

Technische Universität München
Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere

Identifikation heterotypischer TMD-TMD Interaktionen

Diplom Biologe Eric Lindner

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dieter Langosch
2. Univ.-Prof. Dr. Siegfried Scherer

Die Dissertation wurde am 06.03.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 05.04.2007 angenommen.

Meinen lieben Eltern

„Wissenschaft macht den Eindruck, als sei sie eine großartige Kathedrale, eine enorme Struktur, gebaut von fortwährenden Anstrengungen vieler Generationen durch viele Jahrhunderte. Aber es ist eben keine Kathedrale, weil sie nicht geplant worden ist! ... Wissenschaft ist primär willkürliches Spielen und Davon-Besessen-Sein.“

Max Delbrück (1970)

Ich danke

Allen voran Prof. Dr. Dieter Langosch für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und seine schier unendlichen Geduld.

Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Chemie der Biopolymere für die gute Arbeitsatmosphäre.

Meinen Freunden und Kollegen Dr. Holger Stalz, Dr. Mathias Hofmann und Bernhard Poschner für das abendliche Revue passieren lassen des Tages.

Besonders meinen Eltern, meiner Schwester Anke und meiner Freundin Sylvia, die nie aufgegeben haben, mich zu unterstützen und zu motivieren.

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Lipidmembranen.....	3
1.2 Aufbau von Lipidmembranen.....	3
1.3 Aufbau von Membranproteinen.....	4
1.4 Membranintegration von Proteinen.....	5
1.5 Aufbau von Transmembrandomänen (TMDn).....	7
1.6 Faltung von Transmembranhelices.....	7
1.7 Interaktionsmotive bitopischer Membranproteine.....	8
1.8 Biochemische und biophysikalische Techniken zur Detektion von TMD-TMD Interaktionen.....	9
1.9 Genetische Techniken zur Detektion von TMD-TMD Interaktionen.....	10
1.9.1 Das <i>ToxR</i> Protein.....	10
1.9.2 Das <i>ToxR</i> -System.....	11
1.9.3 Das <i>POSSYCCAT</i> -System.....	12
1.9.4 Andere auf <i>ToxR</i> basierende Systeme.....	13
2 ZIEL DER ARBEIT	15
3 MATERIAL	16
3.1 Chemikalien.....	16
3.1.1 Allgemeine Chemikalien.....	16
3.1.2 Detergenzien.....	16
3.2 DNA und RNA modifizierende Enzyme.....	16
3.3 Antikörper.....	16
3.4 Kits.....	17
3.5 Synthetische Oligonukleotide.....	17
3.5.1 Oligonukleotide für die PCR.....	17
3.5.2 Oligonukleotide für die Kassettenklonierung.....	20
3.5.3 Oligonukleotide für die DNA Sequenzierung.....	20
3.6 Vektoren.....	21
3.7 Bakterienstämme.....	21
3.8 Nährmedien.....	22
3.9 Lösungen und Puffer.....	22

3.9.1 Lösungen und Puffer für DNA-Arbeiten	22
3.9.2 Lösungen und Puffer für Protein-Arbeiten	23
3.10 Sonstige Materialien und Geräte.....	24
3.11 Präparative und analytische DNA Techniken.....	25
3.11.1 Minipräparation von Plasmid-DNA (alkalische Lyse)	25
3.11.2 Phenolextraktion und DNA-Fällung mit Ethanol	25
3.11.3 Konzentrationsbestimmung der DNA	26
3.11.4 Agarosegelelektrophorese	26
3.11.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	26
3.11.6 Kassettenklonierung.....	27
3.11.7 Ligation von DNA-Fragmenten	27
3.11.8 Sequenzierung von DNA	27
3.11.9 MOE (mutagenesis by overlap extension) Polymerase-kettenreaktion	28
3.11.10 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	29
3.11.11 Chromosomale Integration von DNA	31
3.12. Gelretardationsanalysen mit unmarkierter DNA	32
3.13 Präparative und analytische Proteinchemie	32
3.13.1 Expression von Fusionsproteinen im pToxRV-Vektor	32
3.13.2 Reinigung der ToxR-Fusionsproteine durch Affinitäts-chromatographie an immobilisierten Metallionen	32
3.13.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese.....	33
3.13.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	34
3.13.5 Nachweis mit Hilfe des Westernblots.....	34
3.14 Analyse der Transmembraninteraktionen.....	35
3.15 Kontrollexperimente für die Membranintegration und Expression.....	36
3.15.1 Integration der ToxR-Fusionsproteine in der inneren <i>E.coli</i> Membran.....	36
3.15.2 Kontrolle der Expression über Western-Blot.....	37
4 ERGEBNISSE.....	38
4.1 TMD Modelle	38
4.1.1 Ein membranständiges Leucinzippermotiv als Modellsystem	38
4.1.2 Messung der relativen TMD-TMD Affinität	39
4.1.3 Verwendete Modell-Transmembrandomänen.....	39
4.2 ToxR/TMD-vermittelte Regulation des ctx-Promotors	40

4.3 ToxR/TMD- vermittelte Regulation des ompT-Promotors	42
4.3.1 Plasmidständiges Reporter-genkonstrukt (<i>ompT::lacZα</i>).....	42
4.3.2 CRP-Abhängigkeit des <i>ompT</i> -Promotors	44
4.3.3 Ein Chromosomal integriertes Reporter-genkonstrukt <i>ompT::lacZ (EL81)</i> ...	45
4.4 ToxR/TMD- vermittelte Regulation des ompU-Promotors.....	46
4.5 Einsatz des ompU und ompT Promotors für die Selektion von TMDn.....	50
4.5.1 Positivselektion mit <i>EL61 (ompU::cat)</i>	50
4.5.2 Negativselektion mit <i>EL47 (ompT::tet^R)</i>	51
4.5.3 Kombinierte Positiv- und Negativselektion mit <i>EL141</i>	52
4.6 Kombinierte chromosomal und plasmidständige Reporter-genkonstrukte.....	54
4.6.1 Charakterisierung der <i>EL61+pOMPII</i> - Zellen	54
4.6.2 Selektion von interagierenden <i>E.coli TMDn</i>	56
4.7 Verlängerung der Transmembrandomäne.....	62
4.8 Zusammenfassung der ToxR-Systeme	66
4.9 Detektion heterotypischer TMD-TMD Interaktionen mit dem dominant- negativem ToxR* Kompetitorsystem	68
4.9.1 Identifikation einer inaktiven <i>ToxR</i> -Mutante.....	69
4.9.2 Charakterisierung der inaktiven <i>ToxR</i> -Mutante <i>S87G (ToxR*)</i>	70
4.9.3 Charakterisierung des dominant-negativen <i>ToxR*</i> -Systems	73
4.10 Analyse der ToxR/DNA Interaktion.....	75
4.10.1 Reinigung von <i>ToxR/AZ2</i> und <i>ToxR/ΔTMD</i> über <i>Ni-Sepharose</i>	75
4.10.2 Analyse der <i>ToxR</i> -DNA-Wechselwirkung durch Analyse der Gelretardation	77
5 DISKUSSION UND AUSBLICK	79
5.1 Der ompU und ompT Promotor.....	79
5.2 Das ToxR*-System	80
5.3 Detektion von interagierenden TMDn aus <i>E.coli</i>	82
6 ANHANG.....	84
6.1 Übersicht über die Vektorklonierungen.....	84
6.1.1 Klonierung des Plasmides <i>pToxRV</i>	84
6.1.2 Klonierung des <i>ompT</i> -Promotors (<i>pOMPI-ompT::Reporter-gen</i>).....	84
6.1.3 Klonierung des <i>ompU</i> -Promotors (<i>pOMPI-ompU::Reporter-gen</i>)	85

<i>6.1.4 Klonierung von pOMPII (pOMPII-ompT::tet^R/ompU::lacZα bzw. pOMPII-ompT::tet^R/ompT::lacZα)</i>	86
<i>6.1.5 Klonierung von pLDR10 Konstrukten</i>	86
<i>6.1.6 Klonierung der Plasmide pToxVI und pToxVII</i>	87
7 LITERATUR	89
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	97
VERÖFFENTLICHUNGEN	99
LEBENS LAUF	100

Zusammenfassung

Als Transmembrandomänen (TMDn) bezeichnet man Proteinstrukturen, welche die Lipiddoppelschicht durchspannen. Um z.B. spezifisch auf Umwelteinflüsse reagieren zu können, ist in der Natur häufig das Prinzip der Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von Rezeptoren über die TMDn verwirklicht. Diese können homotypischen (Selbstinteraktion einer TMD) oder heterotypischen (Interaktion zwei verschiedener TMDn) Charakters sein.

Auf dem ToxR Protein basierende Systeme werden häufig verwendet, um homotypische Interaktionen von TMDn zu untersuchen, welche aus natürlichen Proteinen oder aus kombinatorisch hergestellten Bibliotheken isoliert wurden. Das Prinzip dieser Methode ist, dass die Selbstinteraktion von jeglichen TMDn, welche als ToxR Fusionsprotein vorliegen, zu einer Oligomerisierung des ToxR Proteins in der inneren Bakterienmembran führt. In bereits bestehenden Varianten dieses Systems führt eine ToxR-ToxR Interaktion zu einer Transkriptionsaktivierung des *ctx* Promotors und induziert somit die Expression von stromabwärts gelegenen Reportergenen (z.B. β -Galaktosidase oder Chloramphenikol-Acetyl-transferase) in dafür hergestellten Bakterienstämmen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einsatz von anderen, bereits bekannten ToxR regulierten Promotoren für diese Zwecke untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine ToxR-ToxR Interaktion, welche durch oligomerisierende TMDn hervorgerufen wird, auch den *ompU* Promotor aktiviert. Im Gegensatz dazu führt eine solche Interaktion zu einer Repression des konstitutiv aktiven *ompT* Promotors. Bei Verwendung dieser unterschiedlichen Promotoren induziert oder reprimiert eine TMD-TMD Interaktion daher die Expression von Reporterenzymen in entsprechend konstruierten Bakterienzellen. Diese Stämme stellen somit eine Erweiterung des ToxR Systems dar und könnten zukünftig für die vereinfachte Detektierung von Aminosäuren, die an der Interaktion der TMD beteiligt sind (*interface*) oder zur Selektion von nicht, schwach, mittelstark bzw. stark interagierenden TMDn aus kombinatorischen Bibliotheken verwendet werden.

Um auch heterotypische Interaktionen ($TMD_{(A)}-TMD_{(B)}$) untersuchen zu können, wurde eine weitere, auf dem ToxR Protein basierende, genetische Technik entwickelt. Die neue Komponente besteht aus einer modifizierten ToxR-Domäne (ToxR*), bei der die DNA-Bindung und/oder die Rekrutierung der RNA-Polymerase zerstört ist und daher

zum Verlust der Aktivität führt. In diesem System wird eine homotypisch interagierende $TMD_{(A)}$ als ToxR Fusionsprotein mit einer potentiellen Kompetitor $TMD_{(B)}$ als ToxR* Fusionsprotein koexprimiert. Eine heterologe Interaktion ($TMD_{(A)}$ - $TMD_{(B)}$) führt zu einem dominant negativen Effekt, da der ausgebildete Komplex $ToxR-TMD_{(A)}/ToxR*-TMD_{(B)}$ bezüglich der Transkription inaktiver als $ToxR-TMD_{(A)}/ToxR-TMD_{(A)}$ ist. Dadurch wird zukünftig eine Charakterisierung von Transmembrandomänen, deren homotypische und heterotypische Interaktionen miteinander konkurrieren, ermöglicht. Durch den kombinierten Einsatz der beschriebenen Promotoren und des Kompetitorsystems (ToxR*) sollte ebenfalls eine Selektion von homotypisch und heterotypisch interagierenden TMDn aus komplexen kombinatorischen Bibliotheken realisierbar sein.

1 Einleitung

1.1 Lipidmembranen

Ein jegliches Lebewesen muss auf äußere Umwelteinflüsse reagieren, um in dieser Welt existieren zu können. Die Wahrnehmung von Veränderungen stellt somit das erste Glied einer zum Teil sehr langen Informations- und Reaktionskette dar.

Alle Organismen bestehen aus Zellen. Beginnend bei Bakterien, die aus einer Zelle geformt sind, bis zu höheren Organismen, die aus einem großen Komplex von vielen Zellen mit unterschiedlichen Funktionen aufgebaut sind. Sie alle werden von Membranen, die aus Lipiden und Proteinen geformt wird, begrenzt. Eukaryonten beinhalten zusätzlich noch intrazelluläre Membranen, die die Zellkompartimente separieren. Diese Kompartimente, z.B. Zellkern, Chloroplasten und Mitochondrien, übernehmen spezielle Funktionen innerhalb der Zelle. Somit stellt die Membran das „Kommunikationszentrum“ eines Lebewesens dar, da alle Signale, ob von außen nach innen oder umgekehrt, diese passieren müssen. Aber auch wichtige Energieumwandlungsprozesse wie die Photosynthese und die ATP-Gewinnung laufen an Membranen ab. Diese überlebenswichtigen Funktionen werden vorwiegend von Proteinen übernommen, die in die Lipiddoppelschicht integriert sind.

1.2 Aufbau von Lipidmembranen

Membranen bestehen aus bis zu einhundert verschiedenen Lipidtypen. Lipide sind zwitterionische Moleküle, die einen langkettigen, hydrophoben, aus Kohlenwasserstoffketten bestehenden Schwanz und einen polaren Kopf besitzen. Der Kopf ist wegen der ihm eigenen Polarität sehr gut hydratisierbar. Dagegen ist der hydrophobe Schwanz bestrebt möglichst wenig dem Wasser zugewandt zu sein. Unpolare Moleküle haben in Wasser das Bestreben sich zusammenzufinden, weil die Entropie des Wassers durch die Freisetzung von Wassermolekülen zunimmt. Diese Eigenschaft wird hydrophober Effekt genannt und steuert viele biochemische Prozesse. Kommen Lipide mit Wasser in Berührung, lagern sie sich spontan zu spezifischen Strukturen zusammen. Sie bilden eine Lipiddoppelschicht aus, deren Äußeres mittels der polaren Köpfe dem

Wasser zugewandt ist und deren Inneres durch die hydrophoben Schwänze gebildet wird. Die hydrophobe Region der Lipiddoppelschicht ist ca. 30 Å und die zwei polaren je ca. 15 Å dick [1].

1.3 Aufbau von Membranproteinen

Membranproteine sind für die Funktion einer Membran unerlässlich. Ihre Bedeutung wird dadurch erkennbar, dass in jedem Organismus 25-30 % aller Gene für Membranproteine kodieren [2, 3]. Periphere Membranproteine sind über elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrücken mit den Kopfgruppen der Lipide an die Membran gebunden. Viele periphere Membranproteine sind an die Oberfläche integraler Membranproteine gekoppelt oder über eine kovalent gebundene hydrophobe Seitenkette (z.B. Fettsäure) in der Lipiddoppelschicht verankert. Integrale Membranproteine durchspannen die Membran mit einer oder mehreren Transmembrandomänen (TMDn), welche vorwiegend aus hydrophoben Aminosäuren bestehen, da das Innere der Membran apolar ist. Eine TMD kann als α -Helix oder als β -Faltblatt die Membran durchspannen (Abb. 1). β -Fässer haben einen amphipathischen Charakter mit einer hydrophoben Außenseite, die mit der Membran in Kontakt steht, und einer hydrophilen Innenseite, welche einen Kanal durch die Membran bilden kann. In Bakterien kommen derartig gefaltete Proteine ausschließlich in der äußeren Membran vor [4]. Proteine, deren TMD aus α -Helices besteht, sind in der inneren Membran lokalisiert. Sie können die Lipiddoppelschicht mit einer α -Helix oder aber mit einem Bündel von α -Helices durchspannen (z.B. Bakteriorhodopsin; Abb. 1).

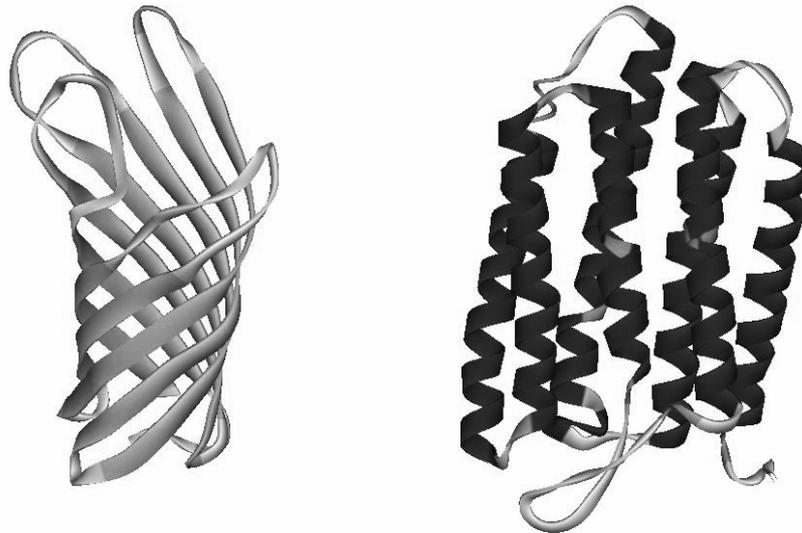


Abb. 1: Struktur von zwei Membranproteinen. Links: OmpA (OUTER MEMBRANE PROTEIN A) aus *Escherichia coli* (β -Fass; PDB Code 1BXW) [5]. **Rechts:** Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarium* (α -Helix; PDB Code 1AT9) [6]. Die Abbildung wurde mit DS ViewerPro 5.0 generiert.

1.4 Membranintegration von Proteinen

Die meisten Proteine benutzen eine Vielzahl von anderen Proteinen, um durch die Membran „geschleust“ (Translokation) zu werden, oder in selbige integriert zu werden. In Bakterien existieren viele unterschiedliche Mechanismen, die dieses Ziel verwirklichen [7, 8]. Im Fall der gramnegativen Bakterien ist es möglich, die grundlegenden Transportmechanismen auf drei Hauptwege (jeder mit einer Vielzahl von Untergruppen) zu reduzieren. Klasse 1: Transportweg, der Polypeptide durch bzw. in die Cytoplasmamembran translokalisiert, ungeachtet der Nutzung unterschiedlicher Translokons und ungefalteter (Sec YEG/YidC) bzw. gefalteter Proteine TAT ABC). Klasse 2: Proteine, die für den Transport durch die äußere Membran ausgehend vom Periplasma notwendig sind. Klasse 3: Proteine, die für den Transport von ungefalteten Proteinen vom Cytoplasma direkt nach außen notwendig sind [8].

Große und vollständig gefaltete Proteine werden durch den Tat-Signalweg (*twin arginine targeting*) translokalisiert [9-12]. Andere Proteine benutzen die SecYEG Maschinerie mit Hilfe des „Motor“-Proteins SecA und des Chaperons SecB. Zur Integration von Proteinen in die Membran interagiert eine N-terminale Signalsequenz (oder die erste TMD) des Proteins mit der Translokationsmaschinerie (*Signal recognition*

particle (SRP)), wenn diese vom Ribosom freigesetzt wird und leitet diesen Komplex mit Hilfe des FtsY-Proteins zum SecYEG Translocon. Anschließend wird die Translation der Aminosäuren fortgesetzt und diese aus dem Kanal lateral in die Membran entlassen (Abb. 2). Jüngst wurde YidC als essentielles Protein in der Biogenese von allen Membranproteinen von *E. coli* identifiziert, dessen genaue Rolle bisher noch ungeklärt ist [13-16].

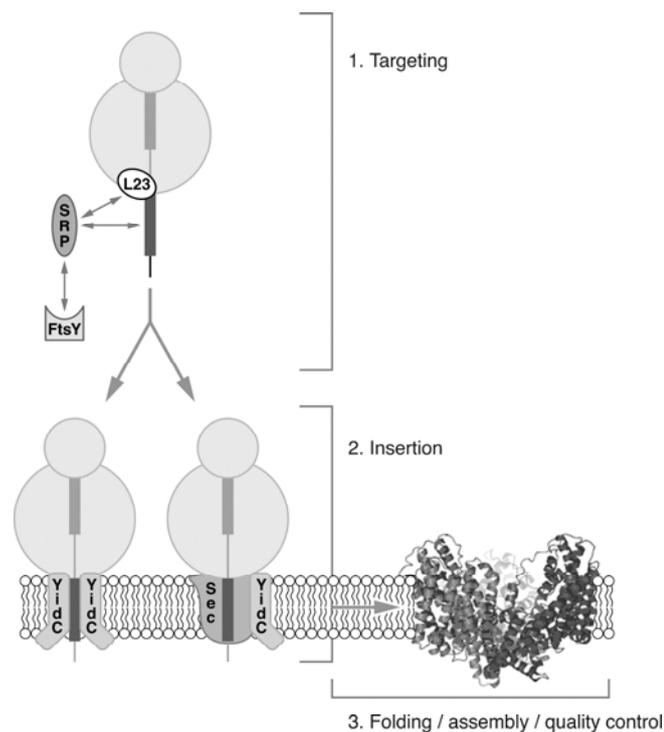


Abb. 2: Schematische Darstellung der Biogenese von *E. coli* Proteinen in die innere Membran am Beispiel des SRP, Sec/YidC Weges. Abbildung aus Luirink et al. [13]. Schritt 1: SRP bindet an eine hydrophobe Zielsequenz im entstehenden Protein (L23) nahe des Ausgangs der großen Untereinheit des Ribosoms. Schritt 2: FtsY bindet den Ribosom-SRP Komplex und geleitet diesen aufgrund seiner Lipidaffinität (möglicherweise auch Translokon-Affinität (SecY)) zur inneren Membran. Das entstehende Protein wird zum Sec/YidC-Translokon, oder zur YidC Insertase transferiert. Schritt 3: Die Transmembrandomäne (TMD) wird lateral in die Lipiddoppelschicht entlassen und das Membranprotein faltet und organisiert (häufig Oligomere) sich in seine native Struktur.

Einige Proteine oder Peptide bauen sich spontan in die Membran ein. Diese Eigenschaft ist auf deren Hydrophobizität zurückzuführen [17, 18].

1.5 Aufbau von Transmembrandomänen (TMDn)

Membranproteine mit einer Transmembrandomäne werden als bitopisch bezeichnet. Haben sie mehrere dieser Domänen, sind sie polytopisch. Die durchschnittliche Länge einer TMD beträgt 20-25 Aminosäuren [19-21]. In Transmembrandomänen sind die Aminosäuren Phe, Ile, Leu, Met und Val angereichert, da diese einen hydrophoben Charakter besitzen [20, 22-25]. Die Orientierung einer Helix in der Membran wird häufig von einem Überschuss positiv geladener Aminosäure-Seitenketten an der cytoplasmatischen Seite bestimmt (*positive-inside rule*) [26, 27]. Die α -Helix ist eine rechtsgängige, schraubenförmige Struktur, bei der jede Aminosäure um 100° gegenüber der vorangegangenen verdreht ist. Daraus ergibt sich eine Umdrehung pro 3,6 Aminosäuren. Die Stabilität der Helix beruht auf der Ausbildung von interhelikalen N-H \cdots O=C Wasserstoffbrücken zwischen den Rückgrat-Atomen pro Windung und intrahelikalen Interaktionen zwischen den Aminosäureseitenketten.

1.6 Faltung von Transmembranhelices

Die α -Helix ist die Sekundärstruktur, bei der ein Maximum an Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten NH- und CO-Gruppen der Peptidbindungen ausgebildet werden können. Dies führt zu einer Stabilisierung des Peptides in einer hydrophoben Umgebung (Lipiddoppelschicht). Würde eine hydrophobe α -Helix nicht in die Membran inserieren, hätte dies eine Reduktion der Entropie von Wasser zur Folge. Die Wassermoleküldipole um die nicht inserierte α -Helix wären in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt, da sie nicht mit der hydrophoben α -Helix interagieren können. Dieser hydrophobe Effekt ist in der Summe auf eine negative freie Energie zurückzuführen, die bei der Insertion der hydrophoben α -Helix in die Membran frei wird. Aus diesen Gründen ist es für eine einmal in die Membran inserierte hydrophobe α -Helix fast unmöglich, zum einen ihre Struktur zu ändern, und zum anderen die Lipiddoppelschicht zu verlassen. Dies ist die erste Stufe im *two-stage* Model der Membranproteinfaltung. In der zweiten Stufe können die autonomen α -Helices interagieren, ohne ihre Sekundärstruktur zu verändern. Durch die Oligomerisierung der TMDn können somit Membranproteine ihre Tertiär- oder Quartärstruktur einnehmen [28, 29] (Abb. 3).

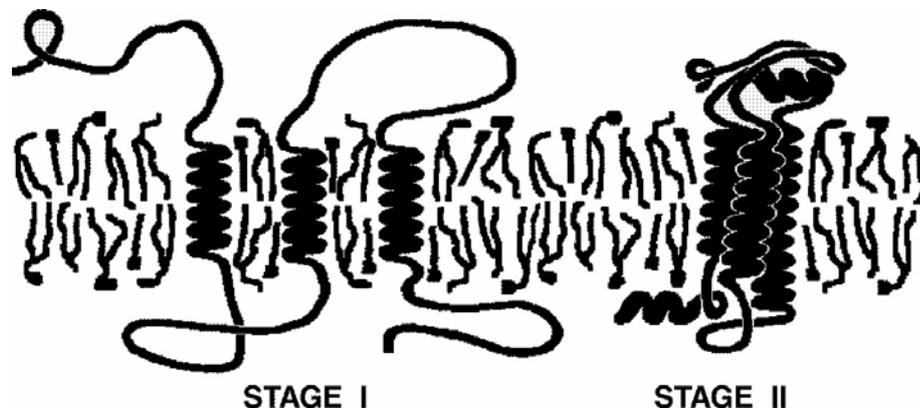


Abb. 3: Schematische Darstellung des *two-stage* Modells für α -helikale Transmembrandomänen. Erste Stufe: Einzelne Helices eines polytopischen Proteins inserieren separat und stabil in die Lipiddoppelschicht. Die Stabilität der Domänen ist die Konsequenz des hydrophoben Effektes und interhelikaler Wasserstoffbrücken. 2. Stufe: Helix-Helix Interaktionen führen anschließend zum funktionstüchtigen Protein (Tertiär- oder Quartärstruktur). Abbildung aus Popot und Engelman 2000 [29].

1.7 Interaktionsmotive bitopischer Membranproteine

Zum derzeitigen Stand der Forschung ist nur ein dimeres, bitopisches Membranprotein in seiner atomaren Struktur bekannt (NMR) [30, 31]. Durch zahlreiche Mutationsanalysen und durch Auswertung von atomaren Strukturen polytopischer Membranproteine werden TMD-TMD Interaktionen in zwei Klassen unterteilt. Die erste weist ein $[abcd]_n$ Motiv auf, wobei die Aminosäurepositionen a und b die interagierenden Seitenketten (*interface*) darstellen. Diese Helices bilden rechtshändige Paare mit negativen Kreuzungswinkeln aus (Abb. 4). Die andere Klasse basiert auf einem Heptadenmotiv $[abcdefg]_n$, und entspricht linkshändigen Paaren mit positiven Kreuzungswinkeln (Abb. 4), mit den Aminosäuren an Position a, d, e und g als Kontaktfläche.

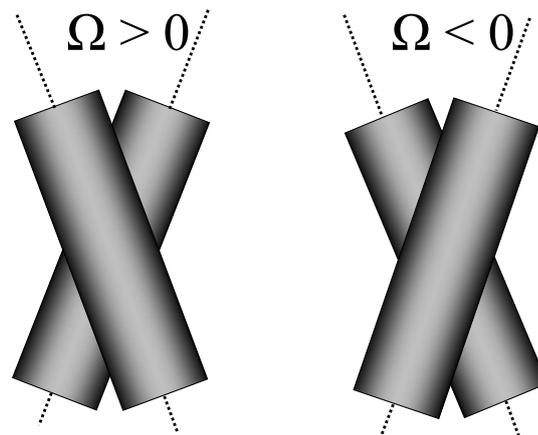


Abb. 4: Schematische Darstellung zweier selbstinteragierender Transmembrandomänen (α -Helix) bitopischer Membranproteine. **Links:** Linkshändiges Homodimer mit einem Kreuzungswinkel $\Omega > 0^\circ$. **Rechts:** Rechtshändiges Homodimer mit einem Kreuzungswinkel $\Omega < 0^\circ$.

1.8 Biochemische und biophysikalische Techniken zur Detektion von TMD-TMD Interaktionen

Um Interaktionen zwischen Transmembrandomänen experimentell nachzuweisen, können einerseits Untersuchungen in Detergenzlösung, welche unspezifische Aggregation verhindert [32], und andererseits in Lipidmembranen vorgenommen werden. Gegenstand der Interaktionsuntersuchungen sind native bzw. rekombinant hergestellte Membranproteine [33, 34], oder synthetische Peptide [35-38]. Direkte Informationen über eine mögliche Interaktion erhält man durch NMR- oder Röntgenstruktur-Daten [30, 39]. Weitere Methoden wie z.B. die denaturierende Elektrophorese (SDS-PAGE) [40], nicht-denaturierende Elektrophorese [41], Gelfiltration und Dichte-Gradienten-Ultrazentrifugation [42], Analytische-Ultrazentrifugation [43], Massenspektrometrie [44] und FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) [45] können Hinweise auf Oligomerisierung von TMDn liefern.

1.9 Genetische Techniken zur Detektion von TMD-TMD Interaktionen

Um Interaktionen von TMDn in natürlichen Lipidmembranen durchführen zu können, wurden verschiedene Techniken entwickelt. All diesen Methoden liegt das Grundprinzip der Reporterexpression bei auftretender Oligomerisierung von TMDn zugrunde. Die Menge des auftretenden Reporterproteins lässt Rückschlüsse auf die Affinität der Interaktion zu.

1.9.1 Das ToxR Protein

Das modulare, transmembrane Signaltransduktionsprotein ToxR aus *Vibrio cholerae* vereinigt Sensor- und Regulatorfunktionen klassischer Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme innerhalb einer Polypeptidkette. Extrazelluläre Signale werden von der C-terminalen, im Periplasma lokalisierten Sensordomäne registriert und über ein kurzes, transmembranes Segment an die N-terminale, cytoplasmatische Regulatordomäne weitergeleitet. Letztere bindet DNA ((TTTGGAT)_{3,8}) und fungiert als Transkriptionsaktivator des *ctxAB*-Operons [46-48]. Nach dem postulierten Dimerisierungsmodell wird der Informationsfluss über die innere Membran durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkung gewährleistet, indem unter der stabilisierenden Mitwirkung des Membranproteins ToxS zunächst eine signalinduzierte Dimerisierung zweier periplasmatischer ToxR-Domänen erfolgt (siehe Abb. 5) [49, 50]. Die daraus resultierende passive Dimerisierung der zugehörigen cytoplasmatischen Regulatordomänen führt zur spezifischen Bindung und Aktivierung der *ctx*-, *toxT*- und *ompU* Zielpromotoren [51-53]. Das natürliche „Gegenstück“ ist die Reprimierung der Transkription des *outer membran porin* (*OmpT*). Somit kann *Vibrio cholerae* auf verschiedene Wachstumsbedingungen reagieren [54]. Der *ompU* und der *ompT* Promotor stellt somit ein natürliches Paar der reziproken Regulierung dar.

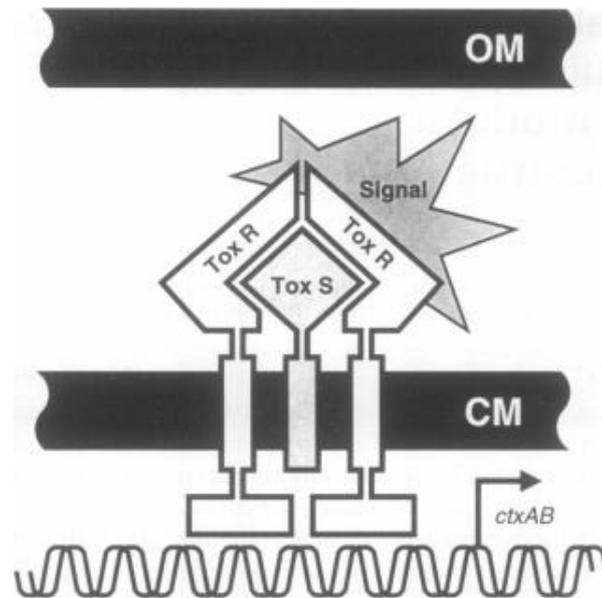


Abb. 5: Aktivierung der Transkription des *Vibrio cholerae ctx* Promotors [47]. Signalinduzierte Interaktion zwischen den periplasmatischen Domänen der Membranproteine ToxR und ToxS führen zur passiven Dimerisierung der cytoplasmatischen ToxR-Domäne. Dies resultiert in einer sequenzspezifischen Bindung an die *ctx* Promotor DNA und aktiviert somit die Transkription der *Vibrio cholerae* Toxingene *ctxA* und *ctxB*. OM, äußere Membran; CM, innere Membran; Abbildung aus Kolmar et al. [55].

1.9.2 Das ToxR-System

Auf der Grundlage des ToxR Proteins wurde das ToxR-Transkriptionsaktivatorsystem entwickelt. Dies wurde bereits für Interaktionsanalysen von einer Vielzahl von TMDn in natürlichen Lipidmembranen (innere Membran von *E.coli*) verwendet [56-62]. Des Weiteren wurde es für *in vivo* Selektion von interagierenden TMDn aus kombinatorischen Bibliotheken eingesetzt [63-66]. Die ursprüngliche Version (ToxRI) besteht aus einem Fusionsprotein, dessen kodierende Sequenz sich auf einem *high copy* Plasmid (pToxRI) befindet und konstitutiv transkribiert wird. Dieses besteht aus der cytoplasmatischen ToxR-Transkriptionsaktivatordomäne, einer variablen TMD und der periplasmatisch lokalisierten MalE (Maltose Bindeprotein) Domäne. Nur eine interaktionsfähige TMD führt zur Dimerisierung bzw. Oligomerisierung des Fusionsproteins in der Membran. In einem speziellen *E.coli*-Stamm (FHK12; [55]) wird der *ctx*-Promotor, der in dessen Chromosom integriert ist, durch dieses Oligomer

aktiviert und das nachgeschaltete *lacZ* (β -Galaktosidase) Reporter gen transkribiert (Abb. 6). Die Quantität der exprimierten β -Galaktosidase kann mit einem kolorimetrischen Verfahren nachgewiesen werden und stellt einen Indikator für die Affinität einer TMD-TMD Interaktion dar [60].

1.9.3 Das POSSYCCAT-System

Das POSSYCCAT-System (ToxRIV) findet seinen Einsatz in der Selektion von hochaffinen, homolog interagierenden TMDn aus einer Bibliothek [64]. Es besteht aus einem Bakterienstamm Chr3 und einem durch Arabinose induzierbaren Expressionsvektor pToxR (Abb. 6). Das Hybridgen *ctx::cat* (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase) wurde chromosomal in DH5 α integriert (Chr3-Stamm). Eine erhöhte Expression des Reporterproteins (CAT), welches auf eine stark ausgeprägte Oligomerisierung der TMD zurückzuführen ist, verleiht den Bakterienzellen eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol. Somit lassen sich Zellen anreichern, die eine hochaffine, homolog interagierende TMD im Fusionsprotein beinhalten, da diese bei steigendem Selektionsdruck (hohe Konzentration an Chloramphenicol) überleben. Damit resultiert die Assemblierung von TMDn in einem Selektionsvorteil. Dies ist die Grundvoraussetzung für den Ablauf einer natürlichen Evolution. Somit wird gewährleistet, dass das *in vitro* System mit dem natürlichen System verglichen werden kann.

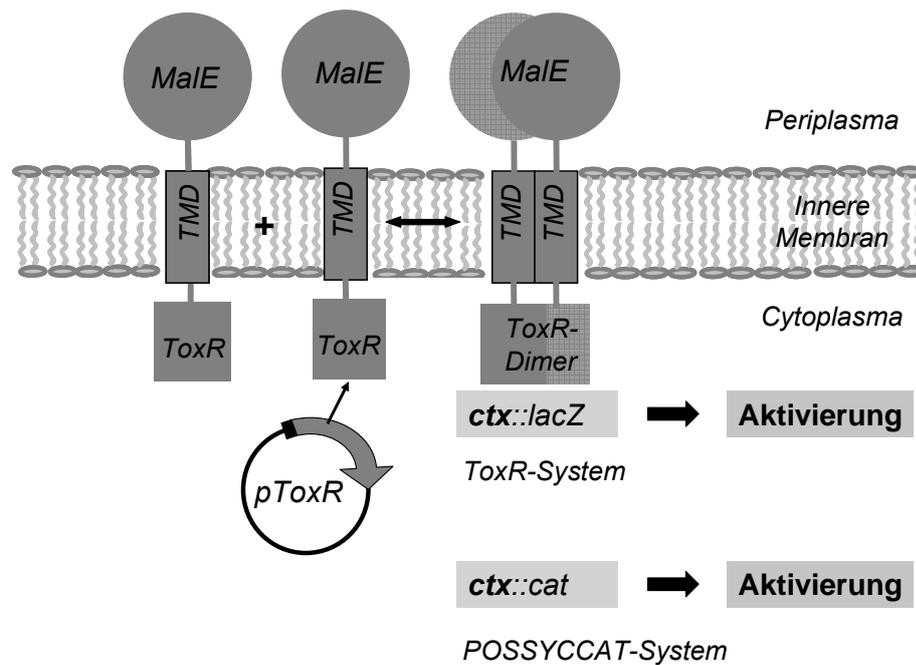


Abb. 6: Graphische Darstellung des ToxR- und POSSYCCAT-Systems. Die cytoplasmatische ToxR Domäne ist über eine variable TMD mit dem periplasmatischen MalE-Teil verbunden. Bei der Dimerisierung (Oligomerisierung) des Fusionsproteins über deren TMDn wird der *ctx* Promotor aktiviert. Dies führt zur Expression des Reporterproteins LacZ (ToxR-System) bzw. CAT (POSSYCCAT-System). *pToxR*, *high copy* Plasmid; ToxR, ToxR-Transkriptionsaktivatordomäne; TMD, Transmembrandomäne; MalE, Maltosebindeprotein; *ctx*, *ctx* Promotor (TTTTGAT)₇; *lacZ*, Gen der β -Galaktosidase; *cat*, Gen der Chloramphenicolacetyltransferase.

1.9.4 Andere auf ToxR basierende Systeme

Derzeit wird das ToxR-System hauptsächlich zur Analyse von homotypischen TMD-TMD Interaktionen eingesetzt. Da viele Membranproteine als heterooligomere Komplexe vorliegen, ist es notwendig Techniken zu entwickeln, die diese Interaktionen detektieren können. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von synthetisch hergestellten TMD-Peptiden, die zu den Indikatorzellen (FHK12) in das Wachstumsmedium gegeben werden. Diese können mit einer homologen ToxR/TMD-ToxR/TMD Interaktion konkurrieren und somit die Expression des Reporterproteins unterdrücken [38, 62, 67]. Eine andere Technik beinhaltet die Expression zweier ToxR-Fusionsproteine mit unterschiedlicher TMD auf einem Plasmid [68]. Um eine Aussage über eine heterologe

Oligomerisierung treffen zu können, dürfen beide verwendeten TMDn keine bzw. nur schwache homotypische Interaktionen aufweisen.

Eine nicht auf ToxR basierende Technik zur Identifizierung von heterotypischen TMD-TMD Interaktionen hat als Grundlage das LexA-Transkriptionsaktivatorsystem. [69].

2 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Detektion heterologer Interaktionen von Transmembrandomänen. Hierfür sollte zunächst ein neues Selektionssystem entwickelt werden, da das POSSYCCAT-System auf die Selektion von homotypisch interagierenden TMDn aus einer Bibliothek beschränkt ist. Somit war es notwendig das bestehende System (POSSYCCAT) so zu modifizieren, dass es in der Lage ist nicht- bzw. schwach oligomerisierende TMDn anzureichern (Negativselektion). Diese wiederum sollen im Anschluss paarweise auf starke Interaktion untersucht werden (Positivselektion). Da im Vorfeld homooligomerisierende TMDn ausgeschlossen werden (Negativselektion), kann es sich bei einem gefundenen TMD-Paar nur um eine heterologe Interaktion handeln.

In einer zweiten Strategie sollte ein Kompetitor-System entwickelt werden. Neben einer homotypisch interagierenden $TMD_{(A)}$ sollte eine weitere $TMD_{(B)}$ detektiert werden, die mit dieser Interaktion konkurrieren kann. Die neue Komponente besteht aus einer modifizierten ToxR-Domäne ($ToxR^* = ToxR/S87G$), bei der die DNA-Bindung und/oder die Rekrutierung der RNA-Polymerase zerstört ist und daher zum Verlust der Aktivität führt. Bei dieser Methode wird eine homotypisch interagierende $TMD_{(A)}$ als ToxR Fusionsprotein mit einer potentiellen Kompetitor $TMD_{(B)}$ als $ToxR^*$ Fusionsprotein koexprimiert. Eine heterologe Interaktion ($TMD_{(A)}-TMD_{(B)}$) führt zu einem dominant negativen Effekt, da der ausgebildete Komplex $ToxR-TMD_{(A)}/ToxR^*-TMD_{(B)}$ bezüglich der Transkription inaktiver als $ToxR-TMD_{(A)}/ToxR-TMD_{(A)}$ ist. Somit soll eine TMD, welche eine heterologe Interaktion aufweist, durch eine Negativselektion aus einer kombinatorischen Bibliothek detektiert werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

3.1.1 Allgemeine Chemikalien

Sämtliche Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (Millipore Filtereinheit) angesetzt. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Standardchemikalien von folgenden Firmen bezogen: Roth (Karlsruhe), Applichem (Darmstadt), Sigma (München).

3.1.2 Detergenzien

Triton-X-100 (Applichem), Natriumdodecylsulfat (Sigma), Thesit (Polyethylene glycol dodecyl ether)(Sigma).

3.2 DNA und RNA modifizierende Enzyme

RNase A (Applichem), Taq Polymerase (MBI Fermentas), Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas und New England Biolabs), DNA Ligase (MBI Fermentas).

3.3 Antikörper

Enzymgekoppelte Sekundärantikörper wurden von Promega (Mannheim) bezogen: Goat-anti-Mouse Alkalische Phosphatase gekoppelt, Goat-anti-Rabbit Alkalische Phosphatase gekoppelt, rabbit-anti-MalE polyklonaler Antikörper von New England Biolabs, mouse-anti-His6 monoklonaler Antikörper (Roche).

3.4 Kits

Die Firma Machery-Nagel (Düren) lieferte Kits zur DNA Isolierung und Aufreinigung: NucleoSpin Plasmid und NucleoSpin Extract II.

3.5 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide für die PCR, Kassettenklonierung und Sequenzierung wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) und Invitrogen (GB) bezogen. Alle Sequenzen sind von 5' nach 3' angegeben. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und Modifikationen von Nukleotiden (Mutationen) sind grau unterlegt dargestellt. In Klammern stehende Zahlen sind interne „Primer-Nummern“.

3.5.1 Oligonukleotide für die PCR

Für die Herstellung des ToxV-Vektors (Derivat des ToxIV-Vektors)

HISDOWN (19a)

CTCGAGTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTTCAGATCTTCTTCGCTGATCAGC
TTCTGTTCCGGTACCGA

HISUP (19)

TCTAGATAACGAGGGCAAAAATGTTCCGATTAGGACAC

Für die Klonierung des ToxVII Vektors

ToxAraPOBsuup (135)

GACCGCATCGATAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATC

Toxdown (164)

CTGCAGGTCGACCTCGAG

Für die Klonierung des ompT Promotor in den pET22b Vektor

forompTapa (55)

CGTGCCGGGCCCAAAAGGGTTTTGGCCATCTCGGC

revOmpT (56)

GGCACGCATATGGTTAATCCACTGCCTTTTTCTTAATATGGG

Für die Klonierung des ompT Promotor in den pACYC184 Vektor

ompbsu15I (57)

CGTGCCATCGATACAAAGGGTTTTGGCCATCTCGGC

revterminator (58)

GGCACGAAGCTTCAAAAAACCCCTCAAGACCCG

Für die Klonierung des ompU Promotor in den pACYC184 Vektor

ompUBsuup (88)

CGTGCCATCGATCCTAAATCGGGTCGGGTTAGGGTTG

OmpUNdedownlo (92)

GCAGCTCATATGCCTATTAAGTCCTAATTTATTGTCC

Für die Klonierung des Tetracyclin Reporter Gens

NdeTetup (74)

CGGATCCCATATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGC

XhoTetdown (75)

GCAGCTCTCGAGTCAGGTCGAGGTGGCCCGGCTCC

Für die Klonierung des β -Galaktosidase (α -Fragment) Reporter Gens aus pUC18

LacZaup (78)

CGGATCCCATATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGG

LacZadown (79)

GCAGCTCTCGAGTTAGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCG

Für die Klonierung des Chloramphenikol-Acetyltransferase Reporter Gens

CmNdeup (95)

CGGATCCCATATGGAGAAAAAATCACTGGATATAACCACC

CmXhodown (96)

GCAGCTCTCGAGTTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCG

Für die Klonierung des β -Galaktosidase Reporter Gens

lacZfullNdeup (116)

CGTGCCCATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCG

lacZtruncXhodown (117)

GCACAACTCGAGTTAAATGGAAACCGTCGATATTCAGCC

ELsacup (118)

CGGATCGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGG

ELXhodown (119)

GCAGCTCTCGAGTTATTTTTGACACCAGACCAACTGG

Für die Erstellung von ToxR-Punktmutanten Bibliotheken (E51NNY, P62NNY, S87NNY, K110NNY) mit Hilfe der MOE-PCR

MutE51se (190)

TTAGGCAGCAACNNYAGCCGAATTCTT

MutE51as (191)

AAGAATTCGGCTRNNGTTGCTGCCTAA

MutP62se (192)

CTGGCCCAACGTNNYAACGAGGTAATT

MutP62as (193)

AATTACCTCGTTRNNACGTTGGGCCAG

MutS87se (194)

GTCGATGATTCCNNYTAAACCCAAGCC

MutS87as (195)

GGCTTGGGTAARNNGGAATCATCGAC

MutLys110se (196)

CCACAATACGTCNNYACGGTTCCGAAG

MutLys110as (197)

CTTCGGAACCGTRNNGACGTATTGTGG

Für die Einführung der ToxR Punktmutation S87G mit Hilfe der MOE-PCR

ToxS87Gup (125)

GAAGTCGATGATTCCGGCTTAACCCAAGCC

ToxS87Gdown (126)

GGCTTGGGTAAAGCCGGAATCATCGACTTC

Für chromosomale Integrationen mit Hilfe des pLDR10 Vektors

184Pstdown (105)

GCACAACTGCAGGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGC

184Sacup (106)

CGTGCCGAGCTCGTAGCACCTGAAGTCAGCCCC

184Bsudown (113)

GCACAAATCGATGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGC

184Pstup (115)

CGTGCCCTGCAGGTAGCACCTGAAGTCAGCCCC

Für die Herstellung des pOMPII Vektors

184dCMPstup (130)

CGTGCCCTGCAGGCACCGCCGGACATCAGCGC

184dCmPstdown (131)

GGCACGCTGCAGGTTAGCGAGGTGCCGCCGGC

3.5.2 Oligonukleotide für die Kassettenklonierung

Für die Herstellung von DNA-Substraten (Gelretardationsanalyse)

ELHEPUP (22)

TTTTGATTTTTGATTTTTGATTTTTGATTTTTGATTTTTGATTTTTGATTTTTGAT

ELHEPDOWN (23)

ATCAAAAATCAAAAATCAAAAATCAAAAATCAAAAATCAAAAATCAAAAATCAAAA

PBSKUP (14)

CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT

PBSKDOWN (15)

CAGGAAACAGCTATGAC

3.5.3 Oligonukleotide für die DNA Sequenzierung

Die Sequenzanalyse wurde am LI-COR (DNA Sequencer, MWG-BIOTECH) durchgeführt. Alle Primer haben eine 5' Modifikation (IRD700 oder IRD800).

Für pTox R**Toxdown700 (IRD700)**

CCGTTATAGCCTTTATCGCCG

TOXSEQDOWN (IRD800)

CCGTTATAGCCTTTATCGCCG

Toxsequp (IRD700)

CGCAGAATCAAGCAGTGTGCC

new_pBAD-primer (IRD800)

TCACGGCAGAAAAGTCCACATTG

Für pACYC184 Derivate**pEL1sequUP (IRD800)**

GTAGCACCTGAAGTCAGCCCC

3.6 Vektoren

Für die Herstellung des ToxV-Vektors wurde der ToxIV-Vektor [64] als Grundlage verwendet. Der His₆-tag wurde mit Hilfe der PCR eingeführt. Das *lacZα* Gen wurde aus pUC18 [70] (Fermentas) amplifiziert. Für chromosomale DNA Integrationen wurden die Plasmide pLDR8 und pLDR10 verwendet [71]. Das pOMP-Plasmid wurde aus pACYC184 erhalten [72]. Für die Herstellung von DNA-Substraten (Gelretardationsanalyse) wurde das Plasmid pBluescript II (Fermentas) verwendet [73].

3.7 Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme sind Modifikationen von *Escherichia coli*. Der Stamm DH5α wurde für alle Klonierungen, Plasmidpräparationen und für chromosomale DNA-Integrationen verwendet. PD28 Zellen [74] wurden für die Wachstumsversuche eingesetzt. Die TMDn-Interaktionsanalysen erfolgten in FHK12 Zellen [55] oder in anderen dafür hergestellten Bakterienstämmen (Kapitel 4 - Ergebnisse). Die Bakterienstämme für Selektionsversuche von TMDn (Negativ- und

Positivselektion) wurden ebenfalls in dieser Arbeit hergestellt. Für die Expression der ToxR Fusionsproteine wurde der Stamm Top10 (Invitrogen) verwendet.

3.8 Nährmedien

LB-Medium

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l H₂O (Platten + 15 g Agar)

SOC-Medium

20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 ml 1 M NaCl, 2,5 ml 1 M KCl, ad 1 l H₂O

Nach dem Autoklavieren 10 ml 1 M MgCl₂, 10 ml MgSO₄ und 10 ml 2 M Glukose zugeben. Die Stammlösungen werden durch Sterilfiltration sterilisiert.

Minimalmedium

1 x M9 Salze, 0,4 % Maltose (w/v), 2 mM MgSO₄

Selektivmedien:

Ampicillin: 100 µg/ml bzw. 50 µg/ml

Kanamycin: 33 µg/ml

Chloramphenicol: 30 µg/ml

Tetracyclin: 12,5 µg/ml

3.9 Lösungen und Puffer

3.9.1 Lösungen und Puffer für DNA-Arbeiten

Restriktionspuffer für Restriktionsendonukleasen

Puffer Rot, Gelb, Blau, Grün (MBI Fermentas); Puffer 1, 2, 3, 4 (New England Biolabs)

Ligase-Puffer

50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP (MBI Fermentas)

Mini-Puffer I

50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0

Mini-Puffer II

0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS

Mini-Puffer III

3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Sucrose-Farbmarker

60 % (w/v) Saccharose, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol FF, in TAE-Puffer.

TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,0

TBE-Puffer

89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA

Transformationspuffer (Hanahan)

10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH 6,7 (mit KOH), 55 mM MnCl₂

X-Gal-Lösung

2 %ige Lösung (w/v) von 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid in Dimethylformamid.

3.9.2 Lösungen und Puffer für Protein-Arbeiten

HEPES-Puffer

25 mM HEPES/KOH pH 7,6

HEPES-Puffer A

25 mM HEPES/KOH pH 7,6, 0,5 M NaCl, 2 % Triton-X 100

HEPES-Puffer B

25 mM HEPES/KOH pH 7,6, 0,5 M NaCl, 2 % Triton-X 100, 0-1 M Imidazol

Harnstoff-Proteinprobenpuffer (HOECHST-PUFFER)

8 M Harnstoff, 200 mM Tris-Base, 200 mM DTT, 2 % (w/v) SDS

Laufpuffer für SDS-PAGE (1 x Laemmli-Puffer)

25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

PAG-Entfärbelösung

500 ml Ethanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l H₂O

PAG-Färbelösung

500 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 7,5 g Coomassie Brilliant Blue R, ad 1 l H₂O

Sammelgelpuffer

1 M Tris/HCl pH 6,8

Transfer-Puffer

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol

TBS-Puffer

8,8 g NaCl, 1,2 g Tris, pH 7,4, ad 1 l H₂O

TBST-Puffer

29,2 g NaCl, 500 ml Tween, 2,2 g Tris, pH 7,5, ad 1 l H₂O

Blocking Puffer

TBS-Puffer, 3 % BSA

Puffer A

5,8 g NaCl, 1,0 g MgCl₂, 12,1 g Tris, pH 9,5, ad 1 l H₂O

BCIP-Stammlösung

50 mg/ml BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat-Toluidinsalz in Dimethylformamid.

NBT-Stammlösung

75 mg/ml NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) in 70 % Dimethylformamid

Z-Puffer

16,1 g Na₂HPO₄x7H₂O, 5,5 g NaH₂PO₄xH₂O, 0,75 g KCl, 0,246 g MgSO₄x7H₂O, ad 1 l, pH 7,0.

3.10 Sonstige Materialien und Geräte

Molecular Devices: Microplate reader (ELISA-Reader) Thermomax

Herml Labortechnik: Zentrifugen

BioRad Laboratories, München: MicroPulser , Elektroporationsküvetten (0,1 cm)

G. Heinemann Laboratoriums-Ausrüstungen, Schwäb. Gmünd: Ultraschallgerät
Branson Sonifier W-250

Amersham Biosciences: Ultrospec 3100pro (Photometer)

Eppendorf: Eppendorf PCR Thermal Cycler für Cycle Sequencing und Polymerase
Kettenreaktionen

MWG-Biotech: LI-COR DNA Sequencer 4000L

3.11 Präparative und analytische DNA Techniken

3.11.1 Minipräparation von Plasmid-DNA (alkalische Lyse)

Für die Minipräparation von Plasmid-DNA wurden 5 ml LB-Medium mit den entsprechenden Stämmen beimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Roller inkubiert. Von dieser Kultur wurden 1,5 ml in der Tischzentrifuge (RT, 1 min, 12000 rpm) geerntet und das Pellet in 100 µl Mini-Puffer I aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 200 µl Mini-Puffer II zugegeben und vorsichtig gemischt (Inkubation für 5 min bei RT). Nach der Zugabe von 150 µl Mini-Puffer III wurden die Ansätze für 10 min bei 0°C inkubiert. In der Kühlzentrifuge (4°C, 12000 rpm, 10 min) wurden dann die Lösungen zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Phenol/Chloroform Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung aufgearbeitet. Das getrocknete Pellet aus der „Speed-Vac“ wurde in 30 µl Wasser (pH 8, 20 µg/ml RNaseA) aufgenommen.

3.11.2 Phenolextraktion und DNA-Fällung mit Ethanol

Die zu extrahierende DNA-Lösung wurde mit einem halben Volumen Phenol und einem halben Volumen Chloroform versetzt. Nach intensivem Mischen der Lösung (vortexen) wurde die Emulsion zur Phasentrennung für 3 min (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit einer Pipette in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zugabe von 1 Volumen Chloroform wurde intensiv gemischt und die Emulsion zur Phasentrennung für 3 min (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit einer Pipette in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Dann wurde 1/10 des Volumens der DNA-Lösung 7 M Ammoniumacetat zugesetzt und gemischt. Nun wurden 3 Volumina 96 %-igen Ethanols zugegeben und gemischt. Die Inkubation erfolgte bei -20°C für 30 min. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (4°C, 30 min, 12000 rpm). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und abzentrifugiert (4°C, 15 min, 12000 rpm). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und verworfen. Das Pellet wurde in der „Speed-Vac“ getrocknet und anschließend in Wasser aufgenommen.

3.11.3 Konzentrationsbestimmung der DNA

Es wurde eine 1:100 bis 1:200-fache Verdünnung der DNA-Lösung hergestellt und diese in eine Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) überführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektroskopisch durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm (Ultrospec 3100pro Photometer), wobei der Verdünnungspuffer als Referenz diente. Eine $OD_{260} = 1$ entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von ca. 50 µg/ml.

3.11.4 Agarosegelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet. Nach Aufkochen der Agarose in TAE-Puffer wurde der etwas abgekühlten Lösung Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugesetzt und in einer Flachbettschale gegossen. Die aufzutrennenden Proben wurden mit Sucrosefarbmarker versetzt und in die Geltaschen des erkalteten Gels gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 125 V durchgeführt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer. Nach Abschluß der Elektrophorese konnten die aufgetrennten DNA-Banden durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht werden; sie erscheinen als rötlich fluoreszierende Banden.

3.11.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Spaltungen mit Restriktionsenzymen wurden unter den vom jeweiligen Hersteller des Enzyms beschriebenen Puffer- und Temperaturbedingungen durchgeführt. Für analytische Zwecke wurden etwa 0,5 µg DNA eingesetzt, wobei die Menge des eingesetzten Enzyms sich nach folgender Formel errechnete:

$$\frac{(\mu\text{g DNA} \times \text{Anzahl der Schnitte} \times 50)}{(\text{kB} \times \text{Schnitte in } \lambda)} = \text{units Enzym}$$

Nach mindestens 60-minütiger Inkubation wurde die Spaltung mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

3.11.6 Kassettenklonierung

Kurze DNA Fragmente wurden aus synthetischen Oligonukleotiden durch Hybridisierung hergestellt. Dazu wurden zwei Oligonukleotide (Sense und Antisense-Strang) gemischt und 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden sie langsam auf RT abgekühlt. Diese Lösung wurde für die Ligation in ein Plasmid eingesetzt.

3.11.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Ligationsprodukt wurde mit einem bis zu fünffachen molaren Überschuß an DNA-Insert-Fragment gegenüber dem DNA-Vektor-Fragment durchgeführt. Verwendet wurde der T4 DNA-Ligase-Puffer unter Zusatz von BSA und ca. 2 u T4 DNA-Ligase in einem Endvolumen von 10 – 20 µl. Die Reaktion erfolgte in der Regel über Nacht bei 16°C. Der Ligationsansatz wurde vor einer Transformation (Elektroporation) von *E. coli*-Zellen mit Ethanol gefällt (unter Zugabe eines *carriers*: yeast tRNA (Invitrogen) [75] oder seeDNA (Amersham Biosciences)). Bei der Verwendung von chemisch kompetenten Zellen (Hanahan) wurde der Ligationsansatz direkt für die Transformation eingesetzt.

3.11.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzanalysen wurden nach der Didesoxynukleotidmethode[76] durchgeführt. Zur Sequenzierung unter Einsatz eines *Minicyclers* (Eppendorf) wurde der Sequenzierkit SequiTherm EXCELII (EPICENTRE TECHNOLOGIES) eingesetzt. Hierfür wurden 100-250 fmol DNA mit 2 pmol des IRD700 markierten Sequenzierprimers zusammengegeben, mit Wasser auf 16 µl aufgefüllt und je 4 µl dieses Gemisches zu je 2 µl des entsprechenden in separate PCR-Gefäße vorgelegten Terminationsmixes (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) gegeben.

Cycle sequencing-Programm:

Schritt	Zeit	Temperatur
1	5 min	95°C
2	30 sek	95°C
3	15 sek	57°C
4	1 min	70°C
		2-4 29 Zyklen

Die Annealingtemperatur wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 69.3^\circ\text{C} + 0.41 * (\%GC) - 650 / \text{Länge des Oligos}$$

Es wurden jeweils 3 µl Formamid-Auftragspuffer zugesetzt und die Ansätze 5 min auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden dann auf ein Polyacrylamid-Harnstoffgel (66 cm lang, Rapid Gel XL (Amersham) bzw. 25 cm lang, Long Ranger (BIOZYM), im DNA-Sequencer (LI-COR DNA Sequencer 4200L, MWG-Biotech) aufgetrennt.

3.11.9 MOE (mutagenesis by overlap extension) Polymerasekettenreaktion

Diese Technik wurde für die Erzeugung von DNA-Mutationen eingesetzt [77].

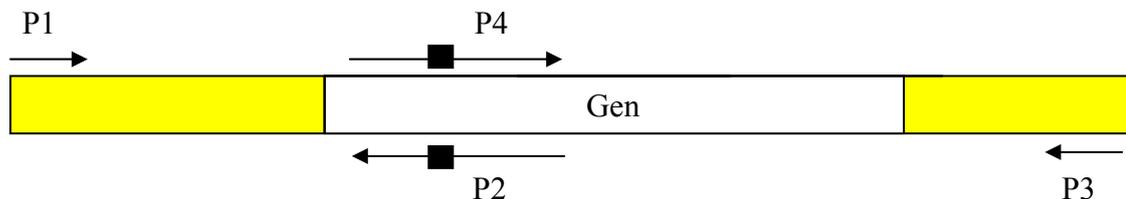


Abb. 7: Schematische Darstellung der MOE-PCR (*mutagenesis by overlap extension*).

■ symbolisiert die auszutauschenden Nukleotide im Gen; P, Primer.

	PCR 1	PCR 2
Template	250 ng	250 ng
Primer 1	100 pmol	
Primer 2	100 pmol	
Primer 3		100 pmol
Primer 4		100 pmol
Polymerase-Puffer	10 µl	10 µl
10xdNTPs	10 µl	10 µl
Taq-Polymerase	2,0 units	2,0 units
H ₂ O	ad 100 µl	ad 100 µl

Programm für PCR 1 und PCR 2

2 min 95°C
 30 sec 95°C
 30 sec 57°C
 1 min 72°C
 30 Zyklen

Die PCR Produkte aus Reaktion 1 und 2 wurden über ein Agarose-Gel gereinigt (Nucleospin Extract II Kit) und anschließend für PCR 3 eingesetzt:

Produkt aus PCR 1	100 ng
Produkt aus PCR 2	100 ng
Primer 1	100 pmol
Primer 3	100 pmol
10 xTaq-Polymerase-Puffer	10 µl
10xdNTPs	10 µl
Taq-Polymerase	2,0 units
H ₂ O	ad 100 µl

Programm für PCR 3

2 min 95°C
 1 min 95°C
 30 sec 57°C
 1 min 72°C
 5 Zyklen
Zugabe von Primer 1 und 3
 1 min 95°C
 30 sec 57°C
 1 min 72°C
 25 Zyklen
 10 min 72°C

3.11.10 Transformation von *Escherichia coli*

3.11.10.1 Elektroporation

Das Prinzip der Transformation durch Elektroporation beruht auf der Permeabilisierung der Zellmembran durch Elektroschock, so dass die Aufnahme von Makromolekülen erleichtert wird. Dazu werden die Zellen einem Elektroschock ausgesetzt, wodurch ein kurzfristiger lokaler Zusammenbruch des Membranpotentials bzw. eine Desorganisation der Membranstruktur erreicht wird [78]. Alle Elektroporationen wurden mit einem MicroPulser (Fa. BioRad Laboratories, München) durchgeführt.

Für die Präparation von Elektroporationszellen von *E.coli* wurde 100 µl einer Übernachtskultur in 50 ml LB-Medium überimpft. Die Kultur wurde dann bei 37°C und 170 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur abzentrifugiert (4000 rpm, 4°C, 15 min). Danach wurde das Pellet in 50 ml kaltem

Wasser resuspendiert und 15 min auf Eis stehen gelassen. Nachfolgend wurde die Lösung erneut zentrifugiert und in 25 ml kaltem Wasser resuspendiert und 15 min auf Eis stehen gelassen. Dieser Schritt wurde mit 10 ml kaltem Wasser wiederholt. Nach letztmaliger Zentrifugation wurde das Pellet in 200 µl kaltem Wasser aufgenommen und direkt für eine Elektroporation eingesetzt.

In vorgekühlten 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen wurden jeweils 40 µl Zellsuspension mit der DNA (50-1000 ng) gemischt. Die DNA/Zellmischung wurde dann in Elektroporationsküvetten (0,1 cm; vorgekühlt) pipettiert und anschließend einer Spannung von 1800 V (Programm: EC1) ausgesetzt. Nun wurde zu der Mischung sofort 1 ml SOC-Medium gegeben und diese zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde auf Selektivplatten plattiert.

3.11.10.2 Kompetente Zellen nach Hanahan

Für die Präparation von kompetenten Zellen nach Hanahan wurde 100 µl einer Übernachtskultur in 50 ml SOC-Medium überimpft. Die Kultur wurde dann bei 37°C und 170 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur abzentrifugiert (4000 rpm, 4°C, 15 min). Danach wurde das Pellet in 15 ml kaltem Hanahan-Transformationspuffer resuspendiert und 15 min auf Eis stehen gelassen. Nachfolgend wurde die Lösung erneut zentrifugiert und in 5 ml kaltem Hanahan-Transformationspuffer resuspendiert. Anschließend wurde zum Röhrchen unter leichtem Vortexen 175 µl DMSO gegeben und die Zellen 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 175 µl DMSO und selbiger Inkubationszeit wurden die Zellen direkt für die Transformation (je 200 µl) eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die DNA (50-1000 ng) wurde zu 200 µl kompetenten Zellen gegeben und 20-30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zell/DNA/Suspension wurde nun für genau 90 Sekunden in einem Wasserbad von 42°C inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz für 2-3 Minuten wieder auf Eis gestellt. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium zugegeben, durch Umschwenken gemischt und der Ansatz zur Expression der Antibiotikaresistenz bei 37°C für 1 h inkubiert. Danach wurde auf Selektivplatten plattiert.

3.11.11 Chromosomale Integration von DNA

Die Grundlage dieser Methode ist ein Zwei-Vektor-System (pLDR10 und pLDR8), welches die Integration von DNA-Fragmenten in die λ attachment site (*attB*) des *E.coli* Chromosoms ermöglicht [71]. Der Klonierungsvektor pLDR10 beinhaltet die λ attachment site (*attB*). Das Helferplasmid pLDR8 verfügt über das λ *int* Gen mit dem λ P_R Promotor, der unter der Kontrolle des Temperatursensitiven cI₈₅₇ Repressors steht. Das zu integrierende DNA-Fragment wird in die *multicloning site* von pLDR10 kloniert. Danach wird der Replikationsursprung entfernt (*NotI*) und die DNA religiert. Dies resultiert in ein zirkuläres DNA-Fragment, welches keinen Replikationsursprung beinhaltet. Ein *E. coli* Stamm mit dem Helferplasmid pLDR8 (λ *int* Gen) wird mit diesem Fragment transformiert und bei 42°C inkubiert, um die *int* Gen Expression zu induzieren. Zusätzlich führt die Temperaturerhöhung nach einigen Zellgenerationen zum Verlust des Helferplasmides (pLDR8), da dessen Replikationsfähigkeit bei 42°C blockiert ist (cI₈₅₇ Repressors).

Zunächst wurde der pLDR10 Vektor, welcher das zu integrierende DNA-Fragment beinhaltet, mit *NotI* verdaut. Anschließend wurde der Ansatz auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, das Fragment mit der zu integrierenden DNA ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert. Anschließend wurde das Fragment ligiert und in chemisch kompetente (Hanahan) DH5 α /pLDR8 Zellen transformiert (Anmerkung: Die kompetenten DH5 α /pLDR8 Zellen wurden bei 30°C vermehrt und die Inkubationszeit für die Ausbildung der Antibiotikaresistenz (Kur) wurde von 60 min auf 80 min bei 37°C verlängert). Der Transformationsansatz wurde auf Agarplatten (Ampicillin 50 μ g/ml) plattiert und über Nacht bei 42°C inkubiert. Einzelne Transformanten wurden isoliert und in frisches LB-Medium (Amp 50 μ g/ml) überführt. Aus der über Nacht Kultur (42°C) wurde ein Vereinzelaustreich auf Agarplatten durchgeführt und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Einzelne Kolonien wurden erneut in LB-Medium (Amp 50 μ g/ml) über Nacht inkubiert (37°C). Um die chromosomale Integration zu bestätigen, wurde eine DNA-Plasmidpräparation durchgeführt (kein Plasmid vorhanden). Eine weitere Überprüfung war die Isolierung der chromosomalen *E.coli* DNA des hergestellten Stammes und einer anschließenden Amplifikation (PCR) des integrierten DNA-Fragmentes (PCR-Produkt vorhanden).

3.12. Gelretardationsanalysen mit unmarkierter DNA

Für Gelretardationsanalysen mit unmarkierter DNA wurden Agarose-HEC-Gele eingesetzt (1 % (w/v) Agarose, 0,5 % HEC (w/v) und 1 % (v/v) Thesit) [79]. Agarose und HEC wurden mit 1 x TBE Puffer / 1 % Thesit gemischt und aufgekocht. Im Anschluss wurde die Lösung direkt auf eine Glasplatte (Dimension 100 x 60 mm) gegossen (horizontale Gelelektrophorese mit 0,5 x TBE / 1 % (v/v) Thesit als Laufpuffer; 115 V; 1 h 20 min; 4°C).

3.13 Präparative und analytische Proteinchemie

3.13.1 Expression von Fusionsproteinen im pToxRV-Vektor

Die Transmembrandomänen (TMDn) wurden im Rahmen des ToxR-Fusionsproteins des pToxRV-Vektors exprimiert. Aus einer bei 37°C angezogenen 5 ml (LB/Kan (33 µg/ml)-Medium) ÜN-Kultur des Expressionsstammes *E. coli* Top10/pToxRV wurden 1:100 in 50 ml LB Medium (Kan 33 µg/ml) überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 37°C vermehrt. Zu diesem Zeitpunkt wurde mit 0,0015 % (w/v) Arabinose induziert und die Zellen für weitere 4 h wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets bei -20°C eingefroren. Die gefrorenen Pellets wurden in 5 ml HEPES-Puffer A resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung auf Eis sonifiziert (30 s, 50 % duty cycle, Mikrotip, Outputlevel 5) und abzentrifugiert (30 min, 4°C). Der Überstand wurde zur Analyse auf ein SDS-PAGE gegeben oder für die weitere Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC) verwendet.

3.13.2 Reinigung der ToxR-Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen

In eine 15 ml Säule mit vorgelegter Fritte wurden 5 ml *Chelating Sepharose*[®] (Pharmacia) gegeben und nach Sedimentation der Sepharose mit einer zweiten Fritte überdeckt. Die Säulenmatrix wurde nacheinander mit 10 ml Wasser und 10 ml HEPES-

Puffer A gewaschen. Zu chelatierende Metallionen wurden in Form von 10 ml 100 mM NiCl₂-Lösung auf die Säule gebracht, welche anschließend mit 2 x 10 ml Wasser und 10 ml HEPES-Puffer A gewaschen und äquilibriert wurde. Es folgte der Auftrag der Proteine, gelöst in HEPES-Puffer A. Die Säule wurde mit 4 x 10 ml IMAC-Puffer A gewaschen und anschließend die schrittweise Elution gebundener Proteine mit einem Imidazolgradienten (HEPES-Puffer B) wie folgt vorgenommen:

- 1.) 10 ml (2 Säulenvolumen) HEPES-Puffer B 50 mM Imidazol
- 2.) 5 ml (1 Säulenvolumen) HEPES-Puffer B 75 mM Imidazol
- 3.) 5 ml (1 Säulenvolumen) HEPES-Puffer B 100 mM Imidazol
- 4.) 5 ml (1 Säulenvolumen) HEPES-Puffer B 250 mM Imidazol

Proben der Fraktionen wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Die Säulenmatrix wurde mit 2 x 10 ml 0,5 M EDTA, pH 9,0 regeneriert und mit 3 x 10 ml Wasser gewaschen, bevor sie wieder verwendet wurde.

3.13.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurden, wie bei Laemmli beschrieben [80], unter denaturierenden Bedingungen auf SDS-Polyacrylamidgelen (Dimension 100 x 60 x 0,75 mm) entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine wird hierbei aufgelöst. Die Gele enthielten 12,5 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (Gewichtsverhältnis 30:0,8). Als Laufpuffer diente 1 x Laemmli-Puffer. Die Gele setzten sich wie folgt zusammen:

Tab. 1: Lösungen für ca. 10 15 %-ige SDS-Polyacrylamid-Gele.

Sammelgel	AA	SGP	SDS	APS	TEMED	H ₂ O
5%	3,34 ml	2,5 ml	100 µl	Spatelspitze	10 µl	14 ml
Trenngel	AA	TGP	SDS	APS	TEMED	H ₂ O
15%	40 ml	15 ml	400 µl	Spatelspitze	40 µl	24,6 ml

Nach Gießen des Trenngeltes wird dieses mit Isopropanol überschichtet. Ist die Matrix polymerisiert, wird das Isopropanol dekantiert und auf das Trenngel das Sammelgel gegossen, in das die Kämme eingefügt werden.

AA: Acrylamid-Lösung (15 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid; Gewichtsverhältnis 30:0,8)

APS: Ammoniumperoxodisulfat

SDS: 20 % (w/v) Natriumdodecylsulfat-Stammlösung

SGP: Sammelgelpuffer, 1 M Tris/HCl, pH 6,8

TEMED: N, N, N', N'-Tetramethyldiamin

TGP: Trenngelpuffer, 2 M Tris/HCl, pH 8,8

Die Proben wurden mit Hoechst-Puffer durch Inkubation für 5 Minuten bei 100°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 25 mA für etwa eine Stunde bis zum Auslaufen der Bromphenolblau-Bande. Das Gel wurde anschließend etwa 10 Minuten mit „Coomassie brilliant blue R“ angefärbt und nachfolgend mit PAG-Entfärber oder zweimal 5 min in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Proteinbanden gut erkennbar waren.

3.13.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteine wurde spektroskopisch ermittelt [81]. Hierfür wurde die Absorption der Proteinlösung bei einer Wellenlänge von 280 nm (E_{280}) bestimmt.

Nach $\epsilon = n(\text{Trp}) * 5500 + n(\text{Tyr}) * 1490 + n(\text{Cystin ;S-S Brücken}) * 125$ (n =Anzahl der betreffenden Aminosäuren im Protein) berechnet man den Extinktionskoeffizienten des betreffenden Proteins und kann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($E = \epsilon * c * d$; d : Schichtdicke der Küvette (1cm)) die Konzentration c ermitteln.

3.13.5 Nachweis mit Hilfe des Westernblots

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines „semi-dry-Blotverfahrens“ auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen [82]. Hierfür wurde auf zwei mit Westernblot-Transferpuffer getränkte Filterpapiere (Whatman 3MMTM) eine ebenfalls mit Transferpuffer getränkte Nitrocellulosemembran gelegt. Auf diese wurde das Gel mit den elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen platziert und mit zwei weiteren in Transferpuffer getränkten Filtern abgedeckt. Der gesamte Stapel wurde nun

so zwischen die Graphitplatten einer Westernblot-Apparatur gelegt, dass die Nitrocellulose-Membran in Richtung der Anode zu liegen kam. Der Transfer erfolgte 70 min bei 60 mA. Nach Beendigung des Transfers wurde der Nitrocellulosefilter für etwa 30 Sekunden mit einer Ponceau-S-Lösung angefärbt und die Position der Markerproteine mit einem Bleistift markiert. Anschließend wurde die Membran 30 Minuten in Blocking-Puffer (3 % BSA in TBS-Puffer) geblockt, die Blots 1 Stunde lang (RT) oder ÜN (4°C) mit dem ersten Antikörper in Blocking-Puffer (1:10000) inkubiert und danach überschüssige Antikörper durch waschen mit TBS (10 min), TBST (10 min) und Blocking-Puffer (10 min) entfernt. Die Inkubation mit dem enzymgekoppelten Antikörper (Alkalische Phosphatase; 1:7500 in Blocking-Puffer) erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit TBS (5 min) TBST (5 min) und TBS (5 min) wurde der Blot mit NBT/BCIP entwickelt.

Die Membran wurde hierfür in der *staining solution* (66 µl NBT, 33 µl BCIP, 10 ml Puffer A (100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂)) geschwenkt, bis deutliche Banden sichtbar wurden (5-15 min). Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit deionisiertem Wasser gestoppt.

3.14 Analyse der Transmembraninteraktionen

Um Interaktionen von TMDn in natürlichen Lipidmembranen durchführen zu können, wurde eine Vielzahl von Techniken entwickelt. All diesen Methoden liegt das Grundprinzip der Reporter-Gen Expression bei auftretender Oligomerisierung von TMDn zugrunde. Die Menge des auftretenden Reporter-Proteins lässt Rückschlüsse auf die Intensität der Interaktion zu.

Hierfür wurde der pToxV-Vektor in den Indikatorstamm FHK12 transformiert [55]. Je 50 µl des Transformationsansatzes wurden in 4 x 1 ml LB Medium (Kanamycin 33 µg/ml, unterschiedliche Konzentrationen an Arabinose und IPTG) überimpft und 20-24 h wachsen gelassen (150 rpm Schüttelinkubator, 37°C). 5 µl der ÜN-Kultur wurden auf den Boden einer Flachmikrotiterplatte pipettiert, wobei die erste Spalte als Referenz frei blieb. Anschließend wurde in jedes Well 100 µl Z-Puffer (+ 10 % Chloroform und 1 % β-Mercaptoethanol) pipettiert und im ELISA-Reader bei OD₆₂₀ vermessen, um die Zelldichte zu bestimmen. Anschließend kamen zu diesem Ansatz 50 µl Z-Puffer (+ 1,6 % SDS) zur Lyse der Zellen. Während einer 10 minütigen Inkubation konnte die

0,4 %-ige o-NPG Lösung (w/v) zur β -Galaktosidaseaktivitätsbestimmung angesetzt werden. Die Kinetik wurde nach 20 min bestimmt, indem alle 30 Sekunden eine Messung bei OD₄₀₅ im ELISA-Reader bei 28°C erfolgte. Die β -Galaktosidaseaktivität gibt die Fähigkeit des ToxR-Fusionsproteins zur Selbstinteraktion an. Die Maßeinheit hierfür sind Miller units [MU] und errechnet sich wie folgt:

$$\frac{\Delta OD_{420}/\text{min}}{OD_{600}} \times 1000 = \text{MU}$$

3.15 Kontrollexperimente für die Membranintegration und Expression

3.15.1 Integration der ToxR-Fusionsproteine in der inneren E.coli Membran

Nur richtig orientierte (N-Terminus im Cytoplasma, C-Terminus im Periplasma) und integrierte ToxR-TMD-MalE Fusionsproteine können für eine Interaktionsanalyse verwendet werden. Deshalb wurden die ToxR-Fusionsproteine in PD28 Zellen transformiert. Diese Zellen haben eine MalE genetische Deletion, so dass sie im Minimalmedium, mit Maltose als einzige Kohlenstoffquelle, nicht wachsen können [74]. Werden sie jedoch mit Plasmiden des ToxR-Fusionsproteins transformiert und in der richtigen Orientierung in die Membran integriert, befindet sich der MalE-Teil des Fusionsproteins im Periplasma. Diese Zellen können Maltose aufnehmen und deshalb wachsen.

ToxR-Vektoren wurden in PD28 transformiert (LB-Medium, Kanamycin) und bei 37°C 20 h wachsen gelassen. 1 ml der ÜN-Kultur wurde abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Dieser Vorgang wurde 3-mal wiederholt. Anschließend wurde 5 ml M9-Medium (Maltose als einzige Kohlenstoffquelle) mit 100 μ l der gewaschenen Bakteriensuspension angeimpft. Die Proben inkubierten bei 37°C (Rollinkubator) und wurden täglich vermessen (OD₆₀₀).

3.15.2 Kontrolle der Expression über Western-Blot

Verschiedene ToxR-Fusionsproteine können bei der Interaktionsanalyse nur miteinander verglichen werden, wenn sie in dem Versuchsansatz ein ähnliches Expressionsniveau aufweisen. Deshalb mussten die analysierten Proben aus unterschiedlichen ToxR-assays auf einem SDS-Gel aufgetragen und anschließend im Western-Blot verglichen werden.

Hierfür wurde von einem ToxR-assay 200 µl Bakteriensuspension abzentrifugiert und das Pellet in 1 x SDS Probenpuffer (Hoechst-Puffer) resuspendiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei 100°C wurden 10 µl mittels SDS-PAGE (mit anschließendem Western-Blot) analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 TMD Modelle

4.1.1 Ein membranständiges Leucinzippermotiv als Modellsystem

Transmembranhelices können Interaktionen zwischen Membranproteinen vermitteln. Bei linkshändigen Paaren interagierender Transmembran- α -Helices ähnelt die dichte Packung der Kontaktfläche der von löslichen Leucinzippern [39]. In einem früher etablierten vereinfachten Modell (AZ2) besteht das Heptadenmotiv aus der Aminosäure Leucin, welche die Kernpositionen a und d sowie die flankierenden Positionen e und g in einer Transmembran- α -Helix einnehmen. Die Positionen b, c und f der α -Helix bestehen aus der Aminosäure Alanin (Abb. 8). Sie sind nach Interaktion den Lipidmolekülen zugewandt und deswegen vermutlich nicht an der Interaktion beteiligt. Diese Positionen wurden mit Alanin besetzt, da für eine reine Transmembran- α -Helix aus Alanin nur eine schwache Selbstinteraktion festgestellt werden konnte.

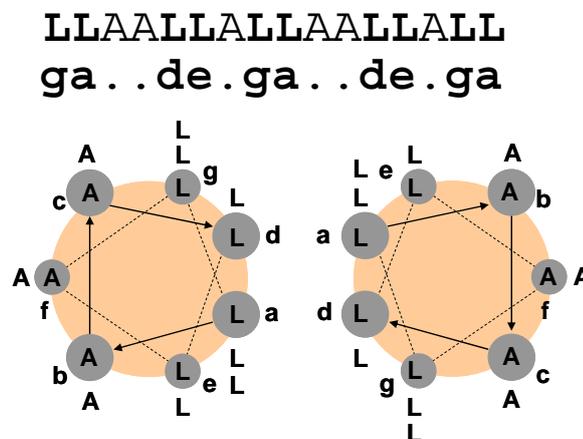


Abb. 8: Schematische Darstellung des Leucinzippermotivs (AZ2). **Oben:** Die Positionen b, c und f sind mit Alanin besetzt und werden als Punkt dargestellt. Die Positionen a, d, e und g sind mit Leucin besetzt und sind hervorgehoben. **Unten:** Es werden zwei interagierende α -Helices in der Aufsicht gezeigt, die durch das Transmembranleucinzippermotiv miteinander interagieren. Das Motiv besteht aus 16 Aminosäuren und beginnt vom N-Terminus mit der Position g des Heptadenmotivs. Die Positionen a und d des Heptadenmotivs sind mit Leucin besetzt, diese können in engen Kontakt treten und den Kern der Kontaktfläche ausbilden. Die Positionen e und g flankieren den Kern der Kontaktfläche und werden ebenfalls von Leucin besetzt. Die der Interaktion abgewandte Seite wird von den Positionen b, c und f gebildet und besteht aus Alanin [64].

4.1.2 Messung der relativen TMD-TMD Affinität

Selbstinteraktion von Transmembrandomänen (TMDn) kann mit dem ToxR-Transkriptionsaktivatorsystem gezeigt werden. Durch Oligomerisierung des ToxR-Proteins in der inneren Membran wird der *ctx* Promotor aktiviert und initiiert die Transkription stromabwärts lokalisierter Gene. Für ein System, welches in der Lage ist TMD-TMD Selbstinteraktion zu detektieren, wurde ein chimäres Protein konstruiert. Dieses besteht aus der cytoplasmatischen ToxR-Domäne (Transkriptionsaktivator), einer TMD und dem periplasmatisch lokalisierten Maltose-Binde-Protein (MalE). Besitzen TMDn die Fähigkeit zur Selbstinteraktion, führt dies zu einer Dimerisierung (Oligomerisierung) des Fusionsproteins in der Membran. Varianten von diesem Protein mit unterschiedlicher TMD werden in *Escherichia coli* Reporter-Stämmen exprimiert, in welchen die Reporter-Gene unter Kontrolle des *ctx*-Promotors stehen. Die ursprüngliche Version des ToxR-Systems nutzt das Gen der β -Galaktosidase (*lacZ*) als Reporter (FHK12 Zellen, positiver ToxR Assay) [55, 60, 83]. FHK12 Zellen beinhalten ein chromosomal integriertes Fusionsgen bestehend aus dem *ctx* Promotor und einem N-terminal verkürzten *lacZ* Gen (*ctx::lacZ*; GenEMBL Nummer: V00296, Startpunkt bei Nukleotid 34). Diese *lacZ* Variante kodiert für eine schwächer aktive β -Galaktosidase als die WT Variante (volle Länge). Die Expression der β -Galaktosidase ist ein Indikator für die Dimerisierung bzw. Oligomerisierung des Transmembranbereiches (siehe Einleitung).

Während die Expression des ToxR-Fusionsproteins (ToxR-TMD-MalE) in der ersten Vektorgeneration (ToxRI) konstitutiv war, wurde in einer späteren Version ein regulierbarer Promotor verwendet. Dabei handelt es sich um die Arabinose Operator/Promotor Region [64]. Durch den Einsatz unterschiedlich hoher Arabinose-Konzentrationen kann das Expressionslevel des ToxR-Fusionsproteins reguliert werden.

4.1.3 Verwendete Modell-Transmembrandomänen

In einer vorangegangenen Arbeit [64] konnte gezeigt werden, dass die Selbstinteraktion des AZ2-Motivs sequenzspezifisch ist. Vierfachmutanten der Positionen a und d oder e und g (eg4) zeigten eine Reduktion der β -Galaktosidaseaktivität gegenüber dem Wildtyp (Abb. 10). Somit bildet Leucin an diesen Positionen vermutlich die

Kontaktfläche zwischen den interagierenden Helices. In einer weiteren Arbeit [66] wurde eine Plasmidbibliothek hergestellt, welche an allen g, a, d und e Positionen des Heptadenmotivs jegliche Aminosäure zulässt (kombinatorische Bibliothek; Komplexität 2×10^7). Aus dieser Bibliothek wurde eine stark interagierende TMD mit Hilfe des POSSYCCAT-Systems [64] selektiert, welche auf dem Heptadenmotiv basiert und als interaktionsfördernde Aminosäure Tryptophan an der letzten g-Position beinhaltet (C65) [66]. Δ TMD stellt die Negativkontrolle dar, da in diesem Konstrukt die TMD deletiert ist (Abb. 9). Die Plasmid-Kontrolle besteht aus einem modifizierten ToxRV-Vektor, aus welchem der Leserahmen für das ToxR-TMD-MalE Fusionsprotein entfernt wurde.

	g a b c d e f g a b c d e f g a
Δ TMD :	-----
AZ2 :	LLAALLALLAALLALL
A16 :	AAAAAAAAAAAAAAAA
eg4 :	LLAALAALAAALAAAL
C65 :	MVAAATAVSAAIIAWA
Bibliothek:	XXAAXXAXXAXXAXX

Abb. 9: Überblick der verwendeten Modell-TMDn die auf dem Heptadenmotiv basieren. Die Positionen des Heptadenmotivs a, d, e und g sind hervorgehoben. Deletionen sind mit einem Strich markiert (Δ TMD); X- steht für eine der 20 natürlichen Aminosäuren (Bibliothek; Komplexität 2×10^7).

4.2 ToxR/TMD-vermittelte Regulation des *ctx*-Promotors

Für einen anfänglichen Vergleich der TMD-TMD Affinität wurden die DNA-Sequenzen, die für die entsprechenden TMDn kodieren, in den ToxRV-Vektor kloniert (Abb. 36, Anhang). Dieses Plasmid ist eine Modifizierung der ToxRIV Variante [64]. Das ToxR-TMD-MalE Fusionsprotein wurde C-Terminal um 6 Histidine (His₆-tag) verlängert. Diese sollten zur Proteinaufreinigung und Detektierung eingesetzt werden [84]. Die Vermessung der verschiedenen TMDn bzw. der Plasmidkontrolle ist in Abb. 10 dargestellt. Daraus ergibt sich eine Reihenfolge bezüglich der

β -Galaktosidaseaktivität und damit auch der relativen Affinität der Modell TMDn: Δ TMD \approx Bibliothek $<$ A16 $<$ eg4 \leq AZ2 $<$ C65.

Verschiedene ToxR-Fusionsproteine können bei der Interaktionsanalyse nur miteinander verglichen werden, wenn sie in dem Versuchsansatz ein ähnliches Expressionsniveau aufweisen. Deshalb wurden die analysierten Proben aus unterschiedlichen ToxR Assays auf einem SDS-Gel aufgetragen und anschließend im Western-Blot verglichen.

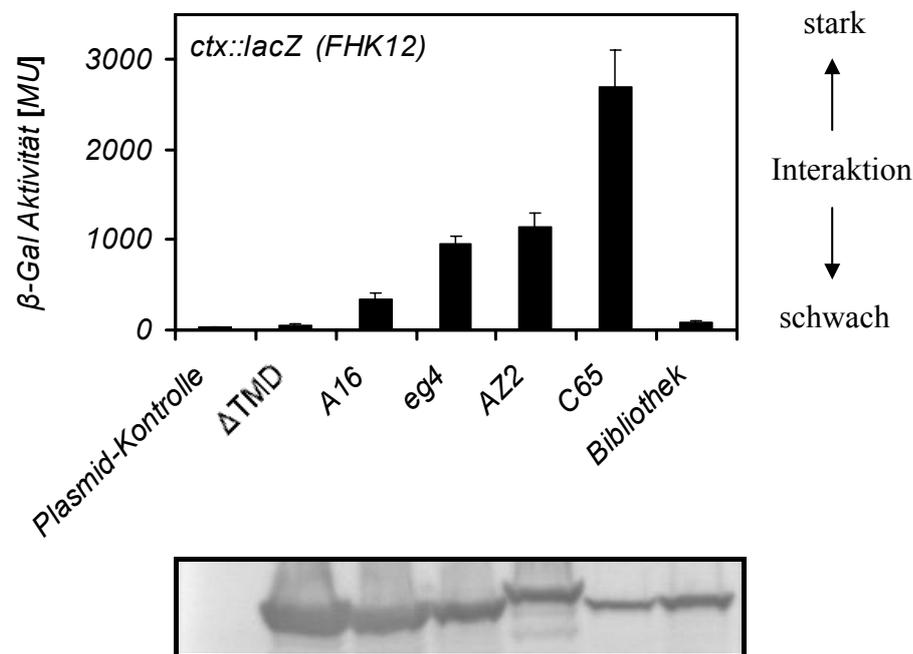


Abb. 10: Positiver ToxR Assay mit FHK12 Zellen. Regulation des *ctx* Promotors durch Modell ToxR-TMD-MalE Fusionsproteine. Transkriptionsaktivierung des *ctx* Promotors (*ctx::lacZ*) durch die Dimerisierung des exprimierten ToxR Fusionsproteins in *E. coli* (FHK12). „Plasmid-Kontrolle“, Zellen die mit dem ToxRV Plasmid transformiert wurden, dem das Gen des ToxR-Fusionsproteins fehlt. „Bibliothek“, unselektierte Zellen, die eine Bibliothek von zufälligen TMD Sequenzen beinhalten (Abb. 13). Jeder Balken zeigt die spezifische β -Galaktosidaseaktivität in lysierten Zellen, die aus einer \overline{UN} -Kultur von 100-500 Transformanten in Anwesenheit von 0,005 % Arabinose (w/v) und 0,4 mM Isopropyl-1-thio- β -D-Galactopyranosid erhalten wurden (Mittelwerte \pm SD, n=3). Der Western-Blot (anti-MalE) zeigt die Expression des ToxR-Fusionsproteins der Gesamtzellextrakte. Gezeigt ist nur die 60-70 kDa Region des Western-Blots.

4.3 ToxR/TMD- vermittelte Regulation des *ompT*-Promotors

4.3.1 Plasmidständiges Reportergenkonstrukt (*ompT::lacZ α*)

Das Ziel dieser Arbeit war die Detektion heterologer Interaktionen von Transmembransegmenten. Hierfür sollte zunächst ein neues Selektionssystem entwickelt werden, da das POSSYCCAT-System auf die Selektion von homotypisch interagierenden TMDn aus einer Bibliothek beschränkt ist. Es war notwendig, das bestehende System (POSSYCCAT) so zu modifizieren, dass es in der Lage ist nicht- bzw. schwach oligomerisierende TMDn anzureichern (Negativselektion). Da dadurch im Vorfeld homooligomerisierende TMDn ausgeschlossen werden (Negativselektion), kann es sich bei einem gefundenen TMD-Paar, welches im Anschluss auf starke Interaktion untersucht wird (Positivselektion), nur um eine hetertypische Interaktion handeln.

Da das ToxR Oligomer den *ompT* Promotor (Abb. 11) reprimiert (Kontrolle des *outer membrane porins* (OmpT) in *Vibrio cholerae*) [54] wurde angenommen, dass eine Anreicherung von schwach interagierenden TMDn durch Selektion möglich sei. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde zunächst ein Plasmid (pOMPI-*ompT::lacZ α*) konstruiert, in welchem der *ompT* Promotor das *lacZ α* Gen kontrolliert (Abb. 37, Anhang).

Mit Hilfe dieses Systems konnte gezeigt werden, dass der *ompT* Promotor in Anwesenheit eines oligomerisierten ToxR-Fusionsproteins die Transkription eines Reporter-Gens (*lacZ α*) reprimiert (negativer ToxR-Assay). Der Grad der Repression hängt von der Induktion des ToxR Fusionsproteins durch Arabinose ab. Somit ergab sich eine umgekehrte Reihenfolge in der Menge der exprimierten β -Galaktosidase, welche die Reihenfolge der relativen Affinität der TMDn widerspiegelt (Abb. 12).

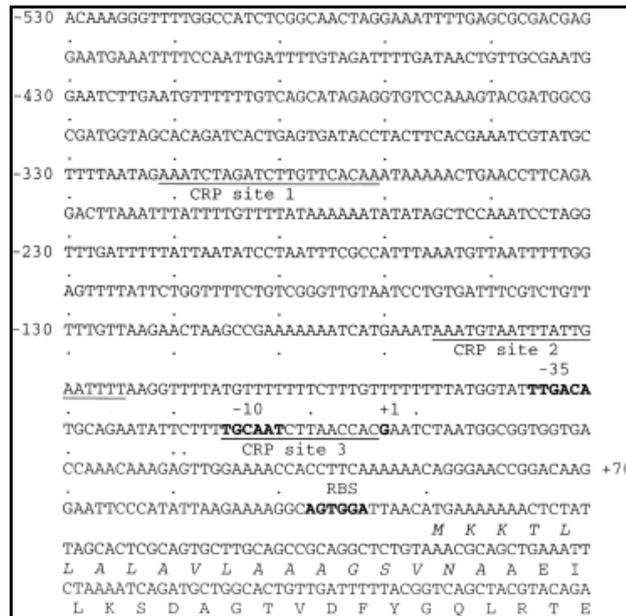


Abb. 11: Sequenz des *ompT* Promotors. Der Transkriptionsstart, -10 und -35 Region und die Ribosomenbindungsstelle (RBS) sind hervorgehoben. Die möglichen CRP Bindungsstellen sind unterstrichen gekennzeichnet. Der kodierende Bereich eines Signalpeptides (kursiv) und die ersten 20 Aminosäuren (OmpT) sind aufgeführt. Abbildung aus Li et. al [54].

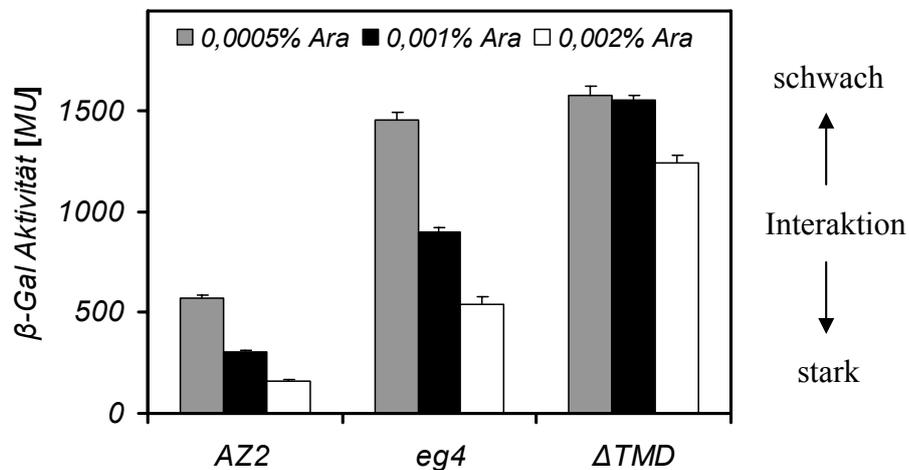


Abb. 12: Negativer ToxR Assay mit DH5α Zellen. Graduelle Transkriptionsrepression des *ompT* Promotors (*ompT::lacZ*; Plasmid lokalisiert (pOMPI) durch die Dimerisierung des exprimierten ToxR Fusionsproteins (ToxRV-Plasmid) in *E. coli* (DH5α)). Jeder Balken zeigt die spezifische β-Galaktosidaseaktivität in lysierten Zellen, die aus einer ÜN-Kultur von 100-500 Transformanten in Anwesenheit von 0,0005 %, 0,001 % bzw. 0,002 % Arabinose (w/v) und 0,4 mM Isopropyl-1-thio-β-D-Galactopyranosid erhalten wurden (Mittelwerte ± SD, n=3).

4.3.2 CRP-Abhängigkeit des *ompT*-Promotors

Kaper und Mitarbeiter konnten mit Hilfe von *crp* Mangelmutanten (cAMP receptor protein) nachweisen, dass der *ompT*-Promotor stark von CRP abhängt [54].

Experimente mit dem *ompT*-Promotor zeigten, dass die Transkription durch Zugabe von Glukose (Katabolitrepression) blockiert werden kann. Aus diesem Grund wurde die Möglichkeit der Verwendung des Promotors als alternatives Expressionssystem getestet. Zu diesem Zweck wurde das *lacZ*-Gen unter die Kontrolle des *ompT*-Promotors (lokalisiert auf dem pLDR10 plasmid; high copy) gestellt.

In Abb. 13 ist gezeigt, dass eine sinkende Glukosekonzentration in zunehmender β -Galaktosidase Expression resultiert. Dies ist vermutlich auf reduzierte Katabolitrepression zurückzuführen, da cAMP für die Funktion des *ompT* Promotors eine Schlüsselrolle einnimmt. CRP erhält die zur Bindung an die Promotor-DNA nötige Affinität erst, wenn zyklisches AMP (cAMP) in genügend hoher Konzentration in der Zelle vorliegt. Dadurch ist eine Regulation der Transkription von beliebigen Genen, die unter der Kontrolle des *ompT* Promotors stehen, mit Hilfe der Glukosekonzentration möglich.

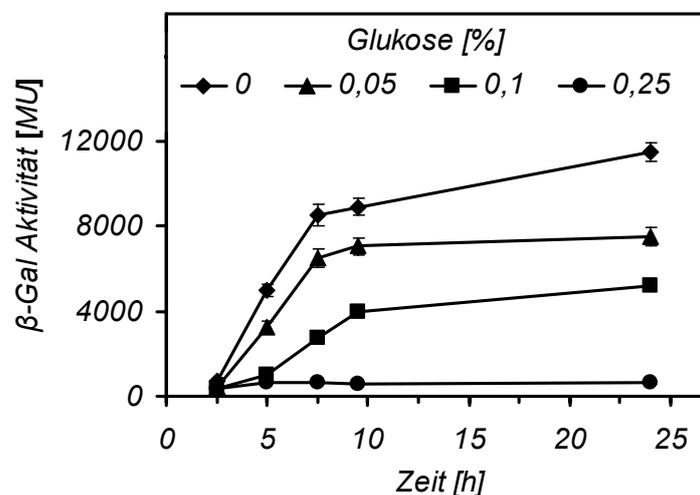


Abb. 13: Abhängigkeit der β -Galaktosidase Expression von der Konzentration an Glukose. Messung der β -Galaktosidase Aktivität in Abhängigkeit von Inkubationszeit und der Glukosekonzentration im Medium. Plasmid pLDR10-*ompT*::*lacZ* wurde in DH5 α transformiert. 50 ml frisches LB-Medium (Cm 30 μ g/ml; Glukose 0 % - 0,25 % w/v) wurde 1:100 mit einer ÜN-Kultur angeimpft. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt (Mittelwerte \pm SD, n=3).

4.3.3 Ein Chromosomal integriertes Reportergenkonstrukt *ompT::lacZ (EL81)*

Die chromosomale Integration von Hybridgenen (*Promotor::Reporter*) reduziert die Kopienzahl auf eins und somit wird die Expression des Reportergens reduziert. Dies sollte zu einer erhöhten Sensitivität der Systeme führen. Des Weiteren können deshalb in Folgeexperimenten zwei Plasmidklassen (p15A und *colE1* Derivate) simultan verwendet werden, auf denen sich zu untersuchende ToxR-TMD-MalE Fusionsproteine befinden. Für chromosomale Integrationen von DNA-Fragmenten in die λ *attachment site attB* wurde ein auf zwei Plasmiden basierendes System verwendet [71]. Dieses System benutzt ein DNA-Fragment mit der λ *attP* site, welches ein Resistenzgen beinhaltet (pLDR10; Abb. 38, Anhang) und einem Helfer-Plasmid pLDR8 (P15A Replicon; Resistenzgen; *int* gen).

Die chromosomale Integration des Fusionsgens *ompT::lacZ* zeigt die gleiche Reihenfolge der Modell-TMDn bezüglich der Interaktionsaffinität (Abb. 14) wie das herkömmliche FHK12 System *ctx::lacZ* (Abb. 10). Allerdings stellt sich die β -Galaktosidaseaktivität in umgekehrter Reihenfolge dar. Das bedeutet, dass der Stamm EL81 ebenso in der Lage ist homotypische Interaktionen von TMDn zu charakterisieren. Die Transkription wurde dabei nicht induziert (0 % Arabinose). Dies führt zu ähnlichen Expressionsniveaus der ToxR-TMD-MalE Konstrukte, welche auf einer Basaltranskription ausgehend vom pBAD Operator/Promotor beruhen.

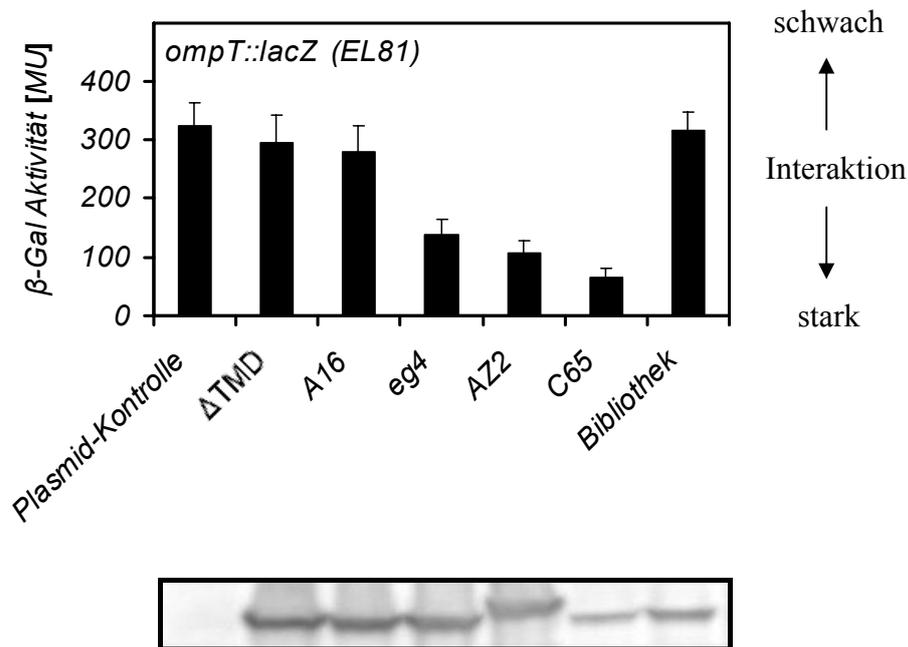


Abb. 14: Negativer ToxR Assay mit EL81 Zellen. Regulation des *ompT* Promotors durch verschiedene ToxR-TMD-Male Fusionsproteine. Transkriptionsreprimierung des *ompT* Promotors (*ompT::lacZ*) durch die Dimerisierung des exprimierten ToxR Fusionsproteins in *E. coli* (EL81). „Plasmid-Kontrolle“, Zellen die mit dem ToxRV Plasmid transformiert wurden, dem das Gen des ToxR-Fusionsproteins fehlt. „Bibliothek“, unselektierte Zellen, die eine Bibliothek von zufälligen TMD Sequenzen beinhalten (Abb. 9). Jeder Balken zeigt die spezifische β-Galaktosidaseaktivität in lysierten Zellen, die aus einer ÜN-Kultur von 100-500 Transformanten in Abwesenheit von Arabinose und Anwesenheit von 0,4 mM Isopropyl-1-thio-β-D-Galactopyranosid erhalten wurden. (Mittelwerte ± SD, n=3). Der Western-Blot (anti-Male) zeigt die Expression des ToxR-Fusionsproteins der Gesamtzellextrakte. Gezeigt ist nur die 60-70 kDa Region des Western-Blots.

4.4 ToxR/TMD- vermittelte Regulation des *ompU*-Promotors

Bisher wurde nur der *ctx* Promotor für die Selektion und Charakterisierung von TMDn verwendet. Es ist jedoch bekannt, dass ToxR-ToxR Interaktionen nicht nur die Transkription des *ctx*, sondern auch die der *ompU*, *ompT* und *toxT* Promotoren regulieren und damit mindestens 17 Gene kontrollieren (ToxR Regulon). In Analogie zum *ctx* Promotor aktiviert ToxR *ompU* und damit die Expression des *outer membrane porin* (OmpU).

In Abb. 15 ist die Basalexpression des β -Galaktosidasegens unter der Kontrolle des *ompU* bzw. des *ctx* Promotors gezeigt. FHK12 Zellen beinhalten ein chromosomal integriertes Fusionsgen bestehend aus dem *ctx* Promotor und einem N-terminal verkürzten *lacZ* Gen (*ctx::lacZ*; GenEMBL Nummer: V00296, Startpunkt bei Nukleotid 34). Diese *lacZ* Variante kodiert für eine schwächer aktive β -Galaktosidase als die WT Variante (volle Länge). Bei den in Abb. 15 dargestellten Basalexpressionen wurde in beiden Fällen (*ctx* und *ompU* Promotor) das vollständige *lacZ* Gen verwendet.

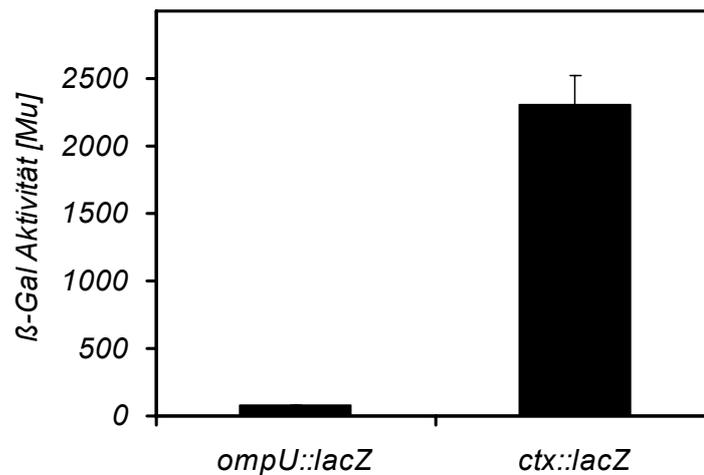


Abb. 15: Vergleich der Basalexpression des β -Galaktosidasegens unter der Kontrolle des *ompU* (EL83) oder *ctx* (EL85) Promotors (chromosomale Integrationen in DH5 α Zellen). Jeder Balken zeigt die spezifische β -Galaktosidaseaktivität in lysierten Zellen, die aus einer ÜN-Kultur in Anwesenheit von 0,4 mM Isopropyl-1-thio- β -D-Galactopyranosid erhalten wurden (Mittelwerte \pm SD, n=3).

Die Basalexpression des *ompU* Promotors ist gegenüber dem *ctx* um das dreißigfache erniedrigt. Dies zeigt, dass der *ompU* Promotor eine Alternative zum bisher genutzten *ctx* Promotor (FHK12, Chr3) ist, da er eine stärkere Differenzierung zwischen verschieden stark interagierender TMDn aufgrund der geringeren Basalaktivität zulassen könnte. Um den Einsatz des *ompU* Promotors an Stelle des *ctx* Promotors zu überprüfen, wurden Stämme konstruiert (chromosomale Integration von *ompU::lacZa* (EL55) bzw. *ompU::lacZ* (EL83)), in welchem der *ompU* Promotor das *lacZa* bzw. *lacZ* Gen kontrolliert. Mit Hilfe dieser Systeme konnte gezeigt werden, dass der Promotor in Anwesenheit eines oligomeren ToxR-Fusionsproteins die Transkription eines Reporter-

Gens (*lacZ α* (Abb. 16) bzw. *lacZ* (Abb.17)) aktiviert. Somit verhält sich der *ompU* Promotor ähnlich dem *ctx* Promotor.

Aufgrund der sehr niedrigen basalen β -Galaktosidaseaktivität der EL55-Zellen konnte ein „Blau-Weiß“ Assay (β -Galaktosidase Komplementation; α -Fragment und ω -Fragment) zur qualitativen Abschätzung der TMD-TMD Affinität auf Agarplatten (Substrat: X-Gal) etabliert werden. Nach Ausplattierung der Zellen konnte eine steigende Intensität der Kolonie-Blaufärbung mit steigender TMD-Interaktion nachgewiesen werden (Δ TMD = weiß; eg4 = hellblau; AZ2 = blau; C65 = dunkelblau).

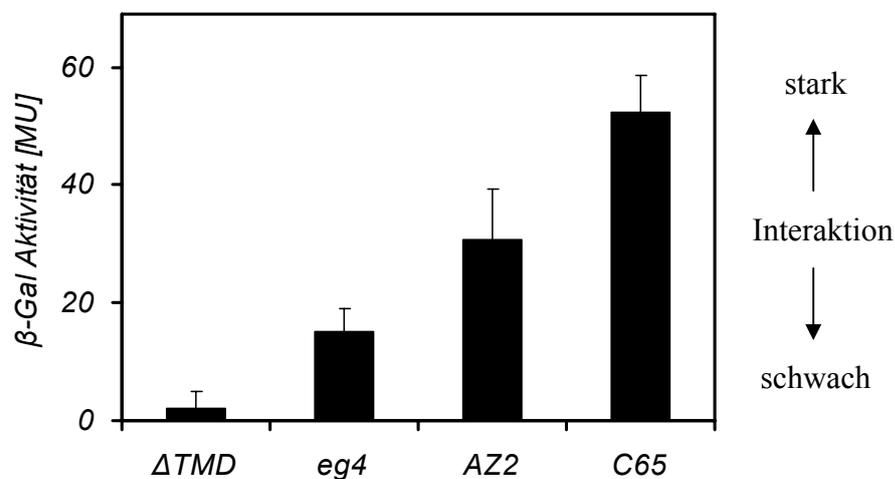


Abb. 16: Positiver ToxR Assay mit EL55 Zellen. Regulation des *ompU* Promotors durch verschiedene ToxR-TMD-MalE Fusionsproteine. Transkriptionsaktivierung des *ompU* Promotors (*ompU::lacZ α*) durch die Dimerisierung des exprimierten ToxR Fusionsproteins in *E. coli* (EL55). Jeder Balken zeigt die spezifische β -Galaktosidaseaktivität in lysierten Zellen, die aus einer ÜN-Kultur von 100-500 Transformanten in Anwesenheit von 0,005 % Arabinose (w/v) und 0,4 mM Isopropyl-1-thio- β -D-Galactopyranosid erhalten wurden (Mittelwerte \pm SD, n=3).

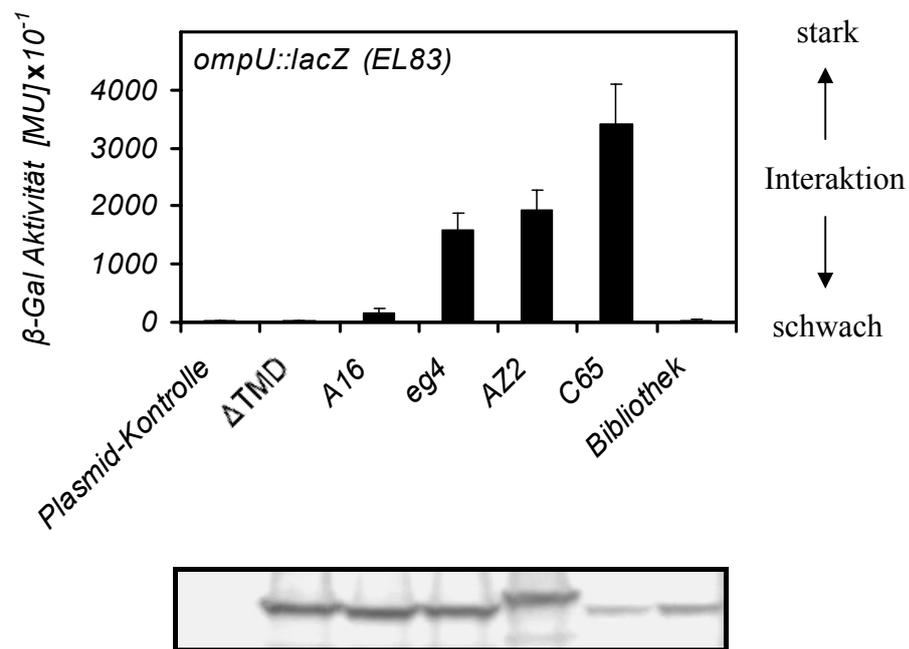


Abb. 17: Positiver ToxR Assay mit EL83 Zellen. Regulation des *ompU* Promotors durch verschiedene ToxR-TMD-MalE Fusionsproteine. Transkriptionsaktivierung des *ompU* Promotors (*ompU::lacZ*) durch die Dimerisierung des exprimierten ToxR Fusionsproteins in *E. coli* (EL83). „Plasmid-Kontrolle“, Zellen die mit dem ToxRV Plasmid transformiert wurden, dem das Gen des ToxR-Fusionsproteins fehlt. „Bibliothek“, unselektierte Zellen, die eine Bibliothek von zufälligen TMD Sequenzen beinhalten (Abb. 13). Jeder Balken zeigt die spezifische β-Galaktosidaseaktivität in lysierten Zellen, die aus einer ÜN-Kultur von 100-500 Transformanten in Abwesenheit von Arabinose und Anwesenheit von 0,4 mM Isopropyl-1-thio-β-D-Galactopyranosid erhalten wurden. (Mittelwerte ± SD, n=3). Der Western-Blot (anti-MalE) zeigt die Expression des ToxR-Fusionsproteins der Gesamtzellextrakte. Gezeigt ist nur die 60-70 kDa Region des Western-Blots.

4.5 Einsatz des *ompU* und *ompT* Promotors für die Selektion von TMDn

4.5.1 Positivselektion mit EL61 (*ompU::cat*)

Auf ToxR basierende Systeme wurden bereits früher für die Selektion von hochaffinen TMDn aus kombinatorischen Bibliotheken eingesetzt (Positivselektion). Hierfür wurden Reporterstämme benutzt, welche einerseits das *ctx::cat* Fusionsgen auf einem Plasmid (TOXCAT) [63] und andererseits im Chromosom (POSSYCCAT) [64] trugen.

Nun sollte erstmals der Einsatz des *ompU* Promotors für eine Positivselektion (Anreicherung von hochaffinen TMDn) untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der Stamm EL61 (*ompU::cat*) hergestellt. EL61 Zellen wurden separat mit den beschriebenen Modell TMDn transformiert und in LB-Medium (ohne Arabinose) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Chloramphenicol wachsen gelassen. Nach 24 h wurde die Zelldichte (OD_{600}) bestimmt (Abb. 18).

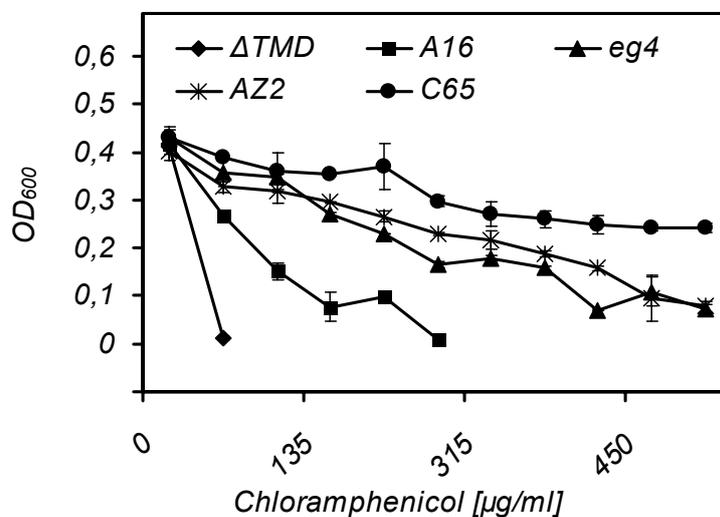


Abb. 18: Positivselektion mit EL61 (*ompU::cat*). Verschiedene ToxR-TMD-MalE Fusionsproteine wurden in EL61 transformiert und in LB-Medium (ohne Arabinose) mit steigenden Konzentrationen von Chloramphenicol separat wachsen gelassen. Nach 24 h wurde die optische Dichte (OD_{600}) gemessen (Mittelwerte \pm SD, $n=3$).

Wie erwartet, äußert sich eine erhöhte Affinität der TMDn in einer erhöhten Expression der Chloramphenicolacetyltransferase und somit einem leichteren Überleben der Zellen in Anwesenheit hoher Chloramphenicol Konzentrationen (Abb. 18). Daher lassen sich mit diesem System hochaffine TMDn anreichern.

4.5.2 Negativselektion mit EL47 (*ompT::tet^R*)

Mit dem bereits beschriebenen *ompT* Promotor-System sollte erstmals eine Negativselektion von TMDn durchgeführt werden. Dies bedeutet, dass aus einer kombinatorischen Bibliothek die hochaffinen TMDn ausgeschlossen und die niederaffinen angereichert werden. Hierfür wurde der Stamm EL47 (*ompT::tet^R*) hergestellt, in welchem die Anwesenheit eines interagierenden ToxR-TMD-Male Fusionsproteins zur Repression des Tetracyclinresistenzgens führt.

Um diese Eigenschaft zu überprüfen, wurde eine Mischung verschieden affiner TMDn verwendet. Diese bestand aus bereits beschriebenen TMDn: Δ TMD, A16, eg4, AZ2 und C65 in gleichen Anteilen. EL47 Zellen wurden separat mit den Modell TMDn transformiert und in LB-Medium ÜN wachsen gelassen. Anschließend wurden diese im selben Verhältnis gemischt und jeweils 1:100 in frisches LB-Medium mit 0,001 % Arabinose und steigenden Konzentrationen von Tetracyclin (0-8 μ g/ml) überimpft. Nach 20 h wurde jeweils aus jeder Tetracyclinkonzentrationsstufe eine Plasmidpräparation durchgeführt. Um die durchschnittliche β -Galaktosidaseaktivität der erhaltenen Plasmidpools zu ermitteln, wurden diese in FHK12 Zellen (*ctx::lacZ*) transformiert (Abb. 19).

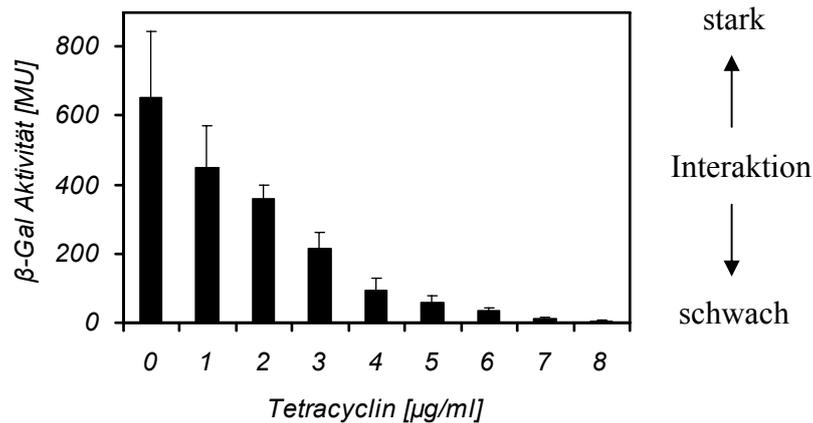


Abb. 19: Negativselektion mit EL47 (*ompT::tet^R*). EL47 Zellen (*ompT::tet^R*) wurden mit den Modell TMDn: Δ TMD, A16, eg4, AZ2 und C65 transformiert. Nach 20 h bei 37°C wurden diese in gleichen Anteilen gemischt. Diese Mischung wurde 1:100 in frisches LB-Medium (0,001 % Arabinose, 33 µg/ml Kanamycin und den angegebenen Konzentrationen von Tetracyclin) für 20 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Plasmid-Pools isoliert und diese in FHK12 Zellen retransformiert, um die durchschnittliche β -Galaktosidaseaktivität zu ermitteln. Jeder Balken zeigt die spezifische β -Gal Aktivität in lysierten Zellen, die aus einer ÜN-Kultur von 100-500 Transformanten in Anwesenheit von 0,005 % Arabinose (w/v) und 0,4 mM IPTG erhalten wurden (Mittelwerte \pm SD, n=3).

Wie erwartet, äußert sich eine erhöhte Interaktionsstärke der TMD in einer erniedrigten Expression des Tetracyclin-Resistenzproteins was sich durch reduziertes Überleben der Zellen in Anwesenheit hoher Tetracyclin Konzentrationen äußert (Abb. 19). Daher lassen sich mit diesem System niederaffine TMDn anreichern.

4.5.3 Kombinierte Positiv- und Negativselektion mit EL141

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten die Möglichkeiten der Positiv- und Negativselektion gezeigt wurden, wurde nun ein Stamm konstruiert, der beides beinhaltet. Zu diesem Zweck wurde EL141 entwickelt der durch eine simultane Positiv- und Negativselektion mittelaffine TMDn anreichert. Die Positivselektion bei niedrigen Konzentrationen von Chloramphenicol würde ToxR Konstrukte abreichern, die nur eine sehr geringe Transkriptionsaktivierung verursachen (verkürzte, oder nicht in die Membran integrierte Sequenzen). Eine simultane Negativselektion würde sehr stark interagierende TMDn aus dem Pool der Bibliothek entfernen.

EL141 (*ompT::tet^R/ompU::cat*) wurde mit der Bibliothek (Abb. 9) transformiert und bei 37°C inkubiert. Nach 20 h wurden die Zellen 1:100 in LB-Medium überimpft und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chloramphenicol (3-30 µg/ml) und Tetracyclin (0-5 µg/ml) kultiviert. Danach wurde von Zellen, die unter diesen Bedingungen Wachstum zeigten, die Plasmid DNA präpariert. Um die durchschnittliche β -Galaktosidaseaktivität der Plasmidpools zu ermitteln, wurden diese in FHK12 Zellen (*ctx::lacZ*) transformiert (Abb. 20). In einem Experiment wurde ausschließlich eine Positivselektion (steigende Konzentrationen von Cm (3-30 µg/ml) in Abwesenheit von Tet) durchgeführt. Der steigende Durchschnitt der β -Gal Aktivität mit steigender Konzentration von Cm zeigte, dass eine schrittweise Anreicherung von mittelstark und stark interagierenden TMDn stattgefunden hat. In einem anderen Experiment wurde eine Negativselektion (steigende Tet Konzentration; 0-5 µg/ml) in Anwesenheit von einer niedrigen Cm Konzentration (3 µg/ml) durchgeführt. Dies führte mit steigender Tet Konzentration zu niedrigeren β -Gal Aktivitätswerten. Somit ließ sich eindeutig die Abreicherung (Negativselektion) von stark interagierenden TMDn nachweisen. Der dritte experimentelle Ansatz bestand in der Kombination von niedriger Tet (1 µg/ml) und mäßiger Cm (8 bzw. 12 µg/ml) Konzentration. In diesem Fall konnten nur mittelstarke β -Gal Aktivitätswerte detektiert werden. Die Interaktion der dafür verantwortlichen TMDn ist damit ebenfalls nur mittelstarker Natur.

Die kombinierte Positiv-/Negativselektion mit EL141 Zellen ermöglichte also die gleichzeitige Abreicherung von sehr stark und schwach interagierenden TMDn aus einer kombinatorischen Bibliothek.

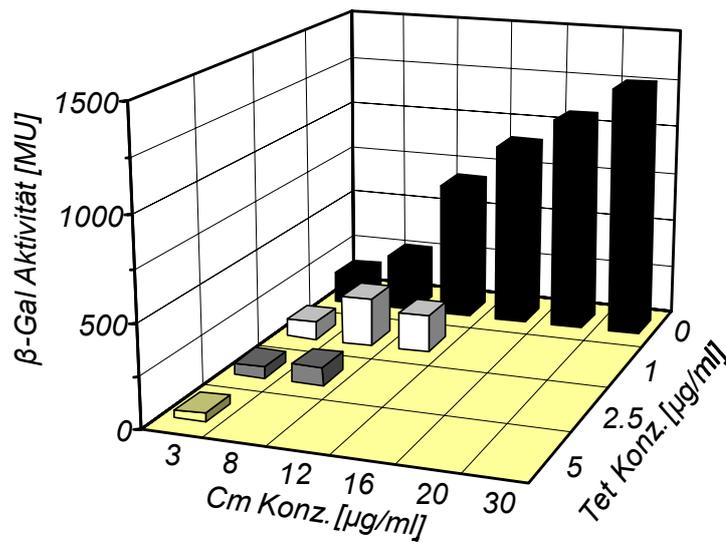


Abb. 20: Kombinierte Positiv- und Negativselektion mit EL141 Zellen. Transkriptionsrepression des *ompT* Promotors (*ompT::tet^R*) und Aktivierung des *ompU* Promotors (*ompU::cat*) durch die Dimerisierung der exprimierten ToxR Fusionsproteine (Bibliothek, Abb. 13) in *E. coli* (EL141). EL141 Zellen wurden mit der Bibliothek transformiert und bei 37°C inkubiert. Nach 20 h wurden sie 1:100 in LB-Medium (0,0025 % Arabinose (w/v) und den angegebenen Konzentrationen von Tetracyclin (0, 1, 2,5 und 5 $\mu\text{g/ml}$) und von Chloramphenicol (3, 8, 12, 16, 20 und 30 $\mu\text{g/ml}$) überimpft und ÜN bei 37°C kultiviert. Nach 24 h wurde aus den Proben, welche ausreichend Wachstum zeigten ($\text{OD}_{600} \geq 0,8$), die DNA präpariert und in FHK12 Zellen retransformiert (positiver ToxR-Assay), um die durchschnittliche β -Galaktosidaseaktivität zu ermitteln. Unter Bedingungen wo keine Balken gezeigt sind, erfolgte kein Wachstum. Jeder Balken zeigt die spezifische β -Gal Aktivität in lysierten Zellen, die aus einer ÜN-Kultur von 100-500 Transformanten in Anwesenheit von 0,005 % Arabinose (w/v) und 0,4 mM IPTG erhalten wurden. Die Standardabweichungen aller Proben sind $< 12\%$.

4.6 Kombinierte chromosomal und plasmidständige Reportergerkonstrukte

4.6.1 Charakterisierung der EL61+pOMPll - Zellen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Prozedur zur Selektion von stark, mittelstark und schwach interagierenden TMDn erläutert. Bei allen Systemen ist nach der Selektierung der TMDn eine nachfolgende Transformation in einen anderen Bakterienstamm, zur Quantifizierung der Affinität über die β -Gal Aktivität, notwendig.

Es wurde ein Stamm hergestellt (EL61+pOMP_{II}), der alle Funktionen (Positivselektion; Negativselektion; Blau-Weiß-Assay; ToxR-Assay) vereint. Diese Zellen enthalten folgende genetische Elemente: chromosomal integrierte *ompU::cat* Fusion (erlaubt eine Positivselektion), plasmidständige *ompT::tet^R* Fusion (pOMP_{II}, erlaubt eine Negativselektion), plasmidständige *ompU::lacZα* oder *ompT::lacZα* Fusion (pOMP_{II}, erlaubt einen β-Gal Aktivitätstest (ToxR Assay) und einen Blau-Weiß Assay. Hierfür wurden die verschiedenen TMDn (ToxV-Vektor) in EL61+pOMP_{II} Zellen transformiert und die β-Gal Aktivität nach 20 h Wachstum ermittelt (Abb. 21 und 22).

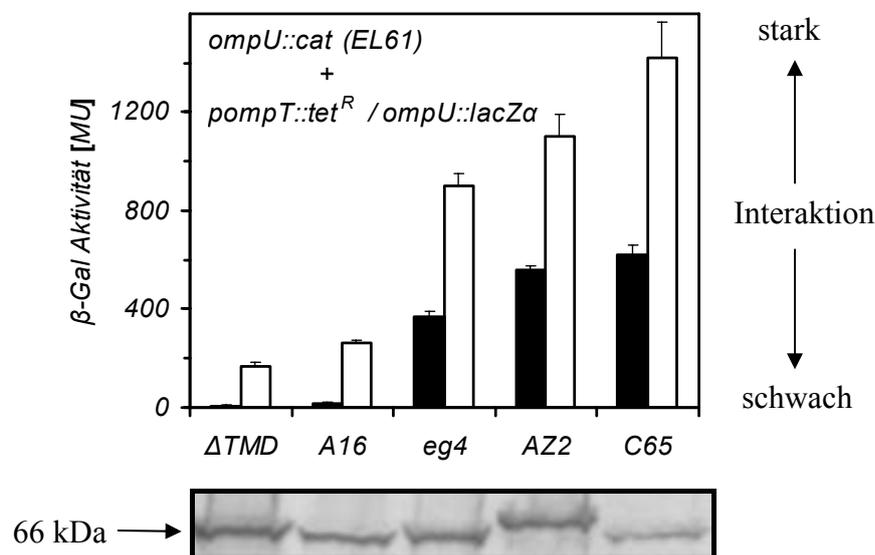


Abb. 21: Positiver ToxR Assay mit EL61+pOMP_{II}-*ompT::tet^R/ompU::lacZα*. Transkriptionsaktivierung des *ompU* Promotors (auf Plasmid lokalisiert; pOMP_{II}; *ompU::lacZα*) durch die Dimerisierung des exprimierten ToxR Fusionsproteins in *E. coli* (EL61 + pOMP_{II}-*ompT::tet^R/ompU::lacZα*). Jeder Balken zeigt die spezifische β-Galaktosidaseaktivität in lysierten Zellen, die aus einer ÜN-Kultur von 100-500 Transformanten in Anwesenheit von 0,00025 % (■) oder 0,001 % (□) Arabinose (w/v) und 0,5 mM IPTG erhalten wurden (Mittelwerte ± SD, n=3). Westernblotanalyse des Expressionsniveaus der Konstrukte bei 0,001 % Arabinose. Der Antikörper ist gegen die MalE-Domäne gerichtet.

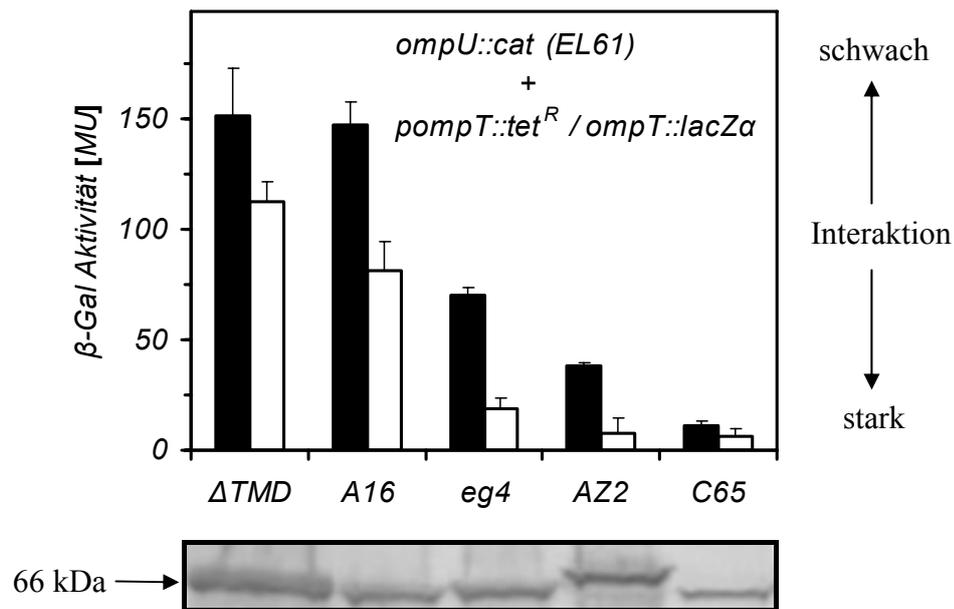


Abb. 22: Negativer ToxR Assay mit EL61+pOMP_{II}-ompT::tet^R/ompT::lacZ α . Transkriptionsaktivierung des *ompT* Promotors (plasmid lokalisiert; *ompT::lacZ α*) durch die Dimerisierung des exprimierten ToxR Fusionsproteins in *E. coli* (EL61 + pOMP_{II}-ompT::tet^R/ompT::lacZ α). Jeder Balken zeigt die spezifische β -Gal Aktivität in lysierten Zellen, die aus einer ÜN-Kultur von 100-500 Transformanten in Anwesenheit von 0,001 % (■) oder 0,0025 % (□) Arabinose (w/v) und 0,5 mM Isopropyl-1-thio- β -D-Galactopyranosid erhalten wurden (Mittelwerte \pm SD, n=3). Westernblot-analyse des Expressionsniveaus der Konstrukte bei 0,001 % Arabinose. Der Antikörper ist gegen die MalE-Domäne gerichtet.

Aus Abbildung 21 und 22 geht hervor, dass EL61+pOMP_{II} Zellen für einen ToxR-Assay eingesetzt werden können, da die Reihenfolge der Modell-TMDn identisch mit den vorher beschriebenen Systemen ist.

4.6.2 Selektion von interagierenden *E. coli* TMDn

Zu diesem Zweck wurde chromosomale *E. coli* DNA mit dem Restriktionsenzym *Sau3AI* (mit *Bam*HI kompatibel) verdaut. Dies resultierte in DNA-Fragmenten, die eine durchschnittliche Länge von 96 bp aufweisen. Diese wurden in den *Bam*HI verdauten ToxRV/ Δ TMD Vektor ligiert. Die erhaltene Bibliothek (Komplexität der Bibliothek 10⁶) wurde in EL61+pOMP_{II}-ompT::tet^R/ompU::lacZ α kloniert und auf LB-Agar (ohne Arabinose, 0,5 mM IPTG und 0,008 % X-Gal) plattiert. Die Kolonien, die eine deutliche Blaufärbung zeigten (interagierende TMDn), wurden gepickt und separat in

frisches LB-Medium (0,001 % Arabinose, 0,5 mM IPTG) überimpft. Nach 20 h wurde die β -Gal Aktivität bestimmt (Abb. 23).

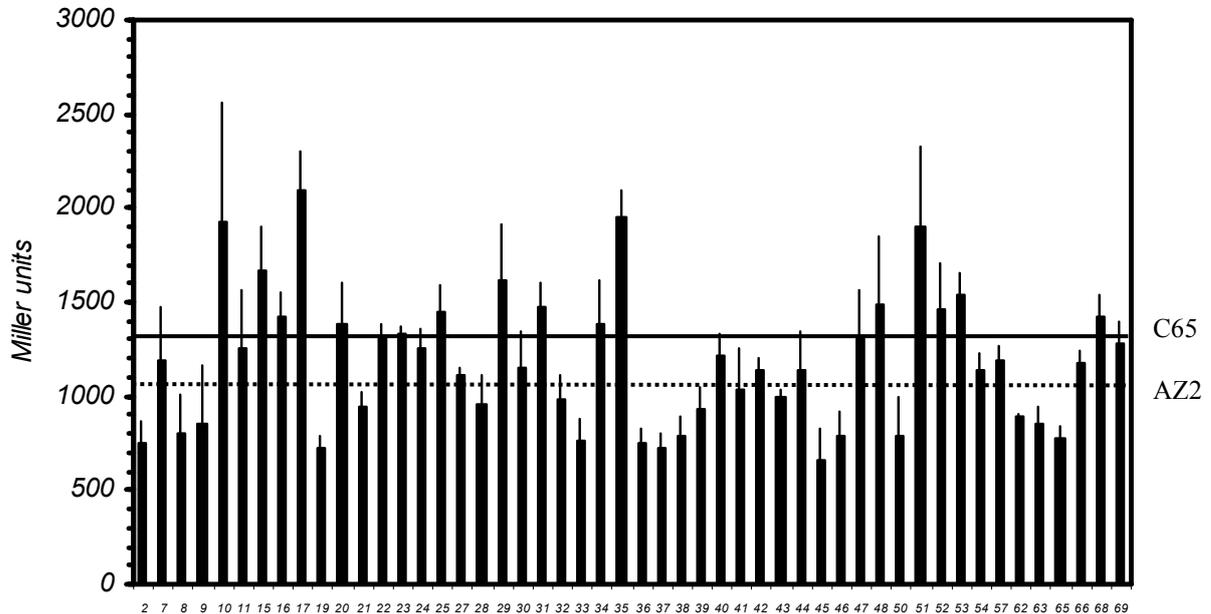


Abb. 23: Positiver ToxR Assay von natürlichen TMDn aus *E.coli*. Transkriptionsaktivierung des *ompU* Promotors (auf Plasmid lokalisiert; pOMPII; *ompU::lacZ α*) durch die Dimerisierung des exprimierten ToxR Fusionsproteins in *E. coli* (EL61 + pOMPII-*ompT::tet^R/ompU::lacZ α*). Jeder Balken zeigt die spezifische β -Galaktosidaseaktivität (Miller units) in lysierten Zellen, die jeweils aus einer Δ -Kultur in Anwesenheit von 0,001 % Arabinose (w/v) und 0,5 mM IPTG erhalten wurden. —, Durchschnittliche β -Galaktosidaseaktivität von TMD C65;, durchschnittliche β -Galaktosidaseaktivität von TMD AZ2.

Anschließend wurde die Plasmid-DNA isoliert und die TMD Sequenz durch DNA-Sequenzierung ermittelt. Der Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit der Datenbank (*E.coli* Chromosom) ließ eine eindeutige Identifizierung der meisten Proteine, welche die jeweilige TMD beinhaltete, zu (Proteine und Sequenzen sind in Tab. 2 aufgelistet). Durch den Einsatz eines Computerprogramms (ExpASY Proteomics Server: TMpred) konnten die Aminosäuren, die den TMD-Bereich beschreiben, vorhergesagt werden.

Alle selektierten Klone besitzen einen mit hydrophoben Aminosäuren besetzten Sequenzabschnitt (bekannte und putative polytopische Membranproteine). Dies weist darauf hin, dass das oligomerisierte ToxR-Protein seine stärkste Transkriptionsaktivierung ausbildet, wenn das Konstrukt in oder an der Membran lokalisiert ist, da keine hydrophilen Sequenzabschnitte identifiziert wurden. Des

Weiteren beträgt die Länge der TMD durchschnittlich 21 Aminosäuren und ist somit länger als die beschriebenen Modelltransmembrandomänen.

Die aus *E. coli* selektierten interagierenden TMDn haben offensichtlich neue Interaktionsmotive, die durch zukünftige Mutationsanalysen detaillierter untersucht werden könnten.

Tab. 2: Liste der identifizierten natürlichen TMDn aus *E. coli* (unbekannte Sequenzen sind mit einem „?“ markiert, putative TMDn Bereiche sind hervorgehoben, „*“ symbolisiert ein Stopp)

Klon Nr.	<i>E. coli</i> Gen	TMD Aminosäuresequenz
K2	<i>dacA</i>	GNRARIEQRPLVVLQEIPEGNFFGKIIDYIKLMFHHWFG*
K7	<i>hs10</i>	GNRARILENHDYPQPVKNVLAELLVATSLLTATLKFDG DITVQLQGDGPMNLAVINGN
K8	<i>mhpT</i>	GNRARIRATGVGTAVAVGRLGAMSGPLLAGKMLALGT GTVGVMAASAPGILVAGLAVLFDE
K9	<i>dinF</i>	GNRARITVLGARLGSDIIAVNAVLMTLLTFTAYALDGFA YAVEAHSG
K10	<i>gudP</i>	GNRARIVMGMLLSMVMVFCNYVNVWMI
K11	<i>glpG</i>	GNRARIWIVAGWFDLFGMSMANGAHIAGLAVGLAMAF VDSL NARKRK
K15	<i>rnhA</i>	GNRARIWRVIAVLIAVIYVRLVVLQFDSITGSLPEMLKQV EIFTDGSCLGNPGGYGAILRYRGREKTFSAGYTRTTN
K16	<i>ldrC</i>	GNRARILAGIITAAIVSWWRNRK
K17	<i>ascF</i>	GNRARIGSAISALVYTIHGYLGWLSVAIMGALWPLLVM TGMHRVFTATIIQTIAETGKEGMVMPSEI
K19	?	GNRARICLKVKIYKELSMSVPSF

K20	<i>ygaP</i>	GNRARIAAGGLILIGVVLGYTVNSGFFLLSGFVGAGLL FAGISGFCGMARLLDKMPWNQRA*
K21	?	GNRARIALLLFVLGRAGCLNDGGIHQSA LGHHDGCFGQ PAIDGLEH
K22	<i>yeaV</i>	GNRARIATVGALTISLVVTAATFTRGLSALTGLPDNFTV QAFVILINPR
K23	<i>ydgR</i>	GNRARIVAFILMLEAIIFFVLYSQMPTSLNFFAIRNVEHSI LGLAVEPEQYQALNPFWILINQG
K24	<i>aroP</i>	GNRARITAAEADNPEQSIPKATNQVIYRILIFYIGSLAVLL SLMPWTRVTADTSPFVLILINQGN
K25	<i>cysU</i>	GNRARITNPQVVAAYKVTLLSAFVASIFNGVFGLLMAW ILINPSQSSF
K27	<i>yadH</i>	GNRARIHRFMRIWVQTLVPPVITMTLYFIIFGNLIGSRIG DMHGFSYMQFIVPG
K28	<i>yjcE</i>	GNRARIKNIANRERMVIFFTILIMTLVVSLSGVVTRVMPF QIRSPSH
K29	<i>yhcP</i>	GNRARIRAPLLMILVCCIWAGFCTWISSLVRIENSYAW GLAGYTALILINPSQ
K30	<i>eamA</i>	GNRARIMSHSTRPAVMSLVIWSALIPIIPFFVASLILDGSA TMIHSLVTIDMTTILSLMYLAFV
K31	<i>ymfR</i>	GNRARIMLILAPLVGVLGALLLAYGAWLIYPPAGFVVA GALCLFWSWLVARVLDRTQSSVGGGK
K32	?	GNRARINTNMKYWSWMGAFSLSMLFWAELLWILINQA NPALNP
K33	<i>mhpT</i>	GNRARIRATGVGTAVAVGRLGAMSGPLLAGKMLALGT GTVGVMAASAPVFLLLGWRCLFDEPRS

K34	<i>hyfD</i>	GNRARIYSTGYLTDKNREHPHNGTNRYYAFLLVFIGAM AGLVLSSTLLGQLLFFEITGGCSWALILINP
K35	<i>yiaB</i>	GNRARIVMKTSKTVAKLLFVVGALVYLVGLWISHFFINISY TLCENIFVLHLLIIN
K36	<i>abrB</i>	GNRARIIFSMRGITLQLPRSAFLAAQAILGCMIAQTSLVRFS PPWASTGRS
K37	<i>yhaO</i>	GNRARISSRGEKLLFKISTGMVLTKLLVVAALGVSMVG MWHLYTSVRYPLGLLVKTPLL
K38	<i>setB</i>	GNRARIWNYHAVFWFAMVMIATLFCLLRIKDV
K39	?	GNRARINHALRRQPNFIGETGEIILPLAVVLANGINRFP VTELFQSFADVLHRRLVAAC
K40	<i>cusA</i>	GNRARIRGKIPPESSNPLNRFLIRVYHPLLLKVLHWPKTT LLVAALSVLTVLWPLNKLAIL
K41	<i>emrB</i>	GNRARIPLTGWLAKRVGEVKLFLWSTIAFAIASWACGV SSSLNMLILINPSQ
K42	<i>yeiH</i>	GNRARIIDVLTLSSTFLLACFLGQKVFGLDKHTSWLILI TQANPALNP
K43	<i>agaC</i>	GNRARIAGFLFVCYIQVSNLLPVAVLGAGFAVYEFFNAK SGSKRNRSPVPKMKKRRTTAMG
K44	?	GNRARIMTHIMTMMIITTMVAVIVTVMAGNTTATTSIST STISTVSPVSI
K45	<i>yfeX</i>	GNRARIHILSLRHVDNFSVAQAAMEAFGDCIEVKEEILINP SQSSFKPLTDI
K46	<i>yejM</i>	GNRARILFPLTFIVGSQRLMRFLSVILATAGMTLLLILIN QANPALNP
K47	<i>yfeO</i>	GNRARIIGVLTTLTGIAVGLVIRFSQGHAGP

K48	<i>mutS</i>	GNRARIITGPNMGGKSTYMRQTALIALMAYIGSYVPAQ KVEIGPIDRIFTA
K50	<i>yghB</i>	GNRARILPIALLTAGLLGTLFVVIKKKCYCN
K51	<i>treB</i>	GNRARILGIVLGVTLVSPQLMNAYLLGQQLPEVWDFG MFSIAKVG YQAQVILINQANP
K52	<i>dcuB</i>	GNRARIAIVAVYGIWMAETMFGAHMSEIQGVLGEMV KEYPWAYAIVLLLVSKEV
K53	<i>yefT</i> (10-50)	GNRARIKGLCICLVVIYHSVITFYPHLTTFQHPLSEVLSK CWILINPSQSSFKPLTDIKIEGGKLV
K54	<i>yefT</i> (90-140)	GNRARIWNIFWVLTWGVVQWLALSALNQWLAPERD LSNASNAAYADSTGEFLHGMI
K57	<i>nuoM</i>	GNRARIPRFGISIH LAIDGLSLLMVVLTGLLGVLAVLCS WKEI
K62	<i>hyfB</i>	GNRARIRPIVSATQRLAKEIQHLQSGDFRLYCLYVVAAL VLLIAIAV
K63	<i>rnfD</i>	<i>GNRARIIAKQLYGGLGQNPFPAMIGYVLLILINPSQSSF</i> KP
K65	<i>ptsG</i>	GNRARIGVALGFTNNDGVSALAAVVAYGIMVKTMAVV APLVLHLP AEEIASKHLADTGVLGGIISGAIPINPSQSS
K66	<i>yjhF</i> (285-340)	GNRARIYTMGLGRGKTIPDLMDSCGKAIAGIAGLLLIIG GGGAFKQVLIDSGVGQYISTLGS
K68	<i>yhjO</i>	GNRARIFLTAPLAFLLHAYIIYAPALMILINPSQSSFKPLT DIKIEEGKLV I WINGDKGYNGLAEVGKEFGKDTGLKS
K69	<i>yhfC</i>	GNRARIAAFLLARSIEWYWVYACIGLVYVAIFILTFGCE FPALGKHAPKTDAPVEKEK WGI

4.7 Verlängerung der Transmembrandomäne

Nachdem in Abschnitt 4.6 interagierende TMDn aus *E. coli* identifiziert wurden (TMDn sind durchschnittlich 21 Aminosäuren lang), sollte nun die Hypothese der verstärkten Affinität aufgrund der verlängerten TMD untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Modell TMD AZ2 um eine Heptade verlängert (AZ2₍₂₃₎; Abb. 24).

```

                                ga..de.ga..de.ga..de.ga
AZ2      : LLAALLALLAALLALL
AZ2(23) : LLAALLALLAALLALLAALLALL

```

Abb. 24: Aminosäuresequenzen von AZ2 und AZ2₍₂₃₎. Die Positionen des Heptadenmotivs a, d, e und g sind hervorgehoben.

Aus Abbildung 25 geht hervor, dass die Verlängerung der TMD (AZ2₍₂₃₎) eine erhöhte Interaktionsaffinität (ca. 3,5 bis 5-fach) zur Folge hat. Des Weiteren wird ersichtlich, dass durch die Erhöhung des Expressionslevels (steigende Konzentration des Induktors Arabinose) die β -Galaktosidaseaktivität nicht weiter zunimmt. Dies weist auf das Erreichen eines Maximums der Transkriptionsaktivierung des *ctx* Promotors hin. Um das Expressionslevel der Fusionsproteine zu erniedrigen, wurden neben der Abwesenheit des Induktors (Arabinose) zusätzlich steigende Konzentrationen von Glukose eingesetzt (Abb. 26). Da der Arabinose induzierbare Promotor, der die Expression der ToxR/TMD-Fusionsproteine kontrolliert, CRP (*cyclic AMP receptor protein*) abhängig ist [85], bewirkte dies eine herabgesetzte Basalexpression (Glukose erniedrigt die Konzentration von cAMP in der Zelle. CRP erhält die zur Bindung an die Promotor-DNA nötige Affinität erst, wenn zyklisches AMP (cAMP) in genügend hoher Konzentration in der Zelle vorliegt.) In diesem Experiment konnte eine Steigerung der Interaktionsaffinität von AZ2₍₂₃₎ um das ca. 17-fache gegenüber AZ2 detektiert werden (Abb. 26). Die Möglichkeit, dass das Expressionsniveau der ToxR/AZ2 und der ToxR/AZ2₍₂₃₎ Variante unterschiedlich ist, konnte jeweils mit einer Westernblotanalyse ausgeschlossen werden.

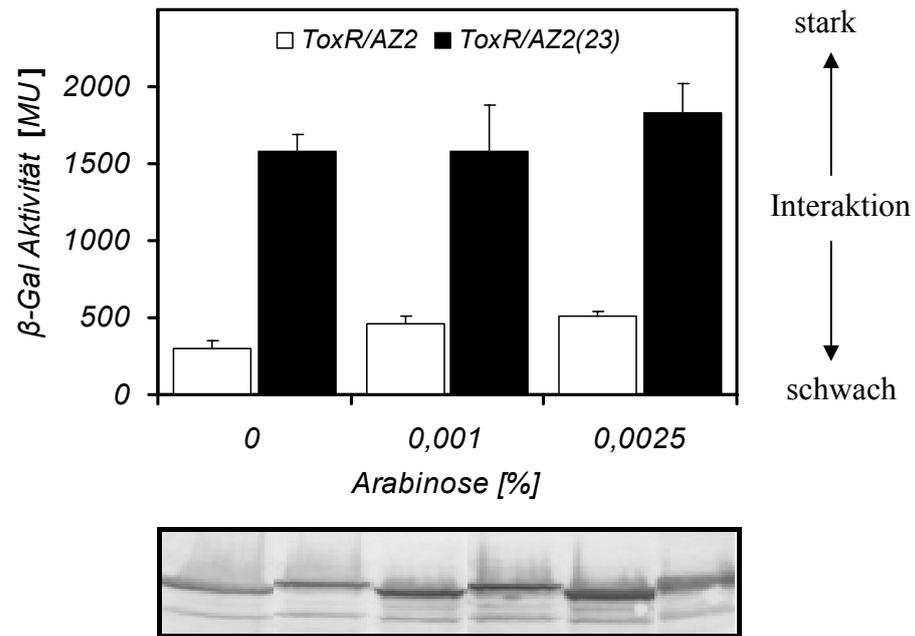


Abb. 25: Positiver ToxR Assay mit FHK12 Zellen. Transkriptionaktivierung des *ctx* Promotors (*ctx::lacZ*) durch die Dimerisierung des exprimierten ToxR Fusionsproteins (ToxR/AZ2 und ToxR/AZ2₍₂₃₎ auf dem ToxRV-Plasmid lokalisiert) in *E. coli* (FHK12). Jeder Punkt zeigt die spezifische β -Galaktosidaseaktivität in lysierten Zellen, die aus einer ÜN-Kultur von 100-500 Transformanten in Anwesenheit von 0 %, 0,001 % bzw. 0,0025 % Arabinose (w/v) und 0,4 mM Isopropyl-1-thio- β -D-Galactopyranosid erhalten wurden (Mittelwerte \pm SD, n=3). Der Western-Blot (anti-MalE) zeigt die Expression des ToxR-Fusionsproteins der Gesamtzellextrakte. Gezeigt ist nur die 60-70 kDa Region des Western-Blots.

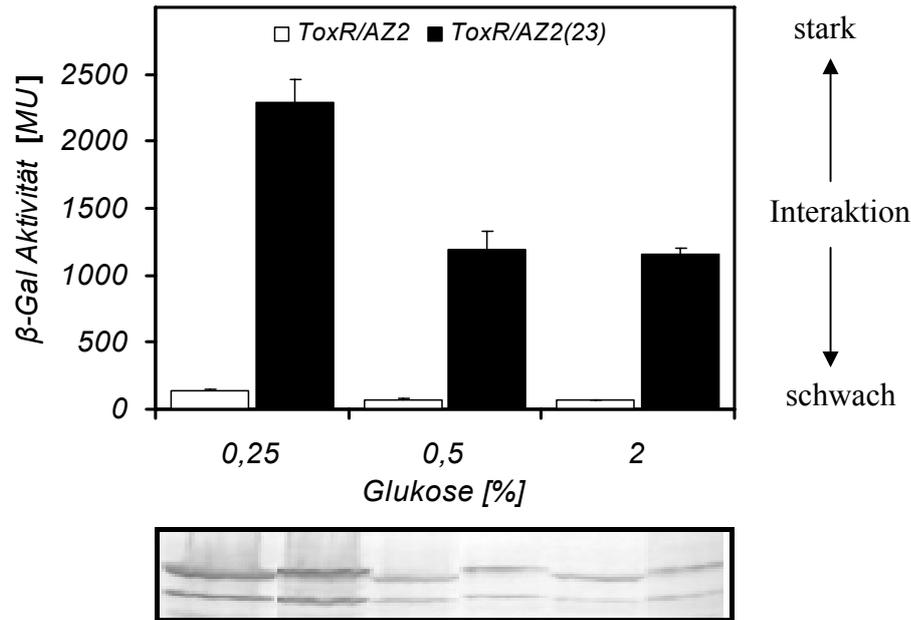


Abb. 26: Positiver ToxR Assay mit FHK12 Zellen. Transkriptionaktivierung des *ctx* Promotors (*ctx::lacZ*) durch die Dimerisierung des exprimierten ToxR Fusionsproteins (ToxR/AZ2 und ToxR/AZ2₍₂₃₎ auf dem ToxRV-Plasmid lokalisiert) in *E. coli* (FHK12). Jeder Punkt zeigt die spezifische β -Galaktosidaseaktivität in lysierten Zellen, die aus einer ÜN-Kultur von 100-500 Transformanten in Abwesenheit von Arabinose und Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Glukose (0,25 %, 0,5 % bzw. 2 % (w/v)) und 0,4 mM IPTG erhalten wurden (Mittelwerte \pm SD, n=3). Der Western-Blot (anti-MalE) zeigt die Expression des ToxR-Fusionsproteins der Gesamtzellextrakte. Gezeigt ist nur die 60-70 kDa Region des Western-Blots.

Um die Einbaueffizienz der beiden Konstrukte (AZ2 und AZ2₍₂₃₎) in die Membran überprüfen zu können, wurden diese Plasmidvarianten in den MalE defizienten *E. coli* Stamm (PD28) transformiert [74]. Nur wenn die MalE-Domäne im Periplasma lokalisiert ist, kann dieser Stamm Maltose als Kohlenstoffquelle verwenden und somit wachsen. Daher wurden Wachstumskurven aufgenommen, wobei das Δ TMD Konstrukt (MalE ist im Cytoplasma lokalisiert) als Negativkontrolle diente (Abb. 27). Aus diesem Experiment konnten eindeutige Unterschiede im Wachstumsverhalten der beiden Konstrukte detektiert werden. Dies führt zu der Annahme, dass das verlängerte Konstrukt schlechter in die Membran integriert ist. Es ist daher vorstellbar, dass die verstärkte Interaktionsaffinität von AZ2₍₂₃₎ teilweise auf die Lokalisierung im Cytoplasma zurückzuführen ist. Allerdings könnten die MalE-Domänen durch die Verlängerung der TMD im Periplasma anders positioniert sein, welches zu einem Aktivitätsverlust (verringerte Bindungsaktivität von Maltose des Maltosebindeproteins (MalE); z.B. sterische Hinderung) führt.

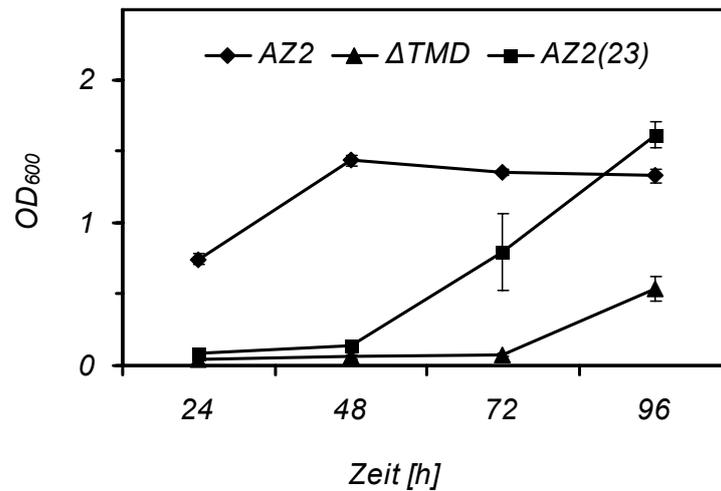


Abb. 27: Kontrolle der Membranintegration von AZ2 und AZ2₍₂₃₎. Die Plasmide ToxRV/AZ2, ToxRV/AZ2₍₂₃₎ und ToxRV/ΔTMD (Negativkontrolle) wurden in PD28 Zellen transformiert und in Minimalmedium (Maltose als einzige Kohlenstoffquelle) wachsen gelassen [56]. Die optische Dichte (OD₆₀₀) wurde nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und gibt die Effizienz der Membranintegration des jeweiligen Konstruktes wieder (Mittelwerte ± SD, n=3).

4.8 Zusammenfassung der ToxR-Systeme

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Konstruktion und Anwendung neuer *E. coli* Reporterstämme erläutert, die chromosomal integrierte bzw. plasmidständige Fusionen des *ctx*, *ompU* und *ompT* Promotors mit *lacZ α* , *lacZ*, *cat* und *tet^R* als Reportergene beinhalten. Abbildung 28 und Tabelle 3 zeigen einen Überblick der bereits bekannten und neuen auf dem ToxR Protein basierenden Systeme.

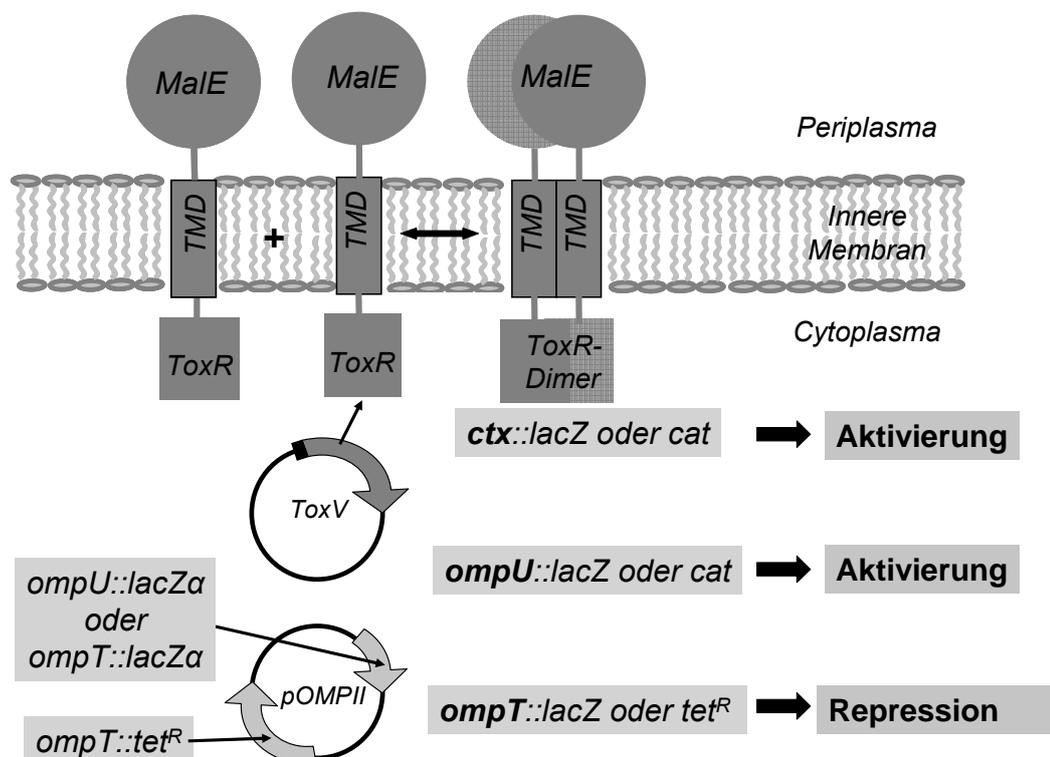


Abb. 28: Überblick des erweiterten ToxR Systems. Die cytoplasmatische ToxR Domäne ist über eine variable TMD mit dem periplasmatischen MalE-Teil verbunden. Bei der Dimerisierung (Oligomerisierung) des Fusionsproteins durch deren TMDn wird der *ctx*-Promotor bzw. *ompU*-Promotor aktiviert und der *ompT*-Promotor reprimiert. Dies führt zur Expression der Reporterproteine LacZ, LacZ α bzw. CAT (*ompU* Transkriptionskontrolle) oder Repression von LacZ, LacZ α bzw. Tet^R (*ompT* Transkriptionskontrolle). ToxV, Plasmid mit ColE1 Replikationsursprung (*high copy number*); pOMP_{II}, Plasmid mit p15A Replikationsursprung (*low copy number*); ToxR, ToxR-Transkriptionsaktivatordomäne; TMD, Transmembrandomäne; MalE, Maltosebindepotein; *ctx*, *ctx*-Promotor (TTTTGAT)₇; *ompU*, *ompU*-Promotor; *ompT*, *ompT*-Promotor; *lacZ*, Gen der β -Galaktosidase; *cat*, Gen der Chloramphenicolacetyltransferase; *lacZ α* , Gen des α -Fragmentes der β -Galaktosidase; *tet^R*, Gen des Tetracyclinresistenzproteins.

Tabelle 3. Überblick der auf ToxR basierenden Systeme

Stamm / Plasmid	Promotor	Reporter Gen	Anwendung	Referenz
FHK12	<i>ctx</i>	<i>lacZ</i>	Positiver ToxR Assay	Kolmar et al., 1994
EL81	<i>ompT</i>	<i>lacZ</i>	Negativer ToxR Assay	Diese Arbeit
EL83	<i>ompU</i>	<i>lacZ</i>	Positiver ToxR Assay	Diese Arbeit
Chr3	<i>ctx</i>	<i>cat</i>	Positivselektion	Gurezka und Langosch, 2001
EL55	<i>ompU</i>	<i>lacZα</i>	Blau-Weiß-Assay	Diese Arbeit
EL47	<i>ompT</i>	<i>tet^R</i>	Negativselektion	Diese Arbeit
EL61	<i>ompU</i>	<i>cat</i>	Positivselektion	Diese Arbeit
EL141	<i>ompT</i>	<i>tet^R</i>	Negativselektion	Diese Arbeit
	<i>ompU</i>	<i>cat</i>	Positivselektion	
	<i>ompU</i>	<i>cat</i>	Positivselektion	
EL61 + pOMPII (ompTtet^R/ompTlacZα)	<i>ompU</i>	<i>cat</i>	Positivselektion	Diese Arbeit
	<i>ompT</i>	<i>tet^R</i>	Negativselektion	
	<i>ompT</i>	<i>lacZα</i>	Negativer ToxR Assay	
		Blau-Weiß-Assay		
EL61 + pOMPII (ompTtet^R/ompUlacZα)	<i>ompU</i>	<i>cat</i>	Positivselektion	Diese Arbeit
	<i>ompT</i>	<i>tet^R</i>	Negativselektion	
	<i>ompU</i>	<i>lacZα</i>	Positiver ToxR Assay	
		Blau-Weiß-Assay		

4.9 Detektion heterotypischer TMD-TMD Interaktionen mit dem dominant-negativem ToxR* Kompetitorsystem

Derzeitig wird das ToxR-System hauptsächlich zur Analyse von homotypischen TMD-TMD Interaktionen eingesetzt. Da viele Membranproteine als heterooligomere Komplexe vorliegen, ist es notwendig Techniken zu entwickeln, die diese Interaktionen detektieren können. Die Basis einer dieser Möglichkeiten ist der Kompetitoreffekt. Das Prinzip dieses Systems beruht auf der Interaktion einer TMD_(B) mit einer homotypisch interagierenden TMD_(A), wobei die konkurrierende TMD_(B) als Fusionsprotein mit einer inaktiven ToxR-Domäne (ToxR* = ToxR/S87G) koexprimiert wird. Bei erfolgreicher Konkurrenz der homo- durch die heterotypische Interaktion (ToxR-TMD_(A)/ToxR*-TMD_(B)) führt dies zu einer reduzierten Transkriptionsaktivierung und somit zu einem dominant-negativem Phänotyp (Abb. 29).

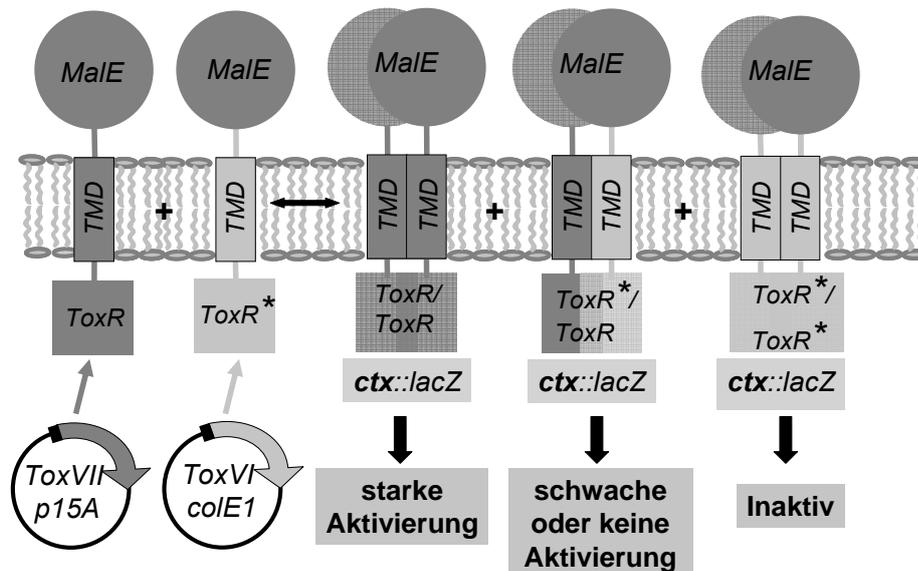


Abb. 29: Schematische Darstellung des dominant-negativen Systems. Transkriptionsaktivierung des *ctx* Promotors durch die Homodimerisierung des exprimierten WT-ToxR Fusionsproteins (dunkelgrau; auf ToxVII-Plasmid mit p15A Replikationsursprung lokalisiert). Schwache bzw. keine Transkriptionsaktivierung wird durch ein Heterodimer von WT-ToxR und der ToxR* Mutante (hellgrau; auf ToxVI-Plasmid mit colE1 Replikationsursprung lokalisiert; ToxR* = ToxR/S87G) bzw. durch ToxR* Homodimere in *E. coli* hervorgerufen. MaIE, Maltosebindeprotein; *lacZ*, β -Galaktosidasereporter gen.

4.9.1 Identifikation einer inaktiven ToxR-Mutante

Das ToxR Protein gehört zur OmpR Familie von Transkriptionsaktivatoren, die an eine DNA Zielsequenz mit dem *helix-winged-helix* Motiv binden [86, 87]. Die 3D Struktur des OmpR Proteins wurde mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt [88]. Zwei OmpR Helices (alpha 2 und alpha 3) und die sie verbindende Schleife (10 Aminosäuren) bilden das DNA-Bindemotiv. Der in Abb. 31 (a) abgebildete Sequenzvergleich zwischen diversen Mitgliedern der OmpR-Familie (ToxR, TcpP, CadC und PsaE) zeigt den homologen Bereich der alpha 3 Region (Position S87; grau unterlegt) [89]. Um eine inaktive ToxR Domäne zu erhalten, wurden verschiedene Punktmutanten hergestellt. Neben der bereits erwähnten Position S87 ergaben sich aus einem Sequenzvergleich des gesamten ToxR-Proteins weitere konservierte Aminosäuren (E51, P62, K110), die sich für inaktivierende Punktmutationen in der ToxR Domäne eignen würden. Um den Sequenzraum möglichst vollständig abzudecken wurden „NNY“-Bibliotheken (Stopp-Codons sind ausgeschlossen) von ToxR Punktmutanten mit der MOE-PCR hergestellt (E51NNY, P62NNY, S87NNY und K110NNY). Die Kombination N = A, C, G, T / N = A, C, G, T / Y = C, T kodiert für Gly, Phe, Ser, Tyr, Cys, Leu, Pro, His, Arg, Ile, Thr, Asn, Val, Ala, Asp.

Um die Aktivität der mutierten ToxR-Domäne zu überprüfen, wurden die „NNY“-Bibliotheken (auf ToxRV lokalisiert) separat in EL83 Zellen (*ompU::lacZ*) transformiert und in LB-Medium $\bar{U}N$ wachsen gelassen. Danach wurde die durchschnittliche β -Galaktosidaseaktivität der Bibliotheken ermittelt (Abb. 30).

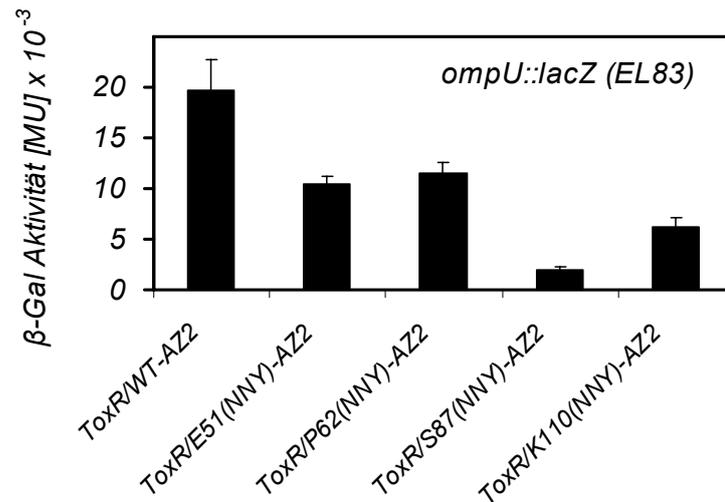


Abb. 30: Positiver ToxR Assay mit EL83 Zellen. Regulation des *ompU* Promotors durch das Modell ToxR(WT)-TMD(AZ2)-MalE Fusionsprotein und den ToxR(NNY)-TMD(AZ2)-MalE Bibliotheken. Jeder Balken zeigt die spezifische β -Galaktosidaseaktivität in lysierten Zellen, die aus einer ÜN-Kultur von 100-500 Transformanten in Abwesenheit von Arabinose und Anwesenheit von 0,4 mM Isopropyl-1-thio- β -D-Galactopyranosid erhalten wurden (Mittelwerte \pm SD, n=3).

Aus Abbildung 30 wird ersichtlich, dass der größte inaktivierende Effekt durch eine Punktmutation der ToxR Domäne an der S87 Position erzielt wurde, da die durchschnittliche β -Gal Aktivität gegenüber dem WT ca. 90 % niedriger ist. Daher wurde für eine inaktive ToxR Domäne Position Serin 87 gewählt und durch Glycin substituiert (ToxR/S87G = ToxR*).

4.9.2 Charakterisierung der inaktiven ToxR-Mutante S87G (ToxR*)

Der funktionelle Effekt der ToxR-Mutation auf die Transkriptionsaktivierung wurde mit zwei bereits beschriebenen TMDn (AZ2 und A16) untersucht (Abb. 31 (b)) [42]. Nach der Transformation und Expression in FHK12 Zellen zeigte TMD AZ2 mit der ToxR(WT) Domäne eine starke und TMD A16 nur eine schwache Interaktion (Abb. 31 (c)). Wurden jedoch die TMDn mit der ToxR-Mutante (ToxR*) exprimiert, führte dies in beiden Situationen nur zu einer basalen β -Gal Aktivität (Abb. 31 (c)). Diese war vergleichbar mit dem Aktivitätsniveau der Plasmid-Kontrolle, der das Gen des ToxR-Fusionsproteins fehlte. Die Möglichkeit, dass das Expressionsniveau der ToxR(WT)

und der ToxR* Variante unterschiedlich ist, konnte mit einer Westernblotanalyse ausgeschlossen werden (Abb. 31 (c)). Auch eine unterschiedliche Einbaueffizienz der beiden Konstrukte in die Membran konnte mit Hilfe des Integrationsassays ausgeschlossen werden. Hierfür wurden die Plasmid-Varianten in den MalE defizienten *E.coli* Stamm (PD28) transformiert [74]. Nur wenn die MalE-Domäne im Periplasma lokalisiert ist, kann dieser Stamm Maltose als Kohlenstoffquelle verwenden und somit wachsen. Daher wurden Wachstumskurven aufgenommen, wobei das Δ TMD Konstrukt (MalE ist im Cytoplasma lokalisiert) als Negativkontrolle diente (Abb. 31 (d)).

Die Ergebnisse zeigten, dass die S87G Mutation die Funktion der ToxR Domäne als Transkriptionsaktivator zerstört. Das reduzierte β -Gal Signal beruht nicht auf einem geringerem Expressionsniveau oder reduzierter Membranintegration.

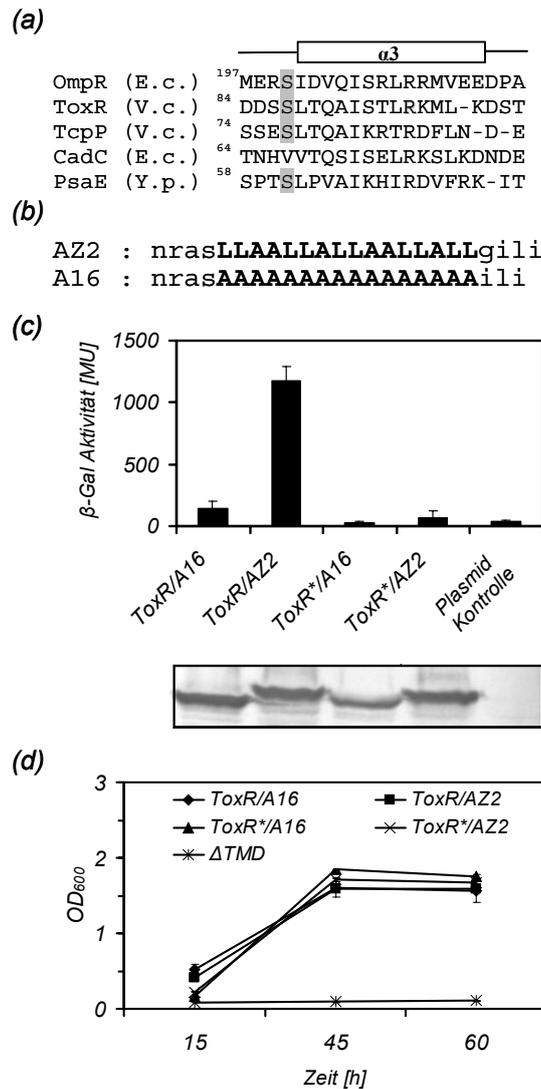


Abb. 31: Charakterisierung der inaktiven ToxR/S87G (ToxR*) Variante. (a) Sequenzvergleich der $\alpha 3$ Region (oberhalb der Sequenzen angegeben) von Transkriptionsaktivator Proteinen der OmpR Familie [89]. Der Aminosäurerest (S87), der für die Punktmutation ausgewählt wurde, ist grau unterlegt. (b) TMD Region der ToxR und ToxR* Fusionsproteinkonstrukte. TMD Aminosäurereste sind hervorgehoben und flankierende Sequenzen in Kleinbuchstaben wiedergegeben. (c) Regulation des *ctx* Promotors durch ToxR bzw. ToxR* Fusionsproteine. Transkriptionsaktivierung des *ctx* Promotors (*ctx::lacZ*) durch die Dimerisierung des exprimierten Fusionsproteins in *E. coli* (FHK12). „Plasmid-kontrolle“, Zellen die mit dem ToxRV Plasmid transformiert wurden, dem das Gen des ToxR-Fusionsproteins fehlt. Jeder Balken zeigt die spezifische β -Galaktosidaseaktivität in lysierten Zellen, die aus einer ÜN-Kultur von 100-500 Transformanten in Anwesenheit von 0,0025 % Arabinose (w/v) und 0,4 mM Isopropyl-1-thio- β -D-Galactopyranosid erhalten wurden (Mittelwerte \pm SD, n=3). Der Western-Blot (anti-MalE) zeigt die Expression der ToxR-Fusionsproteine der Gesamtzellextrakte. Gezeigt ist nur die 60-70 kDa Region des Western-Blots. (d) Kontrolle der Membranintegration. Angegebene Plasmide wurden in PD28 transformiert und in Minimalmedium (Maltose als einzige Kohlenstoffquelle) wachsen gelassen [56]. Die optische Dichte (OD_{600}) wurde nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und gibt die Effizienz der Membranintegration des jeweiligen Konstruktes wieder (Mittelwerte \pm SD, n=2).

4.9.3 Charakterisierung des dominant-negativen ToxR*-Systems

In diesem Experiment sollte gezeigt werden, dass die Selbstinteraktion der TMD AZ2, die als Fusionsprotein mit ToxR(WT) exprimiert wird, sequenzspezifisch mit einer ToxR*-TMD konkurriert. Hierfür wurden zwei genetisch kompatible Plasmide verwendet. Plasmid pToxVII kodiert das ToxR(WT) Fusionsprotein, während pToxVI die genetische Information für die inaktive ToxR* Variante beinhaltet (Abb. 29). pToxVII besitzt als Replikationsursprung p15A (*low copy number*) und pToxVI ColE1 (*high copy number*). In beiden Konstrukten steht das ToxR Fusionsprotein unter Transkriptionskontrolle der Arabinose Operator/Promotor Region (Abb. 39, Anhang). FHK12 Zellen wurden mit pToxVII/AZ2 bzw. pToxVI ohne Fusionsprotein (Plasmidkontrolle) und ToxR*/AZ2 bzw. ToxR*/A16 kotransformiert. Die Experimente wurden in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von 0,4 mM IPTG durchgeführt. Die resultierenden β -Gal Aktivitätswerte wurden miteinander verglichen.

In Abbildung 32 (a) ist gezeigt, dass die β -Gal Aktivität von ToxR/AZ2 in Anwesenheit des Kompetitors ToxR*/AZ2 um $\sim 64\%$ (+ IPTG) bzw. $\sim 83\%$ (- IPTG) erniedrigt ist. In beiden Fällen (+ oder - IPTG) konnte keine signifikante Erniedrigung der Reporterogenaktivität bei der Koexpression von ToxR*/A16 beobachtet werden. Daraus folgt, dass eine sequenzspezifische Interaktion detektiert werden kann. Der Membranintegrationstest (Abb. 31(d)) und die Westernblot-Analyse (Abb. 31(b)) schließen artifizielle Effekte (keine Membranintegration bzw. keine Expression) aus. Daraus folgt, dass eine Interaktion von ToxR/AZ2-ToxR/AZ2 effizient durch die Koexpression von ToxR*/AZ2 (Bildung des Komplexes ToxR/AZ2-ToxR*/AZ2) kompetetiert wird.

Die sequenzspezifische Interaktion von ToxR und ToxR* Fusionsproteinen mit TMDn führen zu nicht funktionsfähigen Komplexen und damit zu einem dominant-negativem Effekt. Daher kann die resultierende Erniedrigung der β -Gal Aktivität zur Identifizierung von heterolog interagierenden TMDn verwendet werden.

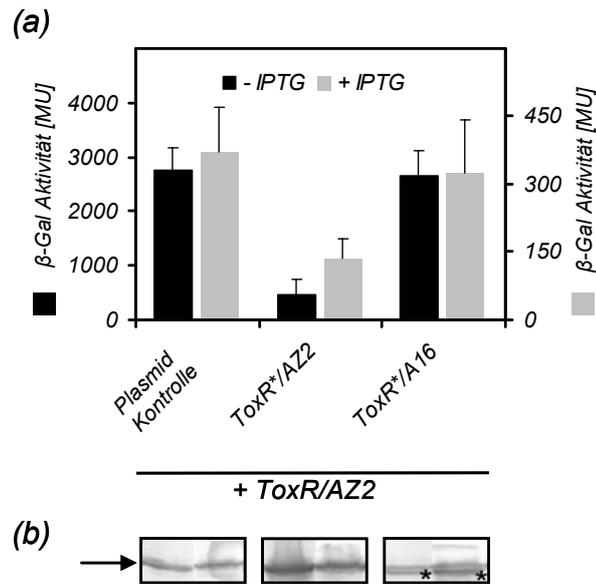


Abb 32: Charakterisierung des dominant-negativen ToxR*-Systems. (a) Regulation des *ctx* Promotors durch Kotransformation von FHK12 Zellen mit pToxVII/AZ2 und einem Kontrollplasmid (Gen des ToxR-Fusionsproteins fehlt) oder mit pToxVI Varianten, die für ToxR*/AZ2 oder ToxR*/A16 kodieren. Jeder Balken zeigt die spezifische β -Galaktosidaseaktivität in lysierten Zellen, die aus einer ÜN-Kultur von 100-500 Transformanten in Anwesenheit von 0,0025 % Arabinose (w/v) und 0,4 mM Isopropyl-1-thio- β -D-Galactopyranosid (■) oder ohne IPTG (■) erhalten wurden. (Mittelwerte \pm SD, n=3). (b) Der Western-Blot (anti-MalE) zeigt die Expression des ToxR-Fusionsproteins der Gesamtzellextrakte. Gezeigt ist nur die 60-70 kDa Region des Western-Blots. Der Pfeil markiert die Position von WT ToxR/AZ2 (pToxVII) und die Sterne die von ToxR*/A16 (pToxVI).

4.10 Analyse der ToxR/DNA Interaktion

Die Bindung eines Proteins an Nucleinsäuren kann durch verschiedene Wechselwirkungen hervorgerufen werden. Zu den unspezifischen Wechselwirkungen zählt man unter anderem die Bindung an das Zuckerphosphatgerüst der Nucleinsäuren. Dabei können positiv geladene Aminosäuren mit dem negativ geladenem Phosphatgerüst Salzbrücken ausbilden. Auch hydrophobe Wechselwirkungen oder Interaktionen von aromatischen Aminosäuren mit den in der DNA vorkommenden Basen können unspezifische Bindung zwischen Protein und DNA hervorrufen. Spezifische Bindung wird durch die selektive Wechselwirkung mit einer speziellen DNA-Sequenz angezeigt. Hier wechselwirkt das Protein über Wasserstoffbrücken mit den Basen der DNA [90]. Die Gelretardationsanalyse ist eine Methode, die DNA-Protein-Komplexe detektieren kann [91]. In einer Lösung besteht ein Gleichgewicht zwischen freiem Protein, freier DNA und Protein-DNA-Komplexen. Während einer nativen Gelelektrophorese wird der Komplex durch die Gelmatrix (Polyacrylamid) stabilisiert. Dieser Effekt wird als *caging* bezeichnet. Die lokale Konzentration des Komplexes wird erhöht, dabei erniedrigt sich wahrscheinlich die Diffusionsgeschwindigkeit [91]. Die elektrophoretische Mobilität der freien DNA unterscheidet sich von der des Komplexes, so dass beide Spezies im Gel voneinander getrennt werden können. Die Detektion erfolgt in der Regel durch radioaktive Markierung der DNA.

4.10.1 Reinigung von ToxR/AZ2 und ToxR/ Δ TMD über Ni-Sepharose

Die Reinigung der Proteine ToxR/AZ2 und ToxR/ Δ TMD sollte mit Hilfe einer *IMAC* (*immobilized metal affinity chromatography*) Affinitätschromatographie an Ni-Sepharose durchgeführt werden [84]. Wie bereits beschrieben, wurden 50 ml Kulturen der entsprechenden *E. coli* Stämme Top10/ToxV-ToxR/AZ2 bzw. Top10/ToxV-ToxR/ Δ TMD angezogen und die Expression der ToxR-Proteine mit 0,0015 % Arabinose induziert. Der Top10 Stamm eignet sich besonders für die Überexpression, da in diesem das Arabinoseoperon mutiert ist und somit Arabinose nicht als Kohlenstoffquelle benutzt werden kann. Somit steht der Induktor Arabinose (bindet an das Repressorprotein AraC) lange zur Verfügung. Aufgrund der in vorangegangenen

Wachstumsversuchen beobachteten Wachstumseinstellung nach einstündiger Induktion, wurde in diesem Fall erst bei einer OD_{600} von ca. 0,8 induziert, um eine möglichst hohe Zelldichte zu erreichen. Nach vierstündigem Wachstum (37°C , 250 rpm) wurden die Zellen abzentrifugiert. Die so gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden nun auf eine Ni-Sepharose *IMAC* Säule (Bettvolumen 5 ml) gegeben. Unspezifisch gebundene Proteine wurden von der Säule gewaschen und die ToxR-Proteine schließlich mit Hilfe eines Stufengradienten steigender Imidazolkonzentration eluiert. In der Elutionsfraktion mit 50 mM Imidazol sind noch deutliche Verunreinigungen durch *E.coli*-Proteine zu finden (Abb. 33, Spuren 2 und 6). Die Fraktion (75 mM Imidazol; Abb. 33, Spur 3 und 7) enthält weitestgehend das zu reinigende Protein (66 kDa) und sein Abbauprodukt (45 kDa, MalE).

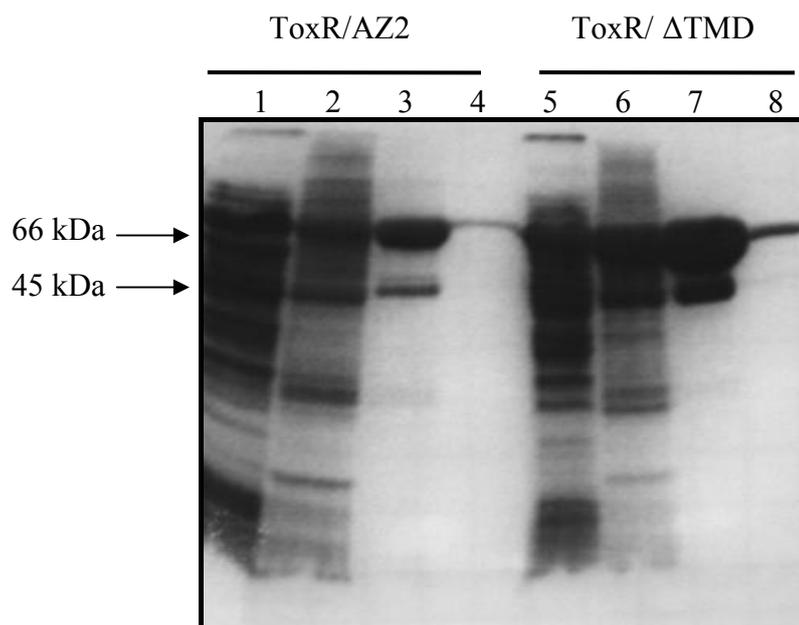


Abb. 33: Elektrophoretische Auftrennung (15 %-iges SDS-PAGE) der Fraktionen einer Reinigung von ToxR/AZ2 und ToxR/ΔTMD aus *E.coli* Zellextrakten (Proteine von mit ToxV-ToxR/AZ2 bzw. ToxV-ToxR/ΔTMD transformierten Zellen des Stammes Top10) über Ni-Sepharose *IMAC*. Eluiert wurde mit einem Imidazol Stufengradienten. 1/5: Durchlauf. 2/6: Eluat mit 50 mM Imidazol. 3/7: Eluat mit 75 mM Imidazol. 4/8: Eluat mit 100 mM Imidazol.

4.10.2 Analyse der ToxR-DNA-Wechselwirkung durch Analyse der Gelretardation

Die Retardationsanalysen wurden mit Agarose/HEC Gelen durchgeführt. Der Einsatz von geringen Mengen an Hydroxy-Ethyl-Cellulose (HEC) in Agarosegelen führt zur besseren Auftrennung sehr kleiner DNA-Fragmente. Hochprozentige HEC-Agarosegele mit Thesit zur Analyse von DNA-Protein Interaktionen wurden dagegen im Rahmen dieser Arbeit erstmals eingesetzt.

Die gereinigten Fusionsproteine ToxR/AZ2 und ToxR/ Δ TMD wurden nach der IMAC dialysiert, um das Imidazol zu entfernen. Danach wurden die Proteinkonzentrationen ermittelt und in unterschiedlichen molaren Verhältnissen mit Substrat DNA ((TTTTGAT)₇) d.h. der 7-fach wiederholten Sequenz des *ctx* Promotors bzw. einem DNA-Fragment ohne die Zielsequenz (Kompetitor) gemischt und auf einem HEC-Agarose Gel analysiert (Abb. 34).

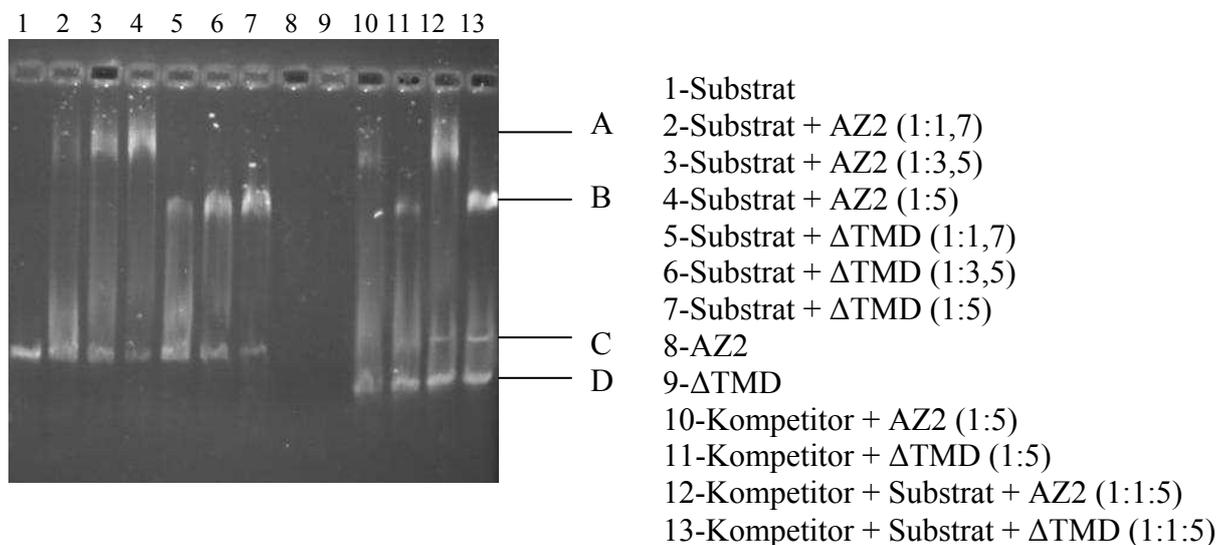


Abb. 34: Gelretardationsanalyse der Interaktion von ToxR/AZ2 und ToxR/ Δ TMD mit der DNA-Zielsequenz bzw. Kompetitor-DNA. Die Ansätze enthielten Protein und DNA in einem molaren DNA-Protein Verhältnis von 1:1,7; 1:3,5 und 1:5. Es ist eine elektrophoretische Auftrennung (Agarose/HEC Gel) gezeigt. A, Substrat/AZ2 Komplex; B, Substrat/ Δ TMD Komplex; C, Substrat DNA (TTTTGAT)₇; D, Kompetitor DNA (ohne Zielsequenz). Die Banden des Gels wurden mit UV-Licht (312 nm) visualisiert.

Aus Abbildung 34 wird ersichtlich, dass sowohl ToxR/AZ2 (Oligomer) als auch ToxR/ Δ TMD (Monomer) in der Lage sind, die Substrat DNA zu binden (Spur 2-7; A bzw. B). Erst bei einem 5-fachen molaren Überschuss der Proteine wird die DNA nahezu vollständig retardiert. Möglicherweise wird dieser Effekt durch eine hohe Dissoziationskonstante K_d des Protein/Substrat-Komplexes verursacht. Die Dissoziationskonstante setzt sich zusammen aus: $K_d = \frac{[P] \cdot [P]}{[PS]} = \frac{k_2}{k_1}$. Dies bedeutet, je schwächer die Affinität von Protein zum Substrat ist, desto höher konzentriert müssen sie vorliegen, um einen Protein/Substrat Komplex auszubilden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der DNA/AZ2 Komplex (Abb. 34, A) höher verläuft als der DNA/ Δ TMD Komplex. Dies könnte durch das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten von AZ2 (Oligomer) und Δ TMD (Monomer) hervorgerufen werden. Allerdings ist auch eine Bindung der hydrophoben Aminosäuren des AZ2-Motivs an das Detergenz (Thesit) im Gel zu erwarten. Denkbar ist daher, dass die reduzierte Migrationsgeschwindigkeit des AZ2/DNA Komplexes durch Micellenbindung entsteht. Dieser Effekt würde bei dem hydrophilen Δ TMD nicht auftreten. Um die Spezifität zu zeigen, wurde Kompetitor DNA eingesetzt. Beide Proteine binden im Vergleich zum Substrat nur sehr schlecht an diese Sequenz (Abb. 34, Spur 10 und 11). In Anwesenheit beider DNA Sequenzen (Substrat und Kompetitor) wird von AZ2 und Δ TMD vorwiegend das Substrat retardiert (Abb. 34, Spur 12 und 13). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die DNA-Bindung *in vitro* unabhängig von der Oligomerisierung des ToxR Proteins ist, da sowohl AZ2 als auch Δ TMD die Substrat DNA spezifisch binden können.

5 Diskussion und Ausblick

5.1 Der *ompU* und *ompT* Promotor

Es wurden neue *E. coli* Reporterstämme konstruiert, die chromosomal integrierte Fusionen des *ompU* und *ompT* Promotors mit *lacZα*, *lacZ*, *cat* und *tet^R* als Reportergene beinhalten. Der *ompU* Promotor ist eine Alternative zum bisher genutzten *ctx* Promotor (FHK12, Chr3) und erlaubt eine stärkere Differenzierung zwischen verschiedenen stark interagierender TMDn. Dies beruht wahrscheinlich auf einer erniedrigten Basalaktivität des *ompU* gegenüber dem *ctx* Promotor. Die Basalexpression des *ompU* Promotors ist gegenüber dem *ctx* nämlich um das dreißigfache erniedrigt. Bei der Nutzung einer Antibiotikaresistenz als Reportergen haben Zellen, die ein ToxR Fusionsprotein mit einer hochaffinen TMD exprimieren, eine sehr viel höhere Überlebenschance in Anwesenheit des Antibiotikums gegenüber denen mit niederaffinen TMDn, wenn der *ompU* statt des *ctx* Promotors eingesetzt wird.

Der *ompT* Promotor dagegen ist konstitutiv aktiv und wird durch die Dimerisierung der ToxR-Domäne reprimiert. Das bekannte reziproke Verhalten des *ompU* und *ompT* Promotors [54] wird in einem ebenfalls neuen System (EL141 Zellen) genutzt (simultane Positiv-/Negativselektion).

Aminosäuren, die an TMD-TMD Interaktionen beteiligt sind, werden durch sukzessive Punktmutationen identifiziert. Der Austausch zu kleineren Aminosäuren (Alanin) führt häufig zu einer reduzierten Affinität der TMDn, da z.B. die Helix-Helix Packung verändert oder zerstört wird [60]. Hingegen erhöht der Austausch einer Aminosäure zu Asparagin die Affinität, da diese Wasserstoffbrücken-Bindungen ausbilden können [65, 92, 93]. Mit dem Prinzip der Negativselektion (EL47, EL141) können die Aminosäuren, welche verantwortlich für die Interaktionsfähigkeit sind, aus einer großen Anzahl von durch Zufallsmutagenese generierten unterschiedlichen TMDn Sequenzen identifiziert werden, falls die Mutation die Interaktion schwächt. Bei der Positivselektion (EL61, EL141, EL55) werden Mutationen angereichert, die eine Verstärkung der TMD-TMD Interaktion hervorrufen.

Eine weitere Anwendung des *ompT* Systems liegt in der Eliminierung von hochaffinen homotypischen TMD-TMD Paaren aus Bibliotheken, bevor diese auf heterotypisch interagierende untersucht werden. In anderen Worten: die Selektion von heterotypisch

interagierenden TMD Paaren von kombinatorisch hergestellten Bibliotheken, wobei zufällig ausgewählte Paare von ToxR-TMD Fusionsproteinen im selben Indikatorstamm exprimiert werden, benötigt die Entfernung von homotypisch interagierenden Paaren aus dieser Bibliothek. Das *ompT* System (Negativselektion) wird hinsichtlich dieses Ziels eingesetzt werden. Die Anreicherung von schwach bzw. nicht interagierenden TMDn führt allerdings auch zu sehr vielen Sequenzen, die nicht in der Membran integriert sind bzw. ein Stopp-Codon in der TMD beinhalten. Um diese ausschließen zu können, wurde der Bakterienstamm EL141 entwickelt. Durch die simultane Positiv- und Negativselektion werden nur mittel affine TMDn angereichert. Die Positivselektion bei niedrigen Konzentrationen von Chloramphenicol reichert TMD Konstrukte ab, die nur eine sehr geringe Transkriptionsaktivierung verursachen (Bibliotheks-Konstrukte mit einem Stopp-Codon, oder nicht in die Membran integrierte Sequenzen). Eine simultane Negativselektion entfernt sehr stark interagierende TMDn aus dem Pool der Bibliothek.

5.2 Das ToxR*-System

Derzeitig wird das ToxR-System hauptsächlich zur Analyse von homotypischen TMD-TMD Interaktionen eingesetzt. Da viele Membranproteine als heterooligomere Komplexe vorliegen, ist es notwendig Techniken zu entwickeln, die diese Interaktionen detektieren können. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von synthetisch hergestellten TMD-Peptiden, die zu den Indikatorzellen (FHK12) in das Wachstumsmedium gegeben werden. Diese können mit einer homotypischen ToxR/TMD-ToxR/TMD Interaktion konkurrieren und somit die Expression des Reporterproteins unterdrücken [38, 62, 67]. Eine andere Technik beinhaltet die Expression zweier ToxR-Fusionsproteine mit unterschiedlicher TMD auf einem Plasmid [68]. Um eine Aussage über eine heterologe Oligomerisierung treffen zu können, dürfen beide verwendeten TMDn keine bzw. nur schwache homotypische Interaktionen aufweisen. Eine nicht auf ToxR basierende Technik zur Identifizierung von heterotypischen TMD-TMD Interaktionen hat als Grundlage das LexA-Transkriptionsaktivatorsystem [69].

In einem hier neu entwickelten System (ToxR*, Kompletorsystem) wurden vorerst bekannte TMDn (AZ2, A16) verwendet, um prinzipiell die Einsatzmöglichkeit zur Identifizierung von heterotypischen Interaktionen ($TMD_{(A)}-TMD_{(B)}$) zu zeigen. Die neue Komponente besteht aus einer modifizierten ToxR-Domäne

(ToxR* = ToxR/S87G), bei der die DNA-Bindung und/oder die Rekrutierung der RNA-Polymerase zerstört ist und daher zum Verlust der Aktivität führt. Bei dieser Methode wird eine homotypisch interagierende TMD_(A) als ToxR Fusionsprotein mit einer potentiellen Kompetitor TMD_(B) als ToxR* Fusionsprotein koexprimiert. Eine heterologe Interaktion (TMD_(A)-TMD_(B)) führt zu einem dominant negativen Effekt, da der ausgebildete Komplex ToxR-TMD_(A)/ToxR*-TMD_(B) bezüglich der Transkription inaktiver als ToxR-TMD_(A)/ToxR-TMD_(A) ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die β -Gal Aktivität von ToxR/AZ2 in Anwesenheit des Kompetitors ToxR*/AZ2 um $\sim 64\%$ (+ IPTG) bzw. $\sim 83\%$ (- IPTG) erniedrigt ist. In beiden Fällen (+ oder - IPTG) konnte keine signifikante Erniedrigung der Reporterogen-Aktivität bei der Koexpression von ToxR*/A16 beobachtet werden. Durch den Membranintegrations-Assay und der Westernblot-Analyse konnten Nebeneffekte wie fehlende Membranintegration oder unterschiedliche Expressionsniveaus ausgeschlossen werden. Daraus folgt, dass eine Interaktion von ToxR/AZ2-ToxR/AZ2 effizient durch die Koexpression von ToxR*/AZ2 (Bildung des Komplexes ToxR/AZ2-ToxR*/AZ2) kompetetiert wurde, da die Verwendung von ToxR*/A16 keinen Effekt aufwies. Um jedoch eine endgültige Aussage treffen zu können, ist eine Untersuchung von weiteren Modell TMDn notwendig. In ersten Versuchen wurde deutlich, dass die Kompetitionseffekte bei Verwendung anderer TMDn (GpA, C65) geringer ausfielen. Der Grund hierfür ist vermutlich eine effizientere Integration der verwendeten Kompetitor TMDn gegenüber der zuerst verwendeten TMD (A16) [94, 95].

Zukünftig wird damit eine Charakterisierung von Transmembrandomänen, deren homotypische und heterotypische Interaktionen miteinander konkurrieren, möglich sein. Hierzu gehören z.B. die TMDn von Integrinen, die einerseits homotypische und andererseits heterotypische Interaktionen aufweisen [69, 96, 97]. Beide Arten von Interaktionen sind wahrscheinlich mit diversen Aktivitätszuständen der Integrine verknüpft, die offensichtlich (Computersimulation) durch unterschiedliche Kontaktflächen der interagierenden TMDn hervorgerufen werden [98]. Des Weiteren könnte die Rolle spezieller Aminosäuren bei der Ausbildung von TMD-TMD Interaktionen untersucht werden. Ein Beispiel hierfür wären polare Aminosäuren (Asn, Gln) [65]. Auch eine Aufklärung von bereits bekannten homotypischen TMD-TMD Interaktionsmotiven [61, 99] bezüglich ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von heterotypischen Interaktionen könnte realisierbar sein.

5.3 Detektion von interagierenden TMDn aus *E.coli*

Integrale Membranproteine spielen eine essentielle Rolle in einer Vielzahl von zellulären Funktionen, wie z.B. Zellteilung, Signalweiterleitung und Transport von Makromolekülen [100-103]. Mutationen in Membranproteinen, welche die Struktur und Anordnung der TMDn beeinflussen, führen häufig zu toxischen Einflüssen in Mikroben oder zu Krankheiten beim Menschen [104, 105]. Daher ist es wichtig Aminosäuren bzw. Motive in der TMD zu identifizieren, die für die Funktion des Membranproteins essentiell sind. Eingehende Untersuchungen wurden bereits am Beispiel des Glycophorin A (GpA) und Phospholamban durchgeführt [106, 107]. Um andere natürlich interagierende TMDn für weiterführende Mutationsanalysen zu identifizieren, wurde bereits das *E. coli* Chromosom durchsucht [108]. Leeds und Mitarbeiter verwendeten zur Selektion die λ cI Repressor DNA-Bindungsdomäne und konnten 12 interagierende TMDn identifizieren [109].

In der hier vorliegenden Arbeit, wurde zur Selektion das neue auf den ompU Promotor basierende System eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde chromosomale *E. coli* DNA mit einem Restriktionsenzym verdaut. Dies resultierte im Durchschnitt in 96 bp Fragmenten (32 Aminosäuren). Die erhaltene Bibliothek (Komplexität: 10^6) wurde auf homotypische TMD-TMD Interaktion selektiert. 50 interagierende TMDn, wurden für weitere Untersuchungen (Interaktionsstudien und Sequenzanalysen) verwendet.

Alle selektierten Klone besitzen einen mit hydrophoben Aminosäuren besetzten Sequenzabschnitt (bekannte und putative Membranproteine). Dies weist darauf hin, dass das oligomerisierte ToxR-Protein seine stärkste Transkriptionsaktivierung ausbildet, wenn das Konstrukt in oder an der Membran lokalisiert ist, da keine hydrophilen Sequenzabschnitte identifiziert wurden. Des Weiteren beträgt die Länge der TMD durchschnittlich 21 Aminosäuren und ist somit länger als die beschriebenen Modelltransmembrandomänen. Eine mögliche Erklärung für die starken homotypischen Interaktionen könnte daher ein anderer Neigungswinkel bzw. Kreuzungswinkel ($\Omega > 0$, linkshändiges Homodimer; $\Omega < 0$, rechtshändiges Homodimer) der TMDn in der Membran sein [110] (Abb. 35), und somit eine andersartige Konformation des ToxR-Oligomers hervorrufen. Dies könnte mit positivem *hydrophobic mismatch* zusammenhängen [111-113].

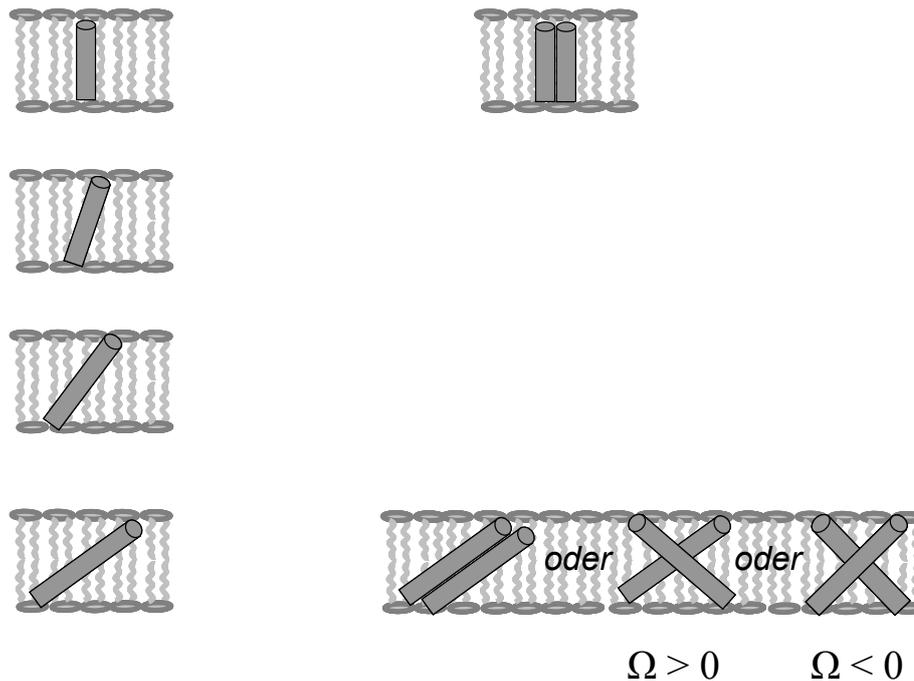


Abb. 35: Schematische Darstellung unterschiedlich langer TMDn in einer Membran und den resultierenden Neigungswinkeln (links) bzw. deren mögliche Interaktionskonformation (Kreuzungswinkel; rechts).

Die aus *E. coli* selektierten interagierenden TMDn haben offensichtlich neue Interaktionsmotive, die durch zukünftige Mutationsanalysen detaillierter untersucht werden könnten.

Diese Experimente verdeutlichen ebenso, dass mit Hilfe der ToxR-Systeme keine Aussagen über den Neigungswinkel und Kreuzungswinkel von interagierenden TMDn gemacht werden können. Über die Änderung der TMD-TMD Packung von Rezeptoren werden in der Natur verschiedene biologische Prozesse, wie z.B. die Chemotaxis (*piston*, *scissors*, *supercoil model*) reguliert [114] und veranschaulichen somit die Bedeutung dieser Information. Es ist daher nicht nur notwendig, Aminosäuremotive der TMD-TMD Kontaktflächen zu identifizieren, sondern auch die Konformation des Oligomers zu untersuchen. Hierfür können zurzeit nur *in vitro* Methoden (Röntgenstrukturanalyse und NMR) verwendet werden [30].

6 Anhang

6.1 Übersicht über die Vektorklonierungen

6.1.1 Klonierung des Plasmides pToxRV

Dieses Plasmid ist eine Modifikation der ToxRIV Variante [64]. Das ToxR-TMD-MalE Fusionsprotein wurde C-Terminal um 6 Histidine (His₆-tag) mit Hilfe der PCR verlängert (Abb. 36) (Primer HISDOWN (19a) und HISUP (19)).

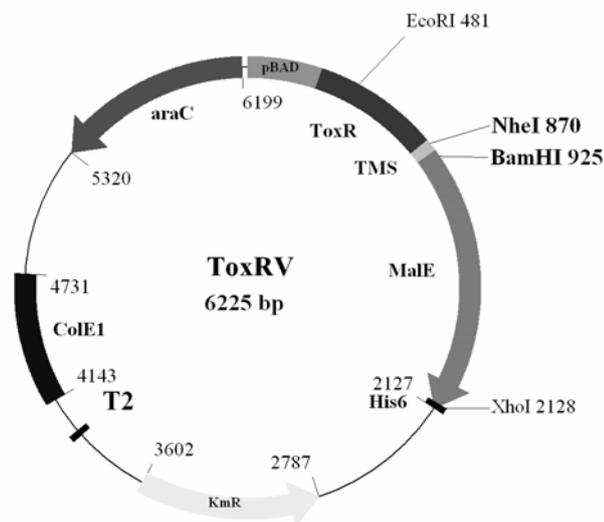


Abb. 36: Plasmidkarte des ToxRV. pBad, Operator/Promotor des araBAD-Operons; ToxR-TMD-MalE-His₆, Fusionsprotein; ColE1, Replikationsursprung (*high copy number*); Km^R, Kanamycin Resistenzgen, araC, Repressorgen; T2, Transkriptionsterminator; *NheI* und *BamHI*, TMD-Klonierungsschnittstellen.

6.1.2 Klonierung des ompT-Promotors (pOMPI-ompT::Reportergen)

Der *ompT*-Promotor (Gen-Bank Nummer: AF079766) wurde aus chromosomaler *Vibrio cholerae* DNA (J.B. Kaper, Baltimore) mit den Primern forompT_{apa} (55) und revOmpT (56) amplifiziert. Das 658 bp Fragment wurde in den Vektor pET22b (Novagen) über die Schnittstellen *ApaI* und *NdeI* ligiert. Für die nachfolgende PCR wurden die Primer ompbsu15I (57) und revterminator (58) verwendet. Das Produkt beinhaltete die multiple Klonierungsstelle und die T7 Terminator Region. Das 925 bp

Fragment wurde über *ClaI* und *HindIII* in den pACYC184 [72] Vektor kloniert. Anschließend wurde ein Restriktionsverdau mit *HindIII/SalI* und nachfolgend eine Behandlung mit *mung bean nuclease* (New England Biolabs) durchgeführt. Der resultierende Vektor beinhaltet nach der Religation ein verkürztes Tetracycliresistenzgen (nicht funktionsfähig). Die Restriktionsschnittstellen *HindIII/SalI* wurden zersört. Das resultierende Plasmid wurde pOMPI genannt. Anschließend wurde pOMPI mit *NdeI/XhoI* verdaut und mit *tet^R*, *lacZ* oder *lacZ α* ligiert. Diese wurden aus pACYC184 (*tet^R*), aus *E.coli* K12 (*lacZ*) bzw. aus pUC18 [70] (*lacZ α*) mit Hilfe der PCR erhalten (*tet^R*: Primer NdeTetup (74), XhoTetdown (75); *lacZ*: Primer lacZfullNdeup (116), lacZtruncXhodown (117), ELSacup (118) und ELXhodown (119); *lacZ α* : Primer LacZaup (78),LacZadown (79)). Die resultierenden Vektoren waren pOMPI-*ompT::tet^R*, pOMPI-*ompT::lacZ* und pOMPI-*ompT::lacZ α* (Abb. 37)).

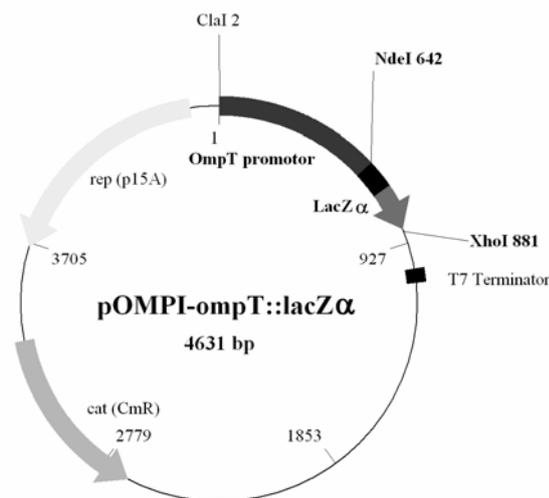


Abb. 37: Plasmidkarte des pOMPI-*ompT::lacZ α* . Der Vektor beinhaltet das *ompT::lacZ α* Hybridgen, T7 Transkriptionsterminator, Gen für die Chloramphenicol-acetyltransferase (*cat*), p15A Replikationsursprung (*low copy number*). Ebenso sind relevante Schnittstellen eingezeichnet.

6.1.3 Klonierung des *ompU*-Promotors (pOMPI-*ompU::Reporter*gen)

Der *ompU*-Promotor (Gen-Bank Nummer: U73751; Nukleotide 324 - 824) wurde aus chromosomaler *Vibrio cholerae* DNA mit den Primern *ompUBsup* (88) und *OmpUNdedownlo* (92) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den *ClaI/NdeI*

verdauten pOMPI-*ompT::lacZ* ligiert (Resultat: pOMPI-*ompU::lacZ*). In den *NdeI/XhoI* verdauten pOMPI-*ompU::lacZ* wurde das *cat* oder *lacZ α* Gen ligiert. Diese wurden aus pACYC184 (*cat*) bzw. aus pUC18 (*lacZ α*) mit Hilfe der PCR erhalten (*cat*: Primer CmNdeup (95), CmXhodown (96); *lacZ α* : Primer LacZaup (78), LacZadown (79)). Die resultierenden Vektoren waren pOMPI-*ompU::cat* und pOMPI-*ompU::lacZ α* .

6.1.4 Klonierung von pOMPII (pOMPII-*ompT::tet^R/ompU::lacZ α* bzw. pOMPII-*ompT::tet^R/ompT::lacZ α*)

Die *ompT::tet^R* Region mit dem T7 Terminator und dem Replikationsursprung p15A (aus pOMPI-*ompT::tet^R*) wurde mit den Primern 184dCMPstup (130) und 184dCmPstdown (131) amplifiziert. Das entstandene PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstelle *PstI* religiert. Dies führte zum Verlust des Chloramphenicol-Acetyltransferase Gens (pOMPI'). In einer nachfolgenden PCR wurde die *ompU::lacZ α* bzw. *ompT::lacZ α* Region (aus pOMPI-*ompU::lacZ α* bzw. pOMPI-*ompT::lacZ α*) mit den Primern ompUBsuup (88) bzw. ompbsu15I (57) und 184Bsudown (113) amplifiziert. Dieses Fragment wurde in den *ClaI* gespaltenen pOMPI' ligiert. Dies resultierte in den Vektoren pOMPII-*ompT::tet^R/ompU::lacZ α* bzw. pOMPII-*ompT::tet^R/ompT::lacZ α* .

6.1.5 Klonierung von pLDR10 Konstrukten

Die *OmpU::cat* Region mit dem T7 Terminator vom Vektor pOMPI-*ompU::cat* wurde mit den Primern 184Sacup (106) und 184Pstdown (105) amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *SacI/PstI* in den pLDR10 Vektor [71] (Abb. 38) ligiert (Resultat: pLDR10*ompU::cat*). Weitere pLDR10 Konstrukte wurden auf die gleiche Weise hergestellt, allerdings mit unterschiedlichen Kombinationen von Promotoren, Reportergenen und Restriktionsschnittstellen (pLDR10*ompU::lacZ*, 184Pstup (115), 184Pstdown (105) (*PstI/PstI*); pLDR10*ompT::tet^R*, 184Sacup (106), 184Pstdown (105) (*SacI/PstI*); pLDR10*ompT::lacZ*, 184Pstup (115), 184Pstdown (105) (*PstI/PstI*); pLDR10*ompU::lacZ α* , ompUBsuup (88), 184Bsudown (113) (*ClaI/ClaI*). (*ompU::cat*, *ompU::lacZ*, *ompT::tet^R*, *ompT::lacZ*, *ompU::lacZ α* wurden so eingefügt, dass die

Transkription von den Promotoren (*ompU* und *ompT*) in entgegengesetzter Richtung im Vergleich zum *bla* Promotor von pLDR10 abläuft.

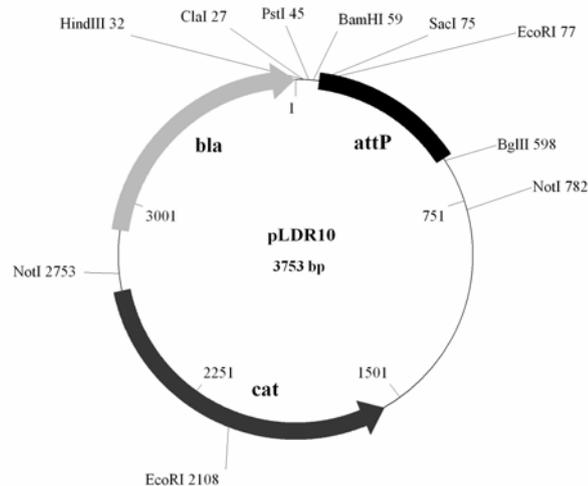


Abb. 38: Plasmidkarte des pLDR10 (ColE1 Replikationsursprung). *cat*, Gen der Chloramphenicolacetyltransferase; *bla*, Gen der β -Laktamase; *attP*, λ attachment site. Ebenso sind relevante Restriktionsschnittstellen angegeben.

Der Vektor pLDR10*ompT::tet^R/ompU::cat* wurde in zwei Schritten hergestellt. Der erste Schritt bestand in der Amplifizierung des *ompU::cat* (Primer *ompUBsuup* (88), und 184Pstdown (105) (*ClaI/PstI*). Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *ClaI/PstI* in den pLDR10 Vektor ligiert. Daraufhin wurde *ompT::tet^R* amplifiziert (184Sacup (106), 184Pstdown (105)) und in den pLDR10*ompU::cat* (aus erstem Schritt) über die Restriktionsschnittstellen *SacI/PstI* ligiert (*ompU::cat* wurde so eingefügt, dass die Transkription vom *ompU* Promotor in der gleichen Richtung im Vergleich zum *bla* Promotor von pLDR10 abläuft und die des *ompT* Promotors in der entgegengesetzten Richtung).

6.1.6 Klonierung der Plasmide pToxVI und pToxVII

Das Plasmid pToxVI ist ein Derivat von pToxRV (Abb. 36). Durch die Anwendung der MOE-PCR wurde eine Punktmutation im ToxR-Bereich (S87G = ToxR*) eingeführt (Primer ToxS87Gup (125), ToxS87Gdown (126)). Das Plasmid pToxVII stammt von pOMPI (Abb. 37) ab. Die ToxR/MalE kodierende Region mit ihrer Promotor/Operator (pBAD) Sequenz wurde aus dem ToxRV-Vektor (Abb. 36) amplifiziert (Primer

ToxAraPOBSuup (135) und Toxdown (164) (*Clai/XhoI*). Das PCR-Fragment wurde anschließend in das *Clai/XhoI* gesplante pOMPI Plasmid ligiert (Abb. 39).

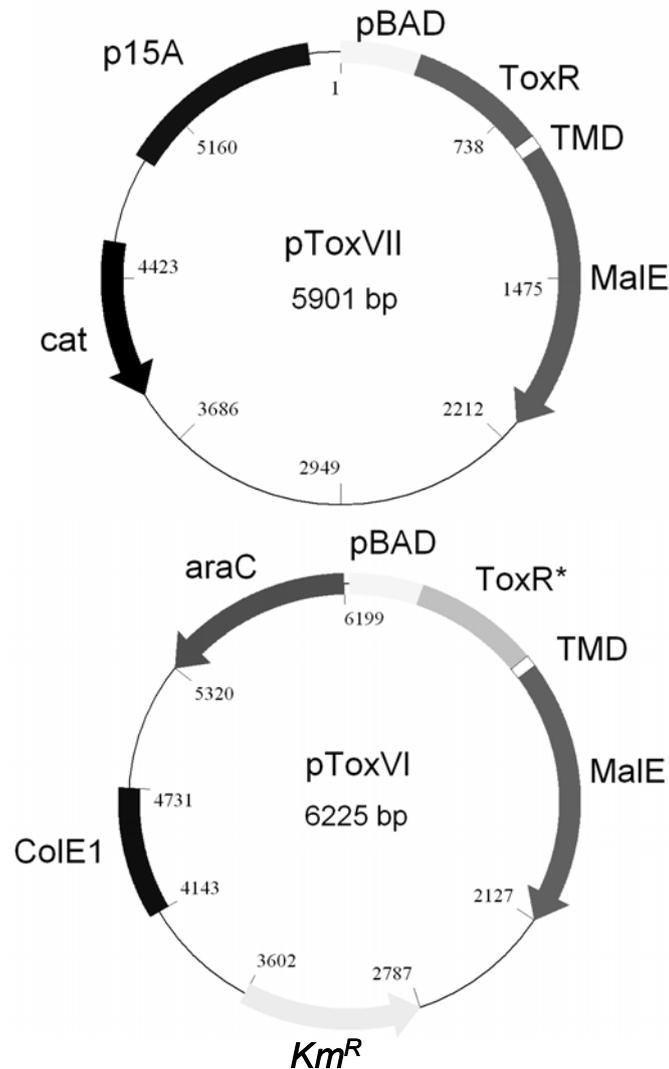


Abb. 39: Plasmidkarte des pToxVII und pToxVI. pBad, Operator/Promotor des araBAD-Operons; p15A, Replikationsursprung (*low copy number*); ColE1, Replikationsursprung (*high copy number*); cat, Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase; Km^R, Kanamycin Resistenzgen, araC, Repressorgen; ToxR-TMD-MalE, ToxR-Fusionsprotein; ToxR*, ToxR Punktmutante S87G.

7 Literatur

1. White, S.H. and W.C. Wimley, *Membrane protein folding and stability: physical principles*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1999. **28**: p. 319-65.
2. Stevens, T.J. and I.T. Arkin, *Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes?* Proteins, 2000. **39**(4): p. 417-20.
3. Wallin, E. and G. von Heijne, *Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms*. Protein Sci, 1998. **7**(4): p. 1029-38.
4. Weiss, M.S., et al., *The structure of porin from Rhodobacter capsulatus at 1.8 Å resolution*. FEBS Lett, 1991. **280**(2): p. 379-82.
5. Pautsch, A. and G.E. Schulz, *Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(11): p. 1013-7.
6. Kimura, Y., et al., *Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography*. Nature, 1997. **389**(6647): p. 206-11.
7. Muller, M., et al., *Protein traffic in bacteria: multiple routes from the ribosome to and across the membrane*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2001. **66**: p. 107-57.
8. Holland, I.B., *Translocation of bacterial proteins--an overview*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1694**(1-3): p. 5-16.
9. Santini, C.L., et al., *A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in Escherichia coli*. Embo J, 1998. **17**(1): p. 101-12.
10. Bogsch, E.G., et al., *An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria*. J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 18003-6.
11. Stanley, N.R., T. Palmer, and B.C. Berks, *The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in Escherichia coli*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 11591-6.
12. Berks, B.C., F. Sargent, and T. Palmer, *The Tat protein export pathway*. Mol Microbiol, 2000. **35**(2): p. 260-74.
13. Luirink, J., et al., *Biogenesis of inner membrane proteins in Escherichia coli*. Annu Rev Microbiol, 2005. **59**: p. 329-55.
14. Samuelson, J.C., et al., *YidC mediates membrane protein insertion in bacteria*. Nature, 2000. **406**(6796): p. 637-41.
15. Scotti, P.A., et al., *YidC, the Escherichia coli homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase*. Embo J, 2000. **19**(4): p. 542-9.
16. Houben, E.N., et al., *Nascent Lep inserts into the Escherichia coli inner membrane in the vicinity of YidC, SecY and SecA*. FEBS Lett, 2000. **476**(3): p. 229-33.

17. Thompson, S.J., S.J. Kim, and C. Robinson, *Sec-independent insertion of thylakoid membrane proteins. Analysis of insertion forces and identification of a loop intermediate involving the signal peptide*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 18979-83.
18. Thompson, S.J., C. Robinson, and A. Mant, *Dual signal peptides mediate the signal recognition particle/Sec-independent insertion of a thylakoid membrane polyprotein, PsbY*. J Biol Chem, 1999. **274**(7): p. 4059-66.
19. Arkin, I.T. and A.T. Brunger, *Statistical analysis of predicted transmembrane alpha-helices*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1429**(1): p. 113-28.
20. Senes, A., M. Gerstein, and D.M. Engelman, *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, 2000. **296**(3): p. 921-36.
21. Schneider, D., et al., *Thermostability of membrane protein helix-helix interaction elucidated by statistical analysis*. FEBS Lett, 2002. **532**(1-2): p. 231-6.
22. Heijne, G.V., *The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology*. Embo J, 1986. **5**(11): p. 3021-3027.
23. Landolt-Marticorena, C., et al., *Non-random distribution of amino acids in the transmembrane segments of human type I single span membrane proteins*. J Mol Biol, 1993. **229**(3): p. 602-8.
24. Jones, D.T., W.R. Taylor, and J.M. Thornton, *A mutation data matrix for transmembrane proteins*. FEBS Lett, 1994. **339**(3): p. 269-75.
25. Jones, D.T., W.R. Taylor, and J.M. Thornton, *A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology*. Biochemistry, 1994. **33**(10): p. 3038-49.
26. von Heijne, G. and Y. Gavel, *Topogenic signals in integral membrane proteins*. Eur J Biochem, 1988. **174**(4): p. 671-8.
27. von Heijne, G., *Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues*. Nature, 1989. **341**(6241): p. 456-8.
28. Popot, J.L. and D.M. Engelman, *Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model*. Biochemistry, 1990. **29**(17): p. 4031-7.
29. Popot, J.L. and D.M. Engelman, *Helical membrane protein folding, stability, and evolution*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 881-922.
30. MacKenzie, K.R., J.H. Prestegard, and D.M. Engelman, *A transmembrane helix dimer: structure and implications*. Science, 1997. **276**: p. 131-133.
31. Smith, S.O., et al., *Structure of the Transmembrane Dimer Interface of Glycophorin A in Membrane Bilayers*. Biochemistry, 2001. **40**(22): p. 6553-6558.
32. Helenius, A., et al., *Properties of detergents*. Methods Enzymol, 1979. **56**: p. 734-49.

33. Laage, R. and D. Langosch, *Strategies for prokaryotic expression of eukaryotic membrane proteins*. Traffic, 2001. **2**(2): p. 99-104.
34. Grisshammer, R. and C.G. Tate, *Overexpression of integral membrane proteins for structural studies*. Q Rev Biophys, 1995. **28**(3): p. 315-422.
35. Gratkowski, H., J.D. Lear, and W.F. DeGrado, *Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(3): p. 880-5.
36. Fisher, L.E. and D.M. Engelman, *High-yield synthesis and purification of an alpha-helical transmembrane domain*. Anal Biochem, 2001. **293**(1): p. 102-8.
37. Melnyk, R.A., A.W. Partridge, and C.M. Deber, *Transmembrane domain mediated self-assembly of major coat protein subunits from Ff bacteriophage*. J Mol Biol, 2002. **315**(1): p. 63-72.
38. Gerber, D. and Y. Shai, *In vivo detection of hetero-association of glycophorin-A and its mutants within the membrane*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31229-31232.
39. Langosch, D. and J. Heringa, *Interaction of transmembrane helices by a knobs-into-holes packing characteristic of soluble coiled coils*. Proteins, 1998. **31**(2): p. 150-9.
40. Lemmon, M.A., et al., *Sequence specificity in the dimerization of transmembrane alpha-helices*. Biochemistry, 1992. **31**(51): p. 12719-12725.
41. Schagger, H., W.A. Cramer, and G. von Jagow, *Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis*. Anal Biochem, 1994. **217**(2): p. 220-30.
42. Gurezka, R., et al., *A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9265-9270.
43. Fleming, K.G., A.L. Ackerman, and D.M. Engelman, *The effect of point mutations on the free energy of transmembrane alpha-helix dimerization*. J Mol Biol, 1997. **272**(2): p. 266-75.
44. Chitta, R.K., D.L. Rempel, and M.L. Gross, *Determination of affinity constants and response factors of the noncovalent dimer of gramicidin by electrospray ionization mass spectrometry and mathematical modeling*. J Am Soc Mass Spectrom, 2005. **16**(7): p. 1031-8.
45. You, M., et al., *Forster resonance energy transfer in liposomes: measurements of transmembrane helix dimerization in the native bilayer environment*. Anal Biochem, 2005. **340**(1): p. 154-64.
46. Mekalanos, J.J., et al., *Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development*. Nature, 1983. **306**(5943): p. 551-557.
47. Miller, V.L., R.K. Taylor, and J.J. Mekalanos, *Cholera toxin transcriptional activator toxR is a transmembrane DNA binding protein*. Cell, 1987. **48**(2): p. 271-279.
48. Pfau, J.D. and R.K. Taylor, *Genetic footprint on the ToxR-binding site in the promoter for cholera toxin*. Mol Microbiol, 1996. **20**(1): p. 213-222.

49. Miller, V.L., V.J. DiRita, and J.J. Mekalanos, *Identification of toxS, a regulatory gene whose product enhances toxR-mediated activation of the cholera toxin promoter*. J Bacteriol, 1989. **171**(3): p. 1288-93.
50. DiRita, V.J. and J.J. Mekalanos, *Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation*. Cell, 1991. **64**(1): p. 29-37.
51. DiRita, V.J., *Co-ordinate expression of virulence genes by ToxR in Vibrio cholerae*. Mol Microbiol, 1992. **6**(4): p. 451-458.
52. Higgins, D.E. and V.J. DiRita, *Transcriptional control of toxT, a regulatory gene in the ToxR regulon of Vibrio cholerae*. Mol Microbiol, 1994. **14**(1): p. 17-29.
53. Crawford, J.A., J.B. Kaper, and V.J. DiRita, *Analysis of ToxR-dependent transcription activation of ompU, the gene encoding a major envelope protein in Vibrio cholerae*. Mol Microbiol, 1998. **29**(1): p. 235-46.
54. Li, C.C., et al., *Molecular cloning and transcriptional regulation of ompT, a ToxR-repressed gene in Vibrio cholerae*. Mol Microbiol, 2000. **35**(1): p. 189-203.
55. Kolmar, H., et al., *Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures*. Embo J, 1995. **14**(16): p. 3895-3904.
56. Brosig, B. and D. Langosch, *The dimerization motif of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues*. Protein Sci, 1998. **7**(4): p. 1052-1056.
57. Langosch, D., E. Lindner, and R. Gurezka, *In vitro selection of self-interacting transmembrane segments--membrane proteins approached from a different perspective*. IUBMB Life, 2002. **54**(3): p. 109-113.
58. Mendrola, J.M., et al., *The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4704-4712.
59. Li, R., et al., *Dimerization of the transmembrane domain of Integrin alphaIIb subunit in cell membranes*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26666-26673.
60. Langosch, D., et al., *Dimerisation of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator*. J Mol Biol, 1996. **263**(4): p. 525-530.
61. Russ, W.P. and D.M. Engelman, *The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association*. J Mol Biol, 2000. **296**(3): p. 911-919.
62. Sal-Man, N. and Y. Shai, *Arginine mutations within a transmembrane domain of Tar, an Escherichia coli aspartate receptor, can drive homodimer dissociation and heterodimer association in vivo*. Biochem J, 2005. **385**(Pt 1): p. 29-36.
63. Russ, W.P. and D.M. Engelman, *TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(3): p. 863-868.

64. Gurezka, R. and D. Langosch, *In vitro selection of membrane-spanning leucine zipper protein-protein interaction motifs using POSSYCCAT*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 45580-45587.
65. Dawson, J.P., et al., *Sequence context strongly modulates association of polar residues in transmembrane helices*. J Mol Biol, 2003. **331**(1): p. 255-262.
66. Ridder, A., et al., *Tryptophan supports interaction of transmembrane helices*. J Mol Biol, 2005. **354**(4): p. 894-902.
67. Gerber, D., N. Sal-Man, and Y. Shai, *Two motifs within a transmembrane domain, one for homodimerization and the other for heterodimerization*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 21177-21182.
68. Hennecke, F., et al., *A ToxR-based two-hybrid system for the detection of periplasmic and cytoplasmic protein-protein interactions in Escherichia coli: minimal requirements for specific DNA binding and transcriptional activation*. Protein Eng Des Sel, 2005. **18**(10): p. 477-486.
69. Schneider, D. and D.M. Engelman, *GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane*. J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 3105-3111.
70. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing, *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors*. Gene, 1985. **33**(1): p. 103-19.
71. Diederich, L., L.J. Rasmussen, and W. Messer, *New cloning vectors for integration in the lambda attachment site attB of the Escherichia coli chromosome*. Plasmid, 1992. **28**(1): p. 14-24.
72. Chang, A.C. and S.N. Cohen, *Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid*. J Bacteriol, 1978. **134**(3): p. 1141-1156.
73. Alting-Mees, M.A., J.A. Sorge, and J.M. Short, *pBluescriptII: multifunctional cloning and mapping vectors*. Methods Enzymol, 1992. **216**: p. 483-95.
74. Duplay, P., et al., *Silent and functional changes in the periplasmic maltose-binding protein of Escherichia coli K12. I. Transport of maltose*. J Mol Biol, 1987. **194**(4): p. 663-73.
75. Zhu, H. and R.A. Dean, *A novel method for increasing the transformation efficiency of Escherichia coli-application for bacterial artificial chromosome library construction*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(3): p. 910-1.
76. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
77. Ho, S.N., et al., *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*. Gene, 1989. **77**(1): p. 51-59.
78. Miller, E.M. and J.A. Nickoloff, *Escherichia coli electrotransformation*. Methods Mol Biol, 1995. **47**: p. 105-13.
79. Carey, J., *Gel retardation*. Methods Enzymol, 1991. **208**: p. 103-17.
80. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

81. Pace, C.N., et al., *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*. Protein Sci, 1995. **4**(11): p. 2411-23.
82. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
83. Kolmar, H., et al., *Dimerization of Bence Jones proteins: linking the rate of transcription from an Escherichia coli promoter to the association constant of REIV*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1994. **375**(1): p. 61-70.
84. Porath, J., et al., *Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation*. Nature, 1975. **258**(5536): p. 598-9.
85. Schleif, R., *Regulation of the L-arabinose operon of Escherichia coli*. Trends Genet, 2000. **16**(12): p. 559-65.
86. Pratt, L.A. and T.J. Silhavy, *Identification of base pairs important for OmpR-DNA interaction*. Mol Microbiol, 1995. **17**(3): p. 565-573.
87. Martinez-Hackert, E. and A.M. Stock, *Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors*. J Mol Biol, 1997. **269**(3): p. 301-312.
88. Martinez-Hackert, E., et al., *Crystallization, X-ray studies, and site-directed cysteine mutagenesis of the DNA-binding domain of OmpR*. Protein Sci, 1996. **5**(7): p. 1429-1433.
89. Krukonis, E.S., R.R. Yu, and V.J. Dirita, *The Vibrio cholerae ToxR/TcpP/ToxT virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter*. Mol Microbiol, 2000. **38**(1): p. 67-84.
90. Seeman, N.C., J.M. Rosenberg, and A. Rich, *Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(3): p. 804-8.
91. Fried, M. and D.M. Crothers, *Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis*. Nucleic Acids Res, 1981. **9**(23): p. 6505-25.
92. Li, R., J.S. Bennett, and W.F. Degrado, *Structural basis for integrin alphaIIb beta3 clustering*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt3): p. 412-415.
93. Ruan, W., E. Lindner, and D. Langosch, *The interface of a membrane-spanning leucine zipper mapped by asparagine-scanning mutagenesis*. Protein Sci, 2004. **13**(2): p. 555-559.
94. Lewis, R.N., et al., *A polyalanine-based peptide cannot form a stable transmembrane alpha-helix in fully hydrated phospholipid bilayers*. Biochemistry, 2001. **40**(40): p. 12103-11.
95. Chen, H. and D.A. Kendall, *Artificial transmembrane segments. Requirements for stop transfer and polypeptide orientation*. J Biol Chem, 1995. **270**(23): p. 14115-22.
96. Li, W., et al., *A push-pull mechanism for regulating integrin function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1424-1429.

97. Schneider, D. and D.M. Engelman, *Involvement of transmembrane domain interactions in signal transduction by alpha/beta integrins*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 9840-9846.
98. Gottschalk, K.E. and H. Kessler, *The structures of integrins and integrin-ligand complexes: implications for drug design and signal transduction*. Angew Chem Int Ed Engl, 2002. **41**(20): p. 3767-3774.
99. Dawson, J.P., J.S. Weinger, and D.M. Engelman, *Motifs of serine and threonine can drive association of transmembrane helices*. J Mol Biol, 2002. **316**(3): p. 799-805.
100. Guzman, L.M., D.S. Weiss, and J. Beckwith, *Domain-swapping analysis of FtsI, FtsL, and FtsQ, bitopic membrane proteins essential for cell division in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1997. **179**(16): p. 5094-103.
101. Ehrmann, M., et al., *The ABC maltose transporter*. Mol Microbiol, 1998. **29**(3): p. 685-94.
102. Weiss, A. and J. Schlessinger, *Switching signals on or off by receptor dimerization*. Cell, 1998. **94**(3): p. 277-80.
103. Chervitz, S.A., C.M. Lin, and J.J. Falke, *Transmembrane signaling by the aspartate receptor: engineered disulfides reveal static regions of the subunit interface*. Biochemistry, 1995. **34**(30): p. 9722-33.
104. Hegde, R.S., et al., *A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease*. Science, 1998. **279**(5352): p. 827-34.
105. Wigley, W.C., et al., *Transmembrane domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: design, characterization, and secondary structure of synthetic peptides m1-m6*. Biochemistry, 1998. **37**(3): p. 844-53.
106. Lemmon, M.A. and D.M. Engelman, *Specificity and promiscuity in membrane helix interactions*. FEBS Lett, 1994. **346**(1): p. 17-20.
107. Lemmon, M.A., et al., *Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices*. J Biol Chem, 1992. **267**(11): p. 7683-9.
108. Leeds, J.A., et al., *Genetic selection for and molecular dynamic modeling of a protein transmembrane domain multimerization motif from a random Escherichia coli genomic library*. J Mol Biol, 2001. **313**(1): p. 181-95.
109. Leeds, J.A. and J. Beckwith, *Lambda repressor N-terminal DNA-binding domain as an assay for protein transmembrane segment interactions in vivo*. J Mol Biol, 1998. **280**(5): p. 799-810.
110. Park, S.H. and S.J. Opella, *Tilt angle of a trans-membrane helix is determined by hydrophobic mismatch*. J Mol Biol, 2005. **350**(2): p. 310-8.
111. Killian, J.A., *Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1376**(3): p. 401-15.
112. Killian, J.A., *Synthetic peptides as models for intrinsic membrane proteins*. FEBS Lett, 2003. **555**(1): p. 134-8.

113. de Planque, M.R., et al., *Interfacial anchor properties of tryptophan residues in transmembrane peptides can dominate over hydrophobic matching effects in peptide-lipid interactions*. *Biochemistry*, 2003. **42**(18): p. 5341-8.
114. Kim, S.H., *"Frozen" dynamic dimer model for transmembrane signaling in bacterial chemotaxis receptors*. *Protein Sci*, 1994. **3**(2): p. 159-65.

8 Abkürzungsverzeichnis

Symbole für Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Å	Angström 10^{-10} m
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
β-Gal	β-Galaktosidase
BCIP	5-Bromo-4chloro-3-indolyl-phosphat
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Cm	Chloramphenicol

Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethansulfonsäure])
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Broth
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ Konzentration
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
TBS	Tris buffered saline
TBST	TBS mit 0,05 % Triton-X 100
Tet	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxy)aminomethan
ÜN	Über Nacht
WT	Wildtyp

Veröffentlichungen

Lindner, E., Uterreitmeier, S., Ridder, A., Langosch, D., 2007. An extended ToxR POSSYCCAT system for positive and negative selection of self-interacting transmembrane domains. *Journal of Microbiological Methods*, *in press*.

Lindner, E., Langosch, D., 2006. A ToxR-based dominant-negative system to investigate heterotypic transmembrane domain interactions. *Proteins* 65(4), 803-7.

Ruan, W., Lindner, E., Langosch, D., 2004. The interface of a membrane-spanning leucine zipper mapped by asparagine-scanning mutagenesis. *Protein Sci* 13(2), 555-559.

Langosch, D., Lindner, E., Gurezka, R., 2002. In vitro selection of self-interacting transmembrane segments--membrane proteins approached from a different perspective. *IUBMB Life* 54(3), 109-113.

Laging, M., Lindner, E., Fritz, H. J., Kramer, W., 2003. Repair of hydrolytic DNA deamination damage in thermophilic bacteria: cloning and characterization of a Vsr endonuclease homolog from *Bacillus stearothermophilus*. *Nucleic Acids Res* 31(7), 1913-20.

Lebenslauf

Persönliche Daten:	Name:	Eric Lindner
	Anschrift:	Blütenweg 2 85416 Langenbach
	Geburtstag/-ort:	15.04.1973, Halle/Saale
	Familienstand:	ledig, keine Kinder
Schulausbildung:	08/79 - 07/89	Polytechnische Oberschule in Halle/Saale
	08/89 - 07/91	Thomas- Müntzer-Gymnasium in Halle/Saale, Abitur
Studium:	08/91 - 04/92	Studium an der Hochschule für Architektur und Bauwesen Weimar
Zivildienst:	06/92 - 08/93	Zivildienst im Universitäts-Klinikum Halle/Kröllwitz Assistenz in der Intensivstation
Studium:	08/93 - 06/00	Studium der Biologie an der Universität Göttingen, <u>Diplom Biologe</u> <u>Diplomarbeit:</u> "Biochemische und molekulargenetische Studien an einem Vsr homologen DNA-Mismatch-Reparaturenzym aus Bacillus stearothermophilus"
Sprachkenntnisse	08/00 - 12/00	Sprachaufenthalt in Irland
Studium:	05/01 - 09/01	Doktorand an der Universität Heidelberg; Institut für Neurobiologie; Arbeitsgruppe Prof. Langosch
	10/01 – 12/06	Doktorand an der Technischen Universität München (Weihenstephan); Institut für Chemie der Biopolymere; Arbeitsgruppe Prof. Langosch