

**Die Bedeutung
der Stabilität und des Faltungsmechanismus
des Gen-3-Proteins filamentöser Phagen
für die Infektion von *Escherichia coli***

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
- Doktor der Naturwissenschaften -
der Fakultät für Biologie, Chemie
und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin

Barbara Eckert

Bayreuth 2007

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth zur Erlangung des akademischen Grades - Doktor der Naturwissenschaften - genehmigten Dissertation.

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2002 bis Juni 2007 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter der Anleitung von Prof. Dr. Franz X. Schmid angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 29. Juni 2007

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 26. Oktober 2007

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Franz X. Schmid (Erster Gutachter)

Prof. Dr. Mathias Sprinzl (Zweiter Gutachter)

Prof. Dr. Carlo Unverzagt

Prof. Dr. Wolfgang Schumann (Vorsitzender)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Filamentöse Phagen	1
1.1.1	Aufbau und Assemblierung	1
1.1.2	Das Gen-3-Protein ist essentiell für die Infektion von <i>E. coli</i>	2
1.2	Die Rezeptoren bei der Phageninfektion: F-Pilus und TolA	5
1.2.1	Der bakterielle F-Pilus	5
1.2.2	TolA als Rezeptor in der Zellmembran	6
1.3	G3P* als Modellsystem für die Faltung von Mehrdomänenproteinen	8
1.4	Prolinisomerisierung als langsamer Schritt in der Proteinfaltung	9
1.4.1	Eigenschaften der Peptidylprolylbindung	9
1.4.2	Die Prolinhypothese	10
1.4.3	Prolylisomerasen	11
1.4.4	Prolinisomerisierung als regulatorischer Prozess	11
1.5	Problemstellung	12
2	Materialien und Methoden	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Bakterienstämme und Plasmide	15
2.1.2	Oligodesoxyribonukleotide	15
2.1.3	Nährmedien	16
2.1.4	Enzyme	16
2.1.5	Längenstandards	16
2.1.6	Chemikalien und Biochemikalien	16
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.8	Geräte	17
2.1.9	Computerprogramme	18
2.2	Elektrophoretische Methoden	18
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	18
2.2.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger u. v. Jagow	18
2.3	Isolierung und Reinigung von DNA	19
2.3.1	Präparation von doppelsträngiger DNA	19
2.3.2	Präparation von einzelsträngiger Phagen-DNA	19
2.3.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und Reinigung mit Silica	19
2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.4.1	PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	20
2.4.2	Kolonie-PCR	20
2.4.3	<i>BluntEnd</i> -Mutagenese	20
2.4.4	<i>QuikChange</i> -Mutagenese	21
2.5	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.5.1	Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.5.2	Herstellung und Transformation CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	22
2.5.3	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit TSS-Lösung	22
2.6	Erstellen einer Phagenbibliothek	22
2.6.1	Erstellen der Genbibliothek	22
2.6.2	Erstellen der Phagenbibliothek	23

2.7	Arbeiten mit Phagen	23
2.7.1	Propagation und Isolierung von Phagen	23
2.7.2	Infektion des F ⁺ -Stamms <i>E. coli</i> XL1Blue	24
2.7.3	Infektion des F ⁻ -Stamms <i>E. coli</i> HB2156	24
2.7.4	Infektion des F ⁻ -Stamms <i>E. coli</i> HB2156 in Gegenwart verschiedener F-Pilin-Fusionproteine	24
2.7.5	Bestimmung der Phageninfektiosität	25
2.7.6	Kompetitionsexperimente	25
2.7.7	Kinetik der Phageninaktivierung	25
2.7.8	Inhibition der Infektion durch gereinigtes G3P*	26
2.8	Klonierung verschiedener Proteinvarianten	26
2.9	Konstruktion eines <i>traA</i> -knock-out-Stamms	27
2.10	Test verschiedener F-Pilin-Konstrukte auf Funktionalität	27
2.11	Isolierung und Reinigung von F-Pili	28
2.12	Proteinexpression und Reinigung	29
2.12.1	Test auf Überexpression eines Proteins	29
2.12.2	Expression und Reinigung der G3P*-Varianten und der isolierten N1-Domäne	29
2.12.3	Reinigung der C-terminalen Domäne von TolA	30
2.12.4	Reinigung verschiedener MBP-Pilin-Fusionsproteine	31
2.13	Modifikation von TolA-C	32
2.14	Probenvorbereitung und Konzentrationsbestimmung	32
2.15	Proteolyse von G3P* in Gegenwart von TolA-C	33
2.16	Spektroskopische Charakterisierung	33
2.16.1	Circulardichroismus-Spektren	33
2.16.2	Fluoreszenzemissionsspektren	34
2.17	Fluoreszenztitrationen	34
2.18	Bestimmung der konformationellen Proteinstabilität	36
2.18.1	Thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge	36
2.18.2	Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltungsübergänge	39
2.19	Kinetische Messung der Faltungsreaktionen	41
2.19.1	Kinetische Messungen zur Faltung der G3P*-Varianten	41
2.19.2	Kinetische Messungen zur Faltung von TolA-C	43
2.19.3	Auswertung der kinetischen Messungen	44
2.20	Kinetik der Assoziation mit TolA-C	44
2.20.1	Zeitverlauf der Assoziation	45
2.20.2	Zeitverlauf der Verdrängung von TolA-C aus dem N1-TolA-C-Komplex	45
2.20.3	Bindung von TolA an aktiviertes G3P*	45
2.20.4	Freisetzung von TolA-C bei Rückfaltung von G3P*	45
3	Ergebnisse und Diskussion	47
3.1	Der Faltungsmechanismus des G3P und seine Bedeutung für die Infektion von <i>E. coli</i> durch filamentöse Phagen	47
3.1.1	Prolylisomerisierung als konformationeller Schalter bei der Infektion von <i>E. coli</i>	47
3.1.2	Die prolinkontrollierte Domänen dissoziation führt zur partiellen Entfaltung von G3P*	77
3.2	Interaktion des G3P filamentöser Phagen mit dem primären Rezeptor F-Pilin	86
3.2.1	Inhibition der mit dem F-Pilus verbundenen Funktionen durch G3P*	86
3.2.2	Expression von monomerem F-Pilin	91
3.3	Interaktion des G3P filamentöser Phagen mit dem Rezeptor TolA	102

3.3.1	Die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff AEDANS hat keinen Einfluss auf die Stabilität von TolA-C	102
3.3.2	Interaktion der isolierten N1-Domäne mit TolA-C	109
3.3.3	Interaktion des G3P* mit TolA-C	114
3.3.4	Die Phageninfektiosität korreliert mit der G3P-Stabilität	127
4	Zusammenfassende Diskussion	133
4.1	Pro213 wirkt als molekularer Schalter bei der Phageninfektion	133
4.1.1	Die lokale Aminosäuresequenz bestimmt die Rate der Prolinisomerisierung.....	133
4.1.2	Pro213 bestimmt die Lebensdauer des infektiösen Zustands der Phagen	135
4.1.3	Eine partielle Entfaltung des G3P aktiviert die Phagen für die Infektion	136
4.2	Die Interaktion mit dem F-Pilus führt zur Domänendissoziation in G3P	139
4.3	Die N1-Domäne des G3P bindet an den Rezeptor TolA.....	142
4.3.1	Die Interaktion von N1 und TolA-C kann mittels FRET verfolgt werden.....	142
4.3.2	Die Assoziation der beiden Domänen in G3P* inhibiert die Bindung an TolA-C.....	142
4.3.3	Die prolinkontrollierte Domänenassoziation führt zur Freisetzung von TolA-C	143
4.4	Faltung und Stabilität von G3P sind auf die Funktion <i>in vivo</i> abgestimmt.....	144
5	Publikationsliste	147
6	Zusammenfassung.....	149
7	Summary	151
8	Abkürzungsverzeichnis	153
9	Literaturverzeichnis.....	155
10	Anhang	163
10.1	Plasmide.....	163
10.2	Oligodesoxyribonukleotide.....	164

1 Einleitung

Proteine übernehmen essentielle Funktionen in allen biologischen Systemen und stellen die strukturell und funktionell vielseitigste Klasse biologischer Makromoleküle dar. Neben der Aminosäuresequenz ist die definierte Raumstruktur, die aus der Proteinfaltung resultiert, für die biologische Funktion eines Proteins essentiell. Die Stabilität einer Proteinstruktur ist dabei an die Erfordernisse *in vivo* angepasst. Sie muss einerseits groß genug sein, um die native Konformation eines Proteins aufrechtzuerhalten, darf aber andererseits die konformationelle Flexibilität nicht einschränken, da die Dynamik für dessen Funktion unerlässlich ist (Becktel & Schellman, 1987). Einen Extremfall stellen dabei die intrinsisch unstrukturierten Proteine dar (Dyson & Wright, 2004; Uversky, 2002; Uversky *et al.*, 2005), bei denen die Faltung in die biologisch aktive Konformation mit der Funktion gekoppelt ist. Stabilität, Faltungsmechanismus und biologische Aktivität eines Proteins müssen demnach in einem fein abgestimmten Gleichgewicht stehen, damit es durch geringe Änderungen auf unterschiedliche Bedingungen reagieren kann.

Ein wichtiges Ziel der Proteinbiochemie ist daher zu verstehen, wie die Faltungsreaktion und die Stabilität eines Proteins mit seiner Funktion in der Zelle zusammenhängen. Filamentöse Phagen stellen ein gut geeignetes System zur Untersuchung dieses Zusammenhangs dar. Sie sind sehr einfach aufgebaut und ihre Infektiosität gegenüber *Escherichia coli* (*E. coli*) hängt von der richtigen Faltung und Funktion der beteiligten Proteine ab.

1.1 Filamentöse Phagen

1.1.1 Aufbau und Assemblierung

Filamentöse Bakteriophagen sind sehr gut untersucht. Ff-Phagen besitzen eine Länge von 1 bis 2 μm und einen Durchmesser von ca. 7 nm (Model & Russel, 1988) und infizieren spezifisch F-Pilus tragende (F^+) *E. coli*-Stämme. Die Phagen M13, f1 und der in dieser Arbeit verwendete Phage fd sind sehr ähnlich aufgebaut und unterscheiden sich in ihrer DNA-Sequenz nur in wenigen Nukleotiden. Sie bestehen aus einer zirkulären einzelsträngigen DNA (ssDNA) von ca. 6500 Nukleotiden, die für elf verschiedene Proteine kodiert, und einer Proteinhülle, die sich aus ca. 2700 Kopien des Gen-8-Proteins (G8P) zusammensetzt. Die exakte Länge des Phagenpartikels wird dabei durch die Größe des zu verpackenden Phagen-genoms bestimmt. Filamentöse Phagen sind resistent gegenüber den meisten Proteasen sowie stabil bei hohen Salzkonzentrationen und hohen Temperaturen. Sie werden permanent von ihrer Wirtszelle freigesetzt, ohne dabei die Bakterien zu lysieren (Model & Russel, 1988). Nach der Infektion einer Wirtszelle wird die ssDNA mittels bakterieller Enzyme zur doppelsträngigen DNA (dsDNA) vervollständigt, bevor die Expression der Phagengene einsetzt. Die Phagenproteine können dabei in drei Gruppen eingeteilt werden: Hüllproteine

(G3P, G6P, G7P, G8P und G9P), Proteine, die für den DNA-Metabolismus essentiell sind (G2P, G5P und G10P), und Proteine, die für die Assemblierung des Phagen notwendig sind (G1P, G4P und G11P). Die Hüllproteine lagern sich bis zur Phagenassemblierung in die bakterielle Cytoplasmamembran ein (Barbas *et al.*, 2001). G5P bindet an die neusynthetisierte ssDNA, wobei nur eine als Verpackungssignal dienende *Hairpin*-Struktur in der Phagen-DNA ungebunden bleibt. Der entstehende ssDNA-G5P-Komplex verhindert eine Umwandlung in die replikative dsDNA-Form. Ein Komplex aus den Proteinen G1P, G4P und G11P erkennt das Verpackungssignal und bildet in der Membran eine Pore, durch die die Phagen-ssDNA ausgeschleust wird (Barbas *et al.*, 2001; Marciano *et al.*, 1999; Opalka *et al.*, 2003). Die Phagenassemblierung findet in der Cytoplasmamembran statt. Dabei wird das G5P freigesetzt und durch das Haupthüllprotein G8P ersetzt (Feng *et al.*, 1997a). Die anderen Hüllproteine G3P und G6P bzw. G7P und G9P sind in jeweils durchschnittlich drei bis fünf Kopien an den Enden des Phagen lokalisiert. Der Komplex aus G7P und G9P ist dabei an der Initiation der Assemblierung beteiligt und befindet sich daher auf der gleichen Seite des Phagenpartikels wie das ssDNA-Verpackungssignal. Beim Verlassen der Wirtszelle werden die Hüllproteine G3P und G6P am gegenüberliegenden Ende des Phagen eingebaut, wobei G3P an der Freisetzung des Phagenpartikels aus der Wirtszelle beteiligt ist (Rakonjac *et al.*, 1999; Rakonjac & Model, 1998). Die Zelle wird hierbei nicht lysiert, sondern kann sich weiterhin teilen, jedoch mit niedrigerer Teilungsrate als nicht-infizierte Zellen. Abhängig von den Wachstumsbedingungen können so bis zu 2000 Phagen pro Zelle und Generation produziert werden (Barbas *et al.*, 2001; Model & Russel, 1988).

1.1.2 Das Gen-3-Protein ist essentiell für die Infektion von *E. coli*

Das Gen-3-Protein (G3P) ist für die selektive Infektion von F-konjugativen *E. coli*-Zellen essentiell (Chatellier *et al.*, 1999), da es mit den Rezeptoren auf der Zelloberfläche wechselwirkt (Abbildung 1-1a). Es ist modular aus drei Domänen mit insgesamt 406 Aminosäuren aufgebaut, die durch glycinreiche Kettenbereiche (*Linker*) miteinander verknüpft sind (Kremser & Rasched, 1994; Stengele *et al.*, 1990). Die N1-Domäne besteht aus 67 Aminosäuren, die N2-Domäne aus 131 Aminosäuren, und die C-terminale Domäne (CT) aus 150 Aminosäuren. Die beiden glycinreichen *Linker* umfassen 19 (*Linker* G1 zwischen N1 und N2) bzw. 39 Aminosäuren (*Linker* G2 zwischen N2 und CT). Synthetisiert wird das G3P als Vorläuferprotein mit einer Signalsequenz von 18 Aminosäuren, die beim Export ins Periplasma abgespalten wird.

Die CT-Domäne dient sowohl der Verankerung des Proteins in der Phagenhülle (Boeke & Model, 1982; Model & Russel, 1988) als auch der Einlagerung von G3P in die Cytoplasmamembran der Wirtszelle vor und während der Phagenassemblierung (Davis *et al.*, 1995). Sie ist für die Freisetzung der Phagen aus der Wirtszelle essentiell (Rakonjac *et al.*, 1999; Rakonjac & Model, 1998). Die beiden N-terminalen Domänen N1 und N2 bilden eine

strukturelle Einheit und ragen aus der Phagenoberfläche heraus. Diese strukturelle Trennung von CT und N1N2 erlaubt den Einbau von Fremdproteinen zwischen den Domänen, weshalb das G3P eine breite Verwendung in *phage-display*-Techniken findet und so von hoher biotechnologischer Bedeutung ist (Benhar, 2001; Hoogenboom, 2002; Smith, 1985).

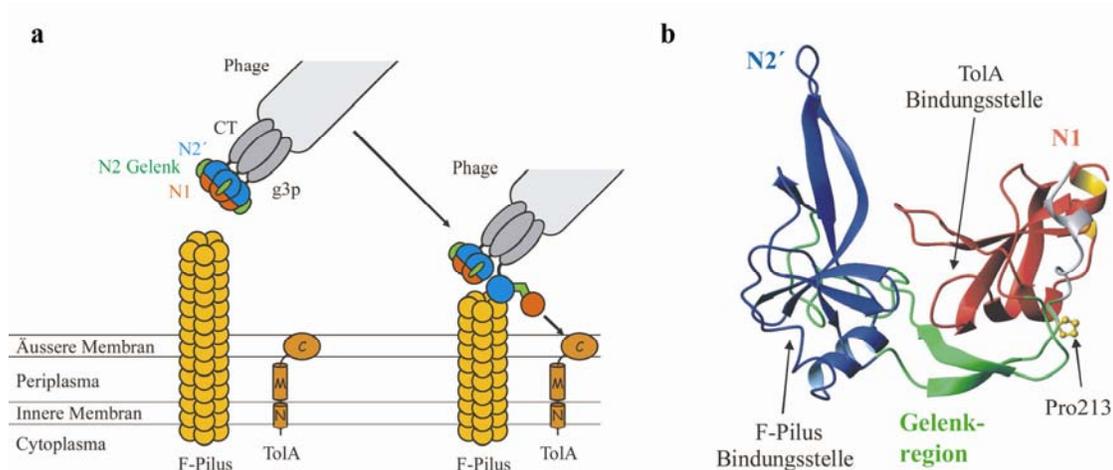


Abbildung 1-1: Die Rolle des G3P bei der Infektion von *E. coli* durch den Phagen fd. (a) Die ersten Schritte der Infektion: die Bindung der N2-Domäne an die Spitze des F-Pilus löst die Interaktion zwischen N1 und N2. Die N1-Domäne kann nun an die C-terminale Domäne des Rezeptors TolA binden. (b) Tertiärstruktur des N1N2-Fragments von G3P (G3P*). Domäne N1 ist in rot dargestellt, der globuläre Teil der N2-Domäne (N2') in blau und die Gelenksubdomäne von N2 in grün. Pro213 ist als Kugel-Stab-Modell gelb dargestellt. Die Abbildung basiert auf der Kristallstruktur von Holliger *et al.* (1999, PDB-Eintrag: 2G3P) und wurde mit dem Programm MolMol (Koradi *et al.*, 1996) erstellt.

Während die CT-Domäne aufgrund ihres hydrophoben Charakters strukturell noch nicht untersucht werden konnte, existieren für das N1N2-Fragment von G3P (G3P*) hochaufgelöste Kristall- und NMR-Strukturen (Holliger & Riechmann, 1997; Holliger *et al.*, 1999; Lubkowski *et al.*, 1998). G3P* besitzt eine hufeisenförmige Struktur (Abbildung 1-1b). Die beiden Domänen zeigen trotz ihrer geringen Sequenzhomologie in Teilbereichen eine ähnliche Faltung mit überwiegend β -Faltblattstruktur, wobei zusätzlich in jeder Domäne eine kurze α -Helix vorhanden ist. Die größere N2-Domäne kann in zwei Subdomänen unterteilt werden. Sie besteht aus einem globulären Teil (N2'), der die gleiche Topologie wie N1 besitzt, und einer zusätzlichen Gelenkregion aus zwei β -Faltblattsträngen. Diese Gelenkregion umgibt im nativen Protein die N1-Domäne, wobei die beiden β -Stränge mit dem β -Faltblatt in N1 interagieren (Lubkowski *et al.*, 1998). Diese Subdomäne ist somit wesentlich an der Assoziation von N1 und N2 beteiligt und steuert die meisten Interdomänenwechselwirkungen bei. Im Faltungsverlauf ist die Assoziation der beiden Domänen wichtig, da die instabilere N2-Domäne durch die Wechselwirkung mit N1 stabilisiert wird (1.3). Die beiden Domänen weisen eine Kontaktfläche von 1000 \AA^2 auf, die vor allem von hydrophoben Resten gebildet wird. Ein Vergleich der verfügbaren Strukturen der hochhomologen G3P der Phagen fd und M13 zeigt geringe konformationelle Unterschiede, die vermuten lassen, dass die Domänen N1

und N2 über ein Scharnier im Bereich der Aminosäurereste Gly99 und Ser208 in der Gelenksubdomäne gegeneinander verschoben werden können (Holliger *et al.*, 1999).

Die beiden N-terminalen Domänen sind direkt am Infektionsprozess beteiligt, indem sie sequentiell mit den beiden Rezeptoren, dem bakteriellen F-Pilus und TolA in der Zellmembran, wechselwirken. Im Ruhezustand des Phagen interagieren alle drei Domänen des G3P miteinander. In diesem Zustand ist G3P sehr stabil, aber der Phage nicht infektiös. Dieser stabile intramolekulare Komplex muss daher im Verlauf der Infektion gelöst werden (Chatellier *et al.*, 1999). Die Infektion erfolgt in zwei Schritten (Abbildung 1-1a). Zunächst bindet die N2-Domäne mit ihrer Außenseite an die Spitze des bakteriellen F-Pilus, den primären Rezeptor (Deng *et al.*, 1999; Deng & Perham, 2002). Nach der Bindung des Phagen wird der F-Pilus durch einen bislang unbekanntem Mechanismus zurückgezogen (Jacobson, 1972). Zudem aktiviert die Bindung an den F-Pilus das G3P, indem sie die Dissoziation der Domänen N1 und N2 induziert und so die Bindungsstelle für TolA, den eigentlichen Rezeptor in der Zellmembran, zugänglich macht. Die TolA-Bindungsstelle ist auf der N1-Domäne im Bereich der Interaktionsfläche zwischen N1 und N2 lokalisiert, so dass sie in der geschlossenen Ruheform des Phagen mit fest assoziierten Domänen unzugänglich ist (Lubkowski *et al.*, 1999). Nach Bindung an den F-Pilus muss deshalb die geöffnete Form des G3P so lange erhalten bleiben, bis der Phage die Zelloberfläche erreicht hat und N1 mit der C-terminalen Domäne von TolA (TolA-C) wechselwirken kann (Riechmann & Holliger, 1997). Diese Wechselwirkung mit TolA induziert eine Konformationsänderung in der C-terminalen Domäne des G3P, wodurch die Phagenhülle geöffnet und das Phagen genom in die Wirtszelle transferiert wird (Bennett & Rakonjac, 2006; Glaser-Wuttke *et al.*, 1989).

Die Infektiosität des Phagen erfordert somit einerseits eine Interaktion der drei G3P-Domänen, andererseits die Dissoziation der beiden N-terminalen Domänen, um die Bindung von N1 an TolA zu ermöglichen. Die Stabilität und Faltung des G3P muss so abgestimmt sein, dass es die verschiedenen, bei der Phagenvermehrung gestellten Anforderungen erfüllen kann. Im Ruhezustand des Phagen ist eine hohe Stabilität erforderlich, um G3P vor Proteolyse im extrazellulären Medium zu schützen; zur Infektion müssen dann aber die Domänen dissoziieren, um an die zellulären Rezeptoren binden zu können.

1.2 Die Rezeptoren bei der Phageninfektion: F-Pilus und TolA

1.2.1 Der bakterielle F-Pilus

Die Aktivierung des G3P filamentöser Ff-Phagen für die Infektion erfolgt durch die Bindung der N2-Domäne an die Spitze des bakteriellen F-Pilus. Neben den F-spezifischen filamentösen Phagen nutzen auch verschiedene RNA-Phagen (z. B. MS2, R17, fr, Q β) den F-Pilus als primäre Bindungsstelle, wobei diese jedoch an die Seite des Pilus binden (Manchak *et al.*, 2002; Paranchych & Dunker, 1975). Die eigentliche Aufgabe des F-Pilus ist es Zell-Zell-Kontakte bei der bakteriellen Konjugation herzustellen, um den horizontalen DNA-Transfer zwischen einer Donor-Zelle (F⁺) und einer Rezipienten-Zelle (F⁻) zu ermöglichen. Eine Zelle kann als Donor fungieren, wenn sie das konjugative F-(*fertility*)-Plasmid besitzt. Dieses Plasmid besteht aus einer zirkulären dsDNA mit einer Größe von 100 kb (Willetts & Skurray, 1987; Firth *et al.*, 1996) und kommt in ein bis zwei Kopien pro Zelle vor (Collins & Pritchard, 1973; Frame & Bishop, 1971). Das F-Plasmid kodiert für etwa 60 Gene, wobei die 33,3 kb große Transferregion (*tra*-Region) für die Konjugation essentiell ist. Sie enthält die 36 Gene, die für den DNA-Transfer notwendig sind, sowie den *oriT*, den *origin* für den DNA-Transfer (Frost *et al.*, 1994; Johnson & Willetts, 1980; Ray *et al.*, 1986).

Der initiale Kontakt zwischen der Donor- und der Rezipientenzelle wird durch die Wechselwirkung zwischen der Spitze des F-Pilus und der Zelloberfläche der F⁻-Zelle herbeigeführt. Pro Zelle können ein bis drei F-Pili gebildet werden, wobei die Ausbildung der F-Pili und damit die Fähigkeit zur Konjugation von der jeweiligen Wachstumsphase abhängt (Frost & Manchak, 1998; Will *et al.*, 2004). Aufgebaut sind F-Pili aus einer einzigen Proteinuntereinheit, dem F-Pilin (Armstrong *et al.*, 1980; Broda, 1975; Date *et al.*, 1977; Helmuth & Achtman, 1978). Die Untereinheiten sind dabei helikal angeordnet, so dass eine zylindrische Struktur mit einem Durchmesser von 8 nm und einem zentralen 2 nm großen Hohlraum entsteht. Eine Helixwindung enthält fünf Pilinproteine (Marvin & Folkhard, 1986; Paranchych & Frost, 1988; Silverman, 1997); die Piluslänge beträgt normalerweise 1 bis 2 μ m, kann jedoch je nach Wachstumsbedingungen variieren (Frost *et al.*, 1994).

Die Proteinprodukte der Gene *traA*, *traQ* und *traX* sind an der Synthese der Pilusuntereinheit beteiligt. Das *traA*-Gen kodiert für das 121 Aminosäuren umfassende Vorläuferprotein Propilin, das anschließend zum reifen F-Pilin mit 70 Aminosäuren prozessiert wird (Frost *et al.*, 1984; Ippen-Ihler *et al.*, 1984; Minkley *et al.*, 1976). Die N-terminale Signalsequenz aus 51 Resten ist zwar ungewöhnlich lang, besitzt aber die typischen Merkmale einer Signalsequenz: positiv geladene Reste, gefolgt von einem hydrophoben Bereich und der Schnittstelle für die Signalpeptidase (Frost *et al.*, 1984; Oliver, 1985).

Die *traQ*-Sequenz kodiert für ein 94 Aminosäuren langes Membranprotein (TraQ), das für die effiziente Reifung von Propilin notwendig ist (Ippen-Ihler *et al.*, 1984; Laine *et al.*, 1985; Wu *et al.*, 1988). TraQ wirkt dabei als Chaperon und sorgt für die korrekte Insertion des Propilins in die innere Zellmembran, wo es durch die *E. coli* Leaderpeptidase (LepB) prozessiert wird.

Anschließend wird der N-Terminus der reifen Pilinuntereinheit durch das Protein TraX acetyliert. Diese Acetylierung von F-Pilin ist für die biologische Funktion des F-Pilus nicht essentiell, ist aber vermutlich für die Kontrolle der Assemblierungsrate des Pilus notwendig (Anthony *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 1993). Die reifen F-Pilinuntereinheiten akkumulieren in der inneren Membran und bilden dort einen Proteinpool von ca. 100000 Untereinheiten (Laine *et al.*, 1985; Moore *et al.*, 1981a; Moore *et al.*, 1981b). Die Assemblierung des F-Pilus erfolgt ausgehend von diesem Proteinpool und erfordert elf weitere *tra*-Genprodukte. Diese Proteine sind dabei entweder an der Assemblierung der Pilusspitze, der Elongation des F-Pilus oder der Stabilisierung der Pilusstruktur beteiligt (Anthony *et al.*, 1999). Sowa *et al.* postulierten, dass die F-Pilinmonomere transient und reversibel zur Pilusstruktur assemblieren können. Nach diesem Modell durchlaufen die F-Pilusuntereinheiten verschiedene Zyklen von Piluswachstum und Pilusretraktion (Sowa *et al.*, 1983).

1.2.2 TolA als Rezeptor in der Zellmembran

Nachdem N2 mit der Pilusspitze interagiert und dadurch die Dissoziation der beiden N-terminalen G3P-Domänen induziert wurde, bindet im zweiten Schritt der Infektion die N1-Domäne an die C-terminale Domäne von TolA. TolA ist ein Membranprotein mit 421 Aminosäuren, das während der logarithmischen Wachstumsphase von *E. coli* in ca. 400 - 800 Kopien pro Zelle vorhanden ist (Webster, 1991). Aufgebaut ist TolA aus drei Domänen (Levengood *et al.*, 1991). Die N-terminale Domäne (TolA-N, AS 1-47) enthält eine hydrophobe Transmembranregion und verankert das Protein in der Cytoplasmamembran. Der periplasmatische Teil des Proteins umfasst die anderen beiden Domänen. Die mittlere Domäne (TolA-M, AS 48-310) bildet eine α -helikale Struktur von ca. 34 nm Länge und durchspannt das Periplasma (Derouiche *et al.*, 1999). Die C-terminale Domäne (TolA-C, AS 311-425) besitzt eine globuläre Faltung (Lubkowski *et al.*, 1999; Deprez *et al.*, 2005) und bindet neben dem G3P filamentöser Phagen (Riechmann & Holliger, 1997) auch Colicine der Gruppe A (Benedetti *et al.*, 1989; Benedetti *et al.*, 1991; Lazdunski, 1995; Webster, 1991).

Die Struktur von TolA-C konnte sowohl isoliert gelöst werden (Deprez *et al.*, 2005) als auch im Komplex mit den jeweiligen Liganden, der N1-Domäne von G3P bzw. der N-terminalen Domäne von Colicin A (Deprez *et al.*, 2002; Lubkowski *et al.*, 1999). Abbildung 1-2 zeigt die Struktur von TolA-C und die an der Wechselwirkung mit N1 beteiligten Reste. Ein Vergleich der verschiedenen Strukturen zeigt, dass TolA-C je nach Ligand verschiedene Konformationen einnimmt. Im Komplex mit N1 kommt es zu einer Reorientierung der ersten α -Helix (Deprez *et al.*, 2005), während die Wechselwirkung mit der N-terminalen Domäne von Colicin A eine erhöhte Flexibilität in der gesamten Domäne herbeiführt (Deprez *et al.*, 2002). Für die Funktion von TolA-C ist also eine flexible Struktur entscheidend, um bei Komplexbildung mit den verschiedenen Liganden, die weder Sequenz- noch Strukturhomologie aufweisen, spezifische Konformationsänderungen vornehmen zu können.

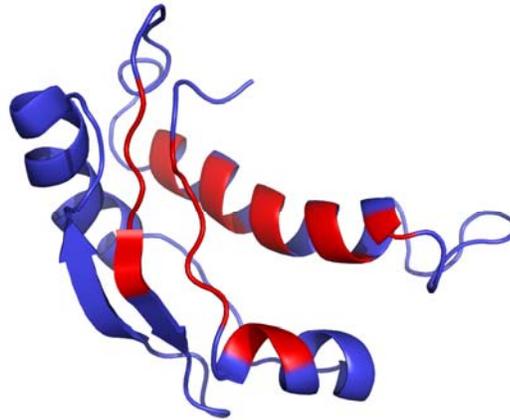


Abbildung 1-2: Tertiärstruktur der C-terminalen Domäne von TolA (TolA-C). Reste, die mit der N1-Domäne des G3P filamentöser Phagen wechselwirken, sind rot dargestellt. Die Abbildung basiert auf der NMR-Struktur von Deprez *et al.* (2005, PDB-Eintrag: 1S62).

Die N-terminale Domäne von TolA assoziiert in der Cytoplasmamembran mit den Transmembranproteinen TolQ und TolR zum TolQRA-Komplex (Derouiche *et al.*, 1995; Lazzaroni *et al.*, 1995). Dieser Komplex ist für die Translokation der Phagen-DNA in das Cytoplasma und für die Integration der Phagenproteine in die Cytoplasmamembran verantwortlich (Click & Webster, 1998; Russel *et al.*, 1988). Bakterien mit Mutationen in den entsprechenden Genen zeigen eine Toleranz gegenüber filamentösen Phagen oder Colicin A, was für die Namensgebung der Gene ausschlaggebend war (Webster, 1991). TolA-C wechselwirkt mit dem Komplex aus dem periplasmatischen TolB und dem Lipoprotein PAL, das in der äußeren Zellmembran verankert ist (Cascales *et al.*, 2000; Dubuisson *et al.*, 2002; Walburger *et al.*, 2002). Durch diese Interaktion entsteht eine Verknüpfung zwischen der inneren und äußeren Zellmembran (Sturgis, 2001).

Während die Funktion der Tol-Proteine bei der Phageninfektion bzw. der Bindung von Colicinen gut untersucht ist, ist ihre eigentliche Aufgabe in *E. coli* noch unklar. Postuliert wurden u.a. die Beteiligung am Transport von makromolekularen Membranbestandteilen (Derouiche *et al.*, 1996; Rigal *et al.*, 1997) oder Lipopolysacchariden (Gaspar *et al.*, 2000). Eine entscheidende Funktion dieser Proteine besteht darin, die Membranstabilität und -struktur aufrechtzuerhalten (Llobes *et al.*, 2001). Mutationen in *tolA*, *tolR*, *tolQ* oder *tolB* führen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber bestimmten Antibiotika oder Detergenzien und zur Freisetzung periplasmatischer Proteine ins Medium (Lazzaroni *et al.*, 1999; Webster, 1991).

1.3 G3P* als Modellsystem für die Faltung von Mehrdomänenproteinen

Das G3P filamentöser Phagen stellt nicht nur ein geeignetes System dar, um den Zusammenhang zwischen Stabilität, Faltung und Funktion eines Proteins *in vivo* zu untersuchen. Das isolierte N1N2-Fragment (G3P*) dient auch als Modellsystem, um den Faltungsmechanismus eines Mehrdomänenproteins *in vitro* zu analysieren. Bisherige Kenntnisse über Faltungsmechanismen und Stabilität von Proteinen beruhen fast ausschließlich auf Untersuchungen an kleinen Eindomänenproteinen. Viele dieser Proteine falten extrem schnell, im Bereich weniger Millisekunden, und folgen dabei einem einfachen Zweizustandsmodell (Jackson, 1998; Kragelund *et al.*, 1995; Schindler *et al.*, 1995; Schönbrunner *et al.*, 1997). Langsame Faltungsprozesse sind bei Eindomänenproteinen häufig auf Isomerisierungsreaktionen an Peptidylprolylbindungen (Balbach & Schmid, 2000), die Ausbildung von Disulfidbrücken (Creighton, 2000) oder die Bindung von Cofaktoren (Sosnick *et al.*, 1996) zurückzuführen.

Die überwiegende Zahl der Proteine in der Zelle ist jedoch aus mehreren Domänen oder Untereinheiten aufgebaut, die strukturelle oder funktionelle Einheiten bilden (Hawkins & Lamb, 1995; Netzer & Hartl, 1997). Dieser modulare Aufbau ermöglicht die Kombination unterschiedlicher Funktionen (Vogel *et al.*, 2004), und oftmals ist die Wechselwirkung von Domänen von regulatorischer Bedeutung. Die Faltung von Mehrdomänenproteinen ist ein wesentlich komplexerer Vorgang als die der Eindomänenproteine und bislang nur wenig untersucht (Garel, 1992; Jaenicke, 1999). Je nach Stabilität der Einzeldomänen und der Wechselwirkungen zwischen den Domänen falten Mehrdomänenproteine in unterschiedlicher Weise. Domänen, die isoliert stabil sind, können zunächst unabhängig voneinander falten, um dann in einem nachfolgenden Schritt miteinander zu assoziieren. Dieser Mechanismus wurde für die beiden Domänen C_L und V_L der leichten Kette von Immunglobulinen (Tsunenaga *et al.*, 1987) und für die Phosphoglyceratkinase (Parker *et al.*, 1996) nachgewiesen. In anderen Fällen ist nur eine Domäne isoliert stabil, und die Faltung der labileren Domäne ist mit der Domänenassoziation gekoppelt. Dies bedeutet, dass die stabilere, schnell faltende Domäne als Faltungsgerüst für eine zweite, instabilere Domäne dient, wie z.B. im Fall des γ_{II} -Cristallins der Augenlinse (Rudolph *et al.*, 1990). Im Extremfall sind beide Domänen für sich instabil, so dass die Faltung direkt mit ihrer Assoziation verknüpft ist. Ein Beispiel für eine solche Wechselwirkung zweier intrinsisch unstrukturierter Domänen ist der Komplex zwischen dem Transkriptionscoaktivator CBP/p300 und dem hormonellen Rezeptorcoaktivator p160 (Demarest *et al.*, 2002). Die Assoziation von gefalteten Domänen oder Untereinheiten ist nicht nur für die *de novo*-Faltung von Mehrdomänenproteinen essentiell, sondern kann auch für deren biologische Funktion von Bedeutung sein, die in vielen Fällen mit Domänenöffnungs- und -schließreaktionen gekoppelt ist.

Bei der Entfaltung von Zweidomänenproteinen können entsprechend drei Prozesse auftreten: die Dissoziation der beiden Domänen, die Entfaltung der ersten und die Entfaltung der zweiten Domäne. Je nach Stabilität der Einzeldomänen kann ihre Entfaltung mit der

Domänen dissoziation gekoppelt sein. Im G3P* sind die beiden Domänen nicht nur strukturell abgegrenzt, sie unterscheiden sich auch deutlich in ihrer Stabilität (Martin & Schmid, 2003a). N2 entfaltet, sobald die Domänen dissoziieren und die stabilisierenden Wechselwirkungen zu N1 verloren gehen. N1 hingegen behält seine native Konformation auch, wenn N2 entfaltet ist, und entfaltet erst bei höheren Temperaturen bzw. höheren Konzentrationen an Denaturierungsmitteln.

Die Faltung von G3P* verläuft in mehreren, zeitlich klar getrennten Schritten und umfasst einen sehr großen Zeitbereich (Martin & Schmid, 2003b). Im ersten Schritt faltet die N1-Domäne sehr schnell innerhalb weniger Millisekunden. Die N2-Domäne bildet ihre Struktur etwa tausendfach langsamer in zwei sequentiellen Reaktionen aus. Dabei entspricht der erste Schritt vermutlich der Faltung des globulären Teils von N2 (N2') und der zweite Schritt der lockeren Assemblierung mit der N1-Domäne. Die feste Assoziation der beiden vorgefalteten Domänen und damit die Faltung in den stabilen nativen Zustand ist nochmals zwei Größenordnungen langsamer und besitzt eine Zeitkonstante von 6200 s (bei 25 °C). Diese langsame Domänenassoziation wird durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung der Peptidbindung Gln212-Pro213 in der Gelenksubdomäne kontrolliert (Martin & Schmid, 2003c), die im nativen Zustand eine *cis*-Konformation aufweist (Lubkowski *et al.*, 1998, Abbildung 1-1b).

1.4 Prolinisomerisierung als langsamer Schritt in der Proteinfaltung

1.4.1 Eigenschaften der Peptidylprolylbindung

Aufgrund der besonderen Geometrie der Peptidbindung kann die Isomerisierung von Peptidylprolylbindungen faltungsverlangsamend wirken. Die Peptidbindung besitzt partiellen Doppelbindungscharakter und zeigt daher eine planare Anordnung. Die flankierenden C_α-Atome sind entweder *trans* oder *cis* zueinander angeordnet. Für alle Peptidbindungen ohne Beteiligung von Prolin (Nicht-Prolylbindungen) ist der *cis*-Zustand aus sterischen Gründen sehr viel ungünstiger als der *trans*-Zustand, so dass in Oligopeptiden nur ca. 0,1 bis 1% der Peptidbindungen *cis*-Konformation aufweisen (Scherer *et al.*, 1998). In gefalteten Proteinen sind Nichtprolyl-*cis*-Peptidbindungen demnach äußerst selten (Jabs *et al.*, 1999; Macarthur & Thornton, 1991; Ramachandran & Mitra, 1976; Stewart *et al.*, 1990).

Im Gegensatz dazu ist bei Peptidbindungen vor Prolin (Peptidylprolylbindungen, Prolinbindungen) der energetische Unterschied zwischen den beiden Isomeren nur gering. Aufgrund des Pyrrolidinrings des Prolins steht das C_α-Atom der Aminosäure vor Prolin immer *cis*-ständig zu einem C-Atom (C_α oder C_δ) des Prolins (Abbildung 1-3). Das *trans*-Isomer ist gegenüber dem *cis*-Isomer daher nur leicht energetisch favorisiert. In Peptiden liegen beide Formen im Gleichgewicht vor, wobei der Anteil an *cis*-Prolinbindungen zwischen 10 und 30% liegt und von der Aminosäure vor Prolin abhängt (Cheng & Bovey, 1977; Grathwohl & Wüthrich, 1981; Reimer *et al.*, 1998). Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung ist die Aktivierungsenergie für die *cis/trans*-

Isomerisierung sehr hoch (ca. 80 kJ/mol), und daher sind Prolinisomerisierungen langsame Reaktionen mit Zeitkonstanten im Bereich von 10 bis 100 s bei 25 °C (Brandts *et al.*, 1975; Schmid, 2002).

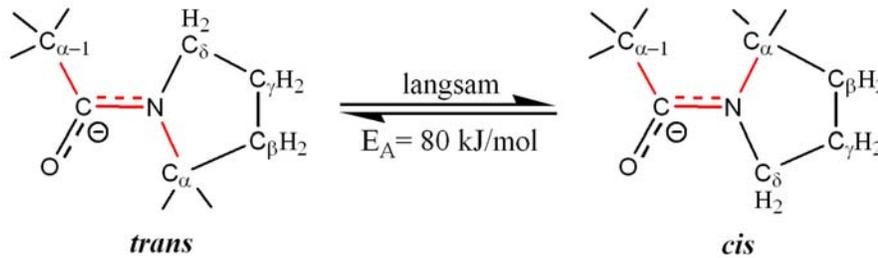


Abbildung 1-3: *Cis-trans*-Isomerisierung der Peptidylprolylbindung. Das Gleichgewicht liegt zu 70 bis 90% auf der Seite der *trans*-Konformation (Balbach & Schmid, 2000).

In gefalteten Proteinen ist die Konformation der Prolinbindung in der Regel klar festgelegt, da die native Struktur meist nur ein Isomer akzeptiert. Etwa 5-7% aller Prolinbindungen in nativen Proteinen weisen *cis*-Konformation auf (Stewart *et al.*, 1990). Nur bei sehr wenigen Proteinen konnte im nativen Zustand ein Gleichgewicht zwischen *cis*- und *trans*-Isomeren beobachtet werden, z.B. in Staphylokokkennuklease (Evans *et al.*, 1987), Calbindin (Chazin *et al.*, 1989) oder humanem Interleukin-3 (Feng *et al.*, 1997b).

1.4.2 Die Prolinhypothese

Garel und Baldwin entdeckten 1973, dass entfaltete Ribonuklease A aus einer heterogenen Mischung von schnell faltenden U_F- und langsam faltenden U_S-Molekülen besteht, wobei beide Formen zu einem enzymatisch aktiven Enzym führen (Garel & Baldwin, 1973). In der sogenannten Prolinhypothese postulierten Brandts *et al.*, dass sich schnell und langsam faltende Moleküle in der Konformation einer oder mehrerer Prolylbindungen unterscheiden (Brandts *et al.*, 1975). Im nativen Protein liegt jede Prolylbindung in einer definierten Konformation, *cis* oder *trans*, vor. Nach der Entfaltung stellt sich jedoch ein Gleichgewicht zwischen den beiden Isomeren ein. Die U_F-Moleküle mit korrekten Prolinisolomeren können schnell in die native Struktur falten, während U_S-Moleküle nur langsam falten, da ihre Rückfaltung mit der Isomerisierung der nicht-nativen Prolinbindungen einhergeht.

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass nicht-native Prolinisolomere die Faltung von Proteinen zu Beginn blockieren. Mittlerweile ist bekannt, dass Faltung und Prolinisomerisierung eng miteinander gekoppelt sind. Die konformationelle Faltung kann mit nicht-nativen Prolinisolomeren beginnen, und viele Proteine können trotz falscher Prolinkonformation ein nativ-ähnliches Intermediat ausbilden. Die letzten Faltungsschritte sind jedoch durch die Rate der Isomerisierungsreaktion limitiert, wobei durch die Ausbildung der nativ-ähnlichen Struktur die Aktivierungsenergie der Isomerisierung je nach Protein

erniedrigt, aber auch erhöht werden kann (Cook *et al.*, 1979; Goto & Hamaguchi, 1982; Kiefhaber & Schmid, 1992b; Schmid & Blaschek, 1981; Balbach *et al.*, 1999).

1.4.3 Prolylisomerasen

Die Entwicklung eines geeigneten Testsystems durch Fischer und Mitarbeiter bildete die Basis für die Entdeckung der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (Prolylisomerasen, PPIasen) (Fischer *et al.*, 1984a). In diesem proteasegekoppelten Isomerasetest spaltet Chymotrypsin ein chromogenes Tetrapeptid nur, wenn dessen Ala-Pro-Peptidbindung *trans*-Konformation besitzt. Mit diesem System gelang es, die erste Prolylisomerase aus Schweinenieren zu isolieren (Fischer *et al.*, 1984b). Bei der Sequenzierung der Isomerase stellte sich später heraus, dass diese mit Cyclophilin, dem Bindungsprotein für das Immunsuppressivum Cyclosporin A, identisch ist (Fischer *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1989). 1987 konnte nachgewiesen werden, dass Prolylisomerasen *in vitro* die prolinlimitierte Faltung von Proteinen beschleunigen können (Lang *et al.*, 1987). Da PPIasen in allen Organismen vorkommen, wird die Faltungskatalyse seither als eine ihrer physiologischen Aufgaben betrachtet.

Die Katalyse einer Faltungsreaktion durch Prolylisomerasen ist ein eindeutiger Nachweis für einen prolinlimitierten Faltungsschritt. Allerdings kann man bei fehlender Faltungsbeschleunigung einen prolinlimitierten Schritt nicht sicher ausschließen. Die schnelle Ausbildung teilgefalteter Intermediate kann, wie im Fall von Ribonuklease A und Thioredoxin, die Zugänglichkeit für das Enzym herabsetzen und so die Katalyse der Prolinisomerisierung verhindern (Lang *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1988).

1.4.4 Prolinisomerisierung als regulatorischer Prozess

Seit längerer Zeit wurde postuliert, dass Prolinisomerisierungen als langsame Schritte in der Proteinfaltung eine regulatorische Funktion in zellulären Prozessen übernehmen können (Schmid *et al.*, 1991). Zum Beispiel katalysiert Pin1 die Isomerisierung von Phosphoserin- oder Phosphothreonin-Prolin-Bindungen. Dieser phosphorylierungsabhängigen Katalyse wird eine regulatorische Rolle im Zellzyklus zugeschrieben (Lu *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2002; Yaffe *et al.*, 1997).

Zudem konnte für einige Proteine mittels NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass sie konformationell heterogen, d.h. als Mischung von Prolylisomeren vorliegen. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die entsprechenden Proline in flexiblen oder lokal entfaltenen Strukturbereichen liegen. Der isomere Zustand ist hierbei nicht eindeutig fixiert, da die Kopplung mit der konformationellen Faltung zu schwach ist. Eine solche Heterogenität könnte auch für die Funktion wichtig sein. Die SH2-Domäne der Tyrosinkinase Itk liegt in zwei Konformationen vor, die sich im *cis/trans*-Zustand von Pro287 und in ihrer Affinität für

ein phosphotyrosinhaltiges Peptid unterscheiden (Andreotti, 2003; Brazin *et al.*, 2002; Mallis *et al.*, 2002). Kürzlich konnte eine ähnliche Heterogenität in der C-terminalen SH3-Domäne des Proteins Crk nachgewiesen werden (Sarkar *et al.*, 2007). Hier fungiert die *cis/trans*-Isomerisierung der Gly237-Pro238-Peptidbindung als lokaler Schalter. Die Isomerisierungsreaktion führt zu einer Reorientierung der benachbarten Aminosäuren und beeinflusst so die intramolekulare Wechselwirkung mit der N-terminalen SH2-Domäne.

1.5 Problemstellung

Die Infektion von *E. coli* durch den filamentösen Phagen fd eignet sich gut als Modellsystem, um die Bedeutung der Stabilität und des Faltungsmechanismus eines Proteins *in vitro* für seine Funktion *in vivo* aufzuklären. Untersuchungen zum Faltungsmechanismus des G3P* zeigten, dass die beiden Domänen N1 und N2 nach schneller Vorfaltung im letzten Schritt der *in vitro*-Rückfaltung langsam assoziieren. Diese Assoziation erstreckt sich über mehrere Stunden und wird durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 in der Gelenkregion zwischen den beiden Domänen limitiert. Die Zeitkonstante dieser Reaktion ist mit 6200 s deutlich langsamer als Prolinisomerisierungen in anderen Proteinen und Peptiden. Im Rahmen dieser Arbeit galt es zunächst, die molekularen Ursachen dieser extrem langsamen Isomerisierungsreaktion *in vitro* zu analysieren. Hierzu sollten im G3P* die zu Pro213 benachbarten Positionen mutiert und ihr Einfluss auf Faltung, Stabilität und Isomerisierungsrate untersucht werden.

Von besonderem Interesse war es zu untersuchen, ob diese langsame Faltungsreaktion von G3P* für die Funktion des Proteins *in vivo* wichtig ist. Für eine erfolgreiche Infektion ist die Domänendissoziation essentiell, da im nativen G3P die TolA-Bindungsstelle auf N1 durch die Interaktion mit N2 blockiert wird. Pro213 in der Gelenkregion wirkt als Schalter zwischen der offenen *trans*-Form und der geschlossenen *cis*-Form mit fest assoziierten Domänen und könnte somit nicht nur die Faltung von G3P*, sondern auch die Infektiosität der Phagen regulieren. Mit Hilfe von Prolylisomerasen und verschiedenen Phagenvarianten sollte der Einfluss der Prolinisomerisierung auf die Lebensdauer dieses offenen, aktiven Zustands von G3P und auf die Infektiosität der Phagen untersucht werden. Daneben sollte der geöffnete Zustand des G3P* *in vitro* genauer charakterisiert werden.

Die Bindung von N2 an den F-Pilus induziert *in vivo* die Domänendissoziation und ermöglicht so die Wechselwirkung der N1-Domäne mit TolA-C in der Zellmembran. Ein weiteres Ziel der Arbeit war deshalb, die Wechselwirkungen zwischen den Interaktionspartnern N2 und F-Pilus bzw. N1 und TolA-C zu charakterisieren. Zu diesem Zweck sollte F-Pilin, die monomere Untereinheit des F-Pilus, isoliert exprimiert und gereinigt werden. Mit Hilfe des F-Pilins sollte dann untersucht werden, ob eine Aktivierung der Phagen durch die isolierte Untereinheit auch in *trans* möglich ist oder ob der Phage für eine erfolgreiche Infektion am Pilus gebunden bleiben und mittels Pilusretraktion an die

Zelloberfläche gebracht werden muss. Desweiteren sollte die Bindung von TolA-C an die N1-Domäne in isolierter Form bzw. im G3P*-Kontext *in vitro* untersucht werden, um den Einfluss der N2-Domäne auf diese Interaktion zu bestimmen. Dieses Zusammenspiel von *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen sollte neue Einsichten vermitteln, wie die Stabilität und der Faltungsmechanismus des Gen-3-Proteins die Infektion von *E. coli* durch den Phagen fd steuern.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Für die Phagenpropagation, die Produktion von Plasmid-DNA und die Expression von Proteinen wurden folgende *E. coli*-Stämme verwendet.

XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>supE44 relA1 lac</i> [F ⁺ <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R)]	Stratagene (La Jolla, USA)
BL21 (DE3)	B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$) gal λ(DE3)	
BL21 (DE3) pLysS	B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$) gal λ(DE3) [pLysS (Cm ^R)]	
DH5α	DH5α F ⁻ φ80d <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r_K^-, m_K^+) <i>phoA supE44 λ^- gyrA96 thi-1 relA1</i>	
Rosetta	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$) gal <i>dcm</i> pRARE ² (Cm ^R)	
HM125	<i>degP rpoH15 eda</i>	Meerman & Georgiou, 1994
HB2156	<i>supE thi-1 Δ(lac-pro-AB) Δ(mcrB-hsdSM)5</i> (r_K^-, m_K^+)	Riechmann & Holliger, 1997

Der F⁺-Stamm *E. coli* XL1Blue wurde zur Phagenpropagation, Phageninfektion und zur Produktion von Plasmid-DNA verwendet, der F⁻-Stamm *E. coli* HB2156 zur Phageninfektion F-Pilus-freier Zellen. *E. coli* BL21 (DE3) pLysS und die anderen Bakterienstämme dienen zur Expression von Proteinen. Das Plasmid pLysS kodiert T7-Lysozym, das geringe Mengen von T7-RNA-Polymerase bindet und dadurch die Expression in nicht-induzierten Zellen verhindert.

Der in dieser Arbeit verwendete filamentöse Phage fd basiert auf dem Phagemid fCKCBS (Krebber *et al.*, 1997). Zur Expression der verschiedenen G3P*-Varianten und der C-terminalen Domäne von TolA wurde der Vektor pET11a verwendet. Die zur Expression von monomeren F-Pilin bzw. der verschiedenen F-Pilin-Fusionsproteine verwendeten Vektoren sowie die zur Herstellung des *ΔtraA*-Stamms verwendeten Plasmide sind im Anhang aufgeführt (10.1).

2.1.2 Oligodesoxyribonukleotide

Die zur Erstellung der jeweiligen Phagenkonstrukte sowie die zur Klonierung der G3P*-Varianten, der C-terminalen Domäne von TolA und der verschiedenen F-Pilin-Konstrukte verwendeten Oligodesoxyribonukleotide sind im Anhang aufgeführt (10.2). Alle Oligodesoxyribonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg, D), Biomers (Ulm, D) oder Invitrogen (Karlsruhe, D) bezogen.

2.1.3 Nährmedien

dYT-Medium: 5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Pepton
Nährböden: dYT-Medium mit 1,5% (w/v) Agar-Agar

Je nach Bedarf wurden dem autoklavierten Nährmedium sterilfiltrierte Antibiotika-Stammlösungen zugesetzt. Die Endkonzentration betrug 300 µg/ml bei Ampicillin (Amp), 25 µg/ml bei Chloramphenicol (Cm) bzw. 50 µg/ml bei Kanamycin (Km).

2.1.4 Enzyme

<i>Taq</i> -, <i>Pfu</i> - und <i>Vent</i> -DNA-Polymerase	Promega (Mannheim, D)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt, D)
	Promega (Mannheim, D)
	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D)
T4-DNA-Ligase, T4-Polynukleotidkinase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Alkalische Phosphatase aus Krabben (SAP)	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	New England Biolabs (Frankfurt, D)
Chymotrypsin, Lysozym	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

2.1.5 Längenstandards

Bench Mark™ Protein Ladder	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pUC19 DNA / <i>Msp</i> I (<i>Hpa</i> II)-Marker	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Lambda DNA / <i>Eco</i> 130I (<i>Sty</i> I)-Marker	

2.1.6 Chemikalien und Biochemikalien

Protease Inhibitor Cocktail Set II	Calbiochem (La Jolla, USA)
Ammoniumhydrogencarbonat, Chloroform/Isoamylalkohol, Dithiothreitol DTT, Imidazol, PEG-8000	Fluka (Seelze, D)
FlexiPrepKit™	GE Healthcare (Freiburg, D)
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	Gerbu (Gaiberg, D)
Guanidiniumchlorid (GdmCl, ultrapure)	ICN Biomedicals (Aurora, USA)
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid (TCEP)	MoBiTec (Göttingen, D)
Bi(sulfosuccinimidyl)-suberat	Perbio, Bonn
Ampicillin, Adenosin-5'-Triphosphat (ATP), Agarose, 30% Acrylamidlösung („Rotiphorese 30“), Chloramphenicol, Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), EDTA, Ethidiumbromid, Kanamycin, Phenol, Roti-Load-Proteinauftragspuffer, <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylenethyldiamin (TEMED), Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe, D)

Ammoniumperoxodisulfat (APS), Desoxycholat, Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg, D)
Coomassie Brilliant Blue G-250, Glutathion ox. (GSSG, > 98%), Glutathion red. (GSH, > 99%), Iodacetat (99 %), 5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure (1,5-IAEDANS, > 90%), Natriumcitrat, Silica S-5631, N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethan)-sulfonsäure (HEPES), Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt, D) im Reinheitsgrad p.A. bezogen. Das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde mit einer Seralpur-Reinstwasseranlage deionisiert (ddH₂O, Leitfähigkeit < 0,1 µS/cm). Puffer für spektroskopische Messungen wurden durch 0,45 µm-Nylonfilter filtriert und vor Gebrauch jeweils mindestens 20 min entgast.

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Membranfilter (0,22 µm und 0,45 µm)	FischerScientific (Schwerte, D)
NAP TM -10- und NAP TM -5-Säulen (Sephadex TM G-25 DNA Grade), HiLoad Superdex TM 75 (16/60) prep grade- und HiLoad Superdex TM 75 (26/60) prep grade-Gelfiltrationssäule	GE Healthcare (Freiburg, D)
Ni-NTA-Superflow-Agarose	Qiagen (Hilden, D)
Spectra/Por-Dialyseschläuche (Ausschlussgrenze 3,5 kD)	Spectrum (Los Angeles, USA)

2.1.8 Geräte

DX.17MV Sequential <i>stopped-flow</i> Spektrofluorimeter	Applied Photophysics (Leatherhead, UK)
Transilluminator 302 nm	Bachhofer (Reutlingen, D)
Sonifier B15 Ultraschall Desintegrator	Branson (Heusenstamm, D)
Christ Alpha 1-4 Gefriertrocknungsanlage	Christ (Osterode, D)
Kühlzentrifuge „Sorvall RC5B Plus“	DuPont (Bad Homburg, D)
Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg, D)
Thermoschüttler “Thermomixer 5436”	
FPLC-Anlage, 2050 MIDGET Electrophoresis Unit	GE Healthcare (Freiburg, D)
Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil	Hellma (Mühlheim, D)
Zentrifuge “Laborfuge 400R“	Hereaus (Hanau, D)
Hitachi-Fluoreszenzspektrophotometer F-4010	Hitachi (Tokio, Japan)
Jasco J-600 Spektropolarimeter mit PTC-348 WI Peltier- Element, Jasco-Fluoreszenzspektrophotometer (FP-6500)	Jasco (Groß-Umstadt, D)
Refraktometer	Krüss (Hamburg, D)
Bio-Print Darkroom CN-UV / WL	LTF Labortechnik (Wasserburg, D)
Microfluidizer M-110L	Microfluidics (Newton, USA)
Thermocycler PTC 100 (Mini-Cycler)	MJ Research (Watertown, USA)
Easyject Prima Elektroporationsapparatur	Peqlab (Erlangen, D)

Seralpur PRO 90 CN Reinstwasser-Anlage
 Cary 100 Bio UV-VIS-Spektrophotometer
 WTW pH 537 Microprocessor pH-Meter

Seral (Ransbach-Baumbach, D)
 Varian (Darmstadt, D)
 WTW (Weilheim, D)

2.1.9 Computerprogramme

Biocapt	LTF-Labortechnik (Wasserburg, D)
BioEdit	Hall, T. (Ibis Therapeutics, Carlsbad, USA)
Grafit 3.0, Grafit 5.0	Erithacus Software (Staines, UK)
ImageJ 1.30v	Rasband, W. (NIH, Bethesda, USA)
MolMol Version 2K.2	Koradi <i>et al.</i> , 1996
Pymol	DeLanoScientific LLC (San Francisco, USA)
Scientist 2.01	Micromath (St. Louis, USA)
Swiss-Pdb Viewer Version 3.7	GlaxoSmithKline (München, D), Guex & Peitsch, 1997

2.2 Elektrophoretische Methoden

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (1x): 40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA, pH^{20 °C} 8,0
Probenpuffer (6x): 4 M Harnstoff, 10 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin,
 0,1% (w/v) Bromphenolblau

Die analytische Auftrennung sowie die präparative Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese, wobei die Konzentration an Agarose (0,6 - 2,0 % (w/v)) je nach Größe der zu analysierenden Fragmente variierte. Die DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{6}$ Volumen Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 30 min lang in 0,5x TAE-Puffer bei einer Spannung von 6 V pro cm Elektrodenabstand. Die DNA-Banden wurden in einer Ethidiumbromid-Lösung (ca. 2 µg/ml Ethidiumbromid in 0,5x TAE-Puffer) 5 min lang gefärbt, kurz in 0,5x TAE-Puffer entfärbt und mit UV-Licht (302 nm) bestrahlt.

2.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow

Trenngel: 12,5% (w/v) Acrylamid (Stammlösung mit 37,5:1 Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid), 1 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,45, 0,1% (w/v) SDS
Sammelgel: 4,2% (w/v) Acrylamid (Stammlösung s.o.), 0,75 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,45, 0,07% (w/v) SDS
Probenpuffer (4x): 0,2 M Tris/HCl, pH^{RT} 7,0, 120 mM DTT, 40 mM EDTA, 15% (w/v) SDS, 48% (w/v) Glycerin, 0,04% (w/v) Bromphenolblau
Anodenpuffer: 0,2 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,9
Kathodenpuffer: 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M Tricin, 0,1% (w/v) SDS, pH^{RT} 8,25
Färbelösung: 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung: 10% (v/v) Essigsäure, 5% (v/v) Methanol

Das von Schägger und von Jagow eingeführte Verfahren zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht eine gute Trennung kleiner Proteine durch Verwendung des Folgeions Tricin (Schägger & von Jagow, 1987). Die Proben (etwa 2,5 µg) wurden mit Probenpuffer versetzt, 15 min im kochenden Wasserbad erhitzt und abzentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte in einer MIDGET-Vertikal-Elektrophorese-Apparatur bei einer Stromstärke von 25 mA für das Sammelgel und 45 mA für das Trenngel. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt, das Trenngel 2 h in der Färbelösung gefärbt und mehrere Stunden entfärbt.

2.3 Isolierung und Reinigung von DNA

2.3.1 Präparation von doppelsträngiger DNA

Für die Isolierung von doppelsträngiger Phagen- und Plasmid-DNA wurde der FlexiPrepKit™ (GE Healthcare, Freiburg, D) verwendet. Die Bakterienkulturen wurden über Nacht in 5 ml dYT-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum bei 37 °C angezogen. 1,5 ml der Kultur wurden abzentrifugiert und gemäß den Angaben des Herstellers behandelt. Die Zellen werden hierbei im alkalischen Milieu (Sambrook *et al.*, 1989) aufgeschlossen, die DNA an eine Anionenaustauschermatrix gebunden und mit 50 µl ddH₂O eluiert.

2.3.2 Präparation von einzelsträngiger Phagen-DNA

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH^{RT} 8,0, 1 mM EDTA

Zur Isolierung einzelsträngiger Phagen-DNA wurde das nach 2.7.1 erhaltene Phagenpellet in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Phagenhülle wurde durch Zugabe von 50 µl Phenol/Tris, starkem Schütteln für 30 s und Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 1 min) abgetrennt. Die ssDNA-haltige Oberphase wurde zusätzlich durch Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) unter den gleichen Bedingungen gewaschen. Die Präzipitation der ssDNA erfolgte mit 300 µl Ethanol / 3 M Na-Acetat (25:1), pH 5,2, 15 min lang bei RT. Nach 10-minütiger Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C) wurde die präzipitierte ssDNA mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen, 10 min bei RT getrocknet und in 20 µl ddH₂O resuspendiert.

2.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und Reinigung mit Silica

PBS: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4

Waschpuffer: 50 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, 2,5 mM EDTA, 50% Ethanol, pH^{RT} 7,5

Silica-Suspension: 1 g Silica in 10 ml 3 M NaI

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten (2.2.1) wurde die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten, und das Gelstück mit dem gleichen Volumen 6 M NaI 5 min unter Schütteln bei 55 °C aufgeschmolzen. Nach Zugabe einer entsprechenden Menge Silica-Suspension (1 mg bindet ca. 3 µg DNA) wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Das Silica wurde abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Waschpuffer restlos abgenommen. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe eines der eingesetzten Silica-Suspension entsprechenden Volumens ddH₂O und 5-minütiger Inkubation bei 45 °C. Nach kurzer Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min) wurde der

DNA-haltige Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das gleiche Verfahren wurde zur Entsalzung von DNA angewendet.

2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.4.1 PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

<i>Pfu</i>-Polymerase-Puffer (10x):	0,2 M Tris/HCl, $\text{pH}^{25\text{ }^{\circ}\text{C}}$ 8,0, 0,1 M KCl, 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM MgSO_4 , 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA
<i>Vent</i>-Polymerase-Puffer (10x) :	0,2 M Tris/HCl, $\text{pH}^{25\text{ }^{\circ}\text{C}}$ 8,0, 0,1 M KCl, 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM MgSO_4 1% Triton X-100

DNA-Fragmente wurden mit *Pfu*- oder *Vent*-Polymerase amplifiziert, da diese Polymerasen im Gegensatz zur fehleranfälligeren *Taq*-Polymerase eine 3'-Exonuclease-Aktivität besitzen. Die PCR erfolgte in 1x Puffer mit $400\text{ }\mu\text{M}$ dNTPs, je 400 nM Primer und $0,5\text{ }\mu\text{l}$ Templat-DNA (ca. $100\text{ ng}/\mu\text{l}$). Die Reaktion wurde nach Aufheizen auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durch Zugabe von 3 U *Pfu*-Polymerase bzw. 5 U *Vent*-Polymerase gestartet („*hot start*“). Die PCR erfolgte nach 2-minütiger Inkubation bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 30 Zyklen aus Strangtrennung ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$), Hybridisierung (je nach verwendetem Primerpaar $45 - 55\text{ }^{\circ}\text{C}$) und Polymerisation ($72\text{ }^{\circ}\text{C}$). Anschließend wurde eine 10-minütige Polymerisation bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt und der Erfolg der PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (2.2.1).

2.4.2 Kolonie-PCR

Mg-freier Puffer für <i>Taq</i>-Polymerase (10x):	0,1 M Tris/HCl, $\text{pH}^{25\text{ }^{\circ}\text{C}}$ 9,0, 0,5 M KCl, 1 % Triton X-100
--	--

Die Kolonie-PCR ermöglicht den Nachweis bestimmter DNA-Fragmente, indem einzelne Kolonien einer PCR mit *Taq*-Polymerase unterzogen werden. Da die PCR ausschließlich dem analytischen Nachweis dient, ist die höhere Fehlerrate der *Taq*-Polymerase hier nicht hinderlich. Ein $50\text{ }\mu\text{l}$ -PCR-Ansatz enthielt $5\text{ }\mu\text{l}$ Mg-freien Puffer (10x), $5\text{ }\mu\text{l}$ 25 mM MgCl_2 , $1\text{ }\mu\text{l}$ dNTPs (10 mM), je $1\text{ }\mu\text{l}$ Primer ($10\text{ }\mu\text{M}$), 1 U *Taq*-Polymerase und $36\text{ }\mu\text{l}$ ddH_2O . Zellen verschiedener Kolonien wurden in den PCR-Ansatz transferiert und $50\text{ }\mu\text{l}$ dYT-Medium mit dem restlichen Zellmaterial angeimpft, um mögliche positive Klone weiter kultivieren zu können. Die PCR erfolgte unter den in 2.4.1 angegeben Bedingungen und wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft (2.2.1). Die Kolonie-PCR wurde auch eingesetzt, um infizierte Kolonien in den Konkurrenzexperimenten auf die jeweiligen Phagen testen zu können (2.7.6).

2.4.3 *BluntEnd*-Mutagenese

<i>Pfu</i>-Polymerase-Puffer (10x):	0,2 M Tris/HCl, $\text{pH}^{25\text{ }^{\circ}\text{C}}$ 8,0, 0,1 M KCl, 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM MgSO_4 , 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA
T4-PNK-Puffer (10x):	0,7 M Tris/HCl, $\text{pH}^{25\text{ }^{\circ}\text{C}}$ 7,6, 0,1 M MgCl_2 , 5 mM DTT
T4-DNA-Ligase-Puffer (10x):	250 mM Tris/HCl, pH 7,6, 50 mM MgCl_2 , 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% PEG-8000

Durch *BluntEnd*-Mutagenese wurden Mutationen in Plasmide oder in das Phagengenom eingeführt. Hierbei wird mit Hilfe von gegenläufigen Primern das gesamte Phagengenom bzw. Plasmid

amplifiziert und anschließend zirkularisiert. Die PCR erfolgte unter den in 2.4.1 angegebenen Bedingungen mit 3 U *Pfu*-Polymerase, wobei auf eine ausreichende Polymerisationszeit (2 min pro kb DNA-Länge) geachtet werden muss.

Das lineare PCR-Fragment wurde im 30 µl-Ansatz phosphoryliert. Hierzu wurden 24 µl gereinigtes PCR-Produkt (2.3.3) mit 3 µl 10x T4-PNK-Puffer und 3 µl 10 mM ATP sowie 2 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl) 2 h lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das entsalzte, phosphorylierte Fragment durch Ligation zirkularisiert. 27 µl PCR-Produkt wurden mit 3 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl) 2 h bei 18 °C inkubiert. Die Templat-DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* geschnitten. *DpnI* erkennt seine Zielsequenz GATC nur bei N6-Methylierung des Adenins und spaltet deshalb spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA. Die *in vitro* mittels PCR synthetisierte DNA weist im Gegensatz zu der aus *E. coli* präparierten DNA diese Modifikation nicht auf und wird daher nicht geschnitten. Die Restriktion mit 1 µl *DpnI* (20 U/µl) bei 37 °C erfolgte nach 20-minütiger Inaktivierung der Ligase (bei 65 °C). Anschließend wurden elektrokompente *E. coli* XL1Blue-Zellen mit 5 µl des Ansatzes transformiert (2.5.1), und die DNA einzelner Kolonien wurde durch Sequenzierung (Seqlab, Göttingen, D) auf die gewünschte Sequenz überprüft.

2.4.4 *QuikChange*-Mutagenese

Mit Hilfe der *QuikChange*-Reaktion (Stratagene, La Jolla, USA) wurden ortsgerichtete Mutationen in Plasmide oder in das Phagengenom eingeführt. Im Gegensatz zur exponentiellen DNA-Amplifikation werden hier zwei zueinander komplementäre Primer an die entsprechende Sequenz angelagert. Für die Polymerisation (2 min pro kb DNA-Länge) wurde *Pfu*-Polymerase unter den in 2.4.1 angegeben Bedingungen verwendet, wobei in diesem Fall pro Zyklus und Ausgangsmolekül nur ein Strang amplifiziert wird (lineare PCR).

Das PCR-Produkt wurde durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert (2.2.1), und die Templat-DNA durch Restriktion mit *DpnI* (2.4.3) verdaut. Anschließend wurden *E. coli* XL1Blue-Zellen mit 5 µl des Ansatzes gemäß 2.5.1 transformiert, und die DNA einzelner Kolonien durch Sequenzierung (Seqlab, Göttingen, D) auf die gewünschte Sequenz überprüft.

2.5 Transformation von *E. coli*-Zellen

2.5.1 Herstellung und Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden 500 ml dYT-Medium mit 1 ml einer ÜNK von *E. coli* XL1Blue angeimpft und bis zu einer $OD_{600} \approx 0,7$ bei 30 °C angezogen. Die Kultur wurde 15 min lang auf Eis inkubiert und anschließend einmal mit sterilem ddH₂O und zweimal mit 10% (v/v) Glycerin gewaschen (Zentrifugation für jeweils 10 min bei 5000 rpm und 4 °C). Das gewaschene Zellpellet wurde in 1,5 ml 10% (v/v) Glycerin resuspendiert und in 40 µl-Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die zu transformierende DNA wurde 15 min lang gegen ddH₂O mikrodialysiert. Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, der dialysierte Ansatz zugegeben und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation der Zellen erfolgte durch einen elektrischen Puls (2500 V, ca. 5 ms). Sofort nach dem Elektropuls wurden 700 µl dYT-Medium zugegeben, und die Zellen 30 min lang bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Zellen kurz abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Bakterienpellet im restlichen Medium resuspendiert.

Die Zellen wurden auf Nährböden mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

2.5.2 Herstellung und Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Expression der C-terminalen Domäne von TolA, der verschiedenen G3P*-Varianten, der Fusionsproteine aus F-Pilin und dem Maltose-Bindeprotein (MBP) sowie weiterer F-Pilin-Konstrukte wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS verwendet. Der jeweilige Expressionsvektor wurde nach der Methode von Cohen in die Zellen übertragen (Cohen *et al.*, 1972).

Für die Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen wurden *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen in 500 ml dYT-Medium bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,7 angezogen. Die Zellsuspension wurde 15 min lang auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4 °C). Danach wurde das Bakterienpellet in 40 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 5 ml 80 mM CaCl₂, 20% (v/v) Glycerin aufgenommen und in 200 µl-Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 5 µl Plasmid zu 200 µl kompetenten Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 45 s-Hitzepuls bei 42 °C wurden 700 µl dYT-Medium zugegeben, und die Zellen 30 min lang bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand größtenteils abgenommen und die Zellen im restlichen Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf Nährböden mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

2.5.3 Transformation von *E. coli*-Zellen mit TSS-Lösung

TSS-Lösung: 10 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 10% (w/v) PEG-8000, 5% Dimethylsulfoxid, 50 mM MgCl₂, pH 6,5

Verschiedene *E. coli*-Stämme wurden auch durch TSS-Lösung mit Plasmiden transformiert (Chung *et al.*, 1989). Hierzu wurden die Bakterien in dYT-Medium bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,4 angezogen. Pro Transformationsansatz wurden 1,5 ml abzentrifugiert (3500 rpm, 4 °C, 3 min), in 100 µl eiskalter TSS-Lösung resuspendiert und mit 5 µl Plasmid mindestens 30 min lang bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 900 µl TSS-Lösung und 100 µl 200 mM Glucose zugegeben und der Ansatz 30 min lang bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand größtenteils abgenommen und die Zellen im restlichen Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf Nährböden mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

2.6 Erstellen einer Phagenbibliothek

2.6.1 Erstellen der Genbibliothek

T4-PNK-Puffer (10x): 0,7 M Tris/HCl, pH^{25 °C} 7,6, 0,1 M MgCl₂, 50 mM DTT
***Pfu*-Polymerase-Puffer (10x):** 0,2 M Tris/HCl, pH^{25 °C} 8,0, 0,1 M KCl, 0,1 M (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA

Zur Erstellung der G3P-Bibliotheken wurde zunächst eine PCR unter den in 2.4.1 angegebenen Bedingungen mit degenerierten Oligodesoxyribonukleotiden durchgeführt. Die im Falle der

Sättigungsmutagenese verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle 10-2 aufgeführt. Für die Zufallsmutagenese des G3P wurde eine fehlerbehaftete PCR durchgeführt. Im Gegensatz zum Standard-PCR-Ansatz wurde hier die Konzentration an dNTPs reduziert (40 - 200 μM), und dem Ansatz wurden 0,5 mM MnCl_2 und 2,5 - 5 mM MgCl_2 zugesetzt. Mit flankierenden Primern wurde das Gen mit *Taq*-Polymerase amplifiziert.

Das mutierte Genfragment wurde gereinigt (2.3.3) und phosphoryliert. 24 μl PCR-Produkt wurden mit 3 μl 10x T4-PNK-Puffer und 3 μl 10 mM ATP sowie 2 μl T4-Polynukleotidkinase (10 U/ μl) 2 h lang bei 37 °C inkubiert. Zum Einbau des randomisierten G3P-Fragments in das Phagen genom wurde dieses mit Phagen-ssDNA ((+)-Strang) hybridisiert und mittels *Pfu*-Polymerase in einer sogenannten „Auffüllreaktion“ zum vollständigen (-)-Strang ergänzt. Dazu wurden 3 μl 10x *Pfu*-Puffer, 3 μl 10 mM NAD^+ , 1,5 μl 10 mM NTPs, 8 μl Phagen-ssDNA, 11 μl phosphoryliertes Fragment, 3 U *Pfu*-Polymerase und 20 U *Taq*-Ligase gemischt. Nach 1 min-Denaturierung bei 95 °C und 2-minütiger Hybridisierung des Fragments an die Templat-DNA bei 60 °C erfolgte 2 h lang die Polymerisation bei 68 °C. Die Auffüllreaktion zum vollständigen (-)-Strang wurde durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert (2.2.1), wofür vor und nach der Reaktion je 4 μl des Ansatzes entnommen wurden.

2.6.2 Erstellen der Phagenbibliothek

E. coli XL1Blue wurden mit 10 μl mikrodialysiertem Produkt der Auffüllreaktion transformiert (2.5.1) und auf dYT^{Cm} -Nährmedium ausplattiert. Um den Phagentiter nach der Transformation zu bestimmen, wurden 10 μl des Transformationsansatzes für eine Verdünnungsreihe (in 1:10-Schritten in dYT-Medium) entnommen. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 2 μl auf dYT^{Cm} -Nährböden aufgetragen und bei 37 °C inkubiert. Aus der Zahl der gebildeten Kolonien kann unter Berücksichtigung des entsprechenden Verdünnungsfaktors der Phagentiter (cfu/ml) bestimmt werden.

Der ausplattierte Transformationsansatz lieferte einen Bakterienrasen, der in ca. 5 ml dYT-Medium resuspendiert und in 5 ml frischem dYT^{Cm} -Medium 2-3 h lang bei 37 °C geschüttelt wurde. Die folgende Phagenpräparation nach 2.7.1 lieferte eine Phagenbibliothek, in welcher der Phänotyp nicht unbedingt dem Genotyp entspricht, da in der Auffüllreaktion ein Hybrid-Doppelstrang aus Wildtyp-(WT)-DNA und mutierter DNA entstand. Um eine Übereinstimmung von Geno- und Phänotyp in der Phagenbibliothek zu erhalten, wurde eine 5 ml *E. coli* XL1Blue-Kultur mit 50 μl präparierten Phagen infiziert (2.7.2) und anschließend die Phagen erneut präpariert.

2.7 Arbeiten mit Phagen

2.7.1 Propagation und Isolierung von Phagen

PEG-Lösung: 30% PEG-8000, 1,5 M NaCl
PBS-Puffer: 80 g NaCl (1,37 M), 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 , ad 1 l ddH_2O

Zur Phagenpropagation wurden 5 ml einer *E. coli* XL1Blue-Kultur ($\text{OD}_{600} \approx 1,0$) in dYT-Medium mit 50 μl Phagensuspension (ca. 10^{10} - 10^{11} cfu/ml) infiziert. Nach 30 min wurden 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cm zugegeben. Die verwendeten Phagen vermitteln Cm-Resistenz, jedoch ist eine 30-minütige Inkubation für die Expression der Chloramphenicolacetyltransferase nötig. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

1,5 ml dieser ÜNK wurden bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und die Phagen gefällt, indem 1,2 ml des Überstands mit 250 μl PEG-Lösung 15 min lang bei RT inkubiert wurden. Nach 10-

minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen, das Phagenpellet durch erneute Zentrifugation vom restlichen Medium abgetrennt und in 50 µl PBS-Lösung + 0,01% NaN₃ resuspendiert.

2.7.2 Infektion des F⁺-Stamms *E. coli* XL1Blue

Zum Test der Infektiosität der verschiedenen Phagenvarianten gegenüber F⁺-Zellen wurde der *E. coli*-Stamm XL1Blue infiziert. Zu 495 µl einer *E. coli*-Kultur mit OD₆₀₀ ≈ 1 wurden 5 µl Phagensuspension gegeben und 5 min bei 37 °C bzw. 25 °C geschüttelt. Um Phagen abzutrennen, die nach dieser Zeit noch nicht infiziert hatten, wurde der Ansatz zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 2 min), das Zellpellet mit 500 µl dYT-Medium gewaschen, anschließend in 500 µl dYT-Medium resuspendiert und weitere 30 min bei 37° inkubiert.

Ausgehend von 10 µl des Infektionsansatzes wurde eine Verdünnungsreihe in 1:10-Schritten in dYT-Medium auf Eis erstellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 2 µl auf dYT^{cm}-Nährboden aufgetragen und bei 37 °C inkubiert. Aus der Zahl der gebildeten Kolonien kann unter Berücksichtigung des entsprechenden Verdünnungsfaktors der Phagentiter (cfu/ml) bestimmt werden.

2.7.3 Infektion des F⁻-Stamms *E. coli* HB2156

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH^{RT} 8,0, 1 mM EDTA

Für die Infektion von F⁻-Zellen wurde der Bakterienstamm *E. coli* HB2156 (Riechmann & Holliger, 1997) verwendet. Die Phagen wurden gemäß 2.7.1 präpariert und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Die Infektion erfolgte in dYT-Medium in Gegenwart von 50 mM CaCl₂ (Riechmann & Holliger, 1997). Zu 450 µl *E. coli* HB2156 wurden 25 µl 1 M CaCl₂ und 25 µl Phagensuspension gegeben. Der Ansatz wurde zur Infektion 5 min lang bei 25 °C geschüttelt, die restlichen Phagen durch kurze Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 2 min) abgetrennt, das Zellpellet gewaschen und der Phagentiter (cfu/ml) anhand von Verdünnungsreihen bestimmt (2.7.2).

2.7.4 Infektion des F⁻-Stamms *E. coli* HB2156 in Gegenwart verschiedener F-Pilin-Fusionproteine

Um die Aktivität verschiedener MBP-Pilin-Fusionsproteine zu testen, wurde überprüft, ob durch Zusatz des Fusionsproteins eine vermehrte Infektion von F⁻-Zellen erzielt werden konnte, d.h. ob das Fusionsprotein in *trans* eine Öffnung des G3P induziert. Hierzu wurde die Infektion von *E. coli* HB2156 (2.7.3) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des jeweiligen Pilin-MBP-Fusionsproteins durchgeführt. Im Kontrollansatz wurde die entsprechende Konzentration MBP bzw. das entsprechende Volumen Puffer eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die Phagenvariante fd(3A), die im G3P die Mutationen W181A, F190A und F194A in der F-Pilusbindungsstelle enthält (Deng & Perham, 2002), und die Phagen fd(ΔN2), bei denen die N2-Domäne deletiert wurde.

2.7.5 Bestimmung der Phageninfektiosität

Die Infektiosität von Phagen mit verschiedenen G3P-Varianten wurde relativ zu WT-Phagen bestimmt. Dabei war sowohl die Infektiosität gegenüber F⁺- (XL1Blue) und F⁻- (HB2156)-Zellen von Interesse. Die entsprechenden Phagen wurden wie unter 2.7.1 beschrieben isoliert, wobei der fd-haltige Überstand vor der Polyethylenglycol-Präzipitation sterilfiltriert wurde, um *E. coli*-Zellen aus der Phagenlösung zu entfernen.

Um die relative Phagenkonzentration bestimmen zu können, wurde aus einem Teil der Phagensuspensionen die ssDNA präpariert (2.3.2). Der DNA-Gehalt der verschiedenen Phagensuspensionen wurde durch Analyse der Bandenintensitäten im Agarose-Gel verglichen. Entsprechend den relativen DNA-Konzentrationen wurden Suspensionen gleicher Phagenkonzentration hergestellt und diese für die Bestimmung der relativen Infektiosität (2.7.2 und 2.7.3) verwendet.

2.7.6 Konkurrenzexperimente

Um die Infektiosität verschiedener Phagenvarianten zu vergleichen, wurden außerdem sogenannte Konkurrenzexperimente durchgeführt, bei denen jeweils zwei Phagenvarianten im gleichen Ansatz um die Infektion von *E. coli* XL1Blue konkurrieren. Hierzu wurden sterilfiltrierte Suspensionen gleicher Phagenkonzentration in einem bestimmten Verhältnis (meist 1:1) gemischt. Jeweils 5 µl der Phagenmischung wurden 5 min lang mit 495 µl *E. coli* XL1Blue bei 25 °C inkubiert (m.o.i > 1). Überschüssige Phagen wurden durch Zentrifugation abgetrennt, das Zellpellet mit dYT-Medium gewaschen und anschließend in 500 µl dYT-Medium aufgenommen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 25 °C wurde der Ansatz verwendet, um 5 ml dYT^{cm}-Medium anzupflanzen. Nach 8 h Phagenpropagation wurden die Phagen aus dieser Kultur präpariert (2.7.1) und für eine weitere Infektion eingesetzt. Es wurden vier bis zehn Zyklen aus Infektion, Phagenpropagation und -präparation durchgeführt. Um die konkurrierenden Phagen identifizieren zu können, wurden stille Mutationen an den Positionen S124/L125, S172/S173 bzw. S207/S208 im G3P eingeführt. Nach jeder Infektionsrunde wurde eine geeignete Verdünnung der ÜNK auf dYT^{cm}-Nährmedium ausplattiert und die jeweilige Phagenvariante in einzelnen Klonen mittels Kolonie-PCR (2.4.2) identifiziert. Der PCR-Ansatz enthielt neben dem Primer fdsseq eine Mischung an Primern, die spezifisch an die jeweilige stille Mutation binden. Es wurden mindestens 48 Klone pro Infektionsrunde getestet.

Der Einfluss der Prolylisomerase Cyclophilin 18 (Cyp18) auf die Infektiosität wurde mit Hilfe eines Konkurrenzexperiments zwischen WT-Phagen und Phagen mit der Mutation P213G in G3P bestimmt. Die Infektion erfolgte unter den oben angegebenen Bedingungen in Gegenwart von 10 µM Cyp18 bzw. in einem Kontrollansatz in Gegenwart eines entsprechenden Puffervolumens. Pro Infektionsrunde wurden mindestens 250 Klone getestet.

2.7.7 Kinetik der Phageninaktivierung

Die Inaktivierung der Phagen nach Entfaltung wurde anhand der Infektion F-Pilus-freier Zellen kinetisch untersucht. Eine sterilfiltrierte Phagensuspension wurde entweder durch 30-minütige Inkubation in 5 M GdmCl, 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, oder thermisch (15 min bei 65 °C) denaturiert. Die Rückfaltung und damit die Inaktivierung der Phagen wurde durch zehnfache Verdünnung in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C initiiert. Nach verschiedenen Rückfaltungszeiten wurden dem

Ansatz 25 µl-Aliquots entnommen und zur Infektion von *E. coli* HB2156 eingesetzt. Eine *E. coli* HB2156-Kultur wurde zu Beginn des Experiments aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert, um jeweils die gleiche Zahl an Zellen infizieren zu können. Die Infektion erfolgte unter den in 2.7.3 beschriebenen Bedingungen.

Die Phageninaktivierung wurde durch Zusatz verschiedener Konzentrationen Cyp18 (0,01 - 2 µM) im Rückfaltungsansatz auf eine mögliche Katalyse durch Prolylisomerasen untersucht. Eine parallel angesetzte Rückfaltung ohne Cyp18 diente als Kontrolle. Die Infektion erfolgte wie oben beschrieben.

2.7.8 Inhibition der Infektion durch gereinigtes G3P*

Die Infektion von F⁺-Zellen durch fd-Phagen kann durch isoliertes G3P* inhibiert werden. Um definierte Bedingungen für diese Inhibitionsexperimente zu schaffen, wurden die Experimente in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, durchgeführt. *E. coli* XL1Blue wurde bei 37 °C in dYT-Medium angezogen, die Zellen abzentrifugiert und in Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine OD₆₀₀ = 0,5 verdünnt und in 180 µl-Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden mit 10 µl einer 20-fachen Stammlösung an G3P* bzw. isolierter N1-Domäne verschiedener Konzentrationen 5 min lang bei 25 °C geschüttelt, anschließend mit 10 µl einer sterilfiltrierten Phagensuspension (m.o.i < 1) infiziert und weitere 30 min bei 25 °C inkubiert. Die Zahl der infizierten *E. coli*-Zellen wurde gemäß 2.7.2 bestimmt.

2.8 Klonierung verschiedener Proteinvarianten

T4-DNA-Ligase-Puffer (10x): 250 mM Tris/HCl, pH^{25 °C} 7,6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% PEG-8000

Zur Expression von TolA-C und verschiedenener G3P*-Varianten wurden die jeweiligen Genfragmente in den Vektor pET11a (Novagen, Schwalbach, D) kloniert. Die Konstrukte zur Expression von F-Pilin wurden in verschiedene Vektoren kloniert (10.1).

Für die Klonierung der G3P*-Varianten wurde das Genfragment, das die Reste 1 - 217 des G3P kodiert, aus der Phagen-dsDNA amplifiziert (2.4.1). Durch die verwendeten Primer wurden die nötigen Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme sowie ein C-terminaler Pro-Ser-Gly-(His)₆-Linker angefügt. Das Genfragment für die C-terminale Domäne von TolA umfasst die Reste 295 - 421 sowie einen C-terminalen Cys-(Ala)₃-(His)₆-Linker und wurde aus chromosomaler *E. coli*-DNA unter den in 2.4.1 angegebenen Bedingungen amplifiziert. Das Genfragment zur Expression von F-Pilin wurden ebenfalls aus chromosomaler *E. coli*-DNA amplifiziert, wobei je nach Konstrukt verschiedene Linker und Signalsequenzen angefügt wurden (Tabelle 3-8).

Die DNA-Fragmente von G3P* und TolA-C wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Nde*I und *Bam*HI in den Expressionsvektor pET11a kloniert, für die Klonierung der F-Pilin-Konstrukte wurden je nach Vektor unterschiedliche Restriktionsenzyme verwendet. Die amplifizierten Genfragmente wurden jeweils entsprechend 2.3.3 gereinigt. Die isolierte Vektor-DNA sowie das Genfragment wurden anschließend durch die Restriktionsendonukleasen geschnitten, indem sie mit einem 1/10 Volumen des entsprechenden Puffers (10x), gegebenenfalls mit 1/100 Volumen BSA (100x), und 10 U des Restriktionsenzym 2 h lang bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur (meist 37 °C) inkubiert wurden. Fragment und Vektor wurden nach 2.3.3 gereinigt und wie oben angegeben mit dem zweiten Restriktionsenzym geschnitten. Die Restriktionsansätze wurden durch präparative Agarose-

Gelelektrophorese gereinigt und das geschnittene Genfragment sowie die linearisierte Vektor-DNA aus dem Gel eluiert (2.2.1 und 2.3.3).

Die Ligation mit dem geschnittenen Vektor erfolgte im 20 µl-Ansatz. 2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10x), 9 µl geschnittenes Genfragment und 7 µl Vektor wurden mit 2 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl) mindestens 2 h bei 18 °C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde mikrodialysiert und *E. coli* XL1Blue mit 5 µl des Ansatzes gemäß 2.5.1 transformiert. Die Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR (2.4.2) auf im Vektor eingebaute Fragmente untersucht. Positive Klone wurden kultiviert und die Plasmid-DNA durch Sequenzierung (Seqlab, Göttingen, D) auf den entsprechenden Genotyp überprüft. Von positiven Klonen wurde eine Glycerinkultur (300 µl 87% Glycerin + 600 µl der Kultur) angelegt.

2.9 Konstruktion eines *traA*-knock-out-Stamms

Die Herstellung eines *traA*-knock-out-Stamms erfolgte nach der Methode von Datsenko und Wanner durch homologe Rekombination mit Hilfe der Red-Rekombinase des Phagen λ (Datsenko & Wanner, 2000). Zwei *traA*-Genfragmente mit ca. 100 bp-Länge wurden N- bzw. C-terminal an die Kanamycinkassette im Plasmid pCH70 kloniert (2.8). Das Plasmid wurde in *E. coli* XL1Blue propagiert, isoliert und die Kanamycinkassette mit den N- und C-terminal angrenzenden Bereichen des *traA*-Gens aus dem Plasmid geschnitten und durch präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt (2.2.1 und 2.3.3). Der *E. coli* XL1Blue-Stamm, in dem der *Knock-out* erstellt werden sollte, wurde mit dem Plasmid pKD46 transformiert und bei 30 °C kultiviert. Dieses Plasmid enthält das Gen für die λ Red-Rekombinase unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors und verleiht Amp-Resistenz. Die *E. coli*-Zellen XL1Blue pKD46 wurden in Anwesenheit von 1 mM IPTG elektrokompetent gemacht und mit dem linearen Genfragment aus den *traA*-homologen Bereichen und der Km-Kassette durch Elektroporation (2.5.1) transformiert. Der Transformationsansatz wurde 1 h lang bei 30 °C geschüttelt. Eine Hälfte des Ansatzes wurde auf dYT^{Km}-Nährboden ausplattiert und bei 37 °C inkubiert, die andere Hälfte wurde für weitere 8 h bei 30 °C geschüttelt und anschließend ausplattiert. Einzelne Klone wurden auf Wachstum in dYT^{Amp}-Medium getestet. Das Plasmid pKD46 besitzt einen temperatursensitiven Replikationsursprung und sollte bei 37 °C nicht repliziert werden können. Dadurch geht die λ Red-Rekombinase verloren und eine erneute homologe Rekombination wird verhindert. Die Insertion der Genkassette in das *E. coli*-Genom wurde durch PCR mit flankierenden Primern überprüft. Daneben wurde die Infizierbarkeit des Stamms durch fd-Phagen überprüft. Bei einem erfolgreichen *Knock-out* und damit fehlendem F-Pilin sollte keine Infektion in Abwesenheit von 50 mM CaCl₂ möglich sein. Außerdem wurde analysiert, ob der $\Delta traA$ -Stamm noch mit F⁻-Zellen konjugieren kann (2.10.1.2).

2.10 Test verschiedener F-Pilin-Konstrukte auf Funktionalität

2.10.1.1 Test auf Infizierbarkeit durch fd-Phagen

Zur Aufreinigung der F-Pilin-Konstrukte wurden verschiedene *Linker* und Affinitäts-*Tags* C-terminal an das Protein fusioniert. Dieser für die Reinigung verwendete C-terminale *Linker* kann die Bindung von G3P stark beeinflussen. Mit Hilfe des F-Pilin-knock-out-Stamms *E. coli* XL1Blue $\Delta traA$ konnten die zur Expression verwendeten F-Pilin-Konstrukte auf ihre Infizierbarkeit überprüft werden. Hierfür wurden Varianten von Propilin mit dem jeweiligen C-terminalen *Linker* in das Plasmid pTrc99A

kloniert. In diesem Vektor steht das Propilinkonstrukt unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren Promotors p_{lac} . Der *E. coli* $\Delta traA$ -Stamm wurde mit dem entsprechenden Plasmid transformiert (2.5.3) und in dYT^{Amp+Km} -Medium kultiviert. Um die relative Infizierbarkeit der F-Pilin-Konstrukte abschätzen zu können, wurde WT-Propilin in pTrc99A kloniert, und der $\Delta traA$ -Stamm damit transformiert. Die entsprechenden Stämme wurden in dYT^{Amp+Km} -Medium angezogen und die Überexpression bei einer $OD_{600} \approx 0,7$ mit 1 mM IPTG induziert, nach 1 h wurde die OD_{600} bestimmt und die Zellen auf eine $OD_{600} = 1$ verdünnt. 495 μ l der Zellsuspensionen wurden mit 5 μ l einer sterilfiltrierten Phagenlösung infiziert und die Infizierbarkeit der Stämme gemäß 2.7.2 bestimmt.

2.10.1.2 Konjugationstest

Funktionales F-Pilin ist für die Konjugation von Zellen notwendig, so dass mit Hilfe von Konjugationsexperimenten die Aktivität der F-Pilin-Konstrukte analysiert werden konnte. Hierzu wurden die mit plasmidkodierten Propilinvarianten kultierten $\Delta traA$ -Stämme in dYT^{Amp+Km} -Medium bei 37 °C angezogen, die Überexpression induziert und die Zellen 1 h lang inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit dYT -Medium gewaschen und in dYT -Medium auf die gleiche OD_{600} verdünnt. Parallel wurde der F'-Stamm *E. coli* BL21 (DE3) pLysS in dYT^{Cm} -Medium angezogen, die Zellen abzentrifugiert, gewaschen und in dYT -Medium resuspendiert. 500 μ l *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ($OD_{600} = 1,0$) wurden mit 500 μ l der kultierten $\Delta traA$ -Stämme ($OD_{600} = 1,0$) mit der jeweiligen plasmidkodierten Pilinvariante 3 h lang unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden Verdünnungsreihen in 1:10-Schritten auf dYT^{Cm+Km} -Nährböden erstellt. Bei erfolgreicher Konjugation wird das F-Plasmid in die F'-Zellen übertragen. Im *knock-out*-Stamm ist das *traA*-Gen durch eine Km-Kassette ersetzt, so dass bei Konjugation die Km-Resistenz mit dem F-Plasmid übertragen wird. Das Plasmid pLysS in den Empfängerzellen *E. coli* BL21 (DE3) pLysS verleiht Cm-Resistenz. Demnach können auf dYT^{Cm+Km} -Nährböden selektiv nur *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen angezogen werden, bei denen eine Konjugation durch das in den *knock-out*-Stämmen plasmidkodierte F-Pilin stattfinden konnte. Als Negativkontrolle diente ein *E. coli* XL1Blue $\Delta traA$ -Stamm, der mit dem leeren Plasmid pTrc99A transformiert wurde, bzw. als Positivkontrolle ein *E. coli* XL1Blue $\Delta traA$ -Stamm, der mit pTrc99A (*traA*) transformiert wurde.

2.11 Isolierung und Reinigung von F-Pili

SSC-Lösung:	15 mM Na-Citrat, 150 mM NaCl, pH 7,2
PEG-Lösung:	25% PEG-8000, 2,5 M NaCl
PBS-Lösung:	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 , ad 1 l, pH 7,4
TBT-Puffer (5x):	60,5 g Tris, 29,22 g NaCl, 10,2 g $MgCl_2$, ad 1 l, $pH^{4^\circ C}$ 7,4

Biologisch aktive F-Pili sollten nach dem Protokoll von Helmuth und Achtman aus dem *E. coli*-Stamm XL1Blue isoliert werden (Helmuth & Achtman, 1978). 10 ml einer *E. coli* XL1Blue-Kultur wurden auf dYT -Nährböden ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in SSC-Lösung resuspendiert, 2 h lang in 1 l SSC-Lösung bei 4 °C gerührt und durch 10-minütige Zentrifugation (GS3-Rotor, 5000 rpm, 4 °C) pelletiert. Die Zellen wurden mit 1 l SSC-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Überstände der beiden Zentrifugationsschritte wurden vereinigt und mit 5% PEG-8000, 0,5 M NaCl versetzt. Die F-Pili wurden pelletiert (GS3-Rotor, 8500 rpm, 1 h, 4 °C) und in 120 ml ddH_2O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (SS34-Rotor, 11500 rpm, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand durch Zugabe von 30 ml PEG-Lösung über Nacht bei

4 °C gefällt. Die F-Pili wurden pelletiert (SS34-Rotor, 11500 rpm, 30 min, 4 °C), in 1 ml PBS-Lösung resuspendiert und auf einen CsCl-Stufengradienten (1,2 - 1,5 g/cm³) in TBT-Puffer aufgeschichtet. Anschließend wurde 18 h lang eine Ultrazentrifugation in einem Beckman SW50.1-Rotor bei 43000 rpm und 4 °C durchgeführt. Die F-Pili-Bande wurde abgesaugt, zweimal gegen 1 l PBS-Lösung dialysiert, und die Aktivität der F-Pili analysiert. Hierfür wurde untersucht, ob bei Zusatz der F-Pili eine vermehrte Infektion von F⁻-Zellen durch fd-Phagen beobachtet werden kann (2.7.4).

2.12 Proteinexpression und Reinigung

2.12.1 Test auf Überexpression eines Proteins

LB-Medium:	5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton (+/- 4 g/l Glucose)
SOB-Medium:	5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 2,4 g/l MgSO ₄ , 0,186 g/l KCl
SOC-Medium:	5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 2,4 g/l MgSO ₄ , 0,186 g/l KCl, 4 g/l Glucose
TB-Medium:	24 g/l Hefeextrakt, 12 g/l Pepton, 9,4 g/l K ₂ HPO ₄ , 2,2 g/l KH ₂ PO ₄ (+/- 4 g/l Glucose)
dYT-Medium:	5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Pepton (+/- 4 g/l Glucose)

Um zu überprüfen, ob eine Überexpression der verschiedenen G3P*-Varianten bzw. TolA-C im Vektor pET11a möglich ist, wurden 5 ml dYT^{Amp^rCm}-Medium mit dem jeweiligen *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Stamm angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ ≈ 0,7 wurde 1 ml der Kultur mit OD₆₀₀ = 1 abzentrifugiert und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur restlichen Kultur wurde IPTG (Endkonzentration 1 mM) zur Induktion der Überexpression gegeben und weitere 4 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde erneut die OD₆₀₀ bestimmt und 1 ml mit OD₆₀₀ = 1 abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 50 µl 1x-Probenpuffer resuspendiert und durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (2.2.2). Eine Überexpression konnte anhand der Intensität der Bande mit dem entsprechenden Molekulargewicht vor und nach Induktion festgestellt werden. Der Test auf Überexpression der verschiedenen F-Pilin-Konstrukte erfolgte wie oben beschrieben, wobei die Expression sowohl in den verschiedenen, oben aufgeführten Nährmedien als auch bei verschiedenen Temperaturen (18 °C, 25 °C, 30 °C und 37 °C) untersucht wurde.

2.12.2 Expression und Reinigung der G3P*-Varianten und der isolierten N1-Domäne

2.12.2.1 Fermentation, Zellaufschluss und Waschen der *inclusion bodies*

Lysepuffer:	50 mM Tris/HCl, pH ^{RT} 8,0, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM DTT
Waschpuffer:	1 mM EDTA, 1 mg/ml Desoxycholat, 20 mM DTT, pH ^{RT} 8,0

Die G3P*-Varianten sowie die isolierte N1-Domäne wurden cytoplasmatisch in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS exprimiert. Die Fermentation erfolgte in 2 l dYT^{Cm^rAmp}-Medium bei 37 °C. Bei einer OD₆₀₀ ≈ 0,7 wurde die Überexpression des Proteins durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 3 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (GS3-Rotor, 7000 rpm, 10 min, 4 °C) und das Zellpellet in 50 ml Lysepuffer aufgenommen. Die Zellen wurden entweder mit Hilfe eines Microfluidizers oder durch einen Ultraschallschritt im Desintegrator (2x 5 min, Intensität 0,5, Pulsbetrieb) unter Eiskühlung aufgeschlossen, und die Zelltrümmer und *inclusion bodies* durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 15000 rpm, 10 min, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde in 15 ml Waschpuffer mit 0,2 mg/ml Lysozym gründlich resuspendiert und abzentrifugiert. Um Zelltrümmer vollständig zu entfernen, wurden die

inclusion bodies auf die gleiche Weise noch dreimal mit je 10 ml Waschpuffer ohne Lysozym und dreimal mit je 10 ml Lysepuffer gewaschen.

2.12.2.2 Reduktive Entfaltung und oxidative Rückfaltung

Entfaltungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,0, 1 mM EDTA, 6 M GdmCl, 50 mM GSH
Rückfaltungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,5, 1 mM EDTA, 0,5 mM GSSG

Die *inclusion bodies* wurden zunächst in 5 ml 0,1 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,5, 1 mM EDTA, 50 mM GSH gewaschen, um das DTT aus den vorherigen Waschschritten zu entfernen. Das Pellet wurde dann in 15 ml Entfaltungspuffer resuspendiert und die *inclusion bodies* 2 h unter reduktiven Bedingungen entfaltet. Die oxidative Rückfaltung wurde durch zehnfache Verdünnung in Rückfaltungspuffer initiiert und der Ansatz mindestens 6 h lang bei RT inkubiert. Anschließend wurde das bei der Rückfaltung auftretende Aggregat abzentrifugiert (SS34-Rotor, 16000 rpm, 20 min, 4 °C).

2.12.2.3 Reinigung des G3P* und der N1-Domäne

Ni-NTA-Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl
Ni-NTA-Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 500 mM Imidazol
Gelfiltrationspuffer: 20 mM K-Phosphat, 100 mM KCl, pH 7,0

Die G3P*-Varianten sowie die isolierte N1-Domäne wurden durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Agarosematrix und anschließender Gelfiltrationschromatographie gereinigt. Hierzu wurde der Rückfaltungsansatz aus 2.12.2.2 mit 50 mM MgCl₂ versetzt, um das im Puffer enthaltene EDTA zu komplexieren. Der Ansatz wurde in 10 mM Imidazol auf eine mit Ni-NTA-Puffer A äquilibrierte Säule mit einer Flussrate von 3 ml/min aufgetragen. Nichtbindende Proteine wurden durch Waschen mit 20 mM Imidazol bei einer Flussrate von 2,5 ml/min entfernt. Die Elution des Proteins erfolgte durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM.

Die proteinhaltigen Fraktionen aus der Affinitätschromatographie wurden vereinigt und in mehreren Läufen in 5 ml-Aliquots auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte HiLoad Superdex 75 (16/60) prep grade-Säule aufgetragen. Das Protein wurde mit einer Flussrate von 1,7 ml/min eluiert. Die vereinigten Fraktionen aus der Gelfiltration wurden bei 4 °C unter leichtem Rühren zweimal gegen 5 l 15 mM und einmal gegen 5 l 5 mM (NH₄)₂CO₃ dialysiert und lyophilisiert. Das getrocknete Protein wurde bei -20 °C gelagert.

2.12.3 Reinigung der C-terminalen Domäne von TolA

2.12.3.1 Fermentation und Zellaufschluss

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 8,0, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA,
 20 mM β-Mercaptoethanol

Die C-terminale Domäne von TolA (AS-Reste 295 - 421) mit einem zusätzlichem Cys-(Ala)₃-(His)₆-Linker wurde im Vektor pET11a im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS exprimiert. Hierzu wurden 5 l dYT^{Cm+Amp}-Medium bei 37 °C fermentiert und die Überexpression des Proteins bei einer OD₆₀₀ ≈ 0,7 durch 1 mM IPTG induziert. 4 h nach Induktion wurden die Zellen geerntet (GS3-Rotor, 7000 rpm,

10 min, 4 °C), das Zellpellet in 50 ml Lysepuffer aufgenommen und die Zellen mit Hilfe eines Microfluidizers unter Eiskühlung aufgeschlossen.

2.12.3.2 Reinigung von TolA-C

Ni-NTA-Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 14 mM β -Mercaptoethanol

Ni-NTA-Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 14 mM β -Mercaptoethanol, 500 mM Imidazol

Entfaltungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,0, 1 mM EDTA, 6 M GdmCl, 50 mM GSH

Rückfaltungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,5, 1 mM EDTA, 0,5 mM GSSG

Nach dem Zellaufschluss wurden restliche Zelltrümmer durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 16000 rpm, 20 min, 4 °C) entfernt, und der proteinhaltige Überstand mit 50 mM MgCl₂ versetzt. Der Ansatz wurde in 10 mM Imidazol auf eine mit Ni-NTA-Puffer A äquilibrierte Säule mit einer Flussrate von 3 ml/min aufgetragen. Nichtbindende Proteine wurden durch Waschen mit 20 mM Imidazol bei einer Flussrate von 2,5 ml/min entfernt. Die Elution von TolA-C erfolgte durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM.

Anschließend wurden die vereinigten Fraktionen dreimal gegen 5 l 15 mM (NH₄)₂CO₃ dialysiert und lyophilisiert. Das getrocknete Protein wurde in 15 ml Entfaltungspuffer gelöst und 2 h bei RT entfaltet. Die Rückfaltung wurde durch zehnfache Verdünnung in Rückfaltungspuffer initiiert und der Ansatz durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Agarosematrix und anschließende Gelfiltrationschromatographie unter den in 2.12.2.3 angegebenen Bedingungen weiter aufgereinigt.

2.12.4 Reinigung verschiedener MBP-Pilin-Fusionsproteine

Zur Expression von F-Pilin wurde dieses mit MBP fusioniert. Dabei wurden folgende Konstrukte in den Vektoren pET11a bzw. pMALc2x exprimiert: H₆-GSSG-MBP-Pilin, MBP-Pilin-A₃H₆, MBP-Pilin-GSSG-H₆, MBP-Pilin-GGGSEGGG-H₆ und H₆-GSSG-MBP-Pilin-MBP (Tabelle 3-8). Außerdem wurde das Protein H₆-GSSG-MBP gereinigt.

2.12.4.1 Fermentation und Zellaufschluss

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl, pH^{4 °C} 7,8, 400 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, Proteaseinhibitor Cocktail Set II

Die Expression erfolgte in 5 l dYT^{Cm+Amp}-Medium im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS. Die Zellen wurden bei 30 °C angezogen und die Expression bei einer OD₆₀₀ \approx 0,7 durch 1 mM IPTG induziert; anschließend wurde die Temperatur auf 25 °C erniedrigt. Nach 2 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (GS-Rotor, 7000 rpm, 10 min, 4 °C) geerntet, in 50 ml Lysepuffer resuspendiert und mit Hilfe eines Microfluidizers unter Eiskühlung aufgeschlossen.

2.12.4.2 Reinigung verschiedener MBP-Pilin-Fusionsproteine

Ni-NTA-Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH^{4 °C} 7,8, 400 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin
Ni-NTA-Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH^{4 °C} 7,8, 400 mM KCl, 10% (v/v) Glycerin,
 500 mM Imidazol,
Gelfiltrationspuffer: 20 mM Na-Phosphat, pH 7,0, 100 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin

Nach dem Zellaufschluss wurden restliche Zelltrümmer durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 16000 rpm, 20 min, 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Agarosematrix und anschließende Gelfiltrationschromatographie in einer HiLoad Superdex 75 (26/60) prep grade-Säule (Flussrate 2,5 ml/min) unter den in 2.12.2.3 beschriebenen Bedingungen weiter aufgereinigt. Die vereinigten proteinhaltigen Fraktionen aus der Gelfiltration wurden aufkonzentriert, schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

2.13 Modifikation von TolA-C

Um die Assoziation zwischen der isolierten N1-Domäne und TolA-C anhand von Förster-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Experimenten analysieren zu können, wurde TolA-C mit dem Fluoreszenzfarbstoff AEDANS markiert (TolA-C-AEDANS). Die Modifikation erfolgte durch eine kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit dem C-terminal angefügten Cystein in TolA-C (AS 295 - 421 + Cys-(Ala)₃-(His)₆). Zur Markierung wurde das Iodacetamid-Derivat des Farbstoffs eingesetzt. In einer nukleophilen Substitutionsreaktion ersetzt das Thiolation des Cysteins dabei das Iodat, wobei ein stabiler Thioether gebildet wird. Die Modifikation mit Iodacetat diente dazu, um unmarkiertes TolA-C-Protein (TolA-C-Ac) zu erhalten, in dem das zusätzliche Cystein blockiert ist. Vor der eigentlichen Modifikation erfolgte zunächst eine Reduktion des eventuell oxidierten Cysteins mittels TCEP. Hierzu wurden 6 mg TolA-C in 840 µl 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, gelöst, mit 30 µl 0,1 M TCEP und 30 µl 0,1 M EDTA versetzt und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung mit 2 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,0, auf pH 7,8 eingestellt, 2 mg IAEDANS (gelöst in 100 µl N,N-Dimethylformamid) bzw. 2 mg Iodacetat zum Ansatz gegeben, und der Reaktionsansatz 5 h bei RT geschüttelt. Nach Zentrifugation (30 min, 4 °C, 13000 rpm) wurde nicht umgesetztes IAEDANS bzw. Iodacetat durch zwei aufeinanderfolgende Gelfiltrationsschritte an einer NAPTM-10-Säule entfernt. Das modifizierte Protein wurde schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

2.14 Probenvorbereitung und Konzentrationsbestimmung

Für spektroskopische Messungen wurden die Proteinproben jeweils durch Gelfiltrationschromatographie an einer NAPTM-10- bzw. NAPTM-5-Säule mit dem entsprechenden Messpuffer entsalzt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 30 min), um eventuell auftretendes Aggregat abzutrennen.

UV-Absorptionsspektren wurden in einem Cary 100 Bio UV-VIS-Spektrophotometer im Bereich zwischen 240 und 350 nm bzw. im Fall von TolA-C-AEDANS zwischen 240 und 450 nm aufgenommen. Die Absorptionsspektren wurden in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 50 nm/min bei einer Bandbreite von 2 nm und einer Auflösung von 0,5 nm gemessen. Der entsprechende Puffer diente dabei jeweils als Referenz. Unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes wurde aus der Absorption bei 280 nm die Konzentration der Proteinlösung bestimmt. Für TolA-C-AEDANS konnte der Grad der Markierung aus den relativen

Konzentrationen an AEDANS (berechnet aus der Absorption bei 337 nm) und an TolA-C (berchnet aus der Absorption bei 280 nm) bestimmt werden. Allerdings muss hierbei die geringe Absorption des Farbstoffs bei 280 nm berücksichtigt werden. Folgende Extinktionskoeffizienten wurden nach der Methode von Gill & v. Hippel (Gill & von Hippel, 1989) berechnet.

WT-G3P*	$\epsilon_{280} = 41900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
G3P*-Varianten mit der Mutation D209Y	$\epsilon_{280} = 43400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
isolierte N1-Domäne	$\epsilon_{280} = 21000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
isolierte N2-Domäne	$\epsilon_{280} = 19700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
MBP-Pilin-MBP	$\epsilon_{280} = 136700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
MBP-Pilin	$\epsilon_{280} = 71850 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
MBP	$\epsilon_{280} = 64860 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
AEDANS	$\epsilon_{337} = 5700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
AEDANS	$\epsilon_{280} = 880 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
TolA-C	$\epsilon_{280} = 5480 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

2.15 Proteolyse von G3P* in Gegenwart von TolA-C

Die Proteolyse von G3P* wurde mit Chymotrypsin durchgeführt, da diese Protease nach aromatischen und hydrophoben Aminosäuren spaltet, die normalerweise im Proteininneren verborgen sind. Eine Spaltung durch Chymotrypsin deutet demnach auf eine (zumindest partielle) Entfaltung des Proteins hin. 10 μM der isolierten N1- bzw. N2-Domäne und WT-G3P* sowie 40 μM TolA-C-Ac wurden 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 2,5 μM Chymotrypsin versetzt und weitere 5 min bei 37 °C inkubiert. Um die Proteasestabilität von WT-G3P* in Gegenwart von TolA-C zu bestimmen, wurden 10 μM WT-G3P* mit 40 μM TolA-C-Ac inkubiert und wie oben beschrieben behandelt. Als Kontrolle dienten Ansätze der isolierten Domänen N1 und N2, WT-G3P* und TolA-C-Ac die unter obigen Bedingungen inkubiert, jedoch nicht mit Chymotrypsin versetzt wurden. Die Proben wurden anschließend mit $\frac{1}{4}$ Volumen 4x-Probenpuffer versetzt, schockgefroren und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (2.2.2).

2.16 Spektroskopische Charakterisierung

2.16.1 Circular dichroismus-Spektren

Nah- und Fern-UV-Circular dichroismus-(CD)-Spektren wurden an einem Jasco J-600 Spektropolarimeter in temperierbaren Quarzküvetten aufgenommen. Fern-UV-CD-Spektren wurden bei einer Proteinkonzentration von 10 μM in 10 mM K-Phosphat, pH 7,0, bei einer Schichtdicke von 0,1 cm gemessen, Nah-UV-CD-Spektren bei einer Proteinkonzentration von 20 μM in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei einer Schichtdicke von 1 cm. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 20 nm/min bei einer Bandbreite von 1 nm und einer Dämpfung von 1 s. Es wurden jeweils zehn Einzelspektren gemessen, gemittelt und das Pufferspektrum substrahiert. Aus der gemessenen Elliptizität kann mit Gleichung 2-1 die molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\theta]_{\text{MRW}}$ berechnet werden.

$$[\theta]_{\text{MRW}} = \frac{\theta \cdot 100}{c \cdot d \cdot N_{\text{AS}}} \quad \text{Gl. 2-1}$$

$[\theta]_{\text{MRW}}$: molare Elliptizität pro Aminosäurerest (in Grad·cm²·dmol⁻¹); θ : gemessene Elliptizität (in Grad); c : Konzentration des Proteins (in M); d : Schichtdicke (in cm); N_{AS} : Anzahl der Aminosäurereste des Proteins

Um die Fern-UV-CD-Spektren des WT-G3P* im geöffneten Zustand zu messen, wurden 100 µM WT-G3P* zunächst 5 min lang bei 53 °C entfaltet und die Rückfaltung durch zehnfache Verdünnung in 10 mM K-Phosphat, pH 7,0, initiiert. Nach 3 min- bzw. 6 h-Rückfaltung bei 25 °C wurden zehn Einzelspektren bei 10 °C gemessen, gemittelt und um das Pufferspektrum korrigiert. Als Kontrolle wurde das Spektrum des nativen Proteins bei 10 °C gemessen. Die Spektren wurden unter den oben beschriebenen Bedingungen aufgenommen, wobei die Bandbreite in diesem Fall 2 nm betrug.

2.16.2 Fluoreszenzemissionsspektren

Alle Fluoreszenzemissionsspektren wurden an einem Hitachi F-4010 Spektrofluorimeter in temperierbaren Fluoreszenzrührküvetten der Schichtdicke 1 cm bei 25 °C aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug meist 1 µM in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0. Die Spektren wurden mit einer Geschwindigkeit von 120 nm/min und einer Dämpfung von 0,5 s aufgenommen. Die Anregungsbandbreite betrug 5 nm, die Emissionsbandbreite 5 nm bzw. 10 nm. Die Fluoreszenzspektren wurden nach Anregung bei 280 nm zwischen 300 und 450 nm bzw. nach Anregung bei 295 nm zwischen 305 und 450 nm aufgenommen. Für TolA-C-AEDANS wurden die Emissionsspektren zwischen 300 und 550 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Die Spektren wurden jeweils um die Pufferfluoreszenz korrigiert.

2.17 Fluoreszenztitrationen

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D des N1-TolA-C-AEDANS-Komplexes wurden Fluoreszenztitrationen an einem Hitachi F-4010 Spektrofluorimeter durchgeführt. 0,1 µM TolA-C-AEDANS wurden mit verschiedenen Konzentrationen an isolierter N1-Domäne (0 - 15 µM) bzw. WT-G3P* in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, 1 h lang bei 25 °C inkubiert. Die Messungen wurden bei 25 °C und einer Dämpfung von 0,5 s in temperierbaren Fluoreszenzrührküvetten der Schichtdicke 1 cm durchgeführt. Als Sonde diente die Zunahme der Fluoreszenz bei 490 nm (Bandbreite 10 nm) nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 5 nm).

Durch eine Verdrängungstitration kann der K_D -Wert für den Komplex aus N1 und unmarkiertem TolA-C-Ac bestimmt werden. Hierfür wurde ein Komplex aus 0,1 µM N1 und 2 µM TolA-C-AEDANS mit unterschiedlichen Konzentrationen an TolA-C-Ac (0 - 5 µM) bei 25 °C in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, inkubiert. Die Fluoreszenzabnahme wurde bei 490 nm (Bandbreite 10 nm) nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 5 nm) bei einer Schichtdicke von 1 cm verfolgt.

Bei der Bindung von N1 an TolA-C-AEDANS gilt folgendes Gleichgewichtsschema:



Die Dissoziationskonstante K_D berechnet sich dann nach Gleichung 2-2:

$$K_D = \frac{[N1] \cdot [TolA^*]}{[N1 \cdot TolA^*]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad \text{Gl. 2-2}$$

K_D : Dissoziationskonstante (in M); $[N1]$: Konzentration an freiem N1 (in M), $[TolA^*]$: Konzentration an freiem TolA-C-AEDANS (in M); $[N1 \cdot TolA^*]$: Konzentration an N1-TolA-C-AEDANS-Komplex (in M); k_{on} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (in $M^{-1} \cdot s^{-1}$); k_{off} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation (in s^{-1})

Unter Berücksichtigung der Massenerhaltung, d.h. $[N1] = [N1]_0 - [N1 \cdot TolA^*]$ und $[TolA^*] = [TolA^*]_0 - [N1 \cdot TolA^*]$ (wobei $[N1]_0$ und $[TolA^*]_0$ die Gesamtkonzentration an N1 bzw. TolA-C-AEDANS bezeichnen) erhält man aus Gleichung 2-3 die Konzentration des N1-TolA-C-AEDANS-Komplexes.

$$[N1 \cdot TolA^*] = \frac{[N1]_0 + [TolA^*]_0 + K_D}{2} \pm \sqrt{\frac{([N1]_0 + [TolA^*]_0 + K_D)^2}{4} - [N1]_0[TolA^*]_0} \quad \text{Gl. 2-3}$$

Für die Fluoreszenz von TolA-C-AEDANS gilt:

$$F = F_0 + \Delta F \cdot \frac{[N1 \cdot TolA^*]}{[TolA^*]_0} \quad \text{Gl. 2-4}$$

F: gemessene Fluoreszenz, F_0 : Fluoreszenz des freien TolA-C-AEDANS, ΔF : maximale Fluoreszenzänderung bei vollständiger Bindung

Bei Kombination der Gleichungen 2-3 und 2-4 erhält man Gleichung 2-5, die an die gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration angepasst werden kann, um Werte für die Dissoziationskonstante K_D zu erhalten.

$$F = F_0 + \frac{\Delta F}{[TolA^*]_0} \left(\frac{[N1]_0 + [TolA^*]_0 + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([N1]_0 + [TolA^*]_0 + K_D)^2}{4} - [N1]_0[TolA^*]_0} \right) \quad \text{Gl. 2-5}$$

Im Falle der Verdrängungstitration existieren zwei Bindungsgleichgewichte:

$$K_{D,1} = \frac{[N1] \cdot [TolA^*]}{[N1 \cdot TolA^*]} ; K_{D,2} = \frac{[N1] \cdot [TolA]}{[N1 \cdot TolA]} \quad \text{Gl. 2-6}$$

K_D : Dissoziationskonstante (in M); $[N1]$: Konzentration an freiem N1 (in M), $[TolA^*]$: Konzentration an freiem TolA-C-AEDANS (in M), $[TolA]$: Konzentration an freiem TolA-C-Ac (in M), $[N1 \cdot TolA^*]$: Konzentration an N1-TolA-C-AEDANS-Komplex (in M), $[N1 \cdot TolA]$: Konzentration an N1-TolA-C-Ac-Komplex (in M)

Die Fluoreszenz setzt sich aus der anteiligen Fluoreszenz des freien und des gebundenen TolA-C-AEDANS zusammen. Dieses System ist analytisch nicht lösbar, weshalb eine numerische Berechnung mit Hilfe des Programms Scientist durchgeführt wurde. Dabei werden die Variablen mittels iterativer Minimierung der Fehlerquadrate an die gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration an TolA-C-Ac angeglichen. Die Konzentrationen an N1 und TolA-C-AEDANS sowie die Dissoziationskonstante für den N1-TolA-C-AEDANS-Komplex sind dabei fest vorgegeben. Als Rahmenbedingung wurde zusätzlich vorgegeben, dass die Konzentrationen an freiem N1 bzw. TolA-C positiv und nicht größer als die Gesamtkonzentration der entsprechenden Proteine ist. Die Auswertung lieferte die Dissoziationskonstante K_D für den N1-TolA-C-Ac-Komplex.

2.18 Bestimmung der konformationellen Proteinstabilität

2.18.1 Thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge

2.18.1.1 Messung thermisch induzierter Entfaltungsübergänge

Die thermische Entfaltung der G3P*-Varianten, von TolA-C-AEDANS und TolA-C-Ac wurde mittels Circular dichroismus in einem Jasco J-600 Spektropolarimeter mit PTC-348 WI Peltier-Element verfolgt. Die Messungen erfolgten bei einer Proteinkonzentration von 4 μM in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, und einer Heizrate von 1 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Die thermischen Übergänge der G3P*-Varianten wurden anhand der Abnahme des CD-Signals bei 230 nm verfolgt. Bei dieser Wellenlänge kann sowohl die Entfaltung der N1- als auch der N2-Domäne beobachtet werden, während das CD-Signal bei 210 nm eine selektive Sonde für die Entfaltung der N2-Domäne darstellt (Martin & Schmid, 2003a). Die Übergänge wurden bei einer Bandbreite von 1 nm, einer Dämpfung von 8 s und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die Auswertung der thermischen Entfaltungsübergänge bei 230 nm erfolgte unter Annahme eines Dreizustandsmodells (Beasty *et al.*, 1986), das eine gekoppelte Monomerisierung und Entfaltung beschreibt. Die thermischen Übergänge des G3P* bei 210 nm wurden auf Basis eines Zweizustandsmodells ausgewertet.

Die thermische Stabilität von WT-G3P* im geöffneten Zustand wurde anhand der Signaländerung bei 211 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration betrug 1 μM in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0. Um G3P* im geöffneten Zustand zu populieren, wurden 10 μM Protein 5 min lang bei 53 $^{\circ}\text{C}$ entfaltet und zum Start der Rückfaltung zehnfach in kaltem Puffer verdünnt. Nach 5 min Rückfaltung bei 10 $^{\circ}\text{C}$ wurde der thermische Übergang mit verschiedenen Heizraten (1 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ bis 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) gestartet. Die Messung erfolgte bei einer Schichtdicke von 1 cm, einer Bandbreite von 2 nm und einer Dämpfung von 4 s. Als Vergleich wurden die thermischen Übergänge der isolierten N2-Domäne, des nativen Proteins sowie des entfalteten WT-G3P* nach 6-stündiger Rückfaltung bei 25 $^{\circ}\text{C}$ unter den gleichen Bedingungen gemessen. Die Daten wurden mit Hilfe eines Zwei- bzw. Dreizustandsmodells ausgewertet.

Thermische Übergänge von TolA-C-AEDANS und TolA-C-Ac wurden anhand der Zunahme des CD-Signals bei 222 nm bei einer Bandbreite von 1 nm verfolgt. Die Messungen erfolgten bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Dämpfung von 1 s. Die Daten wurden unter Annahme eines Zweizustandsmodells ausgewertet.

2.18.1.2 Auswertung thermisch induzierter Entfaltungsübergänge

a) Auswertung nach dem Zweizustandsmodell

Entsprechend dem Zweizustandsmodell steht der native Zustand eines Proteins ohne Intermediate mit dem denaturierten Zustand im Gleichgewicht. Die Gleichgewichtskonstante K_U der Entfaltung kann aus einer physikalischen Eigenschaft y bestimmt werden (Gleichung 2-7). Die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG_D kann mit Hilfe von Gleichung 2-8 bestimmt werden.



$$K_U = \frac{[\text{U}]}{[\text{N}]} = \frac{(y_N - y_{\text{obs}})}{(y_{\text{obs}} - y_U)} \quad \text{Gl. 2-7}$$

$$\Delta G_D = -RT \ln K_U \quad \text{Gl. 2-8}$$

K_U : Gleichgewichtskonstante der Entfaltung; y_N, y_U : physikalische Eigenschaft des nativen bzw. denaturierten Proteins; y_{obs} : Messgröße bei Vorliegen einer Mischung von N und U; ΔG_D : freie Enthalpie der Entfaltung (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$); R : allgemeine Gaskonstante; T : Temperatur (in K)

Die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG_D wurde durch Integration des Enthalpie- und des Entropieterms zwischen T_M und T erhalten (Gleichung 2-9). Gleichung 2-10 gibt die lineare Änderung der Messgröße des nativen und des entfalteten Proteins an.

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_D(T_M) \cdot \frac{T_M - T}{T_M} - \Delta C_p \cdot \left[T_M - T + T \cdot \ln \left(\frac{T}{T_M} \right) \right] \quad \text{Gl. 2-9}$$

$$y_{N,U} = y_{N,U}^0 + m \cdot T \quad \text{Gl. 2-10}$$

$\Delta G_D(T)$: freie Enthalpie des thermischen Übergangs (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$); ΔH_D : van't Hoff-Enthalpie der Entfaltung bei T_M (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$); T_M : Temperatur am Mittelpunkt des Übergangs (in K); T : Temperatur (in K); ΔC_p : Änderung der molaren Wärmekapazität bei Entfaltung des Proteins bei konstantem Druck (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)

Die Kombination der Gleichungen 2-7 bis 2-10 liefert Gleichung 2-11. Der Mittelpunkt des thermischen Übergangs T_M und die van't Hoff-Enthalpie ΔH_D wurde dann anhand Gleichung 2-11 durch nicht-lineare Regression mit dem Programm Grafit 3.0 bzw. Grafit 5.0 berechnet.

$$y(T) = \frac{y_N^0 + m_N \cdot T + (y_U^0 + m_U \cdot T) \cdot e^{\left\{ -\frac{\Delta H_D(T_M)}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_M} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left[1 - \frac{T_M}{T} + \ln \left(\frac{T_M}{T} \right) \right] \right\}}{1 + e^{\left\{ -\frac{\Delta H_D(T_M)}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_M} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left[1 - \frac{T_M}{T} + \ln \left(\frac{T_M}{T} \right) \right] \right\}}} \quad \text{Gl. 2-11}$$

$y(T)$: Messgröße, hier gemessene Elliptizität (in Grad); y_N, y_U : physikalische Eigenschaft des nativen (N) bzw. denaturierten (U) Proteins, wobei y^0 jeweils die auf $T=0$ K extrapolierten Werte angibt; m_N, m_U : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins; T_M : Temperatur am Mittelpunkt des Übergangs (in K); ΔH_D : van't Hoff-Enthalpie der Entfaltung bei T_M (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$); ΔC_p : Änderung der molaren Wärmekapazität bei Entfaltung des Proteins bei konstantem Druck (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$); T : Temperatur (in K); R : allgemeine Gaskonstante

Aus den erhaltenen Werten für den Übergangsmittelpunkt T_M und die van't Hoff-Enthalpie ΔH_D (Privalov, 1993) kann die konformationelle Stabilität des Proteins berechnet werden (Gleichung 2-12).

$$\Delta G_D = \Delta H_D \cdot \left(1 - \frac{T}{T_M} \right) - \Delta C_p \cdot \left[T_M - T + T \cdot \ln \left(\frac{T}{T_M} \right) \right] \quad \text{Gl. 2-12}$$

Für die Auswertung der thermischen Übergänge der isolierten N2-Domäne wurde die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p auf $4000 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, für die thermischen Übergänge von TolA-C-AEDANS und TolA-C-Ac auf $6000 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ festgesetzt.

b) Auswertung nach dem Dreizustandsmodell

Bei der Auswertung thermischer Übergänge gemäß dem Dreizustandsmodell (Beasty *et al.*, 1986) müssen die beiden Gleichgewichtskonstanten der Entfaltung K_1 und K_2 berücksichtigt werden.



K_1 : Gleichgewichtskonstante des Übergangs von N nach I; K_2 : Gleichgewichtskonstante des Übergangs von I nach U; N: natives Protein; I: Intermediat; U: entfaltetes Protein

Die Gesamtmenge an Protein (P) setzt sich dabei aus den Anteilen des nativen Proteins (N), des Intermediats (I) und des denaturierten Proteins (U) zusammen (Gleichung 2-14). Aus den Gleichungen 2-13 und 2-14 ergibt sich dann Gleichung 2-15 für die Berechnung des Anteils an denaturiertem Protein U.

$$[P] = [N] + [I] + [U] \quad \text{Gl. 2-14}$$

$$[U] = \frac{K_1 \cdot K_2 \cdot [P]}{K_1 \cdot K_2 + K_1 + 1} \quad \text{Gl. 2-15}$$

Der apparente Anteil des denaturierten Proteins y_{app} ergibt sich aus der Summe der Anteile des denaturierten Proteins (X_U) und des Intermediats (X_I) (Gleichung 2-16), wobei z die optische Ähnlichkeit des Intermediats mit dem denaturierten Zustand angibt.

$$y_{\text{app}} = [X_U] + z \cdot [X_I]; \quad [X_U] = \frac{[U]}{[P]}; \quad [X_I] = \frac{[U]}{K_2 \cdot [P]} \quad \text{Gl. 2-16}$$

Aus der Kombination der Gleichungen 2-13 bis 2-16 erhält man Gleichung 2-17, welche die Entfaltung anhand der Messgröße $y(T)$ in Abhängigkeit von der Temperatur beschreibt. Die Berechnung der Schmelztemperaturen für die beiden Domänen des G3P* sowie der van't Hoff-Enthalpien erfolgte gemäß Gleichung 2-17. Die Auswertung wurde durch nicht-lineare Regression mit dem Programm Grafit 3.0 bzw. Grafit 5.0 durchgeführt.

$$y(T) = y_N^0 + m_N T + \frac{1}{1 + K_2 + \frac{1}{K_1}} \cdot (K_2 + z) \cdot \left[y_U^0 + m_U T - \left(y_N^0 + m_N T \right) \right] \quad \text{Gl. 2-17}$$

$$K_1 = \exp \left[-\frac{\Delta H_{D,1}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{M,1}} \right) - \frac{\Delta C_{p,1}}{R} \left(1 - \frac{T_{M,1}}{T} + \ln \frac{T_{M,1}}{T} \right) \right]$$

$$K_2 = \exp \left[-\frac{\Delta H_{D,2}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{M,2}} \right) - \frac{\Delta C_{p,2}}{R} \left(1 - \frac{T_{M,2}}{T} + \ln \frac{T_{M,2}}{T} \right) \right]$$

$y(T)$: Messgröße, gemessene Elliptizität in Grad; y_N , y_U : Signal des gefalteten (N) und entfalteten (U) Proteins, wobei y^0 jeweils die auf $T = 0$ K extrapolierten Werte angibt; m_N , m_U : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins; $T_{M,1}$, $T_{M,2}$: Temperatur am Mittelpunkt des Übergangs der N2- ($T_{M,1}$) bzw. der N1-Domäne ($T_{M,2}$) (in K); $\Delta H_{D,1}$, $\Delta H_{D,2}$: van't Hoff-Enthalpie der Entfaltung bei $T_{M,1}$ bzw. $T_{M,2}$ (in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$); $\Delta C_{p,1}$, $\Delta C_{p,2}$: Differenz der molaren Wärmekapazitäten des denaturierten und nativen Proteins der N2- ($\Delta C_{p,1}$) bzw. der N1-Domäne ($\Delta C_{p,2}$) (in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$); z : optische Ähnlichkeit des Intermediats mit dem entfalteten Zustand; T : Temperatur (in K); R : allgemeine Gaskonstante

Aus den erhaltenen Werten für den Übergangsmittelpunkt T_M und der van't Hoff-Enthalpie ΔH_D (Privalov, 1993) kann die konformationelle Stabilität des Proteins mit Hilfe von Gleichung 2-12 berechnet werden.

Für die N2-Domäne wurde ein ΔC_p von $10000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, für die N1-Domäne von $1000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ angenommen (Martin & Schmid, 2003a). Die optische Ähnlichkeit z wurde wegen der besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf 0,2 festgesetzt. Wurde z als Parameter freigegeben, wurden Werte zwischen 0,19 und 0,26 erhalten.

2.18.2 Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltungsübergänge

2.18.2.1 Konzentrationsbestimmung von GdmCl und Harnstoff

Für die Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung wurden GdmCl und Harnstoff eingesetzt. Die jeweilige Konzentration wird dabei aus der Differenz der Brechungsindices des Puffers in Gegenwart und Abwesenheit von GdmCl bzw. Harnstoff berechnet (Pace, 1986) (Gleichung 2-18 und 2-19).

$$[\text{GdmCl}] = 57,147 \cdot \Delta n + 38,68 \cdot (\Delta n)^2 - 91,6 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Gl. 2-18}$$

$$[\text{Harnstoff}] = 117,66 \cdot \Delta n + 29,753 \cdot (\Delta n)^2 + 185,56 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Gl. 2-19}$$

[GdmCl]: GdmCl-Konzentration (in M); [Harnstoff]: Harnstoff-Konzentration (in M);
 Δn : Differenz der Brechungsindices der Lösungen mit und ohne Denaturierungsmittel

2.18.2.2 Messung Denaturierungsmittel-induzierter Entfaltungsübergänge

a) Entfaltung der G3P*-Varianten

Die Entfaltung der G3P*-Varianten wurde durch das Denaturierungsmittel GdmCl induziert und anhand der Änderung der Proteinfluoreszenz verfolgt. Die Messungen erfolgten in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C an einem Hitachi F-4010 Spektrofluorimeter in temperierbaren 1 cm-Fluoreszenzrührküvetten. 0,5 μM Protein wurden in einem Gesamtvolumen von 1700 μl mit unterschiedlichen Konzentrationen an GdmCl 1 h lang bei 25 °C inkubiert. Die Fluorophore sind ungleich auf die Domänen des G3P* verteilt, so dass sich selektive Sonden für die Entfaltung der N1- bzw. N2-Domäne ergeben (Martin & Schmid, 2003a). Die Entfaltung der N2-Domäne wurde anhand der Änderung der Tyrosinfluoreszenz bei 310 nm (Bandbreite 5 nm) nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 5 nm) untersucht, die Entfaltung der N1-Domäne anhand der Änderung der Tryptophanfluoreszenz bei 360 nm (Bandbreite 5 nm) nach Anregung bei 295 nm (Bandbreite 5 nm). Die exakte GdmCl-Konzentration der einzelnen Proben wurde nach refraktometrischer Bestimmung der Brechungsindices mit Hilfe von Gleichung 2-18 bestimmt. Die Messwerte wurden jeweils um die Pufferfluoreszenz korrigiert. Die Auswertung erfolgte jeweils gemäß einem Zweizustandsmodell.

b) Entfaltung von TolA-C-Ac und TolA-C-AEDANS

Im Fall von TolA-C-Ac und TolA-C-AEDANS wurde die Entfaltung durch GdmCl und Harnstoff induziert und anhand der Änderung der Fluoreszenz und des Circular dichroismus verfolgt. Die Messungen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1700 μl in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C und einer Schichtdicke von 1 cm. Proben mit unterschiedlicher Konzentration an GdmCl bzw. Harnstoff wurden vor der Messung 1 h lang bei 25 °C inkubiert.

Für die GdmCl- bzw. Harnstoff-induzierten Übergänge diente die Fluoreszenzänderung als Messsonde. Die Entfaltung von 1 μ M TolA-C-AEDANS wurde dabei anhand der Änderung der AEDANS-Fluoreszenz bei 490 nm (Bandbreite 5 nm) nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 5 nm) verfolgt, die Entfaltung von 2 μ M TolA-C-Ac anhand der Änderung der Tyrosinfluoreszenz bei 307 nm (Bandbreite 10 nm) nach Anregung bei 278 nm (Bandbreite 5 nm). Im Fall der GdmCl-induzierten Übergänge wurden die Proben parallel durch CD-Spektroskopie untersucht. Als Messsonde diente dabei die Änderung des CD-Signals bei 222 nm bei einer Schichtdicke von 1 cm, einer Bandbreite von 1 nm und einer Dämpfung von 1 s. Die Konzentration des Denaturierungsmittels wurde nach der Messung anhand der Brechungsindices mit Hilfe der Gleichungen 2-18 und 2-19 bestimmt. Die Messwerte wurden jeweils um die Pufferfluoreszenz korrigiert. Die Auswertung erfolgte gemäß einem Zweizustandsmodell.

2.18.2.3 Auswertung Denaturierungsmittel-induzierter Entfaltungsübergänge

Die experimentellen Daten aus den CD- und Fluoreszenzmessungen wurden mit Hilfe des Zweizustandsmodells ausgewertet (Tanford, 1968a). Dabei wird das lineare Extrapolationsmodell angenommen, welches die lineare Abhängigkeit der Proteinstabilität von der Konzentration an Denaturierungsmittel beschreibt (Gleichung 2-20).

$$\Delta G_D = \Delta G_D(\text{H}_2\text{O}) + m \cdot [\text{D}] \quad \text{Gl. 2-20}$$

ΔG_D : freie Enthalpie der Entfaltung (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$); $\Delta G_D(\text{H}_2\text{O})$: freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$); m : Kooperativität des Übergangs (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$); $[\text{D}]$: Denaturierungsmittelkonzentration (in M)

Für die spektroskopischen Eigenschaften des nativen (N) und des denaturierten Proteins (U) wird eine lineare Abhängigkeit von der Konzentration an Denaturierungsmittel angenommen (Gleichung 2-21).

$$y_{\text{N,U}} = y_{\text{N,U}}^0 + m_{\text{N,U}} \cdot [\text{D}] \quad \text{Gl. 2-21}$$

$y_{\text{N,U}}$: Signal des gefalteten (N) und entfalteten (U) Proteins; $y_{\text{N,U}}^0$: spektroskopische Eigenschaft des nativen bzw. entfalteten Proteins in Abwesenheit des Denaturierungsmittels; $m_{\text{N,U}}$: Steigung der Basislinie des nativen bzw. denaturierten Proteins; $[\text{D}]$: Denaturierungsmittelkonzentration (in M)

Bei Kombination der Gleichungen 2-7, 2-8, 2-20 und 2-21 erhält man Gleichung 2-22 (Santoro & Bolen, 1988), welche die Entfaltung anhand der Messgröße y_{obs} in Abhängigkeit von der Konzentration an Denaturierungsmittel beschreibt. Der Angleich an die experimentellen Daten erfolgte durch nicht-lineare Regression mit dem Programm Grafit 3.0 bzw. Grafit 5.0.

$$y_{\text{obs}}([\text{D}]) = \frac{y_{\text{N}}^0 + m_{\text{N}} \cdot [\text{D}] + (y_{\text{U}}^0 + m_{\text{U}} \cdot [\text{D}]) \cdot e^{-\frac{\Delta G_D(\text{H}_2\text{O}) + m_{\text{U}} \cdot [\text{D}]}{RT}}}{1 + e^{-\frac{\Delta G_D(\text{H}_2\text{O}) + m_{\text{U}} \cdot [\text{D}]}{RT}}} \quad \text{Gl. 2-22}$$

y_{obs} : Messgröße bei Vorliegen einer Mischung von N und U; $y_{\text{N,U}}$: Signal des gefalteten (N) und entfalteten (U) Proteins, wobei y^0 jeweils die auf $T = 0$ K extrapolierten Werte angibt; $m_{\text{N,U}}$: Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins; $[\text{D}]$: Denaturierungsmittelkonzentration (in M); $\Delta G_D(\text{H}_2\text{O})$: freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$); R : allgemeine Gaskonstante; T : Temperatur (in K)

2.19 Kinetische Messung der Faltungsreaktionen

2.19.1 Kinetische Messungen zur Faltung der G3P*-Varianten

2.19.1.1 Kinetik nach manueller Mischung

Langsame Ent- und Rückfaltungsreaktionen verschiedener G3P*-Varianten wurden nach manueller Mischung anhand der zeitlichen Fluoreszenzänderung an einem Hitachi F-4010 Spektrofluorimeter bestimmt. Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 0,5 μM in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C in Fluoreszenzrührküvetten der Schichtdicke 1 cm durchgeführt. Die Entfaltung wurde dabei durch zehnfache Verdünnung von 5 μM nativem Protein in verschiedenen GdmCl-Konzentrationen initiiert, die Rückfaltung durch zehnfache Verdünnung von 5 μM denaturiertem Protein (in 5 M GdmCl) auf verschiedene GdmCl-Konzentrationen. Durch geeignete Wahl der Anregungs- und Emissionswellenlänge konnten selektiv die Faltungsreaktionen der N1- bzw. der N2-Domäne verfolgt werden. Die zeitliche Änderung der Tyrosinfluoreszenz bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm lieferte ein spezifisches Signal für Reaktionen der N2-Domäne, die Änderung der Tryptophanfluoreszenz bei 360 nm nach Anregung bei 295 nm für Reaktionen der N1-Domäne. Die Messungen erfolgten dabei jeweils bei einer Dämpfung von 0,5 s und einer Bandbreite von 5 nm bzw. 10 nm für Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge.

2.19.1.2 Kinetik nach schneller Mischung

Schnelle Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktionen wurden nach *stopped-flow*-Mischung an einem Applied Photophysics DX.17MV Sequential *stopped-flow*-Spektrofluorimeter untersucht. Die Messungen wurden bei 25 °C mit einer Proteinkonzentration von 0,5 μM in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, durchgeführt, wobei Messzelle, Vorschubspritzen und Schlauchverbindungen temperiert wurden. Vor jeder Messung wurden die Lösungen 5 min lang in den Vorschubspritzen temperiert. Die Vorschubspritzen wurden mit einem Vorschubdruck von 2,5 bar bewegt. 5,5 μM natives bzw. denaturiertes (in 5,5 M GdmCl) Protein wurde dabei elffach in Puffer verschiedener GdmCl-Endkonzentrationen verdünnt. Die Kinetik wurde dann anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm (Faltungsreaktionen der N2-Domäne) bzw. 295 nm (Faltungsreaktionen der N1-Domäne) verfolgt. Die Bandbreite des Anregungsspalts betrug 10 nm, die Schichtdicke der Beobachtungszelle 2 mm. Streu- und Fluoreszenzlicht unterhalb von 320 nm wurde durch eine mit Aceton gefüllte 5 mm-Küvette vor dem Photomultiplier absorbiert. Die am Photomultiplier eingestellte Spannung variierte bei den verschiedenen Varianten zwischen 750 und 850 V, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Für jede GdmCl-Konzentration wurden zehn Einzelmessungen durchgeführt, gemittelt und nach Gleichung 2-23 bzw. 2-24 analysiert. Die Entfaltung und Rückfaltung der isolierten N1-Domäne der G3P*-Varianten wurde in Einfachmischexperimenten anhand der Änderung der Tryptophanfluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Die Messungen erfolgten unter den oben beschriebenen Bedingungen.

Durch *stopped-flow*-Doppelmischexperimente konnte die schnelle Entfaltungsreaktion der N1-Domäne in Gegenwart der entfalteten N2-Domäne untersucht werden. Dabei wurden zunächst 33 μM denaturiertes G3P-Protein (in 5,5 M GdmCl) elffach in Puffer verdünnt, um die Rückfaltung bei 0,5 M GdmCl zu initiieren. Im 1 s-Rückfaltungspuls kann nur die N1-Domäne falten, die N2-Domäne mit der langsameren Faltungsreaktion liegt noch ungefaltet vor. Anschließend wurde die N1-Domäne durch sechsfache Verdünnung in Puffer verschiedener GdmCl-Konzentrationen erneut entfaltet. Die

Kinetik wurde anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt. Die Messungen erfolgten unter den oben beschriebenen Bedingungen.

Anhand von *stopped-flow*-Doppelmischexperimenten konnte auch die Entfaltungsreaktion der N2-Domäne verfolgt werden, wenn die beiden gefalteten Domänen noch dissoziiert vorliegen. Hierzu wurden 33 μM entfaltetes Protein (in 5,5 μM) zunächst durch elffache Verdünnung in Puffer rückgefaltet. Nach 3-minütiger Rückfaltung erfolgte die erneute Entfaltung von N2 durch sechsfache Verdünnung in GdmCl-Konzentrationen zwischen 1,5 und 3,0 M GdmCl. Die Reaktionen wurden anhand der Änderungen der integralen Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Messungen erfolgten unter den oben beschriebenen Bedingungen.

2.19.1.3 Kinetik der Domänenassoziation

a) Doppel- und Dreifachmischexperimente

Die prolinlimitierte Domänenassoziation geht nicht mit einer Änderung der Fluoreszenz einher, so dass diese Faltungsreaktion zum nativen Protein nicht direkt verfolgt werden kann. Anhand von Doppelmischexperimenten kann jedoch bestimmt werden, wie viele Moleküle sich nach einer bestimmten Rückfaltungszeit im nativen Zustand befinden (Schmid, 1983; Schmid, 1986). Dieser Zweischritt-Entfaltungstest beruht darauf, dass Moleküle, welche die Barriere mit der höchsten Aktivierungsenergie überwunden und damit den nativen Zustand erreicht haben, im anschließenden Entfaltungsschritt langsam entfalten. Intermediate, die diesen letzten Faltungsschritt noch nicht durchlaufen haben, entfalten jedoch schnell. Die zeitliche Änderung der Amplitude der langsamen Entfaltungsreaktion liefert dann die Kinetik der Domänenassoziation.

Das Doppelmischexperiment wurde nach Handmischung an einem Hitachi F-4010 Spektrofluorimeter in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, durchgeführt. 50 μM entfaltetes Protein (in 5,0 M GdmCl) wurde zehnfach in Puffer verdünnt. Die Rückfaltung erfolgte bei 25 °C in 0,5 M GdmCl. Nach verschiedenen definierten Rückfaltungszeiten wurden Aliquots entnommen und erneut entfaltet. Die Entfaltung erfolgte je nach Stabilität der untersuchten G3P*-Variante bei verschiedenen GdmCl-Endkonzentrationen bei 15 °C oder 25 °C. Für den Entfaltungsschritt, d.h. die Detektionsreaktion, wurde eine niedrigere Temperatur gewählt, um die Entfaltungsreaktion durch manuelle Mischung gut auflösen zu können. Auf die Kinetik der Domänenassoziation hat dies keinen Einfluss, da die Rückfaltungsreaktion, d.h. die Bildung nativer Moleküle, bei 25 °C durchgeführt wurde. Die Entfaltung wurde anhand der Tyrosinfluoreszenz bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm oder alternativ anhand der Tryptophanfluoreszenz bei 360 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt. Die Bandbreite betrug dabei 5 nm für den Anregungs- bzw. 10 nm für den Emissionsspalt. Um zu überprüfen, ob die Domänenassoziation durch Prolylisomerasen katalysiert werden kann, wurde das Doppelmischexperiment in Gegenwart von 1 μM Cyp18 im Rückfaltungsansatz durchgeführt.

Die *cis*→*trans*-Isomerisierung von Pro213 im denaturierten Zustand ist ebenfalls nur über indirekte Messungen zugänglich, wofür Dreifachmischexperimente genutzt wurden (Schmid, 1986). Im ersten Schritt wurde natives Protein für verschiedene Zeiten (10 - 500 s) in 5,0 M GdmCl, 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C entfaltet. Die Rückfaltung wurde durch manuelle zehnfache Verdünnung im zweiten Schritt initiiert (bei 25 °C), und nach einer Rückfaltungszeit von 180 s wurde durch eine weitere manuelle zehnfache Verdünnung in 4 M GdmCl bei 15 °C die Entfaltungsreaktion gestartet. Die Messungen erfolgten dabei mit 0,5 μM Protein unter den oben beschriebenen Bedingungen.

b) CD-spektroskopische Messung der Domänenassoziation

Die Bildung von nativem G3P* kann CD-spektroskopisch an einem Jasco J-600 Spektropolarimeter mit PTC-348 WI Peltier-Element verfolgt werden. Hierzu wurde 10 μM WT-G3P* 5 min lang bei 53 °C entfaltet und anschließend zehnfach in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C verdünnt. Die Rückfaltungsreaktion wurde anhand der Zunahme des CD-Signals bei 211 nm (Bandbreite 2 nm) bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Dämpfung von 8 s gemessen.

2.19.2 Kinetische Messungen zur Faltung von TolA-C

2.19.2.1 Kinetik nach schneller Mischung

Die Faltungsreaktionen von TolA-C-Ac und TolA-C-AEDANS wurden nach *stopped-flow* Mischung an einem Applied Photophysics DX.17MV Sequential *stopped-flow*-Spektrofluorimeter verfolgt. Die Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, unter den in 2.19.1.2 angegeben Bedingungen durchgeführt. Die Endkonzentration an Protein betrug dabei 4 μM für TolA-C-Ac bzw. 2 μM für TolA-C-AEDANS. Natives bzw. denaturiertes (in 4 M GdmCl) Protein wurde elffach in Puffer verschiedener GdmCl-Endkonzentrationen verdünnt. Im Fall von TolA-C-Ac wurde die Kinetik anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 300 nm nach Anregung bei 278 nm bzw. im Fall von TolA-C-AEDANS anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 460 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Die Bandbreite des Anregungsspalts betrug jeweils 10 nm, die Schichtdicke der Beobachtungszelle 2 mm. Streu- und Fluoreszenzlicht unterhalb von 300 nm bzw. 460 nm wurde durch eine 5 mm-Küvette vor dem Photomultiplier absorbiert, die entweder mit einer 10 mM cCMP-Lösung (TolA-C-Ac) oder einer Lösung von p-Nitroanilin (2 mg/ml) in Ethanol (TolA-C-AEDANS) gefüllt war. Am Photomultiplier wurde eine Spannung von 750 V eingestellt, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Für jede GdmCl-Konzentration wurden zehn Einzelmessungen durchgeführt, gemittelt und nach Gleichung 2-23 bzw. 2-24 analysiert.

2.19.2.2 Kinetik nach manueller Mischung

Die langsame Phase der TolA-C-Rückfaltung wurde durch manuelle Mischung an einem Hitachi F-4010 Spektrofluorimeter untersucht. Die Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, mit einer Proteinkonzentration von 4 μM TolA-C-Ac bzw. 2 μM TolA-C-AEDANS durchgeführt. Die Rückfaltung wurde durch zehnfache Verdünnung des denaturierten Proteins (in 4 M GdmCl) auf verschiedene GdmCl-Konzentrationen initiiert. Die Kinetik wurde für TolA-C-Ac anhand der Fluoreszenzänderung bei 307 nm nach Anregung bei 278 nm bzw. für TolA-C-AEDANS anhand der Fluoreszenzänderung bei 490 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Messungen erfolgten jeweils bei einer Dämpfung von 0,5 s und einer Bandbreite von 5 nm bzw. 10 nm für Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge. Um die Katalysierbarkeit der langsamen Rückfaltungsphase durch Prolylisomerasen zu überprüfen, wurde die Rückfaltung in Gegenwart von 1 μM *E. coli* SlyD bzw. 1 μM Cyp18 gemessen.

2.19.3 Auswertung der kinetischen Messungen

Die Auswertung der kinetischen Messungen von G3P*-Varianten und TolA-C erfolgte durch Angleich der experimentellen Daten an einfach- oder mehrfachexponentielle Kurvenverläufe (Gleichung 2-23).

$$y(t) = y_0 + \sum_{i=0}^n A_i \cdot \exp(-k_i \cdot t); \quad k_i = 1/\tau_i \quad \text{Gl. 2-23}$$

$y(t)$: Fluoreszenzsignal zur Zeit t ; y_0 : Fluoreszenzsignal zur Zeit $t = 0$ s; A_i : Amplitude der Signaländerung; k_i : Rate der Signaländerung (in s^{-1}); τ_i : Zeitkonstante der Signaländerung (in s)

In manchen Fällen wurde obige Gleichung durch einen linearen Anteil ergänzt, wodurch Photo- und Aggregationseffekte während längerer Messzeiten berücksichtigt werden konnten (Gleichung 2-24).

$$y(t) = y_0 + m \cdot t + \sum_{i=0}^n A_i \cdot \exp(-k_i \cdot t); \quad k_i = 1/\tau_i \quad \text{Gl. 2-24}$$

$y(t)$: Fluoreszenzsignal zur Zeit t ; y_0 : Fluoreszenzsignal zur Zeit $t = 0$ s; A_i : Amplitude der Signaländerung; k_i : Rate der Signaländerung (in s^{-1}); m : Steigung des linearen Anteils; τ_i : Zeitkonstante der Signaländerung (in s)

Der Angleich an die Daten erfolgte mit dem Programm Grafit 3.0 bzw. Grafit 5.0. Die apparente Geschwindigkeitskonstante λ berücksichtigt die Beiträge der Ent- und der Rückfaltungsreaktion. Das lineare Zweizustandsmodell beschreibt die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante λ von der Denaturierungsmittelkonzentration (Gleichung 2-25).

$$\lambda = k_{\text{NU}} \cdot \exp(m_{\text{NU}} \cdot [\text{D}]) + k_{\text{UN}} \cdot \exp(m_{\text{UN}} \cdot [\text{D}]) \quad \text{Gl. 2-25}$$

λ : apparente Geschwindigkeitskonstante; k_{NU} , k_{UN} : extrapolierte Geschwindigkeitskonstanten der Ent- bzw. Rückfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (in s^{-1}); m_{NU} , m_{UN} : kinetische Kooperativitätsparameter (in M^{-1}); $[\text{D}]$: Denaturierungsmittelkonzentration (in M)

Der komplexe Faltungsmechanismus von G3P* macht eine exakte Interpretation der gemessenen Raten λ schwierig. In erster Näherung können die Faltungsschritte der Domänen, die sowohl strukturell als auch zeitlich deutlich getrennt ablaufen, durch obige Gleichung analysiert werden.

2.20 Kinetik der Assoziation mit TolA-C

Die Wechselwirkung von TolA-C mit der isolierten N1-Domäne bzw. verschiedenen G3P*-Varianten wurde nach *stopped-flow*-Mischung an einem Applied Photophysics DX.17MV Sequential *stopped-flow*-Spektrofluorimeter gemessen. Die Messungen wurden in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C unter den in 2.19.1.2 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die Komplexbildung konnte anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 460 nm beobachtet werden. Die Anregung erfolgte bei 280 nm mit einer Bandbreite von 10 nm in einer Beobachtungszelle der Schichtdicke 2 mm. Streu- und Fluoreszenzlicht unterhalb von 460 nm wurde durch eine mit einer Lösung von p-Nitroanilin in Ethanol (2 mg/ml) gefüllte 5 mm-Küvette vor dem Photomultiplier absorbiert. Am Photomultiplier wurde eine Gegenspannung von 750 V angelegt, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Es wurden jeweils zehn Einzelmessungen durchgeführt, gemittelt und analysiert.

2.20.1 Zeitverlauf der Assoziation

Die Assoziation von TolA-C-AEDANS und der isolierten Domäne T13I-N1 wurde durch sechsfache Verdünnung einer N1-Stammlösung mit 0,12 μM TolA-C-AEDANS initiiert. Die Endkonzentration an TolA-C-AEDANS betrug 0,1 μM , die Endkonzentration an T13I-N1 variierte zwischen 0 und 8 μM . Die Bindung von 2 μM G3P* an 0,5 μM TolA-C-AEDANS, wurde nach elfacher Verdünnung von 22 μM G3P* mit 0,55 μM TolA-C-AEDANS verfolgt. Die Messungen erfolgten unter den oben beschriebenen Bedingungen.

2.20.2 Zeitverlauf der Verdrängung von TolA-C aus dem N1-TolA-C-Komplex

Um die Dissoziationsreaktion des Komplexes aus T13I-N1 und dem unmarkierten TolA-C-Ac zu bestimmen, wurde dieses durch TolA-C-AEDANS aus dem Komplex mit der isolierten N1-Domäne verdrängt. Ein Komplex aus 0,6 μM TolA-C-Ac und 3,6 μM TolA-C-Ac wurde vorinkubiert und mit einer sechsfach konzentrierten Stammlösung an TolA-C-AEDANS gemischt. Die Endkonzentration an TolA-C-Ac und T13I-N1 betrug 3 μM bzw. 0,5 μM . Die Endkonzentration an TolA-C-AEDANS variierte zwischen 5 und 50 μM . Die Messungen erfolgten unter den oben beschriebenen Bedingungen.

2.20.3 Bindung von TolA an aktiviertes G3P*

Bei der Infektion von *E. coli* durch fd-Phagen kommt es nach Bindung der N2-Domäne an den F-Pilus zu einer Dissoziation der Domänen, so dass N1 an TolA-C binden kann. Diese Wechselwirkung von TolA-C mit der N1-Domäne im geöffneten Protein wurde auch *in vitro* untersucht. Hierzu wurde denaturiertes WT-G3P* bzw. IIHY-G3P* (in 5,5 M GdmCl) in Gegenwart von 0,5 μM TolA-C-AEDANS rückgefaltet und die Assoziation mit TolA-C verfolgt. Die Rückfaltung wurde durch elffache Verdünnung initiiert, so dass die Endkonzentration an G3P* 2 μM betrug. Zur Kontrolle wurde auch die Bindung an die isolierte Domäne T13I-N1 nach Rückfaltung, sowie die Bindung von 0,5 μM TolA-C-AEDANS an natives T13I-N1, WT-G3P* und IIHY-G3P* unter denselben Messbedingungen (0,5 M GdmCl, 0,1 M K-Phosphat, pH7,0) untersucht.

2.20.4 Freisetzung von TolA-C bei Rückfaltung von G3P*

Die Freisetzung von TolA-C aus dem Komplex mit N1 während der Rückfaltung von G3P* wurde nach manueller Mischung an einem Hitachi F-4010 Spektrofluorimeter verfolgt. Die Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, durchgeführt. Dabei wurden 10 μM G3P* in 5 M GdmCl entfaltet. Anschließend erfolgte die Rückfaltung durch zehnfache Verdünnung in Gegenwart von 1 μM TolA-C-AEDANS. Die Wechselwirkung mit TolA-C-AEDANS wurde anhand der Änderung der Fluoreszenz bei 490 nm (Bandbreite 10 nm) nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 5 nm) in temperierbaren Fluoreszenzrührküvetten der Schichtdicke 1 cm bei einer Dämpfung von 0,5 s beobachtet.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Der Faltungsmechanismus des G3P und seine Bedeutung für die Infektion von *E. coli* durch filamentöse Phagen

3.1.1 Prolylisomerisierung als konformationeller Schalter bei der Infektion von *E. coli*

3.1.1.1 Die Prolylisomerisierung an Pro213 bestimmt die Kinetik der Domänenassoziation

Das G3P der filamentösen Phagen fd, fl und M13 ist für die Infektion von *E. coli* essentiell. Es besteht aus drei Domänen, die durch glycinreiche *Linker* miteinander verknüpft sind. Die beiden aminoterminalen Domänen N1 und N2 ragen aus der Phagenhülle heraus und sind im Verlauf der Infektion für die Bindung an die Rezeptoren der Zelle verantwortlich. Dieses N1N2-Fragment (G3P*) kann isoliert gereinigt werden und besitzt eine hufeisenförmige Struktur, in der die N1-Domäne teilweise von der größeren N2-Domäne umfasst wird (Holliger *et al.*, 1999; Lubkowski *et al.*, 1998; Lubkowski *et al.*, 1999). Die N2-Domäne besteht aus einem globulären Teil (N2') und einer Gelenksubdomäne, die zahlreiche Wechselwirkungen mit N1 ausbildet.

Die Stabilität und Faltung des G3P* aus dem Phagen fd wurde bereits untersucht (Martin & Schmid, 2003a; Martin & Schmid, 2003b; Martin & Schmid, 2003c; Kather *et al.*, 2005), wobei zur Analyse des Faltungsmechanismus eine stabilisierte Variante verwendet wurde. Diese Variante enthält die vier stabilisierenden Mutationen T13I, T101I, Q129H und D209Y (IIHY-G3P*) und ermöglicht aufgrund ihrer höheren Stabilität eine bessere Charakterisierung teilgefalteter Intermediate. Die labilere N2-Domäne enthält drei der vier stabilisierenden Mutationen, wovon die Mutationen T101I und D209 in der Gelenkregion lokalisiert sind und die Wechselwirkung mit N1 verbessern. Die Gesamtstabilität von G3P* wird durch die N2-Domäne limitiert, und die Entfaltung verläuft in einem zweiphasigen Prozess. Zunächst erfolgt die Domänen dissoziation gekoppelt mit der Entfaltung von N2. Anschließend entfaltet die stabilere Domäne N1 in einer zweiten Reaktion, die von der Anwesenheit der entfalteten N2-Domäne unabhängig ist (Martin & Schmid, 2003a). Ein Vergleich der Faltungsreaktionen der stabilisierten IIHY-Variante mit denen des WT-Proteins zeigte keinen Einfluss der vier stabilisierenden Mutationen auf den grundlegenden Faltungsmechanismus (Martin, 2003), so dass eine Verwendung dieser Variante für kinetische Analysen gerechtfertigt ist.

Die Faltungsreaktionen der beiden Domänen N1 und N2 können selektiv gemessen werden, da eine ungleichmäßige Verteilung von Trp- und Tyr-Resten spezifische Sonden für die verschiedenen Faltungsreaktionen liefert (Martin & Schmid, 2003a). Die Rückfaltung des denaturierten Proteins verläuft in mehreren Phasen, wobei die Faltungsraten der beiden Domänen stark unterschiedlich sind (Martin & Schmid, 2003b). Die Faltung der N1-Domäne weist eine monoexponentielle Kinetik mit einer Zeitkonstante τ von 9,4 ms (in 0,5 M GdmCl, 25 °C) auf, während die Faltung der labileren N2-Domäne etwa tausendfach langsamer in

einem zweiphasigen Prozess ($\tau_1 = 7$ s und $\tau_2 = 42$ s) verläuft. Die beiden Prozesse reflektieren die konformationelle Faltung des globulären Teils N2' und eine lockere Assemblierung der beiden vorgefalteten Domänen N1 und N2. Der native Zustand mit fest assoziierten Domänen wird in einem weiteren, hundertfach langsameren Faltungsschritt erreicht, der eine Zeitkonstante von 6200 s besitzt.

Der Zeitverlauf der Entfaltung ausgehend vom nativen Protein ist für die beiden Domänen identisch ($\tau = 71$ s), was auf einen gemeinsamen ratenlimitierenden Schritt hindeutet. Liegen die Domänen jedoch noch nicht assoziiert vor, entfalten sie hingegen schnell und mit unterschiedlichen Raten. Solange die Domäne N2 entfaltet vorliegt, zeigt Domäne N1 eine Entfaltungsreaktion mit $\tau = 28$ ms, die mit der Kinetik der isolierten N1-Domäne übereinstimmt. Isoliert faltet und entfaltet N1 also im Millisekundenbereich, wird aber im nativen G3P* durch die Interaktion mit der gefalteten N2-Domäne ca. tausendfach in seiner Entfaltung verlangsamt. Die N2-Domäne entfaltet ausgehend vom nicht-assozierten Zustand ebenfalls schneller als ausgehend vom nativen Protein. Die langsame Rückfaltungsreaktion, in der die Domänen fest assoziieren, führt also zu einer kinetischen Kopplung der Entfaltung von N2 und N1, die durch die Domänen dissoziation limitiert wird.

Martin und Schmid konnten zeigen, dass die Domänenassoziation durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung der Gln212-Pro213-Peptidbindung in der Gelenksubdomäne bestimmt wird (Martin & Schmid, 2003c). Die Mutation dieses *cis*-Prolins zu Glycin führte zu einer 26-fachen Beschleunigung der langsamen Faltungsreaktion, die Zeitkonstante verringerte sich von 6200 s auf 240 s. Die Stabilität und Faltung der N1-Domäne und des globulären Teils N2' im Protein mit nicht-assozierten Domänen wurden durch die Mutation nicht beeinflusst. Unklar ist jedoch, ob die gemessene Zeitkonstante $\tau = 240$ s die beschleunigte Assoziation der beiden Domänen widerspiegelt. G3P* enthält neben Pro213 ein zweites *cis*-Prolin an Position 161 im globulären Teil der N2-Domäne. Die beschleunigte Reaktion könnte also auch auf die Isomerisierung dieses zweiten *cis*-Prolins zurückzuführen sein. Abbildung 3-1 zeigt die Struktur von G3P* mit den vier stabilisierenden Mutationen und den beiden *cis*-Prolinbindungen.

Die Mutation des *cis*-Pro161 gibt Auskunft darüber, welcher Faltungsreaktion die Zeitkonstante von 240 s zuzuordnen ist. Die Substitution von Pro161 durch Alanin führte sowohl in IIHY- als auch in P213G-IIHY-G3P* zu einer leichten Destabilisierung der N2-Domäne. Die mit der Domänen dissoziation gekoppelte Entfaltung von N2 erfolgte jeweils bei einer um ca. 2 °C niedrigeren Temperatur, wohingegen die Stabilität der N1-Domäne nicht beeinflusst wurde (Tabelle 3-1). Die Mutation P161A hatte auch keinen Einfluss auf die Kinetik der gekoppelten Entfaltungsreaktion des nativen Proteins. Die Rückfaltung des globulären Teils der N2-Domäne (N2') war mit einer Zeitkonstante von 12 s (0,5 M GdmCl) im Vergleich zum Pseudowildtyp-Protein IIHY-G3P* leicht verlangsamt ($\tau = 7$ s), die lockere Assoziation der beiden Domänen war jedoch unverändert ($\tau = 55$ s bei 0,5 M GdmCl und 25 °C), genauso wie die Entfaltung der N2-Domäne im nicht-assozierten Zustand.

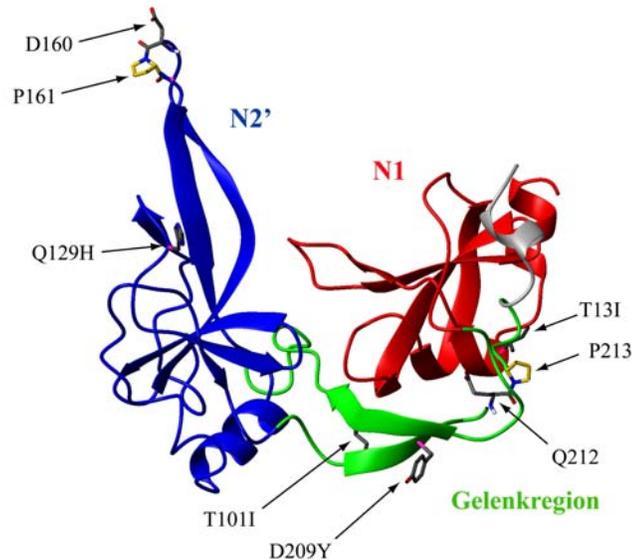


Abbildung 3-1: Tertiärstruktur von G3P* mit den vier stabilisierenden Mutationen und den beiden *cis*-Prolinbindungen (Kristallstrukturdaten aus Holliger *et al.*, 1999, PDB-Eintrag: 2G3P). Domäne N1 ist in rot, der globuläre Teil der N2-Domäne (N2') in blau und die Gelenksubdomäne von N2 in grün dargestellt. Die Seitenketten der vier stabilisierenden Mutationen und die an den *cis*-Prolinbindungen beteiligten Reste sind als Stäbchen-Modell gezeigt, die Proline sind gelb eingefärbt. Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol (Koradi *et al.*, 1996) erstellt.

Von Interesse war hier jedoch insbesondere, ob die Mutation an Position 161 die Kinetik der Domänenassoziation beeinflusst. Diese Rückfaltungsreaktion zum nativen Protein ist fluoreszenzspektroskopisch nicht messbar, da nur die Faltung der beiden Einzeldomänen, nicht aber deren Assoziation, mit einer Änderung der Fluoreszenz einhergeht (Martin & Schmid, 2003b). Zur Analyse dieser Assoziation wurde daher ein Zweischnitt-Entfaltungstest für native Moleküle genutzt (Schmid, 1983; Schmid, 1986). Diese Methode beruht darauf, dass diejenigen Moleküle langsam entfalten, die bei der Rückfaltung den nativen Zustand erreicht und somit die höchste Aktivierungsenergiebarriere bereits überwunden haben. Faltungsintermediate, die den Übergangszustand noch nicht durchlaufen haben, entfalten hingegen sehr viel schneller. Die Amplitude der langsamen Entfaltungsreaktion ist daher ein Maß für die Zahl nativer Moleküle, die nach einer bestimmten Rückfaltungszeit vorhanden waren. Die Zunahme dieser Amplitude als Funktion der Rückfaltungszeit liefert so die Kinetik der Bildung des vollständig gefalteten Proteins. Im Fall des G3P* wird die langsame gekoppelte Entfaltung der beiden Domänen N1 und N2 im nativen Protein zur Detektion verwendet werden, da die beiden Domänen nur im endgültig assoziierten Zustand langsam entfalten. Abbildung 3-2 zeigt die Kinetik der Domänenassoziation für das WT-Protein mit den beiden *cis*-Prolinen (G3P*), für die Varianten, bei denen jeweils ein *cis*-Prolin mutiert ist (P161A-IIHY-G3P*, P213G-IIHY-G3P*) sowie für die Doppelmutante (P161A-P213G-IIHY-G3P*).

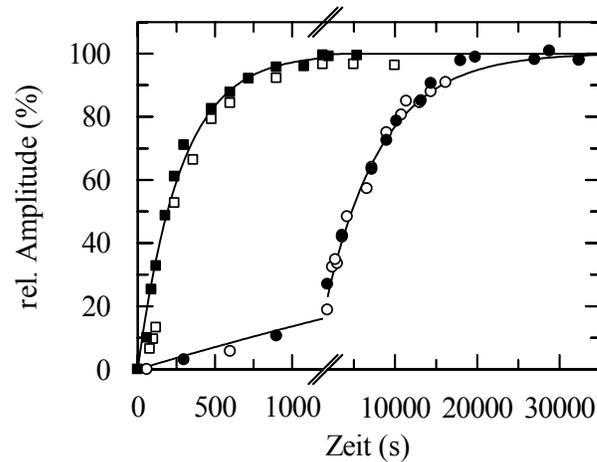


Abbildung 3-2: Zeitverlauf der Domänenassoziation für IIHY-G3P* (○), P161A-IIHY-G3P* (●), P213G-IIHY-G3P* (□) und P161A-P213G-IIHY-G3P* (■) gemessen anhand des Zweischnitt-Entfaltungstests für native Moleküle. Aufgetragen ist die Amplitude der langsamen Entfaltungsreaktion der N1-Domäne als Funktion der Rückfaltungszeit in 0,5 M GdmCl. Die Entfaltungsreaktion wurde anhand der Trp-Fluoreszenz bei 360 nm (Bandbreite 10 nm) nach Anregung bei 295 nm (Bandbreite 5 nm) in einem Doppelmischexperiment mit einer Proteinkonzentration von 0,5 μ M in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C gemessen. Die Linien repräsentieren den Angleich der experimentellen Daten an eine monoexponentielle Funktion mit den Zeitkonstanten $\tau = 6200$ s (IIHY-G3P* und P161A-IIHY-G3P*) bzw. $\tau = 240$ s (P213G-IIHY-G3P* und P161A-P213G-IIHY-G3P*).

Die Ergebnisse in Abbildung 3-2 zeigen klar, dass die Mutation P161A die Domänenassoziation nicht beeinflusst. Sie verändert weder die langsame Reaktion mit einer Zeitkonstante von 6200 s im WT-Protein, die durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 limitiert wird, noch die beschleunigte Reaktion in der P213G-Variante. Die Rückfaltungsreaktion mit der Zeitkonstante $\tau = 240$ s spiegelt daher die beschleunigte Isomerisierung der Glu212-Gly213-Bindung in der P213G-Variante und nicht die Isomerisierung an *cis*-Pro161 wider. Damit werden auch frühere Experimente bestätigt, in denen gezeigt wurde, dass die Rückfaltungsreaktion der P213G-Mutante nicht durch die Isomerase Cyp18 katalysiert werden kann (Martin & Schmid, 2003c), obwohl Pro161 im nativen Protein stark exponiert und gut zugänglich ist und die Gleichgewichtseinstellung der Asp160-Pro161-Peptidbindung in der isolierten N2-Domäne durch Isomerasen katalysiert werden kann (Knappe *et al.*, 2007).

Die gemessene Zeitkonstante von 240 s in der P213G-Variante ist für eine Isomerisierung einer Nicht-Prolylpeptidbindung relativ niedrig (Odefey *et al.*, 1995; Vanhove *et al.*, 1996; Wheeler *et al.*, 1998). Die *trans*→*cis*-Isomerisierung könnte jedoch durch eine Kopplung mit der konformationellen Entfaltung verlangsamt sein. Möglich ist auch ein Einfluss einer potentiellen Isomerisierung an Pro214 benachbart zu Gly213. Eine Strukturanalyse der Variante P213G-IIHY-G3P* könnte Aussagen darüber liefern, ob Gly213 tatsächlich in der *cis*-Konformation vorliegt.

3.1.1.2 Die lokale Sequenz bestimmt die Rate der Prolylisomerisierung an Pro213

Die Isomerisierung der Gln212-Pro213-Peptidbindung führt in einer sehr langsamen Reaktion zur Bildung des nativen Proteins. Martin und Schmid bestimmten die Gleichgewichtskonstante dieser Isomerisierung mit $K_{tc} = 0,06$, d.h. im denaturierten Zustand liegt in 94% aller Moleküle das für die Faltungsgeschwindigkeit bestimmende Prolin in der nicht-nativen *trans*-Konformation vor (Martin & Schmid, 2003c). Bei der Rückfaltung müssen somit nahezu alle Moleküle die langsame *trans*→*cis*-Isomerisierung durchlaufen, um in den nativen Zustand falten zu können.

Die Prolylisomerisierung in G3P* ist mit einer Zeitkonstante von 6200 s etwa hundertfach langsamer als bekannte Prolylisomerisierungen in Peptiden (Stein, 1993; Reimer *et al.*, 1998) und Proteinen (Cook *et al.*, 1979; Kamen & Woody, 2002; Mayr *et al.*, 1996; Schreiber & Fersht, 1993), deren Zeitkonstanten bei 25 °C im Bereich von 10 bis 100 s liegen. Eine Kopplung dieser *trans*→*cis*-Isomerisierung mit konformationellen Faltungsreaktionen, wie sie z.B. in Ribonuklease T1 zu finden ist (Kiefhaber & Schmid, 1992a), ist als Ursache für die niedrige Isomerisierungsrate auszuschließen. Zum einen ist die Zeitkonstante dieser Domänenassoziation in G3P* unabhängig von der Denaturierungsmittelkonzentration (Martin & Schmid, 2003b); zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Varianten P161A-IIHY-G3P* und ILY-G3P* noch die gleiche langsame Assoziationsreaktion besitzen, obwohl sie eine geringere Stabilität und damit veränderte Faltungsraten des globulären Teils von N2 aufweisen.

Der letzte Faltungsschritt repräsentiert die Assoziation der bereits gefalteten Domänen N1 und N2' und ist unabhängig von deren Stabilität. Die Kopplung zwischen der sehr langsamen *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 und der Assoziation der Domänen kann gut anhand der Kristallstruktur erklärt werden. Auffallend ist eine Anhäufung von Prolinen in der unmittelbaren Umgebung von *cis*-Pro213 (Pro211, Pro213, Pro214) sowie im benachbarten Segment des zweiten Gelenkstranges (Pro96, Pro98), was zu einer geringen Flexibilität der Peptidkette führt. Dies zeigt sich auch in den niedrigen B-Faktoren in der Kristallstruktur (Holliger *et al.*, 1999; Lubkowski *et al.*, 1998). Eventuell ist diese niedrige Flexibilität für die relative Orientierung der beiden Domänen entscheidend. Im nativen Protein bilden die beiden Stränge der Gelenksubdomäne zahlreiche Wechselwirkungen mit der N1-Domäne aus (Abbildung 3-3). Das der *cis*-Peptidbindung vorausgehende Gln212 bildet zwei Wasserstoffbrücken mit Gln52 in der N1-Domäne aus. Eine dritte Interaktion mit dem Rückgratsauerstoff von Pro211 fixiert die Konformation dieser Region um Pro213 zusätzlich. Zudem finden sich weitere Wechselwirkungen zwischen der Gelenkregion und N1: Tyr92 geht eine Wasserstoffbrücke mit Thr18 ein, Val215 und Pro211 sind mit Ser16 wasserstoffverbrückt. Diese Wechselwirkungen sind vermutlich für die Assoziation der beiden Domänen entscheidend und können nur ausgebildet werden, wenn Pro213 in der *cis*-Konformation vorliegt. Bei einer Isomerisierung der Prolinbindung von der nativen *cis*- in die inkorrekte *trans*-Form gehen diese Wechselwirkungen verloren. Die *trans*→*cis*-

Isomerisierung an Pro213 bestimmt so die relative Orientierung der beiden Domänen zueinander sowie deren Assoziationsrate.

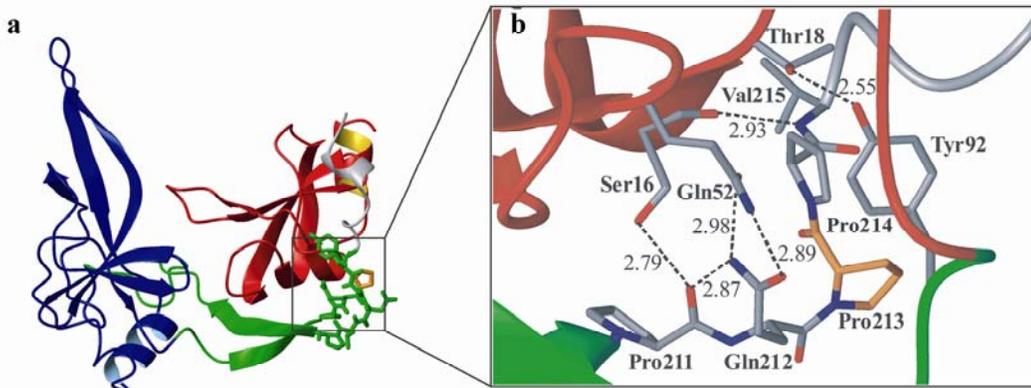


Abbildung 3-3: (a) Tertiärstruktur von G3P* (Kristallstrukturdaten aus Holliger *et al.*, 1999, PDB-Eintrag: 2G3P). Domäne N1 ist in rot, der globuläre Teil der N2-Domäne (N2') in blau und die Gelenksubdomäne von N2 in grün dargestellt. Die Regionen Tyr92 - Pro98 sowie Pro211 - Val215 sind als Stäbchen-Modell gezeigt, und *cis*-Pro213 ist gelb eingefärbt. (b) Die Wechselwirkungen zwischen der N1-Domäne und der Gelenkregion sind vergrößert gezeigt, wobei die gestrichelten Linien Wasserstoffbrücken zwischen den Resten angeben. Die Abstände zwischen den jeweiligen Heteroatomen sind in Å angegeben. Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol (Koradi *et al.*, 1996) erstellt.

Eine wichtige Frage war hier, wie die sehr niedrige Isomerisierungsrate an Pro213 erklärt werden kann. Untersuchungen von *cis/trans*-Isomerisierungen in Peptiden zeigten, dass die flankierenden Aminosäuren die Isomerisierungsrate beeinflussen können (Reimer *et al.*, 1998). Zum Beispiel isomerisieren Gln-Pro-Bindungen etwa dreimal langsamer als Ala-Pro-Bindungen. Ebenso wird die Isomerisierung um den Faktor drei verlangsamt, wenn auf die Prolinbindung ein weiteres Prolin folgt (Reimer *et al.*, 1998). In G3P* besitzt Pro213 eine besondere lokale Sequenzumgebung. Der *cis*-Peptidbindung geht an Position 212 ein Gln voraus, und auf die *cis*-Bindung folgt ein weiteres Prolin an Position 214, so dass hier beide Kriterien zum Tragen kommen. Die *cis/trans*-Isomerisierungsrate eines Pentapeptids mit der entsprechenden Sequenz Ac-AQPPV-OH des G3P* wurde mittels 1D-¹H-NMR-Spektroskopie untersucht (Eckert *et al.*, 2005; Martin, 2003). Aus der gemessenen apparenten Rate ergibt sich mit der Gleichgewichtskonstante K_{ic} von 0,06 eine Zeitkonstante von 6980 s für die *trans*→*cis*-Isomerisierung im Peptid, was der Zeitkonstante der Isomerisierung im Protein entspricht.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Rate der Prolylisomerisierung durch die Art der vorhergehenden bzw. nachfolgenden Aminosäure ähnlich moduliert werden kann wie in kurzen Peptiden. Zu diesem Zweck wurde Gln212 bzw. Pro214 in IIHY-G3P* mutiert und die Auswirkung der Mutation auf Stabilität, Faltung und Domänenassoziation bestimmt. Die Analyse erfolgte wie schon in 3.1.1.1 im Hintergrund des stabilisierten Proteins IIHY-G3P*,

da die höhere Stabilität dieser Variante die Charakterisierung teilgefalteter Intermediate erleichtert, ohne dabei den grundlegenden Faltungsmechanismus zu verändern.

a) thermodynamische Charakterisierung der Varianten mit Mutationen an den Positionen 212 und 214

Die Analyse der thermodynamischen Stabilität der Varianten erfolgte sowohl durch thermische als auch durch Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung. Als Sonde für die thermische Denaturierung diente die Änderung des CD-Signals bei 230 nm (Martin & Schmid, 2003a). Bei dieser Wellenlänge kann sowohl für IIHY-G3P* als auch für die Varianten ein zweiphasiger Verlauf beobachtet werden. Der erste Übergang repräsentiert dabei die mit der Domänendissoziation gekoppelte Entfaltung der labileren N2-Domäne, während der zweite Übergang der Entfaltung der stabileren N1-Domäne zugeordnet werden kann. Die thermisch induzierten Entfaltungsübergänge von IIHY-G3P* sowie der Mutanten Q212A-, P213G- und P214A-IIHY-G3P* sind in Abbildung 3-4 dargestellt. Die experimentellen Daten wurden gemäß einem Dreizustandsmodell analysiert; die daraus erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

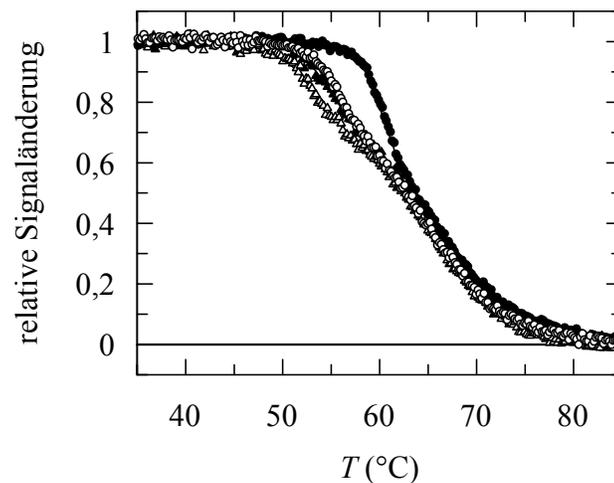


Abbildung 3-4: Thermische Entfaltung von IIHY-G3P* (●) sowie der IIHY-G3P*-Varianten Q212A (○), P213G (△) und P214A (▲). Aufgetragen ist die relative Änderung des CD-Signals bei 230 nm in Abhängigkeit von der Temperatur nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell. Die Übergänge wurden mit 4 μ M Protein in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Dämpfung von 8 s gemessen. Die aus der Analyse erhaltenen T_M -Werte sowie die thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

Tabelle 3-1: Stabilitätsdaten aus der thermischen Entfaltung von IIHY-G3P* und dessen Varianten.

G3P*-Variante	Domänen dissoziation und Entfaltung von N2			Entfaltung von N1		
	T_{M1} (°C)	ΔH_D (kJ·mol ⁻¹)	$\Delta G_D^{55^\circ\text{C}}$ (kJ·mol ⁻¹)	T_{M2} (°C)	ΔH_D (kJ·mol ⁻¹)	$\Delta G_D^{65^\circ\text{C}}$ (kJ·mol ⁻¹)
IIHY	61,4	662	11,8	65,6	202	0,3
Q212A-IIHY	54,2	546	-1,4	65,1	229	0,1
P213G-IIHY	53,8	396	-1,5	66,2	290	1,1
P214A-IIHY	54,3	553	-1,2	64,8	229	-0,2
P161A-IIHY	59,6	610	8,0	65,7	224	0,5
P161A-P213G-IIHY	50,8	440	-6,1	65,3	237	0,2

Angegeben sind die Schmelztemperaturen T_M , die Enthalpien der Entfaltung am Übergangsmittelpunkt ΔH_D und die freien Enthalpien der Entfaltung $\Delta G_D^{55^\circ\text{C}}$ bei 55 °C und $\Delta G_D^{65^\circ\text{C}}$ bei 65 °C. Die T_M -Werte geben die Mittelpunkte des ersten bzw. zweiten Übergangs im biphasischen Entfaltungsübergang von G3P* nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell an. Der erste Übergang (T_{M1}) reflektiert die Dissoziation der Domänen und die Entfaltung der N2-Domäne, der zweite Übergang (T_{M2}) die Entfaltung der N1-Domäne. Für die Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde eine konstante Änderung der Wärmekapazität ΔC_p von 10000 J·mol⁻¹·K⁻¹ für N2 und von 1000 J·mol⁻¹·K⁻¹ für N1 angenommen.

Die Stabilität der N1-Domäne wird durch die Mutationen in der Gelenkregion nicht beeinflusst. Dies war zu erwarten, da N1 als stabilere Domäne unabhängig von der Anwesenheit der labileren N2-Domäne ist, und die Übergänge der isolierten N1-Domäne mit denen in G3P* übereinstimmen (Martin & Schmid, 2003a; Kather *et al.*, 2005). Die für die verschiedenen Varianten gefundenen geringen Abweichungen in den T_M - und ΔG_D -Werten sind auf Ungenauigkeiten beim Angleich der experimentellen Daten an ein Dreizustandsmodell zurückzuführen. Generell ist die Analyse eines Zweidomänenproteins basierend auf einem sequentiellen Zweischrittmechanismus nur verlässlich, wenn die beiden Domänen deutlich voneinander separierte Übergänge besitzen (Tsalkova & Privalov, 1985, Brandts *et al.*, 1989).

Die N2-Domäne wurde durch die Mutationen im Bereich 212 - 214 um bis zu 13,3 kJ/mol destabilisiert. Die Mutation P213G wirkt scheinbar am stärksten destabilisierend, wobei die angegebenen thermodynamischen Parameter auch hier aufgrund der Ungenauigkeit der Analyse abweichen können. Auffallend ist zum einen, dass alle Mutationen in der Gelenkregion IIHY-G3P* nahezu im gleichen Ausmaß destabilisieren, und zum anderen, dass die Kooperativität der Entfaltung im Vergleich zum Pseudowildtyp-Protein stark verändert ist. Die Übergänge der beiden Domänen in G3P* unterscheiden sich klar in ihren Kooperativitäten. Der Übergang der N2-Domäne verläuft mit einer deutlich höheren Kooperativität ($\Delta H_D \approx 660$ kJ/mol) als der Übergang der N1-Domäne, der für IIHY-G3P* eine Entfaltungsenthalpie ΔH_D von 220 kJ/mol besitzt. Zunächst erfolgt die Entfaltung des globulären Teils der N2-Domäne (N2'), welcher in Größe und Struktur der N1-Domäne ähnelt, gekoppelt mit der Dissoziation der Domänen und der Entfaltung der Gelenkregion. In

diesem ersten Entfaltungsprozess müssen also neben den Wechselwirkungen innerhalb von N2' auch die Interaktion der Gelenkregion mit der N1-Domäne aufgebrochen werden, was die höhere Kooperativität erklärt. Im Fall der Varianten mit destabilisierenden Mutationen in der Gelenkregion ist die Kooperativität von 660 kJ/mol (IIHY-G3P*) auf bis zu 400 kJ/mol (P213G-IIHY-G3P*) erniedrigt. Das deutet darauf hin, dass durch die Mutationen die Zahl der Wechselwirkungen der Gelenksubdomäne mit N1 verringert wird. Dies wäre konsistent mit der Annahme, dass die Ausbildung der Wasserstoffbrücken im Bereich Pro211 - Val215 entscheidend für die Assoziation der Domänen ist, und dass diese Region durch das *cis*-Pro213 fixiert wird. Eine Substitution der entsprechenden Reste führt zum Verlust der Wasserstoffbrücken und damit zu einer geringen Zahl von Interaktionen mit N1, was sowohl eine geringe Kooperativität als auch eine Destabilisierung des ersten Übergangs zur Folge hat. Dabei ist es irrelevant, ob der die Wechselwirkung eingehende Rest Gln212 selbst oder aber Pro213 mutiert wird, das durch seine *cis*-Konformation erst die Ausbildung dieser Interaktion ermöglicht.

Neben der thermischen Stabilität von G3P* wurde auch seine Stabilität gegenüber dem Denaturierungsmittel GdmCl untersucht. Die GdmCl-induzierten Entfaltungsübergänge wurden anhand der Änderung der Proteinfluoreszenz verfolgt. G3P* besitzt 4 Trp- und 15 Tyr-Reste, die ungleichmäßig auf die beiden Domänen verteilt sind. Durch gezielte Wahl der Anregungs- und Emissionswellenlängen kann so selektiv die Entfaltung der N2- bzw. der N1-Domäne verfolgt werden (Martin & Schmid, 2003a). Die N2-Domäne enthält ein einzelnes, stark lösungsmittlexponiertes Tryptophan an Position 181 und zwölf Tyrosine, von denen sich sieben im globulären Teil N2' und fünf in der Gelenksubdomäne befinden. Die Zunahme der Tyrosinfluoreszenz dient somit als Sonde für die Entfaltung der N2-Domäne, wobei hier nicht zwischen der Entfaltung des globulären Teils und der Entfaltung der Gelenkregion unterschieden werden kann. Die N1-Domäne enthält drei Tyrosine und drei Tryptophane, deren Fluoreszenz als Sonde für die N1-Domäne verwendet werden kann. Die Entfaltung von N1 führt zu einer Zunahme der Tryptophanfluoreszenz. Durch die beiden selektiven Sonden vereinfacht sich der GdmCl-induzierte Gleichgewichtsübergang des Zweidomänenproteins G3P* zu zwei Übergängen, die jeweils nach dem Zweizustandsmodell ausgewertet werden können. Allerdings ist die Trp-Sonde nicht ganz spezifisch für N1, da das in der N2-Domäne vorhandene Trp181 trotz seiner lösungsmittlexponierten Position bei einigen Varianten einen geringen Fluoreszenzbeitrag liefert (vgl. Abbildung 3-5b). In Abbildung 3-5 sind die an ein Zweizustandsmodell angepassten und normierten Entfaltungsübergänge der N1- und N2-Domäne für die verschiedenen IIHY-G3P*-Varianten dargestellt; die zugehörigen Parameter sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

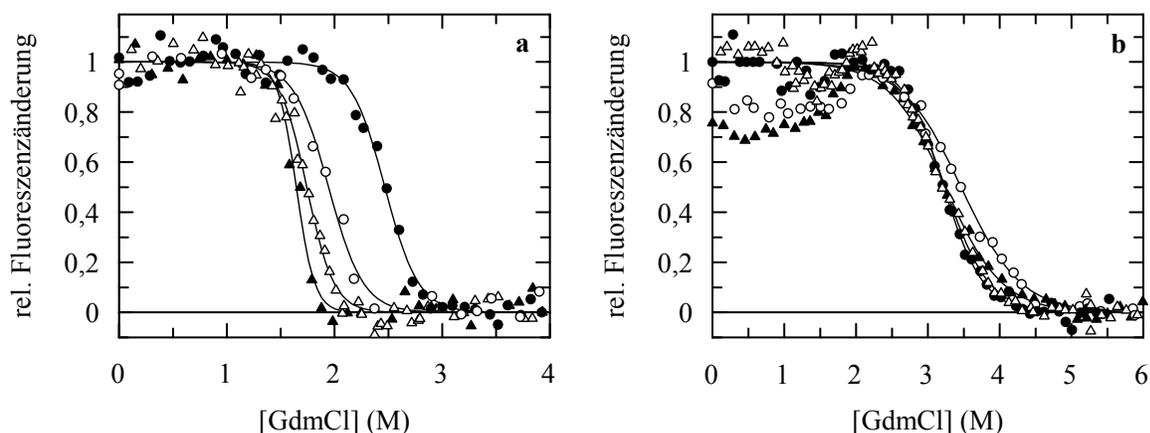


Abbildung 3-5: GdmCl-induzierte Entfaltung von IIHY-G3P* (●) sowie der IIHY-G3P*-Varianten Q212A (○), P213G (△) und P214A (▲). (a) normierte Entfaltungsübergänge der N2-Domänen beobachtet anhand der Tyr-Fluoreszenzänderung bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm, (b) normierte Entfaltungsübergänge der N1-Domänen beobachtet anhand der Trp-Fluoreszenzänderung bei 360 nm nach Anregung bei 295 nm. Die Übergänge wurden mit 0,5 μM Protein in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei einer Schichtdicke von 1 cm und 25 $^{\circ}\text{C}$ gemessen. Die Bandbreiten betragen 5 nm für das Anregungs- bzw. 10 nm für das Emissionslicht. Die Linien stellen einen Angleich der Daten an ein Zweizustandsmodell dar. Bei den Varianten Q212A- und P214A-IIHY-G3P* wurde bei der Entfaltung der N1-Domäne die Basislinie des nativen Proteins festgesetzt und die Daten unter 2 M GdmCl bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Die aus der Analyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-2 aufgeführt. Die Daten für IIHY-G3P* wurden aus Martin & Schmid (2003a) entnommen.

Tabelle 3-2: Stabilitätsdaten aus der GdmCl-induzierten Entfaltung für IIHY-G3P* und dessen Varianten.

G3P*- Variante	Domänen dissoziation und Entfaltung von N2			Entfaltung von N1		
	$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)	m ($\text{kJ mol}^{-1}\text{M}^{-1}$)	$\Delta G_D^{25^{\circ}\text{C}}$ (kJ mol^{-1})	$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)	m ($\text{kJ mol}^{-1}\text{M}^{-1}$)	$\Delta G_D^{25^{\circ}\text{C}}$ (kJ mol^{-1})
IIHY	2,5	15,9	39,3	3,2	8,9	28,6
Q212A-IIHY	1,6	21,5	35,4	3,3	6,3	20,5
P213G-IIHY	1,7	19,8	34,3	3,2	8,1	26,3
P214A-IIHY	1,9	15,5	30,1	3,4	6,0	20,7

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte $[\text{GdmCl}]_{1/2}$, die Kooperativitätsparameter m und $\Delta G_D^{25^{\circ}\text{C}}$ in Abwesenheit des Denaturierungsmittels für die N2- und die N1-Domäne. Aufgrund der geringen Signaländerung wird die Genauigkeit der Parameter auf $\pm 10\%$ geschätzt. Die Entfaltung der N2-Domäne wurde anhand der Tyr-Fluoreszenz bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt, die Entfaltung der N1-Domäne anhand der Trp-Fluoreszenz bei 360 nm nach Anregung bei 295 nm. Die Analyse der Daten erfolgte für beide Domänen auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells. Die Daten für IIHY-G3P* wurden aus Martin & Schmid (2003a) entnommen.

Die Ergebnisse der GdmCl-induzierten Entfaltung bestätigen die der thermischen Denaturierung. Die N2-Domäne entfaltet bei deutlich niedrigeren GdmCl-Konzentrationen als die N1-Domäne. Ebenso haben die Mutationen an den Positionen 212, 213 und 214 in der Gelenkregion lediglich Einfluss auf die Stabilität der N2-Domäne.

N2 wird durch die Wechselwirkungen zwischen der Gelenkregion und der N1-Domäne stabilisiert. Daher führt der Wegfall dieser Interaktionen durch die eingeführten Mutationen in der Gelenksubdomäne dazu, dass die Domänen dissoziation und die damit verbundene Entfaltung von N2' bei niedrigeren GdmCl-Konzentrationen verläuft als im Pseudowildtyp-Protein IIHY-G3P*. Die N2-Domäne wird durch die Mutationen um bis zu 0,9 M GdmCl destabilisiert, wobei die Varianten Q212A, P213G und P214A sehr ähnliche Destabilisierungen zeigen. Die Substitution Q212A hat den größten Effekt, während bei der thermischen Denaturierung die Variante P213G am stärksten destabilisiert war. Ob dieser Unterschied als signifikant angesehen werden kann, ist fraglich, da die Entfaltung der N2-Domäne nur mit einer sehr geringen Signaländerung einhergeht. Die Genauigkeit der angegebenen Parameter wird deshalb auf $\pm 10\%$ geschätzt. Zudem ist der Kooperativitätsparameter m für die Entfaltung der verschiedenen Varianten stark unterschiedlich, was die berechneten ΔG_D -Werte stark beeinflusst. Der Grund für die schlecht definierten m -Werte liegt ebenfalls in der geringen Fluoreszenzänderung und dem hochkooperativen Übergang der N2-Domäne. Zudem wird für die Varianten Q212A und P214A deutlich, dass die Trp-Fluoreszenzsonde nicht völlig selektiv für N1 ist. Die Basislinie der nativen N1-Domäne ist im GdmCl-Bereich des Entfaltungsübergangs von N2 (1,4 - 2,0 M GdmCl) nicht konstant, weil die Fluoreszenz des Trp181 in N2 bei Entfaltung abnimmt. Für die Auswertung wurde hier die Steigung der Basislinie aus den Daten unterhalb 1,4 M GdmCl bestimmt und bei der Anpassung der Messwerte oberhalb von 2 M GdmCl festgesetzt. Diese Annahme kann ebenfalls zu geringfügigen Abweichungen in den erhaltenen thermodynamischen Parametern führen. Weshalb diese auf die Entfaltung von N2 zurückgehende Signaländerung in der Trp-Fluoreszenz bei den Varianten Q212A und P214A stärker ausgeprägt ist als bei IIHY-G3P*, bleibt unklar.

b) Einfluss der Mutationen Q212A und P214A auf die Faltung von IIHY-G3P*

Der Einfluss der Mutationen auf den Faltungsmechanismus von G3P* wurde anhand kinetischer Messungen charakterisiert. Die Faltung der individuellen Domänen N1 und N2 in G3P* kann dabei wie zuvor bei den GdmCl-induzierten Gleichgewichtsübergängen anhand der Änderungen der Tyr- und Trp-Fluoreszenz selektiv verfolgt werden. Die abschließende Domänenassoziation wurde mit Hilfe des Zweischritt-Entfaltungstests für native Moleküle analysiert (3.1.1.1, Martin & Schmid, 2003b; Schmid, 1983; Schmid, 1986). Abbildung 3-6 zeigt die Entfaltungs- und Rückfaltungsraten als Funktion der GdmCl-Konzentration (Chevron-Auftragung) für die Varianten Q212A-IIHY-G3P* und P214A-IIHY-G3P* jeweils im Vergleich zum Pseudowildtyp-Protein IIHY-G3P* (Martin & Schmid, 2003b).

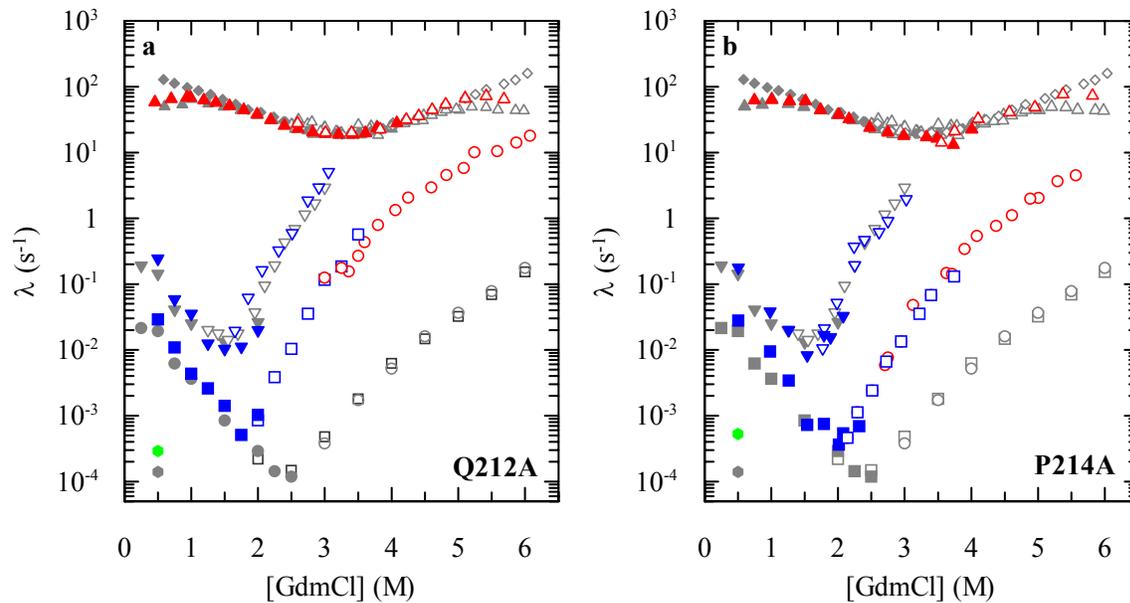


Abbildung 3-6: Chevron-Auftragung der Entfaltungs- und Rückfaltungsraten von (a) Q212A-IIHY-G3P* und (b) P214A-IIHY-G3P*. Dargestellt sind die apparenten Ratenkonstanten λ der Entfaltungs- (offene Symbole) und Rückfaltungsreaktion (geschlossene Symbole) als Funktion der GdmCl-Konzentration. Reaktionen, die anhand der Trp-Fluoreszenz bei 360 nm nach Anregung bei 295 nm gemessen wurden und der N1-Domänen zuzuordnen sind, sind rot dargestellt. Faltungsreaktionen der N2-Domäne wurden anhand der Änderung der Tyr-Fluoreszenz bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm beobachtet und sind blau, die Rate der Prolylisomerisierung grün dargestellt. Die Rückfaltung der N1-Domäne (\blacktriangle), die Entfaltung von N1 im nicht-assoziierten Zustand (\triangle), die Entfaltung des nativen Proteins (\circ) bei GdmCl-Konzentration oberhalb von 3 M GdmCl sowie die Entfaltung der N2-Domäne im nicht-assoziierten Zustand (∇) wurden mittels *stopped-flow*-Mischung gemessen. Die schnelle (\blacktriangledown) und langsame (\blacksquare) Rückfaltungsreaktion von N2 sowie die gekoppelte Entfaltung von N2 (\square) und N1 (\circ) unterhalb 3,5 M GdmCl wurde nach manueller Mischung verfolgt. Die Rate der Prolylisomerisierung (\bullet) wurde mit Hilfe des Zweischritt-Entfaltungstests für native Moleküle in Doppelmischexperimenten bestimmt. Alle Messungen erfolgten mit 0,5 μ M Protein in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C. Die Schichtdicke betrug 1 cm, die Bandbreiten 5 nm (Anregung) bzw. 10 nm (Emission). Zum Vergleich sind die Raten des Pseudowildtyp-Proteins IIHY-G3P* in grau mit den entsprechenden Symbolen sowie die Raten der isolierten Domäne T131-N1 ($\blacklozenge, \blacklozenge$) angegeben (Martin & Schmid, 2003b).

Sowohl in IIHY-G3P* als auch in den Varianten unterscheidet sich die Rückfaltung der N1-Domäne stark von derjenigen der N2-Domäne. N1 faltet in einem einphasigen Prozess innerhalb von Millisekunden mit einer Zeitkonstante von $\tau = 14$ ms (bei 0,5 M GdmCl). Die Rückfaltungsraten der N1-Domänen in beiden Varianten stimmen dabei mit den Raten für N1 im Pseudowildtyp IIHY-G3P* und der isolierten N1-Domäne mit der Mutation T131 überein (Martin & Schmid, 2003b). Die Rückfaltung des globulären Teils der N2-Domäne wurde ebenfalls durch die Mutationen an den Positionen 212 und 214 nicht beeinflusst. Beide Varianten zeigten für N2 eine biexponentielle Reaktion, deren Raten mit denen des Pseudowildtyp-Proteins übereinstimmen. Hierbei wurde die schnellere Reaktion mit einer Zeitkonstante von 6 s (bei 0,5 M GdmCl) der Faltung des globulären Teils N2', die zweite

Reaktion mit einer Zeitkonstante von 35 s (bei 0,5 M GdmCl) der lockeren Assemblierung von N2' und N1 zugeordnet.

Die Entfaltung der individuellen Domänen N1 und N2 im nicht-assoziierten Zustand konnte in *stopped-flow*-Doppelmischexperimenten bestimmt werden. Um die Entfaltung der N1-Domäne unabhängig von der Domänendissoziation, d.h. bei entfaltet vorliegender N2-Domäne, messen zu können, wurde entfaltetes G3P* 1 s lang bei 0,5 M GdmCl rückgefaltet. In dieser Zeit kann nur N1 in den nativen Zustand falten, N2 liegt noch entfaltet vor. Im anschließenden Entfaltungsschritt wird dann die Entfaltung von N1 verfolgt. Die Entfaltung von N2' im nicht-assoziierten Zustand kann durch ein ähnliches experimentelles Vorgehen untersucht werden. Allerdings wurde hier vor dem Entfaltungsschritt das Protein 3 min lang in 0,5 M GdmCl rückgefaltet, um die Faltung von N2', jedoch nicht die lockere Assoziation mit N1, zu ermöglichen. In beiden Varianten zeigten die Domänen im nicht-assoziierten Zustand die gleichen Entfaltungsraten wie im Pseudowildtyp IIHY-G3P*. Die N1-Domäne entfaltet innerhalb weniger Millisekunden mit Zeitkonstanten, die denen von IIHY-G3P* sowie der entsprechenden isolierten N1-Domäne entsprechen. Dies war zu erwarten, da die Mutationen außerhalb der N1-Domäne liegen und auch die Stabilität der N1-Domäne nicht beeinflussen. N2' entfaltet in Q212A- und P214A-IIHY-G3P* ebenfalls mit der gleichen Rate wie im Pseudowildtyp-Protein. Die Mutationen in der Gelenkregion haben somit keine Auswirkung auf die Rück- und Entfaltungskinetik der individuellen Domänen im nicht-assoziierten Zustand.

Die Mutationen Q212A und P214A wirken jedoch stark beschleunigend auf die Entfaltung des nativen Proteins. Im Vergleich zu IIHY-G3P* ist die Entfaltung in 5 M GdmCl 170-fach (Q212A) bzw. 63-fach (P214A) beschleunigt. Die beiden Domänen sind zwar ausgehend vom nativen Protein weiterhin in ihrer Entfaltung kinetisch gekoppelt, der für die Entfaltung geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Domänendissoziation erfolgt jedoch in den Varianten wesentlich schneller als in IIHY-G3P*. Beide Domänen zeigten die gleiche Entfaltungskinetik mit einer Zeitkonstanten von 175 ms für Q212A-IIHY-G3P* bzw. 490 ms für P214A-IIHY-G3P* (in 5 M GdmCl).

N1 und N2' stellen separate Faltungseinheiten dar, deren Faltungs- und Entfaltungsreaktion im nicht-assoziierten Zustand durch die Mutationen in der Gelenkregion nicht beeinflusst werden. Die Mutation an den Positionen 212 und 214 beschleunigen allerdings stark die gekoppelte Entfaltung der beiden Domänen ausgehend vom nativen Protein, die durch die Domänendissoziation limitiert wird. In IIHY-G3P* bildet die Gelenksubdomäne zahlreiche Wechselwirkungen mit der N1-Domäne aus und liefert so einen großen Beitrag zur Stabilität des nativen Proteins. Diese Interaktionen werden im Verlauf der Faltung erst spät nach der Faltung der individuellen Domänen ausgebildet. In der Entfaltung des nativen Proteins werden diese Wechselwirkungen jedoch im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt gelöst. Durch die Mutation an den Positionen 212 und 214 in der Gelenkregion gehen die stabilisierenden Wechselwirkungen mit N1 verloren, so dass die Domänendissoziation und damit die Entfaltung des nativen Proteins in den Varianten stark beschleunigt ist.

Von besonderem Interesse war, wie die Mutation von Gln212 bzw. Pro214 zu Alanin die Isomerisierungsrate der *cis*-Peptidbindung an Pro213 und die damit gekoppelte Domänenassoziation beeinflusst. Diese fluoreszenzspektroskopisch stille Reaktion wurde, wie unter 3.1.1.1 beschrieben, mit Hilfe des Zweischritt-Entfaltungstests für native Moleküle gemessen. Abbildung 3-7 zeigt die Kinetik der Domänenassoziation des Pseudowildtyp-Proteins IIHY-G3P* sowie der Mutanten Q212A, P213G und P214A in 0,5 M GdmCl.

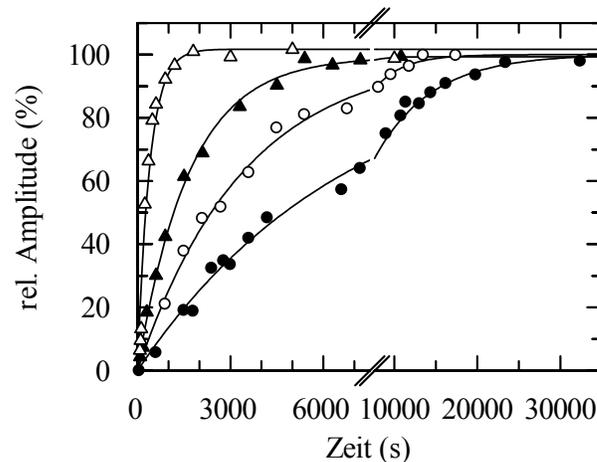


Abbildung 3-7: Zeitverlauf der Domänenassoziation für IIHY-G3P* (●), Q212A-IIHY-G3P* (○), P213G-IIHY-G3P* (△) und P214G-IIHY-G3P* (▲) gemessen anhand des Zweischritt-Entfaltungstests für native Moleküle. Aufgetragen ist die normierte Amplitude der langsamen Entfaltungsreaktion der N1-Domäne als Funktion der Rückfaltungszeit in 0,5 M GdmCl. Die Entfaltungsreaktion wurde anhand der Trp-Fluoreszenz bei 360 nm (Bandbreite 10 nm) nach Anregung bei 295 nm (Bandbreite 5 nm) in einem Doppelmischexperiment mit einer Proteinkonzentration von 0,5 μ M in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C gemessen. Die Linien repräsentieren den Angleich der experimentellen Daten an eine monoexponentielle Funktion mit den Zeitkonstanten $\tau = 6200$ s (IIHY-G3P*), $\tau = 3400$ s (Q212A-IIHY-G3P*), $\tau = 1900$ s (P214A-IIHY-G3P*) bzw. $\tau = 240$ s (P213G-IIHY-G3P*). Die Daten für P213G-IIHY-G3P* sind aus Martin & Schmid (2003c) entnommen.

In allen Varianten wirkt die Mutation beschleunigend auf den letzten Schritt der Rückfaltung von IIHY-G3P*. Die Mutation Q212A verringert dabei die Zeitkonstante von 6200 s auf 3400 s, während die Substitution des Pro214 durch Alanin die Zeitkonstante auf 1900 s reduziert. Den größten Effekt zeigte die Mutation des *cis*-Pro213 zu Glycin, die zu einer 26-fachen Beschleunigung der Domänenassoziation führt (Martin & Schmid, 2003c). Dies verdeutlicht, dass die Mutationen in der Gelenkregion die Faltung der einzelnen Domänen unbeeinflusst lassen, aber einen starken Einfluss auf die Domänenassoziation haben, die mit der Isomerisierung an Pro213 gekoppelt ist. Die Domänenassoziation konnte sowohl in Q212A- als auch in P214A-IIHY-G3P* durch die Prolylisomerase Cyp18 (1 μ M) beschleunigt werden (Abbildung 3-8). Die Zeitkonstanten der katalysierten Reaktion betragen 1200 s (Q212A-IIHY-G3P*) bzw. 1000 s (P214A-IIHY-G3P*) und stimmen damit gut mit der für IIHY-G3P* ermittelten katalysierten Reaktion ($\tau = 1100$ s) überein (Martin & Schmid,

2003c). Die unveränderte Katalysierbarkeit weist darauf hin, dass zum einen Cyp18 die Varianten Q212A und P214A genauso gut binden und katalysieren kann wie IIHY-G3P*, und zum anderen die Domänenassoziation weiterhin durch die Isomerisierung an Pro213 bestimmt wird.

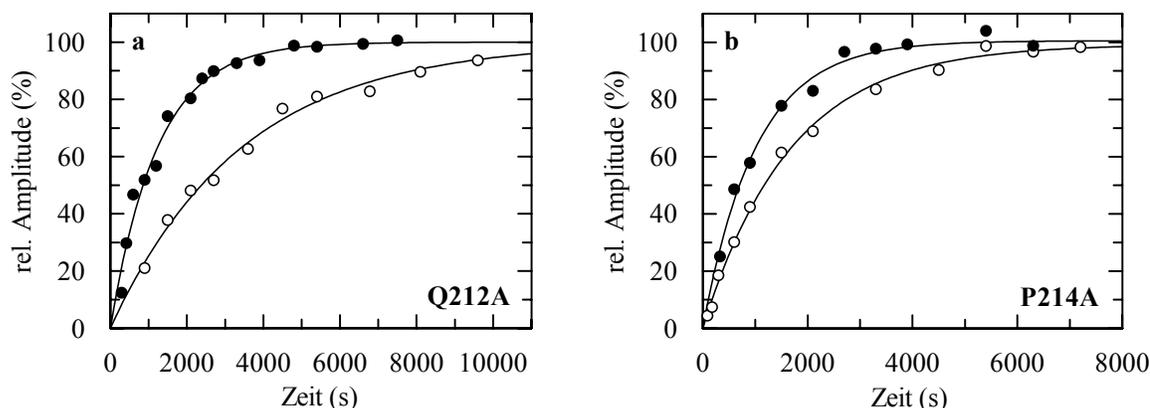


Abbildung 3-8: Zeitverlauf der Domänenassoziation für (a) Q212A-IIHY-G3P* bzw. (b) P214-IIHY-G3P* in Abwesenheit (○) bzw. in Gegenwart von 1 μM Cyp18 (●) gemessen mittels des Zweischnitt-Entfaltungstests für native Moleküle. Aufgetragen ist die normierte Amplitude der langsamen Entfaltungsreaktion der N1-Domäne als Funktion der Rückfaltungszeit in 0,5 M GdmCl. Die Entfaltungsreaktion wurde anhand der Trp-Fluoreszenz bei 360 nm (Bandbreite 10 nm) nach Anregung bei 295 nm (Bandbreite 5 nm) in einem Doppelmischexperiment mit einer Proteinkonzentration von 0,5 μM in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C gemessen. Die Linien repräsentieren den Angleich der experimentellen Daten an eine monoexponentielle Funktion mit den Zeitkonstanten $\tau = 3400$ s (Q212A-IIHY-G3P*), $\tau = 1200$ s (Q212A-IIHY-G3P* + 1 μM Cyp18), $\tau = 1900$ s (P214A-IIHY-G3P*) bzw. $\tau = 1000$ s (P214G-IIHY-G3P* + 1 μM Cyp18).

Ferner wurde anhand von Dreifachmischexperimenten die *cis/trans*-Isomerisierung im denaturierten Zustand bestimmt (2.19.1.3, Tabelle 3-3). Die apparente Rate erhöhte sich dabei um den Faktor 3,5 (Q212A-IIHY-G3P*) bzw. 6 (P214A-IIHY-G3P*), so dass sich Raten für die *cis*→*trans*-Isomerisierungsraten von 0,0097 s^{-1} bzw. 0,0163 s^{-1} im denaturierten Zustand ergeben. Die daraus resultierenden Gleichgewichtskonstanten $K_{\text{tc}} = 2,9$ für Q212A-IIHY-G3P* und $K_{\text{tc}} = 3,2$ für P214A-IIHY-G3P* bedeuten, dass in beiden Varianten in ca. 97% aller Moleküle Pro213 im denaturierten Zustand in der nicht-nativen *trans*-Konformation vorliegt. Dieser Prozentsatz stimmt gut mit den für IIHY-G3P* bzw. P213G-IIHY-G3P* erhaltenen Werten von 94% bzw. 98% überein. Durch die Mutation der zur *cis*-Peptidbindung benachbarten Reste wird also die Gleichgewichtslage des Prolins selbst nicht beeinflusst.

Tabelle 3-3: Kinetische Daten zur *cis/trans*-Isomerisierung an Pro213 im nativen und denaturierten Protein.

G3P*-Variante	$k_{cis \rightarrow trans}$ (s ⁻¹)	$k_{trans \rightarrow cis}$ (s ⁻¹)	<i>cis</i> -Anteil (%)
IIHY	0,0027	0,00016	5,9
Q212A-IIHY	0,00971	0,00029	2,9
P213G-IIHY	0,173	0,0042	2,4
P214A-IIHY	0,0163	0,00052	3,2

Angegeben sind die Raten der *trans*→*cis*-Isomerisierung im nativen Zustand bzw. der *cis*→*trans*-Isomerisierung im denaturierten Zustand sowie der relative Anteil des *cis*-Isomers im denaturierten Protein für die G3P*-Varianten IIHY, Q212A-IIHY, P213G-IIHY und P214A-IIHY. Die Daten für IIHY-G3P* und P213G-IIHY-G3P* sind aus Martin & Schmid (2003c) entnommen.

Durch die Mutation der zu *cis*-Pro213 benachbarten Reste kann also die Isomerisierungsgeschwindigkeit der *cis*-Peptidbindung verändert werden. Substitution des Gln212 durch Ala erhöht die Rate um den Faktor 2, Mutation des nachfolgenden Pro214 zu Ala um den Faktor 3. Diese für G3P* erhaltenen Werten entsprechen den Daten, die für kurze Peptide erhalten wurden (Reimer *et al.*, 1998). Zusammen mit der Isomerisierungsrate, die für ein Pentapeptid mit der entsprechenden G3P*-Sequenz anhand von NMR-Messungen erhalten wurde (Eckert *et al.*, 2005; Martin, 2003), belegt dies, dass die lokale Sequenz die Ursache für die sehr langsame *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 ist. Gln212 und Pro214 verlangsamen die Isomerisierung in G3P* derart, dass sie im Vergleich zu den meisten Prolinisomerisierungen ca. hundertfach langsamer verläuft. Die Assoziation der beiden Domänen in G3P* verläuft gekoppelt mit dieser Prolinisomerisierung. Entsprechend haben die Mutationen Q212A und P214A ausschließlich Einfluss auf Prozesse, die mit der Domänenassoziation bzw. -dissoziation verknüpft sind. Q212A und P214A beschleunigen die Domänenassoziation und demnach auch die gekoppelte Entfaltung von N2 und N1. Im Gleichgewichtsexperiment ist die Entfaltung von N2 thermodynamisch mit der Domänenassoziation gekoppelt. Die Stabilität von N2 wird daher durch die Mutationen sowohl bei der thermischen als auch bei der GdmCl-induzierten Denaturierung verringert. Im Gegensatz dazu haben die Domänenassoziation und folglich auch die Mutationen in der Gelenkregion keinen Einfluss auf die Stabilität von N1. Die Mutationen erhöhen die Isomerisierungsrate der *cis*-Pro213-Peptidbindung und somit die Geschwindigkeit der Domänenassoziation. Die lokale Sequenz Gln212-Pro213-Pro214 ist also für die ungewöhnlich langsame Isomerisierung verantwortlich. Die Mutation dieser spezifischen Sequenz erlaubt folglich die Variation der Geschwindigkeit, mit der dieser letzte Schritt bei der Faltung von G3P* abläuft.

3.1.1.3 Einfluss der Isomerisierungsrate an Pro213 auf die Phageninfektiosität

Die *in vitro*-Experimente zum Faltungsmechanismus von G3P* zeigen, dass die beiden Domänen zunächst in schnellen, voneinander unabhängigen Reaktionen falten, und dass der native geschlossene Zustand mit fest assoziierten Domänen erst durch die sehr langsame Isomerisierung an Pro213 ($\tau = 6200$ s bei 25 °C) erreicht wird. Langsame Faltungsschritte stellen für Zellen aufgrund einer möglichen Aggregation langlebiger Intermediate jedoch ein Problem dar. Ziel eines jeden Organismus ist es, die Aggregation möglichst zu unterdrücken, d.h. langsame Faltungsschritte möglichst zu vermeiden. Langsame Reaktionen sollten nur auftreten, wenn sie für die Funktion des jeweiligen Proteins wichtig sind. Es wurde deshalb untersucht, ob die ungewöhnlich langsame Isomerisierungsreaktion für die Funktion des G3P bei der Infektion von *E. coli* wichtig ist. Im Verlauf der Phageninfektion induziert die Bindung der N2-Domäne an den F-Pilus der Bakterienzelle die Dissoziation von N1 und N2. Erst durch diese Dissoziation wird die TolA-Bindungsstelle in G3P zugänglich (Chatellier *et al.*, 1999). Sie ist auf der N1-Domäne an der Interaktionsfläche von N1 und N2 lokalisiert, so dass sie im assoziierten Ruhezustand durch die N2-Domäne blockiert wird (Lubkowski *et al.*, 1999). Der geöffnete Zustand muss demnach im Verlauf des Infektionsvorgangs erhalten bleiben, damit eine Wechselwirkung zwischen N1 und TolA möglich ist. Eine sehr langsame Reassoziierung der Domänen könnte diesen infektiösen Zustand mit dissoziierten Domänen für längere Zeit aufrechterhalten. Die langsame Prolylisomerisierung und die besondere lokale Sequenz um *cis*-Pro213 könnten demnach der Schlüssel für einen langlebigen geöffneten Zustand und damit eine hohe Phageninfektiosität sein.

Um den Einfluss der Prolylisomerisierung auf die Phageninfektiosität zu bestimmen, wurden Phagen mit WT-G3P bzw. den entsprechenden G3P-Varianten im WT-Hintergrund verwendet, da Phagen mit stabilisierten G3P-Varianten eine geringere Infektiosität aufweisen (3.3.4, Kather *et al.*, 2005). Zunächst wurde *in vitro* der Effekt der jeweiligen Mutation auf die Stabilität und die prolylimitierte Faltungsreaktion des WT-Proteins bestimmt. Der Faltungsmechanismus kann, wie schon erwähnt, von der stabilisierten Variante IIHY-G3P* auf WT-G3P* übertragen werden. Die Mutationen in der Gelenksubdomäne von N2 zeigen für WT-G3P* den gleichen Effekt auf die Stabilität der beiden Domänen und die Assoziationsreaktion wie für IIHY-G3P*, d.h. die Raten der Isomerisierungsreaktion an Pro213 entsprechen den jeweiligen Raten der Varianten im stabilisierten Hintergrund. Die Mutationen Q212A, P213G und P214A beeinflussen nur die Stabilität der N2-Domäne in WT-G3P*, die Stabilität von N1 bleibt unverändert. Wie im IIHY-Protein destabilisieren alle Mutationen G3P* um den gleichen Betrag (Abbildung 3-9), wobei hier die Analyse der Daten nach einem Dreizustandsmodell zuverlässiger ist als in IIHY-G3P*, da die Übergänge der beiden Domänen deutlicher voneinander getrennt sind. In Tabelle 3-4 sind die Mittelpunkte der beiden Übergänge sowie die Zeitkonstanten der prolylimitierten Assoziationsreaktion für die jeweiligen G3P*-Varianten aufgeführt.

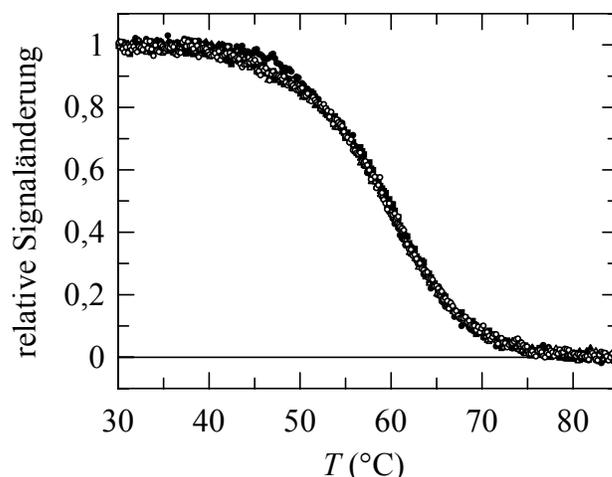


Abbildung 3-9: Thermische Entfaltung von WT-G3P* (●) sowie der G3P*-Varianten Q212A (○), P213G (△) und P214A (▲). Aufgetragen ist die relative Änderung des CD-Signals bei 230 nm in Abhängigkeit von der Temperatur nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell. Die Übergänge wurden mit 4 μ M Protein in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Dämpfung von 8 s gemessen. Die aus der Analyse erhaltenen T_M -Werte sowie die thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-4 aufgeführt.

Tabelle 3-4: Zeitkonstanten der prolinlimitierten Domänenassoziation und Stabilitätsdaten aus der thermischen Entfaltung für WT-G3P* und dessen Varianten.

G3P*-Variante	$\tau_{trans \rightarrow cis}$ (s)	Domänen dissoziation und Entfaltung von N2			Entfaltung von N1		
		T_{M1} (°C)	ΔH_D (kJ·mol ⁻¹)	$\Delta G_D^{45^\circ C}$ (kJ·mol ⁻¹)	T_{M2} (°C)	ΔH_D (kJ·mol ⁻¹)	$\Delta G_D^{60^\circ C}$ (kJ·mol ⁻¹)
WT	6200	48,1	411	3,8	60,2	230	0,1
Q212A-WT	3400	44,5	254	-0,4	60,4	223	0,2
P213G-WT	240	44,9	279	-0,1	60,2	225	0,1
P214A-WT	1900	44,3	283	-0,8	60,2	218	0,1
G153D-WT	6600	44,4	255	-0,6	60,6	227	0,4

Für die verschiedenen G3P*-Varianten sind die Zeitkonstanten τ der prolinlimitierten Domänenassoziation, die Schmelztemperaturen T_M , die Enthalpien der Entfaltung am Übergangsmittelpunkt ΔH_D und die freien Enthalpien der Entfaltung $\Delta G_D^{55^\circ C}$ bei 55 °C und $\Delta G_D^{65^\circ C}$ bei 65 °C angegeben. Die Zeitkonstanten der *trans*→*cis*-Isomerisierung wurden anhand des Zweischritt-Entfaltungstests für native Moleküle bestimmt. Die T_M -Werte geben die Mittelpunkte des ersten bzw. zweiten Übergangs im biphasischen Entfaltungsübergang von G3P* nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell an. Der erste Übergang (T_{M1}) reflektiert die Dissoziation der Domänen und die Entfaltung der N2-Domäne, der zweite Übergang (T_{M2}) die Entfaltung der N1-Domäne. Für die Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde eine konstante Änderung der Wärmekapazität von $\Delta C_p = 10000 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ für N2 und von $\Delta C_p = 1000 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ für N1 angenommen.

Wird die Infektiosität filamentöser Phagen gegenüber *E. coli* durch die langsame Domänenassoziation bestimmt, sollte eine langsame Prolylisomerisierung in der Gelenkregion die Infektion begünstigen. Die Isomerisierungsrate kann, wie zuvor gezeigt, durch Mutation

des *cis*-Pro213 bzw. seiner benachbarten Aminosäuren verändert werden (3.1.1.2). Entsprechend sollten sich Phagen mit niedriger Isomerisierungsrate und somit langsamer Domänenassoziation bei einer Selektion auf erhöhte Infektiosität durchsetzen. In drei unabhängigen Phagenbibliotheken wurden die Positionen Q212, P213 bzw. P214 randomisiert. Da zur Erstellung von Phagenbibliotheken einzelsträngiges Phagen-DNA-Templat mit mutierten Fragmenten zu doppelsträngiger DNA aufgefüllt und die resultierenden Hybride zur Transformation von *E. coli* eingesetzt werden (2.6), enthalten initiale Phagenbibliotheken zu 50% Templat-kodierte Phagen. Als Templat wurde deshalb nicht der WT-Phage, sondern Phagen mit der Q212A-, P213G- bzw. P214A-Mutation in G3P verwendet. Dadurch konnte vermieden werden, dass sich Phagen mit WT-Sequenz nur aufgrund ihrer Dominanz in den initialen Bibliotheken durchsetzen. Nach zehn aufeinanderfolgenden Zyklen aus Infektion, Phagenpropagation und -präparation wurden jeweils fünf Phagen pro Bibliothek analysiert. Die selektierten Aminosäuren und ihre Codons sind in Tabelle 3-5 aufgelistet.

Tabelle 3-5: Selektierte Varianten aus den G3P*-Bibliotheken mit den randomisierten Positionen 212, 213 bzw. 214.

Bibliothek	Aminosäure (Codon) im Ausgangsphagen	selektierte Aminosäure (Codon)	Häufigkeit	Aminosäure (Codon) im WT-Phagen
212X	Ala (GCG)	Gln (CAA)	2/5	Gln (CAA)
		Gln (CAG)	1/5	
		<i>amber</i> (TAG)	2/5	
213X	Gly (GGC)	Pro (CCC)	5/5	Pro (CCT)
214X	Ala (GCG)	Pro (CCC)	5/5	Pro (CCT)

Angegeben sind die in den Bibliotheken selektierten Aminosäuren und ihre Codons, sowie die Aminosäuren und die Codons der jeweiligen Ausgangs- und WT-Phagen. Die Häufigkeit gibt den Anteil sequenzierter Klone mit dem entsprechenden Basentriplett an der Gesamtzahl sequenzierter Klone nach zehn Infektionsrunden an. Das *amber*-Codon TAG führt im verwendeten *E. coli*-Stamm XL1Blue durch die Suppressor-tRNA *supE* zum Einbau der Aminosäure Gln.

An allen Positionen konnte die WT-Aminosäure gefunden werden. An den Positionen 213 und 214 wurde jeweils Prolin selektiert, wobei alle Klone das Codon CCC statt des WT-Codons CCT aufwiesen. Für Gln212 konnten verschiedene Codons selektiert werden, zum einen das im Gen-3 vorkommende Codon CAA und zum anderen das alternative Codon CAG. Bemerkenswert war hier, dass auch das *amber*-Stopcodon TAG gefunden wurde. Im verwendeten *E. coli*-Stamm XL1Blue kann dieses Codon durch die Suppressor-tRNA *supE* supprimiert werden und führt zum Einbau von Gln. Dies zeigt, dass die Bibliotheken zu Beginn der Selektion eine ausreichend hohe Diversität aufzeigten. Das Auftreten alternativer Codons für eine bestimmte Aminosäure beweist außerdem, dass die gefundenen Phagen tatsächlich selektiert wurden, und es sich nicht um Verunreinigungen mit WT-Phagen handelt. Die Sequenz Gln-Pro-Pro ist also für eine hohe Infektiosität der Phagen von Vorteil. Allerdings gibt die Selektion dieser Aminosäuren nicht eindeutig Aufschluss darüber, ob der

Selektionsvorteil bei der Infektion tatsächlich auf der langsamen prolinlimitierten Domänenassoziation beruht, oder ob andere Faktoren, wie zum Beispiel die Stabilität von G3P, ausschlaggebend sind.

Besitzt die langsame Prolinisomerisierung einen Einfluss auf die Infektion von *E. coli*, so sollte die Beschleunigung dieser Reaktion durch eine Prolylisomerase wie Cyp18 die Infektiosität der Phagen und damit die Zahl der infizierten Zellen verringern. Um diese Hypothese zu testen, wurde eine *E. coli* XL1Blue-Kultur mit WT-Phagen in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 10 μM Cyp18 infiziert und der Phagentiter bestimmt. Die Katalyse der Prolinisomerisierung und die damit beschleunigte Domänenassoziation verringert die Infektiosität der Phagen, wenn auch nur um den Faktor 1,8 ($4,3 \cdot 10^{10}$ cfu-ml⁻¹ im Vergleich zu $7,6 \cdot 10^{10}$ cfu-ml⁻¹). Der Effekt der Katalyse ist zwar gering, konnte aber in Wiederholungen des Experiments bestätigt werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die zu isomerisierende Prolinbindung für die Isomerase im Phagen wesentlich schlechter zugänglich ist als im gereinigten Protein. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass zur Infektion der F⁺-Stamm *E. coli* XL1Blue verwendet wurde. Obwohl die Isomerase zu einer beschleunigten Schließreaktion der Domänen führt, kann eine erneute Domänen dissoziation nicht vermieden werden, da G3P wiederholt mit dem F-Pilus von *E. coli* wechselwirken kann. Diese ständige Konkurrenz zwischen beschleunigter Assoziationsreaktion durch die Isomerase und Domänen dissoziation durch die Pilusbindung ist vermutlich für den geringen Unterschied verantwortlich.

Die Rate der Domänenassoziation in G3P kann nicht nur durch die Katalyse mit Isomerasen, sondern auch durch Mutation der lokalen Sequenz um *cis*-Pro213 variiert werden (3.1.1.2). Es sollte deshalb untersucht werden, inwiefern die Infektiosität mit der Assoziationsrate verschiedener G3P-Varianten korreliert. Ein Vergleich der Infektion verschiedener *E. coli* XL1Blue-Kulturen durch die Phagenvarianten ist relativ ungenau. Die Expression der F-Pili und damit die Konzentration des primären Rezeptors hängt stark von den jeweiligen Wachstumsbedingungen der *E. coli*-Kultur ab (Frost & Manchak, 1998; Will *et al.*, 2004), wodurch die Infizierbarkeit der Zellen beeinflusst wird. Um variierende Wachstumsbedingungen als Ursache für apparente Infektiositätsunterschiede auszuschließen, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt, bei denen Phagen mit verschiedenen G3P-Varianten um die Infektion der gleichen *E. coli*-Kultur konkurrieren. Ähnlich wie bei der Infektion in Gegenwart der Prolylisomerase sind auch hier nur geringe Infektiositätsunterschiede zu erwarten, da abermals F-Pili ständig präsent sind und die G3P-Domänen dissoziation permanent von neuem initiieren können. Allerdings ist es hier möglich, mehrere Infektionsrunden hintereinander durchzuführen und so geringe Unterschiede zwischen den Phagen mit verschiedenen G3P-Varianten zu amplifizieren.

Für die Analyse der Konkurrenz war es nötig, nach jeder Infektionsrunde die Zahl der Zellen zu ermitteln, die durch eine bestimmte Phagenvariante infiziert wurden. Hierzu wurden die verschiedenen Phagenvarianten mit spezifischen Mutationen im Gen-3 markiert, die dann

mittels Kolonie-PCR detektiert werden konnten. Beim Design dieser stillen Markermutationen wurde ausgenutzt, dass Serin durch sechs verschiedene Basentriplets kodiert wird, wobei alle drei Basen eines Serin-Codons ausgetauscht werden können. Zusätzlich wurden Leucin-Codons genutzt, bei denen der Austausch zweier Basen möglich ist. Zusammen mit der *wobble*-Base des vorhergehenden Codons konnten so sechs bzw. sieben Basen ausgetauscht werden, um drei Markersequenzen an den Aminosäurepositionen S124/L125, S172/S173 und S207/S208 im G3P einzuführen. Zur Kolonie-PCR wurden dann spezifische Primer verwendet, deren 3'-Ende komplementär zu den stillen Mutationen war, so dass ein PCR-Produkt nur erhalten wurde, wenn die getestete Kolonie den entsprechenden Phagen enthielt. Die PCR einer Kontrollmischung verschiedener Phagen lieferte die erwartete Zahl und Größe von Banden (Abbildung 3-10) und bestätigte damit die Spezifität der Identifizierung der Phagen mittels Kolonie-PCR.

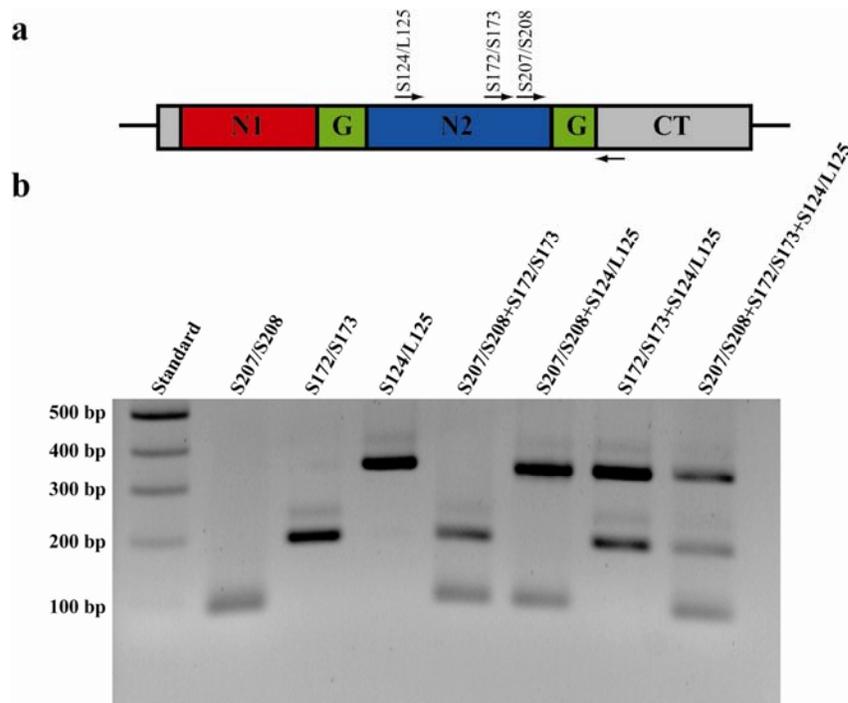


Abbildung 3-10: (a) schematische Darstellung des Gen-3 des Phagen fd. Domäne N1 ist in rot, Domäne N2 in blau, die Gelenkregion in grün, die C-terminale Domäne und die Signalsequenz in grau dargestellt. Die Positionen der stillen Markermutationen sowie der für die Amplifikation in (b) verwendeten Primer sind eingezeichnet. (b) Agarosegel nach Amplifizierung der DNA verschiedener Phagenvarianten. Im PCR-Ansatz waren jeweils die Phagen mit den angegebenen Markermutationen bzw. Mischungen der entsprechenden Phagen sowie alle in (a) eingezeichneten Primer vorhanden.

Vor der ersten Infektion von Zellen wurden die relativen Konzentrationen der Phagensuspensionen anhand des Gehalts an einzelsträngiger DNA bestimmt und die Suspensionen der miteinander konkurrierenden Varianten in einem bestimmten Verhältnis (meist 1:1) gemischt. Es wurden vier aufeinanderfolgende Zyklen aus Infektion,

Phagenpropagation und -präparation durchgeführt. Nach jeder Infektionsrunde wurde die Zahl der mit der jeweiligen Phagenvariante infizierten Zellen bestimmt, wozu in der Regel 48 Klone analysiert wurden. Abbildung 3-11 a zeigt die Ergebnisse der Konkurrenz zwischen WT-Phagen und Phagen mit der Mutation P213G in G3P.

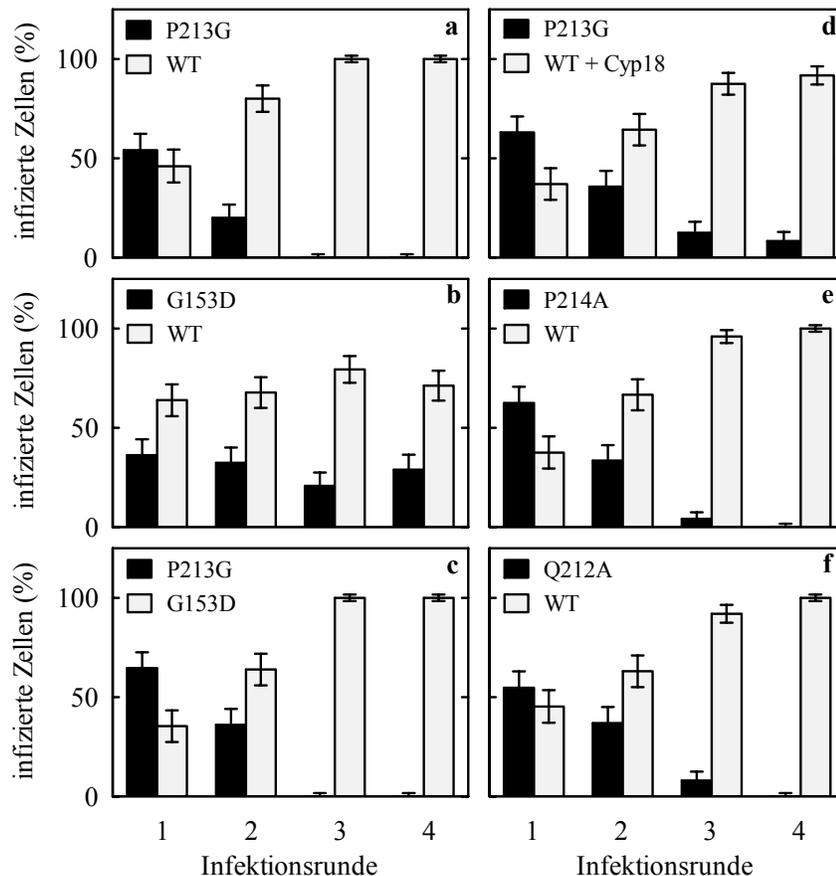


Abbildung 3-11: Konkurrenz der verschiedenen Phagenvarianten um die Infektion von *E. coli* XL1Blue. Dargestellt ist der Anteil der mit den entsprechenden Phagen infizierten Zellen nach jeder Infektionsrunde. Die jeweils konkurrierenden Varianten sind in den Teilabbildungen angegeben. Suspensionen mit gleichem Phagengehalt wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Es wurden jeweils vier Zyklen aus Infektion, Phagenpropagation und -präparation durchgeführt. In Teilabbildung (d) wurde die Konkurrenz zwischen WT-Phagen und P213G-G3P-Phagen in Gegenwart von 10 μ M Cyp18 durchgeführt. Nach jeder Infektionsrunde wurden die Phagen aus 48 (bzw. in Teilabbildung (d) aus 250) Einzelklonen mittels PCR analysiert.

Die Mutation P213G beschleunigt die Domänenassoziation 26-fach und verringert somit die Lebensdauer des geöffneten, infektiösen Zustands. Im Konkurrenzexperiment verliert der entsprechende Phage gegen WT-Phagen und kann bereits nach drei Infektionsrunden nicht mehr detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn die beiden Phagen zu Beginn des Experiments in verschiedenen Verhältnissen eingesetzt wurden. Auch wenn der P213G-G3P-Phage zu Beginn des Experiments im fünfzig- bzw. hundertfachen Überschuss vorhanden war, konnten nach drei oder vier Infektionsrunden nur noch WT-Phagen

nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ein Einfluss der stillen Markermutationen auf die Phageninfektiosität kann hier ausgeschlossen werden. Zum einen setzt sich der WT-Phage im Konkurrenzexperiment gegen P213G-G3P-Phagen auch durch, wenn die Phagen die jeweils andere Markermutation besitzen; zum anderen zeigt eine Mischung aus WT-Phagen mit zwei verschiedenen stillen Markermutationen über zehn Infektionsrunden ein innerhalb der Fehlergrenze konstantes Phagenverhältnis (Daten nicht gezeigt).

Die Mutation P213G beeinflusst jedoch nicht nur die Assoziationsreaktion der beiden Domänen, sondern verringert auch die Stabilität von G3P*. Der Schmelzpunkt des ersten Übergangs in G3P* verringert sich von 48,1 °C für das WT-Protein auf 44,9 °C in der Variante (Tabelle 3-4). Dieser erste Prozess in der thermischen Entfaltung von G3P* ist auf die Dissoziation der beiden Domänen und die damit gekoppelte Entfaltung von N2 zurückzuführen. Um diese Destabilisierung als Ursache für die niedrigere Infektiosität auszuschließen, wurde ein Konkurrenzexperiment zwischen WT-Phagen und Phagen durchgeführt, welche die Mutation G153D in G3P tragen. Gly153 befindet sich innerhalb des globulären Teils der N2-Domäne an der Interaktionsfläche zwischen N1 und N2 (Abbildung 3-34). Die Substitution dieses Gly153 durch Asp führt zu einer ähnlichen Destabilisierung der N2-Domäne wie die Mutationen im Sequenzbereich 212 - 214, zeigt aber keinen Effekt auf die Rate der Isomerisierung an *cis*-Pro213 und damit auf die Rate der Domänenassoziation (Tabelle 3-4). Tatsächlich kann sich der WT-Phage im Konkurrenzexperiment nicht durchsetzen (Abbildung 3-11b), und auch nach zehn Infektionsrunden ist der G153D-G3P-Phage noch zu 15% in der Phagensuspension vorhanden (Daten nicht gezeigt). Die G153D-Phagenvariante setzt sich jedoch in der Konkurrenz gegen P213G-G3P-Phagen durch (Abbildung 3-11c). Da beide Varianten im thermischen Entfaltungsübergang die gleiche Stabilität besitzen, beruht der Unterschied in der Infektiosität nicht auf einer unterschiedlichen Proteininstabilität, sondern auf der unterschiedlichen Isomerisierungsrate in den beiden Varianten.

Entsprechend müsste eine Erhöhung der Isomerisierungsrate durch Katalyse eine Erniedrigung der Infektiosität zur Folge haben. Cyp18 katalysiert die Isomerisierung an Pro213 in WT-G3P*, nicht aber an Gly213 in der P213G-Mutante (Martin & Schmid, 2003c), so dass der Unterschied in den Raten der Domänenassoziation zwischen den beiden Varianten verringert wird. Die katalysierte Reaktion ist jedoch im WT-Protein ($\tau = 1100$ s) immer noch fünfmal schneller als in der P213G-Variante ($\tau = 240$ s). Da die Lebensdauer des offenen Zustands im WT-Phagen damit immer noch länger ist als in P213G-G3P-Phagen, kann sich der WT-Phage im Konkurrenzexperiment weiterhin durchsetzen (Abbildung 3-11d). Der Unterschied in der Infektiosität ist allerdings deutlich geringer als in Abwesenheit von Cyp18, und nach vier Infektionsrunden können immer noch Zellen nachgewiesen werden, die mit P213G-G3P-Phagen infiziert waren. Die Isomerase verändert durch die Katalyse nur die Rate der Prolinisisomerisierung, nicht aber die Stabilität von G3P. Die im Vergleich zum isomerasefreien Experiment verringerte Infektiosität von WT-Phagen ist also tatsächlich auf eine beschleunigte Assoziationsreaktion und damit auf eine kürzere Lebensdauer des

geöffneten, infektiösen Zustands zurückzuführen. Um die Fehlergrenzen in diesem Konkurrenzexperiment gering zu halten, wurden nach jeder Infektionsrunde 250 Einzelklone analysiert.

Die Rate der Isomerisierungsreaktion wird, wie unter 3.1.1.2 gezeigt, durch die lokale Sequenz um Pro213 bestimmt. In den G3P-Varianten Q212A und P214 ist diese Reaktion um den Faktor zwei bzw. drei beschleunigt. Entsprechend setzt sich in den Konkurrenzexperimenten der WT-Phage mit der langsameren Assoziationsreaktion gegen die jeweilige Phagenvariante durch (Abbildung 3-11e,f). Im Gegensatz zur Konkurrenz zwischen WT- und P213G-G3P-Phagen konnten hier jedoch nach der dritten Infektionsrunde noch Q212A-G3P- bzw. P214A-G3P-Phagen detektiert werden. Untereinander zeigen die Phagen mit den jeweiligen Mutationen an den Positionen 153, 212, 213 bzw. 214 das erwartete Verhalten (Abbildung 3-12). G153D-G3P-Phagen weisen mit einer Zeitkonstante von 6600 s die langsamste Isomerisierungsreaktion und damit längste Lebensdauer des infektiösen Zustands auf und setzen sich gegen Phagen mit der G3P-Mutation Q212A bzw. P214A durch, deren Domänenassoziation Zeitkonstanten von 3400 s bzw. 1900 s besitzt. Diese beiden Varianten besitzen wiederum eine höhere Infektiosität als P213G-G3P-Phagen, die mit einer Zeitkonstante von $\tau = 240$ s die schnellste Assoziationsreaktion zeigen und demzufolge in den Konkurrenzexperimenten verdrängt werden. Der Vergleich zwischen den Phagen mit Q212A- und P214A-G3P lieferte kein eindeutiges Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Nach vier Infektionsrunden konnte sich keiner der beiden Phagen durchsetzen. Möglicherweise ist der Unterschied zwischen den Isomerisierungsraten der beiden G3P-Varianten ($\tau = 1900$ s bzw. $\tau = 3400$ s) zu gering und zusätzlich der Fehler der Auslesemethode zu groß, um einen Effekt bei einer so geringen Änderung in der Assoziationsrate eindeutig bestimmen zu können.

Da alle Varianten mit Mutationen an den Positionen 153, 212, 213 und 214 die gleiche thermische Stabilität besitzen (Tabelle 3-4), kann auch hier ein Unterschied in der Stabilität als Ursache für die niedrigere Infektiosität ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Konkurrenzexperimente in den Abbildungen 3-11 und 3-12 zeigen deutlich, dass die Infektiosität der Phagen von der Rate der Prolylisomerisierung und damit von der Lebensdauer des geöffneten, infektiösen Zustands mit dissoziierten Domänen abhängt. Verkürzt man die Lebensdauer dieses Zustands entweder durch Katalyse mit Hilfe einer Prolylisomerase oder durch Mutation der lokalen Sequenz um Pro213, nimmt die Infektiosität der Phagen ab. WT-Phagen und G153D-G3P-Phagen weisen in der Gelenksubdomäne die Sequenz Gln212-Pro213-Pro214 auf, die für die langsame, an die Isomerisierung von Pro213 gekoppelte Domänenassoziation verantwortlich ist. Das G3P dieser Phagen liegt damit am längsten im geöffneten, aktiven Zustand vor, d.h. die TolA-Bindungsstelle ist hier am längsten zugänglich. Diese Phagen setzen sich demzufolge in den Konkurrenzexperimenten durch.

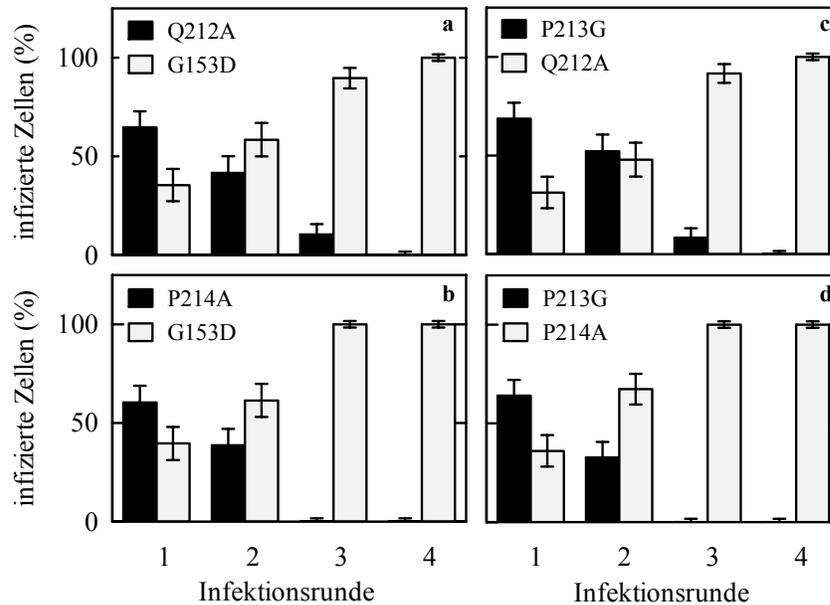


Abbildung 3-12: Konkurrenz der verschiedenen Phagenvarianten um die Infektion von *E. coli* XL1Blue. Dargestellt ist der Anteil der mit den entsprechenden Phagen infizierten Zellen nach jeder Infektionsrunde. Die jeweils konkurrierenden Varianten sind in den Teilabbildungen angegeben. Suspensionen mit gleichem Phagengehalt wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Es wurden jeweils vier Zyklen aus Infektion, Phagenpropagation und -präparation durchgeführt, und nach jeder Infektionsrunde die Phagen aus 48 Einzelklonen mittels PCR analysiert.

3.1.1.4 Die prolinlimitierte Domänenassoziation führt zur Inaktivierung der Phagen

Nachdem die Bindung der N2-Domäne an den zellulären F-Pilus die Dissoziation der G3P-Domänen induziert hat, ist eine lange Lebensdauer dieses geöffneten Zustands von G3P mit exponierter TolA-Bindungsstelle für eine hohe Infektiosität der Phagen von Vorteil. Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt, setzen sich Phagen mit einer langsamen Domänenassoziation in den Konkurrenzexperimenten gegen schnell-assoziiierende Mutanten durch. Der für diese Experimente verwendete *E. coli*-Stamm XL1Blue besitzt F-Pili und lässt sich also sehr gut mit Phagen infizieren. Die Präsenz der F-Pili führt allerdings auch dazu, dass Phagen mit bereits assoziierten Domänen durch erneute Bindung an den F-Pilus reaktiviert werden können. Unterschiede in der Rate der Domänenassoziation verschiedener G3P-Varianten wirken sich daher nur relativ gering auf die Phageninfektiosität aus.

E. coli-Stämme ohne F-Pili können ebenfalls durch filamentöse Phagen infiziert werden (Holliger & Riechmann, 1997), allerdings mit wesentlich niedrigerer Effizienz. Eine Phagensuspension, die bei Infektion von *E. coli* XL1Blue 10^{11} cfu·ml⁻¹ zeigt, führt bei F-Pilus-freien Zellen zu lediglich $10^5 - 10^7$ cfu·ml⁻¹. Da bei F⁻-Zellen die F-Pilus-induzierte Domänenassoziation nicht möglich ist, muss ein spontanes Öffnen des G3P erfolgen, um die Bindungsstelle für TolA-C freizugeben. Eine Infektion ist zudem nur in Gegenwart von 50 mM CaCl₂ zu beobachten. Möglicherweise erhöht Ca²⁺ die Phageninfektiosität, indem es die Phagen auf der Zelloberfläche präzipitiert oder die Stabilität der äußeren Zellmembran

stört und so die Zugänglichkeit von TolA erhöht. Um auszuschließen, dass die Gegenwart von CaCl_2 zur Aufnahme freier Phagen-DNA aus der Phagensuspension und damit nur zu einer scheinbaren Infektion führt, wurden die Zellen unter identischen Bedingungen mit einzel- und doppelsträngiger Phagen-DNA inkubiert. In beiden Fällen konnten jedoch keine Transformanten gefunden werden. Dies bestätigt, dass der verwendete F^- -Stamm *E. coli* HB2156 tatsächlich durch fd-Phagen infiziert werden kann - wenn auch nur mit geringer Effizienz.

Beim Vergleich der Infektiositäten verschiedener Phagenvarianten gegenüber *E. coli* HB2156 fällt auf, dass alle Mutanten eine höhere Infektiosität besitzen als WT-Phagen (Tabelle 3-6). Der Unterschied ist dabei für P213G-G3P-Phagen am deutlichsten. Mögliche Ursachen hierfür sind die geringere thermodynamische Stabilität der Mutanten, bedingt durch den Verlust stabilisierender Interdomänenwechselwirkungen, oder aber deren schnellere Isomerisierungsrate. Auch Phagen mit G153D-G3P sind unter den hier vorliegenden Bedingungen deutlich infektiöser als WT-Phagen. G153D-G3P besitzt eine gegenüber WT unveränderte Assoziationskinetik der Domänen, so dass der Infektiositätsunterschied in diesem Fall auf unterschiedliche G3P*-Stabilitäten zurückzuführen ist. Auf den Einfluss der Stabilität des G3P auf die Infektiosität wird unter 3.3.4 näher eingegangen.

Tabelle 3-6: Stabilität, Rate der Domänenassoziation und Infektiosität verschiedener Phagenvarianten.

G3P-Variante	T_{M1} (°C)	$\tau_{\text{Domänenassoziation}}$ (s)	Phagentiter ($\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1} \times 10^{-5}$)	
			nativ	denaturiert
WT	48,1	6200	1,2	1400
G153D	44,4	6600	8,4	1600
Q212A	44,5	3800	8,8	1500
P213G	44,9	240	160	170
P214A	44,3	1900	17	1200

Angegeben ist der Schmelzpunkt T_{M1} des ersten Übergangs bei der thermischen Entfaltung sowie die Zeitkonstante τ der prolinlimitierten Domänenassoziation. Die Phagentiter sind als Kolonie-bildende Einheiten für die Infektion des F^- -Stamms *E. coli* HB2156 im nativen Zustand bzw. nach 10-minütiger Denaturierung der Phagen bei 65 °C angegeben. Der Fehlerbereich der Phagentiter liegt bei $\pm 10\%$.

Bei Mutanten mit gleicher G3P-Stabilität fällt auf, dass die Infektiosität gegenüber F^- -Zellen mit zunehmender Assoziationsrate der Domänen ansteigt. Die Infektion F^- -Pilus-freier Zellen hängt von der spontanen Dissoziation der beiden Domänen N1 und N2 ab, so dass eine verringerte Zahl an Interaktionen zwischen den beiden Domänen und eine schnellere Öffnungsrate vorteilhaft sind. Mutationen innerhalb der Gelenkregion haben zwar kaum Einfluss auf die Lage des Prolin-*cis/trans*-Gleichgewichts, beschleunigen jedoch sowohl die *trans*→*cis*- als auch die *cis*→*trans*-Reaktion (3.1.1.2, Tabelle 3-3). Nach spontaner Domänen dissoziation werden Phagen mit geöffneten G3P durch Infektion aus dem

Gleichgewicht entfernt. Die Wiedereinstellung des Gleichgewichts kann bei Phagen mit Mutationen an den Positionen 212 - 214 schneller erfolgen, was sich in einer gegenüber WT- oder G153D-Phagen höheren Infektiosität der Varianten Q212A, P213G und P214A widerspiegelt.

Für die Infektion von *E. coli* HB2156 muss G3P im offenen, infektiösen Zustand mit dissoziierten Domänen vorliegen. *In vitro* kann die Dissoziation der G3P-Domänen durch thermische oder Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung erreicht werden. Entsprechend wurden WT-Phagen 10 min lang bei 65 °C bzw. 30 min lang in 5 M GdmCl inkubiert, und anschließend F-Pilus-defiziente *E. coli*-Zellen 5 min lang bei 25 °C infiziert. Durch derartige Entfaltung von G3P und Rückfaltung in Gegenwart der Zellen konnte die Infektiosität von WT-Phagen gegenüber F⁻-Zellen tausendfach erhöht werden (Tabelle 3-6). Wie die Analyse des Faltungsmechanismus gezeigt hat, ist die Faltung von N1 und des globulären Teils von N2 nach 3 min abgeschlossen, die beiden vorgefalteten Domänen liegen aber noch lange Zeit dissoziiert vor, so dass die TolA-Bindungsstelle auf N1 zugänglich bleibt. Phagen mit den G3P-Mutanten G153D, Q212A und P214, deren Domänenassoziation mit einer Zeitkonstante von mehr als 30 min abläuft, zeigten nach *in vitro*-Entfaltung eine ähnliche Infektionserhöhung wie WT-Phagen. Nur für P213G-G3P-Phagen konnte kein Unterschied in der Infektiosität festgestellt werden. Die gewählten Entfaltungsbedingungen führen zwar auch hier zu einem Intermediat mit dissoziierten Domänen, allerdings ist bei dieser G3P-Variante die Reassoziationszeit der Domänen so schnell ($\tau = 240$ s), dass sie innerhalb der 300 s-Totzeit des Infektionsexperiments abläuft.

Eine wichtige Frage bei diesen Infektionsexperimenten war, ob die Lebensdauer des infektiösen Zustands tatsächlich durch die Kinetik der Domänenassoziation und damit durch die Isomerisierungsreaktion an Pro213 bestimmt wird. Um die Lebensdauer dieses geöffneten infektiösen Zustands der Phagen zu bestimmen, wurde ein ähnliches Prinzip wie beim Zweischnitt-Entfaltungstest für native Moleküle angewendet (3.1.1.1). G3P wurde zunächst denaturiert, indem die Phagen 30 min lang in 5 M GdmCl inkubiert wurden. Anschließend wurde G3P durch zehnfache Verdünnung in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C rückgefaltet. Nach verschiedenen Rückfaltungszeiten wurden Aliquots der Phagensuspension entnommen, *E. coli* HB2156 infiziert und die Zahl infektiöser Phagen bestimmt. Um den Fehler gering zu halten, wurden jeweils drei parallele Infektionsansätze analysiert. Zu Beginn des Experiments wurde eine *E. coli*-Kultur aliquotiert, um jeweils die gleiche Zellzahl zu infizieren. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert und vor der Infektion 5 min lang bei 25 °C inkubiert. Eine Abnahme der Infektiosität aufgrund einer Abnahme der Zahl infizierbarer Zellen kann ausgeschlossen werden. In einem Kontrollexperiment wurden Zellen zu Beginn des Experiments sowie nach achtstündiger Inkubation auf Eis mit thermisch entfalteteten Phagen infiziert und die Zahl der infizierten Zellen bestimmt. In beiden Ansätzen konnten die gleiche Zahl infizierter Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation der Zellen auf Eis hat demnach keinen Einfluss,

und Änderungen in der Zahl infizierter Zellen sind ausschließlich auf eine veränderte Zahl aktiver Phagen zurückzuführen.

Die Zahl der infizierten Zellen nahm mit zunehmender Rückfaltungszeit monoexponentiell ab. Die daraus ermittelte Zeitkonstante von 5900 s stimmt sehr gut mit derjenigen der *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 überein (Abbildung 3-13a). Mit zunehmender Rückfaltungszeit erreicht G3P seinen nativen Zustand mit Pro213 in der *cis*-Konformation, d.h. G3P liegt zunehmend im geschlossenen Zustand mit assoziierten Domänen N1 und N2 und blockierter TolA-Bindungsstelle vor, wodurch die hohe Infektiosität verloren geht.

Diese Inaktivierung der Phagen durch Rückfaltung des G3P ist reversibel, eine rückgefaltete Phagensuspension besitzt nach erneuter Inkubation in 5 M GdmCl die gleiche Infektiosität wie zu Beginn des Experiments (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass die Abnahme der Infektion nicht auf eine Aggregation des G3P oder anderer Phagenproteine zurückzuführen ist. Infiziert man nach Entfaltung und unterschiedlich langen Rückfaltungszeiten hingegen den F⁺-Stamm *E. coli* XL1Blue, kann man keine Abnahme in der Zahl der infizierten Zellen und somit in der Infektiosität feststellen (Daten nicht gezeigt). In diesem Fall werden G3P-Moleküle, die im Verlauf der Rückfaltung bereits ihre native Konformation mit assoziierten Domänen erreicht haben, durch die Wechselwirkung mit dem F-Pilus erneut in den offenen, aktiven Zustand überführt, so dass die Anzahl aktiver Phagen konstant und unabhängig von der Rückfaltungszeit ist. Der aktive Zustand der Phagen kann also entweder *in vitro* durch Entfaltung oder *in vivo* durch die Wechselwirkung mit dem F-Pilus populiert werden.

Der nach Rückfaltung gleichbleibend hohe Phagentiter bei der Infektion von *E. coli* XL1Blue zeigt, dass die Wechselwirkung mit dem F-Pilus zur vollständigen Dissoziation der Domänen führt. Zudem unterstreicht dies, dass die Abnahme der Infektiosität gegenüber F⁻-Zellen auf dem mit der Domänenassoziation einhergehenden Blockieren der TolA-Bindungsstelle und nicht auf einer Aggregation der Phagen oder auf Fehlfunktionen anderer Phagenproteine (hervorgerufen durch die Entfaltung in GdmCl) beruht. Ist der F-Pilus als Öffner vorhanden, erreichen auch bereits inaktivierte Phagen durch die F-Pilus-induzierte Domänen dissoziation wieder ihre infektiöse Form.

Wird die Rückfaltung der Phagen in Gegenwart von Cyp18 durchgeführt, nimmt die Zahl der aktiven, infektiösen Phagen sehr viel schneller ab. Die Zeitkonstante dieser Reaktion ist dabei abhängig von der Konzentration an Isomerase (Abbildung 3-13b). Durch Cyp18 wird die *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 in der Gelenkregion und damit die Domänenassoziation beschleunigt. G3P kann schneller in seine native Konformation mit assoziierten Domänen falten, und die Phagen verlieren dementsprechend schneller ihre Infektiosität gegenüber F-Pilus-freien Zellen, da die TolA-Bindungsstelle auf N1 schneller durch N2 blockiert wird. Als Kontrolle diente ein Ansatz, in dem die Phagen vor der Infektion nicht durch GdmCl entfaltet wurden. In diesem Fall bleiben die Domänen fest miteinander assoziiert, und die Phagen besitzen daher nur eine sehr geringe Infektiosität.

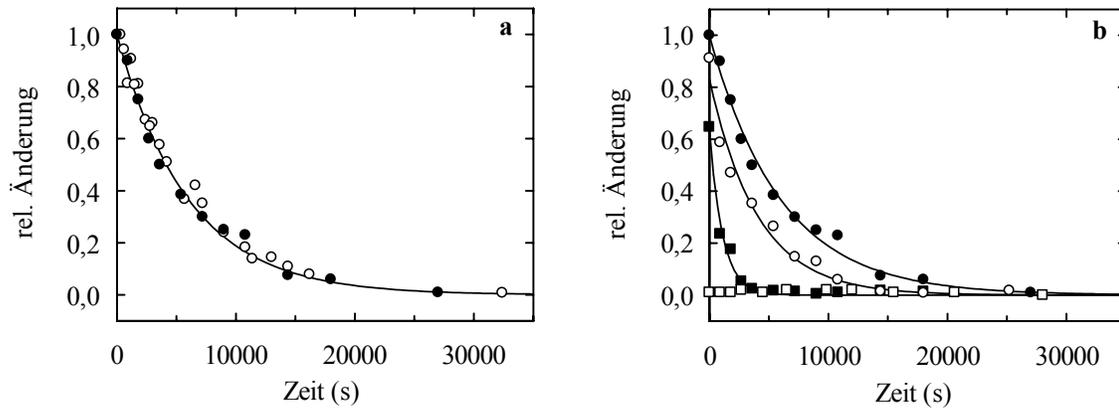


Abbildung 3-13: Kinetik der Phageninaktivierung. (a) Vergleich der Kinetik der Inaktivierung von WT-Phagen (●) mit der im Zweischritt-Entfaltungstest *in vitro* bestimmten Kinetik der *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 (○). Die Rückfaltung wurde nach Entfaltung der Phagen in 5 M GdmCl, 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, durch zehnfache Verdünnung initiiert. Nach verschiedenen Rückfaltungszeiten wurden F⁻-Zellen *E. coli* HB2156 infiziert. Die Linie repräsentiert den Angleich der experimentellen Daten der Phageninaktivierung an eine monoexponentielle Funktion mit der Zeitkonstante $\tau = 5900$ s. (b) Katalyse der Inaktivierung von WT-Phagen durch Cyp18. Kinetik der Inaktivierung bei Rückfaltung der Phagen in Gegenwart von 0 (●), 10 (○) und 50 nM (■) Cyp18. Im Kontrollansatz (□) wurden die Phagen zuvor nicht entfaltet. Die Linien repräsentieren den Angleich der experimentellen Daten an eine monoexponentielle Funktion mit den Zeitkonstanten $\tau = 5900$ s (0 nM Cyp18), $\tau = 3700$ s (10 nM Cyp18) bzw. $\tau = 1030$ s (50 nM Cyp18).

Die Katalyse der Phageninaktivierung durch Cyp18 zeigt erneut, dass die Isomerisierungsrate an Pro213 tatsächlich die Lebensdauer des aktiven, geöffneten Zustands und damit die Infektiosität der Phagen bestimmt. Außerdem wird deutlich, dass Pro213 nicht nur im gereinigten Protein, sondern auch im intakten Phagen gut für die Isomerase zugänglich ist. Bei der Infektion von F⁺-Zellen konkurriert das durch die Isomerase beschleunigte Schließen der Domänen mit dem erneuten Öffnen der Domänen durch den F-Pilus. Der zuvor in 3.1.1.3 beschriebene geringe Effekt von Cyp18 auf die Infektion von F⁺-Zellen *E. coli* XL1Blue lässt sich somit gut mit dieser permanenten Konkurrenz zwischen F-Pilus und Prolylisoamerase erklären. In Abwesenheit des F-Pilus entfällt diese Konkurrenz, und bereits geringe Konzentrationen an Cyp18 zeigen einen deutlichen Effekt auf die Infektiosität der Phagen. Da die Inaktivierung der Phagen durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 bestimmt wird, zeigten die Phagenvarianten mit veränderter Isomerisierungsrate erwartungsgemäß eine schnellere Inaktivierungskinetik als WT-Phagen (Abbildung 3-14). Die für Phagen mit Q212A- bzw. P214A-G3P erhaltenen Zeitkonstanten von 3700 s bzw. 2100 s stimmen dabei gut mit den Zeitkonstanten der Prolylisoamerasierung im gereinigten G3P* *in vitro* überein (Tabelle 3-13). Für Phagen mit der Mutation P213G konnte die Kinetik der Inaktivierung nicht bestimmt werden, da hier die Isomerisierung gegenüber dem WT-Phagen 26-fach beschleunigt ist ($\tau = 240$ s), und die Phagen somit innerhalb der 300 s-Totzeit des Experiments in den Zustand mit assoziierten Domänen falten.

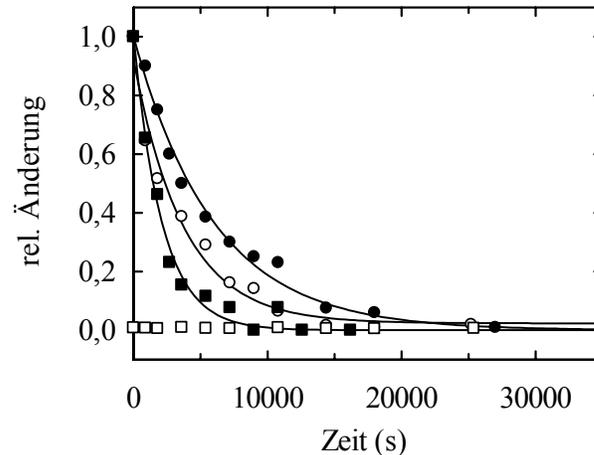


Abbildung 3-14: Kinetik der Inaktivierung von WT-Phagen (●), Q212A-G3P-Phagen (○), P214A-G3P-Phagen (■) und P213G-G3P-Phagen (□). Die Rückfaltung wurde nach Entfaltung der Phagen in 5 M GdmCl, 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, durch zehnfache Verdünnung initiiert. Nach verschiedenen Rückfaltungszeiten wurden F⁻-Zellen *E. coli* HB2156 infiziert. Die Linien repräsentieren den Angleich der experimentellen Daten an eine monoexponentielle Funktion mit den Zeitkonstanten $\tau = 5900$ s (WT-Phagen), $\tau = 3700$ s (Q212A-G3P-Phagen) bzw. $\tau = 2100$ s (P214A-G3P-Phagen). Für P213G-G3P-Phagen konnte die Kinetik der Inaktivierung aufgrund der 300 s-Totzeit des Experiments nicht aufgelöst werden.

Zusammen mit den Konkurrenzexperimenten und den Ergebnissen aus der Selektion, wird deutlich, dass die Isomerisierungsreaktion an Pro213 tatsächlich die Infektiosität der Phagen bestimmt. Pro213 wirkt dabei als Schalter und Zeitgeber zugleich. Im nativen Zustand mit Pro213 in der *cis*-Konfiguration steht der Schalter auf “aus“; die beiden Domänen N1 und N2 sind fest miteinander assoziiert und die Bindungsstelle für TolA-C, den Rezeptor auf der Zelloberfläche, ist blockiert. In diesem Ruhezustand ist der Phage zwar robust und stabil, aber nicht infektiös. Die Wechselwirkung der N2-Domäne mit dem bakteriellen F-Pilus aktiviert G3P durch die Dissoziation der Domänen N1 und N2. Als Folge springt Pro213 im Gelenkbereich aus dem gespannten *cis*- in den stabileren *trans*-Zustand. Diese Konformation entspricht der “an“-Stellung des Prolinschalters, und die TolA-Bindungsstelle auf N1 ist in dieser aktiven, infektiösen Form zugänglich. Pro213 fungiert jetzt als Zeitgeber. Die Rückisomerisierung von der *trans*- in die *cis*-Form ist mit einer Zeitkonstante von 6200 s sehr langsam und garantiert, dass die geöffnete, bindungsaktive Form des G3P so lange erhalten bleibt, bis die N1-Domäne mit TolA interagieren kann. Die Lebensdauer dieses angeschalteten Zustands wird direkt durch die lokale Aminosäuresequenz um Pro213 (Gln212-Pro213-Pro214) kodiert. Sowohl die vorhergehende als auch die nachfolgende Aminosäure ist so gewählt, dass die Rate der Isomerisierungsreaktion und damit die Schaltfrequenz möglichst niedrig ist. Mutation dieser Aminosäuren oder Katalyse der Isomerisierung durch eine Prolylisomerase erhöhen die Rate und erniedrigen die Infektiosität, da die Phagen schneller in ihren inaktiven Ruhezustand zurückkehren. Die Prolinisomerisierung im G3P steuert also die Infektion von *E. coli* durch filamentöse Phagen. Diese intrinsisch langsame Reaktion garantiert zum einen, dass ein ausreichend großes

Zeitfenster für die Wechselwirkung von N1 mit dem Rezeptor und den damit initiierten Infektionsprozess vorhanden ist; zum anderen aber auch, dass der Phage durch die Reassoziierung der Domänen wieder in einen robusten und stabilen Ruhezustand gelangt, falls keine Infektion stattfinden kann.

3.1.2 Die prolinkontrollierte Domänendissoziation führt zur partiellen Entfaltung von G3P*

Bei der Infektion von *E. coli* wirkt Pro213 in der Gelenkregion zwischen den beiden Domänen als konformationeller Schalter. Als *cis*-Isomer liegt G3P in der geschlossenen, inaktiven Konformation vor. Die Aktivierung des G3P erfolgt durch die Wechselwirkung der N2-Domäne mit dem F-Pilus, welche zur Dissoziation der beiden Domänen und zur Isomerisierung von Pro213 von der *cis*- in die *trans*-Form führt. Die Rate der Reisoimerisierung in den nativen *cis*-Zustand bestimmt die Infektiosität der Phagen (3.1.1). In gefalteten Proteinen ist die Konformation von Prolinbindungen festgelegt, weil meist nur ein Isomer in der dreidimensionalen Struktur akzeptiert wird. Bei Entfaltung des Proteins entfallen diese sterischen Einschränkungen und es kann sich ein Gleichgewicht zwischen *cis*- und *trans*-Isomer einstellen, wobei hier das stabilere *trans*-Isomer dominiert. In G3P* besitzen 94% aller entfalteten Moleküle Pro213 in der nicht-nativen *trans*-Konformation und müssen daher die langsame *trans*→*cis*-Isomerisierung durchlaufen, um in den nativen Zustand falten zu können (Tabelle 3-3, Martin & Schmid, 2003c). Die Isomerisierung an Pro213 bestimmt also sowohl die Rückfaltung von G3P *in vitro* als auch die Kinetik der Inaktivierung der Phagen *in vivo*. Es sollte daher untersucht werden, ob die Aktivierung durch den F-Pilus lediglich durch die lokale Isomerisierung an Pro213 verursacht wird, oder ob sie auch eine partielle Entfaltung in G3P erfordert.

3.1.2.1 Spektroskopische Charakterisierung des aktiven Zustands von G3P*

Die Prolinisomerisierung und die damit gekoppelte Assoziation der beiden Domänen N1 und N2 ist nicht mit einer Fluoreszenzänderung verbunden, so dass dieser letzte Schritt der Faltung von G3P bisher fluoreszenzspektroskopisch nicht analysiert werden konnte (3.1.1.1. und 3.1.1.2, Martin & Schmid, 2003b; Martin & Schmid, 2003c). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der aktive Zustand mit dissoziierten Domänen und Pro213 in der *trans*-Konformation detaillierter charakterisiert werden. Die Änderung des CD-Signals im Fern-UV-Bereich (190 - 250 nm) stellt die beste Sonde für konformationelle Faltungsreaktionen dar, da das CD-Signal in diesem Bereich vom Sekundärstrukturgehalt eines Proteins bestimmt wird. Abbildung 3-15 zeigt die CD-Spektren von WT-G3P* bei verschiedenen Temperaturen sowie die Differenzspektren der verschiedenen Faltungszustände von G3P*.

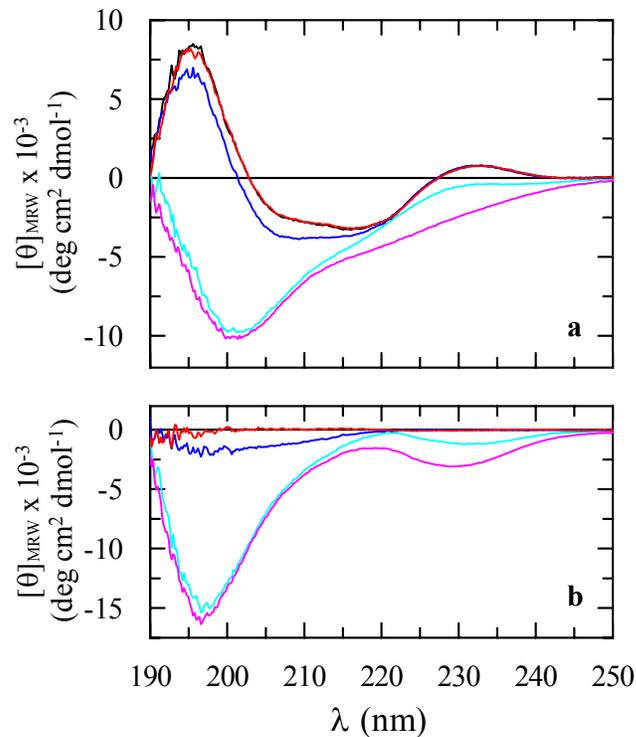


Abbildung 3-15: (a) Fern-UV-CD-Spektren von WT-G3P* bei 10 °C (—), 53 °C (—) und 80 °C (—). Um das Spektrum des aktiven, geöffneten G3P* mit dissoziierten Domänen zu bestimmen, wurden 100 μ M Protein 5 min lang bei 53 °C entfaltet und durch zehnfache Verdünnung bei 25 °C rückgefaltet. Nach einer Rückfaltungszeit von 3 min (—) bzw. 6 h (—) wurde das Spektrum bei 10 °C gemessen. (b) Die Differenzspektren der verschiedenen Zustände und dem nativen Zustand von G3P* sind in den entsprechenden Farben dargestellt. Alle Spektren wurden mit 10 μ M Protein in 10 mM K-Phosphat, pH 7,0, bei einer Schichtdicke von 1 mm und einer Bandbreite von 2 nm (Dämpfung 2 s) gemessen.

Bei 10 °C ist G3P* gefaltet und die Domänen sind fest miteinander assoziiert. Das zugehörige CD-Spektrum zeigt ein Maximum im Wellenlängenbereich von 190 bis 200 nm, wie für native Proteine erwartet wird. Bei Temperaturerhöhung auf 53 °C kommt es zur Domänendissoziation und damit gekoppelt zur Entfaltung der N2-Domäne (T_{M1} (WT-G3P*) = 48,1 °C, Tabelle 3-4), was sich in einer starken Abnahme des CD-Signals im Bereich von 190 bis 220 nm widerspiegelt. Im Bereich von 230 nm kommt es jedoch nur zu einer geringen Abnahme des CD-Signals. Dies erklärt auch den geringen Beitrag von N2 zum CD-Signal bei 230 nm im thermischen Entfaltungsübergang (Abbildung 3-4 und 3-9). Bei einer Temperatur von 80 °C liegt G3P* vollständig entfaltet vor. Die Signaländerung relativ zum CD-Spektrum bei 53 °C findet hier ausschließlich im Bereich um 230 nm statt und ist auf die Entfaltung der N1-Domäne zurückzuführen. Entsprechend besitzt N1 im thermischen Entfaltungsübergang einen größeren Anteil an der CD-Signaländerung bei 230 nm. Bei Wellenlängen unterhalb von 215 nm ist keine weitere Änderung im CD-Signal zu beobachten, so dass in diesem Wellenlängenbereich spezifisch Konformationsänderungen der N2-Domäne

verfolgt werden können. Die Differenzspektren von G3P* in den verschiedenen Faltungszuständen zeigen das erwartete Minimum bei 197 nm (Abbildung 3-15b).

Um den aktivierten Zustand von G3P* mit dissoziierten Domänen zu populieren und charakterisieren zu können, wurde WT-G3P* zunächst 10 min bei 53 °C inkubiert und damit dessen N2-Domäne entfaltet. Anschließend wurde das Protein durch zehnfache Verdünnung in kaltem Puffer auf 25 °C abgekühlt, 3 min rückgefaltet und das CD-Spektrum bei 10 °C gemessen. Nach dieser Zeit ist der globuläre Teil von N2 (N2') gefaltet, die Domänen liegen aber weiterhin dissoziiert vor (Martin & Schmid, 2003b). Die Prolinisomerisierung verläuft bei 10 °C mit einer Zeitkonstante von mehr als 10000 s, so dass während der Messung des CD-Spektrums kaum eine Domänenassoziation stattfindet. Dadurch war es möglich, dieses Faltungsintermediat, das nur kinetisch, jedoch nicht im Gleichgewicht populiert werden kann, zu charakterisieren. Das CD-Spektrum des Intermediats entspricht oberhalb von 220 nm dem des nativen Proteins, im Bereich von 190 bis 220 nm weicht es jedoch vom Spektrum des nativen Proteins ab. Das zugehörige Differenzspektrum besitzt ein Minimum bei 197 nm, was auf einen geringen Anteil an entfalteter Struktur hindeutet. Aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass N2' nach 3 min bereits seine native Struktur besitzt. Der geringe Unterschied im CD-Signal zwischen vollständig nativem G3P* und kurz rückgefaltetem Protein ist demnach nicht auf eine Änderung innerhalb N2' zurückzuführen, sondern reflektiert vermutlich die Entfaltung der Gelenksubdomäne. Konsistent mit dieser Vermutung ist der geringe Beitrag der CD-Signaländerung, da die Gelenksubdomäne aus zwei Faltblattsträngen aufgebaut ist, und β -Faltblätter und β -Turns nur einen geringen Beitrag zum CD-Signal liefern. In einem Kontrollansatz wurde WT-G3P* nach der Entfaltung 6 h lang bei 25 °C rückgefaltet und anschließend das CD-Spektrum bei 10 °C gemessen. Das Spektrum dieses rückgefalteten Proteins ist mit dem des nativen G3P* identisch, d.h. die Entfaltung ist vollständig reversibel und der für das kurz rückgefaltete Protein beobachtete Effekt ist nicht auf Aggregation, sondern tatsächlich auf noch unstrukturierte Bereiche in G3P* zurückzuführen.

Die Faltungskinetik, die zur Bildung des nativen Proteins führt, wurde anhand der Änderung des CD-Signals bei 211 nm verfolgt (Abbildung 3-16). Die vorherige Entfaltung erfolgte thermisch durch Inkubation bei 53 °C. Von einer Entfaltung durch GdmCl wurde abgesehen, da Reste des Denaturierungsmittels im Rückfaltungsansatz das Signal-Rausch-Verhältnis bei 211 nm verschlechterten, und das CD-Signal unter den gewählten Messbedingungen ohnehin nur gering war.

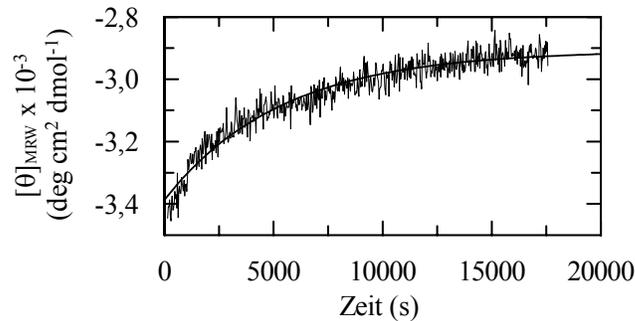


Abbildung 3-16: Kinetik der langsamen Domänenassoziation von G3P*. Die Faltung von 1 μM G3P* wurde anhand der Zunahme des CD-Signals bei 211 nm (Bandbreite 2 nm) verfolgt. Die Rückfaltung erfolgte nach fünfminütiger Entfaltung bei 53 °C durch zehnfache Verdünnung in temperiertem Puffer. Die Linie stellt den Angleich der experimentellen Daten an eine monoexponentielle Funktion mit einer Zeitkonstante von 5300 s dar. Die Messung wurde in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C und 1 cm Schichtdicke (Dämpfung 8 s) durchgeführt.

Die Rückfaltung verläuft in einer monoexponentiellen Reaktion mit einer Zeitkonstanten von 5300 s. Diese Zeitkonstante konnte in Wiederholungen des Experiments bestätigt werden und stimmt gut mit derjenigen der *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 überein ($\tau = 6200$ s). Die Isomerisierung ist also nicht nur eine lokale Reaktion an Pro213, sondern geht mit einer konformationellen Rückfaltungsreaktion und der Ausbildung von Sekundärstrukturelementen einher. Dabei handelt es sich um die Faltung der Gelenksubdomäne, da zu diesem Zeitpunkt alle konformationellen Faltungsreaktionen von N1 und N2' bereits abgeschlossen sind (Martin & Schmid, 2003b).

Die *trans*→*cis*-Isomerisierung führt somit sowohl zu einer Faltung der Gelenkregion zwischen den beiden Domänen als auch zu einer Inaktivierung der Phagen (3.1.1.3). Umgekehrt lässt sich vermuten, dass die Aktivierung des G3P für die Infektion nicht nur auf eine Isomerisierung von Pro213, sondern auch auf eine lokale Entfaltungsreaktion zurückzuführen ist. Dieser Entfaltungsschritt betrifft vermutlich die Gelenksubdomäne. Inwiefern andere Bereiche des G3P von dieser Entfaltung betroffen sind, insbesondere der globuläre N2'-Teil, ist unklar. Die stabilere N1-Domäne sollte größtenteils strukturiert vorliegen, da sie zum einen auch in isolierter Form nativ gefaltet ist, und zum anderen im Anschluss an die Aktivierung mit dem Rezeptor TolA-C interagiert.

3.1.2.2 Die Domänen dissoziation führt zur Destabilisierung der N2-Domäne

Die Entfaltung von N2 ist mit der Dissoziation der Domänen gekoppelt, wobei die Dissoziationsreaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Der globuläre Teil von N2 (N2', AS 102-205 + Tyr-Gln-Gly-(His)₆) besitzt nur eine geringe Stabilität und wird im nativen Protein durch die Wechselwirkung mit der N1-Domäne stabilisiert. Dabei bildet vor allem die Gelenksubdomäne zahlreiche Interaktionen mit N1 aus. Entsprechend erhöht sich der Mittelpunkt im thermischen Entfaltungsübergang von 35,2 °C für die isolierte N2'-

Domäne auf 48,1 °C für die N2-Domäne in G3P* (Abbildung 3-17). Im Folgenden wurde die thermische Stabilität von N2' im Volllängenprotein, jedoch in Abwesenheit der Wechselwirkungen mit N1 analysiert. Hierzu wurde die nicht-assoziierte Form von G3P* kinetisch populierte, indem G3P* zunächst bei 53 °C entfaltet und nach zehnfacher Verdünnung in kaltem Puffer 5 min bei 10 °C rückgefaltet wurde. Anschließend wurden die thermischen Entfaltungsübergänge anhand des CD-Signals bei 211 nm gemessen. Wie bereits zuvor erwähnt, verläuft die *trans*→*cis*-Isomerisierung bei niedrigen Temperaturen sehr langsam, so dass das Faltungsintermediat mit nicht-assoziierten Domänen langlebig ist. Abbildung 3-17 zeigt die Entfaltungsübergänge der N2-Domäne in isolierter Form, im nativen Protein bzw. im Intermediat mit vorgefalteten, aber noch nicht assoziierten Domänen. Die aus der Analyse der Übergänge erhaltenen Mittelpunkte sind in Tabelle 3-7 aufgeführt.

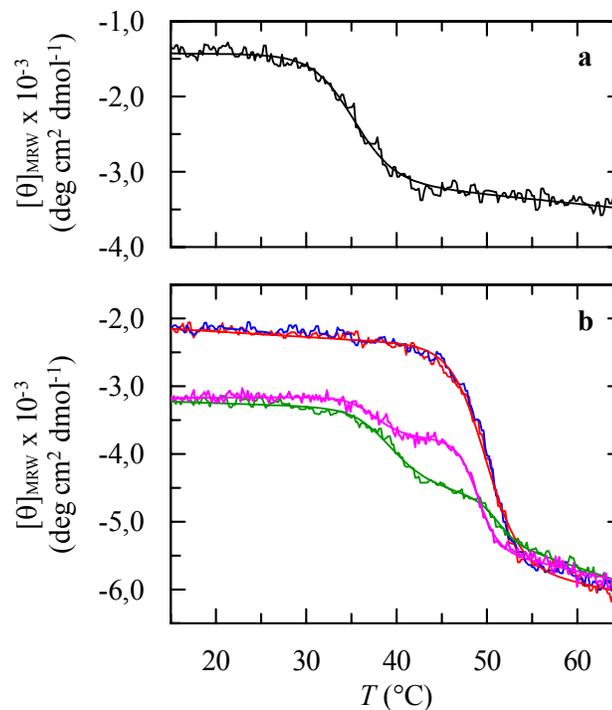


Abbildung 3-17: Konformationelle Destabilisierung von N2 durch Domänen dissoziation. (a) Thermische Entfaltung von 1 μM isolierter N2'-Domäne (—). (b) Thermische Entfaltung von 1 μM G3P* im nativen Zustand (—). Um die Stabilität von G3P* im aktiven, geöffneten Zustand mit dissoziierten Domänen zu bestimmen, wurden 10 μM Protein 5 min lang bei 53 $^{\circ}\text{C}$ entfaltet. Nach zehnfacher Verdünnung in vortemperiertem Puffer wurde der thermische Entfaltungsübergang mit einer Heizrate von 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (—) bzw. 1 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (—) gemessen. Als Kontrolle wurde der thermische Übergang des dissoziierten G3P* nach sechsstündiger Rückfaltung (bei 25 $^{\circ}\text{C}$) gemessen (—). Der Angleich an die experimentellen Daten erfolgte gemäß einem Zwei- bzw. einem Dreizustandsmodell. Sofern nicht anders angegeben, betrug die Heizrate 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Die Übergänge wurden anhand der Änderung des CD-Signals bei 211 nm (Bandbreite 2 nm) mit einer Schichtdicke von 1 cm und einer Dämpfung von 4 s in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, gemessen.

Das CD-Signal bei 211 nm stellt eine spezifische Sonde für die Entfaltung von N2 dar (Abbildung 3-15). Ausgehend von nativem G3P* verläuft die Entfaltung von N2 in einem einphasigen Übergang. Im Gegensatz dazu verläuft die Entfaltung von N2 im nicht-assoziierten G3P* als zweiphasiger Prozess, wobei das CD-Signal zu Beginn des Entfaltungsübergangs bereits deutlich niedriger ist. Der erste Übergang besitzt einen Schmelzpunkt von 38,8 °C, der zweite von 51,2 °C (Tabelle 3-7). Diese T_M -Werte stellen jedoch nur apparente Werte dar und können einen größeren Fehler aufweisen, da das Experiment nicht unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt wurde. Dennoch liefern sie Aussagen über die ungefähre Stabilität der N2-Domäne. Der erste Übergang besitzt einen ähnlichen Mittelpunkt wie N2' in isolierter Form ($T_M = 35,2$ °C) und repräsentiert vermutlich die Entfaltung von Molekülen mit noch dissoziierten Domänen. Der Mittelpunkt des zweiten Übergangs entspricht in etwa dem des nativen Proteins (51,2 °C im Vergleich zu 48,1 °C) und ist der Entfaltung von Molekülen zuzuordnen, die im Verlauf des Experiments bereits in den nativen Zustand falten konnten. Trifft diese Annahme zu, müsste der relative Anteil der beiden Phasen an der Gesamtamplitude des Übergangs von der relativen Zahl der G3P*-Moleküle mit dissoziierten bzw. assoziierten Domänen abhängen. Um dies zu überprüfen, wurde die Heizrate im Entfaltungsübergang auf 1 °C·min⁻¹ reduziert. Auch unter diesen Bedingungen konnte ein zweiphasiger Übergang mit Schmelzpunkten von 37,5 °C bzw. 48,9 °C beobachtet werden. Allerdings wies jetzt die zweite Phase die größere Amplitude auf, da das G3P* aufgrund der geringeren Heizrate länger Bedingungen ausgesetzt war, welche die Pro213-*trans*→*cis*-Isomerisierung und damit die Faltung in den nativen Zustand mit assoziierten Domänen ermöglichten.

Wird das Intermediat mit dissoziierten Domänen vor der thermischen Entfaltung 6 h lang bei 25 °C zurückgefaltet, ist der Übergang erneut einphasig und stimmt mit dem des nativen Proteins überein. Außerdem beginnt der Übergang bei der gleichen Elliptizität wie der des nativen G3P*. Das bedeutet einerseits, dass die initiale Entfaltung bei 53 °C vollständig reversibel verläuft, andererseits wird damit auch bestätigt, dass die Abnahme der Elliptizität bei dieser Wellenlänge tatsächlich auf die Entfaltung der Gelenkregion zurückzuführen ist.

Im Intermediat mit dissoziierten Domänen gehen durch die Entfaltung der Gelenkregion und die Isomerisierung des Pro213 in die nicht-native *trans*-Form zahlreiche stabilisierende Wechselwirkungen verloren, so dass die N2-Domäne in diesem Zustand eine ähnliche Stabilität besitzt wie in isolierter Form. Die Rückisomerisierung in die *cis*-Konformation und die damit gekoppelte Faltung der Gelenksubdomäne führen zur Domänenassoziation und aufgrund der Ausbildung von Wechselwirkungen zwischen N1 und der Gelenkregion zur Stabilisierung der N2-Domäne.

Tabelle 3-7: Stabilitätsdaten aus der thermischen Entfaltung für G3P* im nativen bzw. geöffneten Zustand.

	Heizrate (°C·min ⁻¹)	T_{M1} (°C)	T_{M2} (°C)
N2' (isoliert)	5	35,2	
WT-G3P* (nativ)	5		48,1
WT-G3P* (geöffnet)	5	38,8	51,2
WT-G3P* (geöffnet)	1	37,5	48,9

Angegeben sind die Schmelztemperaturen T_M der isolierten N2'-Domäne und der N2-Domäne von G3P* im nativen bzw. geöffneten Zustand bei der jeweiligen Heizrate. Die thermischen Entfaltungsübergänge wurden anhand der Änderung des CD-Signals bei 211 nm verfolgt und sind in Abbildung 3-17 dargestellt. Für G3P* im geöffneten Zustand erfolgte die Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell, für natives G3P* und die isolierte N2-Domäne gemäß einem Zweizustandsmodell. Da bei den vorliegenden experimentellen Bedingungen kein Gleichgewicht vorliegt, stellen die T_M -Werte nur apparente Werte dar; eine Angabe thermodynamischer Parameter ist deshalb nicht möglich.

Die konformationelle Destabilisierung der N2-Domäne durch die Domänen dissoziation erniedrigt nicht nur den Schmelzpunkt von N2 im thermischen Übergang, sondern führt auch dazu, dass G3P* proteolytisch durch Chymotrypsin abgebaut werden kann. Chymotrypsin spaltet nach aromatischen und großen hydrophoben Aminosäuren, die in gefalteten Proteinen meist im Inneren verborgen sind. Bei Entfaltung werden die Reste für die Protease zugänglich, so dass eine Spaltung der Peptidbindungen erfolgen kann. Um die Entfaltung der Gelenkregion und damit die Destabilisierung von N2 nachweisen zu können, musste die Proteolyse bei 37 °C durchgeführt. Innerhalb der Gelenkregion von G3P* ist keine Schnittstelle für Chymotrypsin vorhanden, d.h. im Protein mit gefalteten Domänen N1 und N2', aber entfalteter Gelenkregion kann keine Spaltung detektiert werden. Erfolgt die Proteolyse jedoch bei einer Temperatur (z.B. 37 °C), bei der N2' in isolierter Form bereits entfaltet vorliegt, sollte im Intermediat mit dissoziierten Domänen eine Spaltung innerhalb der N2'-Domäne erfolgen, da diese durch den Wegfall der Interdomänenwechselwirkungen destabilisiert ist. Der aktivierte Zustand mit dissoziierten Domänen wurde diesmal jedoch nicht durch Entfaltung und kurzzeitige Rückfaltung populiert, sondern durch Bindung an TolA-C. Wie später unter 3.3.3 gezeigt, liegt ein sehr geringer Prozentsatz von WT-G3P* in dissoziierter Form vor und kann daher an TolA-C binden. Setzt man einen hohen Überschuss an TolA-C ein, wird das Gleichgewicht zwischen geschlossenen und offenen G3P*-Molekülen durch die Bindung an TolA-C auf die Seite des offenen Zustands verschoben. Abbildung 3-18 zeigt die Proteolyse von N1, N2 bzw. G3P* in Abwesenheit bzw. Gegenwart von TolA-C, wobei die Ansätze jeweils 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 5 min durch Chymotrypsin verdaut wurden.

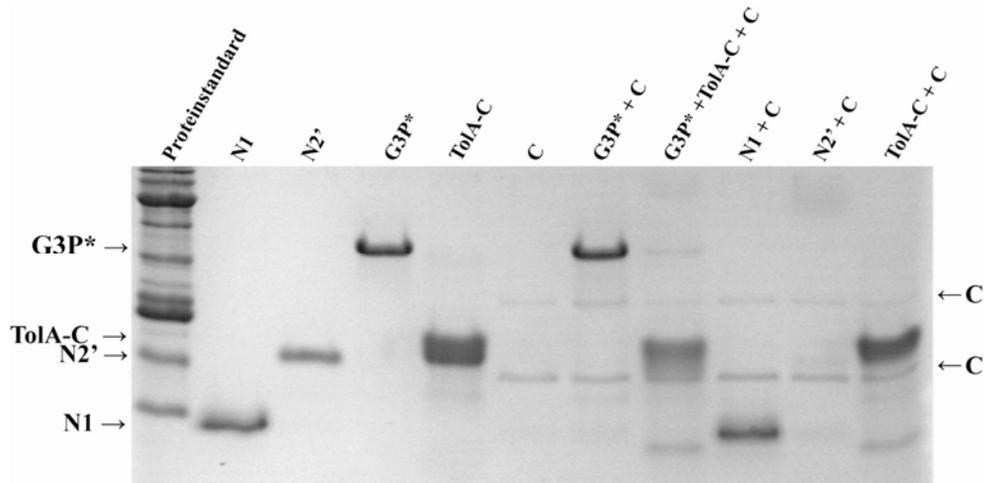


Abbildung 3-18: Proteolytische Spaltung von G3P* in Abwesenheit bzw. Gegenwart von TolaA-C. Die isolierten Domänen N1 und N2', WT-G3P* (je 10 μ M) und TolaA-C (40 μ M) wurden 30 min lang bei 37 °C inkubiert. Sofern angegeben, wurde Chymotrypsin (C, Endkonzentration: 2,5 μ M) zugegeben. Die Ansätze wurden weitere 5 min bei 37 °C inkubiert und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Schägger & von Jagow, 1987) analysiert.

In Abwesenheit von TolaA-C ist die native Form von G3P* resistent gegenüber proteolytischem Abbau, und die Gel-Banden der Ansätze mit bzw. ohne Chymotrypsin zeigen die gleiche Intensität (vgl. Bahnen G3P* und G3P* + C). In Gegenwart von TolaA-C wird G3P* jedoch nahezu vollständig abgebaut (vgl. Bahnen G3P* + C und G3P* + TolaA-C + C), d.h. durch die Bindung an TolaA-C kann tatsächlich eine Domänen dissoziation in G3P* herbeigeführt werden. Bei 37 °C liegt N2' in isolierter Form bereits entfaltet vor (Tabelle 3-7) und wird deshalb durch Chymotrypsin abgebaut (vgl. Bahnen N2' und N2' + C). Entsprechend wird N2 in G3P* durch die Dissoziation der Domänen und den damit verbundenen Verlust der Interdomänenwechselwirkungen destabilisiert und liegt im Ansatz mit TolaA-C bei 37 °C bereits entfaltet vor. Folglich kann es durch Chymotrypsin abgebaut werden, und im Ansatz mit TolaA-C und Chymotrypsin ist nur noch eine schwache Bande des Volllängenproteins G3P* zu erkennen. Hier konnte keine Bande gefunden werden, die der isolierten N1-Domäne entspricht, obwohl die isolierte N1-Domäne nicht durch Chymotrypsin verdaut wird und die Banden der N1-Domäne mit bzw. ohne Protease jeweils die gleiche Intensität aufweisen (vgl. Bahnen N1 und N1 + C). Durch die Proteolyse von G3P* entsteht ein Produkt, das zusätzlich zur N1-Domäne (AS 1-68) noch Reste der Gelenkregion enthält, da sich im glycinreichen *Linker* zwischen N1 und N2' keine Schnittstelle für Chymotrypsin befindet. Die erste Schnittstelle außerhalb von N1 ist an Position 110, so dass ein wesentlich größeres Spaltprodukt entsteht, das im Gel auf Höhe der TolaA-C-Bande läuft. TolaA-C selbst wird zu einem geringen Prozentsatz durch Chymotrypsin angegriffen, obwohl es im thermischen Entfaltungsübergang einen Schmelzpunkt von 71,2 °C besitzt (Abbildung 3-25) und bei 37 °C noch gefaltet vorliegen sollte. Bei Inkubation mit Chymotrypsin entsteht eine zusätzliche Bande mit einem Molekulargewicht kleiner als 10 kDa. Die Komplexbildung mit

N1 führt zu einer Umstrukturierung von TolA-C (Deprez *et al.*, 2005). Dadurch könnte eine Schnittstelle für die Protease zugänglich werden, was die geringere Intensität der TolA-C-Bande im Ansatz mit G3P* und Chymotrypsin erklären würde (vgl. Bahnen G3P* + TolA-C + C und TolA-C + C). Dieser Abbau von TolA-C durch die Protease ist aber nicht störend, da TolA-C lediglich dazu verwendet wird, eine Öffnung der Domänen in G3P* zu induzieren. Die Bindung von TolA-C an G3P* führt jedenfalls zu einer Destabilisierung und damit zum Verlust der Proteaseresistenz des G3P*. Dies ist auf die Entfaltung von N2 bei 37 °C zurückzuführen, da N1 unter den gegebenen Bedingungen gefaltet vorliegt und in isolierter Form nicht abgebaut wird.

Die Ergebnisse des proteolytischen Abbaus bestätigen die Ergebnisse aus der thermischen Denaturierung. Die Entfaltung der Gelenkregion und die damit einhergehende Domänen dissoziation destabilisieren die N2-Domäne. Dies wird dadurch deutlich, dass die isolierte N2'-Domäne einen um 13 °C niedrigeren Schmelzpunkt besitzt als im nativen Protein. Im Rückfaltungsintermediat mit noch nicht assoziierten Domänen ist die Stabilität von N2 dementsprechend erniedrigt, da die *trans*→*cis*-Isomerisierung und damit die Faltung in den nativen Zustand noch nicht vollständig abgelaufen ist. Der Übergangsmittelpunkt gleicht dem der isolierten N2-Domäne, und das Protein kann durch die Protease Chymotrypsin abgebaut werden. Eine ähnliche Destabilisierung von N2 wurde auch anhand der kinetischen Messungen detektiert. Durch Doppelmischexperimente wurde hier ein entsprechendes Intermediat mit gefalteten, aber noch dissoziierten Domänen populierte. Anhand der Chevron-Auftragung der apparenten Faltungsraten von N2 aus IIHY-G3P* in dieser nicht-assozierten Form konnte ein Mittelpunkt des Übergangs bei $[GdmCl]_{1/2} = 1,6$ M erhalten werden. Dieser Mittelpunkt ist damit um 0,9 M niedriger als der im Gleichgewicht erhaltene Mittelpunkt für die N2-Domäne im nativen Protein (3.1.1.2, Martin & Schmid, 2003b).

3.2 Interaktion des G3P filamentöser Phagen mit dem primären Rezeptor F-Pilin

Im Ruhezustand der Phagen wird die Bindungsstelle von G3P für den Rezeptor TolA durch die N2-Domäne blockiert (Chatellier *et al.*, 1999), und die Phagen sind deshalb nicht infektiös. *In vivo* wird die notwendige Dissoziation von N1 und N2 dadurch induziert, dass die Spitze des bakteriellen F-Pilus an die von N1 abgekehrte Außenseite der N2-Domäne bindet (Deng & Perham, 2002). Nach der Pilus-induzierten Dissoziation der G3P-Domänen kommt es zur spontanen Reassoziierung, deren Kinetik von der *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 in der Gelenksubdomäne bestimmt wird und die zur Inaktivierung der Phagen führt (3.1.1.3). Die Interaktion zwischen N1 und TolA kann somit nur innerhalb eines bestimmten, durch die Prolinisomerisierung vorgegebenen Zeitfensters erfolgen. Für die *in vitro*-Rückfaltung konnte gezeigt werden, dass die Gelenksubdomäne im Intermediat mit noch nicht assoziierten Domänen entfaltet vorliegt (3.1.2). Demnach ist die *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 keine lokale, auf das Prolin beschränkte Reaktion, sondern ist mit der Faltung der Gelenksubdomäne gekoppelt. Übertragen auf den Infektionsmechanismus könnte das bedeuten, dass die Bindung des F-Pilus an N2 zu einer Konformationsänderung in der Gelenksubdomäne mit *cis*-Pro213 führt. Durch die resultierende lokale Entfaltung würden die sterischen Einschränkungen wegfallen, die eine *cis*-Konformation an Pro213 erfordern, so dass es zur Isomerisierung in den stabileren *trans*-Zustand kommen könnte.

Um diese Hypothese zu testen, sollte die Wechselwirkung zwischen dem F-Pilus und der N2-Domäne des G3P charakterisiert werden. Desweiteren sollte das F-Pilin, die monomere Untereinheit des F-Pilus, isoliert gewonnen werden, um damit der Frage nachzugehen, ob G3P auch durch die Bindung an nur eine Pilusuntereinheit *in vitro* aktiviert werden kann oder ob dafür die komplexe Pilusstruktur benötigt wird. Darüber hinaus könnten mit Hilfe der gereinigten Komponenten G3P*, F-Pilin und TolA-C die ersten Infektionsschritte *in vitro* analysiert werden; insbesondere, wie die Bindung des F-Pilus an die Außenseite der N2-Domäne zur Entfaltung der Gelenksubdomäne, zur *cis*→*trans*-Isomerisierung des Pro213 und damit zur Aktivierung des G3P führt.

3.2.1 Inhibition der mit dem F-Pilus verbundenen Funktionen durch G3P*

3.2.1.1 Konstruktion eines *traA*-knock-out-Stamms

Ein *E. coli*-Stamm, in dem das für F-Pilin kodierende Gen *traA* ausgeschaltet ist, die restlichen, für die Ausbildung des F-Pilus essentiellen Gene aber noch vorhanden sind, ermöglichte es, die *in vivo*-Funktionen verschiedener F-Pilinvarianten zu untersuchen. Dieser Stamm war vor allem hilfreich, die zur Expression von isoliertem Pilin verwendeten Konstrukte auf ihre Funktion zu testen (3.2.2). Der *traA*-Knock-out wurde im *E. coli*-Stamm XL1Blue nach der Methode von Datsenko und Wanner (2000) durch homologe Rekombination mit Hilfe der Red-Rekombinase des Phagen λ hergestellt. Dabei wurde eine

Kanamycinkassette in das *traA*-Gen inseriert. Um sicherzustellen, dass die Insertion der Km-Kassette tatsächlich im *traA*-Gen und nicht an anderer Stelle im F-Plasmid oder Chromosom erfolgte, wurde der Stamm spezifisch auf den Verlust des F-Pilins hin getestet.

Üblicherweise wird ein *Knock-out* eines Gens anhand von Western Blots mit Hilfe von Antikörpern gegen das entsprechende Genprodukt verifiziert. Da jedoch keine Antikörper gegen F-Pilin zur Verfügung standen, musste auf andere Methoden zurückgegriffen werden, um den *Knock-out* nachzuweisen. Eine PCR mit Primern, die komplementär zu *traA*-flankierenden Sequenzen im F-Plasmid waren, lieferte für den *E. coli* XL1Blue $\Delta traA$ -Stamm ein deutlich größeres Produkt als für den WT-Stamm, so dass eine Insertion innerhalb dieses Sequenzbereichs stattgefunden haben muss. Ebenso konnte der $\Delta traA$ -Stamm in Abwesenheit von 50 mM CaCl_2 nicht durch filamentöse Phagen infiziert werden. Durch den *traA*-*Knock-out* können keine F-Pili ausgebildet werden, so dass keine Pilus-induzierte Aktivierung des G3P erfolgen kann. Die Infektion von F⁻-Zellen erfordert daher die spontane Öffnung der G3P-Domänen und die Gegenwart von mindestens 50 mM Ca^{2+} im Infektionsansatz (3.1.1.4). Die fehlende Infizierbarkeit des Stamms in Abwesenheit von CaCl_2 belegte, dass das für F-Pilin kodierende Gen ausgeschaltet war. Um zu überprüfen, ob auch andere Gene innerhalb des F-Plasmids vom *Knock-out* betroffen waren, wurde der $\Delta traA$ -Stamm mit dem Plasmid pTrc99A (*traA*) transformiert, welches *traA* unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren Promotors p_{tac} enthielt. Nach Induktion der Pilinexpression konnten die Zellen durch fd-Phagen infiziert werden, was darauf hindeutete, dass wieder F-Pili gebildet wurden und somit keine anderen Gene durch den *Knock-out* beeinträchtigt waren.

Als weiterer Nachweis für die Abwesenheit des F-Pilin wurde untersucht, ob der konstruierte $\Delta traA$ -Stamm mit dem F⁻-Stamm *E. coli* BL21 (DE3) pLysS konjugieren konnte. Das F-Plasmid kann nur durch Konjugation in die Rezipientenzelle übertragen werden, wenn F-Pili gebildet werden. Zur Analyse wurde ausgenutzt, dass das F-Plasmid auch ein Tetracyclinresistenzgen kodiert. Der F⁻-Stamm BL21 (DE3) pLysS besitzt keine Resistenz gegenüber Tetracyclin (Tet), jedoch kodiert das enthaltene Plasmid pLysS für die Chloramphenicolacetyltransferase. Nach Inkubation mit dem F⁺-Donorstamm können BL21-Zellen auf $\text{dYT}^{\text{Tet}^+\text{Cm}^-}$ -Nährböden deshalb nur wachsen, wenn eine Konjugation stattgefunden hat und die Zellen sowohl über Cm⁻ (kodiert durch pLysS) als auch über Tet-Resistenz (kodiert durch F-Plasmid) verfügen. Die F⁺-Donorzellen können auf diesem Selektionsmedium nicht wachsen, da sie keine Cm-Resistenz besitzen. Im Gegensatz zum Konjugationsansatz mit WT-*E. coli* XL1Blue konnten im Ansatz mit *E. coli* XL1Blue $\Delta traA$ keine BL21-Zellen gefunden werden, in die das F-Plasmid und damit die Tet-Resistenz übertragen wurde. Eine Konjugation war erneut möglich, nachdem der $\Delta traA$ -Stamm durch Transformation mit dem Plasmid pTrc99A (*traA*) kuriert und die Pilinexpression induziert wurde. In diesem Fall wurde zusätzlich auch die Km-Kassette übertragen, die zur Konstruktion des *Knock-outs* im F-Plasmid verwendet wurde, so dass die Rezipientenzellen nach der Konjugation Cm⁻, Tet⁺ und Km-Resistenz besaßen. Eine Nachweis der erfolgten

Konjugation war hier folglich auch durch Anzucht der Zellen auf dYT^{Km+Cm} -Nährboden möglich.

Durch homologe Rekombination konnte somit spezifisch das *traA*-Gen ausgeschaltet werden, das für die Pilusuntereinheit F-Pilin kodiert. Der entsprechende *knock-out*-Stamm konnte weder mit F⁻-Zellen konjugieren noch durch filamentöse Phagen infiziert werden - beides Eigenschaften, die mit der Ausbildung von F-Pili korrelieren. Wurde dieser Stamm jedoch durch Transformation mit pTrc99A (*traA*) kuriert, war sowohl eine Konjugation als auch eine Infektion durch fd-Phagen möglich. Dies belegt, dass bei der Konstruktion des *knock-out*-Stamms nur das gewünschte Gen ausgeschaltet wurde, jedoch keine weiteren Gene innerhalb des F-Plasmids oder der *E. coli*-DNA betroffen waren.

3.2.1.2 Inhibition der Konjugation durch G3P*

Zunächst sollte untersucht werden, ob isoliertes G3P* an den F-Pilus binden und so die mit dem F-Pilus verbundenen Funktionen, d.h. die Infektion durch filamentöse Phagen und die Konjugation mit F⁻-Zellen, unterbinden kann. Als Donorstamm für die Konjugationsexperimente wurde der *knock-out*-Stamm *E. coli* XL1Blue $\Delta traA$ verwendet, der mit dem Plasmid pTrc99A (*traA*) kuriert wurde. Dadurch wurde bei der Konjugation zusammen mit dem F-Plasmid auch die inserierte Km-Kassette in die Rezipientenzellen *E. coli* BL21 (DE3) pLysS übertragen, so dass diese Zellen nach erfolgter Konjugation selektiv auf dYT^{Km+Cm} -Nährboden kultiviert werden konnten. Bei Verwendung des WT-Stamms besaßen die Rezipientenzellen nach Konjugation dagegen Cm- und Tet-Resistenz und enthielten damit die gleichen Marker wie fd-infizierte *E. coli* XL1Blue-Zellen. Um eine Verunreinigung mit infizierten Zellen und damit falsch-positive Klone auf dYT^{Cm+Tet} -Nährmedium zu vermeiden, wurde daher auf den kurierten *knock-out*-Stamm zurückgegriffen.

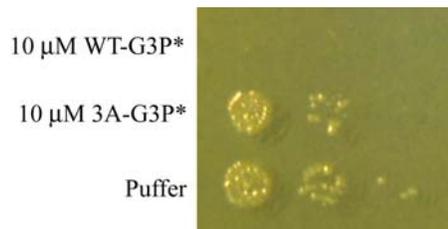


Abbildung 3-19: Inhibition der bakteriellen Konjugation durch WT-G3P* bzw. 3A-G3P*. Dargestellt sind die Verdünnungsreihen auf dYT^{Cm+Km} -Nährböden nach Konjugation der F⁻-Zellen *E. coli* XL1Blue $\Delta traA$ pTrc99A (*traA*) mit den F⁻-Zellen *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Die Cm-resistenten *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen erlangen durch Konjugation Km-Resistenz, so dass auf dYT^{Cm+Km} -Nährboden nur Zellen wachsen können, die durch Konjugation das F-Plasmid besitzen und damit Km-Resistenz aufweisen. Die Konjugation wurde in Gegenwart von 10 µM WT-G3P* bzw. 3A-G3P* durchgeführt. Als Kontrolle diente ein Ansatz in Gegenwart von Puffer.

Im *E. coli*-Stamm XL1Blue $\Delta traA$ pTrc99A (*traA*) wurde vor der Konjugation die Expression des F-Pilins induziert und anschließend mit *E. coli* BL21 (DE3) pLysS in Gegenwart von WT-G3P* bzw. einem entsprechenden Volumen Puffers geschüttelt. Danach wurden Verdünnungsreihen auf dYT^{Cm+Km} erstellt (Abbildung 3-19). Zellen der mit Puffer inkubierten Probe konnten auf dYT^{Cm+Km} wachsen, d.h. sie mussten durch Konjugation das F-Plasmid und damit auch die Km-Resistenz erhalten haben. Für die Probe, bei der die Konjugation in Gegenwart von WT-G3P* durchgeführt wurde, konnten dagegen keine Zellen detektiert werden, d.h. G3P* inhibiert die Konjugation, indem es an die Spitze des F-Pilus bindet und damit die Wechselwirkung zwischen Donor- und Rezipientenzelle verhindert. Falls diese Inhibition der Konjugation tatsächlich auf der Bindung von G3P* an den Pilus beruht, sollte eine G3P*-Variante, bei der die F-Pilus-Bindungsstelle mutiert wurde, die Konjugation nicht beeinflussen. Deng *et al.* (2002) konnten zeigen, dass die Mutationen W181A, F190A und F194A innerhalb der N2-Domäne von G3P* die Bindung der entsprechenden Phagen an immobilisierte F-Pili verhindert. Als Kontrolle wurde deshalb die Konjugation in Gegenwart der G3P*-Dreifachmutante W181A-F190A-F194A-G3P* (3A-G3P*) durchgeführt. In diesem Fall konnte kein Unterschied im Ansatz mit bzw. ohne 3A-G3P* festgestellt werden (Abbildung 3-19). Dies bedeutet, dass 3A-G3P* die Konjugation nicht inhibieren konnte, so dass das F-Plasmid mit der Km-Kassette transferiert wurde, und die Rezipientenzellen auf dYT^{Cm+Km} -Nährboden wachsen konnten. Die Inhibition der Konjugation durch WT-G3P* beruht folglich auf der spezifischen Bindung der N2-Domäne von WT-G3P* an die Spitze des F-Pilus.

3.2.1.3 Inhibition der Infektion durch G3P*

Die Konjugationsexperimente zeigten qualitativ, dass durch die Bindung von G3P* die Spitze des F-Pilus blockiert und damit die Konjugation unterbunden werden kann. Daraufhin sollte untersucht werden, ob die Infektion von *E. coli* XL1Blue durch fd-Phagen ebenfalls durch isoliertes G3P* inhibiert werden kann. Um definierte Infektionsbedingungen zu gewährleisten, erfolgte die Infektion in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0. Hierfür wurde *E. coli* XL1Blue in dYT -Medium bei 37 °C angezogen, die Zellen wurden pelletiert und in Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde aliquotiert, 5 min lang mit unterschiedlichen Konzentrationen an WT-G3P* inkubiert und anschließend mit WT-Phagen infiziert. Abbildung 3-20 zeigt die Infektion von *E. coli* XL1Blue durch filamentöse Phagen in Abhängigkeit von der G3P*-Konzentration.

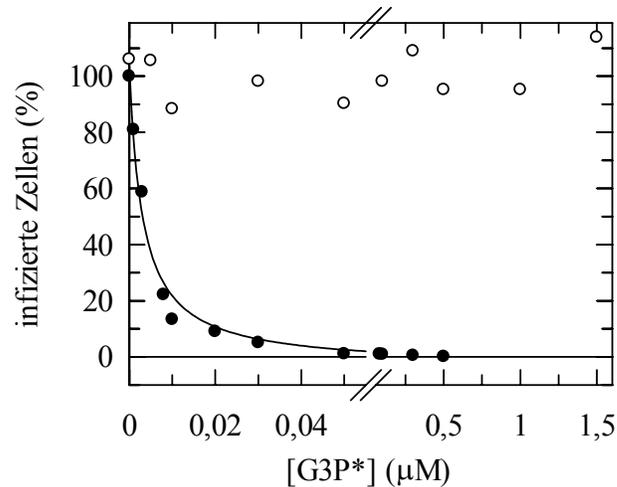


Abbildung 3-20: Inhibition der Infektion von *E. coli* durch WT-G3P* (●) bzw. 3A-G3P* (○). Eine Suspension von *E. coli* XL1Blue ($OD_{600} = 0,5$) wurde 5 min lang mit der entsprechenden Konzentration an G3P* inkubiert und anschließend mit WT-Phagen infiziert. Die Zahl der infizierten Zellen wurde anhand von Verdünnungsreihen auf dYT^{Cm}-Nährböden bestimmt. Um den Fehler zu minimieren, wurden pro G3P*-Konzentration jeweils drei parallele Infektionsansätze ausgezählt. Die verwendeten Phagen vermitteln Cm-Resistenz, so dass nur infizierte Zellen auf dYT^{Cm}-Medium wachsen können. Die Infektion wurde bei 25 °C in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, durchgeführt.

In Puffer konnten nur ca. 15% der Zellen durch WT-Phagen infiziert werden, wohingegen eine Zellsuspension der gleichen OD_{600} in dYT-Medium vollständig infiziert werden konnte. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass durch den Zentrifugationsschritt die F-Pili von der Zelloberfläche abgeschert wurden, so dass die entsprechenden Zellen schlechter infiziert werden konnten. Dies war jedoch nicht störend, da für das Inhibitionsexperiment Aliquots einer einzigen Zellsuspension verwendet wurden.

Mit steigender G3P*-Konzentration nahm die Zahl der infizierten Zellen ab, und der Angleich der experimentellen Daten lieferte einen apparenten IC_{50} -Wert von 3 nM G3P*. Das Experiment wurde mehrmals wiederholt, wobei IC_{50} -Werte zwischen 2 und 6 nM erhalten wurden. Diese IC_{50} -Werte geben keine exakten Inhibitionskonstanten an, sondern können nur als ungefähres Maß für die Affinität zwischen G3P und dem F-Pilus betrachtet werden. Zum einen liegt G3P im Phagen in drei bis fünf Kopien vor, wodurch die Affinität für den F-Pilus verändert sein könnte. Außerdem ist auch denkbar, dass die Phagenhülle die Pilusbindung von G3P im Vergleich zum isolierten G3P* erschwert. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass pro Zelle mehrere F-Pili ausgebildet werden. Um die Infektion einer Zelle durch fd-Phagen zu inhibieren, müssen alle F-Pili mit G3P* blockiert werden. Für die Aktivierung des Phagen und die anschließende Infektion ist jedoch die Interaktion der Phagen mit nur einem F-Pilus ausreichend. Die Affinität zwischen dem G3P und dem F-Pilus könnte durchaus höher sein als aus den Inhibitionsexperimenten hervorgeht.

Durch 3A-G3P* konnte die Infektion auch bei einer Konzentration von 15 µM nicht inhibiert werden. Dies zeigt, dass es sich um eine spezifische Wechselwirkung zwischen der N2-

Domäne und dem F-Pilus handelt. Die isolierte N1-Domäne konnte die Infektion ebenfalls nicht inhibieren (Daten nicht gezeigt). Dass N1 nicht mit dem F-Pilus wechselwirkt, ist zu erwarten, da sich die Pilus-Bindungsstelle in G3P auf der N2-Domäne befindet. Allerdings sollte die isolierte N1-Domäne an den zweiten Wechselwirkungspartner, die C-terminale Domäne von TolA, binden und dadurch die Infektion inhibieren können (3.3.2). Die Experimente zur Infektion von F⁻-Zellen zeigen, dass eine Wechselwirkung zwischen N1 und TolA-C grundsätzlich möglich ist. In diesem Fall erfolgt die Infektion nach spontaner Domänenöffnung im G3P und anschließender Interaktion von N1 mit TolA-C (3.1.1.4), und erfordert die Gegenwart von 50 mM CaCl₂. Jedoch konnte auch in Gegenwart von CaCl₂ keine Inhibition durch die isolierte N1-Domäne festgestellt werden. Die Ursache für diese fehlende Inhibition ist unklar. Möglicherweise sind die eingesetzten 10 μM N1 nicht ausreichend, um alle TolA-Moleküle in der Zellmembran zu blockieren, da TolA in weitaus höherer Konzentration in der Zellmembran vorhanden ist als F-Pili. Desweiteren ist möglich, dass N1 nicht permanent an TolA-C gebunden bleibt. Die Dissoziation des Komplexes zwischen isolierter N1-Domäne und TolA-C zeigt *in vitro* mit 0,48 s⁻¹ zwar eine relativ niedrige Rate (3.3.2), jedoch kann diese Rate *in vivo* durch die Zellstruktur deutlich erhöht sein.

Die Ergebnisse aus den Konjugations- und Inhibitionsexperimenten zeigen, dass isoliertes G3P* die mit dem F-Pilus korrelierten Funktionen spezifisch und extrem effizient inhibiert. G3P* bindet mit seiner N2-Domäne an die Spitze des F-Pilus und verhindert damit sowohl die Wechselwirkung des F-Pilus mit F⁻-Zellen während der Konjugation als auch die Bindung filamentöser Phagen. Die Infektionsexperimente in Gegenwart unterschiedlicher G3P*-Konzentrationen deuten auf eine hochaffine Interaktion zwischen G3P und dem F-Pilus hin.

3.2.2 Expression von monomerem F-Pilin

Die Wechselwirkung des F-Pilus mit der N2-Domäne führt zur Aktivierung des G3P und zur *cis*→*trans*-Isomerisierung an Pro213. Nach dem bisherigen Modell bleibt der Phage nach der initialen Interaktion noch am F-Pilus gebunden (Jacobson, 1972). Dieser wird durch einen unbekanntem Mechanismus zur Zelloberfläche zurückgezogen und bringt so den Phagen in die räumliche Nähe von TolA-C. Es sollte daher untersucht werden, ob die Aktivierung des G3P durch Bindung an den F-Pilus nur erfolgen kann, wenn dieser auf der Zelle präsentiert und nach Phagenbindung zurückgezogen wird, oder ob eine Aktivierung auch in *trans* durch isolierte F-Pili bzw. die isolierte Pilusuntereinheit, F-Pilin, erfolgen kann.

Zu diesem Zweck wurden zunächst F-Pili aus *E. coli* XL1Blue nach der Methode von Helmuth und Achtmann (1978) isoliert. Dabei wurden die F-Pili von der Zelle abgeschert, gewaschen, in PEG-Lösung gefällt und durch Zentrifugation pelletiert. Abschließend erfolgte eine Ultrazentrifugation im CsCl-Stufengradient. Die F-Pili wurden dialysiert und auf ihre biologische Aktivität untersucht, indem die Infektiosität von fd-Phagen gegenüber F⁻-Zellen

in Gegenwart bzw. Abwesenheit der gereinigten F-Pili bestimmt wurde. Wenn die isolierten F-Pili aktiv sind und an das G3P der Phagen auch in *trans* binden, könnte dies zur Domänen dissoziation im G3P führen und somit die Infektiosität der Phagen gegenüber F⁻-Zellen im Vergleich zum Kontrollansatz ohne F-Pili erhöhen.

Tatsächlich konnte für WT-Phagen eine fünf- bis zehnfache höhere Infektiosität beobachtet werden, wenn im Infektionsansatz isolierte F-Pili vorhanden waren. Ein Problem hierbei war jedoch, dass die Konzentration der F-Pili schlecht bestimmt werden konnte. Dazu trug auch bei, dass die F-Pili trotz der verschiedenen Zentrifugationsschritte und der Ultrazentrifugation im CsCl-Gradienten nicht ganz rein waren. Neben der aufwendigen Reinigung und der geringen Ausbeute war außerdem die Lagerung problematisch. Nach zwölfstündiger Lagerung bei 4 °C bzw. -20 °C konnten keine aktiven F-Pili mehr nachgewiesen werden, da diese stark zur Aggregation neigten. Die damit verbundene Lichtstreuung beeinträchtigt spektroskopische Untersuchungen, so dass im Folgenden die monomere Untereinheit isoliert exprimiert werden sollte, um den Infektionsmechanismus und die Bindung von G3P an F-Pilin *in vitro* analysieren zu können.

F-Pilin wird in *E. coli* als Vorläuferprotein mit 121 Aminosäuren, dem sogenannten Propilin, exprimiert. Dieses wird dann durch das Chaperon TraQ gebunden und in die Zellmembran inseriert, wo die N-terminalen 51 Aminosäuren durch die Peptidase LepB abgespalten werden. Das reife F-Pilin wird N-terminal durch das Protein TraX acetyliert und akkumuliert in der Cytoplasmamembran, von wo aus es den F-Pilus bildet.

Zur Expression von isoliertem F-Pilin wurden verschiedene Strategien verfolgt. Zunächst wurde versucht, das prozessierte Protein ohne Signalsequenz (AS 52-121 von Propilin) zu exprimieren. Zur Reinigung und Selektion des Volllängenproteins wurde dabei meist ein C-terminaler (His)₆-Tag über verschiedene *Linker*-Sequenzen an das Protein angefügt. Zudem wurden die Signalsequenzen aus G3P, β-Lactamase (bLA), DsbA oder OmpA N-terminal an F-Pilin fusioniert, um das Protein in das Periplasma exportieren zu können. Die Signalsequenz von DsbA führt dabei zum cotranslationalen, die anderen Signalsequenzen zum posttranslationalen Export des Proteins. Tabelle 3-8 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Konstrukte.

Tabelle 3-8: Konstrukte zur Expression von isoliertem F-Pilin bzw. verschiedener Fusionsproteine

Konstrukt	Beschreibung
Pilin-A ₃ H ₆	F-Pilin mit C-terminalem (Ala) ₃ -(His) ₆ -Tag
Pilin-GSSGH ₆	F-Pilin mit C-terminalem GSSG-(His) ₆ -Tag
Pilin-GGGH ₆	F-Pilin mit C-terminalem GGGSEGG-(His) ₆ -Tag
Pilin-SEGH ₆	F-Pilin mit C-terminalem SEGGTSEGGG-(His) ₆ -Tag
Pilin-GGG-Pilin-GSSGH ₆	zwei F-Pilin-Einheiten fusioniert über den AS-Linker GGGSEGGTSGAGGG und mit C-terminalem GSSG-(His) ₆ -Tag
H ₆ -GSSG-Pilin	F-Pilin mit N-terminalem (His) ₆ -GSSG-Tag

Pilin-GSSG-FLAG	F-Pilin mit C-terminalem GSSG-GDYKDDDDK-Tag
G3P-ss-Pilin- A ₃ H ₆	F-Pilin mit N-terminaler Signalsequenz aus G3P und C-terminalem (Ala) ₃ -(His) ₆ -Tag
OmpA-Pilin-GSSGH ₆	F-Pilin mit N-terminaler Signalsequenz aus OmpA und C-terminalem GSSG-(His) ₆ -Tag
bLA-ss-Pilin-GSSGH ₆	F-Pilin mit N-terminaler Signalsequenz aus β-Lactamase und C-terminalem GSSG-(His) ₆ -Tag
DsbA-ss-Pilin-GGGH ₆	F-Pilin mit N-terminaler Signalsequenz aus DsbA und C-terminalem GGGSEGG-(His) ₆ -Tag
Pilin-GSSGH ₆ + TraQ	Coexpresssion von F-Pilin mit C-terminalem GSSG-(His) ₆ -Tag und dem Chaperon TraQ
Propilin-GSSGH ₆ + TraQ	Coexpresssion von Propilin mit C-terminalem GSSG-(His) ₆ -Tag und dem Chaperon TraQ
Fusionsproteine	
H ₆ -trpE-M-Pilin(5M5L)	Fusionsprotein aus der trpE-Signalsequenz und F-Pilin (M9L, M41L, M43L, M44L, M65L) mit N-terminalem (His) ₆ -Tag; verknüpft über Met zur anschließenden BrCN-Spaltung
H ₆ -trpE-DP-Pilin	Fusionsprotein aus der trpE-Signalsequenz und F-Pilin mit N-terminalem (His) ₆ -Tag; verknüpft über Asp-Pro zur anschließenden Säurespaltung
KSI-Pilin-GSSG-H ₆	Fusionsprotein aus der Ketosteroidisomerase (KSI) und F-Pilin mit C-terminalem GSSG-(His) ₆ -Tag; verknüpft über Asp-Pro zur anschließenden Säurespaltung
SUMO-Pilin-GGGH ₆	Fusionsprotein aus SUMO und F-Pilin mit C-terminalem GGGSEGG-(His) ₆ -Tag
H ₆ -SUMO-Pilin	Fusionsprotein aus SUMO und F-Pilin mit N-terminalem (His) ₆ -Tag
GST-Pilin-GGGH ₆	Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase (GST) und F-Pilin mit C-terminalem GGGSEGG-(His) ₆ -Tag
NusA-Pilin-GGGH ₆	Fusionsprotein aus NusA und F-Pilin mit C-terminalem GGGSEGG-(His) ₆ -Tag
SlyD*-SlyD*-GGG-Pilin (HD) ₄ -H ₆	Fusionsprotein aus zwei <i>E. coli</i> SlyD*-Kassetten (AS 1-165) und F-Pilin mit C-terminalem (HD) ₄ -(His) ₆ -Tag (Scholz <i>et al.</i> , 2005)
FkpA-FkpA-Pilin-(HD) ₄ -H ₆	Fusionsprotein aus zwei <i>E. coli</i> FkpA-Kassetten (AS 26-270) und F-Pilin mit C-terminalem (HD) ₄ -(His) ₆ -Tag (Scholz <i>et al.</i> , 2005)
Tt-SlyD-Pilin-(HD) ₄ -H ₆	Fusionsprotein aus <i>Thermus thermophilus</i> SlyD (AS 1-149) und F-Pilin mit C-terminalem (HD) ₄ -(His) ₆ -Tag
Fusionsproteine mit MBP	
MBP-Pilin-A ₃ H ₆	Fusionsprotein aus MBP und F-Pilin mit C-terminalem (Ala) ₃ -(His) ₆ -Tag
MBP-Pilin-GSSGH ₆	Fusionsprotein aus MBP und F-Pilin mit C-terminalem GSSG-(His) ₆ -Tag
MBP-Pilin-GGGH ₆	Fusionsprotein aus MBP und F-Pilin mit C-terminalem GGGSEGG-(His) ₆ -Tag
H ₆ -GSSG-MBP-Pilin	Fusionsprotein aus MBP und F-Pilin mit N-terminalem (His) ₆ -GSSG-Tag
H ₆ -GSSG-MBP-Pilin-MBP	Fusion von F-Pilin zwischen zwei MBP-Einheiten mit N-terminalen (His) ₆ -GSSG-Tag
MBP-Pilin-Pilin-GSSGH ₆	Fusionsprotein aus MBP und zwei F-Pilin-Einheiten mit C-terminalem GSSG-(His) ₆ -Tag
H ₆ -GSSG-MBP	MBP mit N-terminalem (His) ₆ -GSSG-Tag

Legende zu Tabelle 3-8: Angegeben sind die Konstrukte zur Expression von monomerem F-Pilin. Die Expression der verschiedenen Pilinkonstrukte wurde in den Vektoren pET11a, pET28b, pBAD24N, pBlueskript IISK, pBlueskript IIKS, pTrc99A, pdsbA3, pTCLE und pET31b sowie in den *E. coli*-Stämmen XL1Blue, Rosetta, DH5 α , HM125, BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS untersucht. Zudem wurden verschiedene Fermentationstemperaturen und Nährmedien getestet (2.12.1). Zur Coexpression von F-Pilin bzw. Propilin mit TraQ wurde der Vektor pET-Duet1 verwendet. Die Expression der Fusionsproteine mit SUMO (Malakhov *et al.*, 2004), NusA (Davis *et al.*, 1999) und Glutathion-S-Transferase (Kaelin *et al.*, 1992) erfolgte in den Vektoren pETSUMOadapt, pET43.1a bzw. pGEX-5x-1 (10.1). Die Fusionsproteine mit *E. coli* FkpA, SlyD* (Scholz *et al.*, 2005) bzw. *Thermus thermophilus* SlyD wurden in pET24b erstellt. Die Expression der Fusionsproteine mit MBP (Maina *et al.*, 1988) erfolgte in den Vektoren pMALc2x bzw. pET11a.

Es wurde eine Vielzahl verschiedener Vektoren verwendet, um das klonierte Gen für die Expression unter die Kontrolle unterschiedlicher Promotoren zu stellen. Im pET11a-Vektor steht das Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors; in den Vektoren pBlueskript IIKS und IISK bzw. pTrc99A sind die jeweiligen p_{lac}- bzw. p_{tac}-Promotoren durch IPTG induzierbar; der p_{BAD}-Promotor im Vektor pBAD24N wird durch Arabinose induziert. Die Expression der jeweiligen F-Pilin-Konstrukte mit bzw. ohne Signalsequenz wurde in den *E. coli*-Stämmen BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, Rosetta, XL1Blue, DH5 α und HM125 (Meerman & Georgiou, 1994) untersucht und unterschiedliche Nährmedien (2.12.1) sowie verschiedene Fermentationstemperaturen (18 °C, 25 °C, 30 °C und 37 °C) getestet. Die Coexpression mit TraQ - dem Chaperon, das in *E. coli* an das Vorläuferprotein Propilin bindet, - erfolgte im Vektor pET-Duet1, wobei hierbei das prozessierte Protein bzw. Propilin jeweils mit C-terminalen (His)₆-Tag exprimiert werden sollte. Allerdings konnte für keines der aufgeführten Konstrukte eine Expression von isoliertem F-Pilin beobachtet werden.

Daraufhin wurde F-Pilin C-terminal an die *trpE*-Signalsequenz kloniert (Calderone *et al.*, 1996). Aufgrund ihres hohen Anteils an hydrophoben Aminosäuren führt diese Signalsequenz zur Bildung von *inclusion bodies* und ist nur in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Denaturierungsmittel löslich. Mit dieser Signalsequenz fusionierte Proteine können durch Reinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen und anschließender BrCN-Spaltung am C-terminalen Methionin der Signalsequenz gewonnen werden. Da F-Pilin selbst fünf Methionine besitzt, wurden diese zuvor zu Leucin mutiert, um eine Spaltung innerhalb des Proteins zu verhindern. Das erhaltene F-Pilin enthält deshalb die Mutationen: M9L, M41L, M43L, M44L und M65L (5M5L-F-Pilin). Nach der BrCN-Spaltung wurde das Protein in 5 M GdmCl gelöst und die Signalsequenz mit dem N-terminalen (His)₆-Tag durch Affinitätschromatographie abgetrennt. Für die Rückfaltung von 5M5L-F-Pilin wurden verschiedene Bedingungen untersucht. Parallel dazu wurde geprüft, ob diese 5M5L-Variante noch biologische Aktivität besitzt. Hierzu wurden Varianten von Propilin mit den jeweiligen Mutationen in das Plasmid pTrc99A kloniert, *E. coli* XL1Blue Δ *traA* damit transformiert, und die Infizierbarkeit dieser Stämme durch fd-Phagen nach Induktion der Propilinexpression bestimmt. Zellen mit der Mutation M41L konnten nicht

mehr infiziert werden, so dass 5M5L-Pilin, selbst nach erfolgreicher Rückfaltung, demnach *in vitro* keine biologische Funktion zeigen würde.

Aus diesem Grund wurde WT-F-Pilin an die *trpE*-Signalsequenz fusioniert, wobei diesmal die Abspaltung der Signalsequenz im sauren Milieu an einer Asp-Pro-Sequenz erfolgen sollte (Ryan *et al.*, 2003). Jedoch konnte in diesem Fall kein Protein überexprimiert werden. Ebenso konnte für eine C-terminale Fusion von WT-Pilin an eine Ketosteroidisomerase, die zur Bildung von *inclusion bodies* neigt und deshalb zur Reinigung von Peptiden eingesetzt wird (Kuliopulos *et al.*, 1994), keine Expression beobachtet werden. Hier war das Konstrukt ebenfalls so gewählt, dass die Isolierung des F-Pilins durch eine Säurespaltung an Asp-Pro möglich gewesen wäre.

Da die Expression von isoliertem F-Pilin im Cytoplasma sowie der Export ins Periplasma mit verschiedenen Signalsequenzen nicht möglich war, wurde versucht, Fusionsproteine zu erstellen, in denen F-Pilin gebildet wird und noch seine biologische Funktion besitzt (Tabelle 3-8). Die Fusionsproteine aus F-Pilin mit SUMO, NusA oder Glutathion-S-Transferase wurden in den verschiedenen *E. coli*-Stämmen jedoch nicht exprimiert, obwohl für die entsprechenden Proteine ohne Fusion mit F-Pilin jeweils eine deutliche Überexpression beobachtet werden konnte. Außerdem wurde F-Pilin C-terminal an je zwei *E. coli* SlyD*-(Aminosäuren 1-165 von SlyD) bzw. FkpA-Kassetten sowie an SlyD aus *Thermus thermophilus* fusioniert. SlyD und FkpA sind Prolylisomerasen, die zusätzlich Chaperonaktivität besitzen (Ramm & Plückthun, 2000; Ramm & Plückthun, 2001; Scholz *et al.*, 2006). Scholz *et al.* konnten zeigen, dass die Fusion mit *E. coli* SlyD* bzw. FkpA die Reinigung des Hüllproteins gp41 aus dem HI-Virus ermöglicht, indem die Löslichkeit dieses ansonsten sehr aggregationsanfälligen Proteins deutlich erhöht wird (Scholz *et al.*, 2005). Da auch für das gp41-Fusionsprotein ein Expressionstest im kleinen Maßstab mit anschließender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese keine eindeutige Überexpression zeigte (C. Scholz, persönliche Mitteilung), wurde je eine 1 l-Kultur der Expressionsstämme mit den F-Pilin-Fusionsproteinen angezogen und durch IPTG-Zugabe induziert. Die Zellen wurden in 8 M Harnstoff aufgeschlossen und das Lysat mit der Ni-NTA-Matrix inkubiert. Im anschließenden Elutionsschritt konnte jedoch kein F-Pilin-Fusionsprotein nachgewiesen werden.

Für das Konstrukt MBP-Pilin-A₃H₆ konnte erstmals eine Überexpression beobachtet werden. Das Protein wurde durch Affinitätschromatographie und anschließende Gelfiltrationschromatographie gereinigt, wobei die Ausbeute mit 4 mg pro 5 l Fermentationsansatz trotz der guten Überexpression sehr gering war. Dies lag daran, dass ein großer Teil des Fusionsproteins innerhalb des F-Pilins proteolytisch gespalten wurde, obwohl Proteaseinhibitor im Lysepuffer vorhanden war.

Um die Aktivität des gereinigten MBP-Pilin-A₃H₆ zu überprüfen, wurde der F-Stamm *E. coli* HB2156 mit WT-Phagen in Gegenwart von MBP-Pilin-A₃H₆ infiziert. Als Kontrollen dienten dabei Ansätze, die H₆-GSSG-MBP oder das entsprechende Volumen Puffer enthielten. Falls das F-Pilin im Fusionsprotein seine biologische Funktion besitzt, an Phagen binden und diese in *trans* aktivieren kann, sollten im Infektionsansatz mit MBP-Pilin-A₃H₆ mehr Phagen im

aktivierten Zustand mit dissoziierten Domänen vorliegen und damit eine höhere Infektiosität besitzen. Im Vergleich zum Kontrollansatz konnte jedoch keine erhöhte Zahl infizierter Zellen festgestellt werden. Mögliche Ursachen hierfür könnten sein, dass das F-Pilin im Fusionsprotein nicht gefaltet vorliegt, oder dass zwar eine Bindung an das G3P erfolgt, diese jedoch nicht zur Domänendissoziation im G3P führt. Desweiteren könnte im Fusionsprotein die Bindungsstelle für G3P durch das 43 kDa große MBP blockiert sein, oder der C-terminale (Ala)₃-(His)₆-Tag verhindert eine produktive Wechselwirkung mit G3P. Um den Einfluss des C-terminalen (His)₆-Tags auf die Bindung von G3P zu untersuchen, wurde Propilin mit der entsprechenden C-terminalen *Linker*-Sequenz in das Plasmid pTrc99A kloniert. Der F-Pilin-*knock-out*-Stamm *E. coli* XL1Blue $\Delta traA$ wurde mit dem Plasmid transformiert und die Infizierbarkeit der Zellen nach Induktion der F-Pilinexpression mit Zellen verglichen, die mit WT-Propilin kultiert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-9 gezeigt.

Tabelle 3-9: Vergleich der Infizierbarkeit von *E. coli* XL1Blue $\Delta traA$ -Stämmen mit verschiedenen F-Pilin-Konstrukten.

<i>E. coli</i> XL1Blue $\Delta traA$	Phagentiter (cfu·ml ⁻¹) (x10 ⁻⁷)
pTrc99A (Propilin)	300
pTrc99A (Propilin-A ₃ H ₆)	< 0,1
pTrc99A (Propilin-GSSGH ₆)	0,6
pTrc99A (Propilin-GGGH ₆)	4
pTrc99A (Propilin-SEGH ₆)	0,8
pTrc99A (Propilin-GSSG-FLAG)	< 0,1

Der F-Pilin-*knock-out*-Stamm *E. coli* XL1Blue $\Delta traA$ wurde mit verschiedenen plasmidkodierten F-Pilin-Konstrukten kultiert, und der Einfluss der C-terminalen *Linker*-Sequenz an F-Pilin auf die Infektion der jeweiligen Zellen durch fd-Phagen bestimmt. Die Expression von F-Pilin wurde durch IPTG-Zugabe induziert. Zellsuspensionen einer OD₆₀₀ = 1 wurden mit fd-Phagen infiziert und anschließend die Zahl infizierter Zellen durch Verdünnungsreihen auf dYT^{Cm}-Nährböden bestimmt. Die verwendeten Phagen vermitteln Cm-Resistenz, so dass nur infizierte Zellen auf dYT^{Cm}-Medium wachsen können.

Zellen, die mit dem Plasmid pTrc99A (Propilin-A₃H₆) kultiert wurden, konnten durch filamentöse Phagen nicht infiziert werden. Dies liegt möglicherweise daran, dass Propilin-A₃H₆ entweder gar nicht exprimiert wird oder nicht zum Pilus assemblieren kann. Weitere Ursachen für die fehlende Infektion könnten sein, dass der (Ala)₃-(His)₆-Tag die Bindung des G3P verhindert bzw. die Bindung in diesem Fall nicht zu einer Aktivierung des G3P führt.

Um diesen negativen Einfluss des C-terminalen (Ala)₃-(His)₆-Tags zu vermeiden, wurde im Folgenden der (His)₆-Tag an den N-Terminus verschoben und das entsprechende Fusionsprotein H₆-GSSG-MBP-Pilin exprimiert und gereinigt. Aufgrund des N-terminalen (His)₆-Tags binden auch verkürzte Proteine an die Ni-NTA-Matrix, bei denen das F-Pilin proteolytisch gespalten wurde. Tatsächlich zeigte das gereinigte Protein im SDS-Polyacrylamid-Gel die gleiche Größe wie das Kontrollprotein H₆-GSSG-MBP, d.h. im Verlauf der Reinigung wurde das C-terminal fusionierte F-Pilin vollständig proteolytisch

abgebaut (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt die Vermutung, dass die geringe Ausbeute bei der Reinigung von MBP-Pilin-A₃H₆ auf proteolytischen Abbau zurückzuführen ist. F-Pilin liegt im Fusionsprotein anscheinend größtenteils entfaltet oder fehlgefaltet vor und kann deshalb gut durch Proteasen abgebaut werden.

Um bei der Reinigung auf Fusionsprotein mit ungespaltenem F-Pilin selektieren zu können, muss ein C-terminaler Reinigungs-*Tag* vorhanden sein. Aus diesem Grund wurden verschiedene *Linker*-Sequenzen zwischen F-Pilin und dem (His)₆-*Tag* sowie der FLAG-*Tag* als alternativer Affinitäts-*Tag* (Chubet & Brizzard, 1996) an Propilin kloniert, und die Infizierbarkeit der verschiedenen Propilinvarianten im *knock-out*-Stamm bestimmt (Tabelle 3-9). Der *E. coli*-Stamm mit Propilin-GSSG-FLAG konnte nicht infiziert werden, während Varianten mit den *Linker*-Sequenzen GSSG, GGGSEGG und SEGGTSEGGG zwischen F-Pilin und (His)₆-*Tag* eine Infektion der entsprechenden *E. coli*-Stämme ermöglichten. Allerdings ist die Infizierbarkeit für Varianten mit GSSG-(His)₆-*Tag* oder SEGGTSEGGG-(His)₆-*Tag* ca. tausendfach bzw. für Varianten mit GGGSEGG-(His)₆-*Tag* ca. hundertfach geringer als für WT-Propilin. Da für diese *Linker*-Sequenzen eine Aktivierung von G3P und damit eine Infektion möglich war, wurden diese für die Fusion des F-Pilins mit MBP verwendet (Tabelle 3-8). Die entsprechenden Proteine konnten alle exprimiert werden, die Ausbeuten waren aufgrund des proteolytischen Abbaus jedoch gering. Die proteolytische Spaltung des F-Pilins konnte dabei weder durch niedrigere Wachstumstemperaturen noch durch die Anwesenheit eines Proteaseinhibitors oder die Reinigung bei 4 °C verhindert werden.

In einem weiteren Konstrukt wurde F-Pilin zwischen zwei MBP-Einheiten positioniert, um so den Abbau von F-Pilin möglichst gering zu halten. Als *Linker* zwischen F-Pilin und dem C-terminalen MBP wurde eine 14 Aminosäuren umfassende glycinreiche Sequenz (Abbildung 3-22a) verwendet, um eine ausreichende Flexibilität zu gewährleisten und die Bindung an G3P möglichst wenig beeinträchtigen. In Abbildung 3-21 ist die Reinigung dieses Fusionsproteins H₆-GSSG-MBP-Pilin-MBP mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dokumentiert, wobei auch in diesem Fall mehr als 75% des Fusionsproteins proteolytisch gespalten wurden. Nach Induktion durch IPTG-Zugabe ist eine Überexpression von H₆-GSSG-MBP-Pilin-MBP zu erkennen (Abbildung 3-21, vgl. Bahn 2 und 3). Im Eluat der Ni-Säule ist neben unspezifisch gebundenen Verunreinigungen bereits eine Bande starker Intensität bei einem Molekulargewicht von 45 kDa vorhanden, welche auf das Spaltprodukt H₆-GSSG-MBP zurückzuführen ist. Dieses und ähnliche Spaltprodukte, die aufgrund des N-terminalen His-*Tags* am MBP ebenfalls an die Ni-Matrix binden, können jedoch bei der anschließenden Gelfiltrationschromatographie aufgrund ihrer geringeren Größe (ca. 45 kDa) gut vom Volllängenprotein (ca. 95 kDa) abgetrennt werden. Das erste Elutionsmaximum der Gelfiltration enthält das Volllängenprotein (Bahn 7), das zweite das Spaltprodukt (Bahn 8).

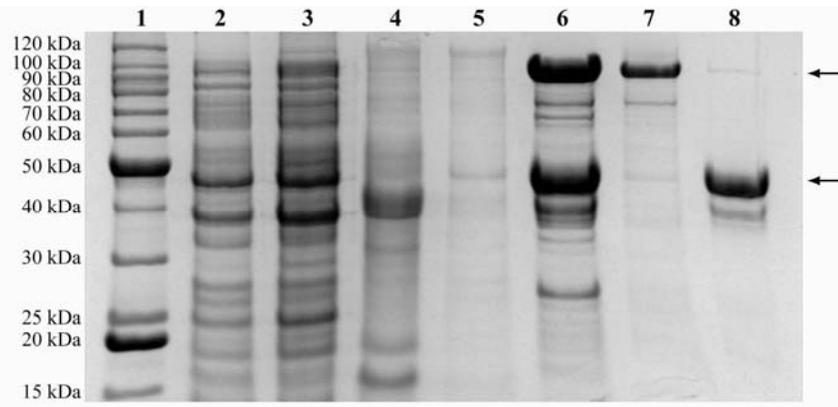


Abbildung 3-21: Verlauf der Reinigung von H_6 -GSSG-MBP-Pilin-MBP dokumentiert mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Gezeigt ist das Trenngel nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250. Die Pfeile geben die Position von H_6 -GSSG-MBP-Pilin-MBP und des Spaltprodukts H_6 -GSSG-MBP an. Bahn 1: Molekulargewichtsstandard (Bench Mark[™] Protein Ladder, Invitrogen); Bahn 2: Rohextrakt vor Induktion; Bahn 3: Rohextrakt nach Induktion mit 1 mM IPTG; Bahn 4: Pellet nach Zellaufschluss und Zentrifugation; Bahn 5: Durchbruch der Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Agarose-Matrix; Bahn 6: Eluat der Affinitätschromatographie; Bahn 7: Protein bei einem Elutionsvolumen von 125 ml der Gelfiltrationschromatographie; Bahn 8: Protein bei einem Elutionsvolumen von 165 ml der Gelfiltrationschromatographie.

Zur Analyse der Aktivität der Fusionsproteine MBP-Pilin-GSSG H_6 , MBP-Pilin-GGGH $_6$ und H_6 -GSSG-MBP-Pilin-MBP wurde getestet, ob die Anwesenheit der Proteine zur Domänen dissoziation in G3P und damit zur vermehrten Infektion von F^- -Zellen durch fd-Phagen führt. Im Kontrollansatz war jeweils die entsprechende Konzentration an H_6 -GSSG-MBP bzw. das entsprechende Volumen Puffer vorhanden. Für alle Konstrukte konnte eine vermehrte Infektion von F^- -Zellen beobachtet werden, wobei die Infektiosität um einen Faktor 10 bis 50 erhöht war. Abbildung 3-22 zeigt beispielhaft die Infektion von F^- -Zellen durch fd-Phagen in Anwesenheit von H_6 -GSSG-MBP-Pilin-MBP.

Der aktivierende Effekt der verschiedenen Konstrukte lässt sich allerdings nur schlecht vergleichen. Zum einen kann die tatsächliche Konzentration der Fusionsproteine stark abweichen, da die Konzentration der MBP-Pilin-Konstrukte aufgrund der Verunreinigungen nur schlecht quantifiziert werden konnte. Zum anderen kann nicht abgeschätzt werden, welcher Anteil des Fusionsproteins in der gefalteten aktiven Konformation vorlag. In der Tat variierte der aktivierende Effekt eines Konstrukts für verschiedene Reinigungsansätze.

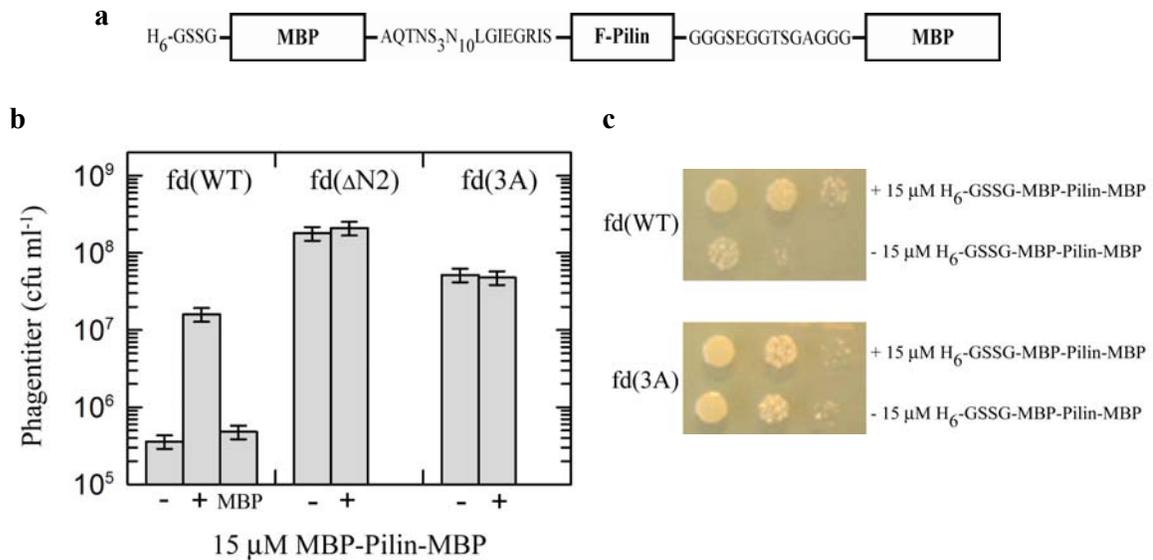


Abbildung 3-22: Aktivierung von G3P durch monomeres F-Pilin. (a) Schematische Darstellung des Fusionsproteins H_6 -GSSG-MBP-Pilin-MBP, in dem F-Pilin zwischen zwei MBP-Einheiten positioniert ist. Die jeweiligen *Linker*-Sequenzen sowie der N-terminale $(His)_6$ -Tag sind angegeben. (b) Gezeigt ist die Infektiosität von WT-Phagen (fd(WT)) gegenüber den F^- -Zellen *E. coli* HB2156 (angegeben als Phagentiter in $cfu \cdot ml^{-1}$) in Abwesenheit bzw. Gegenwart von $15 \mu M$ H_6 -GSSG-MBP-Pilin-MBP bzw. in Gegenwart von $30 \mu M$ H_6 -GSSG-MBP. Die Infektiositäten von Phagen ohne N2-Domane (fd($\Delta N2$)) und 3A-G3P-Phagen (fd(3A)) in Abwesenheit bzw. Gegenwart von $15 \mu M$ H_6 -GSSG-MBP-Pilin-MBP sind ebenfalls gezeigt. (c) Dargestellt sind Verdünnungsreihen der F^- -Zellen *E. coli* HB2156 auf dYT^{Cm} -Nährböden nach Infektion durch WT-Phagen (fd(WT)) bzw. 3A-G3P-Phagen (fd(3A)) in Abwesenheit bzw. Gegenwart von $15 \mu M$ H_6 -GSSG-MBP-Pilin-MBP. Die verwendeten Phagen vermitteln Cm-Resistenz, so dass nur infizierte Zellen auf dYT^{Cm} -Medium wachsen können.

Um zu bestätigen, dass die beobachtete Infektionserhöhung tatsächlich auf eine Aktivierung der Phagen durch Bindung an F-Pilin im Fusionsprotein zurückzuführen ist, wurde die Infektion von F^- -Zellen durch 3A-G3P-Phagen untersucht. Diese Phagen besitzen im G3P die Mutationen W181A, F190A und F194A in der F-Pilus-Bindungsstelle (3.2.1.2, Deng & Perham, 2002) und können nicht an den F-Pilus binden, d.h. G3P kann aufgrund der fehlenden Interaktion mit dem F-Pilus nicht aktiviert werden. Die Gegenwart des F-Pilin-Fusionsproteins sollte demnach keinen Effekt auf die Infektiosität der Phagen besitzen. In Abbildung 3-22 ist die Infektion von F^- -Zellen durch 3A-G3P-Phagen in Gegenwart bzw. Abwesenheit von H_6 -GSSG-MBP-Pilin-MBP gezeigt. Für beide Ansätze konnte die gleiche Zahl infizierter Zellen detektiert werden. Das bedeutet, dass die Anwesenheit eines F-Pilin-Fusionsproteins keinen Einfluss auf die Infektiosität von 3A-G3P-Phagen besitzt. Jedoch wurden in beiden Ansätzen deutlich mehr Zellen infiziert als durch WT-Phagen. Die Ursache dafür ist, dass die Infektiosität der 3A-G3P-Phagen gegenüber F^- -Zellen aufgrund der geringeren Stabilität von 3A-G3P erhöht ist, worauf unter 3.3.4 näher eingegangen wird.

Phagen, in denen die N2-Domäne deletiert wurde (fd(Δ N2)), können ebenfalls nicht durch Pilusbindung aktiviert werden. Die Anwesenheit des Fusionsproteins zeigte demnach keinen Effekt auf die Infektiosität dieser Phagen. Die für WT-Phagen beobachtete Infektionserhöhung beruht somit auf einer spezifischen Wechselwirkung zwischen dem G3P im Phagen und dem F-Pilin im Fusionsprotein mit MBP.

Aufgrund der fehlenden N2-Domäne ist die TolA-Bindungsstelle in fd(Δ N2)-Phagen permanent zugänglich, was die ca. 700-fach höhere Infektiosität dieser Phagen im Vergleich zum WT-Phagen erklärt. Die Phagen sind somit dauerhaft aktiviert und stellen ein Maß für den unter diesen Bedingungen maximal erreichbaren Phagentiter dar. Die Erhöhung der Infektiosität von WT-Phagen um den Faktor 50 ist somit im Vergleich zu der ca. tausendfachen Erhöhung bei Entfaltung der Phagen durch GdmCl (3.1.1.4) oder bei Deletion der N2-Domäne in fd(Δ N2)-Phagen relativ niedrig. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass das F-Pilin im Fusionsprotein, wie zuvor erwähnt, größtenteils entfaltet vorliegt, wodurch auch die starke Proteasesensitivität und die je nach Reinigung variierende Aktivität zu erklären wäre. Zudem ist denkbar, dass die Bindungsstelle im Fusionsprotein nicht vollständig zugänglich ist und der C-terminale *Linker* bzw. die C-terminale MBP-Kassette die G3P-Bindung beeinflusst. Die *Linker*-Sequenz ist für die Aktivität von F-Pilin entscheidend, so dass Stämme, die F-Pilin mit unterschiedlichen C-terminalen *Linker*-Sequenzen exprimieren, unterschiedlich gut infiziert werden konnten (Tabelle 3-9). Eventuell liegt monomeres F-Pilin auch in einer anderen Konformation vor als im F-Pilus, was zu einer weiteren Verringerung der Aktivität führen könnte. Unklar ist zudem, ob G3P im Verlauf der Infektion an nur eine Pilusuntereinheit oder an mehrere Untereinheiten gleichzeitig bindet. Eine multivalente Bindung mit dem F-Pilus könnte also ebenfalls die moderate Infektionserhöhung durch das Fusionsprotein erklären.

Neben der Aktivierung der Phagen *in vivo* wurde versucht, die Bindung von G3P an die MBP-Fusionsproteine *in vitro* zu charakterisieren. Hierfür wurde zunächst die Retardation des Komplexes aus G3P* und MBP-Pilin-GSSGH₆ in einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese im Vergleich zum Laufverhalten der einzelnen Komponenten untersucht (Goldenberg, 1997). Außerdem sollte versucht werden, die Komplexbildung durch *Pull-Down*-Experimente mit WT-G3P* ohne C-terminalen (His)₆-Tag und Ni-NTA-immobilisiertem MBP-Pilin-GSSGH₆ oder durch Quervernetzung der beiden Komponenten durch Bi(sulfosuccinimidyl)-suberat (Mattson *et al.*, 1993) nachzuweisen. Allerdings konnte keine Komplexbildung detektiert werden. Ferner wurde versucht, die Bildung des G3P*-F-Pilin-Komplexes fluoreszenzspektroskopisch zu untersuchen. Hierfür wurde die mit dem thiolreaktiven Fluoreszenzfarbstoff AEDANS markierte Variante S128C-G3P* (R. Jakob, Universität Bayreuth) verwendet. Der Farbstoff AEDANS ist dabei an der Außenseite der N2-Domäne in der Nähe der F-Pilusbindungsstelle lokalisiert, so dass es möglich sein sollte, die Bindung an F-Pilin durch eine Änderung der AEDANS-Fluoreszenz zu verfolgen. Allerdings konnte auch hier keine Komplexbildung beobachtet werden.

Eine spezifische Bindung des G3P an F-Pilin konnte also nur durch die vermehrte Infektion von F⁻-Zellen nachgewiesen werden. Der Vorteil der Infektion liegt in der hohen Sensitivität des Testsystems und der geringen Konzentration der eingesetzten Phagen ($\sim 10^{-12}$ M), so dass bereits ein kleiner Prozentsatz an aktivem F-Pilin zu einer signifikanten Infektionserhöhung führen kann.

Um den Infektionsmechanismus und das Zusammenspiel des G3P mit den beiden Rezeptoren F-Pilin und TolA-C besser aufklären zu können, wäre es vorteilhaft, die Bindung des G3P an F-Pilin auch *in vitro* untersuchen zu können. Hierfür ist lösliches F-Pilin in ausreichend hoher Konzentration und mit hoher Aktivität unabdingbar. Wahrscheinlich erschwert die hohe Hydrophobizität des F-Pilins die Expression des monomeren Proteins. Im F-Pilus werden die einzelnen Proteinuntereinheiten ausschließlich durch hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten. Während diese hydrophoben Wechselwirkungen im F-Pilus also zur Stabilität der Pilusstruktur beitragen, sind sie für das isolierte Protein vermutlich problematisch, da in diesem Fall zu viele hydrophobe Bereiche exponiert vorliegen, die das Protein aggregationsanfällig und proteasesensitiv machen.

Für weitere Experimente müsste die Reinigung der MBP-Fusionsproteine optimiert werden bzw. müssten neue Fusionsproteine erstellt werden, welche die hydrophoben Bereiche des F-Pilins besser schützen, ohne dabei zu einem Verlust der Funktion zu führen. Desweiteren könnte man versuchen, ein Fusionsprotein mit dem *trpE*-Leader zu erstellen, in dem eine Säurespaltung der Asp-Pro-Peptidbindung erfolgt. Die Tatsache, dass das inaktive 5M5L-F-Pilin als Fusionsprotein mit der *trpE*-Signalsequenz exprimiert werden konnte, das WT-Protein jedoch nicht, könnte darauf hinweisen, dass eine destabilisierte Variante des F-Pilins exprimiert werden kann. Das F-Pilin sollte daher eine destabilisierende Mutation enthalten, die eine Expression des Fusionsproteins in *inclusion bodies* sowie eine Rückfaltung des F-Pilins nach erfolgter Spaltung ermöglicht, ohne dabei die Bindung von G3P zu verhindern. Zudem könnte man versuchen, durch *in vivo*-Selektion eine lösliche F-Pilinvariante zu erhalten. Das Selektionssystem von Maxwell *et al.* beruht darauf, dass das zu selektierende Protein an die Chloramphenicolacetyltransferase fusioniert wird (Maxwell *et al.*, 1999). Eine Aggregation des Zielproteins führt damit auch zur Aggregation der Chloramphenicolacetyltransferase und zum Verlust der Cm-Resistenz. Bei Einbau einer Bibliothek des gewünschten Proteins können so durch wiederholte Inkubation in Cm-haltigen Nährmedium lösliche Varianten gefunden werden. Es bleibt zu untersuchen, inwiefern diese Methode zur Selektion löslicher F-Pilinvarianten eingesetzt werden kann, ohne dass diese dabei ihre Aktivität verlieren.

3.3 Interaktion des G3P filamentöser Phagen mit dem Rezeptor TolA

Die Interaktion mit dem bakteriellen F-Pilus führt zur Domänendissoziation in G3P und ermöglicht so die Interaktion des Phagen mit dem Rezeptor TolA-C in der Zellmembran. Diese Bindung an TolA ist nur durch G3P mit dissoziierten Domänen möglich, da im Ruhezustand die TolA-Bindungsstelle auf N1 durch die N2-Domäne blockiert ist. Die Interaktion zwischen dem Rezeptor TolA-C und N1 sollte für die isolierte N1-Domäne und für G3P* charakterisiert werden. Um diese Wechselwirkung fluoreszenzspektroskopisch mittels Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) verfolgen zu können, wurde TolA-C mit dem Fluoreszenzfarbstoff AEDANS markiert. Hierzu wurde TolA-C (AS 295 - 421) C-terminal mit einem zusätzlichen Cystein versehen, das mit dem thiolreaktiven Farbstoff reagieren kann. Um die Reinigung der isolierten Domäne zu erleichtern, wurde zusätzlich ein (Ala)₃-(His)₆-Tag angehängt, so dass das Konstrukt TolA-C₂₉₅₋₄₂₁-CA₃H₆ erhalten wurde.

3.3.1 Die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff AEDANS hat keinen Einfluss auf die Stabilität von TolA-C

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Markierung von TolA-C mit dem Fluoreszenzfarbstoff AEDANS die Stabilität und den Faltungsmechanismus des Proteins beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden die thermische und die Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung sowie die Entfaltungs- und Rückfaltungsraten des markierten Proteins TolA-C-AEDANS bestimmt und mit denen der unmarkierten Cys-Mutante verglichen. Um eine Dimerisierung des unmarkierten Proteins durch Bildung einer Disulfidbrücke zu verhindern, wurde das freie Cystein mit Iodacetat carboxymethyliert (TolA-C-Ac). Sowohl durch die Carboxymethylierung als auch die Markierung mit AEDANS wurde eine zusätzliche negative Ladung eingeführt, so dass sich TolA-C-Ac und TolA-C-AEDANS nicht in ihrer Nettoladung unterscheiden.

3.3.1.1 Thermodynamische Charakterisierung von TolA-C

Das CD-Signal im Fern-UV-Bereich gibt Auskunft über die Sekundärstruktur eines Proteins, so dass anhand von Fern-UV-CD-Spektren überprüft werden konnte, ob TolA-C-AEDANS und TolA-C-Ac strukturiert vorlagen. Neben den Spektren des nativen Proteins wurden auch jeweils die Spektren des denaturierten Proteins bei 85 °C gemessen. Aus dem Differenzspektrum wurde die Wellenlänge bestimmt, bei der die Entfaltung der beiden Proteine am besten verfolgt werden konnte. Abbildung 3-23 zeigt die CD-Spektren von TolA-C-Ac und TolA-C-AEDANS im nativen und denaturierten Zustand sowie die zugehörigen Differenzspektren. Sowohl TolA-C-Ac als auch TolA-C-AEDANS liegen bei 25 °C strukturiert vor. Die CD-Spektren der beiden nativen Proteine sind identisch, d.h. der

Fluoreszenzfarbstoff AEDANS liefert keinen Beitrag zum CD-Signal im Fern-UV-Bereich und verändert die Sekundärstruktur von TolA im Vergleich zu TolA-C-Ac nicht. Die Differenzspektren zeigen jeweils ein Maximum bei 222 nm, so dass die Entfaltung der beiden Proteine gut anhand der Änderung des CD-Signals bei dieser Wellenlänge verfolgt werden kann.

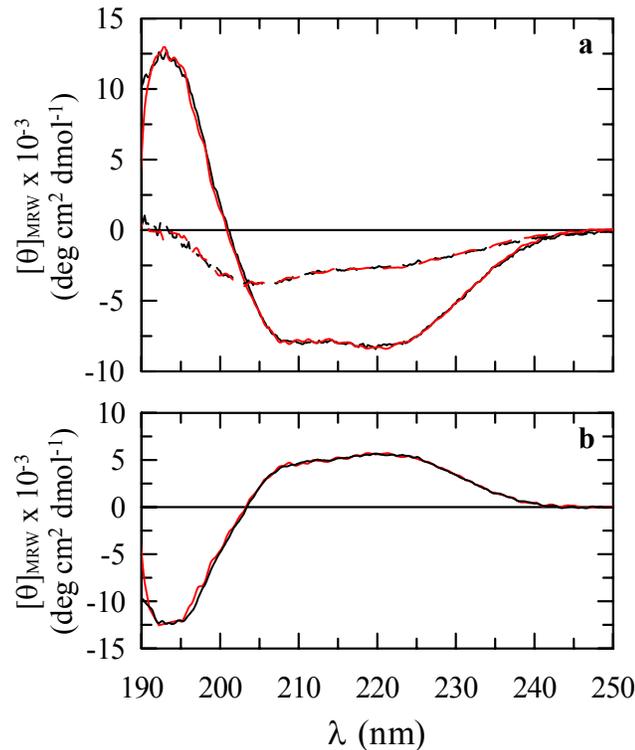


Abbildung 3-23: (a) Fern-UV-CD-Spektren von TolA-C-Ac (—) und TolA-C-AEDANS (---) bei 20 °C (durchgezogene Linie) bzw. 90 °C (gestrichelte Linie). (b) Differenzspektrum des nativen und denaturierten Zustands von TolA-C-Ac (—) und TolA-C-AEDANS (---). Die Spektren wurden mit 10 μM Protein in 10 mM K-Phosphat, pH 7,0, bei einer Schichtdicke von 1 mm, einer Bandbreite von 1 nm und einer Geschwindigkeit von 20 nm/min (Dämpfung 1 s) gemessen. Alle Spektren wurden um den Pufferbeitrag korrigiert.

Außerdem wurde mit Hilfe von Fluoreszenzspektren die Wellenlänge bestimmt, die sich als Messsonde für die Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung eignet (Abbildung 3-24). TolA-C enthält lediglich vier Tyrosine, jedoch kein Tryptophan. Dementsprechend zeigt TolA-C-Ac nur eine relativ geringe Fluoreszenz mit einem Maximum bei 307 nm. Bei Denaturierung nimmt die Fluoreszenz ab, wobei keine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zu beobachten ist. Die Entfaltung von TolA-C-Ac kann also anhand der Fluoreszenzabnahme bei 307 nm verfolgt werden. Im Fall von TolA-C-AEDANS wird bei 280 nm auch der Fluoreszenzfarbstoff selbst angeregt; das zusätzliche Signal bei 490 nm ist demnach auf die Fluoreszenz des Farbstoffs zurückzuführen. Diese Fluoreszenz bei 490 nm nimmt bei

Entfaltung des Proteins stark ab, so dass die Signaländerung bei 490 nm als Messsonde für die Entfaltung von TolA-C-AEDANS verwendet werden konnte.

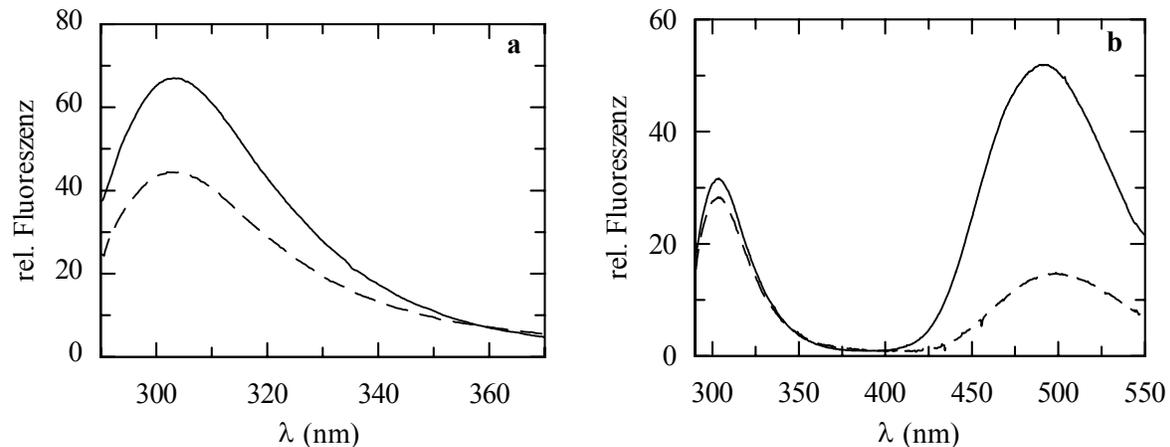


Abbildung 3-24: Fluoreszenzspektren von TolA-C-Ac (a) und TolA-C-AEDANS (b) in 0 M (—) und 5 M GdmCl (---). Die Spektren wurden nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite je 5 nm) mit 1 μ M Protein in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C und 1 cm Schichtdicke gemessen. Alle Spektren wurden um die Pufferfluoreszenz korrigiert.

Um den Einfluss der Fluoreszenzmarkierung auf die thermodynamische Stabilität von TolA-C zu bestimmen, wurden für beide Proteine sowohl die thermisch induzierte Entfaltung als auch die Entfaltung durch die Denaturierungsmittel GdmCl und Harnstoff gemessen. Für die thermisch induzierte Entfaltung, die anhand der Änderung des CD-Signals bei 222 nm verfolgt wurde, konnte jeweils ein einphasiger Übergang beobachtet werden. Die Entfaltungsübergänge der beiden Proteine sind in Abbildung 3-25 dargestellt. Die Markierung von TolA-C durch den Fluoreszenzfarbstoff AEDANS führte zu keiner signifikanten Destabilisierung des Proteins.

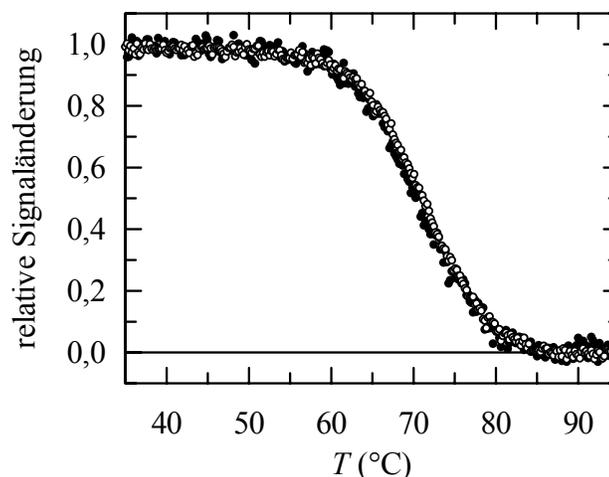


Abbildung 3-25: Thermische Stabilität von TolA-C-Ac (○) und TolA-C-AEDANS (●). Aufgetragen ist die relative Änderung des CD-Signals bei 222 nm in Abhängigkeit von der Temperatur nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell. Die Übergänge wurden mit 4 μM Protein in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die aus der Analyse erhaltenen thermodynamischen Parameter betragen $T_M = 71,2$ °C, $\Delta H_D = 256$ kJ·mol⁻¹ und $\Delta G_D^{70^\circ\text{C}} = 0,9$ kJ·mol⁻¹ für TolA-C-Ac bzw. $T_M = 70,1$ °C, $\Delta H_D = 246$ kJ·mol⁻¹ und $\Delta G_D^{70^\circ\text{C}} = 0,5$ kJ·mol⁻¹ für TolA-C-AEDANS.

Die GdmCl-induzierte Entfaltung der beiden Proteine wurde sowohl anhand der Änderung des CD- als auch des Fluoreszenzsignals beobachtet, die Harnstoff-induzierte Entfaltung nur anhand der Änderung des Fluoreszenzsignals. Alle Übergänge konnten nach einem Zweizustandsmodell ausgewertet werden (Tabelle 3-10). Abbildung 3-26 zeigt die GdmCl- und Harnstoff-induzierte Entfaltung von TolA-C-Ac und TolA-AEDANS, verfolgt anhand der Fluoreszenzänderung bei 307 nm bzw. 490 nm. Für die GdmCl-induzierten Denaturierungsübergänge wurden sowohl mit der CD- als auch der Fluoreszenzsonde identische Mittelpunkte für TolA-C-Ac und TolA-C-AEDANS (1,9 M) erhalten. Die Differenz der Mittelpunkte aus der Harnstoff-induzierten Entfaltung (5,4 M bzw. 5,3 M) liegt innerhalb des Messfehlers. Ebenso stimmen die freie Enthalpie der Entfaltung bei 25 °C in Abwesenheit des Denaturierungsmittels und die Kooperativitätsparameter m für die beiden Proteine überein, wobei die Kooperativität der beiden Proteine in der Harnstoff-induzierten Entfaltung um ca. 4 kJ·mol⁻¹·M⁻¹ geringer ist als in der GdmCl-induzierten Entfaltung. Dies entspricht den Erwartungen, da GdmCl wesentlich stärker denaturierend wirkt als Harnstoff. Die Ergebnisse der thermischen und der Denaturierungsmittel-induzierten Entfaltung zeigen klar, dass die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff keinen Einfluss auf die Stabilität von TolA-C besitzt.

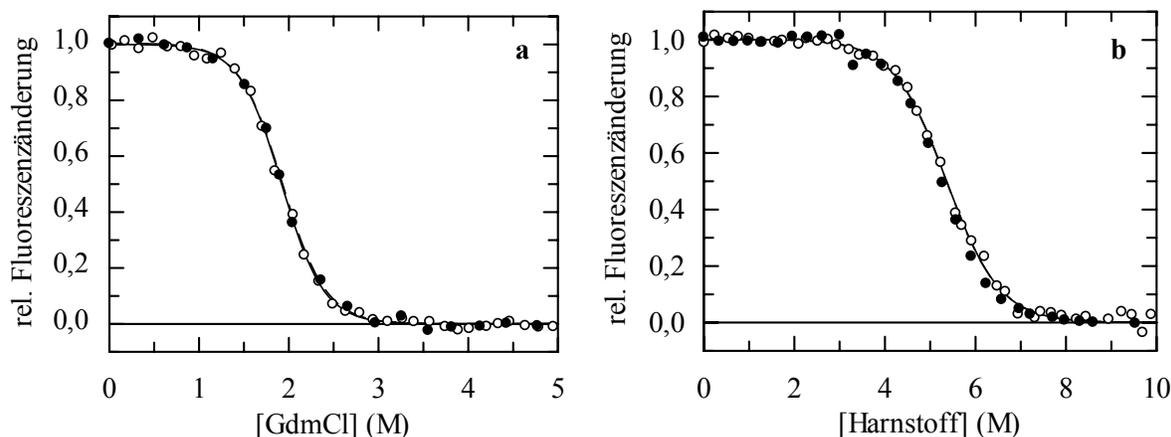


Abbildung 3-26: Normierte Entfaltungsübergänge von TolA-C-Ac (○) und TolA-C-AEDANS (●), induziert durch GdmCl (a) bzw. Harnstoff (b). Der Übergang von 2 μM TolA-C-Ac wurde anhand der Fluoreszenzänderung bei 307 nm (Bandbreite 5 nm), der Übergang von 1 μM TolA-C-Ac anhand der Fluoreszenzänderung bei 490 nm (Bandbreite 10 nm) verfolgt. Die Anregung erfolgte jeweils bei 280 nm mit einer Bandbreite von 5 nm. Die Übergänge wurden in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die Linien repräsentieren den Angleich der experimentellen Daten an ein Zweizustandsmodell; die aus der Analyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-10 aufgeführt.

Tabelle 3-10: Stabilitätsdaten für TolA-C-Ac und TolA-C-AEDANS aus der GdmCl- und Harnstoff-induzierten Entfaltung.

		Entfaltung durch GdmCl			Entfaltung durch Harnstoff		
		$[\text{GdmCl}]_{1/2}$	m	$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$	$[\text{Harnstoff}]_{1/2}$	m	$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$
		(M)	($\text{kJ mol}^{-1}\text{M}^{-1}$)	(kJ mol^{-1})	(M)	($\text{kJ mol}^{-1}\text{M}^{-1}$)	(kJ mol^{-1})
TolA-C-Ac	F_{307}	1,9	10,5	20,2	5,4	4,2	22,7
	CD_{222}	1,8	8,9	16,4			
TolA-C-AEDANS	F_{490}	1,9	10,4	20,1	5,3	4,5	23,5
	CD_{222}	2,0	8,1	15,9			

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte $[\text{GdmCl}]_{1/2}$ bzw. $[\text{Harnstoff}]_{1/2}$, die Kooperativitätsparameter m und die freien Enthalpien der Entfaltung $\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ bei 25 °C in Abwesenheit des Denaturierungsmittels für TolA-C-Ac und TolA-C-AEDANS. Die Entfaltung wurde anhand der Fluoreszenzänderung bei 307 nm (F_{307}) für TolA-C-Ac bzw. 490 nm (F_{490}) für TolA-C-AEDANS nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Bei der GdmCl-induzierten Entfaltung wurde zusätzlich die Änderung des CD-Signals bei 222 nm (CD_{222}) gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells.

3.3.1.2 Faltungsmechanismus von TolA-C

Die kinetische Analyse der Faltungs- und Entfaltungsreaktionen sollte Aufschluss darüber geben, ob die Fluoreszenzmarkierung den Faltungsmechanismus von TolA-C verändert. Hierzu wurde die Faltung von TolA-C-AEDANS anhand der Änderung der AEDANS-Fluoreszenz bzw. die Faltung von TolA-C-Ac anhand der Änderung der Tyrosinfluoreszenz verfolgt. Die Chevron-Auftragung in Abbildung 3-27 zeigt die Faltungs- und Entfaltungsraten

λ von TolA-C-Ac und TolA-C-AEDANS in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die apparente Rate λ entspricht dabei der Summe der Ent- und Rückfaltungsraten bei der jeweiligen Denaturierungsmittelkonzentration (Gleichung 2-25). Am Übergangsmittelpunkt sind die Ent- und Rückfaltungsraten identisch, so dass dieser durch den Schnittpunkt der extrapolierten Ent- und Rückfaltungsraten bestimmt wird. Der kinetische m -Wert gibt die Denaturierungsmittelabhängigkeit der Faltungsraten an.

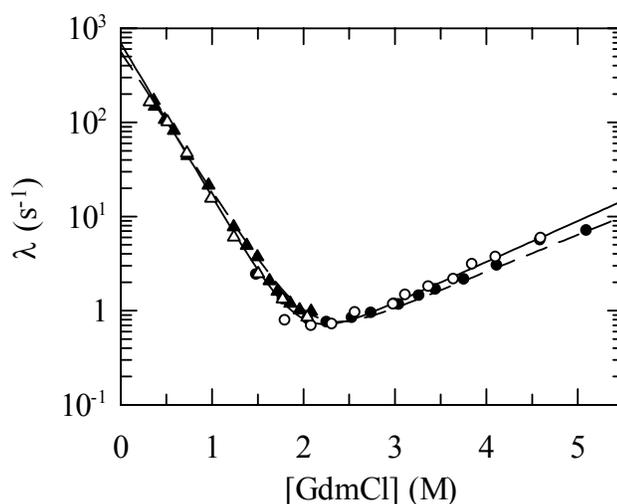


Abbildung 3-27: Chevron-Auftragung von TolA-C-Ac (Δ, \circ) und TolA-C-AEDANS (\blacktriangle, \bullet). Dargestellt sind die Entfaltungs- (\circ, \bullet) und schnellen Rückfaltungsraten (Δ, \blacktriangle) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Faltungsreaktionen von TolA-C-Ac wurden anhand der Änderung der Tyrosinfluoreszenz oberhalb von 300 nm, Faltungsreaktionen von TolA-C-AEDANS anhand der Änderung der AEDANS-Fluoreszenz oberhalb von 460 nm in *stopped-flow*-Mischexperimenten verfolgt. Die Anregung erfolgte jeweils bei 280 nm (Bandbreite 10 nm). Die Linien repräsentieren den Angleich an die experimentellen Daten gemäß einem Zweizustandsmodell. Die Messungen wurden mit 4 μM TolA-C-Ac bzw. 1 μM TolA-C-AEDANS in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C durchgeführt.

Der Vergleich der Faltungsreaktionen zeigt, dass sowohl bei TolA-C-Ac als auch bei TolA-C-AEDANS die Denaturierungsmittelabhängigkeit der Entfaltungsraten ($m_{\text{NU}} = 0,9 \text{ M}^{-1}$) sehr gering ist. Die Entfaltung verläuft dabei in einer einphasigen Reaktion, während die Rückfaltung für beide Proteine in zwei Schritten erfolgt. Die schnelle Rückfaltungsreaktion besitzt bei 0,5 M GdmCl eine Zeitkonstante von ca. 10 ms und kann nur in *stopped-flow*-Mischexperimenten aufgelöst werden. Diese Rückfaltungsreaktion ist abhängig von der Konzentration an Denaturierungsmittel ($m_{\text{UN}} \approx 3,5 \text{ M}^{-1}$), wie für konformationelle Faltungsreaktionen erwartet wird (Tanford, 1968b). Im Gegensatz dazu ist die bei beiden Proteinen nachgelagerte langsamere Rückfaltungsreaktion unabhängig von der GdmCl-Konzentration im Rückfaltungsansatz - eine Eigenschaft, die charakteristisch für prolinlimitierte Faltungsreaktionen ist (Balbach & Schmid, 2000). Eine Katalyse dieser Faltungsreaktion durch die Prolylisomerasen SlyD und Cyp18 konnte jedoch nicht beobachtet werden, was auf eine schlechte Zugänglichkeit der Prolinbindung zurückzuführen sein

könnte. Die Zeitkonstante der langsamen Rückfaltungsreaktion lag mit ca. 30 s (bei 25 °C, Daten nicht gezeigt) im Bereich der für Prolinisomerisierungen in Peptiden und Proteinen beobachteten Zeitkonstanten (10 - 100 s; Balbach & Schmid, 2000; Fischer, 2000). Zusammen mit der fehlenden Denaturierungsmittelabhängigkeit dieser Rate deutet dies auf einen prolinlimitierten Rückfaltungsschritt hin. TolA-C enthält zehn Prolinreste, die im nativen Protein alle in der *trans*-Konformation vorliegen. Der zweite Rückfaltungsschritt könnte also durchaus einer *cis*→*trans*-Isomerisierung zuzuordnen sein, was auch mit der kleinen Amplitude dieser Reaktion kompatibel wäre.

Die Chevron-Auftragung verdeutlicht, dass TolA-C-Ac und TolA-AEDANS den gleichen Faltungsmechanismus besitzen. Der Farbstoff hat also keinen Einfluss auf die Faltungsreaktion. Anhand der AEDANS-Fluoreszenz konnten dieselben Faltungsreaktionen beobachtet werden wie anhand der intrinsischen Tyrosinsonde in TolA-C-Ac. Es wurden keine weiteren Reaktionen detektiert, die auf eine Umorientierung oder eine andere spezifische Reaktion des Farbstoffs hindeuten könnten.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung und der Rückfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (k_{NU} und k_{UN}) konnten durch eine Zweizustandsanalyse aus den apparenten Raten λ in der Chevron-Auftragung bestimmt werden. Aus diesen extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten lässt sich zusammen mit den kinetischen m -Werten die thermodynamische Stabilität der Proteine berechnen. Die kinetischen Daten sowie die daraus erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-11 aufgeführt.

Die aus der Analyse erhaltenen Übergangsmittelpunkte und die freien Enthalpien der Entfaltung stimmen für TolA-C-AEDANS und TolA-C-Ac ebenso überein wie die kinetischen Parameter beider Proteine. Zudem sind die berechneten Werte für die thermodynamische Stabilität mit den Werten aus den Gleichgewichtsübergängen konsistent. Die Markierung von TolA-C beeinflusst also weder die thermodynamische Stabilität noch den Faltungsmechanismus des Proteins. Da der Farbstoff die Eigenschaften von TolA-C nicht verändert, eignet sich TolA-C-AEDANS gut, um die Wechselwirkung zwischen TolA-C und N1 mittels FRET zu charakterisieren.

Tabelle 3-11: Kinetische Daten für die Faltung von TolA-C-Ac und TolA-C-AEDANS.

	k_{UN} (s ⁻¹)	k_{NU} (s ⁻¹)	m_{UN} (M ⁻¹)	m_{NU} (M ⁻¹)	[GdmCl] _{1/2} (M)	m (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)	$\Delta G_{\text{D}}^{25\text{ °C}}$ (kJ·mol ⁻¹)
TolA-C-Ac	697	0,1	-3,8	1,0	2,0	11,8	23,2
TolA-C-AEDANS	565	0,1	-3,4	0,9	2,1	10,7	22,3

Die kinetischen Daten wurden durch Fluoreszenzmessung in *stopped-flow*-Mischexperimenten bestimmt. Angegeben sind die extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung k_{UN} und der Entfaltung k_{NU} , sowie die kinetischen m -Werte der Rückfaltung m_{UN} und der Entfaltung m_{NU} . Am Übergangsmittelpunkt sind die Ent- und Rückfaltungsraten identisch ($[\text{GdmCl}]_{1/2} = \ln(k_{\text{NU}}/k_{\text{UN}})/(m_{\text{UN}} - m_{\text{NU}})$). Der Kooperativitätsparameter m wird aus den kinetischen m -Werten berechnet ($m = R \cdot T \cdot (m_{\text{NU}} - m_{\text{UN}})$). Die freie Enthalpie der Entfaltung $\Delta G_{\text{D}}^{25\text{ °C}}$ bei 25 °C berechnet sich aus den extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten ($\Delta G_{\text{D}}^{25\text{ °C}} = -R \cdot T \cdot \ln(k_{\text{NU}}/k_{\text{UN}})$). Die Daten wurden gemäß einem Zweizustandsmodell ausgewertet.

3.3.2 Interaktion der isolierten N1-Domäne mit TolA-C

Bei Bindung der N1-Domäne an TolA-C-AEDANS sollte Energie von den drei Tryptophanresten in N1 auf den Farbstoff übertragen werden. Für die entsprechenden FRET-Experimente wurde meist die stabilisierte Variante T13I der N1-Domäne verwendet, die aus einer *in vitro*-Selektion auf erhöhte Stabilität hervorgegangen war (Martin & Schmid, 2003a). In der Kristallstruktur des Fusionsproteins aus N1 und TolA-C (Lubkowski *et al.*, 1999) befindet sich Thr13 außerhalb der Interaktionsfläche der beiden Proteine (Abbildung 3-28). Die Mutation T13I in N1 sollte deshalb keinen Einfluss auf die Affinität zu TolA-C haben.

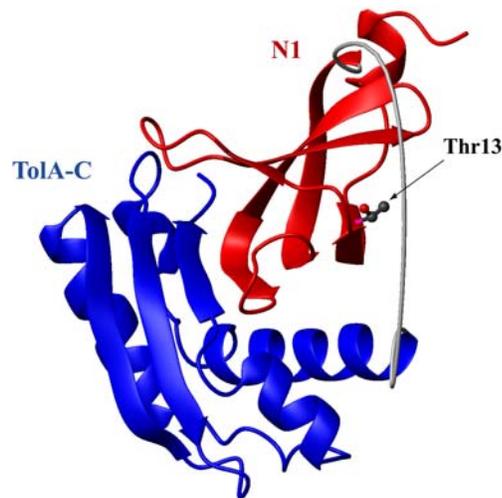


Abbildung 3-28: Tertiärstruktur des Fusionsproteins bestehend aus der N1-Domäne des Phagen-G3P und der C-terminalen Domäne von TolA. Die N1-Domäne ist in rot, TolA-C in blau und der *Linker* zwischen den beiden Domänen in grau dargestellt. Thr13 ist als Kugel-Stab-Modell gezeigt. Die Abbildung basiert auf der Kristallstruktur von Lubkowski *et al.* (1999, PDB-Eintrag: 1tol) und wurde mit dem Programm MolMol (Koradi *et al.*, 1996) erstellt.

Zunächst wurden Fluoreszenzspektren von TolA-C-AEDANS in Abwesenheit bzw. Gegenwart verschiedener Konzentrationen an T13I-N1 gemessen (Abbildung 3-29). Die Anregung erfolgte bei 280 nm, da bei dieser Wellenlänge die Trp-Reste in der N1-Domäne gut angeregt werden können, der Fluoreszenzfarbstoff in TolA-C selbst aber nur wenig absorbiert. Dennoch konnte in Abwesenheit der N1-Domäne eine Fluoreszenz bei 490 nm beobachtet werden, die zum einen auf einem geringen Energietransfer der Tyr-Reste des TolA-C auf AEDANS und zum anderen auf der direkten Anregung des Farbstoff basiert. Bei Bindung von T13I-N1 an TolA-C nahm die AEDANS-Fluoreszenz bei 490 nm stark zu, wobei die Fluoreszenzänderung von der Konzentration an N1 abhing. In Fluoreszenzemissionsspektren äußert sich FRET sowohl in der Zunahme der Akzeptorfluoreszenz (AEDANS) als auch in der Abnahme der Donorfluoreszenz (Tryptophan). Bei der Bindung von N1 an TolA-C-AEDANS nahm die

Tryptophanfluoreszenz bei 340 nm allerdings nur leicht ab. Daneben war eine leichte Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zu kürzeren Wellenlängen zu beobachten. Die relativ geringe Fluoreszenzabnahme und die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums deuten darauf hin, dass nicht alle drei Tryptophane der N1-Domäne Energie auf den Fluoreszenzfarbstoff in TolA-C übertragen.

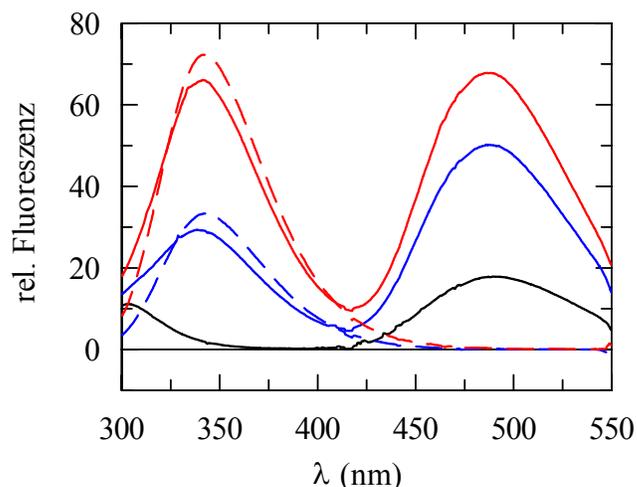


Abbildung 3-29: Fluoreszenzänderung von TolA-C-AEDANS bei Bindung der N1-Domäne. Dargestellt sind die Fluoreszenzemissionsspektren von 0,5 μ M TolA-C-AEDANS (—), 0,5 μ M (---) und 3 μ M (---) isolierter Domäne T13I-N1 bzw. des Komplexes von 0,5 μ M TolA-C-AEDANS mit 0,5 μ M (—) oder 3 μ M T13I-N1 (—). Die Messungen wurden in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C und einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 280 nm mit 5 nm Anregungs- und 10 nm Emissionsbandbreite. Alle Spektren wurden um die Pufferfluoreszenz korrigiert.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante des Komplexes aus TolA-C-AEDANS und T13I-N1 wurde die Fluoreszenzänderung bei 490 nm bei steigender Konzentration an T13I-N1 gemessen. Die Auftragung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration an N1 lieferte eine Bindungskurve mit einem K_D -Wert von 490 nM (Abbildung 3-30). Um zu überprüfen, ob der Farbstoff die Affinität von TolA-C zu N1 verändert, sollte auch der K_D -Wert für das unmarkierte Protein bestimmt werden. Da die Bindung von T13I-N1 an unmarkiertes TolA-C-Ac mit keiner Signaländerung einhergeht, wurde eine Verdrängungstitration durchgeführt. Hierzu wurden 0,1 μ M T13I-N1 und 2 μ M TolA-C-AEDANS vorinkubiert, so dass T13I-N1 nahezu komplett (ca. 85%) im Komplex gebunden vorlag, und unmarkiertes Protein zutitriert. Die Freisetzung von TolA-C-AEDANS aus dem Komplex durch das unmarkierte Protein führt zu einer Fluoreszenzabnahme bei 490 nm (Abbildung 3-30b). Die Analyse der erhaltenen Titrationskurve nach Thrall *et al.* (1996) lieferte für den Komplex zwischen unmarkiertem TolA-C-Ac und T13I-N1 eine Dissoziationskonstante von 120 nM, die damit ca. vierfach niedriger ist als die für TolA-C-AEDANS. Der Fluoreszenzfarbstoff verringert somit die Affinität von TolA-C zur N1-Domäne leicht, wobei diese noch im gleichen Größenordnungsbereich liegt. Die fluoreszenzspektroskopisch bestimmten K_D -Werte sind niedriger als die durch Oberflächen-

Plasmonen-Resonanz bestimmten K_D -Werte (Karlsson *et al.*, 2003). Bei der Oberflächen-Plasmonen-Resonanz muss jeweils ein Ligand auf einer Trägermatrix immobilisiert werden. Je nachdem, welcher der beiden Bindungspartner immobilisiert vorlag, wurden hierbei Werte von $1,9 \mu\text{M}$ (N1 fixiert) bzw. $1,0 \mu\text{M}$ (TolA-C fixiert) erhalten. Da die Anbindung an das Trägermaterial die Wechselwirkung der beiden Proteine stören kann, sind die in Lösung mittels FRET bestimmten Dissoziationskonstanten zuverlässiger.

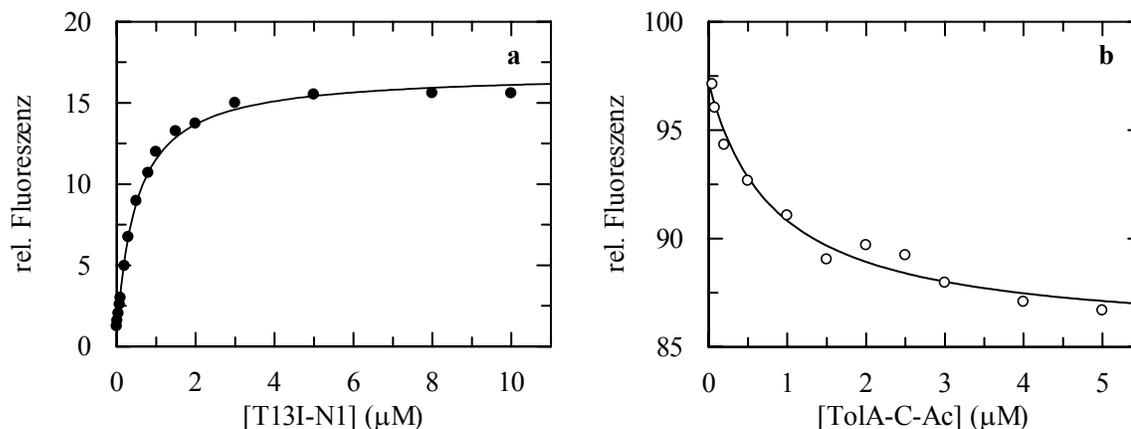


Abbildung 3-30: (a) Fluoreszenzänderung bei Assoziation von $0,1 \mu\text{M}$ TolA-C-AEDANS und T13I-N1 (●). Die Linie zeigt den Angleich einer Bindungskurve mit der Dissoziationskonstanten $K_D = 490 \text{ nM}$ an die Messpunkte. (b) Verdrängung von $2 \mu\text{M}$ TolA-C-AEDANS aus dem Komplex mit $0,1 \mu\text{M}$ T13I-N1 durch TolA-C-Ac (○). Aus dem Angleich an die experimentellen Daten gemäß einer kompetitiven Bindung wurde ein K_D -Wert von 120 nM für den Komplex aus TolA-C-Ac und T13I-N1 erhalten (durchgezogene Linie). Die Assoziation sowie die Verdrängung wurden anhand der AEDANS-Fluoreszenz bei 490 nm (Bandbreite 10 nm) nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 5 nm) verfolgt. Die Messungen wurden in $0,1 \text{ M}$ K-Phosphat, $\text{pH } 7,0$, bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Die Kinetik der Komplexbildung zwischen TolA-C-AEDANS und T13I-N1 konnte ebenfalls anhand des Energietransfers der Trp-Reste in N1 auf den AEDANS-Farbstoff in TolA-C verfolgt werden. Die Bindung wurde nach *stopped-flow*-Mischung mit Hilfe der Zunahme der integralen Fluoreszenz oberhalb 460 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. In Abbildung 3-31a sind exemplarisch einzelne Zeitverläufe für die Assoziation von TolA-C-AEDANS mit verschiedenen Konzentrationen an T13I-N1 gezeigt. In Abwesenheit von T13I-N1 bleibt das Signal konstant. Die Fluoreszenzänderung spiegelt also den Verlauf der Komplexbildung zwischen TolA-C und der N1-Domäne wider.

Die Zeitverläufe konnten jeweils mit einer monoexponentiellen Funktion angeglichen werden. Sowohl die Amplitude als auch die Geschwindigkeit der Signaländerung nahmen mit steigender Konzentration an T13I-N1 zu (Abbildung 3-31b,c). Nach linearer Regression der apparenten Raten k_{app} konnten die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k_{off} aus dem y-Achsenabschnitt bzw. die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation k_{on} aus der Steigung abgeleitet werden. Für den Komplex aus TolA-C-AEDANS und T13I-N1 ergeben sich dabei

Werte von $k_{\text{off}} = 0,32 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{on}} = 0,83 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Aus dem Verhältnis der beiden Geschwindigkeitskonstanten lässt sich eine Dissoziationskonstante $K_D = 390 \text{ nM}$ berechnen, die gut mit dem K_D -Wert aus der Gleichgewichtstitration übereinstimmt (Abbildung 3-30).

Die Amplituden der Assoziationsreaktion nahmen zunächst mit steigender Konzentration an T13I-N1 zu, blieben bei Konzentrationen oberhalb $4 \mu\text{M}$ konstant bzw. nahmen leicht ab (Abbildung 3-31c). Dies liegt vermutlich daran, dass die hohen Fluorophorkonzentrationen zu *inner-filter*-Effekten in der *stopped-flow*-Mischkammer führen, d.h. dass durch Absorption ein Teil des Anregungslichts verloren geht bzw. durch Reabsorption die Intensität des Fluoreszenzlichts verringert wird. Die Amplituden bei hohen N1-Konzentrationen wurden deshalb bei der Analyse nicht berücksichtigt. Zwischen 0 und $4 \mu\text{M}$ beschreibt die Amplitude eine Bindungskurve, deren K_D -Wert von 340 nM gut mit dem aus den Ratenkonstanten erhaltenen K_D -Wert übereinstimmt.

Die Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation des Komplexes aus unmarkiertem TolA-C-Ac und T13I-N1 konnte in einem Konkurrenzexperiment bestimmt werden. Dabei wurden $0,5 \mu\text{M}$ T13I-N1 mit $3 \mu\text{M}$ TolA-C-Ac vorinkubiert, so dass T13I-N1 fast vollständig (ca. 95%) mit unmarkiertem TolA-C-Ac komplexiert war. Anschließend wurde der Komplex mit verschiedenen Konzentrationen ($5 - 50 \mu\text{M}$) an TolA-C-AEDANS gemischt. Durch den Überschuss an markiertem TolA-C wurde das unmarkierte Protein aus dem Komplex verdrängt, und die Fluoreszenz nahm aufgrund der Bindung von TolA-C-AEDANS an die N1-Domäne zu. Für TolA-C-AEDANS-Konzentrationen oberhalb des K_D -Werts (490 nM) ist dabei die Geschwindigkeit der Reaktion nur von der Dissoziation des vorgeformten Komplexes abhängig. In Abbildung 3-31d ist exemplarisch der Zeitverlauf der Verdrängung durch $10 \mu\text{M}$ TolA-C-AEDANS dargestellt. Für alle Konzentrationen erfolgte die Bindung des markierten TolA-C an T13I-N1 mit der gleichen Geschwindigkeitskonstante. Dies zeigt, dass die Bindung von TolA-C-AEDANS an T13I-N1 durch die vorausgehende Dissoziation des Komplexes der N1-Domäne und TolA-C-Ac limitiert wird. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante ($0,48 \text{ s}^{-1}$) entspricht also der Dissoziationsrate dieses Komplexes und ist damit unwesentlich höher als die des AEDANS-markierten Proteins ($0,32 \text{ s}^{-1}$).

Die Gleichgewichtstitration und auch die kinetischen Messungen zeigen, dass die Bindung der N1-Domäne an den Rezeptor TolA-C gut anhand von FRET-Experimenten analysiert werden kann. Die hierfür notwendige Markierung von TolA mit dem Fluoreszenzfarbstoff AEDANS hat nur einen sehr geringen Einfluss auf die Affinität und die Geschwindigkeit der Dissoziation. Die Komplexbildung mit der isolierten N1-Domäne verläuft schnell ($0,83 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) und kann durch ein einfaches Bindungsmodell beschrieben werden.

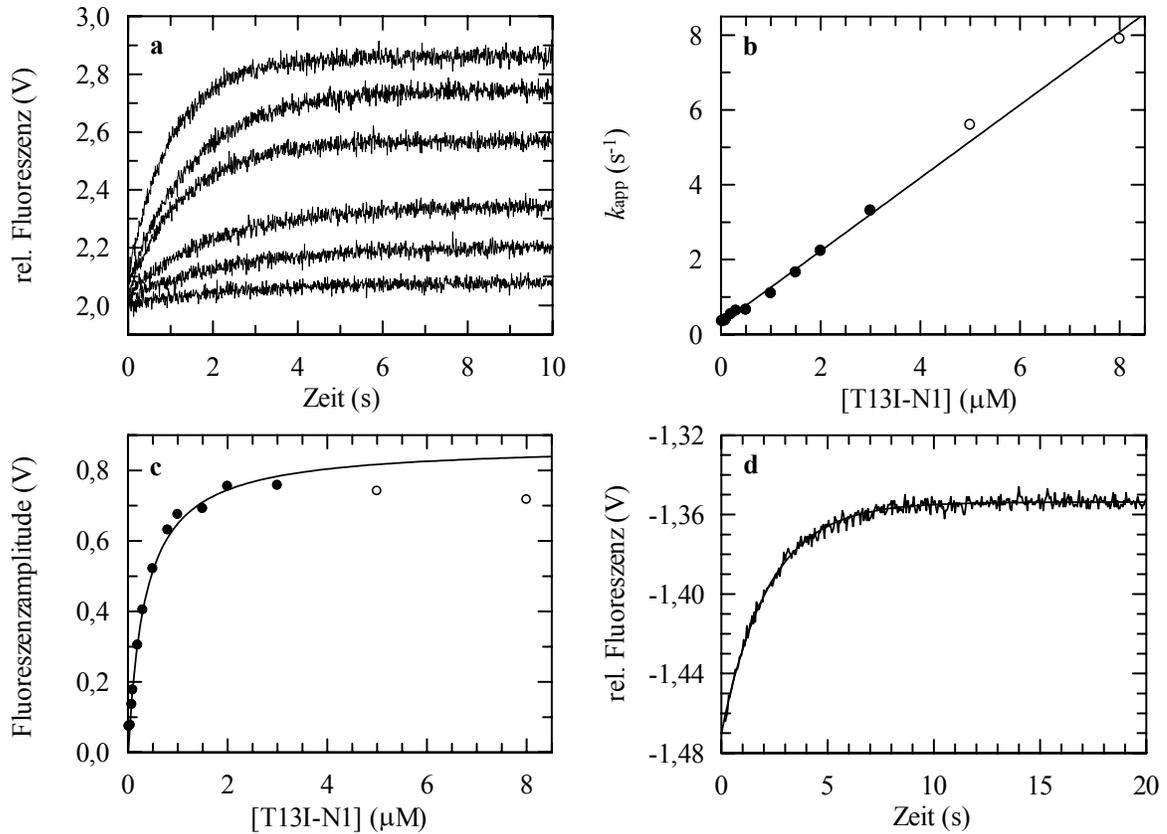


Abbildung 3-31: (a) Kinetik der Assoziation von TolA-C-AEDANS und der isolierten Domäne T13I-N1. Die Reaktion von 0,1 μM TolA-C-AEDANS mit (von unten nach oben) 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1 und 3 μM T13I-N1 wurde anhand der Änderung der AEDANS-Fluoreszenz in *stopped-flow*-Mischexperimenten verfolgt. (b) Abhängigkeit der apparenten Assoziationsrate von der Konzentration an T13I-N1 (●). Die Daten wurden nach einem einfachen Zweischnitt-Bindungsmechanismus ausgewertet (durchgezogene Linie). Die Analyse lieferte Werte für k_{on} von 0,83 μM⁻¹·s⁻¹ und für k_{off} von 0,32 s⁻¹. Datenpunkte oberhalb von 4 μM wurden bei der Analyse nicht berücksichtigt (○). (c) Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzamplitude von der Konzentration an T13I-N1 (●). Die Linie zeigt einen Anstieg an die Messpunkte mit einer Dissoziationskonstante $K_D = 340$ nM. Datenpunkte oberhalb von 4 μM (○) wurden aufgrund von *inner-filter*-Effekten bei der Analyse nicht berücksichtigt. (d) Kinetik der Verdrängung von TolA-C-Ac aus dem Komplex mit T13I-N1. 3 μM TolA-C-Ac wurden durch Zugabe von 10 μM TolA-C-AEDANS aus dem Komplex mit 0,5 μM T13I-N1 verdrängt. Die Linie repräsentiert den Anstieg einer monoexponentiellen Funktion mit der Rate von 0,48 s⁻¹ an die Daten. Die Reaktionen wurden anhand der Fluoreszenzänderung oberhalb von 460 nm nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 10 nm) verfolgt. Alle Experimente wurden in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C durchgeführt.

3.3.3 Interaktion des G3P* mit TolA-C

3.3.3.1 Die Domänen dissoziation aktiviert G3P* für die Bindung an TolA-C

Als isolierte Domäne kann N1 mit hoher Affinität an TolA-C binden, da die Interaktionsfläche permanent zugänglich ist. Im nativen G3P* dagegen ist die Bindungsstelle auf N1 durch die Wechselwirkung mit der N2-Domäne blockiert, und die Bindung an TolA-C erfordert die Dissoziation der Domänen. Bei der *in vitro*-Faltung von G3P* faltet N1 innerhalb weniger Millisekunden, gefolgt von der Faltung der globulären Domäne von N2 sowie der mit der Faltung der Gelenksubdomäne gekoppelten Domänenassoziation. Bei der Rückfaltung kann somit ein kinetisches Intermediat populiert werden, in dem die Domänen noch dissoziiert sind und N1 in einem bindungsaktiven Zustand vorliegt. Um zu überprüfen, wie die Domänenassoziation in G3P* die Interaktion der N1-Domäne mit TolA-C beeinflusst, wurde die Wechselwirkung zwischen N1 und TolA-C-AEDANS während der Rückfaltung der isolierten T13I-N1-Domäne bzw. der Rückfaltung von G3P* verfolgt (Abbildung 3-32). Hierzu wurde die denaturierte Domäne T13I-N1 bzw. G3P* in Gegenwart von 0,5 μM TolA-C-AEDANS rückgefaltet und die Interaktion mittels FRET beobachtet. Zum Vergleich wurde die Bindung der nativen Proteine an TolA-C analysiert.

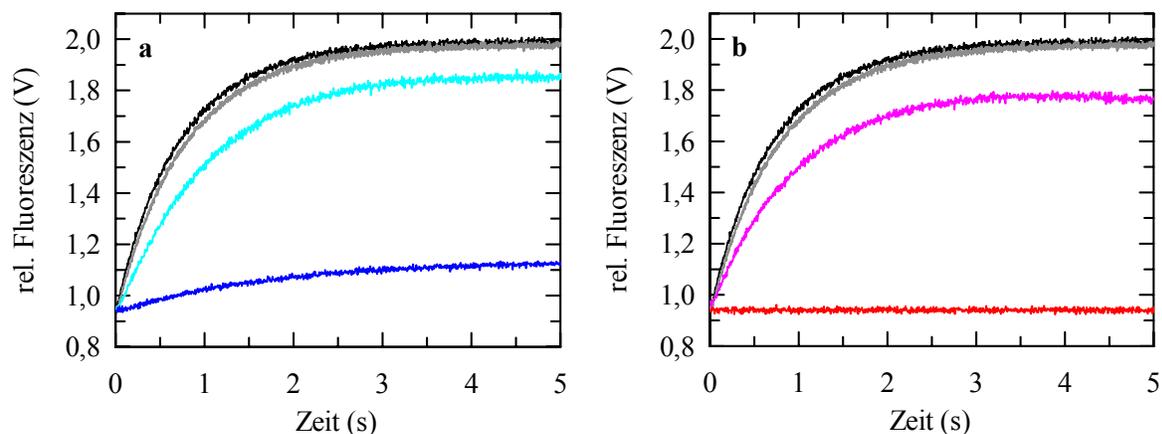


Abbildung 3-32: Bindung von TolA-C-AEDANS an aktiviertes G3P*. (a) Assoziationsreaktion zwischen 0,5 μM TolA-C-AEDANS und 2 μM der geschlossenen, nativen Form (—) bzw. der geöffneten, aktivierten Form (—) von WT-G3P*. (b) Assoziationsreaktion zwischen 0,5 μM TolA-C-AEDANS und 2 μM der geschlossenen, nativen Form (—) bzw. der geöffneten, aktivierten Form (—) von IIHY-G3P*. Um die Bindung an G3P* im geöffneten Zustand zu bestimmen, wurden die Proteine zunächst in 5,5 M GdmCl, 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, entfaltet. Rückfaltung und Assoziation mit TolA-C-AEDANS wurden durch elffache Verdünnung mit 0,55 μM TolA-C-AEDANS initiiert. Die Assoziation von 0,5 μM TolA-C-AEDANS mit der isolierten Domäne T13I-N1 (2 μM) im nativen Zustand (—) oder nach Rückfaltung aus 5,5 M GdmCl (—) diente dabei jeweils als Kontrolle. Die Reaktion wurde anhand der Fluoreszenzänderung oberhalb von 460 nm nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 10 nm) verfolgt. Die Messungen wurden mittels *stopped-flow*-Mischung in 0,5 M GdmCl, 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C durchgeführt.

Die Kinetik der Interaktion mit der isolierten T13I-N1-Domäne ist unabhängig davon, ob die N1-Domäne nativ eingesetzt oder zuvor entfaltet wurde. Unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen (0,5 M GdmCl, 25 °C) faltet die N1-Domäne mit einer Zeitkonstante von 10 ms, d.h. etwa hundertfach schneller als die Assoziation mit TolA-C erfolgt ($\tau \approx 1$ s). N1 liegt damit schon gefaltet vor, bevor die Assoziation mit TolA-C-AEDANS einsetzt, so dass die Bindungskinetik nicht durch die vorgelagerte Faltungsreaktion beeinflusst wird.

N1 faltet als isolierte Domäne und als Teil von G3P* gleich schnell (Martin & Schmid, 2003b). Während der Rückfaltung von G3P* entsteht innerhalb weniger Millisekunden ein Intermediat mit entfalteter N2-Domäne und gefalteter N1-Domäne, das an TolA-C-AEDANS binden kann. Die Wechselwirkung mit TolA-C-AEDANS ist dabei schneller als die Faltung des globulären Teils von N2, die erst nach 3 min abgeschlossen ist. Die Faltung der Gelenkregion zwischen den beiden Domänen und die damit verbundene Assoziation von N1 und N2 erfolgt innerhalb mehrerer Stunden. Die Faltungsreaktionen der N2-Domäne stören also zunächst die Interaktion der N1-Domäne mit TolA-C nicht, und die Bindung des faltenden G3P* an TolA-C-AEDANS erfolgt mit der gleichen Rate wie im Fall der isolierten N1-Domäne. Die Amplitude der Signaländerung ist dabei unwesentlich geringer als für T13I-N1.

Im nativen Zustand mit assoziierten Domänen ist die TolA-Bindungsstelle auf N1 durch die N2-Domäne blockiert, so dass keine Bindung an TolA-C-AEDANS möglich sein sollte. Wurde natives G3P* unter denselben Bedingungen (0,5 M GdmCl, 25 °C) mit TolA-C-AEDANS gemischt, konnte jedoch eine geringe Änderung der AEDANS-Fluoreszenz beobachtet werden. Die Amplitude betrug dabei 20% der Signaländerung, die bei Bindung von zuvor entfaltetem G3P* an TolA-C-AEDANS beobachtet wurde. Unter Berücksichtigung der Dissoziationskonstante des N1-TolA-C-AEDANS-Komplexes ($K_D = 490$ nM) und der eingesetzten Konzentrationen bedeutet dies, dass 5,8% des WT-Proteins in der dissoziierten Form vorliegen.

Um zu überprüfen, ob WT-G3P* tatsächlich zu einem geringen Anteil dissoziiert, d.h. partiell entfaltet vorliegt, wurde das TolA-C-Bindungsexperiment mit der stark stabilisierten Variante IIHY-G3P* wiederholt (Abbildung 3-32b). Entfaltetes IIHY-G3P* kann bei Rückfaltung in Gegenwart von TolA-C-AEDANS ebenfalls an TolA-C binden. Die Rate und Amplitude stimmen dabei mit denen des denaturierten WT-G3P* überein. Dies zeigt, dass die Mutation T13I in der N1-Domäne, wie unter 3.3.2 angenommen, tatsächlich keinen Einfluss auf die Affinität zu TolA-C besitzt. Im Gegensatz zu WT-G3P* konnte für IIHY-G3P* im nativen Zustand jedoch keine Bindung an TolA-C-AEDANS detektiert werden. Somit liegen nahezu alle Moleküle dieser stabileren G3P*-Variante im assoziierten Zustand vor, während für WT-G3P* offenbar ein geringer Prozentsatz der Moleküle partiell entfaltet und damit aktiv ist. Dieser Anteil aktiver Moleküle ist für die beobachtete Bindung des nativen WT-G3P* an TolA-C-AEDANS verantwortlich.

Im Folgenden wurde die Dissoziationskonstante für den Komplex zwischen TolA-C-AEDANS und WT-G3P* in einer Gleichgewichtstitration bestimmt. Die Messung erfolgte unter nativen Bedingungen in 0 M GdmCl. Abbildung 3-33 zeigt die Fluoreszenzänderung bei 490 nm in Abhängigkeit von der Konzentration an WT-G3P*. Zum Vergleich ist die Titration von TolA-C-AEDANS mit der isolierten T13I-N1-Domäne (3.3.2) dargestellt.

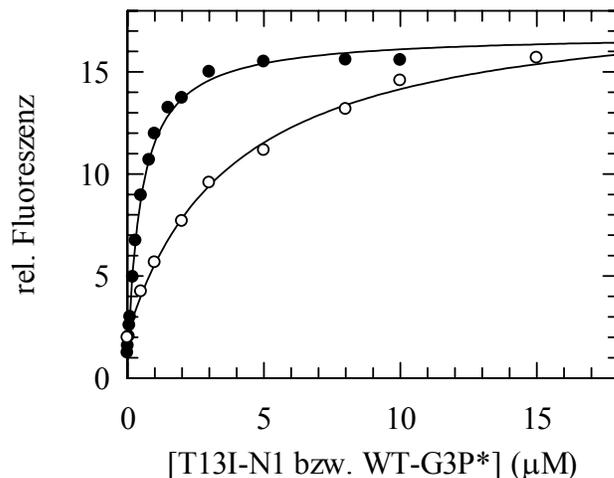


Abbildung 3-33: Fluoreszenzänderung bei Assoziation von 0,1 µM TolA-C-AEDANS mit T13I-N1 (●) oder WT-G3P* (○). Die Linien repräsentieren den Angleich an die Messpunkte mit Dissoziationskonstanten K_D von 490 nM (T13I-N1) bzw. 3,9 µM (WT-G3P*). Die Bindung wurde anhand der Änderung der AEDANS-Fluoreszenz bei 490 nm (Bandbreite 10 nm) nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 5 nm) verfolgt. Die Messungen wurden in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C durchgeführt.

Die Titration von TolA-C-AEDANS mit WT-G3P* lieferte eine Bindungskurve, die nach einem einfachen Bindungsmodell ausgewertet werden konnte. Der erhaltene K_D -Wert von 3,9 µM ist dabei achtfach höher als der K_D -Wert für die isolierte N1-Domäne (490 nM). Dieser K_D -Wert für G3P* ist jedoch nur eine apparente Dissoziationskonstante. Zum einen konkurriert die Bindung an TolA-C-AEDANS mit der Assoziation der beiden Domänen, zum anderen werden G3P*-Moleküle mit dissoziierten Domänen durch die Bindung an TolA-C dem Domänenassoziationsgleichgewicht entzogen, so dass sich das Gleichgewicht zwischen Molekülen mit dissoziierten und assoziierten Domänen permanent nachstellt. Jedoch verdeutlicht dieses Experiment erneut, dass eine Bindung von WT-G3P* an TolA-C-AEDANS auch in 0 M GdmCl, d.h. unter vollständig nativen Bedingungen, erfolgen kann.

3.3.3.2 Die Stabilität von G3P* beeinflusst die Bindung an TolA-C im nativen Zustand

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von nativem G3P* an TolA-C-AEDANS darauf basiert, dass ein Teil des Proteins in der bindungsaktiven Konformation, d.h. mit dissoziierten Domänen und entfalteter Gelenkregion, vorliegt. Für die stabilisierte Variante IIHY-G3P* konnte hingegen keine Bindung an TolA-C beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass der Anteil aktiver Moleküle und damit die Bindung an TolA-C im nativen Zustand von der Stabilität des G3P* abhängen. Um diesen Zusammenhang genauer zu analysieren, wurden verschiedene G3P*-Varianten untersucht, deren Mutationen den globulären Teil von N2 oder die Gelenkregion zwischen den beiden Domänen stabilisieren bzw. destabilisieren. Abbildung 3-34 zeigt die Tertiärstruktur von G3P* mit den Positionen der ausgewählten Mutationen.

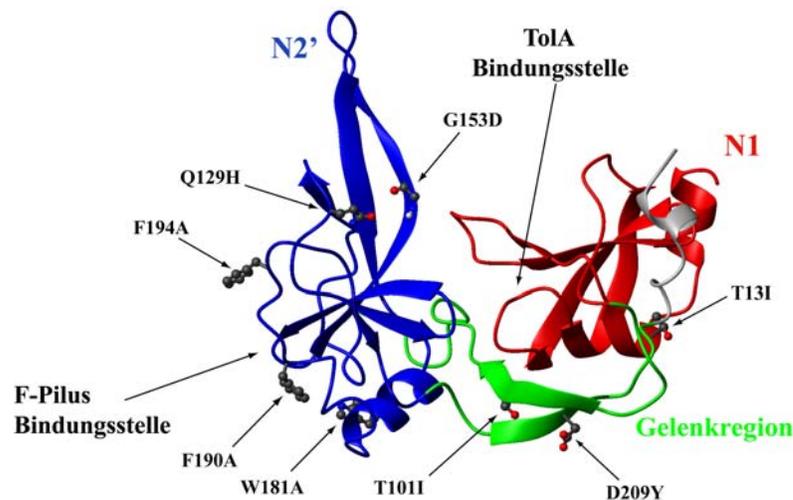


Abbildung 3-34: Tertiärstruktur von G3P*. Domäne N1 ist in rot, der globuläre Teil der Domäne N2 (N2') in blau und die Gelenkregion in grün dargestellt. Die Positionen der ausgewählten Mutationen sind als Kugel-Stab-Modell gezeigt. Die Bindungsstellen für den F-Pilus und TolA-C sind gekennzeichnet. Die Abbildung wurde auf Grundlage der Kristallstrukturdaten von Holliger *et al.* (1999; PDB-Eintrag: 2G3P) mit dem Programm MolMol (Koradi *et al.*, 1996) erstellt.

Die Stabilität der verschiedenen G3P*-Varianten wurde in thermischen Entfaltungsübergängen bestimmt (Abbildung 3-35a); die aus der Analyse erhaltenen Daten und Schmelzpunkte sind in Tabelle 3-12 aufgeführt. Die Variante 3A-G3P* besitzt, wie unter 3.2.1 beschrieben, die Mutationen W181A, F190A und F194A. Diese Mutationen verhindern die Bindung der N2-Domäne an den F-Pilus (Deng & Perham, 2002, 3.2.1) und wirken zudem destabilisierend. Da die Mutationen ausschließlich in der N2-Domäne lokalisiert sind, wird nur die Stabilität von N2 beeinflusst. Der Schmelzpunkt ist im Vergleich zum WT-Protein um 5,5 °C auf 42,6 °C erniedrigt, die Stabilität von N1 entspricht der des WT-Proteins. Die Mutation G153D verringert ebenfalls die Stabilität von N2 ($T_M = 44,4$ °C). Sie befindet sich

an der Grenzfläche zwischen den beiden Domänen und führt vermutlich zu einer schwächeren Interaktion von N2 und N1 und damit zur Destabilisierung von N2. Position 129 befindet sich im globulären Teil von N2 auf der von N1 abgekehrten Seite. Die Mutation Q129H führt zu einer Stabilisierung der N2-Domäne um 3,3 °C ($T_M1 = 51,4$ °C), die Stabilität der N1-Domäne wird erwartungsgemäß nicht beeinflusst. Gln129 ist zudem weit von der Gelenksubdomäne entfernt und hat deshalb keinen Einfluss auf deren Stabilität, so dass die Q129H-Variante den Einfluss der Stabilisierung von N2' auf die Bindung von TolA-C-AEDANS wiedergibt.

Die Gelenkregion wurde durch die Mutationen T101I und D209Y in den beiden β -Faltblattsträngen stabilisiert. Der Schmelzpunkt der N2-Domäne beträgt für diese Variante (IY-G3P*) 56,5 °C. Der T_M -Wert der N1-Domäne weicht mit 60,0 °C von den T_M -Werten für WT-N1 anderer Varianten ab, was allerdings auf Ungenauigkeiten in der Datenanalyse zurückzuführen ist. Durch die Stabilisierung der N2-Domäne sind die Entfaltungsübergänge von N1 und N2 nicht mehr deutlich genug getrennt, um eine zuverlässige Datenanalyse nach dem Dreizustandsmodell zu gewährleisten (Beasty *et al.*, 1986). Die Variante T101I-Q129H-D209Y-G3P* (IHY-G3P*) kombiniert die stabilisierenden Mutationen in der Gelenkregion und im globulären Teil von N2, so dass N2 in dieser Variante eine ähnlich hohe Stabilität wie N1 besitzt. Die thermische Entfaltung dieser Variante verläuft nicht mehr zweiphasig, wie für labilere G3P*-Varianten beobachtet, sondern in einem hochkooperativen einphasigen Übergang, da die Domänen dissoziation nun nicht nur mit der Entfaltung von N2, sondern auch mit der Entfaltung der N1-Domäne gekoppelt ist. Eine Angabe thermodynamischer Parameter ist für diese Variante nicht möglich. Der angegebene Schmelzpunkt von 60,0 °C entspricht der Temperatur bei 50% Signaländerung und stellt nur einen apparenten Wert zum qualitativen Vergleich mit den anderen Varianten dar. Derartige hochkooperative Übergänge konnten auch für G3P*-Varianten beobachtet werden, in denen der Ersatz der beiden Disulfidbrücken in N1 (C7-C36 und C46-C53) die Stabilität dieser Domäne stark verringerten und somit in den Stabilitätsbereich von N2 brachten (Kather *et al.*, 2005).

Wird die N1-Domäne durch eine zusätzliche Mutation wie in der Variante IIHY-G3P* (Martin & Schmid, 2003a) stabilisiert, verläuft die thermische Entfaltung erneut in zwei getrennten Übergängen, und eine thermodynamische Analyse ist wieder möglich. Die Mutation T13I erhöht den Schmelzpunkt der N1-Domäne auf 67,5 °C, der Schmelzpunkt von N2 beträgt 61,5 °C.

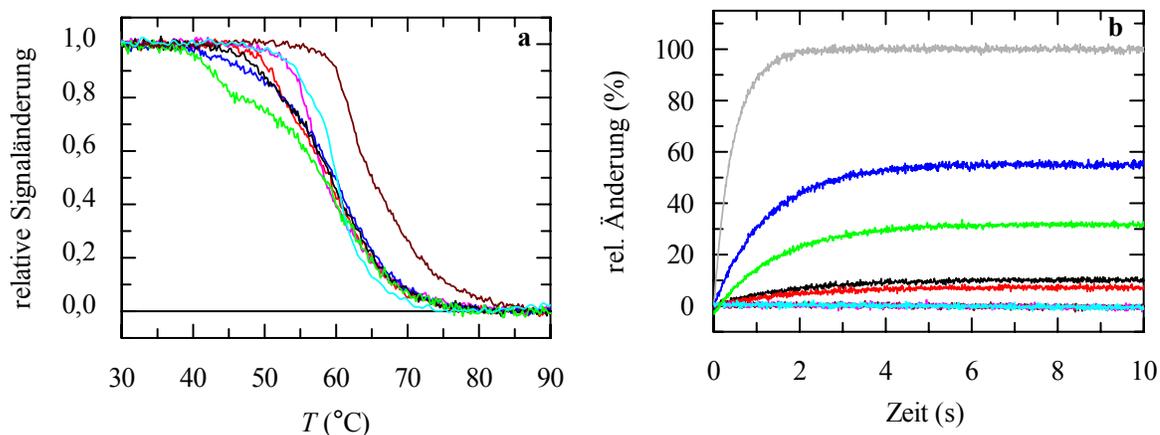


Abbildung 3-35: (a) Thermische Stabilität von WT-G3P* (—) sowie der G3P*-Varianten 3A (—), G153D (—), Q129H (—), IY (—), IHY (—) und IIHY (—). Aufgetragen ist die relative Änderung des CD-Signals bei 230 nm in Abhängigkeit von der Temperatur nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell. Die Übergänge wurden mit 4 μM Protein in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die aus der Analyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-12 aufgeführt. (b) Assoziation der jeweiligen G3P*-Varianten (2 μM) im nativen Zustand mit 0,5 μM TolA-C-AEDANS. Die Bindung von 2 μM isolierter Domäne T13I-N1 an 0,5 μM TolA-C-AEDANS (—) diente dabei als Kontrolle. Die Assoziation wurde anhand der Fluoreszenzänderung oberhalb von 460 nm nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 10 nm) verfolgt. Die Messungen wurden mittels *stopped-flow*-Mischung in 0,5 M GdmCl, 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C durchgeführt.

Tabelle 3-12: Stabilitätsdaten für WT-G3P* und dessen Varianten aus der thermischen Entfaltung.

G3P*-Variante	Domänen dissoziation und Entfaltung von N2			Entfaltung von N1		
	T_{M1} (°C)	ΔH_D (kJ·mol ⁻¹)	$\Delta G_D^{55^\circ\text{C}}$ (kJ·mol ⁻¹)	T_{M2} (°C)	ΔH_D (kJ·mol ⁻¹)	$\Delta G_D^{60^\circ\text{C}}$ (kJ·mol ⁻¹)
WT	48,1	411	-9,5	60,2	230	0,1
3A	42,6	434	-19,3	60,3	230	0,2
G153D	44,4	255	-10,3	60,6	227	0,4
Q129H	51,4	521	-1,1	60,8	249	0,6
IY	56,5	574	2,2	60,9	211	0
IHY	60,0	-	-	-	-	-
IIHY	61,5	642	11,9	67,5	205	4,4

Angegeben sind die Schmelztemperaturen T_M , die Enthalpien der Entfaltung am Übergangsmittelpunkt ΔH_D sowie die freien Enthalpien der Entfaltung $\Delta G_D^{55^\circ\text{C}}$ bei 55 °C und $\Delta G_D^{60^\circ\text{C}}$ bei 60 °C für WT-G3P* und die G3P*-Varianten. Die T_M -Werte geben die Mittelpunkte des ersten bzw. zweiten Übergangs im biphasischen Entfaltungsübergang von G3P* nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell an. Der erste Übergang reflektiert die Dissoziation der Domänen und die Entfaltung der Domäne N2, der zweite Übergang die Entfaltung der N1-Domäne. Für die Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde eine konstante Änderung der Wärmekapazität von $\Delta C_p = 10000 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ für N2 bzw. $\Delta C_p = 1000 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ für N1 angenommen. Für die IHY-Variante sind die Übergänge nicht zu trennen. Da in diesem Fall eine thermodynamische Analyse nicht möglich ist, ist nur ein apparenter T_M -Wert angegeben, welcher die Temperatur bei 50% Signaländerung angibt.

In Abbildung 3-35b ist die Bindung der G3P*-Varianten (je 2 μM) an 0,5 μM TolA-C-AEDANS unter Nativbedingungen (0 M GdmCl, 25 °C) dargestellt. Die Bindung der isolierten T13I-N1-Domäne diente als Kontrolle und gibt die maximale Amplitude unter den gegebenen Messbedingungen an. Die destabilisierten Varianten G153D-G3P* und 3A-G3P* führten zur stärksten Änderung der AEDANS-Fluoreszenz (Tabelle 3-14). Die gemessenen Amplituden entsprechen 55% bzw. 35% der Amplitude für die Bindung der isolierten N1-Domäne. Für WT-G3P* und die in N2' stabilisierte Variante Q129H konnten relative Amplituden von 10% bzw. 7,2% bestimmt werden. Die stabilisierten Mutanten IY-, IHY- und IIHY-G3P*, deren Mittelpunkte des thermischen Entfaltungsübergangs oberhalb von 56 °C liegen, zeigten keine Bindung an TolA-C-AEDANS.

Anhand der detektierten Amplituden konnte, unter Berücksichtigung des K_D -Wertes von 490 nM, für jede G3P*-Variante der Anteil an Protein errechnet werden, der in der aktiven, dissoziierten Form mit entfalteter Gelenkregion vorliegt und deshalb an TolA-C-AEDANS binden kann (Tabelle 3-14). Demnach liegen 30,6% von G153D-G3P* und 13,5% von 3A-G3P* in einer offenen Konformation mit dissoziierten Domänen vor. Im WT-Protein und der stabilisierten Variante Q129H sind in 2,8% bzw. 1,9% aller Moleküle die Domänen dissoziiert. Der für WT-G3P* berechnete Anteil von 2,8% (in 0 M GdmCl) ist dabei konsistent mit dem zuvor bestimmten Wert von 5,8% in 0,5 M GdmCl. Eine GdmCl-Konzentration von 0,5 M führt vermutlich zu einer Erhöhung des Anteils offener Moleküle, da der Mittelpunkt des GdmCl-induzierten Übergangs von N2 mit 1,4 M GdmCl ohnehin relativ niedrig ist (Martin & Schmid, 2003a). Für die drei stabilsten Varianten kann keine Bindung an TolA-C-AEDANS unter Nativbedingungen detektiert werden. Dies belegt, dass hier keine aktiven Moleküle mit dissoziierten Domänen vorliegen, d.h. die Bindungsstelle für TolA-C auf N1 stets durch die N2-Domäne blockiert ist.

Anhand der untersuchten Varianten zeigt sich deutlich, dass die Amplitude der TolA-Bindung und damit der relative Anteil der partiell entfalteten, aktiven Form mit dissoziierten Domänen von der Stabilität der jeweiligen G3P*-Mutante abhängt. Je stabiler das G3P*, umso weniger Moleküle liegen in der offenen Konformation mit entfalteter Gelenkregion und dissoziierten Domänen vor. Die Bindungsexperimente unter Nativbedingungen zeigen zudem, dass alle aktiven Varianten mit der gleichen Rate ($0,6 \text{ s}^{-1}$) an TolA-C-AEDANS binden. Diese Rate stimmt gut mit der Geschwindigkeitskonstanten überein, die unter den gleichen Bedingungen für die Bindung der isolierten N1-Domäne an TolA-C-AEDANS erhalten wurde. Dies deutet darauf hin, dass für diese Varianten ein Teil der Moleküle tatsächlich bereits in der aktiven, partiell entfalteten Konformation vorliegen und diese Konformation nicht erst durch Bindung an TolA-C induziert werden muss.

Über die Bindung an TolA-C-AEDANS wird der Anteil an partiell entfaltetem G3P* nur indirekt bestimmt. Moleküle mit dissoziierten Domänen und entfalteter Gelenksubdomäne können jedoch auch direkt anhand ihrer Entfaltungskinetik nachgewiesen werden. N1 entfaltet als isolierte Domäne bzw. im Intermediat mit dissoziierten Domänen innerhalb weniger Millisekunden, die Assoziation mit der N2-Domäne im nativen Protein verlangsamt diese

Entfaltung durch die Wechselwirkung zwischen den Domänen jedoch deutlich (Martin & Schmid, 2003b, 3.1.1.2). Um festzustellen, ob neben der langsamen Entfaltungsreaktionen für Moleküle mit fest assoziierten Domänen auch schnelle Reaktionen detektiert werden können, wurden Entfaltungsreaktionen von WT-G3P* bzw. der Varianten G153D-, 3A- und IIHY-G3P* ausgehend vom nativen Zustand durch *stopped-flow*-Mischung untersucht. Zum Vergleich wurde die schnelle Entfaltungsreaktion der isolierten N1-Domäne sowie der bereits gefalteten N1-Domäne im kinetischen Rückfaltungsintermediat mit noch entfalteter N2-Domäne bestimmt.

Die Entfaltungskinetik der N1-Domäne im isolierten Zustand und im Intermediat konnte jeweils durch eine monoexponentielle Funktion angeglichen werden. Die Entfaltungsreaktion der nativen Proteine wurde dagegen mit Hilfe einer doppel-exponentiellen Funktion angeglichen, wobei die Amplitude der ersten schnellen Entfaltungsphase den Anteil der offenen Moleküle mit dissoziierten Domänen widerspiegelt. Für WT, 3A- und G153D-G3P* wurde die Entfaltung in 3 M GdmCl durchgeführt. Die stabilisierte Variante IIHY-G3P* wurde in 5,5 M GdmCl entfaltet, um eine gute Signaländerung innerhalb der Messzeit der *stopped-flow*-Mischung zu ermöglichen. Abbildung 3-36 zeigt die Entfaltungskinetik der N1-Domäne im isolierten Zustand, im Zustand mit dissoziierten Domänen sowie im nativen Protein.

In der Tat zeigten im WT-Protein ca. 5,3% aller Moleküle eine schnelle Entfaltungskinetik mit einer Zeitkonstante von 22 ms, die der Zeitkonstanten der N1-Domäne in isolierter Form bzw. im Intermediat mit dissoziierten Domänen entspricht. Der so ermittelte Anteil geöffneter Moleküle stimmt also gut mit den Werten überein, die aus der Bindung des nativen Proteins an TolA-C-AEDANS in 0 bzw. 0,5 M GdmCl (Abbildung 3-35b bzw. 3-32) erhalten wurden. Im Fall der destabilisierten Varianten 3A- und G153D-G3P* entfalten 22% bzw. 32% in einer schnellen Reaktion, wobei auch hier die Werte aus der Entfaltung gut mit denen aus der TolA-C-Bindung übereinstimmen. Im Gegensatz dazu konnte in der stabilisierten Variante IIHY-G3P* keine schnelle Entfaltungsreaktion beobachtet werden. Die fehlende schnelle Entfaltungsreaktion in nativem IIHY-G3P* zeigt, dass in allen Molekülen die Entfaltung durch die Domänen-dissoziation limitiert und damit N1 in seiner Entfaltungsreaktion verlangsamt wird. Damit sind in allen Molekülen die beiden Domänen fest miteinander assoziiert, weshalb im nativen Protein die TolA-Bindungsstelle auf N1 unzugänglich ist und keine Bindung an den Rezeptor beobachtet werden kann.

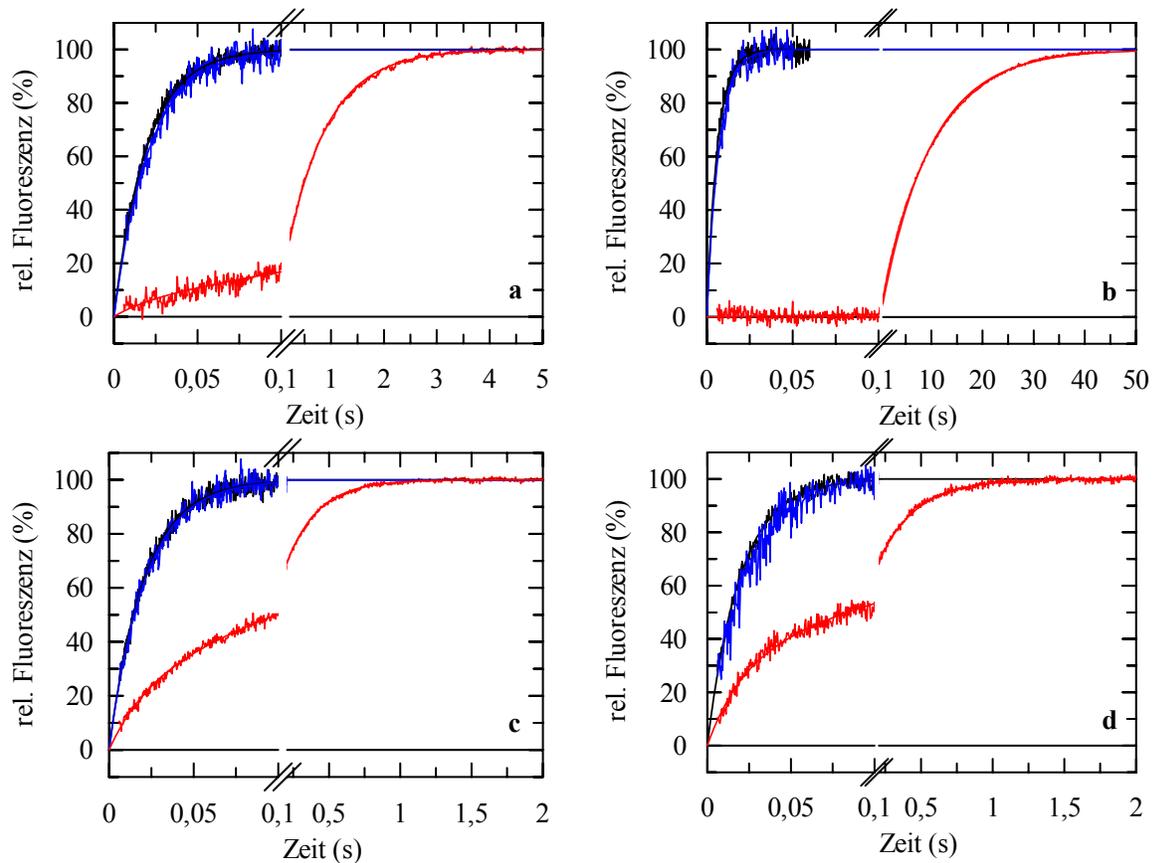


Abbildung 3-36: Entfaltungskinetik der isolierten N1-Domäne (—) bzw. der N1-Domäne in G3P* im nativen (—) und geöffneten (—) Zustand für (a) WT-G3P*, (b) IIHY-G3P*, (c) 3A-G3P* und (d) G153D-G3P*. Die Entfaltung von WT-G3P*, 3A-G3P*, G153D-G3P* und WT-N1 erfolgte in 3 M GdmCl, 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, die Entfaltung von IIHY-G3P* und T131-N1 in 5,5 M GdmCl, 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0. Die Entfaltung von G3P* im geöffneten Zustand wurde nach 1 s-Rückfaltung (bei 0,5 M GdmCl) des zuvor entfaltenen Proteins gemessen. Die Signaländerungen der Reaktionen sind normiert dargestellt. Die Linien repräsentieren den Angleich an die experimentellen Daten mit mono- bzw. doppeltexponentiellen Funktionen. Die Reaktionen wurden anhand der Änderung der Tryptophanfluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 295 nm (Bandbreite 10 nm) verfolgt. Alle Messungen wurden mit 0,5 μ M Protein in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C durchgeführt.

Die Entfaltungsreaktionen des nativen Proteins bestätigen die Ergebnisse aus den Bindungsexperimenten. Die instabileren G3P*-Varianten können zu einem geringen Teil mit TolA-C interagieren, d.h. in einem Teil der Moleküle ist die Bindungsstelle auf N1 exponiert. Dieser aktive, offene Zustand des G3P* wird durch eine Entfaltung der Gelenkregion und die damit gekoppelte Domänendissoziation erzeugt. Entsprechend zeigen diese offenen Moleküle eine schnelle Entfaltungsreaktion, die der Entfaltung der isolierten N1-Domäne entspricht. Die Amplitude der schnellen Entfaltungsreaktion bzw. die Amplitude bei der Bindung an TolA-C entspricht also dem relativen Anteil partiell entfalteter, aktiver Moleküle mit dissoziierten Domänen. Dieser Anteil korreliert mit der Stabilität der jeweiligen G3P*-Variante. Da die Aktivierung und die Domänendissoziation mit einer Entfaltung der

Gelenkregion (und vermutlich auch der N2-Domäne) einhergeht (3.1.2), wird der Anteil an aktivem Protein durch Mutationen verringert, die N2 oder die Gelenksubdomäne stabilisieren. Entsprechend erhöhen Mutationen, die zu einer Destabilisierung der N2-Domäne führen, die relative Zahl offener, aktiver Moleküle.

3.3.3.3 Die Faltung von G3P* führt zur Freisetzung von TolA-C aus dem Komplex mit N1

Die bisherigen Ergebnisse zeigen deutlich, dass ein Komplex mit TolA-C nur gebildet wird, wenn die Bindungsfläche auf N1 zugänglich ist. Entsprechend kann die isolierte N1-Domäne mit hoher Affinität an TolA-C-AEDANS binden. Im Verlauf der *in vitro*-Rückfaltung von G3P* wird ein kinetisches Intermediat populiert, das ähnlich gut an TolA-C-AEDANS binden kann, da lediglich Domäne N1 gefaltet vorliegt (Abbildung 3-32). Durch die folgende Faltung von N2' innerhalb von etwa 3 min und die mit der Faltung der Gelenksubdomäne gekoppelte Domänenassoziation innerhalb weniger Stunden geht diese TolA-bindungskompetente, offene Form von G3P* verloren. Um dies genauer zu untersuchen, wurde G3P* wie zuvor in 3.3.3.1 in 5 M GdmCl entfaltet und anschließend in Gegenwart von TolA-C-AEDANS rückgefaltet. Die Rückfaltung wurde diesmal jedoch durch manuelle Mischung initiiert, und die Änderung der AEDANS-Fluoreszenz über einen langen Zeitraum verfolgt (Abbildung 3-37a).

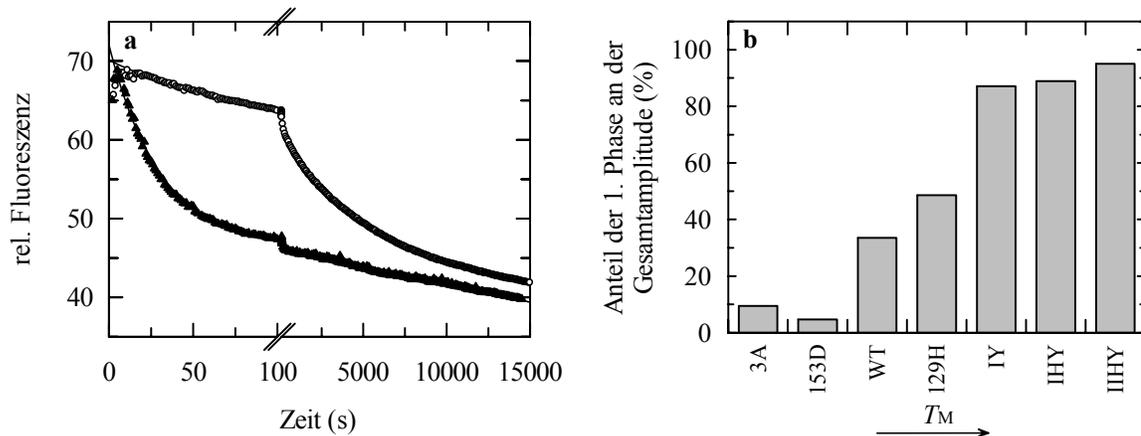


Abbildung 3-37: Freisetzung von TolA-C aus dem Komplex mit N1 bei Rückfaltung von G3P*. (a) Die Kinetik der TolA-C-Freisetzung bei Rückfaltung von WT-G3P* (○) bzw. IIHY-G3P* (▲) wurde nach zehnfacher Verdünnung des entfalteten Proteins (10 μ M in 5 M GdmCl, 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0) in Gegenwart von 1 μ M TolA-C-AEDANS gemessen. Die Wechselwirkung zwischen N1 und TolA-C-AEDANS wurde mittels FRET zwischen den Trp-Resten in N1 und dem AEDANS-Farbstoff in TolA-C verfolgt. Die AEDANS-Fluoreszenz wurde bei 490 nm (Bandbreite 10 nm) nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 5 nm) und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die Experimente wurden in 0,5 M GdmCl, 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C durchgeführt. Die Linien zeigen den Angleich einer mono- (IIHY-G3P*) bzw. doppeltexponentiellen (WT-G3P*) Funktion an die experimentelle Daten. (b) Dargestellt ist der relative Anteil der TolA-C-Freisetzung der ersten Rückfaltungsphase an der Gesamtamplitude für die verschiedenen G3P*-Varianten.

Die Faltung der N1-Domäne und die anfängliche Bindung an TolA-C-AEDANS erfolgen innerhalb der Totzeit der manuellen Mischung (Abbildung 3-32), so dass die mit der Komplexbindung verbundene Fluoreszenzzunahme nicht verfolgt werden kann (3.3.1). Im Verlauf der weiteren Rückfaltung von G3P* nimmt die AEDANS-Fluoreszenz ab, was auf eine Freisetzung von TolA-C-AEDANS aus dem Komplex mit N1 zurückzuführen ist. Diese Freisetzung des Rezeptors erfolgt für WT-G3P* in einem zweiphasigen Prozess. Der Angleich der experimentellen Daten an eine doppeltexponentielle Reaktion lieferte Zeitkonstanten von 92 s und 5300 s. Die Zeitkonstante der ersten Phase entspricht dabei der langsameren Rückfaltungsreaktion von N2 ($\tau = 67$ s), die anhand der Tyrosinfluoreszenz verfolgt werden kann. Im Faltungsmechanismus wurde dieser Rückfaltungsreaktion eine lockere Assoziation der beiden Domänen zugeschrieben. In dem dadurch entstehenden Intermediat wechselwirken N1 und N2 miteinander, die Gelenkregion ist aber noch ungefaltet und Pro213 liegt in der nicht-nativen *trans*-Konformation vor, so dass der Großteil der Interaktionen zwischen den Domänen noch nicht ausgebildet ist. Entsprechend besitzt die beobachtete erste Phase der TolA-C-AEDANS-Freisetzung nur ca. 33,5% der Fluoreszenzamplitude, da durch die Ausbildung lockerer Kontakte zwischen N1 und N2 nur ein geringer Anteil des TolA-C-AEDANS aus dem Komplex mit N1 verdrängt wird. Der Hauptanteil des gebundenen TolA-C-AEDANS wird in der zweiten Phase freigesetzt. Diese Phase besitzt eine Zeitkonstante von 5300 s und spiegelt die *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 und die damit gekoppelte Faltung der Gelenksubdomäne wider. Durch die Prolinisisomerisierung und die Faltung der Gelenkregion kommt es zur festen Assoziation der beiden Domänen, wodurch die TolA-Bindungsstelle auf N1 durch N2 blockiert und TolA-C-AEDANS aus dem Komplex mit N1 freigesetzt wird.

Die Kinetik der TolA-C-Freisetzung liefert somit Auskunft über die beiden Prozesse, die zur Assoziation der beiden Domänen im G3P* führen: die zunächst lockere Bindung von N2' an N1 und die mit der Isomerisierung an Pro213 gekoppelte Faltung der Gelenkregion, die letztlich zum "Einrasten" der beiden Domänen in der nativen Konformation führt.

Die Verdrängung von TolA-C-AEDANS während der Rückfaltung von G3P* wurde auch für die zuvor beschriebenen Varianten 3A-, G153D-, Q129H-, IY-, IHY- und IIHY-G3P* untersucht. Da in allen Varianten die unmittelbare Sequenzumgebung von Pro213 unverändert ist, zeigen sie die langsame *trans*→*cis*-Isomerisierung und die damit gekoppelte Faltung der Gelenkregion. Die Zeitkonstante der langsamen Reaktion ist also gegenüber dem WT-Protein unverändert, und auch die Zeitkonstante der ersten Phase, welche die Ausbildung lockerer Kontakte zwischen den beiden Domänen widerspiegelt, wird durch die Mutationen nur wenig beeinflusst. Allerdings variiert das Verhältnis der Amplituden der beiden Phasen für die verschiedenen Varianten sehr deutlich (Abbildung 3-37b und Tabelle 3-14). Für die destabilisierte Variante 3A-G3P* beträgt der Anteil der ersten Phase nur 9,5% im Vergleich zu 33,5% im WT-Protein. Noch deutlicher ist diese Abnahme im Falle der Mutation G153D (4,7%). Gly153 befindet sich im globulären Teil von N2 in der Kontaktfläche der beiden Domänen. Die Substitution des Glycins durch das größere Aspartat stört vermutlich die

Ausbildung lockerer Kontakte in der ersten Phase der Domänenassoziation. Dementsprechend wird nur ein geringer Anteil an TolA-C-AEDANS bei dieser ersten Phase freigesetzt.

Im Gegensatz dazu führt eine Stabilisierung der N2-Domäne und der Gelenkregion, zu einer vermehrten Freisetzung von TolA-C-AEDANS in der ersten Reaktion. Der Anteil der Amplitude an der Gesamtsignaländerung steigt für Q129H-G3P* auf 48,6%, für die Mutanten IY- und IHY-G3P* auf ca. 90%. In der am stärksten stabilisierten Variante IIHY-G3P* wird das gesamte TolA-C-AEDANS innerhalb dieser ersten Phase verdrängt (Abbildung 3-37a). Die hier beobachtete lineare Abnahme der AEDANS-Fluoreszenz bei langen Rückfaltungszeiten ist auf eine Zerstrahlung des Farbstoffs zurückzuführen, die bei der Analyse aller Varianten berücksichtigt werden musste. Die TolA-C-Verdrängung aus dem Komplex mit N1 der verschiedenen G3P*-Varianten zeigt, dass die Amplitude der ersten Phase mit dem Mittelpunkt der ersten Entfaltungsreaktion des G3P* korreliert, in der die Domänen dissoziieren und die damit gekoppelte Entfaltung von N2 erfolgt. Je höher der Schmelzpunkt, umso mehr TolA-C wird bei der lockeren Assoziation der Domänen verdrängt (Abbildung 3-37b). Die relative Amplitude der TolA-C-Freisetzung in dieser Phase ist somit ein Maß für die Stärke der Interaktion zwischen den beiden Domänen in G3P*.

Die zweite Phase der TolA-C-Verdrängung spiegelt die Faltung der Gelenkregion und die damit verbundene Isomerisierung an Pro213 wider. Wie bereits in 3.1.1.2 gezeigt, kann die Isomerisierungsrate an Pro213 durch Mutation der benachbarten Reste Q212 und P214 bzw. durch Mutation des Pro213 selbst verändert werden. Die Freisetzung von TolA-C-AEDANS im Verlauf der Rückfaltung wurde für die G3P*-Varianten Q212A, P213G und P214A untersucht. Für alle Varianten konnte ein zweiphasiger Verlauf der Signaländerung beobachtet werden, wobei die zweite Phase den Hauptanteil der Gesamtamplitude ausmachte, d.h. der größte Teil des TolA-C-AEDANS wird in dieser Reaktion verdrängt. Die erste Phase, die der Ausbildung lockerer Kontakte zwischen den Domänen zuzuordnen ist, zeigte für alle Varianten eine Zeitkonstante von ca. 92 s, während sich die Zeitkonstanten der zweiten Phase je nach Variante unterschieden. Für die Mutanten Q212A- und P214A-G3P* konnten Zeitkonstanten von 3200 s bzw. 1300 s ermittelt werden. Diese stimmen jeweils gut mit den Zeitkonstanten überein, die anhand von Doppelmischexperimenten für die Domänenassoziation gemessen wurden (Tabelle 3-13). Die für P213G-G3P* erhaltene Zeitkonstante von 570 s entspricht ebenfalls der im Zweischritt-Entfaltungstest bestimmten Zeitkonstante von 240 s (3.1.1, Martin & Schmid, 2003c). In diesem Fall ist der doppelte exponentielle Verlauf der Kinetik jedoch nur schlecht zu erkennen, da sich die Raten der beiden Phasen nur um den Faktor 3 unterscheiden. Dies erklärt auch die Abweichung der anhand der TolA-C-Freisetzung bestimmten Rate von der im Doppelmischexperiment erhaltenen Rate.

Die Analyse dieser Mutanten verdeutlicht, dass die Raten der TolA-C-Verdrängung generell den Raten der Prolinisomerisierungsreaktion aus den Doppelmischexperimenten entsprechen. Die G3P*-Varianten zeigen eine beschleunigte Isomerisierungsreaktion, und entsprechend wird auch TolA-C-AEDANS schneller aus dem Komplex mit N1 verdrängt. Tabelle 3-13

vergleicht die aus den verschiedenen Experimenten erhaltenen Zeitkonstanten der Isomerisierungsreaktion.

Tabelle 3-13: Vergleich der anhand verschiedener Messmethoden erhaltenen Zeitkonstanten der Domänenassoziation für verschiedene G3P*-Varianten.

G3P-Variante	Zeitkonstante τ der Domänenassoziation (s)		
	Zweischritt-Entfaltungstest	TolA-C-Verdrängung	Phageninaktivierung
WT	6 200	5 300	5 900
G153D-WT	6 600	5 600	
Q212A-WT	3 400	3 200	3 700
P213G-WT	240	570	< 300
P214A-WT	1 900	1 300	2 100

Angegeben sind die Zeitkonstanten der Domänenassoziation für die verschiedenen G3P*-Varianten. Im Doppelmischexperiment wurde die Zeitkonstante *in vitro* mittels des Zweischritt-Entfaltungstests für native Moleküle bestimmt (3.1.1.2, Abbildung 3-7). Bei der TolA-C-AEDANS-Verdrängung im Verlauf der Rückfaltung von G3P* gibt die zweite Phase die Zeitkonstante der Domänenassoziation wieder (3.3.3.3, Abbildung 3-37). Die Infektiosität der Phagen gegenüber F⁻-Zellen nimmt mit zunehmender Rückfaltungszeit ab; die Zeitkonstante dieser Abnahme entspricht ebenfalls der Geschwindigkeitskonstanten der Domänenassoziation (3.1.1.4, Abbildung 3-13).

Die Blockierung der TolA-Bindungsstelle auf N1 durch N2 und die damit verbundene Freisetzung von TolA-C-AEDANS stellt somit eine weitere Möglichkeit dar, die Rate der Prolinisomerisierung und der Domänenassoziation zu bestimmen. Die gemessene Rate entspricht der anhand von Doppelmischexperimenten bestimmten Rate der *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass auch der Verlust der Phageninfektiosität gegenüber F⁻-Zellen die gleiche Kinetik aufweist. In Abbildung 3-38 ist ein Vergleich der mit den verschiedenen Messmethoden erhaltenen Daten dargestellt.

Die Faltung der Gelenkregion konnte anhand der Änderung des CD-Signals verfolgt werden; die zugehörige Rate entspricht der Isomerisierungsrate. Die Daten dieser Faltungsanalyse wurden entsprechend normiert und sind ebenfalls in Abbildung 3-38 gezeigt. Die *in vitro* bestimmten Rückfaltungsraten stimmen also mit der Rate für den Verlust der Funktionalität, d.h. der Abnahme der Infektiosität gegenüber F⁻-Zellen sowie der Freisetzung des Rezeptors TolA-C überein. Im Verlauf der G3P-Rückfaltung *in vitro* bzw. in Gegenwart der F⁻-Zellen *in vivo* wird ein Intermediat gebildet, in dem die beiden Domänen N1 und N2 dissoziiert vorliegen. In dieser aktiven Form von G3P besitzt Pro213 die nicht-native *trans*-Konformation und die Gelenkregion liegt entfaltet vor. Dies bedeutet, dass die Bindungsstelle für TolA-C auf N1 zugänglich ist, d.h. eine Bindung von N1 an TolA-C möglich ist. *In vivo* können die Phagen in diesem Zustand an TolA-C der F⁻-Zellen binden, *in vitro* führt diese Form zu einer transienten Bindung von N1 an TolA-C-AEDANS. Mit längerer Rückfaltungszeit liegt die Gelenkregion zunehmend gefaltet und Pro213 in der *cis*-

Konformation vor, und die Phagen verlieren ihre Infektiosität gegenüber F^- -Zellen bzw. TolA-C-AEDANS wird freigesetzt, wenn N2 fest mit N1 assoziiert.

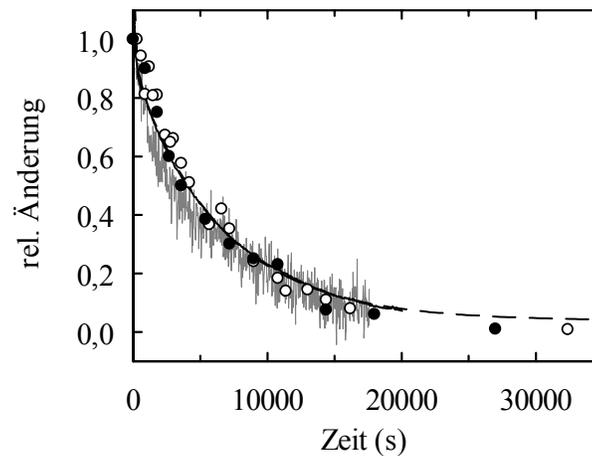


Abbildung 3-38: Vergleich der verschiedenen Messmethoden zur Bestimmung der Kinetik der Domänenassoziation. Dargestellt ist der Zeitverlauf der prolinlimitierten Domänenassoziation in WT-G3P*, die anhand des Zweischritt-Entfaltungstests für native Moleküle bestimmt wurde (○, 3.1.1.2), sowie die Kinetik der Phageninaktivierung (●, 3.1.1.4). Die Faltung der Gelenkregion wurde anhand der Änderung des CD-Signals bei 211 nm verfolgt (—, 3.1.2.1). Der Zeitverlauf der Freisetzung von TolA-C-AEDANS bei Rückfaltung von G3P* (---, 3.3.3.3) ist ebenfalls gezeigt. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Angleich an die experimentellen Daten der TolA-C-Freisetzung.

3.3.4 Die Phageninfektiosität korreliert mit der G3P-Stabilität

Da die Aktivierung der Phagen für die Infektion mit einer partiellen Entfaltung der Gelenkregion einhergeht, sollte hierfür neben der Isomerisierungskinetik an Pro213 auch die Stabilität des G3P, insbesondere der N2-Domäne und der Gelenkregion, entscheidend sein. Stabilisierende Mutationen sollten also die Infektiosität verringern, indem sie die Entfaltung der Gelenkregion erschweren. Um die Bedeutung der Entfaltung der Gelenkregion für die Infektion zu analysieren, wurde die Infektiosität von Phagen mit G3P-Varianten unterschiedlicher Stabilität bestimmt. Hierzu wurden die bereits in 3.3.3.2 gezeigten Mutanten G153D-, 3A-, Q129H, IY-, IHY- und IIHY-G3P verwendet, da sie die Stabilität von G3P* verändern, jedoch keinen Einfluss auf die Rate der Isomerisierungsreaktion und damit auf die Lebensdauer des aktiven Zustands mit dissoziierten Domänen besitzen. Die Infektiosität der entsprechenden Phagenvarianten wurde sowohl gegenüber dem F^+ -Stamm *E. coli* XL1Blue als auch gegenüber dem F^- -Stamm *E. coli* HB2156 (Riechmann & Holliger, 1997) bestimmt. In Tabelle 3-14 sind die jeweiligen Phagentiter sowie die Schmelzpunkte der G3P*-Varianten aufgelistet.

Tabelle 3-14: Infektiosität verschiedener Phagenvarianten und Stabilität der entsprechenden G3P*-Varianten.

G3P*- Variante	thermische Stabilität ^a		Phagentiter (cfu·ml ⁻¹) ^b		TolA- Verdrängung in der 1. Phase (%) ^c	Amplitude der TolA- Bindung (%) ^d	Anteil dissoziiertes Protein (%) ^e
	T_{M1} (°C)	T_{M2} (°C)	XL1B (F ⁺) (x 10 ⁻¹¹)	HB2156 (F ⁻) (x 10 ⁻⁵)			
WT	48,1	60,2	3,6	6,8	33,5	10	2,8
3A	42,6	60,3	< 0,0001	270	9,5	35	13,5
G153D	44,4	60,6	11	220	4,7	55	30,6
Q129H	51,4	60,8	3	1,7	48,6	7,2	1,9
IY	56,5	60,9	1,6	< 0,4	87,1	0	0
IHY	60,0	-	0,9	< 0,4	88,9	0	0
IIHY	61,5	67,5	0,4	< 0,4	100	0	0

^a Die T_M -Werte geben die Mittelpunkte des ersten bzw. zweiten Übergangs im biphasischen Entfaltungsübergang der G3P*-Varianten nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell an. Die Entfaltungsübergänge sind in Abbildung 3-35a dargestellt. Der erste Übergang reflektiert die Dissoziation der Domänen und die Entfaltung der Domäne N2, der zweite Übergang die Entfaltung der N1-Domäne. Für die Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde eine konstante Änderung der Wärmekapazität von $\Delta C_p = 10000 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ für N2 bzw. von $\Delta C_p = 1000 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ für N1 angenommen. Für die IHY-Variante sind die Übergänge nicht zu trennen. In diesem Fall ist nur ein apparenter T_M -Wert angegeben, der die Temperatur bei 50% Signaländerung angibt. ^b Die Phagentiter sind als Kolonie-bildende Einheiten für die Infektion von *E. coli*-Zellen mit bzw. ohne F-Pili angegeben. Die Fehlerbereich der angegebenen Daten liegt bei $\pm 10\%$. ^c Anteil von TolA-C-AEDANS, der bei der lockeren Assoziation von N1 und N2 (erste Phase der Reaktion) freigesetzt wird. ^d Anteil der gemessenen Amplitude bei Bindung von 2 μM nativem G3P* an 0,5 μM TolA-C-AEDANS (relativ zur Amplitude bei Bindung von 2 μM T13I-N1 an 0,5 μM TolA-C-AEDANS). ^e Angegeben ist der Anteil an dissoziiertem Protein, der sich aus den Amplituden der TolA-C-Bindung des nativen Proteins mit einem K_D -Wert von 490 nM berechnen lässt.

Im F⁺-Stamm XL1Blue führt die initiale Bindung der N2-Domäne an die Spitze des F-Pilus zur Domänen dissoziation und damit gekoppelt zur Isomerisierung des Pro213 in die nicht-native *trans*-Form. *Trans*-Pro213 hält die Phagen dann in der infektiösen Form mit dissoziierten Domänen im G3P. Phagen mit der 3A-Mutation im G3P können nicht an den F-Pilus binden, es erfolgt daher keine Pilus-induzierte Domänenöffnung und Aktivierung der Phagen für die Infektion. Die Phagen sind unter den vorliegenden Infektionsbedingungen praktisch inaktiv und der Phagentiter ist um mehr als 10⁴-fach verringert.

In den Infektionsexperimenten mit den verschiedenen Mutanten wurde deutlich, dass die Infektiosität gegenüber F⁺-Zellen umso geringer war, je höher der Schmelzpunkt des ersten Übergangs im thermischen Entfaltungsübergang war. Die Infektiosität der Phagen nimmt also durch eine erschwerte Domänen dissoziation ab. Folglich zeigten Phagen mit der stabilsten G3P*-Variante IIHY die niedrigste Infektiosität. Allerdings waren die beobachteten Effekte der Mutationen auf die Infektiosität nur gering.

Zwischen Phagen mit der instabilsten aktiven G153D- und der stabilsten IIHY-Variante von G3P wurde nur ein 30-facher Unterschied detektiert. Dies war zu erwarten, da mit Ausnahme des 3A-G3P-Phagen in allen Fällen die Domänen dissoziation und damit die Bildung der aktiven, partiell entfaltenen Form durch die Bindung an den F-Pilus vermittelt wird.

In Abwesenheit des F-Pilus kann diese Aktivierung nicht erfolgen, d.h. eine Infektion der F⁻-Zellen HB2156 beruht allein auf einer spontanen Domänen dissoziation in G3P. Entsprechend ist die Infektiosität der Phagen gegenüber F⁺-Zellen ungefähr 10⁵-fach geringer und hängt zudem von der Anwesenheit von 50 mM CaCl₂ im Infektionsansatz ab (3.1.1.4). Auch für F⁻-Zellen war die Infektiosität der Phagen umso höher, je schwächer die Wechselwirkungen zwischen den Domänen, d.h. je niedriger der Schmelzpunkt T_{M1} war. Im Gegensatz zur Infektion des F⁺-Stamms war der Unterschied zwischen den Varianten allerdings deutlicher. Vergleicht man zum Beispiel die destabilisierten G153D-G3P-Phagen mit den stabilisierten Q129H-G3P-Phagen, führt der Anstieg im Schmelzpunkt um 7 °C zu einer 130-fachen Abnahme in der Infektiosität der Phagen gegenüber F⁻-Zellen. Im Fall der F⁺-Zellen unterschieden sich die Phagentiter nur um einen Faktor von ca. 4.

Phagen mit 3A-G3P zeigten gegenüber F⁻-Zellen die größte Infektiosität, weil sie die niedrigste Stabilität aufweisen. Für Phagen mit den stabilisierten Varianten IY-, IHY- und IIHY-G3P konnte hingegen keine Infektion von F⁻-Zellen nachgewiesen werden. Die Phageninfektiosität nimmt also mit zunehmender Stabilität sehr stark ab. Mutationen im globulären Teil von N2 und in der Gelenksubdomäne haben dabei den gleichen Effekt auf die Phageninfektiosität, da die Domänen dissoziation und die Entfaltung von N2 in einem gekoppelten Prozess erfolgen. Die Infizierbarkeit des F⁻-Stamms HB2156 durch die verschiedenen Phagenvarianten stellt somit eine gute Sonde für die Stärke der Domäneninteraktion dar und bietet zudem die Möglichkeit, den Einfluss der Stabilisierung auf die Funktion des G3P *in vivo* zu analysieren.

Da Phagen mit einer schwächeren Domäneninteraktion F⁻-Zellen besser infizieren als WT-Phagen oder Phagen mit stabilisierten G3P-Varianten, sollten sich Phagen mit destabilisierten G3P-Varianten bei der wiederholten Infektion von *E. coli* HB2156 anreichern. Mittels einer fehlerbehafteten PCR wurde eine Bibliothek von Phagen erstellt, deren G3P Zufallsmutationen im Bereich der N2-Domäne und der Gelenkregion enthielten (2.6). Die Phagenbibliothek wurde zur Infektion von *E. coli* HB2156 eingesetzt, wobei zehn Zyklen aus Phageninfektion, -propagation und -präparation durchgeführt wurden. Die Infektiosität der Phagenbibliothek nahm während dieser Infektionsrunden etwa hundertfach zu. Nach jeder Infektionsrunde wurde die Bibliothek mittels PCR auf Volllänge des G3P hin untersucht, und nach der zehnten Infektionsrunde wurden einzelne Phagen sequenziert. In Abbildung 3-39 ist die Analyse der PCR anhand einer Agarose-Gelelektrophorese sowie ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des G3P einzelner Phagen dargestellt.

noch eine schwache Bande für das N1N2-Fragment zu erkennen, welches ab der vierten Infektionsrunde überhaupt nicht mehr detektiert werden konnte. Die Sequenzierung des G3P einzelner Phagen nach zehn aufeinanderfolgenden Infektionsrunden ergab, dass in allen fünf sequenzierten Phagen der komplette globuläre Teil von N2 sowie der Großteil der Gelenkregion durch Rekombination deletiert wurden. Der Anstieg in der Infektiosität im Verlauf der Infektionsrunden beruht also nicht auf der Selektion von Phagenvarianten mit schwächeren Domänenwechselwirkungen, sondern auf der Deletion der N2-Domäne. In den erhaltenen Phagenvarianten ist die Bindungsstelle für TolA-C demnach permanent zugänglich, und sie zeigen eine ähnlich hohe Infektiosität wie Phagen, in denen die N2-Domäne gezielt deletiert wurde. Zum einen bestätigen diese Ergebnisse, dass die Infektiosität gegenüber F⁻-Zellen niedrig ist, da die Assoziation der Domänen im geschlossenen, inaktiven Zustand die TolA-Bindungsstelle auf N1 blockiert und somit eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor verhindert. Zum anderen wird auch deutlich, dass die Deletion der N2-Domäne durch Rekombination die effizienteste Methode darstellt, um eine Interaktion von N1 und TolA und damit die Infektion von F⁻-Zellen zu ermöglichen.

Da filamentöse Phagen normalerweise F⁺-Zellen infizieren, ist eine Deletion von N2 *in vivo* nicht von Vorteil. Die Anwesenheit der N2-Domäne garantiert vermutlich eine hohe Proteasestabilität der Phagen in der geschlossenen Form mit assoziierten Domänen. Die Wechselwirkung mit dem F-Pilus führt dann zur Öffnung der Domänen und damit zur Aktivierung der Phagen. Die Pilus-Bindung der N2-Domäne dient somit wahrscheinlich der Erhöhung der lokalen Konzentration der Phagen an der Zelloberfläche. Daneben liefert sie aber auch das Signal, dass geeignete Wirtszellen vorhanden sind und eine Infektion erfolgen kann. Phagen ohne N2-Domäne sind zwar permanent für die Bindung an TolA-C aktiviert, zeigen aber im Vergleich zu WT-Phagen trotzdem eine geringere Infektiosität gegenüber F⁺-Zellen, da sie sich nicht durch Pilusbindung an der Zelloberfläche anreichern können. Die lokale Ankonzentrierung der Phagen durch die Interaktion mit dem F-Pilus ist folglich für eine effiziente Infektion von großer Bedeutung.

4 Zusammenfassende Diskussion

4.1 Pro213 wirkt als molekularer Schalter bei der Phageninfektion

4.1.1 Die lokale Aminosäuresequenz bestimmt die Rate der Prolinisomerisierung

Das G3P* filamentöser Phagen stellt ein gutes Modellsystem für Zweidomänenproteine dar, um die Bedeutung der relativen Stabilität der einzelnen Domänen und ihrer Wechselwirkungen für die Gesamtstabilität des Proteins und für den Faltungsmechanismus zu untersuchen. Bei der Entfaltung eines Zweidomänenproteins sind drei Prozesse zu erwarten: die Dissoziation der beiden Domänen, die Entfaltung der ersten und die Entfaltung der zweiten Domäne. Je nach Stabilität der Einzeldomänen kann ihre Entfaltung mit der Domänen dissoziation zusammenfallen. WT-G3P* bzw. die in dieser Arbeit untersuchten Varianten entfalten nach einem Dreizustandsmodell mit zwei getrennten Übergängen. Der erste Entfaltungsübergang spiegelt die Dissoziation der Domänen und die damit gekoppelte Entfaltung der instabileren N2-Domäne wider, der zweite Übergang die Denaturierung der stabileren N1-Domäne. Eine Ausnahme bildet die Variante IHY-G3P*. Durch die Mutationen Q129H im globulären Teil der N2-Domäne bzw. T101I und D209Y in der Gelenkregion ist die Domäne N2 so stark stabilisiert, dass sie die Stabilität der N1-Domäne erreicht. Im thermischen Übergang ist demnach nur ein einzelner, hochkooperativer Übergang zu beobachten, in dem die Dissoziation der beiden Domänen mit der Entfaltung des gesamten Proteins gekoppelt ist. Ein ähnliches Verhalten konnte für verschiedene G3P*-Varianten beobachtet werden, die aus der *in vitro*-Selektion einer stabilisierten disulfidfreien G3P*-Variante erhalten wurden (Kather *et al.*, 2005; Kather, 2007). Durch die Substitution der beiden Disulfidbrücken in N1 ist diese Domäne so stark destabilisiert, dass ihre native Faltung nur durch die Domäneninteraktion aufrechterhalten werden kann. Der Wegfall dieser Interaktion durch die Domänen dissoziation und die Entfaltung von N2 führt damit auch zur Denaturierung von N1. Der Zeitverlauf der Entfaltung beider Domänen wird durch die Domänen dissoziation limitiert. Sie ist langsamer als die Entfaltung der beiden Domänen im nicht-assoziierten Zustand.

Im Verlauf der *in vitro*-Rückfaltung falten N1 und N2 sehr schnell mit Zeitkonstanten von 10 ms bzw. 3 min (bei 25 °C), ihre Assoziation ist jedoch mit einer Zeitkonstante von 6200 s ausgesprochen langsam, da sie durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 in der Gelenksubdomäne bestimmt wird (Martin & Schmid, 2003b; Martin & Schmid, 2003c). Anhand der Kristallstruktur des G3P* wird deutlich, wie es zu einer Kopplung zwischen der langsamen *trans*→*cis*-Isomerisierung der Gln212-Pro213-Peptidbindung und der Bildung der nativen Struktur kommt. Beide β -Faltblattstränge der Gelenkregion gehen im nativen Protein zahlreiche Wechselwirkungen mit der N1-Domäne ein, die bei der Rückfaltung von G3P* erst im Verlauf der langsamen Domänenassoziation ausgebildet werden, da für Etablierung dieser Interaktionen die native *cis*-Konformation an Pro213 erforderlich ist (Abbildung 3-3). Dies

konnte auch anhand von Echtzeit-NMR-Experimenten bestätigt werden (U. Weininger, Halle, persönliche Mitteilung).

Die Isomerisierung in G3P* ist mit einer Zeitkonstante von 6200 s ungewöhnlich langsam im Vergleich zu bekannten Isomerisierungen in Peptiden und Proteinen, deren Zeitkonstanten bei 25 °C oft im Bereich von 10 bis 100 s liegen (Balbach & Schmid, 2000; Stein, 1993). Die langsame Isomerisierung in G3P* wird durch die lokale Sequenz um Pro213 (Gln212-Pro213-Pro214) bedingt. Reimer *et al.* (1998) konnten anhand von Messungen an Modellpeptiden zeigen, dass die zu Prolin benachbarten Aminosäuren die Isomerisierungsrate beeinflussen, wobei Gln als vorhergehende bzw. Pro als nachfolgende Aminosäure jeweils zu einer deutlichen Verlangsamung relativ zu den entsprechenden Ala-Varianten führten. Tatsächlich konnte für ein von der G3P-Sequenz abgeleitetes Pentapeptid (Ac-AQPPC-OH) eine ähnliche Zeitkonstante der *trans*→*cis*-Isomerisierung beobachtet werden wie für G3P* selbst (Eckert *et al.*, 2005; Martin, 2003).

Die Substitutionen von Gln212 und Pro214 bestätigen, dass die lokale Sequenz die Isomerisierungsrate im Protein bestimmt. Diese Mutationen in der Gelenkregion hatten erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Stabilität der stabileren N1-Domäne, wirkten jedoch destabilisierend auf N2. Dabei ist bemerkenswert, dass alle Mutationen im Bereich 212 - 214 sowohl im WT-Hintergrund als auch im Hintergrund der stabilisierten Variante IIHY-G3P* das Protein nahezu gleich stark destabilisierten. Die Abnahme der Kooperativität im thermischen Entfaltungsübergang deutet darauf hin, dass die Zahl der bei der Denaturierung zu lösenden Wechselwirkungen durch die Mutationen verringert wird. Gln212 trägt durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen wesentlich zur Stabilität bei. Dass alle Mutationen im Bereich 212 - 214 zu einer gleichen Destabilisierung führen, lässt vermuten, dass es für die Ausbildung Wasserstoffbrückennetzes zwischen der Gelenkregion und N1 irrelevant ist, ob Gln212 selbst, oder aber das benachbarte Pro213 mutiert wird, welches mit seiner *cis*-Konformation Gln212 richtig positioniert. Pro214 könnte dabei einen mittelbaren Effekt haben, da es die Flexibilität des Peptidrückgrats weiter einschränkt und somit die Ausbildung stabilisierender Interaktionen zwischen den beiden Domänen indirekt beeinflusst. Die Mutationen verändern den grundsätzlichen Faltungsmechanismus des Proteins nicht. Die Domänen N1 und N2' falten und entfalten wie im WT-Protein, solange sie noch nicht assoziiert sind. Die Entfaltung ausgehend vom nativen Protein ist allerdings wesentlich schneller, weil die Mutationen die Interdomänenwechselwirkungen stark verringern. Daneben beschleunigen die Mutationen Q212A und P214A die prolinlimitierte Domänenassoziation zwei- bzw. dreifach. Dies entspricht den Erwartungen aus den Messungen mit Modellpeptiden (Reimer *et al.*, 1998). Durch Mutationen in der lokalen Umgebung von Pro213 kann somit nicht nur in Peptiden, sondern auch im Protein die Isomerisierungsrate verändert werden. Dabei beeinflussen die Mutationen lediglich die Rate der Isomerisierung, die Gleichgewichtslage zwischen den beiden isomeren Formen ändert sich dagegen nicht. Für alle Varianten liegt im denaturierten Zustand das Pro213 zu ca. 95% in der nicht-nativen *trans*-Form vor, d.h. nahezu alle Moleküle durchlaufen bei der Rückfaltung den langsamen

prolinlimitierten Faltungsschritt. Die Domänenassoziation ist somit auch für die Mutanten weiterhin durch die Prolylisomerisierung limitiert, was durch die Katalysierbarkeit der Reaktion durch die Isomerase Cyp18 bestätigt wurde. Dies alles zeigt klar, dass die lokale Sequenzumgebung für die ungewöhnliche langsame Isomerisierungsreaktion in G3P* verantwortlich ist.

4.1.2 Pro213 bestimmt die Lebensdauer des infektiösen Zustands der Phagen

Für die biologische Aktivität von Mehrdomänenproteinen sind oftmals Domänenöffnungs- und -schließreaktionen nötig, so dass die Assoziation der gefalteten Domänen auch für die Funktion des Proteins bedeutend sein kann. In G3P übernimmt die langsame prolinlimitierte Domänenassoziation eine derartige Funktion. Im Ruhezustand des Phagen sind die beiden N-terminalen Domäne N1 und N2 miteinander assoziiert und damit ist die TolA-Bindungsstelle auf N1 durch N2 blockiert (Lubkowski *et al.*, 1999). Die Bindung der N2-Domäne an den bakteriellen F-Pilus führt zur Dissoziation der beiden Domänen und so zur Exposition der TolA-Bindungsstelle.

Die sehr langsame Prolinisomerisierung und die daran gekoppelte Domänenassoziation nehmen eine Schlüsselrolle bei der Phageninfektiosität ein, da sie die Lebensdauer des infektiösen Zustands mit dissoziierten Domänen kontrollieren. Phagen mit niedriger Isomerisierungsrate und dadurch längerer Lebensdauer des aktiven, dissoziierten Zustands besitzen eine höhere Infektiosität. In einer Selektion auf erhöhte Infektiosität wurde nach Randomisierung der Positionen 212, 213 und 214 jeweils die WT-Aminosäure an der entsprechenden Position gefunden. Die Sequenz Gln-Pro-Pro ist damit für die langsame Isomerisierung und für die hohe Infektiosität der Phagen verantwortlich.

Bei kompetitiven Infektionen von *E. coli*-Kulturen durch Phagen mit verschiedenen Mutationen an den Positionen 212 - 214 setzten sich immer die Phagen mit der langsameren Isomerisierungsreaktion durch. WT-Phagen besitzen demnach die höchste, Phagen mit P213G-G3P die niedrigste Infektiosität. Diese Variante besitzt die schnellste Domänenassoziation und somit die kürzeste Lebensdauer des aktiven, offenen Zustands. Die Tatsache, dass die Prolylisomerase Cyp18 den Vorteil von WT-Phagen gegenüber P213G-G3P-Phagen verringerte, zeigt ebenfalls klar, dass die Isomerisierung an Pro213 die Lebensdauer des offenen, aktiven Zustands bestimmt. Cyp18 beschleunigt lediglich die *cis/trans*-Isomerisierung, hat aber keinen Einfluss auf die Stabilität von G3P oder die Phagenproduktion. Die mit den Mutationen einhergehenden Destabilisierungen von G3P konnten deshalb als Ursache für die beobachtete niedrigere Infektiosität ausgeschlossen werden.

Bei der Infektion von F⁺-Zellen führt die Bindung von N2 an den bakteriellen F-Pilus zur Domänen dissoziation. Die prolinlimitierte Schließreaktion konkurriert dabei ständig mit der Pilus-induzierten Öffnungsreaktion, so dass die Kinetik des Übergangs vom infektiösen

dissoziierten Zustand zum nicht-infektiösen geschlossenen Zustand in Gegenwart von F⁺-Zellen nicht bestimmt werden kann. F⁻-Zellen werden durch filamentöse Phagen nur sehr schlecht infiziert. Eine F-Pilus-induzierte Domänendissoziation ist in diesem Fall nicht möglich, so dass die TolA-Bindungsstelle auf N1 nur durch eine spontane Domänendissoziation zugänglich werden kann. Dementsprechend ist die Infektiosität der Phagen gegenüber F⁻-Zellen um bis zu sechs Größenordnungen geringer. Die Infektion dieser Zellen ist eine gute Sonde, um den Einfluss von Stabilität und Faltung des G3P auf seine Funktion *in vivo* zu untersuchen.

Im Verlauf der *in vitro*-Rückfaltung des G3P falten die individuellen Domänen schnell, während die Assoziation der Domänen und damit die Blockierung der TolA-Bindungsstelle durch N2 von der langsamen Isomerisierung an Pro213 bestimmt werden. Tatsächlich konnten die Phagen durch Entfaltung in 5 M GdmCl und kurzzeitige Rückfaltung aktiviert werden, wobei für WT-Phagen eine enorme, ca. tausendfache Infektionserhöhung gegenüber F⁻-Zellen beobachtet werden konnte. Die Zahl infizierter Zellen verringerte sich, je länger die Phagen vor der Infektion den Rückfaltungsbedingungen ausgesetzt waren. Die Kinetik dieser Abnahme entsprach dabei der Rate der *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213, die für das gereinigte G3P* *in vitro* gemessen worden war. Im Verlauf der Rückfaltung isomerisiert Pro213 in die native *cis*-Konformation, und die Domänen von G3P assoziieren. Die TolA-Bindungsstelle wird so von N2 blockiert, und die Phagen kehren in die inaktive Ruheform zurück, was die Abnahme der Phageninfektiosität erklärt.

Mutationen im Bereich um Pro213 beeinflussten diese Abnahme genauso, wie sie die Prolylisomerisierung in G3P* *in vitro* beeinflussten. Der letzte Schritt der G3P-Rückfaltung bestimmt also die Lebensdauer des aktiven, infektiösen Zustands der Phagen, da die Faltung in die native Struktur mit einer Assoziation der Domänen und somit der Blockade der TolA-Bindungsstelle auf N1 einhergeht.

4.1.3 Eine partielle Entfaltung des G3P aktiviert die Phagen für die Infektion

Die Katalyse einer Faltungsreaktion durch Prolylisomerasen ist ein eindeutiger Nachweis für eine prolinlimitierte Reaktion. Umgekehrt kann jedoch bei fehlender Faltungsbeschleunigung eine Prolylisomerisierung nicht ausgeschlossen werden, da die Bildung teilgefalteter Intermediate oftmals die Bindung der Isomerase und damit auch die Katalyse verhindert. Sowohl im isolierten Protein als auch im Phagen kann die Isomerisierung an Pro213 gut durch Cyp18 katalysiert werden, d.h. die zu isomerisierende Gln212-Pro213-Peptidbindung ist für die Isomerase gut zugänglich. Pro213 ist zwar an der Oberfläche von G3P lokalisiert, die gute Katalysierbarkeit in G3P stellt aber bereits einen ersten Hinweis dafür dar, dass die *cis*→*trans*-Isomerisierung bei Domänendissoziation mit einer Entfaltungsreaktion einhergeht. In gefalteten Proteinen ist die Konformation von Prolylbindungen normalerweise festgelegt, da die dreidimensionale Struktur nur eine der beiden isomeren Formen erlaubt. Übertragen

auf die Phageninfektion bedeutet dies, dass die Aktivierung von G3P durch Domänen dissoziation und Isomerisierung in die *trans*-Form mit einer Entfaltungsreaktion einhergehen sollte. Nur in der entfalteten Peptidkette kann sich ein Gleichgewicht zwischen *cis*- und *trans*-Prolinisomeren einstellen, da die sterischen Einschränkungen entfallen.

Mit Hilfe von Fern-UV-CD-Spektren konnte gezeigt werden, dass während der Rückfaltung von G3P* nach der fluoreszenzspektroskopisch messbaren Faltung der beiden globulären Domänen N1 und N2' immer noch unstrukturierte Bereiche im Protein vorhanden sind. Die Differenz zwischen dem CD-Signal dieses Intermediats und des nativen G3P* ist dabei gering und kann der Entfaltung der Gelenksubdomäne zugeordnet werden, welche aus zwei β -Faltblattsträngen besteht. Die Faltung dieses partiell strukturierten Intermediats zum nativen Zustand wird durch die Isomerisierung an Pro213 bestimmt. Diese Isomerisierung ist somit nicht nur lokal auf die Gln212-Pro213-Peptidbindung beschränkt, sondern geht mit der konformationellen Rückfaltungsreaktion der Gelenkregion einher. Umgekehrt bedeutet dies, dass die Aktivierung des G3P durch die Bindung an den F-Pilus zur Entfaltung der Gelenksubdomäne und somit zur Domänen dissoziation führt. Als Folge dieser partiellen Entfaltung isomerisiert Pro213 aus dem sterisch anspruchsvollen *cis*- in den stabileren *trans*-Zustand.

Die partielle Entfaltung des G3P führt auch zu einer Destabilisierung der N2-Domäne. Die Gelenkregion bildet zahlreiche Wechselwirkungen mit N1 aus und stabilisiert so die N2-Domäne. Im aktivierten Intermediat mit *trans*-Pro213 und dissoziierten Domänen gehen diese stabilisierenden Wechselwirkungen durch die Entfaltung der Gelenkregion verloren, und die N2-Domäne besitzt deshalb eine ähnlich niedrige Stabilität wie in isolierter Form.

Aus diesen Befunden ergibt sich also folgendes Modell für den Infektionsprozess (Abbildung 4-1). Im Verlauf der Infektion nimmt das G3P zwei verschiedene Zustände ein, wobei Pro213 als konformationeller Schalter zwischen diesen Zuständen dient. Im Ruhezustand des Phagen liegt das G3P in seiner nativen Form mit Pro213 in der *cis*-Konformation vor. In dieser Form kann sich das Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen N1 und der Gelenkregion ausbilden, so dass N2 durch die Wechselwirkung mit N1 stabilisiert wird. Das Protein besitzt eine hohe Stabilität und ist dadurch vor proteolytischem Abbau geschützt. Die Phagen sind jedoch nicht infektiös, da durch die Assoziation von N1 und N2 die TolA-Bindungsstelle auf N1 blockiert wird. Pro213 in seiner *cis*-Form entspricht somit der „aus“-Stellung des Prolinschalters. Für eine Interaktion von N1 mit dem Rezeptor TolA muss die TolA-Bindungsstelle durch Dissoziation der Domänen freigegeben werden. *In vivo* wird die Domänen dissoziation und damit die Aktivierung von G3P durch die Wechselwirkung von N2 mit dem bakteriellen F-Pilus induziert. In dieser aktiven Form ist die Gelenkregion zwischen den beiden Domänen entfaltet, so dass konformationelle Einschränkungen wegfallen und Pro213 in den stabileren *trans*-Zustand isomerisiert. Diese Drehung der Peptidbindung entspricht einem Umlegen des Prolinschalters, d.h. der Prolinschalter ist nun in seiner aktiven „an“-Stellung. In dieser

aktiven, geöffneten Konformation des G3P ist die TolA-Bindungsstelle zugänglich, und die Phagen sind infektiös.

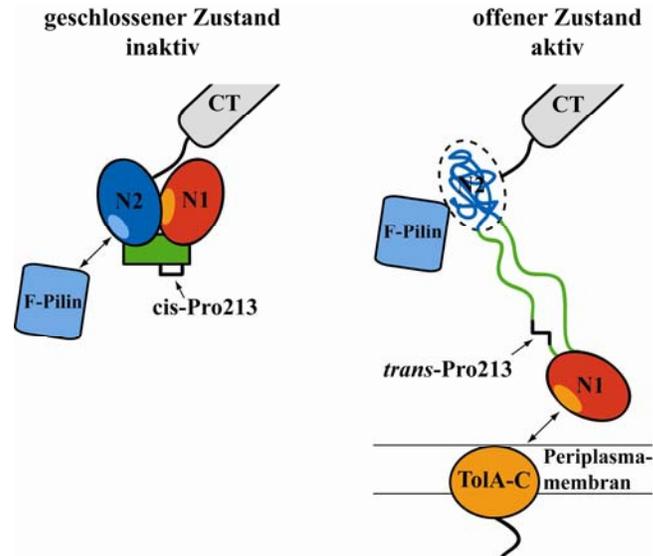


Abbildung 4-1: Aktivierung der Phagen durch partielle Entfaltung. Vor der Infektion liegt G3P vollständig gefaltet vor. In dieser Form sind die Domänen N1 und N2 fest miteinander assoziiert und Pro213 besitzt *cis*-Konformation (L). Dieser geschlossene Zustand ist inaktiv, da die TolA-Bindungsstelle auf N1 durch N2 blockiert wird. Die Bindung an den F-Pilus induziert die Dissoziation der Domänen und destabilisiert so die Gelenkregion und eventuell auch die N2-Domäne. Die damit induzierte Entfaltung der Gelenkregion führt zur *cis*→*trans*-Isomerisierung an Pro213. *Trans*-Pro213 (L) hält G3P im aktiven, offenen Zustand, da die langsame *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 die Rückfaltung der Gelenkregion und somit die Domänenassoziation verhindert. In dieser partiell entfaltenen, infektiösen Form wechselwirkt N1 mit TolA-C in der Periplasmamembran. N1 ist in rot, N2 in blau und die Gelenkregion in grün dargestellt. Die Bindungsstellen auf den G3P-Domänen sind in der gleichen Farbe abgebildet wie die Interaktionspartner, F-Pilin und TolA-C.

Ob es aufgrund des Verlusts der Domäneninteraktionen auch zu einer Entfaltung des globulären Teils von N2 kommt, bleibt unklar. Eine solche Entfaltung würde die Mobilität der Phagen auf der Zelloberfläche erhöhen. Allerdings widerspricht dies dem bisherigen Modell, in dem der Phage nach der initialen Interaktion am F-Pilus gebunden bleibt und durch die Retraktion des F-Pilus zur Zelloberfläche gebracht wird (Jacobson, 1972). Bei Entfaltung der N2-Domäne würde auch die Bindungsstelle für den F-Pilus zerstört werden, so dass eine permanente Bindung an den Pilus nicht möglich wäre.

Nach der Domänendissoziation fungiert Pro213 als Zeitgeber. Die langsame Isomerisierung in die native *cis*-Form kontrolliert die Rückfaltung der Gelenkregion und damit die Reassoziierung der Domänen. Dabei ist die Isomerisierung mit einer Zeitkonstante von 6200 s (bei 25 °C) ausgesprochen langsam und verhindert so möglichst lange die Rückkehr in den inaktiven Zustand, um eine produktive Bindung von N1 an TolA in der Zellmembran zu garantieren. Die Isomerisierungsrate und damit die Schaltfrequenz wird dabei durch die lokale Aminosäuresequenz um Pro213 bestimmt. Mutationen innerhalb dieser Sequenz

beschleunigen die Assoziationsreaktion und verringern die Infektiosität der Phagen. Die langsame Prolinisomerisierung garantiert so einerseits ein ausreichend langes Zeitfenster für die Interaktion von N1 mit TolA, andererseits aber auch die Rückkehr in die stabile Ruheform.

Ein ähnliche funktionelle Bedeutung einer Prolylisomerisierung wurde auch für die Tyrosinkinase Itk postuliert (Andreotti, 2003; Brazin *et al.*, 2002; Mallis *et al.*, 2002). In diesem Fall unterscheidet sich die Affinität der SH2-Domäne von Itk zu einem phosphotyrosinhaltigem Peptid je nach Konformationszustand von Pro287. Der Affinitätsunterschied zwischen der *cis*- und der *trans*-Form ist jedoch nur relativ gering.

Daneben konnten Sarkar und Mitarbeiter kürzlich die Funktion einer Prolinisomerisierung im Protein Crk zeigen (Sarkar *et al.*, 2007). Die Isomerisierung an Pro238 führt hier zu einer Reorientierung der benachbarten Aminosäuresesequenz, wodurch die intramolekularen Wechselwirkungen der C-terminalen SH3-Domäne mit der N-terminalen SH2-Domäne kontrolliert wird. Im Gegensatz zum G3P hat die Isomerisierung in Crk jedoch nur eine lokale Veränderung in der Peptidkette zur Folge, eine Entfaltungsreaktion konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2 Die Interaktion mit dem F-Pilus führt zur Domänendissoziation in G3P

Die Aktivierung des G3P erfolgt *in vivo* durch die Wechselwirkung der N2-Domäne mit der Spitze des F-Pilus, wobei die Bindungsfläche auf der Außenseite von N2 liegt (Deng & Perham, 2002). In Experimenten zur Inhibition der Phageninfektion durch isoliertes G3P* wurde für die Bindung von G3P* an den F-Pilus ein IC₅₀-Wert von ca. 3 nM erhalten. Dieser IC₅₀-Wert ist nur als ungefähres Maß für die Affinität von G3P zum F-Pilus anzusehen. Im intakten Phagen kann die Verankerung des G3P in der Phagenhülle die Affinität ebenso beeinflussen wie die Anwesenheit weiterer G3P-Moleküle an der Phagenspitze. Die Bindung ist jedoch hochaffin und wird durch die spezifische Wechselwirkung zwischen N2 und dem F-Pilus vermittelt, da G3P*-Varianten mit Mutationen in der F-Pilus-Bindungsstelle die Phageninfektion nicht inhibieren konnten.

Nach dem bisherigen Modell bleibt der Phage an den F-Pilus gebunden, der dann auf ein unbekanntes Signal hin zurückgezogen wird (Jacobson, 1972) und so den Phagen für die anschließende Interaktion mit TolA-C in unmittelbare Nähe der Zellmembran bringt. Mit Hilfe gereinigter F-Pili bzw. der monomeren Untereinheit F-Pilin wäre es möglich *in vitro* zu untersuchen, wie die Bindung der N2-Domäne an den F-Pilus zur Aktivierung der Phagen, d.h. zur Domänendissoziation, partiellen Entfaltung und Isomerisierung an Pro213 in G3P führt. Zudem könnten Aussagen darüber getroffen werden, ob eine Aktivierung des G3P auch durch isolierte F-Pili bzw. durch monomeres Pilin in *trans* möglich ist, oder ob hierfür die assemblierte Pilusstruktur auf der Zelloberfläche und die Retraktion des F-Pilus nötig sind.

Die Infektion F-Pilus-freier Zellen stellt ein sehr sensitives Testsystem für die Aktivierung von Phagen durch isolierte F-Pili oder durch F-Pilin dar. Normalerweise werden F⁻-Zellen nur schlecht durch filamentöse Phagen infiziert, da G3P in seiner nativen Form mit assoziierten Domäne vorliegt und deshalb die TolA-Bindungsstelle auf N1 durch N2 blockiert ist. Jedoch sollte eine Aktivierung des G3P durch gereinigte F-Pili oder monomeres F-Pilin die Dissoziation der Domänen induzieren und so die Infektiosität gegenüber F⁻-Zellen erhöhen. Durch isolierte F-Pili konnte tatsächlich eine fünf- bis zehnfache Infektionserhöhung herbeigeführt werden. Ein gravierendes Problem bei diesen Experimenten war allerdings, dass die Ausbeute an isolierten F-Pili sehr gering und deren Quantifizierung schwierig war. Zudem erschwerten die starke Aggregationsanfälligkeit und die damit verbundene Lichtstreuung spektroskopische Untersuchungen.

Die Expression von funktionalem, monomeren F-Pilin erwies sich als enorm schwierig. Das F-Pilin-Gen wurde hierzu in sehr viele verschiedene Vektoren kloniert und die Expression in verschiedenen *E. coli*-Stämmen sowie in unterschiedlichen Nährmedien und bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Zudem wurde versucht, das Protein periplasmatisch mit Hilfe verschiedener Signalsequenzen zu exprimieren, die einen post- oder einen cotranslationalen Export des Proteins ermöglichen. Diese Versuche waren jedoch ebenso erfolglos wie die Coexpression von unprozessiertem Propilin bzw. reifem F-Pilin mit dem zelleigenen Chaperon TraQ, welches in F⁺-Zellen F-Pilin zur Cytoplasmamembran transportiert, von wo aus dann der F-Pilus gebildet wird. Auch Fusionen von F-Pilin mit den Proteinen NusA, SUMO, GST, FkpA oder SlyD führten zu keiner Expression.

Einzig im Fusionsprotein mit MBP konnte F-Pilin exprimiert werden. Allerdings ist das F-Pilin auch in diesem Konstrukt sehr anfällig gegenüber proteolytischem Abbau. Zum Beispiel wurde im Fusionsprotein (His)₆-MBP-Pilin das F-Pilin während der Reinigung vollständig abgebaut, so dass nur (His)₆-MBP erhalten werden konnte. Folglich wurde ein C-terminaler Hexahistidin-Tag verwendet, um durch Affinitätschromatographie auf ungespaltenes Vollängenprotein selektieren zu können. Dabei zeigte sich, dass die *Linker*-Sequenz zwischen F-Pilin und dem Hexahistidin-Tag entscheidend für die Aktivität des F-Pilins ist. Die Expression der Propilinvarianten mit den unterschiedlichen *Linker*-Sequenzen im F-Pilin-*knock-out*-Stamm *E. coli* XL1Blue $\Delta traA$ ermöglichte es, die entsprechenden Konstrukte auf ihre Funktionalität zu testen. Konnten die Bakterienstämme nicht durch Phagen infiziert werden, bedeutete dies, dass keine funktionalen F-Pili gebildet wurden. Die Ursache hierfür ist unklar. Möglicherweise konnten die entsprechenden *Linker*-Varianten des Propilins in den Zellen nicht ausreichend exprimiert bzw. prozessiert werden, oder die F-Pili konnten nicht richtig assembliert werden. Es ist aber auch denkbar, dass zwar Pili gebildet wurden, der C-terminale Tag aber die Phagenbindung verhinderte, bzw. die Bindung möglich war, jedoch keine Aktivierung des G3P erfolgen konnte. Zwar wird angenommen, dass primär Reste im N-terminalen Bereich des prozessierten F-Pilins für die Wechselwirkung mit fd-Phagen verantwortlich sind, allerdings lassen Mutationsstudien und strukturelle Analysen des

assemblierten F-Pilus auch vermuten, dass N- und C-Terminus in der Struktur räumlich benachbart sind (Manchak *et al.*, 2002; Silverman, 1997). Die räumliche Nähe des angefügten Hexahistidin-*Tags* zur Bindungsstelle für G3P könnte eine Erklärung für die fehlende Bindung bzw. fehlende Aktivierung sein.

Einige Propilin-Varianten mit bestimmten *Linker*-Sequenzen zwischen F-Pilin und dem Hexahistidin-*Tag* führten tatsächlich zur Ausbildung von Pili und ermöglichten so die Infektion der kurierten F-Pilin-*knock-out*-Stämme durch filamentöse Phagen. Die Infizierbarkeit dieser Stämme war jedoch im Vergleich zum WT-Stamm deutlich niedriger. Die entsprechenden Fusionsproteine MBP-Pilin-GSSGH₆ und MBP-Pilin-GGGH₆ konnten exprimiert und gereinigt werden, wobei die Ausbeuten aufgrund des proteolytischen Abbaus gering waren. In einem Fusionsprotein, in dem F-Pilin von zwei MBP-Einheiten flankiert war, war die Proteolyseanfälligkeit reduziert. In seiner Gegenwart konnte die Infektiosität der Phagen gegenüber F⁻-Zellen immerhin 50-fach erhöht werden. Im Vergleich zu der 10⁶-fach besseren Infektion von F⁺-Zellen bzw. der tausendfachen Erhöhung der Infektiosität gegenüber F⁻-Zellen nach Entfaltung der Phagen in GdmCl ist der beobachtete Effekt relativ gering, aber er zeigt, dass eine Aktivierung auch durch die monomere Pilusuntereinheit in *trans* erfolgen kann. Eine Retraktion des F-Pilus ist also für die Infektion nicht unbedingt erforderlich.

Um die Interaktion von F-Pilin mit G3P* auch *in vitro*, z.B. mit Hilfe spektroskopischer Methoden, nachweisen zu können, bedarf es jedoch noch weiterer Optimierung. Mögliche Ansatzpunkte sind hier die Optimierung der F-Pilin-Reinigung, um Entfaltung und Proteolyse zu unterdrücken, sowie die Wahl geeigneter *Linker*-Sequenzen oder Affinitäts-*Tags*. Denkbar wäre auch, bereits assemblierte Pili zu isolieren und diese durch geeignete Methoden zu dissoziieren.

Phagen ohne N2-Domäne infizieren F⁻-Zellen zwar 600-fach besser als WT-Phagen mit assoziierten Domänen, da die TolA-Bindungsstelle in diesem Fall permanent zugänglich ist. Allerdings ist diese Infektiosität immer noch ca. tausendfach niedriger als die Infektiosität von WT-Phagen gegenüber F⁺-Zellen. Die Bindung der Phagen an den F-Pilus induziert also nicht nur die Dissoziation der Domänen, sondern führt auch zu einer lokalen Ankonzentrierung der Phagen in Zellnähe. Ob die Phagen tatsächlich nach Aktivierung am F-Pilus gebunden bleiben und mit dem Pilus zur Zelloberfläche zurückgezogen werden, bleibt unklar. Gegen dieses Modell spricht jedoch, dass die Anwesenheit von Cyclophilin die Infektiosität von WT-Phagen verringert. Wäre G3P permanent an den als Öffner fungierenden F-Pilus gebunden, sollte Cyclophilin als Katalysator der Domänenschließreaktion und damit der Inaktivierung keinen Einfluss auf die Infektiosität haben. Die Dynamik der Interaktion von G3P mit dem F-Pilus sowie die Dynamik der Pilusretraktion sind hier weitere wichtige Kriterien, die noch analysiert werden müssen. Insbesondere wäre interessant, ob die Bindung der Phagen tatsächlich eine Retraktion der F-Pili auslösen kann, oder ob diese Retraktion einen periodischen Prozess darstellt, dessen Ablauf nicht durch äußere Faktoren wie die Phagenbindung beeinflusst wird.

4.3 Die N1-Domäne des G3P bindet an den Rezeptor TolA

4.3.1 Die Interaktion von N1 und TolA-C kann mittels FRET verfolgt werden

Nach Aktivierung des G3P durch die Domänen dissoziation bindet N1 an die C-terminale Domäne von TolA, wobei die Interaktionsfläche auf N1 ist an der Domänengrenzfläche lokalisiert ist. Um die Wechselwirkung zwischen TolA-C und N1 fluoreszenzspektroskopisch mittels FRET zu untersuchen, wurde die isolierte Domäne TolA-C mit dem Fluoreszenzfarbstoff AEDANS markiert. Die Markierung von TolA-C beeinflusste dabei weder die Struktur noch die Stabilität oder den Faltungsmechanismus des Proteins. Anhand des Energietransfers von den Trp-Resten in N1 auf den AEDANS-Farbstoff konnte die Komplexbildung gut verfolgt werden. Die Dissoziationskonstanten für den Komplex der N1-Domäne mit dem markierten Protein bzw. dem unmarkiertem Protein unterscheiden sich dabei nur geringfügig. Auffällig ist, dass beide fluoreszenzspektroskopisch bestimmten K_D -Werte deutlich niedriger sind als die K_D -Werte, die von Karlsson und Mitarbeitern (2003) aus Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Experimenten erhalten wurden. Vermutlich interferiert die Immobilisierung eines Bindungspartners auf der Sensoroberfläche mit der Zugänglichkeit der Interaktionsstellen. Dissoziationskonstanten aus Experimenten mit immobilisierten Liganden sind prinzipiell weniger zuverlässig als solche, die in Lösung bestimmt wurden.

Die Bindung von N1 an TolA-C-AEDANS erfolgt innerhalb weniger Sekunden, und die aus den kinetischen Messungen erhaltenen Amplituden und apparenten Geschwindigkeitskonstanten liefern K_D -Werte, die gut mit denen der Gleichgewichtstitration übereinstimmen. Die Komplexbildung zwischen TolA-C und der isolierten N1-Domäne kann *in vitro* gut durch ein einfaches Bindungsmodell beschrieben werden. Ob diese Dissoziationskonstante bzw. die Bindungskinetik auch die Situation *in vivo* widerspiegelt, ist unklar. TolA bildet mit den Proteinen TolQ und TolR einen Komplex in der Zellmembran, der für die Aufrechterhaltung der Membranstruktur essentiell ist. Eventuell ist die Zugänglichkeit von TolA-C in diesem Komplex verringert, was eine niedrigere Affinität zur Folge hätte. Ebenso kann die Verankerung des G3P in der Phagenhülle bzw. die Anwesenheit der N2 und der CT-Domäne die Bindung von N1 an TolA beeinflussen.

4.3.2 Die Assoziation der beiden Domänen in G3P* inhibiert die Bindung an TolA-C

Die Rückfaltungsexperimente in Gegenwart von TolA-C-AEDANS zeigten sehr klar, wie die Rückfaltung von G3P* und die Bindung an den Phagenrezeptor aufeinander abgestimmt sind. N1 faltet sowohl als isolierte Domäne als auch im G3P* innerhalb weniger Millisekunden zurück und liegt daher schon gefaltet vor, bevor die etwa hundertfach langsamere Bindung an TolA beginnt. Für alle Varianten von G3P* erfolgte die Assoziation dieses kinetischen Intermediats mit TolA-C gleich schnell wie für die isolierte N1-Domäne. Die Faltung von N2 läuft in wenigen Minuten ab und behindert die Bindung von TolA-C nur geringfügig. Erst die

prolinlimitierte feste Domänenassoziation verdrängt TolA-C und führt so zur Inaktivierung des G3P bzw. des Phagen.

Entgegen den Erwartungen konnte auch für das native WT-Protein eine geringe Bindung an TolA-C festgestellt werden. Die Amplitude der Assoziationsreaktion zeigte, dass ca. 6% des nativen Proteins in einer bindungskompetenten Form mit dissoziierten Domänen vorliegen. Eine entsprechende Bindung konnte auch im Gleichgewichtsexperiment nachgewiesen werden. Der Anteil der Moleküle mit entfalteter Gelenkregion hängt dabei von der Stabilität des G3P* ab. Ausschlaggebend ist hierbei v.a. die Stabilität der instabileren N2-Domäne, deren Entfaltung gekoppelt mit der Domänen dissoziation verläuft. Destabilisierende Mutationen erhöhten den Anteil an partiell entfaltetem Protein, und die entsprechenden G3P*-Varianten zeigten demnach unter Nativbedingungen eine größere Amplitude bei der Assoziation mit TolA-C. Entsprechend unterdrückten stabilisierende Mutationen in der N2-Domäne oder der Gelenksubdomäne zwischen den Domänen eine Bindung an TolA-C. Für Varianten, bei denen die Domänen dissoziation und die Entfaltung von N2 einen Mittelpunkt oberhalb von 56 °C aufwiesen, konnte keine Bindung an TolA detektiert werden. In diesen Fällen war G3P* so stark stabilisiert, dass keine partiell entfaltenen Moleküle mit dissoziierten Domänen vorlagen.

Dass ein Teil der Proteinmoleküle mit dissoziierten Domänen vorliegt, konnte auch anhand ihrer Entfaltungskinetik empfindlich nachgewiesen werden. N1 entfaltet im dissoziierten, offenen Zustand deutlich schneller als im nativen, geschlossenen Zustand, da im nativen Protein die Dissoziation der Domänen limitierend ist. Der Anteil der schnell entfaltetenden Moleküle stimmte sehr gut mit den aus der TolA-Bindung erhaltenen Werten überein. Je stabiler G3P*, umso weniger Moleküle liegen in der offenen Konformation mit entfalteter Gelenkregion und dissoziierten Domänen vor.

4.3.3 Die prolinkontrollierte Domänenassoziation führt zur Freisetzung von TolA-C

Mit zunehmender Rückfaltungszeit kann auch N2 falten, und es kommt zu einer lockeren Assoziation der beiden Domänen bei noch entfalteter Gelenkregion. Die endgültige Domänenassoziation ist sehr langsam und entspricht der *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 und der daran gekoppelten Faltung der Gelenkregion. Durch diese Faltung in den nativen, geschlossenen Zustand wird TolA-C aus dem Komplex mit N1 verdrängt.

Diese prolinlimitierte Domänenassoziation konnte *in vitro* und *in vivo* durch eine Reihe struktureller und funktioneller Sonden verfolgt werden. Sie konnte durch kinetische Zweischritt-Entfaltungstests ebenso nachgewiesen werden wie durch CD-Spektroskopie und die Freisetzung von TolA-C im Verlauf der Rückfaltung von G3P. Darüber hinaus nimmt die Phageninfektiosität gegenüber F⁻-Zellen, also die Inaktivierung der Phagen, mit der gleichen Kinetik ab. Alle Sonden ergaben dieselbe Zeitkonstante, nämlich die der *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213. Damit ist klar gezeigt, dass die Isomerisierung an Pro213 und die

damit gekoppelte Faltung der Gelenksubdomäne ein zentrales Steuerelement für die Domäneninteraktion in G3P und für die Infektiosität des Phagen darstellen.

Während die Rate der TolA-Freisetzung Aufschluss über die Kinetik der Prolinisomerisierung und der Domänenassoziation gibt, stellen die relativen Amplituden der beiden Phasen ein Maß für die Stärke der Domäneninteraktion dar. Die erste Phase ist auf die Ausbildung lockerer Kontakte zwischen den beiden Domänen zurückzuführen. Die Amplitude dieser Phase korreliert dabei mit der thermischen Stabilität von G3P*. Bei destabilisierten Varianten, die einen niedrigeren Mittelpunkt für die Domänen dissoziation und Entfaltung von N2 zeigen, besitzt die erste Phase der TolA-Verdrängung nur einen geringen Anteil an der Gesamtamplitude. Im Gegensatz dazu führt eine Stabilisierung von N2 bzw. der Gelenkregion zu einer verstärkten Freisetzung von TolA-C innerhalb dieser ersten Phase. Bei stark stabilisierten Varianten reicht diese lockere Assoziation bereits aus, um TolA-C komplett aus dem Komplex mit N1 zu verdrängen.

4.4 Faltung und Stabilität von G3P sind auf die Funktion *in vivo* abgestimmt

Die *in vitro*-Experimente zeigen, dass sowohl die TolA-Bindung unter Nativbedingungen als auch die Verdrängung von TolA im Verlauf der G3P*-Rückfaltung von der Stabilität des G3P* abhängt. Da die Aktivierung der Phagen für die Infektion mit einer partiellen Entfaltung der Gelenkregion einhergeht, besteht ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Stabilität und Funktionalität auch *in vivo*. Neben der Isomerisierungskinetik ist auch die Stabilität des G3P, insbesondere der N2-Domäne und der Gelenkregion, für die Infektiosität wichtig. Stabilisierende Mutationen verringern die Infektiosität der Phagen, da sie diese Entfaltungsreaktion und damit die Aktivierung erschweren. Mutationen, welche die Isomerisierungsrate verändern, haben einen Effekt auf die Phageninfektiosität, da sie die Lebensdauer des aktiven Zustands nach erfolgter Domänen dissoziation beeinflussen. Mutationen, welche die Stabilität von G3P verändern, haben hingegen einen Einfluss darauf, wie leicht der aktive Zustand eingenommen werden kann, d.h. wie leicht die Domänen dissoziieren können. Dieser Effekt war bei der Infektion von F⁺-Zellen mäßig, bei der Infektion von F⁻-Zellen sehr stark ausgeprägt.

Bei der Infektion von F⁺-Zellen führt die initiale Bindung der N2-Domäne an die Pilusspitze zur Dissoziation der Domänen. Die Infektiosität der Varianten ist dabei umso geringer, je stabiler die G3P-Variante, d.h. je mehr Energie zur Dissoziation der Domänen aufgebracht werden muss. Entsprechend zeigen Phagen mit der stabilsten untersuchten G3P-Variante IIHY die geringste Infektiosität. Allerdings ist der Effekt, wie bereits erwähnt, gering, da die Domänen dissoziation und damit die Bildung der aktiven, infektiösen Form vor allem durch die Bindung an den F-Pilus bestimmt wird.

Bei der Infektion von F⁻-Zellen konnte eine Aktivierung durch Pilusbindung nicht erfolgen, so dass die Infektion von der spontanen Dissoziation der Domänen abhängt. Die Infektiosität

nahm daher mit zunehmender Stabilität der G3P-Varianten stark ab, da die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Domänenöffnung verringert war. Für stark stabilisierten Varianten konnte deshalb keine Infektion von F⁻-Zellen mehr nachgewiesen werden. Dies stimmte sehr gut mit der Beobachtung überein, dass diese Varianten unter nativen Bedingungen *in vitro* keine Assoziationsreaktion mit TolA-C eingehen bzw. dass TolA-C bei der Rückfaltung bereits in der ersten Phase, d.h. bei der lockeren Domänenassoziation, nahezu vollständig aus dem Komplex mit N1 verdrängt wird. Der Einfluss der Stabilisierung ist also nicht nur in den *in vitro*-Experimenten, sondern auch *in vivo* bei der Funktion des G3P zu beobachten.

Die Infektion von *E. coli*-Zellen durch filamentöse Phagen zeigt deutlich, dass die Stabilität und die Faltung eines Proteins auf die jeweiligen funktionellen Anforderungen *in vivo* angepasst sind. Im Fall von G3P bedeutet dies, dass die Phagen einerseits im Ruhezustand unter den vorherrschenden Bedingungen stabil sind, v.a. gegenüber proteolytischem Abbau, dass andererseits aber eine Aktivierung des Proteins durch Domänen dissoziation möglich ist. Die Bindung an den bakteriellen F-Pilus liefert die nötige Energie für die Aktivierung des G3P. Die Infektiosität der Phagen korreliert stark mit der Stabilität des G3P, insbesondere der Stärke der Domäneninteraktion. In stabilisierten G3P-Varianten ist die Aktivierung durch Domänen dissoziation und Entfaltung der Gelenkregion erschwert, und die entsprechenden Phagen sind daher weniger infektiös. Die Stabilität des G3P ist also für den Aktivierungsschritt, der die Domänen dissoziation und die Entfaltung der Gelenkregion beinhaltet, entscheidend. Der Faltungsmechanismus des G3P hingegen ist derart optimiert, dass der infektiöse Zustand der Phagen nach der Pilus-induzierten Aktivierung möglichst langlebig ist.

In G3P erstreckt sich der langsame Faltungsschritt in den nativen Zustand über mehrere Stunden, so dass der Faltungsmechanismus optimal an die Anforderungen der Infektion angepasst ist. Hingegen faltet die Semliki Forest Virus Protease (SFVP), ebenfalls ein Zweidomänenprotein, innerhalb weniger Millisekunden (Sanchez *et al.*, 2004). Die Protease wird als Teil eines Polyproteins translatiert und faltet cotranslational. Diese schnelle cotranslationale Faltung ist entscheidend, da SFVP anschließend das Polyprotein prozessiert, wodurch eine Signalsequenz entsteht, die für den Transport der restlichen viralen Hüllproteine ins endoplasmatische Retikulum essentiell ist. Die Funktion von SFVP ist also von einer schnellen, cotranslationalen Faltung abhängig, während die Funktion des G3P bei der Infektion filamentöser Phagen von einer partiellen Entfaltung, gefolgt von einer sehr langsamen Faltungsreaktion, profitiert. Diese beiden Proteine sind Beispiele für Mehrdomänenproteine mit extrem unterschiedlichen Faltungsreaktionen. Sie verdeutlichen, dass die Stabilität und die Faltungskinetik eines Proteins durch die funktionellen Anforderungen an das Protein *in vivo* bestimmt werden.

5 Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits publiziert bzw. zur Publikation eingereicht:

1. Eckert, B., Martin, A., Balbach, J. & Schmid, F. X. (2005). Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 619-623.
2. Eckert, B. & Schmid, F. X. (2006). Prolin als molekularer Schalter. *Biospektrum*, **2**, 151-153.
3. Eckert, B. & Schmid, F. X. (2007). A conformational unfolding reaction activates phage fd for the infection of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **eingereicht**.

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden außerdem folgende Publikationen, die nicht Teil der Dissertation sind:

4. Scholz, C., Eckert, B., Hagn, F., Schaarschmidt, P., Balbach, J. & Schmid, F. X. (2006). SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochemistry*, **45**, 20-33.
5. Knappe, T. A., Eckert, B., Schaarschmidt, P., Scholz, C. & Schmid, F. X. (2007). Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding. *J. Mol. Biol.*, **368**, 1458-1468.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die Bedeutung der Stabilität und des Faltungsmechanismus eines Proteins für dessen Funktionsweise *in vivo* zu untersuchen. Als Modellsystem diente der filamentöse Phage fd, der Gram-negative Bakterien infiziert. Das Gen-3-Protein (G3P) dieses Phagen ist für die initialen Schritte der Infektion essentiell. G3P ist aus drei Domänen aufgebaut, wobei die C-terminale Domäne das Protein in der Phagenhülle verankert. Die beiden N-terminalen Domänen N1 und N2 bilden eine strukturelle Einheit und wechselwirken mit den beiden zellulären Phagenrezeptoren, dem bakteriellen F-Pilus und TolA in der Zellmembran. Die Wechselwirkung der N2-Domäne mit der Pilusspitze führt zur Dissoziation der beiden Domänen und aktiviert so G3P für die anschließende Interaktion der N1-Domäne mit der C-terminalen Domäne von TolA. Die TolA-Bindungsstelle befindet sich auf N1 an der Domänengrenzfläche und ist deshalb im nativen Ruhezustand des Proteins durch N2 blockiert. Im Verlauf der Infektion muss nach der Pilusbindung die geöffnete, aktive Form des G3P so lange erhalten bleiben, bis N1 mit TolA wechselwirken kann.

Die Analyse des Faltungsmechanismus des N1N2-Fragments *in vitro* zeigte, dass die beiden Domänen N1 und N2 sehr schnell falten, ihre Assoziation im letzten Rückfaltungsschritt jedoch außergewöhnlich langsam ist. Die Geschwindigkeit der Domänenassoziation wird durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro213 bestimmt, das in der Gelenkregion zwischen den beiden Domänen lokalisiert ist. Die Isomerisierung in den nativen *cis*-Zustand ist mit einer Zeitkonstante von 6200 s (bei 25 °C) sehr viel langsamer als Prolinisomerisierungen in anderen Proteinen und wird durch die lokale Sequenzumgebung um *cis*-Pro213 (Gln212-Pro213-Pro214) verursacht. Durch Mutation der benachbarten Reste Gln212 bzw. Pro214 zu Alanin konnte die Isomerisierung an Pro213 in G3P zwei- bzw. dreifach beschleunigt werden.

Die Relevanz der langsamen Prolinisomerisierung für die Phageninfektiosität konnte in Konkurrenzexperimenten nachgewiesen werden. In diesen Experimenten konkurrierten jeweils zwei Phagenvarianten, die sich in ihrer Isomerisierungsrate und damit der Assoziationsrate der beiden Domänen unterschieden, um die Infektion einer *E. coli*-Kultur. Phagen, die eine langsame Prolinisomerisierung und damit eine lange Lebensdauer des aktiven, geöffneten Zustands mit dissoziierten Domänen aufweisen, setzten sich in den Konkurrenzexperimenten durch. Dass es sich bei der Inaktivierung der Phagen tatsächlich um einen prolinkontrollierten Mechanismus handelt, zeigte der Einfluss der Prolyl-Isomerase Cyp18. Nach Dissoziation der Domänen kontrolliert also die langsame *trans*→*cis*-Isomerisierung die Lebensdauer des infektiösen Zustands. Die Infektion von F⁻-Zellen mit *in vitro* aktivierten Phagen ermöglichte es, die Lebensdauer des aktiven Zustands und die Kinetik der Inaktivierung der Phagen zu bestimmen. Die für verschiedene Phagenvarianten erhaltenen Zeitkonstanten spiegelten dabei die Isomerisierungskinetik des entsprechenden

G3P-Proteins *in vitro* wider. Auch hier konnte eine Katalyse durch eine Prolylisomerase nachgewiesen werden, was den prolinlimitierten Schritt bestätigt.

Die langsame Prolinisomerisierung in der Gelenkregion steuert so die Funktion des G3P bei der Phageninfektion, indem Pro213 sowohl als Schalter als auch als Zeitgeber wirkt. In der nativen *cis*-Konformation steht dieser Schalter auf „aus“, die beiden Domänen N1 und N2 sind fest miteinander assoziiert und die Gelenksubdomäne liegt gefaltet vor. Entsprechend sind die Phagen in dieser Ruheform stabil, aber nicht infektiös. Die Bindung der N2-Domäne an den F-Pilus führt zur Dissoziation der beiden Domänen. Mit Hilfe CD-spektroskopischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Gelenkregion in diesem offenen, aktivierten Zustand entfaltet vorliegt. Dies führt zu einer Destabilisierung der N2-Domäne. Ob N2 bei der Infektion ebenfalls entfaltet vorliegt, konnte jedoch nicht gezeigt werden. Als Folge der partiellen Entfaltung der Gelenkregion isomerisiert Pro213 aus dem sterisch anspruchsvollen *cis*- in den stabileren *trans*-Zustand, welcher der „an“-Stellung des Prolinschalters entspricht. Die sehr langsame Rückisomerisierung in die native *cis*-Konformation fungiert nun als Zeitgeber und gewährleistet, dass G3P lange genug geöffnet und partiell entfaltet bleibt, um eine Wechselwirkung zwischen der N1-Domäne und TolA in der Zellmembran zu ermöglichen.

Neben dem Faltungsmechanismus beeinflusst auch die Stabilität des G3P die Infektiosität der Phagen. Mit Hilfe von Infektionsexperimenten von F⁺- und F⁻-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Infektiosität stark von der Stabilität des G3P, insbesondere von der Stärke der Domäneninteraktion, abhängt. Mit zunehmender Stabilität nimmt die Infektiosität ab, und stabilisierende Mutationen erschweren den Übergang in die aktive, partiell entfaltete Form mit dissoziierten Domänen. Die Stabilität des G3P ist daher so angepasst, dass einerseits eine Stabilität der Phagen im Ruhezustand garantiert ist, und es andererseits bei Bindung an den F-Pilus durch Domänen-dissoziation aktiviert werden kann.

Die Wechselwirkung der N1-Domäne mit der C-terminalen Domäne von TolA konnte *in vitro* nachgestellt werden. Fluoreszenzmarkiertes TolA-C eignete sich dabei hervorragend, um die Wechselwirkung mit der isolierten N1-Domäne bzw. dem isolierten N1N2-Fragment spektroskopisch zu untersuchen und den Einfluss der Domäneninteraktion auf die Bindung an TolA-C zu analysieren.

Die Analyse der Wechselwirkung zwischen G3P und F-Pilin gestaltete sich dagegen schwieriger. Zwar konnte monomeres F-Pilin als Fusionsprotein mit MBP gereinigt werden, eine Bindung an G3P *in vitro* war jedoch nicht nachzuweisen. Allerdings konnte *in vivo* gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Phagen durch das F-Pilin-Fusionsprotein auch in *trans* möglich ist. Ein Zurückziehen des F-Pilus mit daran gebundenen Phagen ist demnach für die Infektion nicht zwingend erforderlich. Um den Infektionsmechanismus *in vitro* mit den gereinigten Proteinkomponenten nachzustellen, bedarf es vor allem einer Optimierung der Reinigung bzw. der Expression von F-Pilin in einer stabilen und funktionalen Form. Damit wäre es möglich, beide Schritte bei der Phageninfektion *in vitro* zu rekonstituieren.

7 Summary

The aim of this thesis was to determine the relevance of the stability and the folding mechanism of a protein for its function *in vivo*. The filamentous bacteriophage fd that infects Gram-negative bacteria served as a model system. The gene-3-protein (G3P) of the phage is essential for the initial steps of infection. G3P consists of three domains. The C-terminal domain anchors the protein in the phage coat, the two N-terminal domains N2 and N1 form a structural entity and interact sequentially with two receptors, the bacterial F pilus and TolA in the cell membrane. Binding of the N2 domain to the tip of the pilus causes dissociation of the two domains and thus activates G3P for the subsequent interaction of domain N1 with the C-terminal domain of TolA. The binding site for TolA on domain N1 is localized at the domain interface, and therefore it is blocked by N2 when G3P is in its native, latent form with N1 and N2 tightly associated. In the course of phage infection, the open, binding-competent form of G3P must persist until N1 interacts with TolA.

Analysis of the folding mechanism of the N1N2 fragment *in vitro* showed that both domains fold rapidly. After these initial conformational refolding steps, the two domains are loosely associated. In a final very slow folding reaction, the two domains then become locked. This locking reaction is controlled by the *trans*→*cis* isomerization at Pro213 in the hinge between the two domains. The isomerization shows a time constant of 6200 s and is much slower than prolyl isomerizations in other proteins. The unusually low isomerization rate of G3P is determined by the local sequence around *cis*-Pro213 (Gln212-Pro213-Pro214). Mutations of the residues adjacent to Pro213, Gln212 and Pro214, decreased the time constants two- and threefold, respectively.

The importance of the slow prolyl isomerization for the phage infectivity was examined in competition experiments, in which two phage variants that differ in their isomerization rate and thus in the rate of domain association, compete against each other for the infection of a single *E. coli* culture. Phage variants with a slow prolyl isomerization and thus a long life time of the open, active state after pilus-induced domain dissociation prevailed in the competitive infections each time. Furthermore, the adverse effect of the prolyl isomerase cyclophilin 18 on phage infectivity confirms that the infection is controlled by a proline-limited mechanism. The *trans*→*cis* isomerization determines the life time of the open, infectious form of the phage after domain dissociation. Infection of F pilus deficient cells with *in vitro* activated phage was used to determine the life time of the active state and the kinetics of phage inactivation. For all phage variants investigated, the loss of infectivity *in vivo* showed the same time course as the proline isomerization of the corresponding protein *in vitro*. Thus, the slow prolyl isomerization in the hinge region controls the function of G3P during phage infection. Pro213 acts as a switch and as a timer. With Pro213 in the native *cis* state the timer is switched off, domains N1 and N2 are tightly associated, and the hinge domain is folded. Correspondingly, phage in this latent state are stable, but not infectious. Binding of domain

N2 to the F pilus activates G3P by domain dissociation, and CD-spectroscopic analysis revealed that the hinge region is partially unfolded in this open, active state. This loss of domain interactions leads to destabilization of the N2 domain, however, it remains unclear, whether N2 unfolds during infection. As a consequence of the unfolding of the hinge, the isomeric state of Pro213 becomes uncoupled from folding, and Pro213 isomerizes to the more stable *trans* conformation. The proline switch is now turned on. The very slow re-isomerization into the native *cis* state subsequently acts as a timer and ensures that G3P remains in the active, partially unfolded state long enough to allow interaction of N1 with TolA in the cell membrane.

A fine-tuned stability of G3P is important for the phage infectivity as well. Infection of F pilus bearing cells and F pilus deficient cells indicates that infectivity inversely correlates with the stability of G3P, in particular with the strength of domain interactions, as stabilizing mutations suppress the transition into the active, partially unfolded state with dissociated domains. The stability of G3P must be adjusted such that it guarantees the stability of the phage in its latent state, but also allows phage activation by pilus-induced unfolding of the hinge and domain dissociation.

Binding of domain N1 to the C-terminal domain of TolA was analyzed *in vitro*. A fluorescently labeled TolA provided a sensitive probe to study the interaction with the isolated domain N1 as well as the N1N2 fragment, and to analyze the interrelation between the domain interactions in G3P* and the affinity for TolA. Analyzing the interaction between the F pilus and G3P turned out to be much more complicated. Although it was possible to purify monomeric F pilin as a fusion protein with MBP, binding of this protein to G3P could not be detected *in vitro*. However, *in vivo* the F-pilin fusion protein could be used to activate phage in *trans* for the infection of F⁻-cell. Thus, retraction of the F pilus with the phage bound is not an essential step in the infection mechanism. In order to mimic the infection mechanism *in vitro* with the purified proteins, it would be necessary to further optimize the expression and purification of the F pilin fusion protein. It may then be possible to fully reconstitute the mechanism of phage infection *in vitro* with purified components on a molecular and structural level.

8 Abkürzungsverzeichnis

AEDANS	5-(((Acetylamino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure
Amp	Ampicillin
bLA	β -Lactamase
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	Circulardichroismus
cfu	<i>colony forming unit</i> (Kolonie-bildende Einheit)
ΔC_p	Wärmekapazitätsänderung während der Entfaltung eines Proteins bei konstantem Druck
Cm	Chloramphenicol
CT	C-terminale Domäne des Gen-3-Proteins
Cyp18	Cyclophilin 18
d	Schichtdicke
D	Denaturierungsmittel
$[D]_{1/2}$	Mittelpunkt des Denaturierungsmittel-induzierten Entfaltungsübergangs
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O
dNTP	Desoxyribonukleotide
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
dYT	double <i>yeast-tryptone</i> -Medium
ε_λ	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	N,N,N',N'-Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
fd(3A)	fd-Phagen mit den Mutationen W181A, F190A und F194A in G3P
fd(Δ N2)	fd-Phagen mit Deletion der N2-Domäne von G3P (AS 70-261)
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
G3P	Gen-3-Protein filamentöser Phagen
G3P*	N-terminales Fragment des Gen-3-Proteins mit den Domänen N1 und N2 (AS 1-217 + Pro-Ser-Gly-(His) ₆)
3A-G3P	G3P mit den Mutationen W181A, F190A und F194A
ΔG_D	freie Enthalpie der Entfaltungsreaktion
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
ΔH_D	Enthalpie der Entfaltungsreaktion
IAEDANS	5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure
IHY-G3P	G3P mit den Mutationen T101I, Q129H und D209Y
IIHY-G3P	G3P mit den Mutationen T13I, T101I, Q129H und D209Y
IY-G3P	G3P mit den Mutationen T101I und D209Y
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
k_{app}	apparente Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion
K_D	Dissoziationskonstante
k_{NU}	mikroskopische Geschwindigkeitskonstante einer Entfaltungsreaktion
k_{UN}	mikroskopische Geschwindigkeitskonstante einer Rückfaltungsreaktion
Km	Kanamycin
KSI	Ketosteroidisomerase
λ	apparente Ratenkonstante ($k_{NU} + k_{UN}$)

λ_{ex}	Anregungswellenlänge
λ_{em}	Emissionswellenlänge
m	Kooperativitätsparameter der Entfaltungsreaktion ($\delta\Delta G_D / \delta\Delta[D]$)
m_{NU}	kinetischer m -Wert der Entfaltungsreaktion ($\delta\ln k_{\text{NU}} / \delta\Delta[D]$)
m_{UN}	kinetischer m -Wert der Rückfaltungsreaktion ($\delta\ln k_{\text{UN}} / \delta\Delta[D]$)
MBP	Maltose-Bindeprotein
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
n	Brechungsindex
N	nativer Zustand eines Proteins
N1	N1-Domäne des Gen-3-Proteins bzw. isoliertes Teilfragment (AS 1-67 + (Ala) ₃ -(His) ₆)
N2	N2-Domäne des Gen-3-Proteins bzw. isoliertes Teilfragment (AS 102-205 + Tyr-Gln-Gly-(His) ₆)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PBS-Puffer	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
5M5L-Pilin	F-Pilin mit den Mutationen M9L, M41L, M43L, M44L und M65L
PNK	Polynukleotidkinase
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SlyD*	<i>E. coli</i> SlyD ohne C-terminale Domäne (AS 1-165)
ssDNA	Einzelstrang-DNA
SUMO	<i>small ubiquitin like modifier</i>
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TolA-C	C-terminale Domäne von TolA bzw. isoliertes Fragment (AS 295-421 + Cys-(Ala) ₃ -(His) ₆)
TolA-C-Ac	carboxymethyliertes TolA-C
TolA-C-AEDANS	AEDANS-markiertes TolA-C
Tricin	N-(Tris(hydroxymethyl)-methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
τ	Zeitkonstante einer Reaktion
T_M	Mittelpunkt des thermischen Entfaltungsübergangs
$[\theta]_{\text{MRW}}$	molare Elliptizität pro Aminosäure ($\text{Grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$)
U	entfalteter Zustand eines Proteins
ÜNK	Übernachtkultur
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
WT	Wildtyp (Protein mit unveränderter Aminosäuresequenz)

Austausche einer Aminosäure A gegen Aminosäure B an Position X der Polypeptidkette wurden mit AXB bezeichnet.

9 Literaturverzeichnis

- Andreotti, A. H. (2003). Native state proline isomerization: An intrinsic molecular switch. *Biochemistry* **42**, 9515-9524.
- Anthony, K. G., Klimke, W. A., Manchak, J. & Frost, L. S. (1999). Comparison of proteins involved in pilus synthesis and mating pair stabilization from the related plasmids F and R100-1: insights into the mechanism of conjugation. *J. Bacteriol.* **181**, 5149-59.
- Armstrong, G. D., Frost, L. S., Sastry, P. A. & Paranchych, W. (1980). Comparative biochemical studies on F and EDP208 conjugative pili. *J. Bacteriol.* **141**, 333-41.
- Balbach, J. & Schmid, F. X. (2000). Prolyl isomerization and its catalysis in protein folding. In *Mechanisms of Protein Folding* (Pain, R. H., ed.), pp. 212-237. Oxford University Press, Oxford.
- Balbach, J., Steegborn, C., Schindler, T. & Schmid, F. X. (1999). A protein folding intermediate of ribonuclease T1 characterized at high resolution by 1D- and 2D real-time NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **285**, 829-842.
- Barbas, C. F., 3rd, Burton, D. R., Scott, J. K. & Silverman, G. J. (2001). *Phage Display: A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Beasty, A. M., Hurlle, M. R., Manz, J. T., Stackhouse, T., Onuffer, J. J. & Matthews, C. R. (1986). Effects of the phenylalanine-22-leucine, glutamic acid-49- methionine, glycine-234-aspartic acid, and glycine-234-lysine mutations on the folding and stability of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **25**, 2965-74.
- Becktel, W. J. & Schellman, J. A. (1987). Protein stability curves. *Biopolymers* **26**, 1859-77.
- Benedetti, H., Frenette, M., Baty, D., Lloubes, R., Geli, V. & Lazdunski, C. (1989). Comparison of the uptake systems for the entry of various BtuB group colicins into *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 3413-20.
- Benedetti, H., Lazdunski, C. & Lloubes, R. (1991). Protein import into *Escherichia coli*: colicins A and E1 interact with a component of their translocation system. *EMBO J.* **10**, 1989-95.
- Benhar, I. (2001). Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol. Adv.* **19**, 1-33.
- Bennett, N. J. & Rakonjac, J. (2006). Unlocking of the filamentous bacteriophage virion during infection is mediated by the C domain of pIII. *J. Mol. Biol.* **356**, 266-73.
- Boeke, J. D. & Model, P. (1982). A prokaryotic membrane anchor sequence: carboxyl terminus of bacteriophage f1 gene III protein retains it in the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5200-5204.
- Brandts, J. F., Halvorson, H. R. & Brennan, M. (1975). Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to *cis-trans* isomerism of proline residues. *Biochemistry* **14**, 4953-4963.
- Brandts, J. F., Hu, C. Q. & Lin, L.-N. (1989). A simple model for proteins with interacting domains. Application to scanning calorimetry data. *Biochemistry* **28**, 8588-8596.
- Brazin, K. N., Mallis, R. J., Fulton, D. B. & Andreotti, A. H. (2002). Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1899-904.
- Broda, P. (1975). Transience of the donor state in an *Escherichia coli* K12 strain carrying a repressed R factor. *Mol. Gen. Genet.* **138**, 65-9.
- Calderone, T. L., Stevens, R. D. & Oas, T. G. (1996). High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **262**, 407-412.
- Cascales, E., Gavioli, M., Sturgis, J. N. & Lloubes, R. (2000). Proton motive force drives the interaction of the inner membrane TolA and outer membrane pal proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **38**, 904-15.
- Chatellier, J., Hartley, O., Griffiths, A. D., Fersht, A. R., Winter, G. & Riechmann, L. (1999). Interdomain interactions within the gene 3 protein of filamentous phage. *FEBS Lett.* **463**, 371-374.
- Chazin, W. J., Kördel, J., Drakenberg, T., Thulin, E., Brodin, P., Grundström, T. & Forsén, S. (1989). Proline isomerism leads to multiple folded conformations of calbindin D9k: direct evidence from two-dimensional NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2195-2198.
- Cheng, H. N. & Bovey, F. A. (1977). *Cis-trans* equilibrium and kinetic studies of acetyl-L-proline and glycy-L-proline. *Biopolymers* **16**, 1465-1472.
- Chubet, R. G. & Brizzard, B. L. (1996). Vectors for expression and secretion of FLAG epitope-tagged proteins in mammalian cells. *Biotechniques* **20**, 136-41.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-5.
- Click, E. M. & Webster, R. E. (1997). Filamentous phage infection: required interactions with the TolA protein. *J. Bacteriol.* **179**, 6464-6471.

- Click, E. M. & Webster, R. E. (1998). The TolQRA proteins are required for membrane insertion of the major capsid protein of the filamentous phage f1 during infection. *J. Bacteriol.* **180**, 1723-8.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2110-4.
- Collins, J. & Pritchard, R. H. (1973). Relationship between chromosome replication and F'lac episome replication in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **78**, 143-55.
- Cook, K. H., Schmid, F. X. & Baldwin, R. L. (1979). Role of proline isomerization in folding of ribonuclease A at low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 6157-6161.
- Creighton, T. E. (2000). Protein folding coupled to disulphide-bond formation. In *Mechanisms of Protein Folding* 2nd edit. (Pain, R. H., ed.), pp. 250-278. Oxford University Press, Oxford.
- Date, T., Inuzuka, M. & Tomoeda, M. (1977). Purification and characterization of F pili from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **16**, 5579-85.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6640-5.
- Davis, G. D., Elisee, C., Newham, D. M. & Harrison, R. G. (1999). New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **65**, 382-8.
- Davis, K. G., Plyte, S. E., Robertson, S. R., Cooper, A. & Kneale, G. G. (1995). Comparison of Pfl and Fd gene 5 proteins and their single-stranded DNA complexes by NMR spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Biochemistry* **34**, 148-54.
- Demarest, S. J., Martinez-Yamout, M., Chung, J., Chen, H., Xu, W., Dyson, H. J., Evans, R. M. & Wright, P. E. (2002). Mutual synergistic folding in recruitment of CBP/p300 by p160 nuclear receptor coactivators. *Nature* **415**, 549-53.
- Deng, L. W., Malik, P. & Perham, R. N. (1999). Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of *Escherichia coli*. *Virology* **253**, 271-7.
- Deng, L. W. & Perham, R. N. (2002). Delineating the Site of Interaction on the pIII Protein of Filamentous Bacteriophage fd with the F-pilus of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **319**, 603-614.
- Deprez, C., Blanchard, L., Guerlesquin, F., Gavioli, M., Simorre, J. P., Lazdunski, C., Marion, D. & Lloubes, R. (2002). Macromolecular import into *Escherichia coli*: the TolA C-terminal domain changes conformation when interacting with the colicin A toxin. *Biochemistry* **41**, 2589-98.
- Deprez, C., Lloubes, R., Gavioli, M., Marion, D., Guerlesquin, F. & Blanchard, L. (2005). Solution structure of the *E. coli* TolA C-terminal domain reveals conformational changes upon binding to the phage g3p N-terminal domain. *J. Mol. Biol.* **346**, 1047-57.
- Derouiche, R., Benedetti, H., Lazzaroni, J. C., Lazdunski, C. & Lloubes, R. (1995). Protein complex within *Escherichia coli* inner membrane. TolA N-terminal domain interacts with TolQ and TolR proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 11078-84.
- Derouiche, R., Gavioli, M., Benedetti, H., Prilipov, A., Lazdunski, C. & Lloubes, R. (1996). TolA central domain interacts with *Escherichia coli* porins. *EMBO J.* **15**, 6408-15.
- Derouiche, R., Lloubes, R., Sasso, S., Bouteille, H., Oughideni, R., Lazdunski, C. & Loret, E. (1999). Circular dichroism and molecular modeling of the *E. coli* TolA periplasmic domains. *Biospectroscopy* **5**, 189-98.
- Dubuisson, J. F., Vianney, A. & Lazzaroni, J. C. (2002). Mutational analysis of the TolA C-terminal domain of *Escherichia coli* and genetic evidence for an interaction between TolA and TolB. *J. Bacteriol.* **184**, 4620-5.
- Dyson, H. J. & Wright, P. E. (2004). Unfolded proteins and protein folding studied by NMR. *Chem Rev* **104**, 3607-22.
- Eckert, B., Martin, A., Balbach, J. & Schmid, F. X. (2005). Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 619-623.
- Evans, P. A., Dobson, C. M., Kautz, R. A., Hatfull, G. & Fox, R. O. (1987). Proline isomerism in staphylococcal nuclease characterized by NMR and site-directed mutagenesis. *Nature* **329**, 266-268.
- Feng, J. N., Russel, M. & Model, P. (1997a). A permeabilized cell system that assembles filamentous bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4068-73.
- Feng, Y., Hood, W. F., Forgey, R. W., Abegg, A. L., Caparon, M. H., Thiele, B. R., Leimgruber, R. M. & McWherter, C. A. (1997b). Multiple conformations of a human interleukin-3 variant. *Protein Sci.* **6**, 1777-82.
- Firth, N., Ippen-Ihler, K. & Skurray, R. (1996). Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt, F. C., ed.), pp. 2377-2401. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.
- Fischer, G. (2000). Chemical aspects of peptide bond isomerisation. *Chemical Society Reviews* **29**, 119-127.
- Fischer, G., Bang, H., Berger, E. & Schellenberger, A. (1984a). Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **791**, 87-97.
- Fischer, G., Bang, H. & Mech, C. (1984b). Determination of enzymatic catalysis for the *cis-trans*-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed. Biochim. Acta* **43**, 1101-11.

- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. & Schmid, F. X. (1989). Cyclophilin and peptidyl-prolyl-*cis/trans*-isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**, 476-478.
- Frame, R. & Bishop, J. O. (1971). The number of sex-factors per chromosome in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **121**, 93-103.
- Frost, L. S., Ippen-Ihler, K. & Skurray, R. A. (1994). Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol. Rev.* **58**, 162-210.
- Frost, L. S. & Manchak, J. (1998). F- phenocopies: characterization of expression of the F transfer region in stationary phase. *Microbiology* **144** (Pt 9), 2579-87.
- Frost, L. S., Paranchych, W. & Willetts, N. S. (1984). DNA sequence of the F traALE region that includes the gene for F pilin. *J. Bacteriol.* **160**, 395-401.
- Garel, J.-R. (1992). Folding of large proteins: multidomain and multisubunit proteins. In *Protein Folding* 1 edit. (Creighton, T. E., ed.), pp. 405-454. Freeman, New York.
- Garel, J. R. & Baldwin, R. L. (1973). Both the fast and slow refolding reactions of ribonuclease A yield native enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 3347-3351.
- Gaspar, J. A., Thomas, J. A., Marolda, C. L. & Valvano, M. A. (2000). Surface expression of O-specific lipopolysaccharide in *Escherichia coli* requires the function of the TolA protein. *Mol. Microbiol.* **38**, 262-75.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Glaser-Wuttke, G., Keppner, J. & Rasched, I. (1989). Pore-forming properties of the adsorption protein of filamentous phage fd. *Biochim. Biophys. Acta* **985**, 239-47.
- Goldenberg, D. P. (1997). Analysis of protein conformation by gel electrophoresis. In *Protein Structure: a practical approach* (Creighton, T. E., ed.), pp. 187-218. IRL Press, Oxford.
- Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1982). Unfolding and refolding of the reduced constant fragment of the immunoglobulin light chain. Kinetic role of the disulfide bond. *J. Mol. Biol.* **156**, 911-926.
- Grathwohl, C. & Wüthrich, K. (1981). NMR studies of the rates of proline *cis-trans* isomerization in oligopeptides. *Biopolymers* **20**, 2623-2633.
- Guex, N. & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 4121-30.
- Hawkins, A. R. & Lamb, H. K. (1995). The molecular biology of multidomain proteins. Selected examples. *Eur. J. Biochem.* **232**, 7-18.
- Helmuth, R. & Achtman, M. (1978). Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: purification of F pili with biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1237-41.
- Hennecke, J., Sebbel, P. & Glockshuber, R. (1999). Random circular permutation of DsbA reveals segments that are essential for protein folding and stability. *J. Mol. Biol.* **286**, 1197-215.
- Holliger, P. & Riechmann, L. (1997). A conserved infection pathway for filamentous bacteriophages is suggested by the structure of the membrane penetration domain of the minor coat protein g3p from phage fd. *Structure* **5**, 265-75.
- Holliger, P., Riechmann, L. & Williams, R. L. (1999). Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Angström: evidence for conformational lability. *J. Mol. Biol.* **288**, 649-657.
- Hoogenboom, H. R. (2002). Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods Mol. Biol.* **178**, 1-37.
- Ippen-Ihler, K., Moore, D., Laine, S., Johnson, D. A. & Willetts, N. S. (1984). Synthesis of F-pilin polypeptide in the absence of F traJ product. *Plasmid* **11**, 116-29.
- Jabs, A., Weiss, M. S. & Hilgenfeld, R. (1999). Non-proline *cis* peptide bonds in proteins. *J. Mol. Biol.* **286**, 291-304.
- Jackson, S. E. (1998). How do small single-domain proteins fold? *Fold. Des.* **3**, R81-91.
- Jacobson, A. (1972). Role of F pili in the penetration of bacteriophage fl. *J. Virol.* **10**, 835-843.
- Jaenicke, R. (1999). Stability and folding of domain proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**, 155-241.
- Johnson, D. A. & Willetts, N. S. (1980). Construction and characterization of multicopy plasmids containing the entire F transfer region. *Plasmid* **4**, 292-304.
- Kaelin, W. G., Jr., Krek, W., Sellers, W. R., DeCaprio, J. A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C. S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P. J., Blonar, M. A. & et al. (1992). Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* **70**, 351-64.
- Kamen, D. E. & Woody, R. W. (2002). Folding kinetics of the protein pectate lyase C reveal fast-forming intermediates and slow proline isomerization. *Biochemistry* **41**, 4713-23.
- Karlsson, F., Borrebaeck, C. A., Nilsson, N. & Malmberg-Hager, A. C. (2003). The mechanism of bacterial infection by filamentous phages involves molecular interactions between TolA and phage protein 3 domains. *J. Bacteriol.* **185**, 2628-2634.

- Kather, I. (2007). Stabilisierung von Proteinen durch *in vitro*-Evolution - Selektion und biophysikalische Charakterisierung. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Kather, I., Bippes, C. A. & Schmid, F. X. (2005). A stable disulfide-free gene-3-protein of phage fd generated by *in vitro* evolution. *J. Mol. Biol.* **354**, 666-78.
- Kiefhaber, T. & Schmid, F. X. (1992a). Kinetic coupling between protein folding and prolyl isomerization. II. Folding of ribonuclease A and ribonuclease T1. *J. Mol. Biol.* **224**, 231-40.
- Kiefhaber, T. & Schmid, F. X. (1992b). Kinetic coupling between protein folding and prolyl isomerization. II. Folding of ribonuclease A and ribonuclease T1. *J. Mol. Biol.* **224**, 231-240.
- Knappe, T. A., Eckert, B., Schaarschmidt, P., Scholz, C. & Schmid, F. X. (2007). Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding. *J. Mol. Biol.* **368**, 1458-68.
- Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**, 51-55.
- Kragelund, B. B., Robinson, C. V., Knudsen, J., Dobson, C. M. & Poulsen, F. M. (1995). Folding of a four-helix bundle: Studies of acyl-coenzyme A binding protein. *Biochemistry* **34**, 7217-7224.
- Krebber, C., Spada, S., Desplancq, D., Krebber, A., Ge, L. & Plückthun, A. (1997). Selectively-infective phage (SIP): a mechanistic dissection of a novel *in vivo* selection for protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **268**, 607-18.
- Kremser, A. & Rasched, I. (1994). The adsorption protein of filamentous phage fd: assignment of its disulfide bridges and identification of the domain incorporated in the coat. *Biochemistry* **33**, 13954-8.
- Kuliopulos, A., Nelson, N. P., Yamada, M., Walsh, C. T., Furie, B., Furie, B. C. & Roth, D. A. (1994). Localization of the affinity peptide-substrate inactivator site on recombinant vitamin K-dependent carboxylase. *J. Biol. Chem.* **269**, 21364-70.
- Kuzminov, A. (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 751-813, table of contents.
- Laine, S., Moore, D., Kathir, P. & Ippen-Ihler, K. (1985). Genes and gene products involved in the synthesis of F-pili. *Basic Life Sci* **30**, 535-53.
- Lang, K., Schmid, F. X. & Fischer, G. (1987). Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* **329**, 268-270.
- Lazdunski, C. J. (1995). Colicin import and pore formation: a system for studying protein transport across membranes? *Mol. Microbiol.* **16**, 1059-66.
- Lazzaroni, J. C., Germon, P., Ray, M. C. & Vianney, A. (1999). The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**, 191-7.
- Lazzaroni, J. C., Vianney, A., Popot, J. L., Benedetti, H., Samatey, F., Lazdunski, C., Portulier, R. & Geli, V. (1995). Transmembrane alpha-helix interactions are required for the functional assembly of the *Escherichia coli* Tol complex. *J. Mol. Biol.* **246**, 1-7.
- Levengood, S. K., Beyer, W. F., Jr. & Webster, R. E. (1991). TolA: a membrane protein involved in colicin uptake contains an extended helical region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5939-5943.
- Lin, L.-N., Hasumi, H. & Brandts, J. F. (1988). Catalysis of proline isomerization during protein folding reactions. *Biochim. Biophys. Acta* **956**, 256-266.
- Lloubes, R., Cascales, E., Walburger, A., Bouveret, E., Lazdunski, C., Bernadac, A. & Journet, L. (2001). The Tol-Pal proteins of the *Escherichia coli* cell envelope: an energized system required for outer membrane integrity? *Res Microbiol* **152**, 523-9.
- Lu, K. P., Hanes, S. D. & Hunter, T. (1996). A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* **380**, 544-547.
- Lu, K. P., Liou, Y. C. & Zhou, X. Z. (2002). Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends Cell Biol* **12**, 164-72.
- Lubkowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A. & Wlodawer, A. (1998). The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of G3P. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 140-147.
- Lubkowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A. & Wlodawer, A. (1999). Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA. *Structure* **7**, 711-722.
- Macarthur, M. W. & Thornton, J. M. (1991). Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.* **218**, 397-412.
- Maina, C. V., Riggs, P. D., Grandea, A. G., 3rd, Slatko, B. E., Moran, L. S., Tagliamonte, J. A., McReynolds, L. A. & Guan, C. D. (1988). An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* **74**, 365-73.
- Malakhov, M. P., Mattern, M. R., Malakhova, O. A., Drinker, M., Weeks, S. D. & Butt, T. R. (2004). SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J. Struct. Funct. Genomics* **5**, 75-86.
- Mallis, R. J., Brazin, K. N., Fulton, D. B. & Andreotti, A. H. (2002). Structural characterization of a proline-driven conformational switch within the Itk SH2 domain. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 900-905.

- Manchak, J., Anthony, K. G. & Frost, L. S. (2002). Mutational analysis of F-pilin reveals domains for pilus assembly, phage infection and DNA transfer. *Mol. Microbiol.* **43**, 195-205.
- Marciano, D. K., Russel, M. & Simon, S. M. (1999). An aqueous channel for filamentous phage export. *Science* **284**, 1516-9.
- Martin, A. (2003). *In vitro*-Evolution und Analyse der biophysikalischen Grundlagen der Proteinestabilität. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Martin, A. & Schmid, F. X. (2003a). Evolutionary stabilization of the gene-3-protein of phage fd reveals the principles that govern the thermodynamic stability of two-domain proteins. *J. Mol. Biol.* **328**, 863-875.
- Martin, A. & Schmid, F. X. (2003b). The folding mechanism of a two-domain protein: folding kinetics and domain docking of the gene-3-protein of phage fd. *J. Mol. Biol.* **329**, 599-610.
- Martin, A. & Schmid, F. X. (2003c). A proline switch controls folding and domain interactions in the gene-3-protein of the filamentous phage fd. *J. Mol. Biol.* **331**, 1131-1140.
- Martin, A., Schmid, F. X. & Sieber, V. (2003). Proside: a phage based method for selecting thermostable proteins. *Methods in Molecular Biology* **230**, 57-70.
- Marvin, D. A. & Folkhard, W. (1986). Structure of F-pili: reassessment of the symmetry. *J. Mol. Biol.* **191**, 299-300.
- Mattson, G., Conklin, E., Desai, S., Nielander, G., Savage, M. D. & Morgensen, S. (1993). A practical approach to crosslinking. *Mol. Biol. Rep.* **17**, 167-83.
- Maxwell, K. L., Mittermaier, A. K., Forman-Kay, J. D. & Davidson, A. R. (1999). A simple *in vivo* assay for increased protein solubility. *Protein Sci.* **8**, 1908-11.
- Mayr, L. M., Odefey, C., Schutkowski, M. & Schmid, F. X. (1996). Kinetic analysis of the unfolding and refolding of ribonuclease T1 by a stopped-flow double-mixing technique. *Biochemistry* **35**, 5550-5561.
- Meerman, H. J. & Georgiou, G. (1994). Construction and characterization of a set of *E. coli* strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Biotechnology* **12**, 1107-10.
- Minkley, E. G., Jr., Polen, S., Brinton, C. C., Jr. & Ippen-Ihler, K. (1976). Identification of the structural gene for F-pilin. *J. Mol. Biol.* **108**, 111-21.
- Model, P. & Russel, M. (1988). Filamentous Bacteriophage. In *The Bacteriophages* 2nd edit. (Calendar, R., ed.), pp. 375-456. Plenum Publishing Corp., New York.
- Moore, D., Hamilton, C. M., Maneewannakul, K., Mintz, Y., Frost, L. S. & Ippen-Ihler, K. (1993). The *Escherichia coli* K-12 F plasmid gene traX is required for acetylation of F pilin. *J. Bacteriol.* **175**, 1375-83.
- Moore, D., Sowa, B. A. & Ippen-Ihler, K. (1981a). The effect of tra mutations on the synthesis of the F-pilin membrane polypeptide. *Mol. Gen. Genet.* **184**, 260-4.
- Moore, D., Sowa, B. A. & Ippen-Ihler, K. (1981b). Location of an F-pilin pool in the inner membrane. *J. Bacteriol.* **146**, 251-9.
- Netzer, W. J. & Hartl, F. U. (1997). Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* **388**, 343-349.
- Odefey, C., Mayr, L. M. & Schmid, F. X. (1995). Non-prolyl *cis-trans* peptide bond isomerization as a rate-determining step in protein unfolding and refolding. *J. Mol. Biol.* **245**, 69-78.
- Oliver, D. (1985). Protein secretion in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**, 615-48.
- Opalka, N., Beckmann, R., Boisset, N., Simon, M. N., Russel, M. & Darst, S. A. (2003). Structure of the filamentous phage pIV multimer by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **325**, 461-70.
- Pace, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* **131**, 266-280.
- Paranchych, W. & Dunker, A. K. (1975). On the structure of R17 phage. *Virology* **67**, 297-9.
- Paranchych, W. & Frost, L. S. (1988). The physiology and biochemistry of pili. *Adv. Microb. Physiol.* **29**, 53-114.
- Parker, M. J., Spencer, J., Jackson, G. S., Burston, S. G., Hosszu, L. L., Craven, C. J., Waltho, J. P. & Clarke, A. R. (1996). Domain behavior during the folding of a thermostable phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* **35**, 15740-52.
- Privalov, P. L. (1993). Physical basis of the stability of the folded conformations of Proteins. In *Protein folding* (Creighton, T. E., ed.). Freeman, New York.
- Rakonjac, J., Feng, J. & Model, P. (1999). Filamentous phage are released from the bacterial membrane by a two-step mechanism involving a short C-terminal fragment of pIII. *J. Mol. Biol.* **289**, 1253-65.
- Rakonjac, J. & Model, P. (1998). Roles of pIII in filamentous phage assembly. *J. Mol. Biol.* **282**, 25-41.
- Ramachandran, G. N. & Mitra, A. K. (1976). An explanation for the rare occurrence of *cis* peptide units in proteins and polypeptides. *J. Mol. Biol.* **107**, 85-92.
- Ramm, K. & Plückthun, A. (2000). The periplasmic *Escherichia coli* peptidylprolyl *cis,trans*-isomerase FkpA - II. Isomerase-independent chaperone activity *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **275**, 17106-17113.
- Ramm, K. & Plückthun, A. (2001). High enzymatic activity and chaperone function are mechanistically related features of the dimeric *E. coli* peptidyl-prolyl-isomerase FkpA. *J. Mol. Biol.* **310**, 485-98.

- Ray, A., Cheah, K. C. & Skurray, R. (1986). An F-derived conjugative cosmid: analysis of tra polypeptides in cosmid-infected cells. *Plasmid* **16**, 90-100.
- Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M. & Fischer, G. (1998). Side-chain effects on peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerisation. *J. Mol. Biol.* **279**, 449-60.
- Riechmann, L. & Holliger, P. (1997). The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell* **90**, 351-360.
- Rigal, A., Bouveret, E., Lloubes, R., Lazdunski, C. & Benedetti, H. (1997). The TolB protein interacts with the porins of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 7274-9.
- Rudolph, R., Siebendritt, R., Neslauer, G., Sharma, A. K. & Jaenicke, R. (1990). Folding of an all-beta protein: independent domain folding in gamma-II-crystallin from calf eye lens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4625-4629.
- Russel, M., Whirlow, H., Sun, T. P. & Webster, R. E. (1988). Low-frequency infection of F- bacteria by transducing particles of filamentous bacteriophages. *J. Bacteriol.* **170**, 5312-6.
- Ryan, R. O., Forte, T. M. & Oda, M. N. (2003). Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I. *Protein Expr. Purif.* **27**, 98-103.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Sanchez, I. E., Morillas, M., Zobeley, E., Kiefhaber, T. & Glockshuber, R. (2004). Fast folding of the two-domain semliki forest virus capsid protein explains co-translational proteolytic activity. *J. Mol. Biol.* **338**, 159-67.
- Santoro, M. M. & Bolen, D. W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl α -chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**, 8063-8068.
- Sarkar, P., Reichman, C., Saleh, T., Birge, R. B. & Kalodimos, C. G. (2007). Proline *cis-trans* isomerization controls autoinhibition of a signaling protein. *Mol. Cell* **25**, 413-26.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Scherer, G., Kramer, M. L., Schutkowski, M., U., R. & Fischer, G. (1998). Barriers to rotation of secondary amide peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5568-5574.
- Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M. A. & Schmid, F. X. (1995). Extremely rapid folding in the absence of intermediates: the cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 663-673.
- Schmid, F. X. (1983). Mechanism of folding of ribonuclease A. Slow refolding is a sequential reaction via structural intermediates. *Biochemistry* **22**, 4690-4696.
- Schmid, F. X. (1986). Fast-folding and slow-folding forms of unfolded proteins. In *Enzyme Structure Part L 1* edit. (Hirs, C. H. W. & Timasheff, S. N., eds.), Vol. 131, pp. 71-82. Academic Press, New York.
- Schmid, F. X. (2002). Prolyl isomerases. *Adv. Protein Chem.* **59**, 243-282.
- Schmid, F. X. & Blaschek, H. (1981). A native-like intermediate on the ribonuclease A folding pathway. 2. Comparison of its properties to native ribonuclease A. *Eur. J. Biochem.* **114**, 111-117.
- Schmid, F. X., Lang, K., Kiefhaber, T., Mayer, S. & Schönbrunner, R. (1991). Prolyl Isomerase. Its role in protein folding and speculations on its function in the cell. In *Conformations and Forces in Protein Folding* (Nall, B. T. & Dill, K. A., eds.). AAAS, Washington, D. C.
- Scholz, C., Eckert, B., Hagn, F., Schaarschmidt, P., Balbach, J. & Schmid, F. X. (2006). SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochemistry* **45**, 20-33.
- Scholz, C., Schaarschmidt, P., Engel, A. M., Andres, H., Schmitt, U., Faatz, E., Balbach, J. & Schmid, F. X. (2005). Functional solubilization of aggregation-prone HIV envelope proteins by covalent fusion with chaperone modules. *J. Mol. Biol.* **345**, 1229-41.
- Schönbrunner, N., Koller, K. P. & Kiefhaber, T. (1997). Folding of the disulfide-bonded beta-sheet protein tendamistat: Rapid two-state folding without hydrophobic collapse. *J. Mol. Biol.* **268**, 526-538.
- Schreiber, G. & Fersht, A. R. (1993). The Refolding of *cis*-Peptidylprolyl and *trans*-Peptidylprolyl Isomers of Barstar. *Biochemistry* **32**, 11195-11203.
- Silverman, P. M. (1997). Towards a structural biology of bacterial conjugation. *Mol. Microbiol.* **23**, 423-9.
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-7.
- Sosnick, T. R., Mayne, L. & Englander, S. W. (1996). Molecular collapse: The rate-limiting step in two-state cytochrome c folding. *Protein-Struct.Funct.Genet.* **24**, 413-426.
- Sowa, B. A., Moore, D. & Ippen-Ihler, K. (1983). Physiology of F-pilin synthesis and utilization. *J. Bacteriol.* **153**, 962-8.
- Stein, R. L. (1993). Mechanism of enzymatic and nonenzymatic prolyl *cis-trans* isomerization. *Adv. Protein Chem.* **44**, 1-24.
- Stengele, I., Bross, P., Garcés, X., Giray, J. & Rasched, I. (1990). Dissection of functional domains in phage fd adsorption protein. Discrimination between attachment and penetration sites. *J. Mol. Biol.* **212**, 143-149.

- Stewart, D. E., Sarkar, A. & Wampler, J. E. (1990). Occurrence and role of *cis* peptide bonds in protein structures. *J. Mol. Biol.* **214**, 253-260.
- Sturgis, J. N. (2001). Organisation and evolution of the *tol-pal* gene cluster. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 113-22.
- Takahashi, N., Hayano, T. & Suzuki, M. (1989). Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337**, 473-475.
- Tanford, C. (1968a). Protein denaturation, part A. *Adv. Protein Chem.* **23**, 121-217.
- Tanford, C. (1968b). Protein denaturation. Part B. The transition state from native to denatured state. *Adv. Protein Chem.* **23**, 218-282.
- Thrall, S. H., Reinstein, J., Wöhrl, B. M. & Goody, R. S. (1996). Evaluation of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase primer tRNA binding by fluorescence spectroscopy: specificity and comparison to primer/template binding. *Biochemistry* **35**, 4609-4618.
- Tsalkova, T. N. & Privalov, P. L. (1985). Thermodynamic study of domain organization in troponin C and calmodulin. *J. Mol. Biol.* **181**, 533-544.
- Tsunenaga, M., Goto, Y., Kawata, Y. & Hamaguchi, K. (1987). Unfolding and refolding of a type kappa immunoglobulin light chain and its variable and constant fragments. *Biochemistry* **26**, 6044-6051.
- Uversky, V. N. (2002). Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci.* **11**, 739-56.
- Uversky, V. N., Oldfield, C. J. & Dunker, A. K. (2005). Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *J. Mol. Recognit.* **18**, 343-84.
- Vanhove, M., Raquet, X., Palzkill, T., Pain, R. H. & Frere, J. M. (1996). The rate-limiting step in the folding of the *cis*-Pro167Thr mutant of TEM-1 beta-lactamase is the *trans* to *cis* isomerization of a non-proline peptide bond. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **25**, 104-111.
- Vogel, C., Bashton, M., Kerrison, N. D., Chothia, C. & Teichmann, S. A. (2004). Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 208-16.
- Walburger, A., Lazdunski, C. & Corda, Y. (2002). The Tol/Pal system function requires an interaction between the C-terminal domain of TolA and the N-terminal domain of TolB. *Mol. Microbiol.* **44**, 695-708.
- Webster, R. E. (1991). The *tol* gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**, 1005-11.
- Wheeler, K. A., Hawkins, A. R., Pain, R. & Virden, R. (1998). The slow step of folding of *Staphylococcus aureus* PC1 beta-lactamase involves the collapse of a surface loop rate limited by the *trans* to *cis* isomerization of a non-proline peptide bond. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **33**, 550-7.
- Will, W. R., Lu, J. & Frost, L. S. (2004). The role of H-NS in silencing F transfer gene expression during entry into stationary phase. *Mol. Microbiol.* **54**, 769-82.
- Willetts, N. S. & Skurray, R. A. (1987). Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. (Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. & Umberger, H. E., eds.), pp. 1110-1133. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Wu, J. H., Kathir, P. & Ippen-Ihler, K. (1988). The product of the F plasmid transfer operon gene, *traF*, is a periplasmic protein. *J. Bacteriol.* **170**, 3633-9.
- Yaffe, M. B., Schutkowski, M., Shen, M. H., Zhou, X. Z., Stukenberg, P. T., Rahfeld, J. U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M. W., Fischer, G., Cantley, L. C. & Lu, K. P. (1997). Sequence-Specific and Phosphorylation-Dependent Proline Isomerization - a Potential Mitotic Regulatory Mechanism. *Science* **278**, 1957-1960.

10 Anhang

10.1 Plasmide

Die in dieser Arbeit zur Expression von Proteinvarianten und zur Konstruktion des F-Pilin-*knock-out*-Stamms verwendeten Plasmide sind in Tabelle 10-1 aufgeführt.

Tabelle 10-1: verwendete Plasmide zur Expression von Proteinen und Konstruktion des F-Pilin-*knock-out*-Stamms

Plasmid		
pET11a	Expressionsvektor, in dem das zu exprimierende Gen unter Kontrolle eines T7-Promotors steht; Amp ^R	Novagen (Schwalbach, D)
pET24b	Expressionsvektor, in dem das zu exprimierende Gen unter Kontrolle eines T7-Promotors steht; Km ^R	
pET28b	Expressionsvektor, in dem das zu exprimierende Gen unter Kontrolle eines T7-Promotors steht; Km ^R	
pET31b	Expressionsvektor, in dem das zu exprimierende Gen C-terminal an eine Ketosteroidisomerase fusioniert wird; Amp ^R	
pET43.1a	Expressionsvektor, in dem das zu exprimierende Gen C-terminal an NusA fusioniert wird; Amp ^R	
pET-Duet-1	Expressionsvektor für die Coexpression von zwei Genen, jeweils unter Kontrolle eines T7-Promotors, Amp ^R	
pBlueskript IISK	Phagemidvektor, in dem das zu exprimierende Gen unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren Promotors p _{lac} steht; Amp ^R	Stratagene (La Jolla, USA)
pBlueskript IIKS	Phagemidvektor, in dem das zu exprimierende Gen unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren Promotors p _{lac} steht; Amp ^R	
pTrc99A	Expressionsvektor, in dem das zu exprimierende Gen unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren Promotors p _{lac} steht; Amp ^R	GE Healthcare (Freiburg, D)
pGEX-5x1	Expressionsvektor, in dem das zu exprimierende Gen C-terminal an Glutathion-S-Transferase fusioniert wird; Amp ^R	
pBAD24N	Expressionsvektor, in dem das zu exprimierende Gen unter Kontrolle des Arabinose-induzierbaren Promotors p _{BAD} steht, basierend auf pBAD24 mit zusätzlicher <i>NdeI</i> -Schnittstelle, Amp ^R	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pdsbA3	Expressionsvektor, in dem das zu exprimierende Gen mit der DsbA-Signalsequenz fusioniert wird; basierend auf pTrc99A	Hennecke <i>et al.</i> , 1999
pTCLE	Expressionsvektor, in dem das zu exprimierende Gen C-terminal an die <i>trpE</i> -Signalsequenz und einen (His) ₆ -Tag fusioniert wird; Amp ^R	Calderone <i>et al.</i> , 1996
pMALc2x	Expressionsvektor, in dem das zu exprimierende Gen C-terminal an MBP fusioniert wird und unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren Promotors p _{lac} steht; Amp ^R	New England Biolabs (Frankfurt, D)
pETSUMOadapt	Expressionsvektor, in dem das zu exprimierende Gen C-terminal an SUMO fusioniert wird und unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren Promotors p _{lac} steht; Amp ^R	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pKD46	Plasmid mit temperatursensitiven Replikationsursprung und λ Red-Rekombinase unter Kontrolle IPTG-induzierbaren Promotors p _{lac}	Datsenko & Wanner, 2000
pCH70	Plasmid mit Kanamycinkassette, basierend auf pBlueskript IIKS	C. Hayes (MIT, Cambridge, USA)

Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und deren Antibiotikumresistenz.

10.2 Oligodesoxyribonukleotide

Die in dieser Arbeit zur Klonierung und Mutagenese von G3P, TolA-C, F-Pilin und F-Pilin-Fusionsproteinen sowie die zur Erstellung verschiedener Phagenkonstrukte und Phagenbibliotheken verwendeten Oligodesoxyribonukleotide sind in Tabelle 10-2 aufgeführt.

Tabelle 10-2: verwendete Oligodesoxyribonukleotide

Name	Basensequenz in 5'→3'Richtung	Verwendung
Phagen- und G3P-spezifische Oligodesoxyribonukleotide		
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	Kolonie-PCR, Sequenzierung
T7-Terminator	GTTATGCTAGTTATTGCTCA	Kolonie-PCR, Sequenzierung
fdg3pN	TTATTATTCGCAATTCCTTT	Kolonie-PCR, Sequenzierung
fdsseq	AGCCGCCGCCAGCGTTAACCC	Kolonie-PCR, Sequenzierung
fdlseq	CAAGGCCAATCGTCTGACC	Kolonie-PCR, Sequenzierung
fdspl6	GCATTTTCGGTCATAGC	Kolonie-PCR, Sequenzierung
fdvg3pa	GGTTGTTGCCTTCGTAGTGG	Kolonie-PCR, Sequenzierung
g3pNNdea	GGAATTCCATATGGCTGAACTGTTGAAAGT TG	Klonierung G3P*, <i>NdeI</i> -Schnittstelle
g3pCHisb	CGGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGCC CGGACGGAGCATTGACAGGAGG	Klonierung G3P*, <i>BamHI</i> -Schnittstelle
g3pN1ssNa	GGAATTCCATATGAAAAAATTATTATTCGCA ATTCC	Klonierung G3P*, <i>NdeI</i> -Schnittstelle
g3pP161A_a	CTCAAGGCACTGACGCGGTTAAACTTATTA CCAG	Mutation P161A in G3P
g3pP161A_b	CTGGTAATAAGTTTTAACCGCGTCAGTGCCTT GAG	Mutation P161A in G3P
g3pQ212A_a	CCAATCGTCTTACCTGCCTGCGCCTCCTGTCA ATGC	Mutation Q212A in IIHY-G3P
g3pQ212A_b	GCATTGACAGGAGGCGCAGGCAGGTAAGAC GATTGG	Mutation Q212A in IIHY-G3P
g3pQ212L_a	CCAATCGTCTTACCTGCCTCTGCCTCCTGTCA ATGC	Mutation Q212L in IIHY-G3P
g3pQ212L_b	GCATTGACAGGAGGCGAGGCAGGTAAGAC GATTGG	Mutation Q212L in IIHY-G3P
g3pQ212G_a	CCAATCGTCTTACCTGCCTGGCCCTCCTGTCA ATGC	Mutation Q212G in IIHY-G3P
g3pQ212G_b	GCATTGACAGGAGGCGCAGGCAGGTAAGAC GATTGG	Mutation Q212G in IIHY-G3P
g3pP214A_a	CCTGCCTCAACCTGCGGTCAATGCTCCGTCC	Mutation P214A in IIHY-G3P
g3pP214A_b	GGACGGAGCATTGACCGCAGGTTGAGGCAG G	Mutation P214A in IIHY-G3P
WT_213G_BEa	GCCTTGAGGCAGGTCAGACGATTG	Mutation P213G in G3P
WT_213G_BEb	CCTGTCAATGCTCCGTCCG	Mutation P213G in G3P
wtP214A_BEa	GCCGTCAATGCTCCGTCCGGGGCCAG	Mutation P214A in G3P
wtP214A_BEb	AGGTTGAGGCAGGTCAGACGATTGGCC	Mutation P214A in G3P
G153D_BEa	GATACTGTTACTCAAGGCACTGACCCCG	Mutation G153D in G3P
G153D_BEb	CGTATAAACAGTTAATGCCCC	Mutation G153D in G3P
WT_212A_BEa	GCGCCTCCTGTCAATGCT	Mutation Q212A in G3P
WT_212A_BEb	AGGCAGGTCAGACGATTGG	Mutation Q212A in G3P
g3p172S_173S	GTACACTCCTGTGAGCAGC	Kolonie-PCR
172S173SBEa	CGTCATACATGGCTTTGCTGCTCACAGGAGT GTACTGG	stille Mutation S172/S173 in G3P

172S173SBEB	CTTACTGGAACGGTAAATTCAGAG	stille Mutation S172/S173 in G3P
g3p_207S_208S	GAATATCAAGGCCAGAGCAGC	Kolonie-PCR in IIHY-G3P
207S208S_BEa	GCTGCTCTGGCCTTGATATTCACAAAC	stille Mutation S207/S208 in IIHY-G3P
207S208S_BEb	TACCTGCCTCAACCTCCTG	stille Mutation S207/S208 in IIHY-G3P
WT_207S208S_BEb	GACCTGCCTCAACCTCCTG	stille Mutation S207/S208 in G3P
g3p_124S125L_BEa	GAGCTTGGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATAC	stille Mutation S124/L125 in G3P
g3p_124S125L_BEb	GGATTAGGATTAGCGGGGTTTTGC	stille Mutation S124/L125 in G3P
g3p124S125L	GCTAATCCTAATCCGAGCTTG	Kolonie-PCR
g3pwt-P213X-b	CCCGGACGGAGCATTGACAGGNNNTTGAGGC AGGTCAGACGATTG	Randomisierung der Position 213 in G3P
g3pwt-P214X-b	CCCGGACGGAGCATTGACNNNAGGTTGAGGC AGGTCAGACGATTG	Randomisierung der Position 214 in G3P
g3pwt-Q212X-b	CCCGGACGGAGCATTGACAGGAGNNNAGG CAGGTCAGACGATTG	Randomisierung der Position 212 in G3P
g3pwt-212-214 X-b	CCCGGACGGAGCATTGACNNNNNNNNNTTG AGGCAGGTCAGACGATTG	Randomisierung der Positionen 212-214 in G3P
g3pwtP105-P112-a	CCTCTCGACGGCACTTATCCGCCTGG	Randomisierung der Positionen 212, 213, 214 und 212-214 in G3P
g3p190A194A_BEa	GACTGCGCTGCGCATTCTGGCGGAATGAGG ATTTA	Mutation F190A/F194A in G3P
g3p181A_BEb	TCTGAATTTACCGTTGGCGTAAGCGTCATAC ATGGC	Mutation W181A in G3P
g3p190A194A_BEa NEU	GACTGCGCTGCGCATTCTGGCGGAATGAGG ATTTATTTGTTTGTGAATATCAAGGC	Mutation F190A/F194A in G3P
fdWT Q129H_BEa	CACCCCTTAATACTTTCATGTTTCAGAATAA TAAG	Mutation Q129H in G3P
fdWT Q129H_BEb	AGACTCCTCAAGAGAAGGATTAGGATTAGC	Mutation Q129H in G3P
P213X	CGTCTGACCTCCCTCAANNCTGTCAATGCT CCG	Randomisierung der Position 213 in IIHY-G3P
P213XoP_1	CGTCTGACCTCCCTCAA(GATC) (GAT) (GATC)CCTGTCAATGCTCCG	Randomisierung der Position 213 in IIHY-G3P
P213XoP_2	CGTCTGACCTCCCTCAA(GAT) (GATC) (GATC)CCTGTCAATGCTCCG	Randomisierung der Position 213 in IIHY-G3P

TolA-C-spezifische Oligodesoxyribonukleotide

TolA-N-Nde	GGAATCCATATGGATGATATTTTCGGTGA	Klonierung von TolA-C (AS 295-421), <i>NdeI</i> -Schnittstelle
TolACHis-Bam	CGGGATCCTTACTAGTGATGGTGATGGTGAT GTGCGGCCGCGCACGGTTTGAAGTCCAATGG	Klonierung von TolA-C (AS 295-421) mit C-terminalen CA ₃ H ₆ -Tag, <i>BamHI</i> -Schnittstelle

F-Pilin-spezifische Oligodesoxyribonukleotide

TraA_ko_SacI	CCCGAGCTCCATTTATCCGAAATTGAGGTAA CT	Konstruktion von <i>AtraA</i>
TraA_ko_BamHI	CGGGATCCCATCAGGTCCTGACCACTGCTGC C	Konstruktion von <i>AtraA</i>
TraA_ko_EcoRI	CCGGAATCCGGTTAAGGCGACCTTCGGTAA G	Konstruktion von <i>AtraA</i>
TraA_ko_KpnI	CCCGGTACCTTATTTCTGTGTCAGAGGCCAAC	Konstruktion von <i>AtraA</i>

ProPilinN-SacI	CCCAGCTCATGAATGCTGTTTTAAGTGTTCA GGG	Klonierung von Propilin, <i>SacI</i> - Schnittstelle
PropilinN-EcoRI	CCGGAATTCATGAATGCTGTTTTAAGTGTTCA G	Klonierung von Propilin, <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
PropilinC-HindIII	CCCAAGCTTTCAGAGGCCAACGACGGCCATA CC	Klonierung von Propilin, <i>HindIII</i> -Schnittstelle
PilinN_Nde	GGAATTCCATATGGCCGGCAGCAGTGGTCAG GACCTGATGGC	Klonierung von F-Pilin ohne Signalsequenz, <i>NdeI</i> - Schnittstelle
PilinC_Hisb	CGGATCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGC GGCCGCGAGGCCAACGACGGCCATACCCACA GC	Klonierung von F-Pilin mit C- terminalen A ₃ H ₆ -Tag, <i>BamHI</i> - Schnittstelle
PilinN_Ndeg3pSS	GGAATTCCATATGAAAAAATTATTATTCGCA ATTCTTTAGTTGTTCTTTCTATTCTCACTCC GCCGGCAGCAGTGGTCAGGACCTGATGGC	Klonierung von F-Pilin mit G3P-Signalsequenz, <i>NdeI</i> - Schnittstelle
PilinC_HisHind	GGCGGCAAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGA TGTGCGGCCGCGAGGCCAACGACGGCCATAC CCAC	Klonierung von F-Pilin mit C- terminalen A ₃ H ₆ -Tag, <i>HindIII</i> - Schnittstelle
PilinN_SacI	TAGTCCGAGCTCATGGCCGGCAGCAGTGGTC AGGACCTGATGGC	Klonierung von F-Pilin ohne Signalsequenz, <i>SacI</i> - Schnittstelle
PilinN_SacI g3pSS	TAGTCCGAGCTCATGAAAAAATTATTATTCG CAATTCCTTTAGTTGTTCTTTCTATTCTCACT CCGCCGGCAGCAGTGGTCAGGACCTGATGGC	Klonierung von F-Pilin mit G3P-Signalsequenz, <i>SacI</i> - Schnittstelle
Nde_ompA_N	GGAATTCCATATGAAAAAGACAGCTATCGCG	Klonierung von F-Pilin mit OmpA-Signalsequenz, <i>NdeI</i> - Schnittstelle
ompAC_PilinN_ neu	GCTTGCCATCAGGTCCTGACCACTGCTGCCG GCGGCCTGCGCTACGGTAGCG	Klonierung von F-Pilin mit OmpA-Signalsequenz
SacI-ompA-N	GGCCGGAGCTCATGAAAAAGACAGCTATCGC G	Klonierung von F-Pilin mit OmpA-Signalsequenz, <i>SacI</i> - Schnittstelle
SacI-bLA-SS-N	GGCCGGAGCTCATGAGTATTCAACATTTCCG TGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTG CCTTCCTGTTTTGCTGCCGGCAGCAGTGGTC AGGACCTGATGGC	Klonierung von F-Pilin mit bLA-Signalsequenz, <i>SacI</i> - Schnittstelle
PilinC-GSSG- HisB	CGGATCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGCC AGACGAGCCGAGGCCAACGACGGCCATACC CACAGC	Klonierung von F-Pilin mit C- terminalen GSSGH ₆ -Tag, <i>BamHI</i> -Schnittstelle
PilinC BamHI	CGCGGATCCTCAGAGGCCAACGACGGCCATA CCC	Klonierung von F-Pilin, <i>BamHI</i> - Schnittstelle
Nde-N-His- GSSG-Piln	GGGGAATTCATATGCACCATCACCATCACC ATGGCTCCTCTGGCGCCGGCAGCAGTGGTCA GGACCTGATG	Klonierung von F-Pilin mit N- terminalen H ₆ GSSG-Tag, <i>NdeI</i> - Schnittstelle
PilinC- GGGSEGGH6- BamHI	CGGGATCCTTAATGGTGATGGTGATGGTGAC CGCCCTCCGAGCCACCGCCGAGGCCAACGAC GGCCATACCCACAGC	Klonierung von F-Pilin mit C- terminalen GGGSEGGH ₆ -Tag, <i>BamHI</i> -Schnittstelle
PilinC- SEGGTSH6- BamHI	CGGGATCCTTAATGGTGATGGTGATGGTGAC CGCCACCCTCCGAGGTACCGCCCTCCGAGAG GCCAACGACGGCCATACCCACAGC	Klonierung von F-Pilin mit C- terminalen SEGGTSEGGH ₆ - Tag, <i>BamHI</i> -Schnittstelle
Pilin N SfiI	CCGGGGCCCAGCCGGCCGGCAGCAGTGG TCAGGACCTGATG	Klonierung von F-Pilin in fd, <i>SfiI</i> -Schnittstelle
Pilin C KpnI	GGCCGGTACCAGCTCAGAGGGCAGGCCAAC GACGGCCATACCCACAGC	Klonierung von F-Pilin in fd, <i>KpnI</i> -Schnittstelle
PilinN_XmnI	GGATCGAGGGAAGGATTTACGCCGGCAGCA GTGGTCAGGACCTGATGGC	Fusion von F-Pilin mit MBP in pMALc2x, <i>XmnI</i> -Schnittstelle
N-His-MBP NdeI	GGAATTCCATATGCACCATCACCATCACCAT GGCTCGTCTGGCAAATCGAAGAAGGTA AAC TGGTAATC	Fusion von F-Pilin mit MBP mit H ₆ GSSG-Tag anMBP, <i>NdeI</i> - Schnittstelle
MBP-C-BamHI	GCGGGATCCCTAGAATTCTGAAATCCTTCCCT C	Fusion von MBP, <i>BamHI</i> - Schnittstelle

PilinC-GGG1-KpnI	CGGGGTACCACCTCGAGCCGCCACCGAGGC CAACGACGGCCATACCCACAGC	Fusion von F-Pilin in N-His-MBP-Pilin-MBP, <i>KpnI</i> -Schnittstelle
KpnI-GGG2-MBP-N	CGGGGTACCAGCGGGGCGGTGGCGGTATGA AAATCGAAGAAGGTAACTGGTAATC	Fusion von F-Pilin in N-His-MBP-Pilin-MBP, <i>KpnI</i> -Schnittstelle
NdeI-MBP	GGAATTCATATGAAAATCGAAGAAGGTAAA CTGGTAATC	Fusion von F-Pilin in MBP-Pilin-Pilin GGGSEGGH ₆ , <i>NdeI</i> -Schnittstelle
KpnI-GGG2-PilinN	CGGGGTACCAGCGGGGCGGTGGCGGTGCCG GCAGCAGTGGTCAGGACCTGATG	Fusion von F-Pilin in MBP-Pilin-Pilin GGGSEGGH ₆ , <i>KpnI</i> -Schnittstelle
PilinGly38 XmnI	GGATCGAGGGAAGGATTTTCAGGTGCTGTCAT GTACATGATGACC	Fusion von AS 38-71 von F-Pilin mit MBP, <i>XmnI</i> -Schnittstelle
SlyD-TraA-N-BamHI	CGCGGATCCGGTGGCGGTTCCGGCGGTGGCT CTGGTGGCGGTGCCGGCAGCAGTGGTCAGGA CCTGATGGC	Fusion von F-Pilin mit SlyD in pET24b, <i>BamHI</i> -Schnittstelle
SlyD-TraA-C-XhoI	CCGCTCGAGGAGGCCAACGACGGCCATACCC ACAGC	Fusion von F-Pilin mit SlyD in pET24b, <i>XhoI</i> -Schnittstelle
PilinN BsaI	CGGTCCGGTCTCATGGTGCCGGCAGCAGTGG TCAGGACCTGATG	Fusion von F-Pilin mit SUMO, <i>BsaI</i> -Schnittstelle
SUMO_N Nde oHis	GGGAATTCATATGTCCGACTCAGAAGTCAA TCAAGAAGCT	Klonierung von SUMO ohne N-terminalen H ₆ -Tag, <i>NdeI</i> -Schnittstelle
SUMO_C BamHI	CGCGGATCCTTAGTAGGTAGCACCACCAATC TGTTCTCTGTGAGCCTC	Klonierung von SUMO, <i>BamHI</i> -Schnittstelle
N-His Nde SUMO	GGGAATTCATATGGGCAGCAGCCATCATCA TCATCATCACGGCAGC	Klonierung von SUMO mit N-terminalen H ₆ -Tag, <i>BamHI</i> -Schnittstelle
PilinN SpeI	CGACTAGTGGTTCTGGTGCCGGCAGCAGTGG TCAGGACCTG	Fusion von F-Pilin mit NusA in pET43.1a, <i>SpeI</i> -Schnittstelle
PilinN BamHI	GGGATCCCCGCCGGCAGCAGTGGTCAGGACC TG	Fusion von F-Pilin mit GST in pGEX-5x1, <i>BamHI</i> -Schnittstelle
GlyHis6-C SmaI	AGGCCCGGGTTAATGGTGATGGTGATGGTGA CC	Fusion von F-Pilin mit GST mit C-terminalen GGGSEGGH ₆ -Tag, <i>SmaI</i> -Schnittstelle
pTCLE PilinN Nde	CGGGAATTCATATGGCCGGCAGCAGTGGTC AGGACCTGCTGGCAAGCGGT	Klonierung von F-Pilin in pTCLE, Mutation M9L, <i>NdeI</i> -Schnittstelle
pBAD24N_Seq	GCGGATCCTACCTGACGC	Kolonie-PCR, Sequenzierung
pMALc2x_Seq	TCGATGAAGCCCTGAAAGACG	Kolonie-PCR, Sequenzierung
pBluescript_KSII_Term	TCGAGGTCGACGGTATCG	Kolonie-PCR, Sequenzierung
pMAL-MBP-Seq	TGTGTGGAATTGTGAGCGG	Kolonie-PCR, Sequenzierung
pMAL-MBP-Seq-C	AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG	Kolonie-PCR, Sequenzierung

Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonukleotide und der jeweilige Verwendungszweck. N steht dabei für eine Mischung der vier Nukleotide an der entsprechenden Position.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2002 bis Juni 2007 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Franz X. Schmid angefertigt. Bei ihm möchte ich mich für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit bedanken. Durch seine zahlreichen guten Ratschläge, nicht nur wissenschaftlicher Art, und seine stete Hilfsbereitschaft hat er erheblichen Anteil an dieser Arbeit.

Vielen Dank an meine Laborkolleginnen und -kollegen Jochen Balbach, Roman Jakob, Insa Kather, Stefan Lorenz, Christian Löw, Christine Magg, Andreas Martin, Ulrich Weininger, Michael Wunderlich, Markus Zeeb und Gabriel Zoldak für ihren fachlichen Rat, ihre Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit im Labor. Ein besonderer Dank gilt Andreas Reiner und Jonathan Power für ihre hilfreiche Mitarbeit im Rahmen ihrer Mitarbeiterpraktika und Diplomarbeiten.

Mein herzlicher Dank gilt Insa Kather und Andreas Martin für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für die schöne Zeit in Bayreuth und die Ablenkung vom Laboralltag bedanken.

Vielen herzlichen Dank auch an meine Eltern und Andi, die immer für mich da sind und mir durch ihre Unterstützung so vieles ermöglichen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, den 29. Juni 2007