

Das Proteintoxin Colicin M
aus *Escherichia coli*:
aktives Zentrum und spezifische Resistenz

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Stephanie Helbig
aus Schweinfurt

Tübingen
2012

Tag der mündlichen Qualifikation: 02.04.2012

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Volkmar Braun

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Friedrich Götz

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	2
1.1 Bacteriocine als System mikrobieller Verteidigung.....	2
1.2 Colicine – Proteintoxine von <i>Escherichia coli</i>	3
1.3 Colicin M – ein einzigartiges Toxin.....	5
1.3.1 Wirkungsweise von Colicin M.....	5
1.3.2 Synthese von Colicin M.....	7
1.3.3 Freisetzung von Colicin M.....	8
1.3.4 Struktur von Colicin M.....	8
1.3.5 Immunität des Produzenten gegenüber Colicin M.....	10
1.3.6 Import von Colicin M in die Zielzelle.....	13
1.4 Die Bedeutung molekularer Chaperone für die Proteinfaltung.....	16
1.5 Faltungsfaktoren im Periplasma von <i>Escherichia coli</i>	17
1.6 Die <i>cis/trans</i> -Isomerisierung von Prolyl-Peptidbindungen als geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Proteinfaltung.....	19
1.6.1 Eigenschaften von Prolyl-Peptidbindungen.....	19
1.6.2 Katalyse der Isomerisierung von Prolyl-Peptidbindungen durch Peptidyl- Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen.....	21
1.7 Das periplasmatische Protein FkpA – Chaperon und Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> - Isomerase.....	22
1.8 Abhängigkeit der Colicin M-Aktivität von FkpA.....	24
1.9 Einfluss von CbrA auf die Colicin M-Sensitivität.....	25
2 Ergebnisse und Diskussion	27
2.1 Zuordnung funktioneller Domänen von Colicin M.....	27
2.1.1 Lage des aktiven Zentrums.....	27
2.1.2 Rezeptorbindung über die hydrophobe Helix α_1	30
2.1.3 Funktion des offenen β -Barrels.....	32
2.2 Aktivierung von Colicin M durch FkpA.....	34
2.2.1 Aktivität von Prolin-Einzelmutanten <i>in vivo</i>	34
2.2.2 Katalyse der <i>cis/trans</i> -Isomerisierung von Prolyl-Peptidbindungen in synthetischen Peptiden.....	38

2.3	Modifizierung der äußeren Membran durch das Flavoprotein CbrA und die dadurch vermittelte Resistenz gegenüber Colicin M.....	43
2.3.1	Kopplung von <i>cbrA</i> -Expression und Colicin M-Resistenz.....	43
2.3.2	Strukturänderung der äußeren Membran von <i>E. coli</i> durch CbrA.....	46
2.3.3	Identifizierung von CbrA als FAD-bindendes Protein.....	49
3	Ausblick.....	52
4	Literaturverzeichnis.....	54
5	Abkürzungsverzeichnis.....	69
6	Manuskripte/Publicationen.....	71
7	Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen/Manuskripten.....	134
8	Danksagung.....	136

Zusammenfassung

In Stresssituationen produzieren bis zu 50 % aller *Escherichia coli*-Stämme plasmidcodierte Proteintoxine, sogenannte Colicine, die andere *E. coli*-Zellen und nahe verwandte Stämme abtöten. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem kleinsten dieser Toxine, Colicin M. Als einziges Colicin inhibiert es die Mureinsynthese durch Hydrolyse des Phosphatesters zwischen dem Lipidcarrier Undecaprenol und der Mureinvorstufe N-Acetylmuramyl-(Pentapeptid)-N-Acetylglucosamin im Periplasma. Die kompakte Struktur des Proteins weist eine einzigartige Faltung auf. Bei Recherchen in Genom-Datenbanken konnte bislang kein Protein gefunden werden, das eine vorhergesagte Phosphatase-Aktivität besitzt und zugleich Ähnlichkeit zu Colicin M zeigt. In der vorliegenden Arbeit konnte das aktive Zentrum dieser neuartigen Phosphatase durch Mutationsstudien definiert werden. Dabei ist Asp226, das an der Oberfläche des Proteins exponiert ist, vermutlich direkt an der katalytischen Aktivität beteiligt. Die umgebenden Reste Asp225, Tyr228, Asp229, His235 und Arg236 unterstützen die Hydrolyse des Phosphoesters. Die exponierte hydrophobe Helix α_1 konnte als die Region identifiziert werden, die mit dem Colicin M-Rezeptor FhuA in der äußeren Membran interagiert.

Mutationen in FhuA oder im Ton-Komplex aus TonB, ExbB und ExbD, der die für die Colicin M-Aufnahme nötige Energie der protonenmotorischen Kraft von der inneren auf die äußere Membran überträgt, führen zu Colicin M-Resistenz. Die Toxizität von Colicin M hängt zudem streng vom periplasmatischen Protein FkpA ab, das neben seiner Chaperon- auch eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasedomäne besitzt. Eine Mutation in dieser Isomerase-Domäne verleiht Resistenz gegenüber Colicin M. Es wird vermutet, dass das Toxin während seiner Aufnahme über die äußere Membran entfaltet und im Periplasma mit der Unterstützung von FkpA rückgefaltet wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Prolyl-Peptidbindung Phe175-Pro176 als die Bindung identifiziert werden, die vermutlich das Substrat von FkpA darstellt und während der Rückfaltung *cis* zu *trans* isomerisiert wird. Der Chaperondomäne von FkpA wird dabei eine unterstützende Aktivität zugeschrieben.

Des Weiteren wurde das Protein CbrA entdeckt, dessen Expression über das CreBC-Zweikomponentensystem reguliert wird und die Sensitivität gegenüber Colicin M herabsetzt. Dies stellt einen neuen Resistenzmechanismus dar, der unter Nährstoff-limitierten Wachstumsbedingungen, wie sie in natürlichen Habitaten von *E. coli* herrschen, dem Schutz der Zellen vor dem Toxin dient. CbrA wurde als FAD-abhängiges Protein identifiziert, das Homologie zu Geranylgeranyl-Reduktasen zeigt. Die Ursache der Colicin M-Resistenz wird in einer Änderung der Membranintegrität und/oder des Substrates von Colicin M vermutet.

1 Einleitung

1.1 Bacteriocine als System mikrobieller Verteidigung

Mikroorganismen haben eine Vielzahl unterschiedlicher Systeme entwickelt, um sich gegen andere Prokaryoten durchzusetzen. Dazu zählt z. B. die Produktion klassischer Antibiotika, lytischer Substanzen wie Lysozym, verschiedener Arten von Exotoxinen oder die Synthese der sogenannten Bacteriocine [144;145;170]. Hierbei handelt es sich um proteinogene Toxine, die von bestimmten Bakterienstämmen produziert werden und andere Stämme der gleichen oder einer ähnlichen Art abtöten. Im Vergleich zu den klassischen Breitband-Antibiotika haben die Bacteriocine ein enges Wirkspektrum und töten somit nur die Bakterien ab, die mit dem Produzenten nahe verwandt sind [128]. Derartige Toxine wurden in fast allen Bakterienarten gefunden, die bis heute untersucht wurden. Bei den Toxinen der Gram-positiven handelt es sich um kleine Peptid-Bacteriocine, während die Gram-negativen eine große Vielzahl kleiner Peptide und großer Proteine synthetisieren [144]. Auch bei den Archaea wurden Bacteriocin-ähnliche Toxine gefunden, die Archaeocine, von denen bislang nur die Halocin-Familie der Halobakterien charakterisiert ist [176].

All diese Proteine sind wichtige Mediatoren inter- und intraspezifischer Interaktionen. Sie verhindern das Eindringen eines neuen Stammes in eine etablierte mikrobielle Gemeinschaft [61;112] oder in eine bereits besetzte ökologische Nische [99] und ermöglichen dem Bacteriocin-Produzenten Zugang zu limitierten Ressourcen, indem sie den Konkurrenten abtöten. Sie erlauben jedoch auch eine stabile Koexistenz von Populationen in Nischen wie z. B. im Darm von Säugetieren [118] und spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der mikrobiellen Biodiversität [32;103]. Bei Gram-positiven dienen sie auch als Mediatoren beim Quorum sensing [60] und als Kommunikationssignal in bakteriellen Zusammenschlüssen wie z. B. in Biofilmen [84;144].

Unter den Bacteriocinen sind die Colicine von *Escherichia coli* am besten untersucht. Diese werden im folgenden Kapitel behandelt.

1.2 Colicine – Proteintoxine von *Escherichia coli*

Seit der Entdeckung des ersten Colicins von Gratia 1925 [64] sind die Bacteriocine von *E. coli*, die in natürlichen Populationen von 10 bis 50 % der Stämme produziert werden [25], bis heute Gegenstand intensiver Forschung. Bislang wurden mehr als 20 Colicine entdeckt [25;104], die bekanntesten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Die verschiedenen Toxine haben unterschiedliche Wirkmechanismen. Sie hemmen die Mureinsynthese, bauen als DNasen oder RNasen Nukleinsäuren im Cytoplasma ab oder bilden Poren in der Cytoplasmamembran und reduzieren somit das Membranpotential [25]. Um diese toxischen Wirkungen ausüben zu können, müssen die freigesetzten Colicine in die Zielzelle aufgenommen werden. Dazu binden sie an spezifische Rezeptoren in der äußeren Membran, über die sie mit Hilfe bestimmter Translokationsproteine transferiert werden.

Tabelle 1: Einteilung, Importsystem und Wirkungsweise verschiedener Colicine

Colicin	Rezeptor in der äußeren Membran	Translokationsproteine	Wirkmechanismus
Gruppe A			
A	BtuB	OmpF, TolQ, TolR, TolA, TolB	Porenbildung
E1	BtuB	TolC, TolA, TolQ	Porenbildung
E2, E7, E8, E9	BtuB	OmpF, TolQ, TolR, TolA, TolB	DNase
E3, E4, E6	BtuB	OmpF, TolQ, TolR, TolA, TolB	16S-RNase
E5	BtuB	OmpF, TolQ, TolR, TolA, TolB	tRNA-spezifische RNase
K	Tsx	OmpF, TolQ, TolR, TolA, TolB	Porenbildung
N	OmpF	OmpF, TolQ, TolR, TolA	Porenbildung
S4	OmpW	OmpF, TolQ, TolR, TolA, TolB	Porenbildung
U	OmpA	OmpF, TolQ, TolR, TolA, TolB	Porenbildung
Gruppe B			
B	FepA	TonB, ExbB, ExbD	Porenbildung
D	FepA	TonB, ExbB, ExbD	tRNA-spezifische RNase
Ia, Ib	Cir	Cir, TonB, ExbB, ExbD	Porenbildung
M	FhuA	TonB, ExbB, ExbD	Inhibition der Mureinsynthese
5, 10	Tsx	TolC, TonB, ExbB, ExbD	Porenbildung

BtuB: Vitamin B₁₂-Transporter, Cir: Colicin I-Rezeptor, FepA: Ferrienterobactin-Rezeptor, FhuA: Ferrichrom-Eisen-Rezeptor, Omp: *outer membrane protein* (Außenmembranprotein), Tsx: Nukleosid-spezifisches porenbildendes Protein; Tabelle verändert nach [25;104].

Obwohl sie auch in ihrem Molekulargewicht variieren (30 - 70 kDa), haben alle Colicine den gleichen Aufbau aus drei Domänen, die die einzelnen Schritte von ihrer Aufnahme in die Zelle bis zur Ausübung der Toxizität widerspiegeln. Sie bestehen aus einer zentralen Domäne, die mit hoher Affinität an ihren spezifischen Rezeptor in der äußeren Membran

bindet, einer flexiblen, Glycin-reichen N-terminalen Domäne für die Translokation über die äußere Membran und einer C-terminalen Aktivitätsdomäne, die für die Toxizität verantwortlich ist (siehe auch 1.3.4).

Als Rezeptoren dienen meist monomere β -Barrels aus 22 antiparallelen Faltblättern mit einer N-terminalen globulären Korkdomäne, die normalerweise Vitamin B₁₂ (BtuB) oder Eisen-Chelat-Komplexe (FhuA, FepA, Tsx, Cir) transportieren, oder trimere Porine wie OmpF oder OmpW. Die Spezifität dieser Rezeptoren erklärt das enge Wirkspektrum der Colicine [25;104].

Aufgrund ihrer Translokationsmaschinerie werden die Colicine in zwei Gruppen eingeteilt (vgl. Tabelle 1). Die Aufnahme der Gruppe A-Colicine ist vom Tol-System abhängig. Dieses besteht aus den Proteinen TolA, Q und R in der inneren Membran, TolB im Periplasma und dem Lipoprotein Pal in der äußeren Membran. Die physiologische Funktion dieses Systems ist unklar, vermutlich spielt es eine stabilisierende Rolle bei der Zellteilung [59;110]. Die Gruppe B-Colicine werden mit Hilfe des TonB-Systems aus TonB, ExbB und ExbD aufgenommen. Dieser Komplex sitzt in der Cytoplasmamembran und überträgt die für den Import nötige Energie, die aus der protonenmotorischen Kraft über der inneren Membran stammt, auf den Rezeptor (siehe auch 1.3.6) [25].

Tol-abhängige Colicine brauchen (mit Ausnahme von Colicin N) neben ihrem Rezeptor an der Zelloberfläche ein zweites Protein (OmpF oder TolC), das als Translokationspore dient [104]. Dies wurde beispielsweise für die Aufnahme von Colicin E2 gezeigt, das nach der Bindung an den Rezeptor BtuB OmpF über seine N-terminale Translokationsdomäne rekrutiert. Man geht davon aus, dass nach Interaktion dieser Domäne mit dem Tol-Komplex die Rezeptorbinde- und Translokationsdomäne proteolytisch abgespalten wird und die Aktivitätsdomäne die äußere Membran durch die OmpF-Translokationspore passieren kann [37;161].

Die Translokation von Colicin N stellt eine Ausnahme dar, da dieses Toxin OmpF als Rezeptor und Translokator verwendet und nicht durch die Pore, sondern an der Kontaktstelle zwischen dem OmpF-Trimer und dem Lipopolysaccharid ins Periplasma gelangt [6].

Auch für die Aufnahme der Colicine Ia und Ib der Gruppe B ist ein zusätzliches Translokationsprotein in der äußeren Membran nötig (vgl. Tabelle 1). Sie rekrutieren nach der Bindung an den Rezeptor Cir über ihren unstrukturierten N-Terminus ein zweites Cir-Molekül, durch dessen Pore die Toxine in die Zelle aufgenommen werden [22;93].

Für die Ton-abhängigen Colicine B, D und M wurde bislang kein zusätzliches Translokationsprotein in der äußeren Membran entdeckt [104]. Es wird vermutet, dass diese Toxine durch die Pore des ursprünglichen Rezeptors in das Periplasma gelangen [25] (siehe auch 1.3.6).

1.3 Colicin M – ein einzigartiges Toxin

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Colicin M, das einzigartig unter den von *E. coli* produzierten Bacteriocinen ist. Es wurde 1951 von Fredericq entdeckt [54;55] und ab den 70er Jahren von Braun *et al.* näher beschrieben [16;21].

1.3.1 Wirkungsweise von Colicin M

Als einziges Bacteriocin von *E. coli* bewirkt Colicin M die Lyse sensitiver Zellen, indem es im Periplasma agiert und dort die Biosynthese des Mureins inhibiert [20;71;151]. Dieses besteht aus den zwei Zuckerderivaten N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, die β -1,4-glykosidisch verbunden und über Peptidketten miteinander quervernetzt sind [156;179]. Die Mureinvorstufen werden im Cytoplasma synthetisiert und können aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften nur mit Hilfe eines Lipidcarriers durch die Cytoplasmamembran transportiert werden. Sie binden dazu an das C₅₅-Isoprenoid Undecaprenylphosphat, das die Vorstufen in Form von Lipid II durch die Membran transferiert, bevor sie in das bestehende Peptidoglykan eingebaut werden. Dabei wird Undecaprenylpyrophosphat freigesetzt und durch Abspaltung des endständigen Phosphats in Monophosphat umgewandelt (Abbildung 1). Dieses kann wieder in den Reaktionszyklus eintreten und als Rezeptor für neue Mureinvorstufen dienen. An dieser Stelle greift Colicin M an und spaltet als Phosphatase die Bindung zwischen dem Lipidrest und der Pyrophosphatgruppe. Somit werden anstelle von Undecaprenylphosphat als Endprodukte Undecaprenol (C₅₅-OH) und 1-Pyrophospho-N-Acetylmuramyl-(Pentapeptid)-N-Acetylglucosamin gebildet. Die Regeneration des Lipidcarriers unterbleibt und die Peptidoglykansynthese ist blockiert [41;71;151]. Im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung von osmotisch sensitiven Sphäroblasten und zur Lyse der Zellen [20;150].

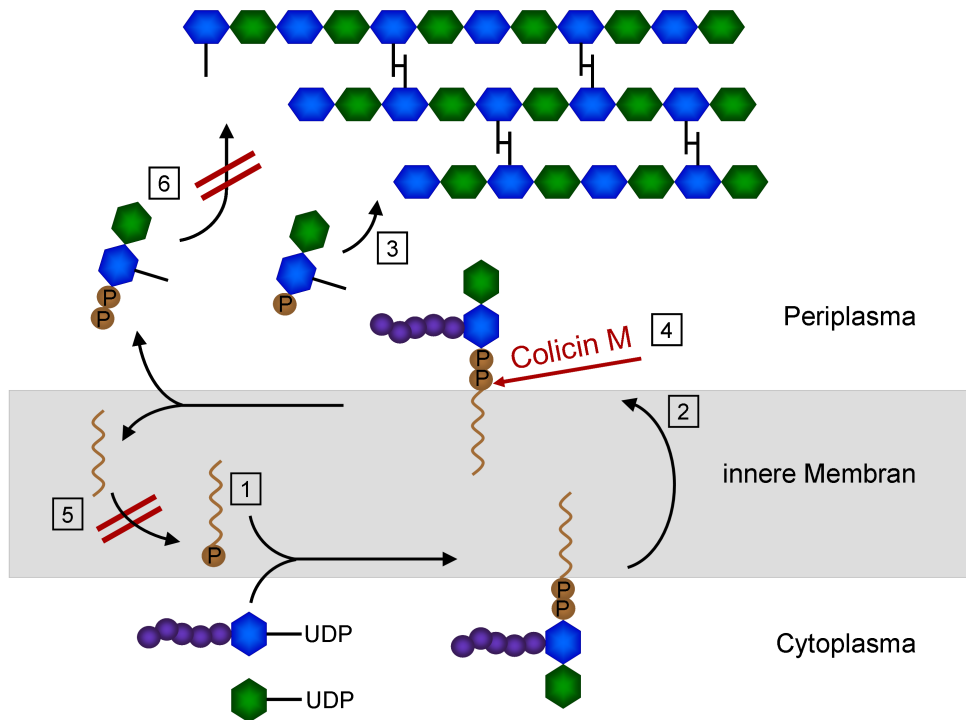


Abbildung 1: Wirkmechanismus von Colicin M

Bei der Synthese des Peptidoglykan werden die UDP-aktivierten Mureinvorstufen N-Acetylglucosamin (grün) und N-Acetylmuraminsäure (blau) mit Hilfe des Lipidcarriers Undecaprenylphosphat (braun; (1)) über die innere Membran transferiert (2), wo sie nach Abspaltung des Phosphatrests in das bestehende Murein eingebaut werden (3). Undecaprenylphosphat kann wieder in den Reaktionszyklus eintreten. Colicin M spaltet im Periplasma die Phosphoesterbindung zwischen dem Lipidcarrier und den Mureinvorstufen (roter Pfeil (4)), was in einem unphosphorylierten Lipidcarrier resultiert, dessen Regeneration somit blockiert ist (5). Die zweifach phosphorylierten Mureinvorstufen können nicht mehr in das Peptidoglykan eingebaut werden (6) und es kommt zur Lyse der Zellen. P: Phosphat; UDP: Uridindiphosphat; violette Kreise: Aminosäuren des an N-Acetylmuraminsäure gebundenen Pentapeptids; rote doppelte Linien: durch Colicin M gehemmte Reaktionen.

Wie der Mechanismus der Substratspaltung genau verläuft, ist nicht bekannt. Die meisten Phosphatasereaktionen sind Zwei-Schritt-Mechanismen mit einem Phosphoenzym-Intermediat als Zwischenschritt. Trifft dies auch auf Colicin M zu, könnte ein nukleophiler Angriff der Phosphoesterbindung durch einen katalytischen Rest zur Bildung eines instabilen Toxin-Pyrophospho-Zucker-Peptid-Intermediates und der Freisetzung von Undecaprenol führen. Ein zweiter nukleophiler Angriff durch ein aktiviertes Wassermolekül könnte in der Freisetzung des Pyrophospho-Zucker-Peptid-Produkts resultieren. Theoretisch ist auch ein Ein-Schritt-Mechanismus vorstellbar. Dabei würde das Substrat so im aktiven Zentrum positioniert werden, dass ein direkter nukleophiler Angriff durch ein Wassermolekül geschieht, wie dies z. B. bei Serin-/Threonin-Phosphatasen der Fall ist [9].

Da Undecaprenylphosphat auch bei der Synthese des Lipopolysaccharid-O-Antigens als Lipidcarrier fungiert, wird diese Reaktion ebenfalls durch Colicin M gehemmt, was jedoch keine Lyse der Zellen nach sich zieht [70]. Dies spielt nur in natürlichen Isolaten von *E. coli* eine Rolle, da unter Laborbedingungen keine Formen vorkommen, die ein O-Antigen auf ihrer Oberfläche tragen [18].

1.3.2 Synthese von Colicin M

Colicine sind in Form von Operons auf Plasmiden codiert. Man unterscheidet zwei Klassen dieser pCol-Plasmide, Typ I und II [69]. Die Typ I-Plasmide sind mit sechs bis zehn Kilobasen relativ klein und kommen in ca. 20 Kopien pro Zelle vor. Sie codieren überwiegend Colicine der Gruppe A, während die Plasmide des Typ II das Operon für die Gruppe B-Colicine tragen. Diese sind mit ca. 40 Kilobasen deutlich größer und liegen nur als eine Kopie in der Zelle vor. Sie können auch zwei Colicin-Operons enthalten, die nebeneinander liegen. Zellen, die ein solches Plasmid tragen, produzieren somit zwei unterschiedliche Colicine, wie dies z. B. für Colicin B und M der Fall ist [25] (s. u.).

Die Colicin-Operons bestehen je nach Art des Colicins aus ein bis drei Genen. Das erste Gen ist das Aktivitätsgen, das das jeweilige Toxin codiert. Das Operon porenbildender Colicine der Gruppe B besteht nur aus diesem Gen. Strangabwärts liegt das Gen für das Immunitätsprotein, das unter der Kontrolle von zwei Promotoren steht, dem LexA-Promotor des Colicin-Operons und seinem eigenen konstitutiven Promotor, der im Aktivitätsgen lokalisiert ist. Die ständige Expression des Immunitätsgens stellt sicher, dass der Colicin-Produzent nicht durch sein eigens synthetisiertes Toxin abgetötet wird (siehe 1.3.5). Porenbildende Colicine haben in ihrem Operon kein Immunitätsgen, dieses liegt auf dem Gegenstrang zwischen dem Colicin-Aktivitäts- und dem Lysegen und wird mit Hilfe eines eigenen Promotors konstitutiv exprimiert. Das letzte Gen des Operons ist das Lysegen, dessen Produkt die Freisetzung des Colicins ins Medium erlaubt. Es kommt jedoch nur bei Colicinen der Gruppe A sowie bei Colicin 5, 10 und D der Gruppe B vor [25;142;143].

Colicin M (Cma) ist zusammen mit Colicin B (Cba) auf pColBM-Plasmiden codiert. Die Gene liegen in der Reihenfolge *cba*, *cbi*, *cma*, *cmi* hinter dem LexA-Promotor. Die Immunitätsgene (*cbi*, *cmi*) werden in die eine und die Strukturgene (*cba*, *cma*) in die andere Richtung transkribiert [107;132]. Es ist kein Gen für ein Lyseprotein vorhanden [174].

Die Expression aller Colicin-Operons wird durch die SOS-Antwort ausgelöst. Der Repressor der SOS-Gene LexA bindet in Form von zwei Dimeren an zwei überlappende LexA-Boxen, die strangabwärts von der Pribnow-Box des Promotors liegen, und verhindert so die

Transkription des Colicin-Operons. Unter Stresseinwirkung wie z. B. bei Nährstoffmangel, durch UV-Licht oder DNA-schädigende Substanzen wird RecA aktiviert und stimuliert die Selbstspaltung und Freisetzung des LexA-Repressors, so dass das Colicin-Operon transkribiert werden kann [25]. Vor dem Colicin M-Operon liegt keine SOS-Box, seine Transkription wird über die LexA-Box reguliert, die direkt vor dem Colicin B-Strukturgen lokalisiert ist [107;132].

Neben den beiden Colicinen codieren pColBM-Plasmide auch Virulenzfaktoren wie Eisentransportsysteme, Hämolyse, Hämagglutinine oder Faktoren, die Resistenz gegenüber dem Komplementsystem vermitteln [31].

1.3.3 Freisetzung von Colicin M

Um andere Zellen abzutöten müssen die produzierten Colicine ins Medium freigesetzt werden. Dies erfolgt nicht über einen der fünf Protein-Sekretionswege, die für Gram-negative Bakterien bekannt sind [127;173], sondern mit Hilfe eines Lyseproteins, das auf dem Colicin-Operon codiert ist (vgl. 1.3.2) [19]. Das Lysegen wird zusammen mit dem Strukturgen exprimiert.

Die Lyseproteine sind kleine Lipoproteine aus ca. 30 Aminosäuren, die im Cytoplasma als Vorläufer mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert und anschließend mehrfach prozessiert werden, bevor sie ihren Zielort an der Innenseite der äußeren Membran erreichen [25]. Die Expression des Lysegens aktiviert die Phospholipase A in der äußeren Membran, so dass es zur Bildung von Lysophospholipiden kommt. Diese Detergenzien permeabilisieren die äußere und die innere Membran, wodurch es zur Freisetzung der Colicine und dem Abtöten des Produzenten kommt [19;25].

Wie bereits unter 1.3.2 beschrieben enthält das Colicin M-Operon wie das der Ton-abhängigen Colicine mit Ausnahme von Colicin D, 5 bzw. 10 kein Lysegen [174]. 10 % des produzierten Toxins (im Vergleich zu 50 % bei der Freisetzung der Ton-abhängigen Colicine mittels Lyseprotein) wird über einen unbekanntenen Mechanismus freigesetzt. Möglicherweise verursacht die bloße Akkumulation des Toxins im Cytoplasma Membranschädigung und Zelltod [19].

1.3.4 Struktur von Colicin M

Mit nur 271 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 29 kDa ist Colicin M das kleinste aller Bacteriocine von *E. coli* [107]; die meisten Colicine bestehen aus 500 bis 700 Aminosäuren [25]. Zeth *et al.* konnten 2008 die Kristallstruktur von Colicin M lösen [183].

Das Protein weist eine einzigartige Faltung auf, die bislang bei anderen Colicinen und überhaupt bei anderen Proteinen noch nicht beobachtet wurde. Es zeigt eine kompakte Struktur, in der die drei funktionalen Domänen nur schwer voneinander abzugrenzen sind, wie es bei anderen Colicinen der Fall ist [183] (siehe Abbildung 2).

Die N-terminale Translokationsdomäne (Aminosäure 1 - 35) ist unstrukturiert und flexibler als der Rest des Proteins. Diese Flexibilität ist vermutlich Voraussetzung für die Interaktion von Colicin M mit TonB, die über die TonB-Box (Aminosäure 2 - 6) erfolgt [137;183]. Die zentrale Domäne (Aminosäure 36 - 123) ist überwiegend helikal und für die Bindung an den FhuA-Rezeptor verantwortlich [9;183]. Die C-terminale Phosphatase-Domäne (Aminosäure 124 - 271) besteht aus einer Mischung von α -Helices und β -Faltblättern, wobei β 1, β 2, β 3 und β 6 ein offenes β -Barrel bilden (siehe auch [80], Abbildung 1) [183].

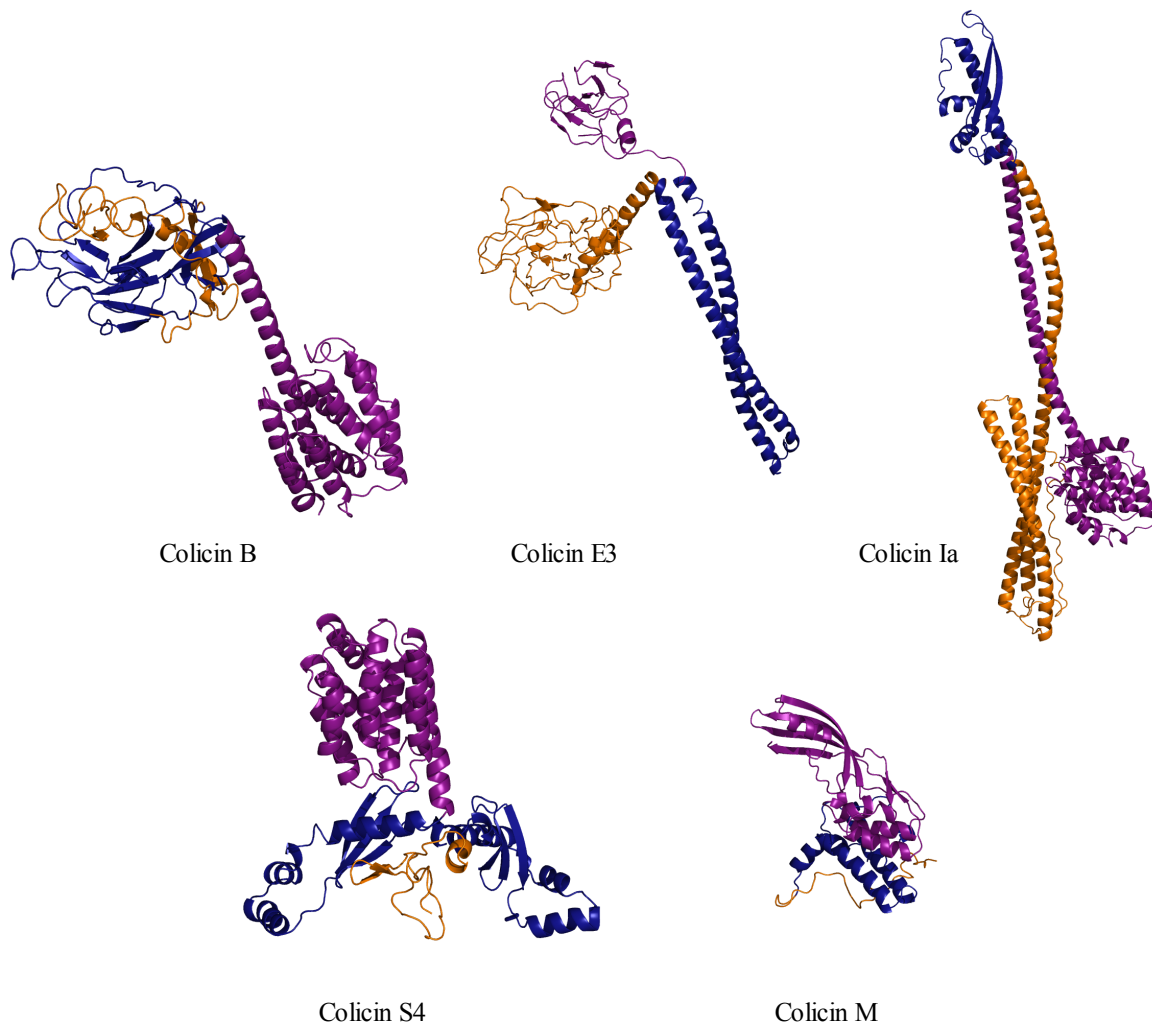


Abbildung 2: Kristallstruktur verschiedener Colicine

Darstellung der drei funktionalen Domänen von Colicin B (PDB-Eintrag 1RH1 [86]), E3 (PDB-Eintrag 1JCH [167]), Ia (PDB-Eintrag 1CII [180]), S4 (PDB-Eintrag 3FEW [4]) und M (PDB-Eintrag 2XMX [82]); gelb: N-terminale Translokationsdomäne; blau: zentrale Rezeptorbindedomäne, magenta: C-terminale Aktivitätsdomäne.

Der modulare Aufbau der Colicine wird verdeutlicht, wenn man deren Aminosäuresequenzen miteinander vergleicht. So sind z. B. die ersten 300 Aminosäuren von Colicin B und D zu 96 % identisch, was ihre Aufnahme über den gleichen Rezeptor (FepA) und das TonB-System widerspiegelt (vgl. Tabelle 1). Ihre C-terminalen Aktivitätsdomänen hingegen unterscheiden sich deutlich; dies ist in den unterschiedlichen Wirkmechanismen begründet [146] – Colicin B bildet Poren, Colicin D spaltet spezifisch RNA. Die Colicine 5 und K sind in ihren N-terminalen Regionen nur zu 20,3 % homolog, was ihre unterschiedlichen Aufnahmewege über den Ton- bzw. Tol-Komplex reflektiert. Ihre Bindung an den gleichen Rezeptor Tsx zeigt sich in einer Sequenzähnlichkeit der zentralen Domänen von 68 %. Ihre C-terminalen Sequenzen sind zu 99 % identisch; beide Toxine bilden Poren in der inneren Membran. Auch ihre Immunitätsproteine sind zu 100 % identisch, was verdeutlicht, dass sie an die homologen Aktivitätsdomänen binden [136].

Dieser modulare Aufbau der Colicine und die Tatsache, dass natürliche oder rekombinante chimäre Colicine funktionstüchtig sind, machen deutlich, dass die Toxine durch horizontalen Gentransfer der Plasmide und Austausch der funktionalen Domänen entstanden sind [9;19;27;94;97;183]. Die Aminosäuresequenzen der Immunitätsproteine haben sich entsprechend angepasst, um spezifisch mit den Aktivitätsdomänen interagieren zu können [18].

Colicin M zeigt keine Sequenzähnlichkeit zu bekannten Colicinen sowie anderen Phosphatasen [9;80;183]. Dies erklärt, dass es als einziges Bacteriocin von *E. coli* FhuA als Rezeptor verwendet und die Mureinsynthese inhibiert. Seine Aktivitätsdomäne ist jedoch zu 26 - 45 % identisch mit nicht-charakterisierten Proteinen von *Burkholderia ambifaria*, *B. cepacia*, *B. oklahomensis*, *B. ubonensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. syringae* sowie einem *Pseudomonas*-Phagen (siehe 2.1.1 sowie [80]). In den Rezeptorbinde- und Translokationsdomänen sind nur wenige Aminosäuren identisch; dies verdeutlicht die Spezifität der Importproteine in den verschiedenen Bakterien [8;9;80;183].

1.3.5 Immunität des Produzenten gegenüber Colicin M

E. coli-Zellen sind vor dem Abtöten durch ihr eigenes Colicin geschützt, indem sie ein Immunitätsprotein exprimieren, das spezifisch an die Aktivitätsdomäne des Toxins bindet und dieses inaktiviert. Die Immunitätsproteine der Colicine mit Nuklease-Aktivität werden als heterodimerer Komplex aus Aktivitäts- und Immunitätsprotein freigesetzt. Letzteres wird bei der Aufnahme in die Zielzelle aus dem Komplex entlassen. Die porenbildenden Colicine

werden hingegen nicht im Komplex freigesetzt. Ihre Immunitätsproteine sind in der Cytoplasmamembran des Produzenten verankert und inaktivieren das entsprechende Toxin, kurz bevor die durch das Colicin gebildeten Poren geöffnet werden [25].

Das ca. 14 kDa große Colicin M-Immunitätsprotein (Cmi) ist wie unter 1.3.2 beschrieben neben dem Aktivitätsprotein Cma auf pColBM-Plasmiden codiert und wird mit dem Strukturgen coexprimiert. Es wird nicht wie die anderen Colicine mit Enzymaktivität im Komplex mit seinem Toxin freigesetzt, sondern ist im Periplasma lokalisiert und über eine N-terminale, hydrophobe α -Helix in der Cytoplasmamembran verankert (siehe Abbildung 3) [65;131;133].

Die Kristallisation von Cmi ohne seine N-terminale hydrophobe Sequenz führte zu dem Ergebnis, dass es ein Dimer bildet [I. Usón, S. I. Patzer, D. D. Rodriguez, V. Braun, K. Zeth, unveröffentlichte Daten]. Jedes Monomer besteht aus einer langen N-terminalen α -Helix und vier antiparallelen β -Faltblättern am C-Terminus, die über unstrukturierte Schleifen miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 3). Die Cysteine 31 und 107 bilden zwei intermolekulare Disulfidbrücken, die der Stabilisierung des Dimers dienen. Die Faltung von Cmi ist charakteristisch für Proteine der YebF-Familie mit unbekannter Funktion, die von einigen Gram-negativen Bakterien ins äußere Medium sekretiert werden. Ein Vergleich der Sequenzen zeigt, dass auch die beiden Cysteinreste strikt konserviert sind [I. Usón, S. I. Patzer, D. D. Rodriguez, V. Braun, K. Zeth, unveröffentlichte Daten].

Im Gegensatz dazu zeigt die von Gérard *et al.* publizierte Kristallstruktur das Colicin M-Immunitätsprotein als Monomer mit einer abweichenden räumlichen Anordnung der vier Faltblätter und der in diesem Fall vier α -Helices. Dabei wird der intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cys31 und Cys107 ebenfalls eine stabilisierende Funktion zugeschrieben [58].

Der Wirkmechanismus des Immunitätsproteins ist bislang unbekannt. Beim Auftropfen von gereinigtem Cma und Cmi auf einen sensitiven Stamm sowie in Co-Immunopräzipitationsversuchen zeigte sich ebenso wie in Pulldown-Experimenten nur eine sehr schwache Interaktion der beiden Proteine [65;133]. Mittels analytischer Gelfiltration und Light scattering-Messungen konnte die Bildung eines Cma-Cmi-Komplexes nicht nachgewiesen werden. Auch ein 20-facher Überschuss des Immunitätsproteins konnte *in vitro* keine Hemmung des Lipid II-Abbaus durch Colicin M hervorrufen [58]. Versuche der Co-Kristallisation von Cmi und Cma waren bislang ohne Erfolg [I. Usón, S. I. Patzer, D. D. Rodriguez, V. Braun, K. Zeth, unveröffentlichte Daten].

Da Colicin M einen einzigartigen Wirkmechanismus besitzt, ist es wahrscheinlich, dass auch die Interaktion mit seinem Immunitätsprotein sehr spezifisch ist. Konkurrenzexperimente von Colicin M und dem Phagen T5, der ebenfalls an FhuA bindet, zeigten, dass das Immunitätsprotein nicht die Adsorption von Cma an den FhuA-Rezeptor verhindert [133]. Des Weiteren beeinflusst es nicht die Translokation von Cma über die äußere Membran, wie in osmotischen Schockexperimenten nachgewiesen wurde [133]. Eine Interaktion von Cmi mit der Zielstruktur von Colicin M konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da es die Sensitivität für das Antibiotikum Bacitracin, das als Komplexbildner mit Undecaprenoldiphosphat ebenfalls die Regeneration des Lipidcarriers hemmt, nicht herabsetzt [133].

Die Überexpression des Aufnahmesystems für Colicin M führt zum Verlust der durch Cmi verliehenen Immunität. Diese kann durch eine Erhöhung der *cmi*-Kopienzahl wiederhergestellt werden [73]. Des Weiteren verhindert Cma teilweise den Abbau von Cmi durch Trypsin [133]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Immunitätsmechanismus auf der direkten Interaktion von Cmi und Cma basiert, die zur Neutralisierung des Toxins führt [73]. Versuche von Gross *et al.* zeigten, dass der N-Terminus des Immunitätsproteins nur der Verankerung in der inneren Membran sowie der Translokation dient und nicht in die Erkennung bzw. Bindung des Toxins involviert ist. Eine Mutante, bei der die N-terminale Sequenz (Aminosäure 1 - 23) abgespalten ist, bewahrt als lösliches Protein im Periplasma immer noch den Schutz vor der toxischen Wirkung von Colicin M [65]. Eine Deletion der letzten vier Aminosäuren des C-Terminus führt hingegen dazu, dass das Immunitätsprotein keine Resistenz mehr vermittelt [58].

Das Colicin M-Immunitätsprotein ist ein hochgeladenes Protein mit einem deutlichen Überschuss negativer Ladungen (pI 4,9). Diese könnten an der Interaktion mit Colicin M beteiligt sein. Bindestudien mittels „RosettaDock“ [116] lieferten ein Modell, bei dem das negativ geladene Immunitätsprotein an die positiv geladenen Aminosäuren Arg88, Lys106 und Lys120 von Colicin M bindet [I. Usón, S. I. Patzer, D. D. Rodriguez, V. Braun, K. Zeth, unveröffentlichte Daten]. Diese Region ist Teil der Rezeptorbindedomäne und liegt etwas entfernt vom aktiven Zentrum, das die Immunitätsproteine normalerweise blockieren (die Lokalisation des aktiven Zentrums wird in 2.1 ausführlich diskutiert). Allerdings wurde auch für Colicin E9 gezeigt, dass das Immunitätsprotein nicht an das aktive Zentrum bindet, sondern an eine benachbarte Region, was in einer sterischen und elektrostatischen Blockade des Substrats resultiert [105]. Dies könnte auch für die Interaktion von Colicin M mit seinem Immunitätsprotein zutreffen.

Barreteau *et al.* zeigten, dass eine Colicin M-Deletionsmutante aus zentraler und C-terminaler Domäne (Aminosäure 33 - 271) nach osmotischem Schock ins Periplasma noch durch das Immunitätsprotein inhibiert werden kann, was für eine Mutante, die nur aus der C-terminalen Domäne (Aminosäure 122 - 271) besteht, nicht der Fall ist [9]. Bei Sekretion von Colicin M mit Hilfe der OmpA-Signalsequenz über die innere Membran hemmt das Immunitätsprotein alle getesteten Konstrukte, die eine funktionelle C-Domäne besitzen. Dies lässt vermuten, dass das Protein diese Domäne erkennt und daran bindet [7].

1.3.6 Import von Colicin M in die Zielzelle

Colicin M ist nur toxisch, wenn es von außen in die Zelle aufgenommen wird [72]. Dabei reichen wenige Moleküle aus, eine Zelle abzutöten; die Schätzungen liegen bei zehn Molekülen [150]. Das aus dem Produzenten freigesetzte Toxin muss zunächst an einen spezifischen Rezeptor in der äußeren Membran der Zielzelle binden. Hierbei handelt es sich um das Protein FhuA, das auch für die Aufnahme des Eisen-Siderophors Ferrichrom, der Antibiotika Albomycin und Rifamycin CGP4832 sowie für den Import von Microcin J25 verantwortlich ist. Es dient ebenso als Rezeptor für die Phagen T1, T5, ϕ 80 und UC-1 [18]. Das Protein bildet ein β -Barrel aus 22 antiparallelen Faldblättern (siehe Abbildung 3), das durch eine N-terminale Korkdomäne aus vier β -Faldblättern und vier kurzen Helices hermetisch verschlossen ist [47]. Die Aufnahme von Colicin M über die äußere Membran ist energieabhängig. Diese Energie wird von der protonenmotorischen Kraft über der Cytoplasmamembran bereitgestellt. Der sogenannte TonB-Komplex, der aus den drei in der inneren Membran verankerten Proteinen TonB, ExbB und ExbD besteht, überträgt dabei die Energie über einen bislang unbekanntem Mechanismus auf die äußere Membran [14;18;137]. Er ist für die Aufnahme von Colicin M essentiell; eine Mutation in einem der codierenden Gene resultiert in der Resistenz der Zellen [13].

Die Interaktion zwischen FhuA und TonB erfolgt über die TonB-Box, die am N-Terminus des Rezeptors liegt. Mutationen in der TonB-Box von FhuA führen zu Colicin M-Resistenz; diese können durch einen Austausch von Gln160 in TonB durch Leucin oder Lysin supprimiert werden [159]. Wie bereits unter 1.3.4 beschrieben, besitzt Colicin M am N-Terminus (Aminosäure 2 - 6) ebenfalls eine TonB-Box. Ein Aminosäureaustausch in dieser Region resultiert in inaktiven Colicin M-Mutanten. Eine V7R-Mutation in dieser Region kann ebenfalls durch die Mutationen Q160L bzw. Q160K in TonB supprimiert werden [137]. Dies verdeutlicht, dass TonB bei der Aufnahme von Colicin M sowohl mit FhuA als auch mit dem Toxin interagiert [18].

Es ist unwahrscheinlich, dass Colicin M in seiner kompakten Struktur (Durchmesser ca. 3 nm auf 4 nm) die FhuA-Pore passieren kann, auch wenn der Korken komplett aus der Pore austritt, da der Durchmesser der geöffneten FhuA-Pore nur ca. 2 nm beträgt [15]. Daher wird vermutet, dass das Protein während der Translokation teilweise entfaltet [183]. Colicin M wird Trypsin-sensitiv, wenn es an den Rezeptor gebunden hat. Dies deutet auf eine Konformationsänderung als Folge der Rezeptorbindung hin [90;150].

Nach der Bindung an FhuA dringt Colicin M vermutlich mit seiner N-terminalen Translokationsdomäne in die FhuA-Pore ein. Diese wird durch die Interaktion mit dem energetisierten TonB geöffnet. Im Verlauf der Translokation entfaltet Colicin M weiter und gelangt schließlich ins Periplasma [183].

Der Mechanismus der Porenöffnung ist bislang nicht geklärt, entweder kommt es durch die Energetisierung zu Konformationsänderungen im β -Barrel, so dass ein kleiner Kanal gebildet wird [47], oder die Korkdomäne, die die Pore verschließt, bewegt sich teilweise oder komplett aus dem β -Barrel ins Periplasma [45]. Locher *et al.* zeigten, dass die Bindung von Ferrichrom an FhuA zu minimalen Konformationsänderungen der Ferrichrom-Bindestelle an der Zelloberfläche führt. Diese potenzieren sich und breiten sich zunächst über die Korkdomäne aus, bevor sie in einer veränderten Konformation der Proteinstruktur auf der periplasmatischen Seite resultieren [113].

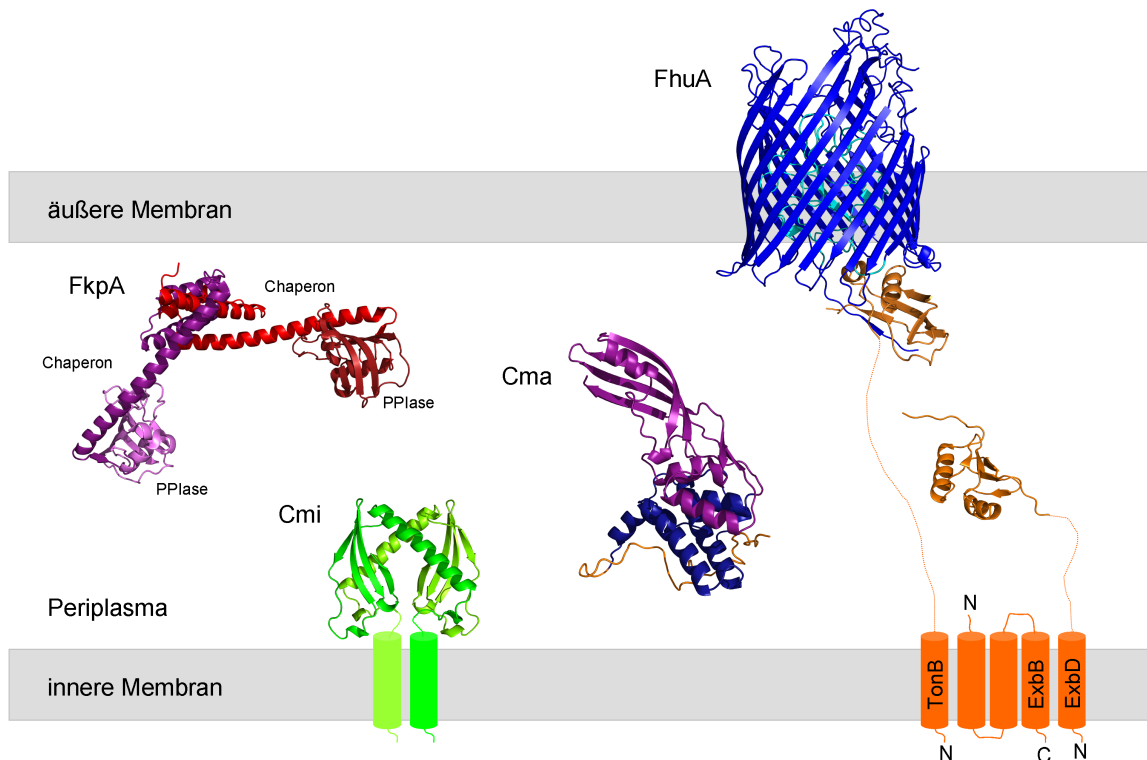


Abbildung 3: Darstellung der Proteine, die an der Aufnahme und Aktivität von Colicin M beteiligt sind
 Colicin M (Cma; Farbgebung der Domänen entsprechend Abbildung 2) bindet an den FhuA-Rezeptor in der äußeren Membran, der ein β -Barrel (dunkelblau) mit einer globulären Korkdomäne (hellblau) bildet. Die Energie für die Aufnahme von Cma aus der protonenmotorischen Kraft der inneren Membran wird mit Hilfe des Ton-Komplexes aus TonB, ExbB und ExbD (orange) übertragen. Cma entfaltet während der Translokation und muss im Periplasma rückfalten, um seine toxische Wirkung ausüben zu können. Die Rückfaltung wird durch das periplasmatische Chaperon FkpA unterstützt; jedes der beiden FkpA-Monomere (rot bzw. magenta) besteht aus einer Chaperon- und einer Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase)-Domäne. Das Colicin M-Immunitätsprotein Cmi (Dimer aus zwei Monomeren, in unterschiedlichen Grüntönen markiert) ist in der inneren Membran verankert und ragt ins Periplasma. (PDB-Einträge: Cma 2XMX [82], FhuA/TonB-Komplex 2GRX [135], ExbD 2PFU [56], FkpA 1Q6H [149]; Cmi-Kristallstruktur: I. Usón, S. I. Patzer, D. D. Rodriguez, V. Braun, K. Zeth, unveröffentlichte Daten).

Unklar ist, ob das gesamte Colicin M oder nur seine Aktivitätsdomäne in die Zelle aufgenommen wird. So wurde beispielsweise für Colicin E2 gezeigt, dass das Toxin außerhalb der Zelle gebunden bleibt, während die Nuklease-Domäne ins Cytoplasma gelangt [37]. Ein ähnlicher Mechanismus wird z. B. auch für Colicin Ia vermutet, dessen Aktivitätsdomäne Poren in der Cytoplasmamembran bildet [93].

Um toxisch wirken zu können, muss Colicin M nach der Translokation in seine aktive Form falten. Es wurde vermutet, dass dies durch das periplasmatische Chaperon FkpA unterstützt wird [183], worauf in den folgenden Kapiteln eingegangen wird.

1.4 Die Bedeutung molekularer Chaperone für die Proteinfaltung

Proteine sind die wandlungsfähigsten und strukturell komplexesten Makromoleküle in einer Zelle. Sie sind an nahezu jedem biologischen Prozess beteiligt. Nach der Synthese am Ribosom muss die Polypeptidkette in ihre native, dreidimensionale Struktur falten, um ihre biologische Funktion ausüben zu können [77]. Anfinsen *et al.* zeigten in Faltungsexperimenten an Ribonuklease A, dass die räumliche Struktur eines Proteins durch seine Aminosäuresequenz bestimmt wird und für diesen Prozess keine Energiezufuhr und keine zusätzlichen Faktoren nötig sind [2].

In Abhängigkeit vom jeweiligen Protein und der Faltungsumgebung kann die Faltung eines Proteins *in vivo* spontan und ohne Unterstützung in Millisekunden bis Sekunden erfolgen [108]. Allerdings sind die Proteinkonzentrationen in der Zelle mit 300 - 400 mg/ml sehr hoch [186], so dass spontane Faltung oftmals fehlerhaft, ineffizient und zeitaufwändig ist und es schnell zur Aggregation von Faltungsintermediaten oder falsch gefalteten Proteinen kommt [92]. Dies kann nicht nur zum Verlust der Proteinfunktion, sondern auch zur Akkumulation toxischer Proteine führen [30].

Daher hängt die Proteinfaltung in Zellen von der Aktivität von Faltungshelfern ab, den sogenannten molekularen Chaperonen. Eine Vielzahl dieser Proteine ist in allen lebenden Organismen zu finden. Sie assistieren in der *de novo*-Faltung von Polypeptidketten und der Rückfaltung von unter Stress denaturierten oder aggregierten Proteinen, sind jedoch nicht Teil der finalen nativen Struktur. Sie erleichtern die Faltung von nicht-nativen Intermediaten und optimieren die Faltungseffizienz, fügen jedoch keine strukturelle Information zum Faltungsprozess hinzu. Die Bindung der Chaperone an exponierte hydrophobe Bereiche stabilisiert bestimmte Faltungsintermediate und verhindert, dass nicht-native Proteine inkorrekte inter- oder intramolekulare Wechselwirkungen ausbilden, so dass Fehlfaltung und Aggregation verhindert werden [87]. Diese hydrophobe Wechselwirkung ist nur wenig spezifisch und die Faltungsintermediate sind flexibel, was ihre Konformation angeht. Aus diesem Grund sind molekulare Chaperone nicht spezifisch und können an viele verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz und Konformation binden. Die gebundenen Proteine werden kontrolliert wieder freigesetzt, indem die Chaperone eine veränderte Konformation einnehmen, die eine geringere Affinität für hydrophobe Polypeptide besitzt. Die Energie für diesen Vorgang stammt aus der Hydrolyse von ATP oder aus der Wechsel-

wirkung mit anderen Proteinkomponenten der jeweiligen Chaperonmaschinerie. Native Proteine und späte Faltungsintermediate sind keine Substrate für molekulare Chaperone, da diese meist keine hydrophoben Regionen exponieren [177].

Am besten charakterisiert in *E. coli* sind die Chaperone des Cytoplasmas, wie beispielsweise GroEL/GroES oder DnaK/DnaJ [48]. Im Gegensatz dazu ist über periplasmatische Faltungshelfer eher wenig bekannt.

1.5 Faltungsfaktoren im Periplasma von *Escherichia coli*

Damit extracytoplasmatische Proteine funktionstüchtig sind, müssen sie in das entsprechende Kompartiment exportiert und dort richtig gefaltet werden. Periplasmatische Proteine werden im Cytoplasma mit einer abspaltbaren N-terminalen Signalsequenz synthetisiert, mit deren Hilfe sie über das Sec- oder Tat-Sekretionssystem ins Periplasma transportiert werden [122]. Dieses Kompartiment stellt eine besondere Umgebung für die Proteinfaltung dar. Zum einen begünstigen die dort herrschenden oxidativen Bedingungen die Bildung von Disulfidbrücken, zum anderen enthält es kein ATP, dessen Hydrolyse die Energie für die meisten molekularen Chaperone im Cytoplasma liefert. Außerdem steht es über die Poren der äußeren Membran im direkten Kontakt mit dem externen Milieu und ist somit empfindlicher gegenüber Änderungen in der Umgebung als das Cytoplasma [10]. Daher wurde lange Zeit diskutiert, ob im Periplasma überhaupt Proteine vorhanden sind, die die Faltung unterstützen [181].

Studien über die Stressantwort in *E. coli* führten zu dem Ergebnis, dass unter Stressbedingungen bestimmte Gene hochreguliert werden, die für die Proteinfaltung wichtig sind. So wurden verschiedene periplasmatische Faltungshelfer identifiziert (Tabelle 2) [38]. Dazu gehören das einzige Chaperon ohne zusätzliche enzymatische Funktion Skp, das die Faltung und Translokation von Außenmembranproteinen über die innere Membran unterstützt [10], und das Lipoprotein-spezifische Chaperon LolA [171]. Zusätzlich zu den Chaperonen spielen Faltungskatalysatoren eine wichtige Rolle, da sie geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Proteinfaltung beschleunigen. Dies sind zum einen die Disulfid-Oxidoreduktasen, die die Bildung von Disulfidbrücken katalysieren. Dabei wurden bislang sechs Mitglieder der Dsb-Proteine im Periplasma gefunden. Zum anderen sind die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) von großer Bedeutung, da sie die Isomerisierung von Peptidbindungen vor Prolinresten von *cis* nach *trans* und umgekehrt katalysieren [10;74]. Es wurden Vertreter aller drei PPIase-Familien (siehe auch 1.6.2), den Cyclophilinen, den Parvulinen und den FK506-bindenden Proteinen, im Periplasma entdeckt.

Einige der Faltungskatalysatoren haben auch eine sekundäre, nicht-katalytische Chaperonaktivität (vgl. Tabelle 2), indem sie nicht-native Proteine binden und stabilisieren. Daher können diese periplasmatischen Enzyme auch als molekulare Chaperone betrachtet werden [122].

Tabelle 2: Faltungsfaktoren im Periplasma von *E. coli*

Protein	Funktion	
Skp	Chaperon	Translokation von Außenmembranproteinen über die Cytoplasmamembran
LolA	Chaperon	Freisetzung von Lipoproteinen
PpiA		Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase (Cyclophilin)
FkpA	Chaperon	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase (FKBP)
SurA	Chaperon	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase (Parvulin)
PpiD (IM)		Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase (Parvulin)
DsbA		Disulfid-Oxidoreduktase
DsbB (IM)		Disulfid-Oxidoreduktase
DsbC	Chaperon	Disulfid-Oxidoreduktase
DsbD (IM)		Disulfid-Oxidoreduktase
DsbE		Disulfid-Oxidoreduktase
DsbG	Chaperon	Disulfid-Oxidoreduktase

IM: Protein verankert in der inneren Membran; FKBP: FK506 bindendes Protein; Tabelle verändert nach [10;74].

Die Transkription dieser Faltungshelfer wird über zwei Signalwege reguliert, das Cpx-Zweikomponentensystem und das σ^E -Regulon. Beide antworten auf extracytoplasmatischen Stress und die damit verbundene Akkumulation von falsch gefalteten Polypeptiden im Periplasma [38;122]. Das Cpx-System besteht aus der Histidinkinase CpxA (Sensor) und dem Regulator CpxR. Erstere ist ein integrales Innenmembranprotein, das über seine periplasmatische Sensordomäne Stresssignale aus der Zellhülle erhält und daraufhin in einer ATP-abhängigen Reaktion autophosphoryliert wird. Der Phosphatrest wird anschließend auf den periplasmatischen Regulator übertragen, der die Transkription der Zielgene, darunter *degP*, *ppiA*, *ppiD* und *dsbA* [122], aktiviert [38]. Dieses System reagiert u. a. auf einen Anstieg des pH-Werts [126], eine veränderte Zusammensetzung der inneren Membran [121] oder die Überproduktion von Hüllproteinen wie z. B. des Lipoproteins NlpE [165] und von Pili-Untereinheiten [91;96]. Unter Normalbedingungen inhibiert das periplasmatische Protein CpxP durch Bindung an CpxA dessen Autophosphorylierung [38].

Das σ^E -Regulon wird durch hohe Temperaturen, Ethanol oder eine erhöhte Expression von Außenmembranproteinen induziert [34;120;123]. Unter Normalbedingungen ist die Aktivität von σ^E durch den Anti-Sigmafaktor RseA in der inneren Membran und das periplasmatische Protein RseB negativ reguliert. Als Antwort auf extracytoplasmatischen Stress wird

RseA durch die DegS-Protease abgebaut, was dem Sigmafaktor die Interaktion mit der RNA-Polymerase erlaubt und in der Transkription der Zielgene resultiert. Über dieses System wird u. a. die Expression von *degP*, *surA*, *skp* und *dsbC* reguliert [38;122].

Auch die Expression von *fkpA* wird durch das σ^E -Regulon kontrolliert [123]. Das FkpA-Protein, dessen Funktion essentiell für die Aktivität von Colicin M ist (siehe auch 1.8), gehört zur Familie der FK506-bindenden Proteine der PPIasen [88]. Die durch derartige Enzyme katalysierte *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Peptidbindungen wird im Folgenden näher beschrieben.

1.6 Die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Peptidbindungen als geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Proteinfaltung

1.6.1 Eigenschaften von Prolyl-Peptidbindungen

Proteine sind Polymere, in denen die einzelnen Aminosäuren über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Diese Amidbindungen sind planar und besitzen partiellen Doppelbindungscharakter, da die Länge der C-N-Bindung mit 0,132 Å um 0,015 Å kürzer ist als die einer normalen Einfachbindung [134]. Die flankierenden C^α-Atome können daher entweder in der *cis*- (dihedraler Winkel $\omega = 0^\circ$) oder in der *trans*- ($\omega = 180^\circ$) Konformation vorliegen (Abbildung 4). In Peptidbindungen ohne Prolin wird die *trans*-Form bevorzugt, da die sterische Hinderung der Substituenten hier sehr viel geringer ist als im *cis*-Zustand [158]. Daher weisen in Oligopeptiden nur ca. 0,1 bis 1 % der Peptidbindungen die *cis*-Konformation auf [153]. In nativen, gefalteten Proteinen sind Nichtprolyl-*cis*-Bindungen somit äußerst selten [117;168].

Im Gegensatz dazu liegen Peptidbindungen vor Prolinen (Prolyl-Peptidbindungen) häufig in der *cis*-Konformation vor [158]. In beiden Isomeren befindet sich das C^α-Atom der Aminosäure vor Prolin (C^{α-1}) in *cis*-Stellung zu einem Kohlenstoffatom des Prolins (C^α oder C^δ) (Abbildung 4), so dass sich die freien Enthalpien der beiden Isomere nur geringfügig voneinander unterscheiden [40]. In kurzen linearen Peptiden liegt der *cis*-Gehalt bei 10 - 30 % und hängt von der chemischen Beschaffenheit der Aminosäure vor Prolin ab [29;62;63;141].

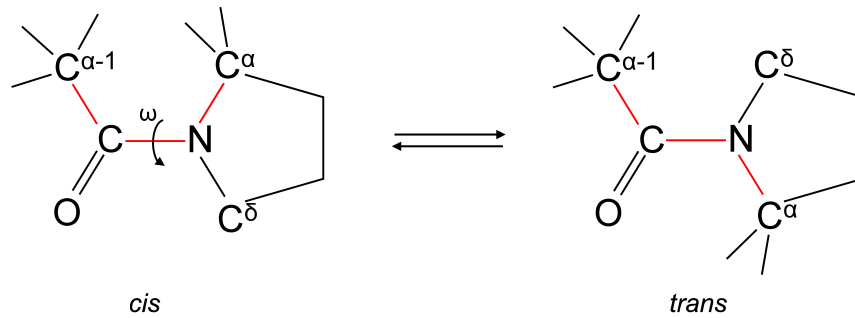


Abbildung 4: Isomerisierung der *cis*- und *trans*-Form einer Prolyl-Peptidbindung

Die C^α-Atome der planaren Peptidbindungen liegen im *trans*-Zustand gegenüber ($\omega = 180^\circ$), während sie in der *cis*-Form auf der gleichen Seite ($\omega = 0^\circ$) zueinander angeordnet sind.

Die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung ist eine ausgesprochen langsame Reaktion; die Zeitkonstante liegt bei 25 °C zwischen 10 und 100 Sekunden. Die Aktivierungsenergie für die Reaktion ist mit ca. 85 kJ/mol sehr hoch, da sie die Rotation um die partielle Doppelbindung beinhaltet [29;62;63]. In nativen Proteinen mit bekannter dreidimensionaler Struktur kommen ca. 7 % aller Prolylbindungen in der *cis*-Form vor [117;168]. Normalerweise ist der Konformationszustand jeder Peptidbindung in gefalteten Proteinen durch die native Struktur klar definiert, entweder als *cis* oder *trans* [158]. Ausnahmen davon stellen Insulin [85], Calbindin [28] oder die *Staphylococcus*-Nuklease [43] dar; für diese Proteine wurde im nativen Zustand ein Gleichgewicht von *cis*- und *trans*-Form beobachtet.

1973 entdeckten Garel und Baldwin, dass ungefaltete RNase A aus einer heterogenen Mischung von Molekülen besteht, die sich in ihrer Faltungsrates unterscheiden. Die schnell faltenden U_F- (Index von *fast*) und langsam faltenden U_S- (Index von *slow*) Moleküle coexistieren in einem langsamen Gleichgewicht und führen zu parallel ablaufenden schnellen (im Bereich von Millisekunden) und langsamen Phasen (im Bereich von Minuten) in der Rückfaltung der RNase A [57]. Später wurden ähnliche U_F- und U_S-Zustände auch für viele andere Proteine entdeckt [100;101]. Eine Erklärung für dieses Phänomen lieferten Brandts *et al.* 1975 mit ihrer Prolylhypothese. Sie postulierten, dass sich die langsam und die schnell faltenden Moleküle in der Konformation einer oder mehrerer Prolyl-Peptidbindungen unterscheiden. Im nativen Protein nimmt jedes Prolin eine bestimmte Konformation ein, entweder *cis* oder *trans*. Während der Entfaltung entstehen jedoch zwei Fraktionen aus den beiden isomeren Formen. Die U_F-Moleküle falten direkt zurück, da ihre Prolyl-Konformation der des nativen Zustands entspricht. Für die U_S-Moleküle ist dies nicht möglich, sie erreichen ihre native Struktur nur durch Re-Isomerisierung der nicht-nativen Prolylbindung [12].

1.6.2 Katalyse der Isomerisierung von Prolyl-Peptidbindungen durch Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

Bald nach Brandts Prolinhypothese begann die Suche nach einer enzymatischen Aktivität, die die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung katalysiert. 1984 konnte die erste Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase von Fischer *et al.* aus der Schweineleiere isoliert werden [52]. Die Entdeckung gelang ihnen mit Hilfe eines Peptidassays, der auf der Konformationsspezifität von Chymotrypsin basiert. Die Protease spaltet dabei das Chromophor 4-Nitroanilin von Succinyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-Nitroanilid-Peptiden nur dann ab, wenn die Prolylbindung in der *trans*-Form vorliegt. [51].

Die Sequenzierung dieser PPIase 1989 führte zu dem Ergebnis, dass sie identisch ist mit dem im gleichen Jahr entdeckten Cyclophilin [67], dem Bindepartner für das Immunsuppressivum Cyclosporin A [53;172]. Das Enzym katalysiert effektiv die *cis/trans*-Isomerisierung von Oligopeptiden *in vitro* [50;51]. Lang *et al.* konnten nachweisen, dass es auch langsame Schritte in der Rückfaltung einer Reihe von Proteinen beschleunigt, deren Rückfaltung durch die Isomerisierung der Prolyl-Peptidbindung limitiert ist [109].

Zur gleichen Zeit wurde bei der Suche nach dem Rezeptorprotein für das Immunsuppressivum FK506 eine zweite Klasse von Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen entdeckt, die als FK506-Bindeproteine (FKBPs) bezeichnet wurden. Diese Proteine binden nicht an Cyclosporin A, sondern werden durch FK506 und Rapamycin gehemmt. Ihre Aminosäuresequenz zeigt keine Ähnlichkeit zu den Cyclophilinen [68;102;164]. Später wurde die dritte Familie entdeckt, die Parvuline, deren erster Vertreter aus *E. coli* isoliert wurde [138]. Diese Proteine werden durch 5-Hydroxy-1,4-Naphthoquinon inhibiert [83].

In Prokaryoten wurde zudem eine Ribosomen-gebundene PPIase gefunden, der Triggerfaktor. Das Protein zeigt eine schwache Sequenzähnlichkeit zu den FKBP, besitzt jedoch keine FK506-Bindfähigkeit, wie sie für diese PPIase-Familie typisch ist [169]. Durch seine Lokalisation direkt an der Austrittsstelle der naszierenden Polypeptidkette ist es optimal für seine Funktion bei der *de novo*-Proteinfaltung positioniert [46].

PPIasen sind weit verbreitet in allen lebenden Organismen und in allen Kompartimenten der Zelle zu finden. Einige dieser Enzyme bestehen aus mehreren katalytischen (nur FK506-bindende Proteine) und/oder weiteren Proteindomänen mit zusätzlichen Funktionen, wie beispielsweise RNA-, DNA- oder Ran-Bindedomänen, TPR- (*tetratricopeptide repeat*) Motive mit Calmodulinbindestellen oder Zinkfinger-Domänen [154].

Sie sind nicht nur an der Faltung neu synthetisierter Proteine, sondern an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt, wie z. B. der Transkription und Translation, Immunantwort, Assemblierung von Viren, Signaltransduktion, Regulation von Ionenkanälen, Zellzyklus-Kontrolle usw. [75;111;114;157;162].

Obwohl sie alle die gleiche chemische Reaktion katalysieren, gibt es keine Sequenzhomologien zwischen den drei Klassen der Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen [154]. Auch wenn sie sich in ihrer Faltung unterscheiden, ist die Struktur des aktiven Zentrums sehr ähnlich. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der katalytische Mechanismus der *cis/trans*-Isomerisierung in den drei Familien sehr ähnlich ist [44]. Dieser wurde bislang nicht aufgeklärt [44;66]. Fanghänel *et al.* und Schiene-Fischer *et al.* gehen davon aus, dass das einzelne Elektronenpaar der Peptidbindung durch einen Wasserstoffbrückendonator des Proteins am Stickstoff fixiert und der Übergangszustand gleichzeitig durch ein enzymgebundenes Wassermolekül am positiv geladenen Kohlenstoffatom der senkrecht angeordneten Carbonylgruppe stabilisiert wird [44;154].

1.7 Das periplasmatische Protein FkpA – Chaperon und Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase

Das periplasmatische Protein FkpA wurde 1994 von Horne und Young bei den Enterobacteriaceae entdeckt. Es wurde als Homolog der eukaryotischen FK506-bindenden Proteine (FKBPs) eingeordnet, da die Sequenz seiner C-terminalen Domäne zu 83 % mit der Konsensus-Sequenz des FK506-Bindemotivs übereinstimmt, einschließlich der Aminosäuren im aktiven Zentrum, die Wasserstoffbrückenbindungen mit diesem Immunsuppressivum eingehen. FkpA weist dabei eine hohe Ähnlichkeit zur Unterklasse der Mip- (*macrophage infectivity potentiator*) Proteine der pathogenen Bakterienarten *Legionella pneumophila* und *Chlamydia trachomatis* auf. Daher wurde vermutet, dass es sich bei dem Protein um einen möglichen Virulenzfaktor handelt [88].

Missiakas *et al.* lieferten den ersten Hinweis, dass FkpA eine entscheidende Rolle als periplasmatischer Faltungshelfer in *E. coli* spielt. Sie entdeckten, dass hohe Syntheseraten an FkpA die Akkumulation von ungefalteten Außenmembran- oder periplasmatischen Proteinen verhindert [123]. Nullmutanten im *fkpA*-Gen haben keinen Phänotyp. Da die Deletion des Gens jedoch zu einer erhöhten σ^E -Aktivität führt und die Expression der periplasmati-

schen Hitzeschock-induzierbaren Protease DegP stimuliert [33], wurde seine Funktion als Faltungsfaktor vermutet. Die Expression von *fkpA* wird durch extracytoplasmatischen Stress und die σ^E -Antwort induziert [33].

Einen weiteren Hinweis, dass FkpA als Faltungsfaktor im Periplasma fungiert, lieferten Bothmann und Plückthun, die zeigten, dass FkpA die Bildung von funktionalen Antikörperfragmenten im Periplasma erhöht [11]. Arié *et al.* fanden heraus, dass FkpA *in vivo* und *in vitro* die Aggregation von MalE31, einer faltungsdefekten Mutante des Maltosebindoproteins, verhindert [3]. FkpA verbessert zudem bei Coexpression [184] oder als Partner in Fusionsproteinen [160] die Überproduktion von korrekt gefalteten rekombinanten Proteinen und bindet mit hoher Affinität an die entfaltete N-terminale Domäne des Autotransporters EspP pathogener Enterobakterien [148].

Die Vermutung, dass FkpA wie alle Mip-Proteine eine Prolyl-*cis/trans*-Aktivität besitzt [88], wurde mit Hilfe des von Fischer *et al.* entwickelten Chymotrypsin-gekoppelten Peptidassays (vgl. 1.6.2) [3;123] sowie der Rückfaltung der RNase T1 *in vitro* [139] bestätigt. Die Isomerisierungsraten sind dabei mit denen von Mitgliedern der Mip-Proteinfamilie vergleichbar.

Zehn Jahre nach seiner Entdeckung konnte die Kristallstruktur von FkpA gelöst werden. Das 29 kDa große Protein besteht aus einer N-terminalen Dimerisierungsdomäne aus drei α -Helices [160;184] und einer C-terminalen Domäne aus einer antiparallelen β -Faltblattstruktur, die durch FK506 inhibiert wird. Das Dimer bildet eine V-förmige Struktur mit den beiden FK506-bindenden Domänen an den Enden (siehe Abbildung 3) [89;149].

Über die Bedeutung der Struktur- und Funktionsdomänen von FkpA gibt es in der Literatur widersprüchliche Daten und Schlussfolgerungen, die an künstlichen Substraten erhoben wurden. Laut Plückthun katalysiert die C-terminale Domäne die Faltung eines Antikörperfragments und verzögert die Aggregation der Citratsynthase. Beide Funktionen werden demnach von der C-proximalen Domäne ausgeübt [11;139;140]. Im Gegensatz dazu ist die N-terminale Domäne von FkpA laut Arié *et al.* für die korrekte Faltung des Maltosebindungsproteins MalE31 verantwortlich und trägt somit die Chaperonfunktion [3]. Dies konnte von Saul *et al.* bestätigt werden; eine Mutante, bei der die C-terminale Domäne deletiert ist, zeigt keinen Verlust dieser Chaperonaktivität [149]. Eine Deletionsmutante ohne N-Terminus zeigt volle Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität gegenüber synthetischen Peptiden [3]. Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass die Chaperonfunktion in der N-terminalen und die Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität in der C-terminalen Domäne lokalisiert ist [149]. Die Dimerisierung über die N-terminale Domäne ist vermut-

lich auch für die PPIase-Aktivität essentiell. Die Autoren sind sich einig, dass die beiden Funktionen unabhängig voneinander sind [139;140;149]. Die Chaperonaktivität wird über eine zweite Bindestelle für Polypeptide vermittelt, die entfernt vom aktiven Zentrum liegt und durch FK506 und Rapamycin nicht gehemmt wird [140].

1.8 Abhängigkeit der Colicin M-Aktivität von FkpA

In den Jahren 1980/81 wurden von Braun *et al.* Colicin M-insensitive *E. coli*-Mutanten isoliert, die als Colicin M-tolerant (*tolM*) bezeichnet wurden [17;150]. Diese zeigten keine Mutationen in den Genen für die Aufnahme des Toxins; alle waren voll sensitiv gegenüber den Phagen T1 und T5 sowie Albomycin und nicht in ihrer Aufnahme von Ferrichrom beeinträchtigt. Der Gendefekt wurde in der Nähe des Streptomycin-Resistenzgens *rpsL* lokalisiert, allerdings konnte das mutierte Gen zu diesem Zeitpunkt nicht identifiziert werden.

1995 wurde das Chaperon FkpA entdeckt und sein Genlocus in der Nähe von *rpsL* bestimmt [88]. Die daraufhin durchgeführte Sequenzierung der *tolM*-Mutanten führte zu dem Ergebnis, dass diese tatsächlich in *fkpA* mutiert waren [90]. Dabei besitzen die Mutanten Mo3 (FkpA40) und Mo4 (FkpA41) jeweils eine IS1-Insertion bzw. FkpA42 aus Mo6 ein Stop-Codon in der C-terminalen PPIase-Domäne, was zu einem Verlust dieser Domäne führt. Eine temperatursensitive Mutante, die bei 42 °C tolerant, bei 30 °C jedoch sensitiv gegenüber Colicin M ist [152], zeichnet sich durch einen Y25N-Austausch in der Dimerisierungsdomäne aus [90]. Vermutlich schwächt dieser Aminosäure-Austausch die Interaktion zwischen den beiden Untereinheiten, so dass bei 42 °C inaktive Monomere gebildet werden. Dies verdeutlicht, dass letztlich beide Domänen intakt sein müssen, damit das Colicin seine toxische Wirkung zeigen kann.

Die isolierten *tolM*-Mutanten sind sensitiv gegenüber den Colicinen B, Ib und E1, die nicht an den FhuA-Rezeptor binden und für ihre Aufnahme den Ton-Komplex (B, Ib) oder die Tol-Proteine (E1) benötigen [17]. Zudem wurden zehn weitere Colicine (A, D, E3, K, L, N, S4, U, 5 und 10) getestet, die über unterschiedliche Rezeptoren und das Ton- bzw. Tol-System aufgenommen werden und verschiedene Aktivitäten in der Zielzelle besitzen. Die Deletionsmutante JW3309 $\Delta fkpA$ zeigte dabei vollständige Sensitivität gegenüber allen Toxinen, war jedoch komplett resistent gegenüber Colicin M. Durch Komplementation mit plasmidcodiertem FkpA konnte der Stamm seine Empfindlichkeit gegenüber diesem Toxin wieder vollständig erlangen [90]. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass FkpA nur für die Aktivität von Colicin M eine Rolle spielt, jedoch nicht für die der anderen getesteten Colicine.

Deletionsmutanten in den anderen Chaperon- und/oder PPIase-codierenden Genen *skp*, *surA*, *ppiA*, *ppiD* (Periplasma) bzw. *groL* und *dnaK* (Cytoplasma) sowie den Genen für das Protein-Exportprotein SecB bzw. die Proteasen ClpP und DegP waren *in vivo* sensitiv gegenüber allen getesteten Colicinen inklusive Colicin M [90]. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aktivität von Colicin M spezifisch von FkpA abhängt.

Mit Hilfe eines Renaturierungsassays konnte gezeigt werden, dass denaturierte RNase T1 durch die Zugabe von FkpA ihre Aktivität wiedergewinnt [139]. Das Immunsuppressivum FK506 hemmt dabei vollständig die Rückfaltung. Dieser etablierte Assay wurde auch auf Colicin M angewendet. Das denaturierte Toxin kann durch FkpA wieder aktiviert werden, wobei die Rückfaltung ebenfalls durch FK506 inhibiert wird. Eine weitere *fkpA*-Mutante, die eine Punktmutation (G148D) in der C-terminalen PPIase-Domäne besitzt, kann denaturiertes Colicin M nicht mehr aktivieren. Auch die Zugabe des periplasmatischen Chaperons SurA renaturiert *in vitro* Colicin M nicht [90]. Zwei weitere Mutanten, die durch unspezifische Mutagenese isoliert worden waren (G176D und G180D) und ebenfalls in der PPIase-Domäne lokalisiert sind, verleihen ebenfalls keine Sensitivität gegenüber Colicin M [82].

Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass alle Colicin M-insensitiven Mutanten einen Defekt in der PPIase-Domäne von FkpA aufweisen, verdeutlichen die spezifische Aktivierung des Toxins durch FkpA, wobei vermutlich die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität entscheidend ist. Dies sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

1.9 Einfluss von CbrA auf die Colicin M-Sensitivität

Wie bereits beschrieben isolierten Braun *et al.* und Schaller *et al.* Colicin M-tolerante *E. coli*-Mutanten [17;150], die später als *fkpA*-Mutanten charakterisiert wurden (siehe 1.8). Bevor diese Zuordnung gemacht wurde, wurde versucht, das mutierte Gen mit Hilfe einer Genbibliothek zu identifizieren (K. Hantke). Dazu wurde das Genom von *E. coli* mit Restriktionsenzymen in Teilstücke gespalten, in Vektoren ligiert und mittels Transformation in einen Colicin M-sensitiven Stamm eingebracht. Bei der Überprüfung der Transformanten auf ihre Colicin M-Resistenz wurden Klone isoliert, die durch eine reduzierte Sensitivität gegenüber dem Toxin auffielen. Diese zeichneten sich dadurch aus, dass ihr genomisches Fragment das Gen *cbrA* (*vidS*) enthielt.

Die Funktion des codierten Proteins ist bislang ungeklärt. Bekannt ist nur, dass die Transkription des Gens durch das CreBC-Zweikomponentensystem bei Wachstum in Minimalmedium [5] oder durch den Autoinducer 2, ein Signal-Pheromon beim Quorum sensing [35], reguliert wird. Zudem zeigten Zhou *et al.* in einer Microarray-Analyse unter Verwen-

dung von *E. coli*-Mutanten mit Deletionen in allen Zweikomponentensystemen, dass die Deletion von *cbrA* zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Hydroxylamin (mutagene Substanz) sowie zu Hypersensitivität gegenüber Ofloxacin (Antibiotikum), 5,7-Dichlor-8-Hydroxyquinaldin (lipophiler Chelator) bzw. einen 18-Kron-6-Ether (Ionophor) führt [185]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Protein CbrA näher zu charakterisieren und seine Funktion in Bezug auf die vermittelte Colicin M-Resistenz zu klären.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Zuordnung funktioneller Domänen von Colicin M

2.1.1 Lage des aktiven Zentrums

Wie unter 1.3.4 beschrieben, bestehen alle Colicine aus drei Domänen, die Rezeptorbindung, Translokation und Aktivität des entsprechenden Toxins vermitteln. Was die Domänenstruktur von Colicin M betrifft, lieferten Dreher *et al.* einen ersten Vorschlag [36]. Sie zeigten, dass ein 24 kDa großes, C-terminales Abbauprodukt aus dem Verdau des Toxins mit Proteinase K an FhuA bindet und ein Abtöten der Zellen durch Wildtyp-Colicin M verhindert. Das Fragment ist aktiv, wenn es durch osmotischen Schock in die Zelle gebracht wird. Mit Hilfe dieser Methode, die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, können Proteine nicht nur aus dem Periplasma in das umgebende Medium freigesetzt [130], sondern auch in das Periplasma transferiert werden [9;17;137;175]. Dabei werden die Aufnahme Proteine, im Fall von Colicin M der FhuA-Rezeptor und das TonB-System, umgangen. Diese Reaktion ist Cma-spezifisch, da die Expression des Colicin M-Immunitätsprotein die Zellen vor Colicin M schützt, das mittels osmotischem Schock unabhängig vom Aufnahmesystem importiert wird [9;82]. Des Weiteren zeigten Dreher *et al.*, dass die Entfernung der beiden C-terminalen Reste Lys270 und Arg271 mittels Carboxypeptidase B zu einem kompletten Aktivitätsverlust des Toxins führt. All diese Daten deuteten darauf hin, dass der N-Terminus für die Aufnahme des Proteins über die äußere Membran verantwortlich ist, während die Rezeptorbinde- und Aktivitätsdomäne die restlichen 90 % des Moleküls ausmachen [36].

Pilsel *et al.* isolierten inaktive Punktmutanten durch ungerichtete (G170D, G193S, L196F, G197S, G197D, G197V, S223L, D226N, G252D) bzw. ortsspezifische Mutagenese (S233A, S233T, S251A), die alle in der C-terminalen Domäne von Colicin M liegen. Diese Mutanten sind nicht beeinträchtigt in der Bindung an FhuA und der Translokation über die äußere Membran, woraufhin vermutet wurde, dass sie die Aktivitätsdomäne betreffen [137]. Da bei Recherchen in Genom-Datenbanken bislang kein Protein gefunden wurde, das eine vorhergesagte Phosphatase-Aktivität besitzt und zugleich Ähnlichkeit zu Colicin M aufweist, handelt es sich bei dem Toxin um eine neuartige Phosphatase, deren aktives Zentrum erst definiert werden muss.

Einige von Pilsls inaktiven Mutanten [137] betreffen Glycin- und Leucinreste, die keine typischen katalytischen Aminosäuren darstellen, sondern oftmals eine strukturelle Funktion haben. In anderen nicht-aktiven Mutanten sind Serin- und Aspartatreste ausgetauscht, die evtl. an der Bindung oder Hydrolyse des Substrats beteiligt sein könnten. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von Colicin M mit nicht-charakterisierten, Cma-ähnlichen Proteinen von *Pectobacterium carotovorum*, verschiedenen *Pseudomonas*- und *Burkholderia*-Stämmen sowie einem *Pseudomonas*-Phagen führte zu dem Ergebnis, dass diese Aminosäuren zum Teil streng konserviert sind [8;9;183] (Abbildung S1 [80]). Es stellte sich heraus, dass die entsprechenden gereinigten Proteine aus *P. aeruginosa*, *P. syringae* und *P. fluorescens* ebenfalls Lipid I und II spalten [8].

Um das aktive Zentrum von Colicin M näher zu definieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit jede der Aminosäuren 222 bis 236, die in allen oder einigen der Cma-ähnlichen Proteine konserviert sind und zum Teil mögliche katalytische Seitenketten besitzen, mittels ortsspezifischer Mutagenese einzeln durch Alanin ausgetauscht. Die Proteine wurden – wie alle in dieser Arbeit isolierten Derivate – in *E. coli* BL21(DE3) *fhuA* mit einem N-terminalen His₆-Tag exprimiert; die *fhuA*-Mutation verhinderte dabei die Lyse des Produzenten durch freigesetztes Colicin M. Rohextrakt bzw. mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigtes Protein wurde anschließend für die Aktivitätsbestimmung in verschiedenen Experimenten (Auftropf- und Competitionstest sowie Import durch osmotischen Schock) verwendet.

Bis auf wenige Ausnahmen zeigten alle Mutanten eine reduzierte oder gar keine Aktivität im Reihenverdünnungstest (Tabelle 1 [80]), bei dem die Colicin-Derivate in verschiedenen Verdünnungen auf Agarplatten aufgetropft werden, die mit einem sensitiven Indikatorstamm überschichtet sind. Anhand klarer Lysezonen konnte somit die Toxizität der Proteine bestimmt werden. Die Analyse der Rohextrakte mittels SDS-PAGE belegte, dass Colicin M jeweils das dominierende Protein darstellt und sich die produzierten Mengen von Wildtyp- und Mutantenprotein nicht unterscheiden (Abbildung 2 [80]). Somit ist nachgewiesen, dass die herabgesetzte bzw. fehlende Aktivität der Colicin-Derivate nicht auf eine reduzierte Proteinmenge zurückzuführen ist. Dies wurde für alle Mutanten in dieser Arbeit überprüft. Um auszuschließen, dass Strukturänderungen die Ursache sind, wurde die Faltung ausgewählter Mutantenproteine mittels Zirkulardichroismus und Tryptophan-Fluoreszenz überprüft. Dabei verhielten sich die Mutanten wie der Wildtyp (Abbildungen S2, S3 und S4 [80]). Auch der Verdau der Proteine mittels Proteinase K lieferte keinen Hinweis auf eine Strukturänderung (Abbildung S5 [80]).

Zur Unterscheidung zwischen einer Beeinträchtigung in der Aufnahme und der Aktivität des Toxins wurden die Colicin M-Derivate mittels osmotischem Schock unter Umgehung des Aufnahmesystems in die Zelle importiert. Alle Mutanten waren dabei inaktiv, d. h. die entsprechenden Mutationen beeinträchtigen nicht die Aufnahme des Proteins, sondern dessen Phosphatase-Aktivität. Dies gilt nicht für die Mutante K227A, die im Auftropftest eine Aktivität von 10 % aufwies. Nach osmotischem Schock war sie hoch aktiv, was auf einen Defekt in der Rezeptorbindung oder Translokation des Proteins zurückzuführen ist.

Die Mutanten D225A und D226A waren im Reihenverdünnungstest inaktiv, D229A zeigte eine Aktivität von 0,1 %. Die Carboxygruppen dieser konservierten Aminosäuren könnten direkt an der Hydrolyse des Phosphoesters beteiligt sein. Um dies zu überprüfen, wurden die Reste durch Asparagin bzw. Glutamat ausgetauscht. Die Mutanten D226E und D226N waren dabei komplett inaktiv, was vermuten lässt, dass die Carboxygruppe bzw. deren genaue Positionierung eine entscheidende Rolle spielt. Womöglich ist Asp226, das streng konserviert ist, direkt an der Hydrolyse des Substrats beteiligt; dies trifft vermutlich nicht für Asp225 und Asp229 zu, deren Austausch durch Glutamat oder Asparagin die Aktivität der Derivate im Vergleich zu den Alanin-Mutanten nicht beeinträchtigte (D225E) bzw. sogar erhöhte (D225N, D229N, D229E). Diese Aminosäuren dienen möglicherweise der Substratbindung oder der Orientierung der katalytischen Seitenketten, so dass das aktive Zentrum die korrekte Konformation einnimmt. Dies könnte auch für Phe230 zutreffen, das keinen katalytischen Rest besitzt, sowie für Tyr224, Tyr228, His235 und Arg236, allerdings ist für diese Aminosäuren nicht ausgeschlossen, dass ihre katalytischen Seitenketten direkt an der Spaltung des Substrats beteiligt sind.

Die von Barreteau *et al.* publizierten Daten bestätigen diese Ergebnisse [9]. Mit dem Ziel, die katalytische Domäne von Colicin M zu definieren, tauschten sie ebenfalls konservierte Aminosäuren aus und bestimmten die Aktivität der Derivate durch Auftropftest, osmotischen Schock und Spaltung von ¹⁴C-markiertem Lipid II. Dabei zeigten die Mutanten D226A, Y228A, D229A, H235A und R236A keine oder nur eine sehr geringe Toxizität bzw. Phosphatase-Aktivität. Die Ergebnisse stimmen mit den Daten der vorliegenden Arbeit und der Annahme, dass diese Aminosäuren das aktive Zentrum bilden, überein. Sie bilden ein breites Cluster an der Oberfläche des Proteins, wobei ihre Seitenketten nach außen gerichtet sind; diese exponierte Lage ermöglicht einen guten Zugang zum relativ großen Substrat.

Tyr255 ist ebenfalls konserviert und liegt in der Kristallstruktur in nächster Nähe zu den Aspartatresten 225, 226 und 229. Daher wurde vermutet, dass die Hydroxygruppe für die Hydrolyse von Lipid II eine Rolle spielt. Dies kann jedoch ausgeschlossen werden, da eine Y255F-Mutante volle Aktivität zeigt (Tabelle 1 [80]).

PilsI *et al.* beschrieben die Mutanten S223A und S233A als inaktiv [137]. Dies konnte in der vorliegenden sowie in der von Barreteau *et al.* publizierten Arbeit [9] nicht bestätigt werden, die Derivate sind dabei so aktiv wie der Wildtyp. Dies gilt auch für die Mutante T234A. Ein Austausch von Asn231 zu Alanin reduzierte die Aktivität um 10 % (Tabelle 1 [80]). Dies deutet darauf hin, dass diese Aminosäuren nicht unbedingt Teil des aktiven Zentrums sind. Eine Co-Kristallisation von Toxin und Substrat könnte weiteren Aufschluss über die genaue Lage des aktiven Zentrums und die an der Bindung und Hydrolyse des Substrats beteiligten Reste geben. Kristallisationsversuche von Colicin M mit dem künstlichen Substrat Isopen-tenylphosphat waren bislang nicht erfolgreich (S. Helbig, unveröffentlichte Daten).

2.1.2 Rezeptorbindung über die hydrophobe Helix α_1

Beim Betrachten der Struktur von Colicin M fällt auf, dass die Helix α_1 (38-VQVVYSFFQ-46) inklusive der direkt davorliegenden Loopregion aus überwiegend hydrophoben Aminosäuren besteht und aus der sonst eher kompakten Struktur des Proteins herausragt (Abbildungen 1 und S1 [80]). Es wurde postuliert, dass diese Helix das Protein an der inneren Membran, in nächster Nähe zu seinem Substrat, verankert [183]. Um dies zu überprüfen, wurden die hydrophoben Aminosäuren mittels ortsspezifischer Mutagenese durch geladene Aminosäuren ausgetauscht und die Helix durch einen Prolinrest unterbrochen sowie komplett deletiert. Im Auftropftest waren die Mutanten V30D und L36D in der Loopregion ebenso wie F44D am Ende der Helix voll aktiv, während die Toxizität der Doppelmutante G32K/A33K direkt an der Loopspitze sowie die der Mutanten L37D, V40D und V41P auf 10 % reduziert war. Ein Austausch der Leucinreste 36 und 37 direkt vor der Helix durch Lysin resultierte in einer kompletten Inaktivität der Doppelmutante im Auftropftest. Das Derivat war jedoch nach osmotischem Schock ins Periplasma aktiv und verhinderte im Competitionstest ein Abtöten der Zellen durch Albomycin. Das Antibiotikum bindet an den gleichen Rezeptor wie Colicin M und benötigt ebenfalls das TonB-System für seine Aufnahme in die Zelle. Competitionsexperimente unter Verwendung eines Colicin M-resistenten, aber Albomycin-sensitiven Stammes ermöglichen die Überprüfung, ob ein Cma-Derivat noch an FhuA bindet. Aus den Ergebnissen für die Doppelmutante Cma(L36K L37K) lässt sich schließen, dass die beiden Leucinreste für die Translokation des Toxins entscheidend sind.

Die Deletion der kompletten α_1 -Helix reduzierte die Aktivität von Colicin M auf 0,01 % (Tabelle 1 [80]). Der unspezifische Import des Proteins mittels osmotischem Schock resultierte in einer hohen Aktivität des Toxins, was auf einen Defekt in seiner Aufnahme und

nicht in seiner Aktivität hindeutet. Dies wurde im Konkurrenzexperiment mit Albomycin bestätigt; dabei verhinderte Cma($\Delta 38 - 46$) nicht das Absterben der Zellen durch das Antibiotikum, wie dies für das Wildtyp-Toxin der Fall ist (Abbildung 3 [80]). Die Deletionsmutante bindet nicht mehr an FhuA, so dass der Rezeptor frei ist für Albomycin. Daraus lässt sich schließen, dass die hydrophobe Helix α_1 die Kontaktstelle bildet, über die Colicin M mit FhuA interagiert, und sie nicht der Verankerung des Proteins in der inneren Membran dient. Dies zeigte sich auch in einem Experiment unter Verwendung von Colicin M-Rohextrakt, in dem das Toxin bei 20.000 x g präzipitiert. Bei Zugabe von gereinigtem FhuA verhinderte der Rezeptor die Präzipitierung von Wildtyp-Colicin M, jedoch nicht die von Cma($\Delta 38 - 46$) (S. Helbig, unveröffentlichte Daten).

Die Helix α_1 ist hydrophob, die exponierten Loops des Rezeptors jedoch hauptsächlich hydrophil [42], so dass es möglich ist, dass die Helix tiefer in die hydrophobe Region von FhuA eindringt, entweder mit oder ohne dessen vorheriger Strukturänderung.

Ein synthetisches Peptid, das die Sequenz der α_1 -Helix enthält (EEGLLVQVVYSF-FQGGEE), hemmte *in vivo* die Bindung des Wildtyp-Toxins an zelluläres FhuA, allerdings war dazu ein 75.000 facher molarer Überschuss nötig (diese Arbeit, unveröffentlichte Daten). Es ist fraglich, ob das Peptid eine α -helikale Struktur einnimmt. In der Regel treten in Peptidlösungen unterschiedliche Konformationen auf, wobei durch Interaktion mit FhuA vermutlich die passende Konformation aus dem Gemisch filtriert wird. Ein gesteigerter Anteil „falscher“ Konformere könnte die hohe benötigte Konzentration an Peptid erklären. Eine Co-Kristallisation des Peptids mit FhuA resultierte bislang nur in Kristallen, die keine Streuung zeigten (S. Helbig, unveröffentlichte Daten). Ein 2.500 facher Überschuss an Peptid hemmte die Bindung von Albomycin an zelluläres FhuA nicht (S. Helbig, unveröffentlichte Daten), was daran liegen könnte, dass Albomycin deutlich fester bindet als das Peptid oder die Bindestellen für die beiden Liganden nicht überlagern. Frühere Studien an *fhuA*-Deletionsmutanten führten zu dem Ergebnis, dass Colicin M mit den Loops 3, 7 und 8 des Rezeptors interagiert und Albomycin mit Loop 3 und 11 [42].

Wildtyp-Cma inhibierte *in vivo* die Bindung der Phagen T5 und $\Phi 80$, dies war jedoch nicht der Fall für Cma($\Delta 38 - 46$) (S. Helbig, unveröffentlichte Daten). Dies zeigt in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen von Endriß und Braun [42], dass die Bindestellen des Toxins und der beiden Phagen überlagern. Die Deletion der Helix reicht aus, um die Interaktion mit FhuA zu verhindern. Das kurze α_1 -Peptidderivat inhibierte jedoch nicht die Infektion von *E. coli* mit einem der beiden Phagen (S. Helbig, unveröffentlichte Daten).

Ein weiterer Bereich von Colicin M, der durch seine exponierte Lage sowie die Anhäufung geladener Reste auffällt, ist die Region 59-EDYIKKH-65 am Ende der Helix α_2 und im Übergangslösch zu Helix α_3 (Abbildung 1 [80]). Um zu untersuchen, ob diese Aminosäuren ebenfalls der Bindung an den Rezeptor dienen, z. B. durch die Bildung von Salzbrücken mit entgegengesetzt geladenen Aminosäuren von FhuA, wurden sie einzeln durch Alanin ausgetauscht. Lediglich die Mutante E59A zeigte eine reduzierte Toxizität von 10 % im Auftropftest (Tabelle 1 [80]). Das Colicin-Derivat war nach Import mittels osmotischem Schock aktiv und verhinderte im Wettbewerbsexperiment zu einem gewissen Teil das Abtöten der Zellen durch Albomycin (Abbildung 3 [80]). Dies lässt vermuten, dass die reduzierte Aktivität in einer schwachen Bindung an FhuA begründet ist, allerdings wird ausgeschlossen, dass der gesamte polare Bereich direkt an der Bindung von FhuA beteiligt ist. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass diese Region der Wechselwirkung des basischen Toxins (pI 8,9) mit dem sauren Immunitätsprotein (pI 4,9) dient. Eventuell spielen dabei die positiv geladenen Reste Lys63, Lys64 und His65 eine Rolle, indem sie über Salzbrücken mit negativ geladenen Aminosäuren von Cmi interagieren. Diese Hypothese wurde jedoch nicht bestätigt, da die Einzelmutanten einen Überproduzenten des Immunitätsproteins genauso wenig abtöteten wie Wildtyp-Colicin M.

2.1.3 Funktion des offenen β -Barrels

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Colicin M-Mutante P260A, die im Übergangslösch zwischen den Faltblättern β_5 und β_6 liegt (Abbildung 1 [82]), isoliert. Ihre reduzierte Aktivität von 1 % wurde in Verbindung mit einem Defekt in der Translokation des Proteins über die äußere Membran in Verbindung gebracht (siehe 2.2). Des Weiteren erwies sich in früheren Studien ein Toxinderivat, dessen C-terminalen Reste Lys270 und Arg271 (am Ende von β_6 , siehe Abbildung 1 [80]) durch Carboxypeptidase B abgespalten worden waren, als inaktiv [36]. Die genetische Deletion der beiden Aminosäuren (Cma Δ (K270 R271)) resultierte in einer Aktivität von 1 % im Auftropftest. Die Mutante war nach osmotischem Schock hoch aktiv, inhibierte jedoch im Wettbewerbstest die Bindung von Albomycin an FhuA (Tabelle 1 und Abbildung 1 [80]), was darauf hindeutet, dass auch hier eine Beeinträchtigung der Aufnahme des Proteins vorliegt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass Mutationen im Bereich von β_6 und der Stränge β_1 , β_2 und β_3 , die zusammen ein offenes β -Barrel bilden (Abbildung 1 [80]), die Translokation beeinflussen. Anhand eines früheren Sequenzvergleichs [183] wurden konservierte Aminosäuren in diesem Bereich durch Alanin ersetzt. Die Auswahl, Lokalisation

und Aktivität der mutierten Reste sind Tabelle 1 [80] zu entnehmen. Die Mutanten K266A und S268A waren genauso aktiv wie der Wildtyp, alle anderen Derivate zeigten eine stark herabgesetzte toxische Wirkung, die allerdings in einer deutlich reduzierten Proteinmenge im Rohextrakt begründet ist. Die meisten im β -Barrel mutierten Proteinderivate sind somit instabil. Dies zeigte auch die Behandlung der Proteine mit Harnstoff; die Mutante Cma Δ (K270 R271) denaturierte schon bei niedrigeren Harnstoff-Konzentrationen als der Wildtyp (Abbildung S4 [80]). Die Deletion der beiden C-terminalen Reste resultiert womöglich in einer Strukturänderung, die die Faltung des Proteins über eine größere Distanz beeinflusst und somit die Translokation verhindert. Dies könnte auch für weitere Mutanten zutreffen, die außerhalb der vorhergesagten Translokationsdomäne (Aminosäure 1 - 35) [183] liegen, darunter die oben beschriebenen Mutanten L36K/L37K und P260A sowie die in früheren Studien isolierte inaktive Mutante R115C, die nach unspezifischem Import ebenfalls aktiv war und die Bindung von Wildtyp-Colicin M an FhuA verhinderte [137].

In dieser Arbeit konnte der modulare Aufbau von Colicin M aus drei Domänen bestätigt werden. Es wurden bestimmte Aminosäuren bzw. Bereiche identifiziert, die Rezeptorbindung, Translokation und Aktivität des Toxins vermitteln.

2.2 Aktivierung von Colicin M durch FkpA

Die fünf periplasmatischen Chaperone bzw. Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen PpiD, SurA, FkpA, PpiA, Skp haben viele Substrate und können einander in ihrer Funktion ersetzen [10;106;124]. Dies ist nicht der Fall für die Aktivierung von Colicin M, die streng von FkpA abhängt (siehe 1.8). Das Chaperon wird nicht für die Aktivierung von neu synthetisiertem Toxin benötigt, sondern nur, wenn dieses von außen aufgenommen wird [90]. Da alle bislang isolierten Colicin M-toleranten Mutanten in der PPIase-Domäne des Proteins mutiert sind, wurde postuliert, dass die *cis/trans*-Isomerisierung einer oder mehrerer Prolyl-Peptidbindungen eine entscheidende Rolle bei der Rückfaltung des Toxins nach seiner Aufnahme ins Periplasma spielt.

2.2.1 Aktivität von Prolin-Einzelmutanten *in vivo*

Um die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung zu untersuchen, wurde jedes der 15 Proline von Colicin M mittels ortsspezifischer Mutagenese durch Alanin ersetzt, das entsprechende Derivat mit einem N-terminalen His₆-Tag in BL21(DE3) *fkpA* exprimiert und seine Aktivität unter Verwendung von Rohextrakt im Auftropftest bestimmt [79]. Die Mutanten P16A, P31A, P35A, P48A, P70A und P109A waren voll aktiv (siehe Tabelle 2 [82]). Eine Relevanz der entsprechenden Prolyl-Peptidbindungen für die Aktivierung von Colicin M konnte somit ausgeschlossen werden. Ein Austausch der Prolinreste 9, 11, 28 bzw. 157 resultierte in Proteinderivaten mit einer 10 % höheren Aktivität als der Wildtyp, bei gleicher Proteinmenge im Rohextrakt. Bei P9A und P11A handelt es sich um TonB-Box-Mutanten, da Interaktionen von TonB mit FhuA bzw. BtuB zeigen [135;163], dass der Bereich, der mit TonB interagiert, länger ist, als bislang für Colicin M als TonB-Box-Konsensusminimalsequenz (2-ETLTV-6) beschrieben wurde (vgl. 1.3.4) [36;107;137]. Daher wäre es denkbar, dass aus dem Aminosäure-Austausch von Pro9 oder Pro11 eine erhöhte Flexibilität der TonB-Box resultiert, die zu einer besseren Bindung an TonB führt. Die Mutanten sind ohne TonB nicht aktiv, wie in einem Auftropftest unter Verwendung der TonB-Mutante BR158 AB2847 *tonB* gezeigt wurde [79]. Da die TonB-Box im Wesentlichen eine bestimmte Konformation definiert, ist es interessant, dass P9A und P11A die Aktivität nicht herabsetzen, sondern verstärken. Eine Möglichkeit wäre, dass die hochaktiven Mutanten schneller aufgenommen werden; bis auf P157A liegen sie alle in der Translokationsdomäne. Dies muss noch geprüft werden.

Die Mutanten P129A, P176A und P260A zeigten im Auftropftest eine Restaktivität von 1 %, die jeweiligen Doppelmutanten erwiesen sich als komplett inaktiv. Ein Austausch von Pro107 resultierte in einer zehnfach niedrigeren Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (Tabelle 2 [82]). Diese mit Rohextrakt ermittelten Aktivitäten bestätigten sich unter Verwendung der entsprechenden Proteinderivate, die mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt worden waren. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Proteine in einem *fkpA*⁺- oder *fkpA*-Stamm exprimiert wurden, was bestätigt, dass das Chaperon für die Aktivität von neu synthetisiertem Colicin M keine Rolle spielt [90]. Die Überproduktion von FkpA erhöhte die Aktivität der Mutanten nicht, d. h. die chromosomal codierte Menge des Proteins reicht aus, um Sensitivität gegenüber den Colicin M-Derivaten zu verleihen [79].

Die Prolinreste der drei Mutanten mit der niedrigsten Aktivität wurden zudem durch Glycin ausgetauscht. Diese Aminosäure besitzt keine Seitenkette, über die es mit anderen Aminosäuren interagieren kann, und ist daher flexibler. Es sollte untersucht werden, ob die resultierenden Toxin-Derivate durch die höhere Flexibilität der Peptidbindung ohne FkpA spontan falten können und Aktivität zeigen. Dies bestätigte sich nicht, keine der Mutanten war ohne FkpA aktiv. Auch ein Austausch durch Serin, das in Polypeptidketten aufgrund eines Ringschlusses über eine Wasserstoffbrückenbindung eine strukturelle Ähnlichkeit zu Prolin aufweist, jedoch nicht isomerisiert werden kann, veränderte die Toxizität des Proteins nicht [79].

Um auszuschließen, dass die reduzierten Aktivitäten der Mutanten auf Änderungen der Sekundärstruktur zurückzuführen sind, wurde ihre Faltung mittels Zirkulardichroismus (CD, *circular dichroism*), Tryptophan-Fluoreszenz und Proteinase K-Verdau überprüft. Der proteolytische Verdau der Proteinderivate lieferte dabei das gleiche Bandenmuster wie für Wildtyp-Colicin M (Abbildung S2 [82]). Auch die CD-Spektren waren identisch, allerdings lagen die Schmelztemperaturen der Mutanten alle niedriger als die des Wildtyps. Die Mutanten P107A und P129A unterschieden sich mit 4 °C bzw. 7 °C am stärksten von Wildtyp-Cma (genaue Werte siehe [82]). Die geringere Stabilität der beiden Mutanten bestätigte sich in der Denaturierung durch Harnstoff (siehe Abbildung S4 [82]).

Des Weiteren wurde die Kristallstruktur der Mutante P107A bestimmt. Dieses Derivat ist besonders interessant, da die Bindung Lys106-Pro107 die einzige *cis*-Prolylbindung in Colicin M darstellt. Die Kristallisation des Proteins ergab, dass der Austausch des Prolins durch Alanin in einer *trans*-Bindung resultiert, die eine lokale Strukturänderung an dieser Stelle hervorruft. Diese hat jedoch keine Auswirkung auf die Gesamtstruktur des Proteins inklusive dem aktiven Zentrum (siehe Abbildung 2 B und C [82]). Die Bindung vor Pro176 stellte sich im Verlauf der Untersuchungen als mögliches Substrat für die *cis/trans*-Iso-

merisierung durch FkpA heraus (siehe unten). Um ganz sicherzugehen, dass eine veränderte Sekundärstruktur nicht die Ursache für die herabgesetzte Aktivität der Mutante P176A ist, wurde dieses Derivat ebenfalls kristallisiert. Die Struktur des Proteins ist identisch mit der des Wildtyps, die entsprechende Peptidbindung liegt auch nach Austausch mit Alanin in der *trans*-Konformation vor (Abbildung 2 B und D [82]). Somit wird ausgeschlossen, dass die reduzierte toxische Wirkung dieser Mutante auf eine Strukturänderung zurückzuführen ist, die zu einer Inaktivierung des aktiven Zentrums führt. Dieses liegt wie unter 2.1.1 beschrieben, weit davon entfernt (Abbildung 1 [82]).

Im weiteren Verlauf wurden die vier gering aktiven Mutanten P107A, P129A, P176A und P260A bzgl. der Auswirkung ihrer Punktmutation näher charakterisiert, da ihre reduzierte Aktivität in einer Beeinträchtigung der Rezeptorbindung, der Translokation über die äußere Membran, der Phosphatase-Aktivität oder der Aktivierung durch FkpA begründet sein kann. Zur Unterscheidung eines Defekts in der Aufnahme und der Aktivität des Toxins wurden die Colicin M-Derivate mittels osmotischem Schock unter Umgehung des Aufnahmesystems in die Zelle transferiert. Die Mutanten P107A, P129A und P260A waren nach unspezifischem Import hoch aktiv (Tabelle 4 [82]), was darauf hindeutet, dass der Aminosäureaustausch die Aufnahme über den FhuA-Rezeptor und/oder das TonB-System beeinträchtigt. Im Vergleich zu diesen drei Mutanten lag die Aktivität des Derivats P176A nach osmotischem Schock zehnfach niedriger, d. h. es ist auch dann nicht sonderlich aktiv, wenn es unspezifisch in die Zelle transferiert wird. Ein Defekt in der Aufnahme dieses Proteins ist somit nicht der Grund für seine reduzierte Toxizität.

Im Konkurrenzexperiment mit Albomycin (vgl. 2.1.2) verhinderten die Derivate P107A, P176A und P260A wie Wildtyp-Colicin M die Bindung des Antibiotikums an FhuA, d. h. sie können trotz ihrer Mutation an den Rezeptor binden. Dies trifft nicht auf Cma(P129A) zu, das ein Abtöten der Zellen durch Albomycin nicht verhinderte. Daher wurde dieser Mutante eine Beeinträchtigung der Bindung an den Rezeptor zugeschrieben. Um zu überprüfen, ob die Hemmung der Albomycinwirkung auf der Blockade des TonB-Systems beruht, das für die Aufnahme beider FhuA-Liganden benötigt wird, wurde ein Konkurrenzexperiment mit Colicin B anstelle von Albomycin durchgeführt. Dieses Toxin benötigt ebenfalls das TonB-System für die Aufnahme, bindet jedoch an einen anderen Rezeptor (FepA). Keine der Mutanten reduzierte die Wachstumsinhibierung durch Colicin B, was die Hemmung der Albomycinwirkung aufgrund einer Blockade des TonB-System ausschließt.

Die Ergebnisse, dass die Derivate P107A und P260A nach unspezifischem Import mittels osmotischem Schock hoch aktiv werden sowie ein Abtöten der Zellen durch Albomycin verhindern, lassen einen Defekt in ihrer Translokation vermuten. Dieser ist für Cma(P107A)

wahrscheinlich in der Umwandlung der Prolyl-*cis*- zu einer *trans*-Bindung in der Alanin-Mutante begründet, wie die Kristallisation zeigte. Beide Mutanten liegen außerhalb der postulierten Translokationsdomäne, allerdings ist unklar, inwieweit andere Bereiche des Proteins ebenfalls an der Aufnahme beteiligt sind. Wie bereits unter 2.1.3 beschrieben, beeinflussen die Mutationen L36K/L37K und R115C sowie die Deletion der α_1 -Helix ebenfalls die Translokation. Dies muss durch die Isolierung weiterer Mutanten in diesen Regionen geprüft werden.

Die sehr geringe Aktivität der Mutante P176A nach Import mittels osmotischem Schock zeigt, dass der Aminosäure-Austausch ihre Aufnahme nicht beeinflusst. Die Peptidbindung vor Pro176 stellt somit ein mögliches Substrat für FkpA dar, zumal ein Austausch dieses Prolinrestes durch weitere Aminosäuren die Aktivität in jedem Fall herabsetzte (1 % Aktivität für P176L, P176V, P176K, P176D bzw. 10 % für P176F, P176Y).

Keine der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Mutanten war im Auftropftest aktiv ohne FkpA. In einer früheren Studie konnte unter mehr als 9500 Klonen ebenfalls keine Colicin M-Mutante identifiziert werden, die unabhängig von FkpA spontan faltet und die richtige Konformation einnimmt [79]. Osmotische Schockexperimente unter Verwendung der FkpA-Deletionsmutante Mo3 *fkpA40* führten zu dem Ergebnis, dass FkpA auch für die Toxizität von Colicin M nötig ist, das unspezifisch ins Periplasma transferiert und nicht über den Rezeptor- und Energie-abhängigen Weg importiert wird (Tabelle 4 [82]); dies gilt auch für die Mutanten P107A, P129A, P176A und P260A. Ein Vergleich der Schockwerte ohne Cma (durchschnittlich 6 % Überlebende) und mit Cma (1,5 % Überlebende für den Wildtyp bzw. 0,2 bis 1,8 % für die vier Mutanten) macht jedoch deutlich, dass die Proteine auch ohne FkpA eine geringe Restaktivität zeigen. Dies bedeutet, dass ein kleiner Teil der Moleküle nach Schock auch ohne FkpA eine aktive Konformation einnimmt. Cma (P176A) unterscheidet sich insofern von den anderen Mutanten, dass die Werte nach osmotischem Schock in FkpA-Wildtyp und Mutante mit 0,4 % bzw. 0,6 % Überlebenden (Tabelle 4 [82]) kaum voneinander abweichen. Im Gegensatz dazu verleiht die Expression des Colicin M-Immunitätsproteins volle Resistenz gegenüber dem Toxin, wie dies auch für die anderen Mutanten und den Wildtyp der Fall ist (5,8 bis 8,9 % Überlebende mit Schock und Cma im Vergleich zu 6 % mit Schock ohne Cma; Tabelle 4 [82]). Dies bedeutet, dass für unspezifisch importiertes Cma(P176A) die Anwesenheit von FkpA keine Rolle spielt.

Das ist nicht der Fall, wenn das Toxin-Derivat von innen über die Cytoplasmamembran ins Periplasma sekretiert wird. Dazu wurde das Protein mit der Signalsequenz des Maltosebindeproteins MalE fusioniert und hinter den *araC*-Arabinosepromotor kloniert. Bei einer Arabinosekonzentration von 0,001 % inhibierte Wildtyp-Colicin M ebenso wie die Mutante

P107A, die im Auftropftest eine Aktivität von 10 % aufwies, das Wachstum des FkpA-Wildtyps. Eine Mutation im aktiven Zentrum (D226A) verhinderte dies. Die Toxin-Derivate P129A, P260A und P176A zeigten eine Restaktivität, dabei war die der letztgenannten Mutante am geringsten (Abbildung 4A [82]). Um zu untersuchen, ob die Aktivität der sekretierten Proteine ebenfalls von FkpA abhängt, wurde die Inhibition des Wachstums der FkpA-Mutante Mo3 *fkpA40* ebenso untersucht; die Arabinosekonzentration wurde dabei zehnfach erhöht, um die Expression zu steigern. Keine der Mutanten war nach Sekretion ins Periplasma aktiv ohne FkpA. Dies bedeutet, dass FkpA für die Aktivierung von Wildtyp- und Mutanten-Toxin essentiell ist, unabhängig davon, ob es über die äußere Membran aufgenommen oder über die innere Membran sekretiert wird. Dies wird mit einer Konformationsänderung des Toxins beim Passieren der Membran in Verbindung gebracht. In beiden Fällen muss das Protein rückfalten, was durch FkpA unterstützt wird. Die Daten werden bestärkt durch Studien von Barnéoud-Arnoulet *et al.*, in denen Colicin M mit Hilfe der OmpA-Signalsequenz ins Periplasma sekretiert wurde. Das Protein ist bakterizid ohne FhuA und TonB, benötigt jedoch die Anwesenheit beider Domänen von FkpA [7].

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass drei der vier Prolylbindungen in den Colicin M-Mutanten mit herabgesetzter Aktivität als Substrat für die *cis/trans*-Isomerisierung durch FkpA ausgeschlossen werden können, da die Punktmutation der Derivate P107A, P129A und P260A ihre Aufnahme in die Zelle beeinträchtigt. Somit bleibt nur die Bindung Phe175-Pro176 als Substrat für die *cis/trans*-Isomerisierung übrig. Ein Austausch dieses Prolinrestes durch Alanin macht eine *cis/trans*-Isomerisierung durch FkpA unmöglich, da PPIasen vom FKBP-Typ keine Nicht-Prolyl-Bindungen isomerisieren [155]. Um zu überprüfen, ob diese Bindung tatsächlich das Substrat von FkpA darstellt, wurde ein neuartiger Peptidassay verwendet, der im Folgenden beschrieben wird.

2.2.2 Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Peptidbindungen in synthetischen Peptiden

Die Bestimmung der *cis/trans*-Isomerisierung erfolgte *in vitro* anhand synthetischer Pentapeptide der Sequenz *p*-Aminobenzoyl-Cys-Xaa-Pro-Yaa-Cys-(NO₂)Tyr-NH₂, wobei Xaa und Yaa beliebige Aminosäuren darstellen. Die beiden Cysteinreste bilden eine Disulfidbrücke und die Xaa-Pro-Bindung liegt überwiegend in der *cis*-Konformation vor [49]. In diesem Zustand wird die Fluoreszenz der Aminobenzoylgruppe durch das Nitrotyrosylamid gelöscht. Durch Reduktion wird die Disulfidbrücke geöffnet und die Peptidbindung iso-

merisiert. Dies führt zu einem gesteigerten Gehalt des *trans*-Zustands (ca. 85 %) und einer Abnahme des Quenching-Effekts, wodurch die Fluoreszenz erhöht wird. Die langsame spontane *cis/trans*-Isomerisierung kann durch PPIasen wie FkpA beschleunigt werden.

Ein Vergleich der spontanen und katalysierten Isomerisierung des Peptids *p*-Aminobenzoyl-CFPVC-(NO₂)Tyr-NH₂, das die Peptidbindung Phe175-Pro176 repräsentiert, zeigt, dass die Reaktion unter Zugabe von FkpA deutlich schneller abläuft (Abbildung 5 [82]). Der k_{cat}/K_M -Wert der katalysierten Reaktion ist dabei mit dem für PPIasen vom FKBP-Typ unter Verwendung optimaler Substrate vergleichbar [76]. Die Katalyse der Kontrollpeptide *p*-Aminobenzoyl-CKPAC-(NO₂)Tyr-NH₂ und *p*-Aminobenzoyl-CLPGC(NO₂)Tyr-NH₂, die den Prolylbindungen Lys106-Pro107 bzw. Leu259-Pro260 von Colicin M entsprechen, ist im Vergleich mehr als zehnfach weniger effizient (Tabelle 5 [82]). Dies bestärkt die Substratspezifität in Bezug auf die Prolylbindung vor Pro176. Die niedrige katalytische Effizienz für das Peptid mit der Bindung Lys106-Pro107 bestätigt, dass die einzige *cis*-Prolylbindung in Colicin M nicht das Substrat von FkpA darstellt. Die Aktivität einer Colicin M-resistenten Punktmutante in der PPIase-Domäne von FkpA (G148D) [90] liegt im Vergleich zur Katalyse der Bindung Phe106-Pro107 mit Wildtyp-FkpA nur bei 0,2 % für das Pro176- bzw. 0,4 % für das Pro260-Peptid. Dies bestätigt die Rolle der PPIase-Funktion von FkpA für die Aktivierung von Colicin M. Die Daten werden bestärkt durch die Ergebnisse einer weiteren Messung unter Verwendung einer temperatursensitiven FkpA-Mutante. Diese ist aufgrund eines Y25N-Austausches in der Dimerisierungsdomäne bei 42 °C inaktiv und zeigt bei 30 °C eine Restaktivität von 10 % gegenüber Colicin M [90]. Der k_{cat}/K_M -Wert für das Peptid mit der Bindung Phe175-Pro176 liegt im Experiment bei 10 °C fünffach höher als der für das Leu259-Pro260-Peptid bzw. zweifach niedriger als für die Messung mit Wildtyp-FkpA.

Die hohe Effizienz der Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung der Bindung Phe175-Pro176 und die Tatsache, dass P176A die einzige Prolinmutante mit herabgesetzter Aktivität ist, die nicht in ihrer Aufnahme beeinträchtigt ist, sprechen dafür, dass diese Bindung das Substrat von FkpA bei der Rückfaltung von Colicin M im Periplasma darstellt. Die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidbindung vor Pro176 stellt somit einen molekularen Schaltmechanismus dar, über den das Toxin von der inaktiven in die aktive Form umgewandelt wird. Eine derartige Funktion übernimmt die *cis/trans*-Isomerisierung in vielen Bereichen [115], so beispielsweise auch bei der Infektion von *E. coli* durch den filamentösen Phagen fd. Das Gen-3-Protein des Phagen kommt in mehreren Kopien an der Spitze des Phagen vor und ist über seinen C-Terminus in der Phagenhülle verankert. Die Domänen N1 und N2 ragen nach außen und sind in der Ruhephase des Phagen fest miteinander verbunden. Die Peptid-

bindung Gln212-Pro213 in der Gelenkregion zwischen N1 und N2 liegt in diesem nicht-infektiösen Zustand in der *cis*-Form vor. Bindet die N2-Domäne an den bakteriellen F-Pilus, dissoziieren die beiden Domänen und die N1-Domäne kann mit dem eigentlichen Phagenrezeptor TolA assoziieren. Eine *cis*-zu-*trans*-Isomerisierung der Peptidbindung vor Prolin 213 stellt sicher, dass diese offene, bindungsaktive Konformation solange aufrechterhalten wird, bis die Bindung an TolA erfolgt ist [119].

Mit der Identifizierung der Phe175-Pro176-Bindung von Colicin M als Substrat für FkpA konnte erstmals eine Prolylbindung eines bakteriellen Proteins bestimmt werden, die durch eine PPIase isomerisiert wird. Überhaupt wurde mit der Aktivierung von Colicin M durch die FkpA-vermittelte *cis/trans*-Isomerisierung zum ersten Mal gezeigt, dass die Aktivität eines importierten Proteins von einer periplasmatischen PPIase abhängig ist [90]. Bereits beschrieben ist die Beteiligung eines Chaperons und einer Prolyl-Isomerase an der Translokation eines bakteriellen Toxins über endosomale Membranen ins Cytosol von Säugetierzellen. Das C2-Toxin von *Clostridium botulinum* wird durch Rezeptor-vermittelte Endocytose in Endosomen aufgenommen. Die anschließende Translokation der Enzymkomponente des Toxins, die für die ADP-Ribosylierung von Aktin und dem damit verbundenen Zusammenbruch des gesamten Aktin-Zytoskeletts führt, hängt von der Aktivität des Wirtszell-Chaperons Hsp90 sowie der PPIase Cyclophilin A ab [78;98].

Die exponierte Lage von Pro176 an der Oberfläche von Colicin M (siehe Abbildung 1 [82]) ermöglicht FkpA einen direkten Zugang zu seinem Substrat. Im Vergleich dazu sind die Prolinreste 107, 260 und insbesondere 129 nicht so leicht zugänglich, es sei denn, dies wird durch die Entfaltung des Proteins während der Translokation bzw. durch größere Strukturänderungen, die aus der Interaktion mit FkpA resultieren, ermöglicht. Welche Änderungen in der Raumstruktur im Verlauf der Rezeptorbindung und Translokation auftreten, ist bislang nicht klar, allerdings wird davon ausgegangen, dass dies nicht nur die Umwandlung der Bindung Phe175-Pro176 von der *trans*- in die *cis*-Form beinhaltet, zumal Colicin M nach der Bindung an FhuA sensitiv gegenüber Trypsin wird [150] und das Molekül zudem in seiner kompakten Struktur zu groß ist, um die Pore in FhuA zu passieren [15] – vorausgesetzt, das Protein wird überhaupt durch das β -Barrel aufgenommen und nicht auf einem anderen Weg. Unabhängig davon, ob Colicin M durch FhuA aufgenommen wird oder nicht, muss es zur Translokation durch die äußere Membran auf jeden Fall entfalten. Im Periplasma erfolgt die Rückfaltung, die die *cis*-zu-*trans*-Isomerisierung der Peptidbindung vor Pro176 beinhaltet.

Dabei stellt sich die Frage, ob auch die Chaperonfunktion von FkpA eine Rolle bei der Rückfaltung spielt. Cma(P176A), das mittels Schock ins Periplasma transferiert wurde, war in einer *fkpA*-Mutante ähnlich aktiv (Restaktivität) wie im FkpA-Wildtyp, d. h. das Derivat spricht nicht auf FkpA an. Sekretiertes Cma ist dagegen nur im FkpA-Wildtyp aktiv, wenn auch nur geringfügig. Dies macht deutlich, dass die Anwesenheit von FkpA eine Auswirkung hat. Da die *cis/trans*-Isomerisierung aufgrund des Alanin-Austausches dafür nicht der Grund sein kann, wird diese Aktivität der Chaperonfunktion von FkpA zugeschrieben. Barnéoud-Arnoulet *et al.* exprimierten die beiden Domänen von FkpA getrennt voneinander im Periplasma. Die Komplementation einer *fkpA*-Mutante mit einem Plasmid, das entweder die C- oder N-terminale Domäne codiert, führte dabei nicht zur Wiedergewinnung der Sensitivität gegenüber Colicin M, das von außen zugegeben wird oder mit Hilfe der OmpA-Signalsequenz ins Periplasma sekretiert wird. Diese Ergebnisse bestätigen, dass beide Funktionen von FkpA nötig sind, um das Toxin zu aktivieren [7]. Jakob *et al.* lieferten kürzlich ein Modell, das den Mechanismus der Proteinfaltung von PPIasen darstellt. Die Chaperondomäne bindet dabei mit niedriger Affinität an nicht-native Proteinsubstrate und transferiert diese zum aktiven Zentrum der PPIase, wo sie isomerisiert werden [95]. Neben der Bindung und Rückfaltung von Colicin M könnte FkpA auch an der richtigen Positionierung des Toxins gegenüber seinem Substrat Lipid II beteiligt sein. Barnéoud-Arnoulet *et al.* entdeckten, dass ein C-terminales Fragment von Colicin M (Aminosäure 119 - 271), das die katalytische Domäne enthält, auch ohne FkpA toxisch wirkt, wenn es mit Hilfe der OmpA-Signalsequenz ins Periplasma sekretiert wird [6]. Zudem ist die isolierte katalytische Domäne nach Schock auch ohne FkpA aktiv [9]. Die Autoren gehen davon aus, dass Colicin M normalerweise in einer inaktiven Form produziert wird und erst nach Import und/oder Aktivierung durch FkpA toxisch wirkt, was die Notwendigkeit von FkpA im osmotischen Schock erklären würde. Sie postulieren, dass in der Deletionsmutante die katalytische Domäne in einer veränderten, bereits aktiven Konformation vorliegt, die FkpA nicht mehr benötigt. Dies könnte ihre 45-fach erhöhte Aktivität *in vitro* erklären, widerspricht jedoch der Hypothese, dass Colicin M in einer aktiven Form synthetisiert wird [90] und erst durch die Entfaltung während der Aufnahme inaktiviert wird [183] (vgl. 1.3.6). Diese Annahme basiert u. a. darauf, dass aus dem Cytoplasma isoliertes Colicin M Lipid II *in vitro* auch ohne Zugabe von FkpA spaltet [9;41;90].

In dieser Arbeit konnte die Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität von FkpA bezüglich seines natürlichen Substrates Colicin M definiert und somit erstmals eine Prolylbindung eines bakteriellen Proteins bestimmt werden, die durch eine PPIase isomerisiert wird. Zudem konnten Hinweise auf eine Beteiligung der Chaperonfunktion bestärkt werden. Das Toxin ist bislang das einzig bekannte natürliche Substrat von FkpA.

2.3 Modifizierung der äußeren Membran durch das Flavoprotein CbrA und die dadurch vermittelte Resistenz gegenüber Colicin M

2.3.1 Kopplung von *cbrA*-Expression und Colicin M-Resistenz

Wie bereits beschrieben wurde bei der Suche nach Colicin M-toleranten *E. coli*-Mutanten unter Verwendung einer Genbibliothek neben FkpA ein weiteres Gen identifiziert, das die Sensitivität gegenüber Colicin M beeinflusst (vgl. 1.9). Dabei handelt es sich um *cbrA* (*yidS*).

Die Transformation des Colicin M-sensitiven Stammes AB2847 mit dem Plasmid pKH35 *cbrA* resultierte im Auftropftest in trüben Lysezonen bis zu einer 1.000-fachen Verdünnung einer Colicin M-Lösung, die 1 mg/ml Colicin M enthielt. Im Gegensatz dazu zeigte der untransformierte Stamm klare Höfe bis zu einer Verdünnung von 10^5 (Tabelle 2 [81]). Das Plasmid pKH35 stammt aus der Erstellung einer Genbibliothek von *E. coli* und enthält den offenen Leserahmen von *cbrA* sowie Teile der Gene *yidR* (uncharakterisiertes Protein) und *dgoT* (D-Galactonsäure-Transporter), die *cbrA* im *E. coli*-Genom flankieren, jedoch in die entgegengesetzte Richtung transkribiert werden. Wurde das gleiche DNA-Fragment in den Vektor pACYC184 eingebracht (pAB115), resultierte das Auftropfen einer 100-fach verdünnten Colicin M-Lösung in klaren Lysezonen, während bei einer 1.000-fachen Verdünnung nur noch ein trüber Hof zu beobachten war (Tabelle 2 [81]). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Sensitivität gegenüber Colicin M durch das Protein CbrA kontrolliert wird.

Da die beiden verwendeten Plasmide pKH35 und pAB115 in der DNA-Sequenz ihrer Inserts und der Region strangaufwärts identisch sind, ist die unterschiedlich hohe Colicin M-Resistenz, die sie vermitteln und die im Vergleich zum Wildtyp mindestens 1.000-fach gesteigert ist, auf die unterschiedliche Kopienzahl der beiden Vektoren zurückzuführen. pKH35 ist ein Abkömmling des Multicopy-Vektors pACYC184 [26], während pWSK29, der für die Klonierung von pAB115 verwendet wurde, als Vektor mit geringer Kopienzahl beschrieben wird [178]. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde *cbrA* hinter den T7-Promotor des Multicopy-Vektors pET28b kloniert, so dass die Transkription des Gens durch die T7 RNA-Polymerase gezielt induziert werden konnte. Die Transformation des *cbrA*-Wildtypstammes AB2847 mit dem resultierenden Plasmid pSH150 führte zur Trübung der Lysezonen im Auftropftest, eine komplette Resistenz gegenüber Colicin M konnte durch gezielte Induktion der *cbrA*-Transkription erreicht werden (Tabelle 2 [81]). Die Aktivität der *cbrA*-

Deletionsmutante JW5631 unterschied sich im Auftropftest unter Verwendung von LB-Agarplatten nicht von der des Wildtyps (Tabelle 2 [81]). Dies wird darauf zurückgeführt, dass *cbrA* in komplexem Medium kaum exprimiert wird (siehe unten).

Um zu überprüfen, ob CbrA auch Resistenz gegenüber anderen Colicine verleiht, wurde die Sensitivität des CbrA-Überproduzenten AB2847 pSH150 *cbrA* nach gezielter Induktion der *cbrA*-Transkription bezüglich der Colicine A, B, D, E1, E3, Ib, K, L, N, S4, U, 5 und 10 getestet. Im Vergleich zu Colicin M resultierte das Auftropfen dieser Toxine, die über unterschiedliche Rezeptoren und Translokationsproteine importiert werden und verschiedene Wirkmechanismen aufweisen (vgl. Tabelle 1), in klaren Lysezonen. Dies macht deutlich, dass die durch CbrA vermittelte Resistenz spezifisch für Colicin M ist.

Die Ergebnisse der Sensitivitätstests lassen vermuten, dass der Grad der durch CbrA verliehenen Colicin M-Resistenz vom Expressionslevel von *cbrA* abhängt. In früheren Studien wurde in Analysen mittels Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und DNA-Microarray eine CreBC-abhängige Hochregulation der *cbrA*-Expression beobachtet, jedoch bislang nicht weiter untersucht [5;23]. Im CreBC-Zweikomponentensystem reagiert der Sensor CreC auf ein bislang unbekanntes Signal und phosphoryliert den Regulator CreB. Dieser bindet daraufhin an ein bestimmtes Promotor-proximales Motiv mit der Sequenz TTCACnnnnnnTTCAC, was zur Aktivierung der Transkription führt. Die Expression der Gene des *cre*-Regulons erfolgt bei Wachstum in Minimalmedium, wenn Kohlenstoffquellen aus der Glykolyse fermentiert werden, oder bei aerobem Wachstum, wenn niedrigmolekulare Fermentationsprodukte wie Pyruvat, Lactat oder Acetat als Kohlenstoffquelle verwendet werden [24].

Um zu überprüfen, ob *cbrA* tatsächlich über das CreBC-System reguliert wird, wurde die Region strangaufwärts von *cbrA* (564 bp), die ein mögliches Cre-Tag-Motiv mit der Sequenz TTCACAAGGACTTCAC enthält, mit dem *lacZ*-Gen von *E. coli* auf dem Vektor pRS415 fusioniert. Nach Transformation der Zellen mit dem resultierenden Plasmid pKH55 wurde die Aktivität der β -Galactosidase bei Wachstum in Komplex- bzw. Minimalmedium unter aeroben und anaeroben Bedingungen bestimmt. Dabei war bei aerobem Wachstum in Minimalmedium mit einem Wert von 16,2 eine achtfach höhere β -Galactosidase-Aktivität zu beobachten als in LB-Medium (Aktivität von 2,1; Tabelle 4 [81]). Die Deletion von *creB* reduzierte die Aktivität in M9-Medium auf 3,6 unter aeroben bzw. 1,6 unter anaeroben Bedingungen. In der Mutante JW5631 Δ *cbrA* pKH55 *cbrA* lagen die Werte für die verschiedenen Wachstumsbedingungen minimal niedriger als die Wildtyps. Anaerobes Wachstum der

Transformanten reduzierte in allen Stämmen die Enzymaktivität geringfügig, was mit einer niedrigeren Stoffwechselrate und einer verlangsamten Enzymsynthese in Verbindung gebracht wird.

Das plasmidcodierte Fusionskonstrukt aus der Promotorregion von *cbrA* und dem *lacZ*-Gen wurde außerdem mit Hilfe eines λ -Phagen in das Chromosom von *E. coli* integriert. Dabei wurden deutlich niedrigere β -Galactosidase-Aktivitäten als nach Transformation mit dem Plasmid pKH55 beobachtet (Tabelle 4 [81]), allerdings konnten die höheren Werte bei Wachstum in Minimalmedium im Vergleich zu Komplexmedium bestätigt werden. Die *creB*-Deletionsmutante JW4361 zeigte keine bzw. nur eine minimale Aktivität von 0,01, während für die *cbrA*-Mutante JW5631 die höchste Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte; diese lag unter anaeroben Bedingungen mit einem Wert von 0,37 am höchsten.

Die Ergebnisse der β -Galactosidasetests bestätigen, dass die Transkription von *cbrA* über das CreBC-Zweikomponentensystem reguliert wird. Das TTCACAAGGACTTCAC-Motiv vor *cbrA* dient dabei als CreB-Bindestelle. Die Aktivierung des Zweikomponentensystems bei Wachstum in Minimalmedium konnte bestätigt werden.

Die höhere β -Galactosidaseaktivität der *cbrA*-Mutante JW5631 mit dem chromosomalen Fusionskonstrukt aus der Promotorregion von *cbrA* und *lacZ* im Vergleich zum Wildtyp BW25113 wird darauf zurückgeführt, dass die Deletion von *cbrA* zu einem Stresssignal führt, das eine erhöhte Aktivierung des CreBC-Systems und somit eine verstärkte Transkription von *lacZ* zur Folge hat.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, inwieweit der Grad der Colicin M-Resistenz mit dem *cbrA*-Transkriptionsniveau korreliert. Dies wurde bei Wachstum in LB- bzw. M9-Medium unter aeroben und anaeroben Bedingungen überprüft. Der *cbrA*-Wildtypstamm BW25113 wurde bei aerobem Wachstum in Komplexmedium ebenso wie die *cbrA*-Deletionsmutante JW5631 durch Colicin M lysiert (OD₅₇₈ nach 150 Minuten: 0,08 bzw. 0,07; Tabelle 3 [81]). Dies ist, wie im β -Galactosidase-Test gezeigt, auf die geringe Aktivierung des CreBC-Systems und der Transkription des Zielgens bei aerobem Wachstum in Komplexmedium zurückzuführen. Für den Stamm BW25113 pKH35 *cbrA* lagen die OD₅₇₈-Werte bei 2,08 ohne bzw. 1,01 mit Colicin M-Zugabe, d. h. die zusätzliche Expression von plasmidcodiertem *cbrA* resultierte in partieller Colicin M-Resistenz. Dies bestätigte sich bei aerobem Wachstum in M9-Minimalmedium (Abbildung 2 und Tabelle 3 [81]), die OD-Werte von 0,88 ohne bzw. 0,76 mit Colicin-Zugabe liegen nahe beieinander. Dies zeigt, dass die Expression von plasmidcodiertem *cbrA* in beiden Medien ausreicht, um Colicin M-Resistenz zu vermitteln.

Wachstum in Minimalmedium erhöhte die Resistenz des Wildtyp-Stammes BW25113 gegenüber Colicin M im Vergleich zu Wachstum in Komplexmedium deutlich (OD₅₇₈ von 0,08 auf 0,47). Dies lässt sich mit der Aktivierung des CreBC-Systems in Minimalmedium erklären, die im β -Galactosidasetest gezeigt worden war (vgl. Tabelle 4 [81]). Die *creB*-Deletionsmutante JW4361 war in M9-Medium ebenso wie die *cbrA*-Mutante JW5631 komplett sensitiv gegenüber Colicin M (OD₅₇₈ von 0,07 bzw. 0,09). Dies zeigt zum einen, dass die Deletion von *cbrA* die Zellen auch in Minimalmedium sensitiv gegenüber Colicin M werden lässt. Zusammen mit dem Ergebnis, dass für die *creB*-Deletionsmutante JW4361 nur eine minimale β -Galactosidase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen worden war, bestätigen diese Ergebnisse zum anderen, dass die Transkription von *cbrA* über das CreBC-Zweikomponentensystem reguliert wird. Da das Level der β -Galactosidase-Aktivität mit dem Grad der Colicin M-Resistenz korreliert, konnte nachgewiesen werden, dass das Ausmaß der Resistenz vom Transkriptionslevel von *cbrA* abhängt. Die Expression des Gens wird unter Nährstoff-limitierten Wachstumsbedingungen, wie sie in natürlichen Habitaten von *E. coli* herrschen, induziert.

Da die Expression von *cbrA* nicht die Sensitivität der Zellen gegenüber Colicin B, das als Kontrolle verwendet wurde, beeinträchtigte, wurde ausgeschlossen, dass die in Minimalmedium beobachtete Resistenz gegenüber Colicin M auf eine herabgesetzte Wachstumsrate im Vergleich zu der in LB-Medium zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse der Messungen in M9-Medium unter aeroben Bedingungen korrelieren mit denen unter Sauerstoffausschluss. Die geringeren absoluten OD₅₇₈-Werte sind dabei auf eine geringere Wachstumsrate der Zellen unter anaeroben Bedingungen zurückzuführen. Eine Ausnahme stellte der Stamm JW4631 $\Delta creB$ pKH35 *cbrA* dar, der bei aerobem Wachstum sensitiv, unter anaeroben Bedingungen jedoch resistent gegenüber Colicin M war (Tabelle 3 [81]). Dies zeigt, dass ohne Sauerstoff die Expression von *cbrA* auf dem Plasmid pKH35 ausreicht, um Colicin M-Resistenz zu vermitteln.

2.3.2 Strukturänderung der äußeren Membran von *E. coli* durch CbrA

Eine mögliche Ursache der Colicin M-Resistenz bei *cbrA*-Überexpression könnte eine Beeinträchtigung der Aufnahme des Toxins sein. Um dies zu überprüfen, wurde neben der Sensitivität der Zellen gegenüber Colicin B auch die Empfindlichkeit gegenüber Albomycin getestet. Die Moleküle binden an unterschiedliche Rezeptoren, Colicin B an FepA, Albomycin wie Colicin M an FhuA, benötigen jedoch alle das TonB-System für ihre Aufnahme. Wie schon für Colicin B gezeigt worden war, waren die *cbrA*-Mutante JW4361 und

der Überproduzent BW25113 pKH35 *cbrA* gegenüber Albomycin ebenso sensitiv wie der Wildtyp. Somit kann eine Beeinträchtigung der Aktivität des TonB-Systems durch CbrA ausgeschlossen werden.

Um eine Inhibition der Toxin-Aufnahme weiter auszuschließen, wurden osmotische Schockexperimente durchgeführt. Die *cbrA*-Deletionsmutante JW5631 war wie der Wildtyp komplett sensitiv gegenüber unspezifisch importiertem Colicin M (keine Überlebenden). Im Gegensatz dazu erhöhte die Überexpression von *cbrA* die Zahl der überlebenden Zellen auf 34 % (Tabelle 5 [81]). Ein Vergleich der Daten zeigt, dass die Zahl der Überlebenden nach osmotischem Schock ohne Zugabe von Colicin M im *cbrA*-Überproduzenten mit 54 % mehr als dreimal so hoch war wie in der *cbrA*-Mutante (17 %) bzw. im Wildtyp (16 %). Dies macht deutlich, dass die Zellen durch die Expression von *cbrA* schockresistent werden. Unter Colicin M-Zugabe ohne Schock überlebten fast 20-mal mehr Zellen des Wildtyps als der *cbrA*-Mutante (0,9 bzw. 0,05 % Überlebende), während der Überproduzent nur eine geringe Sensitivität zeigte (69 %). Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen der Wachstumsexperimente insofern, dass die *cbrA*-Mutante die geringste Colicin M-Sensitivität aufweist und die Resistenz mit zunehmender Expression von *cbrA* ansteigt. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass die absoluten Werte aus den Schockexperimenten und den Wachstumskurven nicht miteinander verglichen werden können, da sich die jeweiligen Versuchsbedingungen deutlich unterscheiden. Im ersten Versuch werden die Zellen mit Colicin M für 15 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie in kaltem Puffer verdünnt und ausplattiert werden, während das Toxin bei den Sensitivitätstests in Flüssigmedium zu logarithmisch wachsenden Zellen zugegeben wird, die unter Schütteln bei 37 °C weiter inkubiert werden.

Die beschriebene Schockresistenz der Zellen bei *cbrA*-Expression lässt vermuten, dass das Protein die äußere Membran so modifiziert, dass der Transfer von Colicin M ins Periplasma beeinträchtigt ist. Um zu überprüfen, ob das Protein die Membranpermeabilität beeinflusst, wurde die Sensitivität gegenüber verschiedenen Chemikalien überprüft. Wie bereits unter 1.9 beschrieben zeigten Zhou *et al.* in einer Microarray-Analyse, dass die Deletion von *cbrA* zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Hydroxylamin sowie zu Hypersensitivität gegenüber Ofloxacin, 5,7-Dichlor-8-Hydroxyquinolindin bzw. einem 18-Kron-6-Ether führt [185], was einen Einfluss auf die Durchlässigkeit der Membran vermuten lässt. Unter anaeroben Bedingungen schränkte 1 µg/ml Ofloxacin das Wachstum des CbrA-Überproduzenten BW25113 pKH35 *cbrA* um knapp 25 % ein, für den Wildtyp und die *cbrA*- bzw. *creB*-Mutante war kein Unterschied zu den unbehandelten Kulturen zu beobachten. 50 µg/ml Hydroxylamin

reduzierten das Wachstum aller Stämme gleichermaßen um 61 bis 64 %. Die postulierte höhere Resistenz der *cbrA*-Mutante gegenüber Hydroxylamin und die Hypersensitivität gegenüber Ofloxacin konnte somit nicht bestätigt werden.

Es wurden weitere Substanzen getestet, die *E. coli*-Mutanten mit einem Defekt in der äußeren Membran, wie z. B. *tol*-Mutanten, inhibieren [125;129]. In Bezug auf die Sensitivität gegenüber 0,1 µg/ml Polymyxin war bei aerobem Wachstum in Minimalmedium zwischen dem Wildtyp, der *cbrA*-Mutante JW5631, der *creB*-Mutante JW4361 und dem *cbrA*-Überproduzenten BW25113 pKH35 *cbrA* kein großer Unterschied zu beobachten, die OD₅₇₈-Werte lagen zwischen 0,12 und 0,14 im Vergleich zu 0,53 bis 0,61 in den unbehandelten Kulturen. Die Zugabe von 1 mM EDTA bzw. 1 % Natriumcholat reduzierte das Wachstum der Zellen nur geringfügig, dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Stämmen. Dies zeigt zum einen, dass eine Deletion von *cbrA* keinen generellen Defekt der äußeren Membran zur Folge hat. Zum anderen schließt dies aus, dass die Expression von *cbrA* eine Beeinträchtigung des Tol-Systems hervorruft, was einen weiteren Mechanismus der Colicin-Resistenz darstellt. *tol*-Mutanten zeichnen sich u. a. durch die Überempfindlichkeit gegenüber Gallensalzen, Detergenzien, Antibiotika und anderen toxischen Substanzen aus [125;129]. Dies konnte für die *cbrA*-Deletionsmutante JW5631 nicht gezeigt werden. Die Schockresistenz des CbrA-Überproduzenten ist somit der einzige Hinweis auf eine Membranmodifikation.

Anhand dieser Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass die Transkription von *cbrA* unter Nährstoff-limitierten Wachstumsbedingungen, wie sie in natürlichen Habitaten von *E. coli* herrschen, induziert wird. Neben der Inaktivierung des Aufnahmesystems (FhuA, TonB, ExbB, ExbD) und des FkpA-Chaperons stellt die durch CbrA vermittelte Resistenz einen weiteren Mechanismus dar, sich vor Colicin M zu schützen. Dies verhindert in der Umgebung von Colicin M-Produzenten die Lyse von Zellen, die kein entsprechendes Immunitätsprotein exprimieren. Unter wachstumslimitierenden Bedingungen reicht die Expression von chromosomal codiertem *cbrA* vermutlich aus, um mit dem Colicin M-Produzenten konkurrieren zu können.

Neben CbrA ist ein weiteres Protein, YieJ (CbrC), bekannt, das ebenfalls durch das CreBC-Zweikomponentensystem reguliert wird und Colicin-Resistenz verleiht. Eine Mutation im Sensor CreC führt dabei zu einer fast 100-fachen Überexpression von CbrC, was im Auftropftest in einer 16-fach höheren Resistenz gegenüber Colicin E2 resultiert [23]. Die Funktion des Proteins ist ebenso wie die aller bislang bekannten *creBC*-regulierten Gene

unbekannt [23]. *cbrC* und *cbrA* bilden kein Operon, sondern liegen 20 offene Leserahmen auseinander. Als Resistenzmechanismus kommt wie auch für CbrA eine Änderung der Membranstruktur in Frage, was bislang allerdings nicht weiter überprüft wurde.

2.3.3 Identifizierung von CbrA als FAD-bindendes Protein

Auf der Suche nach CbrA-homologen Proteinen konnten in der Proteindatenbank „NRPD“ (*Non-Redundant Protein Database*) mit Hilfe des Programmes „PSI-BLAST“ (*Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool* [1]) FAD-bindende Oxidoreduktasen als nächste Homologe identifiziert werden (siehe Abbildung 4 [81]). Mittels „HHpred“ [166], einem Programm zur Bestimmung der Homologie von Proteinen und zur Vorhersage ihrer Struktur, wurde die Geranylgeranyl-Reduktase des Archaeons *Thermoplasma acidophilum* als nächstes homologes Protein mit bekannter Struktur (PDB-Eintrag 3OZ2) bestimmt. Seine Sequenz ist zu 21 % mit CbrA identisch. Das Archaeon-Protein hat FAD über die Supersekundärstruktur der Rossmann-Faltung gebunden. Diese besteht ursprünglich aus zwei Einheiten des Motivs $\beta\alpha\beta\beta$, in dem drei parallele β -Faltblätter über zwei α -Helices verbunden sind. In der Geranylgeranyl-Reduktase von *T. acidophilum* kommt die Supersekundärstruktur in einer von Dym und Eisenberg [39] beschriebenen modifizierten Form vor, in der nur eine $\beta\alpha\beta\beta$ -Einheit vorliegt. Nach dem zweiten β -Faltblatt ist eine Insertionssequenz zu finden, so dass die Rossmann-Faltung letztlich aus dem in Abbildung 5 B [81] bezeichneten Sekundärstrukturelementen $\beta_1\alpha_A\beta_2\alpha_C\beta_3$ besteht. Ein solches Rossmann-Motiv wird auch für CbrA postuliert. Dabei sind die Aminosäuren, die an der Bindung von FAD beteiligt sind, zum Teil streng konserviert. Dies trifft auch für weitere Reste zu, die in der Geranylgeranyl-Reduktase von *T. acidophilum* an der Bindung eines bakteriellen Lipids beteiligt sind (vgl. Abbildung 5 [81]). Diese Konservierung lässt vermuten, dass CbrA eine Bindeaktivität für Lipide besitzt, was im Zusammenhang mit der im osmotischen Schock angedeuteten Strukturänderung der äußeren Membran stehen könnte, zumal Geranylgeranyl-Reduktasen in Archaea die Reduktion der Doppelbindungen von Membranlipiden katalysieren, was die chemische Stabilität der Membran erhöht und diese unter anderem auch unter extremen osmotischen Bedingungen überleben lässt [182]. Die Konservierung von Aminosäuren des Lipidbindebereiches und die Spezifität der durch CbrA vermittelten Resistenz für Colicin M, das als einziges Colicin die Mureinsynthese durch Hydrolyse der Phosphoesterbindung zwischen dem Lipidcarrier und den Mureinvorstufen inhibiert, deutet auf eine Interaktion mit dem Substrat von Colicin M hin. Hier könnte beispielsweise die Re-

duktion einer oder mehrerer Doppelbindungen des C₅₅-Isoprenoids Undecaprenylphosphat das Substrat so modifizieren, dass es von Colicin M nicht mehr erkannt bzw. gespalten wird, was in der Resistenz gegenüber dem Toxin resultiert.

Ob CbrA eine derartige Funktion besitzt, sollte unter Verwendung des künstlichen Substrates Geranylgeranyl-Pyrophosphat, einem Isoprenoid mit vier Doppelbindungen, untersucht werden. Dazu wurde das Protein mit einem C-terminalen His₆-Tag hinter den T7 Promotor des Vektors pET28b kloniert und unter Zugabe von 1 mM IPTG mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase exprimiert (Abbildung 1, Spur 1 und 2 [81]). Die anschließende Reinigung des Proteins gestaltete sich schwierig, da es nicht löslich war. Mit Hilfe verschiedener Detergenzien bzw. 0,1 Na₂CO₃ konnte CbrA teilweise solublisiert werden, allerdings führte die Entfernung dieser Substanzen direkt zur Präzipitation des Proteins. Dies war auch bei einer Reinigung unter denaturierenden Bedingungen mit anschließender Rückfaltung des Proteins zu beobachten. Unter Verwendung des Detergens Undecylmaltosid (1 %) konnte das Protein letztlich teilweise in Lösung gebracht und über seinen C-terminalen His₆-Tag mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden (Abbildung 1 [81]). Das eluierte Protein war sehr instabil und präzipitierte schon bei geringen Protein-Konzentrationen innerhalb weniger Stunden. Nach Elution des Proteins mit 0,2 M Imidazol zeigte sich ein gelbes Präzipitat, mit 1 M Imidazol ein weißer Niederschlag und ein gelber Überstand. Eine rasche Verdünnung des Proteins mit Imidazol-freiem Puffer, eine Änderung der Temperatur sowie der Salz- und Detergenkonzentration konnte eine Präzipitation des Proteins nicht verhindern. Aufgrund der Instabilität des Proteins waren weitere biochemische Untersuchungen mit gereinigtem Protein nicht erfolgreich. Auch wenn CbrA bioinformatischen Analysen zufolge keine Transmembranregion aufweist, spricht die starke Aggregation des Proteins dafür, dass es hydrophobe Bereiche an seiner Oberfläche besitzt, über die es mit der Membran in Kontakt steht. Die gelbe Farbe der Proteinproben lässt vermuten, dass es sich bei CbrA um ein Flavoprotein handelt. Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Aufnahme des UV-Vis-Spektrums konnte im gelben Überstand der mit 1 M Imidazol eluierten Fraktion FAD nachgewiesen werden (Abbildung 3 [81]). Dies bestätigt die Annahme, dass es sich bei CbrA um ein FAD-abhängiges Enzym handelt.

Da das gereinigte Protein zu instabil war, wurde Rohextrakt verwendet, um die Umsetzung des künstlichen Substrates Geranylgeranyl-Pyrophosphat mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) zu zeigen. Allerdings konnte das Substrat nach Inkubation im Reaktionspuffer auch ohne Enzymzugabe nicht mehr nachgewiesen werden, wohingegen

direkt injiziertes, reines Geranylgeranyl-Pyrophosphat detektiert werden konnte (Andreas Kulik, Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf einen Zerfall der Substanz zurückzuführen sein. Somit gelang es bislang nicht, die Enzymaktivität von CbrA zu bestimmen.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von *cbrA* über das CreBC-Zweikomponentensystem reguliert wird und die Sensitivität gegenüber Colicin M herabsetzt. Dies stellt einen neuen Resistenzmechanismus dar, der unter Nährstoff-limitierten Wachstumsbedingungen, wie sie in natürlichen Habitaten von *E. coli* vorkommen, dem Schutz der Zellen vor dem Toxin dient. CbrA konnte als FAD-abhängiges Protein identifiziert werden, das Homologie zu Geranylgeranyl-Reduktasen zeigt. Die Ergebnisse lassen einen Effekt auf die Membranintegrität bzw. eine Modifikation des Substrates von Colicin M als Ursache für die vermittelte Resistenz vermuten.

3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte der modulare Aufbau von Colicin M aus drei Domänen bestätigt und das aktive Zentrum dieser neuartigen Phosphatase definiert werden. Die Kristallisation von Colicin M mit seinem Substrat könnte neue Erkenntnisse darüber liefern, wie das Substrat genau bindet und welche Konformationsänderungen diese Bindung hervorruft. Der Versuch der Co-Kristallisation des Toxins mit dem künstlichen Analogon Isopen-tenylpyrophosphat war bislang erfolglos. Es gilt, die Bedingungen zu optimieren und andere Substrate, darunter auch das natürliche Colicin M-Substrat Lipid II, zu testen.

Die exponierte, hydrophobe Helix α_1 konnte als die Region identifiziert werden, die mit dem FhuA-Rezeptor interagiert. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Bindung über diesen Bereich hinausgeht. Dies kann in weiteren Mutationsstudien überprüft werden. Bindestudien *in vivo* und *in vitro* unter Verwendung optimierter Cma-Peptide sowie deren Co-Kristallisation mit FhuA könnten weitere Aufschlüsse über die Interaktion von Toxin und Rezeptor liefern. Bei der ortsspezifischen Mutagenese zur Identifizierung des Substrats von FkpA wurden die Mutanten P9A, P11A, P28A und P157A isoliert, die eine ca. zehnfach höhere Toxizität als der Wildtyp zeigten. Der Grund für die gesteigerte Aktivität wurde bislang nicht weiter untersucht. Mit Ausnahme von P157A liegen die Mutanten in der Translokationsdomäne, daher wäre es möglich, dass sie schneller aufgenommen werden als der Wildtyp. Wachstumsexperimente unter Zugabe dieser Derivate und Colicin M-Antikörper, die freies und FhuA-gebundenes Colicin M inaktivieren, könnten diese Frage klären.

Die Colicin M-Peptidbindung Phe175-Pro176 wurde als das Substrat von FkpA identifiziert, das bei der Rückfaltung des Toxins im Periplasma *cis* zu *trans* isomerisiert wird. Unklar ist bislang, welche Konformationsänderungen neben der Prolyl-Isomerisierung bei der Entfaltung und Rückfaltung des Toxins ablaufen und welche Auswirkungen sie auf die Struktur des Proteins haben. Daher könnte man in einem weiteren Experiment aus dem Cytoplasma isoliertes Colicin M zu einem *fkpA*-Stamm zugeben und das Toxin nach seiner Aufnahme in die Zelle aus dem Periplasma isolieren. Aufgrund der Deletion von FkpA kann das Protein nicht rückgefaltet werden und liegt in der inaktiven Form vor. Nach Zugabe von FkpA müsste das Protein wieder in die aktive Konformation falten. Durch die Kristallisation beider Formen von Colicin M könnte man einen Aufschluss über die Konformationsänderungen erhalten, die bei der Rückfaltung des Toxins durch das Chaperon stattfinden.

Allerdings hat sich die Isolierung von Colicin M aus dem Periplasma bislang als schwierig erwiesen, da nur wenige Toxin-Moleküle in die Zelle aufgenommen werden und der Hintergrund durch aktives, unspezifisch oder spezifisch an FhuA gebundenes Protein zu hoch ist. Weder in dieser Arbeit noch in einer früheren Studie [79] konnte unter insgesamt fast zehntausend Klonen eine Colicin M-Mutante identifiziert werden, die unabhängig von FkpA spontan faltet und die richtige Konformation einnimmt. Die Suche soll mittels unspezifischer Mutagenese fortgesetzt werden. Eine solche Mutante bzw. ihre Struktur könnte zusätzliche Informationen darüber liefern, welche weiteren Aminosäuren von Colicin M für die Rückfaltung durch FkpA entscheidend sind und welche Konformationsänderungen dabei ablaufen.

Mit der Expression von *cbrA* konnte ein neuer Mechanismus der Resistenz gegenüber Colicin M identifiziert werden. Die geringe Löslichkeit und unzureichende Stabilität des Proteins erschwerte bislang seine Reinigung sowie die Durchführung weiterer biochemischer Experimente. Daher müssen die Bedingungen optimiert werden, um eine ausreichende Menge an reinem und stabilem Protein zu erhalten, das u. a. auch für seine Kristallisation eingesetzt werden soll. Bisherige Versuche, die Enzymaktivität von CbrA durch Umsetzung des künstlichen Substrates Geranylgeranylpyrophosphat zu bestimmen, waren nicht erfolgreich. Vermutet wird eine Modifikation des Colicin M-Substrates durch Reduktion einer oder mehrerer Doppelbindungen des Lipidcarriers. Um dies zu überprüfen, müssen die Versuchsbedingungen optimiert bzw. andere Substrate getestet werden. Zudem könnte die massenspektrometrische Analyse von Chloroformextrakten von *cbrA*-Mutante und Überproduzent einen Aufschluss über eine derartige Reduktion des Lipidcarriers geben.

4 Literaturverzeichnis

- [1] Altschul, SF., Madden, TL., Schäffer, AA., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, DJ. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- [2] Anfinsen, CB. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230.
- [3] Arié, JP., Sassoon, N. and Betton, JM. (2001). Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 39, 199-210.
- [4] Arnold, T., Zeth, K. and Linke, D. (2009). Structure and function of colicin S4, a colicin with a duplicated receptor-binding domain. *J. Biol. Chem.* 284, 6403-6413.
- [5] Avison, MB., Horton, RE., Walsh, TR. and Bennett, PM. (2001). *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media. *J. Biol. Chem.* 276, 26955-26961.
- [6] Baboolal, TG., Conroy, MJ., Gill, K., Ridley, H., Visudtiphole, V., Bullough, PA. and Lakey, JH. (2008). Colicin N binds to the periphery of its receptor and translocator, outer membrane protein F. *Structure* 16, 371-379.
- [7] Barnéoud-Arnoulet, A., Barreteau, H., Touzé, T., Mengin-Lecreulx, D., Lloubès, R. and Duché, D. (2010). Toxicity of the colicin M catalytic domain exported to the periplasm is FkpA independent. *J. Bacteriol.* 192, 5212-5219.
- [8] Barreteau, H., Bouhss, A., Fourgeaud, M., Mainardi, J., Touzé, T., Gérard, F., Blanot, D., Arthur, M. and Mengin-Lecreulx, D. (2009). Human- and plant-pathogenic *Pseudomonas* species produce bacteriocins exhibiting colicin M-like hydrolase activity towards peptidoglycan precursors. *J. Bacteriol.* 191, 3657-3664.
- [9] Barreteau, H., Bouhss, A., Gérard, F., Duché, D., Boussaid, B., Blanot, D., Lloubès, R., Mengin-Lecreulx, D. and Touzé, T. (2010). Deciphering the catalytic domain of colicin M, a peptidoglycan lipid II-degrading enzyme. *J. Biol. Chem.* 285, 12378-12389.
- [10] Betton, JM. (2007). Periplasmic chaperones and peptidyl-prolyl isomerases. In: *The Periplasm*. Ehrmann, M. (ed.). Washington, DC: ASM Press, pp. 141-149.

- [11] Bothmann, H. and Plückthun, A. (2000). The periplasmic *Escherichia coli* peptidylprolyl *cis,trans*-isomerase FkpA. I. Increased functional expression of antibody fragments with and without *cis*-prolines. *J. Biol. Chem.* *275*, 17100-17105.
- [12] Brandts, JF., Halvorson, HR. and 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.
- [13] Braun, V. (1995). Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* *16*, 295-307.
- [14] Braun, V. (2006). Energy transfer between biological membranes. *ACS Chem Biol* *1*, 352-354.
- [15] Braun, V. (2009). FhuA (TonA), the career of a protein. *J. Bacteriol.* *191*, 3431-3436.
- [16] Braun, V. and Wolff, H. (1973). Characterization of the receptor protein for phage T5 and colicin M in the outer membrane of *E. coli* B. *FEBS Lett.* *34*, 77-80.
- [17] Braun, V., Frenz, J., Hantke, K. and Schaller, K. (1980). Penetration of colicin M into cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *142*, 162-168.
- [18] Braun, V., Patzer, SI. and Hantke, K. (2002). Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie* *84*, 365-380.
- [19] Braun, V., Pilsl, H. and Gross, P. (1994). Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Arch. Microbiol.* *161*, 199-206.
- [20] Braun, V., Schaller, K. and Wabl, MR. (1974). Isolation, characterization, and action of colicin M. *Antimicrob. Agents Chemother.* *5*, 520-533.
- [21] Braun, V., Schaller, K. and Wolff, H. (1973). A common receptor protein for phage T5 and colicin M in the outer membrane of *Escherichia coli* B. *Biochim. Biophys. Acta* *323*, 87-97.
- [22] Buchanan, SK., Lukacik, P., Grizot, S., Ghirlando, R., Ali, MMU., Barnard, TJ., Jakes, KS., Kienker, PK. and Esser, L. (2007). Structure of colicin I receptor bound to the R-domain of colicin Ia: implications for protein import. *EMBO J.* *26*, 2594-2604.
- [23] Cariss, SJL., Constantinidou, C., Patel, MD., Takebayashi, Y., Hobman, JL., Penn, CW. and Avison, MB. (2010). YieJ (CbrC) mediates CreBC-dependent colicin E2 tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *192*, 3329-3336.
- [24] Cariss, SJL., Tayler, AE. and Avison, MB. (2008). Defining the growth conditions and promoter-proximal DNA sequences required for activation of gene expression by CreBC in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *190*, 3930-3939.

- [25] Cascales, E., Buchanan, SK., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S. and Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *71*, 158-229.
- [26] Chang, AC. and Cohen, SN. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* *134*, 1141-1156.
- [27] Chavan, M., Rafi, H., Wertz, J., Goldstone, C. and Riley, MA. (2005). Phage associated bacteriocins reveal a novel mechanism for bacteriocin diversification in *Klebsiella*. *J. Mol. Evol.* *60*, 546-556.
- [28] Chazin, WJ., Kördel, J., Drakenberg, T., Thulin, E., Brodin, P., Grundström, T. and Forsén, S. (1989). Proline isomerism leads to multiple folded conformations of calbindin D9k: direct evidence from two-dimensional ¹H NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *86*, 2195-2198.
- [29] Cheng, HN. and Bovey, FA. (1977). *Cis-trans* equilibrium and kinetic studies of acetyl-*L*-proline and glycyl-*L*-proline. *Biopolymers* *16*, 1465-1472.
- [30] Chiti, F. and Dobson, CM. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 333-366.
- [31] Christenson, JK. and Gordon, DM. (2009). Evolution of colicin BM plasmids: the loss of the colicin B activity gene. *Microbiology* *155*, 1645-1655.
- [32] Czárán, TL., Hoekstra, RF. and Pagie, L. (2002). Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 786-790.
- [33] Danese, PN. and Silhavy, TJ. (1997). The sigma(E) and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* *11*, 1183-1193.
- [34] De Las Peñas, A., Connolly, L. and Gross, CA. (1997). SigmaE is an essential sigma factor in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *179*, 6862-6864.
- [35] DeLisa, MP., Wu, CF., Wang, L., Valdes, JJ. and Bentley, WE. (2001). DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *183*, 5239-5247.
- [36] Dreher, R., Braun, V. and Wittmann-Liebold, B. (1985). Functional domains of colicin M. *Arch. Microbiol.* *140*, 343-346.
- [37] Duché, D. (2007). Colicin E2 is still in contact with its receptor and import machinery when its nuclease domain enters the cytoplasm. *J. Bacteriol.* *189*, 4217-4222.

- [38] Duguay, AR. and Silhavy, TJ. (2004). Quality control in the bacterial periplasm. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 121-134.
- [39] Dym, O. and Eisenberg, D. (2001). Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* 10, 1712-1728.
- [40] Eckert, B. and Schmid, FX. (2006). Proline als molekularer Schalter. *Biospektrum* 2, 151-153.
- [41] El Ghachi, M., Bouhss, A., Barreteau, H., Touzé, T., Auger, G., Blanot, D. and Mengin-Lecreulx, D. (2006). Colicin M exerts its bacteriolytic effect via enzymatic degradation of undecaprenyl phosphate-linked peptidoglycan precursors. *J. Biol. Chem.* 281, 22761-22772.
- [42] Endriß, F. and Braun, V. (2004). Loop deletions indicate regions important for FhuA transport and receptor functions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 4818-4823.
- [43] Evans, PA., Dobson, CM., Kautz, RA., Hatfull, G. and Fox, RO. (1987). Proline isomerism in staphylococcal nuclease characterized by NMR and site-directed mutagenesis. *Nature* 329, 266-268.
- [44] Fanghänel, J. and Fischer, G. (2004). Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases. *Front. Biosci.* 9, 3453-3478.
- [45] Faraldo-Gómez, JD., Smith, GR. and Sansom, MSP. (2003). Molecular dynamics simulations of the bacterial outer membrane protein FhuA: a comparative study of the ferrichrome-free and bound states. *Biophys. J.* 85, 1406-1420.
- [46] Ferbitz, L., Maier, T., Patzelt, H., Bukau, B., Deuerling, E. and Ban, N. (2004). Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature* 431, 590-596.
- [47] Ferguson, AD., Hofmann, E., Coulton, JW., Diederichs, K. and Welte, W. (1998). Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* 282, 2215-2220.
- [48] Fink, AL. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.* 79, 425-449.
- [49] Fischer, G. and Aumüller, T. (2003). Regulation of peptide bond *cis/trans* isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 148, 105-150.
- [50] Fischer, G. and Bang, H. (1985). The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* 828, 39-42.

- [51] Fischer, G., Bang, H. and Mech, C. (1984). Determination of enzymatic catalysis for the *cis-trans*-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed. Biochim. Acta* *43*, 1101-1111.
- [52] Fischer, G., Bang, H., Berger, E. and Schellenberger, A. (1984). Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates. *Biochim. Biophys. Acta* *791*, 87-97.
- [53] Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. and Schmid, FX. (1989). Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature* *337*, 476-478.
- [54] Fredericq, P. (1951). Spontaneous formation of the colicine M producing mutants of *Esch. coli* V. *Antonie Van Leeuwenhoek* *17*, 227-231.
- [55] Fredericq, P. (1951). Origin of mutants of *E. coli* V producing colicine M. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* *145*, 930-933.
- [56] Garcia-Herrero, A., Peacock, RS., Howard, SP. and Vogel, HJ. (2007). The solution structure of the periplasmic domain of the TonB system ExbD protein reveals an unexpected structural homology with siderophore-binding proteins. *Mol. Microbiol.* *66*, 872-889.
- [57] Garel, JR. and Baldwin, RL. (1973). Both the fast and slow refolding reactions of ribonuclease A yield native enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *70*, 3347-3351.
- [58] Gérard, F., Brooks, MA., Barreteau, H., Touzé, T., Graille, M., Bouhss, A., Blanot, D., van Tilbeurgh, H. and Mengin-Lecreulx, D. (2011). X-ray structure and site-directed mutagenesis analysis of the *Escherichia coli* colicin M immunity protein. *J. Bacteriol.* *193*, 205-214.
- [59] Gerding, MA., Ogata, Y., Pecora, ND., Niki, H. and de Boer, PAJ. (2007). The trans-envelope Tol-Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* *63*, 1008-1025.
- [60] Gobetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Minervini, F. and Limitone, A. (2007). Cell-cell communication in food related bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* *120*, 34-45.
- [61] Gordon, DM. and Riley, MA. (1999). A theoretical and empirical investigation of the invasion dynamics of colicinogeny. *Microbiology* *145 (Pt 3)*, 655-661.
- [62] Grathwohl, C. and Wüthrich, K. (1976). The X-Pro peptide bond as an nmr probe for conformational studies of flexible linear peptides. *Biopolymers* *15*, 2025-2041.

- [63] Grathwohl, C. and Wüthrich, K. (1976). Nmr studies of the molecular conformations in the linear oligopeptides H-(L-Ala)_n-L-Pro-OH. *Biopolymers* 15, 2043-2057.
- [64] Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol (Paris)* 93, 1040-1041.
- [65] Gross, P. and Braun, V. (1996). Colicin M is inactivated during import by its immunity protein. *Mol. Gen. Genet.* 251, 388-396.
- [66] Hamelberg, D. and McCammon, JA. (2009). Mechanistic insight into the role of transition-state stabilization in cyclophilin A. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 147-152.
- [67] Handschumacher, RE., Harding, MW., Rice, J., Drugge, RJ. and Speicher, DW. (1984). Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226, 544-547.
- [68] Harding, MW., Galat, A., Uehling, DE. and Schreiber, SL. (1989). A receptor for the immunosuppressant FK506 is a *cis-trans* peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341, 758-760.
- [69] Hardy, KG., Meynell, GG., Dowman, JE. and Spratt, BG. (1973). Two major groups of colicin factors: their evolutionary significance. *Mol. Gen. Genet.* 125, 217-230.
- [70] Harkness, RE. and Braun, V. (1989). Inhibition of lipopolysaccharide O-antigen synthesis by colicin M. *J. Biol. Chem.* 264, 14716-14722.
- [71] Harkness, RE. and Braun, V. (1989). Colicin M inhibits peptidoglycan biosynthesis by interfering with lipid carrier recycling. *J. Biol. Chem.* 264, 6177-6182.
- [72] Harkness, RE. and Braun, V. (1990). Colicin M is only bactericidal when provided from outside the cell. *Mol. Gen. Genet.* 222, 37-40.
- [73] Harkness, RE. and Ölschläger, T. (1991). The biology of colicin M. *FEMS Microbiol. Rev.* 8, 27-41.
- [74] Harms, N. and de Cock, H. (2003). Chaperones and folding catalysts involved in the general protein secretion pathway of *Escherichia coli*. In: Protein secretion pathways in Bacteria. Oudega, B. (ed.). Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp. 99-119.
- [75] Harrar, Y., Bellini, C. and Faure, JD. (2001). FKBP: at the crossroads of folding and transduction. *Trends Plant Sci.* 6, 426-431.
- [76] Harrison, RK. and Stein, RL. (1990). Substrate specificities of the peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry* 29, 3813-3816.
- [77] Hartl, FU., Bracher, A. and Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324-332.

- [78] Haug, G., Leemhuis, J., Tiemann, D., Meyer, DK., Aktories, K. and Barth, H. (2003). The host cell chaperone Hsp90 is essential for translocation of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin into the cytosol. *J. Biol. Chem.* 278, 32266-32274.
- [79] Helbig, S. (2008). Chaperon-abhängiger Proteinimport: Aktivierung von Colicin M durch FkpA. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Eberhardt-Karls-Universität Tübingen.
- [80] Helbig, S. and Braun, V. (2011). Mapping functional domains of colicin M. *J. Bacteriol.* 193, 815-821.
- [81] Helbig, S., Hantke, K., Ammelburg, M. and Braun, V. (Manuskript). CbrA is a FAD protein that modifies the *E. coli* outer membrane and confers resistance to colicin M. *Manuskript noch nicht zur Veröffentlichung eingereicht.*
- [82] Helbig, S., Patzer, SI., Schiene-Fischer, C., Zeth, K. and Braun, V. (2011). Activation of colicin M by the FkpA prolyl *cis-trans* isomerase/chaperone. *J. Biol. Chem.* 286, 6280-6290.
- [83] Hennig, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Rücknagel, KP., Grabley, S., Küllertz, G. and Fischer, G. (1998). Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases by juglone. *Biochemistry* 37, 5953-5960.
- [84] Hibbing, ME., Fuqua, C., Parsek, MR. and Peterson, SB. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 15-25.
- [85] Higgins, KA., Craik, DJ., Hall, JG. and Andrews, PR. (1988). *Cis-trans* isomerization of the proline residue in insulin studied by ¹³C NMR spectroscopy. *Drug Des. Deliv.* 3, 159-170.
- [86] Hilsenbeck, JL., Park, H., Chen, G., Youn, B., Postle, K. and Kang, C. (2004). Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 Å resolution. *Mol. Microbiol.* 51, 711-720.
- [87] Hoffmann, A., Bukau, B. and Kramer, G. (2010). Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 650-661.
- [88] Horne, SM. and Young, KD. (1995). *Escherichia coli* and other species of the *Enterobacteriaceae* encode a protein similar to the family of Mip-like FK506-binding proteins. *Arch. Microbiol.* 163, 357-365.

- [89] Hu, K., Plückthun, A. and Pervushin, K. (2004). Backbone H^N, N, C^α, C' and C^β chemical shift assignments and secondary structure of FkpA, a 245-residue peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase with chaperone activity. *J. Biomol. NMR* *28*, 405-406.
- [90] Hullmann, J., Patzer, SI., Römer, C., Hantke, K. and Braun, V. (2008). Periplasmic chaperone FkpA is essential for imported colicin M toxicity. *Mol. Microbiol.* *69*, 926-937.
- [91] Hung, DL., Raivio, TL., Jones, CH., Silhavy, TJ. and Hultgren, SJ. (2001). Cpx signaling pathway monitors biogenesis and affects assembly and expression of P pili. *EMBO J.* *20*, 1508-1518.
- [92] Jahn, TR. and Radford, SE. (2008). Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* *469*, 100-117.
- [93] Jakes, KS. and Finkelstein, A. (2010). The colicin Ia receptor, Cir, is also the translocator for colicin Ia. *Mol. Microbiol.* *75*, 567-578.
- [94] Jakes, KS., Davis, NG. and Zinder, ND. (1988). A hybrid toxin from bacteriophage ϕ 1 attachment protein and colicin E3 has altered cell receptor specificity. *J. Bacteriol.* *170*, 4231-4238.
- [95] Jakob, RP., Zoldák, G., Aumüller, T. and Schmid, FX. (2009). Chaperone domains convert prolyl isomerases into generic catalysts of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 20282-20287.
- [96] Jones, CH., Danese, PN., Pinkner, JS., Silhavy, TJ. and Hultgren, SJ. (1997). The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *EMBO J.* *16*, 6394-6406.
- [97] Kageyama, M., Kobayashi, M., Sano, Y. and Masaki, H. (1996). Construction and characterization of pyocin-colicin chimeric proteins. *J. Bacteriol.* *178*, 103-110.
- [98] Kaiser, E., Pust, S., Kroll, C. and Barth, H. (2009). Cyclophilin A facilitates translocation of the *Clostridium botulinum* C2 toxin across membranes of acidified endosomes into the cytosol of mammalian cells. *Cell. Microbiol.* *11*, 780-795.
- [99] Kerr, B., Riley, MA., Feldman, MW. and Bohannan, BJM. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature* *418*, 171-174.
- [100] Kim, PS. and Baldwin, RL. (1982). Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* *51*, 459-489.
- [101] Kim, PS. and Baldwin, RL. (1990). Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *59*, 631-660.

- [102] Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H. and Imanaka, H. (1987). FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot.* *40*, 1249-1255.
- [103] Kirkup, BC. and Riley, MA. (2004). Antibiotic-mediated antagonism leads to a bacterial game of rock-paper-scissors *in vivo*. *Nature* *428*, 412-414.
- [104] Kleanthous, C. (2010). Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 843-848.
- [105] Kleanthous, C., Kühlmann, UC., Pommer, AJ., Ferguson, N., Radford, SE., Moore, GR., James, R. and Hemmings, AM. (1999). Structural and mechanistic basis of immunity toward endonuclease colicins. *Nat. Struct. Biol.* *6*, 243-252.
- [106] Kleinschmidt, JH. (2007). Assembly of integral membrane proteins from the periplasm into the outer membrane. In: *The Periplasm*. Ehrmann, M. (ed.). Washington, DC: ASM Press, pp. 30-66.
- [107] Köck, J., Ölschläger, T., Kamp, RM. and Braun, V. (1987). Primary structure of colicin M, an inhibitor of murein biosynthesis. *J. Bacteriol.* *169*, 3358-3361.
- [108] Kubelka, J., Hofrichter, J. and Eaton, WA. (2004). The protein folding 'speed limit'. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *14*, 76-88.
- [109] Lang, K., Schmid, FX. and Fischer, G. (1987). Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* *329*, 268-270.
- [110] Lazzaroni, J., Dubuisson, J. and Vianney, A. (2002). The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the translocation of group A colicins. *Biochimie* *84*, 391-397.
- [111] Lehnart, SE., Huang, F., Marx, SO. and Marks, AR. (2003). Immunophilins and coupled gating of ryanodine receptors. *Curr Top Med Chem* *3*, 1383-1391.
- [112] Lenski, RE. and Riley, MA. (2002). Chemical warfare from an ecological perspective. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 556-558.
- [113] Locher, KP., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch, JP. and Moras, D. (1998). Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* *95*, 771-778.
- [114] Lu, KP. (2003). Prolyl isomerase Pin1 as a molecular target for cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer Cell* *4*, 175-180.

- [115] Lu, KP., Finn, G., Lee, TH. and Nicholson, LK. (2007). Prolyl *cis-trans* isomerization as a molecular timer. *Nat. Chem. Biol.* 3, 619-629.
- [116] Lyskov, S. and Gray, JJ. (2008). The RosettaDock server for local protein-protein docking. *Nucleic Acids Res.* 36, W233-8.
- [117] MacArthur, MW. and Thornton, JM. (1991). Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.* 218, 397-412.
- [118] Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B. and Riley, MA. (2011). Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *ISME J* 5, 71-81.
- [119] Martin, A. and Schmid, FX. (2003). A proline switch controls folding and domain interactions in the gene-3-protein of the filamentous phage fd. *J. Mol. Biol.* 331, 1131-1140.
- [120] Mecsas, J., Rouviere, PE., Erickson, JW., Donohue, TJ. and Gross, CA. (1993). The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* 7, 2618-2628.
- [121] Mileykovskaya, E. and Dowhan, W. (1997). The Cpx two-component signal transduction pathway is activated in *Escherichia coli* mutant strains lacking phosphatidylethanolamine. *J. Bacteriol.* 179, 1029-1034.
- [122] Miot, M. and Betton, J. (2004). Protein quality control in the bacterial periplasm. *Microb. Cell Fact.* 3, 4.
- [123] Missiakas, D., Betton, JM. and Raina, S. (1996). New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol. Microbiol.* 21, 871-884.
- [124] Mogensen, JE. and Otzen, DE. (2005). Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol. Microbiol.* 57, 326-346.
- [125] Nagel de Zwaig, R. and Luria, SE. (1967). Genetics and physiology of colicin-tolerant mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 94, 1112-1123.
- [126] Nakayama, S. and Watanabe, H. (1995). Involvement of *cpxA*, a sensor of a two-component regulatory system, in the pH-dependent regulation of expression of *Shigella sonnei virF* gene. *J. Bacteriol.* 177, 5062-5069.
- [127] Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 593-656.
- [128] Nomura, M. (1967). Colicins and related bacteriocins. *Annu. Rev. Microbiol.* 21, 257-284.

- [129] Nomura, M. and Witten, C. (1967). Interaction of colicins with bacterial cells. 3. Colicin-tolerant mutations in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. *94*, 1093-1111.
- [130] Nossal, NG. and Heppel, LA. (1966). The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. J. Biol. Chem. *241*, 3055-3062.
- [131] Ölschläger, T. and Braun, V. (1987). Sequence, expression, and localization of the immunity protein for colicin M. J. Bacteriol. *169*, 4765-4769.
- [132] Ölschläger, T., Schramm, E. and Braun, V. (1984). Cloning and expression of the activity and immunity genes of colicins B and M on ColBM plasmids. Mol. Gen. Genet. *196*, 482-487.
- [133] Ölschläger, T., Turba, A. and Braun, V. (1991). Binding of the immunity protein inactivates colicin M. Mol. Microbiol. *5*, 1105-1111.
- [134] Pauling, L. and Corey, RB. (1953). Stable configurations of polypeptide chains. Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. *141*, 21-33.
- [135] Pawelek, PD., Croteau, N., Ng-Thow-Hing, C., Khursigara, CM., Moiseeva, N., Allaire, M. and Coulton, JW. (2006). Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. Science *312*, 1399-1402.
- [136] Pilsl, H. and Braun, V. (1995). Strong function-related homology between the pore-forming colicins K and 5. J. Bacteriol. *177*, 6973-6977.
- [137] Pilsl, H., Glaser, C., Gross, P., Killmann, H., Ölschläger, T. and Braun, V. (1993). Domains of colicin M involved in uptake and activity. Mol. Gen. Genet. *240*, 103-112.
- [138] Rahfeld, JU., Schierhorn, A., Mann, K. and Fischer, G. (1994). A novel peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase from *Escherichia coli*. FEBS Lett. *343*, 65-69.
- [139] Ramm, K. and 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.
- [140] Ramm, K. and 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*, 485-498.
- [141] Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M. and Fischer, G. (1998). Side-chain effects on peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerisation. J. Mol. Biol. *279*, 449-460.
- [142] Riley, MA. (1993). Molecular mechanisms of colicin evolution. Mol. Biol. Evol. *10*, 1380-1395.

- [143] Riley, MA. (1993). Positive selection for colicin diversity in bacteria. *Mol. Biol. Evol.* *10*, 1048-1059.
- [144] Riley, MA. and Wertz, JE. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* *56*, 117-137.
- [145] Riley, MA. and Wertz, JE. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* *84*, 357-364.
- [146] Roos, U., Harkness, RE. and Braun, V. (1989). Assembly of colicin genes from a few DNA fragments. Nucleotide sequence of colicin D. *Mol. Microbiol.* *3*, 891-902.
- [147] Rossmann, MG., Moras, D. and Olsen, KW. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* *250*, 194-199.
- [148] Ruiz-Perez, F., Henderson, IR. and Nataro, JP. (2010). Interaction of FkpA, a peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase with EspP autotransporter protein. *Gut Microbes* *1*, 339-344.
- [149] Saul, FA., Arié, J., Vulliez-le Normand, B., Kahn, R., Betton, J. and Bentley, GA. (2004). Structural and functional studies of FkpA from *Escherichia coli*, a *cis/trans* peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity. *J. Mol. Biol.* *335*, 595-608.
- [150] Schaller, K., Dreher, R. and Braun, V. (1981). Structural and functional properties of colicin M. *J. Bacteriol.* *146*, 54-63.
- [151] Schaller, K., Höltje, JV. and Braun, V. (1982). Colicin M is an inhibitor of murein biosynthesis. *J. Bacteriol.* *152*, 994-1000.
- [152] Schaller, K., Krauel, A. and Braun, V. (1981). Temperature-sensitive, colicin M-tolerant mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *147*, 135-139.
- [153] Scherer, G., Kramer, ML., Schutkowski, M., Reimer, U. and Fischer, G. (1998). Barriers to rotation of secondary amide peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* *120*, 5568-5574.
- [154] Schiene-Fischer, C., Aumüller, T. and Fischer, G. (2011). Peptide Bond *cis/trans* Isomerases: A Biocatalysis Perspective of Conformational Dynamics in Proteins. *Top Curr Chem*, pp. 1-33.
- [155] Schiene-Fischer, C., Habazettl, J., Schmid, FX. and Fischer, G. (2002). The hsp70 chaperone DnaK is a secondary amide peptide bond *cis-trans* isomerase. *Nat. Struct. Biol.* *9*, 419-424.
- [156] Schleifer, KH. and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* *36*, 407-477.

- [157] Schmid, FX. (2001). Prolyl isomerases. *Adv. Protein Chem.* 59, 243-282.
- [158] Schmid, FX., Mayr, LM., Mücke, M. and Schönbrunner, ER. (1993). Prolyl isomerases: role in protein folding. *Adv. Protein Chem.* 44, 25-66.
- [159] Schöffler, H. and Braun, V. (1989). Transport across the outer membrane of *Escherichia coli* K12 via the FhuA receptor is regulated by the TonB protein of the cytoplasmic membrane. *Mol. Gen. Genet.* 217, 378-383.
- [160] Scholz, C., Schaarschmidt, P., Engel, AM., Andres, H., Schmitt, U., Faatz, E., Balbach, J. and Schmid, FX. (2005). Functional solubilization of aggregation-prone HIV envelope proteins by covalent fusion with chaperone modules. *J. Mol. Biol.* 345, 1229-1241.
- [161] Sharma, O., Yamashita, E., Zhalnina, MV., Zakharov, SD., Datsenko, KA., Wanner, BL. and Cramer, WA. (2007). Structure of the complex of the colicin E2 R-domain and its BtuB receptor. The outer membrane colicin translocon. *J. Biol. Chem.* 282, 23163-23170.
- [162] Shaw, PE. (2002). Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription. *EMBO Rep.* 3, 521-526.
- [163] Shultis, DD., Purdy, MD., Banchs, CN. and Wiener, MC. (2006). Outer membrane active transport: structure of the BtuB:TonB complex. *Science* 312, 1396-1399.
- [164] Siekierka, JJ., Hung, SH., Poe, M., Lin, CS. and Sigal, NH. (1989). A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 341, 755-757.
- [165] Snyder, WB., Davis, LJ., Danese, PN., Cosma, CL. and Silhavy, TJ. (1995). Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway. *J. Bacteriol.* 177, 4216-4223.
- [166] Söding, J., Biegert, A. and Lupas, AN. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* 33, W244-8.
- [167] Soelaiman, S., Jakes, K., Wu, N., Li, C. and Shoham, M. (2001). Crystal structure of colicin E3: implications for cell entry and ribosome inactivation. *Mol. Cell* 8, 1053-1062.
- [168] Stewart, DE., Sarkar, A. and Wampler, JE. (1990). Occurrence and role of *cis* peptide bonds in protein structures. *J. Mol. Biol.* 214, 253-260.

- [169] Stoller, G., Rücknagel, KP., Nierhaus, KH., Schmid, FX., Fischer, G. and Rahfeld, JU. (1995). A ribosome-associated peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase identified as the trigger factor. *EMBO J.* *14*, 4939-4948.
- [170] Tagg, JR., Dajani, AS. and Wannamaker, LW. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* *40*, 722-756.
- [171] Tajima, T., Yokota, N., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (1998). Genetic analyses of the *in vivo* function of LolA, a periplasmic chaperone involved in the outer membrane localization of *Escherichia coli* lipoproteins. *FEBS Lett.* *439*, 51-54.
- [172] Takahashi, N., Hayano, T. and Suzuki, M. (1989). Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* *337*, 473-475.
- [173] Thanassi, DG. and Hultgren, SJ. (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 420-430.
- [174] Thumm, G., Ölschläger, T. and Braun, V. (1988). Plasmid pColBM-C1139 does not encode a colicin lysis protein but contains sequences highly homologous to the D protein (resolvase) and the oriV region of the miniF plasmid. *Plasmid* *20*, 75-82.
- [175] Tilby, M., Hindennach, I. and Henning, U. (1978). Bypass of receptor-mediated resistance to colicin E3 in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* *136*, 1189-1191.
- [176] Torreblanca, M., Meseguer, I. and Ventosa, A. (1994). Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. *Letters in Applied Microbiology* *19*, 201-205.
- [177] Walter, S. and Buchner, J. (2002). Molecular chaperones – cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *41*, 1098-1113.
- [178] Wang, RF. and Kushner, SR. (1991). Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* *100*, 195-199.
- [179] Weidel, W. and Pelzer, H. (1964). Bagshaped macromolecules – a new outlook on bacterial cell walls. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* *26*, 193-232.
- [180] Wiener, M., Freymann, D., Ghosh, P. and Stroud, RM. (1997). Crystal structure of colicin Ia. *Nature* *385*, 461-464.
- [181] Wülfing, C. and Plückthun, A. (1994). Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *12*, 685-692.

- [182] Xu, Q., Eguchi, T., Mathews, II., Rife, CL., Chiu, H., Farr, CL., Feuerhelm, J., Jaroszewski, L., Klock, HE., Knuth, MW. et al. (2010). Insights into substrate specificity of geranylgeranyl reductases revealed by the structure of digeranylgeranyl glycerophospholipid reductase, an essential enzyme in the biosynthesis of archaeal membrane lipids. *J. Mol. Biol.* 404, 403-417.
- [183] Zeth, K., Römer, C., Patzer, SI. and Braun, V. (2008). Crystal structure of colicin M, a novel phosphatase specifically imported by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 283, 25324-25331.
- [184] Zhang, Z., Song, L., Fang, M., Wang, F., He, D., Zhao, R., Liu, J., Zhou, Z., Yin, C., Lin, Q. et al. (2003). Production of soluble and functional engineered antibodies in *Escherichia coli* improved by FkpA. *BioTechniques* 35, 1032-8, 1041-2.
- [185] Zhou, L., Lei, X., Bochner, BR. and Wanner, BL. (2003). Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J. Bacteriol.* 185, 4956-4972.
- [186] Zimmerman, SB. and Trach, SO. (1991). Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 222, 599-620.

5 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
bp	Basenpaar
Å	Ångström
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CD	<i>circular dichroism</i>
Cma	Colicin M
Cmi	Colicin M-Immunitätsprotein
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
FKBP	FK506-Bindeprotein
g	Gramm
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropanyl- β -D-Thiogalactopyranosid
IS	Insertionssequenz
J	Joule
k	kilo-
k_{cat}	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
K_{M}	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
m	Meter
m-	milli-
M	Molar
μ -	mikro-
Mip	<i>macrophage infectivity potentiator</i>
n	nano-
NAD(P)	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat

N-Terminus	Amino-Terminus
OD ₅₇₈	optische Dichte, gemessen bei 578 nm
<i>p</i>	<i>para</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
pI	isoelektrischer Punkt
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
PSI-BLAST	<i>Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool</i>
RNase	Ribonuklease
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
UV	ultraviolett
Vis	<i>visible</i>

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

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

6 Manuskripte/Publicationen

Stephanie Helbig und Volkmar Braun
2011

Mapping functional domains of colicin M
Journal of Bacteriology 193(4):815-21.

inkl. Supplemental Material

Seite 73 - 85

**Stephanie Helbig, Silke I. Patzer, Kornelius Zeth, Cordelia Schiene-Fischer
und Volkmar Braun**
2011

Activation of colicin M by the FkpA prolyl *cis/trans* isomerase/chaperone
Journal of Biological Chemistry 286(8):6280-90

inkl. Supplemental Material

Seite 86 - 98

Stephanie Helbig, Klaus Hantke, Moritz Ammelburg und Volkmar Braun
Manuskript

CbrA is a FAD protein that modifies the *E. coli* outer membrane
and confers resistance to colicin M

Manuskript noch nicht zur Veröffentlichung eingereicht

Seite 99 - 133

Mapping Functional Domains of Colicin M^{∇†‡}

Stephanie Helbig and Volkmar Braun*

Max Planck Institute for Developmental Biology, Spemannstrasse 35, 72076, Tübingen, Germany

Received 8 October 2010/Accepted 1 December 2010

Colicin M (Cma) lyses *Escherichia coli* cells by inhibiting murein biosynthesis through hydrolysis of the phosphate ester between C₅₅-polyisoprenol and N-acetylmuramyl (MurNAc)-pentapeptide-GlcNAc in the periplasm. To identify Cma functional domains, we isolated 54 point mutants and small deletion mutants and examined their cytotoxicity levels. Activity and uptake mutants were distinguished by osmotic shock, which transfers Cma into the periplasm independent of the specific FhuA receptor and the Ton system. Deletion of the hydrophobic helix α 1, which extends from the compact Cma structure, abolished interference with the antibiotic albomycin, which is transported across the outer membrane by the same system as Cma, thereby identifying α 1 as the Cma site that binds to FhuA. Deletion of the C-terminal Lys-Arg strongly reduced Cma translocation across the outer membrane after binding to FhuA. Conversion of Asp226 to Glu, Asn, or Ala inactivated Cma. Asp226 is exposed at the Cma surface and is surrounded by Asp225, Asp229, His235, Tyr228, and Arg236; replacement of each with alanine inactivated Cma. We propose that Asp226 directly participates in phosphate ester hydrolysis and that the surrounding residues contribute to the active site. These residues are strongly conserved in Cma-like proteins of other species. Replacement of other conserved residues with alanine inactivated Cma; these mutations probably altered the Cma structure, as particularly apparent for mutants in the unique open β -barrel of Cma, which were isolated in lower yields. Our results identify regions in Cma responsible for uptake and activity and support the concept of a three-domain arrangement of Cma.

Colicins are plasmid-encoded protein toxins released by *Escherichia coli* and taken up by sensitive *E. coli* cells (8, 35). Colicins are important traits of *E. coli* since they are produced by 40 to 50% of the natural isolates. Colicins are also the only proteins imported by *E. coli*. These enzymes or pore-forming proteins are equipped with receptor binding and translocation domains for their import into sensitive cells. They kill cells by degrading DNA or RNA in the cytoplasm, dissipating the membrane potential by forming pores in the cytoplasmic membrane, degrading murein, or inhibiting murein biosynthesis in the periplasm. Cma cleaves the phosphate bond between C₅₅-polyisoprenol and N-acetylmuramyl (MurNAc)-pentapeptide-GlcNAc (10) in the periplasm near the outside of the cytoplasmic membrane. The released C₅₅-polyisoprenol no longer translocates MurNAc-pentapeptide-GlcNAc across the cytoplasmic membrane. Normally, C₅₅-polyisoprenol leaves the biosynthetic reaction as a pyrophosphate ester in the periplasm and enters the reaction cycle as a monophosphate ester at the inner side of the cytoplasmic membrane. The same lipid reaction cycle incorporates O antigen into lipopolysaccharide, which is also inhibited by colicin M (14).

Cma differs from the other colicins in various aspects. With 271 amino acid residues, it is the smallest of the colicins, most of which are composed of 500 to 700 residues (8). It is the only colicin that inhibits murein and O-antigen biosynthesis (13, 14,

25). It forms a compact structure (36), which makes it difficult to delineate the functional domains; most other colicins have extended conformations with well-separated domains. The fold of Cma is unique among colicins and even among all known proteins (36).

The boundaries of the Cma functional domains have been derived from the crystal structure (Fig. 1) (36) and the sequence identity (26 to 45%) of the C-terminal half (residues 124 to 271) to uncharacterized Cma-like proteins of *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, various strains of *Burkholderia*, and a *Pseudomonas* phage (see Fig. S1 in the supplemental material). However, the predicted activity domain is not similar in sequence and conformation to known phosphatases (36). The N-terminal and central domains of these proteins have only a few identical residues (2, 3, 36), which reflects the import specificities of the various bacterial genera. Cma homologues of various *Pseudomonas* species, like Cma, release C₅₅-polyisoprenol from lipid II (3).

Although 90% of the colicin M synthesized remains inside cells and is not released into the culture medium (32), it does not kill the producer cells. Colicin M kills cells only after it has been taken up across the outer membrane into the periplasm (15). Uptake of Cma specifically involves binding to the FhuA outer membrane receptor protein and the electrochemical potential of the cytoplasmic membrane for translocation into the periplasm. TonB, ExbB, and ExbD serve to transfer energy from the cytoplasmic membrane into the outer membrane (4, 6, 23).

The finding that killing of cells by Cma strictly requires the periplasmic prolyl *cis-trans* isomerase/chaperone FlpA (17), the determination of the Cma crystal structure (36), the identification of the phosphatase activity (10), and the prediction of Cma-like proteins in species other than *E. coli* (2, 3, 36)

* Corresponding author. Mailing address: Max Planck Institute for Developmental Biology, Spemannstrasse 35, D-72076 Tübingen, Germany. Phone: (49) 7071 601343. Fax: (49) 7071 601349. E-mail: volkmar.braun@tuebingen.mpg.de.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jb.asm.org/>.

‡ Published ahead of print on 10 December 2010.

‡ The authors have paid a fee to allow immediate free access to this article.

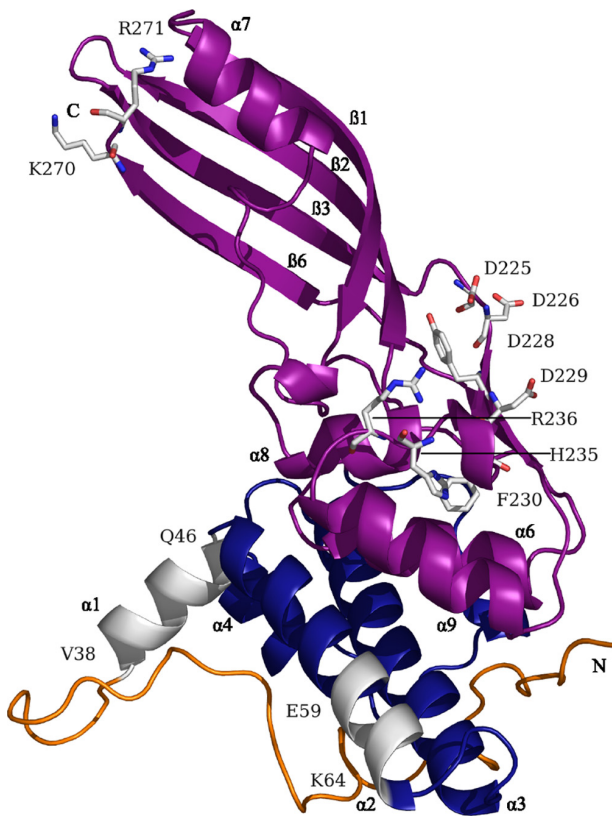


FIG. 1. Location of the mutations in an improved crystal structure of Cma (PDB 2XMX). This structure showed an excellent defined structural homogeneity for all main chain and side chain atoms, whereas the former structure (PDB 3DA4) showed partial disorder, in particular in the flexible N-terminal domain. Note that the short β 1- and β 2-strands in the previous structure are no longer listed as β -strands since they are too short. This resulted in a renumbering of the β -strands, β 1 to β 6 instead of β 1 to β 8. The predicted structural and functional domains are indicated as follows: yellow, N-terminal translocation domain, which was extended from the previously proposed extension from residues 1 to 35 (36) to 1 to 37 according to the results of this paper; blue, central receptor binding domain; magenta, C-terminal activity domain extending from residues 124 to 271 (2) and helix α 1 (V38-Q46), which when mutated resulted in inactive Cma derivatives; N, N-terminal end; C, C-terminal end; white, carbon atoms; red, oxygen atoms; blue, nitrogen atoms. For the sake of clarity, not all sites whose predicted functions are discussed in the text are indicated.

prompted our interest in the functional regions of Cma proteins. To study the functional domains of Cma and to correlate them with structural domains, we isolated and characterized mutants in the various predicted domains, with special emphasis on the activity domain.

By constructing and analyzing Cma mutants we identified sites that affect binding to FhuA, translocation across the outer membrane, and phosphatase activity.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and plasmids. *E. coli* AB2847 *aroB thi tsx malT* and its *fkpA40* deletion mutant, *E. coli* Mo3 (17), were used for the activity assays. *E. coli* BL21(DE3) *fhuA F⁻ ompT gal dcm hsd_B(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3) lon lacI lacUV5*-phage T7 gene 1 (17) served to produce Cma and mutant Cma proteins (30). This

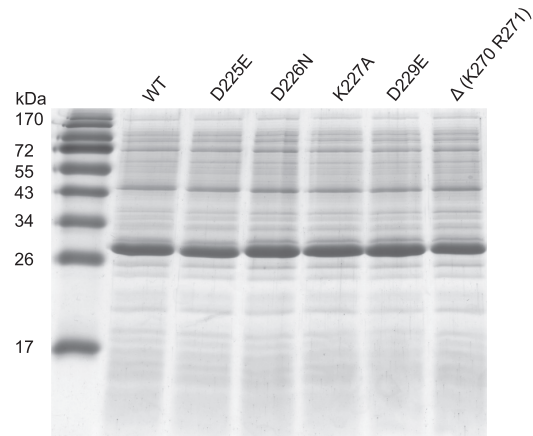


FIG. 2. SDS-PAGE of crude cell extracts of the indicated wild-type (WT) and mutant strains harvested at the same OD_{578} . The major band of 29 kDa is Cma.

strain encodes the T7 RNA polymerase under *lac* control, which, upon induction with isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), transcribes *cma* cloned downstream of the T7 gene 10 promoter on plasmid pMLD237 (generously provided by D. Mengin-Lecreulx, Université Paris-Sud, Orsay, France). The *fhuA* mutation prevents killing of the producer by Cma.

Point mutants and small deletions of Cma were generated by site-directed mutagenesis of *cma* with appropriate primers, which are available upon request, using a QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) and Phusion high-fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland). The *cma* gene on plasmid pMLD237 encodes Cma with an N-terminal (His)₆ tag. Mutagenized *cma* genes were introduced into *E. coli* DH5 α [λ ⁻ ϕ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_K⁻ m_K⁻) *supE44 thi-1 gyrA relA1*] (12) by transformation, and the mutations were verified by sequencing the *cma* genes isolated from the transformants. If the yields of Cma were low, we again sequenced the *cma* genes to exclude T7 gene 10 promoter mutations. To determine Cma activity, we isolated wild-type and mutant Cma proteins from transformants of the *E. coli* BL21(DE3) *fhuA* mutant carrying the wild-type or mutated *cma* genes on pMLD237.

Cma sensitivity tests. Sensitivity of *E. coli* cells to Cma was tested with Cma and mutant derivatives purified by Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) agarose chromatography or with crude extracts of cells that overexpressed Cma or mutant derivatives. Cma had to be isolated from disrupted cells since the *cma* transformants released less than 10% of the Cma produced. They lack a Cma lysis gene, which is also absent on natural pColBM plasmids (32). Cells were grown in LB medium (19) at 37°C to an optical density at 578 nm (OD_{578}) of 0.5. IPTG was added to a final concentration of 1 mM, and the cells were further cultured for 3 h. Cells from an 8-ml culture were harvested by centrifugation and suspended in 0.5 ml of 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5. An aliquot of 0.25 ml was disrupted by sonication, and cell debris was removed by centrifugation (16,000 $\times g$ at 4°C). Tenfold dilutions of Cma in water were spotted onto 20-ml LB agar plates seeded with 10⁹ cells of the strains to be tested in 3 ml of soft agar. The results are given as percentage of wild-type Cma activity (100%).

Larger amounts of Cma were isolated from 3.2-liter cultures, and Cma in the crude cell extract was purified by Ni-NTA agarose chromatography as previously described (17).

Synthesis of all mutant proteins was tested by SDS-PAGE of crude cell extracts. Since the strongest protein band was Cma (Fig. 2), crude extracts were tested, except for the 13 Cma mutant proteins listed in the footnote to Table 1, which were purified by Ni-NTA agarose chromatography. The purified proteins included mainly those which were assigned to the active center of Cma. From the purified proteins the same amounts of Cma were used in the assays. From the crude extracts similar amounts were used which, in the case of the active derivatives, resulted in the same activity levels in the spot test.

Osmotic shock. Osmotic shock not only releases periplasmic proteins into the shock medium (20) but also transfers added proteins into the periplasm (2, 5, 9, 33). The Cma sensitivity of cells after osmotic shock was tested with purified Cma samples. *E. coli* AB2847 in 10 ml of LB medium was grown to an OD_{578} of 0.5; cells were harvested by centrifugation and then suspended in 1 ml of 0.01 M

TABLE 1. Activity of Cma mutants^a

Cma protein	Cell lysis (%)	% Surviving colonies treated with Cma and osmotic shock ^b	Location ^c	Affected function
Wild type	100	0		
V30D	100	ND	N terminus	
G32K A33K	10	ND	N terminus	
L36D	100	ND	N terminus	
L37D	10	ND	N terminus	
L36K L37K	0	1	N terminus	Uptake
V40D	10	ND	α1	
V40K V41K	1	ND	α1	
V41P	10	ND	α1	
F44D	100	ND	α1	
Δ38–46	0.01	0.3	α1	Uptake
E59A	10	0.5	α2	Uptake
D60A	100	ND	α2	
Y61A	100	ND	α2	
K63A	100	ND	α2	
K64A	100	ND	α2	
K63A K64A	100	ND	α2	
H65A	100	ND	α2	
T174A ^d	10	ND	β1	
S178P ^d	0.1	ND	β1	
S178A ^d	10	ND	β1	
F181A ^d	0.01	ND	β1	
G205A ^d	0.01	ND	β2	
T206A ^d	1	ND	β2	
L207A ^d	0.01	ND	β3	
W215A ^d	0.01	ND	β3	
W215R ^d	0	100	β3	
Y217A ^d	0	ND	β3	
G219A ^d	0.1	ND	β3	
R222A ^d	1	ND	β3	
S223A	100	ND	β3	
S223T	1	ND	β3	
Y224A	0	45	β3-β4	Activity
D225A	0	3	β3-β4	Activity
D225E	0	65	β3-β4	Activity
D225N	1	ND	β3-β4	
D226A	0	28	β3-β4	Activity
D226E	0	ND	β3-β4	
D226N	0	98	β3-β4	Activity
K227A	10	0.3	β4	Uptake
Y228A	0	100	β4	Activity
D229A	0.1	67	β4	Activity
D229E	1	ND	β4	
D229N	10	ND	β4	
F230A	0	5	β4	Activity
N231A	10	ND	β4-α9	
S233A	100	0.3	β4-α9	
T234A	100	ND	β4-α9	
H235A	0	3	β4-α9	Activity
R236A	0	5	β4-α9	Activity
Y255F	100	ND	β5	
K266A	100	ND	β6	
S268A	100	ND	β6	
G269A ^d	10	ND	β6	
Δ(K270 R271)	1	0.3	β6	Uptake

^a Cell lysis was tested by spotting a 10-fold dilution series of Cma and its derivatives on plates seeded with *E. coli* AB2847. The highest dilution of wild-type Cma that gave a clear zone of growth inhibition was taken as reference for the activity of the Cma mutant proteins. For example, a mutant was assigned an activity of 1 when it gave a lysis zone at a 10³-fold dilution compared to wild-type Cma, which gave a lysis zone at a 10⁵ dilution (listed as 100%). The values after Cma treatment by osmotic shock are related to the number of colonies in cultures treated with sucrose without Cma (see Materials and Methods). Crude extracts were tested except in the cases of wild-type Cma and the Cma derivatives E59A, Y224A, D225E, D226A, D226N, K227A, Y228A, D229E, F230A, S233A, H235A, R236A, and Δ(K270 R271), which were purified on Ni-NTA agarose. The affected function is not predicted for mutants whose activity was not tested by osmotic shock but is discussed in the text.

^b Values below 0.1% are listed as 0. ND, not determined.

^c Helix and/or β-strand(s) is indicated. N terminus, no secondary structure.

^d Cma derivative that was obtained in lower yields, which reduced toxicity.

Tris-HCl-0.03 M NaCl, pH 7 (buffer 1). Cells were pelleted by centrifugation, washed once with buffer 1, and centrifuged again. The washed cells were suspended in 0.5 ml of 33 mM Tris-HCl, pH 7 (buffer 2), and 0.1-ml aliquots were added to four tubes. Sucrose (40% in buffer 2; 0.1 ml) was added to two tubes, and buffer 2 (0.1 ml) was added to the other two tubes. Cells were suspended by vortexing and by further shaking for 10 min at 23°C and then harvested by centrifugation at 4°C. Cma (10 μg in 10 μl) was added to an Eppendorf tube containing a cell suspension treated with sucrose and a tube containing an untreated cell suspension. Then 0.3 ml of ice-cold 0.5 mM MgCl₂ and 30 μl of 1 mM CaCl₂ were added to each tube; the *in vivo* activity of Cma depends on Ca²⁺ (24). The contents of the tubes were immediately mixed by vortexing. Two additional samples received no Cma but were otherwise treated the same way. The four samples were kept on ice for 15 min and then serially diluted 10-fold in buffer 2 at 4°C. Aliquots of 0.1 ml were suspended in 3 ml of LB soft agar and spread on 20-ml LB agar plates. After overnight incubation at 37°C, colonies after appropriate dilution were counted. The values listed in Table 1 are related to the number of CFU of cells treated with sucrose without Cma (shock alone), normalized to 6%, the average number of surviving colonies in the sucrose experiments, as illustrated by the following example: for partially active Cma with a deletion of the C-terminal K270 R271 sequence [CmaΔ(K270 R271)] in the spot test, 110 × 10⁶ (100%) colonies were counted in the untreated culture, 2.40 × 10⁶ (2.18%) were counted in the culture treated with Cma, 4.5 × 10⁵ (4.1%) were counted in the culture treated with sucrose, and 2 × 10⁴ (0.02%) were counted in the culture treated with Cma and sucrose, of which 0.3% survivors were calculated.

Competition of Cma with albomycin. Cells of *E. coli* Mo3 *fkpA* were shaken at 160 rpm in nutrient broth at 37°C to an OD₅₇₈ of 0.3. Dodecyl maltoside (0.1% final concentration) was added to prevent precipitation of Cma. Cma (final concentration, 100 μg ml⁻¹) was added 10 min before albomycin (1 μg ml⁻¹) was added. At various time points the optical density of the cultures was measured at 578 nm.

Cleavage of Cma by proteinase K. Twenty micrograms of purified Cma and Cma derivatives was incubated with 0.01 μg of proteinase K for 13 min on ice and then analyzed by SDS-PAGE.

CD. Circular dichroism (CD) spectra of electrophoretically homogeneous wild-type and mutant Cma proteins were recorded in a Jasco spectral polarimeter, model J-810, at 190 to 240 nm and 20°C. Temperature-dependent denaturation was measured at 220 nm between 20 and 80°C.

Denaturation of Cma and Cma mutants by urea. Proteins (1 mg ml⁻¹) dissolved in 20 mM potassium phosphate, 0.5 mM MgCl₂, 2 mM mercaptoethanol, and 150 mM NaCl or in the same buffer containing 1 to 8 M urea were incubated for 15 min at 20°C. The samples were centrifuged, and the fluorescence emission spectrum was measured between 300 and 500 nm (1 nm bandwidth), with excitation at 280 nm (3 nm bandwidth) in a Jasco spectrofluorometer FP-6500. The values of the peak maxima given are the average of five determinations.

Bioinformatics. Sequences homologous to Cma were searched with PSI-BLAST (1) using database nr, the nonredundant weekly updated sequence database at the NCBI, at standard parameters. The 10 sequences found were aligned with CLUSTAL W (31). The graphic was drawn with ESPript, version 2.2 (<http://escript.ibcp.fr>) (11), using the improved Cma crystal structure (Protein Data Bank [PDB] code 2XMX) and for similarity calculations the parameter equivalent, global score 1.0, was used.

RESULTS

Helix α1 is involved in Cma uptake. Helix α1, VQVVYS FFQ, from residue 38 to 46 (Fig. 1; see also Fig. S1 in the supplemental material), is hydrophobic and extends from the otherwise compact Cma structure (36). We previously speculated that the helix might fix Cma to the cytoplasmic membrane, where the substrate resides (36). To test this hypothesis, we mutagenized *cma* on plasmid pMLD237 by PCR with appropriate primers and isolated the Cma mutant proteins from transformants of the *E. coli* BL21(DE3) *fhuA* mutant carrying the plasmid-encoded *cma* genes. The *fhuA* mutation prevents lysis of the producer strain by released Cma since sensitivity of cells to Cma requires import across the outer membrane via FhuA. Cma was by far the most dominant protein in crude cell extracts examined by SDS-PAGE (Fig. 2). The identity of the

strongest band with Cma was examined with anti-Cma antiserum by Western blotting (data not shown).

We purified Cma and some of the Cma mutant derivatives by affinity chromatography on Ni-NTA agarose, taking advantage of the N-terminal (His)₆ tag carried on all Cma mutant proteins. We then assayed the activity of the Cma mutant proteins in a lysis assay in which formation of clear zones of growth inhibition was examined on plates seeded with the Cma-sensitive *E. coli* AB2847. The same amounts of Cma and Cma derivatives were used for the assays. Hydrophobic residues were replaced by charged residues to examine the role of the strong hydrophobicity of the helix, and proline was introduced to distort the helix. Cma mutants V40D and V41P, in the middle of helix α 1, had 10% of the wild-type Cma activity, whereas F44D near the end of helix α 1 was fully active (Table 1). Helix α 1 is preceded by two leucine residues, L36 and L37; L36D did not reduce Cma activity, and L37D reduced activity to 10% of that of wild-type Cma. The double mutant L36K L37K [Cma(L36K L37K)] was inactive. To extend the analysis closer to the N terminus, we constructed the double mutant G32K A33K, which displayed 10% of the wild-type activity. When we deleted helix α 1 (residues 38 to 46 [Cma(Δ 38–46)]), the deletion did not affect the yield of the protein, but 10⁵-fold more Cma(Δ 38–46) was required to inhibit the growth of *E. coli* AB2847 than wild-type Cma (Table 1).

To distinguish between lack of uptake and lack of activity, we bypassed the specific requirement for uptake for the outer membrane FhuA receptor protein and the TonB, ExbB, and ExbD proteins by using osmotic shock (5). This method was originally developed and widely used to release periplasmic proteins into the medium (20) and can be used to transfer colicins unspecifically into cells (2, 5, 9, 22, 33). The method is not quantitative but clearly distinguishes between active and inactive Cma and between defects in uptake and enzymatic activity. Upon osmotic shock in the presence of Cma(Δ 38–46), the number of surviving cells was reduced to 0.3% of the cells treated with only osmotic shock (Table 1). The very low activity of Cma(Δ 38–46) against viable cells and its high activity after unspecific transfer into the periplasm indicate that the defect is in its uptake and not in its activity. We verified this conclusion using a competition assay between Cma(Δ 38–46) and the antibiotic albomycin, which is taken up across the outer membrane by the same proteins as Cma. *E. coli* Mo3 (AB2847 *fkpA40*) was used, which is not lysed by Cma but is sensitive to albomycin. Wild-type Cma inhibited the killing of cells by albomycin, whereas Cma(Δ 38–46) did not (Fig. 3). The mutant protein did not interfere with albomycin because it did not compete with albomycin for binding to FhuA. We concluded that helix α 1 forms a hydrophobic interface through which Cma binds to FhuA. The hydrophobic helix α 1 is not required to fix Cma to the cytoplasmic membrane as its deletion did not prevent killing of osmotically shocked cells. Inactive Cma(L36K L37K) was active when shocked into cells (Table 1) and inhibited albomycin (data not shown). Although the point mutations are adjacent to helix α 1, these residues are involved not in binding to FhuA but in translocation across the outer membrane.

Analysis of region 59-EDYIKKH-65. We functionally analyzed the Cma region 59-EDYIKKH-65 because it is conspicuously polar. Cma(E59A) displayed 10% of the wild-type ac-

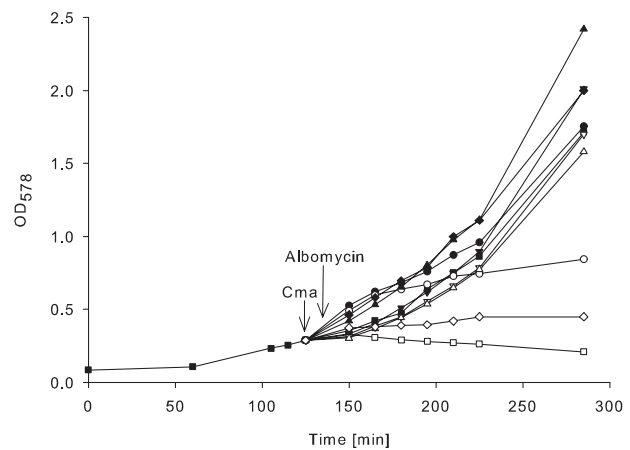


FIG. 3. Binding of wild-type and mutant Cma proteins to the FhuA receptor in a competition assay with albomycin. Exponentially growing *E. coli* Mo3 *fkpA40* in LB medium (■) and in LB medium containing 1 μ g ml⁻¹ albomycin (□), 0.1 mg ml⁻¹ wild-type Cma (▼), wild-type Cma and albomycin (▽), Cma(E59A) (●), Cma(E59A) and albomycin (○), Cma(Δ (K270 R271) (▲), Cma(Δ (K270 R271) and albomycin (△), Cma(Δ 38–46) (◆), and Cma(Δ 38–46) and albomycin (◇). Growth was monitored spectrophotometrically. The arrows indicate the addition of the Cma samples and albomycin. The figure shows an example of reproducibly obtained data.

tivity, was active when transferred into the periplasm by osmotic shock (Table 1), and showed some inhibition of cell killing by albomycin (Fig. 3), which suggests that the residual activity was related to weak FhuA binding. Mutants D60A, Y61A, K63A, K64A, K63A K64A, and H65A were fully active (Table 1). We then tested whether the mutants were impaired in their interaction with the colicin M immunity protein Cmi. Cma is a basic protein (pI 8.9), and Cmi is an acidic protein (pI 4.9). The sequence KKH could participate in binding to Cmi, which contains acidic sequences such as DVEDE. However, cells expressing Cmi encoded on plasmid pPG105 were as resistant to the single Cma mutants as to wild-type Cma (data not shown), which renders it unlikely that this region interacts with Cmi.

Deletion of the C-terminal K270 R271 sequence renders Cma uptake deficient. Previously, removal of the KR sequence at the C terminus of Cma with carboxypeptidase B inactivated Cma (9). Here, we constructed a genetic deletion, which resulted in Cma(Δ (K270 R271) with an activity of 1% of that of wild-type Cma (Table 1). The mutant protein was active when osmotically shocked into cells. The protein reproducibly inhibited albomycin (Fig. 3), which showed that it binds to FhuA. The deletion affects a step in Cma uptake after binding to FhuA.

Mapping the active site of Cma. The sequence 222-RSYD DKYDFNASTHR-236 contains an accumulation of conserved amino acids (see Fig. S1 in the supplemental material) and has been predicted to belong to the active site (3, 9, 22, 36). We replaced each of these amino acids individually with alanine. To exclude the possibility that inactivity was caused by the lack of uptake into the periplasm, inactive mutant Cma proteins were transferred into the periplasm by osmotic shock.

Nearly all Cma replacement mutants displayed strongly reduced activities when spotted onto indicator plates seeded with the Cma-sensitive *E. coli* AB2847 strain. The Cma derivatives that were transferred into the periplasm by osmotic shock remained inactive (Table 1), which indicated that the mutations affected the phosphatase activity and not the uptake of Cma. The mutations may directly affect residues that catalyze phosphate ester hydrolysis or the binding of the substrate, or they may change the geometry of the active site such that substrate binding and/or hydrolysis is impaired. Since the carboxyl groups in the side chain of the aspartate residues may be directly involved in phosphate ester hydrolysis, D225, D226, and D229 were replaced by glutamate, thereby keeping the carboxyl group on a side chain one CH₂ group longer than in aspartate. Cma(D226E) remained completely inactive, which suggested that precise positioning of the carboxyl group was required for hydrolysis. Cma(D225E) after osmotic shock showed even lower activity than Cma(D225A), and Cma(D229E) was 10-fold more active than Cma(D229A).

To further examine the function of the carboxyl groups, we constructed the mutants Cma(D225N), Cma(D226N), and Cma(D229N). Cma(D226N) was inactive, whereas Cma(D225N) and Cma(D229N) displayed 1 and 10% of the wild-type activity, respectively. It is conceivable that D226 directly participates in phosphate ester hydrolysis, whereas D225 and D229 are not directly involved in catalysis but may bind the substrate or orient the catalytic side chains in an active conformation. The same reasoning applies for the inactive Cma mutant proteins Y224A, Y228A, H235A, and R236A, whose side chains may participate in binding or hydrolysis of the phosphate ester bond, or both. Since F230 does not contain a catalytic side chain, the aromatic side chain must be important for the correct conformation of the active site or for the binding of the substrate, or both. Cma(N231A) was partially active, and Cma(S233A) and Cma(T234A) were fully active. Serine residues in phosphatases frequently contribute to the cleavage of phosphate groups. The S223L replacement was previously found to inactivate Cma (22), whereas S233A, previously found to confer inactivity (22), did not inactivate Cma in the present study. Cma(S233A) also killed cells after osmotic shock. K227 is not essential for catalysis as Cma(K227A) displayed 10% of the Cma wild-type activity in the lysis test and was active after transfer into the periplasm by osmotic shock.

Stability of the mutant proteins. In crude cell extracts, the yields of the proteins with mutations assigned to the active site were similar to the yield of wild-type Cma, which showed that the loss of activity was not caused by the loss of protein. The altered amino acids of the inactive Cma mutants could be located outside the active site but change the Cma structure such that the active site is no longer catalytic. To examine possible structural changes, we compared the circular dichroism (CD) spectra of selected purified Cma derivatives with the spectrum of purified wild-type Cma. In addition, we determined the denaturation of the proteins by heat and urea and their degradation by proteinase K. The CD spectra of the Cma derivatives with mutations in the putative active site did not differ from the wild-type Cma CD spectrum (see Fig. S2 in the supplemental material). The temperature-dependent melting curves of the proteins were virtually identical (see Fig. S3) and showed the same melting temperature (T_m) of 54°C. Urea

denatured the wild-type and mutant Cma proteins between 5 and 6 M, except for Cma(Δ K270 R271), which was denatured at a slightly lower concentration (see Fig. S4). We set up the degradation with proteinase K such that a fraction of the protein was left undegraded to better reveal differences in the peptide pattern. Under these conditions, a major degradation product of 24 kDa (complete protein, 29 kDa) was previously identified that lacks the N-terminal portion (9). The degradation products of the proteins did not differ (see Fig. S5). These results suggested that the inactivity of the Cma derivatives with a mutation in the putative active site was not caused by structural changes beyond the replaced side chains.

Additional amino acids conserved among the Cma-like proteins of the strains shown in Fig. S1 in the supplemental material were mutated to alanine (Table 1). Among them were F181A, G205A, L207A, W215A, W215R, G219A, and Y217A, which were inactive. These amino acids are contained in the β 1-, β 2-, or β 6-strands (Table 1), which are part of the Cma-typical open β -barrel formed by four β -strands (36). The strongly reduced activity, however, could mainly be attributed to the reduced yield of these proteins in soluble form. Cma S178P, F181A, W215A, and W215R gave very weak bands after SDS-PAGE, and the amounts of G205A, T206A, and L207A were approximately 20% of wild-type Cma (data not shown). Most Cma proteins with mutations in the open β -barrel were unstable.

DISCUSSION

Comparisons of colicin sequences have revealed that functional domains have been swapped between colicins, resulting in new colicins (summarized in references 6 and 8). Although the three-domain arrangement in the compact crystal structure of Cma (36) is less obvious than in other colicins, it was derived from previous mutational studies. The TonB box was identified by site-specific mutations (22). A C-terminal sequence contains the receptor binding and activity domains but lacks the translocation domain, as shown by a C-terminal proteolytic fragment that protects cells from being killed by wild-type Cma and by phage T5, which binds to FhuA, but is inactive against cells that are killed when the fragment is transferred into the periplasm by osmotic shock (9). The activity domain was recently confined to a genetically engineered fragment of residues 124 to 271, which is inactive against cells that are killed when the fragment enters the periplasm by osmotic shock (2). Randomly generated mutants were accumulated in a region tentatively assigned to the active site (22).

In the present study, we constructed inactive mutants in all three functional and structural domains. Deletion of helix α 1 rendered Cma(Δ 38–46) inactive against cells, but Cma(Δ 38–46) retained activity after transfer by osmotic shock into the periplasm. Uptake of Cma(Δ 38–46) was impaired, as shown by the lack of inhibition of albomycin uptake, which takes the same route across the outer membrane as Cma. The lack of interference with albomycin is caused by the lack of binding to the common receptor, FhuA. Helix α 1 is best suited for binding to FhuA as it extends from the otherwise compact structure of Cma (Fig. 1). However, the involvement of a hydrophobic sequence in Cma binding to FhuA is unexpected because the surface loops of FhuA are predominantly hydrophilic. As seen

in the crystal structure of the receptor protein BtuB bound to colicin E3, the 29 residues of BtuB that interact with the 27 residues of the receptor binding domain of colicin E3 are predominantly hydrophilic (18). The interacting residues of colicin E3 are near the tip of the coiled-coil region and are thus exposed, as are the residues of helix $\alpha 1$ of Cma. The crystal structure of the receptor binding domain of colicin Ia bound to the receptor protein Cir shows mainly a patch of four Asp and Glu residues at the tip of the receptor binding domain (34) that interact with two arginine residues of Cir, forming 18 hydrogen bonds (7). Since the receptor binding domain of Cma is not folded in a coiled coil, the highly exposed helix $\alpha 1$ fulfills a function similar to the coiled-coil tip of colicins Ia (7), E2 (27), and E3 (18, 29). It is likely that additional residues contribute to Cma binding to FhuA. Initial binding may cause structural changes in FhuA that expose hydrophobic regions of FhuA that interact with helix $\alpha 1$. Such large conformational changes occur upon binding of the colicin Ia receptor domain to the colicin Ia receptor Cir. Loops 7 and 8 of Cir move as a rigid body to open outwards by 37° compared with the same loops in the uncomplexed Cir structure (7).

The FhuA binding site does not extend beyond helix $\alpha 1$ toward the N terminus as inactive Cma(L36K L37K) inhibited albomycin uptake. Since Cma(L36K L37K) killed cells when it was transferred into the periplasm by osmotic shock, it is impaired in uptake. The residues involved in translocation across the outer membrane are immediately adjacent to the region that binds to FhuA. Binding of Cma and subsequent translocation involve hydrophobic interactions with FhuA. In contrast, Cma Δ (K270 R271) that bound to FhuA and killed cells when transferred into the periplasm by osmotic shock is located far from helix $\alpha 1$ (Fig. 1). The deletion must therefore specifically affect uptake after binding to FhuA by causing subtle conformational changes that affect translocation through long-range structural changes in Cma. The higher sensitivity to urea supports this notion. Of the same category is the previously isolated Cma(R115C) mutant which does not kill cells unless it is taken up by osmotic shock. It competes with wild-type Cma for binding to FhuA (22). This mutant and the other two translocation mutants, Cma(L36K L37K) and Cma Δ (K270 R271), show that mutations located outside the predicted translocation domain, residues 1 to 37 (Fig. 1), may strongly affect Cma uptake after binding to FhuA.

Our previous random mutagenesis of the *cma* gene with hydroxylamine (22) resulted in inactive Cma mutants that centered at residue 197 and included D226. Of the 10 inactive mutants isolated, three mutations were identified in G197 (G197S, G197D, and G197V). We hypothesized that these sites are part of the active site of Cma (22). G197 and D226 are strictly conserved in all Cma-like proteins (see Fig. S1 in the supplemental material). The proximity of conserved residues D226, D229, and Y255 in the crystal structure (36) also suggested that D226 as well as D229 and Y255 forms part of the active site, and this hypothesis was confirmed by analyzing the mutants.

Inactive Cma TonB box mutants were previously isolated by site-specific mutagenesis (22). One of the mutants, V6R, is active against strains mutated in TonB, TonB(Q160L) and TonB(Q160K). These TonB mutants also suppress TonB box mutations in FhuA (26) and BtuB (16), which indicates that

there are sites of interaction between TonB and the TonB boxes of the receptors. Indeed, these interactions have been recently shown in crystal structures (21, 28). The TonB box of Cma assumes a conformation similar to the conformation of the FhuA TonB box and BtuB TonB box in complex with the TonB β -strand of the region around residue 160 (36). Since the TonB box is required for Cma uptake after binding to FhuA, it defines the translocation domain. This domain is contained in the flexible N-terminal region.

Very recently, Barreteau et al. (2) carried out an alanine-scanning mutagenesis of Cma with the aim of deciphering the catalytic domain. Of the 19 mutants in the mutagenized conserved sequence H135-E254, 13 are also within the 54 newly isolated mutants listed in Table 1. Barreteau et al. determined the cytotoxicity on plates, used osmotic shock, and determined phosphatase activities with ^{14}C -labeled C_{55} -polyisoprenyl-P-P-MurNAc-pentapeptide-GlcNAc. In all mutants studied, the cytotoxicity and the number of survivors after osmotic shock correlated with phosphatase activity. In particular, D226, Y228, D229, H235, and R236 displayed very low or no toxicity and phosphatase activity, which agrees with our assignment of the mutations to the activity domain. These residues are exposed to the surface of Cma in one region where they gain access to the substrate (Fig. 1).

We believe that D226 is directly involved in hydrolysis since our conversion of the aspartate residue to glutamate or asparagine abolished activity. Not only the carboxylate moiety but also its exact positioning is essential. D225 is less important than D226, even though Cma(D225E) and Cma(D225A) are inactive, because Cma(D225N) still exhibits 10% of the wild-type cytotoxicity. Accordingly, D225 occurs in only one other Cma-like protein, whereas D226 is strictly conserved in all Cma-like proteins (see Fig. S1 in the supplemental material). Although D229 is strictly conserved in all Cma-like proteins, it is less important than D226; Cma(D229A) was inactive and Cma(D229E) and Cma(D229N) showed 1 and 10% of the wild-type cytotoxicity, respectively. Y228 may play a structural rather than a catalytic role since in some Cma-like proteins it is replaced by phenylalanine, which does not contain a catalytic side chain. The same conclusion applies to F181 and Y217, which are essential for Cma activity. The aromatic residues are oriented to the inside of the Cma molecule and may play an important structural role.

The results of previous studies (2, 3, 9, 22, 36) and of the current study provide consistent results about the three-domain structure of Cma. The N-terminal domain is responsible for translocation across the outer membrane, the central domain is responsible for binding to the FhuA receptor, and the C-terminal domain contains the phosphatase. Residues located in the catalytic center were identified in the surface-exposed link between $\beta 3$ and $\beta 4$ and within $\beta 3$ and $\beta 4$. The residues are extended over a relatively large area, which may reflect the size of the large substrate. Cma most probably recognizes mainly -O-P-P-MurNAc-pentapeptide-GlcNAc since the C_{55} -isoprenoide is embedded in the lipid bilayer.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Andrei Lupas for generous support, Kornelius Zeth for helpful discussions, Silke Patzer for advice, and Karen A. Brune for critically reading the manuscript.

This work was supported by the Max Planck Society and the German Science Foundation (BR330/25-1).

REFERENCES

- Altschul, S., et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402.
- Barretheau, H., et al. 2010. Deciphering the catalytic domain of colicin M, a peptidoglycan lipid II-degrading enzyme. *J. Biol. Chem.* **285**:12378–12389.
- Barretheau, H., et al. 2009. Human and plant pathogenic *Pseudomonas* species produce bacteriocins exhibiting colicin M-like hydrolase activity towards peptidoglycan precursors. *J. Bacteriol.* **191**:3657–3664.
- Braun, V. 1995. Energy-coupled transport and signal-transduction through the gram-negative outer-membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**:295–307.
- Braun, V., J. Frenz, K. Hantke, and K. Schaller. 1980. Penetration of colicin M into cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **142**:162–168.
- Braun, V., S. I. Patzer, and K. Hantke. 2002. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie* **84**:365–380.
- Buchanan, S. K., et al. 2007. Structure of colicin I receptor bound to the R-domain of colicin Ia: implications for protein import. *EMBO J.* **26**:2594–2604.
- Cascales, E., et al. 2007. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**:158–229.
- Dreher, R., V. Braun, and B. Wittmann-Liebold. 1985. Functional domains of colicin M. *Arch. Microbiol.* **140**:343–346.
- El Ghachi, M., et al. 2006. Colicin M exerts its bacteriolytic effect via enzymatic degradation of undecaprenyl phosphate-linked peptidoglycan precursors. *J. Biol. Chem.* **281**:22761–22772.
- Gouet, P., E. Courcelle, D. I. Stuart, and F. Metz. 1999. ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**:305–308.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557–580.
- Harkness, R. E., and V. Braun. 1989. Colicin M inhibits peptidoglycan biosynthesis by interfering with lipid carrier recycling. *J. Biol. Chem.* **264**:6177–6182.
- Harkness, R. E., and V. Braun. 1989. Inhibition of lipopolysaccharide O-antigen synthesis by colicin M. *J. Biol. Chem.* **264**:14716–14722.
- Harkness, R. E., and V. Braun. 1990. Colicin M is only bactericidal when provided from outside the cell. *Mol. Gen. Genet.* **222**:37–40.
- Heller, K. J., R. J. Kadner, and K. Günter. 1988. Suppression of the *btuB451* mutation by mutations in the *tonB* gene suggests a direct interaction between TonB and TonB-dependent receptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Gene* **64**:147–153.
- Hullmann, J., S. I. Patzer, C. Römer, K. Hantke, and V. Braun. 2008. Periplasmic chaperone FkpA is essential for imported colicin M toxicity. *Mol. Microbiol.* **69**:926–937.
- Kurusu, G., et al. 2003. The structure of BtuB with bound E3 R-domain implies a translocon. *Nat. Struct. Biol.* **10**:948–954.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Nossal, N. G., and L. A. Heppel. 1966. The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. *J. Biol. Chem.* **241**:3055–3062.
- Pawelek, P. D., et al. 2006. Structure of TonB in complex with FhuA, E. coli outer membrane receptor. *Science* **312**:1399–1402.
- Pils, H., et al. 1993. Domains of colicin M involved in uptake and activity. *Mol. Gen. Genet.* **240**:103–112.
- Postle, K., and R. J. Kadner. 2003. Touch and go: tying TonB to transport. *Mol. Microbiol.* **49**:869–882.
- Schaller, K., R. Dreher, and V. Braun. 1981. Structural and functional properties of colicin M. *J. Bacteriol.* **146**:54–63.
- Schaller, K., J.-V. Höltje, and V. Braun. 1982. Colicin M is an inhibitor of murein biosynthesis. *J. Bacteriol.* **152**:994–1000.
- Schöffler, H., and V. Braun. 1989. Transport across the outer membrane of *Escherichia coli* K12 via the FhuA receptor is regulated by the TonB protein of the cytoplasmic membrane. *Mol. Gen. Genet.* **217**:378–383.
- Sharma, O., et al. 2007. Structure of the complex of the colicin E2 R-domain and its BtuB receptor. The outer membrane colicin translocon. *J. Biol. Chem.* **282**:23163–23170.
- Shultis, D. D., M. D. Purdy, C. N. Banchs, and M. C. Wiener. 2006. Outer membrane active transport: structure of the BtuB:TonB complex. *Science* **312**:1396–1399.
- Soelaiman, S., K. Jakes, N. Wu, C. Li, and M. Shoham. 2001. Crystal structure of colicin E3: implications for cell entry and ribosome inactivation. *Mol. Cell* **8**:1053–1062.
- Studier, F. W., and B. A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**:113–130.
- Thompson, J., D. Higgin, and T. Gibson. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.
- Thumm, G., T. Ölschläger, and V. Braun. 1988. Plasmid pColBM-C1139 does not encode a colicin lysis protein but contains sequences highly homologous to the D protein (resolvase) and the oriV region of the mini-F plasmid. *Plasmid* **20**:75–82.
- Tilby, M., I. Hindenach, and U. Henning. 1978. Bypass of receptor-mediated resistance to colicin E3 in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **136**:1189–1191.
- Wiener, M., D. Freymann, P. Ghosh, and R. M. Stroud. 1997. Crystal structure of colicin Ia. *Nature* **385**:461–464.
- Zakharov, S. D., and W. A. Cramer. 2004. On the mechanism and pathway of colicin import across the *E. coli* outer membrane. *Front. Biosci.* **9**:1311–1317.
- Zeth, K., C. Römer, S. I. Patzer, and V. Braun. 2008. Crystal structure of colicin M, a novel phosphatase specifically imported by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **283**:25324–25331.

```

1      10
eco    . . . . . METLTVHAPS . PST
pct_PBR1692 . . . . . MATYKVKVDVTTGAE
pst    . . . . . MPIELPPTYITPY
pph_DVM . . . . . MEFELPATYVY
pae    . . . . . MVMDLGTITIVAGQG
bac_MC40-6 MTERNPWKQTSPTSEKQSRSLVRRLLVASTALPFGSLLKHATAMAQNN . . . . . VLPPITITTPRPDPF
bub    MNDDN . . . . . KRQHQNRRRFLIASTALPLGTLTKHTTSAQAQSN . . . . . VLPPISITTPRPDPF
bok_C6786 . . . . . MHVSKRRSLIRTSIAFPAAMLPSVRIWAQTKGHGPADELFPMISVTAPRETNL
bok_EO147 MEEEKLRHSISNRDRVMHVSKRRSLIRTSIAFPAAMLPSVRIWAQTKGHGPADELFPMISVTAPRETNL
bac_AMMD MRKRGS . . . . . SSDHVAEQTRHRKRRLVAASPYLPIYALLKQSIISLAQTN . . . . . VLPEISVNAAPRLPSL

```

```

          20      30      40      50      60      70
          0.00000000 0.00000000 0.00000000 0.00000000 0.00000000 0.00000000
          alpha1
eco    N.LPSYG..NGAFSLSAPHVPGAGPLLV.QVVYSFFQ.....SPNMCLQALTQLEDYIKKHGASNPL
pct_PBR1692 IEVPPDDKYILDEFKQGVNLPYSCRAGACSSCVALLISS.....GEVDQSDGFSFLSEKQEKKYI
pst    PEISAGGNGTYRGQDLSSGQSFPRGMQNPVATVLLQG.....DLYCSPNCLATFQDQARRDSF
pph_DVM P..DEYGTSRSTGFTVPSPGAIVNRMVQ.ERSAAYARG.....DWAPMLERHLHAMHSNKPA
pae    D.FSAYNYGNNGANWPAPSPAQVGYISKQRDVAYVNG.....DWEKPLLALWAQWANWGTTLYGYPSL
bac_MC40-6 N.FGDFGVNINGIPGANPGTGIPTVTC.FNQYCTSN..FMLHFANTGNMIRATEMFLKHLEIFGRNDTT
bub    N.FGDFKINSNEIPGANIGAGIPPPSVC.FNQYCASN..YMLLFANTGNMVRATEMFFRYLPAIGRNDTN
bok_C6786 P.VPSVGGPVGGYSWTAGFDNIRGGIYQ.IGKFNLVNKRKILSAAEAG..RPLDLVSEFAYGMELASNN
bok_EO147 P.VPSVGGPVGGYSWTAGFDNIRGGIYQ.IGKFNLVNKRKILSAAEAG..RPLDLVSEFAYGMELASNN
bac_AMMD DGFSNKVGGGGAMSEALGY..PKLLC.FGRYCSAT..EMFNNADHGDMISTTEBFFKFLFEY.RN.EI

```

```

          80      90      100      110      120
          0.00000000 0.00000000 0.00000000 0.00000000 0.00000000
          alpha3      alpha4      alpha5
eco    TLQIISTNIGYFCN..ADRNLVLHPGISVYDAY.....HFAKPAPSQYDYRSMNMKQMSGNVT
pct_PBR1692 LTCCSYPKSDCTIETGYEDKILEDPEIELAETG.....LEFFNDLKDLSLPRSGEILSG.VT
pst    GIQSKVALKTFAAADQREAEGRDLRTAYNEIAT.....DIGRSQQINENI IKYPPGNHVLSSGGLM
pph_DVM YGLDGFIMGDLKVAHGADLLLLKKNPKLSTADAW.....NQGIKEGSKIQNNNAQLAVPTFEFSGGTF
pae    PFPNYEFIWDFDLPQADYNQFSLGDDRITAMN.....RAQNHQYPPFNNNEGIPSWDRPKIDTFNGGVY
bac_MC40-6 FWRNQLMLVGGFTPWLAIGGYKYLPGANQYGFN.FEPGQFANITALFGIYIGQTKGLPPTSMFASGYGNPL
bub    FWRNQLVLVGGFTPWLAIGGYKYLPGANQYGFN.FAPGHYANISALFGIYVVGQLDKTPTPSKDFYGNPL
bok_C6786 LVKAQIATYGLFTQWLANNGWQSI V GADQYGLSNTQPSGLTTAFGLFSDYYFSLHPTPISEFQFYATPF
bok_EO147 LVKAQIATYGLFTQWLANNGWQSI V GADQYGLSNTQPSGLTTAFGLFSDYYFSLHPTPISEFQFYATPF
bac_AMMD FWRNQLTLVGEFTGWLARGGYQNFPFANSYNLN.VALAQHGDVSTLFGIYANQLNGIRPVSEFQFYGNPF

```

```

          130      140      150      160      170      180      190
          0.00000000 0.00000000 0.00000000 0.00000000 0.00000000 0.00000000
          alpha6      alpha7      beta1
eco    TPIVLAHNYLWGNCAERSVNIANTGLKISPMKINQIKDIKSG.VVGL..TFPVSTKETH...ATGDYNVI
pct_PBR1692 APFEAFDHYLFCNGVERSININDVGFNINVSQIPPIMSLNLNGK.NVGL..RFDIGSDFVRN...TALDGYS
pst    TPFHALAHGMFGLGAPLTFPIQNVGLNVDIRGIPDVMNVITQSARPVGTSSLDVNFAYDVG...KDSNA
pph_DVM TPFKAIQHWLLGNNTASVQISRTGINPTPEKIPDLMAINTA.RIGETTVNFNTSYT...GQDSVI
pae    TPAAAFAHYLTGKCKMNFPIERLNIKPNVKAMPOFIGVLTSS.PMGOTTVDVFNVYAT...AKDSWV
bac_MC40-6 MFVEAIINHWHGDEGTQRTVNIETSLNLKMSATDFNEIAKAIENP.GYGPGTYSFDTAESTNIFSHGTKDLW
bub    MFIEAVNHWIHHGNGVQRSINIESLNLKMNVSDFGEILRAIENP.GYGGPIYPINSGEFSTNIFNHGTQDLW
bok_C6786 FTLAAIDYWIIRGNCS PRAVDLKSRLRGIGANEIGPIRSIIVND.GMGGPGAYPIDAEFSTNLLSD..KEYI
bok_EO147 FTLAAIDYWIIRGNCS PRAVDLKSRLRGIGANEIGPIRSIIVND.GMGGPGAYPIDAEFSTNLLSD..KEYI
bac_AMMD MFFIGAVYYWVFGNGERRSINLESMLNLRMSASDFKLIQDSIDNP.GYGPGTYSIDGPEFSTNIFNHGAHDFW

```

```

          200      210      220      230      240      250
          0.00000000 0.00000000 0.00000000 0.00000000 0.00000000
          alpha8      beta2      beta3      beta4      alpha9      beta5
eco    TGAYLGNITLTKTEGTLTISANGSWTYNGVVRYSYD DKYDFNASTH RGIIGESLT...RLGAMFSGKE.YQ
pct_PBR1692 VAAAYLGNITMRTEGVLVNKSDDGTWQYEGEVIIRSYNDTYDANPSTH R GALGEWATGVLNNSLGTTP...YE
pst    SWLTLGNITLRLVCTLDKNASGAWTFSGEIRAFNDVYDANPSSNHRGWLGENLTLSSL SAVPFTS...YS
pph_DVM PRIYLGITLNLITGKITRNTSGTVSFSGVVKAFSDRYDANASSHRTIGFDAAATATALREVGRVANAKD.YA
pae    AGNTVGEITLRIVGI L VKSTSGQWSFRGEIRAYDLDYDFNPSNHRTETAEGMTRLRGREVGQKPKDTPYP
bac_MC40-6 SASVFGRIVSGRIRGTLVMLEDDGTYRFDGYSYLNPNDRFDADBSN.RPFLQETATTFLAKLGA I LGHKD.YQ
bub    SATVFGRIVSGRVHGTLELLADNTYRFNGSYTLNPNDRFDADBSN.RPFLQEAATTFLAKLGSVLGHTD.YQ
bok_C6786 VGSALGRVSGHVVGQLVLTADGGFSFSGECTLNPNDKFDFDASNSRPYIQEMLTTLVVRKMG EITGHTD.FM
bok_EO147 VGSALGRVSGHVVGQLVLTADGGFSFSGECTLNPNDKFDFDASNSRPYIQEMLTTLVVRKMG EITGHTD.FM
bac_AMMD SATTVGRVSGHVGRGTLTMQDQNTYRFVGSYTLNPNDKFDFDADSNS.RPFLQEWMTTVLREKGSMLGHAD.YQ

```

```

          260      270
          0.00000000 0.00000000
          beta6
eco    HLLPGEIHTKESGKR...
pct_PBR1692 HRIPGELTKKENGKK...
pst    HEIPGSLPVTVSGN...
pph_DVM HQINGELPISYAR...
pae    HGIPGAIPVNISSG...
bac_MC40-6 HNFVGEKNLSFSG.QRPVKNADIRPPQAVHRPSFGGLMRPPR...
bub    HIFTGKNLSFSG.QRPVRNAEIRPPEAVHRPSFGGLMRPGRF...
bok_C6786 HYFKGSQPLNISGSRRNKAMDER..GIVHRPSMGGLPHLGMARDIINGNVSGL
bok_EO147 HYFKGSQPLNISGSRRNKAMDER..GIVHRPSMGGLPHLGMARDIINGNVSGL
bac_AMMD HYFTGKEKVSFSG.QRTIQNGQTRPPQAVHRPSFGGLMRPGFQ...

```

FIG. S1 Comparison of the *E. coli* Cma sequence with Cma-like sequences of partially incomplete and unassigned genomes of the following strains: eco: colicin M activity protein Cma [*Escherichia coli*]; pct_PBR1692: hypothetical protein PcarbP_02847 [*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* PBR1692]; pst: bacteriocin, putative [*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* str. DC3000]; pph_DVM: Cma [*Pseudomonas* phage DVM-2008]; pae: hypothetical protein EXA13 [*Pseudomonas aeruginosa*]; bac_MC40-6: hypothetical protein BamMC406_0333 [*Burkholderia ambifaria* MC40-6]; bub: hypothetical protein BuboB_20394 [*Burkholderia ubonensis* Bu]; bok_C6786: hypothetical protein BokIC_29925 [*Burkholderia oklahomensis* C6786]; bok_EO147: hypothetical protein BokIE_30981 [*Burkholderia oklahomensis* EO147]; bac_AMMD: hypothetical protein Bamb_0324 [*B. ambifaria* AMMD]. Abbreviations were adapted according to <http://www.genome.jp/kegg/>. Amino acids that occur in all sequences are shaded red, and those that have similar properties are shaded yellow.

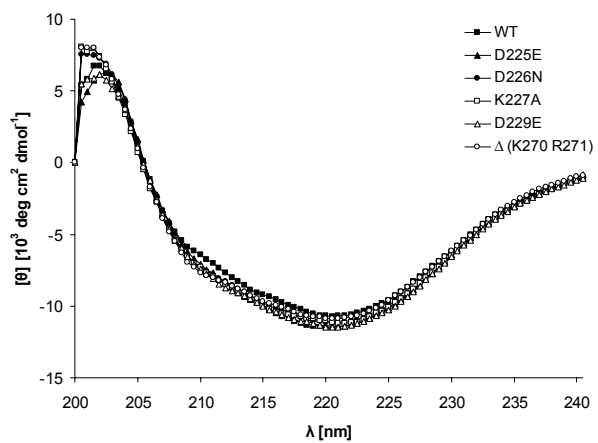


FIG. S2 CD spectra of the wild-type and mutant Cma proteins as indicated.

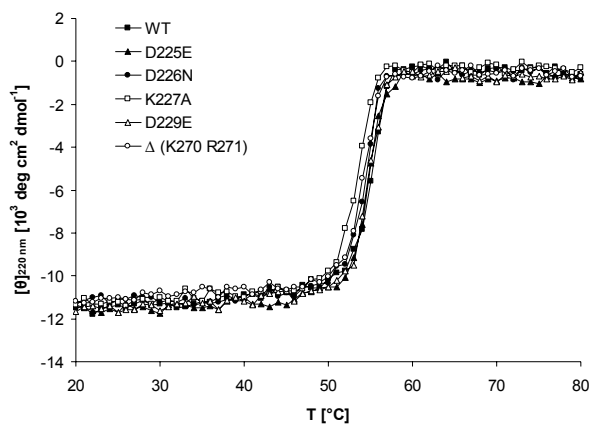


FIG. S3 Temperature-dependent denaturation of Cma (WT) and mutant Cma proteins as indicated.

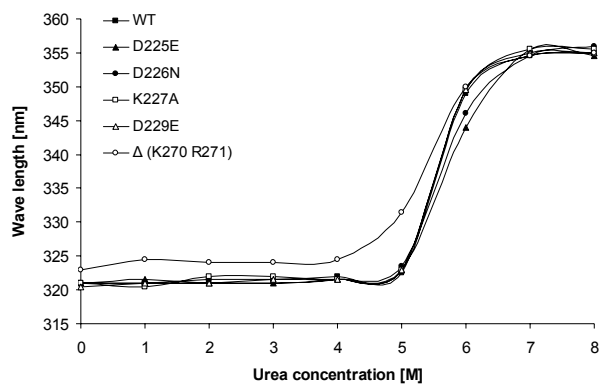


FIG. S4 Denaturation of Cma (WT) and mutant Cma proteins by various concentrations of urea. The shift in the fluorescence peak was determined.

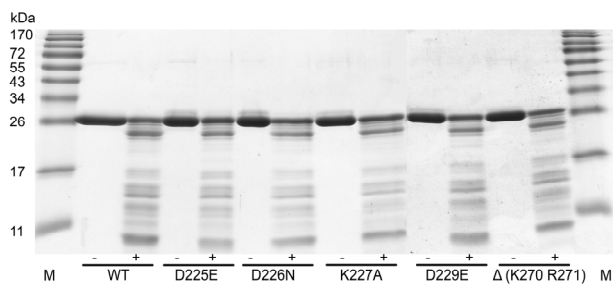


FIG. S5 SDS-PAGE of Cma (WT) and mutant Cma proteins purified by Ni-NTA agarose chromatography. +, incubation with proteinase K; -, no incubation with proteinase K.

Activation of Colicin M by the FkpA Prolyl *Cis-Trans* Isomerase/Chaperone^{*[5]}

Received for publication, July 19, 2010, and in revised form, November 12, 2010. Published, JBC Papers in Press, December 13, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.165274

Stephanie Helbig[‡], Silke I. Patzer[‡], Cordelia Schiene-Fischer[§], Kornelius Zeth[‡], and Volkmar Braun^{‡1}

From the [‡]Max Planck Institute for Developmental Biology, Spemannstrasse 35, 72076 Tübingen, Germany and the [§]Max Planck Research Unit of Enzymology of Protein Folding, 06120 Halle, Germany

Colicin M (Cma) is specifically imported into the periplasm of *Escherichia coli* and kills the cells. Killing depends on the periplasmic peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase/chaperone FkpA. To identify the Cma prolyl bonds targeted by FkpA, we replaced the 15 proline residues individually with alanine. Seven mutant proteins were fully active; Cma(P129A), Cma(P176A), and Cma(P260A) displayed 1%, and Cma(P107A) displayed 10% of the wild-type activity. Cma(P107A), Cma(P129A), and Cma(P260A), but not Cma(P176A), killed cells after entering the periplasm via osmotic shock, indicating that the former mutants were translocation-deficient; Cma(P129A) did not bind to the FhuA outer membrane receptor. The crystal structures of Cma and Cma(P176A) were identical, excluding inactivation of the activity domain located far from Pro-176. In a new peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase assay, FkpA isomerized the Cma prolyl bond in peptide Phe-Pro-176 at a high rate, but Lys-Pro-107 and Leu-Pro-260 isomerized at only <10% of that rate. The four mutant proteins secreted into the periplasm via a fused signal sequence were toxic but much less than wild-type Cma. Wild-type and mutant Cma proteins secreted or translocated across the outer membrane by energy-coupled import or unspecific osmotic shock were only active in the presence of FkpA. We propose that Cma unfolds during transfer across the outer or cytoplasmic membrane and refolds to the active form in the periplasm assisted by FkpA. Weak refolding of Cma(P176A) would explain its low activity in all assays. Of the four proline residues identified as being important for Cma activity, Phe-Pro-176 is most likely targeted by FkpA.

Colicin M (Cma)² is synthesized by *Escherichia coli* cells that carry a pColBM plasmid and is unspecifically released to a low extent. It kills sensitive *E. coli* cells by interfering with lipid carrier recycling, leading to inhibition of murein biosyn-

thesis and cell lysis (1, 2). Specifically, Cma cleaves the phosphate ester bond between the lipid carrier (bactoprenol) and the murein precursor (3). Cma enters the periplasm of sensitive cells by binding to the FhuA outer membrane receptor protein and translocation across the outer membrane by an energy-coupled mechanism through the action of the TonB, ExbB, and ExbD proteins (Ton system) (4–6).

Like all colicins, Cma consists of a central receptor binding domain, an N-terminal translocation domain, and a C-terminal activity domain (7), which can be seen in the crystal structure (8). Only the activity domain, which starts at residue 124, is homologous with colicin-M-like proteins of other bacteria (8, 9).

The first *E. coli* mutants identified that were resistant to added colicin M were mutated in the *fhuA*, *tonB*, *exbB*, or *exbD* transport genes. Another type of Cma-resistant mutant eluded genetic and function characterization (10) until recently. We localized the mutation to the *fkpA* gene, which encodes a periplasmic peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase)/chaperone. Among 10 colicins tested, only Cma requires FkpA for toxicity (11).

The function of FkpA for *E. coli* physiology, however, is not clear as *fkpA* mutants show no phenotype. FkpA is overexpressed under stress conditions, partially controlled by σ^E through a σ^E promoter. Deletion of *fkpA* stimulates transcription of *degP*, which encodes a heat shock-inducible periplasmic protease (12). Overproduction of FkpA prevents the formation of periplasmic inclusion bodies of MalE31, a defective folding derivative of the MalE-binding protein (13), and increases the yield of functional engineered antibody fragments produced in *E. coli* (14).

FkpA displays high PPIase activity, as demonstrated by the refolding of ribonuclease T1 and prolyl *cis-trans* isomerization of oligopeptides (15). Its activity is inhibited by FK506, an inhibitor of prokaryotic and eukaryotic FKBP-type PPIases (15). FkpA forms a dimer; the monomers consist of an N-proximal helical domain (residues 1–114) and a C-proximal domain (residues 115–245) typical for the FKBP family of PPIases (16). The five periplasmic PPIases/chaperones PpiA, PpiD, SurA, FkpA, and Skp usually act on various substrates and can functionally replace each other (17–19). In contrast, the toxicity of Cma strictly depends on FkpA and not on any other *E. coli* PPIase/chaperone (11).

The strict dependence of Cma toxicity on FkpA prompted us to attempt to identify the prolyl bond targeted by FkpA. If periplasmic Cma activity depends on the FkpA prolyl *cis-trans* isomerase function and not, or not

* This work was supported by the Max Planck Society, the German Science Foundation (BR 30/25-1), and the Fonds der Chemischen Industrie.

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S4.

Author's Choice—Final version full access.

The atomic coordinates and structure factors (codes 2XMX and 2XTR) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org>).

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 49-7071-601343; Fax: 49-7071-601349; E-mail: volkmar.braun@tuebingen.mpg.de.

² The abbreviations used are: Cma, colicin M; PPIase, peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; Bis/Tris, 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol; FKBP, FK506-binding protein.

TABLE 1
***E. coli* strains and plasmids used in this study**

Strain/Plasmid	Genotype	Reference
Strain		
AB2847	<i>aroB thi tsx malT</i>	(1)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsd_B (r_B⁻ m_B⁻)</i> λ(DE3) <i>lacI lacUV5-T7 gene 1</i>	(50)
BL21 <i>fhuA</i>	BL21(DE3) <i>fhuA</i>	(11)
MB97	AB2847 Δ <i>fhuA</i>	(54)
K458	AB2847 <i>fkpA43 (tolM-ts)</i>	(20)
Mo3	AB2847 <i>fkpA40</i>	(10)
ES965	KTu50 pES7 <i>cba cbi</i> on pACYC184	(51)
DH5α	<i>supE44 ΔlacI1169 [Φ80lacZΔM15] hsdR17 recA1 endA1 gyrA thi-1 relA1</i>	(52)
SIP1275	AB2847 <i>fkpA313</i>	(11)
Plasmid		
pMLD237	<i>cma</i> encoding Cma-His ^a	(3)
pSP127/56	pET25b encoding FkpA313-His ^b	(11)
pYH15	pET25b encoding FkpA-His ^b	(11)
pYH16	pET25b encoding FkpA43-His ^b	(11)
pGP1-2	Gene 1 (T7 polymerase) behind λP _L controlled by the temperature-sensitive CI857 λ repressor	(53)
pPG773	pT7-7 <i>pfpB-cmi</i> , Ap ^R encoding PfpB'-Cmi	(33)
pSP130/155	encodes MalE1-26-Cma1-271 with a C-terminal His-tag controlled by the <i>araBAD</i> promoter, <i>araC</i> , Ap ^R	This study

^a Cma with a N-terminal His₆ tag.

^b FkpA protein with a C-terminal His₆ tag.

only on the FkpA chaperone function, replacement of the proline residue that is *cis-trans*-isomerized should prevent activation. To test this premise we replaced each of the 15 proline residues in Cma individually with alanine. Here we identified one prolyl bond that could serve as the target of FkpA PPIase catalysis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial Strains and Plasmids—The bacterial strains and plasmids used and their sources are listed in Table 1. Isolation of the FkpA313 mutant SIP1275 and the temperature-sensitive FkpA43 mutant K458 was described previously (10, 11, 20).

Generation of Cma Proline Substitution Mutants—The *cma* gene on plasmid pMLD237 (generously provided by D. Mengin-Lecreux, Université Paris-Sud, Orsay, France) encodes Cma with an N-terminal His₆ tag. We replaced each of the 15 proline residues in Cma with alanine by site-directed mutagenesis of *cma* with appropriate primers (sequences available upon request) using the QuickChange[®] site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) and the Phusion[™] high fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland). Mutagenized *cma* genes on plasmid pMLD237 were introduced into *E. coli* DH5α by transformation, and the mutations were verified by sequencing the *cma* genes isolated from the transformants. Cma activity was determined with transformants of *E. coli* BL21 *fkpA* carrying the mutated *cma* genes on pMLD237. For the assay, crude cell extracts were serially diluted 10-fold, and 10 μl were spotted on LB agar plates seeded with *E. coli* AB2847. The same procedure was used to isolate the mutant Cma(D226A).

To equip Cma with a signal sequence, *cma* on pMLD237 was amplified by PCR, ligated to a sequence encoding a C-terminal His-tag, and cloned downstream of *malE'* of pMA-RQ MalE'-Cma1-130 synthesized by Genearth (Regensburg, Germany), replacing *cma1-130*. The resulting plasmid pSP130/155 encodes the signal sequence MalE1-26 (Swissprot POAEX9), Cma1-271 (Swissprot P05820) and the C-terminal His-tag LAHHHHHH under the control of the *araBAD* promoter. The plasmid contains *araC* from

pMA-RQ MalE'-Cma(1-130). pSP130/155 was mutagenized by site-directed mutagenesis, resulting in plasmids encoding MalE'-Cma(P107A)-His, MalE'-Cma(P129A)-His, MalE'-Cma(P176A)-His, MalE'-Cma(D226A)-His, and MalE'-Cma(P260A)-His.

Isolation of Cma and Mutant Cma—Cma and the proteins from transformants of *E. coli* BL21(DE3) *fkpA* harboring the recombinant plasmids were purified on Ni-NTA-agarose as described previously (11), taking advantage of the His₆ tag on the proteins. *E. coli* BL21(DE3) *fkpA* is not killed by Cma because of the *fkpA* mutation.

Isolation of Colicin B and Competition Assays—A crude extract of colicin B was isolated from *E. coli* ES965 (pES7 *cba cbi*). Synthesis of colicin B was induced by adding 0.4 μg ml⁻¹ mitomycin C in water to the culture and shaking the culture for 150 min at 37 °C. Cells were harvested and suspended in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, and disrupted by sonication, and the suspension was centrifuged. The soluble fraction containing colicin B was active up to a dilution of 10⁶ and was used for competition assays with Cma and the nearly inactive Cma proline mutants. For the assays, exponentially growing cells of *E. coli* Mo3 *fkpA40* were supplemented with a Cma sample and incubated for 10 min; colicin B at a final dilution titer of 10⁴ was then added. Growth of the cultures was monitored spectrophotometrically for 5 h.

Isolation of FkpA-His₆—FkpA-His₆ was isolated from cells of *E. coli* BL21(DE3) *fkpA* transformed with pYH15 *fkpA* and purified on Ni-NTA-agarose as described (11). The eluate of the column was concentrated with Amicon ultra-15 tubes, and FkpA was further purified by chromatography on a 320-ml Superdex 75 column with 35 mM HEPES, pH 7.8. The presence of the desired proteins and impurities in the eluted fractions were analyzed by SDS-PAGE. FkpA313-His and FkpA43-His from cells transformed with plasmids pSP127/56 and pYH16, respectively, were isolated accordingly to electrophoretic homogeneity.

Crystallization, Data Collection, Phasing, and Refinement—Crystallization of initial protein crystals were obtained by sitting-drop crystallization with screens purchased from Qiagen

Cma Activation by FkpA

mixing 0.4 μl of protein with 0.4 μl of reservoir solution. Drops were prepared using the Honeybee 961 crystallization robot (Genomic Solutions) and automatically imaged using the Rock Imager 54 imaging system (Formulatrix, Waltham). Crystals of wild-type (wt) and mutant proteins were mounted from the crystallization drops and frozen in liquid nitrogen according to the procedure described in Table 3. Data of wt and mutant crystals were collected either at beamline PXII, Swiss Light Source, or beamline ID29 of the European Synchrotron Radiation Facility. Diffraction images were recorded on the detector types mentioned in Table 3. All diffraction images were processed and scaled with the XDS/XCALE program package (21). The structure of the wt crystals was solved by molecular replacement using the MOLREP program starting from the PDB entry 3DA4 (MOLREP). Structures of the two mutant datasets were solved using the wt structure and the program MOLREP. Model building and refinement of all structures was performed in CCP4i (22) and Coot (23). Protein geometry was analyzed using the program PROCHECK (24), and secondary structures were assigned based on the DSSP algorithm (25). All pictures were prepared using the PYMOL program. Statistics are summarized in Table 3.

Cma Sensitivity Tests—Sensitivity of *E. coli* cells to Cma was tested with Cma, and mutant derivatives were purified to electrophoretic homogeneity by Ni-NTA-agarose chromatography or with crude extracts of cells that overexpressed Cma or mutant derivatives. In the latter case the Cma protein was by far the most prominent protein in the cell extract, as revealed by SDS-PAGE. The *cma* transformants released less than 10% of the Cma produced as they lack a Cma lysis gene, which is also absent on natural pColBM plasmids (26). Cells from an 8-ml culture were harvested by centrifugation and suspended in 0.5 ml of 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5. An aliquot of 0.2 ml was disrupted by vigorously shaking with glass beads, and cell debris was removed by centrifugation ($16,000 \times g$, 4 °C). 10-Fold dilutions of Cma were spotted onto 20 ml of LB agar plates seeded with 10^9 cells of the strains to be tested in 3 ml of soft agar. The results are given as the diameter (in mm) of the clear zone of growth inhibition.

To examine the sensitivity of cells overexpressing FkpA, we used *E. coli* BL21(DE3) *fkpA* transformed with both pYH15 *fkpA* and pGP1-2, which encodes the T7 polymerase gene 1 behind λP_L , controlled by the temperature-sensitive CI857 λ repressor. Cells were grown at 30 °C to an $A_{578 \text{ nm}}$ of 0.3 and then shifted for 150 min to 42 °C. 10-Fold-diluted Cma samples were spotted onto LB plates seeded with temperature-induced *E. coli* BL21(DE3) *fkpA* (pYH15 *fkpA* pGP1-2) and incubated overnight at 37 °C. The diameter of the lysis zone was measured.

Osmotic Shock—Osmotic shock not only releases periplasmic proteins into the shock medium (27) but also transfers added proteins into the periplasm (10, 28, 29). The Cma sensitivity of cells after osmotic shock was tested with purified Cma samples.

E. coli AB2847 in 10 ml of LB medium was grown to an $A_{578 \text{ nm}}$ of 0.5; cells were harvested by centrifugation and then suspended in 1 ml of 10 mM Tris-HCl, 30 mM NaCl, pH 7 (buffer 1). Cells were pelleted by centrifugation, washed once

with buffer 1, and centrifuged again. The washed cells were suspended in 0.5 ml of 33 mM Tris-HCl, pH 7 (buffer 2), and 0.1-ml aliquots were added to four tubes. Sucrose (40% in buffer 2, 0.1 ml) was added to two tubes, and buffer 2 (0.1 ml) was added to the other two tubes. Cells were suspended by vortexing, kept for 10 min on a shaker, then cooled from room temperature to 4 °C and harvested by centrifugation. Cma (10 μg in 10 μl) was added to an Eppendorf tube containing a cell suspension treated with sucrose and a tube containing an untreated cell suspension. Then 0.2 ml of ice-cold 0.5 mM MgCl_2 and 30 μl of 1 mM CaCl_2 was added to each tube; the *in vivo* activity of Cma depends on Ca^{2+} (20). The contents of the tubes were immediately mixed by vortexing. Two additional samples received no Cma but were otherwise treated the same way. The four samples were kept on ice for 15 min and then serially diluted 10-fold in buffer 2. Aliquots of 0.1 ml were suspended in 3 ml of LB soft agar and spread on 20-ml LB agar plates. After overnight incubation at 37 °C, the colonies were counted.

Activity Assay for Secreted Cma—Cells containing wild-type *cma* and *cma* mutant genes fused to the MalE signal sequence were grown in LB medium containing ampicillin to the exponential growth phase. Arabinose was added to the final concentrations indicated in Fig. 4. To avoid killing of cells by Cma released into the medium, transformants of the *fhuA* mutant MB97 were used. In the case of *fkpA* mutants this precaution was not required as they are resistant to Cma. Cell growth and lysis were monitored by measuring the optical density at 578 nm.

Determination of PPIase Activity in Vitro—The *cis-trans* isomerization of the peptides *p*-aminobenzoyl-CFPVC-(NO₂)Tyr-NH₂ (P is Pro-176), *p*-aminobenzoyl-CKP)AC-(NO₂)Tyr-NH₂ (P is Pro-107), and *p*-aminobenzoyl-CLP)GC-(NO₂)Tyr-NH₂ (P is Pro-260) was induced by reducing the disulfide bond with 50 mM DTT in 35 mM HEPES, pH 7.8. The time course of fluorescence of 1 μM concentrations of each peptide at 10 °C was followed at 420 nm after the peptides were transferred from the peptide stock solution in DMSO to the final buffer solution. The excitation wavelength was 320 nm, and the spectral bandwidth was 5 nm. Data were analyzed by single exponential nonlinear regression using a Sigma Plot Scientific Graphing System. The samples contained 31–124 μM of FkpA and its derivatives. k_{cat}/K_m was determined by evaluating the linear dependence of k_{enz} from the concentration of FkpA and its derivatives. k_{enz} is the catalyzed first-order rate minus the uncatalyzed rate. k_{cat}/K_m was calculated from k_{enz}/E_o , where E_o is the FkpA concentration. Each data point represents the mean of three independent measurements that differed less than 10%.

Cleavage of Cma by Proteinase K—Cma and its derivatives tagged with His₆ at the N terminus were purified on Ni-NTA-agarose; 20 μg of each protein was incubated with 0.01 μg of proteinase K for 13 min on ice and then analyzed by SDS-PAGE.

Circular Dichroism (CD)—CD spectra of electrophoretically homogeneous wild-type and mutant Cma proteins were recorded in a Jasco spectral polarimeter model J-810 at 190–

TABLE 2**Activities of the Cma Pro → Ala mutants**

Clear zones of growth inhibition are listed.

Cma	Diameter of the lysis zones			
	10 ⁰ dilution	10 ¹ dilution	10 ² dilution	10 ³ dilution
			<i>mm</i>	
Wild-type	15	11	8	0
P9A	14	11	9	8
P11A	15	13	10	9
P16A	14	11	9	0
P28A	13	10	8	6
P31A	12	10	8	0
P35A	13	11	8	0
P48A	15	11	8	0
P70A	13	10	7	0
P94A	12	10	8	0
P107A	13	11	0	0
P109A	13	10	8	0
P129A	10	0	0	0
P157A	15	12	10	8
P176A	10	0	0	0
P260A	10	0	0	0

240 nm and 20 °C. Temperature-dependent denaturation was measured at 220 nm between 10 and 70 °C.

Denaturation of Cma and Cma Mutants by Urea—Proteins (1 mg ml⁻¹) dissolved in 20 mM potassium phosphate, 0.5 mM MgCl₂, 2 mM mercaptoethanol, 150 mM NaCl, or in the same buffer containing 1–8 M urea were incubated for 15 min at 20 °C. The samples were centrifuged, and the fluorescence emission spectrum was measured between 300 and 500 nm (1 nm bandwidth), with excitation at 280 nm (3 nm bandwidth) in a Jasco spectrofluorometer FP-6500. The values given are the average of five determinations.

RESULTS

Isolation of Pro → Ala Colicin M (Cma) Mutants—We previously have shown that FkpA is required for killing *E. coli* K-12 by Cma (11). If periplasmic Cma activity depends on the FkpA prolyl *cis-trans* isomerase function and not, or not only on the FkpA chaperone function, replacement of the proline residue that is *cis-trans*-isomerized should prevent activation. To test this premise we replaced each of the 15 proline residues of Cma individually with alanine. The activities of the Cma mutant proteins encoded on pMLD237 were first tested with crude extracts of the *E. coli* pMLD237 transformant BL21(DE3) *fkpA* after IPTG induction of *cma* transcription. The *fkpA* mutation prevented the producer cells to be killed by Cma. In the crude extracts the mutant Cma was the dominant protein (supplemental Fig. S1). 10-Fold dilutions of each mutant Cma protein sample were spotted on nutrient agar seeded with Cma-sensitive *E. coli* AB2847. Four mutants (Cma(P9A), Cma(P11A), Cma(P28A), and Cma(P157A)) showed higher activities than wild-type Cma, and seven mutants had activities similar to that of the wild type (Table 2); these mutants were not studied further. Cma(P129A), Cma(P176A), and Cma(P260A) displayed 1% of the wild-type activity, and Cma(P107A) showed 10% of the wild-type activity (Table 2). Samples of the Cma(P → A) double mutants Cma(P129A,P176A), Cma(P129A,P260A), and Cma(P176A,P260A) were completely inactive (data not shown). The location of the P107A, P129A, P176A, and

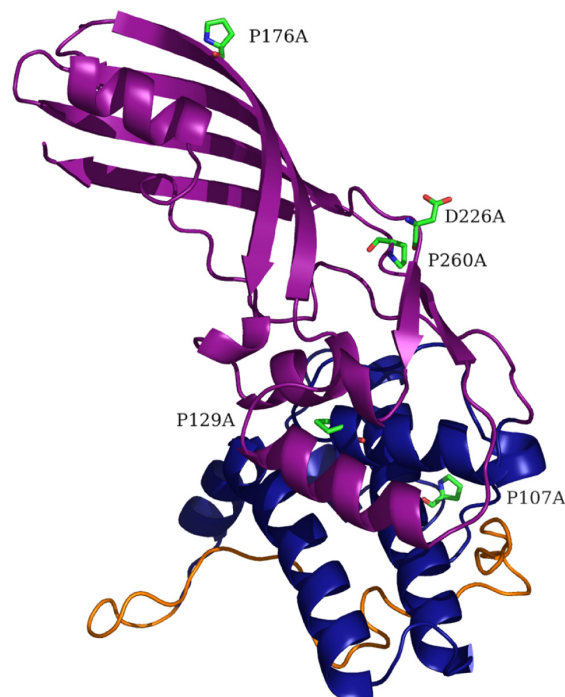


FIGURE 1. Location of the mutations in the crystal structure of Cma studied here (8). The predicted structural and functional domains are indicated; orange, N-terminal translocation domain; blue, central receptor binding domain; magenta, C-terminal activity domain; side chains of Pro-107, Pro-129, Pro-176, Pro-260, and Asp-226, which were replaced by alanine in this study are marked green (C-atoms, blue (nitrogen), and red (oxygen).

P260A mutations in the Cma crystal structure is shown in Fig. 1.

To examine whether overproduction of FkpA increases the toxicity of the Cma(P → A) mutants, crude extracts of wild-type and the three Cma mutant proteins with the lowest activity were spotted onto nutrient agar plates seeded with *E. coli* AB2847 carrying in addition to chromosomal *fkpA*, also *fkpA* encoded on plasmid pYH15 and the temperature-inducible T7 RNA polymerase gene on plasmid pGP1-2. The toxicity of each Cma protein for the FkpA-overproducing strain and for untransformed strain AB2847 was the same (data not shown), i.e. the amount of chromosomally encoded FkpA was sufficient to confer the respective sensitivity to Cma and its mutant derivatives.

Replacement of Pro-129, Pro-176, and Pro-260 by glycine or serine instead of alanine resulted in mutants with activities similar to those of the P → A mutants (data not shown). The higher flexibility of the glycine bonds did not facilitate restoration of the active Cma conformation after transfer across the outer membrane, and the similarity of serine in the hydrogen-bonded form to proline did not increase Cma activity provided the proline residues were essential for Cma phosphatase activity (see also "Discussion"). In addition, Pro-176 was replaced by leucine, valine, tyrosine, phenylalanine, lysine, and aspartate. The Cma derivatives showed 1% *in vivo* activity on FkpA wild-type cells, except P176F and P176Y,

Cma Activation by FkpA

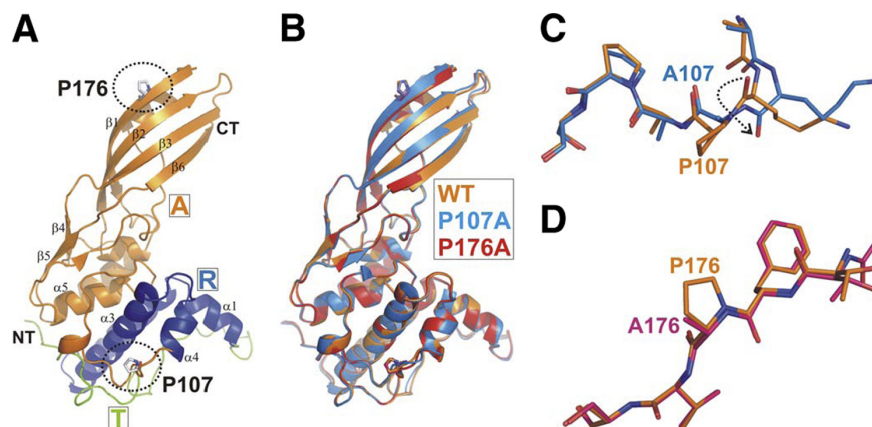


FIGURE 2. *A*, ribbon model representation of the newly determined Cma wt structure in a side view illustration (PDB 2XMX) is shown. The structure consists of three domains, the N-terminal translocation domain (in green; *T*), the intermediate receptor binding domain (blue; *R*), and the C-terminal activity domains (orange; *A*). The secondary structure elements and N (*NT*) and C termini (*CT*) of the structure as well as the two residues mutated are marked accordingly ($\alpha 1$ - $\alpha 5$, $\beta 1$ - $\beta 6$, *NT*, *CT*, *P107*, *P176*). *B*, superposition of the three structures represented as ribbon models (PDB 2XTR). The wt structure is color-coded in orange, the P107A mutant structure is in blue, and the P176A structure is in red. *C*, zoom into the region of the extended loop connecting the receptor binding and activity domain is shown. Wt and mutant structures are displayed in the same orientation and color-coded as in *B*, and adjacent residues of the mutant (P107A) are shown in ball-and-stick representation. *D*, close-up of the second mutation Pro-176 located in the $\beta 1$ -sheet of the protein is shown. Wt and mutant structures are displayed in the same orientation and color coded as in *B*; adjacent residues of the P176A mutant are shown in a ball-and-stick representation.

which displayed 10% of Cma wild-type activity. The activity of all mutant Cma proteins was zero on FkpA mutant cells.

FkpA is not required to produce an active Cma. The activity of wild-type Cma released into the medium or isolated from the cytoplasm is the same when it is produced in wild-type and *fkpA* mutant cells (11). FkpA is only required after uptake of Cma into the periplasm. Nevertheless, we examined whether the low activity of the four Cma *P* \rightarrow *A* mutants was altered when they were produced in *E. coli* BL21 FkpA⁺ cells carrying a *fhuA* mutation, which confers resistance to Cma. Killing *E. coli* AB2847 by the Cma mutant proteins synthesized in *E. coli* BL21 *fhuA* was the same (1 and 10% activity) as killing by the Cma mutant proteins synthesized in parallel by *E. coli* BL21 *fkpA*, i.e. lack of FkpA did not affect the activity of the Cma mutant proteins.

Structural Properties of the Cma *P* \rightarrow *A* Mutant Proteins/ Crystal Structures of Cma(P107A) and Cma(P176A)—Because the reduction in toxicity of the four mutant proteins might be related to changes in the structures, we determined the crystal structures of Cma(P107A) and Cma(P176A). We selected these two proteins because Pro-107 forms the only proline *cis* bond in the Cma structure (8), and as will be shown below, the Pro-176 bond is most likely a target of FkpA. Cma, Cma(P107A), and Cma(P176A) were expressed; the production of similar amounts of the almost inactive Cma derivatives and wild-type Cma indicated that replacement of the proline residues by alanine did not cause gross structural changes that affected the yield and activity of the proteins. We determined an improved structure of wild-type Cma under conditions slightly different from those previously used (8) to 1.67 Å (Fig. 2*A*). The published structures of Cma (Ref. 8; PDB entries 3DA4 and 3DA3) showed partial disorder, in particular in the flexible N-terminal domain, which is frequently not seen in colicin structures. The new wild-type structure, in contrast, showed an excellent defined structural homogeneity for all

main and side-chain atoms (Fig. 2*A*). We determined the crystal structures of mutants Cma(P107A) and Cma(P176A) to 2.3 Å (eight monomers in the asymmetric unit) and 2.15 Å (two monomers in the asymmetric unit), respectively. Crystallographic data are summarized in Table 3. The root mean square deviation between the mutant (P107A and P176A) and the wild-type structures was 0.3 and 0.2 Å², respectively, including all C α -atoms of the molecule.

Superposition of the Cma wild-type and mutant protein structures revealed identical folding (Fig. 2*B*). Analysis of the local environment of each mutation revealed that the Lys-Pro *cis* bond in wild-type Cma was converted to a Lys-Ala *trans* bond in Cma(P107A), which caused a local distortion of the loop region that connects the receptor binding and the activity domains (Fig. 2*C*). The structural changes were confined to the region around Pro-107 and elicited no long range structural transitions up to the predicted active center around Asp-226 (Fig. 1) (8, 9, 29). In contrast, the P176A mutation had no visible effect on the local backbone geometry of the $\beta 3$ strand of Cma, as demonstrated in a section of Cma(P176A) overlaid by wild-type Cma (Fig. 2*D*). The entire structures were almost identical, which indicates that no conformational change inactivated Cma(P176A).

Structural Properties of the Cma *P* \rightarrow *A* Mutant Proteins in Solution—Although the crystal structure of Cma(P176A) and most likely also of Cma(P107A) excluded structural alterations of the Cma activity domain as the cause of the low toxicity, we examined the structures of the three mutants with 1% wild-type activity in solution using proteinase K degradation, circular dichroism (CD), and tryptophan fluorescence spectroscopy after denaturation with urea. Cma(P107A) was not included in all assays because it displayed a Cma activity higher (10%) than that of the other mutant proteins (1%).

TABLE 3
Data collection and refinement statistics

	Cma(WT)	Cma(P107A)	Cma(P176A)
Data collection			
Space group	C222 ₁	P1	C222 ₁
Cell dimensions			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	52.75, 115.10, 227.71	52.85, 63.11, 189.34	52.83, 114.77, 225.40
α , β , γ (°)	90	87.59, 82.17, 65.65	90
Resolution (Å)	48-1.67 ^a (1.71-1.67)	49-2.31 (2.37-2.30)	47-2.14 (2.19-2.14)
<i>R</i> _{sym} or <i>R</i> _{merge}	0.08 (0.57)	0.09 (0.40)	0.19 (0.82)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	14.2 (1.9)	5.4 (1.7)	9.2 (2.0)
Completeness (%)	97.3 (83.9)	89.5 (72.9)	99.0 (94.2)
Redundancy	5.2 (3.2)	1.7 (1.5)	6.3 (4.9)
Refinement			
Resolution (Å)	48-1.67 (1.71-1.67)	49-2.31 (2.37-2.31)	47-2.14 (2.19-2.14)
No. reflections	73413 (5526)	85754 (4514)	36063 (1898)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.16/0.20 (0.25/0.30)	0.24/0.27 (0.31/0.33)	0.18/0.24 (0.26/0.30)
No. atoms (all)	4,733	17,005	4,376
Protein (chains/residues)	2/540	8/2160	2/540
Ligands (nitrate/glycerol)	3/4		1/0
Water	434	451	319
B-Factors			
Protein	5.7	13	20.6
Ligands (nitrate/glycerol)	20/23		34/-
Water	15.1	9.1	26.1
Root mean square deviations			
Bond lengths (Å)	0.027	0.016	0.023
Bond angles (°)	2.1	1.4	2.0
Ramachandran statistics			
Residues in favored regions (%)	532 (99.3)	2123 (99)	531 (99.1)
Residues in allowed region (%)	3 (0.6)	21 (1)	5 (0.9)
Residues in outlier region (%)	1 (0.2)	0 (0)	0 (0)
Crystallization conditions			
Cryo protectant added	20% PEG 3350 0.2 M NaNO ₃ 10% PEG 400	20% PEG 3350 0.2 M NaNO ₃ , 0.1 M Bis/Tris, pH 6.5 10% PEG 400	20% PEG 3350 0.2 M NaNO ₃ 10% PEG 400

^a Values in parentheses are for highest-resolution shell.

We chose proteinase K cleavage conditions such that Cma was not completely digested; instead, fragments were formed, of which the 24-kDa fragment resulted from Cma truncation at the N terminus (7). By analyzing the formation of this intermediary product instead of analyzing complete digestion, differences in the structure of Cma and its mutant forms should become more apparent. No differences in the cleavage pattern of wild-type Cma and the Cma mutants were observed (supplemental Fig. S2).

Next, we used CD spectroscopy to discern whether the mutant Cma proteins structurally differed from wild-type Cma. The far-UV CD spectra of the four Cma mutants and the Cma wild-type were the same at 20 °C (data not shown). However, at higher temperatures, the CD spectra indicated that Cma(P107A) (*T_m* = 51.8 °C) and Cma(P129A) (*T_m* = 48.8 °C) denatured at a lower temperature than Cma (*T_m* = 55.8 °C), Cma(P176A) (*T_m* = 55.4 °C), and Cma(P260A) (*T_m* = 55.0 °C) (supplemental Fig. S3).

We furthermore examined structural changes in the mutant proteins by measuring the fluorescence of urea-denatured proteins. The fluorescence emission maximum shifted to the red from 320 to 355 nm for Cma(P107A) and Cma(P129A) between 4 and 5 M urea and for Cma(P176A), Cma(P260A), and wild-type Cma between 5 and 6 M urea (supplemental Fig. S4). The lower urea stability of Cma(P107A) and Cma(P129A) agrees with their lower stability at higher temperatures.

Translocation of the Cma P → A Mutant Proteins Across the Outer Membrane—We examined whether the Cma P → A mutants were defective in binding to the FhuA receptor and

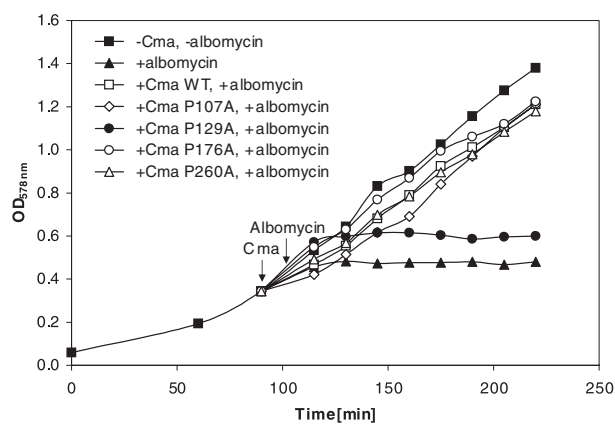


FIGURE 3. Binding of wild-type and mutant Cma proteins to the FhuA receptor in a competition assay with albomycin. Exponentially growing *E. coli* Mo3 *fkpA40* in LB medium untreated (■) and treated with 1 μg ml⁻¹ albomycin (▲), treated with 0.1 mg ml⁻¹ wild-type Cma and albomycin (□), with mutant Cma(P107A) and albomycin (◇), with mutant Cma(P129A) and albomycin (●), with mutant Cma(P176A) and albomycin (○), and with mutant Cma(P260A) and albomycin (△). Growth was monitored spectrophotometrically. The arrows indicate the addition of the Cma samples and albomycin.

in translocation across the outer membrane. Receptor binding was determined by competition of Cma with the antibiotic albomycin, which binds to the same FhuA receptor as Cma. *E. coli* Mo3 *fkpA40* was used because the *fkpA* deletion confers resistance to Cma (11). Growth inhibition was, therefore, confined to the action of albomycin. Albomycin inhibited growth of *E. coli* Mo3 (Fig. 3). Wild-type Cma prevented growth inhibition by albomycin, as did Cma(P107A),

Cma Activation by FkpA

Cma(P176A), and Cma(P260A). These proteins probably interfered with binding of albomycin to FhuA. In contrast, Cma(P129A) failed to interfere with albomycin. The low activity of Cma(P129A), therefore, most likely results from poor binding to FhuA.

Cma and albomycin not only share the common FhuA receptor, but also both use the Ton system for uptake. It is unlikely that albomycin uptake was inhibited because uptake of Cma, and its derivatives used up TonB. TonB can simultaneously interact with several receptors without substantially decreasing their transport rate (30). Reduction of the transport rate of a substrate was only observed after strong overexpression of another TonB-dependent transport system (30). Nevertheless, we determined whether Cma(P176A) and Cma(P260A) interfered with the activity of the Ton system. The competition assay was done with colicin B instead of albomycin; colicin B binds to the FepA receptor and not to FhuA but uses the Ton system for uptake. The *Cma* P → A mutants did not reduce growth inhibition of the Cma-resistant *fkpA* mutant Mo3 by colicin B, which indicates that the Cma mutant proteins do not interfere with the Ton system step of albomycin uptake. Interference of Cma with the target site of albomycin is also excluded as albomycin inhibits the seryl-tRNA synthetase; Cma, on the other hand, cleaves the phosphate ester bond between bactoprenol and the murein precursor.

Lack of Translocation Versus Lack of Phosphatase Activity—To differentiate between lack of translocation across the outer membrane and lack of phosphatase activity, we used an osmotic shock procedure. Transferring *E. coli* cells from a medium of high osmolarity to a medium of low osmolarity renders their outer membrane temporarily permeable to proteins. The procedure was developed and widely used to release periplasmic proteins from cells (27) but can also be used to introduce proteins into cells, as has been shown for colicin E3 (28) and Cma (7, 10, 29). The uptake of Cma by osmotic shock bypasses the requirement for the FhuA outer membrane receptor protein and the energizing Ton system. A variation of this procedure (10) was recently used to differentiate between Cma uptake and activity mutants (9). We purified wild-type and mutant proteins to electrophoretic homogeneity (supplemental Fig. S2) and used the same amounts of protein in the osmotic shock experiments. Osmotic shock treatment rendered cells sensitive to Cma(P107A), Cma(P129A), and Cma(P260A) (0.03 or 0.04% survivors) and to Cma(P176A) but to a much lower extent (0.4% survivors) (Table 4). Killing by Cma(P129A) after osmotic shock agrees with its inability to kill cells under normal conditions because of its failure to bind to FhuA, which is not required to enter osmotically shocked cells. Because Cma(P107A) and Cma(P260A) bound to FhuA but hardly killed cells under normal conditions and were able to kill osmotically shocked cells after being unspecifically translocated into the periplasm, the uptake of these mutant proteins across the outer membrane must be impaired after binding to FhuA. We conclude that Cma(P107A), Cma(P129A), and Cma(P260A) show low activities because they are poorly taken up into the periplasm.

TABLE 4

Activity of selected Cma mutant proteins introduced into cells by osmotic shock

The percent of surviving cells of AB2847, its *fkpA40* derivative, and the pPG773 *cmi* transformant were determined by plating after treatment with purified Cma wt and Cma mutant proteins transferred into cells by osmotic shock (+ shock) or without shock treatment (– shock). The average percentage of survivors of all experiments after shock treatment without Cma was 6.0.

Conditions	Surviving cells		
	AB2847	AB2847 <i>fkpA</i>	AB2847 pPG773 <i>cmi</i>
		Percent of input	
Cma wt + shock	0	1.5	6.1
Cma wt – shock	0.2	93.3	97.4
Cma(P107A) + shock	0.03	1.8	8.8
Cma(P107A) – shock	1.7	91.3	93.9
Cma(P129A) + shock	0.04	0.8	7.0
Cma(P129A) – shock	1.9	95.2	95.8
Cma(P176A) + shock	0.4	0.6	8.9
Cma(P176A) – shock	9.4	90.4	97.3
Cma(P260A) + shock	0.03	0.2	5.8
Cma(P260A) – shock	1.4	90.6	100

Wild-type and mutant Cma proteins were osmotically shocked into an *fkpA* deletion mutant to test whether FkpA was only required for the energy-coupled transfer of Cma across the outer membrane or also required after unspecific transfer by osmotic shock. The Cma proteins were osmotically shocked into *E. coli* Mo3 *fkpA40* under conditions identical to those for the *fkpA* wild-type strain. Killing of the *fkpA* mutant by wild-type Cma and the proline Cma mutant proteins was strongly reduced (Table 4), which shows that regardless of the route across the outer membrane (energy-coupled import or entry by osmotic shock) FkpA was required for wild-type and mutant Cma activity in the periplasm. The results also demonstrated the reliability of the osmotic shock procedure as the Cma activities specifically required FkpA. However, the Cma proteins displayed residual Cma activities; 0.2–1.8% survival compared with 6% survival after osmotic shock in the absence of the Cma proteins (Table 4). After osmotic shock, a fraction of the Cma molecules was active in the absence of FkpA.

This conclusion was further supported by comparison of the surviving *fkpA* mutant cells with cells that synthesize the Cmi colicin M immunity protein. Cmi renders cells resistant to imported Cma (31). Cmi is located in the periplasm and anchored to the cytoplasmic membrane by its N-terminal hydrophobic sequence (32, 33). Membrane fixation brings Cmi to the site where Cma cleaves its substrate and prevents release of Cmi by osmotic shock. We used the previously constructed plasmid pPG773, in which the translocation and membrane anchor of the penicillin-binding protein PBP3 was fused to the periplasmic activity domain of Cmi (33). Transformants carrying this plasmid confer immunity without induction of T7 polymerase synthesis because it contains an *E. coli* polymerase promoter. Wild-type Cma and the Cma P → A mutant proteins were completely inactive on plates seeded with *E. coli* AB2847 pPG773 *cmi*. After osmotic shock, Cma and the Cma derivatives were inactive (Table 4). The percentage of survivors (average 7%) was in the range of the survivors after osmotic shock treatment without Cma (6%). This shows that the Cma proteins that entered cells by osmotic shock were completely inactivated by Cmi. The fraction

of surviving cells into which Cma and the Cma derivatives entered via the normal, energy-coupled route was similar in the *fkpA* mutant and the *cmi* transformants (92 and 100%, respectively; Table 4). The almost complete resistance of the *fkpA* mutant to Cma and its mutant derivatives that enter the cell by energy-coupled uptake (– shock in Table 4) and the partial sensitivity of the *fkpA* mutant when Cma and its mutant derivatives are osmotically shocked into the cell support the conclusion that a fraction of Cma osmotically shocked into cells is active in the absence of FkpA. This fraction assumes an active conformation without the assistance of FkpA.

Cma(P176A) differed from the other Cma P → A mutants in that its low activity after osmotic shock did not differ in wild-type and *fkpA* cells (0.4 versus 0.6% survivors). The percentage of survivors of the immune cells treated with Cma(P176A) reached the level obtained with wild-type Cma and the other Cma P → A mutant proteins (Table 4). This suggests that the residual activity of Cma(P176A) in Cmi-deficient cells is Cma-specific.

The number of survivors in the control of the osmotic shock procedure, *i.e.* without osmotic shock treatment (Table 4), cannot be quantitatively compared with the number of survivors obtained by the plate test (Table 2). In the osmotic shock procedure, test cells are exposed to Cma for 15 min at 4 °C, diluted, and then plated; in the plate test, cells are exposed to Cma overnight at 37 °C.

Killing of Cells by Secreted Wild-type and Cma P → A Mutants—Colicins, including Cma, are not secreted but are rather unspecifically released by partial lysis of the producing cells. Lysis is caused by a lysis protein that is not encoded on pColBM plasmids (26). Therefore, 90% of the Cma stays inside cells. To examine whether Cma translocated across the outer membrane only requires FkpA or whether Cma secreted across the cytoplasmic membrane also requires FkpA, we fused wild-type and mutant Cma proteins to the signal sequence of the periplasmic MalE-binding protein. In a previous paper of our laboratory (34) Cma was fused to the signal peptide of the murein lipoprotein and killed cells of *fhuA*, *tonB*, and *exbBD* uptake mutants but left a *tolM*, now designated *fkpA*, mutant unaffected. The Cma constructs chosen in this paper contained the MalE signal peptide for secretion and C-terminal His₆ for purification and are designated as secreted Cma (Cma_{sec}). We cloned the fusion gene downstream of the *araC* arabinose promoter, which tightly controls transcription of downstream genes. This was important for cloning as uninduced transcription might have resulted in cell lysis and failure to obtain transformants. In addition, the level of expression can be modulated over a wide range (up to 1200-fold) depending on the concentration of the arabinose inducer (35). Cma_{sec} transformants grew well in the uninduced state and stopped growing upon induction of *cma_{sec}* transcription with 0.1% arabinose. Growth inhibition could be caused by the phosphatase activity of Cma or by Cma jamming the secretion pathway by folding in the cytoplasm before secretion, as has for example been shown for the outer membrane LamB protein fused to a large C-terminal fragment of β-galactosidase. In this case cells become sensitive to induction by maltose as enhanced synthesis of the LamB-

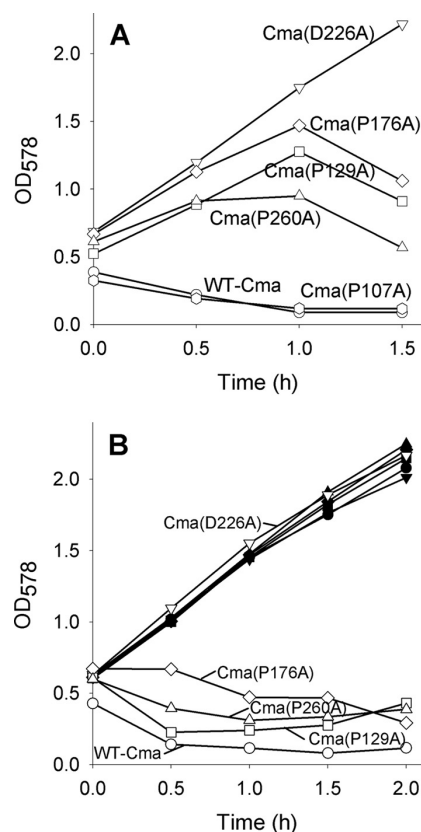


FIGURE 4. Growth inhibition and lysis of *E. coli* Mo3 *fkpA* (filled symbols) and *E. coli* MB97 *fhuA* (open symbols) by Cma and its mutant derivatives fused to the MalE signal sequence after induction of Cma synthesis by 0.001% arabinose (A) and 0.01% arabinose (B). Samples were withdrawn at the indicated times, and the optical density (OD) was measured at 578 nm.

LacZ hybrid protein impairs secretion of LamB-LacZ and of other proteins (36). Indeed, 0.1% arabinose inhibited not only the growth of cells that synthesized wild-type Cma_{sec} but also of cells that synthesized inactive mutant Cma_{sec} (D226A) (data not shown). Asp-226 is located in the predicted active center of Cma and is essential for Cma activity (8, 9, 29). At an arabinose concentration of 0.001%, Cma(D226A) did not inhibit growth, but wild-type Cma and Cma(P107A), with 10% activity in the plate test, completely inhibited growth and lysed cells (Fig. 4A). Cma(P129A), Cma(P176A), and Cma(P260A) displayed residual activities, with Cma(P176A) having the lowest. To compare growth inhibition of wild-type with an *fkpA* mutant, we increased the level of the Cma mutant proteins by enhancing transcription with a higher arabinose concentration (0.01%). At this concentration, Cma(D226A) failed to inhibit growth (Fig. 4B), which indicated that growth inhibition by interference with protein secretion played no role. The Cma P → A mutant proteins now inhibited growth, which was abolished in the *fkpA* strain. Regardless of whether Cma and its mutant derivatives were imported across the outer membrane or secreted across the cytoplasmic membrane, they required FkpA to be active in the periplasm.

Cma Activation by FkpA

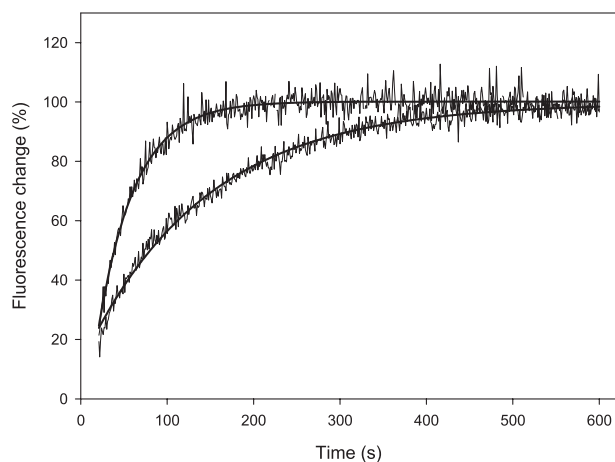


FIGURE 5. Time-dependent spontaneous *cis-trans* isomerization of peptide *p*-aminobenzoyl-CFPVC-(NO₂)Tyr-NH₂ (lower curve) and FkpA-catalyzed *cis-trans* isomerization of peptide *p*-aminobenzoyl-CFPVC-(NO₂)Tyr-NH₂ (upper curve) after reduction of the disulfide bond with DDT.

Catalysis of Prolyl *Cis-Trans* Isomerization of the Phe-Pro-176 Bond by FkpA—Cma(P176A) shocked into the periplasm had a 10-fold lower activity than the other Cma P → A mutants. This residual activity was independent of FkpA, which suggested that the replacement of Pro-176 by alanine affected interaction with FkpA. The Phe-Ala-176 bond is not a substrate of FkpA since FkpA-type PPIases do not catalyze *cis-trans* isomerization of nonprolyl peptide bonds (37). To test whether the Phe-Pro-176 bond serves as a substrate for the FkpA PPIase, we used a novel peptide assay. Disulfide-constrained synthetic pentapeptide derivatives of the amino acid sequence *p*-aminobenzoyl-Cys-Xaa-Pro-Yaa-Cys-(NO₂)Tyr-NH₂ exhibit a high content of Xaa-Pro *cis* conformation (38). Upon opening of the disulfide bridge by reduction, the *cis/trans* ratio declines to an open-chain *cis* isomer level of ~15% (39). Only in the *cis* conformation is the fluorescence of the *p*-aminobenzoyl group efficiently quenched by the nitrotyrosine amide. After reduction of the disulfide bridge, fluorescence increases during *cis/trans* interconversion of the Xaa-Pro bond. This slow reaction is accelerated by PPIases, which use the peptides as substrates.

We compared spontaneous and FkpA-catalyzed *cis-trans* isomerization of the substrate *p*-aminobenzoyl-CFPVC-(NO₂)Tyr-NH₂, which represents the amino acid sequence adjacent to Cma Phe-Pro-176-Val, and used as controls *p*-aminobenzoyl-CKPAC-(NO₂)Tyr-NH₂ and *p*-aminobenzoyl-CLPGC-(NO₂)Tyr-NH₂, which represent the amino acid sequences adjacent to Cma Lys-Pro-107-Ala and Cma Leu-Pro-260-Gly, respectively. FkpA was purified to electrophoretic homogeneity by Ni-NTA-agarose chromatography and subsequent gel filtration on a Superdex 75 column. FkpA considerably accelerated *cis-trans* isomerization of the prolyl bond in Phe-Pro-176-Val as compared with uncatalyzed spontaneous *cis-trans* isomerization (Fig. 5). The k_{cat}/K_m value of the catalyzed reaction was similar to the k_{cat}/K_m values of FKBP-type PPIases with optimal substrates (40). The k_{cat}/K_m value was 14- and 12-fold more efficient than the

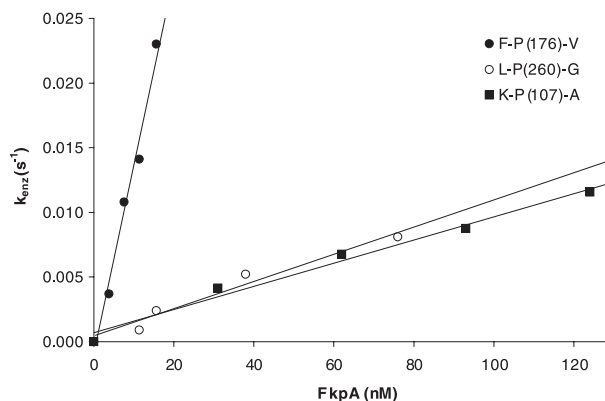


FIGURE 6. Determination of k_{cat}/K_m of FkpA-catalyzed *cis-trans* isomerization of the Phe-Pro-176 bond in *p*-aminobenzoyl-CFPVC-(NO₂)Tyr-NH₂, the Lys-Pro-107 bond in *p*-aminobenzoyl-CKPAC-(NO₂)Tyr-NH₂, and the Leu-Pro-260 bond in *p*-aminobenzoyl-CLPGC-(NO₂)Tyr-NH₂ by measuring the linear dependence of k_{enz} on the concentration of FkpA.

TABLE 5

Catalysis of prolyl *cis-trans* isomerization of Cma peptides by FkpA, FkpA43, and FkpA313

ND, not determined.

Cma prolyl bond	k_{cat}/K_m FkpA	k_{cat}/K_m FkpA43	k_{cat}/K_m FkpA313
	$M^{-1} s^{-1}$	$M^{-1} s^{-1}$	$M^{-1} s^{-1}$
Phe-Pro-176	$(1.38 \pm 0.12) \times 10^6$	$(6.61 \pm 0.33) \times 10^5$	$(3.45 \pm 0.43) \times 10^3$
Leu-Pro-260	$(1.15 \pm 0.11) \times 10^5$	$(1.34 \pm 0.17) \times 10^5$	$(5.11 \pm 1.44) \times 10^3$
Lys-Pro-107	$(9.69 \pm 0.67) \times 10^4$	ND	ND

k_{cat}/K_m values of the Lys-Pro-107-Ala and Leu-Pro-260-Gly peptides, respectively (Fig. 6, Table 5). The low value of the Lys-Pro-107-Ala peptide is particularly interesting because it indicates that the only *cis* prolyl bond in Cma is unlikely to be the site of FkpA *cis-trans* isomerization.

To further support the role of FkpA PPIase activity for Cma activity, we determined the catalytic efficiency toward the Phe-Pro-176-Val and Leu-Pro-260-Gly derivatives using the FkpA313 mutant protein, which contains a G148D replacement in the PPIase domain and does not mediate Cma sensitivity to cells (11). Only a very low *in vitro* PPIase activity of FkpA313 was observed with both peptides; the activity amounted to 0.4 and 0.2% that of wild-type FkpA (Table 5). The data were further corroborated by the temperature-sensitive mutant FkpA43, which confers 10% activity to Cma at 30 °C and no activity at 42 °C (11). It displayed a 2-fold lower PPIase activity than wild-type FkpA for Phe-Pro-176-Val and a 5-fold lower activity for Leu-Pro-260-Gly than for Phe-Pro-176-Val (measured at 10 °C) (Table 5). The near inactivity of mutant Cma(P176A) in lysing cells and the high efficiency of FkpA in the catalysis of the *cis-trans* isomerization of Phe-Pro-176-Val peptide suggest that Phe-Pro-176 is the Cma peptide bond that is most likely catalytically *cis-trans* isomerized by FkpA.

DISCUSSION

Periplasmic folding helper proteins interact with outer membrane proteins, and a considerable degree of redundancy and overlap in their function is observed (41–49). For the periplasmic PPIases FkpA, PpiA, PpiD, and SurA of *E. coli*, no

specificity for a distinct protein has been found, and no defined prolyl bond of a bacterial protein *cis-trans* isomerized by a PPIase has been identified yet. The strict dependence of Cma toxicity on FkpA allowed us to search for a correlation between Cma activity and FkpA catalysis of *cis-trans* isomerization of a specific prolyl bond of Cma. Using such an approach, we could identify a critical prolyl bond of Cma.

The 15 Cma proline-to-alanine replacement mutants encompassed all proline residues in Cma. Three mutants showed a strongly reduced (1%) killing of *E. coli*. A fourth mutant, Cma(P107A), had 10% of Cma wild-type activity in plate assays. This mutant was interesting because Pro-107 forms the only prolyl *cis* peptide bond in Cma. Strongly increased activity after bypassing the energy-coupled uptake by osmotic shock suggested that three mutant proteins (Cma(P107A), Cma(P129A), and Cma(P260A)) were impaired in uptake. Indeed, Cma(P129A) did not bind to the FhuA receptor. The translocation efficiency of Cma(P107A) was probably affected by the isomerization of the Lys-Pro *cis* bond to a Lys-Ala *trans* bond even though this conversion altered the protein crystal structure only locally. Because the molecular mechanism of Cma translocation and in fact of any colicin across the outer membrane is unknown, it is not clear to what extent regions other than the translocation domain (residues 1–35) contribute to uptake across the outer membrane. The same reasoning applies to Cma(P260A), whose mutation is not located in the translocation domain but, rather, in the activity domain.

Cma(P176A) was the only mutant with very low activity (1%) that remained nearly inactive when it was osmotically shocked into cells. It also displayed the lowest activity when it was equipped with a signal sequence, which allowed it to be secreted from the cytoplasm into the periplasm. Because the crystal structure of Cma(P176A) did not differ from the crystal structure of wild-type Cma, it is unlikely that the mutation affects the active center of Cma(P176A). Pro-176 is exposed at the Cma surface (Fig. 1) and its conversion to A176 does not change the Cma structure beyond the mutation site.

Previous results indicate that Pro-176 is not in the active site of Cma (8, 9, 29). Random and site-directed mutagenesis of *cma* localized the active center around residue D226, a strictly conserved residue in a region in which the Cma-type sequences display the highest level of identity (8, 9). Pro-176 is located far from Asp-226 (Fig. 1). If the P176A mutation affects Cma activity independent of catalysis by FkpA, the mutation must have a long distance structural effect on the active center; such an effect was not observed in the crystal structure. We also found no evidence for a structural alteration of Cma(P176A) in solution; it acted like wild-type Cma with regard to proteinase K digestion, thermal denaturation, and urea denaturation.

FkpA exhibits PPIase and chaperone activities with artificial substrates (13, 15, 16). FkpA reactivates Cma denatured with 5 M guanidine hydrochloride, which is inhibited by FK506 (11), an inhibitor of the PPIase activity. In addition, the G148D mutation in the FkpA PPIase center abolishes Cma renaturation (11) and confers resistance to Cma. Additional mutants in the PPIase domain and only in the PPIase domain,

G176D and G180D, were isolated by independent random mutagenesis, which did not confer Cma sensitivity.³ Arié *et al.* (13) isolated by site-specific mutagenesis FkpA mutants I174S and I174S/G176S and found no or only 5% PPIase activity but unaltered chaperone activity using a standard protease-coupled peptide assay. These mutants strongly favor the PPIase activity in Cma activation. In this study Phe-Pro-176 is the only bond left for *cis-trans* isomerization. The high catalytic efficiency of FkpA toward the Phe-Pro-176 peptide substrate, which was 14- and 12-fold higher than toward the Lys-Pro-107 and Leu-Pro-260 peptide substrates agrees with this proposal.

Pro-176 is exposed at the surface of Cma (Fig. 1) and can, thus, be approached by FkpA. Pro-107 and -260 are also close to the surface but are less exposed than Pro-176. Pro-129 is buried inside Cma and cannot be reached by FkpA unless strong structural alterations are induced by binding of Cma to FkpA before catalysis of *cis-trans* isomerization. The location of the Phe-Pro-176 bond makes it the most likely candidate for *cis-trans* isomerization.

Despite strong evidence for the PPIase activity of FkpA in Cma activation, its chaperone activity should also be considered. Cma(P176A) transferred into the periplasm by osmotic shock did not respond to FkpA as the residual activity was not altered in the *fkpA* deletion mutant (Table 4). However, Cma(P176A) secreted from the cytoplasm into the periplasm by a signal sequence fused to Cma(P176A) stopped growth of the *fkpA* wild-type cells and failed to stop growth of the *fkpA* mutant. Although this activity was weak and was only observed after increased synthesis of Cma(P176A), it nevertheless demonstrates some response of Cma(P176A) to FkpA. We assign this activity to the chaperone function of FkpA in the periplasm. However, an exclusive FkpA chaperone activity for activation of Cma would not show such a high site specificity as found for the inactive point mutants in the PPIase domain.

Cma must unfold at least partially during translocation across the outer membrane and, when fused to a signal sequence, during translocation across the cytoplasmic membrane. Unfolding may convert the Phe-Pro-176 *trans* bond into a *cis* bond. *Trans* to *cis* isomerization also occurred in Cma mutant proteins in which Pro-176 was replaced by Ala, Gly, Leu, Val, Thr, Lys, and Asp. These derivatives were all inactive or nearly inactive because the lack of Pro prevented FkpA-catalyzed *cis* to *trans* isomerization during refolding in the periplasm. The conversion involves the PPIase, but the chaperone function of FkpA also contributes to Cma activation. Direct determination of the *cis* to *trans* conversion is hampered by the few molecules of Cma in the periplasm, which are sufficient to kill cells (20) and the much larger unspecific adsorption of Cma to the cells. In addition, we found no suitable wavelength at which fluorescence changes reflected structural changes during *in vitro* refolding of denatured Cma by FkpA (11). Cma refolding may contribute energy for translocation. In addition, FkpA may

³ S. I. Patzer, unpublished results.

Cma Activation by FkpA

act as a chaperone that binds imported Cma and prevents proteolytic degradation of the unfolded protein. Multiple functions of FkpA (Cma refolding, binding of Cma in the periplasm, and positioning of Cma to the substrate site) best explain the complete dependence of Cma activity on FkpA.

Acknowledgments—We thank Dr. Reinhard Albrecht and Kerstin Bär for valuable help in protein crystallization, Dr. Andrei Lupas for generous support, and Karen A. Brune for critically reading the manuscript. We cordially thank the beamline staff from the Max Planck beamline PX10 at the Swiss Light Source for great help and beamline maintenance.

REFERENCES

- Schaller, K., Höltje, J. V., and Braun, V. (1982) *J. Bacteriol.* **152**, 994–1000
- Harkness, R. E., and Braun, V. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 6177–6182
- El Ghachi, M., Bouhss, A., Barreteau, H., Touzé, T., Auger, G., Blanot, D., and Mengin-Lecreulx, D. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 22761–22772
- Braun, V. (1995) *FEBS Microbiol. Rev.* **16**, 295–307
- Braun, V., Patzer, S. I., and Hantke, K. (2002) *Biochimie* **84**, 365–380
- Postle, K., and Larsen, R. A. (2007) *Biometals* **20**, 453–465
- Dreher, R., Braun, V., and Wittmann-Liebold, B. (1985) *Arch. Microbiol.* **140**, 343–346
- Zeth, K., Römer, C., Patzer, S. I., and Braun, V. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 25324–25331
- Barreteau, H., Bouhss, A., Gérard, F., Duché, D., Boussaid, B., Blanot, D., Llobès, R., Mengin-Lecreulx, D., and Touzé, T. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 12378–12389
- Braun, V., Frenz, J., Hantke, K., and Schaller, K. (1980) *J. Bacteriol.* **142**, 162–168
- Hullmann, J., Patzer, S. I., Römer, C., Hantke, K., and Braun, V. (2008) *Mol. Microbiol.* **69**, 926–937
- Danese, P. N., and Silhavy, T. J. (1997) *Genes Dev.* **11**, 1183–1193
- Arié, J. P., Sassoon, N., and Betton, J. M. (2001) *Mol. Microbiol.* **39**, 199–210
- Bothmann, H., and Plückthun, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17100–17105
- Ramm, K., and Plückthun, A. (2001) *J. Mol. Biol.* **310**, 485–498
- Saul, F. A., Arié, J. P., Vulliez-le Normand, B., Kahn, R., Betton, J. M., and Bentley, G. A. (2004) *J. Mol. Biol.* **335**, 595–608
- Betton, J. M. (2007) in *The Periplasm* (Ehrmann, M., ed) pp. 141–149, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Kleinschmidt, J. H. (2007) in *The Periplasm* (Ehrmann, M., ed) pp. 30–66, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Mogensen, J. E., and Otzen, D. E. (2005) *Mol. Microbiol.* **57**, 326–346
- Schaller, K., Dreher, R., and Braun, V. (1981) *J. Bacteriol.* **146**, 54–63
- Kabsch W. (2010) *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66b**, 125–132
- Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M., and Dodson, E. (2003) *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **59**, 1131–1137
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132
- Laskowski, R. A., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) *J. Mol. Biol.* **231**, 1049–1067
- Kabsch, W., and Sander, C. (1983) *Biopolymers* **22**, 2577–2637
- Thumm, G., Olschläger, T., and Braun, V. (1988) *Plasmid* **20**, 75–82
- Nossal, N. G., and Heppel, L. A. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 3055–3062
- Tilby, M., Hindennach, I., and Henning, U. (1978) *J. Bacteriol.* **136**, 1189–1191
- Pilsil, H., Glaser, C., Gross, P., Killmann, H., Olschläger, T., and Braun, V. (1993) *Mol. Gen. Genet.* **240**, 103–112
- Kadner, R. J., and Heller, K. J. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 4829–4935
- Harkness, R. E., and Braun, V. (1990) *Mol. Gen. Genet.* **222**, 37–40
- Olschläger, T., Turba, A., and Braun, V. (1991) *Mol. Microbiol.* **5**, 1105–1111
- Gross, P., and Braun, V. (1996) *Mol. Gen. Genet.* **251**, 388–396
- Olschläger, T. (1991) *Arch. Microbiol.* **156**, 449–454
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., and Beckwith, J. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 4121–4130
- Benson, S. A., Bremer, E., and Silhavy, T. J. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 3830–3834
- Schiene-Fischer, C., Habazettl, J., Schmid, F. X., and Fischer, G. (2002) *Nat. Struct. Biol.* **9**, 419–424
- Fischer, G., and Aumüller, T. (2003) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **148**, 105–150
- Weisshoff, H., Frost, K., Brandt, W., Henklein, P., Mügge, C., and Frömmel, C. (1995) *FEBS Lett.* **372**, 203–209
- Harrison, R. K., and Stein, R. L. (1990) *Biochemistry* **29**, 3813–3816
- Chen, R., and Henning, U. (1996) *Mol. Microbiol.* **19**, 1287–1294
- Justice, S. S., Hunstad, D. A., Harper, J. R., Duguay, A. R., Pinkner, J. S., Bann, J., Frieden, C., Silhavy, T. J., and Hultgren, S. J. (2005) *J. Bacteriol.* **187**, 7680–7686
- Qu, J., Mayer, C., Behrens, S., Holst, O., and Kleinschmidt, J. H. (2007) *J. Mol. Biol.* **374**, 91–105
- Rizzitello, A. E., Harper, J. R., and Silhavy, T. J. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 6794–6800
- Rouvière, P. E., and Gross, C. A. (1996) *Genes Dev.* **10**, 3170–3182
- Schäfer, U., Beck, K., and Müller, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 24567–24574
- Sklar, J. G., Wu, T., Kahne, D., and Silhavy, T. J. (2007) *Genes Dev.* **21**, 2473–2484
- Stymest, K. H., and Klappa, P. (2008) *FEBS* **275**, 3470–3479
- Vertommen, D., Ruiz, N., Leverrier, P., Silhavy, T. J., and Collet, J. F. (2009) *Proteomics* **9**, 2432–2443
- Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986) *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130
- Mende, J., and Braun, V. (1990) *Mol. Microbiol.* **4**, 1523–1533
- Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580
- Tabor, S., and Richardson, C. C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 1074–1078
- Braun, M., Endriss, F., Killmann, H., and Braun, V. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 5508–5518

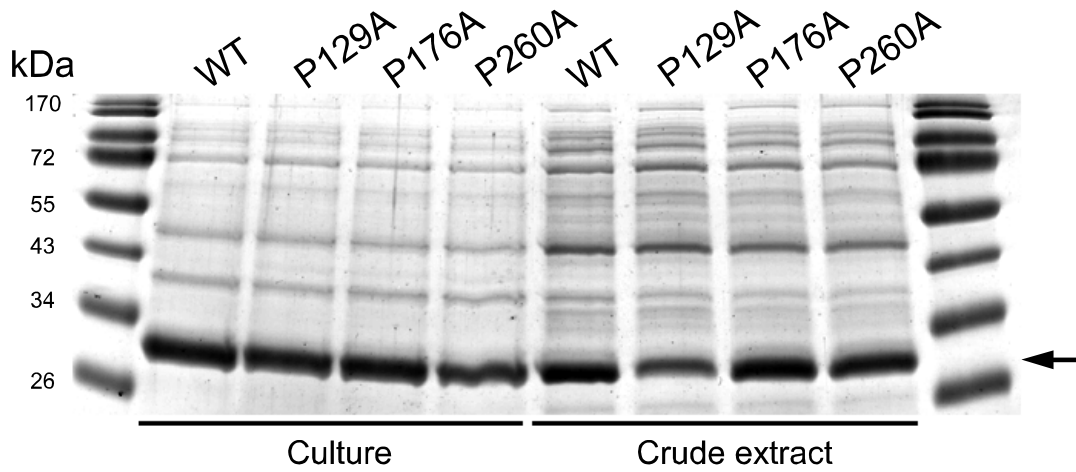


Fig.S1. SDS-PAGE of Cma samples of the indicated *cma* wild-type and mutant strains harvested at the same OD_{578} . The same aliquots of the cultures and the crude extracts were subjected to electrophoresis. The far left and far right lanes contain protein size standards. The arrow indicates the position of Cma.

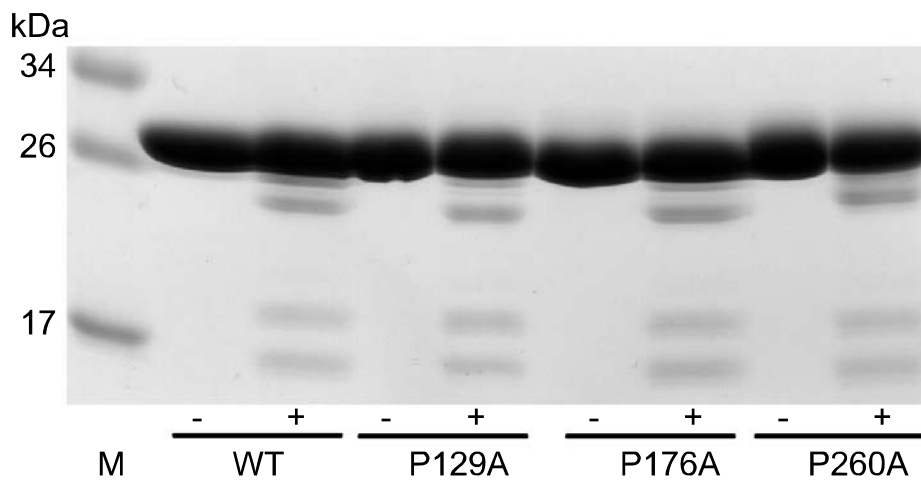


Fig. S2. SDS-PAGE of Cma and mutant Cma proteins purified by Ni-NTA agarose chromatography. +, incubation of Cma protein with proteinase K; -, no incubation with proteinase K. M indicates protein size standards.

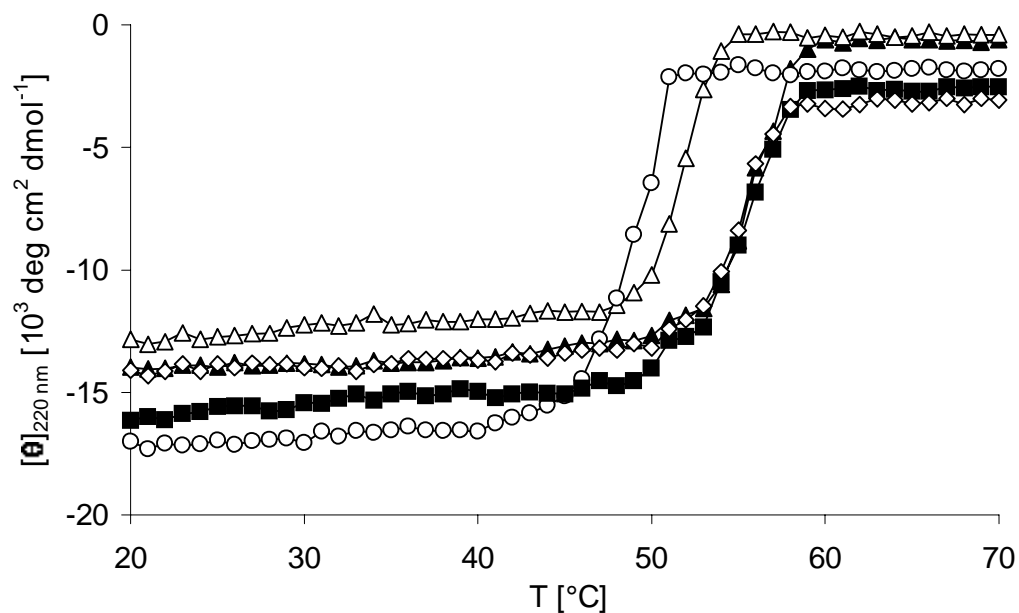


Fig. S3. Temperature-dependent denaturation of Cma and mutant Cma proteins as determined by CD spectroscopy at 220 nm. Cma wild-type (\blacktriangle), Cma(P107A (\triangle), Cma(P129A (\circ), Cma(P176A (\blacksquare), and Cma(P260A (\diamond). The protein concentrations were adjusted to 20 μ M.

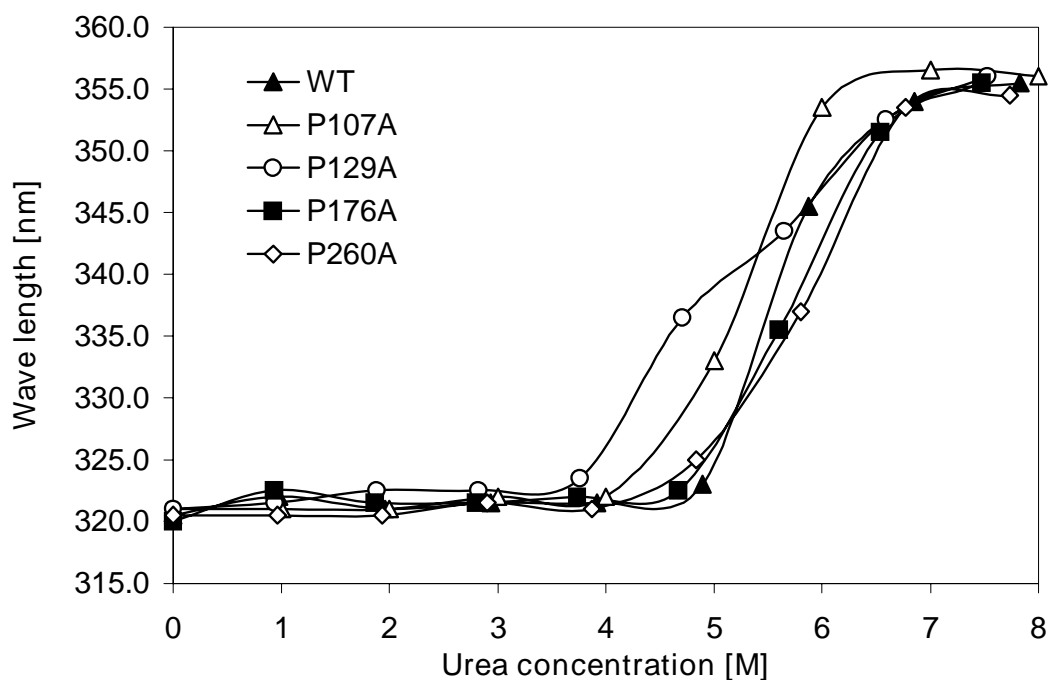


Fig. S4. Denaturation of Cma and mutant Cma proteins by various concentrations of urea. The shift in the fluorescence peak was determined.

“CbrA is a FAD Protein that Modifies the *E. coli* Outer Membrane and Confers Specific Resistance to Colicin M”

Stephanie Helbig¹, Klaus Hantke², Moritz Ammelburg¹ and Volkmar Braun¹
Max Planck Institute for Developmental Biology¹, and IMIT, University of
Tübingen², D-72076 Tübingen, Germany

Key words: CbrA, outer membrane, colicin M

Running title: CbrA alters outer membrane permeability.

Address: Volkmar Braun

Max Planck Institute for Developmental Biology

Spemannstrasse 35

72076 Tübingen / Germany

Phone: 49 7071 601343. Fax: 49 7071 601349.

E-mail: volkmar.braun@tuebingen.mpg.de

Abstract

Colicin M (Cma) is a bacterial protein toxin that kills cells by inhibiting murein biosynthesis in the periplasm. *cbrA* is a gene in the *Escherichia coli* genome with no assigned function. Overexpression of plasmid-encoded *cbrA* strongly increased resistance of cells to Cma, whereas deletion of *cbrA* increased Cma sensitivity. Transcription of *cbrA* was controlled by the two-component *creBC* system which is activated during growth on minimal medium with fermentable carbon sources. Under such growth conditions, cells acquired partial Cma resistance. A deletion mutant in *creB* was highly Cma sensitive since expression of CbrA was low. Transcription of *lacZ* under *cbrA* promoter control was induced in minimal medium which demonstrated *cbrA* expression under growth-limiting conditions. Treatment of CbrA overproducing cells by osmotic shock failed to render cells Cma-sensitive since cells were resistant to osmotic shock. It is concluded that CbrA alters the outer membrane that import of Cma is decreased and transfer of Cma into the periplasm by osmotic shock is largely prevented. At natural growth-limiting nutrient supply, cells defend themselves against colicin M produced by competing cells by synthesis of CbrA which prevents uptake of Cma. Isolated CbrA is a protein with non-covalently bound FAD. Sequence comparison and structure prediction assign CbrA to the digeranylgeranyl-glycerophospholipid reductase of *Thermoplasma acidophilum* as the closest relative with a known crystal structure. Reduction could convert lipid II into a substrate that is no longer cleaved by Cma.

Colicin M (Cma) is frequently encoded on plasmids of naturally *Escherichia coli* isolates (Christenson and Gordon, 2009). It usually forms an operon with colicin B. Transcription of both colicins is regulated by the SOS response through an SOS box in front of the colicin B activity gene (Ölschläger et al., 1984; Köck et al., 1987). Sensitive cells take up Cma into the periplasm where it inhibits murein biosynthesis by interfering with lipid carrier recycling (Schaller et al., 1982; Harkness and Braun, 1989a). It cleaves the phosphate ester bond between the precursor of murein biosynthesis, and the lipid carrier resulting in PP-MurNAc (pentapeptide)-GlcNAc that is not incorporated into the growing murein layer and undecaprenol that no longer serves as lipid carrier (El Gachi et al., 2006). Murein synthesis is inhibited and cells lyse.

Import of Cma occurs through the outer membrane transporter FhuA that must be coupled to the energy-providing electrochemical potential of the cytoplasmic membrane through the activity of the TonB, ExbB and ExbD proteins (Ton system) (Braun et al., 2002). For the uptake of Cma TonB must interact with FhuA and Cma (PilsI et al., 1993). Mutations in each of these proteins confer resistance to Cma. Additional mutations originally designated *tolM* from tolerance to colicin M (Braun et al., 1980; Schaller et al., 1981) turned later out to be located in *fkpA* that encodes a periplasmic chaperone/prolyl *cis-trans* isomerase (Hullmann et al., 2008). Point mutants in the isomerase domain of FkpA and *fkpA* deletion strains are completely resistant to Cma. FkpA is essential for Cma action and is only required for Cma and no other tested colicin. The crystal structure of Cma reveals a compact structure (Zeth et al., 2008) that must unfold in order to be translocated across the outer membrane. Evidence has been obtained that Cma changes its conformation upon binding to FhuA (Hullmann et al., 2008). FkpA interacts with Cma and accelerates refolding of denatured Cma in vitro (Hullmann et al., 2008). Substitution of a single proline residue outside the active center of Cma (Barreteau et al., 2010; Helbig and Braun, 2011; PilsI et al., 1993) by other residues inactivates Cma (Helbig et al., 2011). The proline bond built into a synthetic peptide is *cis-trans* isomerized with a high rate by FkpA suggesting that this is the site that is *cis-trans* isomerized in Cma. It is proposed

that unfolding of Cma during import involves a *trans* to *cis* isomerization of this proline bond which is *cis* to *trans* isomerized by FkpA during Cma refolding in the periplasm (Helbig et al., 2011).

Prior to the identification of *tolM* as *fkpA*, we attempted to characterize *tolM* by cloning the mutated gene on plasmids. Two plasmids were obtained that conferred high but not complete resistance to Cma. Here we report that the gene in question is *yidS*, now designated *cbrA*. Hitherto, no function has been assigned to CbrA. The promoter of *cbrA* is predicted to respond to CreB which is part of a two-component regulatory system in which CreC serves as sensor of an unknown signal (Avison et al., 2001; Cariss et al., 2008; Nikel et al., 2009). Transcription by CreBC is enhanced in minimal media. CbrA-mediated Cma resistance was higher in cells grown in minimal medium than in rich medium. A *creB* mutant was as sensitive to Cma as a *cbrA* mutant. Transcription of *cbrA* was controlled by *creB*. The *cbrA* transcription rate was correlated with the level of Cma resistance. Only a small portion of cells with overexpressed *cbrA* were killed by Cma when Cma was transferred into the periplasm by osmotic shock since cells were rather resistant to osmotic shock. This finding suggests that overexpressed CbrA alters the outer membrane that it becomes refractory to Cma uptake. Since under natural conditions nutrient supply is usually limited, sensitive cells gain resistance to Cma by initiating *cbrA* transcription. The protein encoded by *cbrA* contains non-covalently bound FAD which supports the prediction from sequence comparison that CbrA is a FAD/NAD(P)-dependent oxidoreductase. The closest relative of CbrA with a known crystal structure is the digeranylgeranylglycerophosphate reductase of *Thermoplasma acidophilum*.

MATERIALS AND METHODS

Strains and plasmids used in this study. Strains and plasmids are listed in Table 1. The plasmid pEG5005 with a mini-Mu element was used for *in vivo* cloning experiments of *tolM* (*fkpA*) as described by Groisman and Casadaban 1986. Plasmids pAB115 (vector pWSK29) and pKH35 (vector pACYC184) were subclones of pEG5005-derived plasmids which conferred colicin M tolerance.

pSH150 was constructed by introducing 5' a *NcoI* and 3' a *XhoI* cleavage site into pAB115 by PCR with PhusionTM high fidelity polymerase of Finnzymes Oy, Vantaa, Finland with the primers 5'-GAATGTGAGTGAAACCATGGAACA-TTTCGACGTG-3' and 5'-CGATGTGAAGCGCGTCTCGAGATCCTTCAAC-TGTG-3'. The resulting DNA fragment comprising *cbrA* was cloned into pET28b cleaved with *NcoI/XhoI*. Plasmid pKH55 and λ *pcbrA-lacZ* were constructed according to Simons *et al.* 1987. The primers 5'-GGTACTGAATTCGAG-TTCATGCATTACATGG-3' and 5'-GCATCAGGATCCATCTTTTCACTCACATTCATCAG-3' were used to amplify a 580 bp DNA fragment from chromosomal *E. coli* DNA. The fragment was digested with *EcoRI/BamHI* and ligated into the digested vector pRS415 so that the Met codon of *cbrA* became the start codon of *lacZ*. The expression of *lacZ* from this plasmid pKH55 was very low. To obtain the *pcbrA-lacZ* fusion on a λ phage a λ *pfepA-lacZ* phage making blue plaques on X-Gal plates was used to find the recombinant λ *pcbrA-lacZ* phage making colorless plaques. The recombinant phage was examined by PCR. This phage was used to lysogenize the strains BW25113, JW5631 Δ *cbrA* and JW4361 Δ *creB*.

In pKH569 the kanamycin resistance marker of pGP1-2 was replaced by the chloramphenicol resistance marker (H. Killmann, this institute).

Growth of cells. Cells were grown at 37°C aerobically or anaerobically in LB medium (per liter 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl), or in M9 medium (per liter 12.8 g Na₂HPO₄ × 7 H₂O, 3 g KH₂PO₄, 0.5 g NaCl, 1 g NH₄Cl, 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 0.4% glucose, 0.0002% thiamine), supplemented when required with 50 µg/ml kanamycin, 40 µg/ml chloramphenicol, or 75 µg/ml ampicillin. Chemicals were purchased from Sigma, Steinheim, Germany.

Undecylmaltoside was from Glycon Biochemicals, Luckenwalde, Germany. Overnight cultures grown aerobically or anaerobically were diluted and grown with shaking at 200 rpm and 37°C to an optical density at 578 nm (OD₅₇₈) of 0.3 until Cma, Cba, or chemicals were added. Growth was continued and monitored by measuring OD₅₇₈. Anaerobic growth conditions were created by filling 2.5 ml tubes with the culture and tight sealing. OD₅₇₈ was determined after 5 h of growth.

Colicin sensitivity assays. Cma was overexpressed and purified as previously described (Zeth et al., 2008). Cma sensitivity of cells was determined with purified Cma or with a cell crude extract in which Cma was by far the most prominent protein (Helbig and Braun, 2011). Cba was overexpressed and the activity determined as previously described (Helbig et al., 2011). The crude Cma and Cba extracts contained approximately 1 mg colicin per ml. A 10-fold dilution series was dropped on agar plates seeded with the strain to be tested, or added to liquid cultures (final concentration 1 µg/ml). Transfer of purified Cma into the periplasm by the osmotic shock procedure was performed as described previously (Helbig and Braun, 2011; Helbig et al., 2011).

Sensitivity of *cbrA* overproducing cells to colicins A, B, D, E1, E3, Ib, k, l, N, S4, U, 5, and 10 was determined with 10 µl of crude cell extracts dropped on LB agar plates seeded with *E. coli* AB2847 transformed with plasmids pSH150 *cbrA* and pHK569 which is a derivative of pGP1-2 (Tabor and Richardson, 1985) and encodes the T7 polymerase under the control of the heat-sensitive *c1857* λ repressor. Cells were grown at 30°C to an OD₅₇₈ of 0.4 and then shifted for 30 min to 42°C, and then for 2 h at 37°C until they were spread on the nutrient agar plates and incubated overnight at 37°C with the colicins. Untransformed *E. coli* AB2847 was used as a control.

Determination of β-galactosidase activity. Cells transformed with pHK55 *cbrA-lacZ* were grown aerobically in M9 medium or in LB medium at 37°C. At an OD₅₇₈ of 0.6 cells of 1 ml culture were harvested by centrifugation at 4°C for 10 min and the sediment suspended in 1 ml buffer Z that contained 10 µl 0.1% SDS and 20 µl chloroform (Miller 1992). The suspensions were vortexed for 10 sec and

then incubated for 8 min at 28°C after which 0.2 ml *ortho*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) (4 mg/ml in buffer Z) was added. After 150 min incubation at 28°C the reaction was stopped by adding 0.5 ml 1 M Na₂CO₃. The samples were centrifuged for 10 min at 4°C and OD₄₂₀ was measured. Cells were grown in tightly sealed tubes anaerobically in M9 medium overnight, OD₅₇₈ was measured and β -galactosidase activity determined as described above. β -galactosidase activity of cells with chromosomally encoded *cbrA-lacZ* was determined with 5 ml cultures and cells were disrupted with 20 μ l 0.1% SDS and 40 μ l chloroform. Incubation with ONPG was carried out for 210 min.

Isolation of CbrA. *E. coli* BL21(DE3) pSH150 *cbrA* was grown in 1.6 liter LB medium to an OD₅₇₈ of 0.5, IPTG was added to a final concentration of 1 mM and the cells further cultured for 3 h. Cells were harvested by centrifugation and suspended in 50 ml HSG buffer (20 mM Hepes, 200 mM NaCl, 10% glycerol) supplemented with 10 mM MgCl₂, 1 mg DNase and 1 tablet of complete serine/cysteine protease inhibitor cocktail free of EDTA (Roche, Mannheim Germany). Cells were disrupted in the French Press and the suspension centrifuged for 45 min at 126,000g at 4°C. The sediment was suspended in HSG buffer supplemented with 1% undecyl maltoside (UDM) and the protease inhibitor mixture and stirred overnight at 4°C. The suspension was centrifuged and the CbrA containing supernatant applied to a 1 ml Ni-NTA agarose column (GE Healthcare, Munich, Germany) equilibrated with the HSG buffer that contained 0.1% UDM and 20 mM imidazole. The column was washed with equilibration buffer and the protein first eluted with HSG, 0.1% UDM 200 mM imidazole and then with HSG, 0.1% UDM, 1 M imidazole. The eluted fractions were examined by SDS-PAGE as described previously (Helbig and Braun, 2011).

Determination of FAD. The supernatant of the Ni-NTA agarose fraction in HSG, 0.1% UDM, 1 M imidazole was analyzed in a Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis spectrometer and compared with commercial FAD. In addition, the supernatant was examined by high performance liquid chromatography (HPLC). Aliquots (5 μ l) were injected onto a HPLC column (125x3 mm i.d., pre-column 20 x 3 mm i.d.) packed with 5- μ m Nucleosil-100 C18 (Maisch, Ammerbuch, Germany). The

samples were analyzed by linear gradient elution using 0.1% *ortho*-phosphoric acid as solvent A and acetonitrile as solvent B at a flow rate of 0.85 ml/min. The applied gradient was from 4.5 to 100% solvent B in 15 min with a 3 min hold at 100% solvent B. The HPLC analysis was performed by Marcell Wagner, IMIT, University of Tübingen.

Bioinformatics. Homologs of the CbrA protein of *E. coli* K-12 (GI: 161784314), were identified searching the non-redundant database at NCBI with PSI-BLAST (Altschul et al., 1997). FAD-binding oxidoreductases of the Rossmann fold (Rossmann et al., 1974) were retrieved as the closest homologs. The 2000 most similar sequences obtained by three iterations of PSI-BLAST were clustered in CLANS with BLAST as a comparison tool (Frickey and Lupas, 2004). Clustering was performed in default settings with a P-value cut off of 1.0e-15.

HHpred, a remote homology detection method based on the comparison of profile hidden Markov models, was used to search for homologs of known structure (Söding et al., 2005). Searches with CbrA proteins against the protein Data Bank (Berman et al., 2000), as available on 4 February 2012 and clustered at 70% pair wise sequence identity, found the geranylgeranyl reductase of the archaeon *T. acidophilum*, PDB-identifier 3OZ2 (Xu et al., 2010), as the top hit. HHpred retrieved a P-value of 1.0e-49 and 20% pair wise sequence identity for 3OZ2 using two iterations of PSI-BLAST for multiple sequence alignment generation and activating the realignment with MAC option. Additional searches with CbrA against the SCOP database (Murzin et al., 1995) version 1.75 clustered at 70% pairwise sequence identity, confirmed the assignment of CbrA to the Rossmann fold type of FAD-binding oxidoreductases (Dym and Eisenberg, 2001).

A homology model of CbrA was generated with MODELLER (Sali and Blundell, 1993) using the geranylgeranyl reductase of the archaeon *T. acidophilum* as a template (Xu et al., 2010) relying on an alignment provided by HHpred. Molecular structures were rendered using PyMol (<http://pymol.org>).

RESULTS

Overexpressed *cbrA* confers resistance to Cma. Earlier attempts to clone the mutated *tolM* (*fkpA*) gene from the genome resulted in two plasmids which conferred partial resistance to Cma. Whereas a 10^5 -fold diluted Cma sample gave a clear lysis zone on nutrient agar plates seeded with *E. coli* AB2847, only turbid lysis zones up to a Cma dilution of 10^3 were observed on plates seeded with *E. coli* AB2847 pKH35. AB2847 pAB115 gave clear lysis zones up to a Cma dilution of 10^2 and a turbid zone at a dilution of 10^3 (Table 2). The transformants were at least 10^3 -fold less sensitive to Cma than the untransformed strain. Both plasmids conferred a different resistance level which was probably caused by the distinct copy numbers of the vectors. pACYC is a medium copy number plasmid (18 copies per cell) (Chang and Cohen, 1978), whereas pWSK29 is a low copy number vector (Wang and Kushner, 1991) (Table 1).

The entire insertions in the pKH35 and pAB115 plasmids were sequenced and both contained the same open reading frame which was identical to the *gidS* (*cbrA*) gene of the *E. coli* genome. Overexpression of *cbrA* cloned downstream the phage T7 gene 10 promoter on pSH150 to an even higher level by the phage T7 RNA polymerase resulted in a complete resistance to Cma (Table 2). These results suggest that Cma sensitivity is controlled by CbrA.

Comparison of the Cma sensitivity of the *cbrA* wild-type BW25113 with the *cbrA* deletion mutant JW5631 in LB medium revealed no difference (Table 2). As will be shown later, *cbrA* is only poorly transcribed in LB medium.

The level of Cma resistance depends on the level of CbrA expression. The above results suggest that the level of Cma resistance is correlated with the level of CbrA synthesis. *cbrA* is preceded by the repeat sequence TTCACnnnnnnTTCAC (Avison et al., 2001) which serves as a binding site of the transcriptional regulator CreB (Cariss et al., 2008). CreBC is a global two-component regulator of gene expression with CreC as sensor of an unknown signal. CreBC controlled transcription is initiated when cells are shifted from a rich medium into a poor medium, or when they are grown in minimal media with

fermentation of glycolytic carbon sources, or during aerobic growth when fermentation products serve as carbon sources (Cariss et al., 2008; Nikel et al., 2009).

Since *cbrA* transcription should be induced at nutrient-limiting growth conditions, as they usually occur in natural environments, the level of Cma resistance was tested in rich LB medium and in poor M9 medium. Cells were grown in the presence and absence of Cma. An example is given in Fig. 1 and the absorbance values after 150 min of growth are listed in Table 3. In M9 medium BW25113 *cbrA* wild-type was partially resistant to 1 µg/ml of Cma as seen by the increase in optical density which reached the value of 0.47 after 150 min. Cma resistance of BW25113 was increased when it was transformed with plasmid pKH35 *cbrA* ($OD_{578} = 0.76$). In LB medium BW25113 was fully sensitive ($OD_{578} = 0.08$) and became resistant when transformed with pKH35 *cbrA* ($OD_{578} = 1.01$). In contrast, the absorbance of the *cbrA* deletion mutant JW5631 decreased both in M9 and LB medium caused by Cma-induced cell lysis ($OD_{578} = 0.09$ and 0.07). These results suggested that chromosomally encoded *cbrA* caused partial resistance to Cma in M9 medium but not in LB medium, that overexpression of plasmid-encoded *cbrA* enhanced Cma resistance and lack of *cbrA* rendered cells Cma sensitive in both media. The level of CbrA that confers Cma resistance depends on the medium, whereas overexpression by plasmid-encoded *cbrA* is sufficiently high in both media to confer Cma resistance.

cbrA transcription is under the control of CreB (Avison et al., 2001; Cariss et al., 2010). If the level of CbrA controls Cma sensitivity, a *creB* deletion mutant should reduce *cbrA* transcription and render cells Cma-sensitive. This was indeed the case. The *creB* mutant JW4361 was completely Cma sensitive (Table 3). Transformation of JW4361 by pKH35 only slightly reduced Cma sensitivity. CreBC controlled genes are supposed to be more strongly expressed under anaerobic than under aerobic conditions (Avison et al., 2001). Due to a slower growth rate the absorbance reached after 150 min under anaerobic conditions was below the absorbance at aerobic conditions but the relative values were similar with two exceptions. BW25113 and JW4361 $\Delta creB$ pKH35 were more

resistant when grown anaerobically than aerobically (Table 3). Under anaerobic conditions *cbrA* on pKH35 was sufficiently expressed to confer Cma resistance although the CreB transcription initiator was lacking.

Colicin B (Cba) was used as a control to test whether the different growth rates in LB and M9 media affected the degree of colicin sensitivity and to see whether CbrA affected sensitivity to other colicins than Cma. Wild-type and mutant cells treated with Cba stopped growth to the same extent regardless whether they were grown in LB or M9 medium (examples are given in Fig. 1). Cba is a pore-forming colicin that does not immediately cause cell lysis (Pressler et al., 1986).

To further test the specificity of *cbrA*-related Cma resistance, *E. coli* AB2847 transformed with plasmids pSH150 *cbrA* and pKH569 were spread on nutrient agar plates onto which crude extracts of colicins were added. *cbrA* transcription on pSH150 was under the control of the gene 10 promoter of phage T7 which was transcribed by the T7 RNA polymerase encoded on pKH569. Transcription of the RNA polymerase gene was induced at 42°C prior to the addition of the colicins. Colicins A, B, D, E1, E3, Ib, K, L, N, S4, U, 5, and 10 formed clear lysis zones in contrast to Cma where no lysis zone was observed. Cma resistance by overexpressed CbrA is Cma specific.

Regulation of *cbrA* transcription. To further correlate the level of *cbrA* expression with Cma resistance, a fusion between the upstream region of *cbrA* including the repeat sequence TTCACAAGGACTTCAC and the *E. coli lacZ* gene was constructed. Cells were transformed with the resulting plasmid pKH55 *cbrA-lacZ* and the level of β -galactosidase activity was measured in rich LB medium and poor M9 medium under aerobic and anaerobic growth conditions (Table 4). The level of β -galactosidase activity in cells grown in M9 medium was 8-fold higher than in cells grown in LB medium. Lack of *creB* reduced β -galactosidase activity 4.5-fold under aerobic growth conditions and 9.1-fold under anaerobic growth conditions. To test whether the chromosomal *cbrA* promoter deprived CreB from the plasmid *cbrA* promoter and thus reduced *cbrA-lacZ* expression, β -galactosidase was also determined in a chromosomal *cbrA* deletion mutant

transformed with pKH55 *cbrA-lacZ*. The β -galactosidase levels in the *cbrA* mutant were not higher than in the *cbrA* wild-type strain (Table 4) showing that enough CreB was present to induce transcription of *cbrA-lacZ*. Anaerobically grown cells did not show a higher β -galactosidase activity but a somewhat lower activity which may be caused by the slower cellular growth rate, lower metabolic activity and lower β -galactosidase synthesis. In addition, *cbrA-lacZ* was integrated into the chromosome at the λ attachment site. The colonies were only slightly blue on X-gal plates. The β -galactosidase levels were much lower than the enzyme activities determined with plasmid encoded *cbrA-lacZ* (Table 4). However, the values were qualitatively similar to the values obtained with the pKH55 transformants in that the values were higher in cells grown in M9 than in LB, *creB* mutants displayed no or very low activity, and the *cbrA* mutant showed the highest activity. Growth under anaerobic conditions increased β -galactosidase activity. The higher values of the *cbrA* mutant may result from stress elicited by the lack of CbrA which leads to higher CreBC levels and in turn a higher *cbrA-lacZ* transcription. For the purpose of this paper it is important that the CbrA promoter-controlled β -galactosidase levels agree with the Cma resistance levels and further support the conclusion that it is CbrA that confers Cma resistance.

CbrA alters the *E. coli* membrane. To examine whether overexpressed CbrA inhibits Cma uptake, the Cma transport system via FhuA, TonB, ExbB, and ExbD was bypassed by osmotic shock treatment of cells. This widely used procedure to shock proteins out of the periplasm (Nossal and Heppel, 1966) can also be used to shock proteins into the periplasm. The procedure has been successfully used to shock Cma into the periplasm of Cma import mutants (Braun et al., 1980; Helbig and Braun, 2011). BW25113 and JW5631 were highly sensitive to Cma when treated by osmotic shock (less than 0.01% survivors) (Table 5). Unexpectedly, BW25113 pKH35 showed a rather high level of resistance (34% survivors). Resistance was caused by resistance of the cells to osmotic shock as in the absence of Cma 54% of the cells survived the osmotic shock treatment as

compared to 16% of the untransformed cells. JW5631 *cbrA* was highly Cma sensitive and showed without osmotic shock 18 times less survivors than wild-type BW25113. In contrast, overproduction of plasmid-encoded *cbrA* increased 76.7-fold the resistance to Cma as compared to wild-type cells and 1380-fold as compared to the *cbrA* mutant. The shock resistance indicates that CbrA alters the outer membrane that Cma can only poorly be transferred into the periplasm by shock treatment. It also suggests that the outer membrane is less permeable for Cma through the FhuA, TonB, ExbB, and ExbD import route.

Sensitivity of the *cbrA* deletion mutant to chemicals. In a phenotype microarray analysis of *E. coli* mutants with deletions in all two-component systems, mutants in *cbrA* displayed a greater resistance to hydroxylamine and hypersensitivity to ofloxacin, 5,7-dichloro-8-hydroxyquinoline and a 18-crown-6 ether, suggesting effects on membrane permeability (Zhou et al., 2003). Therefore, we compared growth of BW25113 in the presence of 1 µg/ml ofloxacin with JW6531 $\Delta cbrA$ in M9 medium under anaerobic conditions. There was no change in growth of the *cbrA* and *creB* deletion strains compared to BW25113 in the presence of ofloxacin but a small (24%) growth reduction of the BW25113 pKH35 *cbrA* transformant. Hydroxylamine (50 µg/ml) inhibited growth of the wild-type, the *cbrA* mutant, the *creB* mutant and the pKH35 transformant in M9 minimal medium anaerobically to the same level (36 to 39%). In addition, we tested compounds known to inhibit *E. coli* mutants with defects in the outer membrane, for example in *tol* mutants. Growth of BW25113, BW25113 pKH35 *cbrA*, JW5631 $\Delta cbrA$, and JW4361 $\Delta creB$ in M9 minimal medium treated with 0.1 µg/ml polymyxin was reduced to similar levels, OD₅₇₈ between 0.12 to 0.14 as compared to 0.53 to 0.61 of the untreated cultures. Treatment with 1 mM EDTA, or 1% sodium cholate in M9 medium only slightly reduced the growth rate and did not significantly differ among the strains. In addition, sensitivity to albomycin which is actively taken up by *E. coli* cells via the FhuA and Ton system as Cma (Hartmann et al., 1979) was unaltered in JW5631 $\Delta cbrA$ as compared to

BW25113. These results indicate that lack or overproduction of CbrA caused no general defect in outer membrane permeability.

Identification of the CbrA protein.

To identify the CbrA protein, *E. coli* BL21(DE3) was used to overexpress *cbrA* cloned downstream of the phage T7 promoter on plasmid pET28b by the IPTG-inducible chromosomally encoded T7 RNA polymerase. Isolation of the CbrA protein was difficult since CbrA formed inclusion bodies which only partially dissolved in various detergents, 0.1 M Na₂CO₃, 6 M guanidinium chloride, or 8 M urea. CbrA was only found in the sediment of disrupted cells after centrifugation (Fig. 1, compare lane 2 of IPTG-induced cells with lane 1 of uninduced cells). Only the use of 1% undecyl maltoside resulted in a soluble CbrA fraction that adsorbed to a Ni-NTA column by a C-terminal His₆ tag and was eluted in two steps with 0.2 M and 1 M imidazole (Fig. 1). The position of the protein band agreed with the predicted molecular weight of 40 kDa. The eluted protein formed a precipitate which was yellow in the fractions containing 0.2 M imidazole and white with a yellow supernatant in the fractions containing 1 M imidazole. High performance liquid chromatography of the supernatant resulted in a major peak which was at the position of authentic commercial FAD (Fig. 2, A). The absorption spectrum of the supernatant was typical for the oxidized form of FAD (Fig. 2, B). These results indicate that CbrA contains non-covalently bound FAD.

Homology between CbrA and geranylgeranyl reductases. In order to examine the evolutionary relationships of CbrA proteins and their homologs, the 2000 most similar proteins were collected with PSI-BLAST and clustered with CLANS (Altschul et al., 1997; Frickey and Lupas, 2004). The cluster map shows that CbrA proteins belong to a large superfamily of FAD-binding proteins (Figure 4) exemplified by p-hydroxybenzoate hydroxylase and many other FAD-dependent oxidoreductases with diverse functions (Murzin et al., 1995). Among those the closest homologs of CbrA are geranylgeranyl reductases (GGR), which are widely distributed in plants (Keller et al., 1998), archaea (Nishimura and

Eguchi, 2006), and bacteria, especially proteobacteria, actinobacteria, and cyanobacteria (Shpilyov et al., 2005). In contrast, the presence of CbrA orthologs is restricted mainly to *E. coli* strains and a few other proteobacteria like *Shigella sp.* However, the shared common ancestry of CbrA with FAD-dependent enzymes is consistent with its ability to bind FAD.

Sequence similarity searches for the closest homolog of known structure revealed an archaeal GGR from *T. acidophilum* as the top hit with a statistically highly significant score (HHpred P-values better than 1.0e-49). The crystal structure of this protein was solved in complex with FAD and an endogenous bacterial phospholipid that allowed identification of residues involved in substrate binding (Xu et al., 2010). Detailed analysis of the sequence similarity between CbrA and this GGR revealed conservation of residues crucial not only for binding of the FAD moiety, but also of the lipid (Figure 5 A). This includes the conserved YxWxFP motif that aligns the double bond of the geranyl group with respect to FAD and is therefore important for substrate specificity. The conservation of this and other sequence motifs between CbrA and GGRs suggests that CbrA may perform a function similar to saturation of isoprenoid molecules catalyzed by this type of GGR during the synthesis of archaeal lipids (Nishimura and Eguchi, 2006; Nishimura and Eguchi, 2007). Furthermore, the homology of CbrA, GGRs and other FAD-dependent oxidoreductases predicts that CbrA also adopts a divergent Rossmann fold (Dym and Eisenberg, 2001; Rossmann et al., 1974) (Figure 5 B).

DISCUSSION

Cma kills sensitive cells by inhibiting murein biosynthesis (Schaller et al., 1982; Harkness and Braun 1989a; El Ghachi et al., 2006) which causes lysis of cells. It also inhibits O-antigen biosynthesis (Harkness and Braun, 1989b) which is not detrimental under laboratory conditions but under natural conditions because lipopolysaccharide rough strains are usually not found in *E. coli* natural isolates. Cells growing in the neighborhood of Cma-producing colonies could protect themselves by inactivating the Cma uptake system. But loss of FhuA, TonB,

ExbB and ExbD, or FkpA apparently reduced fitness of the mutants to an intolerable degree since these functions were developed and preserved during evolution. Target site mutants were not found in a screen for Cma resistant mutants (Schaller et al., 1981). In this paper we describe a novel means of protection against Cma. The number of survivors in cultures was 18-fold higher in the CbrA wild-type and 1380-fold higher in CbrA overproducing cells than in the CbrA deletion strain (Table 4). These experiments were done as control experiments of the osmotic shock treatment which uses cells grown in LB medium. Under growth-limiting nutrient conditions in M9 minimal medium synthesis of CbrA was enhanced and these are the conditions *E. coli* usually faces in natural habitats. Protection was not complete unless CbrA was overexpressed but even lower levels of expression may be sufficient for cells to compete with Cma-producing clones. Nearly half of *E. coli* natural isolates produce colicins and pColBM plasmids are among the most frequently occurring plasmids (Christenson and Gordon, 2009). The large pColBM plasmids encode virulence factors such as iron transport systems, hemolysins, hemeagglutinins, and a complement resistance factor which are lost when pColBM is lost. pColBM is maintained by the colicin M immunity protein encoded on pColBM which protects the producer from being killed by its own Cma and Cma produced by surrounding cells. The ability of CbrA to prevent killing of cells lacking pColBM close to Cma-producing cells may play a significant role for survival of such cells in natural environments.

The level of Cma resistance was correlated with the level of *cbrA* transcription. Resistance was highest and complete when *cbrA* on the multicopy plasmid pET28b was transcribed by the highly active T7 RNA polymerase. Under these conditions CbrA was observed as a protein band in a stained SDS polyacrylamide gel in the precipitate of a crude cell extract. The levels of *cbrA-lacZ* transcription in LB, and M9 media and in the *creB* mutant correlated with the degree of Cma resistance by overexpressed CbrA. CreBC-dependent upregulation of *cbrA* expression was previously observed by RT-PCR and DNA

microarray analysis but not further studied (Avison et al., 2001; Cariss et al., 2010).

Overproduction of CbrA did not affect the activity of the Ton system as BW25113 pKH35 and JW5631 *cbrA* were sensitive to all tested TonB dependent colicins and albomycin.

Recently, another *creBC* regulated protein has been identified which increases resistance to colicin E2 (Cariss et al., 2010). This protein, termed YieJ or CbrC, was 95-fold overexpressed in a mutant that carried a point mutation in the CreC histidine kinase domain. The mutant survived a 16-fold higher colicin E2 concentration than the CreC parent strain and *cbrC* under arabinose promoter control conferred an 8-fold higher E2 resistance when transcription was induced by arabinose. In contrast, resistance to Cma by overproduced CbrA was at least 10^3 -fold increased in the colicin dilution test on nutrient agar. *cbrA* and *cbrC* do not form an operon. They are 20 open reading frames apart from each other on the *E. coli* genome. Their designation is not based on a functional context but derived from the common regulation by *creBC*. In fact, previously no function has been experimentally assigned to any of the nine genes that were listed to be controlled by CreBC (Cariss et al., 2010). Tolerance to Cma and resistance to osmotic shock suggests a function of CbrA in outer membrane structure. Alteration of membrane structure also applies to colicin E2 tolerance conferred by overproduction of CbrC (Cariss et al., 2010). Additional direct effects of CbrA on the target site of Cma are not excluded which in the case of colicin E2 is highly unlikely since it acts as a DNase in the cytoplasm (Cascales et al., 2007). In addition to CbrA and CbrC, the Tol system is involved in colicin sensitivity independent of specific colicin import and colicin target sites. The Tol system was originally identified by the insensitivities (tolerance) of *tol* mutants to colicins (De Zwaig and Luria, 1967; Nomura and Witten, 1967). In contrast to CbrA and CbrC which confer partial colicin resistance when they are synthesized, it is the lack of the Tol proteins that render the mutant cells colicin resistant. The Tol system is required for sensitivity of cells to all group A colicins (Cascales et al., 2007),

whereas resistance conferred by CbrA and CbrC seems to be colicin-specific. Tol mutants show pleiotropic phenotypes, hypersensitivity to biles, detergents, toxic compounds, antibiotics, and resistance to filamentous phages which with regard to the tested chemicals, ofloxacin, EDTA, cholate and polymyxin, were not observed in the *cbrA* mutant. The only clear phenotype regarding an effect of CbrA on outer membrane integrity was the increased resistance to osmotic shock when CbrA was overexpressed. Shock resistance prevented transfer of Cma into the periplasm. Under minimal growth conditions CbrA must also reduce the Cma import system via FhuA, TonB, ExbB and ExbD. Lack of an effect of CbrA on sensitivity to Cba and albomycin shows that CbrA does not reduce the activity of Ton-dependent uptake systems.

Isolation of the CbrA protein was a difficult task. Under all tested conditions CbrA formed inclusion bodies and precipitated after removal of solubilizing agents. At high ionic conditions (1 M imidazole) the isolated yellow protein precipitate turned white and the supernatant became yellow. The yellow color was caused by FAD as determined by spectroscopy and high performance liquid chromatography. Protein sequence comparison predicts for CbrA a FAD/NAD(P)-dependent oxidoreductase with polyisoprenoids as possible substrates. No conditions were found to determine the enzymatic activity of the partially solubilized protein which was attempted to examine whether the substrate of Cma, the C₅₅ polyisoprenyl-PP-MurNAc(pentapeptide)-GlcNAC is altered by CbrA. The lack of predicted transmembrane regions in CbrA does not exclude that it inserts with a portion into the cytoplasmic membrane where the polyisoprenoid resides. Strong aggregation suggests a hydrophobic region at the protein surface through which CbrA could contact the cytoplasmic membrane.

The closest relative of CbrA with a known crystal structure is the digeranylgeranylgeracylglycerophospholipid reductase from *T. acidophilum* (Xu et al., 2010). It converts unsaturated 2,3-di-O-geranylgeranylgeracyl phosphate to saturated 2,3-di-O-phytanylglyceryl phosphate. It is conceivable that CbrA catalyzes a similar reaction in that it reduces undecaprenyl phosphate or

undecaprenyl-PP-MurNAc(pentapeptide)-GlcNAc (lipid II), the substrate of Cma. Hydrogenation could convert lipid II into a derivative that is no longer cleaved by Cma. This proposal would imply that the reduced form still functions as a substrate for murein biosynthesis which involves translocation of the precursor across the outer membrane and insertion into the murein layer. Alternatively, reduction of polyisoprenoids is a side reaction that leads to saturated compounds which stabilize membranes against high temperature, extreme pH, and osmotic stress, as is the case for the saturated archaeal tetraetherlipoglycans (van de Vossenberg et al., 1998).

Identification of CbrA as a protein that confers a rather high Cma resistance assigned a membrane function to CbrA. This function became only apparent after growth-limiting nutrient conditions which usually exist in nature. The reason is that the CreBC two-component regulatory system is activated only under these conditions and stimulates *cbrA* transcription. Cma sensitivity may be a convenient tool to study CreBC mediated gene transcription, in particular to identify the signal that regulates CreC phosphorylation and in turn CreB phosphorylation and transcription initiation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Andrei Lupas for his generous hospitality, Marcell Wagner for HPLC analysis, Helga Wolff for technical assistance and Karen A. Brune for critically reading the manuscript. This work was funded by the Max Planck Society and the German Research Foundation (BR330/25-1).

REFERENCES

- Altschul, S. F., T. Madden, A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-402.
- Avison, M. B., R. E. Horton, T. R. Walsh, and P. M. Bennett.** 2001. *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal medium. *J. Biol. Chem.* **276**:26955-26961.
- Barreteau, H., A. Bouhss, F. Gérard, D. Duché, B. Boussaid, D. Blanot, R. Lloubès, D. Mengin-Lecreulx, and T. Touzé.** 2010. Deciphering the catalytic domain of colicin M, a peptidoglycan lipid II-degrading enzyme. *J. Biol. Chem.* **285**:12378-12389.
- Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, and P. E. Bourne.** 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**:235-42.
- Braun, V., J. Frenz, K. Hantke, and K. Schaller.** 1980. Penetration of colicin M into cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **142**:162-168.
- Braun, V., S. I. Patzer, and K. Hantke.** 2002. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie* **84**:365-380.
- Cariss, S. J. L., C. Constantinido, M. D. Patel, Y., Takebayashi, J. L. Hobman, C. W. Penn, and M. B. Avison.** 2010. YieJ (CbrC) mediates CreBC-dependent colicin E2 tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **192**:3329-3336.

Cariss, S. J. L., A. E. Taylor, and M. B. Avison. 2008. Defining the growth conditions and promoter-proximal DNA sequences required for activation of gene expression by CreBC in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**:3930-3939.

Cascales, E., S. K. Buchanan, D. Duché, C. Kleanthous, R. Lloubès, K. Postle, M. Riley, S. Slatin, and D. Cavard. 2007. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**:158-229.

Chang and S. N. Cohen. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic plasmid. *J. Bacteriol.* **134**:1141-1156.

Christenson, J. K., and D. M. Gordon. 2009. Evolution of colicin BM plasmids: the loss of the colicin B activity gene. *Microbiology* **155**:1645-1655.

De Zwaig, N., and S. Luria. 1967. Genetics and physiology of colicin-tolerant mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **94**:1112-1123.

Dym, O., and D. Eisenberg. 2001. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci* **10**:1712-28.

El Ghachi, M. A. Bouhss, H., Barreteau, T. Touzé, G. Auger, D. Blanot, and D. Mengin-Lecreulx. 2006. Colicin M exerts its bacteriolytic effect via enzymatic degradation of undecaprenyl phosphate-linked peptidoglycan precursors. *J. Biol. Chem.* **281**:22761-22772.

Frickey, T., and A. N. Lupas. 2004. CLANS: a Java application for visualizing protein families based on pairwise similarity. *Bioinformatics* **20**:3702-4.

Groisman, E. A. and M. J. Casadaban. 1986. Mini-mu bacteriophage with plasmid replicons for *in vivo* cloning and *lac* gene fusing. *J Bacteriol.* **168**:357-64.

Harkness, R. E., and V. Braun. 1989a. Colicin M inhibits peptidoglycan biosynthesis by interfering with lipid carrier recycling. *J. Biol. Chem.* **264**:6177-6182.

Harkness, R. E., and V. Braun. 1989b. Inhibition of lipopolysaccharide O-antigen synthesis by colicin M. *J. Biol. Chem.* **264**:14716-14722.

Hartmann, A., H.-P. Fiedler, and V. Braun. 1979. Uptake and conversion of the antibiotic albomycin by *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* **99**:517-524.

Helbig, S. and V. Braun. 2011. Mapping functional domains of colicin M. *J. Bacteriol.* **193**:815-821.

Helbig, S., S. I. Patzer, C. Schiene-Fischer, K. Zeth, and V. Braun. 2011. Activation of colicin M by the FkpA prolyl *cis-trans* isomerase/chaperone. *J. Biol. Chem.* **286**:6280-6290.

Hullmann, J., S. I. Patzer, C. Römer, K. Hantke, and V. Braun. 2008. Periplasmic chaperone FkpA is essential for imported colicin M toxicity. *Mol. Microbiol.* **69**:926-937.

Keller, Y., F. Bouvier, A. d'Harlingue, and B. Camara. 1998. Metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis – evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase. *Eur J Biochem* **251**:413-7.

Köck, J., T. Ölschläger, R. M. Kamp, and V. Braun. 1987. Primary structure of colicin M, an inhibitor of murein biosynthesis. *J. Bacteriol.* **169**:3358-36.

Miller, J. H. 1992. *A short course in bacterial genetics.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Murzin, A. G., S. E. Brenner, T. Hubbard, and C. Chothia. 1995. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* **247**:536-40.

Nikel, P. I., J. Zhu, K.-Y. San, B. S. Méndez, and G. N. Bennett. 2009. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli creB* and *arcA* mutants reveals shared control of carbon catabolism under microaerobic growth conditions. *J. Bacteriol.* **191**:5538-5548.

Nishimura, Y., and T. Eguchi. 2006. Biosynthesis of archaeal membrane lipids: digeranylgeranyl glycerophospholipid reductase of the thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *J Biochem* **139**:1073-81.

Nishimura, Y., and T. Eguchi. 2007. Stereochemistry of reduction in digeranylgeranyl glycerophospholipid reductase involved in the biosynthesis of archaeal membrane lipids from *Thermoplasma acidophilum*. *Bioorg Chem* **35**:276-83.

Nomura., M. and C. Witten. 1967. Interaction of colicins with bacterial cells. III. Colicin-tolerant mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **94**:1093-1111.

Nossal, N. G., and L. A. Heppel. 1966. The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. *J. Biol. Chem.* **241**:3055-3062.

Ölschläger, T., E. Schramm, and V. Braun. 1984. Cloning and expression of the activity and immunity genes of colicins B and M on pColBM plasmids. *Mol. Gen. Genet.* **196**:482-487.

PilsI, H., C. Glaser, P. Groß, H. Killmann, T. Ölschläger, and V. Braun. 1993. Domains of colicin M involved in uptake and activity. *Mol. Gen. Genet.* **240**:103-112.

- Pressler, U., V. Braun, B. Wittmann-Liebold, and R. Benz.** 1986. Structural and functional properties of colicin B. *J. Biol. Chem.* **261**:2654-2659.
- Rossmann, M. G., D. Moras, and K. W. Olsen.** 1974. Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* **250**:194-9.
- Sali, A., and T. L. Blundell.** 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**:779-815.
- Schaller, K., J.-V. Höltje, and V. Braun.** 1982. Colicin M is an inhibitor of murein biosynthesis. *J. Bacteriol.* **152**:994-1000.
- Schaller, K., A. Krauel, and V. Braun.** 1981. Temperature-sensitive, colicin M-tolerant mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **147**:135-139.
- Schramm, E., J. Mende, V. Braun, and R. M. Kamp.** 1987. Nucleotide sequence of the colicin B activity gene *cba*: consensus pentapeptide among TonB-dependent colicins and receptors. *J. Bacteriol.* **169**:3350-3357.
- Shpilyov, A. V., V. V. Zinchenko, S. V. Shestakov, B. Grimm, and H. Lokstein.** 2005. Inactivation of the geranylgeranyl reductase (ChIP) gene in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* **1706**:195-203.
- Simons R. W., F. Houman, N. Kleckner.** 1987. Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**:85-96.
- Söding, J., A. Biegert, and A. N. Lupas.** 2005. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* **33**:W244-8.

Studier, F. W., and B. A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**:113-130.

Tabor, S., and C. C. Richardson. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:1074-1078

Van de Vossenberg J. L., A. J. Driessen, and W. N. Konings.1998. The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* **2**:163-70.

Wang, R. F., and S. R. Kushner. 1991. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing , and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**:195-199.

Xu, Q., T. Eguchi, Mathews, II, C. L. Rife, H. J. Chiu, C. L. Farr, J. Feuerhelm, L. Jaroszewski, H. E. Klock, M. W. Knuth, M. D. Miller, D. Weekes, M. A. Elsliger, A. M. Deacon, A. Godzik, S. A. Lesley, and I. A. Wilson. 2010. Insights into substrate specificity of geranylgeranyl reductases revealed by the structure of digeranylgeranylglycerophospholipid reductase, an essential enzyme in the biosynthesis of archaeal membrane lipids. *J Mol Biol* **404**:403-17.

Zeth, K., C. Römer, S. I. Patzer, and V. Braun. 2008. Crystal structure of colicin M, a novel phosphatase specifically imported by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **283**:25324-25331.

Zhou, L., X.-H. Lei, B. R. Bochner, and B. L. Wanner. 2003. Phenotype MicroArray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J. Bacteriol.* **185**:4956-4972.

Table 1. *E. coli* strains, phages and plasmids used in this study

Strain, phage or plasmid	Description	Reference or source
Strains		
BW25113	$\Delta(araD-araB)567 \Delta lacZ4787(::rrnB-3)$ $\lambda^- rph-1 \Delta(rhaD-rhaB)568 hsdR514$	Keio Collection
JW5631	Same as BW25113, but $\Delta cbrA$	Keio Collection
JW4361	Same as BW25113, but $\Delta creB$	Keio Collection
AB2847	<i>aroB tsx malT thi</i>	This institute
BL21(DE3)	$F^- ompT gal dcm hsdB(r_b^- m_b^-) \lambda(DE3)$ <i>lon lacI lacUV5-phage T7 gene 1</i>	Studier and Moffat, 1986
Phages and Plasmids		
$\lambda pcbrA-lacZ$	derived from $\lambda pfepA-lacZ$ by <i>in vivo</i> recombination with pKH55	This study
pKH35	<i>cbrA</i> on pACYC184 $Cm^R Tet^R$	This study
pAB115	<i>cbrA</i> on pWSK29 Amp^R	This study
pSH150	<i>cbrA</i> on pET28b	This study
pHK569	pHSG576 Cm^R with a <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I fragment of pGP1-2	This institute
pET28b	T7 promoter <i>lacI</i> Kan^R	Novagen
pES7	<i>cba cbi</i> on pACYC184	Schramm et al., 1987
pKH55	<i>pcbrA-lacZ</i> promoter fusion on pRS415, Amp^R	This study
pRS415	<i>'lacZ</i> without promoter, Amp^R	Simons et al., 1987

Table 2. Cma sensitivity of *E. coli* strains transformed with plasmids encoding *cbrA*

Strain	Diameter of lysis zones (cm)						
	Ten-fold dilution series						
	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
AB2847	2	1.6	1.4	1.05	0.9	0.7	0.8 ^a
AB2847 pKH35	1.7 ^a	1.5 ^a	1.1 ^a	0.9 ^a			
AB2847 pAB115	1.9	1.6	0.8	0.9 ^a			
AB2847 ^b	1.9	1.6	1.4	1.2	0.8	0.7 ^a	
AB2847 pSH150 uninduced	1.7 ^a	1.3 ^a	1.0 ^a	0.9 ^a			
AB2847 pSH150 induced	0	0	0	0			
BW25113	ND	1.7	1.5	1.3	1.0	0.9 ^a	
JW5631 $\Delta cbrA$	ND	1.8	1.5	1.3	1.0	0.8 ^a	

^a turbid lysis zones. ^b In this and the four following experiments a less active Cma solution was used. A ten-fold dilution series of the purified Cma stock solution was spotted on nutrient agar plates (LB medium) seeded with the strains to be tested. Cells contained in addition to pSH150 plasmid pHK569 which is a derivative of pGP1-2 (Tabor and Richardson, 1985) and encodes the T7 polymerase under the control of the temperature-sensitive *c1857* λ repressor. ND, not determined.

Table 3. CbrA mediated Cma resistance in rich medium versus minimal medium

Strain	Medium	Absorbance after 150 min growth	
		aerobic	anaerobic
BW25113	LB	2.70	ND
BW25113 + Cma	LB	0.08	ND
JW5631 $\Delta cbrA$	LB	2.38	ND
JW5631 $\Delta cbrA$ + Cma	LB	0.07	ND
BW25113 pKH35	LB	2.08	ND
BW25113 pKH35 + Cma	LB	1.01	ND
BW25113	M9	0.84	0.74
BW25113 + Cma	M9	0.47	0.70
JW4361 $\Delta creB$	M9	0.94	0.74
JW4361 $\Delta creB$ + Cma	M9	0.07	0.14
JW5631 $\Delta cbrA$	M9	0.89	0.77
JW5631 $\Delta cbrA$ + Cma	M9	0.09	0.08
BW25113 pKH35	M9	0.88	0.64
BW25113 pKH35 + Cma	M9	0.76	0.65
JW4361 $\Delta creB$ pKH35	M9	0.84	0.69
JW4361 $\Delta creB$ pKH35 + Cma	M9	0.14	0.68

Cells were grown in rich LB medium or in glucose-M9 minimal medium to an absorbance of 0.3 until 1 $\mu\text{g/ml}$ of Cma was added to the cultures. Growth was determined by measuring the absorbance at 578 nm. The values obtained after 150 min cultivation were listed. Sensitivity to Cba (1 $\mu\text{g/ml}$) was tested in parallel and found unaltered in the mutants as compared to wild-type BW25113 (data not listed). ND, not determined.

Table 4. β -galactosidase activity of a *cbrA-lacZ* operon fusion

Strain	Medium	Growth	Activity
BW25113 pKH55	M9	aerobic	16.2
JW4361 $\Delta creB$ pKH55	M9	aerobic	3.6
JW5631 $\Delta cbrA$ pKH55	M9	aerobic	14.4
BW25113 pKH55	M9	anaerobic	14.5
JW4361 $\Delta creB$ pKH55	M9	anaerobic	1.6
JW5631 $\Delta cbrA$ pKH55	M9	anaerobic	13.3
BW25113 pKH55	LB	aerobic	2.1
JW4361 $\Delta creB$ pKH55	LB	aerobic	0.7
JW5631 $\Delta cbrA$ pKH55	LB	aerobic	1.5
BW25113 <i>cbrA-lacZ</i>	M9	aerobic	0.02
JW4361 $\Delta creB$ <i>cbrA-lacZ</i>	M9	aerobic	0
JW5631 $\Delta cbrA$ <i>cbrA-lacZ</i>	M9	aerobic	0.22
BW25113 <i>cbrA-lacZ</i>	M9	anaerobic	0.01
JW4361 $\Delta creB$ <i>cbrA-lacZ</i>	M9	anaerobic	0
JW5631 $\Delta cbrA$ <i>cbrA-lacZ</i>	M9	anaerobic	0.37
BW25113 <i>cbrA-lacZ</i>	LB	aerobic	0.02
JW4361 $\Delta creB$ <i>cbrA-lacZ</i>	LB	aerobic	0.01
JW5631 $\Delta cbrA$ <i>cbrA-lacZ</i>	LB	aerobic	0.03

Plasmid pKH55 encodes the *cbrA-lacZ* operon fusion under the control of CreB. *cbrA-lacZ* denotes a chromosomal *cbrA-lacZ* operon fusion at the λ attachment site.

Table 5. Surviving cells after treatment with osmotic shock and Cma (in percent of input)

Strain	Osmotic shock With Cma	Osmotic shock No Cma	No osmotic shock With Cma
BW25113	0	16	0.9
JW5631 $\Delta cbrA$	0	17	0.05
BW25113 pKH35 <i>cbrA</i>	34	54	69

Cells were shifted from a medium of high osmolarity to a medium of low osmolarity (osmotic shock) in the presence or absence of Cma. Surviving cells were plated on nutrient agar and the colonies counted. The values were related to untreated cultures (100% survivors). Values below 0.01% were listed as 0%.

Legends to figures

Fig. 1 Identification of CbrA by SDS-PAGE in the sediment of disrupted IPTG-induced (lane 2) and uninduced (lane 1) cells after centrifugation, and in fractions obtained after Ni-NTA agarose column chromatography in HSG buffer, 0.1% UDM, 200 mM imidazole (lanes 3-8) and 1 M imidazole (lane 9).

Fig. 2 Growth of the indicated strains in M9 minimal medium in the absence and presence of 1 µg/ml of Cma (+ Cma) or Cba (+ Cba). Addition of Cma and Cba to a logarithmically growing culture at OD₅₇₈ = 0.3 is indicated by an arrow.

Fig. 3 (A) HPLC of the supernatant of the precipitated fraction after Ni-NTA agarose column chromatography in HSG buffer, 0.1% UDM, 1 M imidazole recorded at 260 nm. 1 indicates the position of FAD, 2 of riboflavin. (B) UV-Vis spectrum of the supernatant fraction.

Fig. 4 CLANS (Frickey and Lupas, 2004) cluster map of the relationships of CbrA proteins to its nearest homologs among FAD-binding oxidoreductases. Pair wise similarities of all sequences were computed with BLAST (Altschul et al., 1997). The clustering procedure uses all P-values better than 1.0e-15. Darker lines between two dots, each of which represents one sequence, indicate lower BLAST P-values. The map contains 2000 sequences.

Fig. 5 Conservation of functional residues suggests an isoprenoide substrate for CbrA. (A) The sequence alignment of *E. coli* CbrA and the closest homolog of known structure, geranylgeranyl reductase (GGR) from *T. acidophilum* (PDB-ID 3OZ2; Xu et al., 2010), emphasizes the conservation of residues associated with substrate binding. Common motifs involved in nucleotide binding are shown in red. Identical residues in helices and strands are shown in yellow and green, respectively, and are annotated according to Xu et al., 2010. The alignment was obtained from HHpred (Söding et al., 2005) with a P-value of 1.0e-49 and a pair wise identity of 20%. (B) The homology model CbrA (right panel) shows a

Rossmann fold (Rossmann et al., 1974) FAD-dependent oxidoreductase. Geranylgeranyl reductase from *T. acidophilum* (left panel), which was used as a template, illustrates binding of an FAD moiety and of a bacterial lipid (Xu et al., 2010). The coloring is according to the sequence alignment shown in (A).

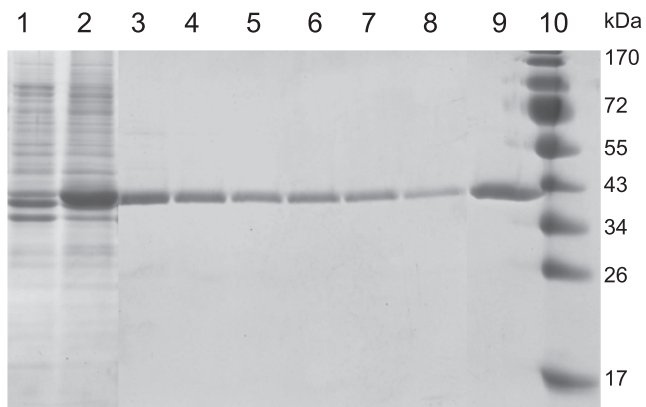


Figure 1

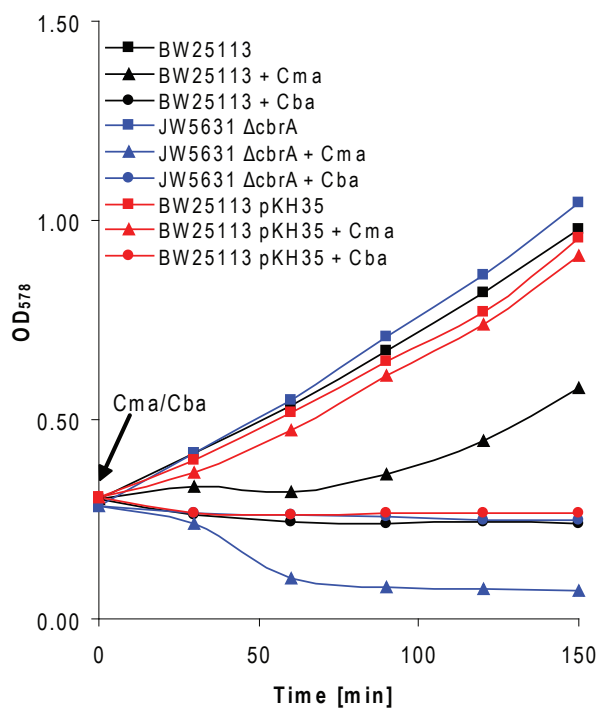


Figure 2

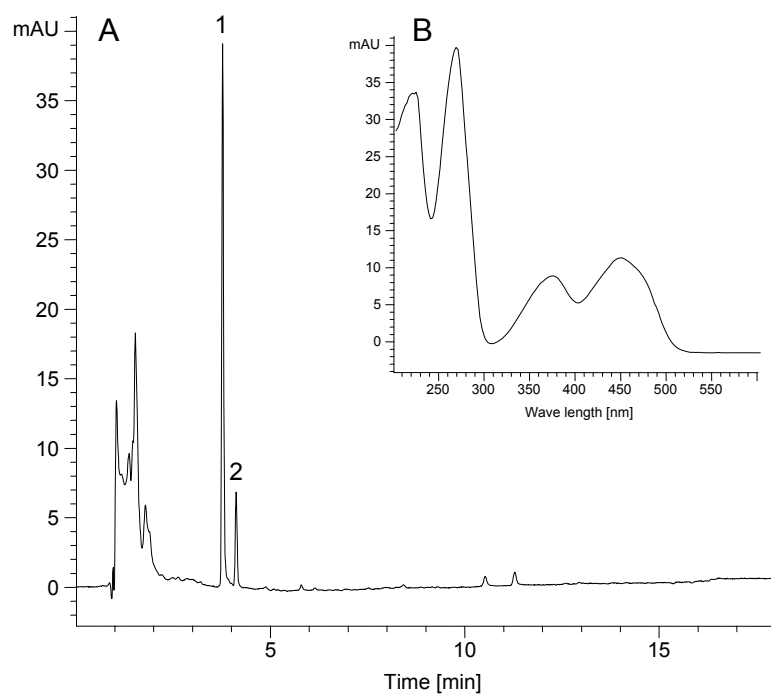


Figure 3

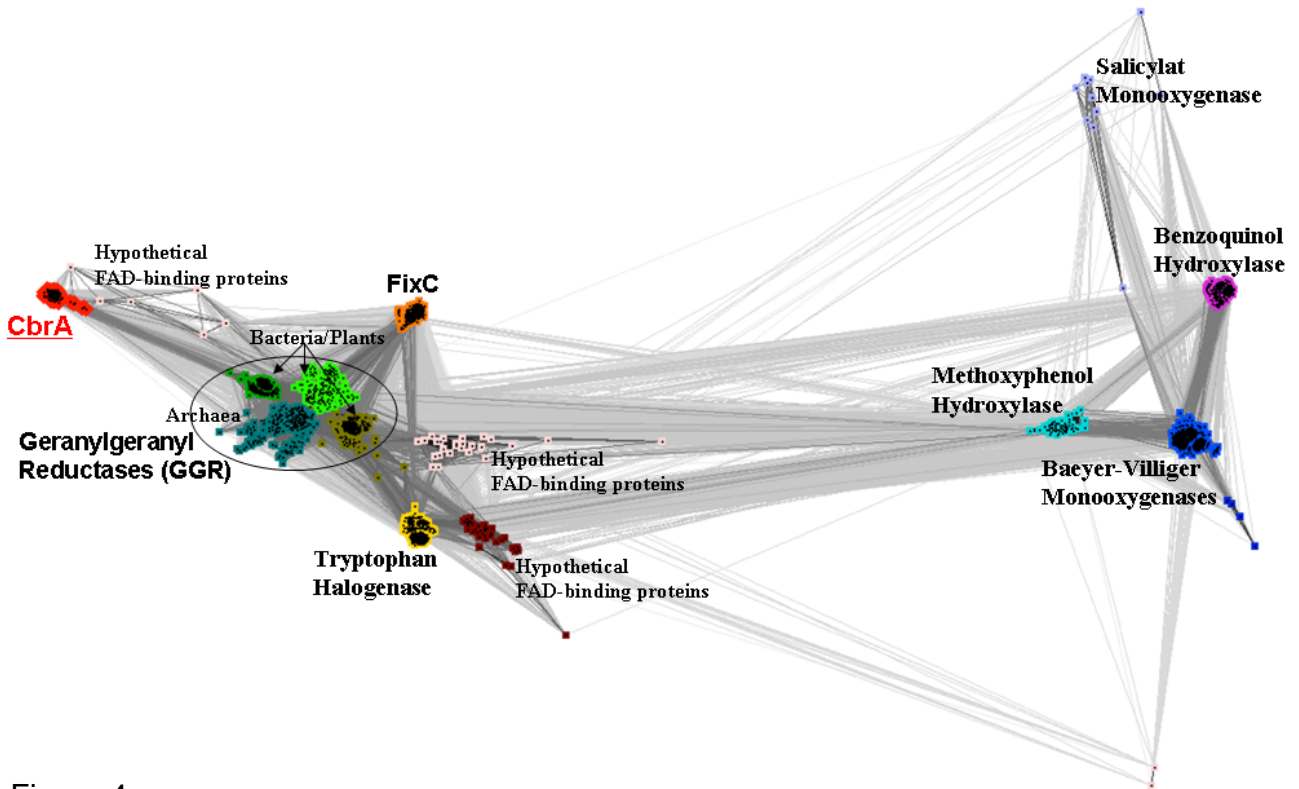


Figure 4

A

	β1	αA	β2	β3	αB	β4	β5	
GGR (<i>T. acidophilum</i>)	EEEEEEEEE	HHHHHHHHHHH	EEEE	EEE	HHHHH	EEEEEEEEEEE		(81)
CbrA (<i>E. coli</i>)	METVDLVVGGGPGGS	TAARYAAKYGLKTLMI	EKRPEI---	GSPVRCGEGLSKGILNEA---	DIKADRSFIANEVKGARI	YGSEKR		(82)
	MEHFDVAII	GLGPAGS	SALARL	LAGK-MQVIALDKKH	CGTEGFSKPCGGL	LAPDAQRSFIR	DLGTL	PVDVIAN----
								PQIFSVKTV
	β6	β7	αC	β8	β9	β10	β11	αD
GGR (<i>T. acidophilum</i>)	EEEE	EEEE	HHHHHHHHHHHHHHH	EEE	EEEEEEE	EEEEEEEEEEE	EEEEEEEEEEE	HHHHHHH
CbrA (<i>E. coli</i>)	PIILQSEKAGNEVGYVLE	RDKFDKHLA	LAALAAKAGADV	VWVKS	PALGVIKENGK	VAGAKIRHNNEI	VDVR	KMVIADG
								FGFES
								EPGRWAG
								PDHQIRK----
								YFIFGGAYPMKDGQTRFTTLK
								FKMSAFQFG----
								MVRRHLY
	αE	αF	β12	β13	β14	β15	αG	αH
GGR (<i>T. acidophilum</i>)	GGG	GGG	EEEEEEEEEEEEEE	EEEE	EEEEEEEE	EEEEEEEEEE	HHHHHHHHHHHHH	HHHH
CbrA (<i>E. coli</i>)	LKSVILARNDIISALQY	RMINVDVDPDY	TDFYLGSIAPAGY	IWVFPK	GEGMANV	IGSSINWI	HNRF-ELK	NYLDRPIEN
								HPGLKKG
								PDHQIRK----
								YVAIQQWFAEKHPVPF
								YSCIF-DNSITNCYSWSISKDG-
								YFIFGGAYPMKDGQTRFTTLK
								FKMSAFQFG----
								EVKMPITMPGLMLVGDAA
								RLIDPITGGGIANAIVSGMYAAQ
								VTKAEI
								ESNDYSPQMMQY
								YKLIKERFERKH
								(339/397)
								KTVKSEKCTVLFPSRWQDFVCGKDN
								FLIGEAA
								GFISASSLEGISYALDS
								TDILRSVLLKQPEKLN--
								TAYWRATRKLRLKLF
								GKIV
								(327/354)

B

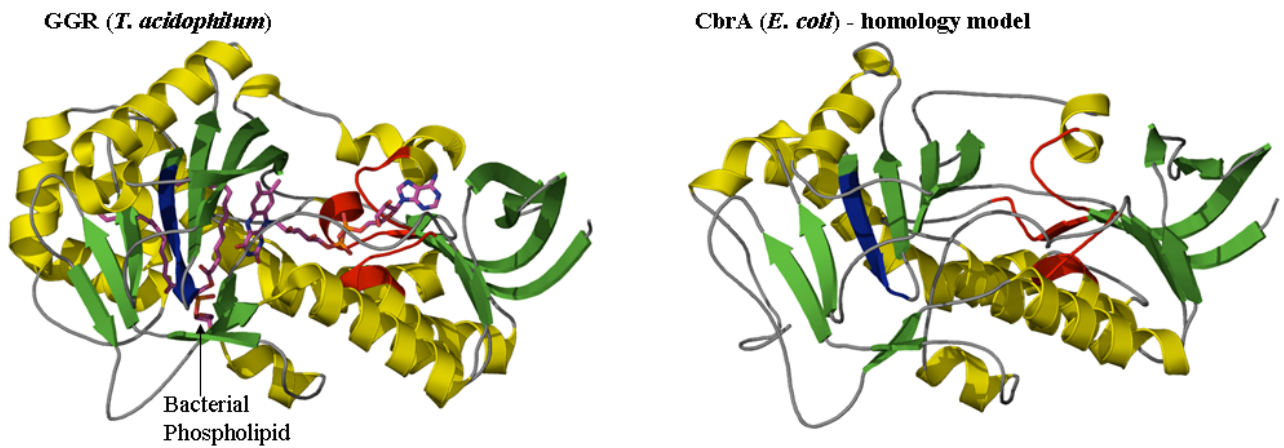


Figure 5

7 Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen/Manuskripten

7.1 Publikation „Mapping functional domains of colicin M“

Ich war maßgeblich an der Planung, Etablierung und Optimierung der Experimente des Projektes „Mapping functional domains of colicin M“ beteiligt, das von Prof. Dr. Volkmar Braun initiiert wurde. Alle praktischen Arbeiten wurden von mir durchgeführt, darunter die Herstellung aller Punkt- und Deletionsmutanten, die Reinigung der Proteine und die Bestimmung ihrer Aktivität mittels Reihenverdünnungstest, osmotischem Schock und Konkurrenzexperimenten. Dazu zählt auch die Überprüfung der Proteinfaltung durch proteolytischen Verdau, Aufnahme von CD-Spektren und Denaturierungsexperimente. Des Weiteren beruhen alle bioinformatischen Daten auf eigenen Analysen. Ich war an der Diskussion aller Daten beteiligt und habe das Manuskript zusammen mit Prof. Dr. Volkmar Braun verfasst und überarbeitet. Zudem wurden alle Abbildungen von mir erstellt.

7.2 Publikation „Activation of colicin M by the FkpA prolyl *cis/trans* isomerase/chaperone“

Zur Publikation „Activation of colicin M by the FkpA prolyl *cis/trans* isomerase/chaperone“ habe ich entscheidende Teile beigetragen. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Volkmar Braun geplant und diskutiert. Die Konstruktion aller Colicin M-Punktmutanten, ihre Reinigung und die Bestimmung ihrer Aktivität mittels Auftropftests, Konkurrenzversuchen und osmotischen Schockexperimenten wurden von mir ebenso durchgeführt wie die Überprüfung ihrer Sekundärstruktur mittels zirkulärem Dichroismus, Tryptophanfluoreszenz und proteolytischem Verdau. Alle zugehörigen Daten wurden von mir ausgewertet und in Abbildungen dargestellt (Abbildungen 1, 3, S1 - S4).

Für die Bestimmung der Kristallstruktur wurde das Colicin M-Derivat P107A von mir gereinigt und von Kerstin Bär zur Kristallisation angesetzt. Die Streuung der Kristalle wurde zusammen mit Dr. Kornelius Zeth am Paul-Scherer-Institut in Villingen, Schweiz, gemessen. Die Reinigung und Kristallisierung von Wildtyp-Colicin M und des Derivats

P176A wurde von Dr. Silke Patzer durchgeführt, die auch die Vermessung der Kristalle zusammen mit Dr. Reinhard Albrecht durchgeführt hat. Alle Kristallstrukturen wurden von Dr. Kornelius Zeth gelöst und in Abbildung 2 dargestellt.

Die Fusionierung der Colicin M-Derivate mit der Male-Signalsequenz und die Versuche zur Sekretion dieser Proteine in *E. coli* wurden von Dr. Silke Patzer durchgeführt; dies gilt ebenfalls für die Darstellung der zugehörigen Ergebnisse in Abbildung 4. Die *in vitro*-Messung der *cis/trans*-Isomerisierung erfolgte durch Dr. Cordelia Schiene-Fischer unter Verwendung von Proteinproben, die von mir bzw. Dr. Silke Patzer gereinigt worden waren. Abbildung 5 wurde von Dr. Cordelia Schiene-Fischer erstellt, Abbildung 6 von mir.

Ich war an der Diskussion aller Daten ebenso wie am Entwurf und der Revision des Manuskripts maßgeblich beteiligt.

7.3 Manuskript „CbrA is a FAD protein that modifies the *E. coli* outer membrane and confers resistance to colicin M“

Das Projekt „CbrA is a FAD protein that modifies the *E. coli* outer membrane and confers resistance to colicin M“ wurde von Prof. Dr. Klaus Hantke initiiert, der auch die *cbrA*-codierenden Plasmide pAB115 und pKH35 sowie das *lacZ*-Konstrukt herstellte. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Volkmar Braun und Prof. Dr. Klaus Hantke war ich maßgeblich bei der Planung, Durchführung und Optimierung der Versuche beteiligt. Alle Sensitivitätsexperimente zur Bestimmung der CbrA-vermittelten Colicin M-Resistenz und der Membranpermeabilität wurden ebenso von mir durchgeführt wie die Messung der β -Galactosidaseaktivität, die Klonierung von *cbrA* in pET28b und die Versuche zur Expression, Solubilisierung und Reinigung von CbrA. Die Untersuchung verschiedener Proben mittels HPLC bzw. ESI-MS erfolgte durch Marcell Wagner bzw. Andreas Kulik. Die bioinformatischen Analysen und die Darstellung der Ergebnisse inkl. der Abbildungen 4 und 5 beruhen auf Arbeiten von Moritz Ammelburg. Ich war an der Diskussion aller Daten beteiligt, habe das Manuskript zusammen mit Prof. Dr. Volkmar Braun verfasst, überarbeitet und die Abbildungen 1 - 3 erstellt.

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Januar 2009 und Februar 2012 am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie Tübingen, Abteilung Proteinevolution, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volkmara Braun.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützen und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Volkmara Braun für das Angebot, das in meiner Diplomarbeit begonnene, überaus interessante Thema weiter zu bearbeiten. Bedanken möchte ich mich vor allem für seine ausgezeichnete Betreuung, stetige Diskussionsbereitschaft und die immer angenehme Arbeitsatmosphäre.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Andrei Lupas meinen Dank aussprechen, der mir die Anfertigung dieser Arbeit unter hervorragenden Arbeitsbedingungen ermöglicht hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Friedrich Götz bedanke ich mich für seine Tätigkeit als Zweitgutachter dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Klaus Hantke, der das CbrA-Projekt initiiert und die *cbrA*-Plasmide und das *lacZ*-Fusionskonstrukt bereitgestellt hat.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Dr. Cordelia Schiene-Fischer für die Messung der *cis/trans*-Isomerisierung *in vitro* bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Kornelius Zeth, der die Kristallisation der Colicin M-Derivate unterstützt und ihre Struktur gelöst hat.

Moritz Ammelburg danke ich herzlich für alle bioinformatischen Analysen.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Kollegen der Arbeitsgruppe Braun und der gesamten Abteilung Proteinevolution für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Dank sagen möchte ich auch ganz besonders meinen Eltern, die mich immer unterstützen haben und mich meinen eigenen Weg gehen lassen, sowie meinem Freund Marcell, der mir immer zur Seite stand.