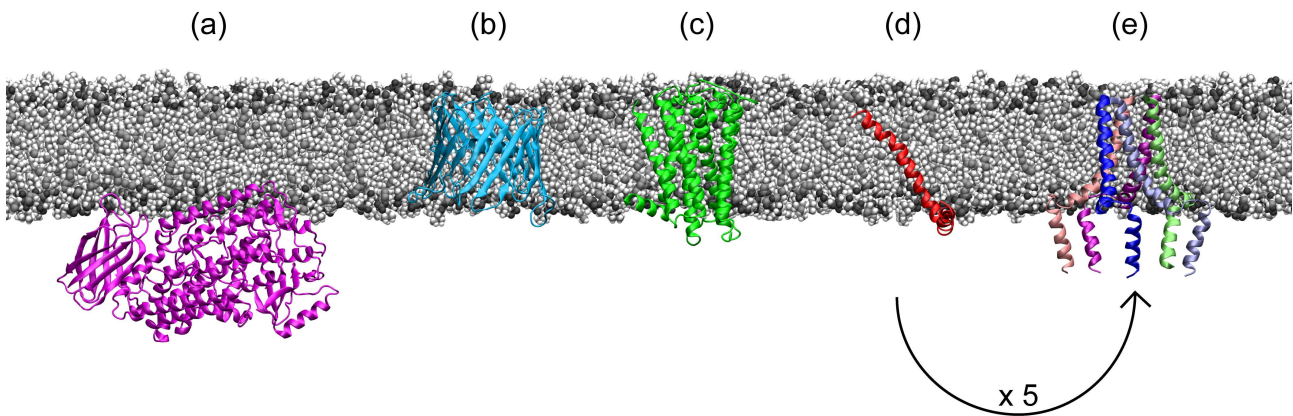
schlussfolgert werden, dass es sich bei diesen Zellen um flüssigkeitsgefüllte Vesikel handeln muss. Ähnliche Experimente wurden 1855 an Pflanzenzellen durchgeführt<sup>[8]</sup>. 1828 wurde der Einstrom von Wasser in eine mit einer semipermeablen Membran verschlossenen Messkammer als Endosmose, der Ausstrom als Exosmose definiert<sup>[9]</sup>. Dazu wurde nicht nur das „Endosmometer“ als Hilfsmittel zum Quantifizieren der Osmose konstruiert, sondern gleichzeitig die Vermutung aufgestellt, dass dieses Phänomen von entscheidender Bedeutung für Lebewesen im Allgemeinen sei. In den 1890er Jahren wurde die Zellpermeabilität hunderter Moleküle systematisch untersucht. Diese Experimente verdeutlichten, dass nicht ihre Größe, sondern ihr Öl-Wasser Verteilungskoeffizient die dafür maßgebliche Eigenschaft ist<sup>[10-12]</sup>. Dies legte nahe, dass die Barriere, welche die Zelle zur Umgebung hin abgrenzt, Lipid-artig oder Lipid-haltig sein muss. 1925 wurde erstmals die Dicke der Zellmembran von Erythrozyten mittels Messung ihrer elektrischen Kapazität bestimmt<sup>[13]</sup>. Unter der Annahme einer Öl-ähnlichen Beschaffenheit ging man damals von einer Dicke von 33 Å aus. Ebenfalls im Jahr 1925 erkannten man, dass die Lipidmenge, die durch organische Lösungsmittel aus Erythrozyten extrahierbar ist, ausreicht, um eine doppelt so große Oberfläche zu bedecken<sup>[14]</sup>. Daraus schloss man, dass es sich bei der Zellmembran um eine Lipiddoppelschicht handelt. Heute geht man von einer hydrophoben Kernregion aus Acylketten mit einer Dicke von 30 Å und zwei polaren Grenzregionen aus den Kopfgruppen der Lipide von je 15 Å zu beiden Seiten aus<sup>[15]</sup>.

Elektronenmikroskopische Studien führten letztlich zum Modell der Einheitsmembran. Die Zellmembranen aller lebenden Organismen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, deren extrazelluläre Seite mit Kohlenhydraten dekoriert ist<sup>[16,17]</sup>. Auf welche Weise Membran-assoziierte Proteine an oder in der Einheitsmembran verankert sind, wurde erst später geklärt. 1970 konnte gezeigt werden, dass Membranproteine sich lateral in der Membran bewegen können. Dazu wurden Zellen fusioniert, welche unterschiedliche Antigenen auf ihrer Oberfläche exponierten. Bei den Antigenen handelte es sich um Plasmamembranproteine, die sich nach der Fusion der Zellen gleichmäßig auf ihrer Oberfläche verteilten und so ihre Mobilität demonstrierten<sup>[18]</sup>. Unter anderem auf dieser Grundlage wurde 1972 das Flüssig-Mosaik-Modell postuliert, dem zufolge „Membranen zweidimensionale Lösungen gerichteter Lipide und globulärer Proteine“ sind<sup>[19]</sup>. Die wenigen Proteine schwimmen in diesem Modell quasi in einem Meer aus Lipiden, wobei sich sowohl Proteine als auch Lipide prinzipiell frei lateral bewegen können. Außerdem erkannte man 1972, dass die Lipidverteilung zwischen exoplasmatischer und endoplasmatischer Hälfte der Lipiddoppelschicht asymmetrisch ist<sup>[20]</sup>. Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) kommen vornehmlich in der exoplasmatischen, Phosphatidylserin (PS) und -ethanolamin (PE) hingegen eher auf der endoplasmatischen Hälfte vor. Später wurden einige Proteine identifiziert, die (mehr oder weniger spezifisch) Lipide von einer in die andere Membranschicht transportieren und die asymmetrische Verteilung der Membranlipide ermöglichen. Dazu gehören sogenannte Flippasen<sup>[21,22]</sup>, Floppasen<sup>[23]</sup> und Scramblasen<sup>[24]</sup>.

Mittlerweile ist die Vorstellung vom Aufbau zellulärer Membranen im Sinne des Flüssig-Mosaik-Modells überholt. Membranproteine kommen in so hoher Konzentration vor, dass sie nicht unabhängig voneinander in der Lipidmembran schwimmen. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die Membranlipide sich teilweise entmischen und so Mikrodomänen entstehen, die man „Lipid Rafts“ nennt<sup>[25,26]</sup>. Wahrscheinlich ist auch die Proteinzusammensetzung zwischen Mikrodomänen unterschiedlich, was möglicherweise auf Wechselwirkungen von Transmembrandomänen mit den jeweiligen Lipiden beruht<sup>[27,28]</sup>.

## 1.2. Membranproteine

Reine Lipidmembranen sind für die meisten Moleküle undurchlässig. Dies bedeutet allerdings, dass z.B. Nährstoffe nicht in eine Zelle aufgenommen, oder Stoffwechselendprodukte nicht abgegeben werden könnten. Auch der Austausch von Informationen (z.B. über Umgebungsbedingungen) wäre nicht möglich. Membranproteine dienen u.a. dazu, die Lipidmembran selektiv zu permeabilisieren oder Informationen weiterzuleiten. Insgesamt 20–30% des Proteoms sind Membranproteine<sup>[29]</sup>. Sie werden anhand ihrer Topologie und der Sekundärstruktur ihrer Transmembrandomänen (TMDn) klassifiziert. Proteine, welche mit der Lipidmembran assoziiert sind, diese aber nicht durchqueren, werden als monotopische Membranproteine bezeichnet (s. Abb. 1.1a). Sie interagieren mit den Lipidkopfgruppen oder inserieren nur in eine Hälfte der Doppelmembran. Bei den meisten Membranproteinen handelt es sich hingegen um polytopische Proteine. Sie durchqueren die Membran mehr als einmal und besitzen somit mindestens zwei TMDn. Man unterscheidet zwischen  $\beta$ -Fass (engl.  $\beta$ -Barrel, s. Abb. 1.1b) Strukturen aus mehreren  $\beta$ -Faltblattsträngen und  $\alpha$ -helikalen Membranproteinen (s. Abb. 1.1c). Dass sich ausschließlich diese beiden Strukturen finden lassen, liegt daran, dass der Transfer einer Peptidbindung von Wasser in die apolare Lipidmembran 25 kJ/mol an Energie erfordert, falls ihre Wasserstoffbrücken nicht gesättigt sind. Ist dies hingegen der Fall, müssen nur noch 2,4 kJ/mol aufgewendet werden<sup>[30]</sup>. Sowohl eine  $\alpha$ -Helix als auch die  $\beta$ -Stränge eines  $\beta$ -Fass Proteins befriedigen die Wasserstoffbindungen des Peptidrückgrates, weshalb diese Sekundärstrukturen für die Integration in die Membran energetisch am günstigsten sind. Proteine, die die Lipidmembran nur ein einziges mal durchqueren, werden als bitopische Proteine bezeichnet (s. Abb. 1.1d). Mangels weiterer TMDn zum gegenseitigen Sättigen der Wasserstoffbindungen des Peptidrückgrates besitzen sie immer eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur. Mit zunehmender Komplexität der Organismen steigt der Anteil bitopischer Proteine am Membranproteom von etwa 15% in *Bacteria*, auf 30–40% in niederen bzw. 40% in höheren *Eukaryota*<sup>[31]</sup>.



**Abbildung 1.1.:** Lokalisation und Struktur von Membranproteinen. Die Strukturen verschiedener Membranproteine sind in einer Lipidmembran aus Dioleoylphosphatidylcholin (Phosphatreste: schwarz, Wasserstoff: weiß, sonstige Atome: grau) dargestellt. **(a)** Monotopische Membranproteine durchqueren die Lipidmembran nicht. Sie sind mit der Kopfgruppenregion der Membran assoziiert und manche inserieren auch hydrophobe Aminosäuren in den apolaren Teil der Membranhälfte (dargestellte Proteinstruktur: Arachidonat 15-Lipoxygenase aus *Oryctolagus cuniculus*; PDB ID: 2p0m, Ref.<sup>[32]</sup>). **(b)** Polytopische  $\beta$ -Fass Membranproteine durchqueren die Lipidmembran mehrmals. Dabei sättigen räumlich benachbarte  $\beta$ -Stränge gegenseitig ihre Wasserstoffbrückendonatoren bzw. -akzeptoren.  $\beta$ -Fass Membranproteine kommen häufig in Prokaryoten und (wie durch die Endosymbiontentheorie<sup>[33]</sup> zu erwarten) in den Mitochondrien und Plastiden eukaryotischer Zellen vor („Voltage-dependent anion channel“ der äußeren Mitochondrienmembran aus *Homo sapiens*; PDB ID: 2jk4, Ref.<sup>[34]</sup>). **(c)** Die meisten eukaryotischen Membranproteine sind polytopisch und besitzen  $\alpha$ -helikale TMDn. Die Wasserstoffbrücken des Peptidrückgrates werden lokal durch Interaktion des Aminosäurerestes an Position  $i$  mit den Resten an Position  $i \pm 3/4$  abgesättigt (Histamin H1 Rezeptor aus *H. sapiens*; PDB ID: 3rze, Ref.<sup>[35]</sup>, Struktur modifiziert). **(d)** Viele eukaryotische Proteine sind bitopisch, d.h. sie durchqueren die Lipidmembran nur einmal. Die TMD ist dadurch zwangsweise immer  $\alpha$ -helikal (Phospholamban Monomer aus *Sus scrofa*; PDB ID: 1fjk, Ref.<sup>[36]</sup>). **(e)** Membranproteine können nicht-kovalente Komplexe bilden. Die Interaktion kann durch plasmatische Domänen der Proteine erfolgen oder wie in diesem Fall durch Wechselwirkungen zwischen den TM Helices (Phospholamban Pentamer aus *H. sapiens*; PDB ID: 1zll, Ref.<sup>[37]</sup>).

### 1.2.1. Entstehung und Struktur

#### Biogenese in *Eukaryota*

In *Eukaryota* findet die Synthese der meisten Membranproteine am Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt<sup>[38,39]</sup>. Bereits kurz nach Beginn der Synthese eines Membranproteins an einem freien Ribosom wird dessen N-Terminus im Cytosol zugänglich. Der N-Terminus des wachsenden Polypeptids enthält eine Signalsequenz, an die ein „signal recognition particle“ (SRP) genanntes Protein bindet<sup>[40]</sup>. Die Translation wird dadurch bis auf weiteres pausiert<sup>[41]</sup>. Der Komplex aus Ribosom, wachsender Polypeptidkette und SRP bindet an einen SRP Rezeptor auf der Oberfläche der ER Membran und wird an einen als Translocon bezeichneten Proteinkomplex weitergegeben<sup>[42]</sup>. In *Mammalia* besteht das Translocon aus  $Sec61\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , sowie TRAM und weiteren Proteinen<sup>[43,44]</sup>. Die wachsende Polypeptidkette wird in den Transloconkanal geführt, der einen Durchgang zum ER Lumen ermöglicht. Die Translation wird fortgesetzt, bis das Ribosom ein Stopp-Codon auf der mRNA erreicht. Das neu synthetisierte Polypeptid wird dabei kotranslational allein durch die Aktivität des Ribosoms transloziert<sup>[45]</sup>.



### Biogenese in *Bacteria*

In *Bacteria* werden Membranproteine direkt in die Plasmamembran integriert. Da Translation und Translokation von sekretorischen Proteinen in *Bacteria* nicht strikt gekoppelt sind<sup>[46]</sup>, werden diese zunächst an freien Ribosomen im Cytosol translatiert. Die meisten werden mittels des SecYEG Proteinkomplexes in die Membran eingefügt, der homolog zum Sec61 $\alpha\beta\gamma$  Komplex in *Eukaryota* ist<sup>[47,48]</sup>. Auch hier gibt es ein SRP, welches die Signalsequenz vieler entstehender Proteine bindet und das translatierende Ribosom zum Translocon rekrutiert. Die Tätigkeit des Ribosoms reicht dabei meistens aus, das neue Protein durch den Transloconkanal zu schieben<sup>[49]</sup>. Proteine, die während der Synthese nicht mit dem SRP interagieren, werden meist durch ein Chaperon namens SecB in einem ungefalteten Zustand gehalten<sup>[50]</sup>. SecB interagiert mit dem SecA Motorprotein, welches unter Verbrauch von ATP und durch Energie aus dem Protonengradienten zwischen extra- und intrazellulärem Raum das zu transportierende Protein in den Transloconkanal führt<sup>[51,52]</sup>. Ein alternativer Weg zur Proteintranslokation ist das „twin-arginine translocation“ (TAT) System, das sich u.a. durch zwei konservierte Argininreste in den Signalpeptiden seiner Substrate auszeichnet<sup>[53]</sup>. Eine Besonderheit ist, dass bereits gefaltete Proteine transportiert werden<sup>[54,55]</sup>. Viele nehmen zunächst einen Kofaktor im Cytoplasma auf und werden erst dann durch das TAT-System transloziert<sup>[56,57]</sup>. Dies wäre mit Hilfe des Translokons nicht möglich, da die Proteine dazu ungefaltete vorliegen müssen und daher keine Kofaktoren kotransloziert werden können.

### Eigenschaften $\alpha$ -helikaler Transmembrandomänen

Eine  $\alpha$ -helikale TMD besteht meist aus 20–24 Aminosäureresten<sup>[58,59]</sup>. Passend zur apolaren Umgebung im Kern einer Lipidmembran bestehen sie zu großem Teil aus hydrophoben Aminosäuren wie Leu, Val und Ile<sup>[60]</sup>. Es wird angenommen, dass sich Helices bereits im Ausgangskanal des Ribosoms<sup>[61]</sup>, spätestens aber im Kanal des Translocons<sup>[62]</sup> bilden. Die hydrophoben TMDn treten anschließend lateral aus dem Translocon aus und werden in die Lipidmembran entlassen<sup>[63–65]</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die Hydrophobizität für die Erkennung der TMDn als solche durch das Translocon verantwortlich ist<sup>[66]</sup>. Wahrscheinlich ist der Prozess der Membranintegration von TMDn auch kinetisch kontrolliert. Zwar ist die Hydrophobizität des Segmentes notwendig für eine Integration in das apolare Milieu der Lipidmembran, die Erkennung von TMDn wird allerdings durch die Verweildauer desselben im Translocon beeinflusst<sup>[67,68]</sup>. Hydrophobe Proteinabschnitte passieren das Translocon langsamer als der Rest des Proteins, wodurch die Wahrscheinlichkeit der Integration in die Membran deutlich ansteigt<sup>[69]</sup>.

Liegt der N-Terminus eines bitopischen Membranproteins im exoplasmatischen Raum, handelt es sich um ein Typ I Membranprotein. Im umgekehrten Fall (N-Terminus im plasmatischen Raum) wird von einem Typ II Membranprotein gesprochen. Über die Topologie des finalen Membranproteins entscheiden verschiedene Faktoren. Das Signalpeptid, welches das Ribosom zum Translocon dirigiert,

kann durch Signalpeptidasen entfernt werden<sup>[70]</sup>. Der neue N-Terminus des wachsenden Polypeptids befindet sich danach im ER Lumen. Manche Signalpeptide bleiben hingegen erhalten und stellen die erste TMD des Proteins. Derartige Signalsequenzen werden als Signalankersequenz bezeichnet und der N-Terminus befindet sich dadurch im Cytosol. Außerdem beeinflussen flankierende geladene Aminosäurereste die Orientierung in der eine TMD integriert wird. Normalerweise gilt hier die „positive-inside“ Regel, da positive Ladungen deutlich häufiger in cytosolischen Domänen zu finden sind<sup>[71–74]</sup>. Dabei spielt vermutlich die Interaktion des translozierten Proteins mit bestimmten Lipiden eine Rolle<sup>[75]</sup>. Darüber hinaus haben auch die Gesamthydrophobizität, die Verteilung der Hydrophobizität entlang der TMD und die Länge der TMD einen Einfluss<sup>[76,77]</sup>.

### 1.2.2. Selbstinteragierende TMDn

Proteine führen die unterschiedlichsten Funktionen innerhalb und außerhalb von Zellen aus. Sie katalysieren chemische Reaktionen (Enzyme), transportieren Atome oder Moleküle, dienen als Sensoren für chemische und physikalische Parameter, geben Informationen weiter und vieles mehr. Viele dieser Funktionen erfordern den physischen Kontakt mit anderen Proteinen. Hieraus resultieren komplexe metabolische und regulatorische Netzwerke. Im Proteom von *Saccharomyces cerevisiae* besitzt jedes Protein im Durchschnitt fünf andere Proteine als Interaktionspartner<sup>[78]</sup>. Hierbei wurden allerdings keine homotypischen Interaktionen berücksichtigt, da diese mit den dabei verwendeten Methoden wie „Yeast Two-Hybrid“ oder Repressorfusionen nur schwer zu messen sind<sup>[79]</sup>. Dementsprechend liegt die Zahl der Interaktionspartner pro Protein in Wahrheit noch höher. Die Auswertung weiterer Netzwerke aus Protein-Protein Interaktionen zeigt, dass signifikant mehr Proteine Homodimere bzw. -oligomere bilden, als per Zufall zu erwarten sind<sup>[80,81]</sup>. Auf Basis von theoretischen Überlegungen und Simulationen wird angenommen, dass sich Kontaktflächen zur Homodimerisierung mit höherer Wahrscheinlichkeit spontan bilden, als dies der Fall für eine Heterodimerisierung ist<sup>[82]</sup>. Häufig lassen sich heterodimere Proteine auf ein früher homodimeres Protein zurückführen, dessen Gen dupliziert wurde. Anschließend haben sich die Proteine divergent entwickelt, wobei die zur Dimerisierung notwendigen Kontaktflächen sich sukzessiv veränderten<sup>[80–82]</sup>.

#### Vorteile durch Homooligomerisierung

Viele lösliche Proteine bestehen aus mehreren Domänen unterschiedlicher Funktion. Diese entstehen meist durch Rekombination von Genen, wodurch Teile von vormals eigenständigen Proteinen in einer Polypeptidkette kovalent zusammengefasst werden. Auf diese Weise können Proteine mit neuen Eigenschaften entstehen<sup>[83]</sup>. Während die kovalente Rekombination von Domänen zwar häufig in löslichen Proteinen nachweisbar ist, wurde dies nur sehr selten im Fall von Membranproteinen beobachtet<sup>[84]</sup>. Die meisten Membranproteine bilden nicht-kovalente Komplexe und kombinieren auf diese Weise mehrere Domänen<sup>[85]</sup>. Eine größere Struktur, wie einen Proteinkomplex, aus kleinen

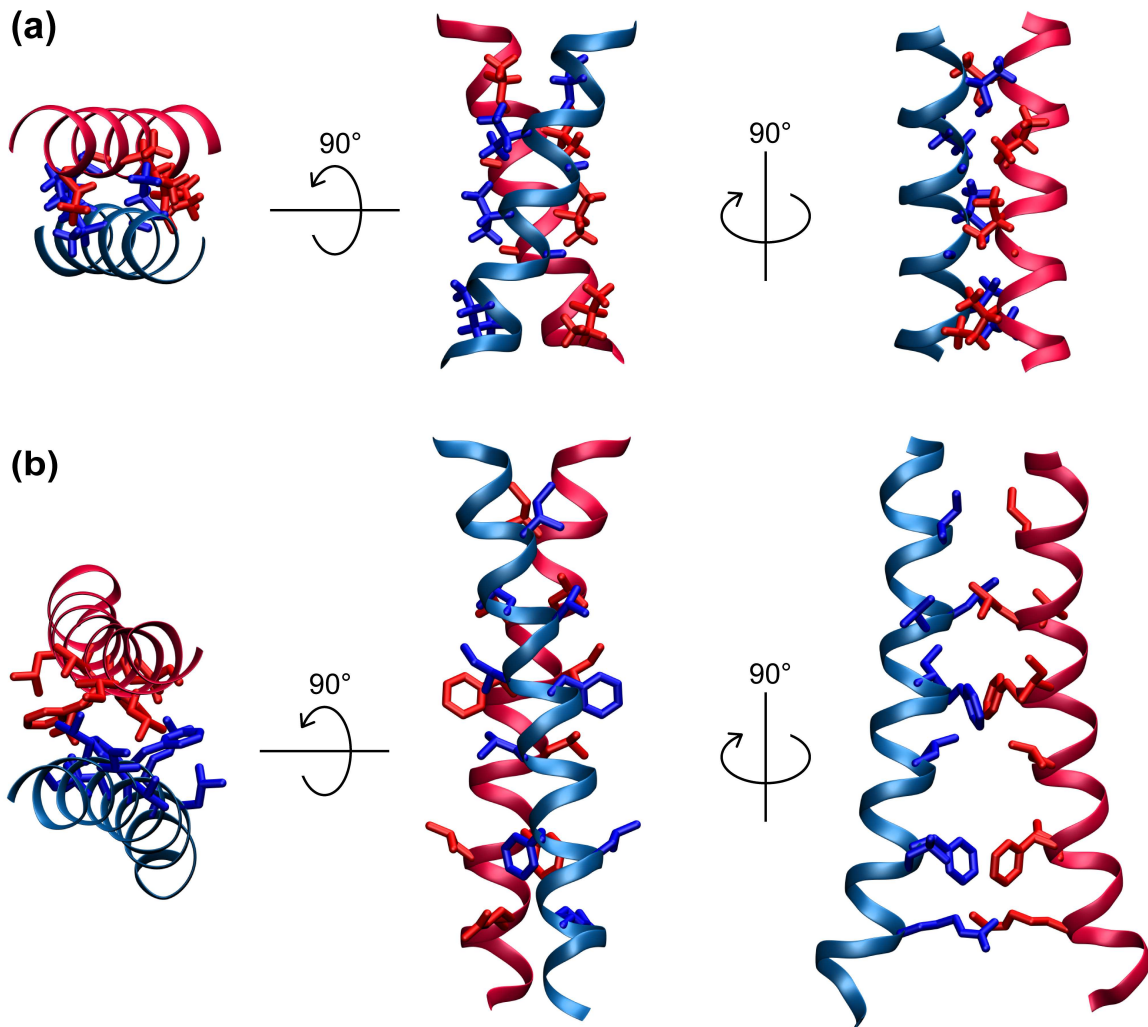
identischen Einheiten aufzubauen hat mehrere Vorteile: (I) Es muss weniger genetische Information gespeichert werden. (II) Fehler während der Translation, vor allem die vorzeitige Termination, nehmen mit wachsender Proteingröße in ihrer Häufigkeit zu. Entsprechend sind kleine Proteine davon weniger betroffen. Fehlsynthetisierte Proteine können durch funktionsfähige Einheiten ersetzt werden. (III) Die Funktion des Komplexes lässt sich leicht (mittels Allosterie oder multivalentem Binden) modulieren<sup>[86,87]</sup>.

### Oligomerisierung von Membranproteinen

Membranproteine können auf zwei Wegen nicht-kovalente Komplexe bilden. Zum Einen können sie analog zu löslichen Proteinen mittels ihrer Extramembrandomänen interagieren. Zum Anderen können ihre Transmembrandomänen miteinander wechselwirken. Letzteres wurde zuerst an humanem Glycophorin A (GpA), einem bitopischen Plasmamembranprotein aus Erythrozyten, nachgewiesen<sup>[88]</sup>. Eine Besonderheit der GpA TMD ist, dass sich Dimere auch in SDS Mizellen bilden können und sogar während der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese stabil bleiben<sup>[89]</sup>. Ein weiteres frühes Beispiel für Wechselwirkungen zwischen TMDn ist das polytopische Membranprotein Bakteriorhodopsin (bRh) aus *Halobacterium halobium*. Es besitzt sieben  $\alpha$ -helikale TMDn<sup>[90]</sup> und benötigt als Kofaktor Retinal, um als lichtabhängige Protonenpumpe zu fungieren<sup>[91]</sup>. Nur korrekt gefaltetes bRh, welches zudem Retinal gebunden hat, kann Protonen translozieren. Trennt man das Protein mit Chymotrypsin in zwei Fragmente zu je zwei bzw. fünf TMDn, können diese reassoziieren und einen funktionsfähigen Komplex bilden<sup>[92]</sup>. Beide Beispiele zeigen, dass TM Helix-Helix Interaktionen sowohl intra-, als auch intermolekular auftreten und eine hinreichende Stärke und Spezifität besitzen.

### TMD Dimerstrukturen

Im Fall von TMDn mit  $\alpha$ -helikaler Sekundärstruktur sind benachbarte Aminosäurereste in einem Winkel von etwa  $100^\circ$  relativ zur Helixachse versetzt. Bei der Interaktion zweier TM Helices können somit nur die Reste teilnehmen, welche auf der dem Interaktionspartner zugewandten Seite zu liegen kommen. Die relevanten Reste sind daher in der Regel in einem Heptaden- oder Tetradenmotiv angeordnet. Die Periodizität des Motivs bestimmt dabei den Verlauf der Interaktionsfläche entlang der Helixoberfläche. Heptadenmotive führen meist zu linksgängigen Dimeren (Kreuzungswinkel  $\Omega > 0$ )<sup>[93]</sup>, Tetradenmotive hingegen meist zu rechtsgängigen Dimeren (Kreuzungswinkel  $\Omega < 0$ )<sup>[94]</sup>. Tetradenmotive weisen in der Regel eine Oberflächenkomplementarität auf, die als „ridges-into-grooves“ bezeichnet wird<sup>[94,95]</sup>. Hierbei bilden die Aminosäurereste der Kontaktfläche Grate („ridges“), welche in die Furchen („grooves“) zwischen den Graten auf der Partnerhelix greifen und *vice versa*. Im Falle von Heptadenmotiven tritt häufig eine Komplementarität in der Form von „knobs-into-holes“ auf<sup>[93,96]</sup>. Dabei bilden die Aminosäurereste Noppen („knobs“), die in die Räume zwischen den Noppen („holes“) der Partnerhelix greifen und *vice versa*. Ein Bei-



**Abbildung 1.2.:** Tetraden- und Heptadenmotive führen zu zwei Arten von homodimeren TMD Komplexen. (a) Ein Tetradenmotiv führt meist zu einem rechtsgängigen Dimer (Kreuzungswinkel  $\Omega < 0$ ), wie hier am Beispiel der GpA TMD (PDB ID: 2kpf, modifiziert) gezeigt ist. Die Helices berühren sich nur in einem kurzen Abschnitt, wie im Text beschrieben ist dafür die Packung der beteiligten Aminosäurereste in Form einer „ridges-into-grooves“ Oberflächenkomplementarität hingegen sehr dicht. (b) Ein Heptadenmotiv resultiert häufig in linksgängigen Dimeren (Kreuzungswinkel  $\Omega > 0$ ) wie hier am Beispiel der ErbB3 TMD (PDB ID: 2I9u, modifiziert) deutlich wird. Die Helices berühren sich auf einem langen Abschnitt und zeigen, wie im Text beschrieben, meist eine „knobs-into-holes“ Oberflächenkomplementarität.

spiel für ein Tetradenmotiv, das zu einem rechtsgängigen Dimer führt, ist die Kontaktfläche von GpA ( $L_{75}I_{xx}GV_{xx}GV_{xx}T_{87}$ )<sup>[97-99]</sup> (s. Abb. 1.2a). Das Heptadenmotiv in der TMD des ErbB3 Proteins ( $I_{49}xxLV_{x}IF_{xx}L_{xxx}FL_{xx}R_{67}$ ) führt hingegen zu einem linksgängigen Dimer<sup>[100]</sup> (s. Abb. 1.2b). Grundsätzlich erlauben positive Kreuzungswinkel längere Kontaktflächen<sup>[101]</sup>.

### Grundlagen der TMD Interaktion

Mittlerweile sind viele Beispiele für Membranproteine mit  $\alpha$ -helikalen TMDn bekannt, die sequenzspezifisch mittels ihrer TMDn oligomerisieren (s. z.B. Ref.<sup>[85,102,103]</sup>). Aus der Analyse solcher TM Helix-Helix Interaktionen konnten die grundlegenden Wechselwirkungen, welche dabei eine Rolle spielen, identifiziert werden. Während lösliche Proteine in einem dreidimensionalen Raum vorliegen und dadurch große translatorische und rotatorische Freiheit besitzen, sind Membranproteine

in einer Lipidmembran verankert. Diese stellt ein anisotropes Medium dar, das die translatorischen Bewegungen der Proteine auf einen zweidimensionalen Raum beschränkt und Rotation fast ausschließlich entlang des Membrannormals zulässt. Die Proteine sind dadurch vor-orientiert, wodurch Helix-Helix Interaktionen nur zu geringem Entropieverlust des Peptidrückgrates führen. Außerdem steigt die apparente Konzentration der Proteine durch die Beschränkung auf ein zweidimensionales Medium. Wahrscheinlich wird dies durch einen „Crowding“ Effekt aufgrund der hohen Dichte an Membranproteinen noch verstärkt<sup>[104]</sup>. Da die Lipidmembran ein apolares Medium darstellt, bestehen TMDn zum größten Teil aus hydrophoben Aminosäuren, welche sich zu einer  $\alpha$ -Helix strukturieren (s. oben). Durch die vorgeformten Helices und den Umstand, dass die Seitenketten der am häufigsten auftretenden Aminosäurereste in  $\alpha$ -Helices keine (Gly, Ala), nur ein (Val, Ile) bzw. zwei (Leu) bevorzugte Rotamer(e) besitzen, kommt es lediglich zu einem geringen Entropieverlust bei TMD-TMD Interaktionen<sup>[105,106]</sup>. Gleichzeitig nimmt die durch Lipide zu solvatisierende Oberfläche der TMDn ab. Ein Teil der zuvor an die TMDn grenzenden und daher in ihrer Freiheit eingeschränkten Lipide wird in den ungeordneten „Bulk“ entlassen, was entropisch günstig ist<sup>[107]</sup>. Im Gegensatz zu löslichen Proteinen hat der hydrophobe Effekt aufgrund der ohnehin apolaren Umgebungen kaum oder keine Bedeutung für Membranproteine<sup>[94,106]</sup>.

Für spezifische Wechselwirkungen zwischen zwei TMDn sind in der Regel Oberflächenkomplementarität und eine möglichst dichte Packung der Aminosäureseitenketten erforderlich. Dies zeigt sich vor allem daran, dass schon ein einzelner Aminosäureaustausch wie Gly $\rightarrow$ Ala (etwa die GpA G83A Mutante) eine Interaktion unterbinden kann<sup>[108]</sup>. Gerade kleine Aminosäuren wie Gly, Ala und Ser (G/A/S) sind häufig in den Interaktionsflächen von TM Helices zu finden. Das GxxxG Motiv ist z.B. das am stärksten überrepräsentierte Motiv aus zwei Aminosäuren in TMDn<sup>[58]</sup>. Kleine Aminosäurereste wie Gly fördern die Oligomerisierung von TM Helices, indem sie eine sehr flache Oberfläche ermöglichen<sup>[105]</sup>. Dadurch können sich die Partnerhelices sehr nahe kommen, was die Packung des Dimers verbessert und so die intermolekularen van-der-Waals Wechselwirkungen verstärkt<sup>[109]</sup>. Generell spielen letztere eine wichtige Rolle in der Oligomerisierung der größtenteils aus apolaren Aminosäureresten bestehenden TMDn. Obwohl die Interaktionen jeweils recht schwach sind, summieren sie sich über die beteiligten Reste auf<sup>[110,111]</sup>. Beim bRh Protein wird dies besonders deutlich. Die Stabilität des Proteins hängt zwar wie erwartet von den Seitenketten der TM Helices ab, allerdings gibt es eine starke Korrelation zwischen Proteinstabilität und Oberfläche der Seitenkette. Da dies gleichermaßen für polare und apolare Seitenketten zutrifft, scheinen van-der-Waals Wechselwirkungen hier zu dominieren<sup>[112]</sup>.

G/A/SxxxG/A/S-Motive werden auffällig häufig von  $\beta$ -verzweigten Resten wie Leu oder Ile flankiert<sup>[58]</sup>. Die Seitenketten von Resten in der Helix-Helix Kontaktfläche werden durch die Oligomerisierung in ihrer rotatorischen Freiheit eingeschränkt. Je mehr Rotamere eine Aminosäuresei-

tenkette besitzt, desto höher ist der Entropieverlust. Wie bereits oben angedeutet, besitzen kleine  $\beta$ -verzweigte Aminosäuren keine oder nur wenige alternative rotamere Zustände, wodurch der Entropieverlust durch Oligomerisierung vergleichsweise gering ausfällt<sup>[105]</sup>. Interessanter Weise kann die Packung zweier Helices aufgrund des GxxxG Motivs so dicht sein, dass zusätzlich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen H-C $_{\alpha}$ -Atomen und Carbonylgruppen der Partnerhelices möglich sind<sup>[113]</sup>. Im Falle der GpA TMD wären theoretisch sechs solcher Bindungen möglich, allerdings sind diese mit durchschnittlich jeweils 0,88 kcal/mol relativ schwach<sup>[114]</sup>.

Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Seitenketten von TM Helices sind hingegen vergleichsweise stark. Dies liegt vor allem daran, dass die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  innerhalb der apolaren Lipidmembran sehr niedrig ist. Vom unbehinderten Wasser, über die Kopfgruppenregion der Lipide bis zum Kern der Lipidmembran fällt  $\epsilon$  von 80 auf 18 und letztlich 2 ab<sup>[15,115]</sup>. Die Seitenketten polarer Reste wie Ser, Thr, Asn, Gln oder Cys ermöglichen intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen<sup>[116–123]</sup>. Einzeln sind sie nicht stark genug, um eine stabile Oligomerisierung zu ermöglichen<sup>[122]</sup>. Mehrere können hingegen ein Netzwerk derartiger Interaktionen bilden, welches für ausreichende Stabilität sorgt<sup>[124]</sup>. Im Zusammenspiel mit anderen Interaktionen können auch einzelne polare Reste für die Stabilität nicht-kovalenter Komplexe entscheidend sein<sup>[125]</sup>.

Auch ionische Wechselwirkungen werden bei kleinem  $\epsilon$  deutlich stärker. TMDn mit geladenen Resten wurden aus teilrandomisierten Bibliotheken aufgrund ihrer hohen homo- und heterotypischer Affinität isoliert<sup>[126]</sup>. Auch in natürlichen TMDn wie beispielsweise in Untereinheiten des T-Zellen Rezeptors spielen ionisierbare Aminosäurereste eine Rolle<sup>[127]</sup>. Der Transfer geladener Reste von einer wässrigen Umgebung in die apolare Membran ist energetisch sehr ungünstig. Die Integration der ungeladenen Form der Seitenketten oder eines Paares aus gegensätzlich geladenen Resten wäre hingegen deutlich günstiger<sup>[128]</sup>. Es gibt Hinweise, dass beide Fälle vorkommen. Die Mutation A391E im FGFR3 Protein führt zu einer konstitutiven Homodimerisierung des Proteins. Da kein Aminosäurerest mit entgegengesetzter Ladung vorkommt, liegt die Vermutung nahe, dass hier eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Glu Seitenketten der Partnerhelices eine Rolle spielt<sup>[129]</sup>. Im Fall der selbstinteragierenden TMDn aus Ref.<sup>[126]</sup> wurden meist Paare von Aminosäureresten mit entgegengesetzter Ladung gefunden. Hier konnte gezeigt werden, dass der Abstand dieser Paare zueinander relevant ist und Punktmutationen zu Resten mit entgegengesetzter Ladung die Interaktion verhindern. Beides spricht dafür, dass ionisierbare Reste Wasserstoffbrückenbindungen oder ionische Interaktionen in der Membran eingehen können.

Die aromatischen Aminosäuren Tyr, Trp und Phe sind sehr vielseitig in ihren Wechselwirkungen. Zum einen können sie untereinander mittels  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen interagieren, wobei vermutlich elektrostatische als auch van-der-Waals Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Zusätzlich sind auch Kation- $\pi$  Interaktionen mit basischen Resten möglich<sup>[130,131]</sup>. Außerdem können Tyr durch sei-

ne Hydroxylgruppe und Trp durch seine Aminogruppe prinzipiell an Wasserstoffbrückenbindungen teilnehmen.

Noch nicht gänzlich verstanden sind spezifische Interaktionen zwischen Membranlipiden und TMDn. Beispielsweise bildet bRh Trimere, benötigt dazu allerdings sechs Lipide im Zentrum der Struktur<sup>[132]</sup>. In ähnlicher Weise bindet die Formiatdehydrogenase-N aus *E. coli* in ihrer trimeren Form drei Cardiolipin Moleküle<sup>[133]</sup>. In Abwesenheit von Cardiolipin verliert die bovine Cytochrom C Oxidase zwei Untereinheiten<sup>[134]</sup> und zwischen der L und M Untereinheit des photosynthetischen Reaktionszentrums aus *Rhodobacter sphaeroides* ist ein Phosphatidylcholin Molekül eingeschlossen<sup>[135]</sup>, welches außerdem wichtig für die Funktion des Komplexes ist<sup>[136]</sup>. Sogar die Dimerisierung der gut untersuchten GpA TMD wird durch Lipidkonzentration, Membrandicke, Cholesterolgehalt und Temperatur beeinflusst<sup>[137]</sup>. Die Spezifität und funktionelle Bedeutung solcher Wechselwirkungen zeigt sich am deutlichsten im Fall der Bindung von Sphingomyelin an das p24 Protein. Diese Interaktion ist sequenzspezifisch und erfolgt über das Motiv VxxTLxxIY. Die Bindung des Lipids führt zur Dimerisierung der TMD<sup>[138]</sup>.

### 1.2.3. Nachweis von TM Helix-Helix Interaktionen

Um die homo- oder heterotypische Interaktion von TM Helices zu bestimmen, können unterschiedliche Methoden eingesetzt werden. Die ersten Beobachtungen homotypisch interagierender TMDn wurden mit Hilfe der SDS-PAGE Mitte der 1970er Jahre anhand der GpA TMD gemacht<sup>[139]</sup>. Heute wird sie als robuster Nachweis oder gar im Hochdrucksatzverfahren<sup>[140]</sup> eingesetzt. Dabei wird ausgenutzt, dass manche TMDn auch in membranmimetischen Umgebungen wie (SDS-)Detergenzmizellen interagieren können. Das Oligomer migriert deutlich langsamer als das Monomer, wodurch (idealer Weise) eine zusätzliche Bande bei einem Vielfachen des apparenten Molekulargewichts eines Monomers zu finden ist. Auf diese Weise kann häufig auch die korrekte Anzahl an Untereinheiten des Komplexes bestimmt werden. Nachteile dieser Methode sind, dass eine starke Interaktion und hohe Proteinkonzentrationen vorhanden sein müssen und viele TMDn nicht in SDS-Mizellen oligomerisieren. Außerdem lassen sich Affinitäten unterschiedlicher TMDn nur schlecht vergleichen. Alternativ zur SDS-PAGE kann auch eine Gelfiltration eingesetzt werden<sup>[139]</sup>. Analog zur verringerten Mobilität des Oligomers im Polyacrylamidgel wird die Retention der Komplexe in der chromatographischen Säule analysiert. Auch hier müssen die TMDn durch Detergenzien solubilisiert werden und die Laufpuffer ausreichende Menge desselben bereitstellen, damit die Proteine nicht ausfallen. Eine sehr sensible Methode zum Nachweis von TMD Interaktionen stellt die analytische Ultrazentrifugation dar<sup>[116]</sup>. Die Affinität und auch Oligomerstruktur kann hier anhand des Sedimentationskoeffizienten von solubiliserten TM Helices bestimmt werden. Der Vergleich von Affinitäten unterschiedlicher TMDn ist hier im Gegensatz zu SDS-PAGE und Gelfiltration sehr leicht mög-

lich. Eine sehr vielseitige Messmethode stellt der Nachweis von Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)<sup>[141]</sup> dar. TMD Interaktionen wurden damit in Detergenzien<sup>[142]</sup>, Liposomen<sup>[143]</sup>, „supported lipid bilayers“<sup>[144]</sup> oder biologischen Membranen<sup>[145]</sup> untersucht. Häufig kommen hier synthetische Peptide zum Einsatz, welche mit einem Donor- oder Akzeptorchromophor gekoppelt werden. Seltener werden Fusionen mit fluoreszierenden Proteinen eingesetzt. Mittels FRET können u.a. auch Dissoziationskonstanten<sup>[142]</sup> oder Oligomerstruktur<sup>[116]</sup> bestimmt werden.

Bis auf einige FRET-basierte Experimente sind die genannten Methoden nur *in vitro* durchzuführen. Sie verwenden Detergenzien oder künstliche Lipidmembranen und benötigen teils besondere Messgeräte. Zudem kann die Synthese und Aufreinigung von hydrophoben Peptiden bzw. die Aufreinigung von Membranprotein aus biologischen Membranen recht aufwendig sein. Um TM Helix-Helix Interaktionen im Rahmen einer biologischen Membran *in cellula* bestimmen zu können, werden verschiedene genetische Reportersysteme verwendet. Die meisten basieren auf der Expression eines chimären Membranproteins in *E. coli*, welches die zu untersuchende TMD-Sequenz und eine cytosolische Transkriptionsaktivator- oder -repressordomäne enthält. Eine Oligomerisierung durch die TMD ermöglicht gleichfalls die Dimerisierung der cytosolischen Domäne. Nur als Dimer kann diese ihre Zielsequenz im Promotor eines Reportergens binden. Dessen Expression wird daraufhin aktiviert bzw. reprimiert und die Änderung verhält sich proportional zur Affinität der TMD. Beispiele solcher genetischen Reportersysteme sind das ToxR-Assay<sup>[146]</sup>, TOXCAT<sup>[147]</sup> bzw. ToxLuc<sup>[148]</sup> oder GAL-LEX<sup>[149]</sup>. Varianten des ToxR-Assays wie beispielsweise POSSYCCAT<sup>[150,151]</sup> ermöglichen zudem die Selektion von TMDn mit Selbstaffinität aus Populationen mit randomisierten TMD-Sequenzen.

Im ToxR-Assay wird ein Fusionsprotein verwendet, das ein N-terminales Fragment des *ToxR* Proteins aus *Vibrio cholerae*, eine TMD und das *MalE* Protein aus *E. coli* enthält. Das *ToxR*-TMD-*MalE* Fusionsprotein wird als Typ II Protein in die Plasmamembran von *E. coli* integriert, sodass sich die *ToxR*-Transkriptionsaktivatordomäne im Cytoplasma befindet. Bei der Dimerisierung der *ToxR*-Domäne bindet diese an die DNA-Sequenz (TTTTGAT)<sub>3-8</sub> im *ctx*-Promotor und löst die Expression der nachgeschalteten Gene aus<sup>[152,153]</sup>. Der ToxR-Assay verwendet eine *ctx::lacZ* Fusion als Reportergen, was bei Dimerisierung des *ToxR*-Fusionsproteins zur Expression der  $\beta$ -Galaktosidase führt. Die Menge an exprimiertem Enzym kann später leicht colorimetrisch durch Umsatz von o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid bestimmt werden<sup>[154]</sup>.

Der ToxR-Assay wird zur Bestimmung homotypischer Interaktionen genutzt, wurde später aber auch zur Quantifizierung heterotypischer Interaktionen modifiziert<sup>[155]</sup>. Dabei wird eine Mutante des *ToxR*-Fusionsproteins koexprimiert, die nicht mehr ihre Zielsequenz im *ctx*-Promotor binden kann. Bilden sich heterooligomere Komplexe aus Wildtyp und mutiertem Fusionsprotein, verringert sich die Expression des Reportergens, da weniger Homooligomere des Wildtyps vorliegen. Die Reduktion der Reportergenexpression verhält sich proportional zur Affinität zwischen Mutante und



Wildtyp. Dieses System setzt folglich einen homotypisch interagierenden Wildtyp voraus, ansonsten könnte die Reporterexpression nicht weiter reduziert werden. Durch eine weitere Veränderung des Systems können heterotypische Interaktionen gemessen werden, solange diese stärker als die homotypischen Wechselwirkungen sind<sup>[126]</sup>.

Um Wechselwirkungen zwischen Membranproteinen in eukaryotischen Zellen messen zu können, sind für *Prokaryota* entwickelte Systeme nicht anwendbar. Da die Transkription im Zellkern erfolgt, können Proteine die nicht in der inneren Kernmembran lokalisiert sind, keinen direkten Einfluss auf die Expression eines Reportergens nehmen. Ein „Split-Ubiquitin“ System für Membranproteine<sup>[156]</sup> umgeht dies durch den Einsatz zweier Fragmente des Ubiquitinproteins. Zwei putativ wechselwirkende Proteine werden mit dem N- bzw. C-terminalen Ubiquitinfragment fusioniert. Beide Domänen müssen sich im Cytoplasma befinden und an das C-terminale Ubiquitinfragment muss ein Transkriptionsfaktor fusioniert sein. Interagieren die Fusionsproteine kommt es zur Komplementation der Ubiquitinfragmente. Das so rekonstituierte Protein wird von Ubiquitin-spezifischen Proteasen erkannt und der Transkriptionsfaktor daraufhin abgespalten. Dieser kann in den Zellkern gelangen und dort die Expression eines Reportergens ermöglichen.

Auch für *Prokaryota* wurde ein Reportersystem entwickelt, das die Wechselwirkung von Membranproteinen durch die Komplementierung von Proteinfragmenten nachweist<sup>[157]</sup>. Im „bacterial adenylate cyclase two-hybrid“ (BACTH) System werden die zu untersuchenden Proteine mit jeweils einem Fragment der Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis* fusioniert und in einem *E. coli* Stamm ohne endogene Adenylatcyclase exprimiert. Findet eine Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen statt, kann das Enzym rekonstituieren und ATP wird zu cAMP umgesetzt. Das „catabolite activator protein“ (CAP) bindet cAMP und führt zur Expression vieler für den Katabolismus relevanter Gene. Ein Reporter gen unter Kontrolle eines CAP-regulierten Promotors ermöglicht anschließend den Nachweis der Proteininteraktion.

Aus der Vielzahl an Methoden zur Analyse von TM Helix-Helix Interaktionen werden genetische Reporterassays wie der ToxR-Assay sehr häufig verwendet. Dieser hat den Vorteil, dass man die homotypische Interaktion einer einzelnen TMD im Umfeld der natürlichen Membran einer lebenden Zelle betrachten kann. Außerdem sind der experimentelle Aufwand und die Anforderung an die Laborausstattung gering.

### 1.3. homo-FRET

Das als Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) bezeichnete Phänomen der strahlungsfreien Energieübertragung zwischen Fluorophoren wird in unterschiedlichsten wissenschaftlichen Bereichen ausgenutzt. Normalerweise unterscheiden sich Donor- und Akzeptorfluorophor, allerdings

muss das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen<sup>[141]</sup>. Wird ein Donorfluorophor durch Licht geeigneter Wellenlänge angeregt, emittiert es längerwelliges Licht. Befindet sich hingegen ein Akzeptorfluorophor im unmittelbaren Umfeld, kann es zum FRET kommen. Da die Energie an den Akzeptor abgegeben wird, fluoresziert nicht der Donor, sondern der Akzeptor entsprechend seines charakteristischen Emissionsspektrums. Da die Emission des Akzeptors im Vergleich zum Donor noch weiter in Richtung langwelligen Lichts verschoben ist, kann man das Auftreten von FRET leicht detektieren. Auf diese Weise lässt sich die Kollokalisierung von Donor- und Akzeptor-markierten Molekülen nachweisen. Als Fluorophore kommen häufig kleine synthetische Moleküle zum Einsatz, welche kovalent an die zu untersuchenden Moleküle gekoppelt werden. Dies erfordert meist eine Reinigung der Zielmoleküle vor und nach dem Anheften der Fluorophore. Wird die Lokalisation von Proteinen untersucht, kann man hingegen fluoreszierende Proteine wie das grün fluoreszierende Protein (GFP)<sup>[158]</sup> verwenden. Die kodierende Sequenz kann an N- oder C-Terminus des zu untersuchenden Proteins angefügt werden, wodurch man ein chimäres Protein erhält. Dadurch entfallen Aufreinigung und Markierung des Proteins und man kann es im Kontext der intakten Zelle detektieren. Möchte man die Homodimerisierung oder -oligomerisierung eines Proteins untersuchen, muss man zwei Varianten desselben erstellen, welche mit unterschiedlichen Fluorophoren fusioniert sind (z.B. blau und grün fluoreszierendes Protein). Auf diese Weise lässt sich zwar die Bildung von Homooligomeren nachweisen, es erfordert allerdings eine Kotransformation/-transfektion des kodierenden genetischen Materials und die Koexpression der beiden Proteinvarianten. Außerdem lässt ein klassisches FRET-Experiment keine Aussage über die Stöchiometrie der gebildeten Komplexe zu.

Fluorophore absorbieren bevorzugt Licht, dessen elektrischer Feldvektor parallel zu ihrem Absorptionsdipolmoment orientiert ist. Das Dipolmoment besitzt eine feste Ausrichtung relativ zum Molekül<sup>[159]</sup>. Unter Verwendung von polarisiertem Licht findet demzufolge eine Photos Selektion statt, sodass nur entsprechend ausgerichtete Fluorophore effizient angeregt werden. Bei der anschließenden Fluoreszenz bestimmt das Emissionsdipolmoment die Polarisations ebene des emittierten Lichts. Auch dieses Dipolmoment hat eine feste Orientierung relativ zur Molekülachse, wobei Absorptions- und Emissionsdipolmoment meist nicht identisch sind<sup>[160]</sup>. In wieweit die Anisotropie des Lichts im besten Fall erhalten bleibt, wird durch den Winkel zwischen diesen beiden Momenten bestimmt. Grundsätzlich wird die Anisotropie  $r$  des Fluoreszenzlichts mittels der Formel

$$r = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot G \cdot I_{\perp}} \quad (1.1)$$

bestimmt. Dazu wird die Intensität des vom Fluorophor emittierten Lichts parallel ( $I_{\parallel}$ ) und antiparallel ( $I_{\perp}$ ) zur Polarisationsachse des zur Anregung verwendeten Lichts gemessen. Der Gerätefaktor

G wird normalerweise aus dem Quotienten

$$G = \frac{i_{\perp}}{i_{\parallel}} \quad (1.2)$$

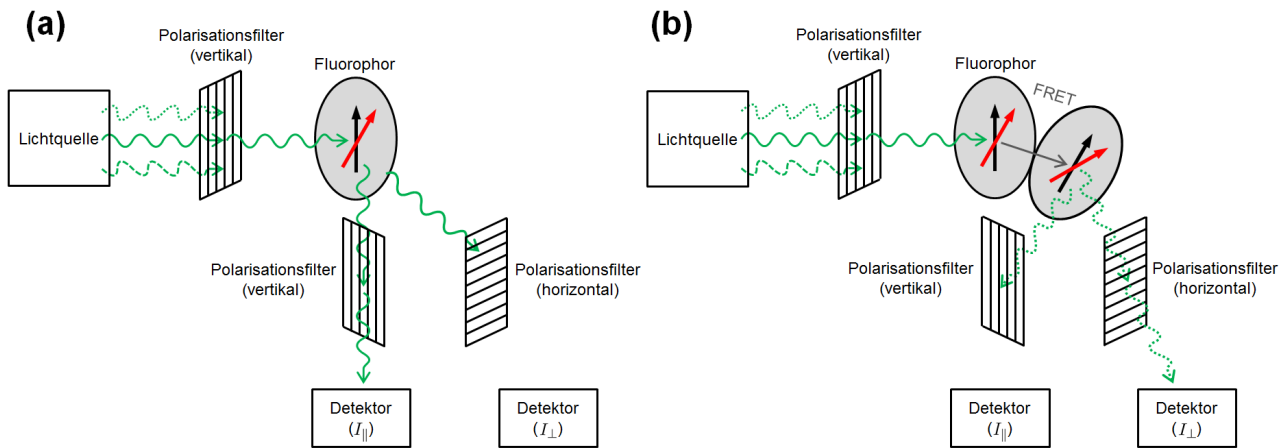
gebildet, wobei  $i_{\perp}$  die Fluoreszenzintensität bei Anregung im parallelen und Messung im anti-parallelen Kanal darstellt. Zur Ermittlung von  $i_{\parallel}$  wird im parallelen Kanal sowohl angeregt, als auch gemessen. Im Idealfall beeinflusst das Messgerät die Intensität des polarisierten Lichts nicht und  $G = 1$ . Die Anisotropie  $r$  kann damit im Intervall von -0,5 bis +1,0 liegen. Entspricht die Polarisation des emittierten Lichts dem des zuvor zur Anregung verwendeten, ist  $r = 1$ . Nur wenn der elektrische Feldvektor des Anregungslichts und das Absorptions- sowie das Emissionsdipolmoment der Fluorophore kollinear ausgerichtet sind, ist die maximale Anisotropie zu erreichen. Die Wahrscheinlichkeit der Anregung eines Fluorophores nimmt ab, wenn der Winkel zwischen Feldvektor und Absorptionsdipolmoment größer wird. Trotzdem werden dabei auch Fluorophore angeregt, die nicht parallel zum Feldvektor orientiert sind. Allein dies verringert die Polarisation des emittierten Lichts und führt dazu, dass die gemessene Anisotropie bei optischer Anregung immer bei  $r < 1$  liegt. Photoselektion bedeutet also nicht, dass alle angeregten Fluorophore die exakt gleiche Orientierung besitzen.

Die Polarisation des emittierten Lichts wird zudem durch verschiedene weitere Faktoren beeinflusst. Wie oben bereits angedeutet wurde, sind Absorptions- und Emissionsdipolmoment der meisten Fluorophore nicht identisch. Dadurch kommt es immer zu einer Depolarisation des absorbierten Lichts, selbst wenn alle Absorptionsdipolmomente kollinear zum Anregungslicht orientiert sind. Dies und die Depolarisation aufgrund der begrenzt strikten Photoselektion beschränken die maximal beobachtbare Anisotropie entsprechend der Formel

$$r_0 = \frac{2}{5} \left( \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right), \quad (1.3)$$

wobei  $r_0$  der maximal erreichbaren Anisotropie und  $\beta$  dem Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment entsprechen. Im Falle von GFP liegt die maximal messbare Anisotropie dadurch bei  $r_0 = 0,4$ .

Zusätzlich kann sich die Anisotropie durch die Rotation der Fluorophore im Zeitraum zwischen Absorption und Emission eines Photons verringern<sup>[161,162]</sup>. Für kleine Moleküle ist die Lebenszeit des angeregten Zustands deutlich länger als die Rotationsdiffusionskonstante  $\tau_c$  (die durchschnittliche Zeit, in der ein Molekül um  $1 \text{ rad} = \frac{360^\circ}{2\pi} \approx 57,9^\circ$  rotiert). DMSO in Wasser hat je nach Temperatur und Konzentration beispielsweise ein  $\tau_c$  im Bereich von 10-100 ps<sup>[163]</sup>. Durchschnittlich große Proteine rotieren etwa tausendmal langsamer. Das 16 kDa große Pheromon-Bindeprotein aus *Bombyx mori* liegt bei 9 ns, die 110 kDa große 7,8-Dihydroneopterin Aldolase aus *Staphylococcus aureus* bei 47 ns<sup>[164]</sup>.



**Abbildung 1.3.:** Versuchsaufbau zur Messung von Fluoreszenzanisotropie und der Einfluss von homo-FRET. (a) Eine Lichtquelle erzeugt Photonen mit zufälliger Polarisation. Nur Photonen mit einem definierten elektrischen Feldvektor können einen vertikal orientierten Polarisationsfilter passieren und die Probe erreichen. Fluorophore (graues Oval) mit einem zum Feldvektor parallel ausgerichteten Absorptionsdipolmoment (schwarzer Pfeil) können effizient angeregt werden. Das angeregte Fluorophor kann seine Energie in Form eines längerwelligen Photons abgeben. Der Feldvektor und damit die Polarisation des emittierten Lichts wird durch die Orientierung des Emissionsdipolmoments (roter Pfeil) bestimmt. Meist ist der Winkel zwischen beiden Momenten klein, sodass es nur zu einer geringen intrinsischen Depolarisation kommt. Hat sich die Polarisation des emittierten Lichts relativ zum Anregungslicht nur wenig verändert, kann es einen weiteren vertikal orientierten Polarisationsfilter passieren. Ein horizontal orientierter Filter ist in diesem Fall hingegen undurchlässig. Nachgeschaltete Detektoren bestimmen die Menge an parallel und antiparallel polarisiertem Licht ( $I_{||}$  bzw.  $I_{\perp}$ ). (b) Eine Möglichkeit zur Depolarisation des emittierten Lichts ist das Auftreten von homo-FRET. Befindet sich ein zweites identisches Fluorophor in unmittelbarer Nähe, kann das angeregte seine Energie strahlungsfrei übertragen. Dazu müssen Emissionsdipolmoment des Donors und Absorptionsdipolmoment des Akzeptors möglichst parallel orientiert sein. Die in (a) angedeutete intrinsische Depolarisation summiert sich bei homo-FRET durch die Beteiligung mehrerer Fluorophore. Dies kann dazu führen, dass die Photonen nicht mehr den vertikal, wohl aber den horizontal orientierten Filter passieren können.

Die zu erwartende Anisotropie eines Moleküls kann mittels der Formel

$$r = \frac{r_0}{1 + (\tau_{fl}/\tau_c)} \quad (1.4)$$

berechnet werden, wobei  $r_0$  der Anisotropie ohne Rotation der Fluorophore und  $\tau_{fl}$  ihrer Lebenszeit im angeregten Zustand entsprechen<sup>[165]</sup>. Daraus folgt, dass große Moleküle aufgrund ihres geringen  $\tau_c$  das Fluoreszenzlicht in geringerem Ausmaß depolarisieren als kleine Moleküle. Ein praktischer Effekt im Zusammenhang mit fluoreszenzmarkierten Proteinen ist, dass im Falle von  $\tau_c \approx \tau_{fl}$  bereits geringe Änderungen in der Rotationsdiffusionskonstante, z.B. durch Bildung von Protein-Ligand oder Protein-Protein Komplexen, eine große Veränderung in der Anisotropie messbar ist. Dies wird u.a. für Protein-Ligand oder Enzym-Substrat Bindungsstudien verwendet, wo sich die Rotationsgeschwindigkeit des fluoreszenzmarkierten Liganden/Substrats durch die Bildung des Komplexes verringert. Ein Beispiel dafür ist in Ref.<sup>[166]</sup> zu finden.

Ein interessantes Phänomen im Zusammenhang mit Fluoreszenzanisotropie stellt der FRET Effekt zwischen identischen Fluorophoren dar. Die Energieübertragung wird in diesem Fall als homo-FRET oder auch „energy migration“ FRET (emFRET) bezeichnet. Dies ist möglich, da sich Absorptions-

und Emissionsspektrum eines Fluorophors immer leicht überschneiden. Da sich die Emission von Donor und Akzeptor hier quasi nicht unterscheiden, kann man das Auftreten von homo-FRET nicht wie beim klassischen hetero-FRET über die längerwellige Emission des Akzeptors oder das Donor-quenching bestimmen. Allerdings lässt sich diese Information aus der Polarisation des Fluoreszenzlichts extrahieren. Verwendet man polarisiertes Licht zur Anregung, kommt es zu einer Photo Selektion. Alle angeregten Fluorophore haben eine ähnliche räumliche Ausrichtung. Befindet sich kein Akzeptorfluorophor in der näheren Umgebung, kommt es zu einer geringen intrinsischen Depolarisation, da die Dipolmomente des GFP Fluorophors nicht parallel orientiert sind (s. Abb. 1.3a). Befindet sich hingegen ein weiteres GFP Fluorophor in unmittelbarer Nähe, kann homo-FRET stattfinden. Eine Voraussetzung ist dabei eine ähnliche Ausrichtung des Emissionsdipolmoments des Donors und des Absorptionsdipolmoments des Akzeptors. Der Akzeptor muss daher eine geringfügig andere Orientierung als der Donor besitzen. Dadurch wird das ansonsten nur leicht depolarisierte Licht des Donors durch den Akzeptor weiter depolarisiert, da auch seine Dipolmomente nicht parallel verlaufen (s. Abb. 1.3b). Befinden sich viele solcher Fluorophore in unmittelbarer Nähe, kann dies auch mehrmals erfolgen und die Depolarisation verstärken.

Die Detektion von homo-FRET mittels Fluoreszenzanisotropie kann mittlerweile auch auf einzelne Zellen und sogar subzelluläre Kompartimente angewendet werden. Dazu wird ein Fluoreszenzmikroskop mit einer digitalen Kamera und Polarisationsfiltern ausgestattet. Diese Technik wird „fluorescence anisotropy imaging microscopy“ (FAIM) genannt<sup>[167-169]</sup>. Unter Anregung mit polarisiertem Licht werden für einen Bereich des Präparates jeweils zwei Bilder aufgenommen. Diese geben die Intensität  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  wieder. Anschließend kann aus den Daten die Anisotropie für jeden Bildpunkt ermittelt werden. Auf diese Weise kann der Oligomerisierungsgrad des zu untersuchenden fluoreszierenden Moleküls, z.B. von GFP-Fusionsproteinen, in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation bestimmt werden.

## 2. Ziel der Arbeit

Im vorangegangenen Kapitel wurde aufgezeigt, dass die Wechselwirkungen zwischen Membranproteinen eine wichtige Rolle für alle Organismen spielen. Trotzdem ist vergleichsweise wenig über den Einfluss nicht-kovalenter Wechselwirkungen auf ihre Struktur und Funktion bekannt. Gerade die Interaktionen innerhalb der Lipidmembran lassen sich nur aufwendig und mit niedrigem Durchsatz bestimmen. Erschwerend kommt hinzu, dass sich die Interaktionsfähigkeit von TM Helices bislang nicht gut anhand der Primärsequenz vorhersagen lässt.

Es ist bekannt, dass die TMDn  $\alpha$ -helikaler Proteine im Mittel eine einseitige (unilaterale) Konserviertheit zeigen<sup>[170]</sup>. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie häufig unilateral konservierte TM Helices auftreten und ob es sich bei den konservierten Seiten um Kontaktflächen zur Wechselwirkung mit anderen TMDn handelt. Dies würde die Identifikation von TMDn mit der Fähigkeit zur TM Helix-Helix Interaktion mit Hilfe von Sequenzdaten ermöglichen.

Als Ausgangspunkt der Analyse wurden die TMDn des bitopischen Membranproteoms von *H. sapiens* gewählt. Unilateral konservierte TM Helices sollten durch Sequenzalignments mit homologen Proteinen identifiziert werden. Ein Zusammenhang zwischen konservierten Helixseiten und homotypischer Interaktionsfähigkeit sollte experimentell mit Hilfe des ToxR-Assays in *E. coli* untersucht werden.

Um TM Helix-Helix Interaktionen zukünftig schneller und umfassender analysieren zu können, sollte eine neue Methode auf Basis von Fluoreszenzanisotropie etabliert werden. Um gleichzeitig die Topologie der meisten bitopischen Proteine widerzuspiegeln, sollte ein fluoreszierendes Membranprotein mit Typ I Topologie zur Expression in *E. coli* entworfen werden. Im Rahmen einer Machbarkeitsstudie könnten TMDn mit bekanntem Oligomerisierungsgrad als Referenzen dienen. Die Methode sollte im Gegensatz zu bestehenden Methoden quantitative Aussagen über Affinität und Stöchiometrie der TMDn *in cellula* möglich machen.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1. Kultivierung von *Escherichia coli* Zellen

Zur Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) in Flüssigkultur wurde LB-Medium verwendet („Lyso-geny Broth“<sup>[171]</sup> in der Formulierung nach Luria; 1% Trypton (Prod.-Nr. 211699, Fa. BD (Becton, Dickinson and Company), Heidelberg), 0,5% (w/v) Hefeextrakt (Prod.-Nr. 212720, Fa. BD), 171 mM NaCl (Prod.-Nr. A3597, Fa. Applichem, Darmstadt), mit NaOH (Prod.-Nr. A1551, Fa. Applichem) auf pH 7,0 eingestellt, autoklaviert). Ggf. wurden Antibiotika in den in Tab. 3.1 angegebenen Konzentrationen zugegeben. 5 mL LB-Medium wurden in ein Glasröhrchen überführt und inokuliert. Die Kultur wurde für mindestens 12 h bei 37 °C in einem Drehrad inkubiert und bei ausreichender Trübung des Nährmediums zur weiteren Verwendung geerntet oder kurzfristig bei 4 °C gelagert. Größere Volumina wurden in Erlenmeyerkolben auf einem Schütteltisch inkubiert. Zur Kultivierung auf Festmedien wurde flüssiger LB-Agar (LB-Medium mit 1,5% Agar (Prod.-Nr. A0949, Fa. Applichem), autoklaviert) mit dem entsprechenden Antibiotikum aus Tab. 3.1 versetzt und in Petrischalen mit Nocken gegossen. Nach Erstarren des LB-Agars wurden die LB-Agar Platten bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Bakterien wurden mit Hilfe eines Drigalskispatels oder durch Dreiösenausstrich auf die Platten aufgebracht und für mindestens 12 h bei 37 °C inkubiert, bis einzelne Kolonien deutlich sichtbar waren.

**Tabelle 3.1.:** Konzentrationen verwendeter Antibiotika.

<b>Antibiotikum</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Quelle</b>
Ampicilin	100 mg/mL in H <sub>2</sub> O	100,0 µg/mL	Prod.-Nr. A0839, Fa. Applichem
Kanamycin	10 mg/mL in H <sub>2</sub> O	35,0 µg/mL	Prod.-Nr. A1493, Fa. Applichem
Tetracyclin	5 mg/mL in Ethanol	12,5 µg/mL	Prod.-Nr. 35866, Fa. Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	30 mg/mL in Ethanol	30,0 µg/mL	Prod.-Nr. A1806, Fa. Applichem

### 3.1.2. Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

#### Chemisch kompetente Zellen

Chemisch kompetente Zellen wurden entsprechend der Anweisungen in Ref.<sup>[172]</sup> hergestellt. Dabei wurden 250 mL SOB Medium (2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl (Prod.-Nr. A3582, Fa. Applichem), pH 7.0) mit geeignetem Antibiotikum (Konzentrationen s. Tab. 3.1) mit 10-12 Kolonien des jeweiligen *E. coli* Stammes inokuliert. Die Kultur wurde bei 18 °C und 160 UpM auf einem Schütteltisch inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde. Die Zellen wurden bei 2500 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert, in 80 mL eiskaltem Transformationspuffer (10 mM PIPES (Prod.-Nr. A3495, Fa. Applichem), 15 mM CaCl<sub>2</sub> (Prod.-Nr. 2382, Fa. Merck, Darmstadt), 250 mM KCl, pH mit KOH (Prod.-Nr. 60380, Fa. Fluka, mittlerweile Sigma-Aldrich GmbH, München) auf 6,7 eingestellt und MnCl<sub>2</sub> (Prod.-Nr. A2087, Fa. Applichem) in einer Endkonzentration von 55 mM zugegeben, anschließend sterilfiltriert) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 20 mL Transformationspuffer resuspendiert. Unter leichtem Schütteln wurde tropfenweise Dimethylsulfoxid (DMSO; Prod.-Nr. A1584, Fa. Applichem) bis zu einer Endkonzentration von 7% (v/v) zugegeben und die Zellen 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in 1,5 mL Reaktionsgefäße (Prod.-Nr. 72.690.001, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) zu je 200 µL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### Elektrokompetente Zellen

400 mL LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum wurden mit 4 mL aus einer Übernachtskultur des jeweiligen *E. coli* Stammes inokuliert. Die Kultur wurde bei 37 °C und 180 UpM auf einem Schütteltisch inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde. Die Zellen wurden mehrmals bei 4000 x g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert und dabei in immer kleineren Volumina von 100, 50, 20 und letztlich 5 mL eiskaltem 10% (v/v) Glycerol (Prod.-Nr. A0567, Fa. Applichem) resuspendiert. Der Ansatz wurde in 1,5 mL Reaktionsgefäße zu je 50 µL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.1.3. Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

#### Chemisch kompetente Zellen

Ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen (200 µL) wurde auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 100 ng DNA wurde die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in einem Wasserbad zunächst für 1 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und dann sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Vor dem Inokulieren von Selektivmedium wurden 800 µL SOC-Medium zu den Zellen zugegeben und diese für 1 h bei 37 °C im Drehrad inkubiert, damit transformierte Zellen die durch das Plasmid



vermittelte Resistenz erlangen konnten.

### Elektrokompetente Zellen

Ein Aliquot elektrokompetenter Zellen (50  $\mu\text{L}$ ) wurde auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der DNA-Lösung wurde die Suspension in eine eiskalte Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand; Prod.-Nr 71-2010-LE, Fa. PEQLAB, Erlangen) überführt. Die Zellen wurden durch einen Spannungspuls mit 18 kV/cm in einem MicroPulser Elektroporator (Prod.-Nr. 165-2100, Fa. Bio-Rad, München) transformiert. Es wurden 350  $\mu\text{L}$  LB-Medium zu den Zellen gegeben und die Suspension in ein 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C im Drehrad inkubiert, damit transformierte Zellen die durch das Plasmid vermittelte Resistenz erlangen konnten.

## 3.2. Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1. Präparation von Plasmiden aus *E. coli*

Wurde DNA zur Durchführung eines Kontrollverbaus mit Restriktionsendonukleasen benötigt, z.B. beim Screening einer großen Anzahl von Klonen, wurde die Plasmidpräparationsmethode nach Ref.<sup>[173]</sup> verwendet. 1 mL einer *E. coli* Übernachtskultur wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, die Zellen für 5 min bei 3000  $\times$  g sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 150  $\mu\text{L}$  TELT-Puffer (50 mM Tris-HCl (Prod.-Nr. A1379, Fa. Applichem), 62,5 mM EDTA (Prod.-Nr. A5097, Fa. Applichem), 2,5 mM LiCl (Prod.-Nr. 5679, Fa. Merck), 4% Triton X-100 (Prod.-Nr. A4975, Fa. Applichem), pH 8,0) + 1 mg Lysosom/mL (Prod.-Nr. A3711, Fa. Applichem) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nukleinsäuren und Proteine wurden durch Inkubation bei 95 °C für 3 min denaturiert. Durch anschließende Inkubation auf Eis für 5 min wurde die Plasmid-DNA renaturiert. Präzipitierte Proteine, RNA und chromosomale DNA wurden bei 16000  $\times$  g für 8 min abzentrifugiert und das kompakte Sediment mittels einer Pipettenspitze entfernt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Isopropanol (Prod.-Nr. A0892, Fa. Applichem) präzipitiert und bei 16000  $\times$  g für 15 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 100  $\mu\text{L}$  70% Ethanol (Prod.-Nr. A2795, Fa. Applichem) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Sediment für etwa 15 min bei RT getrocknet, ohne dieses komplett trocken fallen zu lassen. Zum Sediment wurden 50  $\mu\text{L}$  TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) + etwas RNase (Prod.-Nr. A2760, Fa. Applichem) gegeben, für 5 min bei RT und danach 5 min bei 65 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA Lösung wurde entweder sofort verwendet, oder bei -20 °C gelagert.

Sehr reine DNA für die Sequenzierung und oder zu Klonierungszwecken wurde mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kits (Prod.-Nr. 740615, Fa. Macherey-Nagel, Düren) präpariert. Hierbei wurden die *E. coli* Zellen alkalisch lysiert und danach neutralisiert. Proteine sowie chromosomale DNA wurden dabei denaturiert und konnten abzentrifugiert werden. RNA wurde durch die im Resus-

pensionspuffer enthaltene RNase abgebaut. Anschließend wird die Plasmid-DNA selektiv an eine Silicamembran gebunden und durch mehrere Waschschriffe von Verunreinigungen befreit. Schließlich wurde die Plasmid-DNA bei niedriger Ionenstärke mit einem leicht basischen Puffer eluiert. Das Kit wurde gemäß den Angaben des Herstellers unter Durchführung aller optionalen Waschschriffe verwendet.

### 3.2.2. Restriktionsendonukleaseverdau

Falls nicht anders angegeben, wurden Restriktionsendonukleasen entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Für qualitative Nachweise wurden 250 bis 1000 ng DNA eingesetzt, bei präparativer Anwendung hingegen 2 bis 4  $\mu\text{g}$ .

### 3.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe erfolgte per Elektrophorese in Gelen mit 1% Agarose. Für ein 7 x 10 cm großes Gel wurde Agarose mit niedriger Elektroendoosmose (Prod.-Nr. A2714, Fa. Applichem) zu 50 mL TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure (Prod.-Nr. A2318, Fa. Applichem), 2 mM EDTA, pH 8,0) gegeben und durch Erhitzen gelöst. Die Lösung wurde in einen kombinierten Gieß- und Laufstand gegossen und mit 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ethidiumbromid (Prod.-Nr. A1152, Fa. Applichem) versetzt. Ein Kamm wurde eingesetzt, um in dem erstarrenden Gel Ladetaschen auszuformen. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Laufstand mit TBE-Puffer befüllt und der Kamm entfernt.

DNA-Proben wurden mit 1/5 Probenvolumen an 6x DNA Probenpuffer (Prod.-Nr. R0611, Fa. Fermentas) versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese wurde bei 5 V/cm durchgeführt, bis das im Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau mindestens die Hälfte des Gels erreicht hatte. Im Falle von analytischen Gelen wurde die DNA mittels Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids bei Anregung durch UV-Licht bei 312 nm sichtbar gemacht. Bei präparativen Gelen wurde UV-Licht bei 365 nm verwendet, um die DNA nicht zu schädigen.

### 3.2.4. DNA Extraktion aus Agarose-Gelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen wurde die Gelelektrophorese so kurz wie möglich durchgeführt, um bei ausreichender Auftrennung eine möglichst scharfe und damit konzentrierte DNA Bande zu erhalten. Mit einem sauberen Skalpell wurde die Bande aus dem Gel herausgeschnitten, wobei möglichst viel DNA-freie Agarose entfernt wurde. Das resultierende Gelstückchen wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Die DNA wurde mittels des „Gel and PCR Clean-up“ Kit (Prod.-Nr. 740609, Fa. Macherey-Nagel) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde das Agarosestückchen in einem leicht sauren Puffer mit chaotropen Salzen

für 10 min bei 50 °C aufgelöst. Die DNA wurde an eine Silicamembran gebunden und mit Ethanolhaltigem Puffer zweimal gewaschen. Durch einen leicht basischen Puffer mit geringer Ionenstärke (5 mM Tris-HCl, pH 8,5) wurde die DNA eluiert und anschließend photometrisch quantifiziert.

### 3.2.5. Ligation von DNA Fragmenten

Zur Ligation von DNA Fragmenten, z.B. durch Restriktionsendonukleasen verdaute PCR Produkte und Plasmide, wurden 50–100 ng Vektor DNA und ein dreifacher molarer Überschuss an einzufügendem Fragment verwendet. Die DNA wurde in 20 µL Ligationspuffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 40 mM Tris-HCl, pH 7,8) + 1 Weiss Reaktionseinheit (Unit) T4 DNA Ligase (Prod.-Nr. EL0335, Fa. Fermentas) gelöst. Der Ansatz wurde nacheinander für je 20 min bei 22 °C, 16 °C und 12 °C inkubiert. Im Falle einer anschließenden Elektroporation wurde die Transformationseffizienz durch Inkubation des Reaktionsansatzes für 5 min bei 75 °C erhöht<sup>[174]</sup>. Es wurden 2 oder 5 µL des Reaktionsansatzes zur Transformation von elektro-kompetenten bzw. chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen verwendet.

### 3.2.6. Herstellung der *ToxR-TMD-MalE* Konstrukten

Um eine TMD mit Hilfe des ToxR-Assays auf Selbstinteraktion zu testen, wird sie als Teil eines *ToxR-TMD-MalE* Fusionsproteins exprimiert (s. Kapitel 3.4.1). Verschiedene TMD Sequenzen lassen sich leicht in das artifizielle Gen einzubringen, indem man kurze Oligonukleotidkassetten verwendet, die für die TMD der Wahl kodieren. Diese können in den mit Restriktionsendonukleasen verdauten pToxRV Vektor ligiert werden. Die Oligonukleotidkassetten müssen dazu die Form

```
sense:    5'-CTAGC NNN NNN ... NNN NNN GG-3'
anti-sense: 3'-G NNN NNN ... NNN NNN CCCTAG-5'
```

besitzen, wobei NNN für jeweils ein Codon der TMD kodierenden Sequenz steht. In Tabelle 3.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und die resultierenden Proteinsequenzen aufgelistet. Nach Hybridisierung von sense- und anti-sense-Oligonukleotid besitzt die Kassette 5'-Überhänge, welche zu den durch *NheI*- (Prod.-Nr. ER0975, Fa. Fermentas) bzw. *BamHI* (Prod.-Nr. ER0051, Fa. Fermentas) erzeugten Überhängen kompatibel sind. Synthetische Oligonukleotide besitzen keine 5'-Phosphatgruppe, wie es beispielsweise nach Verdau mit Restriktionsendonukleasen der Fall ist. Die zur Ligation von DNA Fragmenten verwendeten Ligasen benötigen allerdings eine 5'-Phosphatgruppe, um die Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Ende des einen und dem 5'-Ende des anderen Fragmentes herstellen zu können. Daher wurden sense- und anti-sense-Oligonukleotid mittels T4 Polynukleotidkinase (Prod.-Nr. EK0031, Fa. Fermentas) gemäß den Herstellangaben am 5'-Ende phosphoryliert. Die Phosphorylierung der Oligonukleotide und der Verdau des Empfängerplasmids

**Tabelle 3.2.:** Zur Herstellung der *ToxR-TMD-MalE* Konstrukte verwendete Oligonukleotidkassetten. Wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, wurde die TMD Sequenz mittels Kassettenklonierung in den pToxRV Vektor inseriert. Um die Ligation der Kasette mit dem *NheI* und *BamHI* verdauten Vektor zu ermöglichen, wurden an den Termini zusätzliche Nukleotide angefügt. Für jedes Konstrukt sind Proteinsequenz der TMD, sowie die korrespondierenden sense (5'→3') und anti-sense (3'→5') Oligonukleotidsequenz angegeben. Die mit einem Stern gekennzeichneten Aminosäurereste weichen von der in UniProt hinterlegten Proteinsequenz ab.

		C	V	V	L	Y	V	A	S	S	L	F	L	M	V	M	Y	F	F	F	A*
Q6ZRP7	5'-ctagc	TGC	GTG	GTG	CTG	TAT	GTG	GCA	AGC	TCT	CTG	TTT	CTG	ATG	GTG	ATG	TAC	TTC	TTC	TTC	GCG
	3'-g	ACG	CAC	CAC	GAC	ATA	CAC	CGT	TCG	AGA	GAC	AAA	GAC	TAC	CAC	TAC	ATG	AAG	AAG	AAG	CGC
		A	L	F	L	T	L	L	C	L	L	L	L	I	G	L	G	V	L	A	S
Q5QGZ9	5'-ctagc	GCG	CTG	TTC	CTG	ACT	CTG	CTG	TGC	TTG	CTG	CTG	CTG	ATT	GGC	CTC	GGC	GTG	CTG	GCG	TCT
	3'-g	CGC	GAC	AAG	GAC	TGA	GAC	GAC	ACG	AAC	GAC	GAC	GAC	TAA	CCG	GAG	CCG	CAC	GAC	CGC	AGA
		I	A	V	V	F	I	L	L	L	S	V	C	F	I	A	S	C	L	V	T
Q8WXI8	5'-ctagc	ATT	GCG	GTG	GTG	TTT	ATT	CTC	CTC	CTG	AGC	GTG	TGT	TTT	ATT	GCG	AGC	TGC	CTG	GTG	ACT
	3'-g	TAA	CGC	CAC	CAC	AAA	TAA	GAG	GAG	GAC	TCG	CAC	ACA	AAA	TAA	CGC	TCG	ACG	GAC	CAC	TGA
		I	T	L	A	V	P	S	A	V	A	L	V	L	F	L	I	L	A	Y	I
O43556	5'-ctagc	ATT	ACC	CTG	GCG	GTG	CCG	AGT	GCG	GTG	GCG	CTG	GTT	CTG	TTT	CTG	ATT	CTG	GCG	TAT	ATT
	3'-g	TAA	TGG	GAC	CGC	CAC	GGC	TCA	CGC	CAC	CGC	GAC	CAA	GAC	AAA	GAC	TAA	GAC	CGC	ATA	TAA
		A*	H	L	I	Y	V	V	I	P	T	I	P	L	L	L	L	I	L	V	A
Q9H9P2	5'-ctagc	GCT	AAC	TTG	ATT	TAT	GTT	GTG	ATT	CGG	ACC	ATT	CCG	CTG	CTG	CTG	CTG	ATT	CTG	GTG	GCC
	3'-g	CGA	TTG	AAC	TAA	ATA	CAA	CAC	TAA	GGC	TGG	TAA	GGC	GAC	GAC	GAC	GAC	TAA	GAC	CAC	CGG
		T	A	T	V	V	I	V	V	C	V	S	F	L	V	F	M	I	I	L	G
O94985	5'-ctagc	ACT	GCG	ACC	GTG	GTG	ATT	GTG	GTG	TGC	GTG	AGC	TTT	CTG	GTG	TTT	ATG	ATT	ATT	CTG	GGC
	3'-g	TGA	CGC	TGG	CAC	CAC	TAA	CAC	CAC	ACG	CAC	TCG	AAA	GAC	CAC	AAA	TAC	TAA	TAA	GAC	CCG
		Y	L	F	F	S	W	L	V	V	F	V	G	S	W	I	I	Y	V	Q	Y
Q5T7M9	5'-ctagc	TAT	CTG	TTC	TTC	TCT	TGG	TTG	GTG	GTG	TTC	GTT	GGC	AGC	TGG	ATT	ATT	TAT	GTG	CAG	TAT
	3'-g	ATA	GAC	AAG	AAG	AGA	ACC	AAC	CAC	CAC	AAG	CAA	CCG	TCG	ACC	TAA	TAA	ATA	CAC	GTC	ATA
		A	I	I	L	F	I	I	L	F	I	L	L	L	F	L	A	I	F	I	Y
O75923	5'-ctagc	GCC	ATT	ATT	CTG	TTT	ATT	ATT	CTG	TTT	ATT	CTG	CTG	CTG	TTT	CTC	GCC	ATT	TTT	ATT	TAC
	3'-g	CGG	TAA	TAA	GAC	AAA	TAA	TAA	GAC	AAA	TAA	GAC	GAC	GAC	AAA	GAG	CGG	TAA	AAA	TAA	ATG
		C	H	L	L	L	S	L	G	L	G	L	L	L	L	V	I	I	C	V	V
Q8IUN9	5'-ctagc	TGC	CAT	CTG	CTC	CTG	TCT	CTG	TCT	CTG	GCC	CTG	TTG	CTG	CTG	ATT	ATT	TGC	GTG	GTG	GGT
	3'-g	ACG	GTA	GAC	GAC	GAC	AGA	GAC	CGA	GAC	CCG	GAC	AAC	GAC	GAC	CAC	TAA	TAA	ACG	CAC	CAC
		V	A	L	F	L	S	V	L	V	I	L	L	V	I	Y	V	S	W	A*	A*
Q86VH5	5'-ctagc	GTG	GCA	CTG	TTT	CTG	AGC	GTT	CTG	GTG	ATT	CTC	CTG	GTG	ATT	TAT	GTG	AGC	TGG	GCG	GCG
	3'-g	CAC	CGT	GAC	AAA	GAC	TCG	CAA	GAC	CAC	TAA	GAG	GAC	CAC	TAA	ATA	CAC	TCG	ACC	CGC	CGC
		L	I	I	I	L	T	F	I	L	V	S	A	I	L	L	T	T	L	A	A
Q14392	5'-ctagc	CTC	ATC	ATT	ATT	CTG	ACC	TTT	ATT	CTC	GTT	AGT	GCC	ATT	CTC	CTG	ACC	ACC	CTC	GCT	GCG
	3'-g	GAG	TAG	TAA	TAA	GAC	TGG	AAA	TAA	GAG	CAA	TCA	CGG	TAA	GAG	GAC	TGG	TGG	GAG	CGA	CGC
		L	I	L	K	G	V	L	T	A	M	G	L	I	G	I	I	C	L	I	I
Q9UQC9	5'-ctagc	CTG	ATT	CTG	AAG	GGT	GTG	CTG	ACT	GCG	ATG	GGC	CTG	ATT	GGC	ATT	ATT	TGT	CTG	ATT	ATT
	3'-g	GAC	TAA	GAC	TTC	CCA	CAC	GAC	TGA	CGC	TAC	CCG	GAC	TAA	CCG	TAA	TAA	ACA	GAC	TAA	TAA
		A	G	I	T	G	L	V	L	S	I	L	V	L	A	A	A	A	A	L	L
Q96P31	5'-ctagc	GCT	GGT	ATC	ACT	GGT	CTG	GTG	CTG	AGT	ATT	CTG	GTG	CTG	GCG	GCT	GCT	GCT	GCT	CTC	CTG
	3'-g	CGA	CCA	TAG	TGA	CCA	GAC	CAC	GAC	TCA	TAA	GAC	CAC	GAC	CGC	CGA	CGA	CGA	CGA	GAG	GAC
		G	S	P	L	V	F	G	E	K	F	K	L	F	T	L	V	S	A	C	I
Q9H533-2	5'-ctagc	GGT	AGC	CCC	CTG	GTG	TTT	GGC	GAG	AAG	TTT	AAG	CTG	TTT	ACT	CTG	GTG	AGC	GCG	TGC	ATC
	3'-g	CCA	TCG	GGG	GAC	CAC	AAA	CCG	CTC	TTC	AAA	TTC	GAC	AAA	TGA	GAC	CAC	TCG	CGC	ACG	TAG
		G	L	L	G	G	A	L	A	N	L	F	V	I	V	G	F	A	A	F	A
Q8N2K1	5'-ctagc	GGT	CTG	CTC	GGC	GGT	GCC	CTG	GCG	AAT	CTG	TTT	GTT	ATT	GTG	GGT	TTT	GCG	GCC	TTT	GCG
	3'-g	CCA	GAC	GAG	CCG	CCA	CGG	GAC	CGC	TTA	GAC	AAA	CAA	TAA	CAC	CCA	AAA	CGC	CGG	AAA	CGC

pToxRV Integrin  $\alpha_V$  mit GP<sup>[175]</sup> wurden in einem Schritt durchgeführt, indem 1  $\mu$ g Vektor DNA, je 1  $\mu$ g sense- und anti-sense-Oligonukleotid, je 5 U *NheI* und *BamHI* zusammen mit 10 U T4 Polynukleotidkinase in 20  $\mu$ L 1x Puffer Green (Fa. Fermentas) + 1 mM ATP (Prod.-Nr. P0756, Fa. New England Biolabs, Frankfurt) für 1,5 h bei 37 °C inkubiert wurden. Durch Inkubation bei 90 °C für 20 min in einem Heizblock wurden die Enzyme inaktiviert und die Oligonukleotide geschmolzen. Im abgeschalteten Heizblock wurden die Proben für 1 h langsam abgekühlt, um die Oligonukleotide zu hybridisieren. Zum Einfügen der Kassette in den Vektor wurden 1 U T4 DNA Ligase, sowie ATP in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugesetzt und der Ansatz 1 h bei 22 °C inkubiert. Durch Inkubation bei 65 °C für 10 min wurde die Ligase inaktiviert. Dem Ansatz wurden 5 U *ApaI* (Prod.-Nr. ER1411, Fa. Fermentas) zugesetzt und für 1 h bei 30 °C inkubiert. Dies linearisiert eventuell religierten Empfängervektor, da die ursprüngliche Integrin  $\alpha_V$  mit GP TMD Kassette eine *ApaI*-Schnittstelle enthält. Die linearisierte DNA mit stumpfen Enden weist eine sehr geringe Transformationseffizienz auf, wodurch Transformanten fast ausschließlich den Vektor mit der einzufügenden Kassette besitzen. Elektrokompente *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*]; Fa. Stratagene) wurden mit 1–2  $\mu$ L des Reaktionsansatzes versetzt, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben transformiert und auf LB-Agar + Kanamycin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und jeweils 5 mL LB-Medium + Kanamycin mit einzelnen Klonen inokuliert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Plasmide wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben präpariert. Durch Doppelverdau der DNA mit *ApaI* und *PstI* (Prod.-Nr. ER0611, Fa. Fermentas) in 1x Puffer Blue (Fa. Fermentas) und Auftrennung per Agarosegel-Elektrophorese konnte auf Integration der neuen Kassette getestet werden. Klone mit neuer Kassette werden lediglich linearisiert, ansonsten entstehen zwei Fragmente unterschiedlicher Größe. Ein positiver Klon wurde anschließend durch Sequenzierung verifiziert und dieser im ToxR-Assay verwendet.

### 3.2.7. Herstellung der *MalE*-TMD-sfGFP Konstrukte

Der pToxRV Vektor ( $p_{BAD}::toxR\text{-TMD}\text{-}malE\text{-}Myc\text{-}His_6$ )<sup>[176]</sup> wurde mit *XbaI* (Prod.-Nr. ER0681, Fa. Fermentas) und *NheI* verdaut und das Vektorfragment mit Hilfe einer Gelaufreinigung isoliert. Das *malE* Gen wurde mittels des Primerpaares

```
sense:  GGG CTC TAG ATA ACG AGG GCA AAA AAT GAA AAT AAA AAC AGG
        TGC ACG CAT C
anti-sense:  TCA CGC TAG CGG TCA GAT GGG TTT TAA TGC CCG GGC CAT CAT
           GGT CTT TAT AAT CAG AAT TCT TGG TGA TAC GAG TCT GCG C
```

und des Temperaturprofils

98 °C	3 min	
98 °C	10 s	
40 °C	10 s	x 5
72 °C	40 s	
98 °C	10 s	
59 °C	10 s	x 35
72 °C	40 s	
72 °C	3 min	
4 °C	∞	

aus *E. coli* XL1-Blue Zellen amplifiziert. Dabei wurden 0,5 U Phusion Polymerase (Fa. NEB, Prod.-Nr. M0530S) in 1x Phusion High Fidelity Puffer + 9% DMSO entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Das PCR Produkt wurde mit *XbaI* und *NheI* verdaut und mit Hilfe einer Gelaufreinigung isoliert. Der gereinigte Vektor und das PCR Produkt wurden mit T4 DNA Ligase ligiert. Das resultierende Plasmid wurde mit *BamHI* und *XhoI* (Prod.-Nr. ER0691, Fa. Fermentas) verdaut und das Vektorfragment gelgereinigt. Durch Gensynthese (Fa. Life Technologies, Darmstadt) wurde ein lineares DNA-Fragment hergestellt, dass für die Juxtamembranregion des „Ion transport 2 domain“ Proteins aus *Bacillus weihenstephanensis* (UniProt ID A9VEV6), einen künstlichen  $\alpha$ -helikalen Linker der Sequenz A(EAAAK)<sub>5</sub>A<sup>[177]</sup>, superfolder GFP<sup>[178]</sup> und eine modifiziertes FLAG-Epitop kodiert. Die Nukleotidsequenz ist in Kapitel A.1.1 dokumentiert. Das Syntheseprodukt wurde mit *BamHI* und *XhoI* verdaut und anschließend mit dem „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Kit nach Herstellerangaben gereinigt. Anschließend wurden Vektor und Fragment, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, ligiert.

Um die sfGFP-Domänen im Fall einer Homooligomerisierung des Proteins möglichst nahe aneinander zu bringen, sollte der C-terminale Linker auf die Proteinsequenz (A(EAAAK)<sub>3</sub>A) verkürzt werden. Die Ausgangssequenz wurde mittels PCR und dem Primerpaar

sense: GCC GCG AAA GAG GCA GCA GCT AAA GCC GCA  
anti-sense: GGC TTC TTT CGC TGC TGC TTC GGC AGG CAG

verkürzt. Dazu wurde das Temperaturprofil

98 °C	30 s	
98 °C	15 s	
72 °C	-2°C/Zyklus	15 s x 5
	1°C/s	
72 °C	1°C/s	4 min
98 °C	15 s	
70 °C	15 s	x 25
72 °C	4 min	
72 °C	2 min	
4 °C	∞	

angewendet. Für diese PCR-Reaktion wurden 0,5 U Phusion Polymerase in 1x HF Puffer + 3% DMSO eingesetzt.

Die stumpfen Enden des PCR-Produkts wurden an den 5'-Hydroxylgruppen phosphoryliert um die Fragmente zirkularisieren zu können. Dazu wurden 5  $\mu$ L PCR-Ansatz mit 15  $\mu$ L 1x Blue Puffer (Fa. Fermentas) + 5 U T4 Polynukleotidkinase + 1 U T4 DNA Ligase + 0,5 mM ATP (Endkonzentration) gemischt. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C und anschließend je 20 min bei 22, 16 und 12 °C inkubiert. Ligase und PNK wurden durch Inkubation bei 75 °C für 10 min inaktiviert. Es wurden 10 U *DpnI* (Prod.-Nr. ER1702, Fa. Fermentas) zugesetzt und der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert, um die Matrizen-DNA zu verdauen. 5  $\mu$ L des Ansatzes wurden zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen eingesetzt.

Der Abschnitt zwischen *MalE*-Domäne und TMD sollte durch einen weiteren  $\alpha$ -helikalen Linker und die Juxtamembranregion (JM Region) des humanen GpA Proteins ersetzt werden. Dazu wurde das zuvor verwendete Gensyntheseprodukt (s.o.) als Matrize verwendet. Mit Hilfe der PCR-Primer

```
sense:  CTG GCA GTT AAT GTT CAG AAT TCT GCC GAA GCA GCA GCG
anti-sense: TCA CGC TAG CTT CCG GTT CGC TAA AGT GAT GCG CCA GCT GCA
          CTG CGG CTT TAG CTG CTG CCT CTT TCG CGG CAG
```

und des Temperaturprofils

95 °C	60 s	
95 °C	10 s	
72 °C	-0,5 °C/Zyklus	10 s x 35
72 °C		10 s
72 °C		3 min
4 °C		$\infty$

wurde der  $\alpha$ -helikale Linker kopiert und C-terminal davon die GpA JM Region angefügt. Das PCR-Produkt wurde mit *EcoRI* (Prod.-Nr. ER0271, Fa. Fermentas) und *NheI* verdaut und mit Hilfe des „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Kits nach Herstellerangaben gereinigt. Der zuvor erstellte Vektor wurde auf gleiche Weise verdaut und das Vektorfragment mittels „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Kit nach Herstellerangaben aus einem Agarosegel isoliert. Das PCR-Produkt und das jeweilig Vektorfragment wurden anschließend ligiert. Die in Tab. 3.3 aufgeführten Oligonukleotidkassetten wurden analog zum in Kapitel 3.2.6 beschriebenen Vorgehen in den hergestellten Vektor eingefügt.

### 3.2.8. Herstellung weiterer Mutanten

#### Mutagenese durch überlappende Primer

Von den in Kapitel 3.2.6 und 3.2.7 beschriebenen Konstrukten wurden durch gerichtete Mutagenese zusätzliche Varianten hergestellt. Dazu wurde das „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Prod.-Nr. 200519, Fa. Agilent, Böblingen) eingesetzt. Zur Veränderung der DNA Sequenz der

**Tabelle 3.3.:** Zur Herstellung der *MalE*-TMD-sfGFP Konstrukte verwendete Oligonukleotidkassetten. Wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, wurde die TMD Sequenz mittels Kassettenklonierung inseriert. Um die Ligation der Kasette mit dem *NheI* und *BamHI* verdauten Vektor zu ermöglichen, wurden an den Termini zusätzliche Nukleotide angefügt. Für jedes Konstrukt sind Proteinsequenz der TMD, sowie die korrespondierenden sense (5'→3') und anti-sense (3'→5') Oligonukleotidsequenz angegeben. Die mit einem Stern gekennzeichneten Aminosäurereste weichen von der in UniProt hinterlegten Proteinsequenz ab.

Q6ZRP7	C V V L Y V A S S L F L M V M Y F F F A* 5'-ctagc TGC GTG GTG CTG TAT GTG GCA AGC TCT CTG TTT CTG ATG GTG ATG TAC TTC TTC TTC GCG gg-3' 3'-g ACG CAC CAC GAC ATA CAC CGT TCG AGA GAC AAA GAC TAC CAC TAC ATG AAG AAG AAG CGC ccctag-5'
GpA wt	L I I F G V M A G V I G T I L L I S Y 5'-ctagc CTG ATT ATT TTT GGC GTG ATG GCG GCG GTG ATT GGC ACC ATT CTG CTG ATT AGC TAT gg-3' 3'-g GAC TAA TAA AAA CCG CAC TAC CGC CCG CAC TAA CCG TGG TAA GAC GAC TAA TCG ATA ccctag-5'
GpA G83I	L I I F G V M A I V I G T I L L I S Y 5'-ctagc CTG ATT ATT TTT GGC GTG ATG GCG ATT GTG ATT GGC ACC ATT CTG CTG ATT AGC TAT gg-3' 3'-g GAC TAA TAA AAA CCG CAC TAC CGC TAA CAC TAA CCG TGG TAA GAC GAC TAA TCG ATA ccctag-5'
Phospho-lamban	F I W F C L I L I C L L L I C I I V M L 5'-ctagc TTC ATT AAC TTC TGC CTG ATT CTG ATT TGC CTG TTG CTG ATT TGC ATC ATT GTG ATG CTG gg-3' 3'-g AAG TAA TTG AAG ACG GAC TAA GAC TAA ACG GAC AAC GAC TAA ACG TAG TAA CAC TAC GAC ccctag-5'

**Tabelle 3.4.:** Zur Herstellung von Punktmutationen verwendete Mutageneseprimer. Gezeigt ist das jeweilige sense Oligonukleotid. Die anti-sense Oligonukleotide entsprechen dem reversen Komplement der Sequenzen. Nukleotide, die von der Wildtyp-Sequenz abweichen, sind unterstrichen.

Name	Sequenz
pToxRV Q6ZRP7 C1S	5'-C TTG GGG AAT CGA GCT AGC <u>TCC</u> GTG GTG CTG-3'
pToxRV Q6ZRP7 V2A	5'-CGA GCT AGC TGC <u>GCG</u> GTG CTG TAT GTG G-3'
pToxRV Q6ZRP7 V3A	5'-GCT AGC TGC GTG <u>GCG</u> CTG TAT GTG GCA AGC-3'
pToxRV Q6ZRP7 L4A	5'-GC TGC GTG GTG <u>GCG</u> TAT GTG GCA AGC TC-3'
pToxRV Q6ZRP7 Y5A	5'-GC GTG GTG CTG <u>GCT</u> GTG GCA AGC TCT CTG-3'
pToxRV Q6ZRP7 V6A	5'-C GTG GTG CTG TAT <u>GCG</u> GCA AGC TCT CTG TTT G-3'
pToxRV Q6ZRP7 A7L	5'-GC GTG GTG CTG TAT GTG <u>CTG</u> AGC TCT CTG TTT CTG ATG-3'
pToxRV Q6ZRP7 S8A	5'-G GTG CTG TAT GTG GCA <u>GCC</u> TCT CTG TTT CTG ATG G-3'
pToxRV Q6ZRP7 S9A	5'-G CTG TAT GTG GCA AGC <u>GCC</u> CTG TTT CTG ATG GTG-3'
pToxRV Q6ZRP7 L10A	5'-G TAT GTG GCA AGC TCT <u>GCG</u> TTT CTG ATG GTG ATG-3'
pToxRV Q6ZRP7 F11A	5'-G TAT GTG GCA AGC TCT CTG <u>GCG</u> CTG ATG GTG ATG TAC-3'
pToxRV Q6ZRP7 L12A	5'-CA AGC TCT CTG TTT <u>GCT</u> ATG GTG ATG TAC TTC TTC TTC GCG-3'
pToxRV Q6ZRP7 M13A	5'-GCA AGC TCT CTG TTT CTG <u>GCG</u> GTG ATG TAC TTC TTC TTC G-3'
pToxRV Q6ZRP7 V14A	5'-CA AGC TCT CTG TTT CTG ATG <u>GCG</u> ATG TAC TTC TTC TTC GCG-3'
pToxRV Q6ZRP7 M15A	5'-CT CTG TTT CTG ATG GTG <u>GCC</u> TAC TTC TTC TTC GCG-3'
pToxRV Q6ZRP7 Y16A	5'-C TCT CTG TTT CTG ATG GTG ATG <u>GCC</u> TTC TTC TTC GCG-3'
sfGFP G67A	5'-ACC ACC CTG ACC TAT <u>GCT</u> GTT CAG TGT TTC AGC CGT TAT

Matrizen-DNA wurden Oligonukleotide verwendet, die im Zentrum die gewünschte Mutation enthielten. Der restliche Teil der Oligonukleotide hybridisiert hingegen perfekt mit der Matrize. Alle Oligonukleotide wurden so entworfen, dass die basenpaarenden Bereiche eine Schmelztemperatur ( $T_m$ ) von  $\approx 78$  °C aufwiesen, soweit möglich der GC Gehalt bei etwa 40% lag und das 3'-Ende mit einem Purin endete. Schmelztemperaturen wurden mit „Oligo Calc“<sup>[179]</sup> (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) berechnet, wobei die  $T_m$  unter Einfluss von 50 mM Natrium im PCR Ansatz herangezogen wurde. Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen sind in Tabelle 3.4 festgehalten. Die Mutagenesereaktion wurde abweichend von den Angaben des Herstellers mit *PfuUltra* II Fusion HS DNA Polymerase (Prod.-Nr. 600672-51, Fa. Agilent) im entsprechenden 1x Reaktionspuffer durchgeführt und es wurden dNTPs (jeweils 10 mM) eines anderen Herstellers (Prod.-Nr. R0192, Fa. Fermentas) verwendet.



In 50  $\mu\text{L}$  1x Reaktionspuffer wurden 10 ng Matrizen-DNA, je 125 ng sense- und anti-sense Oligonukleotidprimer und je 200  $\mu\text{M}$  dNTPs gelöst. Nach Zugabe von 2,5 U Polymerase wurde die PCR mit dem Temperaturprofil

95 °C	30 s	
95 °C	30 s	
55 °C	60 s	x 16
68 °C	1 min/kb Plasmidlänge	
4 °C	$\infty$	

durchgeführt. Anschließend wurden dem Reaktionsansatz 10 U *DpnI* zugesetzt und für 1-2 h bei 37 °C inkubiert, um die methylierte Matrizen-DNA zu verdauen. Die in PCR-Reaktionen synthetisierte DNA ist nicht methyliert und blieb daher intakt. 2  $\mu\text{L}$  des Reaktionsansatzes wurden zur Transformation von 50  $\mu\text{L}$  elektrokompenter *E. coli* XL1-Blue eingesetzt (s. Kapitel 3.1.3). Die Zellen wurden anschließend auf LB-Agar Platten mit einem geeigneten Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Zur Amplifikation der Plasmid-DNA wurden je 5 mL Übernachtskultur mit einzelnen Kolonien inokuliert und die Plasmid-DNA am Folgetag präpariert. Der Erfolg der gerichteten Mutagenese wurde durch Sequenzierung der Plasmid-DNA bestätigt.

#### Mutagenese durch nicht-überlappende Primer

Die Verwendung nicht-überlappender Primer zur Mutagenese ist vielseitig einsetzbar. Die Insertion und Deletion größerer Bereiche ist dadurch leicht möglich. Bei der Herstellung des *malE*-TMD-sfGFP Gens wurde diese Methode zur Verkürzung des C-terminalen Linkers verwendet (s. Kapitel 3.2.7). Auch Punktmutationen sind auf diese Weise möglich. Überlappende Mutageneseprimer erzeugen einen großen Überhang, wodurch das PCR-Produkt hybridisieren und von der endogenen *E. coli* DNA Ligase nach Transformation zu einem zirkulären DNA-Molekül geschlossen werden kann. Im Falle von nicht-überlappenden Primern entstehen PCR-Produkte mit stumpfen Enden und ohne Phosphatrest am 5'-Ende. Daher muss vor der Ligation zusätzlich phosphoryliert werden.

Um die C1S Mutation in das *MalE*-TMD-sfGFP Protein mit QSOX2 TMD einzuführen, konnte nicht das Primerpaar aus Tab. 3.4 verwendet werden, da die flankierende Nukleotidsequenz für das *ToxR*-TMD-*MalE* Protein entworfen wurde. Die Mutation wurde daher mit Hilfe der PCR-Primer

sense: AGT GTG GTG CTG TAT GTG GCA AGC  
 anti-sense: GCT AGC TTC CGG TTC GCT AAA

und des Temperaturprofils

98 °C	30 s
98 °C	10 s
55 °C	20 s
72 °C	3,5 min
72 °C	5 min
4 °C	$\infty$

durchgeführt. Dabei wurden 0,5 U Phusion Polymerase in 1x HF + 3% DMSO verwendet. 5  $\mu$ L des PCR-Produkts wurden in 20  $\mu$ L 0,75x Tango Puffer + 5% PEG 4000 (Fa. Fermentas) + 0,5 mM ATP + 2,5 U T4 Polynukleotidkinase + 5 U T4 DNA Ligase gelöst. Das PCR Produkt wurde für 12 h bei 22 °C phosphoryliert und ligiert. Die Enzyme wurden durch Inkubation bei 75 °C für 10 min inaktiviert und die Matrizen-DNA durch Zugabe von 2,5 U *DpnI* und für 1 h bei 37 °C verdaut. 5  $\mu$ L des Ansatzes wurden zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue verwendet und die Mutation durch Sequenzierung überprüft.

### 3.2.9. Fluoreszenzmikroskopie

Nach Expression eines fluoreszierenden Proteins in *E. coli* wurden die Zellen für 3 min auf Eis abgekühlt und bei 4000 x g und 4 °C für 3 min sedimentiert. Die Zellen wurden zweimal in eiskaltem PBS gewaschen. Ein Aliquot wurde ausreichend hoch mit PBS verdünnt, 10  $\mu$ L davon auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen bedeckt.

Die Präparate wurden an einem BX51 Fluoreszenzmikroskop mit USH-1030L Quecksilberdampflampe (Fa. Olympus, Hamburg) und U-MNB2 Filtersatz (Exzitationfilter: BP470-490, Emissionsfilter: BA520IF, Dichroitischer Spiegel: DM500; Fa. Olympus) oder mittels Durchlichtbeleuchtung mit Phasenkontrast mikroskopiert. Dabei wurden Objektive des Typs UPlanFl mit den Vergrößerungsfaktoren 10, 20, 40 und 100 (Fa. Olympus) verwendet. Zur Aufnahme von mikroskopischen Bildern wurde eine CCD Kamera (Soft Imaging System F-View, Fa. Olympus) und die Software cell<sup>F</sup> (Fa. Olympus) eingesetzt.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden nach der Aufnahme dekonvolviert um Fluoreszenzlicht aus Ebenen ober- bzw. unterhalb der Fokusebene zu entfernen. Dazu wurde mittels des „Diffraction PSF 3D“ Plug-ins (<http://www.optinav.com/Diffraction-PSF-3D.htm>) für ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) zunächst eine „point spread function“ (PSF) erstellt, welche die resultierende Unschärfe für punktförmige Lichtquellen aufgrund physikalischer Eigenschaften des Präparats und Mikroskops widerspiegelt. Zur Berechnung der verwendeten PSFs wurden folgende Einstellungen verwendet: Brechungsindex: 1,518, Numerische Apertur: 1,3, Wellenlänge: 509 nm, longitudinale sphärische Aberation bei maximaler Apertur: 0 nm, Bildpixelabstand: 64,5  $\mu$ m/Vergrößerungsfaktor, Bildstapelabstand: 6,45  $\mu$ m/Vergrößerungsfaktor, Breite: 256 px, Höhe: 256 px, Tiefe: 1, Normalisierung: Summe der Pixel = 1.

Anschließend wurden die einzelnen Aufnahmen mit Hilfe des ImageJ Plug-ins „Iterative Deconvolution“ (<http://www.optinav.com/Iterative-Deconvolution.htm>) und unter Verwendung der entsprechenden PSF mit folgenden Einstellungen dekonvolviert: Operation: Deconvolve, Iterationsanzahl: 20, Durchmesser Low-pass Filter: 2 px, Monotone Dekonvolierung.

## 3.3. Protein- und Immunochemische Methoden

### 3.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts wurde die diskontinuierliche denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli<sup>[180]</sup> verwendet. Gele mit den Maßen 10 x 10 oder 20 x 10 cm wurden in einem kombinierten Gieß- und Laufstand (PerfectBlue Twin S oder PerfectBlue Twin ExW S; Prod.-Nr. 45-1010-C bzw. 45-2010-C, Fa. PEQLAB) hergestellt und verwendet.

#### Herstellung der Polyacrylamidgele

Vorder- und Rückplatten, sowie Abstandhalter mit 0,8 mm Dicke wurden mit 70% (v/v) Ethanol gereinigt und in den Gießstand eingespannt. Im Falle von einfachen Gelen wurde zunächst die Trenngellösung bestehend aus einer Acrylamid-Bisacrylamid Mischung (30% T, 37,5:1; Prod.-Nr. A0856, Fa. Applichem), Tris-HCl, SDS, N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED; Prod.-Nr. A1148, Fa. Applichem) und Ammoniumpersulfat (APS; Prod.-Nr. A2941, Fa. Applichem) entsprechend Tabelle 3.5 angesetzt. Nach dem Starten der Polymerisation durch Zugabe von APS, wurde die Lösung zu einer Höhe von 6 cm zwischen die Glasplatten gefüllt und mit etwas Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol entfernt, die Sammelgellösung auf das Trenngel geschichtet und ein Kamm zum Ausformen von Taschen eingesetzt. Nach Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel aus dem Gießstand entfernt, in feuchte Tücher eingeschlagen und zur Lagerung in Plastikbeuteln bei 4 °C aufbewahrt. Zur Herstellung von Gradientengelen wurden die Glasplatten aufrecht in einer Gießkammer angeordnet und von unten mit Gellösung befüllt. Um einen gleichmäßigen Fluss der Gellösung zu ermöglichen, wurde die Oberflächenspannung herabgesetzt, indem zunächst etwas Isopropanol eingefüllt wurde. Durch Zugabe von Saccharose (Prod.-Nr. A1125, Fa. Applichem) und etwas Bromphenolblau (Prod.-Nr. A1120, Fa. Applichem) zum 20% Trenngel wurde die nachträgliche Durchmischung des Gradienten verringert und die Qualität konnte während der Herstellung kontrolliert werden. Die 8% und 20% Trenngellösungen wurden in die Tanks eines Gradientenmischers (Prod.-Nr. 120.01, Fa. CTI GmbH, Idstein) gefüllt und langsam in die Gießkammer eingeleitet, wobei ein linearer Gradient geformt wurde. Das Trenngel wurde mit etwas Isopropanol überschichtet und auspolymerisiert. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt, die Sammelgellösung auf das Trenngel geschichtet und ein Kamm zum Ausformen von Taschen eingesetzt. Nach Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel aus dem Gießstand entfernt, in feuchte Tücher eingeschlagen und zur Lagerung in Plastikbeuteln bei 4 °C aufbewahrt.

**Tabelle 3.5.:** Zusammensetzung von 10 mL Gellösung für die denaturierende SDS-PAGE. APS wurde erst unmittelbar vor dem Gießen des jeweiligen Gels zugegeben.

Komponente	einfache Gele			Gradientengele		
	Sammelgel 5%	Trenngel 10%    14%		Sammelgel 4%	Trenngel 8%    20%	
30% Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1)	1,7 mL	3,3 mL	4,7 mL	1,3 mL	2,6 mL	6,5 mL
1,5 M Tris (pH 8,8)	-/-	2,5 mL	2,5 mL	-/-	2,5 mL	2,5 mL
1,5 M Tris (pH 6,8)	1,3 mL	-/-	-/-	1,3 mL	-/-	-/-
10% (w/v) SDS	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Saccharose	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	5% (w/v)
H <sub>2</sub> O	6,8 mL	4,0 mL	2,6 mL	7,2 mL	4,8 mL	ad 10 mL
TEMED	10 µL	4 µL	4 µL	10 µL	20 µL	20 µL
10% (w/v) APS	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	50 µL	50 µL

### Probenvorbereitung

Übernachtukturen von *E. coli* wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und bei 11000 x g und 4 °C für 1 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in einem halb so großen Volumen an eiskaltem DNase Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 100 µM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MnCl<sub>2</sub>) + 350 Kunitz Units/mL DNase I (Prod.-Nr. A3778, Fa. Applichem) resuspendiert und auf Eis gehalten. Die Zellen wurden mittels Ultraschall in einem Becher-Resonator (Prod.-Nr. 101-147-046, Fa. Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) und kompatibelem Ultraschallgenerator Sonifier 450 (Prod.-Nr. 101-063-199, Fa. Branson Ultrasonics) bei 80% Amplitude und 80% Arbeitsphase für 3 min unter Kühlung mit Eiswasser aufgeschlossen. Zum Verdau der freigesetzten DNA wurden die Proben 15 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden mit 5x Laemmli Probenpuffer (20% (v/v) Glycerol, 10 mM DTT (Prod.-Nr. A1101, Fa. Applichem), 10% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 200 mM Tris-HCl pH 6,8) auf eine Endkonzentration von 1x Probenpuffer eingestellt und für 5 min bei 80 °C denaturiert. Die Proben wurden zur sofortigen Verwendung auf RT abgekühlt oder zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

### Durchführung

Für die Durchführung der Elektrophorese wurde ein Polyacrylamidgel in den Laufstand eingespannt und die Elektrodentanks mit 1x Laemmli Laufpuffer (2 mM Tris, 19,2 mM Glycin (Prod.-Nr. A1067, Fa. Applichem), 0,01% (w/v) SDS) befüllt. Der Kamm wurde aus dem Sammelgel entfernt und die Taschen mit Laufpuffer gespült. Die Proben wurden in die Taschen des Sammelgels geladen und die Elektrophorese bei konstant 120 V bis zum Austritt der Lauffront durchgeführt. Als Größenstandards dienten „PageRuler Unstained Protein Ladder“ (Prod.-Nr. 26614, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oder „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Prod.-Nr. 26616, Fa. Thermo Fisher Scientific).

### 3.3.2. Western-Blotting und Immundetektion

Zum Transfer von Proteinen aus SDS-PA Gelen auf Nitrozellulosemembranen wurde eine Halbtrockenzelle (Modell SD 1; Fa. CTI, Idstein) verwendet. Filterpapier (Prod.-Nr. 2.508.580600, Fa. Munktell, Bärenstein) und Nitrozellulosemembran (Hybond-C Extra, RPN203E; Fa. Amersham Biosciences) auf die Maße des PA-Gels zugeschnitten und in Transferpuffer (1x Laemmli-Puffer + 20% (v/v) Methanol (Prod.-Nr. A2954, Fa. Applichem)) getränkt. Vier Lagen Filterpapier wurden übereinander auf die Anode der Halbtrockenzelle geschichtet. Hierauf wurde erst das Polyacrylamidgel und dann die Membran gelegt. Weitere vier Lagen Filterpapier wurden auf den Stapel gelegt und Luftblasen durch Ausrollen mit einer Glaspipette herausgedrückt. Die Kathode wurde auf den Stapel gesetzt und mit einem gefüllten Gefäß beschwert. Die Proteine wurden bei 1 mA/cm<sup>2</sup> für 1,5 h auf die Membran übertragen.

Zur Fixierung und Detektion der auf die Nitrozellulose transferierten Proteine wurde die Membran 1 min in Ponceau S Lösung (0,3% (w/v) Ponceau S (Prod.-Nr. A1405, Fa. Applichem), 3% (v/v) Trichloressigsäure (Prod.-Nr. A1431, Fa. Applichem)) inkubiert. Die Membran wurde in entionisiertem Wasser entfärbt, bis ein optimaler Kontrast zwischen Banden und Hintergrund erreicht war. Die gefärbte Membran wurde dokumentiert und anschließend Spuren und die Banden des Protein-Größenstandards mit einem Bleistift markiert. Die Membran wurde mit entionisiertem Wasser entfärbt und unspezifische Bindestellen durch Inkubation in TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) + 3% Milchpulver (Prod.-Nr. A0830, Fa. Applichem) über Nacht bei 4 °C auf einem Kippschüttler abgesättigt. Die Membran wurde 5 min in TBS gewaschen. Als primäre Antikörper wurden Maus anti-FLAG oder Kaninchen anti-*MalE* (Prod.-Nr. E8030S, Fa. NEB, Frankfurt am Main) Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in TBS + 3% Milchpulver eingesetzt. Pro 10 cm<sup>2</sup> Membran wurde 1 mL Antikörperlösung zugegeben und auf einem Kippschüttler für 1 h inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in TBS-T (TBS + 0,5% (v/v) Tween 20 (Prod.-Nr. A1389, Fa. Applichem)) für je 5 min entfernt. Als sekundäre Antikörper wurden entweder Ziege anti-Maus IgG Alkalische Phosphatase konjugiert (Prod.-Nr. S3721; Fa. Promega, Mannheim) oder Ziege anti-Kaninchen IgG Alkalische Phosphatase konjugiert (Prod.-Nr. S3731, Fa. Promega) in einer Verdünnung von 1:10000 in TBS + 3% Milchpulver verwendet. Pro 10 cm<sup>2</sup> Membran wurde 1 mL Antikörperlösung zugegeben und auf einem Kippschüttler für 1 h inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in TBS-T für je 5 min entfernt. Der sekundäre Antikörper wurde in frisch hergestellter Entwicklerlösung (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,03% (w/v) NBT (Prod.-Nr. A1243, Fa. Applichem), 0,015% (w/v) BCIP (Prod.-Nr. A1117, Fa. Applichem)) durch Bildung eines farbigen Präzipitates detektiert. Die Färbereaktion wurde durch Waschen der Membran in entionisiertem Wasser gestoppt. Nach dem Trocknen der Membran auf Filterpapier wurde diese dokumentiert.

### 3.4. Analyse selbstinteragierender Transmembrandomänen

#### 3.4.1. Selbstinteraktion (ToxR-Assay)

Die Fähigkeit von TMDn zur Selbstinteraktion wurde mit Hilfe des ToxR-Assays<sup>[146,181]</sup> bestimmt. Dazu wurden Zellen des Reporterstammes *E. coli* FHK12 (*ara*  $\Delta$ (*lac-proAB*) *rpsL*  $\phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15 *attB::*(*ctx::lacZ*) [*F'* *lacI*<sup>q</sup> *lacZ* $\Delta$ M15, *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup>])<sup>[181]</sup> mit einem der unter Kapitel 3.2.6 beschriebenen pToxRV Plasmide chemisch transformiert. Ein Glasröhrchen mit 5 mL LB-Medium + Kanamycin + 0,0025% Arabinose (Prod.-Nr. A3256, Fa. Sigma-Aldrich) + 0,4 mM IPTG (Prod.-Nr. A1008, Fa. Applichem) wurde mit 10  $\mu$ L Transformationsansatz angeimpft und 16 h in einem Drehrad bei 37 °C inkubiert. Z-Puffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7,0, autoklaviert; s. Ref.<sup>[154]</sup>) + 10% (v/v) Chloroform (Prod.-Nr. A1585, Fa. Applichem) und 1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol (Prod.-Nr. A1108, Fa. Applichem) wurde 60 s durch Vortexen gemischt und nach 5 min die untere Chloroformphase verworfen. 10  $\mu$ L der Übernachtskultur wurden in eine Kavität einer 96-well Mikrotiterplatte (Prod.-Nr. 82.1581, Fa. Sarstedt) überführt und mit 100  $\mu$ L des Chloroform-haltigen Z-Puffers versetzt, um die Zellen zu fixieren. Die Zelldichte wurde durch Messen der OD<sub>600</sub> in einem ELISA Plattenlesegerät (VersaMmax, Fa. Molecular Devices, Biberach an der Riss) bestimmt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 50  $\mu$ L Z-Puffer + 1,6% (w/v) SDS für 10 min bei 28 °C lysiert. Nach Zugabe von 50  $\mu$ L Z-Puffer + 0,4% (w/v) o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (Prod.-Nr. A1272, Fa. Applichem) wurde über einen Zeitraum von 20 min die OD<sub>405</sub> im Abstand von 30 s bestimmt. Die spezifische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase im Zelllysate wurde als Miller Units =  $1000 \times \frac{V_{max}}{OD_{600}}$  berechnet, wobei  $V_{max}$  der initialen maximalen Steigung der mittels OD<sub>405</sub> gemessenen Enzymkinetikkurve und OD<sub>600</sub> der Zelldichte vor dem Lysieren entspricht<sup>[154]</sup>. Für jede zu testende TMD Sequenz wurden drei unabhängige Transformationen durchgeführt, von denen jeweils vier parallele  $\beta$ -Galaktosidase Tests durchgeführt wurden. Als Leerwert wurden anstelle einer Übernachtskultur 10  $\mu$ L LB-Medium verwendet. Die Berechnung der Miller Units erfolgte mit Hilfe der Software „Softmax Pro 5.0.1“ (Fa. Molecular Devices). Weitere Auswertungen wurden mit der Statistiksoftware/-sprache R (Version 2.13.0, s. Ref.<sup>[182]</sup>) durchgeführt.

#### 3.4.2. Membraninteraktion (PD28-Assay)

Zur Kontrolle der Membranintegration der *ToxR*-TMD-*MalE* und *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsproteine wurde der PD28-Assay<sup>[183]</sup> durchgeführt. PD28 Zellen (*F*<sup>-</sup> *thiA* *relA* *araD*139  $\Delta$ *lacU*169 *rpsL* *malT*<sup>c1</sup>  $\Delta$ *malE*  $\Delta$ (*srlR-recA*)306::*Tn10*, s. Ref.<sup>[184]</sup>) wurden mit einem der in Kapitel 3.2.6 beschriebenen pToxRV Plasmide chemisch transformiert. Ein Glasröhrchen mit 5 mL LB-Medium + Kanamycin wurde mit 10  $\mu$ L Transformationsansatz angeimpft und 16 h in einem Drehrad bei 37 °C inkubiert. Die Zellen aus 2 mL Kultur wurden durch Zentrifugation bei 1500 x g für 10 min bei 4 °C sedi-

mentiert und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 800  $\mu\text{L}$  PBS resuspendiert. Zwei Glasröhrchen mit je 5 mL Minimalmedium (47,7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 22 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Prod.-Nr. 4873, Fa. Merck), 8,6 mM NaCl, 18,7 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Prod.-Nr. A0984, Fa. Applichem), 0,4% Maltose (Prod.-Nr. A3891, Fa. Applichem), 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Thiamin (Prod.-Nr. T-4625, Fa. Sigma-Aldrich)) + Kanamycin wurden mit jeweils 20  $\mu\text{L}$  Zellsuspension inokuliert und in einem Drehrad bei 37 °C inkubiert. Nach 16 und 22 h Inkubation wurde die Zelldichte bestimmt. Dazu wurden jeweils 200  $\mu\text{L}$  Kultur in eine Kavität einer 96-well Mikrotiterplatte überführt und die  $\text{OD}_{600}$  im ELISA Mikrotiterplattenleser gemessen. Die Verdoppelungszeit der transformierten Zellen wurde durch  $\frac{\log_2 \text{OD}_{600,22h} - \log_2 \text{OD}_{600,16h}}{360 \text{ min}}$  berechnet.

### 3.4.3. Fluoreszenzanisotropie

#### Nachweis von Oligomerisierung im 96-well Format

*E. coli* FHK12 Zellen wurden mit einem Vektor zur Expression des *malE*-TMD-sfGFP Gens transformiert und der Transformationsansatz auf LB-Agar + Kanamycin ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert, bis die Kolonien eine angemessene Größe erreicht hatten. Für jede zu testende TMD wurden vier Glasröhrchen mit 5 mL LB + Kanamycin + 0,4% Glucose befüllt und mit je einer Kolonie inokuliert. Die Glasröhrchen wurden für etwa 4 h bei 37 °C und 160 rpm in einem Drehrad inkubiert, bis sich eine merkliche Trübung einstellte. Die Kulturen wurden auf Eis abgekühlt und die Zellen in 2 mL Reaktionsgefäßen bei 4000  $\times$  g und 4 °C für 3 min sedimentiert. Falls nötig wurde mehrmals übereinander zentrifugiert, um eine ausreichende Menge an Zellen zu ernten. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit 500  $\mu\text{L}$  eiskaltem PBS (PBS für die Durchflusszytometrie; Prod.-Nr. A1286301, Fa. Life Technologies) gewaschen. Letztlich wurden die Zellen in eiskaltem PBS (für die Durchflusszytometrie) + 0,02% Arabinose resuspendiert und mit selbigen Puffer verdünnt, um eine  $\text{OD}_{600} = 1,0$  einzustellen. Die  $\text{OD}_{600}$  jeder Probe nach Verdünnung ( $\text{OD}_{600 \text{ raw}}$ ) wurde in einem ELISA Plattenlesegerät gemessen. Je 100  $\mu\text{L}$  jeder Probe wurden in eine Kavität einer 96-well Platte aus schwarzem Plastik (Prod.-Nr. 237108, Fa. Thermo Fisher Scientific) überführt.

Die Proben wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzpolarimeters (POLARstar Omega, Fa. BMG Labtech, Ortenberg) analysiert. Dazu wurde das Gerät auf 27 °C temperiert und ein Verstärkungsfaktor von 2400 im parallelen und antiparallelen Kanal verwendet. Für die Detektion von GFP-Fusionsproteinen wurde bei 485 nm angeregt (485 BP 12, Prod.-Nr. BMG 1114A, Fa. BMG Labtech) und die Emission bei 520 nm (EM 520, Prod.-Nr. BMG 1119A, Fa. BMG Labtech) beobachtet. Die Fluoreszenz der Proben wurde in einem Zeitraum von 4 h im Intervall von 5 min gemessen. Vor jeder Messung wurde die Platte für 30 s bei 700 rpm mit einer Doppelorbitalbewegung geschüttelt, um ein Absetzen der Zellen zu verhindern. Zu jedem Messzeitpunkt  $t$  wurde die Fluoreszenzintensität  $I_{\parallel}$  im parallelen und  $I_{\perp}$  im antiparallelen Fluoreszenzkanal gemessen. Diese Wertepaare werden im folgenden

als Vektoren  $\vec{I}_{\text{roh}}(t)$  und die Gesamtheit aller Vektoren einer Probe als  $\vec{I}_{\text{roh}}$  betrachtet.

Zunächst wurden die gemessenen Fluoreszenzwerte anhand der Zellanzahl zu Beginn der Messung normalisiert. Dazu wurden die Rohdaten  $\vec{I}_{\text{roh}}$  jeder Probe anhand der Abweichung der  $\text{OD}_{600 \text{ roh}}$  vom beabsichtigten Wert ( $\text{OD}_{600} = 1,0$ ) mittels der Formel

$$\vec{I}_{\text{norm}} = \vec{I}_{\text{roh}} \cdot \frac{1,0}{\text{OD}_{600 \text{ roh}}} \quad (3.1)$$

korrigiert.

Anschließend wurde für jeden Zeitpunkt der Leerwert  $\vec{I}_{\text{norm, leer}}(t)$  bestimmt, indem die  $\vec{I}_{\text{norm}}(t)$  der nicht-fluoreszierenden GpA G83I + sfGFP G67A Proben arithmetisch gemittelt wurden. Die eigentliche sfGFP Fluoreszenz  $\vec{I}_{\text{real}}$  der restlichen Proben, wurde durch

$$\vec{I}_{\text{real}}(t) = \vec{I}_{\text{norm}}(t) - \vec{I}_{\text{norm, leer}}(t) \quad (3.2)$$

bestimmt.

Aus diesen Fluoreszenzintensitäten könnte die Anisotropie  $r(t)$  mittels Formel 1.3 berechnet werden. Allerdings entspricht das Verhältnis zwischen parallelem und antiparallelem Kanal nicht dem tatsächlichen Wert. Dies ist z.B. auf eine nicht ideale Ausrichtung der Polarisationsfilter zurückzuführen. Um korrekte Anisotropiewerte berechnen zu können, wurde daher der Gerätefaktor  $G$  bestimmt. Dazu wurden 100  $\mu\text{L}$  einer 10 nM Lösung Uranin (Fluorescein-Dinatriumsalz; Prod.-Nr. 103992, Fa. Merck) in PBS unter den oben genannten Bedingungen gemessen. Als Leerwert wurden 100  $\mu\text{L}$  PBS verwendet und deren Hintergrundfluoreszenz vor der Berechnung der Anisotropie subtrahiert. Die zu erwartende Anisotropie für dieses Fluorophor beträgt  $r = 0,014775$  (entspricht  $P = 0,022$ )<sup>[185]</sup>. Durch Umformen der Formel 1.3 nach  $G$  und Einsetzen der für Fluorescein gemessenen  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  kann der Gerätefaktor bestimmt werden. Parallel zu jeder Messreihe wurde der Gerätefaktor ermittelt und die Messwerte entsprechend korrigiert.

### Bestimmung des Oligomerisierungsgrads

Wie oben beschrieben, wurden *E. coli* FHK12 Zellen mit Vektoren zur Expression des *malE*-TMD-sfGFP Gens transformiert. Die monoklonalen Kulturen wurde in einem Glasröhrchen mit 5 mL LB + Kanamycin + 0,4% Glucose für etwa 4 h bei 37 °C und 160 rpm in einem Drehrad inkubiert, bis sich eine merkliche Trübung einstellte. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von Arabinose in einer Endkonzentration von 0,1% induziert. Die Kulturen wurde weitere 2 h bei 37 °C und 160 rpm inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden in 2 mL Reaktionsgefäßen bei 4000 x g und 4 °C für 3 min sedimentiert. Falls nötig wurde mehrmals übereinander zentrifugiert, um eine ausreichende Menge an Zellen zu ernten. Die Zellen wurden anschließend zweimal



mit 500  $\mu\text{L}$  eiskaltem PBS (PBS für die Durchflusscytometrie) + 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Chloramphenicol gewaschen. Letztlich wurden die Zellen in eiskaltem PBS (für die Durchflusscytometrie) + 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Chloramphenicol resuspendiert und mit selbigem Puffer verdünnt, um eine  $\text{OD}_{600} = 1,0$  einzustellen. Jede Probe wurde in eine transparente Plastikkuvette (10x10x48 mm; Prod.-Nr. 67.755, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) überführt, diese in reflektierende Aluminiumfolie eingewickelt und nur der obere Zugang ausgespart. Die Küvetten wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Zur Messung wurde eine Küvette in der temperierbaren Küvettenhalterung eines RF-1501 Fluoreszenzspektrophotometer (Prod.-Nr. 206-62901-34, Fa. Shimadzu, Kyoto, Japan) auf RT gehalten und mit einem Magnetrührer durchmischt. In der über dem Küvettenhalter gelegenen Zugangsöffnung wurde eine 1 W Laserdiode mit Emission bei 445 nm installiert. Zu Beginn der Messung wurden 100  $\mu\text{L}$  Kultur in eine Kavität der 96-well Platte überführt und mit Hilfe eines Fluoreszenzpolarimeters die Gesamtfluoreszenzintensität und Anisotropie vor dem Bleichen der Fluorophore bestimmt. Das Aliquot wurde wieder in die Küvette überführt und die Probe für wenige Sekunden mit defokussiertem Laserlicht bestrahlt. Dabei wurde eine Ausgangsleistung von etwa 300 mW verwendet. 100  $\mu\text{L}$  der teilweise gebleichten Probe wurden in die 96-well Platte überführt und die resultierende Gesamtfluoreszenzintensität und Anisotropie bestimmt. Das Aliquot wurde wieder in die Küvette überführt. Der Vorgang aus Bleichen und Messen der Probe wurde so lange wiederholt, bis die Gesamtfluoreszenzintensität unter 50% des Ausgangswertes gefallen war. Der Gerätefaktor wurde, wie oben beschrieben, bestimmt und alle Messdaten entsprechend korrigiert. Zur Bestimmung des Leerwerts wurde das nicht-fluoreszierende *MalE*-TMD-sfGFP GpA G83I + sfGFP G67A Protein verwendet.

## 3.5. Bioinformatische Methoden

### 3.5.1. Sequenzdaten

Der UniProtKB Datenbank (Stand Februar 2011, s. Ref.<sup>[186]</sup>) wurden alle Einträge entnommen, welche als „single-pass membrane protein“ im „general annotation (comments)“ Feld annotiert waren (21227 verbliebene Einträge). Die resultierende Datenbank wurde entsprechend dem „organism“ Abschnitt im „names and origin“ Feld auf menschliche Proteine eingegrenzt (2334 verbliebene Einträge). Für jedes menschliche bitopische Protein wurden mit Hilfe von SIMAP<sup>[187]</sup> homologe Proteine in anderen *Chordata* identifiziert. Die Suche wurde auf Proteine aus der RefSeq Datenbank<sup>[188]</sup> mit einem  $e$ -Wert  $\leq 10^{-40}$  und einer „alignment score“  $\geq 200$  beschränkt. Für jedes humane Protein wurden maximal 2000 homologe Proteine zur weiteren Analyse verwendet. SIMAP Daten enthalten Vorhersagen über mögliche Transmembrandomänen durch „PHOBIUS“<sup>[189]</sup>. Die Sequenz der TMD jedes humanen Proteins und seiner homologen Proteine wurde in FASTA-formatierten Dateien zusammengefasst. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms „ClustalW“ (Version 2.0.12,

s. Ref.<sup>[190]</sup>) unter Verwendung der PHAT Austauschmatrix<sup>[191]</sup> aligniert. Dabei wurde der Strafterm für das Einfügen oder Entfernen von Leerstellen auf den Wert 100 gesetzt. Spalten mit  $\geq 25\%$  Gaps am Anfang und Ende der Alignments wurden entfernt. Um Redundanzen zu vermeiden, wurden Alignments entfernt, die neben der humanen Suchsequenz zusätzliche Proteine aus dem initialen Datensatz humaner Proteine enthielten (1136 verbliebene Einträge). Abschließend wurden Alignments mit weniger als fünf Sequenzen verworfen (1067 verbliebene Einträge). Ausgehend von diesem finalen Datensatz wurde durch Permutation der Einzelsequenzen ein randomisierter Testdatensatz erstellt.

### 3.5.2. Konserviertheitsmoment

Für jede Spalte eines Sequenzalignments wurde die relative Häufigkeit jedes Aminosäurerestes bestimmt. Die relative Häufigkeit der am meisten auftretenden Aminosäure wurde als Konserviertheit der jeweiligen Spalte (% Identität) übernommen. Als Sekundärstruktur der TMD Sequenzen wurde eine ideale  $\alpha$ -Helix mit einem Winkel von  $100^\circ$  zwischen benachbarten Aminosäureresten angenommen. Die Spalten der Sequenzalignments wurden entsprechend dieser Annahme in zwei Gruppen eingeteilt, die einem gedachten Schnitt der  $\alpha$ -Helix entlang ihrer Achse entsprechen, sodass die Aminosäurereste auf zwei Seiten verteilt werden. Die durchschnittliche Konserviertheit beider Helixseiten wurde ermittelt und die absolute Differenz zwischen diesen berechnet. Alle möglichen Aufteilungen der  $\alpha$ -Helix wurden durch Verwendung eines gleitenden Ausschnitts mit der Länge von 12 Aminosäureresten bestimmt. Die größte Differenz wurde als Konserviertheitsmoment (KM) der Sequenz betrachtet.

### 3.5.3. Positionsabhängige Aminosäurehäufigkeiten

#### Konservierte vs. nicht-konservierte Helixseite

Die Aminosäurehäufigkeiten auf der konservierten oder nicht-konservierten Seite der gedachten  $\alpha$ -Helix wurde für jedes Sequenzalignment anhand des gleitenden Ausschnitts mit dem maximalen KM bestimmt. Die Häufigkeit der Aminosäuren wurde jeweils auf die Anzahl pro Helixseite, sowie die Anzahl der Sequenzen pro Sequenzalignment normalisiert. Die relativen Häufigkeiten der Aminosäuren für beide Helixseiten wurden anschließend über alle Sequenzalignments gemittelt und das Verhältnis von konservierter zu nicht-konservierter Seite für jede Aminosäure bestimmt. Die Sequenzalignments wurden hundertmal randomisiert und jeweils die relativen Aminosäurehäufigkeiten wie beschrieben berechnet. Aus den gemittelten Ergebnissen wurde das Verhältnis von konservierter zu nicht-konservierter Seite für jede Aminosäure bestimmt. Durch Bildung des Quotienten aus den zuvor ermittelten Verhältnisse von natürlichen und gemittelten randomisierten Sequenzen

konnten Aminosäure-spezifische Verhältnisse ermittelt werden, die unabhängig von der Häufigkeit und der Größe der Helixseiten sind.

### Relativ zum Zentrum der TM-Helix

Die relative Häufigkeit der verschiedenen Aminosäuren wurde über alle Sequenzalignments bestimmt. Dabei wurden die Aminosäurehäufigkeiten jeder Spalte relativ zur Mitte der Sequenz summiert, auf die Anzahl der Sequenzen normalisiert und die normalisierten Werte über alle Sequenzalignments gemittelt. Zusätzlich wurde die positionsabhängige relative Häufigkeit der verschiedenen Aminosäuren für Reste auf den konservierten Helixseiten bestimmt. Ausschließlich Teilsequenzen mit maximalem KM wurden in die oben beschriebene Auswertung einbezogen, wobei die Position relativ zur Mitte der Ursprungssequenz beachtet wurde.

### 3.5.4. Moleküldynamiksimulation

#### Startkonfiguration

Um mögliche Oligomerstrukturen einer TMD Sequenz zu bestimmen, wurde die „global molecular dynamics search“ (GMDS) Methode angewendet. Die Anwendung erfolgte mit Hilfe der „CNS searching of helix interactions (CHI, Version 1.1)“ Skriptsammlung<sup>[192]</sup>. Dabei nutzt CHI als Backend für die MD Simulationen das „crystallography and NMR system“ (CNS, Version 1.2)<sup>[193]</sup>. Die Methode wurde entsprechend des Protokolls in Ref.<sup>[194]</sup> und unter Nutzung des Perl Skripts `ak_cluster.pl` der Autoren durchgeführt.

Die Primärsequenz

L<sub>663</sub>CVVLYVASSLFLMVMYFF<sub>681</sub>

der QSOX2 TMD wurde in eine ideale  $\alpha$ -helikale Proteinstruktur umgesetzt und daraus ein symmetrisches Dimer, Trimer oder Tetramer aufgebaut. Ausgehend von den parallel orientierten Startstrukturen mit einem anfänglichen Helixabstand von 10,4 Å wurde jeweils ein links- und ein rechtsgängiger Komplex mit  $\Omega \pm 25^\circ$  erstellt (Skript „chi\_create“). Anschließend wurde die initiale Helixrotation  $\varphi$  in  $10^\circ$ -Schritten variiert, sodass sich jeweils unterschiedliche Helixseiten berührten. Aufgrund der zwei Kreuzungswinkel und der  $360^\circ/10^\circ = 36$  initialen Helixrotationen ergaben sich jeweils 72 Startstrukturen. Ausgehend von jeder Startstruktur wurden vier kurze MD Simulationen *in vacuo* im kartesischen Modus von CNS durchgeführt (Skript „chi\_search“). Anschließend wurde die strukturelle Ähnlichkeit der Einzelsimulationen durch Berechnung der RMSD Werte zwischen allen Strukturen ermittelt (Skript „chi\_rmsd“). Um mögliche Kandidatenstrukturen zu ermitteln, wurden die Einzelstrukturen auf Basis ihrer RMSD Werte gruppiert. Es wurden Cluster aus den finalen Strukturen gebildet, wenn mindestens neun davon  $\leq 1$  Å RMSD Unterschied zueinander aufwiesen (Skript

„ak\_cluster.pl“). Für jedes Cluster wurde eine gemittelte Struktur (Skript „chi\_average“) erstellt. Sowohl für die Ergebnisse der einzelnen Simulationen, als auch für die gemittelten Strukturen wurde die Energie der resultierenden Struktur ermittelt (Skript „chi\_interaction“). Die Daten wurden anschließend zur weiteren Auswertung aufbereitet (Skript „chi\_plot -xaxis phi1 -yaxis energy“).

### Erzeugen der MD Simulation

Für die MD Simulation eines TMD Oligomers des QSOX2 Proteins wurden die Strukturdaten einer vorangegangenen GMDS Analyse verwendet (s. Kapitel 3.5.4 und 4.2.2). Die Helices wurden mit Hilfe von VMD in separate PDB Dateien getrennt. Jede Helix wurde mittels des CHARMM Skripts A.2 um flankierende Reste der Originalsequenz ergänzt. Dadurch verlängerte sich die Polypeptidsequenz auf

S<sub>657</sub>SLDMSLCVVLYVASSLFLMVMYFFFRVRSR<sub>687</sub>,

wobei ursprünglich enthaltene Reste unterstrichen sind. Die zusätzlichen Reste wurden dabei in  $\alpha$ -helikaler Form angefügt. Die erweiterten Helices wurden mittels des VMD Skripts A.3 wieder zu einer einzigen Struktur zusammengefügt.

Eine Lipidmembran der Fläche  $69 \times 69 \text{ \AA}$  wurde mit Hilfe des „Membrane Builder“<sup>[195,196]</sup> des Web-Dienstes CHARMM-GUI<sup>[197]</sup> erstellt. Um Artefakte durch geladene Termini der Peptide zu vermeiden, wurde der N-Terminus acetyliert („ACE“) und der C-Terminus methyliert („CT3“). Das TMD Dimer wurde mittels der „Replacement method“ des „Membrane Builder“ in die Lipidmembran eingesetzt. Dabei wurden Platzhalter der späteren Lipide, welche mit den Polypeptiden überlappen, gelöscht. Die übrigen Platzhalter wurden schließlich durch zufällige Lipidstrukturen ersetzt. Hierfür wurde eine vereinfachte Lipidzusammensetzung in Anlehnung an ER Membranen aus der Rattenleber<sup>[198]</sup> und die asymmetrische Verteilung in der Plasmamembran von Erythrozyten<sup>[199]</sup> gewählt:

Lipid	innere Halbmembran	äußere Halbmembran
POPC	22	64
POPE	28	8
POPS	22	0
Cholesterol	8	8

Anschließend wurde das System solvatisiert, indem mindestens  $15 \text{ \AA}$  Wasser über Protein und Membran in  $\pm Z$  Richtung eingefügt wurden. Wassermoleküle wurden zufällig durch Kalium- oder Chloridionen ersetzt, um eine Endkonzentration von  $150 \text{ mM}$  KCl und eine neutrale Gesamtladung zu erreichen.

## Durchführung

Sowohl Minimierung, Äquilibrierung als auch die eigentliche Simulation der QSOX2 TMD in einer Lipidmembran wurden am Leibniz-Rechenzentrum der Bayerischen Akademie der Wissenschaften (LRZ) in Garching bei München durchgeführt. Dazu wurde NAMD (Version 2.7b2)<sup>[200]</sup> auf 32 Kernen des ALTIX Linux Clusters oder des SGI Ultraviolet Clusters verwendet. Alle Simulationen wurden unter periodischen Randbedingungen und mit der Particle-Mesh-Ewald-Methode (PME) zur Berechnung elektrostatischer Wechselwirkungen durchgeführt. Bis zu einer Entfernung von 12 Å wurden elektrostatische Wechselwirkungen zu jedem Zeitschritt berechnet. Im Falle von größeren Entfernungen (z.B. Atome aus benachbarten periodischen Boxen) berechnete NAMD die Wechselwirkung nur periodisch und integriert diese über mehrere Zeitschritte. Van-der-Waals Wechselwirkungen wurden bis zu einer Entfernung von 12 Å berechnet, wobei ab 10 Å eine Abschaltfunktion verwendet wurde, die das Potential langsam gegen 0 führt. Die Temperatur wurde mittels eines Langevin Thermostats bei 310,15 K gehalten. Die Länge kovalenter Bindungen zu Wasserstoffatomen wurde mittels des SHAKE Algorithmus konstant gehalten. Die Bindungen in Wassermolekülen wurden hingegen durch den schnelleren SETTLE Algorithmus beschränkt. Das CHARMM Kraftfeld („CHARMM22 All-Hydrogen“) für Proteine<sup>[201,202]</sup> und Lipide<sup>[203–205]</sup> wurde um die Parametrisierung von Cholesterol aus Ref.<sup>[206]</sup> erweitert und in den Simulationen angewendet.

Das System wurde nach dem Schema in Tab. 3.6 minimiert und schrittweise äquilibriert. Zunächst wurde das System mit konstantem Volumen (NVT Ensemble) und ab Schritt 3 der Äquilibrierung bei konstantem Druck von 1,01325 bar durch Verwendung eines Nosé-Hoover Langevin Piston Barostat (NPT Ensemble) simuliert. Im Fall des NPT Ensembles wurde das Verhältnis der Größe des Systems in X-Y Richtung (senkrecht zum Membrannormal) ebenfalls konstant gehalten. Letztlich wurde das System ohne Beschränkungen für 100 ns mit 2 fs/Zeitschritt simuliert und der Zustand alle 5 ps zur späteren Auswertung gespeichert.

## Auswertung

Trajektorien des simulierten Systems wurden mit Hilfe der Programme VMD (Version 1.9.1, s. Ref.<sup>[207]</sup>) und R (Version 2.13.0, s. Ref.<sup>[182]</sup>) ausgewertet. Das Auftreten von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den TM Helices wurde mittels des VMD „Hydrogen Bonds“ Plug-ins (Version 1.2) ermittelt. Als Schwellenwerte wurden eine Maximaldistanz von 3,0 Å (Donor-Akzeptor) und ein zulässiger Winkel (Donor-H-Akzeptor) von  $180 \pm 60^\circ$  verwendet. Die Distanz der TM Helices über die Simulationszeit wurde anhand des Skriptes A.4 ermittelt. Dazu wurde für jede Helix das geometrisch Zentrum der C<sub>α</sub>-Atome von Tyr<sub>5</sub> bis Tyr<sub>16</sub> bestimmt und deren Abstand ermittelt. Zur Bestimmung von Helix-Helix-Kontakten wurde das Skript A.5 verwendet. Dabei wurden für jeden Zeitschritt die Distanzen aller Atome in den Aminosäureseitenketten von einer TM Helix zur anderen bestimmt.

**Tabelle 3.6.:** Strategie zur Minimierung und Äquilibration der in MD Simulationen eingesetzten Systeme. Entweder wurden Volumen und Temperatur (NVT) oder Druck und Temperatur (NPT) konstant gehalten. Acylketten wurden im Bereich von  $Z \pm 5 \text{ \AA}$  und Kopfgruppen nahe der Membranoberfläche bei  $Z = 18 \text{ \AA}$  bzw.  $Z = -18 \text{ \AA}$  gehalten. Wassermoleküle wurden mit den angegebenen Zwangsbedingungen vom Eindringen in den hydrophoben Bereich der Membran abgehalten.

Schritt	1	2	3	4	5	6
Ensemble	NVT	NVT	NPT	NPT	NPT	NPT
Minimierung [Schritte]	10000	0	0	0	0	0
Simulation [Schritte]	25000	25000	25000	100000	100000	100000
Zeitschritt [fs/Schritt]	1	1	1	2	2	2
	harmonische Zwangsbedingungen [kcal/(mol $\text{\AA}^2$ )]					
Peptidrückgrat	10,0	5,0	2,5	1,0	0,5	0,1
Peptidseitenketten	5,0	2,5	1,0	0,5	0,1	0,0
Lipide (Acylketten)	2,5	2,5	1,0	0,5	0,1	0,0
Lipide (Kopfgruppen)	2,5	2,5	1,0	0,5	0,1	0,0
Wasser	2,5	2,5	1,0	0,5	0,1	0,0
Ionen	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Anhand der kürzesten Distanz jedes Seitenkettenpaares wurde anschließend der mittlere Abstand innerhalb der letzten 90 ns der Simulation berechnet. Der Kreuzungswinkel  $\Omega$  der Helices zueinander, sowie ihre Neigung relativ zum Membrannormal wurden mittels des Skriptes A.6 bestimmt. Um das Verhalten der verschiedenen Tyrosinreste der QSOX2 TMD zu untersuchen, wurde der Abstand ihrer Hydroxylgruppen zu einigen markanten Atomen mit Hilfe des Skriptes A.8 untersucht. Dabei wurde die Minimaldistanz zu 1) den Hydroxylgruppen der Cholesterinmoleküle 2) den Sauerstoffatomen der Carbonylgruppen der Phospholipide und 3) den Sauerstoffatomen der Phosphatgruppen der Phospholipide bestimmt. Eine Annäherung auf weniger als  $3,5 \text{ \AA}$  wurde als Interaktion des Tyrosinrestes mit dem entsprechenden Atom gewertet.

## 4. Ergebnisse

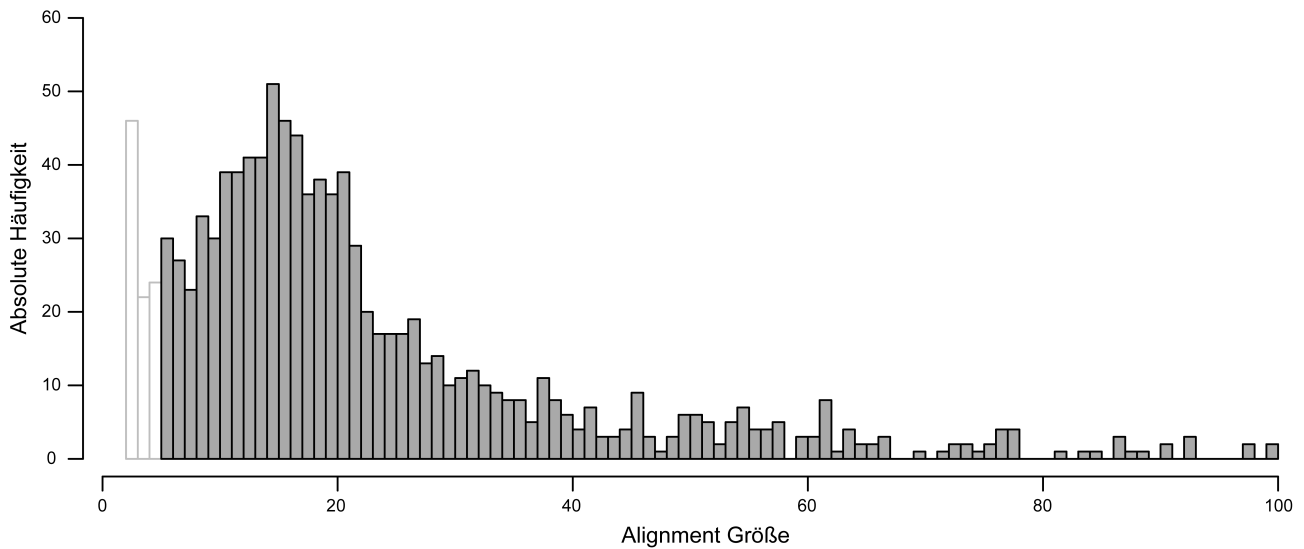
Um die homotypische Interaktion von bitopischen Membranproteinen aus *Homo sapiens* zu untersuchen, wurden sowohl Methoden der Bioinformatik als auch der Molekularbiologie eingesetzt. Im Folgenden wird beschrieben, wie die Proteinsequenzen humaner Membranproteine und ihrer homologen Proteine aus anderen *Chordata* zur Vorhersage der homotypischen Helix-Helix Interaktion ihrer TMDn verwendet wurden. Molekularbiologische Methoden dienten zur Analyse der tatsächlichen Interaktionsfähigkeit verschiedener TMDn in biologischen Membranen. Des Weiteren wurden die Grundlagen der homotypischen Interaktion einer dieser TMDn im Detail untersucht.

### 4.1. Unilaterale Konserviertheit von Transmembranhelices bitopischer Proteine

Proteine interagieren auf vielfältige Weise miteinander. In der Regel sind diese Interaktionen sehr spezifisch und ergeben sich aus dem Zusammenspiel mehrere Aminosäureseitenketten der Interaktionspartner. Häufig bilden diese Aminosäurereste ein zusammenhängendes Gebiet auf der Oberfläche des Proteins. Die Oberfläche des Partnerproteins ist komplementär zu diesem gestaltet, sodass beide Proteine nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip zueinander passen. Polare und gegensätzlich geladene Aminosäurereste tragen zur Spezifität und Stabilität der Wechselwirkung bei. Schon der Austausch einzelner Aminosäurereste in der Interaktionsfläche kann die Bildung des Proteinkomplexes verhindern. Dies kann Auswirkung auf die Funktion der beteiligten Proteine und letztendlich die Fitness des Organismus haben. Dementsprechend sind Aminosäurereste, die für die Funktion eines Proteins relevant sind, stärker evolutionär konserviert als andere. Eine grundlegende Annahme dieser Arbeit ist, dass die an TM Helix-Helix Interaktionen beteiligten Aminosäurereste aufgrund ihrer Funktion ebenfalls evolutionär überdurchschnittlich konserviert sind.

#### 4.1.1. Häufigkeit im Proteom von *H. sapiens*

Es wurde davon ausgegangen, dass die TMDn bitopischer Proteine eine  $\alpha$ -helikale Struktur besitzen<sup>[208]</sup>. Interagieren zwei Helices, entspricht die Kontaktfläche einem schmalen Streifen entlang der Oberfläche. Unabhängig vom Kreuzungswinkel ist die Kontaktfläche auf eine Seite der Helix be-



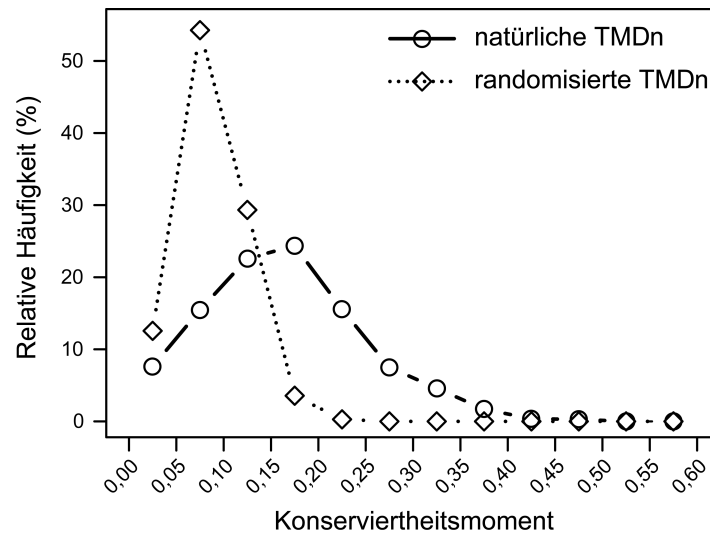
**Abbildung 4.1.:** Größenverteilung der Sequenzalignments humaner bitopischer Membranproteine und ihrer orthologen Proteine aus *Chordata*. Die Alignments erreichten eine Größe von bis zu 452 Sequenzen, wobei der Median bei 18 Sequenzen pro Alignment lag. Alignments mit weniger als fünf Sequenzen wurden wegen des zu geringen Informationsgehaltes von der weiteren Analyse ausgeschlossen (hellgraue Balken). Die Größenverteilung für Alignments mit mehr als 100 Sequenzen ist nicht dargestellt.

grenzt. Mindestens die Hälfte der Aminosäurereste ist folglich nicht an der Helix-Helix Interaktion beteiligt und der Lipidmembran zugewandt. Ein Vergleich der Seiten einer TM Helix könnte daher eine Interaktionsfläche aufgrund der erhöhten Konserviertheit der Aminosäurereste im Gegensatz zu Aminosäureresten der abgewandten Seite identifizieren. Aufgrund der Geometrie einer  $\alpha$ -Helix liegt der Rest an Position  $i$  auf der selben Helixseite wie die Reste in Position  $i \pm 3$  bzw.  $i \pm 4$ . Die Reste in Position  $i \pm 1$  und  $i \pm 2$  liegen hingegen auf der entgegengesetzten Helixseite. Räumlich benachbarte Aminosäurereste bilden demzufolge ein Heptaden- oder Tetradenmotiv in der Primärstruktur. Die unilaterale Konserviertheit einer TMD wäre ein Anzeichen für die Existenz einer Interaktionsfläche. Anhand der Primärsequenz des Proteins könnte man ggf. eine Vorhersage über die Fähigkeit zur Dimer- oder Oligomerisierung des Proteins treffen.

Um zunächst die Konserviertheit einzelner Aminosäurereste zu bestimmen, wurden für jedes bitopische Membranprotein des humanen Proteoms orthologe Proteinsequenzen in anderen *Chordata* identifiziert und die TMD Sequenzen der verwandten Proteine aligniert (s. Kapitel 3.5.1). Nach Durchführung einer Homologiebereinigung konnten für 1067 humane bitopische Proteine jeweils mindestens vier homologe Proteine in anderen *Chordata* identifiziert werden. Die meisten Sequenzalignments besitzen eine Größe von 5–30 Sequenzen, wobei auch größere Alignments beobachtet wurden (s. Abb. 4.1).

Mit Hilfe der multiplen Sequenzalignments wurde die Konserviertheit der Helixseiten bestimmt. Die Helix wurde in zwei Seiten aufgeteilt, sodass die absolute Differenz der durchschnittlichen Konserviertheit zwischen den Seiten maximiert wurde. Diese absolute Differenz, das Konserviertheitsmoment (KM), wurde als Maßzahl für die unilaterale Konserviertheit einer TMD verwendet (s. Kapi-

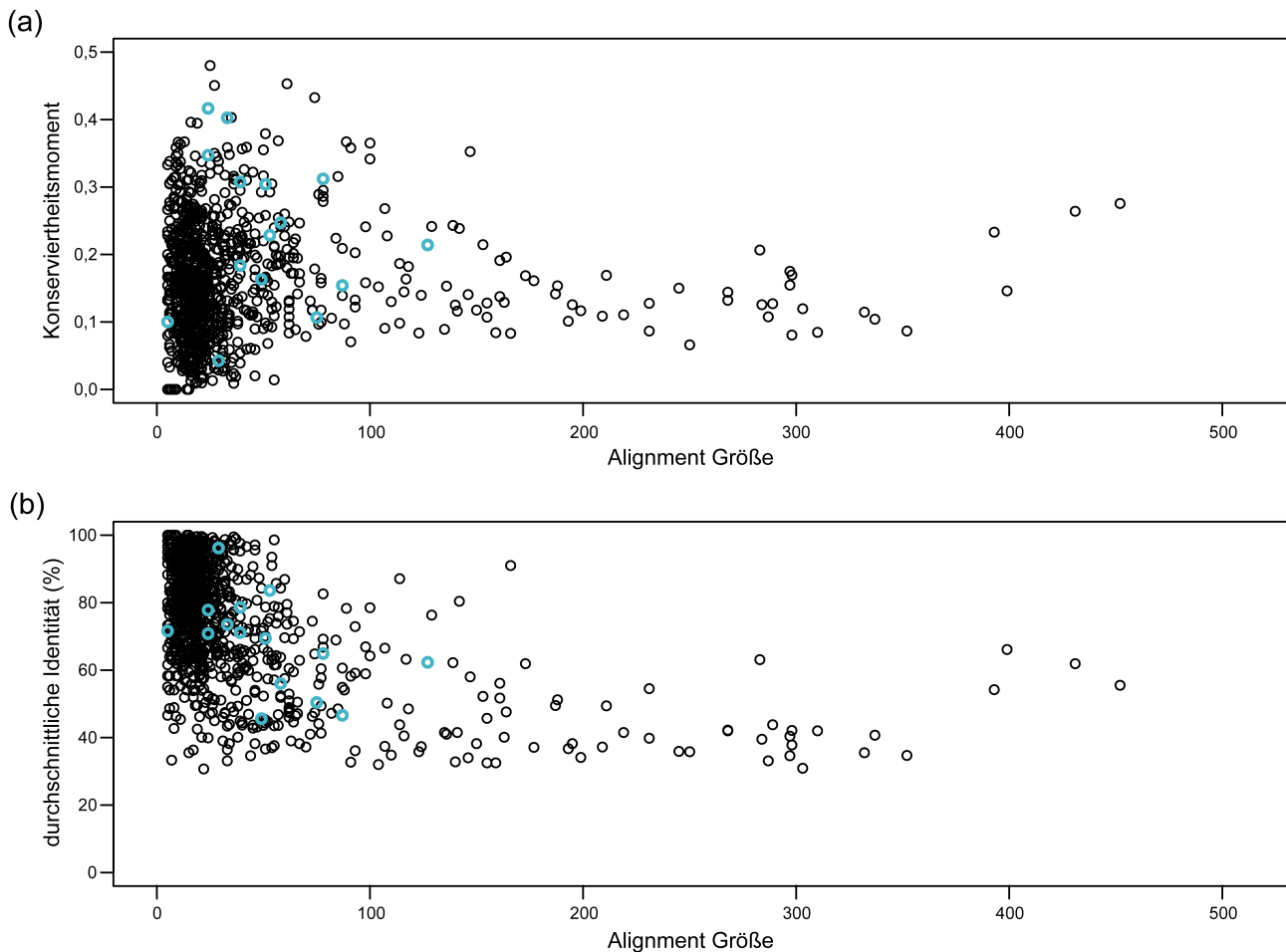




**Abbildung 4.2.:** Relative Häufigkeit des KMs in TMDn bitopischer Proteine. Das KM vieler natürlicher TMD Sequenzen ist deutlich höher als zufällig zu erwarten wäre. Die TMD Sequenzen von 1067 humanen bitopischen Proteinen und ihrer orthologen Proteine aus *Chordata* wurden zu nicht-redundanten Sequenzalignments zusammengefasst. Das KM jedes Alignments wurde vor („natürliche TMDn“) und nach („randomisierte TMDn“) der Randomisierung der Sequenzen bestimmt und die jeweilige Häufigkeitsverteilung in Intervallen von 0,05 berechnet. Ein Kolmogorov-Smirnov Test zeigt, dass die beiden Häufigkeitsverteilungen sich statistisch signifikant voneinander unterscheiden ( $D=0,5473$ ,  $p\text{-Wert} < 2,2 \times 10^{-16}$ ). Auffällig ist, dass randomisierte Sequenzalignments meist einen niedrigen KM erreichen, während natürliche Sequenzen einen breiten Wertebereich abdecken.

tel 3.5.2). Zur Erstellung eines Vergleichsdatensatzes wurden die Sequenzalignments, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, randomisiert und auf dieser Grundlage der KM erneut berechnet. Die Häufigkeit des Konserviertheitsmomentes für randomisierte Sequenzen war im Bereich von 0,05–0,10 maximal (s. Abb. 4.2, „randomisierte TMDn“). Dies lässt sich dadurch erklären, dass Sequenzalignments aus randomisierten Sequenzen (oder z.B. auch Zufallssequenzen) aus gleichmäßig (nicht-) konservierten Spalten bestehen. Zudem ist es unwahrscheinlich, dass überdurchschnittlich „konservierte“ Spalten entsprechend eines Heptaden- oder Tetradenmusters angeordnet sind und daraus ein größeres KM resultiert. Im Gegensatz dazu besaßen die natürlichen (nicht-randomisierten) Sequenzalignments eine deutlich breitere Häufigkeitsverteilung mit einem Maximum im Bereich von 0,15–0,20 und vielen Alignments mit Werten  $> 0,25$  (s. Abb. 4.2, „natürliche TMDn“). Ein Kolmogorov-Smirnov Test auf Übereinstimmung zweier Wahrscheinlichkeitsverteilungen zeigte, dass sich die beiden Verteilungen statistisch signifikant voneinander unterscheiden ( $D=0,5473$ ,  $p\text{-Wert} < 2,2 \times 10^{-16}$ ). Die Sequenzalignments natürlicher TMDn weisen im Mittel einen KM von  $0,16 \pm 0,08$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) auf. Dabei ist das KM vor der Randomisierung bei 46% aller Alignments mindestens eine Standardabweichung (0,08) höher, als nach der Randomisierung.

Ein Scatterplot veranschaulicht, den Einfluss der Größe der Sequenzalignments auf die Höhe des KMs. Während Alignments mit 100 oder weniger Sequenzen ein breites Intervall an KM-Werten abdecken, erreichen Alignments mit mehr als 100 Sequenzen selten einen KM  $> 0,2$  (s. Abb. 4.3a). Es ist möglich, dass sehr große Alignments Proteine aus großen Proteinfamilien beinhalten. Diese



**Abbildung 4.3.:** Abhängigkeit des KMs und der durchschnittlichen Sequenzidentität von der Größe der multiplen Sequenzalignments. (a) Alignments mit  $\leq 100$  Sequenzen decken einen breiten Wertebereich des KMs ab. Größere Alignments erreichen nur selten einen Wert von  $> 0,2$ . (b) Alignments mit  $> 100$  Sequenzen zeigen eine deutlich verringerte Sequenzidentität, was auf sehr unterschiedliche Sequenzen hinweist. Bei derart niedriger Sequenzähnlichkeit können diese Alignments rechnerisch keinen hohen KM erreichen. Die in hellblau dargestellten Datenpunkte entsprechen Proteinen, deren TMDn auf homotypische Interaktionsfähigkeit getestet wurden (s. Abb. 4.4).

sind meist früh in der Evolution entstanden und/oder haben eine wichtige Funktion. Entsprechend häufiger sind sie in Datenbanken zu finden. Die große evolutionäre Distanz zwischen diesen Sequenzen hat allerdings zur Folge, dass diese vergleichsweise unähnlich sind und dies die Konserviertheit gerade bei Verwendung von Identität (anstelle von Ähnlichkeit) als Kriterium deutlich reduziert. Dies wird dadurch unterstützt, dass sich die durchschnittliche Identität mit zunehmender Größe der Alignments deutlich verringert und einer unspezifischen Identität von etwa 30% annähert (s. Abb. 4.3b). Die Mehrzahl der Alignments enthält allerdings weniger als 30 Sequenzen (s. Abb. 4.1). Sie liegen damit in einem Bereich, in dem Sequenzidentität und KM breit verteilt sind und die Alignmentgröße für den Großteil der betrachteten Fälle eine untergeordnete Rolle spielt.

#### 4.1.2. Zusammenhang mit homotypischer Interaktionsfähigkeit

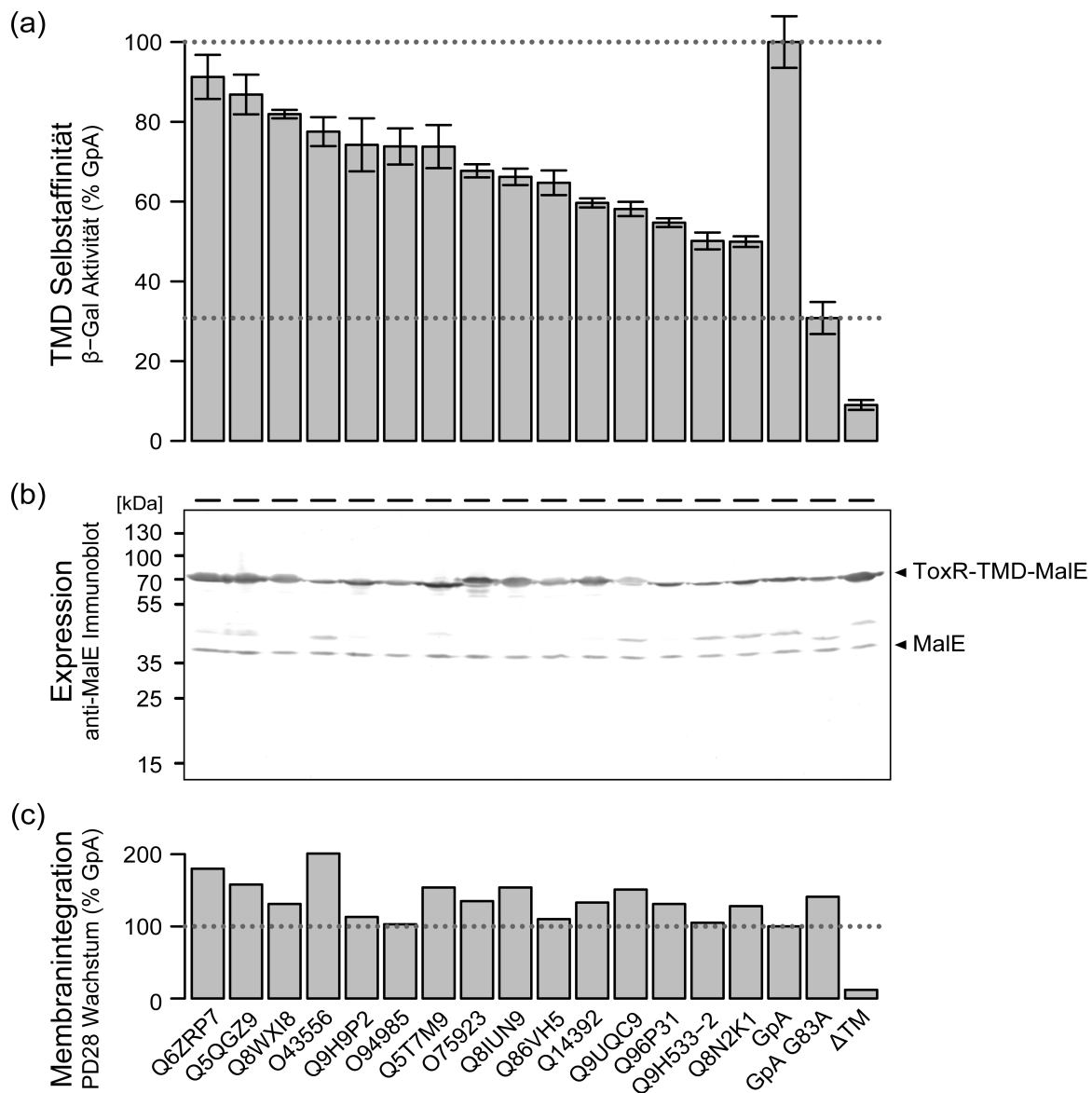
Um die prädiktive Fähigkeit des KMs für TM Helix-Helix Interaktion zu validieren, wurde die Selbstaffinität von 15 TMD Sequenzen experimentell bestimmt. Die Kandidaten wurden aus den 1067 Sequenzalignments zufällig ausgewählt. Einzig die Vorgabe, den Wertebereich des KMs möglichst breit abzudecken, wurde berücksichtigt. Eine für die jeweilige TMD Sequenz kodierende DNA wurden, wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, in den pToxRV Vektor eingefügt, um ein *toxR*-TMD-*malE* Fusionsgen zu erzeugen. Das Fusionsgen wurde, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, in *E. coli* FHK12 Zellen exprimiert, um die Selbstinteraktion mittels des ToxR-Assays relative zu Referenzkonstrukten bestimmen zu können. Als Referenz für starke Selbstinteraktion wurde die TMD des humanen Glycophorin A Proteins eingesetzt. Durch den Aminosäureaustausch G83A wird die Dimerisierung der TMD verhindert<sup>[146]</sup>. Somit eignet sie sich als Referenz für den monomeren Zustand und die zufällige Kolokalisation der Membranproteine. Eine *ToxR-MalE* Fusion ohne TMD wurde eingesetzt, um die Abhängigkeit der Reporterexpression von der korrekten Membranintegration der Proteine zu zeigen.

In einem Vorexperiment wurde die optimale Orientierung der TMDn relativ zum restlichen *ToxR*-Fusionsprotein bestimmt. Dazu wurden für jede TMD vier überlappende Teilsequenzen, im Folgenden Phasen genannt, mittels des ToxR-Assays auf Interaktion getestet. Dass die Rotation der TMD relativ zum restlichen Protein eine Rolle spielt, lässt sich am Beispiel der QSOX2 TMD (Uniprot ID Q6ZRP7) demonstrieren. Die vier Phasen kodierten die folgenden Sequenzen:

Phase 0	CVVLYVASSLFLMVYFFFA
Phase 1	LCVVLYVASSLFLMVYFFF
Phase 2	SLCVVLYVASSLFLMVYFF
Phase 3	MSLCVVLYVASSLFLMVYF

Da TMDn bitopischer Proteine eine  $\alpha$ -helikale Struktur besitzen (s. Kapitel 1.2), verlagert sich der konstante Teil der Sequenzen in 100° Schritten relativ zum restlichen Protein. Hier erreichte Phase 0 100%±3,3%, Phase 1 51,3%±10,2%, Phase 2 60,4%±10,3% und Phase 3 nur noch 20,2%±5,9% relativ zur besten Phase. Für die folgenden Experimente wurde die Phase mit dem stärksten Signal (hier Phase 0) verwendet. Analog wurde mit den restlichen TMD Sequenzen verfahren. Die optimalen Phasen der 15 TMD Sequenzen zeigten ein breites Spektrum an Selbstaffinität (s. Abb. 4.4a). Die schwächste Selbstaffinität liegt noch deutlich über dem Niveau der monomeren GpA G83A Mutante. Die stärkste Selbstinteraktion entspricht nahezu der von GpA.

Um sicherzustellen, dass die gemessenen TMD Selbstaffinitäten nicht auf ungleichmäßige Proteinexpression zurück zu führen sind, wurde ein Teil der für den ToxR-Assay verwendeten Zellen in Laemmli Probenpuffer lysiert und elektrophoretisch aufgetrennt (s. Kapitel 3.3.1). Nach dem Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran mittels Western Blot wurde das *ToxR*-TMD-*MalE* Fusionsprotein mit Hilfe eines anti-*MalE* Antikörpers detektiert (s. Kapitel

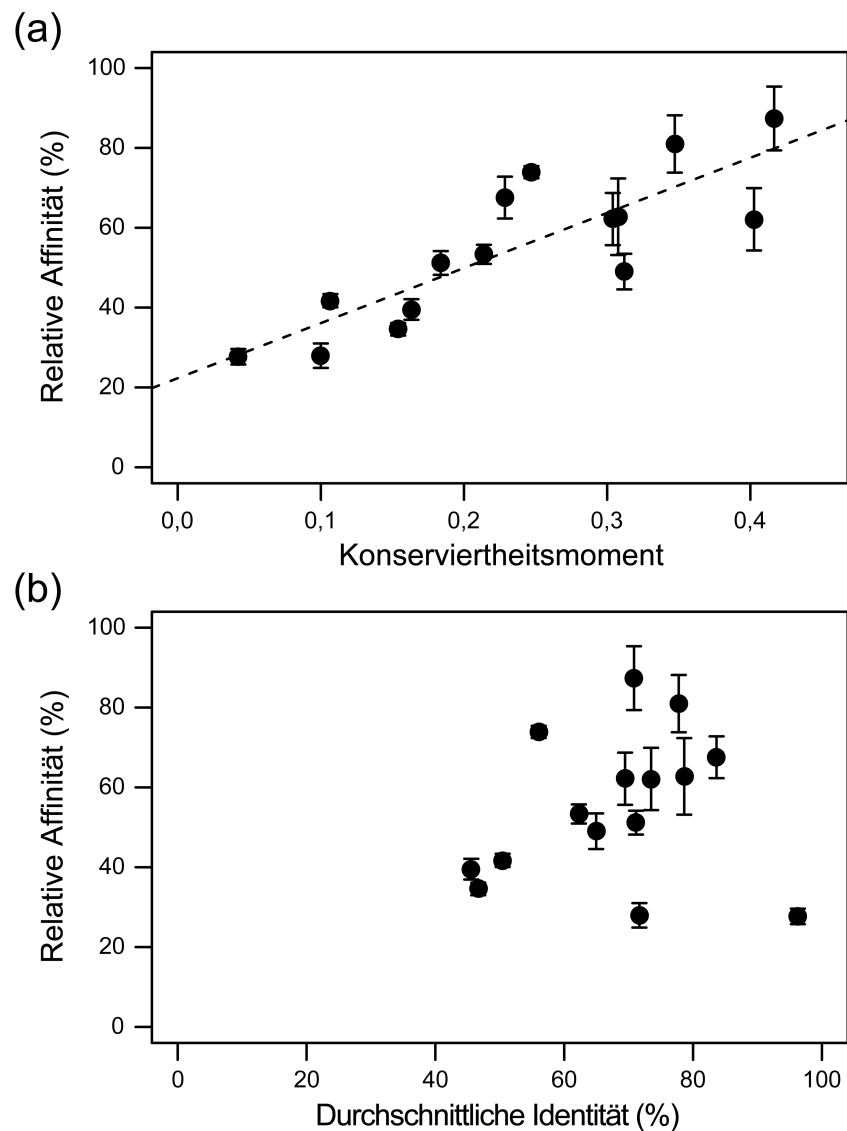


**Abbildung 4.4.:** Selbstaffinität, Expression und Membranintegration verschiedener TMD im Rahmen des *ToxR-TMD-MalE* Fusionsproteins. TMD Sequenzen wurden den, mittels ihrer UniProt ID angegebenen, Proteinen entnommen. (a) Die homotypische Affinität der TMDn wurde relativ zur stark affinen GpA TMD mit Hilfe des ToxR-Assays in der Plasmamembran von *E. coli* FHK12 Zellen bestimmt. Die als monomere GpA G83A Mutante erreicht eine apparente Selbstaffinität von leicht über 33%, was auf zufällige Kolokalisation der Fusionsproteine zurückzuführen ist. Ohne eine TMD ( $\Delta$ TM) lag das Fusionsprotein im Cytoplasma vor und führte lediglich zu einem sehr geringen unspezifischen Signal. Die getesteten TMD Sequenzen zeigten ein breites Spektrum von geringer (Q8N2K1) bis sehr starker (Q6ZRP7) Selbstaffinität. Die relative Affinität ist als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. (b) Die Menge an Fusionsprotein in den Zellen wurde mittels Immunoblot bestimmt. Dazu wurde ein anti-MalE Antikörper eingesetzt, um das MalE-Fusionsproteins als auch das endogene MalE Protein zu detektieren. Alle *ToxR-TMD-MalE* Fusionsproteine zeigen eine vergleichbare Expression, lediglich die lösliche Variante ( $\Delta$ TM) wurden deutlich stärker exprimiert. (c) Neben der gleichmäßigen Expression der Fusionsproteine wurde zudem die Effizienz der Membranintegration bestimmt. Hierzu wurde das PD28-Assay verwendet, in dem die MalE-Defizienz von *E. coli* PD28 Zellen durch die effiziente Membranintegration der Fusionsproteine und periplasmatische Lokalisation ihrer MalE-Domäne komplementiert werden kann. Alle TMD Sequenzen führten zu einer mindestens so effizienten Membranintegration wie die GpA TMD. Lediglich das cytosolische Fusionsprotein ohne TMD ( $\Delta$ TM) führte zu deutlich vermindertem Wachstum der Zellen.

3.3.2). Neben dem *ToxR-TMD-MalE* Fusionsprotein wurde endogenes *MalE* der FHK12 Zellen detektiert (s. Abb. 4.4b). Dieses endogene Protein zeigt eine gleichmäßige Beladung des Gels mit den verschiedenen Proben. Die Expression der verschiedenen Fusionsproteine variierte nur gering und war mit der des GpA Referenzproteins vergleichbar. Lediglich das  $\Delta$ TM Fusionsprotein zeigte eine höhere Expression. Da dieses Protein keine TMD enthält, liegt es im Cytoplasma vor, während die übrigen Fusionsproteine in die Plasmamembran integriert werden. Bekanntermaßen ist die Expression von löslichen Proteinen in *E. coli* effizienter, als die von Membranproteinen<sup>[209]</sup>, was die stärkere Expression in diesem Fall erklärt. Es ist unwahrscheinlich, dass die gemessene Selbstaffinität der verschiedenen TMDn auf unterschiedlich starke Expression der Fusionsproteine zurückzuführen ist.

Obwohl die Fusionsproteine in vergleichbarem Maße exprimiert wurden, liefert dies noch keine Aussage über die korrekte Integration dieser in die Plasmamembran. Um die Integration der Fusionsproteine zu überprüfen, wurden PD28 Zellen verwendet. Diese Zellen exprimieren kein *MalE* Protein und können aufgrund dessen Maltose nur schlecht aufnehmen. Im PD28-Assay wird dies ausgenutzt, um die Integration der Fusionsproteine zu testen, da sie die *MalE*-Defizienz der PD28 Zellen durch ihre periplasmatische *MalE*-Domäne kompensieren können. In Minimalmedium mit Maltose als einzige Kohlenstoffquelle hängt das Wachstum der Zellen daher direkt von der korrekten Integration der Fusionsproteine in die Plasmamembran ab. Wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, wurden die Fusionsproteine in PD28 Zellen exprimiert. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in Minimalmedium + Maltose wurde relativ zum GpA TMD Fusionsprotein bestimmt (s. Abb. 4.4c). Das Wachstum der Zellen, die das  $\Delta$ TM Fusionsprotein exprimierten, war deutlich reduziert. Die *MalE*-Domäne dieses Fusionsproteins befindet sich demzufolge nicht im Periplasma. Das Protein muss als lösliches Protein im Cytoplasma vorliegen. Demgegenüber zeigten die restlichen Fusionsproteine ein zum GpA Fusionsprotein vergleichbares oder besseres Wachstum. Es ist davon auszugehen, dass die Proteine korrekt und mindestens so effizient in die Plasmamembran inseriert werden, wie das GpA Fusionsprotein. Dementsprechend ist es unwahrscheinlich, dass die gemessene Selbstaffinität der Fusionsproteine von der Integrationseffizienz in die Plasmamembran bestimmt wird.

Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen KM und der experimentell bestimmten Selbstaffinität der TMD Sequenzen besteht. Die gemessene Selbstaffinität wurde um den Beitrag der zufälligen Kolo-kalisation der Fusionsproteine in der biologischen Membran korrigiert, wie er anhand der monomeren GpA G83A Mutante bestimmt wurde (s. oben). In Abb. 4.5a ist ein linearer Zusammenhang zwischen KM und relativer Affinität ersichtlich. Eine lineare Regression hat ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,706$ , d.h. 70% der Streuung der relativen Affinität wird durch den linearen Effekt des KMs erklärt. Ein linearer Zusammenhang zwischen durchschnittlicher Identität der orthologen Sequenzen und Selbstaffinität scheint hingegen nicht zu bestehen ( $R^2 = 0,013$ , s. Abb. 4.5b).



**Abbildung 4.5.:** Selbstaffinität von TMDn und Korrelation mit KM und durchschnittlicher Sequenzidentität. Die relative Selbstaffinität der TMDn aus Abb. 4.4 wurde anhand des GpA G83A Wertes auf unspezifische Protein-Protein Wechselwirkung korrigiert und auf den Wert der hochaffinen GpA TMD normalisiert. (a) Eine Ausgleichsrechnung mit einem linearen Modell zeigt, dass die Selbstaffinität im Zusammenhang zum KM der jeweiligen TMD Sequenz steht (gestrichelte Linie, Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,706$ ). (b) Ein Zusammenhang mit der durchschnittlichen Sequenzidentität war nicht festzustellen ( $R^2 = 0,013$ ). Die relative Affinität ist als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

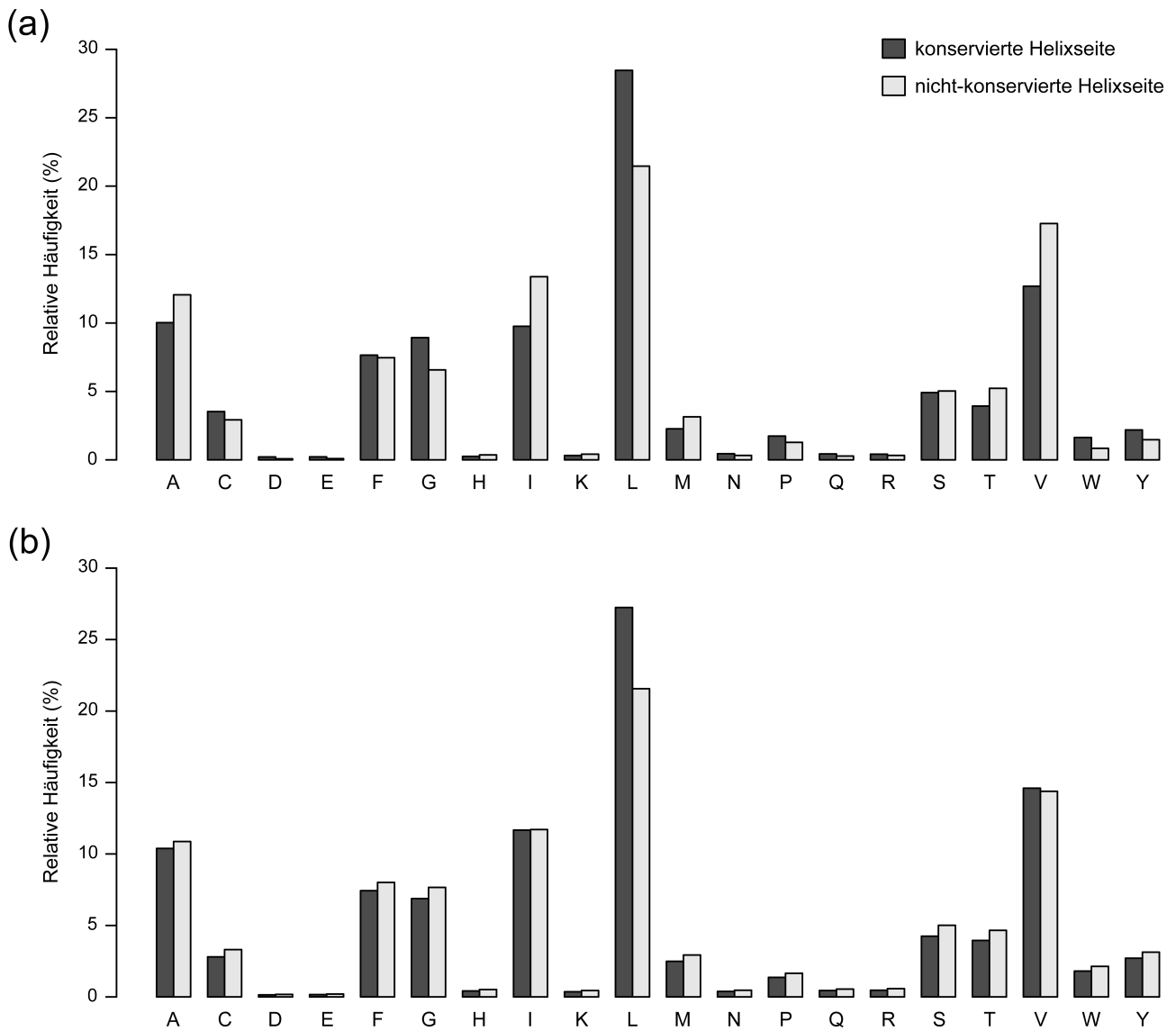
### 4.1.3. Chemische Eigenschaften konservierter und nicht-konservierter Helixseiten

Zur Berechnung des KMs wird die zwölf Aminosäurereste lange Teilsequenz der TMD gesucht, welche die größte Differenz in Hinblick auf Konserviertheit der entgegengesetzten  $\alpha$ -Helix Seiten aufweist. Dabei wird nicht nur der Wert der Differenz erfasst, sondern auch die Art der Aminosäurereste auf der konservierten bzw. nicht-konservierten Helixseite. Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, korreliert das KM mit der Selbstaffinität der jeweiligen TMD. Die Reste der konservierten Helixseiten sind vermutlich Teil von Helix-Helix Kontaktflächen, wohingegen die Reste der abgewandten Helixseiten nicht an Protein-Protein Interaktionen teilnehmen. Von den Kristallstrukturen polytopischer Membranproteinen ist bekannt, dass bestimmte Aminosäurereste preferenziell in Helix-Helix Kontaktflächen zu finden sind, während andere Reste vornehmlich in Richtung Lipidmembran orientiert sind<sup>[210–214]</sup>.

Um festzustellen, ob die Aminosäurezusammensetzung der Helix Kontaktflächen bitopischer und polytopischer Membranproteine vergleichbar ist, wurde zunächst die relative Häufigkeit der 20 proteinogenen Aminosäuren in konservierten und nicht-konservierten Helixseiten bestimmt (s. Abb. 4.6a). Die Analyse wurde für den randomisierten Datensatz wiederholt, um eventuelle Einflüsse der allgemeinen Aminosäurezusammensetzung zu untersuchen (s. Abb. 4.6b).

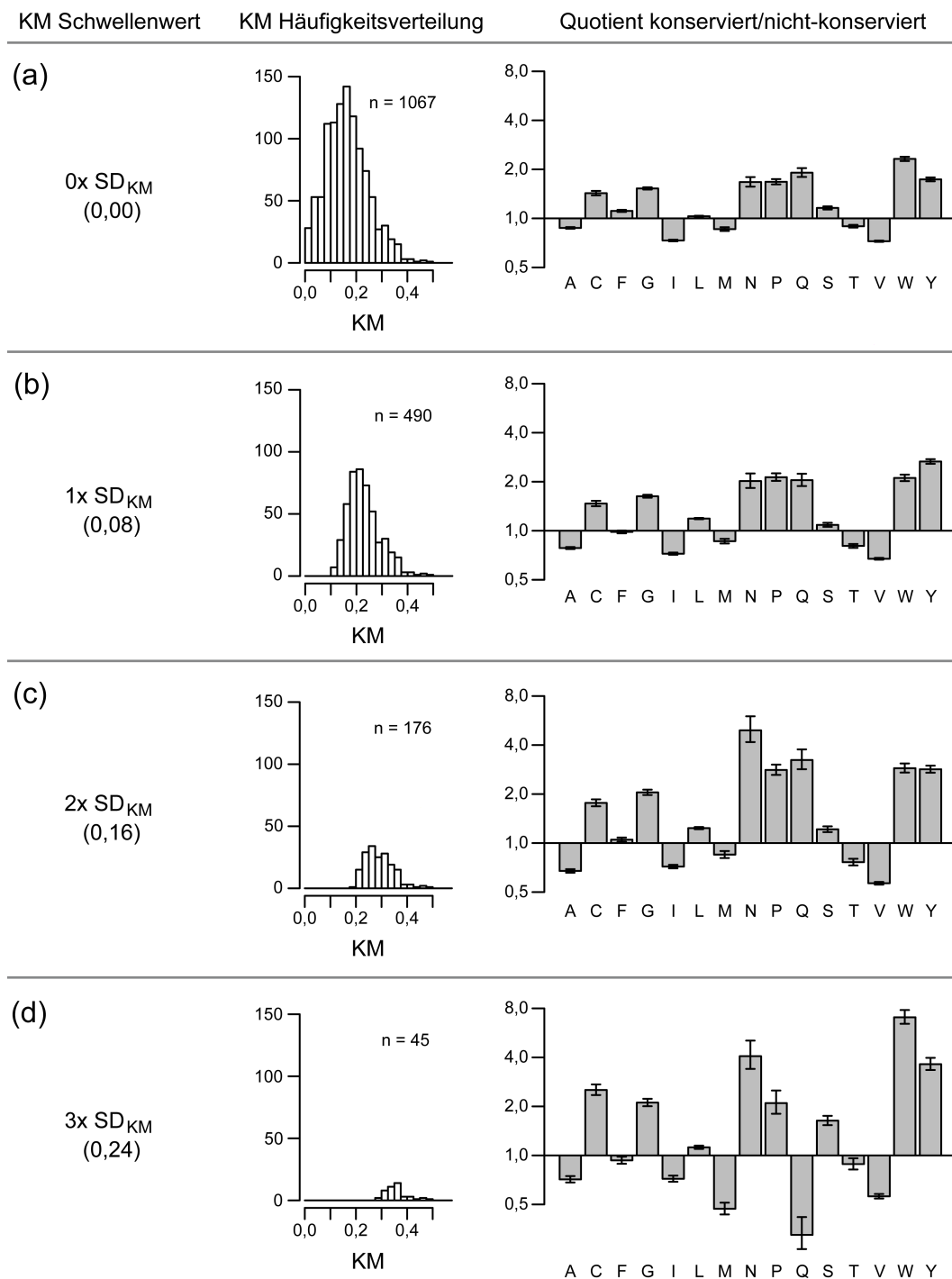
Betrachtet man die Verhältnisse der relativen Häufigkeiten auf konservierter und nicht-konservierter Helixseite, wird deutlich, dass diese von der allgemeinen Aminosäurezusammensetzung des Datensatzes abhängen. Je häufiger eine Aminosäure im Datensatz vorkommt, desto häufiger findet man diese in der konservierten Seite der Helix (z.B. Leu). Dagegen kommen seltenere Aminosäuren häufiger in den nicht-konservierten Helixseiten vor (z.B. Ser). Dieses Phänomen entsteht dadurch, dass bei der Ermittlung des KMs nach einer zwölf Aminosäurereste lange Teilsequenz der TMD mit möglichst großem KM Wert gesucht wird. Häufig vorkommende Aminosäurereste haben eine höhere Chance, per Zufall konservierte Spalten im multiplen Sequenzalignment zu erzeugen, als selten vorkommende Aminosäurereste. Da Leu der mit Abstand häufigste Rest in TMD Sequenzen ist, bestimmt dieser meistens die als konserviert erachtete Helixseite. Die Anreicherung der konservierten Helixseiten mit Leu führt dazu, dass sich seltener auftretende Aminosäuren zwangsläufig in den nicht-konservierten Seiten anreichern. Um den Einfluss der allgemeinen Aminosäurehäufigkeit zu berücksichtigen, wurde für jede Aminosäure das Verhältnis von konservierter zu nicht-konservierter Helixseite berechnet. Der Quotient aus dem Verhältnis von natürlichen und randomisierten Sequenzen gibt letztlich die An- oder Abreicherung einer Aminosäure auf den konservierten Helixseiten an (s. Abb. 4.7, rechte Spalte).

Grundsätzlich sind Cys, Gly, Asn, Pro, Gln, Ser, Trp und Tyr 1,5–2,0-fach häufiger auf konservierten Helixseiten zu finden. Ala, Ile, Met und Val kommen hingegen häufiger auf nicht-konservierten Helixseiten vor (s. Abb. 4.7a, rechte Spalte). Um lediglich multiple Sequenzalignments (MSAs) mit

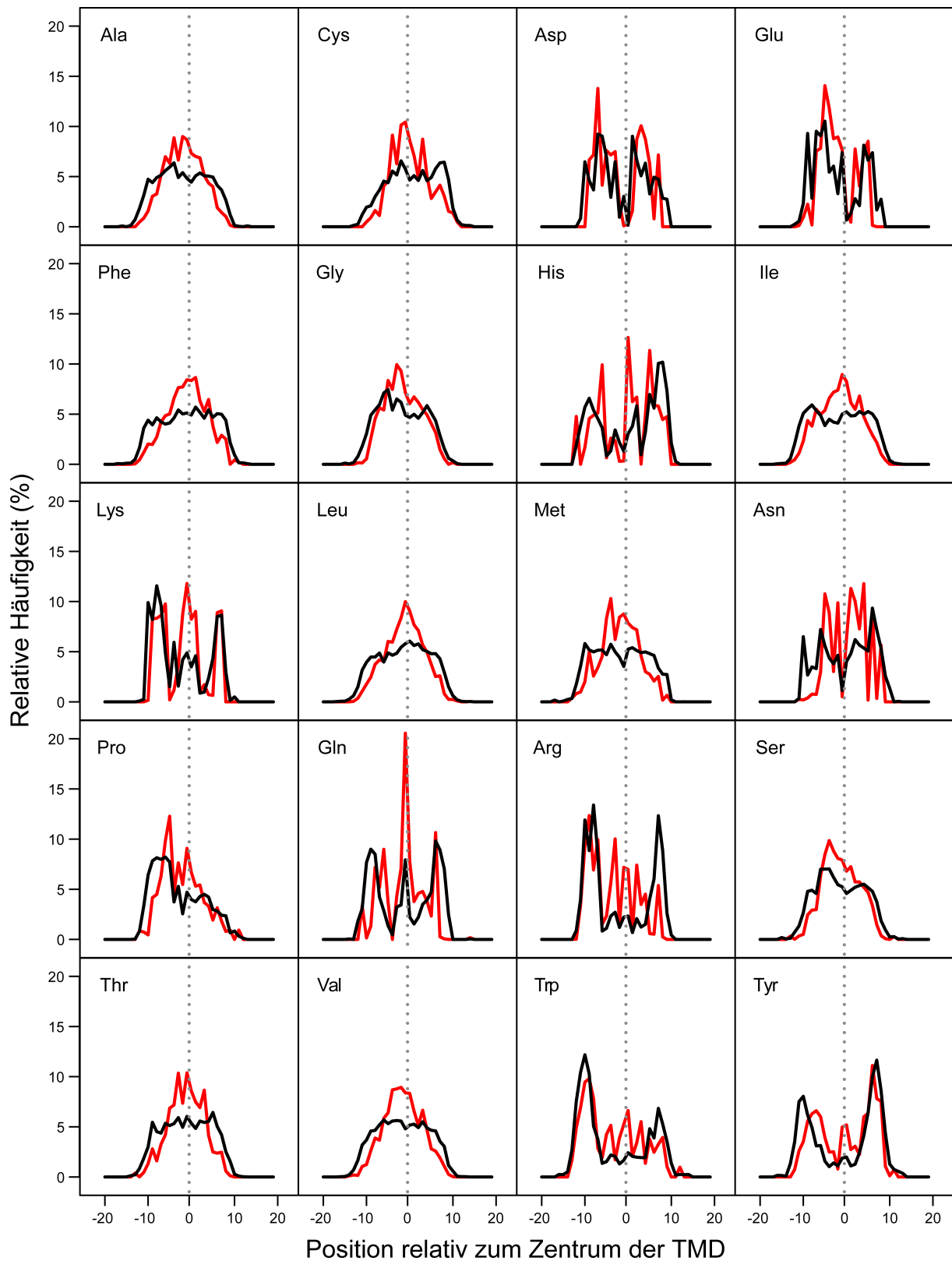


**Abbildung 4.6.:** Relative Aminosäurehäufigkeiten auf konservierten und nicht-konservierten TM Helixseiten. Die relative Häufigkeit der 20 proteinogenen Aminosäuren wurde für TMDn humaner bitopischer Proteine und homologer Sequenzen aus *Chordata* vor (a) und nach Randomisierung (b) der multiplen Sequenzalignments bestimmt. In beiden Fällen wurde zunächst das zwölf Aminosäuren lange Segment mit maximalem KM Wert ermittelt und dieses für die Auswertung herangezogen. Im Falle der randomisierten Sequenzen sind häufig vorkommende Aminosäuren (Leu, Val) eher auf konservierten Helixseite zu finden.





**Abbildung 4.7.:** An- und Abreicherung von Aminosäuren auf konservierten und nicht-konservierten TM Helixseiten. (a) Der KM Wert von  $n = 1067$  TMD Sequenzen humaner bitopischer Proteine wurde bestimmt und eine Häufigkeitsverteilung berechnet (s. auch Abb. 4.2). Für die als konserviert und als nicht-konserviert identifizierte Helixseiten wurde die relative Häufigkeit der Aminosäuren bestimmt. Die An- oder Abreicherung einer Aminosäure ist als Quotient der relativen Häufigkeit auf beiden Helixseite angegeben (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Der systematische Einfluss der allgemeinen Häufigkeit einer Aminosäure auf die Auswertung wurde anhand von 100 randomisierten Datensätzen korrigiert (s. Abb. 4.6). Auffällig ist, dass Cys, Gly, Asn, Pro, Gln, Ser, Trp und Tyr präferentiell in konservierten Helixseiten auftreten, wohingegen Ala, Ile, Met und Val häufiger auf der entgegengesetzten Seite zu finden sind. (b–d) Häufigkeitsverteilung der KM Werte und Aminosäurezusammensetzung von konservierten bzw. nicht-konservierten Helixseiten für TMDn mit überdurchschnittlich stark ausgeprägter unilateraler Konserviertheit. Die Auswertung wurde auf multiple Sequenzalignments beschränkt, deren KM Wert vor Randomisierung der Sequenzen den Wert danach um einen gewissen Schwellenwert übertrifft. Als Schwellenwert wurde die 1–3-fache Standardabweichung der KM Werte natürlicher TMD Sequenzen (0,08) verwendet (s. Kapitel 4.1.1).



**Abbildung 4.8.:** Häufigkeit proteinogener Aminosäuren in Abhängigkeit zur Position in TMDn. Die relative Häufigkeit jeder Aminosäure wurde für den Bereich von  $\pm 20$  Positionen relativ zum Zentrum der TMD berechnet. Dies wurde auf Grundlage aller Reste jeder TMD Sequenzen (schwarz) oder nur der konservierten Helixseite der Teilsequenz mit maximalem KM Wert (rot) berechnet.

ausgeprägtem KM zu betrachten, wurde der Datensatz zunächst gefiltert. Nur MSAs deren KM nach Randomisierung um mehr als 1, 2 oder 3  $SD_{KM}$  (Standardabweichung des KMs für alle natürlichen Sequenzen, s. Kapitel 4.1.1) fällt, wurden ausgewertet. Dabei reduziert sich die Anzahl der analysierten MSAs und die Verteilung des KMs verlagert sich in Richtung höherer Werte (s. Abb. 4.7, linke und mittlere Spalte). Mit steigendem Schwellenwert (1, 2 oder 3  $SD_{KM}$ ) nimmt die oben beschriebene ungleiche Verteilung der Aminosäuren zu (s. Abb. 4.7b-d, rechte Spalte). Aminosäurereste wie Cys, Gly, Asn, Pro, Trp und Tyr sind 2–8-fach häufiger auf konservierten Helixseiten zu finden als erwartet.

Mit am stärksten überrepräsentiert auf konservierten Helixseiten sind hier Trp und Tyr. Man findet diese Reste häufig in Höhe der Lipid-Wasser Grenzschicht, wo sie mit den Kopfgruppen der Membranlipide interagieren<sup>[210]</sup>. Es wäre denkbar, dass die Anreicherung dieser beiden Aminosäuren ein Artefakt der Auswertung ist, indem z.B. die als konservierte Helixseite betrachtete Teilsequenz der TMDn übermäßig die Randbereiche der MSAs/der TMDn abdeckt. Allerdings wurde gezeigt, dass Trp auch in Helix-Helix Interaktionen involviert sein kann<sup>[215]</sup>. Um dies zu untersuchen, wurde die relative Häufigkeit aller 20 proteinogenen Aminosäuren relativ zum Zentrum der TMD bestimmt. Dabei wurden zum Einen die Gesamtsequenzen und zum Anderen nur die als konservierte Helixseite identifizierten Positionen analysiert (s. Abb. 4.8).

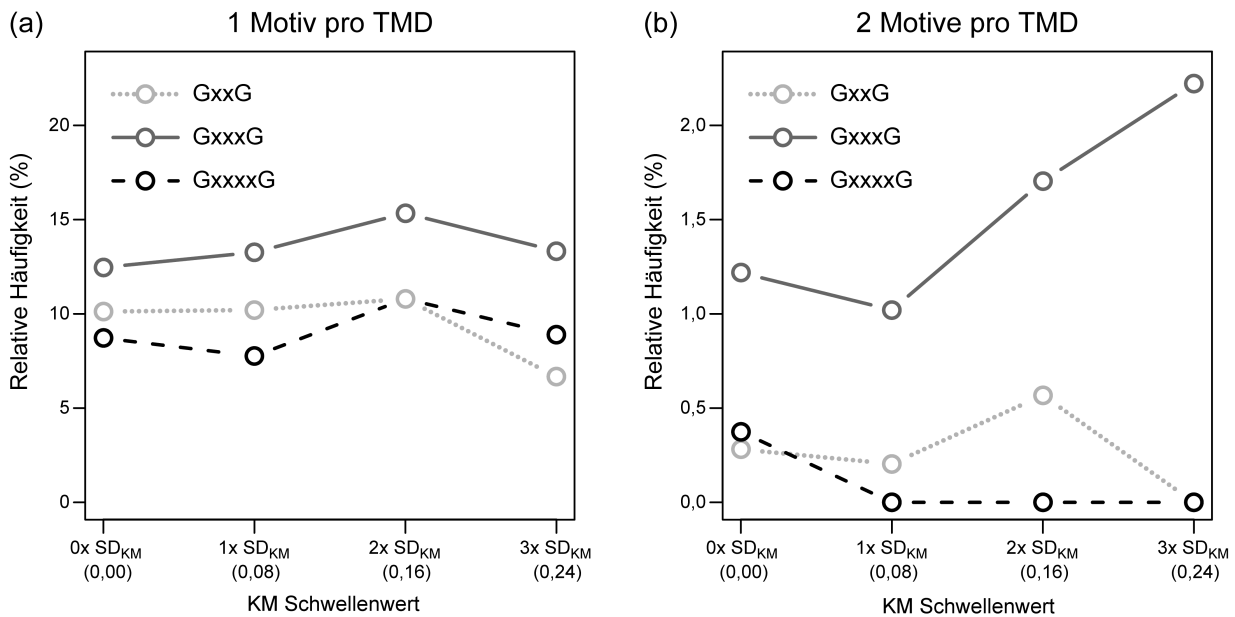
Im Falle von Trp und Tyr wird deutlich, dass diese Aminosäuren vermehrt im Abstand von  $\pm 9$ –10 Resten vom Zentrum der TMD auftreten. Betrachtet man Gesamtsequenzen, treten diese Reste im Zentrum der TMDn nur mit einem geringen Anteil auf. Beschränkt man die Auswertung auf die konservierten Helixseiten, findet man ebenfalls eine Häufung dieser Aminosäuren im selben Bereich. Zusätzlich treten beide vermehrt im Zentrum der TMD auf. Tyr zeigt eine Präferenz für das Zentrum der TMDn, wohingegen Trp auch im Abstand von  $\pm 3$ –4 Resten vom Zentrum auftritt. Die Auswertung von Gesamtsequenzen und konservierten Teilsequenzen zeigt die Anreicherung von Trp und Tyr in vergleichbarem Maße. Daher ist davon auszugehen, dass die zuvor festgestellte Überrepräsentation dieser Aminosäuren in konservierten TM Helixseiten nicht nur ihre Rolle in der Membranverankerung widerspiegelt, sondern auch auf die Anreicherung derselben in der Kontaktfläche zwischen TMDn zurückzuführen ist.

Ähnlich wie Trp und Tyr sind auch Arg, Lys und His verteilt. Generell finden sich diese Aminosäuren vorwiegend in den Grenzbereichen der TMDn. In konservierten Helixseiten sind sie zusätzlich im Zentrum der TMDn zu finden. Besonders Lys und His treten hier verstärkt im TMD Zentrum auf. Ala, Cys, Phe, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr und Val zeigen hingegen eine recht gleichmäßige Verteilung entlang der TMDn. Dies ist auch in konservierten Helixseiten der Fall, wobei nur eine schwache Präferenz für den Kernbereich der TMDn zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu findet man Asp und Glu fast ausschließlich im Bereich zwischen TMD Zentrum und dem Grenzbereichen der

TMDn. Außerdem ist die Verteilung auf konservierten Helixseiten dazu fast identisch. Da Asp und Glu generell selten in TMDn auftreten (s. Abb. 4.6), ist es wahrscheinlich, dass die meisten dieser Aminosäurereste funktionell wichtig und daher stark konserviert sind, was die Ähnlichkeit der Verteilungen erklären würde. Das polare aber ungeladene Gln kommt im Gegensatz dazu häufig in den Grenzbereichen der TMDn sowie im Zentrum der TMDn vor. Auffällig ist, dass es auf konservierten Helixseiten im Zentrum der TMDn sehr stark überrepräsentiert ist. Obwohl die meisten Aminosäuren eine zum TMD Zentrum symmetrische Verteilung aufweisen, tritt Pro generell häufiger im N-terminalen Teil der TMDn auf. Die Häufigkeit nimmt ausgehend von dort über das Zentrum bis zum C-terminalen Ende der TMDn stetig ab. In konservierten Helixseiten findet man Pro dabei häufiger im TMD Zentrum und besonders im Bereich zwischen dem N-terminalen Grenzbereich und dem Zentrum der TMDn.

Abgesehen von der Verteilung einzelner Aminosäuren sind bestimmte Motive ebenfalls von Interesse für diese Untersuchung. Es ist bekannt, dass Gly in Form des GxxxG Motivs häufig an der Dimerisierung von TMDn entscheidend beteiligt ist. Die kleinen Seitenketten im Abstand von vier Resten liegen auf der gleichen Helixseite und erzeugen dadurch einen flachen Bereich auf der Helixoberfläche, welche u.a. den engen Kontakt zweier TM Helices und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Peptidrückgrat beider Moleküle ermöglicht<sup>[105,113]</sup>. GxxxG Motive sind daher ein zentraler Teil vieler Helix-Helix Kontaktflächen. Demgegenüber sollten die Motive GxxG und GxxxxG für die Dimerisierung von TMDn nicht relevant sein, da die Seitenketten auf unterschiedlichen Helixseiten zum liegen kommen. Es ist anzunehmen, dass TMDn mit hohem KM eine konservierte Helixseite besitzen, die meistens der Oligomerisierung dient. Da das GxxxG häufig in oligomerisierenden TMDn auftritt, sollte es in TMDn mit hohem KM Wert angereichert sein. Im Gegensatz dazu müssten die für die Dimerisierung nicht relevanten GxxG und GxxxxG Motive seltener und unabhängig vom KM Wert auftreten.

Um dies zu überprüfen, wurde die relative Häufigkeit einzelner GxxG, GxxxG und GxxxxG Motive in TMD Sequenzen humaner bitopischer Proteine bestimmt (s. Abb. 4.9a). Die funktionell als nicht relevant betrachteten Motive GxxG und GxxxxG kommen in maximal 10% bzw. 8,5% aller TMD Sequenzen vor. Das GxxxG Motiv war hingegen in 12,5% der Sequenzen zu finden. Betrachtet man nur TMD Sequenzen mit mehr als 1, 2 oder 3  $SD_{KM}$  Differenz im KM Wert zwischen natürlichen und randomisierten Sequenzen, nimmt die relative Häufigkeit des GxxxG Motivs bis auf 15% zu. Die beiden anderen Motive sind hingegen stets mit  $< 11\%$  vertreten. Noch deutlicher ist der Unterschied für den Fall, dass ein Motiv zweimal in einer TMD auftritt und sich diese dabei nicht überlappen (s. Abb. 4.9b). Die für die Dimerisierung nicht relevanten Motive treten dann in  $< 0,6\%$  der Sequenzen auf. Das GxxxG Motiv kommt hingegen zu mindestens 1% in den betrachteten TMDn vor. Mit steigendem KM Wert nimmt die relative Häufigkeit dieses Motivs sogar auf  $> 2,2\%$  zu.



**Abbildung 4.9.:** Häufigkeit ausgewählter Sequenzmotive in TMDn mit unterschiedlich hoher unilateraler Konserviertheit. Die relative Häufigkeit dreier Gly-basierter Sequenzmotive wurde für alle TMDn (0x SD<sub>KM</sub>), oder nur für solche TMDn durchgeführt, deren KM Wert vor Randomisierung der Sequenzen den Wert danach um einen gewissen Schwellenwert übertrifft. Als Schwellenwert wurde die 1–3-fache Standardabweichung der KM Werte natürlicher TMD Sequenzen (0,08) verwendet (s. Kapitel 4.1.1). Das GxxxG Motiv kommt deutlich häufiger als verwandte Motive vor. Außerdem nimmt seine Häufigkeit mit dem Grad der unilateralen Konserviertheit zu, was insbesondere für TMDn mit zwei nicht-überlappenden GxxxG Motiven gilt. Nur das GxxxG Motiv, nicht aber die Motive GxxG oder GxxxxG, ist bekanntermaßen an TM Helix-Helix Interaktionen beteiligt.

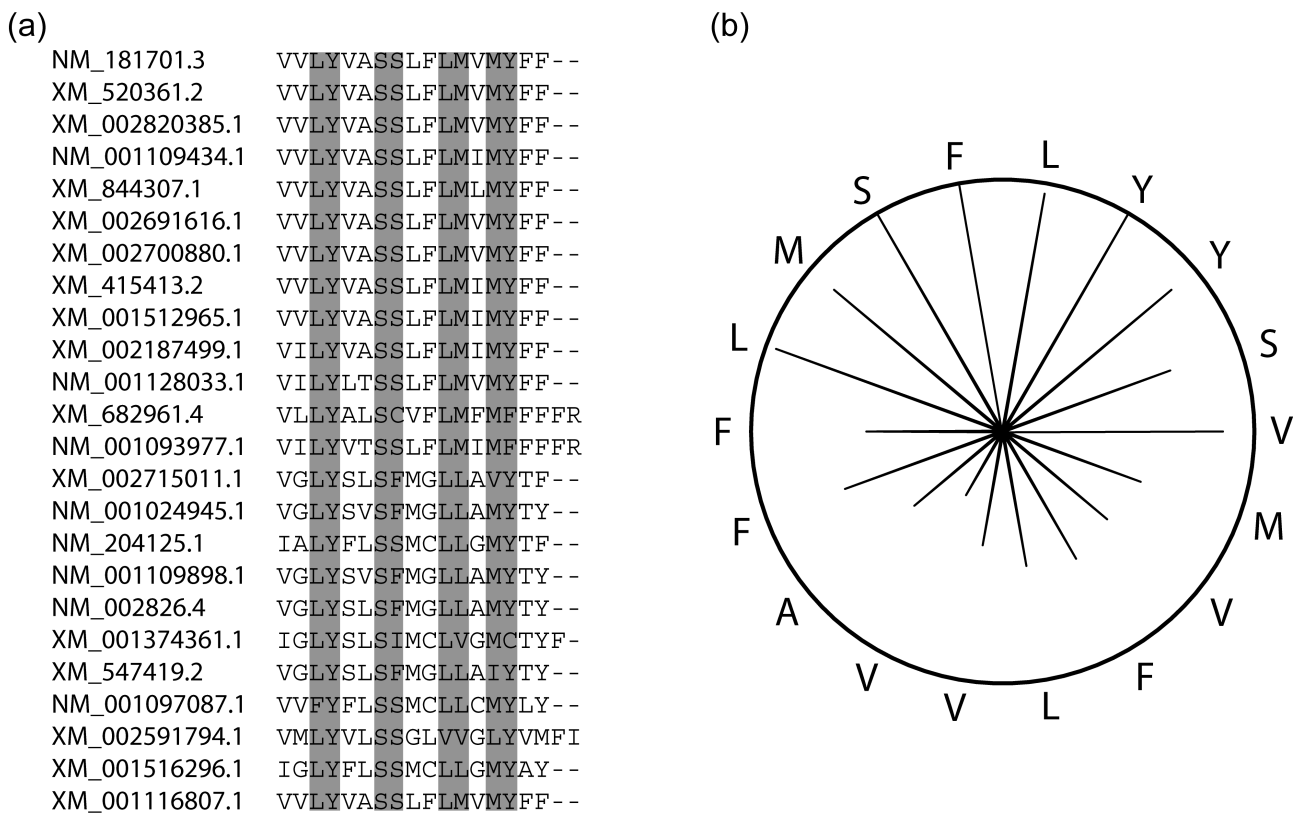
## 4.2. Homotypische Interaktion der QSOX2 TMD

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass eine Vielzahl der bitopischen Membranproteine des humanen Proteoms eine unilateral konservierte TMD besitzen. Als Maßzahl für die unilaterale Konserviertheit einer TM  $\alpha$ -Helix wurde das KM verwendet. Für 15 zufällig ausgewählte TMD Sequenzen wurde die Fähigkeit zur Oligomerisierung experimentell mit Hilfe des ToxR-Assays bestimmt. Die höchste Selbstaffinität zeigte die TMD der Sulfhydryloxidase 2 (QSOX2, UniProt ID: Q6ZRP7). Die Ergebnisse zur Untersuchung der Grundlagen dieser TM Helix-Helix Interaktion werden im Folgenden beschrieben.

### 4.2.1. Mutationsanalyse

Das MSA der QSOX2 TMD enthält 23 weitere Sequenzen homologer Proteine aus *Chordata*. Stark konservierte Spalten treten in einem periodischen Muster auf (s. Abb. 4.10a). Dies wird noch deutlicher, wenn man die Aminosäuresequenz der QSOX2 TMD in eine Helixrad-Darstellung überträgt und die individuelle Konserviertheit der Positionen einfügt. Eine Helixseite ist deutlich stärker konserviert und enthält u.a. die polaren Aminosäuren Ser und Tyr. Die abgewandte Seite weist hingegen ausschließlich die apolaren Aminosäuren Val, Ala, Leu und Phe auf (s. Abb. 4.10b).

Eine naheliegende Vermutung ist, dass es sich bei der konservierten Helixseite um die Helix-Helix



**Abbildung 4.10.:** Unilaterale Konserviertheit der QSOX2 TMD. (a) Multiples Sequenzalignment der QSOX2 TMD aus *H. sapiens* ab Val<sub>665</sub> (oberste Sequenz) mit homologen Proteinen aus *Chordata*. Die Sequenzen sind den durch ihre UniRef Accession Number gekennzeichneten Proteinen entnommen. Stark konservierte Spalten sind grau hinterlegt. (b) Modifizierte Helixrad Darstellung der QSOX2 TMD Sequenz. Die Konserviertheit jeder Position ist als Länge der radialen Linie darunter angegeben. Linien, welche den Kreis berühren, zeigen eine vollständig konservierte Aminosäure an.

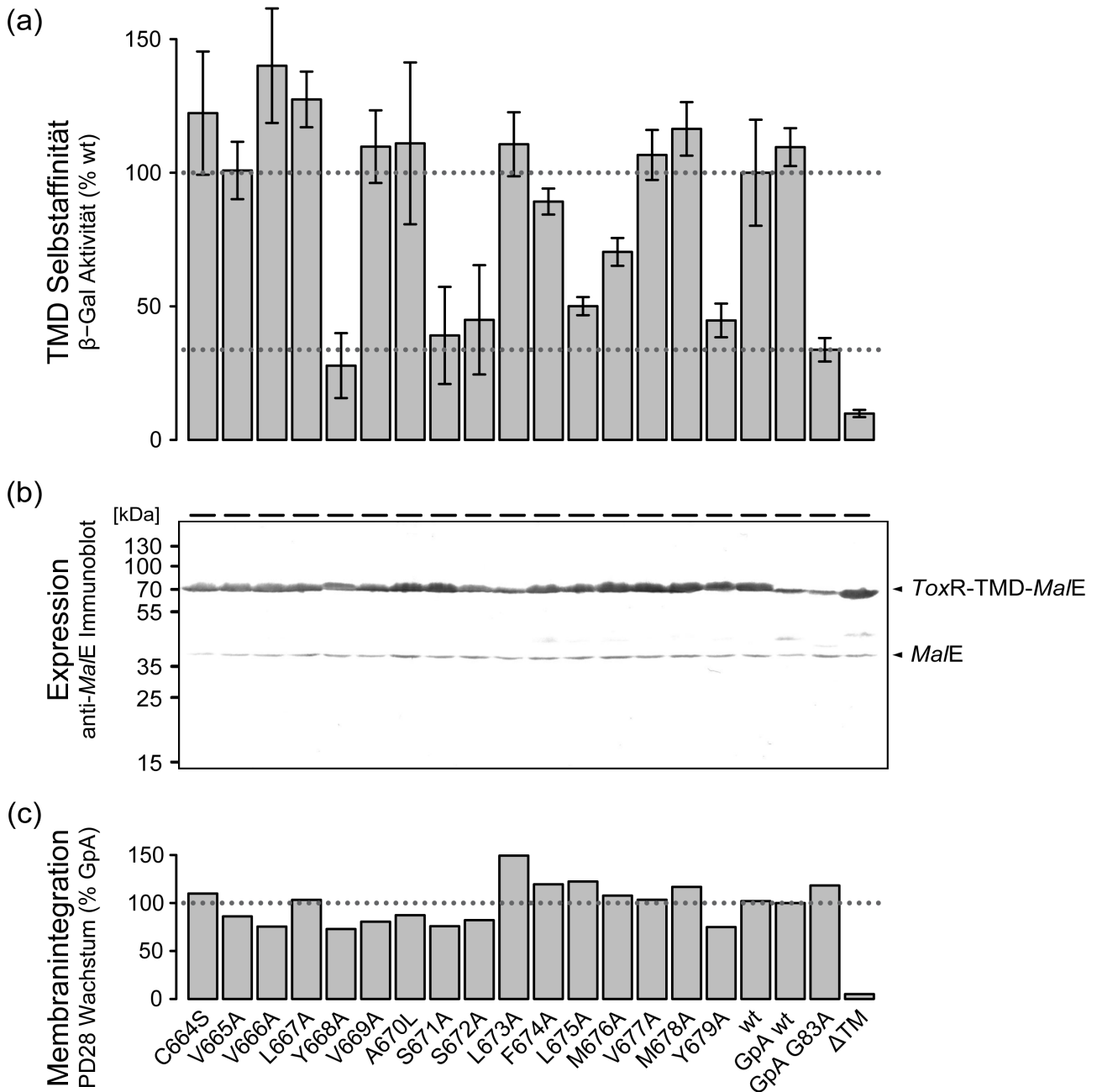
Kontaktfläche des Oligomers handelt. Um dies zu überprüfen, wurde der Einfluss von Punktmutationen auf die Oligomerisierung der QSOX2 TMD untersucht. Dazu wurden 16 Punktmutanten hergestellt, in denen die ursprünglichen Aminosäurereste durch Alanin ersetzt wurden. Zwei Ausnahmen sind die Mutationen C664S und A670L. Mittels des ToxR-Assays wurde die Selbstaffinität der QSOX2 TMD Wildtyp (wt) Sequenz und ihrer Mutanten gemessen (s. Abb. 4.11a). Nur die Mutationen Y668A, S671A, S672A, L675A, M676A und Y679A reduzierten die Selbstaffinität der TMD signifikant. Alle betrachteten *ToxR-TMD-MalE* Fusionsproteine zeigten eine vergleichbare Expression (s. Abb. 4.11b) und Membranintegration (s. Abb. 4.11c). Ein Einfluss dieser Parameter auf die gemessene Selbstaffinität kann daher ausgeschlossen werden.

#### 4.2.2. Putative Struktur

Bisher wurde gezeigt, dass die QSOX2 TMD nicht-kovalent mit sich selbst interagieren kann. Um die Grundlagen einer Protein-Protein Interaktion im Detail zu verstehen, wird für viele Proteine ihre Struktur mit Hilfe verschiedener experimenteller Techniken, wie der Röntgenstrukturanalyse oder Kernspinresonanzspektroskopie, bestimmt. Die vielleicht meist genutzte öffentliche Datenbank für derartig erzeugte Strukturdaten ist die „Protein Data Bank“ (PDB; <http://www.pdb.org>, s. Ref.<sup>[216]</sup>). Momentan (Stand 24.09.2013) enthält die Datenbank 86968 Proteinstrukturen, wovon allerdings nur 615 als Membranproteine annotiert sind. Dieses deutliche Missverhältnis von Strukturen löslicher und membrangebundener Proteine ergibt sich vor allem daraus, dass Membranproteine deutlich schwieriger in ausreichender Menge und Reinheit herzustellen sind. Die hydrophoben TMDn erschweren die Handhabung, da mit Detergenzien gearbeitet werden muss, um die Proteine zu solubilisieren. Trotz erfolgreicher Aufreinigung geht dabei häufig die native Konformation des Moleküls verloren<sup>[217,218]</sup>.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Strukturbestimmung von Membranproteinen werden alternativ bioinformatische Methoden eingesetzt. Eine Möglichkeit ist die Moleküldynamiksimulation (MD Simulation), die die Interaktionen von Atomen und den daraus aufgebauten Molekülen berechnet. Dabei werden meist sogenannte Kraftfelder verwendet, welche die Interaktionen der Atome oder bestimmter Molekülabschnitte untereinander mathematisch beschreiben. MD Simulationen haben den Vorteil, dass man das Verhalten des simulierten Systems über einen gewissen Zeitraum „beobachten“ und analysieren kann. Dies kann Einblick in biologisch relevante alternative Zustände des Systems liefern.

Aufgrund des hohen Rechenaufwands sind MD Simulationen in der Größe des Systems (Anzahl an Atomen) und der simulierten Zeitdauer beschränkt. Bei Verwendung von optimierter Software und Hochleistungsrechnern sind Systeme aus mehreren 100000 Atomen oder Simulationszeiten bis zum einstelligen  $\mu$ s Bereich möglich. Solche Simulationen benötigen i.d.R. Wochen oder Monate rea-



**Abbildung 4.11.:** Selbstaffinität, Expression und Membranintegration der QSOX2 TMD und davon abgeleiteter Mutanten im Rahmen des *ToxR-TMD-MalE* Fusionsproteins. (a) Die homotypische Affinität der TMDn wurde relativ zur QSOX2 wt TMD mit Hilfe des ToxR-Assays bestimmt. Mutationen in Position 668, 671, 672, 675, 676 und 679 verminderten die Selbstaffinität der QSOX2 TMD deutlichen. Die Affinitäten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. (b) Die Menge an Fusionsprotein in den Zellen wurde mittels Immunoblot bestimmt. Zur Detektion des *MalE*-Fusionsproteins und des endogenen *MalE* Proteins wurde ein anti-*MalE* Antikörper eingesetzt. Alle Fusionsproteine zeigten eine vergleichbare Expression. Lediglich die cytosolische Variante ohne TMD ( $\Delta$ TM) wurden deutlich stärker exprimiert. (c) Die Effizienz der Membranintegration wurde, wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, bestimmt. Alle TMD Sequenzen zeigten eine, der GpA und QSOX2 wt TMD vergleichbare, Membranintegration. Das Fusionsprotein ohne TMD ( $\Delta$ TM) wird hingegen nicht in die Plasmamembran integriert.



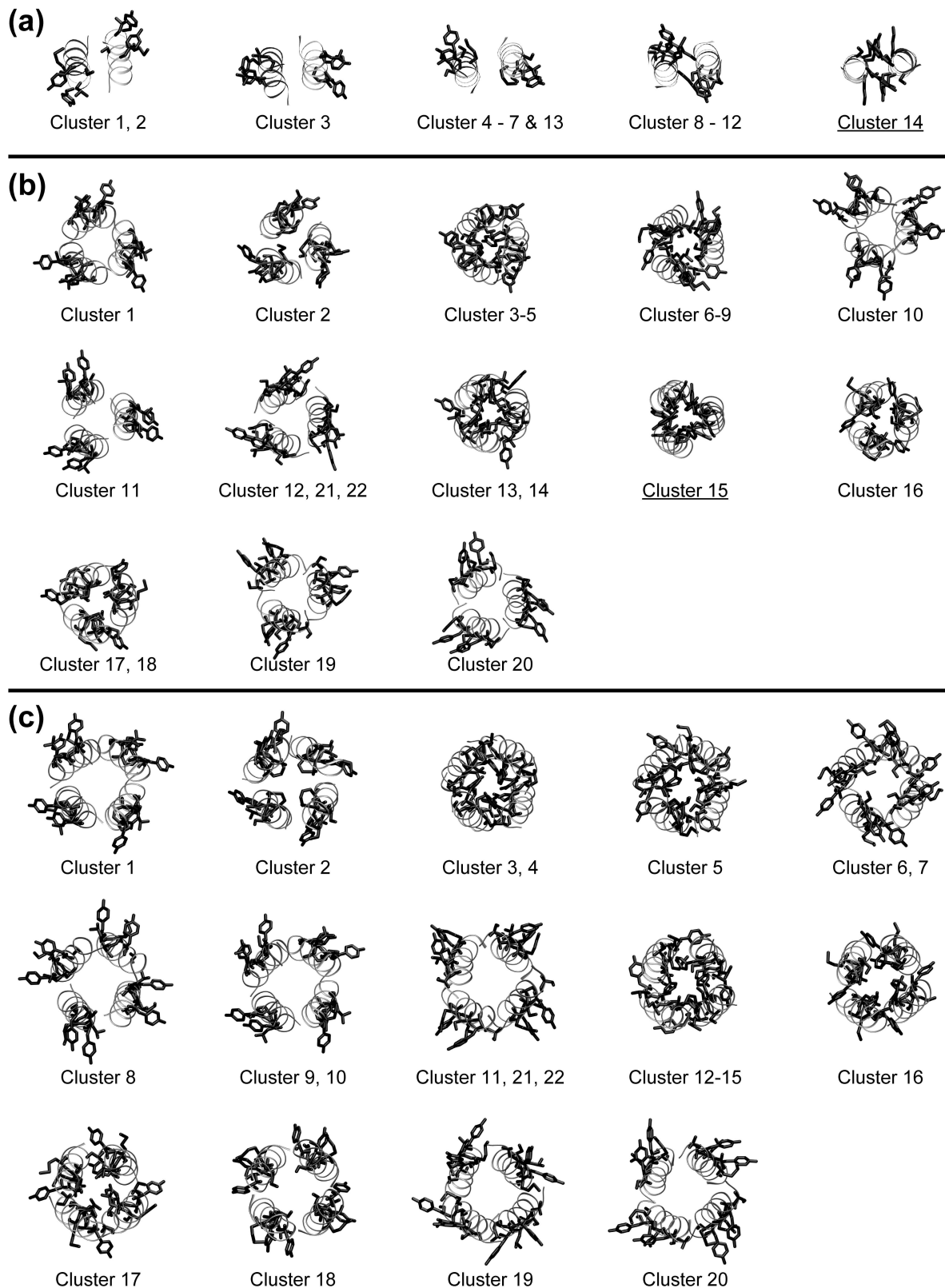
ler Zeit, daher sind Simulationen mit weniger als 100000 Atome und 50 ns Dauer üblich<sup>[200,219]</sup>. Speziell für MD Simulationen entwickelte Hardware kann bereits Simulationszeiten im ms Bereich ermöglichen<sup>[220]</sup>, ist vergleichsweise wenigen Personen zugänglich und wird hier daher nicht berücksichtigt.

Für viele molekulare Prozesse ist die simulierbare Zeit meist nicht ausreichend. Beispielsweise die Translokation eines Kaliumions durch das prokaryotische Kanalprotein *KscA* benötigt etwa 10–20 ns<sup>[221]</sup>. Häufig können wichtige Vorgänge dadurch nicht in ihrer Gänze beobachtet werden. Selbst die laterale Diffusion der Lipide in einer fluiden Membran ist mit  $10^{-12}$  bis  $10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  ein vergleichsweise langsamer Prozess<sup>[222,223]</sup>. Dies entspricht einer durchschnittlich zurückgelegten Distanz von etwa  $100 \text{ \AA}/\text{ms}$  bei ungestörter Bewegungsfreiheit der Moleküle. Entsprechend langsam ist die ungehinderte Diffusion von Proteinen in einer Lipidmembran zu erwarten. Das polytopische „small-conductance mechanosensitive channel“ (*MscS*) Protein besitzt drei TMDn und bildet einen heptameren Komplex. Das artifizielle WALP23 Peptid besteht im Gegensatz dazu nur aus 23 Aminosäureresten, die eine einzelne Transmembranhelix beinhalten. Trotz des enormen Größenunterschieds sind die Diffusionskonstanten des Proteinkomplexes und des Transmembranpeptids mit 4 bzw.  $5 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$  recht ähnlich<sup>[224]</sup>.

### Stöchiometrie der Oligomerisierung

Wegen der langsamen lateralen Diffusion bräuchten räumlich getrennte TMDn sehr lange, um zufällig in Kontakt zu kommen. Hinzu kommt, dass nicht jeder TM Helix-Helix Kontakt in der optimalen Orientierung geschieht, sodass die Bildung eines Komplexes noch länger dauern kann. Entsprechende Simulationen wären aufgrund des enormen Zeitaufwands der Berechnungen nicht möglich. Dies ist insbesondere bei Komplexen mit mehr als zwei Untereinheiten der Fall. Um dennoch die Struktur der QSOX2 TMD bestimmen zu können, wurde die „global molecular dynamics search“ (GMDS, s. Ref.<sup>[192]</sup>) Methode angewendet. Diese ermöglicht es, mit geringem Rechenaufwand von wenigen Minuten bis Stunden die potentielle Oligomerstruktur einer TMD selbst auf handelsüblichen Desktop-PCs zu ermitteln. Dabei werden die TMDn zunächst als ideale  $\alpha$ -Helices erstellt. Diese werden in unmittelbarer Nähe zueinander platziert und dabei der Kreuzungswinkel  $\Omega$  und die Rotation  $\varphi$  der Helices um ihre Längsachsen schrittweise variiert. Für jede Pose werden mehrere kurze MD Simulationen *in vacuo* durchgeführt. Konvergieren einige Simulationen auf eine ähnliche Struktur und ist diese im Vergleich energetisch günstig, könnte sie der realen Oligomerstruktur entsprechen oder diese zumindest annähern.

Die GMDS Analyse wurde für die QSOX2 TMD, wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde die Primärsequenz



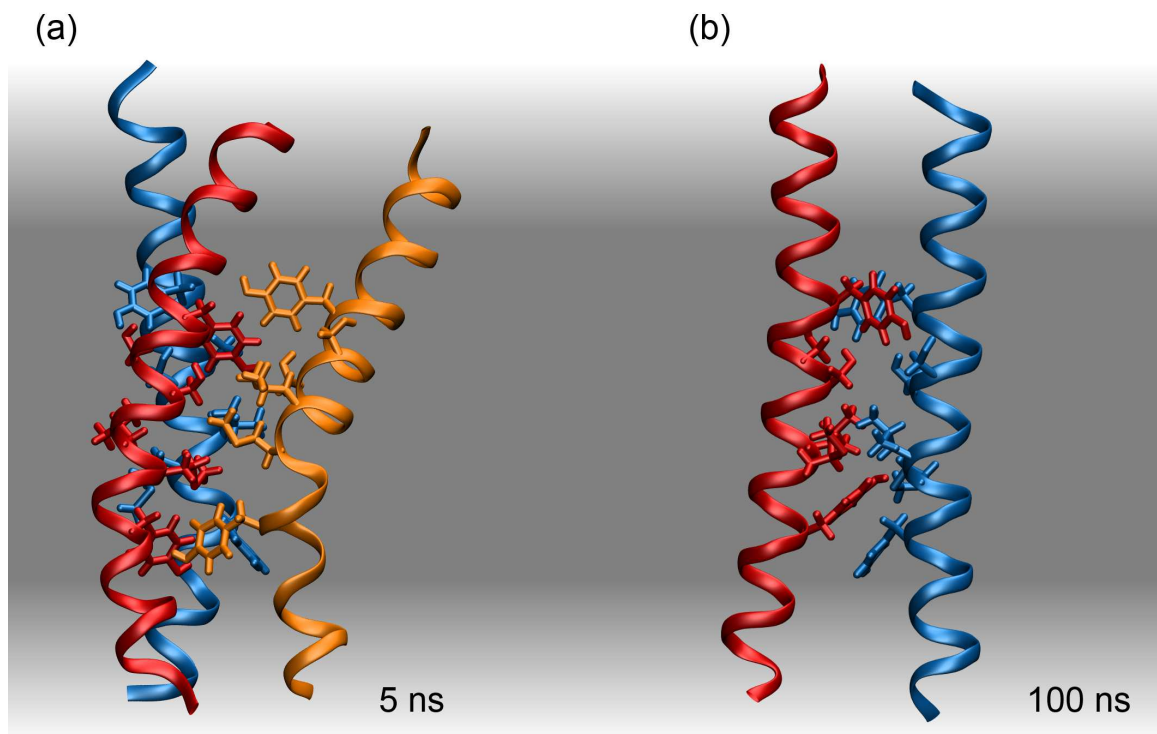
**Abbildung 4.12.:** GMDs Analyse der QSOX2 TMD. Mögliche (a) dimere, (b) trimere und (c) tetramere QSOX2 TMD Oligomere wurden ausgehend von links- und rechtsgängigen Startstrukturen gesucht. Die resultierenden Strukturen wurden anhand ihrer RMSD geclustert, wobei ein Schwellenwert von 1 Å verwendet wurde. Für jedes Cluster mit mehr als neun Kandidaten wurden die enthaltenen Strukturen gemittelt und als Draufsicht mit ihrer N-terminalen Seite zum Betrachter dargestellt. Neben dem abstrahierten Peptidrückgrat (grau) sind nur mutationssensitive Aminosäurereste (schwarz) gezeigt. Es bildeten sich teils redundante Cluster, die nach visueller Überprüfung zu nicht-redundanten Clustern vereinigt wurden. Strukturen mit unterstrichener Beschriftung wurden für weitere Analysen verwendet.

L<sub>663</sub>CVVLYVASSLFLMVMYFF<sub>681</sub>

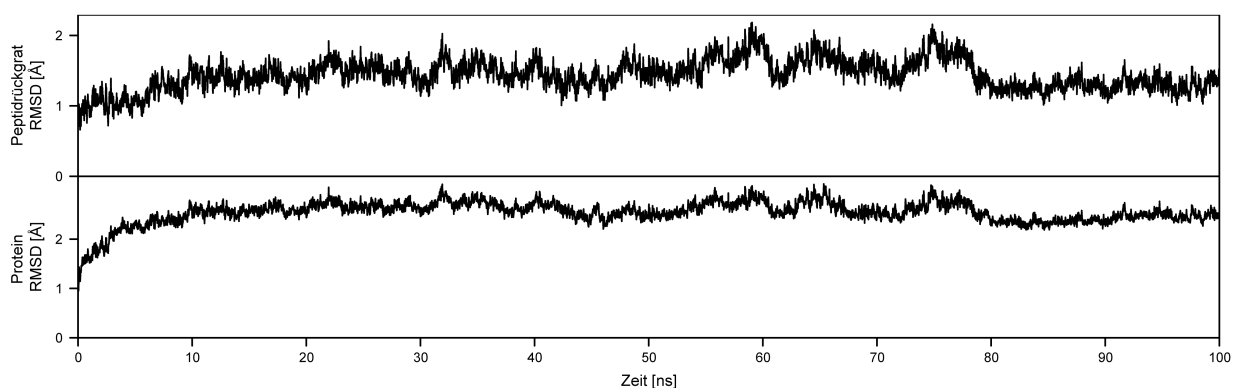
verwendet. Auf Aminosäurereste der Juxtamembranbereiche wurde verzichtet, um nur die Interaktion der TMD zu berücksichtigen. Die Sequenz wurde in eine ideale  $\alpha$ -helikale Proteinstruktur umgesetzt und daraus ein symmetrisches Dimer, Trimer und Tetramer aufgebaut. Ausgehend von den parallel orientierten Startstrukturen wurde jeweils ein links- und ein rechtsgängiger Komplex mit  $\Omega \pm 25^\circ$  erstellt. Anschließend wurde die initiale Helixrotation  $\varphi$  in  $10^\circ$ -Schritten variiert, sodass sich jeweils unterschiedliche Helixseiten berührten. Aufgrund der zwei Kreuzungswinkel und der  $360^\circ/10^\circ = 36$  initialen Helixrotationen ergaben sich jeweils 72 Startstrukturen. Ausgehend von jeder Startstruktur wurden vier kurze MD Simulationen *in vacuo* durchgeführt. Anschließend wurden die Strukturen aufgrund ihrer Ähnlichkeit geclustert. Für jedes Cluster wurde eine gemittelte Struktur berechnet, um die Lage der Aminosäurereste inspizieren zu können. Im Falle einer spezifischen Interaktion sollten die verschiedenen Replikate einer Startstruktur und ähnlicher Startstrukturen mit geringer Abweichung in der initialen Helixrotation  $\varphi$  in einer ähnlichen Struktur konvergieren. Durch die Clusteranalyse lassen sich solche Fälle leicht eingrenzen. Im Falle der dimeren Startstrukturen wurden 14 Cluster mit mindestens neun Mitgliedern und einem RMSD von  $\leq 1 \text{ \AA}$  gefunden. Da sich viele davon zu mehr als 80% in den enthaltenen Strukturen überschneiden, konnten sie manuell zu fünf größeren Clustern zusammengefasst werden. Die gemittelten Strukturen der Cluster wurden visualisiert und mutationssensitive Aminosäurereste hervorgehoben (s. Abb. 4.12a). Nur im Fall von Cluster 14 befanden sich alle mutationssensitiven Aminosäurereste in der Helix-Helix Kontaktfläche. Die Möglichkeit einer trimeren Struktur der QSOX2 TMD wurde ebenfalls untersucht. Nur in der rechtsgängigen Struktur aus Cluster 15 sind die relevanten Aminosäurereste aller drei Helices miteinander in Kontakt (s. Abb. 4.12b). Auch eine mögliche tetramere Struktur wurde mit der GMDS Methode analysiert. Meist waren mutationssensitive Reste entweder der Lipidmembran oder mutationsinsensitiven Resten der Partnerhelices zugewandt. Zudem bildete sich im Zentrum des TM Helixbündels ein Freiraum (s. Abb. 4.12c). Dies würde die Passage von Atomen oder gar kleinen Molekülen ermöglichen und dadurch die Membran permeabilisieren. Da es keinen Hinweis gibt, dass es sich bei der QSOX2 um ein Kanalprotein handelt, wurden nur ein Dimer oder Trimer als mögliche Oligomerstrukturen in Betracht gezogen.

### Detaillierte Simulation

Bis hierhin wurde nur die QSOX2 TMD an sich betrachtet. Für eine möglichst genaue weiterführende Simulation sollten auch die Juxtamembranregionen berücksichtigt werden, da diese in einigen Fällen einen Einfluss auf die Interaktion von TMDn und die Funktion der jeweiligen Proteine haben. Es ist bekannt, dass in diesem Bereich sowohl Protein-Protein als auch Protein-Lipid Interaktionen eine Rolle spielen können (s. z.B. Ref. <sup>[225–227]</sup>). Daher wurden die QSOX2 TM Helices an beiden Ter-



**Abbildung 4.13.:** Struktur des putativen QSOX2 Dimers und Trimers nach ausgewählter Simulationsdauer. Die QSOX2 TMD wurde basierend auf den plausibelsten Strukturen der GMDS Analyse (s. Abb. 4.12a und 4.12b) als Dimer und Trimer modelliert. Beide Komplexe wurden in MD Simulationen mit 100 ns Länge im Umfeld einer Lipidmembran betrachtet. (a) Das Trimer zerfiel bereits nach weniger als 5 ns. Nur zwei der Helices (rot und blau) blieben im weiteren Verlauf assoziiert. (b) Das Dimer blieb über den gesamten simulierten Zeitraum von 100 ns stabil assoziiert. TM Helix-Helix Interaktionen fanden ausschließlich über die experimentell als mutationssensitiv bestimmten Aminosäurereste (in Licorice-Darstellung) statt. Das Peptid-rückgrat der TMDn ist in Banddarstellung gezeigt, der N-Terminus befindet sich jeweils am oberen Bildrand. Die Acylkettenregion der Lipidmembran wurde als graue Fläche angedeutet. Ein Gradient von Grau nach weiß kennzeichnet den Bereich von den Carbonylgruppen der Acylreste bis zu den Phosphatresten der Lipidkopfgruppen.



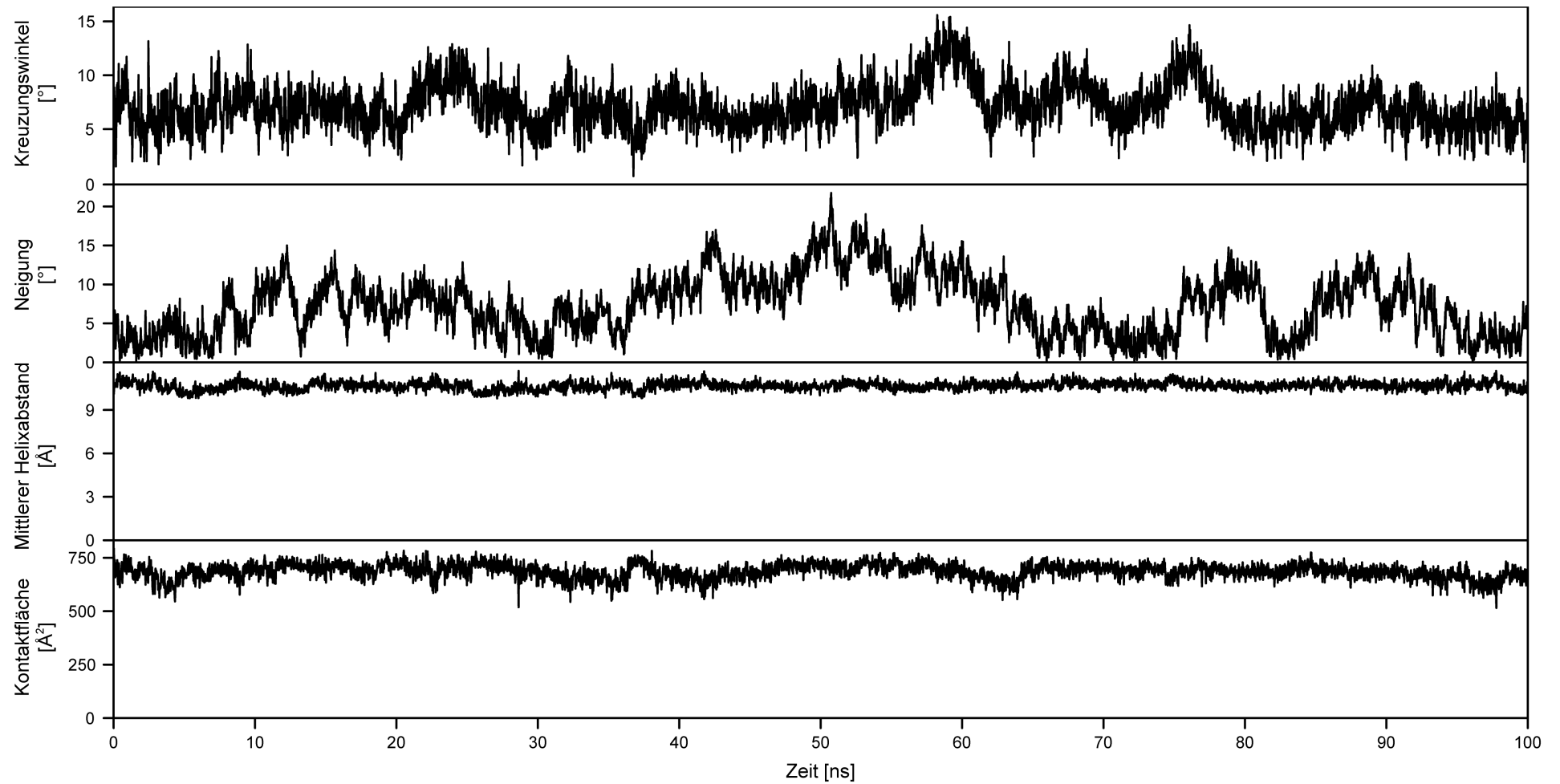
**Abbildung 4.14.:** Veränderung des QSOX2 TMD Dimers während der MD Simulation. Der Unterschied des Dimers relativ zur Startstruktur wurde als „root-mean-square deviation“ (RMSD) berechnet. Innerhalb der ersten 4 ns kam es zu raschen strukturellen Veränderungen. Nach 10 ns scheint die Äquilibration der Dimerstruktur abgeschlossen zu sein. Für weitere Analysen wurde daher der Zeitraum von 10–100 ns verwendet.

mini um jeweils sechs Aminosäurereste aus der Primärsequenz des QSOX2 Proteins ergänzt, um die Juxtamembranregionen einzufügen. Die Peptidsequenz bestand folglich aus den Aminosäureresten Ser<sub>657</sub> bis Arg<sub>687</sub>. Die Juxtamembranregionen wurden in  $\alpha$ -helikaler Form angefügt, sodass sie die  $\alpha$ -Helix der TMD fortsetzten. Um mögliche spezifische Protein-Lipid Interaktionen zu berücksichtigen, wurde eine vereinfachte asymmetrische Lipidmembran aus POPC/-PE/-PS und Cholesterol erstellt (s. Kapitel 3.5.4). Das QSOX2 Dimer (Cluster 14) bzw. Trimer (Cluster 15) wurde in die Lipidmembran eingefügt, indem mit den Peptiden überlappende Lipide entfernt wurden. Das System wurde solvatisiert und auf eine Konzentration von 150 mM KCl gebracht. Die Energie des Systems wurde zunächst, wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben, minimiert und äquilibriert. Anschließend wurden die Simulation ohne Beschränkungen fortgeführt.

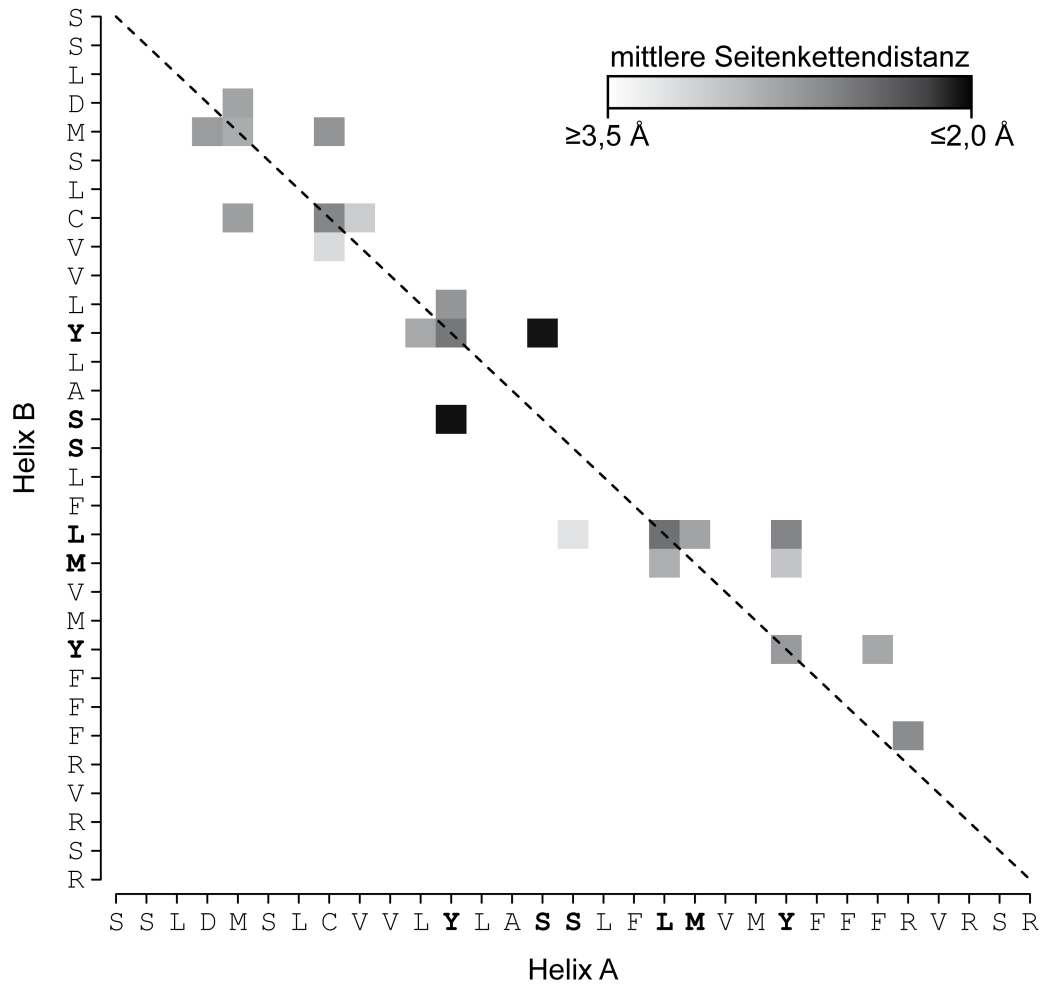
Die Simulationen des Dimers und des Trimers entwickelten sich sehr unterschiedlich. Bereits nach 5 ns begann das Trimer zu zerfallen (s. Abb. 4.13a), wohingegen das Dimer über den gesamten simulierten Zeitraum von 100 ns stabil blieb (s. Abb. 4.13b). Die Stabilität des Dimers lies sich auch an der zeitlichen Veränderung wichtiger struktureller Kenndaten nachvollziehen (s. Abb. 4.15). Die Helices blieben immer in unmittelbarem Kontakt zueinander, was sich sowohl am konstanten mittleren Helix-Helix Abstand von  $10,67 \pm 0,29 \text{ \AA}$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) und der nur gering veränderlichen Größe der Kontaktfläche von  $685,72 \pm 36,02 \text{ \AA}^2$  ablesen lies. Zwar variierte die Neigung des Dimers relativ zum Membrannormal, allerdings pendelte der Wert meist nur im Bereich von  $7,31 \pm 3,85^\circ$ . Auch der Kreuzungswinkel blieb mit  $7,17 \pm 2,07^\circ$  stabil. Für die weiteren Analysen wurde nur der Zeitraum von 10–100 ns betrachtet, um eine möglichst vollständige Äquilibration des Systems sicher zu stellen. In den ersten 10 ns der Simulation veränderte sich die Struktur des Dimers noch vergleichsweise stark (s. Abb. 4.14). Sowohl das Peptidrückgrat, als auch die Seitenketten benötigen 10 ns um zu einer stabilen Struktur zu finden.

Zunächst wurde betrachtet, welche Aminosäureseitenketten der Partnerhelices miteinander in Kontakt standen (s. Abb. 4.16). Es zeigte sich, dass die Kontakte entlang eines großen Abschnittes der TM Helices verliefen. Dies ist auch auf den geringen Kreuzungswinkel des Dimers zurückzuführen. Die Kontaktkarte des Dimers ist größtenteils symmetrisch. Ein enger kreuzweiser Kontakt zwischen Helix A und B besteht beispielsweise im Falle der Seitenketten von Cys<sub>664</sub>-Cys<sub>664</sub>, Tyr<sub>668</sub>-Tyr<sub>668</sub>, Tyr<sub>668</sub>-Ser<sub>671</sub>, Leu<sub>675</sub>-Leu<sub>675</sub>, Leu<sub>675</sub>-Met<sub>676</sub> und Tyr<sub>679</sub>-Tyr<sub>679</sub>. Davon abweichend kommt es zu einem asymmetrischen Kontakt des Tyr<sub>679</sub> von Helix A mit Met<sub>676</sub> und vor allem Leu<sub>675</sub> von Helix B. Dem entgegen gesetzt steht Tyr<sub>679</sub> von Helix B mit Phe<sub>682</sub> von Helix A in Kontakt.

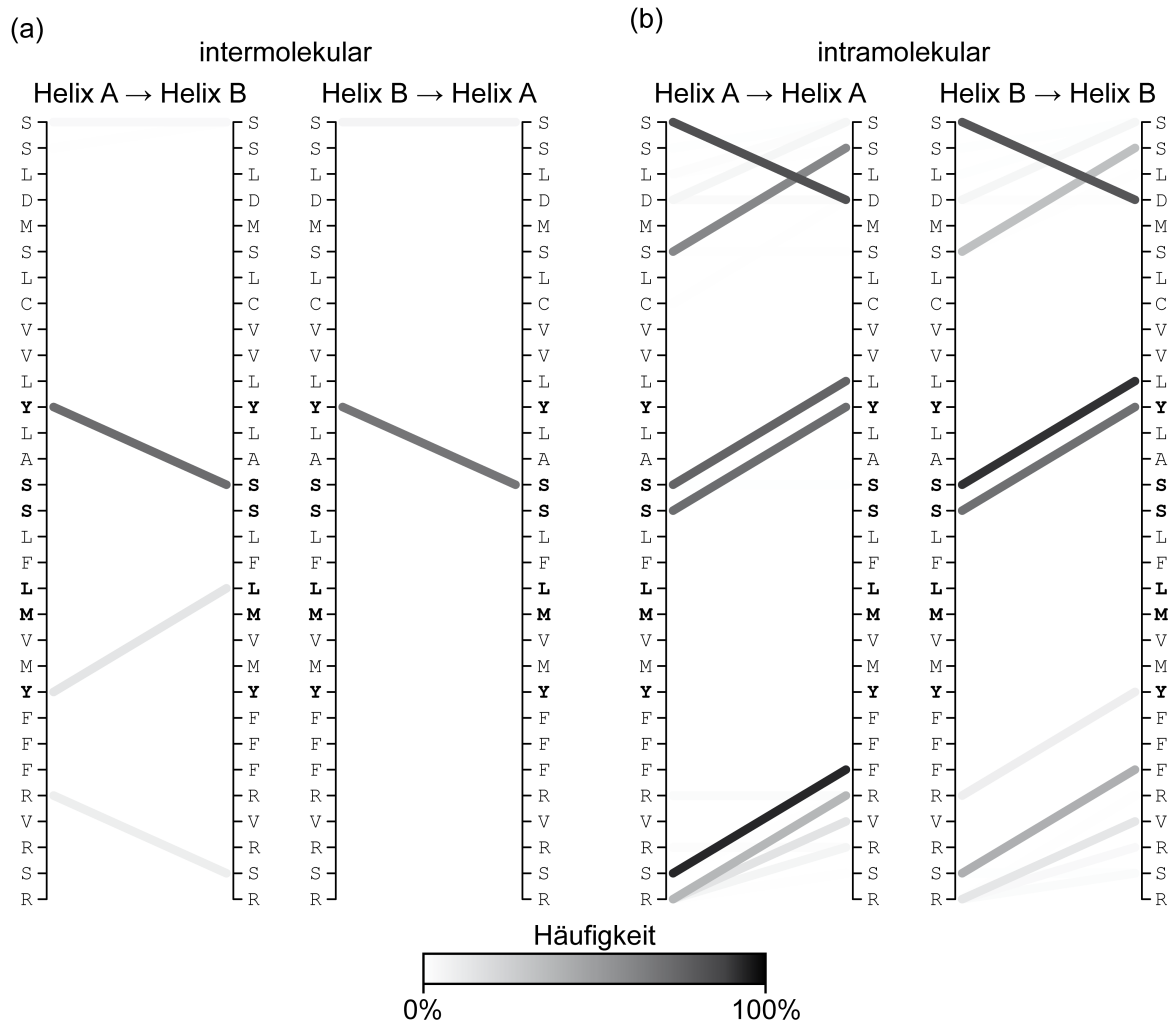
Viele der genannten intermolekularen Kontakte fanden zwischen polaren Aminosäureresten statt. Es zeigte sich, dass hier teils sehr stabile Wasserstoffbrückenbindungen vorlagen. Vor allem die Wechselwirkung zwischen Tyr<sub>668</sub> und Ser<sub>671</sub> beider Helices war sehr häufig zu beobachten. Der zuvor bereits als asymmetrisch erkannte Kontakt zwischen Tyr<sub>679</sub> von Helix A mit Met<sub>676</sub> und vor al-



**Abbildung 4.15.:** Eigenschaften des QSOX2 TMD Dimers während der MD Simulation. Die konstante Größe der Helix-Helix Kontaktfläche und der gleichbleibende mittlere Abstand zwischen den Helices veranschaulicht die Stabilität des Komplexes im gesamten Simulationszeitraum von 100 ns. Obwohl Kreuzungswinkel und Neigung der Helices relativ zur Membran fluktuierten, waren die absoluten Veränderungen gering.



**Abbildung 4.16.:** Intermolekulare Kontakte der Seitenketten im Dimer der QSOX2 TMD. Die MD Simulation des QSOX2 TMD Dimers wurde von 10–100 ns nach Simulationsbeginn betrachtet. Dabei wurde der durchschnittliche minimale Abstand der Seitenketten zwischen den Helices bestimmt. Die Sequenz der TMDn von Ser<sub>657</sub> (oben bzw. links) bis Arg<sub>687</sub> ist jeweils an den Achsen angegeben, wobei für die nicht-kovalente Oligomerisierung relevante Reste fett gedruckt sind. Intermolekulare Kontakte erfolgen entweder zwischen identischen Positionen (entlang der Diagonalen) oder mit Resten, welche  $\pm 3-4$  Positionen entfernt liegen. Fast alle engen Kontakte finden über die mutationssensitiven Reste statt. Während der N-terminale Bereich symmetrisch zur Diagonalen ist, weicht der C-terminale Teil hiervon geringfügig ab.



**Abbildung 4.17.:** Wasserstoffbrückenbindungen im QSOX2 TMD Dimer. Die MD Simulation des Dimers wurde von 10–100 ns nach Simulationsbeginn betrachtet. Die Sequenz der Transmembranpeptide ist von Ser<sub>657</sub> (oben) bis Arg<sub>687</sub> angegeben. Die für die nicht-kovalente Oligomerisierung relevanten Reste sind fett gedruckt. (a) Intermolekulare Wechselwirkungen fanden vorwiegend zwischen Tyr<sub>668</sub> und Ser<sub>671</sub> statt. Eine gelegentliche Interaktion von Tyr<sub>679</sub> und Leu<sub>675</sub> weist auf eine Bindung zwischen der Tyr-Seitenkette von Helix A und der Carbonylgruppe im Peptidrückgrat des Leu-Restes von Helix B hin. (b) Intramolekulare Wechselwirkungen der TMD Region fanden zwischen Ser<sub>671</sub> bzw. Ser<sub>672</sub> und den Resten an Position  $i - 3$  statt. Da Ser<sub>671</sub> schon als Akzeptor für intermolekulare Wechselwirkungen dient und Ser<sub>672</sub> keine sonstigen Interaktionspartner hat, sättigen diese ihr Potential als Wasserstoffbrückendonator durch intramolekulare Interaktion mit dem Peptidrückgrat.

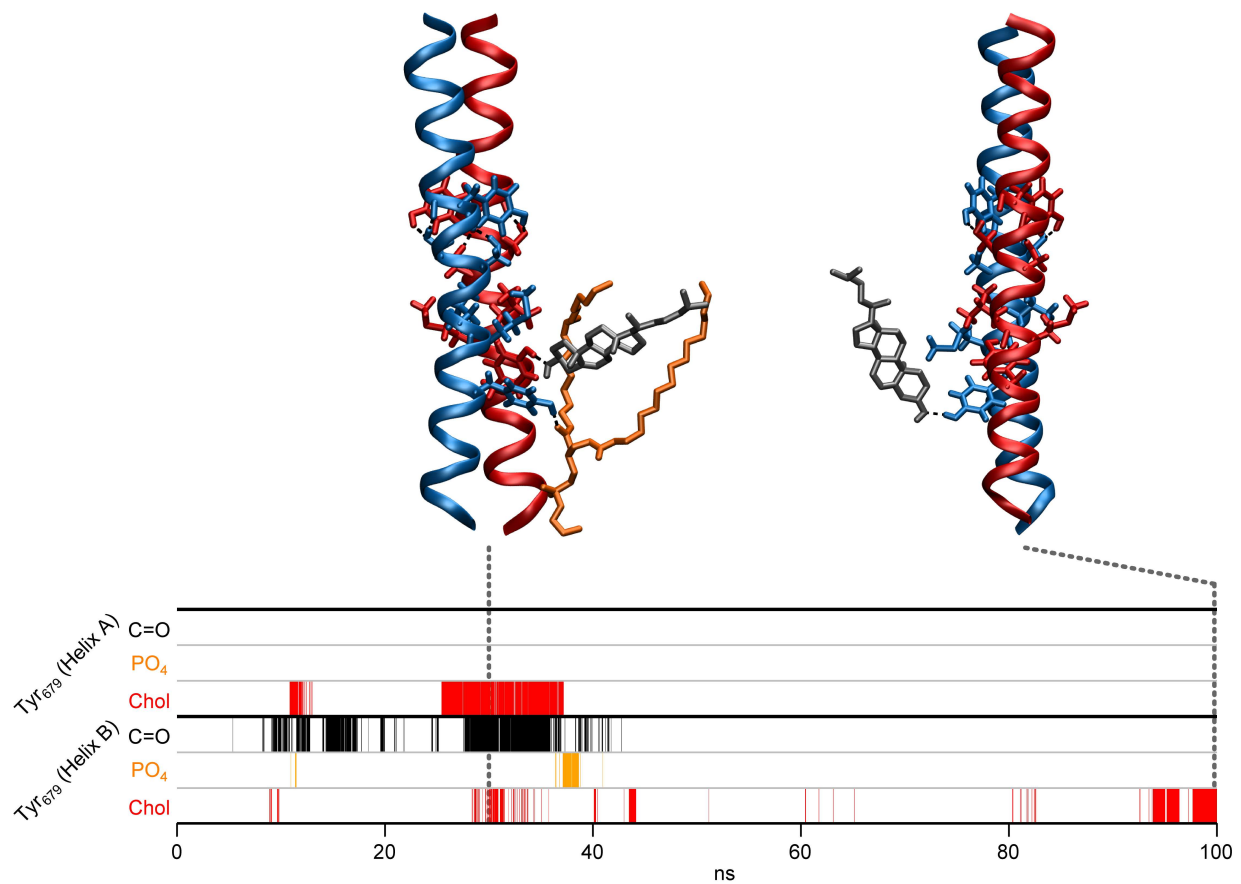


lem Leu<sub>675</sub> von Helix B beruhte auf einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Tyr-Seitenkette und dem Carbonyl-Sauerstoffatom im Peptidrückgrat von Leu<sub>675</sub>. Schwächere oder nur kurzlebige Wechselwirkungen waren zusätzlich zwischen Ser<sub>657</sub>-Ser<sub>657</sub> und Arg<sub>683</sub> von Helix A mit Ser<sub>686</sub> von Helix B zu beobachten (s. Abb. 4.17a). Interessanter Weise traten neben den beschriebenen intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zusätzliche intramolekulare Interaktionen auf. Viele fanden in den Juxtamembranregionen statt. Hervorzuheben sind allerdings die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten von Ser<sub>671</sub> oder Ser<sub>672</sub> und den Carbonyl-Sauerstoffatom im Peptidrückgrat von Leu<sub>667</sub> bzw. Tyr<sub>668</sub> (s. Abb. 4.17b).

Zusätzlich zu den Protein-Protein Interaktionen der beiden TM Helices konnten auch Protein-Lipid Interaktionen beobachtet werden. Die Aminosäurereste Tyr<sub>679</sub> der beiden Helices sind im Gegensatz zur restlichen Struktur nicht punktsymmetrisch angeordnet. Die Seitenkette des einen Tyrosinrests ist in Richtung Zentrum der Lipidmembran, die des anderen in Richtung Membranoberfläche hin orientiert. Der erstere bildet dabei häufig eine Wasserstoffbrücke zum Peptidrückgrat von Leu<sub>675</sub> der Partnerhelix (s. oben). Beide Seitenketten interagierten innerhalb von 100 ns mehrfach mit der Hydroxylgruppe von Cholesterol oder den Carbonyl-Sauerstoffatomen von Glycerolipiden (s. Abb. 4.18). Vor allem der zur Membranoberfläche hin orientierte Rest sättigt seine polare Seitenkette häufig durch Interaktion mit den polaren Gruppen der Lipide ab. Im Falle von Tyr<sub>668</sub> war keine derartige Interaktion mit Lipiden zu beobachten.

### 4.3. Verwendung von homo-FRET als neue Nachweismethode

Zum Nachweis von TM Helix-Helix Interaktionen können verschiedene Assays herangezogen werden. Einige Methoden verwenden in Detergenzien solubilisierete Proteine oder TM Peptide. Nur wenige Methoden ermöglichen die Betrachtung im Kontext einer natürlichen Lipidmembran einer lebenden Zelle. Eine solche Methode ist der in Kapitel 4.2.1 angewendete ToxR-Assay. Dieses und andere genetische Reportersysteme basieren auf der TMD-vermittelten Dimerisierung eines Fusionsproteins, das als Transkriptionsaktivator oder -repressor fungieren kann. Die Fähigkeit zum Binden der Zielsequenz im Promotor des Reportergens ist vom oligomeren Zustand abhängig und steuert so dessen Expression. Der Nachweis der TMD Interaktion erfolgt somit indirekt. Um Protein-Protein Interaktionen direkt und *in cellula* nachzuweisen, wird häufig der FRET-Effekt zwischen Fluorophormarkierten Proteinen eingesetzt. In einem klassischen FRET-basierten Assay werden die interagierenden Proteine mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Dies ist notwendig, da man den Energietransfer anhand der längeren Wellenlänge des vom Akzeptor emittierten Lichts nachweist. Ein Nachteil ist, dass man die betrachteten Proteine zunächst mit Fluorophoren markieren muss. Häufig kommen Proteinfusionen mit fluoreszierenden Proteinen, beispielsweise GFP, RFP oder Va-



**Abbildung 4.18.:** Interaktionen ausgewählter Aminosäurereste des QSOX2 TMD Dimers mit Membranlipiden. Vertikale Linien zeigen eine Interaktion von Tyr<sub>679</sub> der Helix A oder B mit Carbonyl-Sauerstoffatomen der Acylreste (C=O), Phosphatresten der Lipidkopfgruppen (PO<sub>4</sub>) oder Hydroxylresten von Cholesterol (Chol) zum jeweiligen Zeitpunkt an. Für die mit gestrichelten Linien markierten Zeitpunkte sind oben repräsentative Strukturen des TMD Dimers mit den jeweiligen Interaktionspartnern (Cholesterol: grau, Phospholipid: orange) gezeigt. Molekülstrukturen sind, wie in Abb. 4.13 beschrieben, dargestellt.

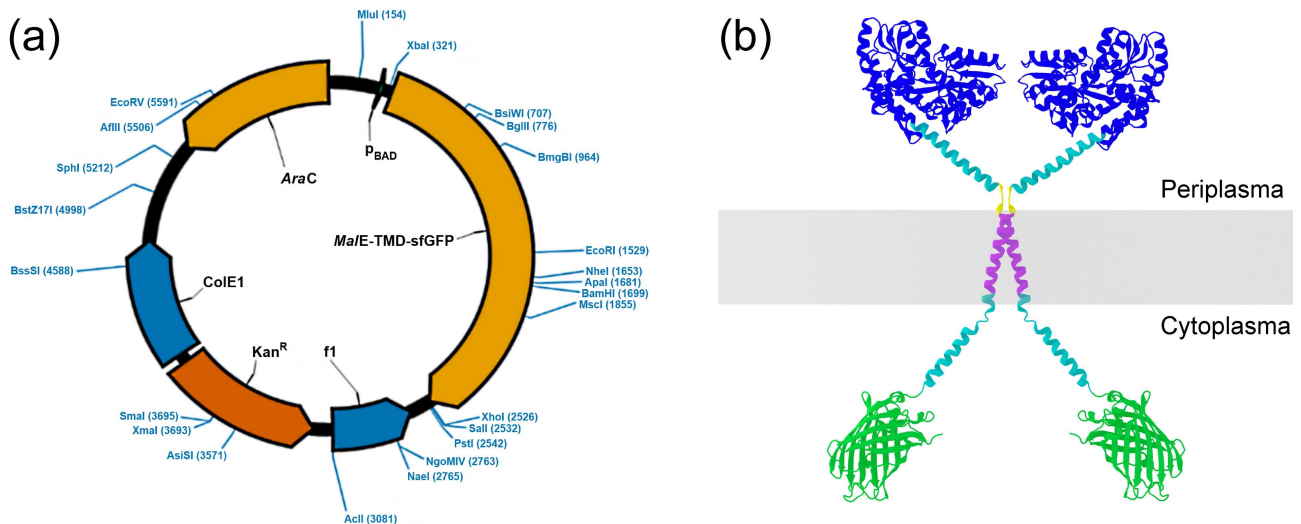
rianten derselben, zum Einsatz. Allerdings müssen auch bei dieser Methode zwei unterschiedliche Fluorophore für den Nachweis des Energietransfers verwendet werden, weshalb die Koexpression zweier Genkonstrukte notwendig ist. Dies erschwert Durchführung und Auswertung. Um TMD Interaktionen direkt und in lebenden Zellen ohne die Nachteile klassischer FRET-basierter Methoden messen zu können und zusätzliche Informationen über die dabei entstehenden Komplexe zu erhalten, sollte ein neues Assay etabliert werden.

#### 4.3.1. Design des Assays

Um die Selbstinteraktion eines bitopischen Membranproteins zu messen, könnte der FRET-Effekt zwischen identischen Fluorophoren (homo-FRET) verwendet werden. Da sich dabei die Wellenlänge des emittierten Lichts mit oder ohne Energietransfer nicht ändert, wird anstelle dessen die Polarisation desselben bestimmt. Durch homo-FRET nimmt diese ab, was einen sensitiven Nachweis mit Hilfe eines Polarisationspektrophotometers ermöglicht (s. Kapitel 1.3).

Um eine effiziente Translation und Translokation zu ermöglichen, wurde das Maltosebindeprotein (*MalE*) verwendet. Eine möglichst hohe Ausbeute an korrekt gefaltetem und maturiertem Fluorophor sollte durch den Einsatz der superfolder GFP Variante<sup>[178]</sup> erreicht werden. Beide Teile wurden zusammen mit Linkersequenzen, wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben, zu einem *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsprotein zusammengefügt. Die TMD wurde dabei N-terminal von der Juxtamembranregion (JM Region) des *H. sapiens* GpA Proteins und C-terminal von der JM Region des „Ion transport 2 domain protein“ aus *Bacillus weihenstephanensis* (UniProt ID A9VEV6) flankiert, um eine effiziente und spezifische Erkennung der jeweiligen TMD durch das Translocon und eine korrekte Orientierung derselben in der Lipidmembran zu ermöglichen. Ein weiterer Grund für die Wahl der C-terminalen JM Region war, dass sie im Rahmen des Ursprungsproteins eine flexible Verbindung zwischen einer TMD und einer cytosolischen  $\alpha$ -Helix darstellt<sup>[228]</sup>. Zur spezifischen Detektion mittels Immundetektion wurde am C-Terminus des Proteins ein modifizierter FLAG-Tag angefügt. Der Aufbau des resultierenden Vektors ist als Plasmidkarte in Abb. 4.19a und als annotierte Nukleotidsequenz in Kapitel A.1.2 festgehalten. Durch Kombination bestehender Strukturdaten aus der PDB Datenbank wurde eine Darstellung des *MalE*-TMD-sfGFP Proteins erzeugt (s. Abb. 4.19b). Diese ermöglicht einen Eindruck von der ungefähren Struktur des Fusionsproteins und verdeutlicht u.a. die Notwendigkeit der Linkersequenzen zur Vermeidung sterischer Hinderungen bei der Oligomerisierung.

Verschiedene TMD Sequenzen wurden in das Fusionsprotein integriert und dessen Expression in *E. coli* überprüft. Nach Transformation mit den jeweiligen Vektoren und basaler Expression des  $p_{BAD}$ -Promotors für 16 h war ein Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht von 79,26 kDa spezifisch detektierbar (s. Abb. 4.20). Lediglich die QSOX2 TMD wies zwei zusätzliche Banden, eine bei etwa 28 kDa und eine weitere bei mehr als 200 kDa auf. Dies wird in Kapitel 4.3.5 weitergehend untersucht.

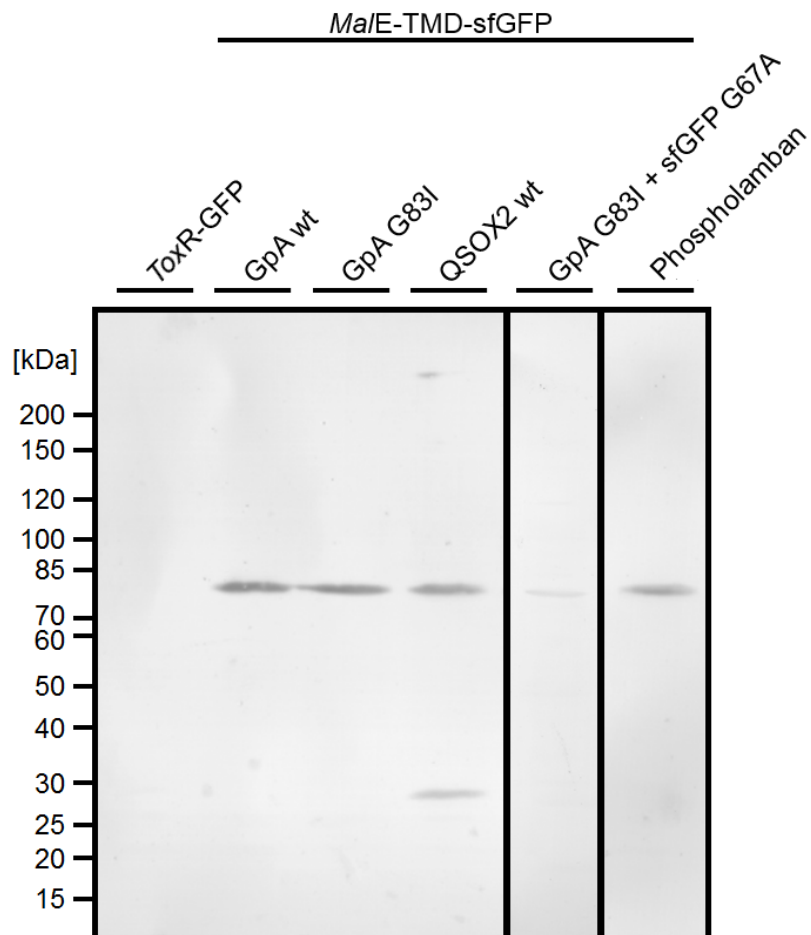


**Abbildung 4.19.:** Aufbau des *maleE*-TMD-sfGFP Expressionsvektors und mögliche Struktur des Fusionsproteins. (a) Die Plasmidkarte zeigt die Position der Replikationsursprünge (blau), des Kanamycin-Resistenzgens (orange), des *p<sub>BAD</sub>* Promotors (grün) und sonstiger kodierender Sequenzen (gelb). Nur einmal enthaltene Restriktionsschnittstellen sind auf der Außenseite des 6186 bp großen Vektors angegeben. (b) Die theoretische Struktur des Fusionsproteins wurde aus bestehenden Strukturdaten manuell zusammengesetzt. In der Lipidmembran (grau) befindet sich ein GpA TMD Homodimer (lila, PDB ID: 1afo). Jede TMD ist über die JM Region und cytosolische Helix des „Ion transport 2“ Proteins (türkis, PDB ID: 3vou) mit einer GFP-Domäne (grün, PDB ID: 1bfp) verbunden. Die gleiche Helix wurde auch zur Modellierung des längeren periplasmatischen Linkers verwendet (türkis). Dieser verbindet die *MaIE*-Domäne (blau, PDB ID: 1anf) mit der N-terminalen GpA JM Region (gelb).

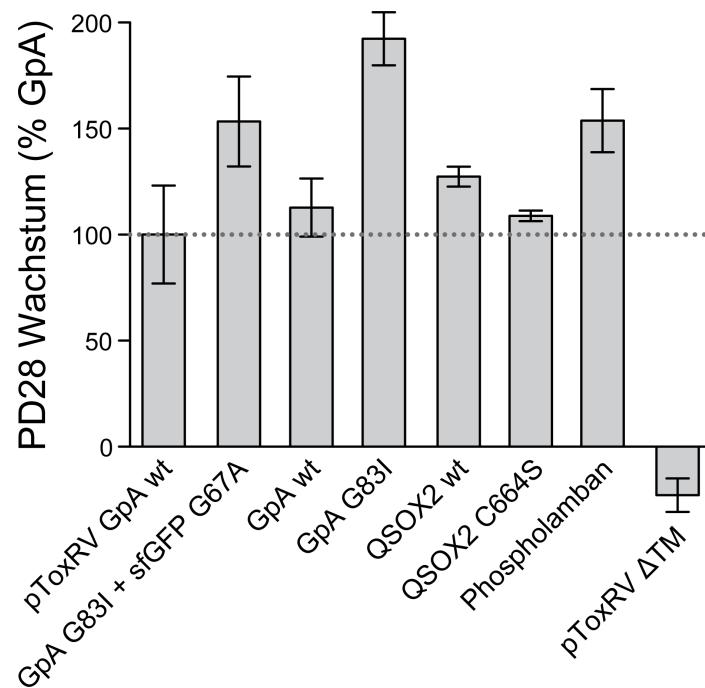
Das Protein mit der sfGFP G67A Mutation war im Vergleich zu den anderen Proteinen in geringeren Mengen vorhanden.

#### 4.3.2. Lokalisation und Topologie des homo-FRET Fusionsproteins

Fusionsproteine mit N-terminaler *MaIE* Domäne werden normalerweise mit dem N-Terminus voran durch den *SecYEG* Komplex transloziert. Es kann angenommen werden, dass die angefügte TMD Sequenz eine Integration in die Plasmamembran ermöglicht und das Fusionsprotein somit ein Typ I Membranprotein ist. Die C-terminale sfGFP Domäne sollte daher im Cytoplasma verbleiben, während die *MaIE* Domäne im Periplasma lokalisiert ist. Um die Topologie des Fusionsproteins zu bestätigen, wurde zunächst die Lokalisation der *MaIE*-Domäne bestimmt. Hierzu wurde der PD28-Assay angewendet, bei dem *E. coli* Zellen ohne endogenes *MaIE* verwendet werden. Bei korrekter Topologie kann das Fusionsprotein die *MaIE*-Defizienz der Zellen komplementieren und deren Wachstum in Minimalmedium mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle ermöglichen. Die Fähigkeit zur Komplementation der *MaIE*-Defizienz wurde relativ zum *ToxR*-Fusionsprotein (Typ II Membranprotein mit C-terminaler *MaIE*-Domäne) bestimmt (s. Abb. 4.21). Die Proteinkonstrukte  $\Delta TM$  (*ToxR-MaIE*)<sup>[183]</sup> und *ToxR*-GFP (Eric Lindner, persönliche Kommunikation) liegen bekanntermaßen im Cytosol vor, da die *ToxR*-Domäne allein kein hinreichendes topogenes Signal enthält<sup>[181]</sup> und können die *MaIE*-Defizienz der PD28 Zellen nicht komplementieren. Das vom pToxRV Vektor exprimierte *ToxR*-GpA



**Abbildung 4.20.:** Expression des  $p_{BAD}::malE$ -TMD-sfGFP Gen in *E. coli*. *E. coli* FHK12 Zellen wurden mit den entsprechenden Vektoren transformiert und uninduziert für 16 h in LB-Medium kultiviert. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Immunoblot mit einem anti-FLAG Antikörper überprüft. Bei der Expression eines Proteins ohne FLAG-Epitop (*ToxR*-GFP) waren keine Banden zu beobachten, was die Spezifität der Detektion demonstriert. Die Transformation mit Vektoren, die das  $p_{BAD}::malE$ -TMD-sfGFP Gen tragen, führte hingegen zur Expression eines Proteins mit dem erwarteten Molekulargewicht von etwa 80 kDa. Die sfGFP G67A Mutation führte zu einer verringerten Proteinmenge. Bei Verwendung der QSOX2 TMD waren zwei zusätzlichen Banden bei etwa 28 und mehr als 200 kDa zu beobachten.



**Abbildung 4.21.:** Die *MalE*-Domäne der *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsproteine befindet sich im Periplasma. Die angegebenen Fusionsproteine wurden durch die basale Expression des  $p_{BAD}$ -Promotors in *MalE*-defizienten *E. coli* PD28 Zellen exprimiert. Anschließend wurde das Wachstum der Zellen mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle bestimmt. Die *MalE*-Domäne des im ToxR-Assay verwendeten Fusionsproteins (pToxRV GpA wt) ist bekanntermaßen im Periplasma lokalisiert und kann die *MalE*-Defizienz der PD28-Zellen komplementieren. ToxR-Fusionen ohne TMD (pToxRV ΔTM) verbleiben, wie im Text beschrieben, im Cytoplasma. Die Aufnahme von Maltose und ein Wachstum der Zellen ist dadurch nicht möglich. Die Expression der verschiedenen *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsproteine führte unter diesen Bedingungen zu Wachstum.



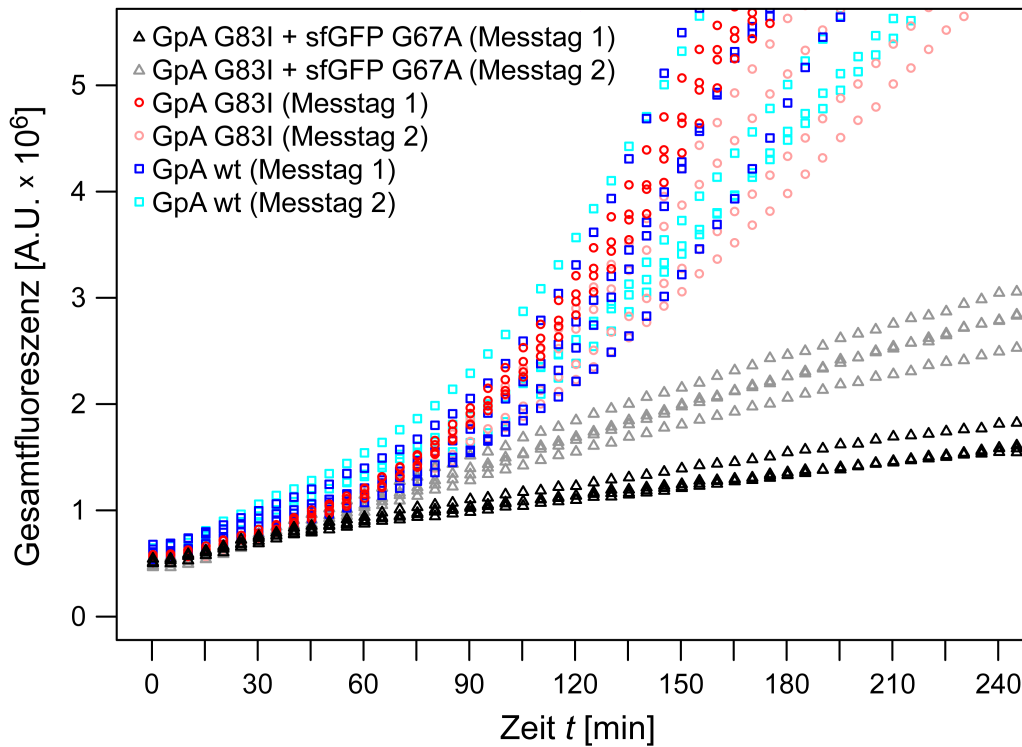
**Abbildung 4.22.:** Lokalisation von *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsproteine in *E. coli*. Verschiedene Fusionsproteine wurden für 3 h in *E. coli* FHK12 Zellen exprimiert und anschließend mikroskopiert. Bei Expression des im ToxR-Assay eingesetzten nicht-fluoreszierenden ToxR-TMD-*MalE* Proteins konnte nur eine geringe Autofluoreszenz des gesamten Zellkörpers beobachtet werden. Das bekannterweise cytosolische ToxR-GFP Protein führte zu Fluoreszenz im Cytoplasma und dem Auftreten von stark fluoreszierenden Bereichen, bei denen es sich wahrscheinlich um Einschlusskörperchen handelte. Die Fluoreszenz der *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsproteine konnte hingegen überwiegend im Randbereich der Zellen beobachtet werden. Alle Bilder entstanden bei 2 s Belichtung und wurden der besseren Sichtbarkeit halber invertiert. Der Maßstabsbalken im linken Bild entspricht 2  $\mu\text{m}$ .

wt TMD-*MalE* Fusionsprotein integriert hingegen in die Plasmamembran, wobei die *MalE*-Domäne im Periplasma lokalisiert ist. Dort ermöglicht es die Aufnahme von Maltose in die Zellen und führt so zu einem Wachstum im Maltose-haltigen Minimalmedium. Für den Anisotropie-basierten Assay wurden mittels Kassettenklonierung verschiedene TMD Sequenzen in das *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsprotein eingefügt (s. Kapitel 3.2.6). Alle ermöglichten ein mindestens gleich starkes Wachstum der PD28 Zellen wie bei Expression des *ToxR*-TMD-*MalE* Fusionsproteins des *ToxR*-Assays. Der N-Terminus der neu entworfenen Proteine, die *MalE* Domäne, muss demzufolge im Periplasma lokalisiert sein.

Ob die Fusionsproteine aufgrund der sfGFP Domäne fluoreszierend sind, wurde durch Expression in *E. coli* FHK12 Zellen überprüft. Die Kulturen wurden bei 37 °C bis zum Erreichen einer  $OD_{600} \approx 0,3$  inkubiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von Arabinose (Endkonzentration 0,02%) induziert und die Kulturen für weitere 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eiskaltem PBS gewaschen und resuspendiert. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben, mikroskopiert, um die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine zu bestimmen (s. Abb. 4.22). Zellen, die das nicht fluoreszierende *ToxR*-TMD-*MalE* Fusionsprotein exprimierten, zeigten nur eine sehr geringe Autofluoreszenz. Das *ToxR*-GFP Protein ohne eine TMD führte hingegen zu einer gleichmäßigen Fluoreszenz im Cytoplasma der Zellen. Hier waren zudem stark fluoreszierende Regionen zu erkennen, bei denen es sich wahrscheinlich um Einschlusskörperchen handelte. Im Gegensatz dazu war bei Expression des *MalE*-TMD-sfGFP Proteins in der Peripherie der Zellen Fluoreszenz zu beobachten. Dies war unabhängig von den hier gewählten TMD Sequenzen (GpA wt, GpA G83I, QSOX2 oder Phospholamban) der Fall. GFP faltet sich nicht unter den oxidierenden Bedingungen des Periplasmas und ist dadurch nicht fluoreszierend<sup>[229]</sup>. Die beobachtete periphere Fluoreszenz nach Expression der Fusionsproteine demonstriert eine cytoplasmatische Lokalisation der sfGFP Domäne, welche an die innere Membran gebunden ist. Die periplasmatische Lokalisation der *MalE*-Domäne und die cytosolische Lokalisation der sfGFP-Domäne demonstrieren die Integration der Fusionsproteine in die Plasmamembran der *E. coli* Zellen mit einer Typ I Topologie.

#### 4.3.3. Messung und Datenauswertung

Um zu untersuchen, ob eine TMD-vermittelte Dimerisierung des Fusionsproteins zu einer unterschiedlichen Fluoreszenzanisotropie führt, wurden zwei mögliche Referenzkonstrukte herangezogen. Zum Einen wurde die GpA TMD Sequenz (GpA wt) als Beispiel für eine homodimerisierende TMD verwendet. Zum Anderen wurde die GpA TMD Sequenz mit der als monomerisierend bekannten Mutation G83I (GpA G83I)<sup>[108]</sup> eingesetzt. Um Autofluoreszenz und Streulicht von der eigentlichen sfGFP Fluoreszenz unterscheiden zu können, wurde GpA G83I mit der zusätzlichen G67A



**Abbildung 4.23.:** Zeitliche Entwicklung der Gesamtfluoreszenz während der Expression von *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsproteinen. Das *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsprotein wurde in *E. coli* FHK12 exprimiert. Die TMD Sequenz entsprach dabei der GpA TMD (blaue Vierecke) oder deren G83I Mutante (rote Kreise). Um später den Beitrag von Puffer und Zellen an der Autofluoreszenz der Proben bestimmen zu können, wurde auch die nicht-fluoreszierende Variante GpA G83I + sfGFP G67A eingesetzt (schwarze Dreiecke). Dargestellt sind Daten von zwei unterschiedlichen Messtagen (dunkle bzw. helle Farbgebung) und jeweils vier monoklonalen biologischen Replikaten. Eine hohe Fluoreszenz zu Beginn der Messung ging mit einem starken Anstieg im weiteren Verlauf einher.

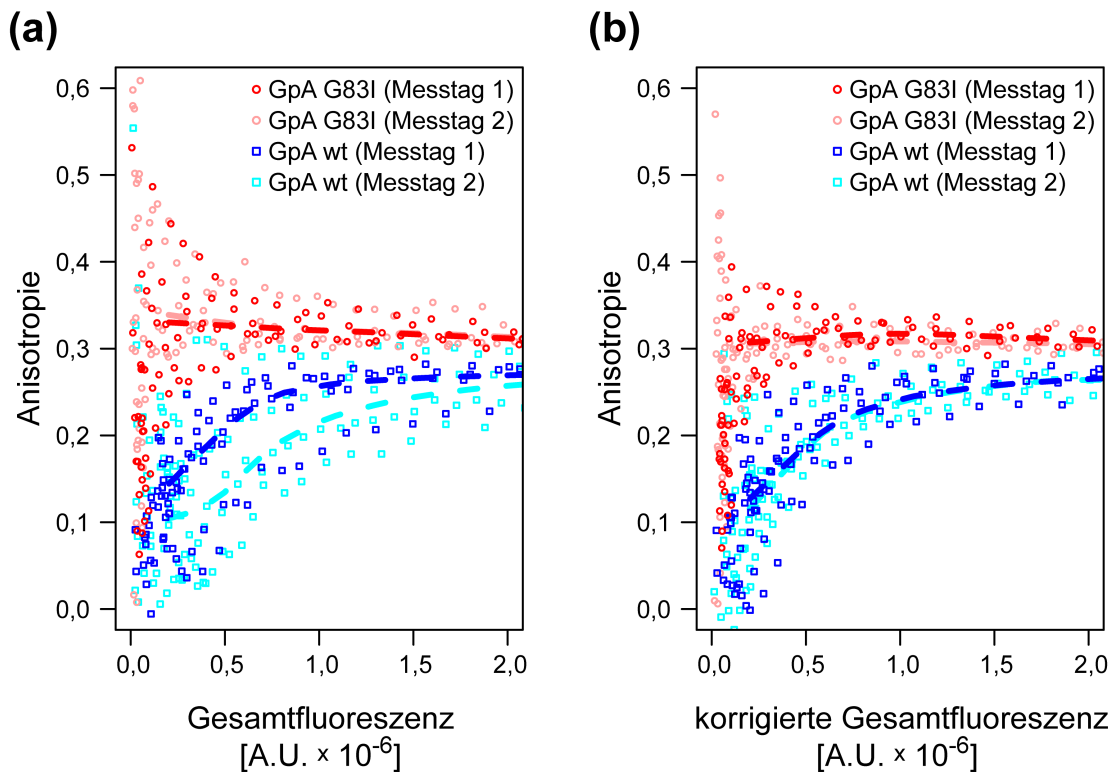
Mutation in der sfGFP Domäne (GpA G83I + sfGFP G67A) zur Ermittlung des Leerwerts verwendet. Die durch diese Mutation vergrößerte Seitenkette verhindert die autokatalytische Bildung des Fluorophors und führt zu einem nicht-fluoreszierenden Protein<sup>[230]</sup>.

Die Fusionsproteine wurden, wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, in *E. coli* FHK12 Zellen exprimiert. Dieser Stamm hat den Vorteil, dass er die zum induzieren des  $p_{BAD}$ -Promotors verwendete Arabinose nicht verstoffwechselt. Zusätzlich sichert es die Vergleichbarkeit zu dem ebenfalls mit diesem Stamm durchgeführten ToxR-Assay. Die transformierten Zellen wurden mehrmals in PBS gewaschen und letztlich auch resuspendiert. Die Zellen wurden durch Verdünnen auf eine einheitliche  $OD_{600}$  eingestellt und die Expression durch Zugabe von Arabinose induziert. Ein Aliquot jeder Probe wurde in eine 96-well Platte überführt und im vortemperierten Polarisationspektrometer bei 27 °C inkubiert. Alle 5 min wurde die Anisotropie durch Messung der Fluoreszenzintensität im parallelen ( $I_{\parallel}$ ) und antiparallelen Kanal ( $I_{\perp}$ ) bestimmt. Gleichzeitig wurde die Anisotropie einer verdünnten Uranin-Lösung gemessen, um später den Gerätefaktor  $G$  bestimmen zu können. Für jedes Fusionsprotein wurden vier biologische Replikate (monoklonale Kulturen) verwendet. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurde der Versuch an einem anderen Tag wiederholt.



Betrachtet man die zeitliche Entwicklung der Gesamtfluoreszenz  $I_{\text{total}}(t) = I_{\parallel}(t) + 2 \cdot G \cdot I_{\perp}(t)$ , wird deutlich, dass sich die Proben merklich unterscheiden (s. Abb. 4.23). Die Gesamtintensität der nicht-fluoreszierenden Kontrolle (GpA G83I + sfGFP G67A) nahm nur wenig und dabei fast linear zu, was auf die Autofluoreszenz der Zellen und ihr Wachstum während des Versuchszeitraums zurückgeführt werden kann. Nach etwa 15 min stieg die Gesamtfluoreszenz der übrigen Proben im Vergleich zur Kontrolle deutlich. Hier wurde die Translation, Faltung und Maturierung der ersten Fusionsproteine abgeschlossen, die daraufhin in den Zellen akkumulierten. Die Kurvenverläufe unterscheiden sich nicht nur zwischen den Proben, sondern auch unter den Replikaten. Dies könnte auf unterschiedliche Startbedingungen wie z.B. eine abweichende Zelldichte, Temperatur, oder variable Expression zwischen den verwendeten Klonen zurückzuführen sein. Aufgrund dessen ist es nicht sinnvoll, die Anisotropie in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  zu betrachten. Die Gesamtfluoreszenz  $I_{\text{total}}$  stellt eine verlässlichere Basis zum Vergleich der Messreihen dar. Sie ermöglicht die Bestimmung der Anisotropie (und damit des Oligomerisierungsgrades) relativ zur Menge an Fusionsprotein in der jeweiligen Probe. Die Messwerte wurden zunächst mit Hilfe des nicht-fluoreszierenden Fusionsproteins korrigiert, um die Autofluoreszenz der Zellen und des verwendeten Puffers zu berücksichtigen (s. Kapitel 3.4.3). Anschließend wurde die Anisotropie  $r(t)$  aller Messpunkte bestimmt und gegen die zugehörige Gesamtfluoreszenz  $I_{\text{total}}(t)$  aufgetragen (s. Abb. 4.24a). Die Punktwolken für GpA wt und GpA G83I überlappen sich kaum. Dabei zeigt der Wildtyp eine deutlich niedrigere Anisotropie als die G83I Mutante. Allerdings ist die Streuung innerhalb der Messreihen und auch zwischen den Messtagen relativ hoch. Entsprechend sind die jeweiligen Regressionskurven verschieden. Besonders für die G83I Mutante ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Messtagen zu beobachten.

Um diese Abweichungen weiter auszugleichen, wurden die Fluoreszenzwerte auf die Anzahl an Zellen der jeweiligen Probe zu Beginn der Messung normalisiert. Bei einer einheitlichen Expressionsrate würden Proben mit mehr Zellen einen schnelleren Anstieg der Gesamtfluoreszenz aufweisen, obwohl der Proteingehalt und die Proteinkonzentration pro Zelle identisch wären. Vor Beginn der Anisotropiemessung und nach dem Einstellen der Zelldichte auf eine  $\text{OD}_{600} = 1,0$  durch Verdünnung der Proben wurden die resultierenden  $\text{OD}_{600 \text{ roh}}$  gemessen. Die Abweichung von der beabsichtigten Zelldichte wurde genutzt, um die Fluoreszenzrohdaten  $\vec{I}_{\text{roh}}$  mittels der Formel 3.4.3 zu normalisieren. Aus den normalisierten Fluoreszenzintensitäten  $\vec{I}_{\text{norm}}$  wurde wie zuvor die Gesamtfluoreszenz  $I_{\text{total}}/t$  berechnet, die durch die Normalisierung nun der  $I_{\text{total}}(t)/\text{OD}_{600}$  entspricht. Auf Grundlage der korrigierten Fluoreszenzwerte wurde die Anisotropie gegen die zugehörige normalisierte Gesamtfluoreszenz aufgetragen (s. Abb. 4.24b). Die Punktwolken zeigen danach eine geringere Streuung und bessere Trennung. Zudem haben sich die Abweichungen zwischen den Messtagen deutlich reduziert, was vor allem die Messreihen der GpA G83I Mutante betrifft. Alle folgenden



**Abbildung 4.24.:** Fluoreszenzanisotropie während der Expression von *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsproteinen. Für die Messreihen aus Abb. 4.23 wurde die Anisotropie für jeden Messpunkt bestimmt. Die Daten von zwei Messtagen (dunkle bzw. helle Farbgebung) wurden getrennt voneinander durch Ausgleichsrechnung mit einem Polynom dritten Grades approximiert. (a) Die Punktwolken für Proben mit GpA wt TMD (hellblaue und blaue Vierecke) und GpA G83I TMD (hellrote und rote Kreise) sind gut voneinander zu unterscheiden. Bei geringer Gesamtintensität ist die Streuung der Einzelwert höher, was auf ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis zurückzuführen ist. Die Ausgleichskurven zeigen, dass sich die Anisotropie der GpA G83I Mutante während der Expression des Proteins kaum verändert. Das Protein mit der GpA wt Sequenz zeigt besonders bei geringen Proteinmengen (zu Beginn der Expression) eine deutlich niedrigere Anisotropie. (b) Durch Normalisierung der Rohdaten mit Hilfe der  $OD_{600}$  jeder Probe vor Beginn der Messung ließ sich die Streuung der Punkte weiter reduzieren. Die korrigierte Fluoreszenz entspricht  $I_{\text{total}}/1 OD_{600}$ . Sowohl die Abweichungen zwischen Replikaten als auch Messtagen wurden dadurch verringert. Es wird umso deutlicher, dass sich die mittlere Anisotropie aufgrund der GpA wt und G83I TMD unterscheidet.

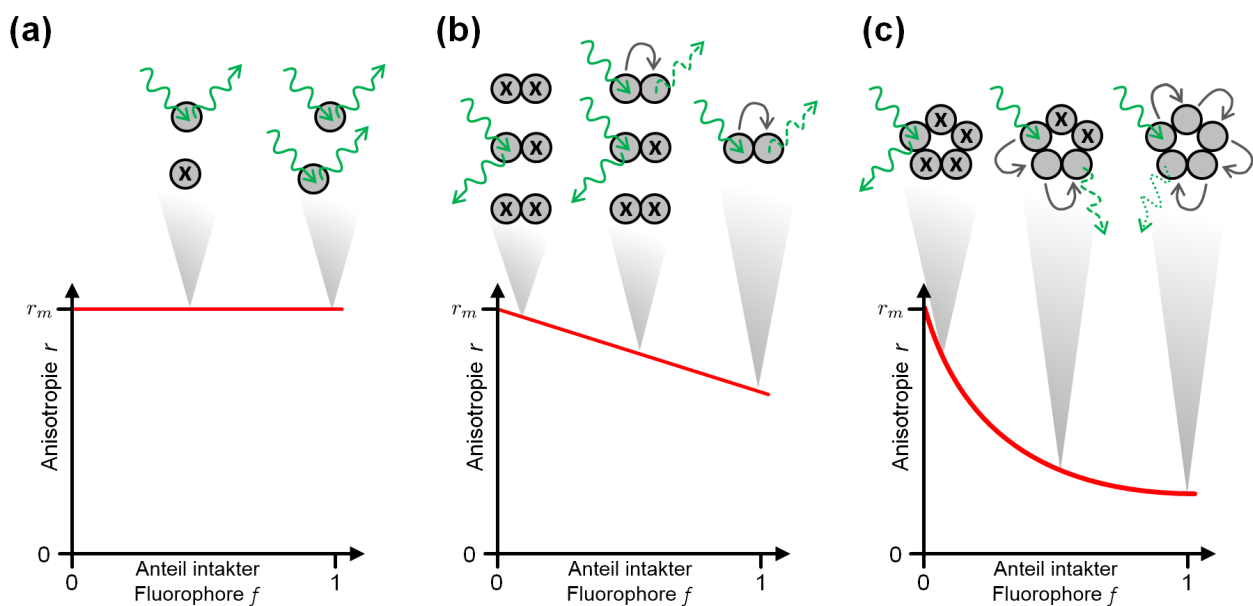
Messungen wurden auf diese Weise ausgewertet.

#### 4.3.4. Bestimmung des Oligomerisierungsgrads

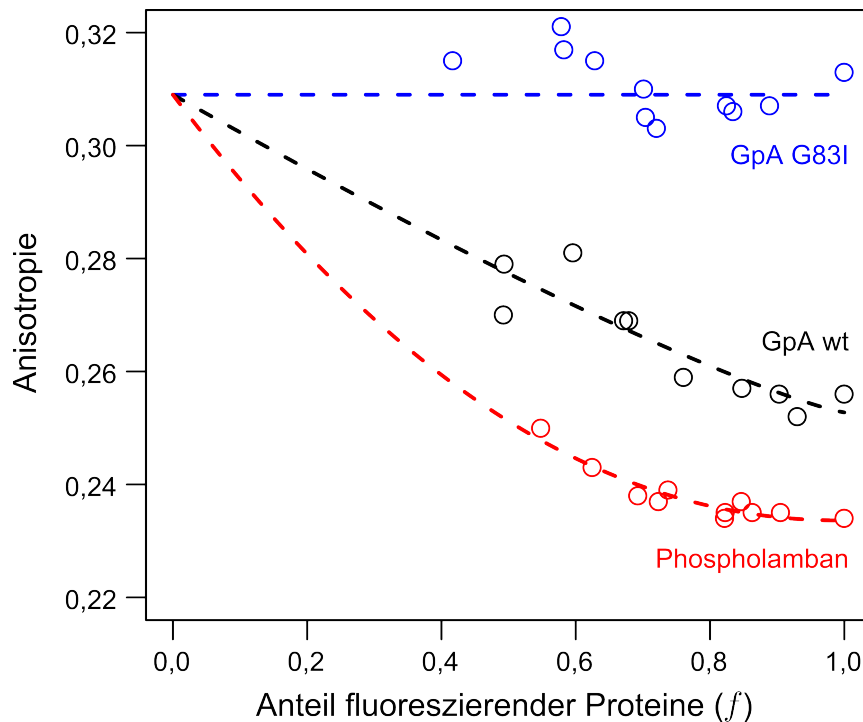
Anhand der Fluoreszenzanisotropie lässt sich nicht nur die Kolo-kalisation von Fluorophoren nachweisen, sondern theoretisch auch der Oligomerisierungsgrad bestimmen<sup>[231]</sup>. Dabei wird zum Einen ausgenutzt, dass homo-FRET nach Anregung eines Fluorophors wiederholt stattfinden kann. Die Energie wird dabei mehrmals von Fluorophor zu Fluorophor weitergegeben. Zum Anderen unterscheiden sich Absorptions- und Emissionsdipolmoment der Fluorophore, sodass das letztlich emittierte Licht umso stärker depolarisiert ist, je mehr Fluorophore beteiligt waren.

Der Oligomerisierungsgrad lässt sich durch den Einsatz von nicht-fluoreszierenden Interaktionspartnern bestimmen. Je höher der Anteil an solchen Proteinen ist, desto wahrscheinlicher kommen sie als Untereinheiten in den Komplexen vor. Die Energie von fluoreszierenden Untereinheiten kann

nicht mittels homo-FRET auf die kompetierenden nicht-fluoreszierenden Proteine übertragen werden. Dadurch nimmt die Häufigkeit von homo-FRET und die Depolarisation des letztlich emittierten Lichts ab. Misst man die Anisotropie bei verschiedenen Mengen des nicht-fluoreszierenden Kompetitors, ergibt sich ein charakteristischer Kurvenverlauf. Im Falle eines monomeren Proteins findet homo-FRET höchstens durch zufällige Kollokalisierung (engl. „concentration depolarisation“) statt, wodurch das Licht kaum depolarisiert und eine hohe Anisotropie gemessen wird. Ein Kompetitor hat folglich kaum Auswirkung auf die Anisotropie (s. Abb. 4.25a). Ein dimeres Protein wird hingegen schon bei geringen Mengen des Kompetitors beeinflusst, denn es gibt nur einen potentiellen Akzeptor im Komplex. Folglich findet homo-FRET statt oder nicht (s. Abb. 4.25b). In höheren Oligomeren nimmt der Einfluss des Kompetitors bei geringen Konzentrationen desselben deutlich ab. Beispielsweise beeinflusst eine einzelne nicht-fluoreszierende Untereinheit in einem Pentamer die Anisotropie nur minimal. Ein angeregtes Fluorophor kann seine Energie noch auf drei andere Akzeptoren übertragen. Erst wenn die Menge an Kompetitor zunimmt, macht sich dies als Zunahme der Anisotropie bemerkbar (s. Abb. 4.25c).



**Abbildung 4.25.:** Modell zum Einfluss des Oligomerisierungsgrads und nicht-fluoreszierender Proteine auf die Fluoreszenzanisotropie. (a) Liegt ein Fluorophor als Monomer vor, kann kein homo-FRET stattfinden. Die Anisotropie wird nur durch die intrinsische Depolarisation (Rotationskorrelationszeit, Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment) der Fluorophore bestimmt. Die Anisotropie entspricht folglich immer  $r_m$ , wenn man die konzentrationsabhängige Depolarisation durch zufällige Kollokalisierung vernachlässigt. (b) Ein dimeres Fluorophor ermöglicht das Auftreten von homo-FRET. Dadurch kommt es zu einer zusätzlichen Depolarisation des emittierten Lichts. Nimmt  $f$  ab, treten Dimere mit nicht-fluoreszierenden Untereinheiten auf. Letztere können nicht als Akzeptoren dienen und verhindern so das Auftreten von homo-FRET in diesen Komplexen. Mit abnehmendem  $f$  nimmt der Anteil solcher gemischten Oligomere zu und die Häufigkeit von homo-FRET folglich ab. Bei sehr kleinem  $f$  nähert sich die Anisotropie dadurch  $r_m$  an.  $r$  verhält sich im Falle eines Dimers linear proportional zu  $f$ . (c) Bei höheren Oligomeren wie etwa einem Pentamer ermöglicht die Nähe der Fluorophore den sequentiellen Transfer der absorbierten Energie. Die Depolarisation wird dadurch verstärkt und die Anisotropie ist sehr gering. Wird  $f$  verringert, hat dies zunächst kaum eine Auswirkung, da viele alternative Akzeptoren vorhanden sind. Erst wenn ein großer Anteil Untereinheiten nicht fluoreszierend ist, erhöht sich die Anisotropie durch die Verhinderung von homo-FRET rapide.



**Abbildung 4.26.:** Veränderung der Fluoreszenzanisotropie durch Bleichen von *MalE*-TMD-sfGFP Proteinen. *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsproteine mit GpA wt, GpA G83I oder Phospholamban TMD wurden in *E. coli* FHK12 Zellen exprimiert und die Translation nach 2 h durch Zugabe von Chloramphenicol gestoppt. Zur Ermittlung der Anisotropie wurden  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  bestimmt. Durch wiederholte Bestrahlung mit Laserlicht wurden die Fluorophore schrittweise gebleicht. Aus der Verringerung der Gesamtfluoreszenz  $I_{\text{total}}$  relativ zum ungebleichten Zustand wurde der Anteil fluoreszierender Proteine  $f$  berechnet. Die Messdaten wurden jeweils durch Ausgleichsrechnung mit Formel 4.1 approximiert (s. Text). Eine Verringerung von  $f$  führte bei Verwendung der GpA G83I TMD quasi nicht zu Veränderungen der Anisotropie. Ein fast linearer Zusammenhang war hingegen im Fall der GpA wt TMD zu beobachten, sodass die Anisotropie mit abnehmendem  $f$  zunahm. Die Phospholamban TMD zeigte anfänglich eine vergleichsweise niedrigere Anisotropie. Die Messpunkte folgen einer Kurve, was zeigt, dass die Verringerung von  $f$  zunächst kaum zu einer Zunahme der Anisotropie führt.

In den genannten Beispielen wurde von konstitutiven Komplexen ausgegangen. Allerdings muss man berücksichtigen, dass nicht nur der Oligomerisierungsgrad, sondern auch die Stabilität der gebildeten Komplexe Einfluss auf die Anisotropie hat. Beispielsweise könnte ein konstitutives Dimer durch häufige, wenn auch geringe Depolarisation eine niedrige gemessene Anisotropie erzeugen. Ein Pentamer kann durch wiederholten homo-FRET zwar stark depolarisiertes Licht emittieren. Wenn das Protein nur selten als Pentamer vorliegt, wird die Gesamtanisotropie trotzdem nur wenig durch homo-FRET verringert. Daher kann anhand von absoluten Anisotropiewerten nicht auf die Oligomerstruktur geschlossen werden.

Sowohl der Oligomerisierungsgrad  $N$ , als auch die Affinität in Form des relativen Anteils der Proteine im monomeren Zustand  $x$  können im einfachsten Fall durch Ausgleichsrechnung mit der Funktion

$$r(f, N) = r_m(x + (1 - x)(1 - f)^{(N-1)}) \quad (4.1)$$

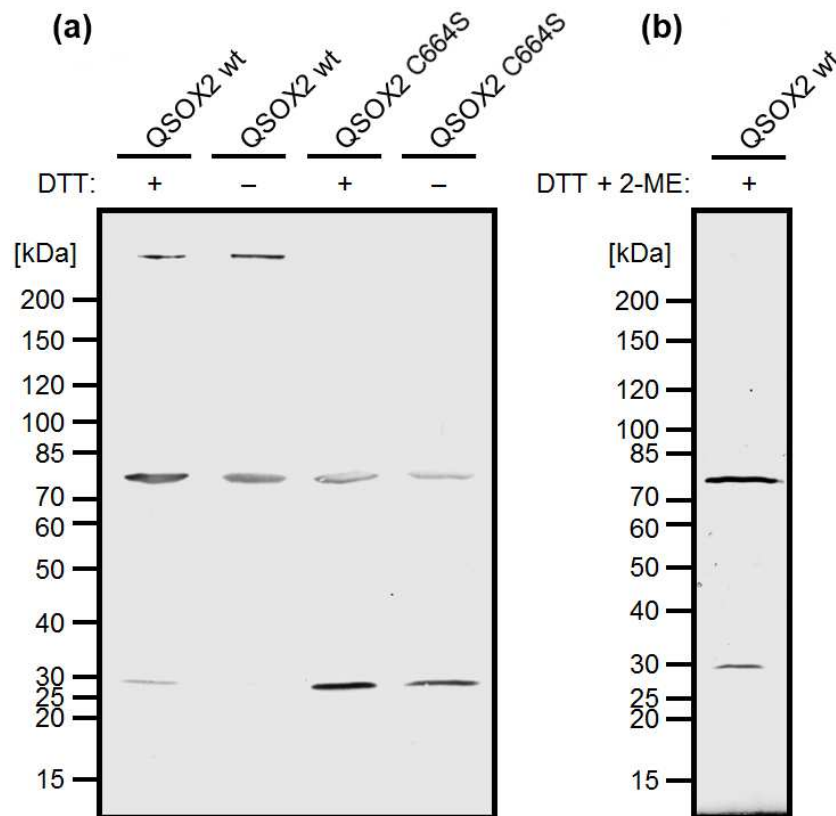
bestimmt werden<sup>[231]</sup>. Dazu muss lediglich die Anisotropie des Monomers  $r_m$  und der relative Anteil an fluoreszierenden Proteinen  $f$  bekannt sein. Diese Schätzungen von  $N$  und  $x$  sind allerdings konservativ und „concentration depolarisation“ wird nicht berücksichtigt.

Zur Untersuchung der Anwendbarkeit der beschriebenen Herangehensweise, wurden nicht-fluoreszierende Proteine durch Bleichen des Chromophors in der sfGFP-Domäne erzeugt. Zunächst wurden die *MalE*-TMD-sfGFP Proteine in *E. coli* überexprimiert. Anschließend wurde die Translation durch Zugabe von Chloramphenicol gestoppt und die Gesamtfluoreszenz und Anisotropie gemessen. Da die Gesamtfluoreszenz linear proportional zur Proteinmenge ist, wurde die Ausgangsintensität als „100% markiert“ betrachtet. Die Zellen wurden wiederholt mit Laserlicht bestrahlt, um die Chromophore zu bleichen und anschließend jedes Mal die Anisotropie bestimmt. Der Anteil an fluoreszierenden Proteinen  $f$  nach dem Bleichschritt  $i$  wurde aus dem Verhältnis der ursprünglichen Fluoreszenzintensität  $I$  und der momentanen Fluoreszenzintensität  $I_i$  mittels  $f_i = I_i/I$  gebildet.

Um einen möglichst deutlichen Effekt zu erzielen, wurde die monomere GpA G83I TMD, die dimeren GpA wt TMD und die pentamere Phospholamban TMD<sup>[232]</sup> gewählt. Es zeigten sich deutliche Unterschiede im Verlauf der Anisotropie relativ zum Anteil der kompetierenden nicht-fluoreszierenden Proteine (s. Abb. 4.26). Im Fall der GpA G83I TMD änderte sich die Anisotropie trotz ansteigender Menge an Kompetitor nicht. Die dimerisierende GpA wt TMD führte hingegen zu einer fast linearen Zunahme der Anisotropie mit steigender Menge an nicht fluoreszierendem Protein. Die deutlichste Abweichung vom monomeren Protein zeigte die Phospholamban TMD. Bei geringen Mengen der kompetierenden Proteine änderte sich die Anisotropie kaum. Erst größere Anteile nicht-fluoreszierenden Proteins führten zu einem sprunghaften und nicht-linearen Anstieg der Anisotropie.

**Tabelle 4.1.:** Oligomerisierungsgrad von *MalE*-TMD-sfGFP Proteinen in Abhängigkeit von der TMD Sequenz. Die Daten in Abb. 4.26 wurden mit Formel 4.1 durch Ausgleichsrechnung approximiert. Dabei wurden der minimale Oligomerisierungsgrad  $N$  und der Anteil an monomerem Protein  $x$  geschätzt. Die Anisotropie des monomeren Proteins  $r_m$  wurde auf den durchschnittlichen Wert für die putativ monomere GpA G83I TMD aus Abb. 4.24b gesetzt ( $r_m = 0,309$ ).

TMD	minimaler Oligomerisierungsgrad $N$	Anteil monomeren Proteins $x$
GpA G83I	1,000	1,000
GpA wt	2,194	0,818
Phospholamban	3,101	0,756

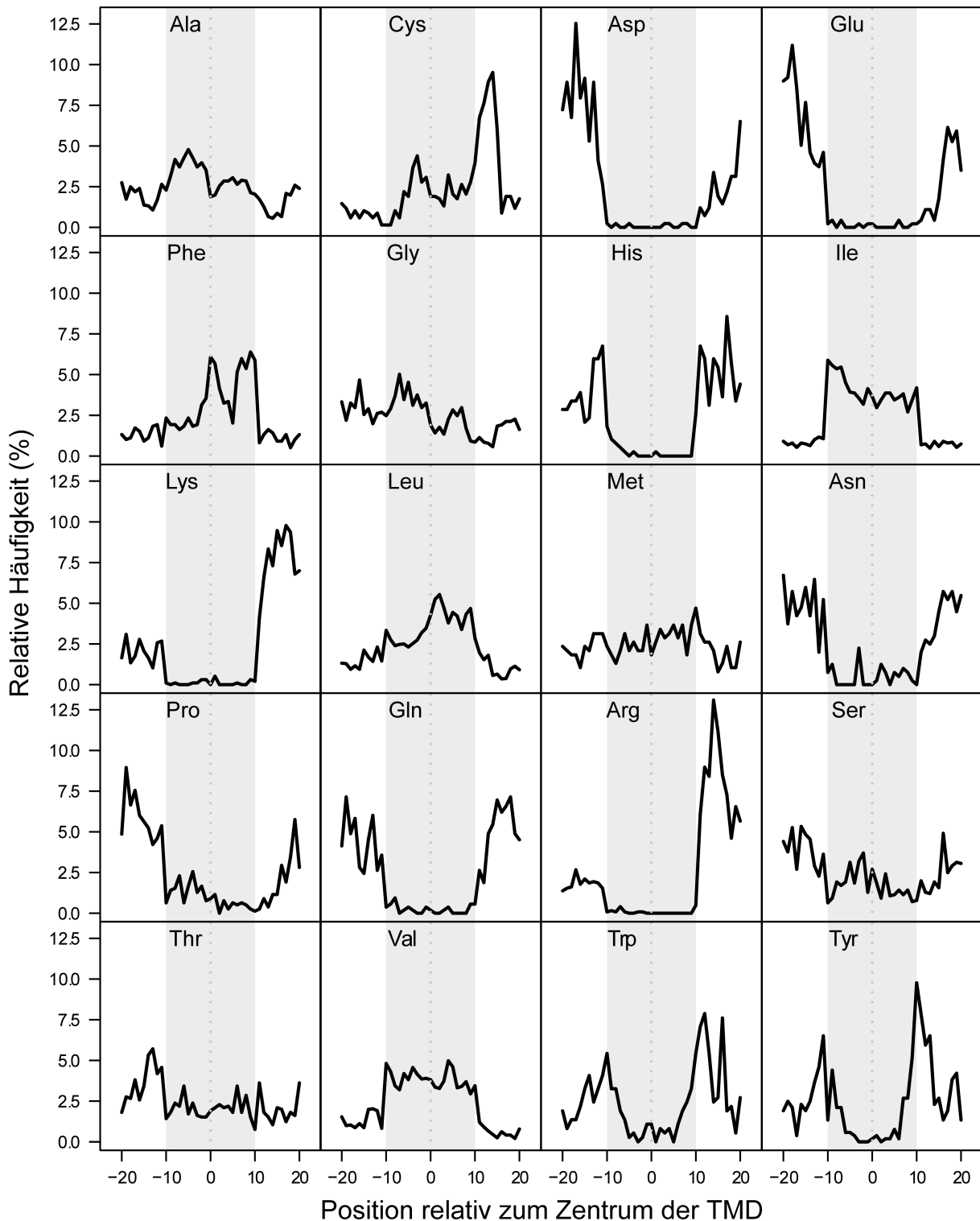


**Abbildung 4.27.:** Oligomerisierung der QSOX2 TMD unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen. (a) Das *MalE*-TMD-sfGFP Protein mit QSOX2 TMD wurde in *E. coli* FHK12 für 16 h bei basaler Aktivität des  $p_{BAD}$ -Promotors exprimiert. Die Zellen wurden lysiert und freie Sulfhydrylgruppen durch Iodacetamid blockiert (s. Text). Das Lysat wurde mit reduzierendem (+ DTT) oder nicht-reduzierendem (- DTT) Laemmli Puffer für 5 min bei 80°C inkubiert. Das Fusionsprotein wurde nach SDS-PAGE und Western Blot mit einem anti-FLAG Antikörper detektiert. Neben einer Bande mit dem Molekulargewicht des monomeren Proteins (etwa 80 kDa) war im Fall der wt TMD Sequenz eine Bande im Bereich von mehr als 200 kDa zu beobachten. Der Zusatz von DTT verringerte deren Menge nur minimal. Im Gegensatz dazu war die Hochmolekulare Bande in Gegenwart der Mutation C664S nicht zu beobachten. Banden im Bereich von etwa 28 kDa entsprechen einem putativen C-terminalen Fragment aus sfGFP-Domäne und FLAG-Epitop. (b) Der Probe aus a) (linke Spur) wurden 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol (2-ME) zugesetzt und diese für 5 min bei 80°C inkubiert. Die hochmolekulare Bande war hier nicht zu beobachten.

Durch Ausgleichsrechnung wurden die Parameter  $N$  (Oligomerisierungsgrad) und  $x$  (relativer Anteil an monomeren Proteinen) auf Basis der Messpunkte mit Hilfe der Formel 4.1 geschätzt (s. Anhang A.1). Die Anisotropie der Proteine im monomeren Zustand wurde anhand der Ausgleichskurve für das Protein mit GpA G83I TMD in Abb. 4.24b als  $r_m = 0,309$  bestimmt. Die resultierenden Koeffizienten für die drei Messreihen aus Abb. 4.26 sind in Tab. 4.1 festgehalten. Die theoretischen Kurvenverläufe unter Verwendung der ermittelten Koeffizienten wurden in Abb. 4.26 eingezeichnet.

#### 4.3.5. Kovalente Dimerisierung der QSOX2 TMD

In das in dieser Arbeit erstellte *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsprotein wurden die TMD Sequenzen des *H. sapiens* GpA und Phospholamban Proteins eingefügt (s. Kapitel 4.3.1). Diese wurden als Referenzkonstrukte eingesetzt, da die Struktur der TM Helices und der aus ihnen gebildeten Komplexe gut untersucht ist. Beabsichtigt wurde zusätzlich, die sequenzspezifisch oligomerisierende QSOX2 TMD (s. Kapitel 4.2.1) auch mittels homo-FRET zu untersuchen, um die Anwendbarkeit dieser neuen Methode zu demonstrieren. Nach der Expression der *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsproteine wurde für alle Konstrukte eine Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht des vollständigen Proteins bei 79,26 kDa detektiert. Nur im Fall der QSOX2 TMD traten zusätzlich Banden bei etwa 28 kDa und mehr als 200 kDa auf (s. Abb. 4.20). Da sich das zur Detektion verwendete Epitop am C-Terminus befindet, handelte es sich im Falle 28 kDa großen Proteins um ein C-terminales Fragment. Das apparente Gewicht entsprach der cytosolischen sfGFP-Domäne nebst FLAG-Epitop. Das anscheinend mehr als 200 kDa große Protein könnte ein Oligomer des Fusionsproteins darstellen. Im Gegensatz zur GpA und Phospholamban TMD enthält die QSOX2 TMD einen N-terminalen Cysteinrest. Ein kovalentes Dimer durch Bildung einer Disulfidbrücke wäre daher denkbar. Dies wird auch dadurch gestützt, dass die beiden Cysteinreste an Position 664 im simulierten QSOX2 TMD Dimer in engem Kontakt miteinander standen (s. Abb. 4.16). Um die Beteiligung einer Disulfidbrücke am Auftreten der zusätzlichen Bande zu untersuchen, wurde eine C664S Mutante hergestellt. Der wt und die C664S Mutante wurden für 2 h in *E. coli* FHK12 Zellen exprimiert. Die Zellen wurden in PBS mit einem Überschuss an Iodacetamid (Endkonzentration 100  $\mu\text{M}$ ) resuspendiert und mittels Ultraschall lysiert. Freie Sulfhydrylgruppen wurden durch Inkubation für 20 min bei RT blockiert. Auf diese Weise sollte verhindert werden, dass sich während der Probenvorbereitung unspezifisch Disulfidbrücken bilden. Jeweils die Hälfte der Lysate wurde mit reduzierendem oder nicht-reduzierendem Laemmli Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 80°C inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und das Fusionsprotein mit Hilfe des FLAG-Epitops detektiert. Im Gegensatz zum wt trat die zusätzliche hochmolekulare Bande im Fall der C664S Mutante nicht auf. Überraschender Weise hatte der Zusatz von DTT als Reduktionsmittel nur wenig Einfluss auf die Intensität der hochmolekularen Bande (s. Abb. 4.27a). Da der Rest Cys<sub>664</sub> eventuell sehr nahe an oder



**Abbildung 4.28.:** Relative Aminosäurehäufigkeiten im Bereich der TMD bitopischer Plasmamembranproteine. Die Primärsequenz von 536 bitopischen Plasmamembranproteinen aus *H. sapiens* wurde analysiert. Die Häufigkeit der proteinogenen Aminosäuren ist relativ zum Zentrum der TMDn angegeben. Hydrophobe Aminosäuren sind vorwiegend auf Höhe der Lipidmembran (Position  $\pm 10$  vom Zentrum) zu finden. Im Fall von Cys, Asp, Glu, His, Phe, Lys und Arg ist eine asymmetrische Verteilung relativ zum Zentrum zu beobachten. Während dies für die geladenen Aminosäuren Asp, Glu, His, Lys und Arg durch ihre Rolle bei der Bestimmung der Topologie der Proteine erklärt werden kann (s. Text), ist die Häufung von Cys am C-terminalen Ende und besonders zwischen N-terminalem Ende und dem Zentrum der TMD auffällig.



sogar in der Lipidmembran lokalisiert, wurde der mit DTT behandelten Probe des QSOX2 TMD wt  $\beta$ -Mercaptoethanol (2-ME) zugesetzt. Nach SDS-PAGE und Immunoblot konnte die hochmolekulare Bande nicht beobachtet werden (s. Abb. 4.27b).

Im Rahmen des ToxR-Assays war kein Einfluss von Rest Cys<sub>664</sub> auf die Oligomerisierung der QSOX2 TMD festzustellen (s. Abb. 4.11a). Dies könnte mit der unterschiedlichen Topologie des *ToxR*-TMD-*MalE* Proteins im ToxR-Assay und dem *MalE*-TMD-sfGFP Protein zusammenhängen. Ersteres weist eine Topologie des Typs II auf, wodurch der Cysteinrest der QSOX2 TMD in Richtung des reduzierenden Cytoplasmas orientiert ist. Das *MalE*-TMD-sfGFP Protein besitzt hingegen eine Typ I Topologie, wie es auch das natürliche QSOX2 Protein aufweist. In beiden ist der Cysteinrest dem oxidierenden exoplasmatischen Raum zugewandt. Die kovalente Oligomerisierung der QSOX2 TMD könnte daher durchaus biologisch relevant sein. Um dies zu untersuchen, wurde die Aminosäurehäufigkeit entlang der TMDn bitopischer Plasmamembranproteine betrachtet. Dazu wurden der UniProt Datenbank alle Proteinsequenzen aus *H. sapiens* entnommen, die als bitopische Proteine der Plasmamembran oder Zelloberfläche und nicht als Proteine des ER annotiert waren (Stand: 20.08.2013). Anhand von 536 bitopischen Typ I Plasmamembranproteinen konnte die Häufigkeit jedes Aminosäurerestes entlang der Proteinsequenz relativ zum Zentrum der TMD bestimmt werden (s. Abb. 4.28). Entsprechend des hydrophoben Charakters der Lipidmembran waren polare und geladene Reste wie Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg kaum in den TMDn zu finden. Die negative geladenen Aminosäuren Asp und Glu flankieren die N-terminale exoplasmatische Seite der TMDn. Im Gegensatz dazu waren die positiv geladenen Reste His, Lys und Arg vor allem auf der cytoplasmatischen Seite zu finden. Diese Verteilung stimmt mit der „positive-inside“ Regel überein (s. Kapitel 1.2). Trp und Tyr flankierten die TMDn fast gleichermaßen zu beiden Seiten. Pro lies sich vor allem am N-Terminus der TMDn finden, was auf seine Rolle als Helix-Kappe<sup>[233,234]</sup> zurückzuführen ist. Interessant ist die asymmetrische Verteilung von Cys, welches quasi nicht am N-Terminus, dafür hingegen gehäuft am C-Terminus der TMDn zu finden ist. Zusätzlich tritt es vermehrt zwischen N-Terminus und der Mitte der TMDn auf. In Anbetracht der geringen Häufigkeit dieser Aminosäure am N-Terminus von TMDn bitopischer Plasmamembranproteine nimmt der Cys-Rest der QSOX2 TMD folglich eine Sonderstellung ein.

## 5. Diskussion

Die meisten Membranproteine bilden nicht-kovalente Komplexe, wobei Wechselwirkung zwischen TM Helices innerhalb der apolaren Umgebung der Lipidmembran beteiligt sein können (s. Kapitel 1.2.2). Trotz der großen Anzahl an Membranproteinen<sup>[29]</sup> und ihrer vielfältigen Funktionen<sup>[235]</sup> sind nur wenige hochauflösende Molekülstrukturen verfügbar. Dies trifft besonders auf nicht-kovalente Komplexe bitopischer Proteine zu, von denen es momentan nur eine leicht überschaubare Menge gibt<sup>[236]</sup>. Aufgrund dessen wird häufig auf die durch Genomsequenzierung verfügbaren Primärsequenzen solcher Proteine zurückgegriffen. Durch statistische Methoden und die intensive Analyse der wenigen bekannten oligomerisierenden TM Helices wurden einige für die Oligomerisierung relevante Sequenzmotive entdeckt. Dazu gehören beispielsweise das G/A/SxxxG/A/S-Motiv oder Cluster aus polaren Resten. Allerdings ermöglicht das Vorliegen eines Motivs nicht notwendigerweise das Auftreten von TM Helix-Helix Interaktionen. Der Sequenzkontext spielt eine entscheidende Rolle, sodass die Oligomerisierung einer TMD immer experimentell bestätigt werden muss<sup>[125]</sup>. Ein gutes Beispiel dafür ist das Screening einer Peptidbibliothek mit 3888 Variationen der ErbB2 TMD Sequenz in Ref.<sup>[140]</sup>. Obwohl in jedem Peptid mindestens ein G/A/SxxxG/A/S-Motiv enthalten war (davon entfielen 20% auf das klassische GxxxG-Motiv), dimerisierten nur sechs Peptide. Erschwerend kommt hinzu, dass TM Helices wechselwirken können, ohne dass ein bekanntes Motiv oder eine Variation derselben beteiligt ist<sup>[237]</sup>. Meist kann auch ein Sequenzalignment verwandter TMDn nicht Auskunft über beteiligte Aminosäurereste geben, da TMDn grundsätzlich stark konserviert sind<sup>[238]</sup>. In einigen Fällen sind scheinbar nicht konservierte Positionen an TM Helix-Helix Interaktionen indirekt beteiligt, da Mutationen zu einer zwar veränderten, aber trotzdem interagierenden Struktur führen können<sup>[239]</sup>.

In dieser Arbeit wurde versucht, potenziell zur Oligomerisierung fähige TMDn bitopischer Proteine aus *H. sapiens* mit Hilfe von Sequenzdaten zu identifizieren. Die bioinformatische Auswertung wurde anschließend anhand einer zufälligen Auswahl von TMDn experimentell überprüft. Eine der TMDn wurde im Detail betrachtet, um die molekularen Grundlagen ihrer starken homotypischen Interaktion zu verstehen. Um den zukünftigen Nachweis von TM Helix-Helix Interaktionen *in cellula* zu erleichtern, wurde ein neuartiges Assay auf Basis von Fluoreszenzanisotropie entwickelt.

## 5.1. Unilateral konservierte TM-Helices bitopischer Proteine

In den letzten 20 Jahren wurde mehrfach versucht, interagierende TMDn anhand von Sequenzdaten zu identifizieren. Im Gegensatz zu löslichen Proteinen lassen sich an Protein-Protein Interaktionen beteiligte Aminosäurereste in TMDn nur schwer anhand von Sequenzähnlichkeit verwandter Proteine identifizieren. Zwar sind Mutationen auf den Lipid-zugewandten Positionen von TM Helices häufiger<sup>[95]</sup>, allerdings sind diese grundsätzlich stärker konserviert als lösliche Domänen<sup>[238]</sup>. Aus diesem Grund wurde vielfach nicht die evolutionäre Konserviertheit von TMD Sequenzen betrachtet, sondern die Anreicherung von Sequenzmotiven mittels statistischer Methoden untersucht. Solche Auswertungen zeigen, dass das aus der GpA TMD bekannte GxxxG Motiv und ähnliche Motive mit kleinen Aminosäuren (G/A/SxxxG/A/S) statistisch signifikant überrepräsentiert sind (s. z.B. Ref.<sup>[58]</sup>). Wie man in Abb. 4.6 sehen kann, sind Gly, Ala und Ser grundsätzlich sehr häufig in TMDn vertreten (> 25%). Die Auftrittswahrscheinlichkeit eines G/A/SxxxG/A/S-Motivs ist dementsprechend hoch. Allein im Aquaporin Protein ist eine Vielzahl solcher Motive zu finden, doch nur wenige nehmen tatsächlich an TM Helix-Helix Interaktionen teil<sup>[240]</sup>. Zur Vorhersage von interagierenden TMDn sind Sequenzmotive daher nur bedingt geeignet.

Obwohl TMDn grundsätzlich stark konserviert sind, konnte eine Periodizität der Konserviertheit in TM Helices beobachtet werden. Diese entspricht mit  $96^\circ$  der Periodizität einer  $\alpha$ -Helix. Dadurch häufen sich überdurchschnittlich konservierte Aminosäurereste auf einer Seite der Helix<sup>[170]</sup>. Für die Funktion eines Proteins wichtige Aminosäurereste sind in der Regel stärker konserviert, da Mutationen schneller zu einem Funktionsverlust und damit zu einer verringerten Fitness führen. Es wäre daher denkbar, dass es sich bei konservierten Helixseiten um Kontaktflächen zur Protein-Protein Interaktion handelt. Um die Verteilung von konservierten Aminosäureresten auf der Oberfläche einer TM Helix beschreiben zu können, wurde hier das Konserviertheitsmoment (KM) verwendet (s. Kapitel 3.5.2). Dieses kann einen Wert im Intervall [0,1] annehmen, wobei ein Wert von  $KM = 0$  für eine gleichmäßige Konserviertheit aller Helixseiten steht. Ist eine Helixseite komplett, die abgewandte Seite hingegen gar nicht konserviert, ist  $KM = 1$ . Je größer der KM, desto ausgeprägter ist folglich der Unterschied zwischen konservierter und nicht-konservierter Helixseite. Im Falle von TM Helix-Helix Interaktionen können selbst als konservativ betrachtete Mutationen einen starken Einfluss auf die Interaktion haben<sup>[103]</sup>. Zur Berechnung des KM wurde daher bewusst nicht die Ähnlichkeit aufgrund einer Austauschmatrize, sondern die Sequenzidentität verwendet.

### 5.1.1. Häufigkeit im Proteom von *H. sapiens*

Um das Auftreten putativer Kontaktflächen in TM Helices untersuchen zu können, wurden der UniProt Datenbank alle bitopischen Proteine aus *H. sapiens* entnommen. Zu jedem dieser Proteine wur-

den in der RefSeq Datenbank homologe Sequenzen aus anderen *Chordata* identifiziert (s. Kapitel 3.5.1). Nach Homologiebereinigung blieben 1136 Alignments übrig, die meist 5–30 unterschiedliche Proteinsequenzen beinhalteten (s. Abb. 4.1). Da die Anzahl an Sequenzen in den Alignments nicht sehr groß ist, kann die Konserviertheit pro Position nur diskrete Werte annehmen. Bei sehr kleinen Alignments führt dies zu starken Schwankungen und extremen Werten für Konserviertheit und KM. Als Kompromiss zwischen stabilen Werten und Größe des Datensatzes wurden alle Alignments mit weniger als fünf Sequenzen ausgeschlossen. Für die verbliebenen 1067 humanen Proteine wurde anschließend der KM berechnet. Es zeigte sich, dass keine TMD ein  $KM > 0,6$  erreicht und die Verteilung der KM-Wert ein breites Maximum im Bereich von  $0,0 < KM < 0,3$  besitzt. Dies erklärt sich dadurch, dass TMDn grundsätzlich eine hohe Konserviertheit zeigen und daher die Unterschiede zwischen den als konserviert und nicht-konserviert betrachteten Helixseiten eher moderat ausfallen. Trotzdem unterscheidet sich diese Verteilung auf Basis der natürlichen Sequenzen statistisch signifikant von der zufällig zu erwartenden Verteilung nach Randomisierung der Sequenzalignments (s. Abb. 4.2). Die Werte nach Randomisierung liegen größtenteils im Bereich von  $0,0 < KM < 0,15$ . Die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine konservierte Helixseite zufällig bildet, ist folglich sehr gering. Interessanterweise haben 46% aller Alignments einen KM-Wert, der deutlich über dem zufällig zu erwartenden liegt. Es wäre folglich möglich, dass knapp die Hälfte aller TMDn aus bitopischen Proteinen eine konservierte Helixseite besitzen, welche eine biologische Funktion unterstützt.

Diese Zahl könnte aufgrund der sogenannten „Janus-faced Helices“<sup>[241,242]</sup> sogar höher sein. Dabei handelt es sich um TM Helices, bei denen die beiden Helixseiten Interaktionen mit unterschiedlichen Proteinen eingehen. Hier ist anzunehmen, dass beide Seiten überdurchschnittliche konserviert sind. Da der KM als Differenz zwischen der Konserviertheit beider Seiten definiert ist, ergibt sich hier ein nur geringer KM-Wert. Einen ähnlichen Fall stellen sehr große Alignments dar. Diese umfassen meist Sequenzen großer Proteinfamilien, welche evolutionär alt sind (z.B. Integrine, Cadherine, SNARE-Proteine). Trotz evolutionärer Verwandtschaft sind die Sequenzen zumindest in der TMD-Region so unterschiedlich, dass die Wahrscheinlichkeit für stark konservierte Aminosäurereste automatisch deutlich abnimmt. Dadurch sind solche TMDn scheinbar wenig konserviert und können nur einen kleinen KM-Wert erreichen (s. Abb. 4.3). Bei einigen TMDn mit Werten im Bereich von  $0,0 < KM < 0,1$  könnte es sich aufgrund der beiden genannten Fälle um oligomerisierende TMDn handeln, für die der KM-Wert als Klassifikationsmerkmal nicht ausreicht.

### 5.1.2. Chemische Eigenschaften konservierter TM Helixseiten

Um die Funktion der auf diese Weise identifizierten konservierten Helixseiten zu untersuchen, wurde ihre Zusammensetzung genauer betrachtet. Dazu wurde für jedes Alignment nicht nur der KM-Wert bestimmt, sondern auch festgehalten, welcher 12 Aminosäurereste lange Abschnitt der TMD

diesen Wert lieferte und welche Reste auf der konservierten bzw. nicht-konservierten Seite zu finden waren. Die Aminosäurehäufigkeiten wurden für beide Helixseiten bestimmt und mit denen nach wiederholter Randomisierung aller Sequenzdaten verglichen. Die Anreicherung einer Aminosäure auf der konservierten Helixseite wurde dabei als Quotient der beiden Häufigkeiten berechnet (s. Abb. 4.7). Generell fanden sich Cys, Gly, Asn, Pro, Gln, Trp und Tyr deutlich häufiger auf den konservierten Helixseiten, während Ala, Ile und Val eher auf der nicht-konservierten Seite zu finden waren. Mit zunehmend ausgeprägter unilateraler Konserviertheit verstärkte sich dieser Trend noch. Die Ausnahme stellten nur Gln und Met dar, die in den 45 TMDn mit der größten unilateraler Konserviertheit extrem unterrepräsentiert waren.

Schon früher wurde festgestellt, dass Gly, Ala, Ser und Thr tendenziell häufiger in den Kontaktflächen zwischen TM Helices zu finden sind. Dies wurde damit erklärt, dass kleine Aminosäuren eine dichte Packung ermöglichen und Leerräume verhindern<sup>[119,243-246]</sup>. Darüber hinaus können polare Reste intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen eingehen, was sowohl an artifizialen als auch natürlichen TMDn im Falle von Asn<sup>[116,117]</sup>, Ser/Thr<sup>[124]</sup> und Gln<sup>[123]</sup> beobachtet wurde. In den hier identifizierten konservierten Helixseiten sind Ser und Thr in der gesamten Höhe der Membran überdurchschnittlich häufig zu finden, während Gln eine starke Präferenz für das Zentrum der Membran hat (s. Abb. 4.8). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass mehrere Ser und Thr Reste für die Interaktion zweier TM Helices notwendig sind, während ein einzelnes Gln (und auch Asn) bereits eine Stabilisierung eines TMD Oligomers ermöglicht.

Trp und Tyr können zudem durch aromatische  $\pi$ - $\pi$  Interaktionen TMD Oligomere stabilisieren<sup>[131,215]</sup>. In den flankierenden Bereichen von TM Helices beeinflusst Trp die vertikale Ausrichtung derselben, da es eine Präferenz für die Membranoberfläche zeigt<sup>[247-249]</sup>. Dass flankierende Trp-Reste relevant für die Struktur und Funktion von Membranproteinen sind, lässt sich an deren Häufigkeit in Juxtamembranregionen<sup>[250]</sup> und funktionellen Studien mit Trp-Analoga<sup>[251]</sup> oder Punktmutationen<sup>[227]</sup> ablesen. Die in dieser Arbeit festgestellte Anreicherung von Trp und Tyr in den konservierten Helixseiten kommt allerdings nicht durch deren Präferenz für flankierende Regionen zustande. Würden flankierende Trp- oder Tyr-Reste die Wahl der konservierten Helixseite beeinflussen, müssten diese überdurchschnittlich häufig in den Juxtamembranregionen dieser Helixseiten zu finden sein. Beide Aminosäurereste treten in den Juxtamembranregionen von konservierten Helixseiten nicht häufiger auf, als es durchschnittlich der Fall ist (s. Abb. 4.8, schwarze und rote Häufigkeitsverteilungen). Ein systematischer Einfluss von Trp und Tyr in den Randbereichen der TMDn auf die Bestimmung der als konserviert betrachteten Helixseite ist damit ausgeschlossen. Zusätzlich ist zu erkennen, dass beide Aminosäurereste auf konservierten Helixseiten überdurchschnittlich häufig im Zentrum der Membran zu finden sind. Da Wechselwirkungen von Trp und Tyr mit Lipiden im Grenzbereich der Membran auftreten, müssen sie innerhalb der Membran eine andere Funktion

erfüllen. Dies macht eine Beteiligung an TM Helix-Helix Interaktionen wahrscheinlich.

Eine weitere überrepräsentierte Aminosäure ist Cys. In vielen löslichen Proteinen stabilisiert es die Tertiärstruktur durch Bildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinresten. Innerhalb der Lipidmembran ist es hingegen selten an Disulfidbrücken beteiligt, lässt sich aber häufig in Kontakt mit kleinen Aminosäuren beobachten<sup>[119]</sup>. Die strukturelle Ähnlichkeit zu Ser könnte auf eine vergleichbare Funktion des Cys in G/A/SxxxG/A/S-Motiven hinweisen.

Eine besondere Rolle in der Struktur von Proteinen spielt Pro. Es gilt gemeinhin als Helixbrecher<sup>[252]</sup>, da es durch den Ringschluss der Seitenkette mit der Amidgruppe kein Proton für eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Peptidrückgrat des Aminosäurerestes an Position  $i-4$  besitzt. Außerdem beeinflusst es den Torsionswinkel des vorangehenden Restes, wodurch eine weniger kompakte Struktur erzwungen wird. Nur am N-Terminus einer  $\alpha$ -Helix wirkt Pro stabilisierend, da die ringförmige Seitenkette ein  $\varphi = -60^\circ$  begünstigt<sup>[233,234]</sup>. Im Gegensatz zu löslichen Helices wird Pro innerhalb der Lipidmembran dennoch toleriert<sup>[253-255]</sup>. Es scheint sogar zur dichten Packung von TM Helices beizutragen<sup>[101]</sup>. Häufig führt es zu einer lokalen Flexibilität, die das Biegen oder Einknicken einer TMD ermöglicht<sup>[256]</sup>. Solche Bewegungen sind häufig von funktioneller Bedeutung, wie z.B. im Falle von Transportern, Rezeptoren oder gar Enzymen<sup>[257,258]</sup>. Die TMD des Cytochrom  $b'_{559} \beta$  (*PsbF*) Proteins aus *Plantae* und *Cyanobacteria* ist ein erwähnenswertes Beispiel, in dem ein Pro-induzierter Knick zwischen der N-terminalen Häm-Bindedomäne und der C-terminalen Dimerisierungsdomäne zu finden ist. Entfernt man den Knick durch die Mutation P28G, dimerisiert die TMD zwar noch, kann aber den Kofaktor nicht mehr binden<sup>[259]</sup>. In dieser Arbeit konnte eine asymmetrische Häufigkeitsverteilung von Pro beobachtet werden (s. Abb. 4.8). Es war eine Präferenz für den N-Terminus der TMDn zu erkennen, welche ihre Funktion als Helix-stabilisierende N-terminale „Kappe“ unterstreicht. In konservierten Helixseiten war zudem ein zweites lokales Maximum im Zentrum der TMDn zu beobachten. Pro-Reste an dieser Stelle könnten analog zu den oben genannten Beispielen funktionell relevante Knicke und Biegungen der TM Helices ermöglichen.

Überraschender Weise sind die positiv geladenen Reste His, Lys und Arg nicht nur in den Grenzbereichen der TMDn zu finden. Es ist bekannt, dass Arg und Lys hier häufig vorkommen<sup>[60,260]</sup>, wo ihre langgestreckte Seitenkette in Richtung der Lipidkopfgruppen zeigen (engl. „snorkle“)<sup>[261-263]</sup>. Man geht davon aus, dass dadurch die Orientierung von TM Helices in der Membran beeinflusst wird. In konservierten Helixseiten findet man diese drei basischen Reste und zusätzlich auch die sauren Reste Asp und Glu überdurchschnittlich häufig nahe dem Zentrum der Membran (s. Abb. 4.8). Diese Aminosäurereste in einer Lipidmembran erscheinen zunächst ungewöhnlich, da die Energie zum Transfer ihrer geladenen Seitenketten von Wasser in eine apolare Umgebung sehr hoch sind. Ohne eine Nettoladung, z.B. für protoniertes Asp oder Glu, ist dies hingegen nicht der Fall<sup>[128]</sup>. Studien mit artifiziellen Transmembranpeptiden zeigen, dass einzelne Asp, Glu oder His Reste durchaus in der

Membran toleriert werden<sup>[264,265]</sup>. Sie können gleichzeitig als Akzeptor und Donor von Wasserstoffbrückenbindungen dienen und so TM Helix-Helix Interaktionen stabilisieren<sup>[118,122,266]</sup>. Für Arg wurde hingegen gezeigt, dass die Insertion in die Membran energetisch umso ungünstiger wird, je näher sich der Rest am Zentrum der Membran befindet<sup>[267]</sup>. Allerdings können zwischen basischen und aromatischen Resten Kation- $\pi$  Interaktionen stattfinden, welche die Oligomerisierung von TMDn stark fördern<sup>[131]</sup>. Dass es auch die Interaktion von Resten mit gegensätzlicher Ladung innerhalb der Membran gibt, konnte durch Studien mit teils randomisierten TMD Sequenzen gezeigt werden. Sowohl starke homo- als auch heterotypische Interaktionen konnten auf ionische Wechselwirkungen zwischen basischen und sauren Aminosäureresten zurückgeführt werden. In der kombinatorischen Bibliothek überrepräsentierte Sequenzmotive finden sich auch in natürlichen TMDn<sup>[126]</sup>.

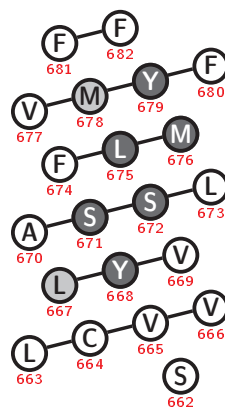
Insgesamt betrachtet ließen sich mit Hilfe des KM solche TMDn identifiziert, die eine konservierte Helixseite besitzen. Die Annahme, dass es sich bei den konservierten Helixseiten um TM Helix-Helix Kontaktflächen handeln könnte, wird durch ihre Zusammensetzung unterstützt. Die putativen Kontaktflächen sind stark mit Aminosäuren angereichert, welche bekanntermaßen für die Oligomerisierung von TMDn eine Rolle spielen.

### 5.1.3. Homotypische Wechselwirkungen *in cellula*

Die Annahme, dass konservierte TM Helixseiten Kontaktflächen zur TM Helix-Helix Interaktion darstellen, wurde experimentell mit Hilfe des ToxR-Assays (s. Kapitel 1.2.3) überprüft. Die 15 zur Untersuchung ausgewählten TMDn wiesen unterschiedlich große Sequenzalignments und KM-Werte auf (s. Abb. 4.3a). Alle TMD-Sequenzen ließen sich im Rahmen des *ToxR-TMD-MalE* Fusionsproteins in *E. coli* exprimieren und wurden in die Plasmamembran integriert (s. Abb. 4.4b und c). Die 15 getesteten TMDn zeigten teilweise sehr hohe Selbstaffinität, die an die starke Interaktion der als Referenz verwendeten GpA TMD heranreichte (s. Abb. 4.4a). Zwischen den aus Sequenzdaten berechneten KM-Werten und den experimentell bestimmten Selbstaffinitäten lies sich ein linearer Zusammenhang ( $R^2 = 0,706$ ) feststellen (s. Abb. 4.5a). Betrachtet man lediglich die durchschnittliche Konserviertheit der TMDn, lässt sich keine Abhängigkeit zur Selbstaffinität ableiten (s. Abb. 4.5b). Die Berücksichtigung der  $\alpha$ -helikalen Struktur der TMDn bitopischer Proteine durch den KM liefert demnach mehr Informationen, als die Gesamtkonserviertheit. Der KM ist dabei nicht nur ein gutes Maß zur Vorhersage einer TM Helix-Helix Kontaktfläche, sondern spiegelt sogar die Stärke der Selbstinteraktion wider. Dies kann nur der Fall sein, wenn Affinität und Konserviertheit korrelieren. Eine mögliche Erklärung ist, dass zwar vergleichsweise viele Sequenzen eine hohe Affinität ermöglichen. Um störende Interaktionen mit anderen Membranproteinen zu verhindern, muss allerdings auch eine ausreichende Spezifität vorhanden sein. Dies kann nur durch die weitere Einengung des Sequenzraums erreicht werden. TMDn mit geringer Affinität wären hiervon weniger betroffen, da

**Tabelle 5.1.:** Periodizität mutationssensitiver und konservierter Aminosäurereste in der QSOX2 TMD. Mutationssensitive Positionen sind dunkelgrau hervorgehoben. Zwar konservierte, allerdings im Alanin-Scanning nicht mutationssensitive Positionen sind hellgrau hinterlegt. Die an Interaktionen beteiligten Reste eines Tetradenmotivs (a und b) und eines Heptadenmotivs (a und d, sowie die flankierenden Reste e und g) sind in verschiedenen Phasen dargestellt. Die beste Übereinstimmung wird im Fall einer Tetrade (Phase 2) erreicht.

Motiv	Phase	C	V	V	L	Y	V	A	S	S	L	F	L	M	V	M	Y	
Tetrade	1	a	b		a	b			a	b			a	b				
	2	b			a	b			a	b			a	b			a	
	3			a	b		a		b		a		b		a	b		
	4		a	b			a	b			a	b			a	b		
Heptade	1	a			d	e		g	a			d	e		g	a		
	2			d	e		g	a			d	e		g	a			
	3		d	e		g	a			d	e		g	a			d	
	4	d	e		g	a			d	e		g	a			d	e	
	5	e		g	a			d	e		g	a			d	e		
	6		g	a			d	e		g	a			d	e		g	a
	7	g	a			d	e		g	a			d	e		g	a	



**Abbildung 5.1.:** Anordnung konservierter Aminosäurereste auf der Oberfläche der QSOX2 TMD. Die QSOX2 TMD ist von Ser<sub>662</sub> bis Phe<sub>682</sub> in einer Netzdarstellung gezeigt. Mutationssensitive Aminosäurereste (dunkelgrau hinterlegt) bilden einen schmalen Streifen auf der Oberfläche der TMD, bei dem es sich um die Helix-Helix Kontaktfläche handelt. Zwar konservierte aber gegenüber Alanin-Punktmutationen insensitive Reste (hellgrau hinterlegt) liegen außerhalb dieses Bereichs.



schwach interagierende Komplexe - auch mit dem falschen Partnerprotein - sich schnell wieder trennen und eine neue Chance haben, mit dem richtigen Interaktionspartner zusammen zu kommen. Folglich würden Mutationen besser toleriert und zu einer geringeren Konserviertheit führen.

## 5.2. Homotypische Interaktion der Sulphydryloxidase 2 TMD

Aus den 15 untersuchten TMD Sequenzen zeigte die des QSOX2 Proteins (UniProt ID: Q6ZRP7) die stärkste Selbstaffinität. Anhand eines Sequenzalignments mit orthologen Proteinsequenzen aus anderen *Chordata* lies sich eine mögliche Helix-Helix Kontaktfläche erahnen (s. Abb. 4.10). Ein klassisches Sequenzmotiv (z.B. G/A/SxxxG/A/S) wie in vielen homotypisch interagierenden TMDn war nicht zu erkennen.

### 5.2.1. Struktur des Oligomers

Die Identität der Kontaktfläche wurde mit Hilfe des ToxR-Assays experimentell in *E. coli* aufgeklärt. Für die Interaktion relevant waren die Reste Y<sub>668</sub>xxSSxxLMxxY<sub>679</sub> (s. Abb. 4.11). Die Teilsequenz Y<sub>668</sub>xxSS erscheint ähnlich zu den SxxSSxxT und SxxxSSxxT Motiven bei denen mehrere polare Reste ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen ermöglicht und so ein TM Helix Dimer stabilisieren<sup>[124]</sup>. In der QSOX2 TMD fehlt allerdings ein vierter polarer Rest analog zum Thr in den beiden genannten Motiven. Außerdem ist fraglich, ob die recht große Seitenkette des Tyr<sub>668</sub> ein ähnliches Netzwerk aus Wasserstoffbrücken ermöglichen kann. Die Wahrscheinlichkeit einer strukturellen Ähnlichkeit ist daher eher gering. Die Struktur des QSOX2 TMD Oligomers wurde daher mit bioinformatischen Methoden untersucht.

Die Periodizität der konservierten Reste in der QSOX2 TMD spricht für ein Tetradenmotiv (s. Tab. 5.1). Nur im Falle einer Tetrade liegen alle relevanten Aminosäurereste innerhalb des Motivs. Interessanter Weise waren die Reste Leu<sub>667</sub> und Met<sub>678</sub> zwar deutlich konserviert, aber nicht mutationssensitiv. Met<sub>678</sub> würde als einziger Rest nicht in das Schema einer Tetrade passen, was allerdings durch die Insensitivität gegen Mutation zu Alanin relativiert wird. Betrachtet man die TMD der QSOX2 in der Netzdarstellung, bilden die mutationssensitiven Reste einen schmalen Streifen im Zentrum der TM Helix (s. Abb. 5.1). Leu<sub>667</sub> und Met<sub>678</sub> flankieren die Reste der Kontaktfläche lediglich. Es ist zu beachten, dass die TMD mit Punktmutationen zu Ala getestet wurde. Möglicherweise kann dessen kleine Seitenkette an diesen zwei Positionen toleriert werden. Aminosäurereste mit größeren Seitenketten könnten hingegen einen Effekt auf die Selbstaffinität der TMD haben. Dies würde die Konserviertheit der Reste erklären, obwohl sie keinen direkten Einfluss auf die TM Helix-Helix Interaktion haben.

Tetradenmotive weisen im Falle von TM Helix-Helix Interaktionen meist auf rechtsgängige Oligo-

merstrukturen mit einem Kreuzungswinkel zwischen 0 und  $-50^\circ$  hin<sup>[213]</sup> (s. Abb. 1.2). Übereinstimmend damit lieferte eine GMSD Analyse als wahrscheinlichste Struktur des QSOX2 TMD Oligomers ein rechtsgängiges Dimer (s. Kapitel 4.2.2 und Abb. 4.12a). Tetramere Strukturen waren nicht wahrscheinlich, da die Aminosäurereste der identifizierten Kontaktfläche hierzu intensiven Kontakt mit mutationsinsensitiven Resten hätten eingehen müssen. Außerdem wäre das Zentrum des Helixbündels so schlecht gepackt, das sich deutliche Hohlräume oder gar eine die Membran permeabilisierende Pore ergeben hätten (s. Abb. 4.12c). Ein rechtsgängiges Trimer wäre in Hinblick auf Kontakte der relevanten Reste zueinander prinzipiell möglich (s. Abb. 4.12b). Ausgehend von einer dimeren und einer trimeren Oligomerstruktur aus der GMSD Analyse wurden MD Simulationen in einer expliziten Lipidmembran durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die trimere Struktur nach wenigen ns zerfiel, während die dimere Struktur über den gesamten Simulationszeitraum von 100 ns stabil interagiert (s. Abb. 4.13).

### 5.2.2. Grundlagen der Interaktion

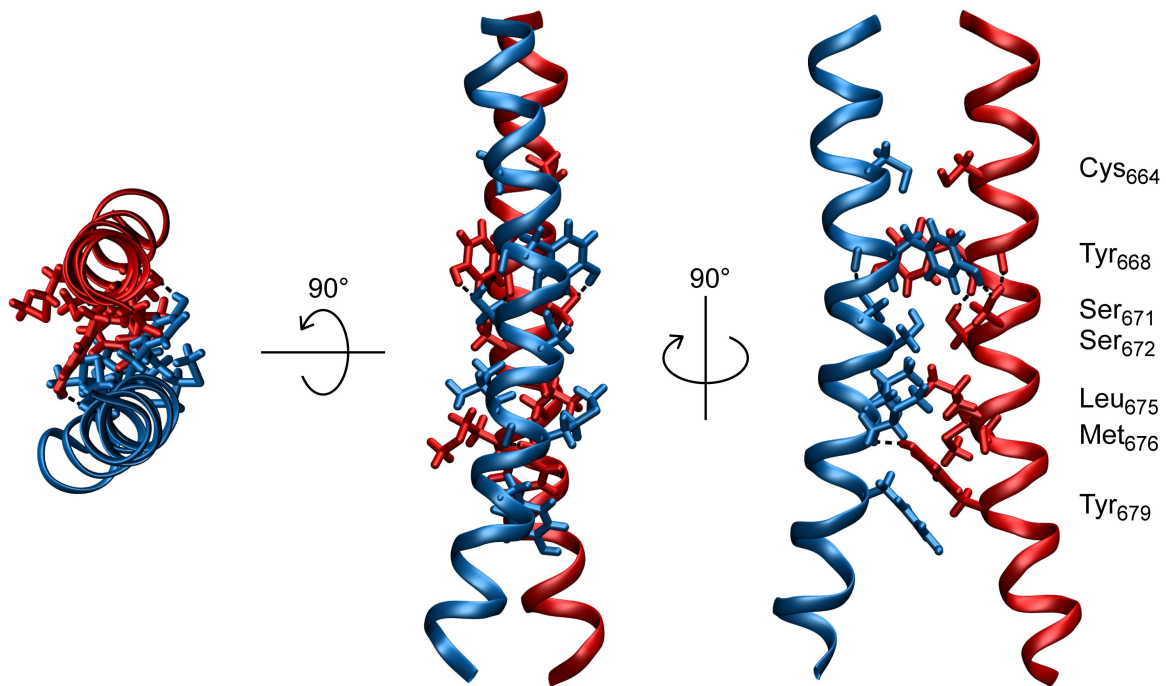
Die Gesamtstruktur des Dimers veränderte sich über die Simulationszeit nur sehr gering, wobei es sich größtenteils um zufällige Fluktuationen handeln sollte (s. Abb. 4.15). In Übereinstimmung mit den experimentellen Daten bildeten die Reste  $Y_{668}xxSSxxLMxxY_{679}$  eine Kontaktfläche mit der jeweiligen Partnerhelix (s. Abb. 4.16). Hier zeigte sich auch, dass der konservierte und mutationsinsensitive Rest  $Leu_{667}$  nicht mit seinem Pendant in der Partnerhelix interagiert, sondern mit dem nachfolgenden  $Tyr_{668}$  in zeitweiligem Kontakt steht. Es unterstützt die Annahme, dass diese Position für die Dimerisierung der TMD nicht notwendig ist, größere Reste aber zu sterischen Hinderungen führen könnten. Interessanter Weise war das Dimer im C-terminalen Bereich nicht symmetrisch. Zwar standen die Seitenketten von  $Tyr_{679}$  miteinander in Kontakt, allerdings kontaktierte die eine Seitenkette das N-terminal liegende  $Leu_{675}$ , während die andere häufig in Nähe des C-terminal gelegenen  $Phe_{682}$  zu beobachten war. Im Gegensatz dazu war der N-terminale Bereich der Kontaktfläche symmetrisch. Auffällig war der sehr enge und dauerhafte Kontakt zwischen  $Tyr_{668}$  und  $Ser_{671}$ . Es zeigte sich, dass hier beständige intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen vorhanden waren (s. Abb. 4.17a). Dabei fungierte das  $Tyr$  als Donor, das  $Ser$  als Akzeptor. Sowohl das hierbei beteiligte  $Ser_{671}$ , als auch das benachbarte  $Ser_{672}$  sättigten ihr Potential als Wasserstoffbrücken-Donor durch Interaktion mit dem Peptidrückgrat der an Position  $i-3$  gelegenen Resten (s. Abb. 4.17b). Dies ermöglicht es, solche polaren Reste ohne einen all zu hohen Energieaufwand in die apolare Lipidmembran zu integrieren<sup>[268]</sup>. Bei  $Leu_{675}$  und  $Met_{676}$  handelte es sich hingegen um die einzigen apolaren Reste unter den mutationssensitiven Positionen. Ihr enger Kontakt wurde durch van-der-Waals Interaktionen stabilisiert.

Im Laufe der simulierten 100 ns konnten neben TM Helix-Helix auch Protein-Lipid Interaktionen beobachtet werden (s. Abb. 4.18). Die Hydroxylgruppen der Aminosäurereste Tyr<sub>679</sub> beider Helices bildeten dabei Wasserstoffbrückenbindungen mit der Hydroxylgruppe von Cholesterol, oder dem Carbonyl-Sauerstoffatom der Fettsäurereste bzw. dem Phosphatrest von Phospholipiden aus. Die in Richtung Membranoberfläche gerichtete Tyr-Seitenkette ging häufiger derartige Interaktionen ein, als die in Richtung des Membranzentrums orientierte. Dies ist nicht verwunderlich, da sie sich näher an den genannten Interaktionspartnern befindet, als die andere Tyr-Seitenkette. Während der Interaktion mit Lipiden drehte sich die Seitenkette leicht in deren Richtung, sodass sie seitlich aus der Dimerstruktur herausragte. Obwohl diese Wechselwirkungen prinzipiell für die Orientierung des Dimers relevant sein könnten, konnte kein signifikanter Einfluss auf dessen Kreuzungswinkel oder Neigung beobachtet werden (vgl. Abb. 4.18 und 4.15).

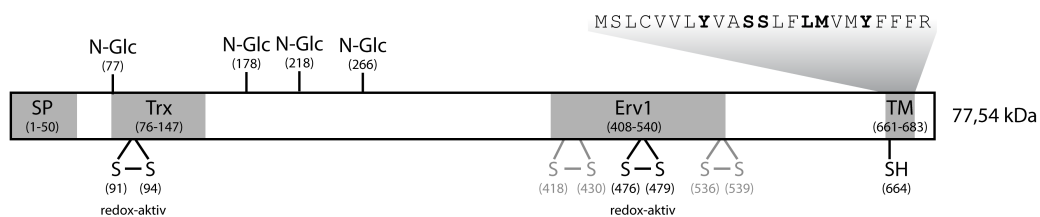
Die repräsentative Struktur in Abb. 5.2 ermöglicht einen umfassenden Blick auf das QSOX2 TMD Dimer. Hierfür wurde eine repräsentative Struktur gewählt, bei der keine spezifischen Interaktionen mit Lipiden die Protein-Protein Interaktion beeinflussen. Deutlich zu erkennen ist die kreuzweise Interaktion von Tyr<sub>668</sub> mit Ser<sub>671</sub> mittels einer Wasserstoffbrückenbindung. Gleichzeitig schmiegen sich die hydrophoben aromatischen Ringe der Tyr-Reste aneinander und an das Peptidrückgrat der Partnerhelix, was van-der-Waals Interaktionen ermöglicht. Leu<sub>675</sub> und Met<sub>676</sub> bilden eine klassische „knobs-into-holes“ Oberfläche aus, wobei die Leu-Seitenkette der einen Helix („knob“) in den Zwischenraum der Leu- und Met-Seitenkette der anderen Helix („hole“) greift. Dies ermöglicht eine große Kontaktfläche und starke van-der-Waals Wechselwirkungen in diesem Bereich. Die Seitenketten von Tyr<sub>679</sub> beider Helices bilden einen verschobenen Stapel (engl. „offset stacked“, s. Ref.<sup>[131]</sup>) aus aromatischen Ringsystemen. Dies ermöglicht sowohl van-der-Waals als auch elektrostatische Wechselwirkungen. Zusätzlich kann eine der Seitenketten eine Wasserstoffbrücke zum Peptidrückgrat der Partnerhelix ausbilden, was diese Struktur weiter stabilisiert.

### 5.2.3. Funktion der TMD-Wechselwirkung

Das QSOX2 TMD Dimer unterscheidet sich von den bekannten Strukturen anderer TMD Oligomere. Obwohl keines der klassischen Interaktionsmotive in seiner Primärsequenz zu finden ist, besitzt es eine Selbstaffinität, die fast so stark wie die der GpA TMD ist. Seine Struktur wird durch das Zusammenspiel verschiedener Wechselwirkungen stabilisiert. Hierzu zählen Wasserstoffbrückenbindungen, sowie van-der-Waals und aromatische Interaktionen. Zusätzlich dürfte die Dimerisierung der TMD auch energetisch sehr günstig sein, da die Präsentation der vergleichsweise vielen polaren Reste dieser TMD in Richtung der Acylkettenregion der Lipidmembran energetisch sehr ungünstig ist<sup>[15]</sup>. Unklar ist hingegen, welche Funktion die Dimerisierung der QSOX2 erfüllt. Das Protein ist nur wenig charakterisiert und hat laut einer genomweiten Assoziationsstudie einen Einfluss



**Abbildung 5.2.:** Putative Struktur des QSOX2 TMD Dimers. Gezeigt ist eine repräsentative Struktur des Dimers nach 70 ns Simulationszeit. Das Peptidrückgrat ist in Band-Darstellung zu sehen. Mutationssensitive Aminosäurereste sowie Cys<sub>664</sub> sind in Licorice-Darstellung gezeigt. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien eingezeichnet. Art und Position der gezeigten Reste sind rechts angegeben. Die Helices zeigen eine fast parallele Ausrichtung, wobei die mutationssensitiven Reste die Kontaktfläche darstellen. Das Dimer wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Tyr<sub>668</sub> und Ser<sub>671</sub>, van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen Leu<sub>675</sub> und Met<sub>676</sub> und aromatische Wechselwirkungen von Tyr<sub>679</sub>, sowie einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung einer Tyr<sub>679</sub>-Seitenkette mit dem Peptidrückgrat von Leu<sub>675</sub> stabilisiert.



**Abbildung 5.3.:** Schematische Darstellung des humanen QSOX2 Proteins. Aufgrund des N-terminalen Signalpeptids (SP) wird das 77,54 kDa große Protein kotranslational durch den Sec61-Komplex transloziert. Die zu Thioredoxin (Trx) und Erv1 homologen Domänen befinden sich dadurch im exoplasmatischen Raum. Das Protein wird durch eine C-terminale TMD (TM) in der Lipidmembran verankert. Die Primärsequenz der TMD ist darüber aufgeführt, wobei an der nicht-kovalenten Oligomerisierung des Proteins beteiligte Aminosäurereste fett gedruckt sind. Das Protein wird durch Glykosylierung posttranslational modifiziert (N-Glc). Die Position einiger wahrscheinlich funktionell relevanter Cysteinreste ist angegeben. Hellgraue Disulfide sind nicht direkt an der Oxidase-Aktivität des Enzyms beteiligt, könnten aber der Regulation dienen. Die Abb. basiert auf Daten aus Ref. [269] und UniProt Eintrag Q6ZRP7.

auf die Körpergröße des Menschen<sup>[270]</sup>. Das Protein besitzt ein Signalpeptid zur Translokation am Sec61-Komplex und eine C-terminale TMD, wodurch sich seine Thioredoxin- und *Erv1*-Domäne im exoplasmatischen Raum befinden (s. Abb. 5.3).

QSOX2 ist ein positiver Regulator der Interferon- $\gamma$  induzierten Apoptose in Neuroblastoma Zellen. Normalerweise ist das Protein überwiegend in der Plasmamembran zu finden, wo es ungleichmäßig verteilt ist. Unter apoptotischen Bedingungen relokalisiert es hingegen in Kern-/ER-Membran und zeigt zusätzlich eine punktuelle Verteilung im Cytoplasma. Aufgrund seiner Expression in einer Vielzahl von Geweben, besitzt es möglicherweise noch weitere Funktionen<sup>[269]</sup>. Die Thioredoxin- und *Erv1*-Domäne weisen auf eine Funktion bei der Bildung von Disulfidbrücken in anderen Proteinen hin. Die Oxidation von Proteinsubstraten ist in *Bacteria* über Ubichinon mit der Atmungskette verbunden<sup>[271]</sup>. Da das oxidative Falten von Proteinen und die Zellatmung in *Eukaryota* in unterschiedlichen Kompartimenten stattfindet, ist hier FAD als Kofaktor für die Redox-Reaktionen notwendig<sup>[272]</sup>. Disulfidbrücken werden meist von Enzympaaren in ihre Substrate eingefügt<sup>[273,274]</sup>. Eines der Enzyme erzeugt unter Verwendung eines Kofaktors *de novo* eine intramolekulare Disulfidbrücke. Diese wird anschließend auf das zweite Enzym und von dort letztlich auf das Substratprotein übertragen. Beispiele für derartige Systeme sind die periplasmatischen Proteine *DsbB/DsbA* in *Prokaryota*<sup>[275]</sup> und *Erv1/Mia40* im mitochondrialen Intermembranraum<sup>[276]</sup> oder *Ero1p/PDI* im endoplasmatischen Retikulum (ER)<sup>[272]</sup> von *Eukaryota*.

Die Proteinfamilie der Quiescin-Sulphydryloxidasen (QSOX) stellt demgegenüber eine Ausnahme dar, da die oben beschriebenen Disulfidbrücken-generierenden und -transferierenden funktionellen Einheiten hier in einem Polypeptid zusammengefasst sind. Auffällig ist, dass die Systeme aus zwei Proteinen in begrenzenden Kompartimenten (z.B. Periplasma, ER, Intermembranraum) vorliegen, was eine hohe lokale Konzentration ermöglicht. QSOX Proteine kommen hingegen u.a. auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran vor und einige Isoformen werden gar sezerniert<sup>[277–279]</sup>. Die Sezernierung von zwei Proteinen würde eine sehr geringe Proteinkonzentration zur Folge haben, was die Katalyse deutlich verlangsamen würde. Teilt man die humane QSOX1 in zwei separate Proteine, ein *Trx*- und ein *Erv1*-Fragment, reduziert sich die Effektivität des Systems dramatisch. Um eine zum Ursprungprotein vergleichbare Umsatzrate zu erreichen, muss das *Trx*-Fragment in einer mehr als 2500-fachen Konzentration gegenüber dem *Erv1*-Fragment zugesetzt werden<sup>[280]</sup>.

Die Homologie zum mitochondrialen *Erv1* Protein deutet darauf hin, dass im Falle der QSOX2 Cys<sub>476</sub> und Cys<sub>479</sub> redoxaktiv sind und durch Transfer von Elektronen auf einen Flavin-Kofaktor oxidiert werden. Die Disulfidbrücke wird anschließend auf das reduzierte Cys<sub>91</sub> und Cys<sub>94</sub> in der Thioredoxin-Domäne übertragen<sup>[276]</sup>. Die zwei weiteren nicht-katalytischen CxxC Motive in der *Erv1*-Domäne dienen wahrscheinlich ähnlich wie in *Ero1p* als Redox-Sensoren und vermindern die Oxidaseaktivität des Enzyms unter stark oxidativen Bedingungen<sup>[281–283]</sup>.

Auf welche Weise QSOX2 die Apoptose von Zellen beeinflusst ist nicht klar. Allerdings kann der Redox-Zustand von Proteinen deren Funktion und Aktivität verändern. Zum Beispiel wird die Aufnahme von Kalzium in das sarcoplasmatische Retikulum durch einen spezifischen Transporter ermöglicht, wohingegen für die Freisetzung ein Inositol-1,4,5-triphosphatrezeptor verantwortlich ist. Die Aktivität beider Proteine wird durch den Redox-Zustand von Cysteinresten beeinflusst, was Auswirkung auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration hat<sup>[284,285]</sup>. Andere redox-abhängige Mechanismen basieren auf der Änderung des Oligomerisierungsgrades oder der subzellulären Lokalisation in Abhängigkeit des Redox-Zustandes von Cysteinresten. Das Protein p66Shc liegt sowohl im Cytosol als auch im mitochondrialen Intermembranraum vor. Unter zellulärem Stress tetramerisiert p66Shc durch Bildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Homodimeren im mitochondrialen Intermembranraum, wobei möglicherweise das *Ervt1/Mia40* System beteiligt ist. Die tetramere Form des Proteins kann den Intermembranraum nicht mehr verlassen und wird dort auf diese Weise angereichert<sup>[286]</sup>. Interessanter Weise spielt cytosolisches Thioredoxin eine Rolle in der Initiierung der Apoptose. Im oxidierten Zustand bindet *Trx* die „apoptosis signal-regulating kinase 1“ (ASK1). Dies fördert die Ubiquitinylierung und den Abbau von ASK1. Durch Reduktion der katalytischen Cys-Reste im *Trx* Protein wird der Komplex aufgelöst<sup>[287]</sup>. Freies ASK1 oligomerisiert und wird dabei aktiviert. Nach Rekrutierung von TRAF2/6 kommt es zur Aktivierung der „Jun N-terminal protein kinase“ (JNK)<sup>[288,289]</sup>. Längerfristige Aktivierung der JNK führt schließlich zur Apoptose<sup>[290]</sup>. Ein vergleichbarer Mechanismus der Thioredoxin-Domäne der QSOX2 wäre denkbar. Es ist bekannt, dass einige Membranproteine des ER als Sensoren für Redox-Zustand und die Aggregation von luminalen Proteinen dienen. Sie können die „unfolded protein response“ (UPR) auslösen, um einem Ungleichgewicht entgegenzuwirken. Bei anhaltendem Stress führt die UPR allerdings zur Apoptose (s. Übersichtsartikel in Ref.<sup>[291]</sup>).

Das QSOX2 Protein könnte als Redox-Sensor im ER Lumen dienen und das Signal über die Komplexierung oder Freisetzung eines weiteren Faktors übertragen. Die TMD-vermittelte Dimerisierung könnte Aktivität oder Substratspezifität des Enzyms beeinflussen. Interessant ist in diesem Zusammenhang der N-terminale Cysteinrest der QSOX2 TMD. Wie in Kapitel 4.3.5 gezeigt, kann die TMD mittels Cys<sub>664</sub> einen kovalenten Komplex bilden. Dies setzte allerdings eine Typ I Topologie voraus, da der besagte Aminosäurerest dann einem oxidierenden Kompartiment zugewandt ist. Das apparente Molekulargewicht des Komplexes lag bei > 200 kDa, was deutlich höher ist, als für ein Dimer mit  $2 \cdot 80 \text{ kDa} = 160 \text{ kDa}$  zu erwarten wäre. Allerdings ist bekannt, dass Membranproteine häufig ein anomales Laufverhalten zeigen. Das apparente Molekulargewicht kann vom tatsächlichen um bis zu  $\pm 50\%$  abweichen<sup>[292]</sup>. Es ist unwahrscheinlich, dass es sich hier um ein höheres Oligomer, beispielsweise ein Trimer handelt, da kein dimeres Intermediat zu beobachten war. Zwar besitzt das *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsprotein in der sfGFP-Domäne weitere Cysteinreste, allerdings wurde im

Fälle anderer TMDn oder der QSOX2 C664S Mutante nur die monomere Form des Proteins beobachtet. Da die QSOX2 wt TMD nur einen einzigen Cysteinrest enthält, sind hier ausschließlich kovalente Dimere zu erwarten. Die Disulfidbrücke mittels Cys<sub>664</sub> lässt sich kaum durch DTT reduzieren. Erst der Einsatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol (2-ME) führte zur Auflösung des dimeren Komplexes. Die geringe Effektivität von DTT gegenüber 2-ME könnte damit erklärt werden, dass letzteres weniger polar ist. In der MD Simulation der QSOX2 TMD ist zu erkennen, dass sich Cys<sub>664</sub> etwa auf Höhe der Carbonylgruppen der Lipide aufhält (vgl. Abb. 5.2 und 4.13b). Die Zugänglichkeit für polare Moleküle ist hier reduziert. Die Effizienz der Markierung von Cysteinresten mit Membran-impermeablen Sonden nimmt nachweislich mit der Tiefe der Reste in der Membran ab<sup>[293]</sup>. Ähnlich verhält es sich auch mit der spontanen Bildung von Disulfidbrücken zwischen TM Helices. Die künstliche kovalente Oligomerisierung mittels Disulfidbrücken wird in Form des „cystein scanning“ zur spezifischen Quervernetzung interagierender Proteine oder Peptide eingesetzt. Ein gutes Beispiel ist die Untersuchung zur Dimerisierung von Integrin TMDn in Ref.<sup>[294]</sup>. Hier wurde zum Einen gezeigt, dass sich Disulfidbrücken in der Membran von selbst bilden können. Zum Anderen nimmt die Effizienz der Quervernetzung in Richtung des Zentrums der Membran ab. Dies erklärt auch teilweise die Verteilung von Cys in TMDn bitopischer Proteine. In Ref.<sup>[60]</sup> (Abb. 5) wurden mehr als 420 bitopische Proteine analysiert, wobei sich eine deutliche Abnahme der Häufigkeit von Cys in Richtung des N-terminalen Endes der TMDn beobachten lässt. Polytopische Proteine zeigten diese asymmetrische Verteilung hingegen nicht. In dieser Arbeit wurde eine ähnliche, allerdings auf bitopische Plasmamembranprotein aus *H. sapiens* beschränkte, Auswertung durchgeführt (s. Abb. 4.28). Auch hier konnte eine verringerte Häufigkeit von Cys in Richtung des N-Terminus beobachtet werden. Da die Mehrzahl der Plasmamembranproteine eine Typ I Topologie aufweist, nimmt die Häufigkeit folglich in Richtung des oxidierenden exoplasmatischen Raums ab. Am N-Terminus der TMDn ist Cys fast nie zu finden. Entgegen der Beobachtung in Ref.<sup>[60]</sup> lässt sich in Plasmamembranproteinen eine deutliche Häufung von Cys im Bereich zwischen N-Terminus und Mitte der TMDn beobachten. Die Nähe zum oxidierenden Milieu des extrazellulären Raums könnte hier durchaus die Bildung von Disulfidbrücken ermöglichen, wobei die Tiefe der jeweiligen Cys-Reste die Geschwindigkeit beeinflusst. Disulfidbrücken zwischen natürlichen TM Helices wurden bereits mehrfach beobachtet. Beispielsweise dimerisiert die menschliche Fucosyltransferase III mittels Cys<sub>23</sub> oder Cys<sub>29</sub>. Dies beeinflusst außerdem die subzelluläre Lokalisation des Proteins. Die dimere Form des Proteins wird im Golgi Apparat zurückgehalten, wohingegen monomere Mutanten in die Plasmamembran fehllokalisieren<sup>[295]</sup>. Das gut untersuchte CD3  $\zeta$  Protein ist ebenfalls ein vorgeformtes Dimer, das über eine Disulfidbrücke an Position Cys<sub>32</sub> der TMD kovalent verknüpft ist<sup>[296]</sup>. Wie im Fall der QSOX2 TMD lässt sich das CD3  $\zeta\zeta$  Dimer nicht durch DTT, sondern nur mit 2-ME vollständig reduzieren<sup>[297]</sup>. Die Raumstruktur des kovalenten Dimers wurde mittels NMR gelöst<sup>[298]</sup>. Die theoretische Orientie-

rung der TMDn in einer Lipidmembran bestätigt, dass sich die Cysteinreste dabei auf Höhe der Carbonylgruppen der Acylreste befinden („Orientations of Proteins in Membranes“ Datenbank, Eintrag 2hac)<sup>[299]</sup>. Die ineffektive Reduktion der Disulfide im Dimer der QSOX2 und CD3  $\zeta$  TMD durch das recht polare DTT lässt sich folglich auf die Lage der Cysteinreste in der hydrophoben Lipidmembran zurückführen.

Die Kombination von nicht-kovalenter und kovalenter Dimerisierung von TMDn erscheint zunächst widersprüchlich. Es stellt sich die Frage, weshalb die zusätzliche Stabilisierung des Dimers mittels einer Disulfidbrücke nötig ist und warum ein Cysteinrest allein für die kovalente Dimerisierung nicht ausreicht? Die CD3  $\zeta$  TMD kann auch mit der Mutation C32S dimerisieren. Allerdings verringert sich die Assoziation mit dem T-Zellen Rezeptor (TCR) Komplex um 40%<sup>[298]</sup>. Die kovalente Bindung fängt den dimeren Zustand ein und treibt die Oligomerisierungsreaktion so in Richtung des Dimers. Durch die höhere Konzentration an CD3  $\zeta$  Dimeren wird die Oligomerisierung mit dem TCR Komplex begünstigt. Allein das Vorhandensein eines Cysteinrestes in einer TMD ist hingegen nicht ausreichend, um effektiv kovalente Dimere zu bilden. Selbst bei hohen Konzentrationen und einem Überschuss an Oxidationsmittel bilden sich Disulfidbrücken zwischen CD3  $\zeta$  TMDn *in vitro* nur sehr langsam, wenn Mutationen vorhanden sind, welche die nicht-kovalente Wechselwirkung verhindern<sup>[298]</sup>. Da sich Disulfidbrücken innerhalb der hydrophoben Lipidmembran nur sehr langsam bilden, würde ein längerfristiger Kontakt der TMDn die Wahrscheinlichkeit der Oxidation erhöhen. Die nicht-kovalente Assoziation der TMDn kann somit als Vorstufe zur Bildung des kovalenten Dimers gesehen werden.

Wie gezeigt, kommt Cys am N-Terminus von TMDn bitopischer Plasmamembranproteine fast nie vor. Auch die Häufigkeit in der extrazellulären JM Region ist deutlich niedriger, als auf der entgegengesetzten Seite der Plasmamembran (s. Abb. 4.28). Dies könnte Ausdruck einer Selektion gegen Cysteinreste in diesem Bereich sein, da diese im oxidierenden Milieu zu unspezifisch Disulfidbrücken führen könnten. Eine unkontrollierte kovalente Quervernetzung könnte die Funktion der meisten Proteine beeinträchtigen. Gleichzeitig ist eine Häufung von Cysteinresten im Bereich zwischen N-Terminus und Mitte der TMDn zu beobachten. Diese Reste werden in Richtung des Zentrums der Membran zunehmend vor Oxidation geschützt. Die unspezifische kovalente Dimerisierung wird dadurch unwahrscheinlicher. Nur ein längerer Kontakt von TM Helices würde die Wahrscheinlichkeit einer Quervernetzung erhöhen. Die nicht-kovalente Oligomerisierung von TMDn kann folglich zwei Aufgaben haben. Einerseits sorgen sie für Spezifität, da nur bestimmte TMDn miteinander interagieren können. Andererseits ermöglicht sie erst die effiziente Ausbildung von Disulfidbrücken durch längerfristige Kontakte.

Im Fall der QSOX2 ist die biologische Bedeutung der Dimerisierung nicht klar. Das punktuelle Verteilungsmuster des Proteins in der Plasmamembran eukaryotischer Zellen weist allerdings auf



eine spezifische Wechselwirkung mit unbekanntem Faktoren hin<sup>[269]</sup>. Die Lokalisation des Proteins sowohl in Kernmembran, ER und Plasmamembran, sowie die vermutete Rolle der Trx- und *Erv1*-Domänen in der oxidativen Faltung anderer Proteine, ermöglicht weitere Hypothesen. Beispielsweise könnte die Dimerisierung mittels Cys<sub>664</sub> als Sensor für oxidative Bedingungen fungieren. Je stärker oxidierend die Umgebung ist, desto mehr QSOX2 liegt als konstitutives Dimer vor. Dies könnte Auswirkungen auf die katalytische Aktivität oder die Bindung weiterer Faktoren haben.

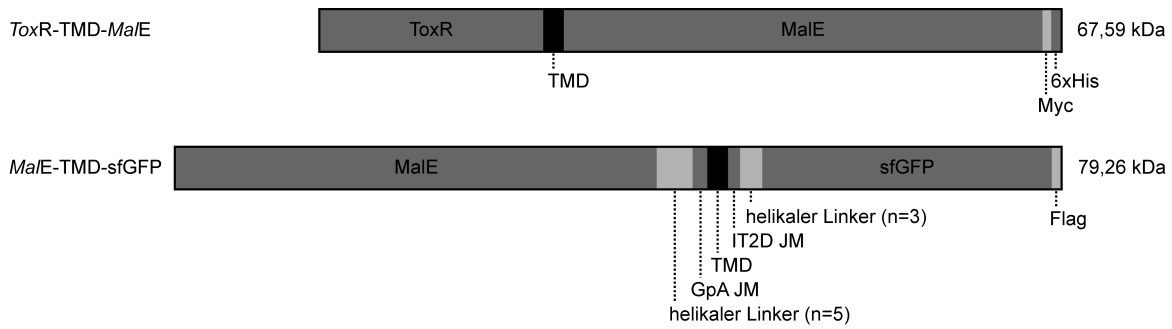
### 5.3. Nachweis TMD-vermittelter Oligomerisierung durch Fluoreszenzanisotropie

Die Selbstaffinität von TM Helices wird experimentell meist mit Hilfe von genetischen Reportersystemen wie dem ToxR-Assay bestimmt. Dabei werden Proteinfusionen einer TMD und einer Transkriptionsaktivator-domäne eingesetzt. Die Oligomerisierung der TMD führt zur Dimerisierung der Aktivator-domäne. Letzteres ermöglicht die Expression eines Reportergens, hier der  $\beta$ -Galaktosidase. Die Menge an exprimierter Galaktosidase ist proportional zur Selbstaffinität der TMD<sup>[146]</sup>. Abwandlungen und vergleichbare Assays sind z.B. das ToxCAT- oder GALLEX-Assay. Details zu diesen Assays und anderen Methoden wurden in Kapitel 1.2.3 beschrieben. Die Ausrichtung der TMD relativ zur Transkriptionsaktivator-domäne spielt allerdings bei ToxR-Assay<sup>[300]</sup>, TOXCAT<sup>[301]</sup> und GALLEX<sup>[149]</sup> eine Rolle. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass zwei Aktivator-domänen korrekt zueinander ausgerichtet sein müssen, um an die spezifische Sequenz im Promotor des Reportergens binden zu können. Da die Struktur einer TM Helix und die Position der putativen Kontaktfläche in der Regel nicht bekannt sind, muss die optimale „Phase“ der TMD relativ zum Rest des Proteins in Vorexperimenten bestimmt werden. Dies wurde in Kapitel 4.1.2 beispielhaft an der QSOX2 TMD gezeigt. Dementsprechend vervielfacht sich der Arbeitsaufwand pro TMD.

Die Fusionsproteine der genannten Systeme besitzen alle eine Typ II Topologie. Die meisten Membranproteine sind allerdings Typ I Proteine. Da biologische Lipidmembranen asymmetrisch aufgebaut sind (s. Kapitel 1.1), und TMDn mehr oder weniger spezifisch mit Lipiden interagieren (s. Kapitel 1.2), könnte die Topologie einen Einfluss auf die Interaktionsfähigkeit der TMDn haben. Nur das erst kürzlich vorgestellte genetische Reportersystem AraTM<sup>[226]</sup> umgeht dies durch Verwendung eines *MalE*-TMD-*AraC* Fusionsproteins.

#### 5.3.1. Design des Fusionsproteins

In dieser Arbeit wurden die Möglichkeiten der Fluoreszenzanisotropie zur Messung von TM Helix-Helix Interaktionen untersucht. Diese hat unter anderem den Vorteil, dass man die Interaktion von Proteinen *in cellula* untersuchen kann. Außerdem muss nur ein Protein exprimiert werden, da bei



**Abbildung 5.4.:** Schematischer Aufbau der in dieser Arbeit eingesetzten Fusionsproteine. Das *ToxR*-TMD-*MalE* Protein wird vom pToxRV Plasmid exprimiert und im *ToxR*-Assay eingesetzt. Die cytosolische *ToxR*-Domäne aktiviert bei Oligomerisierung durch die TMD die Expression eines Reportergens. Die *MalE*-Domäne ist für eine korrekte Membranintegration mit Typ II Topologie notwendig. Aufreinigung oder Immundetektion können mit Hilfe der *MalE*-Domäne, des Myc- oder 6xHis-Epitops erfolgen. Das in dieser Arbeit erstellte *MalE*-TMD-sfGFP Protein wird durch das endogene Signalpeptid der *MalE*-Domäne und die zentrale TMD mit einer Typ I Topologie in die Membran integriert. Durch eine cytoplasmatische sfGFP-Domäne ist das Protein fluoreszierend und ermöglicht den Nachweis der Oligomerisierung mittels homo-FRET. Die extramembranen Domänen sind von der TMD durch  $\alpha$ -helikale Linker unterschiedlicher Länge ( $n=3$  bzw.  $n=5$ ) getrennt, um sterische Hindernisse zu vermeiden. Die Juxtamembranregionen sind dem *H. sapiens* GpA (GpA JM) bzw. dem „ion transport 2 domain“ Protein aus *B. weihenstephanensis* (IT2D JM) entnommen. Sie ermöglichen Bewegungen der Extramembrandomänen relativ zur TMD und Wechselwirkungen mit Lipiden zur Ausrichtung der TMD. Zur Immundetektion kann die *MalE*-Domäne oder das FLAG-Epitop verwendet werden.

Verwendung von homo-FRET: das gleiche Fluorophor als Akzeptor und Donor fungiert. FRET wird hier nicht durch die längere Wellenlänge des vom Akzeptor emittierten Lichts, sondern durch dessen Depolarisation detektiert.

Um TM Helix-Helix Interaktionen mittels homo-FRET untersuchen zu können, wurde ein fluoreszierendes Fusionsprotein zur Expression in *E. coli* entworfen (s. Abb. 5.4). Als N-terminale Domäne wurde *MalE* gewählt, da es als periplasmatisches Protein durch den SecYEG Komplex transloziert wird. Dies ermöglicht die Integration der nachfolgenden TMD in die Plasmamembran. Als cytoplasmatische Domäne wurde die „superfolder“ Variante des GFP (sfGFP)<sup>[178]</sup> gewählt. sfGFP faltet sich deutlich schneller als viele andere GFP Varianten. Nach Denaturierung mit Harnstoff sind 95% des GFP Proteins bereits nach 4 min wieder fluoreszierend. *In vivo* dürfte die Faltung durch die vektorielle Synthese am Ribosom sogar noch schneller ablaufen, als in derartigen *in vitro* Denaturierungsexperimenten<sup>[302]</sup>. Zusätzlich faltet sich sfGFP auch, wenn es an wenig strukturierte oder schlecht faltende Proteine fusioniert wird. Um sterische Hindernisse zu vermeiden, wurde die TMD durch Linker von der *MalE* und der sfGFP Domäne getrennt. Damit das Protein möglichst resistent gegen Proteolyse ist, wurde kein flexibler, sondern ein wohl strukturierter Linker eingesetzt. Würde die sfGFP-Domäne durch endogene Proteasen im Cytoplasma freigesetzt, könnte dessen Fluoreszenz die Quantifizierung von homo-FRET des intakten Membranproteins stören. Als Linker wurde die Sequenz A(EAAAK)<sub>n</sub>A eingesetzt, welche eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur annimmt<sup>[177]</sup>. Die *MalE*-Domäne wurde durch einen langen Linker mit  $n = 5$  von der TMD separiert, um Hindernisse der TMD Oligomerisierung durch die recht große Domäne zu verhindern. Zwischen TMD und der

kompakten sfGFP-Domäne wurde hingegen nur ein Linker mit  $n = 3$  eingefügt, um die Distanz der Chromophore im Falle der Oligomerisierung möglichst gering zu halten und einen effizienten FRET zu ermöglichen.

Damit das Translokon die TMD als solche erkennt und diese in der Lipidmembran korrekt orientiert ist, wurden natürliche Juxtamembransequenzen mit korrekter Topologie (N-Terminus exoplasmatisch) eingefügt. N-terminal der TMD wurde die Juxtamembranregion (JM Region) des GpA Proteins eingesetzt. Diese ermöglicht nachgewiesenermaßen die Dimerisierung einer TMD im Rahmen von Fusionsproteinen wie z.B. mit einer N-terminalen Nuclease A Domäne<sup>[303]</sup>. Da die FRET-Effizienz auch von der Orientierung der Emissions- und Absorptionsdipolmomente abhängt, sollte die C-terminale JM Region flexibel sein, damit die sfGFP-Domäne unterschiedliche Orientierungen annehmen kann. Eine entsprechende Aminosäuresequenz wurde dem „Ion transport 2 domain“ Protein aus *Bacillus weihenstephanensis* (UniProt ID: A9VEV6) entnommen. Diese C-terminale JM Region weist die richtige Topologie auf, ist flexibel und verbindet auch in seinem natürlichen Kontext eine  $\alpha$ -helikale TMD mit einer längeren cytoplasmatischen  $\alpha$ -Helix<sup>[228]</sup>. Um das beschriebene Fusionsprotein schließlich spezifisch detektieren zu können, wurde am C-Terminus ein modifiziertes FLAG-Epitop angefügt.

Die kodierende Sequenz für das Fusionsprotein wurde anstelle des *ToxR-TMD-MalE* Proteins in den pToxRV Vektor eingesetzt. Dadurch stand es unter der Kontrolle des p<sub>BAD</sub>-Promotors, der durch Zugabe von Arabinose reguliert werden kann<sup>[304]</sup>. Dieser Promotor wurde als titrierbar betrachtet, sodass die Transkription aller Zellen einer Kultur proportional zur Arabinosekonzentration des Mediums ist<sup>[305]</sup>. Es hat sich hingegen gezeigt, dass der p<sub>BAD</sub>-Promotor nur einen inaktiven und einen aktiven Zustand besitzt<sup>[306,307]</sup>. Die Menge an Arabinose im Medium bestimmt, wie viele Zellen sich im aktiven Zustand befinden. Betrachtet man die gesamte Kultur, erscheint die Expression des Promotors dadurch titrierbar. Da der Promotor nur zwei Zustände besitzt, ist es sinnvoll, entweder seine basale Transkription zu nutzen, oder alle Zellen zu induzieren. Am geeignetsten sind für die Induktion sehr hohe Arabinosekonzentrationen, da die Zellen ansonsten zu unterschiedlichen Zeitpunkten in den aktiven Zustand wechseln. Dies ist auf die zufällige Menge an Arabinosetransportern in der bakteriellen Plasmamembran zum Zeitpunkt der Arabinosezugabe zurückzuführen<sup>[308]</sup>.

Aufgrund der basalen Expression des p<sub>BAD</sub>-Promotors war das *MalE-TMD-sfGFP* Protein auch in Übernachtkulturen von uninduzierten Zellen nachzuweisen (s. Abb. 4.20). Ein Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht des *MalE-TMD-sfGFP* Konstrukts lies sich spezifisch nachweisen. Die sfGFP G67A Mutation führte zu einer verringerten Proteinmenge. Da ein in *E. coli* häufig genutztes Codon für Ala genutzt wurde, ist ein Einfluss auf die Translation des Proteins weniger wahrscheinlich. Die G67A Mutation soll die autokatalytische Bildung des GFP Fluorophors verhindert, da die vergrößerte Seitenketten den dafür notwendigen engen Kontakt zwischen den beteiligten Amino-

säuren verhindert<sup>[230]</sup>. Allerdings wurde dies an einem GFP untersucht, das der Sequenz des wt aus *A. victoria* mit Ausnahme der Mutation S65T entsprach. Das hier verwendete sfGFP enthält eine Vielzahl an zusätzlichen Mutationen, welche die Faltung des Proteins beschleunigen sollen. Die Mutationen wurden durch künstliche Evolution des Proteins aufeinander abgestimmt. Es wäre denkbar, dass selbst eine kleine Veränderung im Zentrum des Proteins die konzertierten stabilisierenden Wechselwirkungen des hochgradig optimierten sfGFP Proteins stört. Die verringerte Proteinmenge des GpA G83I + sfGFP G67A Proteins könnte auf eine verminderte Stabilität und den Abbau durch endogene Proteasen zurückzuführen sein. Dieses Konstrukt soll zur Bestimmung der Autofluoreszenz von Zellen und Puffer während der Messung der Fluoreszenzanisotropie dienen. Dies könnte zwar auch mit untransformierten Zellen erfolgen, die Vergleichbarkeit durch Transkription und Translation eines fast identischen Proteins in allen Proben ist aber wünschenswert. Ob das nicht-fluoreszierende Protein danach abgebaut wird, ist für die Bestimmung der Anisotropie nicht relevant. Im Gegensatz dazu würden fluoreszierende Abbauprodukte, wie beispielsweise ein C-terminales sfGFP Fragment, die Messung der TM Helix-Helix Interaktion mittels Fluoreszenzanisotropie beeinflussen. Ein lösliches sfGFP Fragment hätte aufgrund seiner verringerten Größe und der isotropen Umgebung des Cytoplasmas eine größere Bewegungsfreiheit und kleinere Rotationskorrelationszeit als das membrangebundene vollständige Protein. Dies würde zu einer verstärkten Depolarisation und niedriger Anisotropie auch ohne das Auftreten von homo-FRET führen. Ein derartiges Fragment wurde bei Einsatz der QSOX2 TMD in das Fusionsprotein beobachtet. Hier war ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 28 kDa nachweisbar. Dies entspricht in etwa einem Fragment aus helikalem Linker, sfGFP-Domäne und FLAG-Epitop. Aus diesem Grund konnte das QSOX2 TMD Konstrukt nicht zur Messung von TM Helix-Helix Interaktionen eingesetzt werden.

Mit Hilfe des PD28-Assays und Fluoreszenzmikroskopie wurde die subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins untersucht. Die *MalE*-Domäne lokalisierte im Periplasma und konnte die *MalE*-Defizienz von *E. coli* PD28 komplementieren (s. Abb. 4.21). Die Fluoreszenz der sfGFP Domäne war in der Peripherie der Zellen, hingegen kaum im Cytoplasma zu beobachten (s. Abb. 4.22). Da sich GFP nur unter den reduzierenden Bedingungen korrekt faltet und fluoresziert<sup>[229]</sup>, muss sich die Domäne im Cytoplasma befinden, aber an die innere Membran gebunden sein. Das Fusionsprotein wurde folglich in einer Typ I Topologie in die Plasmamembran der *E. coli* Zellen integriert.

### 5.3.2. Oligomerisierung führt zu homo-FRET

Durch eine Punktmutation (G67A) in der sfGFP-Domäne wurde eine nicht-fluoreszierende Variante des Fusionsproteins hergestellt. Diese diente dazu, die Autofluoreszenz der Zellen messen zu können und auf diese Weise einen sinnvollen Leerwert in der Anisotropiemessung zu erhalten. Als Referenz für eine dimerisierende und eine monomere TMD wurde die GpA TMD bzw. deren G83I Mutante

verwendet. Während der Expression des Fusionsproteins wurde die Anisotropie des emittierten Fluoreszenzlichts bestimmt (s. Abb. 4.24b). Das Fusionsprotein mit der monomeren GpA G83I TMD zeigte eine konstant hohe Anisotropie, wie sie für fluoreszierende Proteine im monomeren Zustand zu erwarten ist. Dass die Anisotropie mit steigender Menge des Proteins leicht abnimmt, kann durch zufällige Kollokalisierung und dadurch begünstigten homo-FRET (engl. „concentration depolarisation“) erklärt werden. Im Gegensatz dazu zeigt das Fusionsprotein mit der putativ dimerisierenden TMD eine deutlich niedrigere Anisotropie auf. Dies ist vor allem zu Beginn der Expression der Fall.

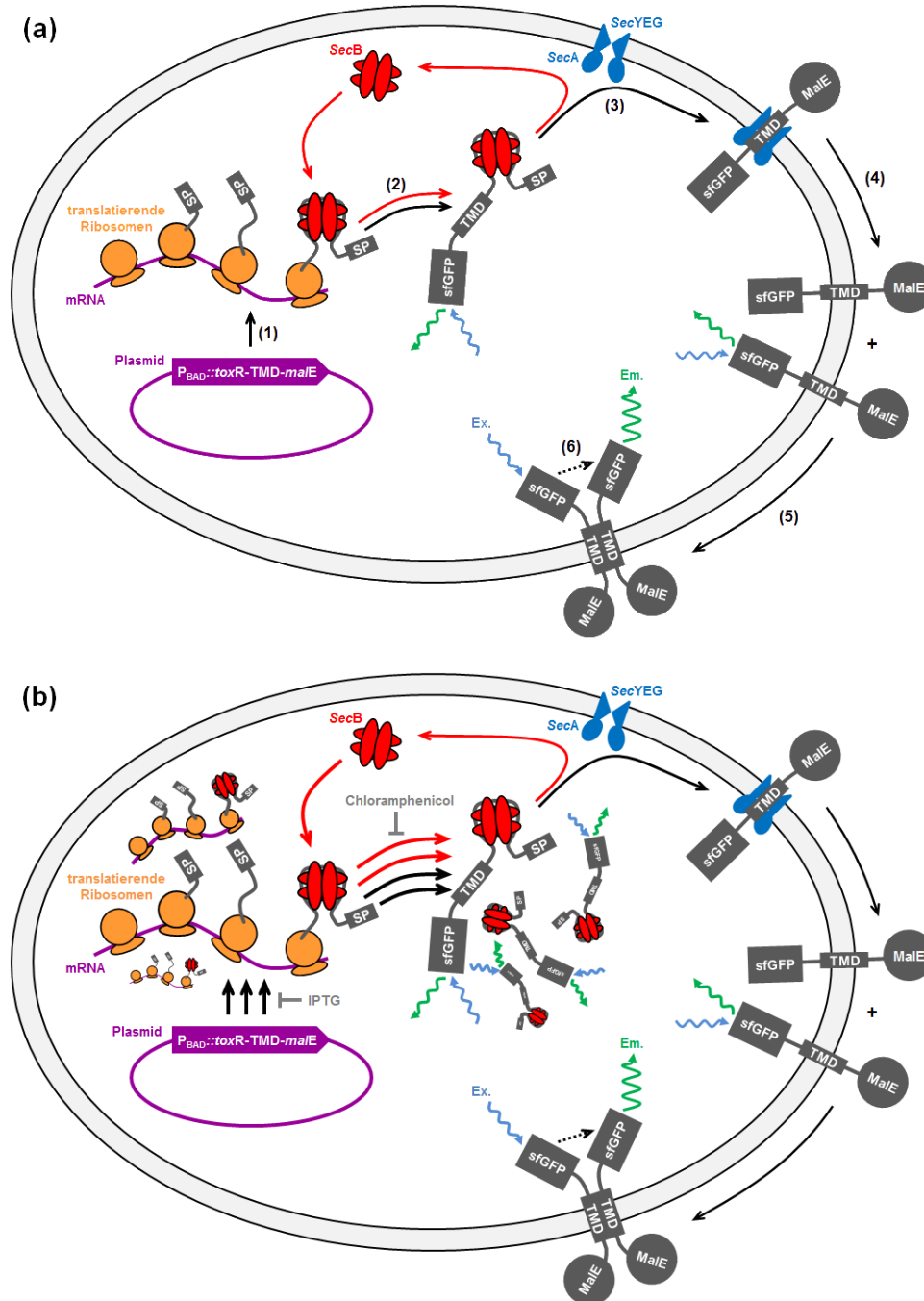
Eine Verringerung der Anisotropie kann nur durch zwei Effekte hervorgerufen werden. Entweder verringert sich die Rotationsdiffusionskonstante des Fluorophors, oder es findet homo-FRET statt. Damit sich die Rotationsdiffusionskonstante des Proteins ändert, müsste sich das fluoreszierende Protein z.B. durch Proteolyse verkleinern. Abbauprodukte des Fusionsproteins, insbesondere ein lösliches Fragment bestehend aus der sfGFP-Domäne, waren für keines der verwendeten Proteine festzustellen (s. Abb. 4.20). Dies stimmt außerdem mit den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen überein (s.o.). Die verringerte Anisotropie ist folglich auf homo-FRET zurückzuführen. Dies kann nur bei Kollokalisierung der Fluorophore stattfinden, was hier eine Oligomerisierung der Fusionsproteine voraussetzt. Die beiden Fusionsproteine unterscheiden sich nur in der TMD in einem Aminosäurerest. Dieser Rest ist bekanntermaßen an der homotypischen TM Helix-Helix Interaktion beteiligt und Mutationen (z.B. G83I) verhindern deren Assoziation. Die verringerte Anisotropie des Fusionsproteins mit GpA wt TMD Sequenz ist folglich auf homo-FRET nach TMD-vermittelter Dimerisierung zurückzuführen.

### 5.3.3. Einfluss posttranslational translozierter Proteine

Das *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsprotein kann mittels seiner TMD sequenzspezifisch oligomerisieren. Dadurch kommt es zu homo-FRET und einer verringerten Anisotropie des Fluoreszenzlichts. Eine dimerisierende TMD führte zu einer deutlich niedrigeren Anisotropie im Vergleich zu einer bekanntermaßen monomeren TMD. Allerdings nahm die Anisotropie aufgrund des dimerisierenden Fusionsproteins während der Expression zu (s. Abb. 4.24b). Dies ist unerwartet, da für die Bildung eines nicht-kovalenten Komplexes das Massenwirkungsgesetz eine Rolle spielt. Im Falle eines Monomer-Dimer Gleichgewichts lautet dieses

$$k_c = \frac{[D]}{[M]^2}, \quad (5.1)$$

wobei  $[M]$  und  $[D]$  für die Konzentration der monomeren bzw. dimeren Form und  $k_c$  für die zugehörige Gleichgewichtskonstante stehen. Es ist zu erkennen, dass die Konzentration an Dimer quadratisch mit der Konzentration des Monomers wächst. Während der Expression des Proteins sollte



**Abbildung 5.5.:** Modell zur Beeinflussung der Anisotropie durch Überexpression von *MalE*-TMD-sfGFP Proteinen in *E. coli*. Die zur Untersuchung von TM Helix-Helix Interaktion mittels Fluoreszenzanisotropie verwendeten Proteine sind auf einem Plasmid kodiert. Das Gen steht unter der Kontrolle des Arabinose-Promotors ( $p_{BAD}$ ). (a) In uninduzierten Zellen kommt es zu geringer Transkription (1) des Gens durch die basale Expression des  $p_{BAD}$ . Eine geringe Menge des Fusionsproteins wird daher konstitutiv translatiert (2). Die *MalE*-Domäne wird durch *SecB* in einem ungefalteten Zustand gehalten, bis dieser cytosolische Komplex mit *SecA* interagiert (3). Der *SecYEG* Komplex transloziert die *MalE*-Domäne in das Periplasma und integriert die darauf folgende TMD in die Plasmamembran (4). Das freie Membranprotein kann mittels seiner TMD oligomerisieren (5). Die sfGFP-Domänen sind im oligomeren Zustand ausreichend nah, sodass homo-FRET zwischen ihnen stattfinden kann (6). Das nach homo-FRET emittierte Licht (Em.) ist relativ zum zur Anregung verwendeten Licht (Ex.) depolarisiert. (b) Durch Induktion mit Arabinose sind Transkription und Translation des Fusionsgens deutlich erhöht. Die Syntheserate des Proteins übersteigt die Integrationsrate in die Membran, sodass *SecB*-gebundenes Protein im Cytoplasma akkumuliert. Da in diesem Zustand keine spezifische Interaktion mittels der TMD möglich ist, liegt es als Monomer vor. Mangels eines Akzeptors kommt es nicht zu homo-FRET und folglich nur zu einer geringen Depolarisation des emittierten Lichts.

dessen Konzentration in der Membran zunehmen und die Dimerisierung begünstigen. Nimmt der relative Anteil an Dimer zu, müsste auch mehr homo-FRET und damit eine weitere Verringerung der Anisotropie stattfinden.

Die Diskrepanz zur Beobachtung kann nur durch einen steigenden Anteil an monomerem Protein während der Expression erklärt werden. Fusionsprotein, das bereits in die Membran integriert wurde, scheint mittels seiner TMD dimerisieren zu können. Am wahrscheinlichsten ist deshalb, dass Vorstufen des Fusionsproteins die Messung beeinflussen. Bei basaler Expression im inaktiven Zustand des  $p_{\text{BAD}}$ -Promotors oder zu Beginn der Überexpression können die Fusionsproteine effizient in die Plasmamembran integriert werden (s. Abb. 5.5a). Endogenes *MalE* ist ein periplasmatisches Protein, das durch den *SecYEG*-Komplex transloziert wird. Allerdings ist hierfür das Chaperon *SecB* notwendig<sup>[309]</sup>. Dieses bindet an das im Cytosol translatierte Protein und hält es in einem ungefalteten Zustand. Anschließend wird es mittels *SecA* in den *SecYEG*-Komplex geführt (s. Kapitel 1.2). Für die Überexpression des *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsproteins wurde der  $p_{\text{BAD}}$ -Promotor auf einem „high-copy“ Plasmid verwendet. Die Induktion dieses Promotors mit Arabinose führt bei in M9 Minimalmedium kultivierten Zellen bereits nach 3 s zur Aktivierung<sup>[310]</sup>. Im aktiven Zustand ist die Expression 300-fach höher als bei basaler Transkription<sup>[311]</sup>. Es ist bekannt, dass die Überexpression von Membranproteinen in *E. coli* das *SecYEG* System auslastet. Dies führt sogar zur Abnahme sekretierter Proteine und endogener Membranproteine, wie denen der Atmungskette<sup>[209]</sup>. Es ist folglich möglich, dass die Überexpression des *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsproteins zur Akkumulation einer nur teilweise gefalteten cytoplasmatischen Vorstufe führt (s. Abb. 5.5b). Da die sfGFP Domäne darauf hin optimiert ist, sich auch als Fusion mit wenig strukturierten Proteinen effizient und schnell zu falten<sup>[178]</sup>, sind diese wahrscheinlich auch fluoreszierend.

Die Gesamtanisotropie  $\bar{r}$  einer Probe mit  $i$  unterschiedlichen Fluorophorpopulationen, lässt sich mittels der Formel

$$\bar{r} = \sum_i f_i r_i \quad (5.2)$$

berechnen. Die Anisotropie  $r_i$  der jeweiligen Population wird anhand ihres relativen Anteils an der Gesamtfluoreszenz  $f_i$  gewichtet. Anhand der Daten aus Abb. 4.24b und der Formel 5.2 lässt sich die aufgestellte Hypothese überprüfen. Zu Beginn der Messung zeigt das dimerisierende Protein eine Gesamtfluoreszenz von 20000 A.U. und eine mittlere Anisotropie von 0,127. Das monomere Protein zeigt bei der zehnfachen Gesamtfluoreszenz von 200000 A.U. eine Anisotropie von 0,309. Unter der Annahme, dass (1) die zu Beginn der Messung vorhandenen Proteine in die Membran integriert sind, neu synthetisierte Proteine hingegen nicht, und (2) die cytosolischen Vorstufen eine vergleichbar hohe Anisotropie wie das monomere Protein zeigen und (3) die Proteinmenge linear proportional zur Gesamtfluoreszenz ist, ergibt sich eine theoretische Anisotropie von

$$\begin{aligned}\bar{r} &= f_{\text{Dimer, Membran}} \cdot r_{\text{Dimer, Membran}} + f_{\text{Monomer, Cytosol}} \cdot r_{\text{Monomer, Cytosol}} \\ \bar{r} &= \frac{20000 \text{ A.U.}}{200000 \text{ A.U.}} \cdot 0,127 + \frac{180000 \text{ A.U.}}{200000 \text{ A.U.}} \cdot 0,309 \\ \bar{r} &\approx 0,291\end{aligned}$$

Die gemessene Anisotropie des dimeren Proteins bei 200000 A.U. liegt bei 0,265 und damit unter dem errechneten Wert von 0,2908. Allerdings ist Annahme (1) sehr wahrscheinlich nicht erfüllt, da eine Zunahme der Gesamtfluoreszenz um circa 200000 A.U. in einem Zeitraum von 2 h erfolgt (s. Abb. 4.23). Parallel zur Translation des Proteins ist davon auszugehen, dass kontinuierlich Protein in die Membran integriert wird. Daher wird dessen Anteil über die Zeit entsprechend zunehmen. Bereits bei der doppelten Menge an integriertem Protein wäre eine theoretische Anisotropie von

$$\begin{aligned}\bar{r} &= \frac{40000 \text{ A.U.}}{200000 \text{ A.U.}} \cdot 0,127 + \frac{160000 \text{ A.U.}}{200000 \text{ A.U.}} \cdot 0,309 \\ \bar{r} &\approx 0,273\end{aligned}$$

zu erwarten. Dies entspricht nahezu dem gemessenen Wert von  $r = 0,265$ .

Die durchgeführten Messungen zeigen, dass sich TM Helix-Helix Interaktionen mittels Fluoreszenzanisotropie nachweisen lassen. Um den Unterschied zwischen monomeren und oligomerisierenden TMDn zu vergrößern, wäre es sinnvoll, weitere Optimierungen durchzuführen. Die Menge an cytosolischen Vorformen des *MalE*-TMD-sfGFP Proteins sollte verringert werden. Dazu könnte man die Abhängigkeit der *MalE*-Domäne vom *SecB* Chaperon verringern. Eine einfache Lösung wäre es, das native *MalE*-Signalpeptid durch das *DsbA*-Signalpeptid zu ersetzen. *DsbA*<sub>SP</sub>-*MalE* wird SRP abhängig und größtenteils kotranslational durch den *SecYEG*-Komplex transloziert<sup>[312]</sup>. Ebenfalls hilfreich könnte eine langsamere Expression des Fusionsproteins sein. Bei der Überexpression von Membranproteinen mittels des T7-Promotors wurde beobachtet, dass diese häufig aggregieren, fehllokalisieren und/oder toxisch wirken. Besondere *E. coli* Stämme (beispielsweise *E. coli* C41 und *E. coli* C43), die für die Überexpression von Membranproteinen selektiert wurden, vermeiden dies durch eine verringerte Expressionsrate<sup>[313]</sup>. Ein Austausch des p<sub>BAD</sub>-Promotors durch den T7-Promotor und die Verwendung von *E. coli* C43 könnte deshalb hilfreich sein. Der Einsatz des p<sub>Rha</sub>-Promotors des Rhamnose-Operons wäre eine weitere Alternative. Im Gegensatz zu p<sub>BAD</sub> und T7-Promotor ist dieser mittels der Rhamnose-Konzentration titrierbar. Voraussetzung ist allerdings der Einsatz von „low-copy“ Plasmiden. Ausgehend von FACS (engl. fluorescence-activated cell sorter) Messungen zeigen die Zellen dabei allerdings eine größere Variabilität in der Menge an exprimiertem Protein<sup>[307]</sup>.



#### 5.3.4. Bestimmung der Oligomerstruktur

Im vorangegangenen Kapitel wurde diskutiert, wie sich TM Helix-Helix Interaktionen mit Hilfe der Fluoreszenzanisotropie nachweisen lassen. Um zusätzliche Informationen über die dabei gebildeten Proteinkomplexe zu erhalten, wurden Konkurrenzexperimente mit nicht-fluoreszierenden Fusionsproteinen durchgeführt (s. Kapitel 4.3.4). Dabei wurde ausgenutzt, dass die kompetierenden Proteine die Anisotropie beeinflussen, indem sie die Anzahl an Akzeptoren für homo-FRET und somit die Depolarisation des letztlich emittierten Lichts verringern (s. Abb. 4.25).

Um die Anwendbarkeit der Konkurrenzexperimente auch im Rahmen des *MalE*-TMD-sfGFP Fusionsproteins zu untersuchen wurde der Einfluss solcher kompetierender Proteine auf die monomere GpA G83I TMD, die dimere GpA wt TMD und die pentamere Phospholamban TMD untersucht. Der minimale Oligomerisierungsgrad  $N$  und der Anteil monomerer Proteine  $x$  wurden durch Ausgleichsrechnung mit Formel 4.1 bestimmt (s. Tab. 4.1). Wie erwartet liegt die GpA G83I TMD vollständig ( $x = 1,0$ ) als Monomer ( $N = 1,0$ ) vor. Die Messwerte der GpA wt TMD lassen sich am besten durch ein Dimer ( $N = 2,194$ ) beschreiben, wobei durchschnittlich  $x = 81,8\%$  der Proteine als Monomer vorliegen. Letzteres stimmt sehr gut mit Messungen in *E. coli* mit Hilfe des TOXCAT Systems überein<sup>[314]</sup>. Dort wurde geschlossen, dass wahrscheinlich mehr als 50% der GpA wt TMD bei geringer Proteinkonzentration als Monomer vorliegen. Für einen Großteil der GpA TMD Mutanten würde ein Anteil an Monomer von  $\geq 80\%$  die beobachtete Reporterexpression des TOXCAT-Assays und die mittels analytischer Ultrazentrifugation gemessene Destabilisierung des TMD Dimers am besten erklären (s. Ref.<sup>[314]</sup>, Abb. 6).

Für die pentamerisierende Phospholamban TMD wurde ein Anteil von durchschnittlich 75,6% monomerem Protein bestimmt. Die Ausgleichsrechnung zeigt einen minimalen Oligomerisierungsgrad von  $N = 3,101$ , was zunächst im Gegensatz zum erwarteten Pentamer steht. Das natürliche Phospholamban Protein ist mit 52 Aminosäuren sehr kurz und nur 31 Aminosäurereste entfallen auf eine kleine cytosolische Domäne. Es wäre möglich, dass es im Rahmen des hier verwendeten Fusionsproteins zu sterischen Hinderungen durch die *MalE* oder sfGFP Domäne kommt, die eine vollständige Assoziation verhindern. Dies könnte bedeuten, dass sich Oligomere mit mehr als drei Untereinheiten nicht bilden können. Andererseits dient Formel 4.1 nur der Bestimmung des Mindest-Oligomerisierungsgrads. Außerdem wird dabei eine Reaktion mit zwei Zuständen, dem Monomer und dem N-mer, angenommen. Durch diese Vereinfachung ist das Ergebnis eine sehr konservative Schätzung. Im Falle der pentamerisierenden Phospholamban TMD würde der Beitrag der dimeren, trimeren und tetrameren Zwischenform nicht berücksichtigt. Der gemessene Oligomerisierungsgrad von  $N = 3,101$  könnte daher auf die Gegenwart verschiedener Oligomerformen zurückzuführen sein. Tatsächlich sind bei der Analyse der Phospholamban TMD mittels SDS-PAGE nicht nur die monomere und pentamere Form des Proteins zu beobachten. Ein Teil der Proteine migriert unter

diesen Bedingungen auch als Dimer<sup>[232]</sup>. In der Umgebung einer biologischen Membran verringern die Wechselwirkungen von TM Helices mit Lipiden und anderen Membranproteinen die Stabilität von nicht-kovalenten TMD Oligomeren<sup>[315]</sup>. Der Anteil dimerer Phospholamban TMDn könnte *in cellula* daher deutlich höher sein, als *in vitro*.

## 5.4. Zusammenfassung und Ausblick

### Der KM als Indikator

Ein Ziel diese Arbeit war es, homotypisch interagierende TMDn aus dem humanen bitopischen Proteom anhand ihrer Primärstruktur zu identifizieren. Dazu wurden die TM Helices auf ihre unilaterale Konserviertheit untersucht und diese in Form des KM quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass ein beträchtlicher Anteil bitopischer Proteine eine TMD mit konservierter Helixseite besitzt. Die konservierten Helixseiten sind mit Aminosäuren angereichert, die häufig an TM Helix-Helix Interaktionen beteiligt sind (s. Kapitel 5.1.2). Anhand von 15 zufällig ausgewählten TMD Sequenzen wurde nachgewiesen, dass der KM gut mit der homotypischen Interaktion der TMDn *in cellula* korreliert (s. Kapitel 5.1.3). Die meisten hier identifizierten konservierten Helixseiten sind folglich TM Helix-Helix Kontaktflächen. Der Umstand, dass 46% aller bitopischen Proteine eine unilateral konservierte TMD aufweisen, ermöglicht erstmals eine Abschätzung der Größe des Interaktoms von TMDn bitopischer Membranproteine. Zwar wurden in dieser Arbeit nur homotypische Interaktionen betrachtet, heterotypische Interaktionen zwischen paralogen Proteinen mit ähnlicher TMD Sequenz sind aber durchaus möglich<sup>[237]</sup>. Dies würde die Komplexität des Interaktoms noch weiter steigern. Nicht alle konservierten Helixseiten sind zwangsläufig an TM Helix-Helix Interaktionen beteiligt. Einige könnten alternativ auch der Bindung von Kofaktoren oder der Protein-Lipid Interaktion dienen. Dadurch könnte die Zahl der oligomerisierenden TMDn niedriger sein. Andererseits kann der KM keine Helices mit zwei gegenüberliegenden Kontaktflächen („Janus-faced TMD“) identifizieren, da eine gänzlich konservierte TMD kein KM aufweist. Somit könnte der Anteil an interagierenden TMDn auch höher liegen. Der KM hat gegenüber der Suche nach möglichst ähnlichen TMD Sequenzen mittels Clusteranalyse und der Suche nach wiederholt auftretenden Sequenzmotiven einen entscheidenden Vorteil. Er kann Kontaktflächen ohne bekanntes Sequenzmotiv identifizieren, da keine Vergleiche mit unverwandten Proteinen notwendig sind. Die so identifizierten „Motive“ können selten oder gar einzigartig sein. Der KM stellt damit eine sinnvolle Ergänzung der gängigen Methoden zur Identifikation und Analyse von interagierenden TMDn bitopischer Proteine dar.

### Struktur des QSOX2 TMD Dimers

Mit Hilfe des KM wurden TMDn mit starker homotypischer Interaktionsfähigkeit identifiziert. Die größte Selbstaffinität zeigte die TMD des QSOX2 Proteins. Die an der Wechselwirkung beteiligten

Aminosäurereste sind  $Y_{668}xxSSxxLMxxY_{679}$ . Ein klassisches Sequenzmotiv für die TM Helix-Helix Interaktion war nicht enthalten. MD Simulationen zeigen, dass ein Dimer die wahrscheinlichste Oligomerstruktur darstellt. Das Dimer wird dabei durch mehrere Wasserstoffbrückenbindungen vor allem zwischen den polaren Resten der N-terminalen Hälfte, van-der-Waals Wechselwirkungen der apolaren zentralen Reste und aromatische Interaktionen der C-terminalen Hälfte stabilisiert. Die Raumstruktur des QSOX2 TMD Dimers ist dadurch mit keinem bisher bekannten TMD Oligomer vergleichbar. Ist die TMD wie im natürlichen QSOX2 Protein orientiert (ein Typ I Membranprotein), liegt der Rest  $Cys_{664}$  auf der exoplasmatischen Seite der Lipidmembran. Wie in wenigen anderen TMDn, beispielsweise im CD3  $\zeta$  Protein, können sich hier Disulfidbrücken bilden, welche das Dimer kovalent quervernetzen. Die im oxidierenden exoplasmatischen Kompartiment befindliche JM Region von bitopischen Membranproteinen ist merklich ärmer an Cysteinresten, als andere Abschnitte nahe der TMD. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass Plasmamembranproteine von *H. sapiens* allerdings häufig Cysteinreste im Bereich zwischen JM Region und Zentrum der TMD aufweisen. Durch die Lage in der Membran findet die Oxidation der Cysteinreste langsamer als in löslichen Domänen statt. Vermutlich oligomerisieren solche Membranproteinen durch nicht-kovalente TM Helix-Helix Interaktionen, wodurch die so stabilisierten Oligomere spezifisch mittels Disulfidbrücken quervernetzt werden können. Die biologische Relevanz der Dimerisierung der QSOX2 TMD ist noch nicht geklärt. Möglich wäre, dass die Oxidation von  $Cys_{664}$  und die damit verbundene Stabilisierung des QSOX2 Dimers eine Rolle als Sensor für den oxidativen Zustand des exoplasmatischen Raums spielt. Inwiefern dies außerdem mit der proapoptotischen Wirkung des QSOX2 Proteins zu tun hat, muss durch weitere Untersuchungen noch geklärt werden

#### Verwendung von homo-FRET zu Analyse von TM Helix-Helix Interaktionen

Einige wenige Studien haben homo-FRET bereits erfolgreich zur Untersuchung einzelner Membranproteine wie beispielsweise des ErbB1/ErbB2-Proteins<sup>[316]</sup>, des Serotonin(1A) Rezeptors<sup>[317]</sup> oder des Biotintransporters BioY<sup>[318]</sup> eingesetzt. In dieser Arbeit wurde versucht, ein auf homo-FRET basierendes Assay zu etablieren, das die Analyse von TM-Helix Helix Interaktionen *in cellula* ermöglicht. Die Verwendung biologischer Membranen ist den *in vitro* Methoden wie SDS-PAGE, Gelfiltration, analytische Ultrazentrifugation oder FRET-basierten Assays in künstlichen Membranen vorzuziehen, da Lipidzusammensetzung und endogene Membranproteine einen dramatischen Einfluss auf die Stabilität von TMD-Oligomeren haben. Besonders Untersuchungen in Detergenz-Mizellen liefern daher kein realistisches Bild von der Stabilität der Oligomere *in vivo*<sup>[145,315]</sup>. Außerdem sind viele TMD Interaktionen in Detergenzien nicht stark genug oder finden gar nicht statt, sodass falsch-negative Ergebnisse zu erwarten sind. Genetische Reportersysteme haben bereits den Vorteil, dass sie *in cellula* durchgeführt werden. Allerdings ist meist nur eine Aussage über die relative apparente Affinität der untersuchten TMDn möglich. Die Oligomerstruktur lässt sich dabei nicht bestimmen.

Ungünstig ist zudem die Abhängigkeit des Messwerts von der relativen Orientierung der TMD zur Transkriptionsaktivatorodomäne. Da für jede TMD mehrere Phasen getestet werden müssen (s. Kapitel 4.1.2), vervielfacht sich dadurch der Arbeitsaufwand. Die Messung von TMD-Interaktionen ist auch aufgrund dessen nicht in einem Hochdurchsatzverfahren möglich.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass es mittels homo-FRET möglich ist, die TMD-vermittelte Wechselwirkung bitopischer Membranproteine nachzuweisen. Zusätzlich lässt sich durch Bleichexperimente leicht eine Aussage über die Oligomerstruktur und sogar den Anteil monomeren Proteins machen. Die Anisotropie lässt sich im 96-well Maßstab messen, was die Durchführung als Hochdurchsatzverfahren ermöglicht. Denkbar wäre beispielsweise das Testen einer Vielzahl von Klonen mit (teil-)randomisierten TMD-Sequenzen. Zunächst wäre es allerdings sinnvoll, die Integration des Fusionsproteins in die bakterielle Plasmamembran zu verbessern (s. Kapitel 5.3.3). Um auszuschließen, dass die Bildung höherer Oligomere durch sterische Hinderung der Extramembrandomänen behindert wird (s. Kapitel 5.3.4), sind weitere Untersuchungen nötig.

Membranproteine stellen die häufigsten Ziele neuer Medikamente dar<sup>[319]</sup>. Dies ist zum Einen auf die leichte Zugänglichkeit im Falle von Plasmamembranproteinen und zum Anderen auf ihre vielfältigen Rollen z.B. in der Signaltransduktion zurückzuführen. Die Beeinflussung der TMD-vermittelten Oligomerisierung durch niedermolekulare Verbindungen wäre daher von weitreichender Anwendbarkeit. Ein anderes Beispiel ist die Wirkung von „non-steroidal anti-inflammatory drugs“ (NSAIDs) auf das Alzheimer Präprotein (APP). Die Bindung von NSAIDs an die APP TMD beeinflusst deren Prozessierung durch die  $\gamma$ -Sekretase. Dies verringert die Menge des toxisch wirkenden amyloid- $\beta$ 42 ( $A\beta$ 42) Peptids und soll auf diese Weise den Beginn bzw. das Fortschreiten der Alzheimer-Krankheit verzögern<sup>[320]</sup>. Durch homo-FRET kann die Oligomerisierung von TMDn im großen Maßstab, direkt und in lebenden Zellen beobachtet werden. Damit wäre das effiziente Testen von Bibliotheken aus niedermolekularen Verbindungen möglich. Wichtige Grundlagen dafür wurden in dieser Arbeit gelegt.

## Literaturverzeichnis

- [1] The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998): Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, **282**, 2012–2018.
- [2] The International Human Genome Sequencing Consortium (2004): Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, **431**, 931–945.
- [3] Y. Barash, J. A. Calarco, W. Gao, Q. Pan, X. Wang, O. Shai, B. J. Blencowe & B. J. Frey (2010): Deciphering the splicing code. *Nature*, **465**, 53–59.
- [4] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova & G. J. Gatto (2005): Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl*, **44**, 7342–7372.
- [5] M. P. H. Stumpf, T. Thorne, E. de Silva, R. Stewart, H. J. An, M. Lappe & C. Wiuf (2008): Estimating the size of the human interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 6959–6964.
- [6] J.-A. Nollet (1748): *Mémoires de Mathématique et de Physique, tirés des registres de l'Académie Royale des Sciences de l'année*, Kapitel Recherches sur les causes du bouillonnement des liquides. l'Académie Royale des Sciences, 57–104.
- [7] W. Hewson (1773): On the figure and composition of the red particles of the blood, commonly called the red globules. *Philos Trans R Soc London*, **63**, 306–324.
- [8] C. Nägeli & C. Cramer (1855): *Pflanzenphysiologische Untersuchungen*. Friedrich Schulthess.
- [9] H. R. J. Dutrochet (1828): *Nouvelles recherches sur l'endosmose et l'exosmose, suivies de l'application expérimentales de ces actions physiques à la solution du problème de l'irritabilité végétale*. J.-B. Baillière, Paris.
- [10] C. E. Overton (1895): Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen- und Thierzelle. *Vierteljahresschr Naturforsch Ges Zürich*, **40**, 159–201.
- [11] C. E. Overton (1896): Über die osmotischen Eigenschaften der Zelle in ihrer Bedeutung für die Toxikologie und Pharmakologie. *Vierteljahresschr Naturforsch Ges Zürich*, **41**, 383–406.
- [12] C. E. Overton (1899): Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie. *Vierteljahresschr Naturforsch Ges Zürich*, **44**, 88–114.
- [13] H. Fricke (1925): The electric capacity of suspensions with special reference to blood. *J Gen Physiol*, **9**, 137–152.

- [14] E. Gorter & F. Grendel (1925): On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J Exp Med*, **41**, 439–443.
- [15] S. H. White & W. C. Wimley (1999): Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **28**, 319–365.
- [16] J. Robertson (1957): The cell membrane concept. *J Physiol*, **140**, 58–59.
- [17] J. Robertson (1960): The molecular structure and contact relationships of cell membranes. *Prog Biophys Mol Biol*, **10**, 343–418.
- [18] L. D. Frye & M. Edidin (1970): The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J Cell Sci*, **7**, 319–335.
- [19] S. J. Singer & G. L. Nicolson (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720–731.
- [20] M. S. Bretscher (1972): Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol*, **236**, 11–12.
- [21] M. Seigneuret & P. F. Devaux (1984): ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**, 3751–3755.
- [22] Z. Beleznyay, A. Zachowski, P. F. Devaux, M. P. Navazo & P. Ott (1993): ATP-dependent aminophospholipid translocation in erythrocyte vesicles: stoichiometry of transport. *Biochemistry*, **32**, 3146–3152.
- [23] J. Connor, C. H. Pak, R. F. Zwaal & A. J. Schroit (1992): Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *J Biol Chem*, **267**, 19412–19417.
- [24] Q. Zhou, J. Zhao, J. G. Stout, R. A. Luhm, T. Wiedmer & P. J. Sims (1997): Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem*, **272**, 18240–18244.
- [25] K. Simons & G. van Meer (1988): Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, **27**, 6197–6202.
- [26] K. Simons & E. Ikonen (1997): Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569–572.
- [27] M. S. Bretscher & S. Munro (1993): Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science*, **261**, 1280–1281.
- [28] J. A. Lundbaek, O. S. Andersen, T. Werge & C. Nielsen (2003): Cholesterol-induced protein sorting: an analysis of energetic feasibility. *Biophys J*, **84**, 2080–2089.
- [29] T. J. Stevens & I. T. Arkin (2000): Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? *Proteins*, **39**, 417–420.
- [30] M. A. Roseman (1988): Hydrophobicity of the peptide C=O ··· H-N hydrogen-bonded group. *J Mol Biol*, **201**, 621–623.

- [31] R. Worch, C. Bökel, S. Höfinger, P. Schwillle & T. Weidemann (2010): Focus on composition and interaction potential of single-pass transmembrane domains. *Proteomics*, **10**, 4196–4208.
- [32] J. Choi, J. K. Chon, S. Kim & W. Shin (2008): Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data. *Proteins*, **70**, 1023–1032.
- [33] L. Sagan (1967): On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol*, **14**, 255–274.
- [34] M. Bayrhuber, T. Meins, M. Habeck, S. Becker, K. Giller, S. Villinger, C. Vonrhein, C. Griesinger, M. Zweckstetter & K. Zeth (2008): Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 15370–15375.
- [35] T. Shimamura, M. Shiroishi, S. Weyand, H. Tsujimoto, G. Winter, V. Katritch, R. Abagyan, V. Cherezov, W. Liu, G. W. Han, T. Kobayashi, R. C. Stevens & S. Iwata (2011): Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature*, **475**, 65–70.
- [36] S. Lamberth, H. Schmid, M. Muenchbach, T. Vorherr, J. Krebs, E. Carafoli & C. Griesinger (2000): NMR Solution Structure of Phospholamban. *Helv Chim Acta*, **83**, 2141–2152.
- [37] K. Oxenoid & J. J. Chou (2005): The structure of phospholamban pentamer reveals a channel-like architecture in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10870–10875.
- [38] A. E. Johnson & M. A. van Waes (1999): The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 799–842.
- [39] D. J. Schnell & D. N. Hebert (2003): Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell*, **112**, 491–505.
- [40] R. J. Keenan, D. M. Freymann, R. M. Stroud & P. Walter (2001): The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem*, **70**, 755–775.
- [41] P. Walter & G. Blobel (1981): Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol*, **91**, 557–561.
- [42] D. I. Meyer, E. Krause & B. Dobberstein (1982): Secretory protein translocation across membranes—the role of the ‘docking protein’. *Nature*, **297**, 647–650.
- [43] D. Görlich, E. Hartmann, S. Prehn & T. A. Rapoport (1992): A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature*, **357**, 47–52.
- [44] D. Görlich & T. A. Rapoport (1993): Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, **75**, 615–630.
- [45] T. Connolly & R. Gilmore (1986): Formation of a functional ribosome-membrane junction during translocation requires the participation of a GTP-binding protein. *J Cell Biol*, **103**, 2253–2261.
- [46] L. L. Randall (1983): Translocation of domains of nascent periplasmic proteins across the cyto-

plasmic membrane is independent of elongation. *Cell*, **33**, 231–240.

- [47] L. Brundage, J. P. Hendrick, E. Schiebel, A. J. Driessen & W. Wickner (1990): The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell*, **62**, 649–657.
- [48] M. Pohlschröder, W. A. Prinz, E. Hartmann & J. Beckwith (1997): Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell*, **91**, 563–566.
- [49] H. G. Koch, T. Hengelage, C. Neumann-Haefelin, J. MacFarlane, H. K. Hoffschulte, K. L. Schinz, B. Mechler & M. Müller (1999): *In vitro* studies with purified components reveal signal recognition particle (SRP) and SecA/SecB as constituents of two independent protein-targeting pathways of *Escherichia coli*. *Mol Biol Cell*, **10**, 2163–2173.
- [50] L. L. Randall, T. B. Topping, D. Suciú & S. J. Hardy (1998): Calorimetric analyses of the interaction between SecB and its ligands. *Protein Sci*, **7**, 1195–1200.
- [51] A. J. Driessen (1992): Precursor protein translocation by the *Escherichia coli* translocase is directed by the protonmotive force. *EMBO J*, **11**, 847–853.
- [52] J. P. van der Wolk, J. G. de Wit & A. J. Driessen (1997): The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *EMBO J*, **16**, 7297–7304.
- [53] F. Sargent, E. G. Bogsch, N. R. Stanley, M. Wexler, C. Robinson, B. C. Berks & T. Palmer (1998): Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J*, **17**, 3640–3650.
- [54] P. J. Hynds, D. Robinson & C. Robinson (1998): The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malformed proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem*, **273**, 34868–34874.
- [55] S. A. Clark & S. M. Theg (1997): A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Mol Biol Cell*, **8**, 923–934.
- [56] C. L. Santini, B. Ize, A. Chanal, M. Müller, G. Giordano & L. F. Wu (1998): A novel Sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J*, **17**, 101–112.
- [57] D. Halbig, T. Wiegert, N. Blaudeck, R. Freudl & G. A. Sprenger (1999): The efficient export of NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding. *Eur J Biochem*, **263**, 543–551.
- [58] A. Senes, M. Gerstein & D. M. Engelman (2000): Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with  $\beta$ -branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol*, **296**, 921–936.



- [59] D. Schneider, Y. Liu, M. Gerstein & D. M. Engelman (2002): Thermostability of membrane protein helix-helix interaction elucidated by statistical analysis. *FEBS Lett*, **532**, 231–236.
- [60] I. T. Arkin & A. T. Brunger (1998): Statistical analysis of predicted transmembrane  $\alpha$ -helices. *Biochim Biophys Acta*, **1429**, 113–128.
- [61] C. A. Woolhead, P. J. McCormick & A. E. Johnson (2004): Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins. *Cell*, **116**, 725–736.
- [62] J. Gumbart, C. Chipot & K. Schulten (2011): Free-energy cost for translocon-assisted insertion of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 3596–3601.
- [63] T. A. Rapoport, V. Goder, S. U. Heinrich & K. E. S. Matlack (2004): Membrane-protein integration and the role of the translocation channel. *Trends Cell Biol*, **14**, 568–575.
- [64] N. N. Alder & A. E. Johnson (2004): Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **279**, 22787–22790.
- [65] B. Van den Berg, W. M. Clemons, Jr, I. Collinson, Y. Modis, E. Hartmann, S. C. Harrison & T. A. Rapoport (2004): X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, **427**, 36–44.
- [66] T. Hessa, H. Kim, K. Bihlmaier, C. Lundin, J. Boekel, H. Andersson, I. Nilsson, S. H. White & G. von Heijne (2005): Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature*, **433**, 377–381.
- [67] A. Sääf, E. Wallin & G. von Heijne (1998): Stop-transfer function of pseudo-random amino acid segments during translocation across prokaryotic and eukaryotic membranes. *Eur J Biochem*, **251**, 821–829.
- [68] F. Duong & W. Wickner (1998): Sec-dependent membrane protein biogenesis: SecYEG, preprotein hydrophobicity and translocation kinetics control the stop-transfer function. *EMBO J*, **17**, 696–705.
- [69] J. C. Gumbart, I. Teo, B. Roux & K. Schulten (2013): Reconciling the roles of kinetic and thermodynamic factors in membrane-protein insertion. *J Am Chem Soc*, **135**, 2291–2297.
- [70] G. Blobel & B. Dobberstein (1975): Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol*, **67**, 835–851.
- [71] G. von Heijne (1986): The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J*, **5**, 3021–3027.
- [72] G. von Heijne & Y. Gavel (1988): Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem*, **174**, 671–678.
- [73] G. von Heijne (1989): Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane

- protein by positively charged residues. *Nature*, **341**, 456–458.
- [74] J. P. Beltzer, K. Fiedler, C. Fuhrer, I. Geffen, C. Handschin, H. P. Wessels & M. Spiess (1991): Charged residues are major determinants of the transmembrane orientation of a signal-anchor sequence. *J Biol Chem*, **266**, 973–978.
- [75] X. Wang, M. Bogdanov & W. Dowhan (2002): Topology of polytopic membrane protein subdomains is dictated by membrane phospholipid composition. *EMBO J*, **21**, 5673–5681.
- [76] V. Goder & M. Spiess (2001): Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett*, **504**, 87–93.
- [77] C. A. Harley, J. A. Holt, R. Turner & D. J. Tipper (1998): Transmembrane protein insertion orientation in yeast depends on the charge difference across transmembrane segments, their total hydrophobicity, and its distribution. *J Biol Chem*, **273**, 24963–24971.
- [78] A. Grigoriev (2003): On the number of protein-protein interactions in the yeast proteome. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4157–4161.
- [79] J. R. Newman, E. Wolf & P. S. Kim (2000): A computationally directed screen identifying interacting coiled coils from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13203–13208.
- [80] I. Ispolatov, A. Yuryev, I. Mazo & S. Maslov (2005): Binding properties and evolution of homodimers in protein-protein interaction networks. *Nucleic Acids Res*, **33**, 3629–3635.
- [81] J. B. Pereira-Leal, E. D. Levy, C. Kamp & S. A. Teichmann (2007): Evolution of protein complexes by duplication of homomeric interactions. *Genome Biol*, **8**, R51.
- [82] D. B. Lukatsky, B. E. Shakhnovich, J. Mintseris & E. I. Shakhnovich (2007): Structural similarity enhances interaction propensity of proteins. *J Mol Biol*, **365**, 1596–1606.
- [83] A. E. Todd, C. A. Orengo & J. M. Thornton (2001): Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective. *J Mol Biol*, **307**, 1113–1143.
- [84] Y. Liu, M. Gerstein & D. M. Engelman (2004): Transmembrane protein domains rarely use covalent domain recombination as an evolutionary mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 3495–3497.
- [85] J. L. Popot & D. M. Engelman (2000): Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu Rev Biochem*, **69**, 881–922.
- [86] S. Miller, A. M. Lesk, J. Janin & C. Chothia (1987): The accessible surface area and stability of oligomeric proteins. *Nature*, **328**, 834–836.
- [87] D. S. Goodsell & A. J. Olson (2000): Structural symmetry and protein function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **29**, 105–153.
- [88] B. J. Bormann, W. J. Knowles & V. T. Marchesi (1989): Synthetic peptides mimic the assembly of transmembrane glycoproteins. *J Biol Chem*, **264**, 4033–4037.

- [89] T. H. Schulte & V. T. Marchesi (1978): Self-association of human erythrocyte glycophorin A. Appearance of low mobility bands on sodium dodecyl sulfate gels. *Biochim Biophys Acta*, **508**, 425–430.
- [90] R. Henderson & P. N. Unwin (1975): Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, **257**, 28–32.
- [91] D. Oesterhelt, M. Meentzen & L. Schuhmann (1973): Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-cis and all-trans-retinal as its chromophores. *Eur J Biochem*, **40**, 453–463.
- [92] K. S. Huang, H. Bayley, M. J. Liao, E. London & H. G. Khorana (1981): Refolding of an integral membrane protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments. *J Biol Chem*, **256**, 3802–3809.
- [93] D. Langosch & J. Heringa (1998): Interaction of transmembrane helices by a knobs-into-holes packing characteristic of soluble coiled coils. *Proteins*, **31**, 150–159.
- [94] M. A. Lemmon & D. M. Engelman (1994): Specificity and promiscuity in membrane helix interactions. *Q Rev Biophys*, **27**, 157–218.
- [95] C. Chothia, M. Levitt & D. Richardson (1981): Helix to helix packing in proteins. *J Mol Biol*, **145**, 215–250.
- [96] F. H. C. Crick (1953): The packing of  $\alpha$ -helices: simple coiled-coils. *Acta Cryst*, **6**, 689–697.
- [97] S. O. Smith, R. Jonas, M. Braiman & B. J. Bormann (1994): Structure and orientation of the transmembrane domain of glycophorin A in lipid bilayers. *Biochemistry*, **33**, 6334–6341.
- [98] S. O. Smith, D. Song, S. Shekar, M. Groesbeek, M. Ziliox & S. Aimoto (2001): Structure of the transmembrane dimer interface of glycophorin A in membrane bilayers. *Biochemistry*, **40**, 6553–6558.
- [99] K. S. Mineev, E. V. Bocharov, P. E. Volynsky, M. V. Goncharuk, E. N. Tkach, Y. S. Ermolyuk, A. A. Schulga, V. V. Chupin, I. V. Maslennikov, R. G. Efremov & A. S. Arseniev (2011): Dimeric structure of the transmembrane domain of glycophorin A in lipidic and detergent environments. *Acta Naturae*, **3**, 90–98.
- [100] E. S. Sulistijo & K. R. Mackenzie (2009): Structural basis for dimerization of the BNIP3 transmembrane domain. *Biochemistry*, **48**, 5106–5120.
- [101] M. Eilers, A. B. Patel, W. Liu & S. O. Smith (2002): Comparison of helix interactions in membrane and soluble  $\alpha$ -bundle proteins. *Biophys J*, **82**, 2720–2736.
- [102] D. T. Moore, B. W. Berger & W. F. DeGrado (2008): Protein-protein interactions in the membrane: sequence, structural, and biological motifs. *Structure*, **16**, 991–1001.
- [103] D. Langosch & I. T. Arkin (2009): Interaction and conformational dynamics of membrane-

- spanning protein helices. *Protein Sci*, **18**, 1343–1358.
- [104] B. Grasberger, A. P. Minton, C. DeLisi & H. Metzger (1986): Interaction between proteins localized in membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**, 6258–6262.
- [105] W. P. Russ & D. M. Engelman (2000): The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol*, **296**, 911–919.
- [106] W. F. DeGrado, H. Gratkowski & J. D. Lear (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.
- [107] V. Helms (2002): Attraction within the membrane. Forces behind transmembrane protein folding and supramolecular complex assembly. *EMBO Rep*, **3**, 1133–1138.
- [108] M. A. Lemmon, J. M. Flanagan, H. R. Treutlein, J. Zhang & D. M. Engelman (1992): Sequence specificity in the dimerization of transmembrane  $\alpha$ -helices. *Biochemistry*, **31**, 12719–12725.
- [109] K. R. MacKenzie, J. H. Prestegard & D. M. Engelman (1997): A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science*, **276**, 131–133.
- [110] A. R. Curran & D. M. Engelman (2003): Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 412–417.
- [111] A. Senes, D. E. Engel & W. F. DeGrado (2004): Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 465–479.
- [112] S. Faham, D. Yang, E. Bare, S. Yohannan, J. P. Whitelegge & J. U. Bowie (2004): Side-chain contributions to membrane protein structure and stability. *J Mol Biol*, **335**, 297–305.
- [113] A. Senes, I. Ubarretxena-Belandia & D. M. Engelman (2001): The  $C_{\alpha}$ -H $\cdots$ O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 9056–9061.
- [114] E. Arbely & I. T. Arkin (2004): Experimental measurement of the strength of a  $C_{\alpha}$ -H $\cdots$ O bond in a lipid bilayer. *J Am Chem Soc*, **126**, 5362–5363.
- [115] L. F. J.P. Dilger & D. Haydon (1982): A critical comparison of electrical and optical methods for bilayer thickness determination. *Chem Phys Lipids*, **30**, 159–176.
- [116] C. Choma, H. Gratkowski, J. D. Lear & W. F. DeGrado (2000): Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nat Struct Biol*, **7**, 161–166.
- [117] F. X. Zhou, M. J. Cocco, W. P. Russ, A. T. Brunger & D. M. Engelman (2000): Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nat Struct Biol*, **7**, 154–160.
- [118] F. X. Zhou, H. J. Merianos, A. T. Brunger & D. M. Engelman (2001): Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 2250–2255.
- [119] L. Adamian & J. Liang (2001): Helix-helix packing and interfacial pairwise interactions of resi-

- dues in membrane proteins. *J Mol Biol*, **311**, 891–907.
- [120] L. Adamian & J. Liang (2002): Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: polar clamps and serine zippers. *Proteins*, **47**, 209–218.
- [121] L. Adamian, R. Jackups, T. A. Binkowski & J. Liang (2003): Higher-order interhelical spatial interactions in membrane proteins. *J Mol Biol*, **327**, 251–272.
- [122] H. Gratkowski, J. D. Lear & W. F. DeGrado (2001): Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 880–885.
- [123] N. Sal-Man, D. Gerber & Y. Shai (2005): The identification of a minimal dimerization motif QXXS that enables homo- and hetero-association of transmembrane helices *in vivo*. *J Biol Chem*, **280**, 27449–27457.
- [124] J. P. Dawson, J. S. Weinger & D. M. Engelman (2002): Motifs of serine and threonine can drive association of transmembrane helices. *J Mol Biol*, **316**, 799–805.
- [125] D. Schneider & D. M. Engelman (2004): Motifs of two small residues can assist but are not sufficient to mediate transmembrane helix interactions. *J Mol Biol*, **343**, 799–804.
- [126] J. R. Herrmann, A. Fuchs, J. C. Panitz, T. Eckert, S. Unterreitmeier, D. Frishman & D. Langosch (2010): Ionic interactions promote transmembrane helix-helix association depending on sequence context. *J Mol Biol*, **396**, 452–461.
- [127] M. E. Call, J. Pyrdol, M. Wiedmann & K. W. Wucherpennig (2002): The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell*, **111**, 967–979.
- [128] W. C. Wimley, T. P. Creamer & S. H. White (1996): Solvation energies of amino acid side chains and backbone in a family of host-guest pentapeptides. *Biochemistry*, **35**, 5109–5124.
- [129] E. Li, M. You & K. Hristova (2006): FGFR3 dimer stabilization due to a single amino acid pathogenic mutation. *J Mol Biol*, **356**, 600–612.
- [130] N. Sal-Man, D. Gerber, I. Bloch & Y. Shai (2007): Specificity in transmembrane helix-helix interactions mediated by aromatic residues. *J Biol Chem*, **282**, 19753–19761.
- [131] R. M. Johnson, K. Hecht & C. M. Deber (2007): Aromatic and cation- $\pi$  interactions enhance helix-helix association in a membrane environment. *Biochemistry*, **46**, 9208–9214.
- [132] L. Essen, R. Siegert, W. D. Lehmann & D. Oesterhelt (1998): Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 11673–11678.
- [133] M. Jormakka, S. Törnroth, B. Byrne & S. Iwata (2002): Molecular basis of proton motive force generation: structure of formate dehydrogenase-N. *Science*, **295**, 1863–1868.
- [134] E. Sedlák & N. C. Robinson (1999): Phospholipase A<sub>2</sub> digestion of cardiolipin bound to bovine Cytochrome c oxidase alters both activity and quaternary structure. *Biochemistry*, **38**, 14966–

14972.

- [135] A. Camara-Artigas, D. Brune & J. P. Allen (2002): Interactions between lipids and bacterial reaction centers determined by protein crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 11055–11060.
- [136] L. Nagy, F. Milano, M. Dorogi, A. Agostiano, G. Laczkó, K. Szabéniyi, G. Váró, M. Trotta & P. Maróti (2004): Protein/lipid interaction in the bacterial photosynthetic reaction center: phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol modify the free energy levels of the quinones. *Biochemistry*, **43**, 12913–12923.
- [137] V. Anbazhagan & D. Schneider (2010): The membrane environment modulates self-association of the human GpA TM domain—implications for membrane protein folding and transmembrane signaling. *Biochim Biophys Acta*, **1798**, 1899–1907.
- [138] F.-X. Contreras, A. M. Ernst, P. Haberkant, P. Björkholm, E. Lindahl, B. Gönen, C. Tischer, A. Elofsson, G. von Heijne, C. Thiele, R. Pepperkok, F. Wieland & B. Brügger (2012): Molecular recognition of a single sphingolipid species by a protein's transmembrane domain. *Nature*, **481**, 525–529.
- [139] H. Furthmayr & V. T. Marchesi (1976): Subunit structure of human erythrocyte glycophorin A. *Biochemistry*, **15**, 1137–1144.
- [140] L. He, A. R. Hoffmann, C. Serrano, K. Hristova & W. C. Wimley (2011): High-throughput selection of transmembrane sequences that enhance receptor tyrosine kinase activation. *J Mol Biol*, **412**, 43–54.
- [141] T. Förster (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys*, **2**, 55–75.
- [142] L. E. Fisher, D. M. Engelman & J. N. Sturgis (1999): Detergents modulate dimerization, but not helicity, of the glycophorin A transmembrane domain. *J Mol Biol*, **293**, 639–651.
- [143] M. You, E. Li, W. C. Wimley & K. Hristova (2005): Förster resonance energy transfer in liposomes: measurements of transmembrane helix dimerization in the native bilayer environment. *Anal Biochem*, **340**, 154–164.
- [144] M. Merzlyakov, E. Li, R. Casas & K. Hristova (2006): Spectral Förster resonance energy transfer detection of protein interactions in surface-supported bilayers. *Langmuir*, **22**, 6986–6992.
- [145] L. Chen, L. Novicky, M. Merzlyakov, T. Hristov & K. Hristova (2010): Measuring the Energetics of Membrane Protein Dimerization in Mammalian Membranes. *J Am Chem Soc*.
- [146] D. Langosch, B. Brosig, H. Kolmar & H. J. Fritz (1996): Dimerisation of the glycophorin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator. *J Mol Biol*, **263**, 525–530.

- [147] W. P. Russ & D. M. Engelman (1999): TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 863–868.
- [148] A. Bennisroune, A. Gardin, C. Auzan, E. Clauser, S. Dirrig-Grosch, M. Meira, A. Appert-Collin, D. Aunis, G. Crémel & P. Hubert (2005): Inhibition by transmembrane peptides of chimeric insulin receptors. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 2124–2131.
- [149] D. Schneider & D. M. Engelman (2003): GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane. *J Biol Chem*, **278**, 3105–3111.
- [150] R. Gurezka & D. Langosch (2001): In vitro selection of membrane-spanning leucine zipper protein-protein interaction motifs using POSSYCCAT. *J Biol Chem*, **276**, 45580–45587.
- [151] E. Lindner, S. Unterreitmeier, A. N. J. A. Ridder & D. Langosch (2007): An extended ToxR POSSYCCAT system for positive and negative selection of self-interacting transmembrane domains. *J Microbiol Methods*, **69**, 298–305.
- [152] V. L. Miller & J. J. Mekalanos (1984): Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**, 3471–3475.
- [153] V. L. Miller, R. K. Taylor & J. J. Mekalanos (1987): Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a transmembrane DNA binding protein. *Cell*, **48**, 271–279.
- [154] J. H. Miller (1972): *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- [155] E. Lindner & D. Langosch (2006): A ToxR-based dominant-negative system to investigate heterotypic transmembrane domain interactions. *Proteins*, **65**, 803–807.
- [156] I. Stagljar, C. Korostensky, N. Johnsson & S. te Heesen (1998): A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5187–5192.
- [157] G. Karimova, N. Dautin & D. Ladant (2005): Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol*, **187**, 2233–2243.
- [158] O. Shimomura, F. H. Johnson & Y. Saiga (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, **59**, 223–239.
- [159] J. Lakowicz (2006): *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science+Business Media, LLC, 3rd edition.
- [160] F. Perrin (1929): La fluorescence des solutions. Induction moléculaire - Polarisation et durée d'émission - Photochimie. *Ann Phys (Paris)*, **12**, 169–275.
- [161] F. Weigert (1920): *Vehr d Deutsch Phys Ges*, **1**, 100–102.

- [162] S. I. Vavilov & W. L. Lewschin (1923): *Z Physik*, **16**, 135–154.
- [163] I. Bulla, P. Törmälä & J. J. Lindberg (1975): Spin Probe Studies on the Dynamic Structure of Dimethyl Sulfoxide-Water Mixtures. *Acta Chemica Scandinavica*, **29a**, 89–92.
- [164] D. Lee, C. Hilty, G. Wider & K. Wüthrich (2006): Effective rotational correlation times of proteins from NMR relaxation interference. *J Magn Reson*, **178**, 72–76.
- [165] F. Perrin (1926): Polarisation de la Lumière de Fluorescence. Vie Moyenne des Molécules dans L'Etat Excité. *J Phys Radium*, **7**, 390–401.
- [166] D. A. Bachovchin, S. J. Brown, H. Rosen & B. F. Cravatt (2009): Identification of selective inhibitors of uncharacterized enzymes by high-throughput screening with fluorescent activity-based probes. *Nat Biotechnol*, **27**, 387–394.
- [167] M. Tramier & M. Coppey-Moisan (2008): Fluorescence anisotropy imaging microscopy for homo-FRET in living cells. *Methods Cell Biol*, **85**, 395–414.
- [168] A. N. Bader, S. Hoetzl, E. G. Hofman, J. Voortman, P. M. P. van Bergen en Henegouwen, G. van Meer & H. C. Gerritsen (2011): Homo-FRET imaging as a tool to quantify protein and lipid clustering. *ChemPhysChem*, **12**, 475–483.
- [169] F. T. S. Chan, C. F. Kaminski & G. S. K. Schierle (2011): HomoFRET fluorescence anisotropy imaging as a tool to study molecular self-assembly in live cells. *ChemPhysChem*, **12**, 500–509.
- [170] M. Zvilin, U. Kochva & I. T. Arkin (2007): How important are transmembrane helices of bitopic membrane proteins? *Biochim Biophys Acta*, **1768**, 387–392.
- [171] G. Bertani (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **62**, 293–300.
- [172] H. Inoue, H. Nojima & H. Okayama (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23–28.
- [173] M. Wilimzig (1985): LiCl-boiling method for plasmid mini-preps. *Trends Genet*, **1**, 158.
- [174] B. K. Michelsen (1995): Transformation of *Escherichia coli* increases 260-fold upon inactivation of T4 DNA ligase. *Anal Biochem*, **225**, 172–174.
- [175] R. J. Herrmann (2010): *Rolle polarer und ionisierbarer Aminosäuren bei der Interaktion membranständiger  $\alpha$ -Helices*. Dissertation, Technische Universität München.
- [176] E. Lindner (2007): *Identifikation heterotypischer TMD-TMD Interaktionen*. Dissertation, Technische Universität München, München.
- [177] R. Arai, H. Ueda, A. Kitayama, N. Kamiya & T. Nagamune (2001): Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. *Protein Eng*, **14**, 529–532.
- [178] J.-D. Pédelacq, S. Cabantous, T. Tran, T. C. Terwilliger & G. S. Waldo (2006): Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, **24**, 79–88.



- [179] W. A. Kibbe (2007): OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*, **35**, W43–W46.
- [180] U. K. Laemmli (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- [181] H. Kolmar, F. Hennecke, K. Götze, B. Janzer, B. Vogt, F. Mayer & H. J. Fritz (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.
- [182] R Core Team (2012): *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0.
- [183] B. Brosig & D. Langosch (1998): The dimerization motif of the glycophorin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues. *Protein Sci*, **7**, 1052–1056.
- [184] P. Duplay, S. Szmelcman, H. Bedouelle & M. Hofnung (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.
- [185] D. M. Jameson & J. A. Ross (2010): Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging. *Chem Rev*, **110**, 2685–2708.
- [186] UniProt Consortium (2012): Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*, **40**, D71–D75.
- [187] T. Rattei, P. Tischler, S. Götz, M.-A. Jehl, J. Hoser, R. Arnold, A. Conesa & H.-W. Mewes (2010): SIMAP - a comprehensive database of pre-calculated protein sequence similarities, domains, annotations and clusters. *Nucleic Acids Res*, **38**, D223–D226.
- [188] K. D. Pruitt, T. Tatusova, W. Klimke & D. R. Maglott (2009): NCBI Reference Sequences: current status, policy and new initiatives. *Nucleic Acids Res*, **37**, D32–D36.
- [189] L. Käll, A. Krogh & E. L. L. Sonnhammer (2004): A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol*, **338**, 1027–1036.
- [190] M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson & D. G. Higgins (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947–2948.
- [191] P. C. Ng, J. G. Henikoff & S. Henikoff (2000): PHAT: a transmembrane-specific substitution matrix. *Bioinformatics*, **16**, 760–766.
- [192] P. D. Adams, I. T. Arkin, D. M. Engelman & A. T. Brünger (1995): Computational searching and mutagenesis suggest a structure for the pentameric transmembrane domain of phospholamban. *Nat Struct Biol*, **2**, 154–162.

- [193] A. T. Brünger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson & G. L. Warren (1998): Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54**, 905–921.
- [194] U. Kochva, H. Leonov, I. T. Arkin & P. D. Adams (2004): Modeling membrane proteins utilizing information from silent amino acid substitutions. *Curr Protoc Bioinformatics*, **Chapter 5**, Unit5.3.
- [195] S. Jo, T. Kim & W. Im (2007): Automated builder and database of protein/membrane complexes for molecular dynamics simulations. *PLoS One*, **2**, e880.
- [196] S. Jo, J. B. Lim, J. B. Klauda & W. Im (2009): CHARMM-GUI Membrane Builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes. *Biophys J*, **97**, 50–58.
- [197] S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer & W. Im (2008): CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem*, **29**, 1859–1865.
- [198] S. C. Davison & E. D. Wills (1974): Studies on the lipid composition of the rat liver endoplasmic reticulum after induction with phenobarbitone and 20-methylcholanthrene. *Biochem J*, **140**, 461–468.
- [199] A. J. Verkleij, R. F. Zwaal, B. Roelofsen, P. Comfurius, D. Kastelijn & L. L. van Deenen (1973): The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta*, **323**, 178–193.
- [200] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kalé & K. Schulten (2005): Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*, **26**, 1781–1802.
- [201] A. D. MacKerell, D. Bashford, Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin & M. Karplus (1998): All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J Phys Chem B*, **102**, 3586–3616.
- [202] A. D. MacKerell, Jr, M. Feig & C. L. Brooks, 3rd (2004): Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J Comput Chem*, **25**, 1400–1415.
- [203] M. Schlenkrich, J. Brickmann, A. MacKerell, Jr. & M. Karplus (1996): Biological Membranes: A Molecular Perspective from Computation and Experiment. Kapitel Empirical Potential Energy

- Function for Phospholipids: Criteria for Parameter Optimization and Applications, Birkhauser, Boston, 31–81.
- [204] S. E. Feller & A. D. MacKerell (2000): An Improved Empirical Potential Energy Function for Molecular Simulations of Phospholipids. *J Phys Chem B*, **104**, 7510–7515.
- [205] S. E. Feller, K. Gawrisch & A. D. MacKerell, Jr (2002): Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. *J Am Chem Soc*, **124**, 318–326.
- [206] M. C. Pitman, F. Suits, A. D. Mackerell, Jr & S. E. Feller (2004): Molecular-level organization of saturated and polyunsaturated fatty acids in a phosphatidylcholine bilayer containing cholesterol. *Biochemistry*, **43**, 15318–15328.
- [207] W. Humphrey, A. Dalke & K. Schulten (1996): VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, **14**, 33–8, 27–8.
- [208] R. C. Page, S. Kim & T. A. Cross (2008): Transmembrane helix uniformity examined by spectral mapping of torsion angles. *Structure*, **16**, 787–797.
- [209] S. Wagner, L. Baars, A. J. Ytterberg, A. Klussmeier, C. S. Wagner, O. Nord, P.-A. Nygren, K. J. van Wijk & J.-W. de Gier (2007): Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 1527–1550.
- [210] L. Adamian, V. Nanda, W. F. DeGrado & J. Liang (2005): Empirical lipid propensities of amino acid residues in multispan alpha helical membrane proteins. *Proteins*, **59**, 496–509.
- [211] T. A. Eyre, L. Partridge & J. M. Thornton (2004): Computational analysis of  $\alpha$ -helical membrane protein structure: implications for the prediction of 3D structural models. *Protein Eng Des Sel*, **17**, 613–624.
- [212] Y. Mokrab, T. J. Stevens & K. Mizuguchi (2010): A structural dissection of amino acid substitutions in helical transmembrane proteins. *Proteins*, **78**, 2895–2907.
- [213] R. F. S. Walters & W. F. DeGrado (2006): Helix-packing motifs in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 13658–13663.
- [214] Y. Park & V. Helms (2007): On the derivation of propensity scales for predicting exposed transmembrane residues of helical membrane proteins. *Bioinformatics*, **23**, 701–708.
- [215] A. Ridder, P. Skupjen, S. Unterreitmeier & D. Langosch (2005): Tryptophan supports interaction of transmembrane helices. *J Mol Biol*, **354**, 894–902.
- [216] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov & P. E. Bourne (2000): The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, **28**, 235–242.
- [217] R. Grisshammer & C. G. Tate (1995): Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev Biophys*, **28**, 315–422.

- [218] C. G. Tate (2001): Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Lett*, **504**, 94–98.
- [219] J. L. Klepeis, K. Lindorff-Larsen, R. O. Dror & D. E. Shaw (2009): Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function. *Curr Opin Struct Biol*, **19**, 120–127.
- [220] D. E. Shaw, R. O. Dror, J. K. Salmon, J. P. Grossman, K. M. Mackenzie, J. A. Bank, C. Young, M. M. Deneroff, B. Batson, K. J. Bowers, E. Chow, M. P. Eastwood, D. J. Ierardi, J. L. Klepeis, J. S. Kuskin, R. H. Larson, K. Lindorff-Larsen, P. Maragakis, M. A. Moraes, S. Piana, Y. Shan & B. Towles (2009): Millisecond-scale Molecular Dynamics Simulations on Anton. In *Proceedings of the Conference on High Performance Computing Networking, Storage and Analysis*, number 39 in SC '09, ACM, New York, NY, USA, 39:1–39:11.
- [221] M. LeMasurier, L. Heginbotham & C. Miller (2001): KcsA: it's a potassium channel. *J Gen Physiol*, **118**, 303–314.
- [222] T. M. Jovin & W. L. Vaz (1989): Rotational and translational diffusion in membranes measured by fluorescence and phosphorescence methods. *Methods Enzymol*, **172**, 471–513.
- [223] G. Lindblom & G. Orädd (1994): NMR Studies of translational diffusion in lyotropic liquid crystals and lipid membranes. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **26**, 483–515.
- [224] S. Ramadurai, A. Holt, V. Krasnikov, G. van den Bogaart, J. A. Killian & B. Poolman (2009): Lateral diffusion of membrane proteins. *J Am Chem Soc*, **131**, 12650–12656.
- [225] P. Aller, N. Garnier & M. Genest (2006): Transmembrane helix packing of ErbB/Neu receptor in membrane environment: a molecular dynamics study. *J Biomol Struct Dyn*, **24**, 209–228.
- [226] P.-C. Su & B. W. Berger (2012): Identifying key juxtamembrane interactions in cell membranes using AraC-based transcriptional reporter assay (AraTM). *J Biol Chem*, **287**, 31515–31526.
- [227] J.-P. Defour, M. Itaya, V. Gryshkova, I. C. Brett, C. Pecquet, T. Sato, S. O. Smith & S. N. Constantinescu (2013): Tryptophan at the transmembrane-cytosolic junction modulates thrombopoietin receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 2540–2545.
- [228] K. Irie, T. Shimomura & Y. Fujiyoshi (2012): The C-terminal helical bundle of the tetrameric prokaryotic sodium channel accelerates the inactivation rate. *Nat Commun*, **3**, 793.
- [229] B. J. Feilmeier, G. Iseminger, D. Schroeder, H. Webber & G. J. Phillips (2000): Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **182**, 4068–4076.
- [230] B. W. Kutrowska, M. Narczyk, A. Buszko, A. Bzowska & P. L. Clark (2007): Folding and unfolding of a non-fluorescent mutant of green fluorescent protein. *J Phys Condens Matter*, 285223.
- [231] E. K. L. Yeow & A. H. A. Clayton (2007): Enumeration of oligomerization states of membrane proteins in living cells by homo-FRET spectroscopy and microscopy: theory and application.

- Biophys J*, **92**, 3098–3104.
- [232] H. K. Simmerman, Y. M. Kobayashi, J. M. Autry & L. R. Jones (1996): A leucine zipper stabilizes the pentameric membrane domain of phospholamban and forms a coiled-coil pore structure. *J Biol Chem*, **271**, 5941–5946.
- [233] P. R. Schimmel & P. J. Flory (1968): Conformational energies and configurational statistics of copolypeptides containing L-proline. *J Mol Biol*, **34**, 105–120.
- [234] S. C. Lovell, I. W. Davis, W. B. Arendall, 3rd, P. I. W. de Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardson & D. C. Richardson (2003): Structure validation by C $\alpha$  geometry:  $\phi$ ,  $\psi$  and C $\beta$  deviation. *Proteins*, **50**, 437–450.
- [235] M. S. Almén, K. J. V. Nordström, R. Fredriksson & H. B. Schiöth (2009): Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biol*, **7**, 50.
- [236] F. Cymer, A. Veerappan & D. Schneider (2012): Transmembrane helix-helix interactions are modulated by the sequence context and by lipid bilayer properties. *Biochim Biophys Acta*, **1818**, 963–973.
- [237] J. Kirrbach, M. Krugliak, C. L. Ried, P. Pagel, I. T. Arkin & D. Langosch (2013): Self-interaction of transmembrane helices representing pre-clusters from the human single-span membrane proteins. *Bioinformatics*, **29**, 1623–1630.
- [238] M. J. Sternberg (1990): Inter-species sequence conservation of single-spanning transmembrane regions. *Protein Eng*, **4**, 45–47.
- [239] A. K. Doura & K. G. Fleming (2004): Complex interactions at the helix-helix interface stabilize the glycophorin A transmembrane dimer. *J Mol Biol*, **343**, 1487–1497.
- [240] E. Li, W. C. Wimley & K. Hristova (2012): Transmembrane helix dimerization: beyond the search for sequence motifs. *Biochim Biophys Acta*, **1818**, 183–193.
- [241] S. P. Barwe, S. Kim, S. A. Rajasekaran, J. U. Bowie & A. K. Rajasekaran (2007): Janus model of the Na,K-ATPase beta-subunit transmembrane domain: distinct faces mediate  $\alpha/\beta$  assembly and  $\beta$ - $\beta$  homo-oligomerization. *J Mol Biol*, **365**, 706–714.
- [242] K. Parthasarathy, X. Lin, S. M. Tan, S. K. A. Law & J. Torres (2008): Transmembrane helices that form two opposite homodimeric interactions: an asparagine scan study of  $\alpha$ M and  $\beta$ 2 integrins. *Protein Sci*, **17**, 930–938.
- [243] M. M. Javadpour, M. Eilers, M. Groesbeek & S. O. Smith (1999): Helix packing in polytopic membrane proteins: role of glycine in transmembrane helix association. *Biophys J*, **77**, 1609–1618.
- [244] M. Eilers, S. C. Shekar, T. Shieh, S. O. Smith & P. J. Fleming (2000): Internal packing of helical

- membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 5796–5801.
- [245] W. C. Wigley, M. J. Corboy, T. D. Cutler, P. H. Thibodeau, J. Oldan, M. G. Lee, J. Rizo, J. F. Hunt & P. J. Thomas (2002): A protein sequence that can encode native structure by disfavoring alternate conformations. *Nat Struct Biol*, **9**, 381–388.
- [246] J. D. Lear, H. Gratkowski, L. Adamian, J. Liang & W. F. DeGrado (2003): Position-dependence of stabilizing polar interactions of asparagine in transmembrane helical bundles. *Biochemistry*, **42**, 6400–6407.
- [247] W. M. Yau, W. C. Wimley, K. Gawrisch & S. H. White (1998): The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, **37**, 14713–14718.
- [248] S. H. White & W. C. Wimley (1998): Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. *Biochim Biophys Acta*, **1376**, 339–352.
- [249] P. Braun & G. von Heijne (1999): The aromatic residues Trp and Phe have different effects on the positioning of a transmembrane helix in the microsomal membrane. *Biochemistry*, **38**, 9778–9782.
- [250] A. Holt & J. A. Killian (2010): Orientation and dynamics of transmembrane peptides: the power of simple models. *Eur Biophys J*, **39**, 609–621.
- [251] H. Sun, D. V. Greathouse, O. S. Andersen & R. E. Koeppe, 2nd (2008): The preference of tryptophan for membrane interfaces: insights from N-methylation of tryptophans in gramicidin channels. *J Biol Chem*, **283**, 22233–22243.
- [252] P. Y. Chou & G. D. Fasman (1978): Empirical predictions of protein conformation. *Annu Rev Biochem*, **47**, 251–276.
- [253] C. J. Brandl & C. M. Deber (1986): Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 917–921.
- [254] S. C. Li, N. K. Goto, K. A. Williams & C. M. Deber (1996):  $\alpha$ -helical, but not  $\beta$ -sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6676–6681.
- [255] D. N. Langelan, M. Wieczorek, C. Blouin & J. K. Rainey (2010): Improved helix and kink characterization in membrane proteins allows evaluation of kink sequence predictors. *J Chem Inf Model*, **50**, 2213–2220.
- [256] K. A. Williams & C. M. Deber (1991): Proline residues in transmembrane helices: structural or dynamic role? *Biochemistry*, **30**, 8919–8923.
- [257] M. S. Sansom & H. Weinstein (2000): Hinges, swivels and switches: the role of prolines in signalling via transmembrane  $\alpha$ -helices. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 445–451.
- [258] D. P. Tieleman, I. H. Shrivastava, M. R. Ulmschneider & M. S. Sansom (2001): Proline-induced hinges in transmembrane helices: possible roles in ion channel gating. *Proteins*, **44**, 63–72.

- [259] A. Prodöhl, T. Volkmer, C. Finger & D. Schneider (2005): Defining the structural basis for assembly of a transmembrane Cytochrome. *J Mol Biol*, **350**, 744–756.
- [260] E. Wallin, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, G. von Heijne & A. Elofsson (1997): Architecture of helix bundle membrane proteins: An analysis of cytochrome c oxidase from bovine mitochondria. *Protein Sci*, **6**, 808–815.
- [261] V. K. Mishra, M. N. Palgunachari, J. P. Segrest & G. M. Anantharamaiah (1994): Interactions of synthetic peptide analogs of the class A amphipathic helix with lipids. Evidence for the snorkel hypothesis. *J Biol Chem*, **269**, 7185–7191.
- [262] V. K. Mishra & M. N. Palgunachari (1996): Interaction of model class A<sub>1</sub>, class A<sub>2</sub>, and class Y amphipathic helical peptides with membranes. *Biochemistry*, **35**, 11210–11220.
- [263] M. R. de Planque, J. A. Kruijtz, R. M. Liskamp, D. Marsh, D. V. Greathouse, R. Koeppe, 2nd, B. de Kruijff & J. A. Killian (1999): Different membrane anchoring positions of tryptophan and lysine in synthetic transmembrane  $\alpha$ -helical peptides. *J Biol Chem*, **274**, 20839–20846.
- [264] S. Lew, J. Ren & E. London (2000): The effects of polar and/or ionizable residues in the core and flanking regions of hydrophobic helices on transmembrane conformation and oligomerization. *Biochemistry*, **39**, 9632–9640.
- [265] G. A. Caputo & E. London (2003): Cumulative effects of amino acid substitutions and hydrophobic mismatch upon the transmembrane stability and conformation of hydrophobic  $\alpha$ -helices. *Biochemistry*, **42**, 3275–3285.
- [266] J. R. Herrmann, J. C. Panitz, S. Unterreitmeier, A. Fuchs, D. Frishman & D. Langosch (2009): Complex patterns of histidine, hydroxylated amino acids and the GxxxG motif mediate high-affinity transmembrane domain interactions. *J Mol Biol*, **385**, 912–923.
- [267] C. P. Moon & K. G. Fleming (2011): Side-chain hydrophobicity scale derived from transmembrane protein folding into lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- [268] D. M. Engelman & T. A. Steitz (1981): The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: the helical hairpin hypothesis. *Cell*, **23**, 411–422.
- [269] I. Wittke, R. Wiedemeyer, A. Pillmann, L. Savelyeva, F. Westermann & M. Schwab (2003): Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the *sulfhydryl oxidase/Quiescin6* family, regulates sensitization to interferon  $\gamma$ -induced cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer Res*, **63**, 7742–7752.
- [270] Y. Okada, Y. Kamatani, A. Takahashi, K. Matsuda, N. Hosono, H. Ohmiya, Y. Daigo, K. Yamamoto, M. Kubo, Y. Nakamura & N. Kamatani (2010): A genome-wide association study in 19633 Japanese subjects identified *LHX3-QSOX2* and *IGF1* as adult height loci. *Hum Mol Genet*, **19**, 2303–2312.

- [271] M. Bader, W. Muse, D. P. Ballou, C. Gassner & J. C. Bardwell (1999): Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell*, **98**, 217–227.
- [272] B. P. Tu, S. C. Ho-Schleyer, K. J. Travers & J. S. Weissman (2000): Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science*, **290**, 1571–1574.
- [273] B. P. Tu & J. S. Weissman (2004): Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol*, **164**, 341–346.
- [274] J. Riemer, N. Bulleid & J. M. Herrmann (2009): Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. *Science*, **324**, 1284–1287.
- [275] T. Kobayashi, S. Kishigami, M. Sone, H. Inokuchi, T. Mogi & K. Ito (1997): Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 11857–11862.
- [276] N. Mesecke, N. Terziyska, C. Kozany, F. Baumann, W. Neupert, K. Hell & J. M. Herrmann (2005): A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell*, **121**, 1059–1069.
- [277] M. C. Ostrowski & W. S. Kistler (1980): Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. *Biochemistry*, **19**, 2639–2645.
- [278] S. M. Zanata, A. C. Luvizon, D. F. Batista, C. M. Ikegami, F. O. Pedrosa, E. M. Souza, D. F. S. Chaves, L. F. Caron, J. V. Pelizzari, F. R. M. Laurindo & L. S. Nakao (2005): High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum. *Redox Rep*, **10**, 319–323.
- [279] J. Jaje, H. N. Wolcott, O. Fadugba, D. Cripps, A. J. Yang, I. H. Mather & C. Thorpe (2007): A flavin-dependent sulfhydryl oxidase in bovine milk. *Biochemistry*, **46**, 13031–13040.
- [280] A. Alon, I. Grossman, Y. Gat, V. K. Kodali, F. DiMaio, T. Mehlman, G. Haran, D. Baker, C. Thorpe & D. Fass (2012): The dynamic disulphide relay of quiescin sulphhydryl oxidase. *Nature*, **488**, 414–418.
- [281] C. S. Sevier, H. Qu, N. Heldman, E. Gross, D. Fass & C. A. Kaiser (2007): Modulation of cellular disulfide-bond formation and the ER redox environment by feedback regulation of Ero1. *Cell*, **129**, 333–344.
- [282] K. M. Baker, S. Chakravarthi, K. P. Langton, A. M. Sheppard, H. Lu & N. J. Bulleid (2008): Low reduction potential of Ero1 $\alpha$  regulatory disulphides ensures tight control of substrate oxidation. *EMBO J*, **27**, 2988–2997.
- [283] C. Appenzeller-Herzog, J. Riemer, B. Christensen, E. S. Sørensen & L. Ellgaard (2008): A novel disulphide switch mechanism in Ero1 $\alpha$  balances ER oxidation in human cells. *EMBO J*, **27**, 2977–2987.



- [284] Y. Li & P. Camacho (2004):  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *J Cell Biol*, **164**, 35–46.
- [285] T. Higo, M. Hattori, T. Nakamura, T. Natsume, T. Michikawa & K. Mikoshiba (2005): Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. *Cell*, **120**, 85–98.
- [286] M. Gertz, F. Fischer, D. Wolters & C. Steegborn (2008): Activation of the lifespan regulator p66Shc through reversible disulfide bond formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**, 5705–5709.
- [287] Y. Liu & W. Min (2002): Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ Res*, **90**, 1259–1266.
- [288] M. Saitoh, H. Nishitoh, M. Fujii, K. Takeda, K. Tobiume, Y. Sawada, M. Kawabata, K. Miyazono & H. Ichijo (1998): Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J*, **17**, 2596–2606.
- [289] G. Fujino, T. Noguchi, A. Matsuzawa, S. Yamauchi, M. Saitoh, K. Takeda & H. Ichijo (2007): Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol Cell Biol*, **27**, 8152–8163.
- [290] H. Liu, C. R. Lo & M. J. Czaja (2002): NF- $\kappa$ B inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through a sustained activation of JNK and c-Jun. *Hepatology*, **35**, 772–778.
- [291] E. Szegezdi, S. E. Logue, A. M. Gorman & A. Samali (2006): Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*, **7**, 880–885.
- [292] A. Rath, M. Glibowicka, V. G. Nadeau, G. Chen & C. M. Deber (2009): Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 1760–1765.
- [293] C.-Y. Su, E. London & N. S. Sampson (2013): Mapping peptide thiol accessibility in membranes using a quaternary ammonium isotope-coded mass tag (ICMT). *Bioconjug Chem*, **24**, 1235–1247.
- [294] B.-H. Luo, T. A. Springer & J. Takagi (2004): A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand. *PLoS Biol*, **2**, e153.
- [295] V. L. Sousa, C. Brito, T. Costa, J. Lanoix, T. Nilsson & J. Costa (2003): Importance of Cys, Gln, and Tyr from the transmembrane domain of human  $\alpha$ 3/4 fucosyltransferase III for its localization and sorting in the Golgi of baby hamster kidney cells. *J Biol Chem*, **278**, 7624–7629.
- [296] J. J. Sussman, J. S. Bonifacino, J. Lippincott-Schwartz, A. M. Weissman, T. Saito, R. D. Klausner & J. D. Ashwell (1988): Failure to synthesize the T cell CD3- $\zeta$  chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell*, **52**, 85–95.
- [297] C. Geisler, J. Kuhlmann & B. Rubin (1989): Assembly, intracellular processing, and expression

- at the cell surface of the human  $\alpha\beta$  T cell receptor/CD3 complex. Function of the CD3- $\zeta$  chain. *J Immunol*, **143**, 4069–4077.
- [298] M. E. Call, J. R. Schnell, C. Xu, R. A. Lutz, J. J. Chou & K. W. Wucherpfennig (2006): The structure of the  $\zeta\zeta$  transmembrane dimer reveals features essential for its assembly with the T cell receptor. *Cell*, **127**, 355–368.
- [299] M. A. Lomize, A. L. Lomize, I. D. Pogozheva & H. I. Mosberg (2006): OPM: orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics*, **22**, 623–625.
- [300] W. Ruan, V. Becker, U. Klingmüller & D. Langosch (2004): The interface between self-assembling erythropoietin receptor transmembrane segments corresponds to a membrane-spanning leucine zipper. *J Biol Chem*, **279**, 3273–3279.
- [301] R. Li, R. Gorelik, V. Nanda, P. B. Law, J. D. Lear, W. F. DeGrado & J. S. Bennett (2004): Dimerization of the transmembrane domain of Integrin  $\alpha_{IIb}$  subunit in cell membranes. *J Biol Chem*, **279**, 26666–26673.
- [302] K. G. Ugrinov & P. L. Clark (2010): Cotranslational folding increases GFP folding yield. *Biophys J*, **98**, 1312–1320.
- [303] M. A. Lemmon, J. M. Flanagan, J. F. Hunt, B. D. Adair, B. J. Bormann, C. E. Dempsey & D. M. Engelman (1992): Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane  $\alpha$ -helices. *J Biol Chem*, **267**, 7683–7689.
- [304] E. Englesberg (1961): Enzymatic characterization of 17 L-arabinose negative mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **81**, 996–1006.
- [305] L. M. Guzman, D. Belin, M. J. Carson & J. Beckwith (1995): Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P<sub>BAD</sub> promoter. *J Bacteriol*, **177**, 4121–4130.
- [306] D. A. Siegele & J. C. Hu (1997): Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 8168–8172.
- [307] M. J. Giacalone, A. M. Gentile, B. T. Lovitt, N. L. Berkley, C. W. Gunderson & M. W. Surber (2006): Toxic protein expression in *Escherichia coli* using a rhamnose-based tightly regulated and tunable promoter system. *Biotechniques*, **40**, 355–364.
- [308] J. A. Megerle, G. Fritz, U. Gerland, K. Jung & J. O. Rädler (2008): Timing and dynamics of single cell gene expression in the arabinose utilization system. *Biophys J*, **95**, 2103–2115.
- [309] J. B. Weiss, P. H. Ray & P. Bassford, Jr (1988): Purified SecB protein of *Escherichia coli* retards folding and promotes membrane translocation of the maltose-binding protein *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8978–8982.

- [310] J. Hirsh & R. Schleif (1973): *In vivo* experiments on the mechanism of action of L-arabinose C gene activator and lactose repressor. *J Mol Biol*, **80**, 433–444.
- [311] R. Schleif, W. Hess, S. Finkelstein & D. Ellis (1973): Induction kinetics of the L-arabinose operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **115**, 9–14.
- [312] C. F. Schierle, M. Berkmen, D. Huber, C. Kumamoto, D. Boyd & J. Beckwith (2003): The DsbA signal sequence directs efficient, cotranslational export of passenger proteins to the *Escherichia coli* periplasm via the signal recognition particle pathway. *J Bacteriol*, **185**, 5706–5713.
- [313] B. Miroux & J. E. Walker (1996): Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, **260**, 289–298.
- [314] M. T. Duong, T. M. Jaszewski, K. G. Fleming & K. R. MacKenzie (2007): Changes in apparent free energy of helix-helix dimerization in a biological membrane due to point mutations. *J Mol Biol*, **371**, 422–434.
- [315] H. Hong & J. U. Bowie (2011): Dramatic Destabilization of Transmembrane Helix Interactions by Features of Natural Membrane Environments. *J Am Chem Soc*.
- [316] A. Szabó, G. Horváth, J. Szölloسی & P. Nagy (2008): Quantitative characterization of the large-scale association of ErbB1 and ErbB2 by flow cytometric homo-FRET measurements. *Biophys J*, **95**, 2086–2096.
- [317] S. Ganguly, A. H. A. Clayton & A. Chattopadhyay (2011): Organization of higher-order oligomers of the serotonin<sub>1A</sub> receptor explored utilizing homo-FRET in live cells. *Biophys J*, **100**, 361–368.
- [318] F. Kirsch, S. Frielingsdorf, A. Pohlmann, J. Ziomkowska, A. Herrmann & T. Eitinger (2012): Essential amino acid residues of BioY reveal that dimers are the functional S unit of the *Rhodobacter capsulatus* biotin transporter. *J Bacteriol*, **194**, 4505–4512.
- [319] M. A. Yildirim, K.-I. Goh, M. E. Cusick, A.-L. Barabási & M. Vidal (2007): Drug-target network. *Nat Biotechnol*, **25**, 1119–1126.
- [320] L. Richter, L.-M. Munter, J. Ness, P. W. Hildebrand, M. Dasari, S. Unterreitmeier, B. Bulic, M. Beyermann, R. Gust, B. Reif, S. Weggen, D. Langosch & G. Multhaup (2010): Amyloid beta 42 peptide (A $\beta$ 42)-lowering compounds directly bind to A $\beta$  and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 14597–14602.

## A. Anhang

### A.1. DNA Sequenzen

#### A.1.1. sfGFP Gensynthese

Ein lineares DNA-Fragment kodierend für eine JM Region des „ion transport 2 domain“ Proteins aus *B. weihenstephanensis*, einen helikalen Linker, eine sfGFP-Domäne und ein modifiziertes FLAG-Epitop wurde durch Gensynthese (Fa. Life Technologies) hergestellt. Zu beiden Enden befanden sich geeignete Restriktionsschnittstellen zur späteren Klonierung in den pToxRV Vektor. Die Sequenz des sense-Stranges, die Übersetzung des offenen Leserasters, und die Position der relevanten Restriktionsschnittstellen (Kleinbuchstaben) sind angegeben.

```

(BamHI)
  I H K L A V N V Q L P A E A A A K E A A A K E
1 TAATggatccACAAACTGGCAGTTAATGTTTCAGCTGCCTGCCGAAGCAGCAGCGAAAAGAAGCCGCTGCCAAAGAA
  10      20      30      40      50      60      70

  A A A K E A A A K E A A A K A A S K G E E L F T G
76 GCGGCAGCGAAAAGAGGCTGCCGCGAAAAGAGGCAGCAGCTAAAGCCGCAAGCAAAGGTGAAGAAGTGTTCACCGGT
  80      90      100     110     120     130     140

  V V P I L V E L D G D V N G H K F S V R G E G E G
151 GTTGTTCGATTCTGTTGAACTGGATGGTGTATGTTAATGGCCACAAATTCTCAGTTCGTGGTGAAGGCGAAGGT
  160     170     180     190     200     210     220

  D A T N G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T L
226 GATGCAACCAATGGTAAACTGACCCTGAAATTTATCTGTACCACCGGCAAAGTCCGGTTCGGTGGCCGACCCTG
  230     240     250     260     270     280     290

  V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K
301 GTTACCACCTGACCTATGGTGTTCAGTGTTCAGCCGTTATCCGGATCATATGAAACAGCAGATTTCTTCAAAA
  310     320     330     340     350     360     370

  S A M P E G Y V Q E R T I S F K D D G T Y K T R A
376 TCTGCAATGCCGGAAGGTTATGTTCAAGAACGTACCATCTCCTTTAAAGATGATGGCACCTATAAGACCCGTGCC
  380     390     400     410     420     430     440

  E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N
451 GAAGTTAAATTTGAAGGTGATACCCTGGTGAATCGCATTGAACTGAAAGGCATCGATTTCAAAGAAGATGGTAAT
  460     470     480     490     500     510     520

  I L G H K L E Y N F N S H N V Y I T A D K Q K N G
526 ATCCTGGGCCATAAACTGGAATATAATTTCAACAGCCACAACGTGTATATCACCGCAGATAAACAGAAGAATGGC
  530     540     550     560     570     580     590

  I K A N F K I R H N V E D G S V Q L A D H Y Q Q N
601 ATCAAAGCCAACTTTAAAGATCCGCCATAATGTTGAAGATGGCAGCGTTCAGCTGGCAGATCATTATCAGCAGAAT
  610     620     630     640     650     660     670

  T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S V L S K D
676 ACACCGATTGGTGTATGGTCCGGTTCGTCTGCCGGATAATCATTATCTGAGCACCCAGAGCGTTCTGAGCAAAGAT
  680     690     700     710     720     730     740

```



A A D G G Y A F K Y E N G K Y D I K D V G V D N A  
 901 TGCTGCTGACGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAAAGGCAAGTACGACATTAAGACGTGGGCGTGGATAACCG  
 910 920 930 940 950 960 970

G A K A G L T F L V D L I K N K H M N A D T D Y S  
 976 TGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGTTGACCTGATTAACAAACACATGAATGCAGACACCGATTACTC  
 980 990 1000 1010 1020 1030 1040

I A E A A F N K G E T A M T I N G P W A W S N I D  
 1051 CATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGA  
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120

T S K V N Y G V T V L P T F K G Q P S K P F V G V  
 1126 CACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTTCGTTGGCGT  
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

L S A G I N A A S P N K E L A K E F L E N Y L L T  
 1201 GCTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCGAAAGAGTTCTCGAAAACCTATCTGCTGAC  
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270

D E G L E A V N K D K P L G A V A L K S Y E E E L  
 1276 TGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTT  
 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340

A K D P R I A A T M E N A Q K G E I M P N I P Q M  
 1351 GCGGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACCATGGAAAAAGCCGAGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCAGCAT  
 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420

S A F W Y A V R T A V I N A A S G R Q T V D E A L  
 1426 GTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCAGCGGTGTCGACTGTGATGAAGCCCT  
 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490

| helikaler Linker (n=5)  
 K D A Q T R I T K N S A E A A A K E A A A K E A A  
 1501 GAAAGACGCGCAGACTCGTATCACCAAGAATTCTGCCGAAGCAGCAGCGAAAGAAGCCGCTGCCAAAGAAGCGCG  
 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570

| GpA JM Region  
 6 A K E A A A K E A A A K A A V Q L A H H F S E P E  
 1576 AGCGAAAGAGGCTGCCGCGAAAGAGGCAGCAGCTAAAGCCGAGTGCAGCTGGCGCATCACTTTAGCGAACCGGA  
 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640

(NheI)| Integrin alpha(V) mut GP TMD |(BamHI) A9VEV6 JM Region  
 A S V I I L A V G P G L L L L G I H K L A V N V Q  
 1651 AgctagcGTGATCATTCTGGCGGTGgggcccGGCCTGCTGCTCCTGGggatccACAAACTGGCAGTTAATGTTCA  
 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720

| helikaler Linker (n=3) | sfGFP-Domäne  
 L P A E A A A K E A A A K E A A A K A A S K G E E  
 1726 GCTGCCTGCCGAAGCAGCAGCGAAAGAAGCCGCCGAAAGAGGCAGCAGCTAAAGCCGCAAGCAAAGGTGAAGA  
 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790

L F T G V V P I L V E L D G D V N G H K F S V R G  
 1801 ACTGTTTACCGGTGTTGTTCCGATTCTGGTTGAACTGGATGGTGATGTTAATGGCCACAAATTCTCAGTTCGTGG  
 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870

E G E G D A T N G K L T L K F I C T T G K L P V P  
 1876 TGAAGGCGAAGGTGATGCAACCAATGGTAAACTGACCCTGAAATTTATCTGTACCACCGGCAAACCTGCCGTTCC  
 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940

W P T L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H  
 1951 GTGGCCGACCCTGTTACCACCCTGACCTATGGTGTTCAGTGTTCAGCCGTTATCCGGATCATATGAAACAGCA  
 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020

D F F K S A M P E G Y V Q E R T I S F K D D G T Y  
 2026 CGATTTCTTCAAATCTGCAATGCCGGAAGGTTATGTTCAAGAACGTACCATCTCCTTTAAAGATGATGGCACCTA  
 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090

K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K  
 2101 TAAGACCCGTGCCGAAGTAAATTTGAAGGTGATACCCTGGTGAATCGCATTGAACTGAAAGGCATCGATTTCAA  
 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170

E D G N I L G H K L E Y N F N S H N V Y I T A D K  
 2176 AGAAGATGGTAATATCTGGGCCATAAACTGGAATATAATTTCAACAGCCACAACGTGTATATCACCGCAGATAA  
 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240

Q K N G I K A N F K I R H N V E D G S V Q L A D H  
 2251 ACAGAAGAATGGCATCAAAGCCAACCTTTAAGATCCGCCATAATGTTGAAGATGGCAGCGTTCAGCTGGCAGATCA  
 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320

Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S V  
 2326 TTATCAGCAGAATACACCGATTGGTGATGGTCCGGTTCTGCTGCCGGATAATCATTATCTGAGCACCCAGAGCGT  
 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390

L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T H  
 2401 TCTGAGCAAAGATCCGAATGAGAAACGTGATCACATGGTGCTGCTGGAATTTGTTACCGCAGCAGGTATTACCCA  
 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470

| modif. FLAG-Epitop |  
 G M D E L Y K G D Y K D H D G \*  
 2476 TGGTATGGATGAACTGTATAAAGCGCATTATAAAGATCACGACGGCTAACTCGAGGTGACCTGCAGAAAATGGA  
 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540

2551 CTGAACAAGTCAGTCCATAAGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGTTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT  
 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620

|<- f1 Replikationsursprung  
 2626 TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTAC  
 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690

2701 ACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGG  
 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770

2776 TCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGA  
 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840

2851 TTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTT  
 2860 2870 2880 2890 2900 2910 2920

2926 CTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGG  
 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990

(f1 Replikationsursprung)  
 3001 GATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAAT  
 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070

->|  
 3076 ATTAACGTTTACAATTTTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAAT  
 3080 3090 3100 3110 3120 3130 3140

|<- KanR (Gegenstrang)  
 3151 ACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATTCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTAT  
 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220

3226 TCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGT  
 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290

3301 TCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTCGGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCC  
 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370

3376 CCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTT  
           3380      3390      3400      3410      3420      3430      3440

3451 TATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAAATCACTCGCATCAACCAAAAC  
           3460      3470      3480      3490      3500      3510      3520

3526 CGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAA  
           3530      3540      3550      3560      3570      3580      3590

3601 TCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATA  
           3610      3620      3630      3640      3650      3660      3670

3676 CCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGA  
           3680      3690      3700      3710      3720      3730      3740

3751 TGGTCGGAAGAGGCATAAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTAC  
           3760      3770      3780      3790      3800      3810      3820

3826 CTTTGCCATGTTTCAGAAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCC  
           3830      3840      3850      3860      3870      3880      3890

3901 CGACATTATCGCGAGCCCATTATACCCATATAAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAGCAAG  
           3910      3920      3930      3940      3950      3960      3970

(KanR (Gegenstrang)) ->| |<-

3976 ACGTTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAAACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATG  
           3980      3990      4000      4010      4020      4030      4040

ColE1 Replikationsursprung

4051 ACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGA  
           4060      4070      4080      4090      4100      4110      4120

4126 GATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCG  
           4130      4140      4150      4160      4170      4180      4190

4201 GATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTA  
           4210      4220      4230      4240      4250      4260      4270

4276 GTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTA  
           4280      4290      4300      4310      4320      4330      4340

4351 CCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG  
           4360      4370      4380      4390      4400      4410      4420

4426 CAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC  
           4430      4440      4450      4460      4470      4480      4490

4501 CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGG  
           4510      4520      4530      4540      4550      4560      4570

4576 GTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGG  
           4580      4590      4600      4610      4620      4630      4640

(ColE1 Replikationsursprung)

4651 CACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACCGG  
           4660      4670      4680      4690      4700      4710      4720

->|

4726 GCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGTCACATGTTCTTTCTCGGTTATCCCTGATTCTGTG  
           4730      4740      4750      4760      4770      4780      4790

4801 GATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTG  
           4810      4820      4830      4840      4850      4860      4870



4876 AGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGG  
4880 4890 4900 4910 4920 4930 4940

4951 TGC ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACTACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGG  
4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020

5026 TCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTT  
5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090

5101 ACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGC  
5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170

5176 AGCAGATCAATTCGCGCGCAAGGCGAAGCGGCATGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGCAGGGATTCTGC  
5180 5190 5200 5210 5220 5230 5240

5251 AAACCCATGCTACTCCGTCAAGCCGTCAATTGTCTGATTCGTTACCAATTATGACAACTTGACGGCTACATCAT  
5260 5270 5280 5290 5300 5310 5320  
|<- AraC (Gegenstrang)

5326 TCACTTTTTTCTTCACAACCGGCACGGAACCTCGCTCGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTTTAAATACCCGCGAGAAAT  
5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390

5401 AGAGTTGATCGTCAAAACCAACATTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGCTCAAAAGCAGCTTCG  
5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470

5476 CCTGGCTGATACGTTGGTCCTCGCGCCAGCTTAAAGACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGAC  
5480 5490 5500 5510 5520 5530 5540

5551 GCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAAAAATTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGT  
5560 5570 5580 5590 5600 5610 5620

5626 ACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGCAGTA  
5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690

5701 ACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCCTTCCCCTTGCCCGGCGTTAATGATTTGCC  
5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770

5776 CAAACAGGTGCTGAAATGCGGCTGGTGCCTTCATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGCAAATATTGACGGCC  
5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840

5851 AGTTAAGCCATTCATGCCAGTAGGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGGTGATACCATTGCGGAGCCTCCGGAT  
5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920

5926 GACGACCGTAGTGATGAATCTCTCCTGGCGGGAACAGCAAAAATATCACCCGGTCGGCAAACAAATTCTCGTCCCT  
5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990

6001 GATTTTTTACCACCCCTGACCGCGAATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTCATTCCCAGCGGTCGGTCGATAA  
6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070

6076 AAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAAACGAGTATCCCGGCA  
6080 6090 6100 6110 6120 6130 6140

(AraC (Gegenstrang)) ->|

6151 GCAGGGGATCATTTTGCCTTCAGCCATACTTTTCA  
6160 6170 6180

## A.2. homo-FRET

**Listing A.1:** R Skript zur von Fluoreszenzanisotropie Daten aus Bleichexperimenten. Die während eines Bleichexperimentes gemessenen Wertepaare für Anisotropie und relative Fluoreszenzintensität werden in einem Koordinatensystem dargestellt. Anschließend werden Oligomerisierungsgrad  $N$  und der relative Anteil monomeren Proteins  $x$  mittels Ausgleichsrechnung bestimmt.

```

1 # ## Messwerte laden
2 Vektor_Anisotropie <- c(<...Daten als Vektor...>)
3 Vektor_RelFluoreszenz <- c(<...Daten als Vektor...>)
4
5 # Darstellungsoptionen
6 my_y_limits <- c(0.22, 0.32)
7 my_x_limits <- c(0, 1)
8 my_type <- "p"
9 my_pointsize_scale <- 1.2
10
11 # Messwerte zeichnen
12 plot(Vektor_RelFluoreszenz, Vektor_Anisotropie, type=my_type, ylim=my_y_limits, xlim=my_x_limits,
13       xaxt="n", yaxt="n", xlab="", bty="o", ylab="", col="black", cex=my_pointsize_scale)
14
15 # Anisotropie des monomeren Proteins
16 r_m <- 0.309
17
18 # Formel (8) aus Yeow et al., 2007
19 r_f_function <- function(r_m, x, f, N) {r_m*(x+(1-x)*(1-f)^(N-1))}
20
21 # Ausgleichsrechnung
22 # Daten umformen
23 f <- Vektor_RelFluoreszenz
24 r <- Vektor_Anisotropie
25 dat <- data.frame(f, r)
26 # nicht-lineares Modell
27 fit <- nls(r ~ r_f_function(r_m, x, f, N), data = dat, start = c(N=2, x=0.5), trace=TRUE,
28           lower=c(1.0, 0.0), upper=c(10, 1), algorithm="port")
29 # Schätzer für N und x auslesen
30 co <- coef(fit)
31
32 # Kurve mit ermittelten Parametern zeichnen
33 test_x <- seq(0,1,0.01)
34 test_y <- r_f_function(r_m, co[2], test_x, co[1])
35 par(new=TRUE)
36 plot(test_x, test_y, ylim=my_y_limits, xlim=my_x_limits, pch=20, xlab="", ylab="", type="l", lwd=2,
37       xaxt="n", yaxt="n", lty=2, col="black")

```

## A.3. MD Simulationen

### A.3.1. Vorbereitung

**Listing A.2:** CHARMM Skript zur Erweiterung einer bestehenden  $\alpha$ -Helix um zusätzliche flankierende Reste. Die Koordinaten der (QSOX2) TMD werden aus einer PDB Datei geladen und die flankierenden Reste anhand der Primärstruktur ergänzt. Letztere werden als Fortsetzung der Helix mit für TMDn typischen  $\phi$  und  $\psi$  Winkeln (s. Ref.<sup>[208]</sup>) mit acetyliertem bzw. methyliertem Terminus erzeugt.

```

1  * Generiere Polypeptid aus Primärstruktur und lade Koordinaten für eine Teilsequenz
2  *
3
4  ! Arbeitsverzeichnis festlegen und Topologiedaten laden
5  SET CHM <...Pfad_zu_Dateien...>/charmm/
6  READ rtf card name @CHM/toppar/top_all22_prot_cmap.inp
7  READ para card name @CHM/toppar/gbsw/par_all22_prot_gbsw.inp
8
9  ! Atome erstellen
10 SET nres 31
11 READ sequence card
12 * Q6ZRP7 wt
13 *
14 @nres
15 Ser Ser Leu Asp Met Ser Leu Cys Val Val Leu Tyr Val Ala Ser Ser Leu Phe Leu Met Val Met Tyr Phe Phe
    Phe Arg Val Arg Ser Arg
16
17 ! Koordinaten für eine Teilsequenz aus bestehender PDB Datei laden
18 GENE hlx1 setup warn first ACE last CT3
19 OPEN read card unit 10 name <Pfad_zu>/hlx1.pdb
20 READ coor pdb unit 10 resid
21
22 ! Prüfen nicht initialisierter Atome
23 COOR print sele ( .not. INIT ) .and. ( .not. hydrogen ) END
24
25 ! Unbekannte interne (!) Koordinaten durch Standardwerte aus der Parameterdatei ergänzen
26 IC param
27
28 ! N-Terminus ausgehend vom ersten TMD Rest zur Helix formen
29 SET 1 1
30 SET 2 @1
31 SET 3 @1
32 INCR 2 by 1
33 INCR 3 by 2
34 LABEL loop
35 IC edit
36 ! PHI
37 DIHE @1 C @2 N @2 CA @2 C -64.
38 ! PSI
39 DIHE @2 N @2 CA @2 C @3 N -41.
40 END

```

```
41 INCR 1 by 1
42 INCR 2 by 1
43 INCR 3 by 1
44 IF 3 le 8 goto LOOP
45
46 ! C-Terminus ausgehend vom letzten TMD Rest zur Helix formen
47 SET 1 23
48 SET 2 @1
49 SET 3 @1
50 INCR 2 by 1
51 INCR 3 by 2
52 LABEL loop2
53 IC edit
54 ! PHI
55 DIHE @1 C @2 N @2 CA @2 C -64.
56 ! PSI
57 DIHE @2 N @2 CA @2 C @3 N -41.
58 END
59 INCR 1 by 1
60 INCR 2 by 1
61 INCR 3 by 1
62 IF 3 le @nres goto LOOP2
63
64 ! Kartesische Koordinaten aller nicht spezifizierten Atome durch interne Koordinaten generieren
65 IC build
66
67 PRNLEV 0
68 HBUILD
69 PRNLEV 5
70
71 ! Topologie und Koordinaten in Dateien schreiben
72 OPEN WRITE card unit 10 name hlx1.pdb
73 WRITE coor pdb unit 10 official
74
75 OPEN WRITE card unit 10 name hlx1.crd
76 WRITE coor unit 10 card
77
78 OPEN WRITE unit 10 card name hlx1.psf
79 WRITE psf unit 10 card
80
81 OPEN WRITE unit 10 card name hlx1.xplor_ext.psf
82 WRITE psf xplo unit 10 card
83
84 IOFORMAT noext
85 OPEN WRITE unit 10 card name hlx1.xplor.psf
86 WRITE psf xplo unit 10 card
87
88 STOP
```

**Listing A.3:** VMD Skript zum Kombinieren zweier Polypeptidstrukturen. Die durch Skript A.2 um zusätzliche Aminosäurereste erweiterten Strukturen werden in einer Struktur vereint.

```
1 mol delete all
2 set path <...Pfad_zu_Dateien...>
3 cd $path
4
5 # CHARMM-GUI Topologiedaten laden
6 package require psfgen
7 resetpsf
8 topology $path/toppar/par_all36_prot.prm
9 topology $path/toppar/par_all36_na.prm
10 topology $path/toppar/par_all36_carb.prm
11 topology $path/toppar/par_all36_lipid.prm
12 topology $path/toppar/par_all36_cgenff.prm
13 topology $path/toppar/toppar_water_ions.str
14 topology $path/toppar/toppar_all36_lipid_cholesterol.str
15 topology $path/toppar/toppar_all36_carb_glycolipid.str
16 topology $path/toppar/toppar_all36_lipid_bacterial.str
17 pdbalias residue HIS HSE
18 pdbalias atom ILE CD1 CD
19 pdbalias atom HOH O OH2
20 pdbalias residue HOH TIP3
21
22 # Segmente definieren
23 segment PROA {
24     auto none
25     first ACE
26     last CT3
27     pdb hlx1.pdb
28 }
29 segment PROB {
30     auto none
31     first ACE
32     last CT3
33     pdb hlx2.pdb
34 }
35 # <...ggf. weitere Strukturen...>
36
37 # Koordinaten laden und nicht initialisierte Koordinaten setzen
38 coordpdb hlx1.pdb PROA
39 coordpdb hlx2.pdb PROB
40 # <...ggf. weitere Strukturen...>
41
42 regenerate angles dihedrals
43 guesscoord
44
45 # Topologie und Koordinaten in Datei schreiben
46 writepsf dimer.psf
47 writpdb dimer.pdb
```

### A.3.2. Auswertung

**Listing A.4:** VMD Skript zur Bestimmung des Helix-Helix Abstandes. Für jede Helix wird das geometrisch Zentrum der  $C_{\alpha}$ -Atome von Tyr<sub>5</sub> bis Tyr<sub>16</sub> bestimmt und anschließend deren Abstand in allen geladenen Zeitschritten ermittelt.

```

1 # Trajektorie laden
2 cd "H:/<...Pfad_zu_Dateien...>"
3 mol new <...Dateiname...>.xplor.psf
4
5 set start 1
6 set end 20
7 for {set i $start} {$i <= $end} {incr i} {
8     set filename prod_[format "%d" $i].out.dcd
9     mol addfile $filename type dcd first 0 last -1 step 10 filebonds 1 autobonds 1 waitfor all
10 }
11
12 # Größe der periodischen Box angeben, falls nicht in Trajektorie gespeichert
13 # set A 70.9306
14 # set B 70.9306
15 # set C 86.6379
16
17 # Ausgabedatei erstellen
18 set outfile center-center_distance.csv
19 set outfile [open $outfile w]
20 # Kopfzeile schreiben
21 puts $outfile "frame distance"
22
23 # Anzahl Frames ermitteln
24 set nf [molinfo top get numframes]
25
26 # Für alle Frames...
27 for {set i 0} {$i < $nf} {incr i} {
28     #Hat sich (nur) eine der TM Helices über die Grenzen der periodischen Box bewegt?
29     set testset1 [atomselect top "segname PROA"]
30     set testset2 [atomselect top "segname PROB"]
31     $testset1 frame $i
32     $testset2 frame $i
33     set test1 [measure center $testset1 weight none]
34     set test2 [measure center $testset2 weight none]
35     set test3 [vecsub $test1 $test2]
36     set correction "0 0 0"
37
38     if {[veclength $test3] > [vecscale [veclength "$A $B $C"] 0.45]} {
39         # Korrektur für Y-Achse nötig?
40         if {[expr abs([lindex $test3 0])] > [expr $A / 2]} {
41             # Korrektur in Richtung + oder - X?
42             if {[lindex $test1 0] < 0} {
43                 set correction [vecadd $correction "$A 0 0"]
44                 echo "X + A in frame $i"

```

```
45     } else {
46         set correction [vecadd $correction "-$A 0 0"]
47         echo "X - A in frame $i"
48     }
49 }
50 # Korrektur für X-Achse nötig?
51 if {[expr abs([lindex $test3 1])] > [expr $B / 2]} {
52     # Korrektur in Richtung + oder - Y?
53     if {[lindex $test1 1] < 0} {
54         set correction [vecadd $correction "0 $B 0"]
55         echo "Y + B in frame $i"
56     } else {
57         set correction [vecadd $correction "0 -$B 0"]
58         echo "Y - B in frame $i"
59     }
60 }
61 # Korrektur für Z-Achse nötig?
62 if {[expr abs([lindex $test3 2])] > [expr $C / 2]} {
63     # Korrektur in Richtung + oder - Z?
64     if {[lindex $test1 2] < 0} {
65         set correction [vecadd $correction "0 0 $C"]
66         echo "Z + C in frame $i"
67     } else {
68         set correction [vecadd $correction "0 0 -$C"]
69         echo "Z - C in frame $i"
70     }
71 }
72 }
73
74 # C-alpha Atome von Tyr668 bis Tyr679 auswählen
75 set seltext1 "segname PROA and resid 12 to 23 and name CA"
76 set sel1 [atomselect top "$seltext1" frame $i]
77 set seltext2 "segname PROB and resid 12 to 23 and name CA"
78 set sel2 [atomselect top "$seltext2" frame $i]
79
80 # Distanz zwischen geometrischem Zentrum der C-alphas berechnen; dabei periodische Box
81   berücksichtigen
82 set distance [veclength [vecsub [measure center $sel2] [vecadd $correction [measure center
83   $sel1 ]]]]
84
85 # Ergebnis in Ausgabedatei schreiben: Frame Nr., Helix-Helix Distanz in Angstrom
86 puts $outfile "$i $distance"
87
88 # Variablen manuell löschen, sonst "out-of-memory" Fehler bei großen Trajektorien
89 unset distance
90 unset seltext2
91 $sel2 delete
92 unset seltext1
93 $sel1 delete
94 $testsel1 delete
```

```

93  $testsel2 delete
94  unset test1
95  unset test2
96  unset test3
97  flush $outfile
98  }
99
100 # Ausgabedatei schließen
101 close $outfile

```

**Listing A.5:** VMD Skript zur Berechnung der Aminosäurerest-Distanzen zweier Polypeptide zur Erstellung einer Kontaktkarte. Dabei wird die minimale Distanz zwischen allen Seitenketten-Atomen zweier TMDn berechnet.

```

1  # Trajektorie laden
2  cd "H:/ <... Pfad_zu_Dateien ... >"
3  mol new <...Dateiname...>.xplor.psf
4
5  set start 1
6  set end 20
7  for {set i $start} {$i <= $end} {incr i} {
8      set filename prod_[format "%d" $i].out.dcd
9      mol addfile $filename type dcd first 0 last -1 step 10 filebonds 1 autobonds 1 waitfor all
10 }
11
12 # Größe der periodischen Box angeben, falls nicht in Trajektorie gespeichert
13 # set A 70.9306
14 # set B 70.9306
15 # set C 86.6379
16
17 # Anzahl der Aminosäurereste bestimmen
18 set sel [atomselect top "segname PROA"]
19 set residList [lsort -integer [$sel get resid] ]
20 set residStart [lindex $residList 0]
21 set residEnd [lindex $residList end]
22
23 # Ausgabedatei definieren
24 set outFilename contact_map_sidechain.csv
25 set outfile [open $outFilename w]
26 # Tabellenkopf schreiben
27 puts $outfile "frame PROA PROB distance"
28
29 # Anzahl an Frames abfragen
30 set nf [molinfo top get numframes]
31
32 # Über alle Frames iterieren
33 for {set i 0} {$i < $nf} {incr i} {

```



```

34 # Prüfen, ob sich eine Helix über die Grenzen der periodischen Box bewegt hat und Werte
    entsprechend korrigieren ...
35 set testsel1 [atomselect top "segname PROA"]
36 set testsel2 [atomselect top "segname PROB"]
37 $testsel1 frame $i
38 $testsel2 frame $i
39 set test1 [measure center $testsel1 weight none]
40 set test2 [measure center $testsel2 weight none]
41 set test3 [vecsub $test1 $test2]
42 set correction "0 0 0"
43
44 if {[veclength $test3] > [vecscale [veclength "$A $B $C"] 0.45]} {
45     # Korrektur für X-Achse nötig?
46     if {[expr abs([lindex $test3 0])] > [expr $A / 2]} {
47         # Korrektur in Richtung + oder - X?
48         if {[lindex $test1 0] < 0} {
49             set correction [vecadd $correction "$A 0 0"]
50             echo "X + A in frame $i"
51         } else {
52             set correction [vecadd $correction "-$A 0 0"]
53             echo "X - A in frame $i"
54         }
55     }
56     # Korrektur für Y-Achse nötig?
57     if {[expr abs([lindex $test3 1])] > [expr $B / 2]} {
58         # Korrektur in Richtung + oder - Y?
59         if {[lindex $test1 1] < 0} {
60             set correction [vecadd $correction "0 $B 0"]
61             echo "Y + B in frame $i"
62         } else {
63             set correction [vecadd $correction "0 -$B 0"]
64             echo "Y - B in frame $i"
65         }
66     }
67     # Korrektur für Z-Achse nötig?
68     if {[expr abs([lindex $test3 2])] > [expr $C / 2]} {
69         # Korrektur in Richtung + oder - Z?
70         if {[lindex $test1 2] < 0} {
71             set correction [vecadd $correction "0 0 $C"]
72             echo "Z + C in frame $i"
73         } else {
74             set correction [vecadd $correction "0 0 -$C"]
75             echo "Z - C in frame $i"
76         }
77     }
78 }
79
80 # Für alle Reste der Helix A
81 for {set j $residStart} {$j <= $residEnd} {incr j} {
82     set seltext1 "segname PROA and resid $j and sidechain"

```

```
83   set sel1 [atomselect top "$seltext1" frame $i]
84
85   # Für alle Reste der Helix B
86   for {set k $residStart} {$k <= $residEnd} {incr k} {
87     set distance 10000
88
89     set seltext2 "segname PROB and resid $k and sidechain"
90     set sel2 [atomselect top "$seltext2" frame $i]
91
92     # Für alle Atome des Restes in Helix A
93     foreach coord1 [$sel1 get {x y z}] {
94       # Für alle Atome des Restes in Helix B
95       foreach coord2 [$sel2 get {x y z}] {
96         # Welche Atome der zwei Aminosäuren liegen am nächsten?
97         if {[veclength [vecsub $coord2 [vecadd $correction $coord1]]] < $distance} {
98           set distance [veclength [vecsub $coord2 [vecadd $correction $coord1]]]
99         }
100      }
101    }
102    # Ergebnis in Datei schreiben: Frame Nr., Nr. Aminosäure in Helix A, Nr. Aminosäure in
      Helix B, Distanz in Angstrom
103    puts $outfile "$i $j $k $distance"
104
105    # Variablen manuell löschen, sonst "out-of-memory" Fehler bei großen Trajektorien
106    unset distance
107    unset seltext2
108    $sel2 delete
109  }
110  unset seltext1
111  $sel1 delete
112 }
113 $testsel1 delete
114 $testsel2 delete
115 unset test1
116 unset test2
117 unset test3
118 flush $outfile
119 }
120 # Ausgabedatei schließen
121 close $outfile
```

**Listing A.6:** VMD Skript zur Berechnung des Kreuzungswinkels und der Neigung eines TM Helix Dimers. Das Skript nutzt das „orient“ Paket (Paul Grayson, [http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/script\\_library/scripts/orient/](http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/script_library/scripts/orient/)), welches seinerseits das „linear algebra“ Paket (Hume Integration Software, <http://www.hume.com/la/>) verwendet. Damit lassen sich die Hauptachsen der Helices bestimmen, aus denen sich Kreuzungswinkel und Neigung der Helices bestimmen lassen.

```

1 # Notwendige Dateien öffnen und Funktionen einbinden
2 lappend auto_path "C:/<...Pfad_zu_Plugins...>/VMD scripts/la1.0"
3 lappend auto_path "C:/<...Pfad_zu_Plugins...>/VMD scripts/orient"
4 package require Orient
5 namespace import Orient::orient
6
7 # Trajektorie öffnen
8 cd "H:/<...Pfad_zu_Dateien...>"
9 mol new <...Dateiname...>.xplor.psf
10
11 set start 1
12 set end 20
13 for {set i $start} {$i <= $end} {incr i} {
14     set filename prod_[format "%d" $i].out.dcd
15     mol addfile $filename type dcd first 0 last -1 step 10 filebonds 1 autobonds 1 waitfor all
16 }
17
18 # Ausgabedatei definieren
19 set outFilename <omega_and_tilt.csv>
20 set out [open $outFilename w]
21 # Tabellenkopf schreiben
22 puts $out [format "omega\ttilt"]
23
24 # VMD OpenGL Fenster Update ausschalten, um Berechnung zu beschleunigen
25 display update off
26
27 # Über alle Frames iterieren
28 for {set i 0} {$i < [molinfo top get numframes] + 1} {incr i} {
29
30     # Auswahl auf aktuellen Frame erneuern und Atome von Tyr668 bis Tyr679 auswählen
31     animate goto $i
32     set tmd1 [atomselect top "segname PROA and name CA and resid 12 to 23"]
33     set tmd2 [atomselect top "segname PROB and name CA and resid 12 to 23"]
34
35     # Helix Achsen bestimmen
36     set I [draw principalaxes $tmd1]
37     set J [draw principalaxes $tmd2]
38
39     # Kreuzungswinkel berechnen
40     set omega [expr acos([vecdot [lindex $I 2] [lindex $J 2]]) * 180/3.14159265]
41
42     # Neigungswinkel relativ zum Membrannormal berechnen
43     set axis [vecadd [lindex $I 2] [lindex $J 2]]
44     set axis [vecnorm $axis]

```

```

45  set tilt [expr acos([vecdot $axis {0 0 1}]) * 180/3.14159265]
46
47  # Ergebnis in Datei schreiben: Kreuzungswinkel, Neigung
48  puts $out [format "%f \t %f" $omega $tilt]
49
50  # Variablen manuell löschen, sonst "out-of-memory" Fehler bei großen Trajektorien
51  $tmd1 delete
52  $tmd2 delete
53  unset I
54  unset J
55  unset omega
56  unset axis
57  unset tilt
58  }
59
60 # VMD OpenGL Fenster wieder aktivieren
61 display update on
62 # Ausgabedatei schließen
63 close $out

```

**Listing A.7:** VMD Skript zur Berechnung der TM Helix-Helix Kontaktfläche. Die „solvent-accessible surface area“ (SASA) wird zunächst für zwei TMDn separat berechnet. Intermolekulare Kontakte werden dabei nicht berücksichtigt. Anschließend wird die SASA für beide Helices zusammen berechnet. Bei intermolekularem Kontakt werden Teile der Oberfläche verdeckt und diese ist dadurch kleiner, als die Summe der separat bestimmten Oberflächen. Die Differenz stellt die Kontaktfläche dar.

```

1  # Trajektorie laden
2  cd "H:/<Arbeitsverzeichnis >"
3  mol new <Dateiname>.xplor.psf
4
5  set start 1
6  set end 20
7  for {set i $start} {$i <= $end} {incr i} {
8      set filename step7.[format "%d" $i]_production.dcd
9      mol addfile $filename type dcd first 0 last -1 step 20 filebonds 1 autobonds 1 waitfor all
10 }
11
12 # Größe der periodischen Box angeben, falls nicht in Trajektorie gespeichert
13 # set A 70.9306
14 # set B 70.9306
15 # set C 86.6379
16
17 # Anzahl Frames ermitteln
18 set start 0
19 set end [expr [molinfo top get numframes] - 1]
20

```

```
21 # Ausgabedatei erstellen
22 set outFilename interface_area.csv
23 set outfile [open $outFilename w]
24 # Kopfzeile schreiben
25 puts $outfile "frame interface PROA PROB both"
26
27 # Radius der Kugel, mit dem die Oberfläche der Moleküle abgetastet wird
28 set radius 1.4
29
30 # Atome auswählen
31 set all1 [atomselect 0 "segname PROA"]
32 set all2 [atomselect 0 "segname PROB"]
33 set all12 [atomselect 0 "segname PROA PROB"]
34 # später nur folgenden Abschnitt betrachten
35 set sel1 [atomselect 0 "segname PROA and resid 10 to 25"]
36 set sel2 [atomselect 0 "segname PROB and resid 10 to 25"]
37 set sel12 [atomselect 0 "segname PROA PROB and resid 10 to 25"]
38
39 # VMD OpenGL Fenster Update ausschalten, um Berechnung zu beschleunigen
40 display update off
41
42 # Über alle Frames iterieren
43 for {set i $start} {$i <= $end} {incr i} {
44     molinfo top set frame $i
45
46     # Oberflächen jeder TMD allein
47     set pep1 [measure sasa $radius $all1 -restrict $sel1]
48     set pep2 [measure sasa $radius $all2 -restrict $sel2]
49     # Oberfläche, beider TMDn zusammen
50     set pep12 [measure sasa $radius $all12 -restrict $sel12]
51
52     # Oberfläche, die durch den Kontakt der Helices verdeckt ist
53     set result [expr $pep1 + $pep2 - $pep12]
54
55     # Ergebnis in Datei schreiben: Frame, Kontaktfläche, Oberfläche TMD 1, Oberfläche TMD 2,
56     # Oberfläche TMD 1+2
57     puts $outfile "$i $result $pep1 $pep2 $pep12"
58
59     # Variablen manuell löschen, sonst "out-of memory" Fehler bei großen Trajektorien
60     unset pep1
61     unset pep2
62     unset pep12
63     unset result
64 }
65 # VMD OpenGL Fenster wieder aktivieren
66 display update on
67
68 # Ausgabedatei schließen
69 close $outfile
```

**Listing A.8:** VMD-Skript zur Detektion der räumlichen Nähe von Tyrosin-OH Gruppen im QSOX2 TMD Dimer und ausgewählten Atomen (Carbonyl-Sauerstoffatomen der Acylreste, Phosphatreste der Lipidkopfgruppen oder Hydroxylreste von Cholesterol) in einer Trajektorie.

```

1 # Ausgabedatei erstellen
2 set outFilename Interaktionen.csv
3 set out [open $outFilename w]
4
5 # Kopfzeile schreiben
6 puts $out [format "Frame \t Tyr1_CO \t Tyr1_PO4 \t Tyr1_Chls \t Tyr2_CO \t Tyr2_PO4 \t Tyr2_Chls \t
   Tyr3_CO \t Tyr3_PO4 \t Tyr3_Chls \t Tyr4_CO \t Tyr4_PO4 \t Tyr4_Chls"]
7
8 # Distanzschwellenwert
9 set min_dist 3.5
10
11 # Atome auswählen
12 set Tyr1 [atomselect top "segname PROA and resid 12 and name OH"]
13 set Tyr2 [atomselect top "segname PROB and resid 12 and name OH"]
14 set Tyr3 [atomselect top "segname PROA and resid 23 and name OH"]
15 set Tyr4 [atomselect top "segname PROB and resid 23 and name OH"]
16 set Carbonyls [atomselect top "segname MEMB and type OBL"]
17 set Phosphates [atomselect top "segname MEMB and type O2L"]
18 set Chls [atomselect top "segname MEMB and type OHL"]
19
20 # VMD OpenGL Fenster Update ausschalten , um Berechnung zu beschleunigen
21 display update off
22
23 # Über alle Frames iterieren
24 for {set i 0} {$i < [molinfo top get numframes] + 1} {incr i} {
25     # jede Auswahl auf neuen Frame updaten
26     $Tyr1 frame $i
27     $Tyr2 frame $i
28     $Tyr3 frame $i
29     $Tyr4 frame $i
30     $Carbonyls frame $i
31     $Phosphates frame $i
32     $Chls frame $i
33
34     # Wieviel der ausgewählten Atome sind in Reichweite?
35     set test1 [llength [lindex [measure contacts $min_dist $Tyr1 $Carbonyls] 0]]
36     set test2 [llength [lindex [measure contacts $min_dist $Tyr1 $Phosphates] 0]]
37     set test3 [llength [lindex [measure contacts $min_dist $Tyr1 $Chls] 0]]
38
39     set test4 [llength [lindex [measure contacts $min_dist $Tyr2 $Carbonyls] 0]]
40     set test5 [llength [lindex [measure contacts $min_dist $Tyr2 $Phosphates] 0]]
41     set test6 [llength [lindex [measure contacts $min_dist $Tyr2 $Chls] 0]]
42
43     set test7 [llength [lindex [measure contacts $min_dist $Tyr3 $Carbonyls] 0]]
44     set test8 [llength [lindex [measure contacts $min_dist $Tyr3 $Phosphates] 0]]
45     set test9 [llength [lindex [measure contacts $min_dist $Tyr3 $Chls] 0]]

```

```
46
47  set test10 [llength [lindex [measure contacts $min_dist $Tyr4 $Carbonyls] 0]]
48  set test11 [llength [lindex [measure contacts $min_dist $Tyr4 $Phosphates] 0]]
49  set test12 [llength [lindex [measure contacts $min_dist $Tyr4 $Chls] 0]]
50
51  # Ergebnisse in Ausgabedatei schreiben
52  puts $out [format "%i \t %i \t %i \t %i \t %i \t %i \t %i \t %i \t %i \t %i \t %i \t %i"
53    $i $test1 $test2 $test3 $test4 $test5 $test6 $test7 $test8 $test9 $test10 $test11 $test12]
54
55  # VMD OpenGL Fenster wieder aktivieren
56  display update on
57
58  # Ausgabedatei schließen
59  close $out
```

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, den Menschen zu danken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit begleitet haben.

Großer Dank gebührt **Prof. Dr. Dieter Langosch**, der mir die Gelegenheit zur Anfertigung dieser Arbeit gegeben hat. Er hat mir ermöglicht, meinen Horizont und meine Fähigkeit im Rahmen verschiedener Projekte zu erweitern.

Ich danke **Prof. Dr. Rudi Vogel** und **Prof. Dr. Michael Groll**, dass sie sich zur Prüfung meiner Dissertation bereit erklärt haben. Dank auch an **Prof. Dr. Dmitrij Frishman** für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bei Fragen zu MD Simulationen und Biophysik war mir **Dr. Christina Scharnagl** von der Physik-Lehre am Wissenschaftszentrum Weihenstephan stets eine große Hilfe. Danke, für so manchen Rat-schlag und viele Augen-öffnende Diskussionen.

Während der Zeit am Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere hatte ich großartige Kollegen, mit denen zu arbeiten es ein Freude war und die meine Freunde geworden sind. Allen voran gilt dies für **Dr. Jan Kirrbach** und **Dr. Oxana Pester**, die nicht nur mit wissenschaftlichen Diskussionen und helfender Hand im Labor zur Stelle waren, sondern auch so manchen Spaß mitgemacht haben.

Dafür, dass er mich an seinem schier unermesslichen Reichtum an Ideen und vor allem Erfahrung hat Teil haben lassen, möchte ich mich bei **Dr. Markus Gütlich** bedanken.

Eine große Hilfe bei verschiedenen Projekten war **Doreen Tetzlaff**. Ohne ihre Hilfe bei zahlreichen Klonierungen und Mutagenesen wäre ich in manchem Projekt nicht so schnell vorangekommen.

Dank auch an **Barbara Rauscher**, die mir immer ein fröhlicher Nachbar im gemeinsamen Labor gewesen ist und hilfreich zur Seite stand.

Für anregende Diskussionen und so manche aus dem Inkubator genommene Kultur (was mir zahlreiche lange Autofahrten erspart hat) möchte ich mich sehr herzlich bei **Christoph Kutzner** und **Christoph Schanzenbach** bedanken.

Dass ich immer gern ins Labor gefahren bin, ist auch der Verdienst von **Sevnur Serim**, **Ute Haedke**, **Oliver Vosyka**, **Walter Stelzer**, **Eliane Küttler**, **Martin Seybold**, **Felix Sigmund**, **Ellen Schneider** und **Elke Holzer**. Danke für eine tolle Zeit und eure Hilfe.

Bis hierhin habe ich es auch durch die Unterstützung meiner Familie geschafft. Insbesondere möchte ich mich bei meiner Mutter **Silvia Lamping** bedanken. Um meine Dankbarkeit für ihre Liebe und Unterstützung auszudrücken, reichen Worte nicht aus.

In der wissenschaftlichen Arbeit muss man so manchen Rückschlag einstecken. Meine Frau **Dr. Janina Ried** hat mir über manchen Tiefpunkt geholfen. Danke für deine Ideen, Unterstützung und Liebe. Zusammen können wir alles schaffen.



## Publikationen

- J. Kirrbach, M. Krugliak, **C. L. Ried**, P. Pagel, I. T. Arkin & D. Langosch (2013): Self-interaction of transmembrane helices representing pre-clusters from the human single-span membrane proteins. *Bioinformatics*, **29**, 1623–1630.

Teile dieser Arbeit wurden bereits im folgenden Artikel publiziert:

- **C. L. Ried**, S. Kube, J. Kirrbach & D. Langosch (2012): Homotypic interaction and amino acid distribution of unilaterally conserved transmembrane helices. *J Mol Biol*, **420**, 251–257.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Christian Lothar Ried (geb. Schmidt)  
Geburtsdatum: 25.08.1983  
Geburtsort: Zwickau

### Schulische Ausbildung

07.1989–07.1994 Kardinal-von-Galen-Schule Dinklage (Niedersachsen)  
08.1994–06.1996 Orientierungsstufe Dinklage  
07.1996–06.2003 Gymnasium Lohne (Niedersachsen, Oldenburg)

### Akademische Ausbildung

10.2004–07.2006 Biologie-Grundstudium an der Universität Bremen  
07.2006 Vordiplom Biologie  
10.2006–07.2009 Biologie-Hauptstudium an der Universität Bremen mit Schwerpunkt Zellbiologie, sowie den Nebenfächern Mikrobiologie und Biochemie  
07.2009 Diplomarbeit ("Untersuchungen zur Toxizität von Lamin A in Embryonen von *Xenopus laevis*") am Institut für Zellbiologie der Universität Bremen  
09.2009–05.2014 Promotion am Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere der Technischen Universität München