

Funktionelle Untersuchungen von Colicin M und seinem Immunitätsprotein

Dissertation

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

vorgelegt von
Christin Römer, geb. Schulz
aus Waren (Müritz)

Tübingen
2012

Tag der mündlichen Prüfung: 28.03.2012

Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. h. c. Volkmar Braun
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Friedrich Götz

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: *Funktionelle Untersuchungen von Colicin M und seinem Immunitätsprotein* selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Christin Römer
Tübingen, Januar 2012

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen in der Abteilung für Proteinevolution unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. h. c. Volkmann Braun und dessen Betreuung in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen im Zeitraum von Januar 2008 bis August 2011 durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gebührt

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Volkmar Braun (Max-Planck-Institut Tübingen)

für die Vergabe des interessanten Themas, seine exzellente Betreuung und sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit. Ich schätze das von ihm entgegengebrachte Vertrauen, die Unterstützung und seine stete Hilfsbereitschaft sehr.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Götz (Universität Tübingen)

für die Freundlichkeit, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Andrei Lupas und Herrn Dr. Jörg Martin (Max-Planck-Institut Tübingen)

für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

allen derzeitigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen des Max-Planck-Instituts.

Besonderer Dank für ihre Hilfsbereitschaft gilt (alphabetisch)

Dr. Moritz Ammelburg, Dr. Thomas Arnold, Kerstin Bär, Silvia Deiss, Carolin Ewers, Dr. Roy Eyllenstein, Dara Forouzan, Dr. Yvonne Groemping, Marcus Hartmann, Dr. Cedric Hobel, Klaus Kopeck, Dr. Dirk Linke, Dr. Frauke Mager, Martin Mechelke, Bijàn Mir-Montazeri, Dr. Suat Özdirekcan, Dr. Avijit Pramanik, Evelyn Sauer, Dr. Steffen Schmidt, Martin Schueckel, Eva Sulz, Silvia Würtenberger.

Ganz besonderer Dank gilt (alphabetisch)

Dr. Hedda Ferris, Stephanie Helbig, Dr. Birte Hernandez-Alvarez, Karin Lehmann, Astrid Ursinus.

meinen Kollaborationspartnern am Max-Planck-Institut (alphabetisch)

Dr. Reinhard Albrecht, Dr. Silke Patzer, Prof. Dr. Heinz Schwarz, Dr. Kornelius Zeth.

meinen externen Kollaborationspartnern am Instituto di Biología Molecular de Barcelona, Spanien *Dayté Rodriguez* und *Isabel Usón-Finkenzeller.*

dem Service des Max-Planck-Instituts (alphabetisch)

Bibliothek: *Markus Schneller,*

Grafik: *Dominic Steiner, Martin Vötsch,*

EDV: *Dr. Thomas Helle, Harald Huss, Henry Vogt,*

Hausmeister: *Waldemar Wulf,*

PhD-Koordination: *Dr. Carolina Müller, Dr. Dagmar Sigurdardottir,*

Verwaltung: *Sven Herb, Ella Maier,*

den Damen und Herren des Genome Center, des Einkaufs und Lagers, der Spül- und Medienküche, der Werkstatt und des Max-Planck-Hauses.

der Verwaltung der Universität Tübingen, *Frau Gudrun Dortschy.*

meinen Eltern *Regina & Günter* für unermessliche Hilfen & Vertrauen - jederzeit, überall, meinem Mann *Thomas*, ohne dich...,

meinen Freunden *Swetlana & Andreas*, Seelen auf dem Du-Fuß und meiner treuen *Britta.*

Für
FELICITAS & WILHELM,
mein Glück und mein Wille.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	XI
Zusammenfassung	XV
Abstract	XVII
1 Einleitung	1
1.1 Bakteriocine	2
1.2 Colicine	2
1.3 Colicin M	7
1.4 Immunitätsproteine von Colicinen	18
1.5 Immunitätsprotein von Colicin M	20
1.6 Zielstellung dieser Arbeit	21
2 Material & Methoden	23
2.1 Material	24
2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien & Kits	24
2.1.2 Chemikalien & Enzyme	24
2.1.3 Bakterienstämme	24
2.1.4 Plasmide	25
2.1.5 Synthetische Oligonukleotide	27
2.1.6 Klonierungsvektoren	28
2.1.6.1 pET-22b(+)	28
2.1.6.2 pET-25b(+)	28
2.1.7 Medien & Medienzusätze	29
2.1.8 Lösungen & Puffer	30
2.1.8.1 Lösungen für Agarosegel-Elektrophorese	30
2.1.8.2 Lösungen für ELISA	30
2.1.8.3 Lösungen für SDS-PAGE	31
2.1.8.4 Lösungen für Proteinaufreinigung	32
2.1.8.5 Lösungen für Western Blot	32
2.2 Methoden	33
2.2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden	33
2.2.1.1 Desinfektion & Sterilisation	33
2.2.1.2 Kultivierung	33
2.2.1.3 Stammhaltung	33

2.2.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden	34
2.2.2.1	Präparation von DNA	34
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von DNA	34
2.2.2.3	Aufreinigung von DNA	34
2.2.2.4	Restriktionsverdau von DNA	34
2.2.2.5	Ligation von DNA	35
2.2.2.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	35
2.2.2.7	Amplifizierung von DNA	35
2.2.2.8	Sequenzierung von DNA	36
2.2.2.9	Herstellung kompetenter Zellen	36
2.2.2.10	Transformation	36
2.2.2.11	Mutagenese von DNA	37
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	39
2.2.3.1	Proteinüberexpression	39
2.2.3.2	Selenomethioninmarkierung	40
2.2.3.3	Proteinisolierung	40
2.2.3.4	Proteinreinigung	41
2.2.3.5	Umpufferung von Proteinen	42
2.2.3.6	Bestimmung der Konzentration von Proteinen	42
2.2.3.7	Aufkonzentrierung von Proteinen	42
2.2.3.8	Strukturbestimmung von Proteinen	43
2.2.3.9	SDS-PAGE	45
2.2.3.10	Western Blot	45
2.2.3.11	ELISA	46
2.2.3.12	Dünnschichtchromatographie	46
2.2.3.13	Auftropftest	46
2.2.3.14	Ko-Elution	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M	50
3.1.1	Überexpression und Reinigung von Colicin M	50
3.1.1.1	Natives Colicin M	50
3.1.1.2	Colicin M mit His ₆ -Tag	51
3.1.2	Herstellung polyklonaler Anti-Cma-Antikörper	52
3.1.2.1	Präimmunsereen	52
3.1.2.2	Anti-Cma-Immunsereum	53
3.1.2.3	Nachweisbarkeitsgrenze des Anti-Cma-Immunsereums	53
3.1.3	Konformationsänderung von Colicin M bei der Bindung an den FhuA-Rezeptor	54
3.1.4	Extraktion von Colicin M aus dem Periplasma und der äußeren Membran des <i>fkpA</i> -Wildtyps und der <i>fkpA</i> -Mutante	59
3.1.4.1	Freisetzung von Colicin M aus lysierten Zellen	59
3.1.4.2	Extraktion von Colicin M aus dem Periplasma und der äußeren Membran	60

3.1.4.3	Extraktion von Colicin M aus dem Periplasma des <i>fkpA</i> -Wildtyps und der <i>fkpA</i> -Mutante	61
3.1.5	Aufnahme von Colicin M	62
3.1.5.1	Hemmung der Aufnahme von Colicin M durch Anti-Cma-Antiserum	62
3.1.5.2	Reversible Translokation von Colicin M durch die äußere Membran	64
3.1.5.3	Lokalisation von Colicin M nach der Translokation	68
3.1.6	Versuche der Bindung von Colicin M an Substratanaloga	70
3.1.7	Versuche zur Bindung von Colicin M an seinen Rezeptor	73
3.2	Kristallstruktur des Colicin M-Immunitätsproteins	78
3.2.1	Konstrukte des Colicin M-Immunitätsproteins	78
3.2.2	Überexpression und Reinigung des Colicin M - Immunitätsproteins	79
3.2.2.1	BlaM-Cmi-His ₆	80
3.2.2.2	PBP3-Cmi-His ₆	81
3.2.2.3	Cmi Δ N(1-23)-His ₆	81
3.2.2.4	Selenomethioninmarkiertes Cmi	82
3.2.3	Aktivität des Colicin M-Immunitätsproteins	84
3.2.3.1	Auftropftests	84
3.2.3.2	Wachstumskurvenversuch	85
3.2.4	Kristallisationsbedingungen des Colicin M-Immunitätsproteins	86
3.2.5	Kristall des Colicin M-Immunitätsproteins	87
3.2.6	Röntgenbeugungsexperiment des Colicin M - Immunitätsproteins	88
3.2.7	Strukturbestimmung des Colicin M-Immunitätsproteins	89
3.2.8	Alignment des Colicin M-Immunitätsproteins	91
3.3	Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein	93
3.3.1	Ko-Kristallisation von Colicin M und seinem Immunitätsprotein	93
3.3.2	Ko-Elution von Colicin M und seinem Immunitätsprotein	96
3.3.3	Auftropftests von Colicin M und seinem Immunitätsprotein	100
3.3.4	Herstellung von nicht an das Immunitätsprotein bindenden Colicin M - Mutanten	101
3.3.4.1	Randommutagenese und Screening	101
3.3.4.2	Spezifische Mutagenese	102
4	Diskussion	107
4.1	Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M	108
4.2	Struktur des Colicin M-Immunitätsproteins	117
4.3	Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein	121
	Literaturverzeichnis	124
	Publikationen	137

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

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

A	Ampère
Å	Ångström
AA	amino acid
A. dest.	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
AG	Aktiengesellschaft
APS	Ammoniumpersulfat
(d)ATP / (d)ADP	(desoxy)Adenosintriphosphat / (desoxy)Adenosindiphosphat
b	Basenpaare
BCA	bicinchoninic acid
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BDT	Big Dye Terminator
BlaM	β-Laktamase
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
CIAP	Calf intestinal alkaline phosphatase
CM	Cytoplasmamembran
Cma	Colicin M
Cmi	Colicin M - Immunitätsprotein
Co.	komplementär
CT	C-Terminus
(d)CTP / (d)CDP	(desoxy)Cytosintriphosphat / (desoxy)Cytosindiphosphat
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DDM	Dodecylmaltosid

dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
evtl.	eventuell
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FKBP	FK 506 - binding proteins
FhuA	ferric hydroxamate uptake
for	forward
FPLC	fast protein liquid chromatography
GFP	green fluorescence protein
gi	Sequenz-Identifikationsnummer in NCBI
GLP	Good Laboratory Practice (Gute Laborpraxis)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
(d)GTP / (d)GDP	(desoxy)Guanosintriphosphat / (desoxy)Guanosindiphosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish-peroxidase
Inc.	incorporation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
l	Liter
LB	lysogeny broth
LDAO	Lauryl-Dimethylaminoxid
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
m	Milli
M	Molar
max.	maximal
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minuten
Mip	Macrophage infectivity potentiator
MM	Minimalmedium
MWCO	nominales Molekulargewichtslimit
μ	Mikro
n	Nano
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information

Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
NT	N-Terminus
(d)NTP / (d)NDP	(desoxy)Nukleosidtriphosphat / (desoxy)Nukleosiddiphosphate
O-Antigen	Oberflächenantigen
OD	optische Dichte
P	Phosphat
p	pico
PBP3	Penicillinbindeprotein 3
PBS	Polybutylensuccinat
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data base
PEG	Polyethylenglycol
pH	pondus Hydrogenii oder potentia Hydrogenii
PP	Diphosphat (Pyrophosphat)
PPIase	Peptidyl-prolyl- <i>cis-trans</i> -isomerase
psi	pound-force per square inch
rev	reverse
(t)RNA	(transfer) ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS - PAGE	Sodiumdodecylsulfat - Polyacrylamid - Gelelektrophorese
SeMet	Selenomethionin
SLS	Swiss Light Source
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TES	Tris EDTA Saccharose
TM	trade mark
ts	temperatursensitiv
Tris	Tris(hydroxymethyl) - aminomethan
(d)TTP / (d)TDP	(desoxy)Thymidintriphosphat / (desoxy)Thymidindiphosphat
U	unit
UDP	Uridindiphosphat
Upm	Units per minute
USA	United States of America
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	volume/volume
WT	Wildtyp
w/v	weight/volume
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Bakteriocine stellen eine große Vielfalt an Protein-Antibiotika dar, die von Bakterien zur Abwehr konkurrierender Bakterien produziert werden. Die Protein-Toxine bestimmter *Escherichia coli*-Stämme werden als Colicine bezeichnet, sind plasmidcodiert und töten Zellen durch Ausbildung von Poren in der Cytoplasmamembran oder den Abbau von Nucleinsäuren. Colicin M wirkt einzigartig als Phosphatase, die die Murein-Biosynthese inhibiert und so zur Lyse der Zellen führt. In meiner Diplomarbeit wurde die Kristallstruktur von Colicin M bestimmt und es konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Aktivität eines importierten Proteins von einem einzigen periplasmatischen Chaperon, FkpA, abhängig ist. Da Colicin M nur die äußere Membran passieren muss, ist es besonders geeignet, den Import von Proteinen in das Periplasma zu studieren.

In dieser Arbeit wird Colicin M in der Art seiner Bindung, Aufnahme und Wirkungsweise näher charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass Colicin M seine Konformation bei der spezifischen Bindung an seinen Rezeptor FhuA in der äußeren Membran ändert. Nachdem es in die Zellen importiert wurde, konnte es aktiv aus dem Periplasma und der Membran extrahiert werden, wobei es nicht möglich war, entfaltetes, inaktives Colicin aus FkpA Mutanten zu gewinnen. Der Schritt der Translokation durch die äußere Membran zum Ziel in das Periplasma ist reversibel, da Colicin M bei einer Erhöhung der Temperatur in einer temperatursensitiven Mutante wieder an die Zelloberfläche gebracht wird und sensitiv gegenüber Colicin M-spezifischen Antikörpern ist. Colicin M wurde bei 30 °C in die Zellen importiert, wobei eine Erhöhung der Temperatur auf 42 °C die Zellen vor der Toxizität von Colicin M, das durch Antikörper inaktiviert wurde, bewahrte. Die Aufnahme von Colicin M in die Zellen bei 37 °C dauerte etwa acht Minuten.

Jedem Colicin ist ein inaktivierendes Immunitätsprotein zugeordnet, das die produzierenden Zellen vor der Wirkung der Colicine schützt. Das Immunitätsprotein von Colicin M ist periplasmatisch nahe dem Substrat Murein in der cytoplasmatischen Membran verankert. Da der Mechanismus der Wechselwirkung von Colicin M und seinem Immunitätsprotein nicht bekannt ist, wurde das Immunitätsprotein kristallisiert, dessen Struktur bestimmt und die Bindung an Colicin M getestet. In Kooperation mit einem Strukturbiologen wurde die Struktur des Immunitätsproteins bei einer Auflösung von 1,9 Å mit einer *de novo* Phasen-Methode bestimmt. Die Struktur des 9 kDa großen Proteins stellt ein Dimer dar, dessen Kontaktfläche zwei kovalente Disulfidbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen und eine Salzbrücke enthält. Es ist ein hoch geladenes Protein mit einem erheblichen Überschuss negativer Ladungen. Die Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein konnte nachgewiesen, aber trotz versuchter Ko-Kristallisation und Mutagenese vermutlich in die Bindung involvierter Reste nicht näher charakterisiert werden.

Abstract

Bacteriocins are a large variety of protein antibiotics produced by bacteria to fend off competitors. The protein toxins encoded on plasmids of certain *Escherichia coli* strains are called colicins killing cells by pore formation or nuclease activities. Colicin M acts uniquely as a phosphatase which inhibits murein biosynthesis resulting in cell lysis. In my diploma thesis I contributed to colicin M crystal structure determination and could show for the first time that the activity of an imported protein depends specifically on a single periplasmic chaperone, FkpA. Since colicin M must pass only the outer membrane, it is particularly suited to study the import of a protein into the periplasm.

In the present study, colicin M was characterized further in its way of binding, uptake and way of action. It could be shown that colicin M changes its conformation while specific bound to the FhuA receptor. After imported into cells, active colicin M could be extracted from the periplasm and membrane, but it was not possible to extract unfolded, inactive colicin from FkpA mutants. The step of translocation through the outer membrane to its target in the periplasm is reversible since it is inactivated by colicin M specific antibodies at increased temperature by using a temperature-sensitive FkpA mutant. Colicin M was imported at 30 °C but a temperature shift from 30 to 42 °C prevented killing and colicin M was inhibited by antibodies. The uptake of colicin M into cells at 37 °C lasted approximately eight minutes.

Each colicin has its own inactivating immunity protein, protecting producer cells against the colicin they form. The immunity protein of colicin M is anchored to the periplasmic surface of the cytoplasmic membrane where the substrate of Colicin M is localized. The mechanism of interaction between Colicin M and its immunity protein is not known. To understand this mechanism, the immunity protein was crystallized, its structure determined and binding to colicin M tested. In cooperation with a structure biologist the structure of the colicin M immunity protein was determined at a resolution of 1.9 Å by a *de novo* phasing method. The structure of the 9 kD protein is dimeric mediated by two covalent disulfide bridges, H-bond interactions and a salt bridge. It is a highly charged protein with a significant surplus of negative charges. Binding of colicin M and its immunity protein could be identified but not further characterized by co-crystallisation or mutagenesis of colicin M at residues predicted to be involved in binding of the immunity protein.

1 Einleitung

„The emergence of bacterial proteins as lethal weapons against other prokaryotic species was one of the very first examples of biological warfare, that was implemented on a molecular scale against an entire population of organisms.“ [18]

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der auf Strukturdaten aufbauenden, weiterführenden funktionellen Untersuchung von Colicin M im Kontext seiner Abhängigkeit von FkpA und seinem Immunitätsprotein. Colicin M ist nur ein Colicin unter vielen, das *Escherichia coli* zur Abwehr verwandter Spezies verwenden kann. Sein Immunitätsprotein bewahrt es dabei vor der eigenen Toxizität und das Chaperon FkpA ist nötig, um eintretendes Colicin zurückzufalten und dessen Wirkung zu ermöglichen. Colicine als genetische Werkzeuge zum Verständnis bakteriellen Proteintransports können viele Fragen rund um *Funktion, Interaktion, Genetik, Stoffwechsel, Membranphysiologie, Ökologie und Evolution* klären [20]. In der Einleitung soll deshalb zunächst der derzeitige Stand bakterieller Toxine, insbesondere von Colicinen und Colicin M, beleuchtet werden. Die Darstellung beteiligter Proteine rund um Colicin M möge das Verständnis erleichtern.

1.1 Bakteriocine

Das erste Bakteriocin, Colicin V, das heute zu den Mikrocinen (Bakteriocine < 10 kDa) zählt, wurde 1925 von Gratia identifiziert und 1946 als solches benannt [51]. Der Begriff „Bakteriocin“ charakterisiert seitdem toxische Proteine, die von einem bestimmten, für das Toxin immunen Bakterienstamm gegen verwandte Spezies produziert werden [51]. Kleine, antibiotische Peptide gram-positiver Bakterien sind nicht zwingend letal [108], sodass Bakteriocine begrifflich vor allem die Proteine gram-negativer Produzenten implizieren. Sie unterscheiden sich durch ihre ribosomale Synthese und ihren schmalen Wirkungsgrad [108] von klassischen Antibiotika. Proteine der Bakteriocin-Familie besitzen hohe Diversität z.B. in Größe, Wirk- und Immunitätsmechanismus und sind stets nach der sie produzierenden Art benannt (siehe Tab. 1.1). Bakteriocine sind nicht nur antibiotisch, sondern können auch probiotisch wirken [48]. Sie sind fähig zu töten, können dem Wirt aber auch gesundheitlichen Vorteil verleihen, z.B. Schutz vor Infektionen mit EHEC, *Helicobacter* oder Shigellose-Diarrhoe.

Tabelle 1.1: **Auswahl an Bakteriocinen**

Bacteriocin	produzierende Art
Pyocin	<i>Pseudomonas pyogenes</i>
Cloacin	<i>Enterobacter cloacae</i>
Pesticin	<i>Yersinia pestis</i>
Klebicin/Klebocin	<i>Klebsiella</i> species
Marcescin	<i>Serratia marcescens</i>
Lumicin	<i>Photobacterium luminescens</i>
Colicin	<i>Escherichia coli</i>

1.2 Colicine

Die am ausgiebigsten studierten Bakteriocine sind die mannigfaltigen Colicine (siehe Tab. 1.2 auf Seite 3). Sie werden von *Escherichia coli* und verwandten Arten wie *Shigella* oder *Citrobacter* produziert und sind in ökologischen Populationen mit unterschiedlichsten Wirkmechanismen, höchster Selektivität und Effizienz weit verbreitet.

Tabelle 1.2: Überblick Colicine

Colicin	Rezeptor	Translokation	Wirkmechanismus	M [kDa]	ursprünglicher Produzent
A	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	Pore	63	<i>C. freundii</i>
B	FepA	TonB,ExbB,D	Pore	55	<i>E. coli</i>
D	FepA	TonB,ExbB,D	tRNase	75	<i>E. coli</i>
E1	BtuB/TolC	TolA,B,Q,R	Pore	52	<i>E. coli</i>
E2	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	DNase	62	<i>Sh. sonnei</i>
E3	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	rRNase	58	<i>E. coli</i>
E4	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	rRNase	n.d.	<i>E. coli</i>
E5	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	tRNase	n.d.	<i>E. coli</i>
E6	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	rRNase	58	<i>E. coli</i>
E7	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	DNase	61	<i>E. coli</i>
E8	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	DNase	70	<i>E. coli</i>
E9	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	DNase	n.d.	<i>E. coli</i>
G*	Fiu	TonB,ExbB,D	Membranlyse ^{n.d.}	n.d.	<i>E. coli</i>
H*	Fiu	TonB,ExbB,D	Membranlyse ^{n.d.}	n.d.	<i>E. coli</i>
Ia	Cir	TonB,ExbB,D	Pore ^{n.d.}	69	<i>E. coli</i>
Ib	Cir	TonB,ExbB,D	Pore ^{n.d.}	70	<i>Sh. sonnei</i>
Js*	Cir	n.d.	nur bei EIEC ^{n.d.}	n.d.	<i>Sh. sonnei</i>
L**	n.d./OmpA	TolA,Q,n.d.	Pore	45	<i>S. marcescens</i>
M	FhuA	TonB,ExbB,D	Inhibit. Murein	29	<i>E. coli</i>
N	OmpF/C, PhoE	TolA,Q,R	Pore	42	<i>E. coli</i>
Q	Cir	TonB,ExbB,D	n.d.	n.d.	<i>E. coli</i>
S1	Cir	TonB,ExbB,D	Pore	n.d.	<i>Sh. boydii</i>
S4	OmpF/W°	TolA,B,Q,R	Pore	55	<i>E. coli</i>
U	OmpA/F, LPS	TolA,B,Q,R	Pore	66	<i>Sh. boydii</i>
5	Tsx/TolC	TonB,ExbB,D	Pore	53	<i>E. coli</i>
10	Tsx/TolC	TonB,ExbB,D	Pore	53	<i>E. coli</i>
28b**	n.d./OmpA/F, LPS	TolA,B,Q,R	Pore	47	<i>S. marcescens</i>

Tabelle nach [122, 20], n.d. nicht definiert, * nicht SOS induzierbar, ** evtl. identisch, °[3], M Molekülmasse, *C. Citrobacter*, *E. Escherichia*, *S. Serratia*, *Sh. Shigella*

Colicin-Import Jedes Colicin besitzt einen spezifischen Rezeptor zur Bindung. Die sich anschließende Translokation durch die äußere Membran kann vom *Ton-* oder *Tol-System* abhängen, wonach sich Colicine entsprechend in zwei Gruppen unterteilen. Die Colicine der *Gruppe A* nutzen das Tol-System, einen Komplex von fünf Proteinen (TolA,B,Q,R und Pal) [6], der die Stabilität der Zellhülle bestimmt [24]. Die Colicine der *Gruppe B* sind vom Ton-System abhängig, das aus einem Transporter der äußeren Membran und

1 Einleitung

drei bekannten Proteinen der inneren Membran (TonB, ExbB, ExbD) besteht [102][103]. Dieses energetisiert den aktiven Transport der Colicine durch die äußere Membran [40]. TonB interagiert mit der sogenannten TonB-Box, der Consensus-Sequenz aller TonB-abhängigen Rezeptoren und Colicine. Je nach Wirkmechanismus werden Colicine in das Periplasma, in die innere Membran oder in das Cytoplasma zu ihrem Zielort transportiert.

Colicin-Aktivität Nach der Rezeptorbindung und Translokation kann das jeweilige Colicin aktiv werden. Diese drei Schritte sind charakteristisch für alle Colicine und bedingen deren Aufbau [18]. Sie bestehen N-terminal aus der *Translokations-*, zentral aus der *Rezeptorbindungs-* und C-terminal aus der *Aktivitätsdomäne* [28][97]. Aufgrund ihrer Wirkung kann man Colicine in *porenformende* und *enzymatische* unterteilen. Die porenformenden Colicine A, B, E1, Ia, Ib, L/28b, N, S1, S2, U, 5 und 10 besitzen spannungsabhängige Kanäle, die bei positiver Spannung geöffnet und bei negativer geschlossen sind. Ein einziges Molekül Colicin ist in der Lage, eine Zelle zu töten. Diese hohe Effektivität ist zusätzlich an eine lange Lebensdauer gekoppelt, was sie von den im Millisekundenbereich kurzlebigen, enzymatisch wirksamen Colicinen D, E2-E9 und M abgrenzt [20]. Nukleasen werden hierbei vom einzigartigen Wirkmechanismus von Colicin M unterschieden (siehe Abschnitt 1.3 auf Seite 10). Die Mehrheit enzymatischer Colicine zielt auf Phosphodiesterbindungen im bakteriellen Cytoplasma, sodass der Zelltod durch degradierte DNA, rRNA oder tRNA eintritt. Metallabhängige DNasen wirken durch mehrfaches Schneiden einzel- oder doppelsträngiger DNA und auch RNA, das den zelleigenen Reparaturmechanismus überlastet. Die rRNasen E3, E4 und E6 attackieren die 30S-Untereinheit der Ribosomen und spalten die 16S-rRNA. Colicin E5 und D agieren als tRNasen: Colicin E5 spaltet die Anticodon-Schleife für Tyr, His, Asn und Asp; Colicin D die vier Iso-tRNA's für Arg [89]. Die entsprechenden Immunitätsproteine bieten dabei spezifischen Eigenschutz (siehe Abschnitt 1.4 auf Seite 18).

Colicin-Genetik Unter Stressbedingungen wie z.B. Nährstoffmangel [80], Anaerobiose [37] oder hohen Temperaturen [75][21] werden Colicine mittels Regulierung von DNA-Schäden (SOS-Regulon) exprimiert und unterscheiden sich so von Mikrocinen und peptidischen Bakteriocinen [62]. Sie sind plasmidcodiert [29] und lassen sich in zwei Plasmidklassen differenzieren. Kleine (6-10 kB) *TypI*-Plasmide mit mehreren Kopien enthalten das Colicin-Operon samt einem Mobilisierungsfaktor; große (40 kB), konjugierbare *TypII*-Plasmide in einfacher Kopie tragen neben dem Gen für die Colicin-Aktivität viele weitere. Die Organisation im Operon wurde an Colicin E1 entdeckt [31]. Colicine mit Nukleaseaktivität enthalten darin ihr Aktivitätsgen zusammen mit ihrem Immunitäts- und Lysegen,

porenformende Colicine hingegen haben ihr Immunitätsgen auf ein spezifisches Operon unter konstitutiver Regulation ausgelagert [20]. Das letzte Gen des Colicin-Operons ist das, das Colicinlyseprotein codierende, Lysegen. Es ist für die Freilassung des Colicins ins Medium und den Zelltod nach Induktion verantwortlich [131]. Dieses Sekretionssystem unterscheidet sich somit von allen anderen bekannten in Anzahl und Menge der zu benötigten Proteine, in zeitlicher Koordination der Freisetzung und Mangel an Spezifität [128]. Evolutionär wird ein gemeinsamer Ursprung aller Colicin-Operons vermutet, da sich die verschiedensten Colicine aus wenigen DNA-Fragmenten, die die funktionellen Domänen der Proteine codieren, zusammensetzen [107].

Colicin-Bedeutung Colicine sind Instrumente zum Verständnis bakteriellen Proteintransports und werden seit über achtzig Jahren erforscht. Sie haben sich zudem als Werkzeuge in Biotechnologie und Molekularbiologie bewährt. So wurde z.B. das Plasmid von Colicin E1 verwendet, um die ersten stabilen, fortpflanzungsfähigen Vektoren zu konstruieren [2]. Umprogrammiert verrichten sie effektiven bakteriellen Selbstmord, was zur Eindämmung von Genverbreitung genutzt wird [130]. Außerdem können mithilfe von Colicin-Operator-Sequenzen gentoxische Substanzen aufgespürt werden. Der GFP-fusionierte SOS-Promoter von Colicin D erwies sich dabei sensitiver als Promotoren von *recA*, *sulA* oder *umuDC* [96]. Auch zur Verbesserung von Proteinaufreinigungsprozessen werden das Tol-System, Colicine und Colicinlyseproteine instrumentalisiert, um die Proteinfreisetzung während des Zellwachstums zu induzieren [22][132]. Größere Colicin-Plasmide codieren zudem für Virulenzfaktoren, sodass eine Co-Produktion deren Verlust verhindert [7].

Colicin-Strukturen (siehe Abb. 1.1 auf Seite 6) Makromoleküle lebender Systeme unterliegen chemischen Gesetzmäßigkeiten, die spezifischen Sequenzen Gestalt verleihen. Als fundamentales Prinzip determiniert dabei die einzigartige Struktur eines jeden Proteins dessen Funktionen. Die Auflösung quartärer, dreidimensionaler Strukturen von Proteinen vermag folglich dessen Funktion und Interaktion mit anderen Molekülen zu identifizieren. Das strukturelle Wissen um Colicine findet 1970 seinen Ursprung mit Colicin Ia und dessen analytischen Ultrazentrifugationsexperimenten [78]. Die langgestreckte Form erschwerte jedoch die Kristallisation, sodass Colicinstrukturen nur langsam bestimmt wurden. Erstmals 1989 wurde die C-terminale Domäne von Colicin A gelöst [98], kurze Zeit später auch das C-terminale Fragment von Colicin E1 [135]. Die erste vollständige Strukturaufklärung eines Colicins lag 1997 mit dem hoch α -helikalen Colicin Ia [134] vor, dessen einzelne Domänen der Y-Form klar zuzuordnen sind. Bislang konnten bereits die Colicine

1 Einleitung

B [63], E3 [124], N [133] mit fehlenden 90 N-terminalen Resten, M [136] und S4 [3] strukturell aufgeklärt werden. Auch wenn die porenformenden Colicine Ia, B, N und S4 sich im C-terminalen zehnfachen Helixbündel ähneln, spiegeln die Strukturen dennoch eine hohe Diversität wider. Langgestreckte Strukturen wie Colicin N und E3 mit klar definierten Domänen stehen kleineren hantelförmigen wie Colicin N und B gegenüber. Colicin S4 besitzt eine einzigartig verdoppelte Rezeptorbindedomäne. Beide können ihren Rezeptor OmpW binden, wobei einer für erfolgreiche Toxizität ausreichend ist. In meiner Diplomarbeit konnte ich zur Aufklärung der Struktur von Colicin M beitragen, das ebenfalls keine Ähnlichkeit mit bekannten Strukturen aufweist (siehe Abschnitt 1.3 ab Seite 7).

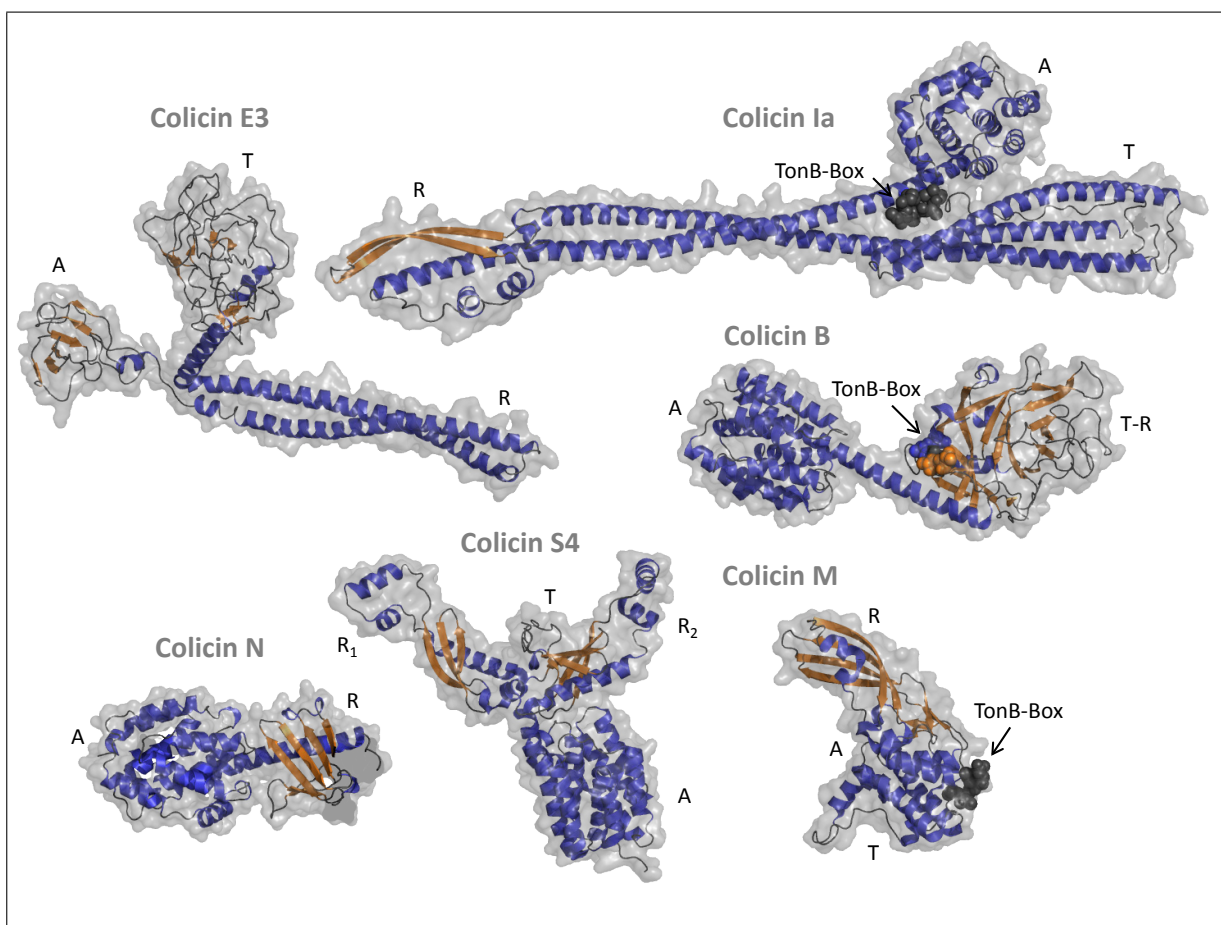


Abbildung 1.1: **Bislang bekannte, vollständige Colicin Strukturen (maßstabsgetreu)**

Links sind Colicine der Tol-abhängigen Gruppe A, rechts die der Ton-abhängigen (TonB-Box markiert) Gruppe B abgebildet. Die α -Helices sind jeweils blau, die β -Faltblätter orange unterlegt. Die Domänen sind Aktivität (A), Rezeptorbindung (B) und Translokation (T) zugeordnet.

Colicin B (PDB 1RH1 [63]), Colicin E3 (PDB 1JCH [124]), Colicin Ia (PDB 1CII [134]), Colicin M (PDB 2XMX, 3DA3 [136]), Colicin N (PDB 1A87 [133]), Colicin S4 (PDB 3FEW [3])

Die Abbildung wurde mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt.

1.3 Colicin M

Colicin M wurde erstmals in den fünfziger Jahren beschrieben [42]. Mit seinen 271 Aminosäuren und 29 kDa ist es das kleinste bekannte Colicin [15][85]. Es wird der Gruppe B der Colicine zugeordnet, weil es das TonB-System benötigt [14]. Colicin M ist häufig mit einem weiteren Colicin, Colicin B, zusammen auf demselben Plasmid codiert (pColBM)[55] und mit Mitomycin C induzierbar [15]. Das pColBM-Plasmid besitzt im Gegensatz zu anderen Colicin-Plasmiden kein Lysegen. Etwa 10% von Colicin M wird über unbekannte Mechanismen freigesetzt [72][129]. Wesentliche Alleinstellungsmerkmale von Colicin M sind der Eingriff in den Stoffwechsel von Murein (Peptidoglycan) [117], indem es als Phosphatase die Regeneration des Lipidcarriers unterbindet [47] (siehe Seite 10) und die Abhängigkeit von FkpA (Prolyl-*cis-trans*-Isomerase/Chaperon) [69] (siehe Seite 15).

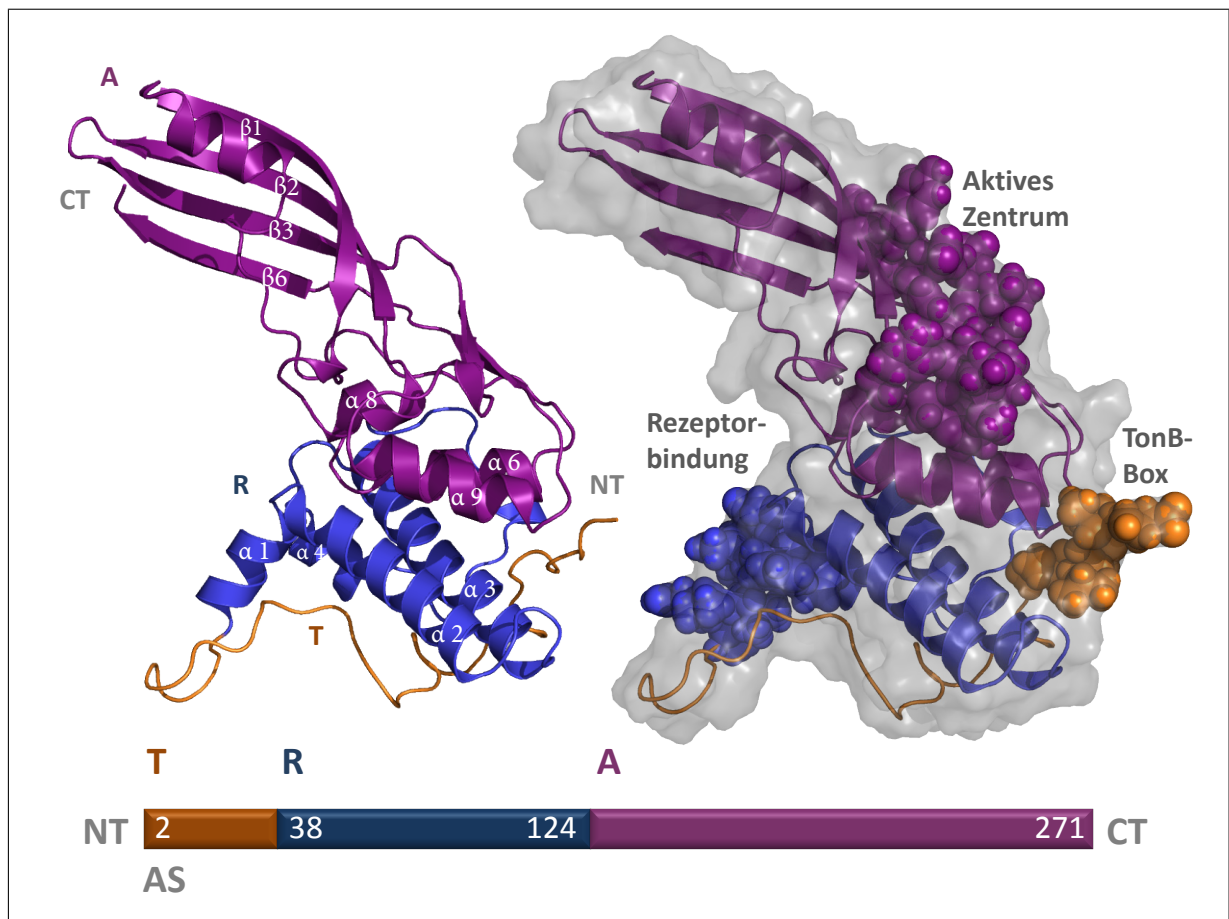


Abbildung 1.2: **Struktur von Colicin M**

T-Translokationsdomäne, R-Rezeptorbindedomäne, A-Aktivitätsdomäne; CT-C-Terminus, NT-N-Terminus
 Identifizierte Reste (Aktives Zentrum, Rezeptorbindestelle, TonB-Box) sind in der rechten Struktur markiert.
 Die Abbildung wurde mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt. PDB 2XMX, 3DA3 [136]

1 Einleitung

Struktur und Domänenorganisation von Colicin M (siehe Abb. 1.2 auf Seite 7) Colicin M besteht aus den drei für Colicine typischen, funktionellen Domänen. Translokations-, Rezeptorbinde- und Aktivitätsdomäne konnten mittels Mutationen in der TonB-Box [100] und am C- und N-Terminus [32] identifiziert werden und gewannen 2008 im Rahmen meiner Diplomarbeit durch Auflösung der Kristallstruktur [136] eine räumliche Dimension. Die einzelnen Bereiche weisen keinerlei Ähnlichkeit zu bereits bekannten Strukturen auf und die neue Phosphatasedomäne gleicht keiner bekannten Phosphatase. Proteine von *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, verschiedenen *Burkholderia*-Stämmen und einem *Pseudomonas*-Phagen weisen eine Sequenz-Identität zu Colicin M von 26 bis 45% auf [61] (siehe Abb. 1.3 auf Seite 9).

Translokationsdomäne Der N-Terminus besteht aus einer kurzen, willkürlichen Windung und weist mit sechs Prolinresten den höchsten Grad an Flexibilität des gesamten Moleküls auf. Derart unstrukturierte N-Termini ohne definierte Sekundärstruktur können z.B. die Entfaltung von Proteinen während der Translokation ermöglichen (siehe Seite 12). Den Anfang des Moleküls bildet die exponierte TonB-Box. Diese Consensus-Sequenz von fünf Aminosäuren enthalten auch alle anderen Transportproteine der äußeren Membran, die das Ton-System (siehe Abschnitt 1.2 auf Seite 3) und die protonenmotorische Kraft für den Import von Substraten benötigen [103] [23]. Colicin M und FhuA (siehe Seite 14) sind für die Aufnahme von Colicin M von der TonB-Box abhängig [100] [119], was durch TonB-Punktmutationen von inaktivem FhuA und Colicin M gezeigt wurde [99].

Rezeptorbindedomäne Die zentrale Domäne ist kugelförmig, vollständig α -helikal und für die Bindung an FhuA zuständig. Als Bindestelle für den Rezeptor FhuA wurden die hydrophoben Reste 38-46 der ersten α -Helix identifiziert [61].

Aktivitätsdomäne Das Hauptstrukturmerkmal der gestreckten C-terminalen Domäne bildet ein offener β -Barrel von vier β -Strängen. Als aktives Zentrum konnte der Bereich der Aminosäuren 222-RSYDDKYDFNASTHR-236 verifiziert werden, wobei Asp226 an der Oberfläche von Colicin M exponiert ist und Asp226 direkt an der Hydrolyse der Phosphatester beteiligt ist [61]. Der Einfluss der C-terminalen Reste Lys-Arg auf eine verringerte toxische Aktivität wurde bereits 1985 untersucht [32]. Die Deletion dieses Bereichs reduziert außerdem die Translokation von Colicin M durch die äußere Membran nach Bindung an den Rezeptor FhuA [61]. Wie auch die zentrale Domäne, ist der N-Terminus innerhalb der Bakteriocine nicht konserviert, was die unterschiedlichen Mechanismen an Import für Bakteriocine widerspiegelt. Das Homologiemuster wiederum kann ein Indiz für die evolutionäre Kombination verschiedener funktioneller Domänen sein.

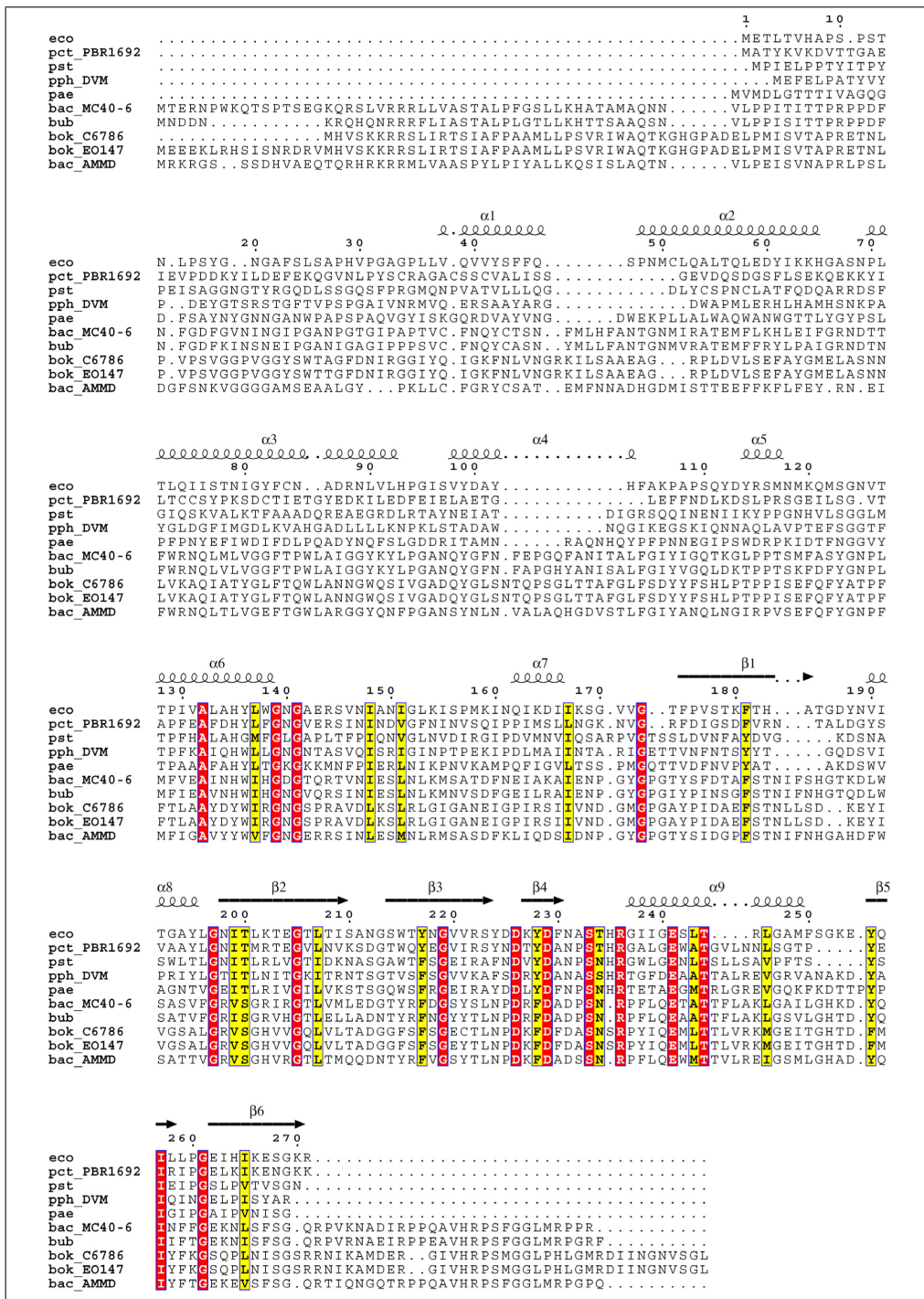


Abbildung 1.3: Vergleich der Sequenz von Colicin M mit Colicin M - ähnlichen Sequenzen [61] **eco** Colicin M Aktivitätsprotein Cma *Escherichia coli*; **pct_PBR1692** hypothetisches Protein PcarbP_02847 *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliensis* PBR1692; **pst** Bakteriocin, vermeintlich *Pseudomonas syringae pv. tomato* str. DC3000; **pph_DVM** Cma *Pseudomonas* Phage DVM-2008; **pae** hypothetisches Protein EXA13 *Pseudomonas aeruginosa*; **bac_MC40-6** hypothetisches Protein BamMC406_0333 *Burkholderia ambifaria* MC40-6; **bub** hypothetisches Protein BuboB_20394 *Burkholderia ubonensis* Bu; **bok_C6786** hypothetisches Protein BokIC_29925 *Burkholderia oklahomensis* C6786; **bok_EO147** hypothetisches Protein BokIE_30981 *Burkholderia oklahomensis* EO147; **bac_AMMD** hypothetisches Protein Bamb_0324 *Burkholderia ambifaria* AMMD. Abkürzungen wurden von <http://www.genome.jp/kegg/> entsprechend angepasst. Identische Aminosäuren (rot) und Aminosäuren ähnlicher Eigenschaften (gelb) sind farblich unterlegt.

1 Einleitung

Wirkungsweise von Colicin M (siehe Abb. 1.5 auf Seite 11) Murein ist ein aus Zuckern und Aminosäuren zusammengesetztes Makromolekül, welches in der Zellwand sowohl gram-positiver (Mureindicke: 20- 80 nm), als auch gram-negativer (Mureindicke: < 10 nm) Bakterien vorkommt. Es fungiert unter anderem als essentielle Stützschiicht gegenüber dem osmotischen Druck eines Bakteriums. Die cytoplasmatischen Vorstufen des Mureins sind UDP-*N*-Acetyl-muraminsäure-Pentapeptid (UDP-MurNAc-Pentapeptid) und UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Diese müssen miteinander verknüpft über die cytoplasmatische Membran ins Periplasma gelangen und in bereits bestehendes Murein eingebaut werden. Zu diesem Zweck werden sie an den Lipid-Carrier Bactoprenylphosphat (=Undecaprenylphosphat) gekoppelt. Dabei entsteht zunächst das Bactoprenyl-PP-MurNAc-Pentapeptid (=Lipid I), dann das Bactoprenyl-PP-MurNAc-GlcNAc-Pentapeptid (Lipid II), über den sie auf die periplasmatische Seite gelangen. Dort wird dieser Mureinbaustein vom Carrier auf das Murein übertragen. Der Bactoprenyl-Pyrophosphat-Carrier muss wieder in den Transferzyklus eintreten, um weitere cytoplasmatische Murein-Vorstufen zu transportieren. Dazu wird der in der Membran verbleibende abgespaltene Bactoprenyl-PP-Carrier zu Bactoprenyl-P dephosphoryliert.

Colicin M greift nun in diesen Regenerierungsschritt ein, indem es den Lipidüberträger inhibiert [58]. Diese Erkenntnis wurde 2006 bestätigt und die exakte Zielstruktur von Colicin M identifiziert [47]. Demnach fungiert Colicin M als Phosphatase [47]. Es spaltet die Pyrophosphatgruppe von Lipid I und II zwischen Carrier und Pentapeptid, so dass 1-Pyrophosphat-*N*-Acetyl-muraminsäure-Pentapeptid-*N*-Acetylglucosamin und Bactoprenol entstehen. Der resultierende freie Alkohol (Bactoprenol) kann nicht mehr als Lipidcarrier agieren und Murein nicht mehr synthetisiert werden. Infolge lysieren die Zellen (siehe Abb. 1.4). Da auch die LPS-O-Antigensynthese von Bactoprenylphosphat abhängig ist, wird dieser Prozess ebenfalls gehemmt.

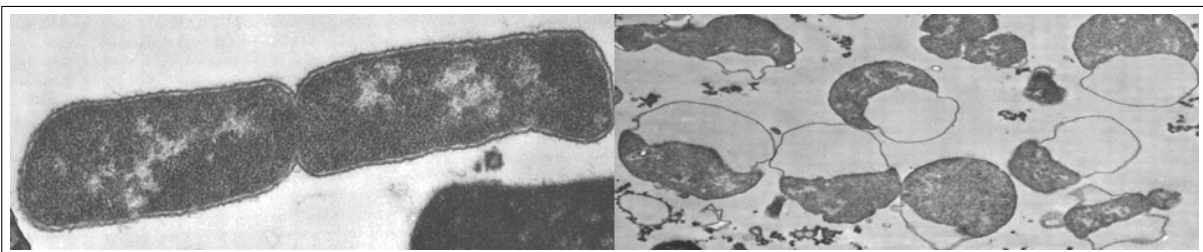


Abbildung 1.4: **Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *E. coli*-Zellen** veranschaulichen die Inhibition der Biosynthese von Murein durch Colicin M. Links sind sich teilende Zellen ohne Colicin M dargestellt, rechts wurden diese 1 Stunde mit Colicin M inkubiert und lysieren [15].

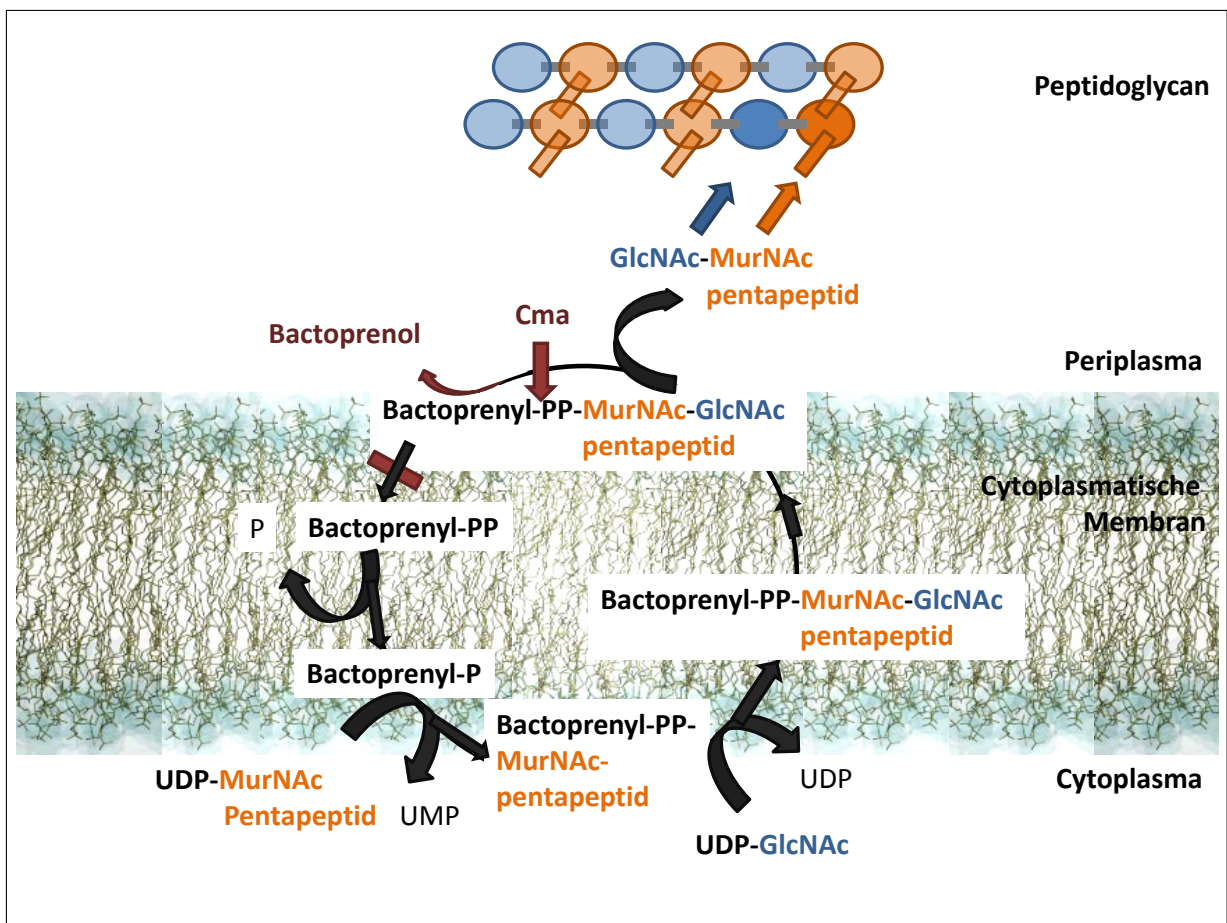


Abbildung 1.5: Inhibition der Biosynthese von Murein durch Colicin M (Cma)

Cytoplasma:

UDP-*N*-Acetyl-Muraminsäure-Pentapeptid (UDP-MurNAc-Pentapeptid),
 UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc)

cytoplasmatische Membran:

- Kopplung an Carrier-Lipid Bactoprenylphosphat (Bactoprenyl-P)
- Entstehung von Bactoprenyl-Pyrophosphat(PP)-MurNAc-Pentapeptid (=Lipid I)
- Entstehung von Bactoprenyl-Pyrophosphat(PP)-MurNAc-GlcNAc-Pentapeptid (Lipid II)

Periplasma:

- Abspaltung von Carrier und Pentapeptid
- *N*-Acetylglucosamin-*N*-Acetyl-muraminsäure-Pentapeptid (GlcNAc-MurNAc-Pentapeptid)
- Bactoprenyl-Pyrophosphat(PP) → Bactoprenyl-Monophosphat(P)
- periplasmatische Phosphatase Colicin M (rot): Spaltung von Lipid I und II
- statt Bactoprenyl-Monophosphat(P) → Bactoprenol → unterbrochener Kreislauf

1 Einleitung

Import von Colicin M Der Importmechanismus [136] von Colicin M hängt von den Proteinen FhuA [25], TonB [40], ExbB/D [40] und FkpA [136] ab (siehe Abb. 1.6), die im Folgenden im Zusammenhang des Imports von Colicin M vorgestellt werden. Die Abbildung 1.7 auf Seite 13 fasst den Importmechanismus in einer Übersicht zusammen.

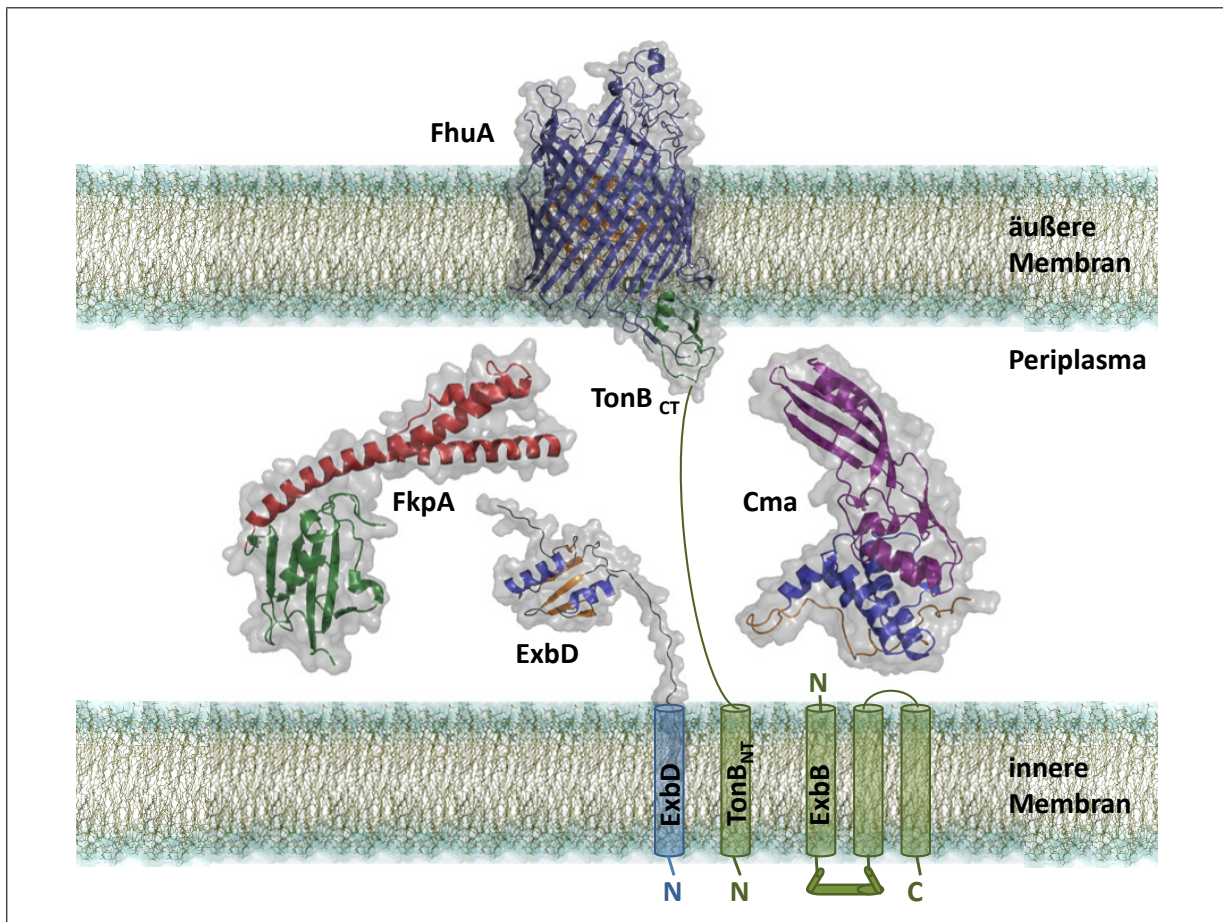


Abbildung 1.6: Import von Colicin M (maßstabsgetreu)

FhuA Colicin M bindet den membranständigen Rezeptor FhuA.

TonB Der Import von Colicin M erfordert den energiegekoppelten Transport mittels TonB.

ExbB/D TonB wird von ExbB/D stabilisiert.

FkpA Colicin M wird während des Imports entfaltet und von FkpA wieder zurückgefaltet.

NT/N- N-Terminus, CT/C- C-Terminus

Die Strukturen von FhuA-TonB, ExbD, Colicin M (Cma) und FkpA wurden mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt. FhuA-TonB-Komplex (PDB 2GRX) [99], ExbD (PDB 2PFU) [44], Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136], FkpA (PDB 1Q6U) [115]

Im Medium vorliegendes Colicin M wird an den Rezeptor FhuA gebunden und über diesen entfaltet ins Periplasma transloziert. In die Zelle eintretendes, entfaltetes, inaktives Colicin M wird von FkpA zurückgefaltet und liegt aktiv im Periplasma vor, um die Synthese von Murein zu inhibieren (siehe Seite 14 - 15).

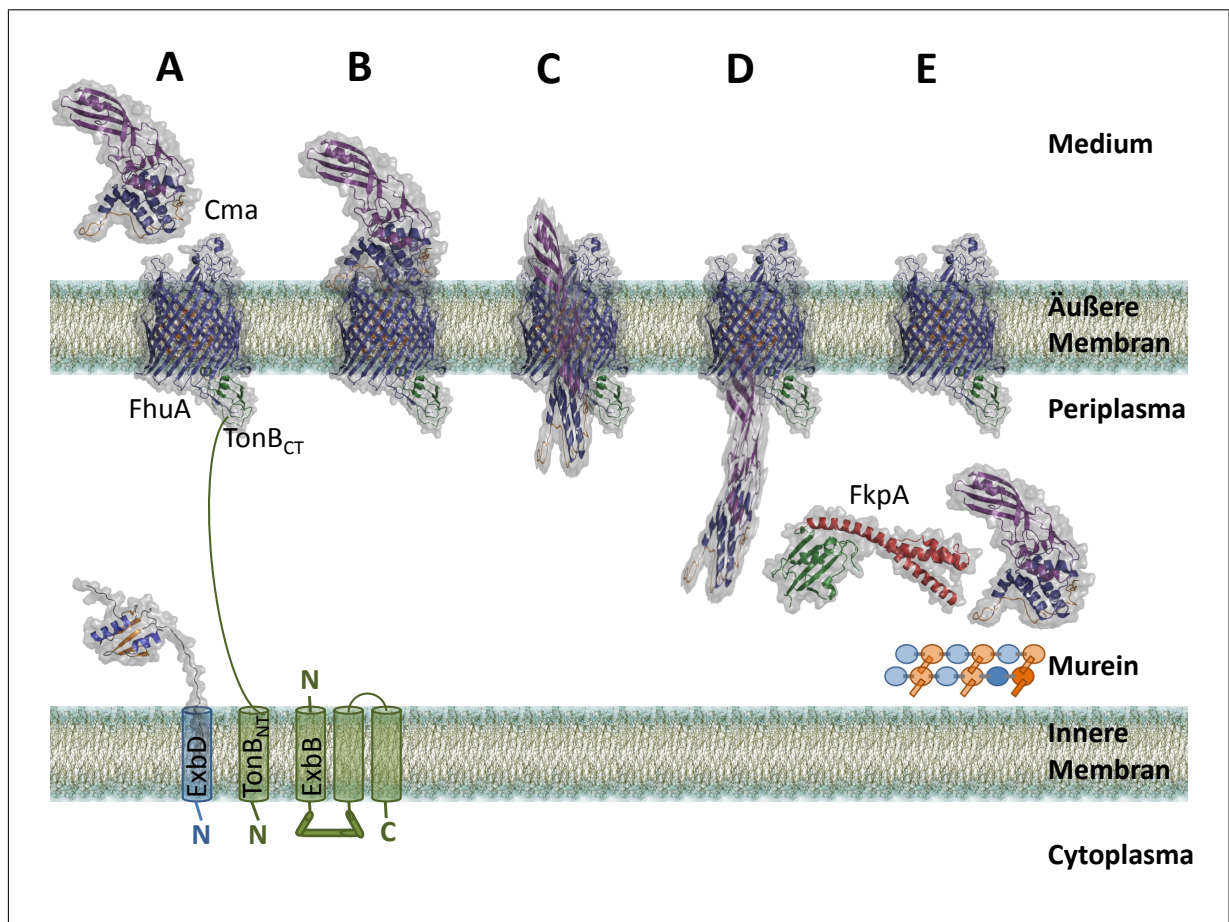


Abbildung 1.7: **Importmechanismus von Colicin M (maßstabsgetreu)**

- A** Colicin M liegt frei im Medium vor.
- B** Colicin M bindet an den Rezeptor FhuA.
- C** Colicin M wird während der Translokation entfaltet.
- D** Entfaltetes Colicin M liegt inaktiv vor.
- E** Colicin M wird von FkpA zurückgefaltet und liegt aktiv im Periplasma vor.

NT/N- N-Terminus, CT/C- C-Terminus

Die Strukturen von FhuA-TonB, ExbD, Colicin M (Cma) und FkpA wurden mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt. FhuA-TonB-Komplex (PDB 2GRX [99]), ExbD (PDB 2PFU [44]), Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136], FkpA (PDB 1Q6U [115])

1 Einleitung

Bindung an FhuA Um toxisch wirken zu können, muss Colicin M von außen aufgenommen werden [59]. Deshalb wird Colicin M zunächst mittels der hydrophoben Reste 38-46 der ersten α -Helix [61] an den Ferrichromrezeptor FhuA (siehe Abb. 1.8) gebunden.

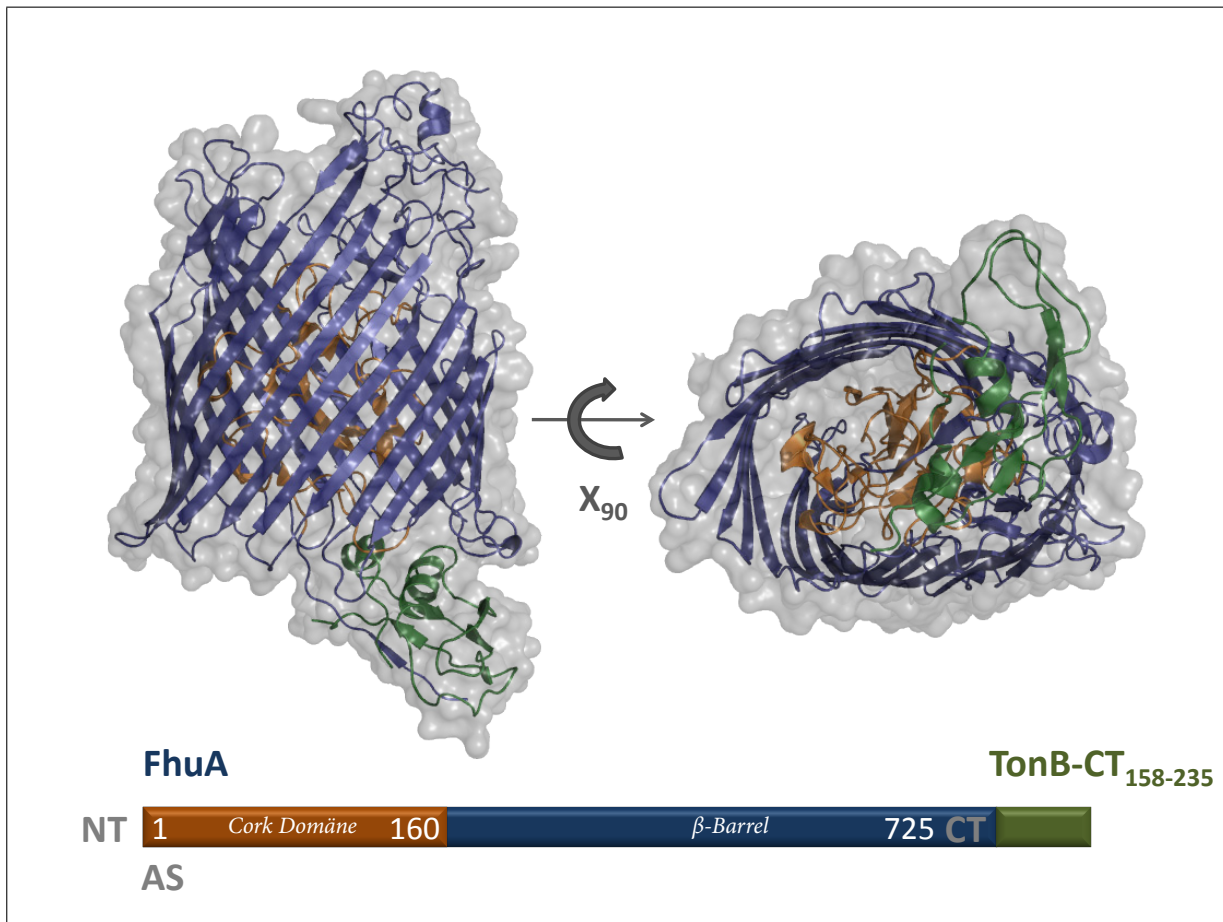


Abbildung 1.8: **Struktur von FhuA und TonB** CT C-Terminus, NT N-Terminus. Die Struktur von FhuA-TonB (PDB 2GRX [99]) wurde mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt.

FhuA transportiert Ferrichrom, das strukturell verwandte Antibiotikum Albomycin und das unverwandte Rifamycin CGP 4832 durch die äußere Membran und dient Colicin M, Microcin J25 und den Phagen T1, T5, UC-1 und ϕ 80 als Rezeptor [13][39]. Seine Kristallstruktur wurde 1998 gelöst und charakterisiert es als, aus 22 antiparallelen β -Faltblättern aufgebauten, kanalbildenden β -Barrel [39]. Dieser ist von einer globulären Domäne („Korken“) verschlossen. Wie auf Seite 8 besprochen, enthält auch FhuA eine TonB-Box, um den hochspezifischen, energiegekoppelten Import durchzuführen. Im Jahr 2000 gelang es, FhuA am C-terminalen Teil von TonB zu kristallisieren [38] und eine Vorstellung von der Konstellation beider Proteine im Transportmechanismus zu gewinnen (siehe Abb. 1.8).

Partielle Entfaltung von Colicin M Colicin M ist im Verhältnis zu FhuA zu groß für eine Passage in kompakter Form. Es ist nicht zuletzt wegen des flexiblen N-Terminus (siehe Seite 8) naheliegend, dass es während seiner Bindung an FhuA seine Form ändert und entfaltet.

Öffnung von FhuA Der Import von Colicin M erfordert einen energiegekoppelten Transport. Die protonenmotorische Kraft vermittelt diesen durch die äußere Membran [14], die Energiekopplung zwischen äußerer und cytoplasmatischer Membran wird durch das von ExbB/D stabilisierte TonB-System bereitgestellt [76] [102]. TonB ist N-terminal (Reste 1-33) in der cytoplasmatischen Membran verankert und kann zur Bildung eines energieübertragenden Komplexes mit ExbB und ExbD in Kontakt treten. C-terminal (Reste 155-239) ist TonB direkt in der Lage, Rezeptoren der äußeren Membran zu berühren, wobei das Zwischenteil von TonB (Reste 34-154) die Verbindung von C- und N-Domäne zwischen beiden Membranen gewährleistet [136]. Die durch diesen Komplex bereitgestellte Energie könnte die Struktur des Rezeptors FhuA verändern, in dessen Folge die globuläre Korkendomäne entweichen kann [35]. Bislang konnte nur eine primäre Bindung von Colicin M an FhuA gezeigt werden [36], die Translokation durch FhuA ist weiterhin fraglich. Es ist wahrscheinlich, dass Colicin M bei seinem Durchtritt sowohl durch FhuA hindurch, als auch an FhuA vorbei entfaltet.

Interaktion von TonB-Box und TonB Indem die TonB-Box von Colicin M mit TonB interagiert, entfaltet das zu importierende Protein zusätzlich. Es kann nun, teilweise entfaltet, ins Periplasma eintreten. Diese zweistufige Interaktion mit TonB, die zum einen den Rezeptor und zum anderen das zu importierende Protein involviert, scheint ein genereller Aufnahmemechanismus der TonB-abhängigen Colicine zu sein. Er wurde auch für die Colicine B [91] und Ia [17] gezeigt.

Rückfaltung durch FkpA Um als Phosphatase aktiv werden zu können, bedarf es der Rückfaltung von Colicin M. Diese Aufgabe übernimmt das Chaperon FkpA, das im nächsten Abschnitt Gegenstand der Betrachtung ist.

Relevanz von FkpA für Colicin M Bereits in den achtziger Jahren sind Mutanten isoliert worden, die tolerant gegenüber Colicin M (*tolM*) [12], gegen andere FhuA-Liganden jedoch weiterhin sensitiv waren. Außerdem sind temperatursensitive Mutanten isoliert worden, die bei 42 °C tolerant gegenüber Colicin M waren, bei 30 °C aber sensitiv. Die zugrundeliegenden Mutationen wurden statt in der für die Aufnahme verantwortlichen Genen nahe des Streptomycin-Resistenzgens *rpsL* kartiert [12] und waren zu jener Zeit nicht erklärbar. 2007 konnte dann das Chaperon FkpA diese Kausalität aufklären und identifizierte die Resistenz als FkpA-Mutation [69].

1 Einleitung

FkpA Das periplasmatische, 29 kDa große, aus 270 Aminosäuren bestehende Protein FkpA wurde Mitte der neunziger Jahre identifiziert [67] und wirkt als Dimer zusammen mit anderen Chaperonen extracytoplasmatischem Stress entgegen [26]. 2004 konnte die Kristallstruktur aufgeklärt werden [115] (siehe Abb. 1.9).

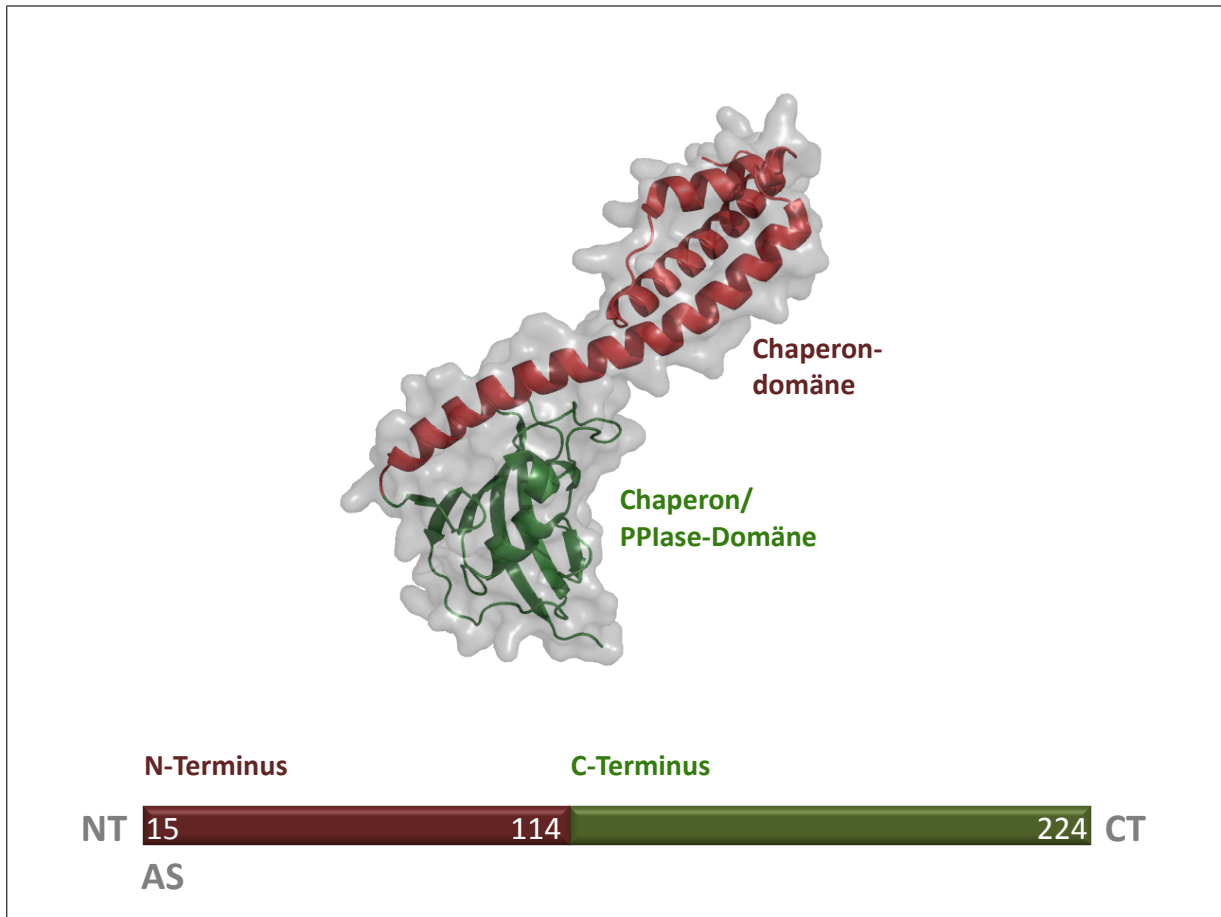


Abbildung 1.9: **Struktur von FkpA** CT C-Terminus, NT N-Terminus. Die Struktur von FkpA (PDB 1Q6U [115]) wurde mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt.

Es gehört zur Familie der FKBP, der FK506-bindenden Proteine. FKBP sind durch Aktivität einer Prolyl-*cis-trans*-Isomerase (PPIase) gekennzeichnet, für die in den achtziger Jahren erste experimentelle Nachweise geliefert wurden [41] [71]. Die *cis-trans*-Isomerisierung gilt als limitierender Schritt bei der Proteinfaltung und charakterisiert Proteine mit PPIase-Aktivität als Chaperone. Dabei stabilisiert die ungewöhnliche Struktur des Prolins die *cis*-Form, sodass beide Isomere unter biologischen Bedingungen vorkommen. Das Immunsuppressivum FK506 hemmt die PPIase-Aktivität von FkpA *in vitro* [1][115].

Chaperone Chaperone sind Proteine, die neu synthetisierten Proteinen bei ihrer korrekten Faltung assistieren, um deren spezifische, native und funktionelle Konformation zu erleichtern oder zu ermöglichen [92]. Außerdem verhindern sie die Aggregation missgefalteter Proteine [1][68][106]. Sie interagieren spezifisch mit aggregationsanfälligen Proteinen und treten dazu direkt in Konkurrenz zu Aggregationsreaktionen. Somit bewahren sie unreife Proteine, etymologisch betrachtet wie die englischen „Anstandsdamen“, ihre ihnen anvertrauten Schützlinge vor schädlichen Kontakten. In *E. coli* befinden sich verschiedenste Chaperone sowohl im Cytoplasma als auch im Periplasma, in welchem sie ihre Funktion, den Schutz vor Fehlfaltung und Einbau von Proteinen in die äußere Membran, ausführen. Bis zu unserer Entdeckung der Interaktion von FkpA und Colicin M waren Chaperone nur aktiv an den Prozessen exportierter Proteine beteiligt. Somit ist FkpA bislang das einzige Chaperon, das Colicin M als importiertem Protein assistiert [69]. Ebenso einzigartig ist seine Unersetzbarkeit durch andere Chaperone, was ich in meiner Diplomarbeit nachweisen konnte [69]. Normalerweise können Chaperone sich gegenseitig funktionell substituieren [109]. Kein anderer bekannter Chaperonmechanismus ist so spezifisch wie der zwischen Colicin M und FkpA [69]. Die Sensitivität von Colicin M ist der erste *in vivo* Test für FkpA.

Chaperon- und PPIase-Domäne In der Literatur gibt es kontroverse Meinungen über die Funktion der beiden Domänen im Dimer FkpA, die alle an artifiziellen Proteinen erhoben wurden. So soll nach Arié *et al.* zum einen die α -helikale N-Domäne die falsche Faltung des MalE31 (Maltosetransporter) Mutantenproteins verhindern und zeichnet sich somit als Chaperondomäne aus [1]. Andererseits verzögert laut Plückthun *et al.* auch die C-Domäne mit ihrer antiparallelen β -Faltblattstruktur die Aggregation der Citratsynthese bei 43 °C und fördert die Faltung einer Antikörperkette, wobei die N-Domäne keinerlei Rolle spielen soll [9][105]. Aus deren weiteren Experimenten ergab sich, dass die Chaperonaktivität unabhängig von der PPIase-Aktivität ist. Die Experimente der Arbeitsgruppe Braun relativieren wiederum die kontroversen Meinungen über die Funktion der beiden Domänen im Dimer FkpA. Beide Domänen von FkpA scheinen für die Aktivierung von Colicin M essentiell [69] zu sein.

Funktion von FkpA Teilweise entfaltetes, periplasmatisches Colicin M kann erst nach erfolgreicher Rückfaltung durch FkpA seine toxische Wirkung entfalten. Dabei scheinen sowohl die Chaperon-Domäne als auch die PPIase-Domäne essentiell und Colicin M kann die Zellen durch seinen Eingriff in die Mureinbiosynthese erfolgreich lysieren.

1.4 Immunitätsproteine von Colicinen

Bereits kurz nach der Entdeckung des ersten Colicins wurde erstmalig erkannt, dass zum Schutz der produzierenden Zellen Immunität erforderlich ist [43]. Mit dem Fund von Colicin E3 und dessen Freisetzung im heterodimeren Komplex mit seinem schützenden Immunitätsprotein wurde das erste Immunitätsprotein beschrieben [70]. Nach und nach konnte jedem Colicin sein entsprechendes, hochspezifisches Immunitätsprotein zugeordnet und dessen biochemische Basis eingehend untersucht werden (siehe Tab. 1.3).

Tabelle 1.3: **Immunitätsproteine von Colicinen**

Colicin	Immunitätsprotein	M [kDa]	Ladung	hydro-	Lokalisation	Genrichtung Col-IP
Colicin A	Cai	20,5	+	-phob	CM	→←←
Colicin B	Cbi	20,2	+	-phob	CM	→←←
Colicin E1	Im1	13,4	+	-phob	CM	→←←
Colicin Ia	Iia	13,3	+	-phob	CM	→←←
Colicin Ib	Iib	13,2	+	-phob	CM	→←←
Colicin N	Cni	15,2	+	-phob	CM	→←←
Colicin M	Cmi	13,9	-	-phil	CM	→←←
Colicin E2	Im2	10	-	-phil	löslich	→→→
Colicin E3	Im3	9,8	-	-phil	löslich	→→→
Colicin E5	Im5	9,1	-	-phil	löslich	→→→
Colicin E8	Im8	9,6	-	-phil	löslich	→→→
Colicin E9	Im9	9,6	-	-phil	löslich	→→→
Colicin D	Cdi	10,1	-	-phil	löslich	→→→

Col Colicin, IP Immunitätsprotein, CM cytoplasmatische Membran; Tabelle nach [60]

Immunitätsproteine von Colicinen liegen entweder löslich oder in der cytoplasmatischen Membran verankert vor [60]. Die löslichen Immunitätsproteine der Nukleasen binden im Cytoplasma an die Aktivitätsdomäne und inaktivieren das Colicin [27][65][70][83]. Sie werden als inaktiver heterodimerer Komplex aus der Zelle ausgeschleust und dissoziieren erst bei der Aufnahme in sensitive Zellen [79]. Auch die integral membranverankerten Immunitätsproteine interagieren mit der Aktivitätsdomäne des jeweiligen Colicins [6][88]. Durch helikale Wechselwirkungen wird bei den porenformenden Colicinen die Ausbildung der Pore verhindert oder der durch das Colicin gebildete Kanal blockiert [45]. Der Komplex verbleibt demzufolge im Gegensatz zu den löslichen Immunitätsproteinen in der Zelle. Alle Immunitätsproteine der Porenformer gleichen sich zudem in ihrer positiven Ladung, ihrer Hydrophobizität und der entgegengesetzten Genrichtung zum Colicin [60]. Die Immunitäts-

proteine der Nukleasen dagegen besitzen eine Molekülmasse um 10 kDa, sind negativ geladen, hydrophil und befinden sich in Genrichtung des Colicins [60]. Das Immunitätsprotein von Colicin M vereint Eigenschaften aus beiden Gruppen (siehe Seite 20). Die Bindungen von Immunitätsproteinen und enzymatischen Nuklease-Colicinen sind sehr stark. So ist der Komplex von Colicin E9 und seinem Immunitätsprotein eine der bislang am stärksten gemessenen Protein-Protein-Interaktionen [77]. 2001 konnte erstmalig ein vollständiges Colicin (E3) an sein spezifisches Immunitätsprotein gebunden strukturell gelöst werden [124]. Seither liegen nur Strukturen von Immunitätsproteinen Nuklease-aktiver Colicine vor: Im2, 3, 5, 7, 8, 9 und Cdi (siehe Abb. 1.10). Die Immunitätsproteine von Colicin E2,7,9 und Colicin D gleichen sich in ihrem Aufbau aus reinen, viersträngigen α -Helices. Nur Im3 und 5 enthalten β -Faltblätter, wobei Im5 den rein α -helikalen stark ähnelt.

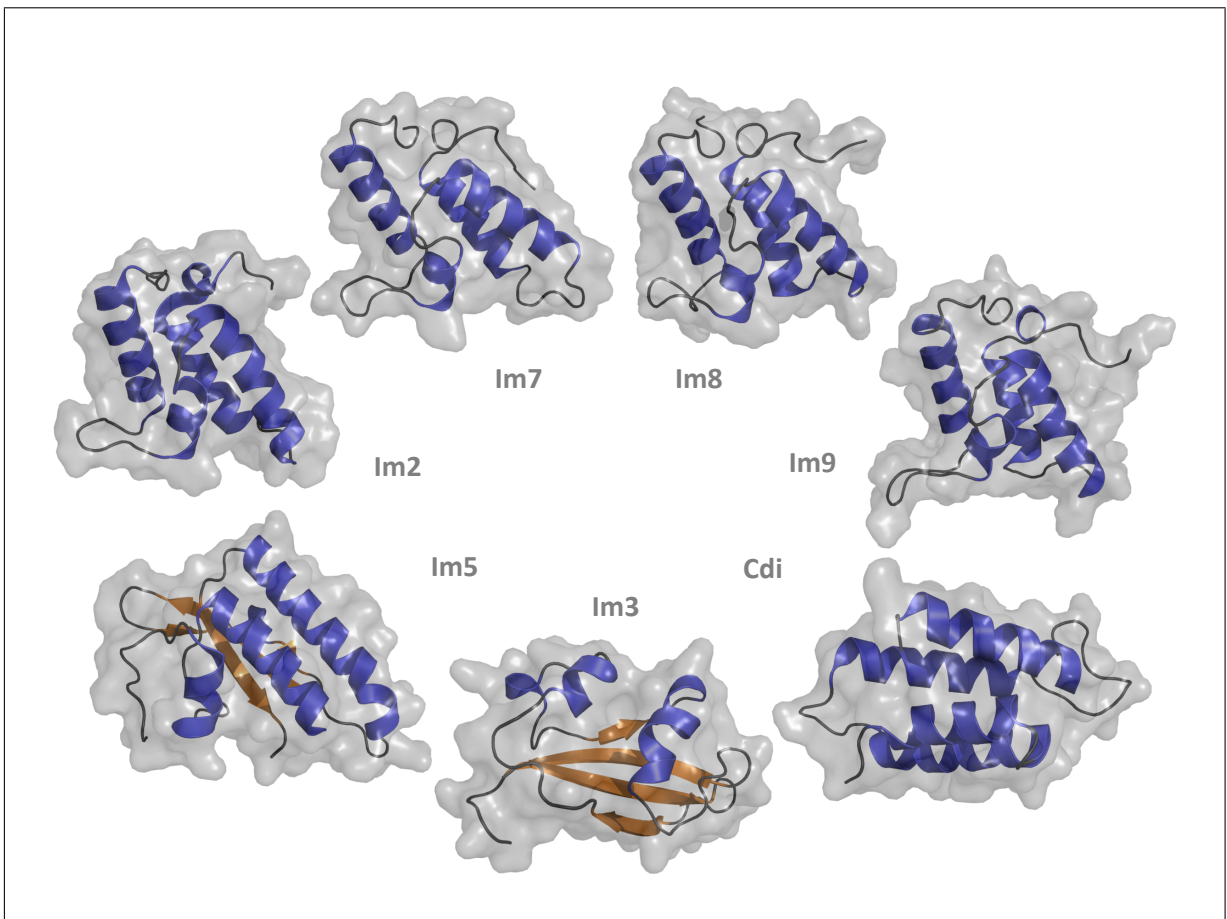


Abbildung 1.10: **Struktur aller bekannten Immunitätsproteine (maßstabsgetreu)**

Col Colicin, Im Immunitätsprotein; Im2 von ColE2 (PDB 2NO8 [8]), Im3 von ColE3 (PDB 1E44 [19]), Im5 von ColE5 (PDB 2FHZ [87]), Im7 von ColE7 (PDB 1AYI [30]), Im8 von ColE8 (PDB 1GXH [84]), Im9 von ColE9 (PDB 1BXI [81]), Cdi von ColD (PDB 1V74 [49]). Die Abbildung wurde mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt, Strukturen wurden z.T. vom Komplex mit Colicin vereinzelt.

1.5 Immunitätsprotein von Colicin M

Colicin M produzierende Zellen werden vom Colicin M - Immunitätsprotein (*cmi*-Gen) geschützt. Dieses inaktiviert Colicin M, bevor es seine Zielstruktur in der Cytoplasmamembran erreichen kann. Wenn durch Mutation das Immunitätsprotein fehlt, werden die Colicinproduzenten nicht getötet, sobald *fhuA*, *tonB*, *exbB*, oder *exbD*, Gene für die Colicin M - Aufnahme, mutiert sind [54][86]. Das Colicin M - Immunitätsprotein vereint Eigenschaften beider Gruppen von Immunitätsproteinen (siehe Tab. 1.3 auf Seite 18). Es ist wie die Immunitätsproteine der Porenformer in die Membran integriert (siehe Abb. 1.11), größer als 10 kDa (14 kDa) und die Gene von Colicin und Immunität sind entgegengesetzt gerichtet. Mit den Immunitätsproteinen der Nukleasen vereint es die hohe negative Ladung und die Hydrophilie. Es ist aus 117 Aminosäuren aufgebaut und zusammen mit Colicin M auf dem pColBM-Plasmid codiert [54][86] (siehe Seite 7). Trotz seiner Lokalisation in der cytoplasmatischen Membran ist es hydrophil, weil nur der ersetzbare, aus 23 Aminosäureresten aufgebaute N-Terminus membranständig, das Protein aber periplasmatisch aktiv ist [86] (siehe Tab. 1.11 auf Seite 20). Die Substituierbarkeit des membranverankerten N-Terminus ist experimentell nützlich. So ist das Immunitätsprotein z.B. an die periplasmatische TEM- β -Laktamase (BlaM) koppelbar [16], die nur dann Ampicillinresistenz verleiht, wenn sie mithilfe des Immunitätsproteins durch die cytoplasmatische Membran transloziert wird [54]. Da das Immunitätsprotein von Colicin M selbst keine Signalsequenz besitzt, kann es mithilfe von BlaM im Periplasma gelöst vorliegen und dennoch aktiv werden [54]. Mittels dieser Hybride konnte die subzelluläre Lokalisation vom Colicin M - Immunitätsprotein bestimmt werden.

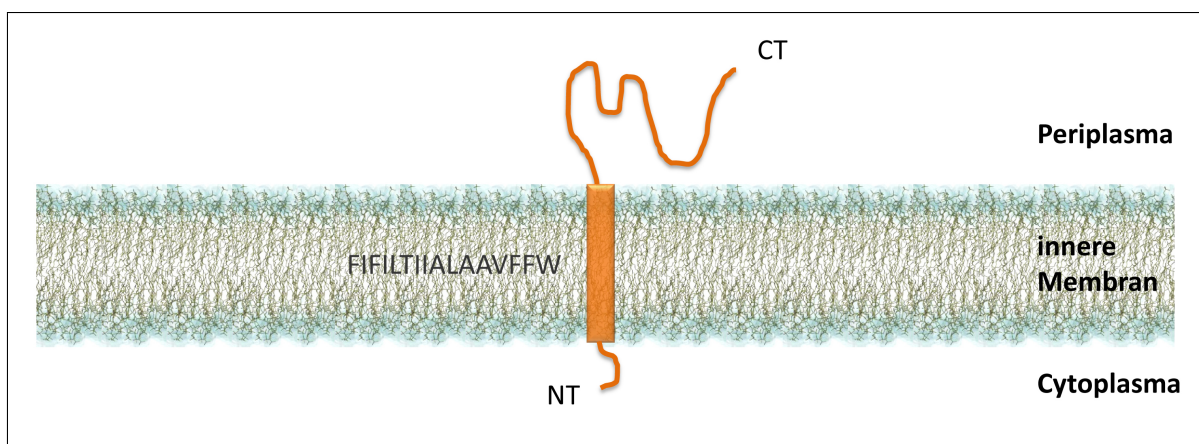


Abbildung 1.11: **Lokalisation vom Colicin M - Immunitätsprotein**
Die Aminosäuresequenz des Transmembranankers ist aufgeführt.

1.6 Zielstellung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit liegt in der auf Strukturdaten aufbauenden, weiterführenden funktionellen Untersuchung von Colicin M. Es sollte im Kontext seiner Abhängigkeit von FkpA und seinem Immunitätsprotein betrachtet und in diesen eingebettet werden.

Zentraler Untersuchungsgegenstand stellt die nähere Charakterisierung seines Import- und Wirkungsmechanismus dar. Dabei sollten Fragen rund um Bindung, Aufnahme und Wirkungsweise geklärt werden.

Rezeptorstudien: *Ändert sich bei der Bindung an FhuA die Konformation von Colicin M? Ist dazu eine spezifische Bindung an FhuA nötig oder genügt eine unspezifische mit den Zellen? Spielen dabei auch TonB und FkpA eine Rolle?*

Extraktionsstudien: *Setzen lysierte Zellen Colicin M frei? Kann dieses erneut aktiv werden? Enthalten resistente Mutanten ohne FkpA ungefaltetes, inaktives und extrahierbares Colicin M? Kann aus Zellen extrahiertes Colicin M in vitro durch FkpA reaktiviert werden?*

Aufnahmekinetik: *Wie lange dauert es, bis das Toxin in die Zellen eingedrungen ist? Verbleibt transloziertes Colicin M in der Zelle oder wird es nach außen abgegeben?*

Aktivitätsstudien: *Wird Colicin M nach der Translokation im Periplasma oder in der äußeren Membran über die ins Periplasma reichende Phosphatase aktiv?*

Bindungsstudien *Kann auch Colicin M in vitro an Substratanaloga oder seinen Rezeptor gebunden werden?*

Um die Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein zu charakterisieren, sollte die Aufklärung der Kristallstruktur vom Colicin M - Immunitätsprotein zweiter Gegenstand der Untersuchungen sein. *Kann die Kristallstruktur des Colicin M - Immunitätsproteins zur Aufklärung der Bindung beider Proteine beitragen?*

Abschließend sollten Colicin M und sein Immunitätsprotein zusammen auf ihren Bindungsmechanismus hin näher untersucht werden. *Bindet Colicin M sein Immunitätsprotein direkt? Welche Reste von Colicin M sind in die Bindung involviert? Wie funktioniert der Mechanismus der Bindung?*

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien & Kits

Geräte, Verbrauchsmaterialien und Kits sind unter Bezugsangabe jeweils an entsprechender Stelle im Methodenteil aufgeführt. Rechtlich geschützte Produkt- und Firmenzeichen sind nicht explizit aufgeführt.

2.1.2 Chemikalien & Enzyme

Für alle Versuche wurden handelsübliche Chemikalien mit dem höchstmöglichen Reinheitsgrad verwendet und, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen *AppliChem GmbH (Darmstadt)*, *Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)*, *Merck AG (Darmstadt)*, *Riedel-de Haën Honeywell Specialty Chemicals GmbH (Seelze)* und *Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)* bezogen. Enzyme für molekularbiologische Versuche sowie Ladepuffer und Größenstandarts wurden bei der *Fermentas/Life Technologies Co. (Frankfurt/Main)* bestellt.

2.1.3 Bakterienstämme

Tabelle 2.1: *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
AB2847	<i>aroB thi tsx malT</i>	Schaller <i>et al.</i> , 1982 [117]
BR158	AB2847 $\Delta tonB$	Hoffmann <i>et al.</i> , 1986 [66]
K458	AB2847 <i>fkpA43</i> (<i>tolM-ts</i>)	Schaller <i>et al.</i> , 1981 [118]
MB97	AB2847 $\Delta fhuA$	Braun <i>et al.</i> 2003 [11]
Mo3	AB2847 <i>fkpA40</i> (<i>tolM40</i>)	Braun <i>et al.</i> , 1980 [12]
BL21(DE3)	<i>ompT gal dcm lon hsd_B(r_B-m_B)</i> λ (DE3) <i>lacI lacUV5-T7 gene 1</i>	Studier and Moffatt, 1986 [125]
BL21(DE3) <i>fkpA</i>	BL21(DE3) <i>rpsL fkpA40</i>	Silke Patzer, Max-Planck- Institut, Tübingen
BL21(DE3) <i>fhuA</i>	BL21(DE3) <i>fhuA</i>	Hullmann <i>et al.</i> , 2008 [69]
BW25113	<i>lacI^r rrnB3 $\Delta lacZ4787 hsdR514$</i> Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ (<i>rhaBAD</i>)568 <i>rph-1</i>	Keio Collection (Baba <i>et al.</i> , 2006) [4]
DH5 α	<i>supE44 $\Delta lacU169$ [$\phi 80lacZ\Delta M15$]</i> <i>hsdR17 recA1 endA gyrA thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983 [56]

2.1.4 Plasmide

Tabelle 2.2: **Plasmide**

Plasmid	Merkmale	Referenz
pGP1-2	pACYC177, <i>T7-RNA-Polymerase</i> , temperaturinduzierbar; Km ^R	Tabor and Richardson, 1985 [127]
pHP751	pT7-5 <i>cmi cmi</i> ; Ap ^R	Pilsl <i>et al.</i> , 1993 [100]
pMLD237	pET2430 <i>cmi</i> , N-terminaler His ₆ -Tag; Km ^R	Dominique Mengin-Lecreulx, Université Paris-Sud, Orsay, France
pPG105	pBCSK ⁺ <i>cmiΔ1-23</i> ; Cm ^R	Gross and Braun, 1996 [54]
pPG773	pT7 <i>pbp3-cmiΔ1-23</i> ; Ap ^R	Gross and Braun, 1996 [54]
pPG775	pT7 <i>blaM-cmiΔ1-23</i> ; Ap ^R	Gross and Braun, 1996 [54]
pSP130/1	pET25b(+) <i>pbp3-cmiΔ1-23</i> , C-terminaler His ₆ -Tag; Ap ^R	Silke Patzer, Max-Planck-Institut Tübingen
pSP130/7	pET25b(+) <i>blaM-cmiΔ1-23</i> , C-terminaler His ₆ -Tag; Ap ^R	Silke Patzer, Max-Planck-Institut Tübingen
pSP130/39	pET22b(+) <i>blaM-cmiΔ1-23</i> , C-terminaler His ₆ -Tag, kürzerer Linker; Ap ^R	Römer <i>et al.</i> , 2011 [111]
pSP130/42	pET22b(+), <i>cmiΔ1-23</i> , C-terminaler His ₆ -Tag; Ap ^R	Römer <i>et al.</i> , 2011 [111]
pYH15	pET25b(+) <i>fkpA</i> , C-terminaler His ₆ -Tag; Ap ^R	Hullmann <i>et al.</i> , 2008 [69]

Ap^R Ampicillin-Resistenz, Cm^R Chloramphenicol-Resistenz, Km^R Kanamycin-Resistenz

Tabelle 2.3: **pSH Plasmide mit mutiertem Colicin M**

Plasmid	Merkmale	Referenz
pSH53	pMLD237 <i>cm</i> a E59A	Stephanie Helbig, 2011 [61]
pSH61	pMLD237 <i>cm</i> a K64A	Stephanie Helbig, 2011 [61]
pSH63	pMLD237 <i>cm</i> a K63A K64A	Stephanie Helbig, 2011 [61]
pSH73	pMLD237 <i>cm</i> a K227A	Stephanie Helbig, 2011 [61]
pSH89	pMLD237 <i>cm</i> a R236A	Stephanie Helbig, 2011 [61]
pSH121	pMLD237 <i>cm</i> a R222A	Stephanie Helbig, 2011 [61]

Tabelle 2.4: **pCR Plasmide mit mutiertem Colicin M**

Plasmid	Merkmale	Referenz
pCR1	pMLD237 <i>cm</i> a R115A 1	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR2	pMLD237 <i>cm</i> a R115A 2	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR3	pMLD237 <i>cm</i> a K120A 1	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR4	pMLD237 <i>cm</i> a K120A 2	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR5	pMLD237 <i>cm</i> a E143A 1	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR6	pMLD237 <i>cm</i> a R115A E143A 1	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR7	pMLD237 <i>cm</i> a R115A E143A 2	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR8	pMLD237 <i>cm</i> a K120A E143A 1	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR9	pMLD237 <i>cm</i> a K120A E143A 2	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR10	pMLD237 <i>cm</i> a K120A E143A 3	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR11	pMLD237 <i>cm</i> a K120A E143A 4	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR12	pMLD237 <i>cm</i> a E59A R222A 1	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR13	pMLD237 <i>cm</i> a E59A R222A 2	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR14	pMLD237 <i>cm</i> a E59A R222A 3	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR15	pMLD237 <i>cm</i> a E59A R222A 4	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR16	pMLD237 <i>cm</i> a R115A K120A 1	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR17	pMLD237 <i>cm</i> a R115A K120A 2	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR18	pMLD237 <i>cm</i> a K120A 3	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR19	pMLD237 <i>cm</i> a R115A K120A 3	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR20	pMLD237 <i>cm</i> a R115A E143A 3	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR21	pMLD237 <i>cm</i> a R115A E143A 4	Christin Römer (diese Arbeit)
pCR22	pMLD237 <i>cm</i> a K120A R115A E143A	Christin Römer (diese Arbeit)

2.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei *Sigma-Aldrich Co., Dorset, England* oder *Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland* synthetisiert.

Tabelle 2.5: **Sequenzierprimer**

Primer	5'3'-Sequenz	Referenz
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	Sigma
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sigma

Tabelle 2.6: **Synthetische Oligonukleotide für die Klonierung vom Colicin M - Immunitätsprotein (Cmi) mit His-Tag und für die Mutagenese von Colicin M (Cma)**

Primer	5'3'-Sequenz	Referenz
PBPCmi	GGAGATATACATATGAAAGCAGCGGCGAAAACG	MWG
BlaPBPCmi	CGCCTCGAGGTCATTCGCATATTCAACATATCC	MWG
BlaCmi	AGGAAGCATATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC	MWG
CmaR115Afor	CAATATGACTATGCCTCAATGAATATGAAAC	Sigma
CmaR115Arev	GTTTCATATTCATTGAGGCATAGTCATATTG	Sigma
CmaR115Afor2	CAGCGCCAAGTCAATATGACTATGCCTC	Sigma
CmaR115Arev2	GAGGCATAGTCATATTGACTTGGCGCTG	Sigma
CmaR115Afor3	CCAAGTCAATATGACTATGCCTCAATG	Sigma
CmaR115Arev3	CATTGAGGCATAGTCATATTGACTTGG	Sigma
CmaK120Afor	CTCAATGAATATGGCACAAATGAGCGGTAATG	Sigma
CmaK120Arev	CATTACCGCTCATTTGTGCCATATTCATTGAG	Sigma
CmaK120Afor2	GAATATGGCACAAATGAGCGGTAATGTCAC	Sigma
CmaK120Arev2	GTGACATTACCGCTCATTTGTGCCATATTC	Sigma
CmaK120Afor3	GGCACAAATGAGCGGTAATGTCACTACAC	Sigma
CmaK120Arev3	GTGTAGTGACATTACCGCTCATTTGTGCC	Sigma
CmaE143Afor	GTAATGGCGCTGCAAGGAGCGTTAATATC	Sigma
CmaE143Arev	GATATTAACGCTCCTTGCAGCGCCATTAC	Sigma
CmaE59Afor	CTTTAACTCAACTTGCGGATTACATCAAAAAAC	MWG
CmaE59Arev	GTTTTTTTGTATGTAATCCGCAAGTTGAGTTAAAG	MWG
CmaR222Afor	CAATGGCGTTGTTGCTTCATATGATGATAAATAC	MWG
CmaR222Arev	GTATTTATCATCATATGAAGCAACAACGCCATTG	MWG

PBP3 Penicillinbindeprotein 3, BlaM β -Laktamase

2 Material & Methoden

2.1.6 Klonierungsvektoren

2.1.6.1 pET-22b(+)

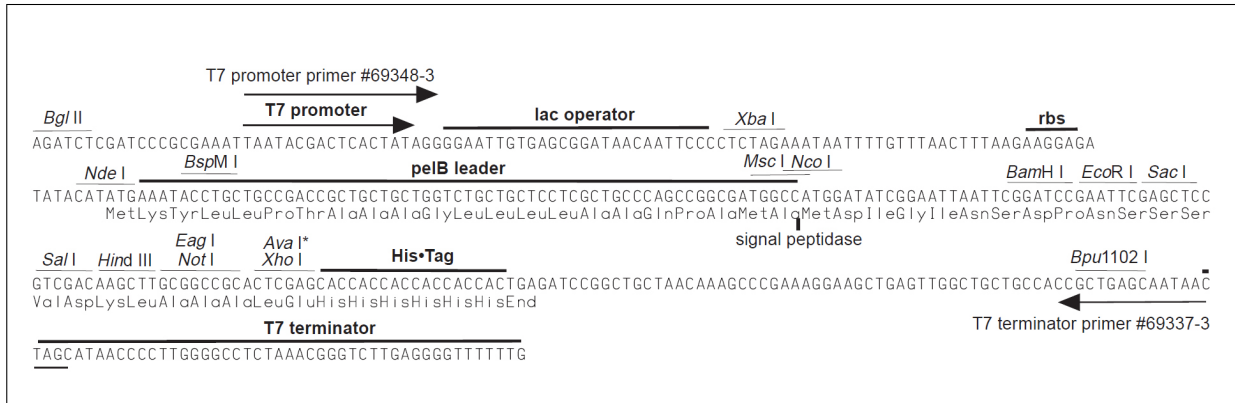


Abbildung 2.1: pET-22b(+) Novagen Ap^R

Quelle: <http://www.merck-chemicals.de/life-science-research/vector-table-novagen-pet-vector-table>

2.1.6.2 pET-25b(+)

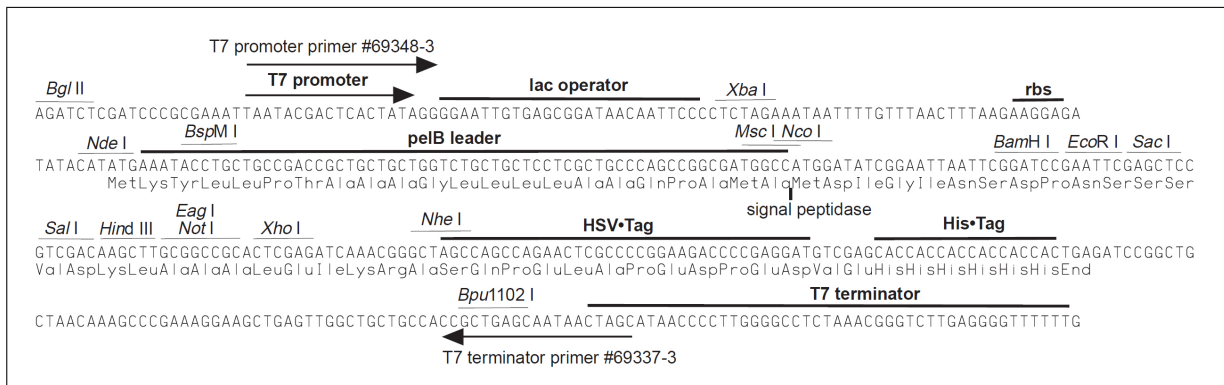


Abbildung 2.2: pET-25b(+) Novagen Ap^R

Quelle: <http://www.merck-chemicals.de/life-science-research/vector-table-novagen-pet-vector-table>

2.1.7 Medien & Medienzusätze

Tabelle 2.7: Medien

LB-Medium	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5
	NaCl	5 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1 l pH 7,4
Se-Met Minimalmedium [°]	MgSO ₄	2 ml
	20x M9-Salze	100 ml
	Glucose (40 %)	10 ml
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O ^{**} (12,5 mg/ml)	2 ml
	Aminosäuremix I* (4 mg/ml)	10 ml
	Aminosäuremix II* (4 mg/ml)	10 ml, pH 8
	Se-Met* (10 mg/ml)	4 ml
	Vitamine* (4 mg/ml)	1 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1 l pH 7,4

M9-Salze: 10 g NH₄Cl, 30 g KH₂PO₄, 68 g Na₂HPO₄-anhydrat

Aminosäuremix I: Gly, Pro, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, His, Lys, Arg, Gln, Asn, Glu, Asp, Ser, Thr (L-Formen)

Aminosäuremix II: Tyr, Trp, Phe (L-Formen)

Vitamine: Riboflavin, Nicotinamid, Pyridoxin-Monohydrochlorid, Thiamin

* Filtersterilisation, Aufbewahrung bei -20 °C, ** aufgrund Oxidation stets frisch angesetzt

[°] Referenzen: Thomas Arnold nach [126], [46], [125], [53], [104]

Die Medien wurden bis auf * und ** autoklaviert.

Tabelle 2.8: Medienzusätze

Agar-Agar	für 20 ml-Platten	15 g/l Medium
	für Topagar-Platten	7,5 g/l Medium
IPTG* (1 M)	für Induktion	0,1 bzw. 1 mM
Arabinose* (10 %)	für Induktion	0,001- 0,1 % (w/v)
Ampicillin Na-Salz* (50 mg/ml [°])	für Resistenz	50 µg/ml
Chloramphenicol* (40 mg/ml ^{°°})	für Resistenz	40 µg/ml
Kanamycinsulfat* (10 mg/ml [°])	für Resistenz	50 µg/ml

* Filtersterilisation, Aufbewahrung bei -20 °C. Antibiotika wurden nach dem Abkühlen dazugegeben.

[°] in H₂O_{dest.}, ^{°°} in Ethanol

2.1.8 Lösungen & Puffer

2.1.8.1 Lösungen für Agarosegel-Elektrophorese

Tabelle 2.9: **Lösungen für Agarosegel-Elektrophorese**

Agarosegel	Agarose in 1x TAE-Puffer	1 % (w/v)
TAE-Puffer (50x)	Tris/HCl pH 7,9 Eisessig EDTA (0,5 M) H ₂ O _{dest.}	242 g 57,1 ml 100 ml ad 1 l
	Ethidiumbromid (10 mg/ml)	2 µg/ml

2.1.8.2 Lösungen für ELISA

Tabelle 2.10: **Lösungen für ELISA**

Bindepuffer I	K ₃ PO ₄ pH 7,2* NaCl	50 mM 150 mM
Bindepuffer I mit BSA	BSA	0,2 % (w/v)
Blockierungspuffer	Saccharose BSA NaCl	2 % (w/v) 0,1 % (w/v) 0,9 % (w/v)
primärer Antikörper Anti-Cma-Antiserum (diese Arbeit)	1:1000	in Bindepuffer I mit BSA
sekundärer Antikörper HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper	1:10000	in Bindepuffer I mit BSA
Substratlösung	ABTS TM Chromophore (Merck KGaA, Darmstadt)	

* Für die Herstellung von K₃PO₄ wurden K₂HPO₄ und KH₂PO₄ separat angesetzt und bis zum gewünschten pH-Wert gemischt. BSA Bovine Serum Albumine, HRP Horseradish-peroxidase

2.1.8.3 Lösungen für SDS-PAGE

Tabelle 2.11: Lösungen für SDS-PAGE

Auftragspuffer (2x)	Tris/HCl pH 6,8	100 mM
	SDS	4 % (w/v)
	Glycerin	20 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,02 %
	β -Mercaptoethanol	30 μ l/ml Puffer
	H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml
Laufpuffer (10x)	Tris/HCl pH 8,3	151,4 g
	Glycerin	720,6 g
	SDS	50 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 5 l
Färbelösung	Comassie Brilliant Blue R-250	2,5 g
	Ethanol	400 ml
	Essigsäure	100 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1 l
Entfärbelösung	Ethanol	300 ml
	Essigsäure	100 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1 l
Trenngelpuffer	Tris/HCl pH 8,8	1,5 M
Sammelgelpuffer	Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
SDS-Gel (10 Gele)		
Trenngel (15 %)	H ₂ O _{dest.}	10,5 ml
	Trenngelpuffer	18,75 ml
	Rotiphoresegel (Acrylamid)	37,5 ml
	SDS (10 %)	0,75 ml
	TEMED (2 %)	3,75 ml
	APS (1,4 %)	3,75 ml
	H ₂ O _{dest.}	18,4 ml
Sammelgel	Sammelgelpuffer	9,4 ml
	Rotiphoresegel (Acrylamid)	5,6 ml
	SDS (10 %)	0,375 ml
	TEMED (2 %)	1,9 ml
	APS (1,4 %)	1,9 ml
	H ₂ O _{dest.}	1,9 ml

2 Material & Methoden

2.1.8.4 Lösungen für Proteinaufreinigung

Tabelle 2.12: **Lösungen für Proteinaufreinigung**

Bindepuffer (Puffer A)	K ₃ PO ₄ pH 7,9*	20 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	Mercapto-Ethanol	2 mM
	NaCl	150 mM
	H ₂ O _{dest.}	ad 1 l
Equilibrierungspuffer/ Waschpuffer	Imidazol in Puffer A	20 mM
Eluierungspuffer	Imidazol in Puffer A	200 mM
Puffer B	Imidazol in Puffer A	1 M

* Für die Herstellung von K₃PO₄ wurden K₂HPO₄ und KH₂PO₄ separat angesetzt und gemischt.

2.1.8.5 Lösungen für Western Blot

Tabelle 2.13: **Lösungen für Western Blot**

Transferpuffer	Isopropanol	10 % (v/v)
	Glycin	150 mM
	Tris	25 mM
	H ₂ O _{dest.}	ad 1 l
Blockierungslösung	BSA	2 % (w/v)
	Tween	0,2 % (v/v)
	PBS	ad 10 ml
Waschpuffer	Tween	0,2 % (v/v)
	PBS	ad 10 ml
Alkalische Phosphatase Entwicklungspuffer	Tris pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	50 mM
Detektionslösung	NBT	5 % (w/v)
	BCIP in 75 % (v/v) DMF	7,5 % (w/v)

PBS phosphate buffered saline: 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O, 0,24 g KH₂PO₄
NBT Nitroblautetrazoliumchlorid, BCIP Brom-4-chlor-3-indolyolphosphat-p-Toluidinsalz, DMF Dimethylformamid

2.2 Methoden

Alle Methoden wurden unter GPL nach § 19a des Chemikaliengesetzes angewendet. Spezielle Versuchsangaben befinden sich jeweils an entsprechender Stelle im Ergebnisteil.

2.2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Desinfektion & Sterilisation

Zum sterilen Arbeiten wurden Handschuhe verwendet, Oberflächen mit 70 %-igem Alkohol desinfiziert und gegebenenfalls die Sterilbank (*Herasafe, Kendro K518; Heraus Holding GmbH, Hanau*) genutzt. Hitzebeständige Materialien wurden UV-bestrahlt, ausgeglüht, abgeflammt oder mittels Autoklav (*Autoklav 2540 EL; Systec GmbH, Nürnberg*) sterilisiert. Hitzeempfindliche Flüssigkeiten wurden mittels Membranfiltern (*Millex GP 0,22 µm; Millipore Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland*) behandelt.

2.2.1.2 Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* fand in der Regel in flüssigem bzw. verfestigtem Komplexmedium LB statt. Für die flüssige Kultivierung wurde die Reinkultur einer Einzelkolonie (siehe 2.2.2.10 auf Seite 36) in 2-5 ml Flüssigmedium eines Reagenzglases suspendiert und über Nacht bei 37 °C oder 30 °C und 220 Upm gegebenenfalls mit Antibiotikum geschüttelt (*Certomat S; B. Braun Biotech AG, Melsungen*). Für größere Maßstäbe wurden entsprechende Kolben mittels Vorkultur stets auf $OD_{578}=0,1$ angeimpft und weiter kultiviert, wobei die Zelldichte mit der optischer Dichte (OD) im Spektrophotometer (*UV-160A; Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg*) bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt wurde. Als Referenz diente LB-Medium ohne Bakterien. Ab einem Absorptionmesswert von 0,5 wurde die Kultur mit LB-Medium verdünnt, um die lineare Beziehung zwischen Zelldichte und Extinktion zu wahren. Die kultivierten Mikroorganismen wurden mittels Lichtmikroskopie (*SZX 10; Olympus Deutschland GmbH, Hamburg*) kontrolliert. Zur Kultivierung auf Platten wurde eine Einzelkolonie im Verdünnungsausstrich auf LB-Agar aufgetragen und über Nacht bei 37 oder 30 °C bebrütet (*Heraus Holding, Hanau*).

2.2.1.3 Stammhaltung

Die Kulturen wurden bei 4 °C kurzfristig aufbewahrt. Für langfristige Lagerung wurden die Kulturen mit 60 % Glycerin im Verhältnis 2 : 1 (Zellsuspension/Vorkultur : Glycerin) bei -70 bis -80 °C eingefroren.

2.2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Präparation von DNA

Die Plasmid-DNA wurde stets mittels eines Kits basierend auf alkalischer Lyse von Zellen mit DNA-Adsorption auf einer Silica-Membran (*QIAprep Spin Miniprep Kit; Qiagen GmbH, Hilden*) und einer Zentrifuge (*Centrifuge 5417C; Eppendorf AG Deutschland, Hamburg*) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die anschließende Elution der Plasmid-DNA erfolgte in 30 μl $\text{H}_2\text{O}_{dest}$. Die DNA wurde kurzfristig bei 4 °C, langfristig bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde im Spektralphotometer (*Nanodrop ND-1000; Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen*) bestimmt, indem 2 μl direkt aufgetragen wurden. Als Referenz diente die Eluierungslösung der Plasmidisolierung ohne DNA. Die Absorption wurde bei 260 nm bestimmt. Eine zusätzliche Messung bei 280 nm gab Auskunft über eine mögliche Proteinverunreinigung (saubere Probe: A_{260}/A_{280} liegt zwischen 1,8 und 2,0).

2.2.2.3 Aufreinigung von DNA

Die Reaktionsansätze wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.2.6 auf Seite 35). Gewünschte DNA-Banden wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit einem Kit (*Gel Extraction Kit; Qiagen, Hilden*) nach Herstellerangaben extrahiert.

2.2.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Die Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsverdau stichprobenartig auf ihre Richtigkeit untersucht. Da die einzelnen Restriktionsendonukleasen in verschiedenen Puffern unterschiedliche Aktivität aufweisen, wurde für die Inkubation jeweils der Verdünnungspuffer vom Hersteller verwendet, der eine optimale Aktivität gewährleistet. 2 μl des Plasmids wurden mit 0,8 μl Puffer und zwei Restriktionsenzymen (je 0,3 μl) (*Fermentas GmbH; St. Leon-Rot*) versetzt. Der Ansatz wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ auf 8 μl aufgefüllt, 1 Stunde bei der jeweiligen Inkubationstemperatur inkubiert (*Thermomixer Compact; Eppendorf GmbH, Hamburg*). Für den Abbau des unmutierten Elternstrangs bei der Mutagenese (siehe Abschnitt 2.2.2.11 auf Seite 37) wurden 1 μl *DpnI* (10 U/ μl) direkt zum PCR-Ansatz pipettiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss des Verdau wurden die Restriktionsenzyme zur direkten Weiternutzung der DNA für 20 min bei 70 °C hitzeinaktiviert.

2.2.2.5 Ligation von DNA

Der Vektor wurde vor der Ligation z.T. mittels eines Kits (*Rapid DNA Dephos & Ligation Kit; Roche, Mannheim, Deutschland*) oder Alkalischer Phosphatase (CIAP) dephosphoryliert. DNA-Fragmente und Vektoren mit kompatiblen Enden wurden mit der T4 DNA-Ligase (*Fermentas GmbH Deutschland; St. Leon Rot*) entsprechend den Angaben des Herstellers ligiert.

2.2.2.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische Auftrennung von DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese ([113]). Noch flüssige 1%-ige Agarosegele wurden mit 2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, weil dieser Fluoreszenzfarbstoff zwischen den Basen der DNA interkaliert und diese bei Anregung durch UV-Licht sichtbar macht. 5 µl einer DNA-Probe bzw. der komplette Restriktionsverdau wurden im Verhältnis 1:6 (Auftragspuffer:Probe) mit Auftragspuffer (*6x DNA Loading Dye; Fermentas GmbH Deutschland, St. Leon Rot*) versetzt und in die Taschen des Agarosegels aufgetragen. Elektrophoretisch aufgetrennt wurde bei einer Spannung von 80-100 V. Die Größe der DNA-Fragmente konnte anhand DNA-Standards (*Gene ruler 1 kB DNA Ladder 0,5 µg/µl; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot*) bestimmt werden. Für präparative Agarosegele zur anschließenden Aufreinigung von DNA wurde Agarose mit geringerem Schmelzpunkt verwendet. Gelelektrophoresezubehör: *Chemie Doc PC System, Mini Sub Cell GT, Power Pac 1000, Power Pac 300, Wide Mini Sub Cell GT; Bio-Rad Laboratories GmbH, München*; Lösungen siehe Abschnitt 2.9 auf Seite 30.

2.2.2.7 Amplifizierung von DNA

Plasmid-DNA wurde mittels PCR in einem Thermocycler (*Mastercycler; Eppendorf AG Deutschland, Hamburg*) amplifiziert. Für die Sequenzierung wurden 150-300 ng Plasmid-DNA mit 0,5 µl T7 Promotor- oder Terminator-Primer (10 pmol/µl) (siehe 2.5 auf Seite 27), 0,5 µl BDT RR Mix, 1,9 µl 5x Sequenzierpuffer und H₂O_{dest.} ad 10 µl versetzt. Die Reagenzien wurden von der Serviceeinheit Sequenzierung (Genome Centre) des Max-Planck-Instituts Tübingen bereitgestellt. Die Probe wurde 20 Sekunden bei 96 °C denaturiert, die anschließende Annealingsreaktion fand 30x 10 Sekunden bei 50 °C, die Elongation 4 Minuten bei 60 °C statt. Die Bedingungen der PCR für die Mutagenese-Experimente sind unter 2.2.2.11 auf Seite 37 beschrieben. Nach der PCR wurden die Proben z.T. mit einem Kit gereinigt (*QIAquick PCR Purification Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland*).

2.2.2.8 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.* [114]) durchgeführt. Die PCR-Sequenzierreaktion erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.7 und wurde anschließend im *ABI 3730XL-Sequencer* (*Applied Biosystems GmbH, Deutschland, Darmstadt*) der Serviceeinheit Sequenzierung (Genome Centre) des Max-Planck-Instituts Tübingen durchgeführt.

2.2.2.9 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Transformation von Bakterienzellen müssen diese zuerst in einen Zustand versetzt werden, der es ihnen ermöglicht, von außen zugeführte Plasmide aufnehmen zu können. Zellen werden dabei durch die Zugabe von CaCl_2 durchlässig für DNA [56]. Der zu benötigende Stamm wurde von einer Platten- oder Glycerinkultur abgenommen und als Übernachtskultur in LB-Medium bei entsprechender Temperatur und 220 Upm schüttelnd vorkultiviert. Nach Einstellung auf eine OD_{578} von 0,1 wuchs die 40-ml Kultur unter Schütteln auf eine OD_{578} von 0,5 an, wurde bei 4 °C und 4000 Upm für 15 Minuten abzentrifugiert (*Sorvall RC6, Rotor F9S; Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland*), das Pellet in 20 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen nach erneutem Abzentrifugieren unter gleichen Bedingungen und Resuspendieren des Pellets in 0,5-1,0 ml 0,1 M CaCl_2 -Lösung 30 min bis 24 h auf Eis gelagert und mit 60 % Glycerin im Verhältnis 2 : 1 (Zellsuspension : Glycerin) bei -70 bis -80 °C aliquotiert (100 µl) eingefroren.

2.2.2.10 Transformation

Die kompetenten Zellen wurden transformiert, nachdem sie mindestens einmal über Nacht gefroren waren. 100 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Plasmid-DNA versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte für 1 min ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad. Die Zellen wurden anschließend in 800 µl LB-Medium für 60 Minuten bei 37 °C geschüttelt (500 Upm, *Thermomixer 5436; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*) und 1 Minute bei 13000 Upm (*Centrifuge 5415C; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 150 µl Überstand resuspendiert und der Ansatz auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei entsprechender Temperatur über Nacht bebrütet (*Heraus Holding, Hanau, Deutschland*).

2.2.2.11 Mutagenese von DNA

Ortsunspezifische Mutagenese mittels PCR Bei der unspezifischen Mutagenese erfolgt die Erzeugung von Mutationen unter dATP-Unterschuss zufällig an einer beliebigen Stelle im Genom. Für das Mutantenscreening zur Charakterisierung der Bindestelle von Colicin M und seinem Immunitätsprotein wurde die mutierte DNA von *cmA* DNA aus über 1000 Klonen verwendet (Diplomarbeit Stephanie Helbig). Die DNA wurde von Silke Patzer mittels PCR hergestellt (siehe Tabelle 2.14).

Tabelle 2.14: **PCR-Ansatz für unspezifische Mutagenese** nach Stephanie Helbig (Diplomarbeit)

10x Taq-Puffer	1x
dATP	50 μ M
dCTP, dGTP, dTTP	je 250 μ M
10 pmol/ μ l T7 Promotor-Primer	0,5 μ M
10 pmol/ μ l T7 Terminator-Primer	0,5 μ M
25 mM MgCl ₂	2 mM
Template-DNA pMLD237	30 ng
5 U/ μ l Taq DNA-Polymerase	0,4 U/ μ l
H ₂ O _{dest.}	50 μ l

Die einmalige, initiale Denaturierung der PCR erfolgte für 3 Minuten bei 95 °C. Anschließend wurden je 30 Zyklen denaturiert (95 °C, 30 sec), annealt (57 °C, 20 sec) und elongiert (72 °C, 2 min). Die einmalige, finale Elongation erfolgte 5 Minuten bei 72 °C. Das mutierte *cmA* wurde anschliesend mit *Xba*I und *Xho*I aus dem ebenfalls mutiertem Vektor herausgeschnitten (siehe Abschnitt 2.2.2.4 auf Seite 34) und mit dem *Xba*I/*Xho*I verdauten 5,4 kb großen Vektorfragment von pMLD237 ligiert (siehe Abschnitt 2.2.2.5 auf Seite 35). Nach der Transformation (siehe Abschnitt 2.2.2.10 auf Seite 36) von *E. coli* DH5 α wurden 1300 Klone gepickt, vereinigt und daraus die Plasmide isoliert (siehe Abschnitt 2.2.2.1 auf Seite 34).

Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR Für die Einführung der Punktmutationen R115A, K120A und E143A in *cmA* wurde die PCR wie in Tabelle 2.15 auf Seite 38 durchgeführt. Die einmalige, initiale Denaturierung der PCR erfolgte für 1 Minute bei 98 °C. Anschließend wurden je 20-30 Zyklen denaturiert (98 °C, 20 sec), annealt (je nach Primer 50-90 °C, 30 sec) und elongiert (72 °C, 3-4 min). Die einmalige, finale Elongation erfolgte

2 Material & Methoden

5 Minuten bei 72 °C. Der nicht mutierte Elternstrang wurde mittels Restriktionsverdau (*DpnI*) abgebaut (siehe Abschnitt 2.2.2.4 auf Seite 34), sodass die DNA direkt ohne weitere Aufreinigungsschritte für die Transformation (siehe Abschnitt 2.2.2.10 auf Seite 36) in *E. coli* DH5 α eingesetzt wurde. Für die Expression (siehe Abschnitt 2.2.3.1 auf Seite 39) von Colicin M wurden die isolierten und mittels Sequenzierung auf Richtigkeit kontrollierten Plasmide mit der gewünschten Mutation in den Stamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Für die Herstellung von Doppel- und Dreifachmutanten wurden die Plasmide verwendet, bei denen die Basen bereits erfolgreich verändert waren.

Tabelle 2.15: **PCR-Ansatz für spezifische Mutagenese**

Phusion HF-Puffer	1x
10 mM dNTPs	0,2 mM
10 pmol/ μ l basensubstituierte Primer forward	0,25 μ M
10 pmol/ μ l basensubstituierte Primer reward	0,25 μ M
Template-DNA pMLD237	20-100 ng
2 U/ μ l Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase*	0,02 U/ μ l
H ₂ O _{dest.}	50 μ l

angelehnt an die Protokolle vom *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene Co., California, USA) und die *PhusionTM DNA Polymerase* (Thermo Scientific Finnzymes Oy.; Vantaa, Finland)

* *Thermo Scientific Finnzymes Oy.; Vantaa, Finland*

Klonierung Für die Konstruktion von *cmi* mit His-Tag wurden vorhandene Cmi1-23-Fusionskonstrukte mit PBP3 und BlaM von Patricia Gross ([54]) mit His-Tag versehen. Dazu wurden die Ausgangskonstrukte pPG773 und pPG775 zunächst mittels Sequenzierung kontrolliert und die geeigneten Primer (siehe Abschnitt 2.1.5 auf Seite 27) und Restriktionsstellen bestimmt. Der Vektor pET25b(+) und die Inserts pPG773 und pPG775 wurden in *E. coli* DH5 α transformiert, deren DNA isoliert und gereinigt, mittels PCR amplifiziert und mit *NdeI* und *XhoI* verdaut (siehe Abschnitte 2.2.2.1-2.2.2.10 auf den Seiten 34-36). Die Restriktionsverdauprodukte von Vektor und Inserts wurden auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen, aus dem Gel extrahiert und gereinigt (siehe 2.2.2.3 auf Seite 34), um in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen ligiert zu werden (siehe 2.2.2.5 auf Seite 35). Die DNA wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und die Klone mittels Sequenzierung auf erfolgreiche Klonierung kontrolliert. Alle Schritte der Klonierung wurden stets mittels analytischen Agarosegelen überprüft (siehe 2.2.2.6 auf Seite 35).

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinüberexpression

Cma Das Colicin M mit N-terminalem His-Tag codierende Plasmid pMLD237 wurde mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert und eine Einzelkultur über Nacht vorkultiviert (siehe Abschnitt 2.2.1.2 auf Seite 33). Mittels Vorkultur wurde LB-Medium auf $OD_{578}=0,1$ beimpft, mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin versetzt und bis zur $OD_{578}=0,5$ kultiviert. Kleine Maßstäbe bis zu 200 ml wurden in Schikanekolben schüttelnd bei 220 Upm, große Maßstäbe bis zu 12l in belüfteten Schott-Flaschen bei 37 °C durchgeführt. Das Plasmid pMLD ist ein T7-Expressionsvektor und somit mittels 0,1 bis 1 mM IPTG induzierbar. Nach der Induktion wurde 3 h weiterkultiviert, wobei die optische Dichte im Spektrophotometer stündlich verfolgt wurde. Nach 10-minütiger Zentrifugation der Kultur bei 4 °C und 4000 Upm (*Centrifuge 5810R*; Eppendorf AG Deutschland, Hamburg bzw. *Sorvall RC6*, Rotor *SS-34*; Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) wurden die pelletierten Zellen für die Isolierung des Proteins genutzt. Für natives Colicin M ohne His-Tag wurde mit dem codierenden Plasmid pHP751 in *E. coli* BL21(DE3) analog verfahren. Die Proteinexpression wurde mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.3.9 auf Seite 45) oder Western Blot (siehe Abschnitt 2.2.3.10 auf Seite 45) kontrolliert.

Cmi Alle vier Cmi-Konstrukte (siehe Tab. 3.9 auf Seite 78 und Abb. 3.18 auf Seite 79) wurden analog Cma überexprimiert, nachdem sie zunächst wie in Tabelle 2.16 abgebildet transformiert wurden (siehe Abschnitt 2.2.2.10 auf Seite 36). Der Kultivierungsmaßstab betrug bis zu 6l und die Temperatur variierte je nach Versuch zwischen 30 und 37 °C. Die Kulturen wurden mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin versetzt. Zur Überexpression von selenomethioninmarkiertem Cmi (siehe Abschnitt 2.2.3.2 auf Seite 40) wurde die Vorkultur in 6l Minimalmedium mit Selenomethionin angezogen und die Kultivierungsdauer aufgrund des langsameren Wachstums bis zur gewünschten OD_{578} von etwa 0,8 verlängert.

Tabelle 2.16: **Cmi-Überexpression**

Konstrukt	Stamm	Plasmid
BlaM-Cmi-His	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSP130/7
PBP-Cmi-His	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSP130/1
Cmi Δ N(1-23)-His	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSP130/42
selenomethioninmarkiertes Cmi-His	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSP130/39 bzw. pSP130/42

2 Material & Methoden

FkpA wurde analog Cma schüttelnd bei 37 °C überexprimiert, wobei das Protein während der Kultivierung bereits in den Überstand abgegeben wird.

2.2.3.2 Selenomethioninmarkierung

Zur Lösung des Phasenproblems in der Kristallstrukturanalyse, das eine erfolgreiche Strukturbestimmung verhindert, können Proteine mit Schwermetallen versetzt werden. Dadurch kann die Lage von Schweratomen bestimmt werden, woraus sich die Lage der übrigen Atome ableiten lässt. Bei der Selenomethioninmarkierung werden die im Protein enthaltenen Methionine durch Selenomethionin ersetzt, indem die Zellen in Minimalmedium mit Selenomethionin kultiviert werden (siehe Tab. 2.7 auf Seite 29). Zur Herstellung von selenomethioninmarkiertem Colicin M-Immunitätsprotein wurde *E. coli* BL21(DE3) mit pSP130/30 oder pSP130/42 transformiert (siehe Abschnitt 2.2.2.10 auf Seite 36) und zunächst in 5 ml LB-Medium über Nacht vorkultiviert (siehe Abschnitt 2.2.1.2 auf Seite 33). Vor der Kultivierung in 6 l Minimalmedium mit Selenomethionin wurden die Zellen 5x mit Minimalmedium mittels Zentrifugation und Resuspension gewaschen. Bei der OD₅₇₈ von etwa 0,5 wurde mit 1 mM IPTG induziert und die Kultur am nächsten Tag nach Übernachtexpression bei einer OD₅₇₈ von etwa 1 abzentrifugiert. Die Kultivierung erfolgte schüttelnd bei 175 Upm und 37 °C stets unter Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin und regelmäßiger Kontrolle der optischen Dichte im Spektralphotometer.

2.2.3.3 Proteinisolierung

Nach der Überexpression wurden die Proteine Cma und Cmi aus den Zellen extrahiert. FkpA wurde bereits bei der Proteinüberexpression ins Medium abgegeben, sodass ein Zellaufschluss nicht nötig war.

French Pressure - Verfahren Als mechanische Aufschlussmethode wurde ein Hochdruckhomogenisator mit 1000 pSI (*French Pressure Cell Press, American Thermal Instruments; Dayton, USA*) gewählt. Das Pellet wurde in 2,5 bis 5 ml Bindepuffer (Puffer A) resuspendiert und für den anschließenden Zellaufschluß mit ca. 1 mg DNase versetzt. Nach mehreren Druck-Entspannungs-Durchläufen (4-6) wurden die geöffneten Zellen eine Stunde bei 16000 Upm (*Sorvall RC6, Rotor SS-34; Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland*) abzentrifugiert und der Überstand als Rohextrakt bei 4 °C verwendet.

Ultraschall Bei kleinen Volumina von 1 bis 2 ml wurden die Zellen mittels Ultraschall-Homogenisator (*Branson Sonifier 250; Branson Ultrasonics Corp., Danbury CT, USA*) in 20 bis 30 Zyklen bei halbmaximaler Leistung auf Eis aufgeschlossen.

Osmotischer Schock [64] [95] Das Pellet von 10 - 100 ml kultivierter Zellen wurde in

1 - 10 ml TES-Puffer (0,2 M Tris pH 8,0; 0,5 M Saccharose; 1 mM EDTA) mit 0,1 % Dodecylmaltosid und Proteaseinhibitor resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 1-stündiger Zentrifugation bei 16000 Upm (*Sorvall RC6, Rotor SS-34; Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland*) befand sich das Protein im Überstand.

2.2.3.4 Proteinreinigung

Die zu isolierenden Proteine enthielten einen Polyhistidin-Tag (His₆-Tag), mit denen sie an eine Ni-NTA-Matrix (Bindekapazität: 5-10 mg/ml) im verwendeten Maßstab von 0,5 bis 50 ml binden konnten. Lösungen siehe Abschnitt 2.12 auf Seite 32.

Small-scale Reinigungen im Batch-Verfahren Für Reinigungen im kleinen Maßstab mittels Zentrifuge (*Centrifuge 5417C; Eppendorf AG Deutschland, Hamburg*) wurden Spin Columns (1,5 ml) mit 0,5 ml Ni-NTA Agarose (*Qiagen GmbH; Hilden Deutschland*) beladen und die Reinigung nach Herstellerangaben (Ni-NTA Spin Columns) durchgeführt. Das Ni-NTA-Granulat wurde nach Herstellerangaben regeneriert.

Gravity-flow Chromatographie Für Reinigungen außerhalb eines FPLC-Systems wurde eine Säule (10 ml) mit 1,5 bis 5 ml Ni-NTA Agarose beladen und mit der 10-fachen Menge Puffer A und 20 mM Imidazol equilibriert. Anschließend konnte die Probe zügig aufgetragen, die Säule wiederum mit der 10-fachen Menge Puffer A und 20 mM Imidazol gewaschen und dann fraktionsweise (6x 1 ml) mit Puffer A und 200 mM Imidazol eluiert werden. Das Ni-NTA-Granulat wurde nach Herstellerangaben regeneriert.

FPLC Für Reinigungen via FPLC wurden Säulen mit Ni-NTA Superflow (30-50 ml *Qiagen GmbH; Hilden Deutschland*) beladen, an ein gekühltes (4 °C) FPLC-System angeschlossen und nach Herstellerangaben gereinigt, wobei via UV-Licht die Absorption detektiert wurde. Die bei steigender Imidazolkonzentration eluierten Fraktionen wurden abschließend mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.3.9 auf Seite 45) oder Western Blot (siehe Abschnitt 2.2.3.10 auf Seite 45) auf das zu reinigende Protein untersucht, vereinigt, umgepuffert (siehe Abschnitt 2.2.3.5 auf Seite 42) und aufkonzentriert (siehe Abschnitt 2.2.3.7 auf Seite 42). Für Kristallisationsprozesse oder Experimente, die besonders reines Protein erfordern, wurde das Ni-NTA gereinigte Protein auf 2 ml einkonzentriert, auf eine Gelfiltrationssäule (*HiLoad 26/600 Superdex 75 pg; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden*) aufgetragen und zur weiteren Reinigung mittels FPLC-System (Äkta) gereinigt. Die eluierten Fraktionen in 10 mM Tris, 10 mM NaCl Puffer (pH 7,4) wurden wiederum mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.3.9 auf Seite 45) oder Western Blot (siehe Abschnitt 2.2.3.10 auf Seite 45) auf das zu reinigende Protein untersucht, vereinigt und aufkonzentriert (siehe Abschnitt 2.2.3.7 auf Seite 42).

Tabelle 2.17: **FPLC-Geräte** (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)

	FPLC	Äkta
Pumpen	<i>Pharmacia LKB Pump P-500</i>	<i>P-900</i>
Programmierer	<i>Pharmacia LKB Programmer GP-250 Plus</i>	<i>P-900</i>
UV-Detektor	<i>Pharmacia LKB UV-MII</i>	<i>UV-900</i>
Fraktionssammler	<i>Pharmacia LKB FRAC-100</i>	<i>frac 950</i>
Schreiber/Monitor	<i>Pharmacia LKB REC-102</i>	<i>pH/C-900</i>

2.2.3.5 Umpufferung von Proteinen

Mittels Ni-NTA gereinigte Proteine enthielten durch die Eluierung störendes Imidazol. Die Proben wurden umgepuffert, indem sie in vorgewässerte Dialysierschläuche (*Spectra/Por Dialysis membrane MWCO 6-8000 23/32mm; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*) pipettiert, sicher mit Klammern verschlossen und in 1000-fach erhöhtes Volumen an gewünschtem Puffer über Nacht bei 4 °C zur Dialyse gegeben wurden. Teilweise wurde der Puffer am folgenden Tag ersetzt und das Procedere wiederholt.

2.2.3.6 Bestimmung der Konzentration von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen wurde mittels der BCA-Methode [123], die die Biuret-Reaktion mit Bicinchoninsäure (BCA) als Detektionssystem verknüpft, bestimmt. Als Nullwert diente der Proteinstandard BSA in 100 mM Tris/HCl (pH 7,5) in Konzentrationen von 0 bis 0,8 mg/ml in 0,05 mg Schritten. Pro Well einer 96-Well-Platte wurden je 10 µl Probe bzw. BSA mit BCA-Referenz eines Kits (*BCA Protein Assay Kit; Novagen/Merck Darmstadt, Deutschland*) nach Herstellerangaben versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 550 nm gemessen (*ELISA-Reader Titertec Multiscan Plus MKII; Labsystems Oy, Finland*). Die Daten des BSA-Standards wurden mit Microsoft Excel Tabellen ausgewertet.

2.2.3.7 Aufkonzentrierung von Proteinen

Die Aufkonzentrierung von Proteinen wurde mittels Zentrifugenröhrchen (*Amicon Ultra 15; Millipore GmbH, Schwalbach Deutschland*) mit größenlimitierender Membran (MWCO=10000) bei 4 °C und 4000 Upm (*Centrifuge 5810R; Eppendorf AG Deutschland, Hamburg*) durchgeführt.

2.2.3.8 Strukturbestimmung von Proteinen

Die Struktur von Proteinen wurde mittels Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen bestimmt. Dazu wurde das überexprimierte und gereinigte Protein auf eine gewünschte Konzentration einkonzentriert (siehe 2.2.3.7 auf Seite 42) und im Dampfdiffusionsverfahren (Vapour Diffusion), das die Sitting- und Hanging-Drop-Technik umfasst (siehe Abb. 2.3 auf Seite 44) kristallisiert. Der initiale Ansatz wurde im Sitting-Drop-Verfahren von Kerstin Bär oder Reinhard Albrecht (Max-Planck-Institut Tübingen) mithilfe eines Roboters (*Honeybee 961; Genomic Solutions, USA*) pipettiert. Die eingesetzten Mengen und Konzentrationen sind jeweils separat im Ergebnisteil aufgeführt. Auf 96-Well-Platten mit jeweils 3 Kristallisationsnäpfchen und 1 Reservoir pro Well (*96 Well CrystalQuick (Greiner); Hampton Research, USA*) wurden 14 Screens (4032 Bedingungen) (siehe Abb. 2.18 auf Seite 44) getestet. Diese wurden nach 1, 7, 30 und 120 Tagen sowie nach Bedarf mittels eines Imagers (*RockIMager 54; Formulatrix, Inc. USA*) regelmäßig beobachtet und fotografiert und in ihrem Entstehungsverlauf ausgewertet. Große Kristalle konnten dem Sitting-Drop-Ansatz direkt entnommen und für das Röntgenbeugungsexperiment vorbereitet werden. Kleine Kristalle wurden im Hanging-Drop-Verfahren reproduziert, indem die kristallgebende Bedingung in 24-Well Kristallisationsplatten (*Hampton Research, USA*) mit verschiedenen Additiven (*Additive Screen; Hampton Research, USA*; einzelne Additive sind unter <http://hamptonresearch.com> abrufbar) versetzt wurde. Das Kristallwachstum wurde regelmäßig mittels eines Mikroskops (*SZX 10; Olympus Deutschland GmbH, Hamburg*) kontrolliert und geeignete Kristalle für das Röntgenbeugungsexperiment vorbereitet. Um geeignete isomorphe Derivate zu erhalten, müssen leichte Atome gegen schwere ersetzt oder schwere Atome an definierten Stellen in die Struktur eingefügt werden. Dies kann zum einen durch Inkubation mit Schwermetallionen (Platin) erreicht werden. Die Kristalle wurden dabei mit Nylonschleifen aus ihrem Well gefischt und in Platin getaucht. Eine weitere Möglichkeit stellt die Selenomethioninmarkierung dar, bei der vorhandene Methionine bereits während der Überexpression des Proteins durch Selenomethionin ersetzt werden (siehe 2.2.3.2 auf Seite 40). Nachdem der Kristall kurz in PEG-Verbindungen getaucht worden ist, um die Bildung von die Messung störenden Eiskristallen zu vermeiden, wurde er in flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt. Zur Messung wurde der Kristall am Synchrotron Lichtquelle Schweiz (SLS) in Villigen einem scharf gebündelten, intensiven Neutronenstrahl ausgesetzt. Das dabei entstehende Beugungsbild wurde elektronisch aufgezeichnet und die Elektronendichteverteilung zur Bestimmung der räumlichen Struktur ausgewertet. Alle Messungen sowie bioinformatischen Auswertungen wurden von Kornelius Zeth durchgeführt.

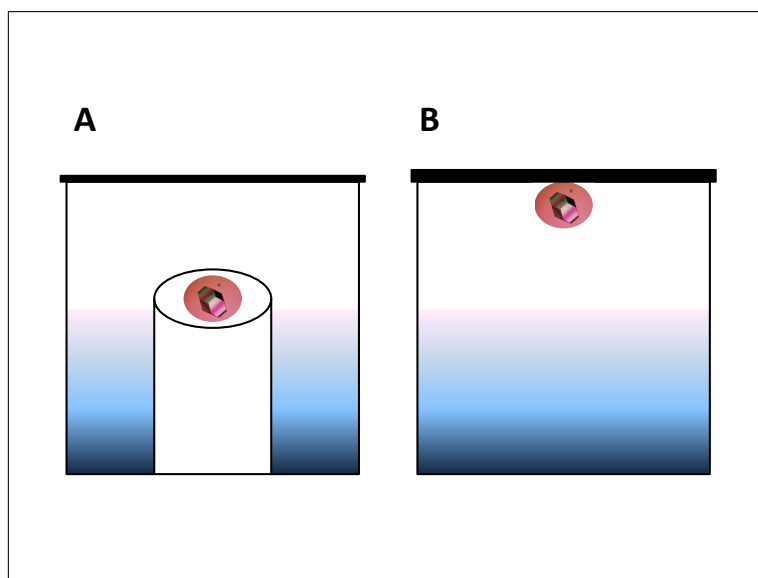


Abbildung 2.3: **Dampfdiffusionsverfahren: A Sitting Drop, B Hanging Drop.** Proteinlösung wird mit Reagenzienlösung vermischt und gemeinsam mit einem größeren Volumen an Reagenzienlösung in einem abgedichteten Well inkubiert. Konzentrationsgradienten zwischen dem Proteintropfen und der Reagenzienlösung werden durch Diffusion ausgeglichen, wodurch bei geeigneten Bedingungen der Kristallisationsprozess induziert wird.

Tabelle 2.18: **Kristallisations-Screens**

Platte	Screen	Firma
1	Jena Bioscience Classic 1	Jena Bioscience GmbH
2	Jena Bioscience Classic 2	Jena Bioscience GmbH
3	Ozma 1K, 4K,48 Salts	Emerald BioSystems, Inc.
4	Ozma 8K, 10K,48 Salts	Emerald BioSystems, Inc.
5	Emerald Cryo I/II	Emerald BioSystems, Inc.
6	Emerald Wizard I/II	Emerald BioSystems, Inc.
7	Hampton Index Screen HT	Hampton Research
8	Hampton Crystal Screen HT	Hampton Research
9	Hampton Salt Rx HT	Hampton Research
10	Hampton MembFac HT	Hampton Research
11	Emerald Wizard III (A-D)	Emerald BioSystems, Inc.
	Sigma 02528 (E-H)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
12	Hampton Cryo (A-D)	Hampton Research
	PEG/Ion (E-H)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
13	JCSG ⁺	Qiagen
14	PACT	Qiagen

Unter xray.bmc.uu.se/markh/php/xtalscreens sind die einzelnen Bedingungen der Screens abrufbar. Stand Juli 2011.

2.2.3.9 SDS-PAGE

Mithilfe der eindimensionalen, vertikalen SDS-PAGE [82] wurden die Proteine analysiert. Dabei wurden 10 µl einer Probe, gegebenenfalls mit H₂O_{dest} verdünnt, mit 5 µl Auftragspuffer (*Fermentas/Life Technologies Co.; Frankfurt/Main*) versetzt, ganz kurz abzentrifugiert und bei 100 °C für 5 min aufgekocht. Der Ansatz wurde in die 10 bzw. 14 Taschen eines vorbereiteten, zwischen 2 Glasplatten in einer Gelkammer montierten SDS-Gels pipettiert. Mit einem Proteinmarker (*Fermentas/Life Technologies Co.; Frankfurt/Main*) versehen und an eine Spannungsquelle angeschlossen, erfolgte die Trennung konstant bei 20 mA. Das Gel wurde anschließend in Färbelösung 10-60 min gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung über Nacht wieder entfärbt, wobei die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Gele wurden in mit H₂O_{dest} gefüllten Plastikboxen aufbewahrt. SDS-PAGE-Zubehör: *Gelkammer Mighty Small II for 8x7 cm gels (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)*, *Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150 (Applied Biosystems GmbH Deutschland, Darmstadt)*; Lösungen siehe Abschnitt 2.1.8.3 auf Seite 31.

2.2.3.10 Western Blot

Zum Nachweis von Colicin M mittels Antikörpern wurden die Proben in der SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.3.9) aufgetrennt und im halbtrockenen Verfahren (*semi-dry*) auf eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm *Protran; Whatman Inc., USA / Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Deutschland*) transferiert. Gel und Membran wurden luftblasenfrei zwischen je 3 Lagen mit Western-Transfer-Puffer gelegt und die Proteine je nach Größe 30-60 min bei 100 mA auf die Membran übertragen.

Nach dem Blotten wurde die, die Proteine enthaltene, Membran über Nacht in 10 ml BCA-Blockierungspuffer geschwenkt. Die polyklonalen Anti-Cma-Antikörper (siehe Abschnitt 3.1.2 auf Seite 52) des zu detektierenden Proteins wurden 1:1000 (v/v) in 10 ml BCA-Blockierungspuffer verdünnt und die Membran darin für 1 h inkubiert. Anschließend ist die Membran dreimal für je 10 min mit PBS-Tween-Puffer gewaschen worden, bevor die Membran mit dem zweiten Antikörper (alkalische Phosphatase gekoppelte Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper) 1:1000 in PBS-Tween-Puffer verdünnt ebenfalls für 1 h inkubiert wurde. Abschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min mit PBS-Tween-Puffer gewaschen und in 10 ml Phosphatase-Entwicklungspuffer überführt. Zur Detektion der Proteinbanden wurden je 50 µl BCIP- und NBT-Lösung dazugegeben und die Membran daran bis zur ausreichenden Intensität der Banden geschwenkt. Die Entwicklung wurde mit destilliertem Wasser gestoppt. Lösungen siehe Abschnitt 2.1.8.5 auf Seite 32.

2.2.3.11 ELISA

Mithilfe des ELISA-Verfahrens wurde die relative Menge von Colicin M bestimmt. Dazu wurden die Proben mit Bindepuffer I verdünnt, jeweils in eine Vertiefung einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und inkubiert. Der Ansatz wurde mehrfach gewaschen, 2 h bei Raumtemperatur sanft geschüttelt und wiederum mehrfach gewaschen. Für den Nachweis wurden polyklonale Anti-Cma-Antikörper (siehe Abschnitt 3.1.2 auf Seite 52) dazugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit Bindepuffer I wurden HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelte Anti-Kaninchen-Antikörper verdünnt zupipettiert, der Ansatz für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach dem Waschen mit ABTS Chromophore - Substratlösung versetzt. Die Extinktion der Proben wurde im ELISA-Reader bei 405 nm nach 10, 20, 30 und 60 min gemessen. Lösungen siehe Abschnitt 2.10 auf Seite 30.

2.2.3.12 Dünnschichtchromatographie

Mittels Dünnschichtchromatographie wurde versucht, die Spaltung von Farnesylpyrophosphat mit Colicin M nachzuweisen. Als stationäre Phase diente eine Kieselgelplatte (*DC Kieselgel 60 25 Alufolien 20 x 20 cm; Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland*). Als mobile Phase diente ein unpolares, hydrophobes Laufmittel (Chloroform - Methanol - Wasser - 29% Ammoniumhydroxid im Verhältnis 88:48:10:1 und 88:10:5:1; Isopropanol - Wasser - Ammoniumhydroxid im Verhältnis 2:1:1). 10 - 20 µl der polaren Proben Colicin M und Farnesylpyrophosphat wurden am Boden der Kieselgelplatte punktförmig aufgetragen und der Lauf gestartet, indem die Platte senkrecht in einen Glasbehälter mit 1-2 cm hohem Laufmittel gegeben wurde. Nach Erreichen der Lösungsmittelfront am oberen Rand der Platte wurde diese zum Entwickeln in einen Glasbehälter mit Ioddampf gegeben.

2.2.3.13 Auftropftest

Die Aktivität von Rohextrakten oder gereinigtem Colicin M wurde mittels Auftropftest getestet. Dazu wurden 100 µl einer Übernachtskultur des Colicin M - sensitiven Stamms *E. coli* AB2847 in 3 ml, ca. 40 °C heißen, LB-Topagar gegeben und auf eine LB-Platte gegossen. Nach der Erstarrung des Topagars wurden 10 µl der Proben unverdünnt und in verschiedenen Verdünnungen aufgetropft, trocknen gelassen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Aktivität von Colicin M war anhand von Hemmhöfen auf den sensitiven Zellen sichtbar, welche mittels Lineal ausgemessen wurden.

2.2.3.14 Ko-Elution

Die Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein kann *in vitro* mittels Ko-Elution untersucht werden. Das mit His-Tag versehene Protein (Cmi) wird dabei an eine Nickel-Säule gebunden. Anschließend wird das zweite Protein ohne His-Tag (Cma) dazugegeben. Wenn die Proteine aneinander binden, können beide zusammen eluiert werden.

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) wurde mit dem Plasmid pHP751 *cma* ohne His-Tag transformiert (siehe 2.2.2.10 auf Seite 36) und überexprimiert (siehe 2.2.3.1 auf Seite 39). Nach dem Zellaufschluss mittels French Press, anschließender Zentrifugation und Filtration konnte der Rohextrakt für die Bindungsstudien verwendet werden. Zur Expression von Colicin M - Immunitätsprotein wurde *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pSP130/42 (siehe Abschnitt 3.2.1 auf Seite 78) transformiert, analog Colicin M wie in Abschnitt 3.2.2 auf Seite 79 überexprimiert und nach French Press, Zentrifugation und Filtration in verschiedenen Konzentrationen auf eine Nickelsäule (Nickel-NTA spin column, 500 µl) für die Bindung des Colicin M -Immunitätsproteins aufgetragen. Nach dem Waschen mit Puffer A und anschließender Eluierung mit 200 µl Imidazol wurden die Proben mit SDS-PAGE und Western Blot ausgewertet.

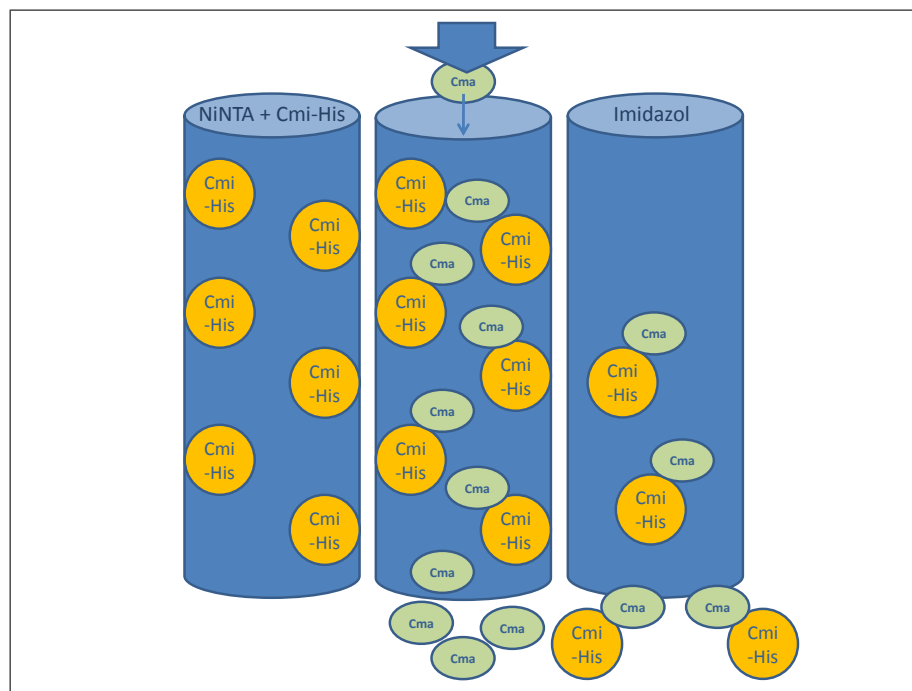


Abbildung 2.4: **Schema der Ko-Elution von Colicin M (Cma) und seinem Immunitätsprotein (Cmi).** Cmi-His wird an die Nickel-NTA-Säule gebunden. Anschließend wird Cma-Rohextrakt dazugegeben und nicht-bindendes Protein durch Waschen entfernt. Binden die beiden Proteine *in vitro* aneinander, werden sie mit Imidazol zusammen eluiert.

3 Ergebnisse

3.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

3.1.1 Überexpression und Reinigung von Colicin M

3.1.1.1 Natives Colicin M

Zur Untersuchung des Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M, sowie für Bindungsstudien von Colicin M mit seinem Immunitätsprotein (siehe Abschnitt 3.3 ab Seite 93) wurde Colicin M ohne His-Tag benötigt. Dazu wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) *fkpA* mit dem Plasmid pHP751 *cma* transformiert und die Klone zur Expression von Colicin M (siehe Abschnitt 2.2.3.1 auf Seite 39) angezogen. Das Kulturvolumen betrug 100 ml und die Induktion fand bei einer OD_{578nm} von 0,5 und zwei unterschiedlichen Konzentrationen an IPTG (0,1; 1 mM) statt, die miteinander verglichen wurden. Ein weiterer Untersuchungsgegenstand war der Einfluss der Expressionsdauer (1-3 h) und die Lokalisation des Proteins (Zellpellet, Überstand). Im Anschluss an die Expression wurden die einzelnen Proben via SDS-PAGE untersucht.

Colicin M ist gut exprimierbar und lässt sich auch ohne Reinigung experimentell einsetzen, weil der Anteil an Colicin M den anderer Proteine bei weitem übersteigt. Die Induktion mit 0,1 mM IPTG ist völlig ausreichend und unterscheidet sich nicht von der mit 1 mM. Colicin M ist bereits nach 1 h sichtbar, die Ausbeute erhöht sich aber mit zunehmender Expressionsdauer, sodass 2-3 h optimal sind. Im Kulturüberstand ist sehr wenig bis kein Colicin M nachweisbar. Es wird nicht ausgeschieden, sondern befindet sich in den Zellen. Dieses lässt sich mit Ultraschall oder French Press aus den Zellen extrahieren und wurde direkt in den Versuchen eingesetzt.

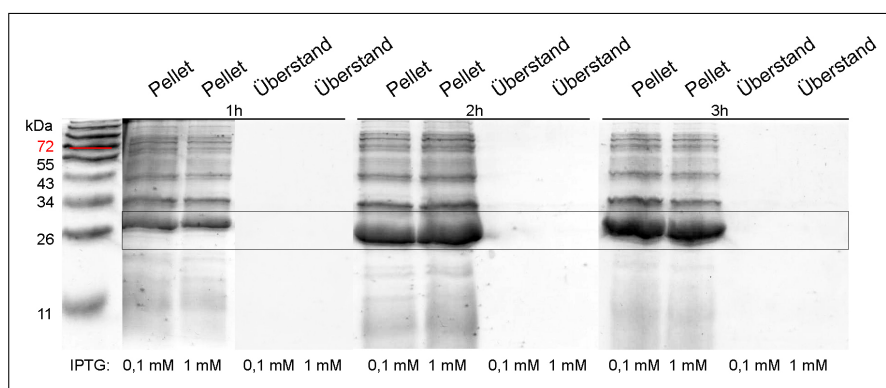


Abbildung 3.1: **SDS-PAGE von Colicin M (Cma) ohne His₆-Tag**

Vergleich der Konzentration an IPTG, der Induktionssdauer und der Lokalisation von Colicin M. Auftrag SDS-PAGE: 5 µl Marker, 5 µl Probe mit 5 µl SDS-Auftragspuffer und 5 µl H₂O_{dest.}

3.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

3.1.1.2 Colicin M mit His₆-Tag

Für Versuche des Import- und Wirkungsmechanismus sowie Kristallisationsansätze wurde Colicin M aufgereinigt. Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) *fkpA* wurde mit dem Plasmid pMLD237 *cma* transformiert und die Klone zur Expression und Reinigung (siehe Abschnitt 2.2.3.4 und 2.2.3.1 ab Seite 41) angezogen. Das Kulturvolumen betrug 100 ml - 12l. Es wurde bei der OD_{578nm} von 0,5 mit 1 mM IPTG für 3h Expression bei 37 °C induziert. Im Anschluss daran wurde Colicin M zunächst mit Nickel-NTA gereinigt, die enthaltenen Fraktionen vereinigt und aufkonzentriert. Anschließend wurde das Konzentrat auf eine Gelfiltrationsäule aufgetragen und die Proben via SDS-PAGE untersucht.

Colicin M ist gut exprimierbar und lässt sich mit seinem His₆-Tag via Nickel-NTA einfach und effizient aufreinigen. Für Kristallisationszwecke wurde das Protein zusätzlich mit Gelfiltration nachgereinigt, was zu höchster Reinheitsstufe führte.

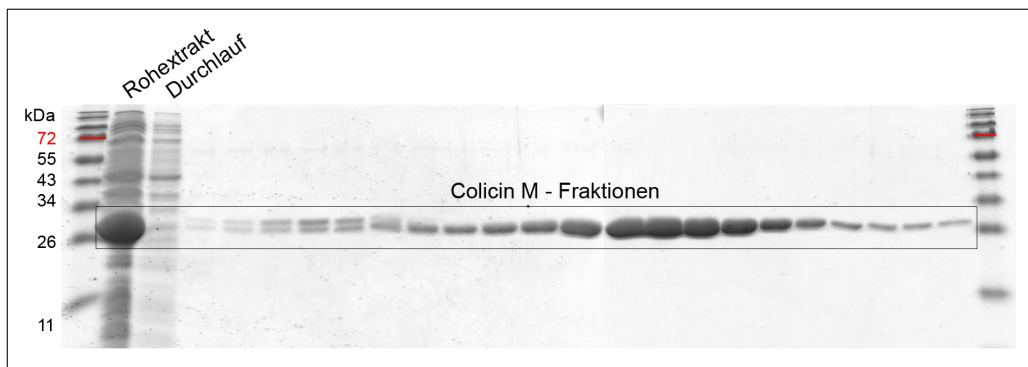


Abbildung 3.2: **SDS-PAGE von Colicin M (Cma) mit His₆-Tag. Reinigung: Nickel-NTA, Elution: 200 mM Imidazol** Auftrag SDS-PAGE: 5 µl Marker, 5 µl Probe mit 5 µl SDS-Auftragspuffer und 5 µl H₂O_{dest.}

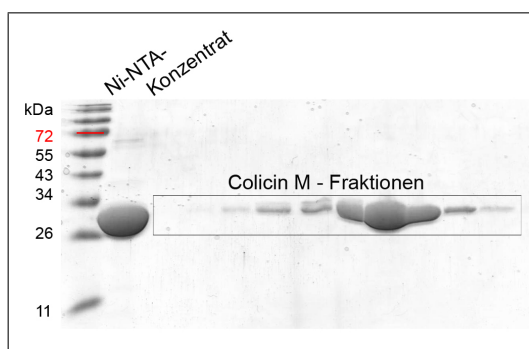


Abbildung 3.3: **SDS-PAGE von Colicin M (Cma) mit His₆. Reinigung via Gelfiltration.** Auftrag SDS-PAGE: 5 µl Marker, 5 µl Probe mit 5 µl SDS-Auftragspuffer und 5 µl H₂O_{dest.}

3.1.2 Herstellung polyklonaler Anti-Cma-Antikörper

Für den Nachweis von Colicin M sowie dessen Studien zur Aufnahmekinetik wurden von Heinz Schwartz 4 Kaninchen mit gereinigtem Colicin M (siehe Abschnitt 3.1.1 auf Seite 50) der Konzentration 10 mg/ml geimpft. Colicin M als körperfremdes Antigen regte in den Kaninchen die Produktion von Antikörpern an.

3.1.2.1 Präimmunseren

Vor der ersten Antigen-Injektion wurde jedem Kaninchen 5 ml Blut, das Präimmuneserum, abgenommen. Dieses wurde zunächst auf Reaktion mit Colicin M getestet, um die Qualität des Serums hinsichtlich Kreuzreaktionen beurteilen zu können. Dazu wurde ein Colicin M produzierender Stamm (*E. coli* BL21(DE3) + pMLD237 *cma*) bei 37 °C bis zu einer OD_{578nm} von 0,5 in LB-Medium kultiviert, abzentrifugiert und die Zellen in 20 µl SDS-Auftragspuffer und 80 µl H₂O_{dest.} suspendiert, um anschließend mit SDS-PAGE aufgetrennt zu werden. Mittels Western Blot wurden die Proben auf eine Membran übertragen und mit den Kaninchenserum (191, 190, 185K, 185) versetzt.

Die Präimmunseren besitzen keine Antikörper gegen Colicin M. Die Reaktivität der Kaninchenserum 185 und 185K mit anderen *E. coli*-Proteinen war gering, sodass die Kaninchen für die Produktion polyklonaler Anti-Cma-Antikörper ausgewählt wurden.

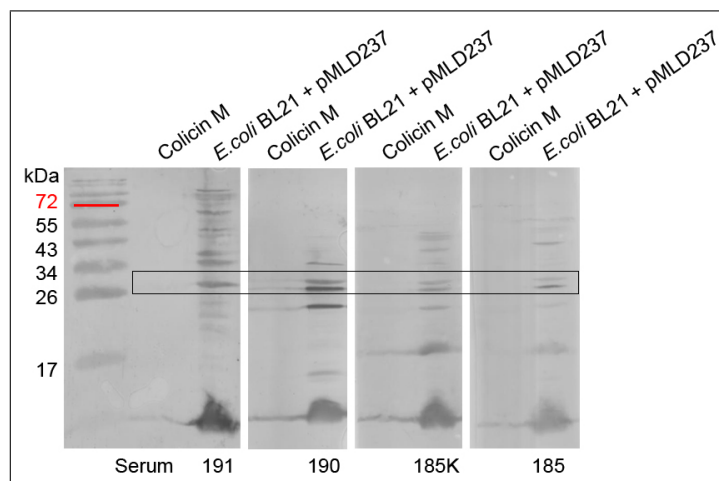


Abbildung 3.4: **Western Blot des Präimmunserums.**

Auftrag SDS-PAGE: 5 µl Marker, 10 µl Colicin M mit 5 µl SDS-Auftragspuffer, 5 µl resuspendierter *E. coli* mit 5 µl H₂O_{dest.} und 5 µl SDS-Auftragspuffer

3.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

3.1.2.2 Anti-Cma-Immuneserum

Nach mehrfacher Impfung der Kaninchen wurde deren Serum nach mehreren Wochen auf Antikörper untersucht. Das Anti-Cma-Immuneserum des Kaninchens 185 besitzt eine hohe, spezifische Antikörperkonzentration. Es ermöglicht damit den immunologischen Nachweis von Colicin M und Versuche, die darauf abzielen, Colicin M gezielt abzufangen bzw. zu inaktivieren (siehe z.B. Abschnitt 3.1.5 ab Seite 62).

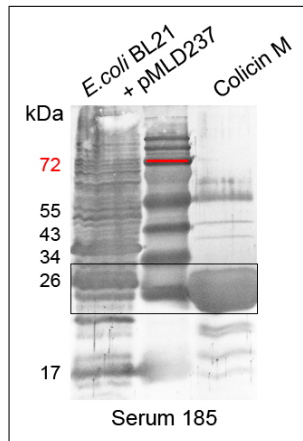


Abbildung 3.5: **Western Blot des Immuneserums.**

Auftrag SDS-PAGE: 5 μ l Marker, 10 μ l Colicin M mit 5 μ l SDS-Auftragspuffer, 5 μ l resuspendierter *E. coli* mit 5 μ l $H_2O_{dest.}$ und 5 μ l SDS-Auftragspuffer

3.1.2.3 Nachweisbarkeitsgrenze des Anti-Cma-Immuneserums

Um Colicin M auch in sehr niedrig eingesetzten Konzentrationen spezifisch nachweisen zu können, wurde die Nachweisbarkeitsgrenze des Anti-Cma-Immuneserums bestimmt. Das Anti-Cma-Immuneserum kann Colicin M bis zu einer Konzentration von ca. 1 ng/ml nachweisen.

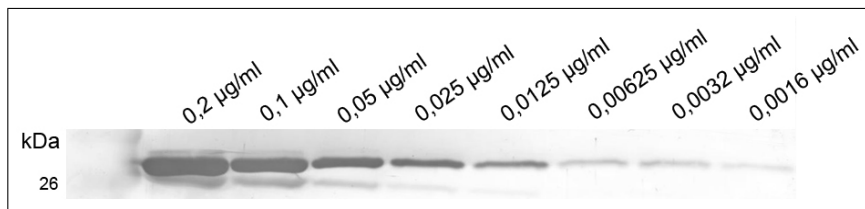


Abbildung 3.6: **Western Blot von verschiedenen Konzentrationen an Colicin M, die mit dem Immuneserum nachweisbar sind.**

Auftrag SDS-PAGE: 5 μ l Marker, 1 μ l Colicin M mit 5 μ l SDS-Auftragspuffer und 4 μ l $H_2O_{dest.}$ in Verdünnungsreihe 1:2

3.1.3 Konformationsänderung von Colicin M bei der Bindung an den FhuA-Rezeptor

Schaller *et al.* stellten 1981 fest, dass aktives Colicin M in Lösung resistent gegen Trypsin ist und dass es an Zellen gebunden abgebaut wird [116] (siehe Abb. 3.7). Sie gehen davon aus, dass Colicin M seine Konformation ändert, wenn es an den Rezeptor gebunden ist und dass dieser Strukturwandel die Anfälligkeit für Trypsin bewirkt. Dieser interessante Befund lässt die Frage offen, ob Colicin M durch spezifische Bindung an FhuA trypsinempfindlich wird oder ob eine unspezifische Interaktion mit den Zellen genügt. Die FhuA-Bindenspezifität wurde untersucht.

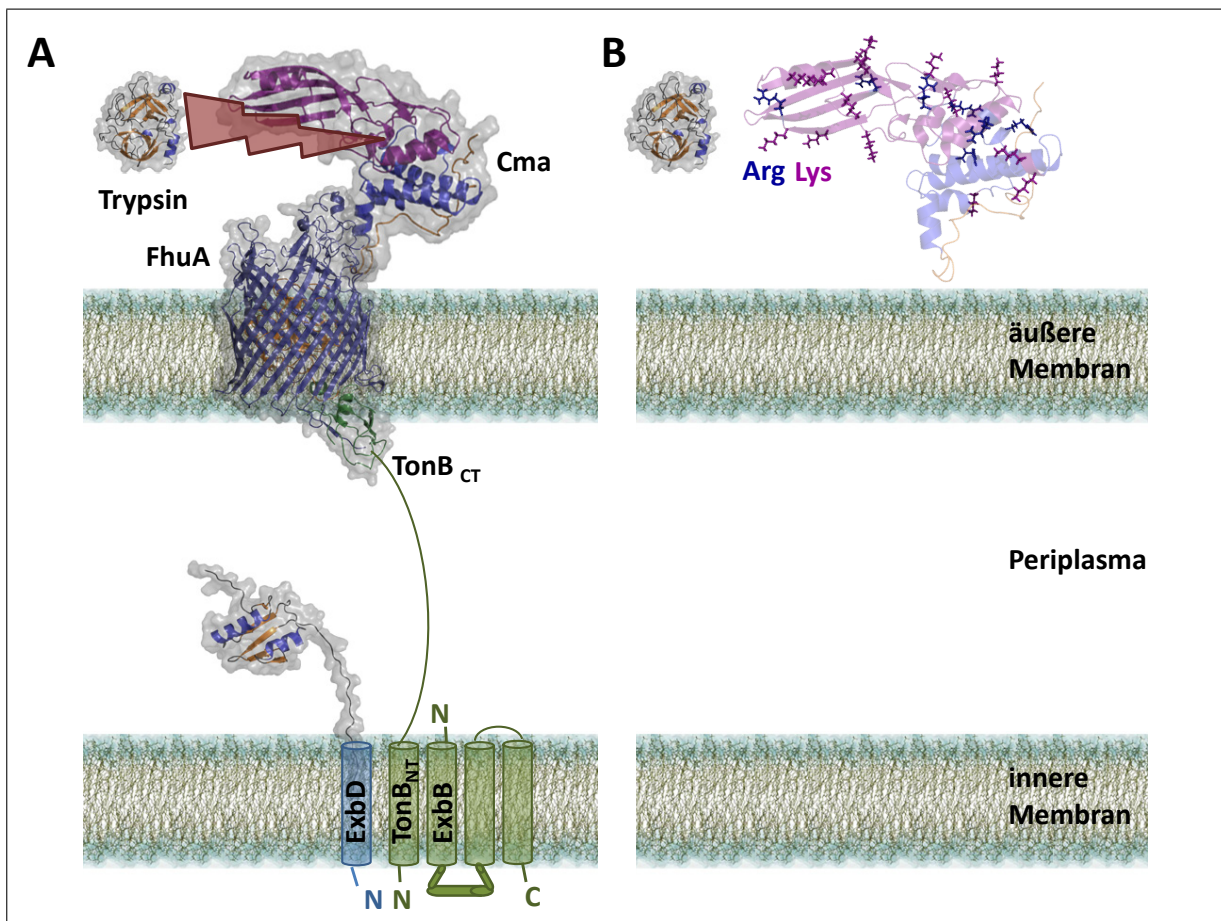


Abbildung 3.7: Trypsinabbau von Colicin M (Cma) (maßstabsgetreu)

A Zell- oder rezeptorgebundenes Colicin M ist trypsinempfindlich.

B Frei vorliegendes Colicin M ist trypsinempfindlich. Trypsinempfindliche Bereiche (Arg, Lys) sind markiert.

Die Strukturen wurden mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt. FhuA-TonB-Komplex (PDB 2GRX [99]), ExbD (PDB 2PFU [44]), Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136], Trypsin (PDB 1DPO) [73]

3.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

Es müssen zunächst freies und rezeptorgebundenen Colicin M unterschieden werden. Dazu muss die Konzentration des Toxins auf die Menge vorhandener FhuA-Rezeptoren abgestimmt werden, um eine unspezifische Bindung von Colicin M an die Zellen auszuschließen. Da nur frei vorliegendes Colicin M gegenüber Trypsin resistent ist und gebundenes Colicin M sensitiv ist [116][110], ist dieses System dazu geeignet (siehe Abb. 3.7 auf Seite 54).

Colicin M sensitive Zellen *E. coli* AB2847 wurden im 50 ml - Maßstab bei einer OD_{578nm} von 0,3 mit 0,01, 0,1, 1 und 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Colicin M versetzt. Zur Spaltung des rezeptorgebundenem Colicin M wurden zeitgleich 0,3 mg/ml Trypsin dazugegeben. 80 min nach der Zugabe von Colicin M und Trypsin wurde die Wirkung von Trypsin mit 3 mg/ml Trypsininhibitor aufgehoben. Die Wirksamkeit von Colicin M wurde stets ohne Trypsin kontrolliert, ebenso der Einfluss von Trypsin auf die Zellen ohne Colicin M. Als Negativkontrolle diente der Colicin M resistente Stamm *E. coli* MB97. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 220 Upm in Erlenmayerkolben inkubiert und deren optische Dichte mittels Absorption bei einer Wellenlänge von 578 nm in regelmäßigen Abständen 300 min verfolgt.

Colicin M hemmte in allen eingesetzten Konzentrationen das Wachstum der Zellen. Der toxische Effekt wurde mit Trypsin aufgehoben, die Zellen konnten trotz Colicin M - Zugabe weiterwachsen. Der Einsatz von Trypsininhibitor gab Auskunft über noch überschüssiges Colicin M im Medium, das nach Inaktivierung von Trypsin wiederum an die Rezeptoren der sensitiven Zellen binden und somit wirksam werden konnte. Colicin M liegt bei gewählten experimentellen Bedingungen ab einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicht mehr frei vor. Im Wachstumsverlauf zeigt sich keine auf die Zellen hemmende Wirkung, sodass überschüssiges Colicin M ausgeschlossen werden kann. Bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Colicin M werden die Zellen im Wachstum gehemmt, überschüssiges Colicin M kann nach Inaktivierung von Trypsin wiederum aktiv werden. Siehe Abb. 3.8 auf Seite 56.

3 Ergebnisse

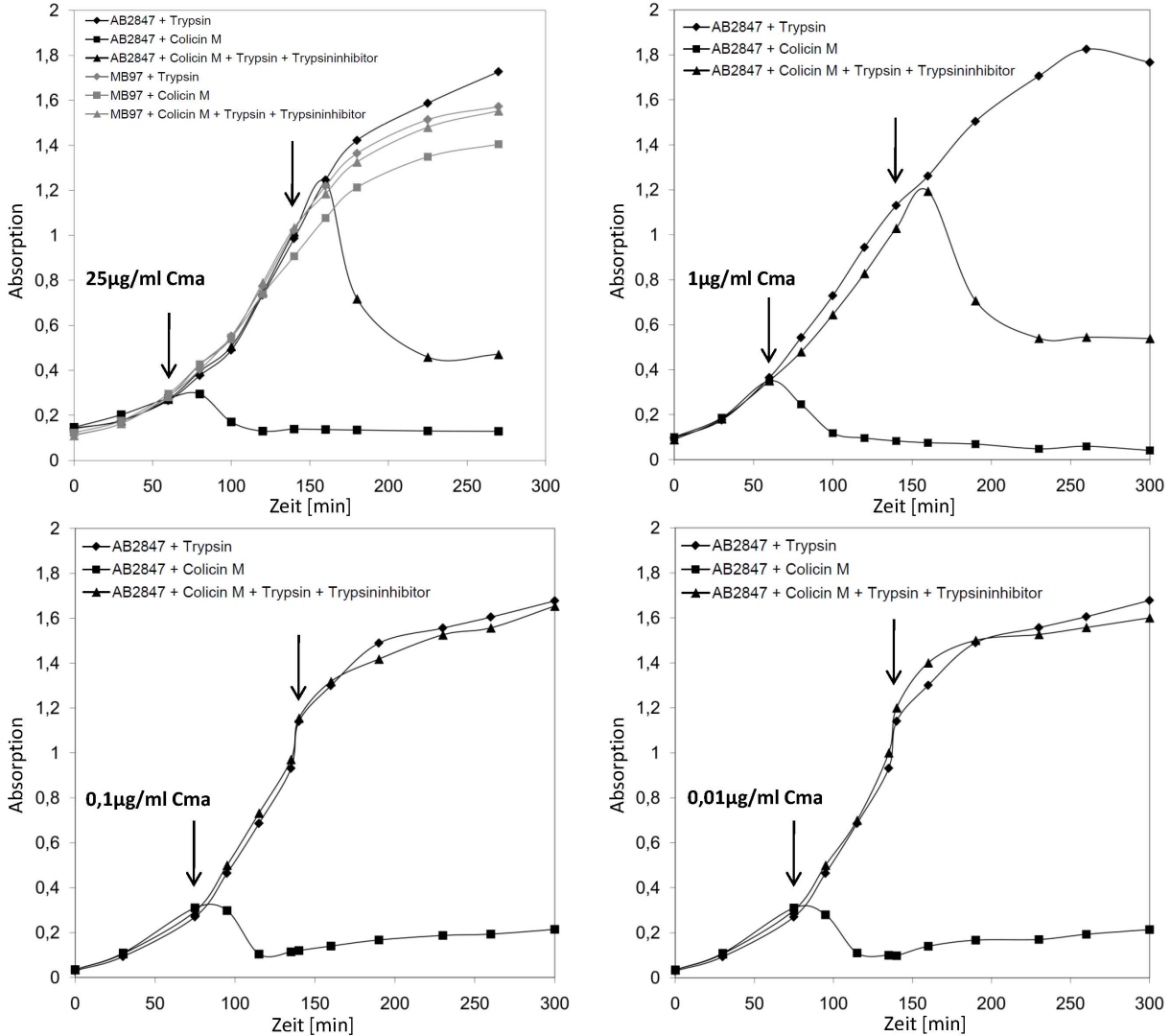
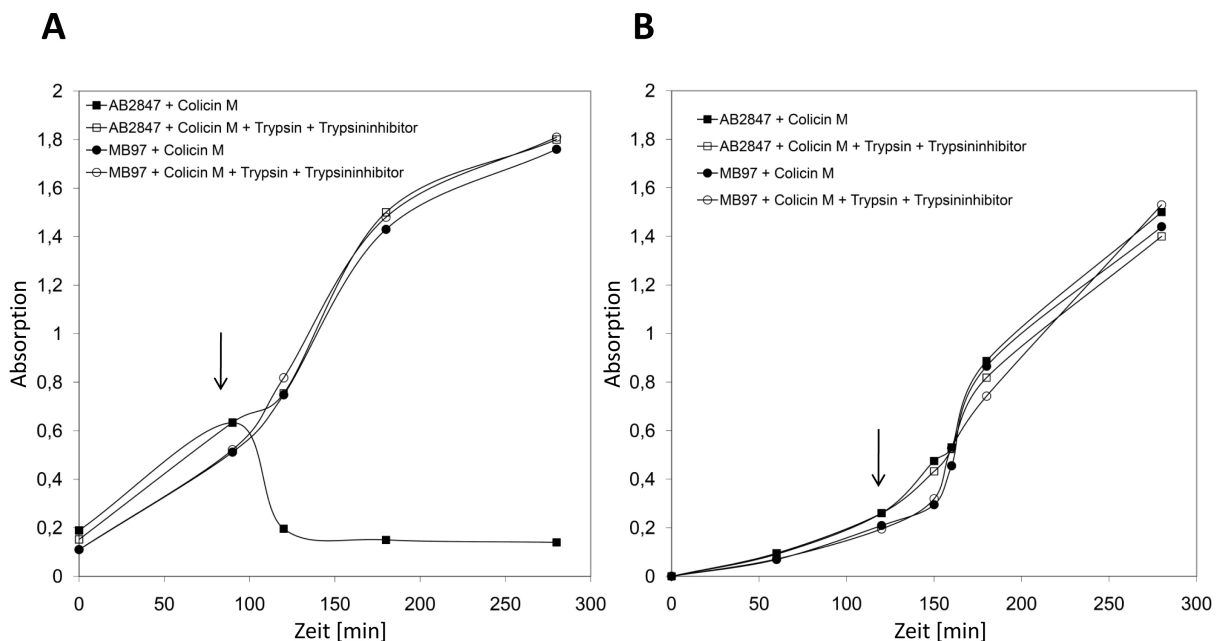


Abbildung 3.8: **Hemmung der Wirkung von Colicin M (Cma) durch Trypsin** Colicin M liegt bei einer Konzentration von und unterhalb 0,1 µg/ml nicht mehr frei vor.

Sensitive (*E. coli* AB2847) und resistente (*E. coli* MB97) Zellen wurden bis zur OD=0,3 angezogen und (mit erstem Pfeil gekennzeichnet) mit Colicin und Trypsin (■,▲) und ohne Colicin (◆) versetzt. Nach 80 min wurde die Probe mit Colicin M und Trypsin (mit zweitem Pfeil gekennzeichnet) zusätzlich mit Trypsininhibitor (▲) versetzt. Eingesetzte Konzentrationen: Cma: 0,01, 0,1, 1, 25 µg/ml; Trypsin: 0,3 mg/ml; Trypsininhibitor: 3 mg/ml. Die optische Dichte der Zellen wurde mittels Absorption bei einer Wellenlänge von 578 nm in regelmäßigen Abständen 300 min verfolgt. Der Versuch wurde 3x reproduziert.

3.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

Um festzustellen, ob Colicin M durch spezifische Bindung an FhuA trypsinempfindlich wird oder ob eine unspezifische Interaktion mit den Zellen genügt, wurde der FhuA-Stamm *E. coli* AB2847 mit der FhuA-Mutante *E. coli* MB97 verglichen. Dazu wurden die Bedingungen so gewählt, dass die Zellen während der Inkubation nicht lysierten, weshalb die Temperatur von 37 auf 30 °C herabgesetzt wurde. Die Zellen wurden 20 min mit Colicin M und Trypsin versetzt, bevor der Inhibitor hinzugefügt wurde. Bei 30 °C und 20-minütiger Inkubation war der toxische Effekt von Colicin M im Wachstumskurvenverlauf nicht zu erkennen (siehe Abb. 3.9). Die Wirkung von Colicin M war erst im Auftropftest als Hemmhof ersichtlich (siehe Tab. 3.1 auf Seite 58).



Abbildungung 3.9: **Wirksamkeit von Colicin M bei 37 °C (A) und 30 °C (B) bei 20-minütiger Inkubation** Sensitive (*E. coli* AB2847)(■□) und resistente FhuA-Mutanten (*E. coli* MB97)(●○) wurden angezogen und mit Colicin (mit Pfeil gekennzeichnet, (■●)) und mit Colicin und Trypsin samt Trypsininhibitor (□○) versetzt. Eingesetzte Konzentrationen: Colicin M 0,1 µg/ml, Trypsin 0,3 mg/ml, Trypsininhibitor 1,5 mg/ml. Die optische Dichte der Zellen wurde mittels Absorption bei einer Wellenlänge von 578 nm in regelmäßigen Abständen 300 min verfolgt. Der Versuch wurde 3x reproduziert.

E. coli AB2847 und *E. coli* MB97 wurden bei einer OD_{578nm} von 0,3 mit 0,1 µg/ml Colicin M und 0,3 mg/ml Trypsin versetzt. Die Wirkung von Trypsin wurde nach 80 min mit 3 mg/ml Trypsininhibitor aufgehoben. Nach weiteren 5 min Inkubation wurden die Zellen bei 4 °C und 4000 Upm in der Zentrifuge (*Centrifuge 5810R; Eppendorf AG Deutschland, Hamburg*) abzentrifugiert, in 1 ml LB-Medium resuspendiert und 5x mit 1 ml LB-Medium gewaschen. Anschließend wurde das an FhuA oder unspezifisch gebundene Colicin M von

3 Ergebnisse

E. coli AB2847 und *E. coli* MB97 mit 0,1 % Dodecylmaltosid gelöst, sodass es nach 5 min der Inkubation und anschließender Abzentrifugation bei 14000 Upm (*Centrifuge 5417C*; Eppendorf AG Deutschland, Hamburg) im Überstand vorlag. Dieser wurde abschließend unverdünnt und 1:10 verdünnt im Auftropftest (siehe Abschnitt 2.2.3.13 auf Seite 46) auf Colicin M untersucht. Als Kontrolle diente eine Probe mit LB-Medium.

Tabelle 3.1: **Konformationsänderung von Colicin M bei der Bindung an den FhuA-Rezeptor** 10 µl Colicin M enthaltender Überstand wurden unverdünnt und 1:10 verdünnt auf LB-Topagar mit AB2847 aufgetropft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Werte der Hemmhöhe sind als Mittelwerte 3-fach reproduzierter Versuche dargestellt.

Stamm	Cma 0,1 µg/ml	Trypsin 0,3 mg/ml	Trypsininhibitor 1,5 mg/ml	DDM 0,1%	Hemmhof 10 ⁰	[mm] 10 ⁻¹
AB2847 (FhuA+)	+	-	-	+	10	8
AB2847 (FhuA+)	+	+	+	+	0	0
MB97 (FhuA-)	+	-	-	+	9	7*
MB97 (FhuA-)	+	+	+	+	8,5	6*
Kontrolle	+	-	-	+	9	7
Kontrolle	+	+	+	+	9	6
AB2847 (TonB+)	+	-	-	+	9,3	n.b.
AB2847 (TonB+)	+	+	+	+	0	n.b.
BR158 (TonB-)	+	-	-	+	7,6*	n.b.
BR158 (TonB-)	+	+	+	+	5,7*	n.b.
Kontrolle	+	-	-	+	10	n.b.
Kontrolle	+	+	+	+	7,7	n.b.
AB2847 (FkpA+)	+	-	-	+	9	n.b.
AB2847 (FkpA+)	+	+	+	+	0	n.b.
Mo3 (FkpA-)	+	-	-	+	7*	n.b.
Mo3 (FkpA-)	+	+	+	+	5*	n.b.
Kontrolle	+	-	-	+	10	n.b.
Kontrolle	+	+	+	+	10	n.b.

Kontrolle: LB-Medium, * trüb, DDM Dodecylmaltosid, n.b. nicht bestimmt

Die Ergebnisse (siehe Tab. 3.1) des FhuA-Stamms *E. coli* AB2847 bestätigen die von Schaller *et al.* [116]. Zellgebundenes Colicin M ist trypsinempfindlich, sodass im Auftropftest keine hemmende Wirkung von Colicin M auf sensitive Zellen erkennbar ist. Colicin M ohne Zugabe von Trypsin und Trypsininhibitor hemmt bis zu einer 10-fachen Verdünnung. An die FhuA-Mutante *E. coli* MB97 unspezifisch gebundenes Colicin M dagegen ist trypsinunempfindlich.

3.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

Die Trypsinempfindlichkeit von rezeptorgebundenem Colicin M bedeutet dessen Konformationänderung bei der Bindung an FhuA. Trypsinempfindliche Bereiche (siehe Abb. 3.7 auf Seite 54) werden exponiert, während freies Colicin M keine Angriffsfläche für die Protease bietet. Da FhuA abhängig von TonB unterschiedliche Konformationen einnehmen kann wurde untersucht, ob die Strukturänderung von Colicin M bei Bindung an FhuA TonB abhängig ist. Diese Möglichkeit wurde analog zum vorangegangenen FhuA-Experiment mit dem sensitiven Stamm *E. coli* AB2847 und der TonB-Mutante *E. coli* BR158 untersucht. Das Ergebnis ist nicht eindeutig. Es verbleiben Reste an aktivem Colicin M nach Trypsinbehandlung.

Ein ähnliches Ergebnis wurde mit der FkpA-Mutante erzielt. FkpA aktiviert Colicin M im Periplasma. Die Rückfaltung von Colicin M nach dessen Translokation durch die äußere Membran im entfalteten Zustand könnte die Energie zur Translokation bereitstellen. Es ist also möglich, dass die partielle Trypsinresistenz am mangelnden Import liegt. Das gleiche gilt für die partielle Trypsinresistenz in der TonB-Mutante.

3.1.4 Extraktion von Colicin M aus dem Periplasma und der äußeren Membran des *fkpA*-Wildtyps und der *fkpA*-Mutante

Die unter 3.1.4.1 - 3.1.4.3 beschriebenen Experimente hatten zum Ziel, importiertes Colicin M aus dem Periplasma von FkpA⁺- und FkpA⁻-Zellen zu gewinnen, um strukturelle Unterschiede von inaktivem und von FkpA aktiviertem Colicin M zu untersuchen.

3.1.4.1 Freisetzung von Colicin M aus lysierten Zellen

Wenn Zellen durch Colicin M lysieren liegt die Frage nahe, ob deren ins Medium abgegebenes oder noch in den Zelltrümmern verbliebenes Toxin aktiv ist. Dieser Untersuchungsaspekt gibt Auskunft über den Aktivitätszyklus von Colicin M *in vivo*, also ob ein Colicin M-Molekül in der Lage ist, mehrere Zellen nacheinander umzubringen.

Dazu wurden mit 0,1 µg/ml Colicin M lysierte Zellen der OD_{578nm}=0,18 mit und ohne Detergenz Dodecylmaltosid (0,1 %) versetzt, um direkt freigesetztes von noch in den Zelltrümmern der Cytoplasmamembran verankertem Colicin M unterscheiden zu können. Das abzentrifugierte Lysat wurde unverdünnt und in den Verdünnungen 10⁻¹, 10⁻² und 10⁻³ mittels Auftropftests (siehe 2.2.3.13 auf Seite 46) auf Colicin M untersucht.

3 Ergebnisse

Lysierte Zellen setzen importiertes, aktives Colicin M wieder frei. Dieses ist nur unverdünnt und schwach aktiv, sodass Colicin M keinen klaren Hemmhof auf sensitiven Zellen im Auftropftest hervorruft (siehe Tab. 3.2). Wurde das freigesetzte Colicin M mit Dodecylmaltosid versetzt, nahm die Aktivität von Colicin M wieder zu, da ein klarer Hemmhof nachgewiesen wurde. Das Detergenz löste aktives Colicin M aus den Zelltrümmern heraus. Das im Versuch eingesetzte Colicin M hemmte bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} , sodass dessen Effektivität nach erfolgreicher Zellyse sehr stark abnimmt. Es handelt sich folglich nur noch um eine Restaktivität.

Tabelle 3.2: **Freisetzung von Colicin M aus lysierten Zellen** Die Werte ergeben sich als Durchschnitt aus 3 reproduzierten Versuchen. 3 ml Topagar + 50 μ l AB2847 Vorkultur, Tropfen: 10 μ l

	Hemmhof [mm]					
	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
extrahiertes Cma -DDM	8,5**	0	0	0	n.b.	n.b.
extrahiertes Cma +DDM	8,5	0	0	0	n.b.	n.b.
Kontrolle Cma	14	12	10	9	7	5*

Cma Colicin M, DDM Dodecylmaltosid (0,1%), n.b. nicht bestimmt, ** sehr trüb

3.1.4.2 Extraktion von Colicin M aus dem Periplasma und der äußeren Membran

Durch Colicin M bedingte Lyse sensitiver Zellen setzt wenig toxisches Colicin frei. Fraglich war nun, ob resistente Mutanten ohne FkpA ungefaltetes, inaktives und extrahierbares Colicin M enthalten. Dazu wurden zunächst verschiedene Extraktionsmethoden (Dodecylmaltosid, Ultraschall, EDTA, LDAO) getestet.

Eine Extraktion von Colicin M aus der äußeren Membran mit LDAO und anschließenden Zellversuchen ist nicht möglich, weil LDAO in der Konzentration von 0,2% toxisch für die Zellen ist. Dadurch würde die Toxizität von Colicin M im Auftropftest durch LDAO verfälscht. Eine Extraktion von Colicin M aus dem Periplasma ist am besten mit Dodecylmaltosid und Ultraschall möglich (siehe Tab. 3.3 auf Seite 61).

3.1.4.3 Extraktion von Colicin M aus dem Periplasma des *fkpA*-Wildtyps und der *fkpA*-Mutante

Da Colicin M im Periplasma von FkpA inaktiviert wird, wurde versucht, inaktives Colicin M aus einer FkpA-Mutante zu isolieren.

Dazu wurde zunächst die optimale Extraktionsmethode von Colicin M aus dem Periplasma von Wildtypzellen etabliert, um sie dann auf die FkpA-Mutante anwenden zu können. *E. coli* AB2847 *fkpA* wurde bis zu einer $OD_{578nm}=0,5$ angezogen und mit $0,1\mu\text{g/ml}$ Colicin M versetzt. Nach zehninütiger Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und mehrfach gewaschen. Anschließend wurden die Proben 10 min vergleichsweise mit und ohne Ultraschallbehandlung und 0,2 % Dodecylmaltosid oder 0,2 % Dodecylmaltosid plus 0,1 % EDTA versetzt. Die derart behandelten Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand im Auftropftest auf Colicin M untersucht. Siehe Tab. 3.3.

Tabelle 3.3: **Extraktion von Colicin M aus dem Periplasma des *fkpA*-Wildtyps und der *fkpA*-Mutante.** Die Werte ergeben sich als Durchschnitt aus 3 reproduzierten Versuchen. 3 ml Topagar + 50 μl AB2847 Vorkultur, Tropfen: 10 μl

Stamm	Extraktion Colicin M			Trypsin	Trypsininhibitor	Hemmhof[mm]		
	DDM	US	EDTA			10^{-0}	10^{-1}	10^{-2}
<i>E. coli</i>	+	-	-	-	-	9	7	0
	+	-	+	-	-	9	0	0
	-	+	-	-	-	0	0	0
	+	+	-	-	-	9	8	0
	+	+	-	+	+	8	0	0
	+	+	-	-	-	8	0	0
AB2847 <i>fkpA</i>	+	-	-	-	-	11	7	0
	+	-	+	-	-	10	0	0
	-	+	-	-	-	0	0	0
	+	+	-	-	-	10	9	0
	+	+	-	+	+	6*	0	0
	+	+	-	-	-	7	0	0

Colicin M: $0,1\mu\text{g/ml}$, DDM: 0,2 % Dodecylmaltosid, US: Ultraschall, EDTA: 0,2 % Ethylendiamintetraacetat, * trüb

Bis auf alleinigen Ultraschall konnte Colicin M mit allen Extraktionsmethoden aus dem Periplasma und der äußeren Membran des FkpA-Wildtyps aktiv isoliert werden. Mit Hilfe von Dodecylmaltosid (0,2 %) und Ultraschall konnte Colicin M sensitive Zellen im

3 Ergebnisse

Auftropftest bis zu einer 1:10 Verdünnung hemmen (siehe Tab. 3.3). Wurden die FkpA-Mutanten *E. coli* Mo3 analog des FkpA-Wildtyps behandelt, wurde ebenfalls aktives Colicin M nachgewiesen. Aufgrund der in den Trypsinversuchen (siehe Abschnitt 3.1.3 auf Seite 54) etablierten Konzentration an Colicin M und mehrfaches Waschen konnte frei vorliegendes Colicin M ausgeschlossen werden. Da Colicin M aber am Rezeptor gebunden vorliegen und so das Ergebnis der FkpA-Mutante beeinträchtigen kann, wurde rezeptorgebundenes Colicin M mit Trypsin verdaut.

E. coli AB2847 und *E. coli* Mo3 wurden bis zu einer $OD_{578nm}=0,5$ angezogen und mit $0,1\mu\text{g/ml}$ Colicin M und Trypsin ($0,3\text{mg/ml}$) versetzt. Nach 30 min wurden die Zellen mit Trypsininhibitor (3mg/ml) versetzt, kurz inkubiert, abzentrifugiert und mehrfach gewaschen. Anschließend wurden die Proben 10 min mit Ultraschall und Dodecylmaltosid ($0,2\%$) behandelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand im Auftropftest auf Colicin M untersucht. Durch diesen Ausschluss an rezeptorgebundenem Colicin M konnte bei der FkpA-Mutante eine verringerte Aktivität an extrahiertem Colicin M beobachtet werden (siehe Tab. 3.3). Es waren sehr schwache Hemmhöfe erkennbar, sodass aus der FkpA-Mutante schwach aktives Colicin M isoliert werden konnte.

Die erzielten Daten weisen darauf hin, dass importiertes Colicin M aus dem Periplasma in zu geringen Konzentrationen gewonnen werden kann, um Strukturuntersuchungen durchführen zu können.

3.1.5 Aufnahme von Colicin M

Ein interessanter Untersuchungsaspekt ist die Aufnahmekinetik von Colicin M, d.h. wie lange es dauert, bis das Toxin in die Zellen eingedrungen ist und ob der Vorgang reversibel ist. In Anlehnung an Versuche von Schaller *et al.* [116] wurden zu diesem Zweck erstmalig Anti-Cma-Antiserum von Colicin M eingesetzt (siehe 3.1.2 auf Seite 52).

3.1.5.1 Hemmung der Aufnahme von Colicin M durch Anti-Cma-Antiserum

Zur Frage stand, ob an FhuA - Rezeptor gebundenes Colicin M von Anti-Cma-Antiserum gehemmt wird und somit Aufschluss zur Aufnahmekinetik von Colicin M gibt.

Dazu wurde Colicin M zunächst überexprimiert (siehe 2.2.3.1 auf Seite 39) und die minimale Hemmkonzentration des Rohextrakts ermittelt. Logarithmisch wachsende Zellen (*E. coli* AB2847) wurden bei einer OD_{578nm} von 0,4 mit minimal hemmendem Colicin M

3.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

versetzt, mit Antiserum vorinkubiert oder nach 1, 3, 5 und 8 min nach Colicin M-Zugabe zu der Zellkultur dazugegeben. Als Kontrollen dienten Proben mit und ohne Colicin M ohne Antiserum.

Die Zellen ohne Colicin M zeigen der Erwartung entsprechend Wachstum, mit Colicin M und ohne Antiserum werden die Zellen gehemmt. Mit Zugabe des Antiserums wird die Wirkung von Colicin M zeitabhängig gehemmt. Die Zellen wachsen normal, wenn das Antiserum 3 min nach Colicin M-Zugabe zugesetzt wird. Nach 5 min zeigen die Zellen einen abfallenden Wachstumsverlauf, der sich nach 8 min verstärkt. Colicin M kann demzufolge nicht mehr durch das Antiserum inhibiert werden, weil es in die Zellen eingedrungen ist (siehe Abb. 3.10).

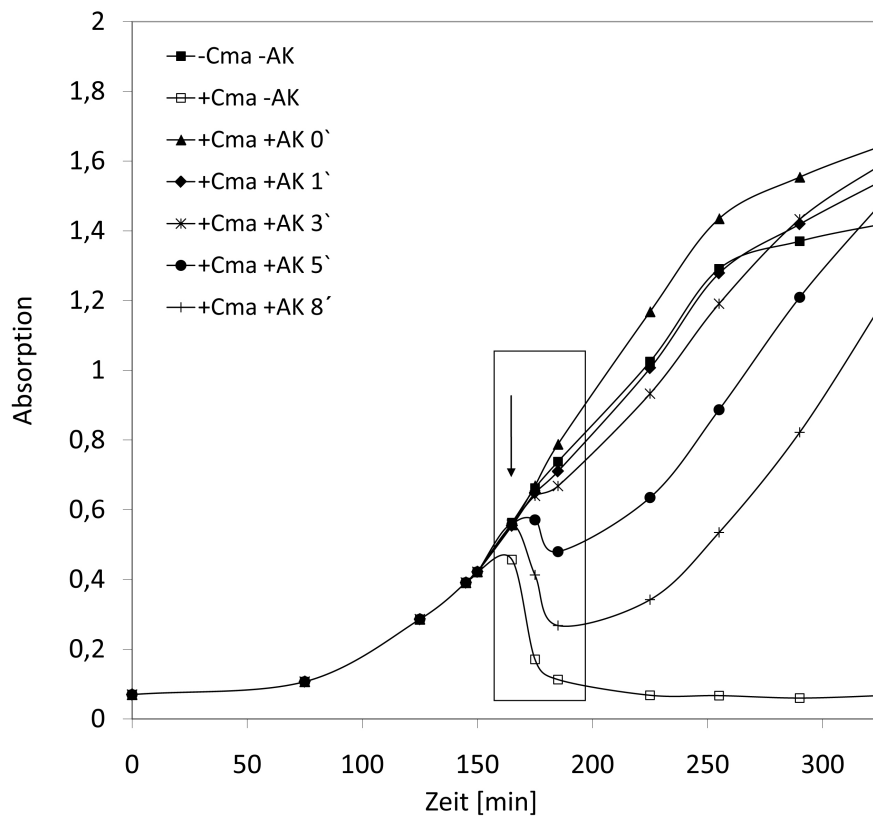


Abbildung 3.10: **Zeitabhängige Hemmung der Wirkung von Colicin M (Cma) durch Anti-Cma-Antikörper (AK)** Je eher Colicin M mit den Antikörpern versetzt wird, desto unwirksamer ist das Colicin; die Zellen können wachsen. Nach 5-8 min zeigen die Zellen (*E. coli* AB2847) einen abfallenden Wachstumsverlauf, die Antikörper können Colicin M nicht mehr hemmen. Der Versuch wurde 3x reproduziert.

3.1.5.2 Reversible Translokation von Colicin M durch die äußere Membran

30 °C → 42 °C

Die temperatursensitive FkpA - Mutante K458 wird bei 30 °C, nicht jedoch bei 42 °C von Colicin M abgetötet [116]. Werden die Zellen nach Zugabe von Colicin M von 42 auf 30 °C gebracht, werden sie abgetötet. Werden sie bei 42 °C mit Trypsin behandelt, erfolgt keine Abtötung bei 30 °C. Offensichtlich bleibt Colicin M bei 42 °C an der Zelloberfläche am Rezeptor gebunden, wo es von Trypsin inaktiviert wird. Bei 30 °C ergibt sich die in Abb. 3.10 beschriebene Aufnahmekinetik, jedoch entsprechend der niedrigen Temperatur verzögert. Die Temperaturerhöhung allein kann aber auch ausreichen, um aufgenommenes Colicin M an der Zelloberfläche für die Hemmstoffe zugänglich zu machen. Die Versuche wurden reproduziert und mit Antiserum erweitert.

Dazu wurde der FkpA-temperatursensitive Stamm *E. coli* K458 bei 30 °C bis zu einer OD_{578nm} von 0,45 angezogen. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Colicin M (1, 5, 10 µg/ml) in unterschiedlichen Einwirkzeiten (10, 12, 15, 20 min) bei 30 bzw. 42 °C versetzt. Das Wachstum wurde mittels Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm über 300 min beobachtet.

Als geeignete Versuchsbedingungen erwiesen sich dabei eine Konzentration von 5 µg/ml Colicin M, eine Einwirkzeit von 15-20 min bei 30 °C, eine Antiserum-Einwirkzeit von 5 min vor Temperaturerhöhung der Zellkultur auf 42 °C. Bei 42 °C gelangt Colicin M an die Zelloberfläche und wird durch das Antiserum inaktiviert. Colicin M wird durch den Temperaturshift dem Antiserum zugänglich gemacht und inaktiviert, sodass die Zellen normal wachsen können (siehe Abb. 3.11).

3.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

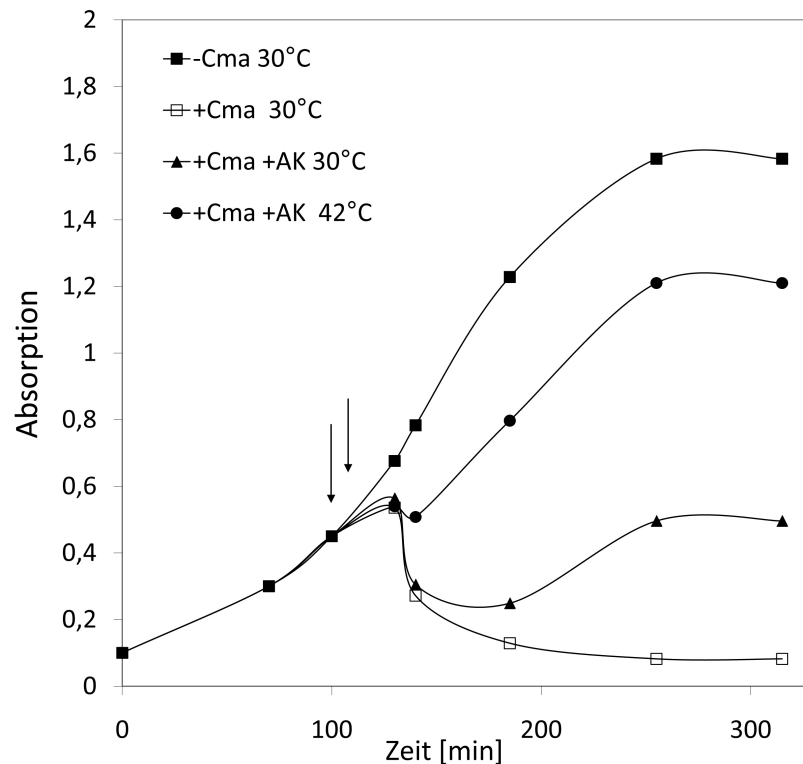


Abbildung 3.11: **Reversible Translokation von Colicin M.** Colicin M wird durch den Temperaturshift auf 42°C den AK im Medium zugänglich gemacht und irreversibel inaktiviert, sodass die Zellen normal wachsen können. Temperatursensitive (*E. coli* K458) FkpA-Mutanten wurden bei 30°C bis zu $OD_{578nm}=0,45$ angezogen und mit 5 µg/ml Colicin M (mit erstem Pfeil gekennzeichnet) 20 min inkubiert, bevor 50 µg/ml Antiserum (zweiter Pfeil) dazugegeben wurden. Eine Probe verblieb bei 30°C, die andere wurde auf 42°C geshiftet und bei dieser Temperatur weiter inkubiert. Kontrollen ohne Colicin M (Cma) und ohne Antikörper (AK). Die optische Dichte der Zellen wurde mittels Absorption bei einer Wellenlänge von 578 nm in regelmäßigen Abständen 320 min verfolgt. Der Versuch wurde 3x reproduziert.

3 Ergebnisse

30 °C → 42 °C → 30 °C

Außerdem wurde untersucht, ob Colicin M nach der Translokation aus dem Periplasma an die Zelloberfläche (30 °C → 42 °C) auch wieder importiert wird (42 °C → 30 °C). *E. coli* K458 (1 ml) wurde bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4 angezogen und mit 1 µg/ml Colicin M versetzt. Eine Probe wurde dabei unmittelbar mit der Zugabe von Colicin M 10 min auf 42 °C geshiftet, („42 °C-Probe“ siehe Abb. 3.12 auf Seite 67), eine weitere zunächst 20 min bei 30 °C mit Colicin M inkubiert und dann 5 min auf 42 °C erhitzt. Die Kontrollen ohne und mit Colicin M wurden bei 30 und 42 °C ohne Temperaturshift durchgeführt (siehe Legende zu Abb. 3.12 auf Seite 67). Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, 3x mit vorgewärmtem Puffer (PBS + 12 mg/ml NaCl) gewaschen und in frisches Medium (LB, 1 ml) ohne Colicin M überführt. Das weitere Wachstum bei 30 °C wurde mittels Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm verfolgt (siehe Abb. 3.12 auf Seite 67).

Die Probe, die mit Colicin M bei 42 °C durchgehend inkubiert wurde, zeigte normales Wachstum (Kurve 4), weil Colicin M bei 42 °C nicht aufgenommen wurde. Hat Colicin M die Möglichkeit, bei 30 °C die Zellen zu passieren, wird es bei der kurzen Erhöhung der Temperatur an die Zelloberfläche gebracht und ist somit für Trypsin und Antiserum zugänglich (siehe Abschnitt 3.1.5.2 auf Seite 64).

Die Probe, die bei 30 °C mit Colicin M inkubiert, dann auf 42 °C gebracht und wieder bei 30 °C weitergezüchtet wurde, lysierte (Kurve 2). Ebenso lysierte die Probe, der Colicin M bei 42 °C 10 min zugesetzt und dann bei 30 °C weiter inkubiert wurde (Kurve 1). Die Lyse ist nicht vollständig, da beim Waschen der Zellen ein Teil des Colicins vom FhuA-Rezeptor entfernt wurde.

3.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

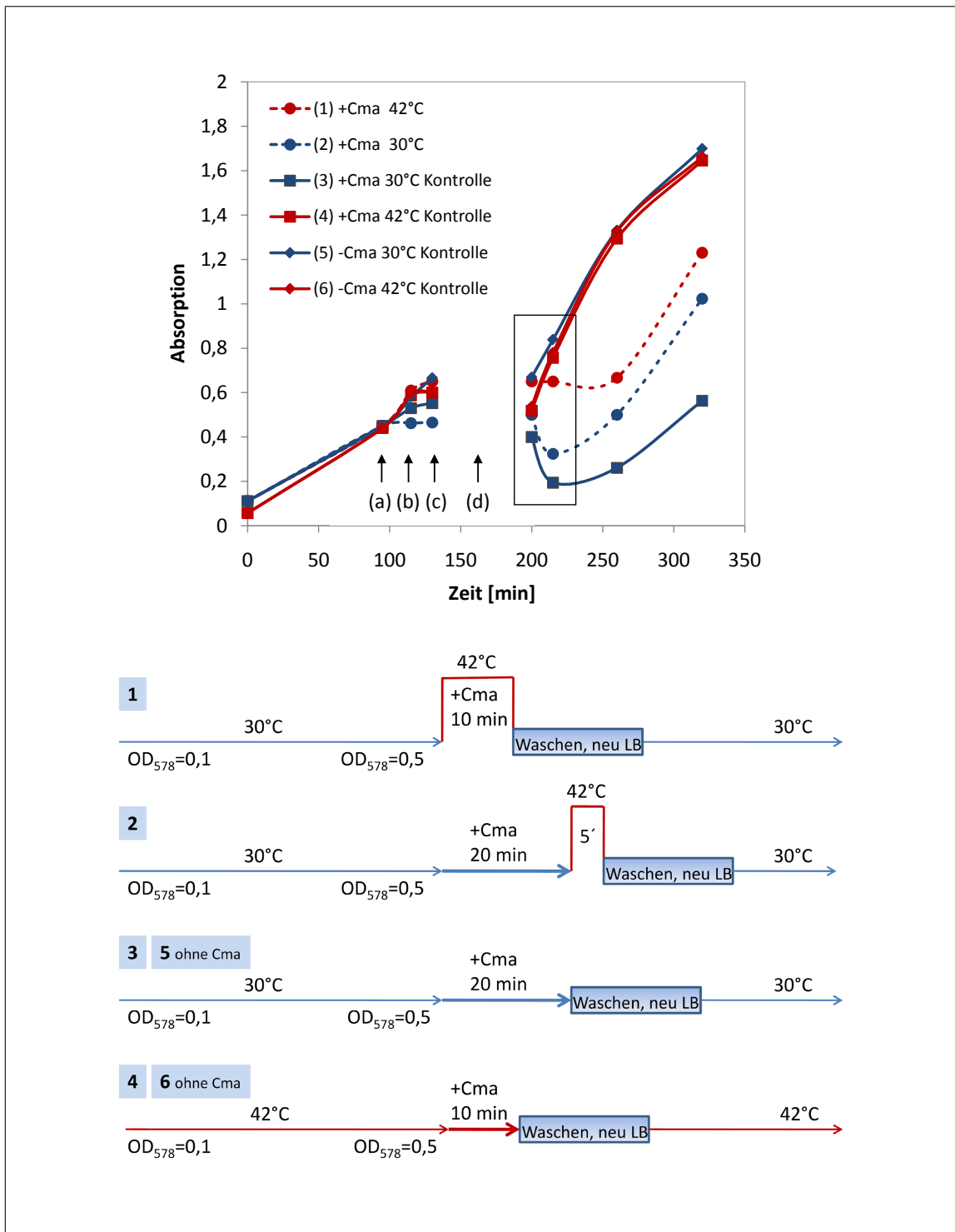


Abbildung 3.12: **Wachstumskurvenverlauf.** Colicin M verbleibt nach dem Temperaturshift in den Zellen, die durch dessen Wirkung lysieren. Während des Temperaturshifts kann Colicin M nicht aufgenommen werden. (a) *E. coli* K458 der OD₅₇₈ = 0,4 wurde mit 1 µg/ml Colicin M versetzt. (b) Eine Probe wurde unmittelbar mit der Zugabe von Colicin M 10 min auf 42 °C geshiftet (rot ●), (c) die zweite 20 min bei 30 °C mit Colicin M inkubiert und dann 5 min auf 42 °C erhitzt (blau ●). (d) Die abzentrifugierten und gewaschenen Zellen wurden in frisches LB-Medium ohne Colicin M überführt. Kontrollen ohne (◆) und mit (■) Colicin M bei 30 °C (blau) und 42 °C (rot) ohne Temperaturshift. Das Zellwachstum wurde bei 30 °C mittels Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm 350 min verfolgt. Der Versuch wurde 3x reproduziert.

3.1.5.3 Lokalisation von Colicin M nach der Translokation

Die Lokalisation und damit der Wirkort von Colicin M ist eine zentrale Frage in dessen Importmechanismus. Colicin M kann nach der Translokation entweder im Periplasma oder in der äußeren Membran über die ins Periplasma reichende Phosphatase aktiv werden. Zu diesem Zweck wurde Colicin M aus dem Periplasma und der äußeren Membran isoliert und mittels SDS-PAGE, Western Blot und ELISA untersucht.

Dazu wurden jeweils 100 ml einer Kultur von *E. coli* AB2847 (FkpA⁺ FhuA⁺), *E. coli* Mo3 (FkpA⁻ FhuA⁺), *E. coli* BL21(DE3) *fhuA* (FkpA⁺ FhuA⁻) bis zu einer OD₅₇₈ von etwa 0,5 bei 37 °C angezüchtet. Die FhuA⁻ Mutante wurde verwendet, um den Anteil an unspezifisch gebundenem Colicin M an Zellen zu bestimmen, die FkpA⁻ Mutante, ob die Rückfaltung von Colicin M die Menge an importiertem Colicin M erhöht. Anschließend wurde mit isoliertem Colicin M ohne His₆-tag 10 Minuten mit minimaler Hemmkonzentration inkubiert, die Zellen in der Kälte abzentrifugiert und zur Entfernung unspezifisch gebundenen Colicins 2x kalt mit je 1 ml vorgekühltem Puffer gewaschen. Dann wurden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen, wobei der abzentrifugierte Überstand das periplasmatische Colicin M enthalten sollte. Die Zellen wurden gewaschen, resuspendiert und für 10 min mit 0,2 % LDAO behandelt, sodass das membrangebundene Colicin M abgelöst wurde und nach Abzentrifugation im Überstand zugänglich war. Die Konzentration an extrahiertem Colicin M aus dem Periplasma und der äußeren Membran war so gering, dass ein Nachweis via SDS-PAGE nicht möglich war, weshalb das aus den Zellen extrahierte Colicin M mittels Western Blot und Anti-Cma-Antiserum untersucht wurde (siehe Abb. 3.13).

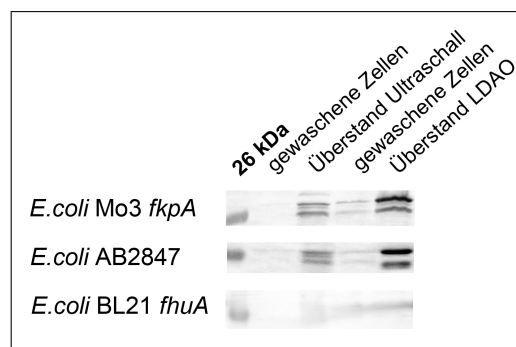


Abbildung 3.13: **Western Blot. Colicin M befindet sich nach Ultraschall und LDAO-Behandlung hauptsächlich im Überstand und ist somit in der Membran verankert.**

Auftrag SDS-PAGE: 10 µl Probe mit 5 µl SDS-Auftragspuffer. Der Versuch wurde 5x reproduziert.

3.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

Colicin M befindet sich vorrangig in der mit LDAO behandelten Probe. Damit ist der Anteil von Colicin M, der sich in der äußeren Membran befindet, höher als der periplasmatische. Die Kontrolle ohne Rezeptor enthält Colicin M erwartungsgemäß weder im Periplasma noch in der äußeren Membran (siehe Abb. 3.13).

Mittels ELISA wurde der periplasmatische Anteil an Colicin M mit dem der äußeren Membran in ungefähre quantitative Relation gesetzt. Die Überstände von periplasmatischem und membrangebundenem Colicin M der vorangegangenen Versuche wurden dazu verschieden mit Bindepuffer I verdünnt (10^{-3} - 10^{-6}), nach mehrmaligem Waschen an eine 96-Well-Mikrotiterplatte gebunden und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz viermal mit 200 µl Bindepuffer I gewaschen, indem die Protein-Proben auf der Mikrotiterplatte bis zu 60 sec mit dem Puffer inkubiert wurden. Der Puffer wurde durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte vollständig entfernt. Anschließend wurden die Proben 2 h bei Raumtemperatur sanft geschüttelt und wiederum viermal mit 200 µl Bindepuffer I gewaschen. Für den Nachweis wurden 200 µl polyklonale Anti-Cma-Antikörper (siehe Abschnitt 3.1.2 auf Seite 52) 1:1000 dazugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit Bindepuffer I wurden 200 µl des HRP (horseradish peroxidase) - gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörpers in einer Verdünnung 1:10.000 zupipettiert und der Ansatz für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit Bindepuffer I wurden 200 µl Substratlösung ABTS Chromophore zugegeben und die Extinktion im ELISA-Reader bei 405 nm nach 10, 20, 30 und 60 min gemessen. Dabei ergab die 30 minütige Messung einer 1:1000 verdünnte Probe reproduzierbare Ergebnisse. In 5 Versuchen wurden dabei die Ergebnisse der Western Blots bestätigt. Colicin M befindet sich hauptsächlich in der äußeren Membran. In der FkpA - Mutante befindet sich etwas mehr Colicin M in der Membranfraktion, was darauf hindeutet, dass FkpA zum Import in das Periplasma beiträgt. *E. coli* BL21(DE3) *fhuA* zeigt die unspezifische Bindung von Colicin M an Zellen.

Tabelle 3.4: **ELISA.** Verhältnis von membrangebundenem zu periplasmatischem Colicin M.

Stamm	Anzahl Versuche	Verhältnis Überstand LDAO/Ultraschall			
		nach 10'	nach 20'	nach 30'	Durchschnitt
<i>E. coli</i> Mo3 <i>fkpA</i>	5	2,36	2,86	3,00	2,74
<i>E. coli</i> AB2847	3	2,06	2,43	2,73	2,4
<i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>fhuA</i>	2	0,95	1,00	1,15	1,03

3.1.6 Versuche der Bindung von Colicin M an Substratanaloga

Colicin M inhibiert während der Mureinbiosynthese den Regenerierungsschritt des Lipidüberträgers (siehe 1.3 auf Seite 10). Das Substrat von Colicin M, Bactoprenylpyrophosphat, ist in wässrigem Milieu unlöslich und deshalb für Versuche und Kristallisationsbedingungen ungeeignet. Deshalb wurde mit den substratanalogen Farnesylpyrophosphat, Pyrophosphat und Para-Nitrophenylphosphat als möglichen Liganden von Colicin M experimentiert. Mittels Ko-Kristallisation, Dünnschichtchromatographie und Enzymassay wurde versucht, die Bindung von Colicin M an sein Substrat und somit sein aktives Zentrum mithilfe der Substratanaloga zu charakterisieren.

Die Kristallisation von Colicin M habe ich während meiner Diplomarbeit etabliert [110]. Innerhalb von 7-14 Tagen hatten sich dabei unter unterschiedlichen Bedingungen nadel- und sternförmige Kristalle herausgebildet (siehe Abb. 3.1.6), die zwischen 1,7 und 2 Å gemessen wurden und erfolgreicher Ausgangspunkt der Strukturbestimmung waren [136]. Bei einer Bindung des Liganden ist eine Ko-Kristallisation also prinzipiell möglich.

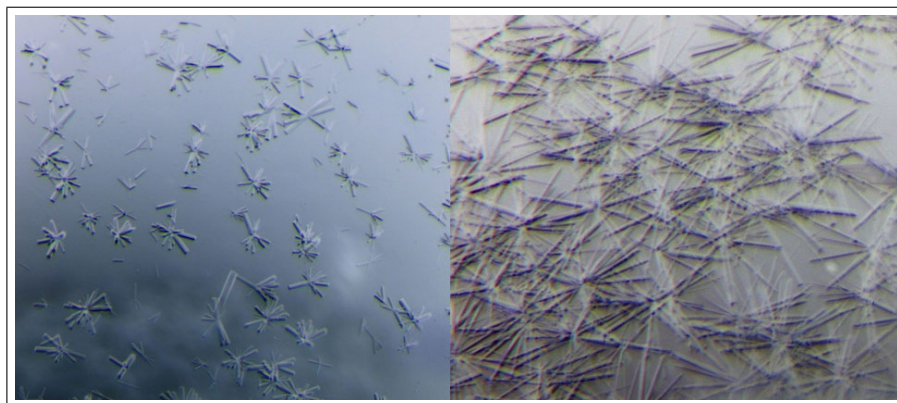


Abbildung 3.14: **Kristalle von Colicin M für erfolgreiche Strukturbestimmung.** [110]

Da Calcium die Aktivität von Colicin M erhöht [116], wurde es der Kristallisationsprobe mit Pyrophosphat zugefügt. Colicin M wurde via Nickel-NTA und Gelfiltration gereinigt und anschließend mit den Substanzen versetzt. Der Kristallisationsversuch wurde im Sitting-Drop-Verfahren begonnen und bei erfolgreicher Kristallbildung im Hanging-Drop-Verfahren reproduziert. Deren Bedingungen sind in der Tabelle 3.5 auf Seite 71 aufgeführt. Die entstandenen Kristalle wurden im SLS gemessen und ausgewertet.

3.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

Tabelle 3.5: **Kristallisationsbedingungen für Colicin M und Vorstufen von Murein**

	Sitting Drop	Hanging Drop
Colicin M & Farnesylpyrophosphat		
Konzentration Colicin M	3 mg/ml	4,5 mg/ml
Konzentration Ligand	0,1 %	0,1 %
Puffer	10 mM Tris, 10 mM NaCl	10 mM Tris, 10 mM NaCl
Detergenz	-	-
Temperatur	20 °C	20 °C
Volumina	Probe/Puffer: 0,3 µl/0,4 µl Reservoir: 75 µl Additiv: -	2,5 µl/2 µl 500 µl 0,5 µl
Kristallisationsbedingungen	1344 (14 Screens)	96 Additive mit 0,2 M Kaliumnitrat
Colicin M & Pyrophosphat		
Konzentration Colicin M	7 mg/ml	
Konzentration Ligand	1 mM	
Puffer	10 mM Tris, 10 mM NaCl	
Detergenz	0,1% Dodecylmaltosid	
Temperatur	20 °C	
Volumina	Probe/Puffer: 0,3 µl/0,4 µl Reservoir: 75 µl Additiv: -	
Kristallisationsbedingungen	1344 (14 Screens)	
Colicin M & Pyrophosphat mit Calcium		
Konzentration Colicin M	7 mg/ml	
Konzentration Ligand	1 mM	
Puffer	10 mM Tris, 10 mM NaCl	
Detergenz	0,1% Dodecylmaltosid	
Temperatur	20 °C	
Volumina	Probe/Puffer: 0,3 µl/0,4 µl Reservoir: 75 µl Additiv: Calcium 1 mM	
Kristallisationsbedingungen	1344 (14 Screens)	

3 Ergebnisse

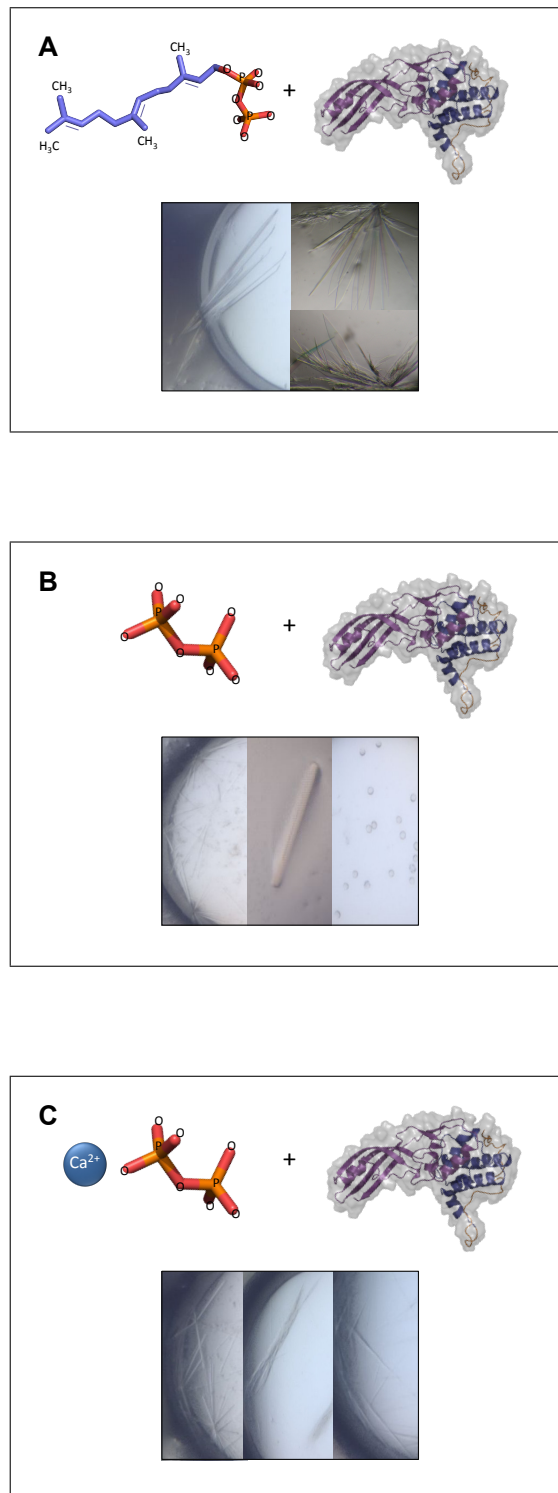


Abbildung 3.15: **Kristalle der Ko-Kristallisationsversuche von Colicin M.**

A Farnesylpyrophosphat, **B** Pyrophosphat, **C** Pyrophosphat und Calcium.

Die Strukturen wurden mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt. Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136]

3.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

Die nadelförmigen Kristalle (siehe Abb. 3.1.6 A auf Seite 72) der Ko-Kristallisation mit Colicin M und Farnesylpyrophosphat waren reproduzierbar und wurden mehrfach im SLS bei 2 Å gemessen. Sie bestanden jedoch lediglich aus Colicin M ohne Liganden. Da sich Farnesylpyrophosphat als ungeeigneter Bindungspartner für Colicin M *in vitro* herausgestellt hat, wurde der Versuch mit Pyrophosphat mit und ohne Calcium wiederholt. Auch diese Kristalle (siehe Abb. 3.1.6 B und 3.15 C auf Seite 72) bestanden lediglich aus Colicin M. Calcium verbessert die Bindung von Colicin M an Pyrophosphat folglich nicht.

Das Bindungsverhalten von Colicin M an die Vorstufe Farnesylpyrophosphat seines Targets Murein wurde anschließend mittels Dünnschichtchromatographie untersucht, wobei auch hierbei keine Bindung festgestellt werden konnte.

Para-Nitrophenylphosphat sollte ebenfalls als mögliches Substrat für die Phosphataseaktivität von Colicin M getestet werden. Dazu wurden 50 mM Para-Nitrophenylphosphat mit 0,1 bzw. 1 mg/ml Colicin M versetzt und die Absorption unmittelbar nach Zugabe bzw. nach 15, 30, 45 und 60 min bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Es war zu keinem Zeitpunkt der Messung eine Gelbfärbung oder ein Anstieg der Absorption im Vergleich zur Kontrolle ersichtlich, sodass das Substrat nicht durch Colicin M hydrolysiert wird.

3.1.7 Versuche zur Bindung von Colicin M an seinen Rezeptor

Analog zu den Bindungsversuchen von Colicin M an Substratanaloga wurde die Bindung von Colicin M an seinen Rezeptor FhuA untersucht. Da Mutanten in der TonB-Box von Colicin M dieses inaktivieren und einige TonB-Box-Mutanten durch Mutationen an einer Stelle von TonB supprimiert wurden [100], wurde auch die Interaktion von Colicin M mit TonB kristallographisch untersucht. Mittels Ko-Kristallisation und Kompetitionsexperimenten mit synthetischen Peptiden sollte die Rezeptorbindestelle von Colicin M charakterisiert werden.

Zur Ko-Kristallisation benötigtes gereinigtes FhuA und TonB wurden von Reinhard Albrecht (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) zur Verfügung gestellt. Colicin M wurde analog Abschnitt 3.1.6 via Nickel-NTA und Gelfiltration gereinigt und anschließend mit FhuA oder TonB versetzt. Der Kristallisationsversuch wurde im Sitting-Drop-Verfahren durchgeführt, die Bedingungen sind in der Tabelle 3.6 auf Seite 74 aufgeführt.

3 Ergebnisse

Die Kristalle (siehe Abb. 3.16 auf Seite 75) waren reproduzierbar und wurden mehrfach im SLS mit einer Auflösung von 2 Å gemessen und ausgewertet. Sie bestanden nur aus Colicin M, sodass Colicin M nicht mit FhuA ko-kristalliert werden konnte.

Tabelle 3.6: **Kristallisationsbedingungen für Colicin M & FhuA und TonB**

Sitting Drop	
Colicin M & FhuA	
Konzentration Colicin M	10 mg/ml
Konzentration Ligand	5 mg/ml
Puffer	10 mM Tris, 10 mM NaCl
Detergenz	0,1% Dodecylmaltosid
Temperatur	20 °C
Volumina	Probe/Puffer: 0,4 µl/0,4 µl Reservoir: 75 µl
	Additiv: -
Kristallisationsbedingungen	1344 (14 Screens)
Colicin M & TonB	
Konzentration Colicin M	10 mg/ml
Konzentration Ligand	5 mg/ml
Puffer	10 mM Tris, 10 mM NaCl
Detergenz	0,1% Dodecylmaltosid
Temperatur	20 °C
Volumina	Probe/Puffer: 0,4 µl/0,4 µl Reservoir: 75 µl Additiv: -
Kristallisationsbedingungen	1344 (14 Screens)
FhuA & TonB	
Konzentration FhuA M	5 mg/ml
Konzentration TonB	5 mg/ml
Puffer	10 mM Tris, 10 mM NaCl
Detergenz	0,1% Dodecylmaltosid
Temperatur	20 °C
Volumina	Probe/Puffer: 0,4 µl/0,4 µl Reservoir: 75 µl Additiv: -
Kristallisationsbedingungen	1344 (14 Screens)

3.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

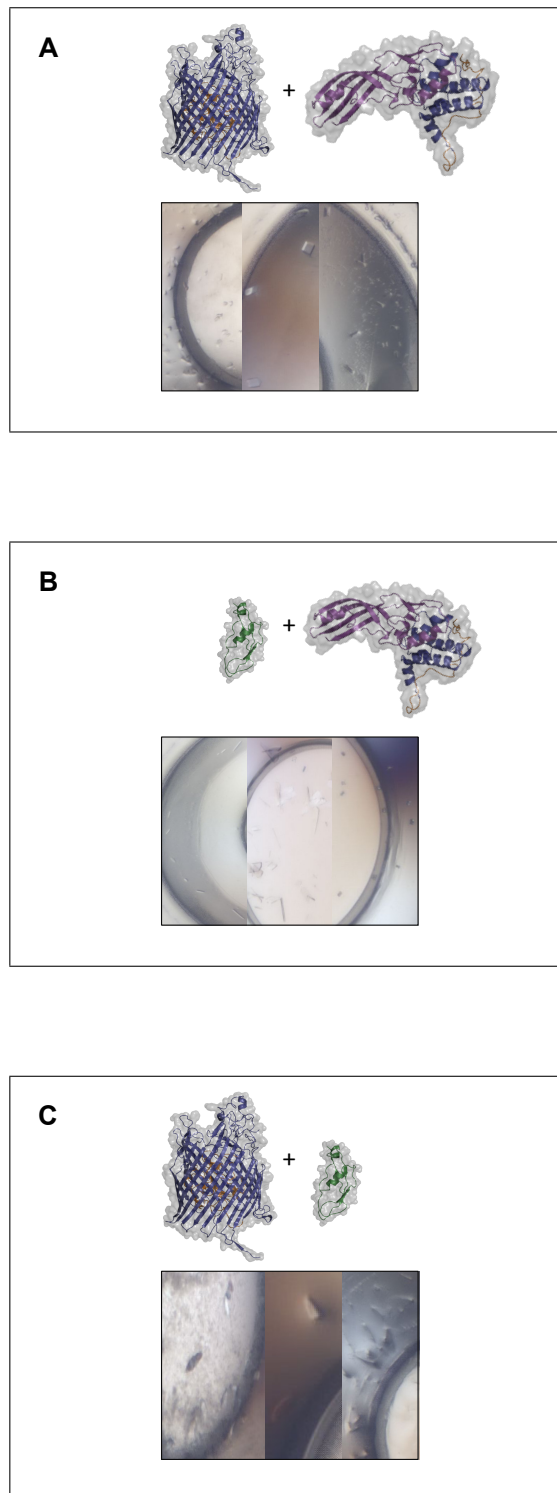


Abbildung 3.16: **Kristalle der Ko-Kristallisationsversuche von Colicin M mit FhuA und TonB.** **A** FhuA, **B** TonB-NT, **C** FhuA und TonB-NT. Die Strukturen wurden mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt. Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136], FhuA-TonB-Komplex (PDB 2GRX) [99]

3 Ergebnisse

Da FhuA nicht mit Colicin M ko-kristallisierte, sollten einzelne Bereiche des Rezeptors auf eine mögliche Bindung mit Colicin M untersucht werden. Die Schleifen 7 und 8 von FhuA wurden als Colicin M - bindende Bereiche identifiziert, weil deren Deletion die Sensitivität von Colicin M spezifisch beeinträchtigt [36]. Die Bindung anderer FhuA - Liganden wurde meist nicht beeinträchtigt. Synthetische Peptide der Schleifen 7 und 8 (siehe Abb. 3.1.7) wurden mit Colicin M versetzt. Bei einer *in vitro* Bindung an die Peptide wäre Colicin M nicht mehr in der Lage, seine toxische Wirkung zu entfalten. Von den Peptiden besetzt könnte es nicht mehr an den Rezeptor sensibler Zellen binden.

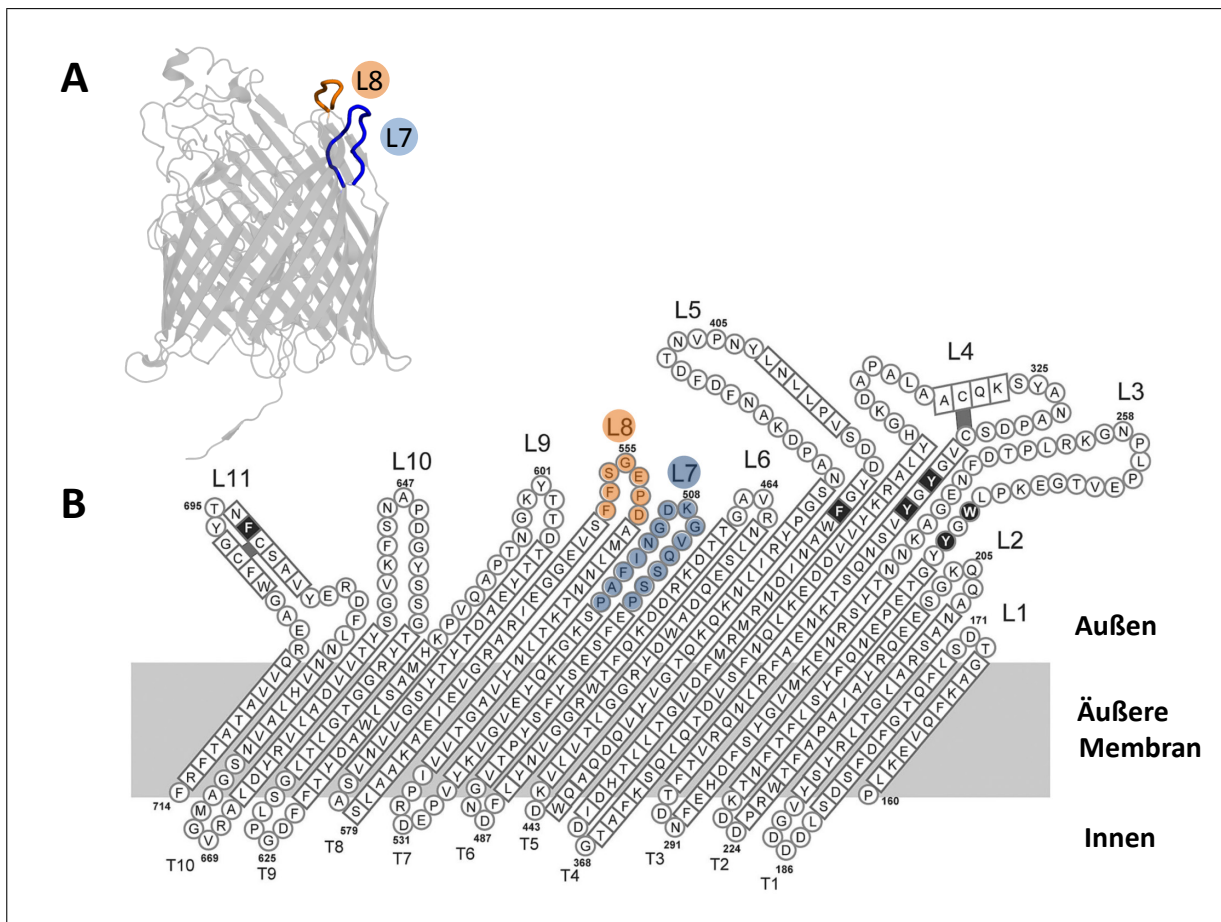


Abbildung 3.17: **FhuA mit markierten Loops 7 und 8.**

A Loop 7 (blau) und 8 (orange) farblich abgegrenzt in der Tertiärstruktur von FhuA. Die Struktur von FhuA wurde mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt. FhuA (PDB 2GRX) [99] **B** Loop 7 (blau) und 8 (orange) farblich abgegrenzt in der Sekundärstruktur von FhuA, verändert nach [36].

E. coli wurde dazu bis zu einer $OD_{578nm}=0,3$ angezogen und die Kultur mit Colicin M ($0,1 \mu\text{g}$) und den Peptiden (einzeln/Mix, molarer Überschuss: 10, 100, 1000, 3334) versetzt. Im Wachstumsverlauf konnte keine Hemmung von Colicin M beobachtet werden

3.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

(siehe Tab. 3.7), was eine feste *in vitro* Bindung von den Peptiden ausschloss. Zudem wurden die Peptide 7 und 8 von FhuA verschiedene Zeiträume (0, 15, 30, 60, 90, 120 und 150 min) mit Colicin M inkubiert und anschließend auf Colicin M sensitive *E. coli* AB2847 in Topagar aufgetropft. Die Konzentrationen wurden analog des Wachstumskurvenversuchs eingesetzt. Das Ergebnis des Auftropftests (siehe Tab. 3.8) bestätigt die Ergebnisse aus den Ko-Kristallisations- und Wachstumskurventests. Colicin M *in vitro* ist nicht in der Lage, die gewählten synthetischen Peptide von FhuA oder FhuA zu binden.

Tabelle 3.7: **Wachstumskurvenversuch: *In vitro* Bindung von Colicin M an Peptid 7 und/oder 8 von FhuA.** Der Versuch wurde 3x reproduziert.

Peptidüberschuss	Wachstum von <i>E. coli</i> bei Zugabe von				
	Cma	Cma+L7	Cma+L8	Cma+L7+L8	ohne Zusätze
x 10	-	-	-	-	+
x 100	-	-	-	-	+
x 1000	-	-	-	-	+
x 3334	-	-	-	-	+

Tabelle 3.8: **Auftropftest: *In vitro* Bindung von Colicin M an Peptid 7 und/oder 8 von FhuA.** 3 ml Topagar + 50 µl AB2847 Vorkultur, Tropfen: 10 µl. Der Versuch wurde 3x reproduziert.

Peptidüberschuss	Inkubation von					Hemmhof [mm] nach Inkubation						
	Cma	L7	L8	A.dest	DMSO	0	15	30	60	90	120	150
x 100	+	+	-	-	-	9	9	8,5*	0	0	0	0
x 1000	+	+	-	-	-	8,5	8	8**	0	0	0	0
x 10000	+	+	-	-	-	9	9	8	0	0	0	0
x 100	+	-	+	-	-	8	8	8	0	0	0	0
x 1000	+	-	+	-	-	8,5	8	7	0	0	0	0
x 10000	+	-	+	-	-	8	7	7*	0	0	0	0
x 100	+	+	+	-	-	8	8	8	0	0	0	0
x 1000	+	+	+	-	-	8	8	7	0	0	0	0
x 10000	+	+	+	-	-	9	9	8	0	0	0	0
-	+	-	-	+	-	8,5	8	7	0	0	0	0
x 100	-	-	-	-	+	8	8	7**	0	0	0	0
x 1000	-	-	-	-	+	7,5	7	7*	0	0	0	0
x 10000	-	-	-	-	+	8	8	7	0	0	0	0

Cma: Colicin M, L7: Loop7 von FhuA, L8: Loop8 von FhuA, *trüb, **sehr trüb

3.2 Kristallstruktur des Colicin M - Immunitätsproteins

Der Mechanismus der Inaktivierung von Colicin M durch sein Immunitätsprotein ist bislang nicht bekannt. Um diese Interaktion von Colicin M und seinem Immunitätsprotein näher zu charakterisieren, galt es dessen Struktur zu determinieren.

3.2.1 Konstrukte des Colicin M - Immunitätsproteins

Zur Isolierung ausreichender Mengen an Colicin M - Immunitätsprotein für die Kristallisation wurden mehrere Derivate hergestellt und überprüft. Da der hydrophobe Bereich FILTIIIALAAVFFW vom Colicin M - Immunitätsprotein zur Verankerung in die Cytoplasmamembran dient, sollte der N-Terminus (1-23) mit der Signalsequenz der β -Lactamase (BlaM) ersetzt und zur Reinigung mit C-terminalem His₆-Tag kloniert werden. Fusionsproteinkonstrukte des Colicin M - Immunitätsproteins mit β -Lactamase (BlaM) und Penicillinbindeprotein (PBP3) liegen bereits aus der Arbeit von Patrica Gross [52] vor. Da β -Lactamase ein *sec*-abhängiges periplasmatisches Protein ist [101], kann das Colicin M - Immunitätsprotein mit dem Signalpeptid von β -Lactamase ins Periplasma exportiert und prozessiert werden, sodass es nicht mehr membrangebunden vorliegt. Das Penicillinbindeprotein dagegen ist ein periplasmatisches, durch seine N-terminal signalähnliche Sequenz in der Cytoplasmamembran verankertes Protein [10][94]. Dadurch kann das Immunitätsprotein von Colicin M ohne seinen eigenen N-terminalen Membrananker in der Cytoplasmamembran verankert werden und ist aktiv.

Die Konstrukte wurden von Silke Patzer (Max-Planck-Institut Tübingen) zur Verfügung gestellt (siehe Tab. 3.9 und Abb. 3.18).

Tabelle 3.9: **Cmi-Konstrukte**

Plasmid	Konstrukt	Lokalisation
pSP130/1	PBP3(1-42)-Cmi(24-117, Δ 1-23)-His ₆	in CM verankert
pSP130/7	BlaM(1-23)-Cmi(24-117, Δ 1-23)-His ₆	löslich im Periplasma
pSP130/39	BlaM(1-23)-Cmi(24-117, Δ 1-23)-His ₆	löslich im Periplasma
pSP130/42	Cmi(24-117, Δ 1-23)-His ₆	löslich im Cytoplasma

CM Cytoplasmamembran, BlaM β -Lactamase, PBP3 Penicillinbindeprotein 3

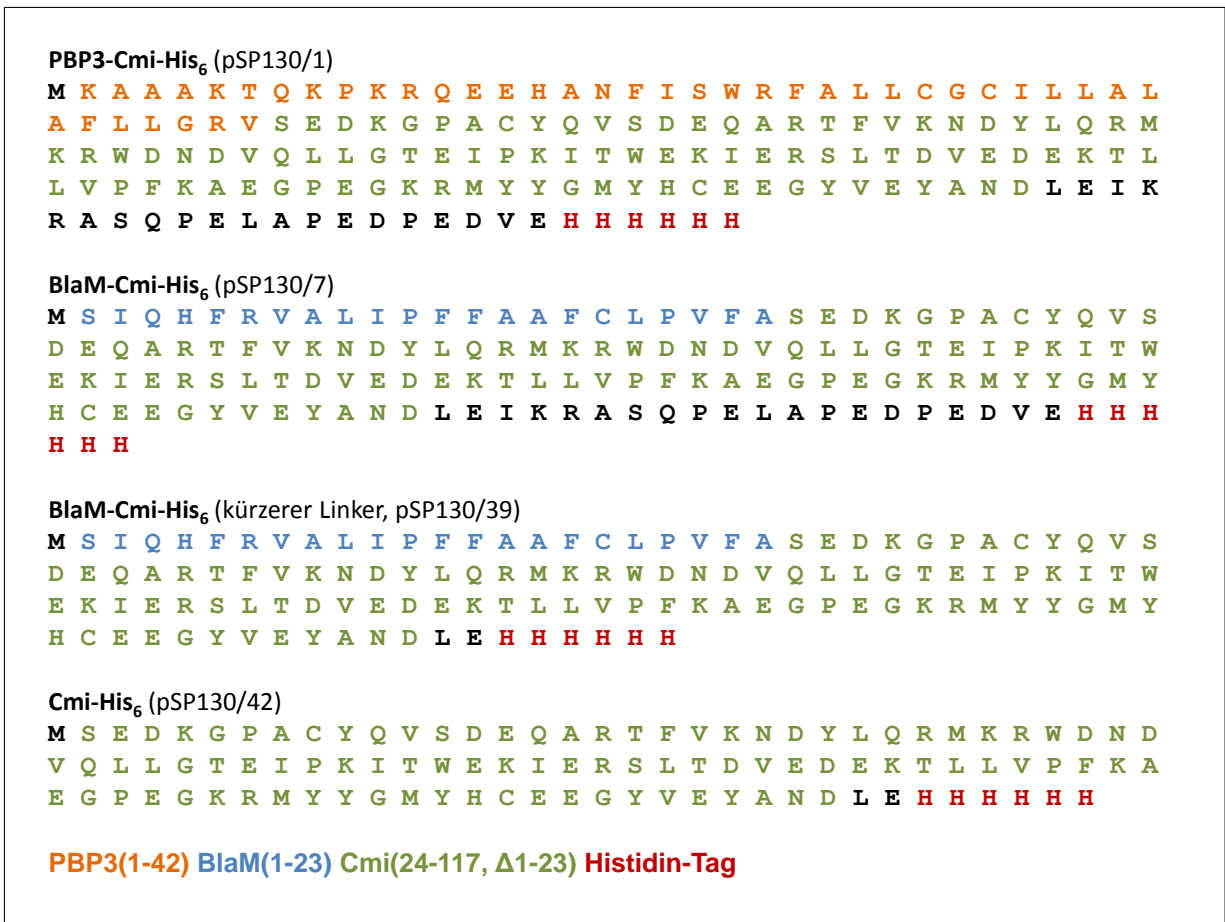


Abbildung 3.18: **Aminosäuresequenzen der Cmi Konstrukte.**
 PBP3 Penicillinbindeprotein 3, BlaM β -Lactamase, Cmi Colicin M-Immunitätsprotein

3.2.2 Überexpression und Reinigung des Colicin M - Immunitätsproteins

Da es sich um Derivate des Colicin M-Immunitätsproteins handelt, musste zunächst deren Synthese etabliert werden. Dazu wurden die Konstrukte von Cmi (siehe 3.2.1 auf Seite 78) mit β -Lactamase (siehe 3.2.2.1 auf Seite 80), Penicillinbindeprotein (siehe 3.2.2.2 auf Seite 81), fehlendem N-Terminus (siehe 3.2.2.3 auf Seite 81) und selenomethioninmarkiert (siehe 3.2.2 auf Seite 82) hinsichtlich unterschiedlicher Parameter (Aufschlussart, Temperatur, Zusätze, IPTG-Induktion, Expressionsdauer) untersucht.

3 Ergebnisse

3.2.2.1 BlaM-Cmi-His₆

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) wurde mit dem Plasmid pSP130/7 transformiert und in LB-Medium überexprimiert. Dabei wurden 10 ml bis 5 l auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft und ohne bzw. mit 0,1 oder 1 mM IPTG bei OD₅₇₈=0,5 induziert. Nach 3-5 h schüttelnder Inkubation bei 30 bzw. 37 °C unter Kontrolle der optischen Dichte wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet. Anschließend wurden sie in 2 bis 15 ml Bindepuffer resuspendiert und aufgeschlossen. Der Zellaufschluss fand entweder durch osmotischen Schock, mit Zugabe von 5 mg/ml bzw. 10 mg/ml Lysozym, Ultraschall oder fünffacher French Press statt (siehe Abschnitt 2.2.3.3 auf Seite 40). Nach Zentrifugation wurde der Rohextrakt über eine Nickelsäule via His₆-Tag und anschließender Gelfiltration gereinigt (siehe Abschnitt 2.2.3.4 auf Seite 41) und nach dessen Aufkonzentrierung (siehe Abschnitt 2.2.3.7 auf Seite 42) mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.3.9 auf Seite 45) auf Reinheit überprüft.

BlaM(1-23)-Cmi(24-117, Δ1-23)-His₆ lässt sich mit osmotischem Schock, Lysozym, Ultraschall und French Press aus Zellen in löslicher Form gewinnen. Die effizientesten Methoden sind Ultraschall und French Press. Die Überexpression unterscheidet sich weder bei 30 und 37 °C, bei 3 und 5 h, noch mit 0,1 mM und 1 mM IPTG. Dodecylmaltosid zur Erhöhung der Löslichkeit und der Zusatz eines Proteaseinhibitorcocktails, der das Protein schützen soll, bewirkten eher dessen vorzeitigen Abbau während der anschließenden Reinigung, so dass bei der Gewinnung im Großmaßstab auf diese verzichtet wurde. Bei anschließender Reinigung mittels Nickel-NTA und Gelfiltration konnte reines Protein gewonnen werden.

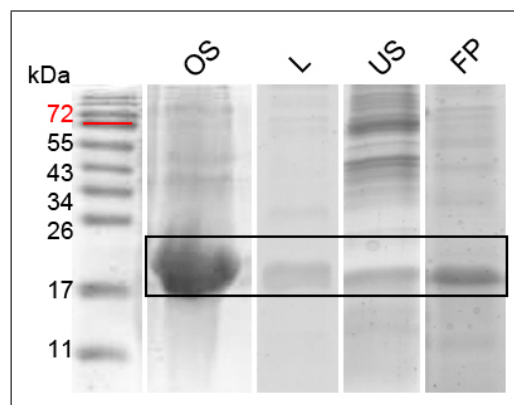


Abbildung 3.19: **SDS-PAGE von BlaM-Cmi-His₆. Testexpression mit verschiedenen Aufschlussmethoden.** OS osmotischer Schock, L Lysozym 5 mg/ml, US Ultraschall, FP French Press
Auftrag SDS-PAGE: 5 µl Marker, 5 µl Probe mit 5 µl SDS-Auftragspuffer und 5 µl H₂O_{dest.}

3.2.2.2 PBP3-Cmi-His₆

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) wurde mit dem Plasmid pSP130/1 transformiert und analog 3.2.2.1 überexprimiert. Zur Lösung aus der Cytoplasmamembran wurde 0,1 % Dodecylmaltosid zugesetzt.

PBP3(1-42)-Cmi(24-117, Δ1-23)-His₆ kann nur bei 30 °C und nur mit Lysozym schwach nachgewiesen werden. Bei der anschließenden Reinigung wird es abgebaut bzw. kann nicht an die Säule binden, sodass es für Aufreinigungszwecke nicht geeignet ist (siehe Abb. 3.20)

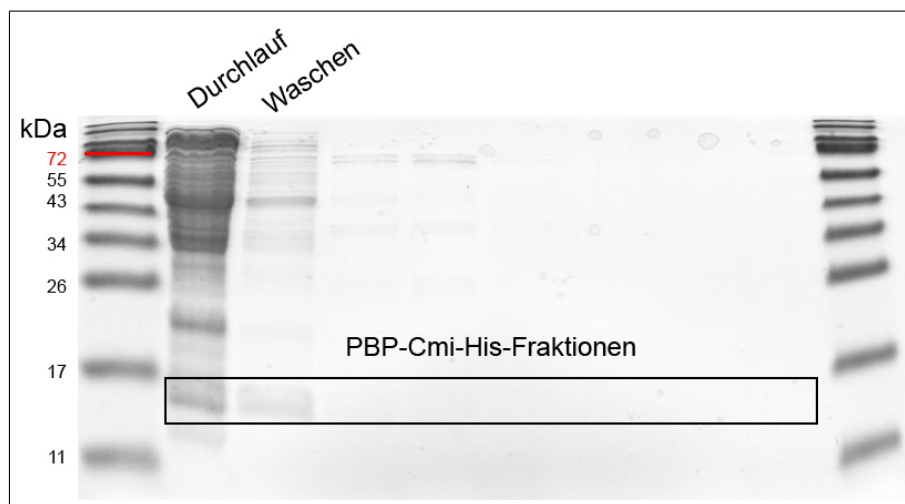


Abbildung 3.20: **SDS-PAGE von PBP3-Cmi-His₆. Reinigung via Nickel-NTA.** Auftrag SDS-PAGE: 5 µl Marker, 5 µl Probe mit 5 µl SDS-Auftragspuffer und 5 µl H₂O_{dest.}

3.2.2.3 CmiΔN(1-23)-His₆

Es wurde davon ausgegangen, dass der hydrophobe Membrananker (Reste 1-23) die Löslichkeit des Immunitätsproteins herabsetzt und die Kristallisation beeinträchtigt. Daher wurden die Bereiche, die bewirken, dass das Protein im Cytoplasma verbleibt, deletiert.

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) wurde mit dem Plasmid pSP130/42 transformiert und analog 3.2.2.1 und 3.2.2.2 überexprimiert.

CmiΔN(1-23)-His₆ lässt sich mittels Ultraschall und/oder French Press bei 30 °C ohne Zusätze und mit 0,1 - 1 mM IPTG gewinnen. Im Großmaßstab konnten bereits mit 0,1 mM

3 Ergebnisse

IPTG innerhalb von 3 h gute Mengen des Proteins nachgewiesen werden, die sich mit Nickel-NTA und Gelfiltration und ohne Verluste aufarbeiten ließen (siehe Abb. 3.21).

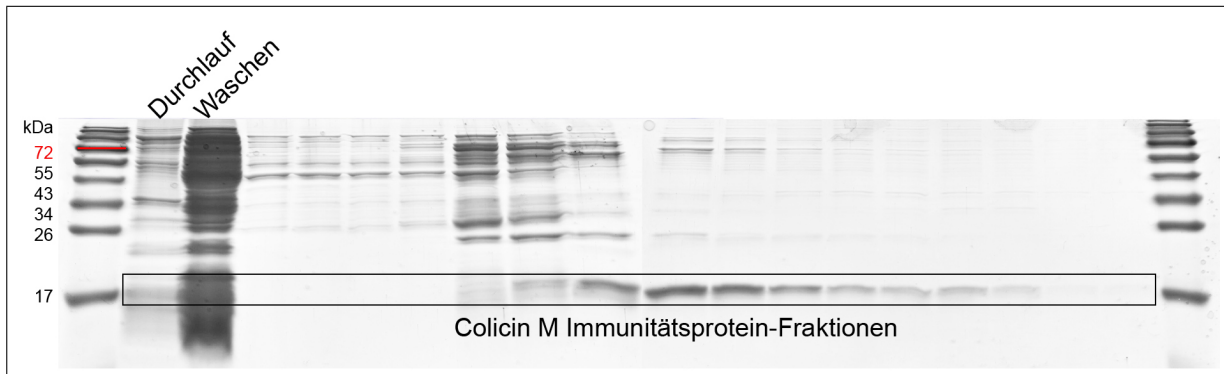


Abbildung 3.21: **SDS-PAGE von Cmi Δ 1-23-His₆. Reinigung via Nickel-NTA.**
Auftrag SDS-PAGE: 5 μ l Marker, 5 μ l Probe mit 5 μ l SDS-Auftragspuffer und 5 μ l H₂O_{dest.}

3.2.2.4 Selenomethioninmarkiertes Cmi

Für die Bestimmung der Phasen bei der Kristallisationsstrukturanalyse wurden die Methioninreste in pSP130/39 (BlaM-Cmi-His₆) und pSP130/42 (Cmi Δ N(1-23)-His₆) mit Selenomethionin ersetzt (siehe Abb. 3.22). Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) wurde dazu mit pSP130/39 und pSP130/42 transformiert und im 6l-Maßstab in Minimalmedium mit Selenomethionin angezogen.

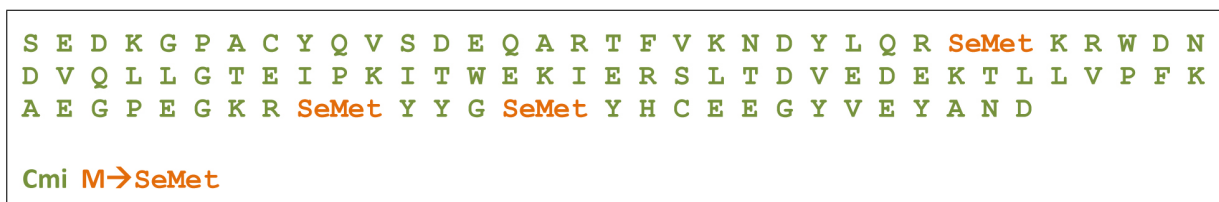


Abbildung 3.22: **Aminosäuresequenz von Cmi Δ N(1-23)-His₆ mit ersetzten Selenomethioninresten (SeMet).**

Die Zellen wuchsen erwartungsgemäß etwas schlechter als im angereicherten LB-Medium (siehe Abb. 3.23), synthetisierten aber ausreichend Immunitätsprotein, das sich gut aufreinigen ließ (siehe Abb. 3.24 auf Seite 83).

3.2 Kristallstruktur des Colicin M-Immunitätsproteins

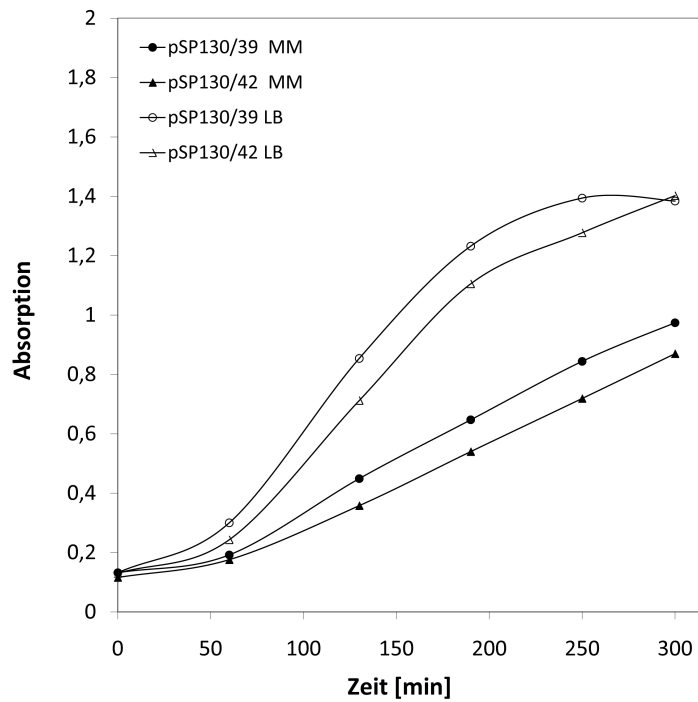


Abbildung 3.23: Wachstumskurvenvergleich von Cmi-produzierenden Zellen in LB-Medium (LB) und in SeMet-Minimalmedium (MM). 1 mM IPTG. Der Versuch wurde 3x reproduziert.

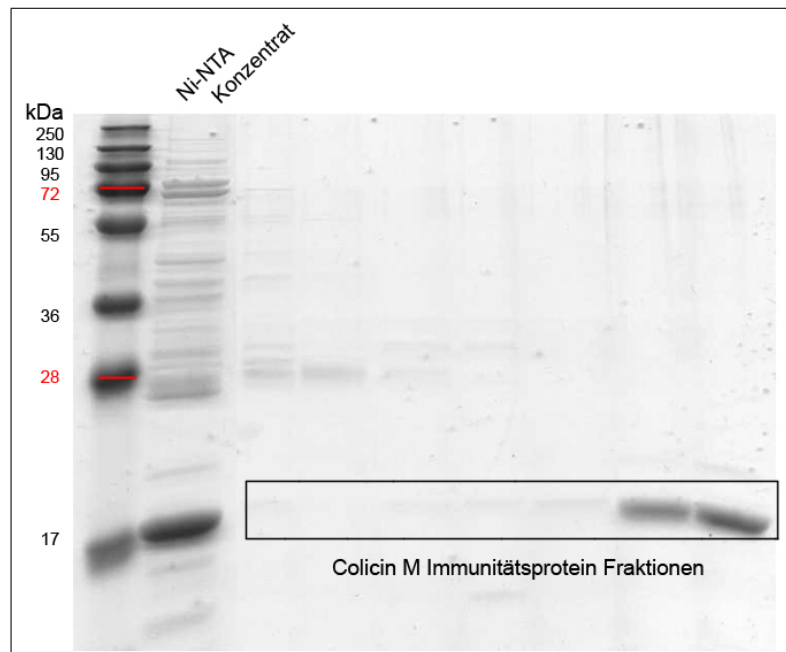


Abbildung 3.24: SDS-PAGE der Reinigung von Se-Met-Cmi via Nickel-NTA und Gelfiltration. Auftrag SDS-PAGE: 5 μ l Marker, 5 μ l Probe mit 5 μ l SDS-Auftragspuffer und 5 μ l H₂O_{dest.}

3.2.3 Aktivität des Colicin M - Immunitätsproteins

3.2.3.1 Auftropftests

Zur Bestimmung der Aktivität von BlaM-Cmi-His₆ und PBP3-Cmi-His₆ wurde jeweils eine Kolonie in 1 ml LB-Medium für 3 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 200 µl der Suspension mit beziehungsweise ohne 1 mM IPTG in 3 ml Topagar gegossen. Auf die Platten wurden 10 µl Colicin M (2 mg/ml) bis zu einer Verdünnung von 10⁻⁵ aufgetragen, die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Hemmhöfe abschließend bestimmt. Als Kontrolle diente *E. coli* BL21(DE3) ohne Immunitätsprotein.

Während die Kontrolle ohne Immunitätsprotein von Colicin M bis zu einer Verdünnung von 10⁻⁵ gehemmt wurde, waren die Stämme mit codierendem Immunitätsprotein dem Toxin gegenüber resistent (siehe Tab. 3.10). Eine Induktion mit IPTG scheint überflüssig zu sein, im Vergleich ohne Induktion ist keine Veränderung zu beobachten.

Tabelle 3.10: **Aktivität vom Colicin M - Immunitätsprotein (Cmi)**. 3 ml Topagar + 50 µl AB2847 Vorkultur, Tropfen: 10 µl. Der Versuch wurde 2x reproduziert.

Konstrukt	Plasmid	IPTG	Hemmhof [mm]					
			1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
PBP-Cmi-His	pSP130/1	+	0	0	0	0	0	0
PBP-Cmi-His	pSP130/1	-	0	0	0	0	0	0
BlaM-Cmi-His	pSP130/7	+	0	0	0	0	0	0
BlaM-Cmi-His	pSP130/7	-	0	0	0	0	0	0
BL21(DE3)	-	+	16	15	12	9	5	5*
BL21(DE3)	-	-	17	15	13	8	6	5*

* trüb

3.2.3.2 Wachstumskurvenversuch

Das Ergebnis der Auftropftests sollte mittels Wachstumsverlaufsbestimmung verifiziert werden. Dazu wurde *E. coli* BL21(DE3) mit pSP130/1 (PBP3(1-42)-Cmi(24-117)-His) und *E. coli* BL21(DE3) mit pSP130/7 (BlaM(1-23)-Cmi(24-117)-His) transformiert und beide Stämme nach schüttelnder Übernachtskultur bei 37 °C auf eine OD_{578nm} von 0,1 angeimpft. Bei logarithmischem Wachstum der OD_{578nm} von 0,5 wurden die Zellen mit 1 µg/ml Colicin M und 1 mM IPTG versetzt und deren Wachstum bei einer Wellenlänge von 578 nm weiter verfolgt. Als Kontrolle diente *E. coli* BL21(DE3) ohne Insert.

Das Immunitätsprotein von Colicin M hemmte dessen Aktivität auch im Wachstumskurventest, sodass das Immunitätsprotein codierende Zellen nicht im Wachstum gehemmt wurden (siehe Abb. 3.25).

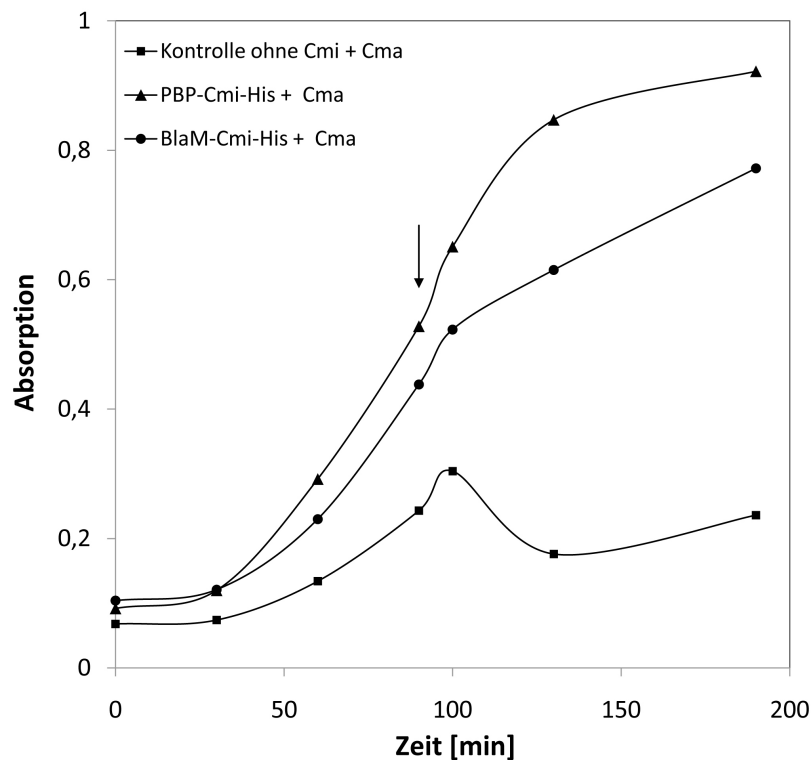


Abbildung 3.25: **Wachstumskurvenversuch. Aktivität von Colicin M - Immunitätsprotein (Cmi) produzierenden Zellen.** *E. coli* BL21(DE3) (■), *E. coli* BL21(DE3) + pSP130/1 (▲) und *E. coli* BL21(DE3) + pSP130/7 (●) wurden bei $OD_{578nm}=0,5$ mit 1 µg/ml Colicin M und 1 mM IPTG versetzt (Pfeil) und das Wachstum bei einer Wellenlänge von 578 nm weiter verfolgt. Colicin M bewirkte eine erwartungsgemäße Hemmung von *E. coli* BL21(DE3). Das Immunitätsprotein codierende Zellen wurden nicht im Wachstum gehemmt. Cmi wirkt, indem es die Wirkung von Colicin M aufhebt.

3.2.4 Kristallisationsbedingungen des Colicin M - Immunitätsproteins

Für die Kristallisation wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pSP130/39 (BlaM-Cmi Δ N(1-23)-His₆) transformiert und analog 3.2.2.1 überexprimiert. Das mittels Ni-NTA und Gelfiltration gereinigte Protein (siehe Abb. 3.26) wurde auf ca. 5 mg/ml einkonzentriert und unter der in Tabelle 3.11 beschriebenen Bedingungen im Sitting-drop-Verfahren mithilfe von Kerstin Bär zur Kristallisation angesetzt.

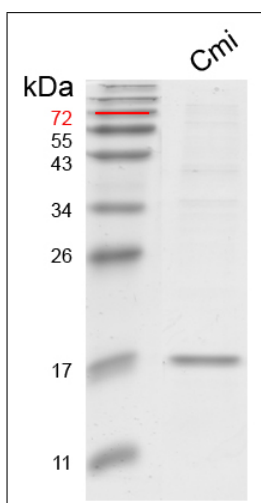


Abbildung 3.26: **SDS-PAGE von gereinigtem Bla-Cmi (pSP130/39) für die Kristallisation. Reinigung via Nickel-NTA und Gelfiltration.** Auftrag SDS-PAGE: 5 μ l Marker, 5 μ l Probe mit 5 μ l SDS-Auftragspuffer und 5 μ l H₂O_{dest.}

Tabelle 3.11: **Cmi-Kristallisationsbedingungen**

	Cmi(Δ 1-23)
Puffer	20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,4
Detergenz	-
Konzentration	5,3 mg/ml
Temperatur	20 °C
Ansatz	Sitting Drop
Volumen Probe	0,4 μ l
Volumen Puffer	50 μ l
getestete Bedingungen	1248, Screen 1-13

3.2.5 Kristall des Colicin M-Immunitätsproteins

Unter geeigneten Kristallisationsbedingungen (siehe Tab. 3.12) entstand innerhalb der ersten sieben Tage ein nadelförmiger Kristall (siehe Abb. 3.27).

Tabelle 3.12: **Cmi-Kristall**

	Cmi(Δ 1-23)
Kristallisationsbedingung	0,2 M Ammoniumsulfat 30 %w/v PEG 4000
Kristallisationsdauer	1-7 Tage
Anzahl	1
Reproduzierbarkeit	nein
Form	Nadel
Größe [μ m]	ca. 380 x 20

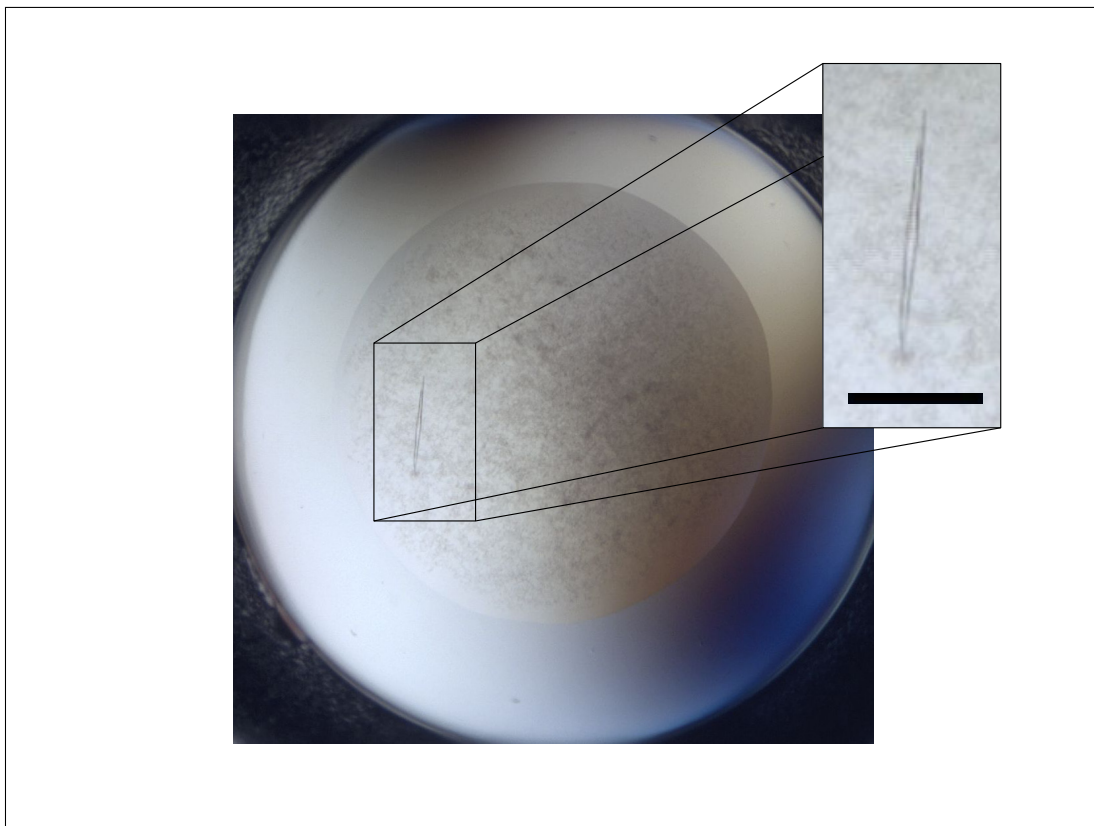


Abbildung 3.27: **Kristall von Cmi(Δ 1-23)** im Tropfen und im Ausschnitt in Bedingung F9 des PEG II - Screens mit 0,2 M Ammoniunsulfat und 30 %(w/v) PEG 4000 nach 1-7 Tagen. Balken: 200 μ m

3.2.6 Röntgenbeugungsexperiment des Colicin M - Immunitätsproteins

Mithilfe von Reinhard Albrecht wurde der unter der in Abschnitt 3.2.5 (siehe Seite 87) beschriebenen Bedingung entstandene Kristall (siehe Abb. 3.29) der 96-Well-Platte mit einer kleinen Nylonschleife entnommen, kurz in die Reservoir-Lösung eingetaucht, mit 10% Ethylenglykol versetzt und zur Röntgenstrukturanalyse sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Das Beugungsexperiment (siehe Tab. 3.29 auf Seite 90 und Abb. 3.28) wurde von Kornelius Zeth an der Beamline des Swiss Light Source (SLS, Villigen, Schweiz) durchgeführt, wobei eine Auflösung von 1.9 Å erreicht wurde.

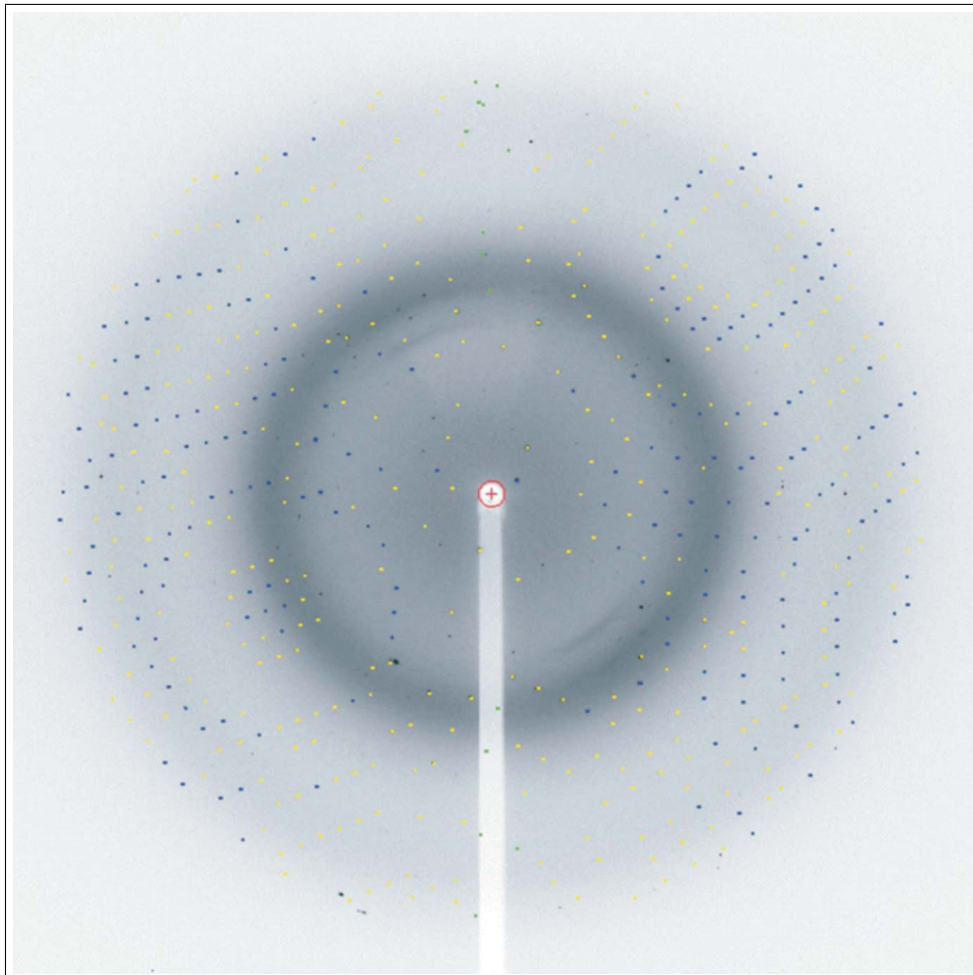


Abbildung 3.28: **Beugungsmuster von Cmi(Δ 1-23)**. Ausschnitt vom gesamten Datensatz. Abb. aus [111].

3.2 Kristallstruktur des Colicin M-Immunitätsproteins

Tabelle 3.13: **Statistik zum Datensatz des Kristalls von Cmi(Δ 1-23.)** Die in Klammern angegebenen Werte gelten für die Form der höchsten Auflösung. Tabelle abgewandelt nach [111].

Beamline	PX10, SLS
Temperatur [°C]	-173,15
CCD Kamera, Detektor	MAR 225 mm
Kristall Dimensionen [μ m]	200 x 50 x 50
Raumgruppe	$C222_1$
Einzelzell-Parameter	
a [Å]	66,02
b [Å]	83,57
c [Å]	38,30
Auflösungsgrenzen	50-1,89 (2,00-1,89)
Wellenlänge [Å]	0,9789
Oszillationswinkel [°]	1
Beobachtete Reflexionen	41344
Einzigartige Reflexionen	15884
Vollständigkeit [%]	96,6 (90,0)
Vielfalt	2,6 (2,5)
ISa ($I/\sigma(I)$)	10,9 (2,5)
$R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl) - \{I(hkl)\} }{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$	0,078 (0,507)

$I_i(hkl)$ Intensität der Reflexion hkl , $\{I(hkl)\}$ Durchschnittsintensität der Reflexion hkl , CCD Charge-coupled Device, SLS Swiss Light Source (Villigen, Schweiz)

3.2.7 Strukturbestimmung des Colicin M - Immunitätsproteins

Die Daten des Röntgenbeugungsexperiments (siehe Abschnitt 3.2.6 auf Seite 88) wurden von Kornelius Zeth mithilfe des Programms XDS und XSCALE ([74]) geindexed, integriert und skaliert. Um aus den gemessenen Intensitäten die Strukturfaktoren abzuleiten, musste das Phasenproblem gelöst werden. Die qualitative oder quantitative Bestimmung kristalliner Phasen anhand des Beugungsbildes vom Colicin M-Immunitätsprotein war nicht möglich. Weder das Tauchen des Kristalls in Schwermetall noch die mehrfache Kristallisation (Sitting- und Hanging Drop) von selenomethioninmarkiertem Protein (siehe Abschnitt 3.22 auf Seite 82) führten zur Lösung des Problems. Aufgrund seiner einzigartigen Faltung, die keine Ähnlichkeit zu bekannten Strukturen aufweist (siehe 3.2.8 auf Seite 91), konnten auch keine Rückschlüsse auf bereits bekannte Strukturbereiche (Molecular Replacement) einen Ansatz zur Lösung der Struktur bieten. Letztlich aber konnte die Struktur des Colicin M-Immunitätsproteins von Dayté Rodriguez und Isabel Usón-Finkenzeller (Instituto di Biología Molecular de Barcelona, Spanien) *de novo* mithilfe der

3 Ergebnisse

kürzlich veröffentlichten Software ARCIMBOLDO [112] gelöst werden. Die Struktursuche wurde mit einem 12-Reste langen α -helikalen Fragment gestartet, das aufgrund der Vorhersage der Sekundärstruktur verwendet wurde und als erste Saat im Kristallgitter dienen konnte. Die Programme SHELXE [120][121], PHASER [90], REFMAC5 [93] und COOT [34] führten zu einem Modell, das die endgültige Verfeinerung der Struktur erlaubte. Das 9 kDa große Protein ist ein Dimer der Maße 5 x 4,5 x 2,5 nm (siehe Abb. 3.29).

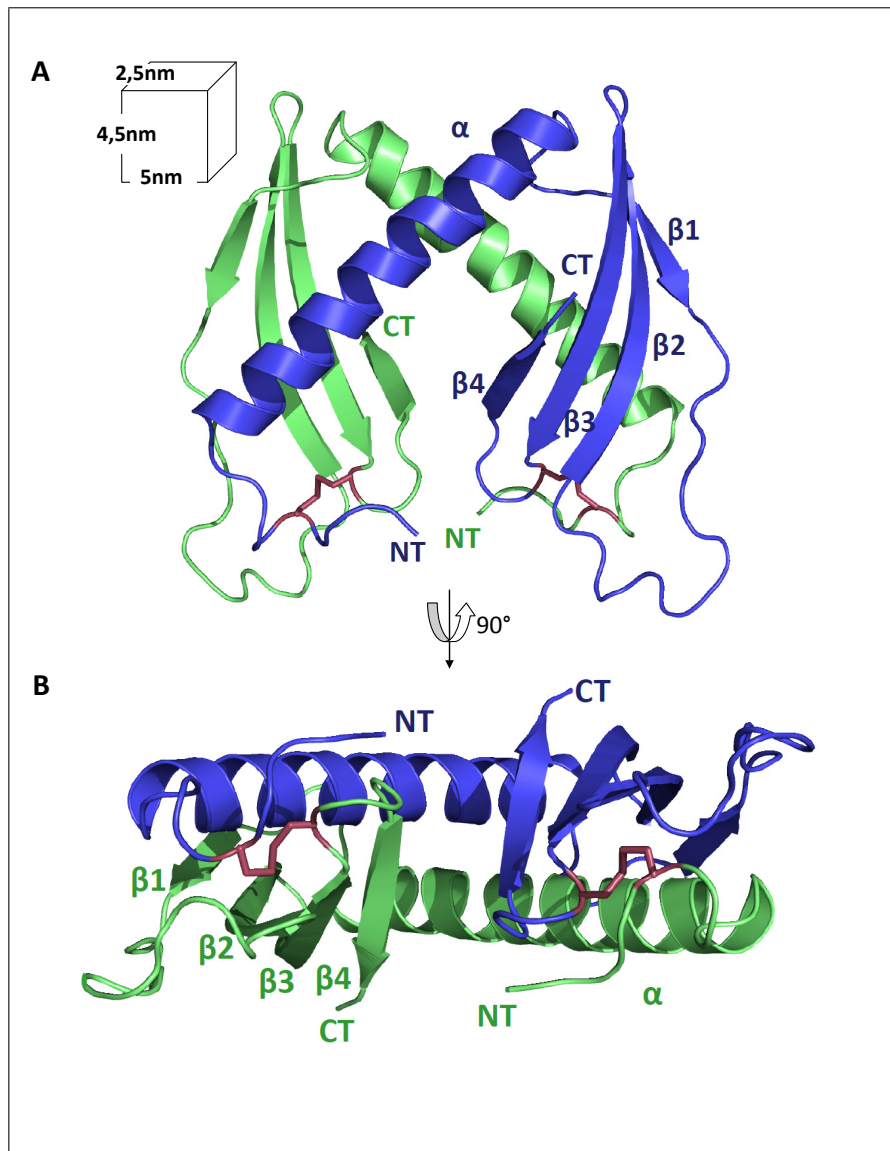


Abbildung 3.29: **Struktur von Cmi(Δ 1-23)**. **A** Vorderansicht des Dimers. **B** Aufsicht des Dimers. Die Monomere sind in blau und grün dargestellt, deren verknüpfende Disulfidbrücken in rot. Die α -Helix und die 4 β -Faltblätter sind markiert. Die Datenauswertung wurde von K. Zeth (Max-Planck-Institut Tübingen), die Strukturberechnung von D. Rodriguez und I. Usón-Finkenzeller (Instituto di Biología Molecular de Barcelona, Spanien) mit ARCIMBOLDO [112] vorgenommen. NT N-Terminus, CT C-Terminus, α Helix, β Faltblatt

3.2.8 Alignment des Colicin M-Immunitätsproteins

A	ATGAAAGTAATTAGCATGAAATTTATTTTTATTTTAACGATTATTGCTCTTG CTGCTGTTTTTTTTCTGGTCTGAAGATAAAGGTCCGGCATGCTATCAGGTCAG CGATGAACAGGCCAGAACGTTTGTAAAAAATGATTACCTGCAAAGAATGAAA CGCTGGGACAACGATGTACAACCTTCTGGTACAGAAATCCCGAAAATTACAT GGGAAAAGATTGAGAGAAGTTTAAACAGATGTTGAAGATGAAAAACACTTCT TGTCCCATTTAAAGCTGAAGGTCCGGAGGGTAAGAGAATGTATTATGGCATG TACCATTGTGAAGAGGGATATGTTGAATATGCGAATGACTAA
B	MKVISMKFIFILTIIALAAVFFWPEDKGPACYQVSDEQARTFVKNDYLQRMR RWDNDVQLLGTEIPKITWEKIERSLTDVEDEKTLVLPFKAEGPEGKRMYYGM YHCEEYVEYAND

Abbildung 3.30: **Sequenz vom Colicin M-Immunitätsprotein (Cmi).**

A Nukleotidsequenz in 5' 3' Richtung, **B** Aminosäuresequenz (gi|195940122)
gi Sequenz Identifikationsnummer in NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Zur Lösung des Phasenproblems mit möglichem molekularem Replacement wurde das Immunitätsprotein auf Ähnlichkeit zu anderen Proteinen untersucht. Die Aminosäuresequenz (siehe Abb. 3.30 B) wurde mittels der Programme PSI-BLAST, CLUSTAL-W und ALI2D analysiert.

Das Immunitätsprotein von Colicin M besitzt keine Ähnlichkeit zu bekannten Strukturen, sodass keine Rückschlüsse auf bereits bekannte Strukturbereiche zur Lösung der Struktur gezogen werden konnten. Es besitzt aber eine signifikante Sequenzsimilarität zu YebF von *E. coli*, einem sekretierten Protein unbekannter Funktion. 30 Reste der 117 Aminosäuren sind identisch (35,1%). Die anderen Ähnlichkeiten entsprechen unbekanntem Proteinen (siehe Abb. 3.31 auf Seite 92).

Da Proteine von *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa* und verschiedenen *Burkholderia*-Stämmen eine Sequenz-Identität zu Colicin M von 26 bis 45 aufweisen (siehe Abb. 1.3 auf Seite 9), wurden die bekannten Genome der Stämme *Burkholderia amifaria* MC40-6 (gi|172059067), *Burkholderia cepacia* QOBIY7 (gi|115286659), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Q88A25 (gi|302121916) und *Pseudomonas aeruginosa* Q1W548 (gi|110645304) auf die Sequenz des Colicin M-Immunitätsproteins (siehe Abb. 3.30 A) via PSI-BLAST (NCBI) untersucht.

In keinem der dem Colicin M ähnlichen Stämme war eine Ähnlichkeit mit dem Colicin M-Immunitätsprotein nachweisbar.

3 Ergebnisse

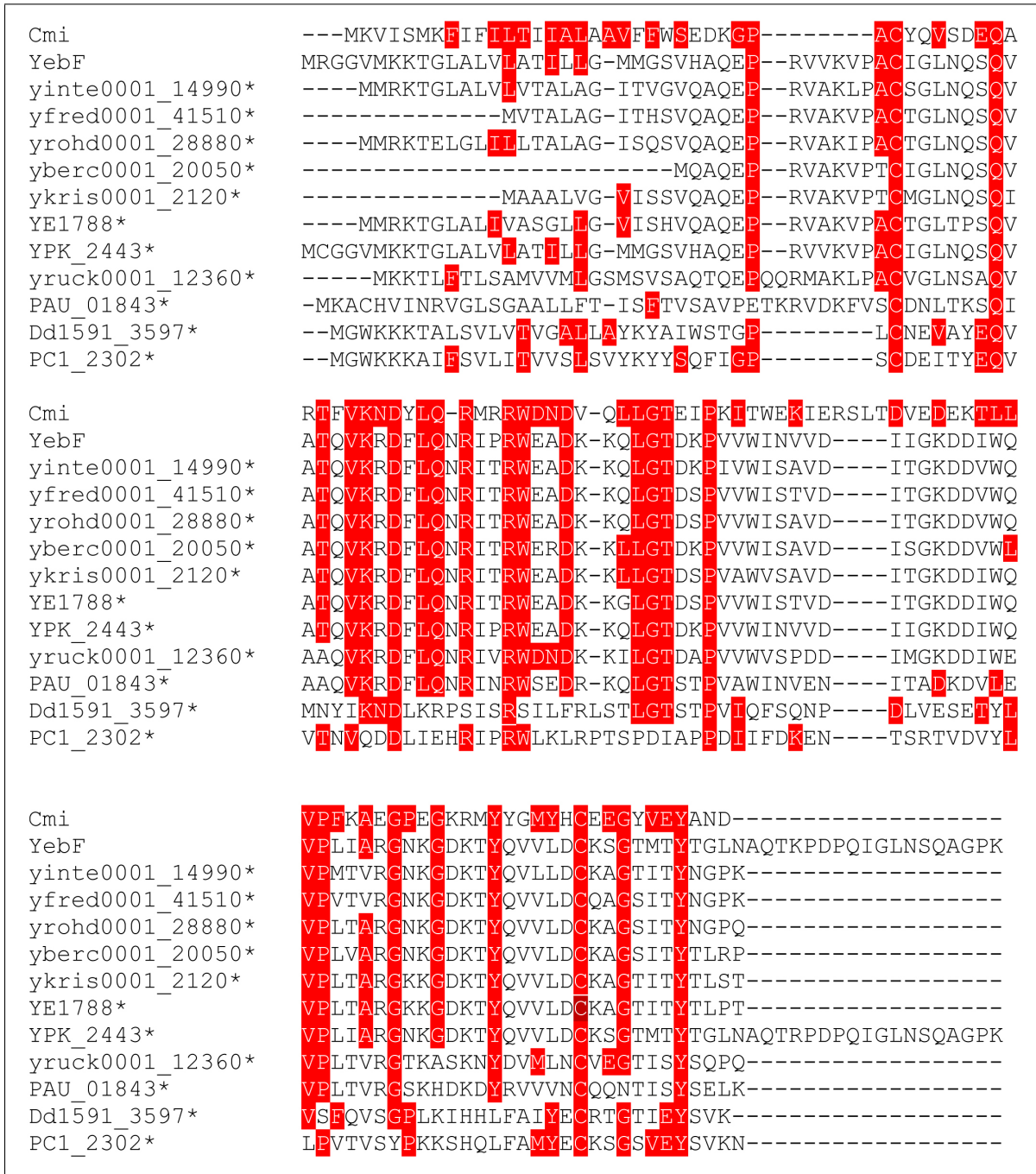


Abbildung 3.31: **Alignment vom Colicin M-Immunitätsprotein (Cmi)**. Identitische Aminosäurereste sind rot unterlegt. Programme: Programme PSI-BLAST, CLUSTAL-W und ALI2D. * hypothetisches Protein

3.3 Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein

Bislang liegen keine überzeugenden Ergebnisse der Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein vor. Ölschläger *et al.* konnten die Colicin M - bedingte Inhibition der Biosynthese von Murein durch dessen Immunitätsprotein von 92 % auf 54 % verringern [86]. Gross und Braun konnten mittels Ko-Immunpräzipitation aber nur eine geringe Bindung beider Proteine nachweisen [54]. Deshalb wurde mittels Ko-Kristallisation (siehe 3.3.1), Ko-Elution (siehe 3.3.2 auf Seite 96), Auftropftest (siehe 3.3.3 auf Seite 100) und Mutagenese (siehe 3.3.4 auf Seite 101) erneut versucht, die Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein nachzuweisen.

3.3.1 Ko-Kristallisation von Colicin M und seinem Immunitätsprotein

Die Kristallstruktur des Colicin M-Immunitätsproteins ist ein erster Schritt zur Charakterisierung der Interaktion von Colicin M und seinem Immunitätsprotein. Eine Ko-Kristallisation beider Proteine würde präzise deren Interaktion charakterisieren. Beide Proteine wurden getrennt kristallisiert, sodass eine Ko-Kristallisation prinzipiell möglich ist. Die Kristallisation von Colicin M wurde während meiner Diplomarbeit etabliert [110] (siehe Abschnitt 3.1.6 auf Seite 70), die vom Immunitätsprotein ist in Abschnitt 3.2 ab Seite 78 beschrieben.

Colicin M und das Colicin M-Immunitätsprotein wurden via Nickel-NTA und Gelfiltration gereinigt (siehe Abschnitt 3.1.1 auf Seite 50 und 3.2.2 auf Seite 79). Das Immunitätsprotein wurde aufgrund der Phasenproblematik parallel mit Selenomethionin markiert. Dazu wurde *E. coli* BL21(DE3) mit pSP130/39 bzw. pSP130/42 (siehe Abschnitt 3.2.1 auf Seite 78) transformiert und im 6 l-Maßstab überexprimiert. Die Aufarbeitung des Rohextraktes und die Reinigung und Aufarbeitung entsprach der des unmarkierten Colicin M-Immunitätsproteins. Alle Proteine konnten zur Kristallisation rein gewonnen werden.

Die Kristallisation wurde zunächst im Sitting-Drop-Verfahren angesetzt. Erfolgreiche Kristalle wurden im Hanging-Drop-Verfahren reproduziert (siehe Tab. 3.14 auf Seite 94). Die entstandenen Kristalle wurden im SLS gemessen und ausgewertet. Dabei handelte es sich um reines Colicin M, sodass kein Ko-Kristall erhalten wurde (siehe Abb. 3.3.1 und 3.32 auf Seite 95).

3 Ergebnisse

Tabelle 3.14: **Kristallisationsbedingungen für Colicin M (Cma) und sein Immunitätsprotein (Cmi)**

Cmi & Cma	Sitting Drop 1	Sitting Drop 2
Konzentration Cmi	8,5 mg/ml	5 mg/ml
Konzentration Cma	8,5 mg/ml	7,3 mg/ml
Puffer Cmi	10 mM Tris, 20 mM NaCl, pH 7,4	20 mM Tris, 10 mM NaCl
Puffer Cma	10 mM Tris, 20 mM NaCl, pH 7,4	10 mM Tris, 10 mM NaCl
Detergenz	0,1% DDM	-
Temperatur	20 °C	20 °C
Volumina	Probe/Puffer: 0,3 µl/0,4 µl Reservoir : 50 µl Additiv: -	0,3 µl/0,4 µl 50 µl -
Bedingungen	1344 (14 Screens*)	1248 (13 Screens*)
Se-Met-Cmi & Cma	Hanging Drop 1	Hanging Drop 2
Konzentration Cmi	3 mg/ml	6 mg/ml
Konzentration Cma	3 mg/ml	3 mg/ml
Puffer	10 mM Tris, 20 mM NaCl, pH 7,4	10 mM Tris, 10 mM NaCl
Detergenz	0,1% DDM	0,1% DDM
Temperatur	4 °C	4 °C
Volumina	Probe/Puffer: 2 µl/2 µl Reservoir : 500 µl Additiv: -	2 µl/2 µl 500 µl 0,5 µl
Bedingungen	(1)-(25)**	(2)** mit 76 Additiven

* Tab. 2.18 auf Seite 44 , Cmi Colicin M-Immunitätsprotein, Cma Colicin M, DDM Dodecylmaltosid

**

- (1) 0,1M Tris pH 8,5; 2,5 M Ammoniumsulfat
- (2) 0,1 M Natriumacetat x3H₂O pH 4,6; 2 M Ammoniumsulfat
- (3) 0,1 M Tris pH 8,5; 1,5 M Lithiumsulfat xH₂O
- (4) 0,1 M MES pH 6; 25 % PEG 6000; 0,01 M Zinkchlorid
- (5) 0,1 M Bis-Tris-Propan pH 8,5; 20 % PEG 3350; 0,2 M Ammoniumsulfat
- (6) 0,1M HEPES pH 7,5; 0,2 M Calciumchlorid x2H₂O; 30 % PEG 4000
- (7) 0,1 M Magnesiumformat; 15 % PEG 3350
- (8) 0,2 M Ammoniumsulfat; 0,1 M Tris pH 8,5; 12 % PEG 8000
- (9) 0,5 M Lithiumsulfatmonohydrat; 15 % PEG 8000
- (10) 0,2 M Magnesiumchlorid x6H₂O; 0,1 M HEPES pH 7,5; 15 % PEG 400
- (11) 0,1 M HEPES pH 7,5; 70 % 2-Methyl-2,4-pentanediol
- (12) 1,5 M Ammoniumsulfat; 0,1 M Tris pH 8,5; 12 % Glycerin
- (13) 30 % PEG 400; 0,1 M Natriumacetat pH 4,5; 0,2 M Calciumchlorid
- (14) 0,1 M Natriumchlorid; 1 M Bis-Tris pH 6,5; 1,5 M Ammoniumsulfat
- (15) 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6; 0,2 M Ammoniumsulfat; 15 % PEG 4000
- (16) 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6; 20 % PEG 2000
- (17) 0,0375 M Cadmiumsulfathydrat; 0,08 M HEPES pH 7,5; 8 % PEG 6000; 4 % 2-Methyl-2,4-pentanediol
- (18) 0,08 M Natriumacetat pH 4,6; 1,6 M Ammoniumsulfat; 20 % Glycerin
- (19) 0,1 M Tris-Hydrochlorid pH 8,5; 2 M Ammoniumsulfat
- (20) 0,1 M Natriumacetat x3H₂O pH 4,6; 2 M Natriumchlorid
- (21) 0,2 M Magnesiumacetat x4H₂O; 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5; 30 % 2-Methyl-2,4-pentanediol
- (22) 0,1 M HEPES pH 6,5; 0,01 M Cobalddchlorid x6H₂O; 1,8 M Ammoniumsulfat
- (23) 2 M Ammoniumsulfat
- (24) 1 M Lithiumsulfat xH₂O; 2 % PEG 8000
- (25) 0,4 M Lithiumsulfat xH₂O; 12 % PEG 8000; 20 % Glycerol

3.3 Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein

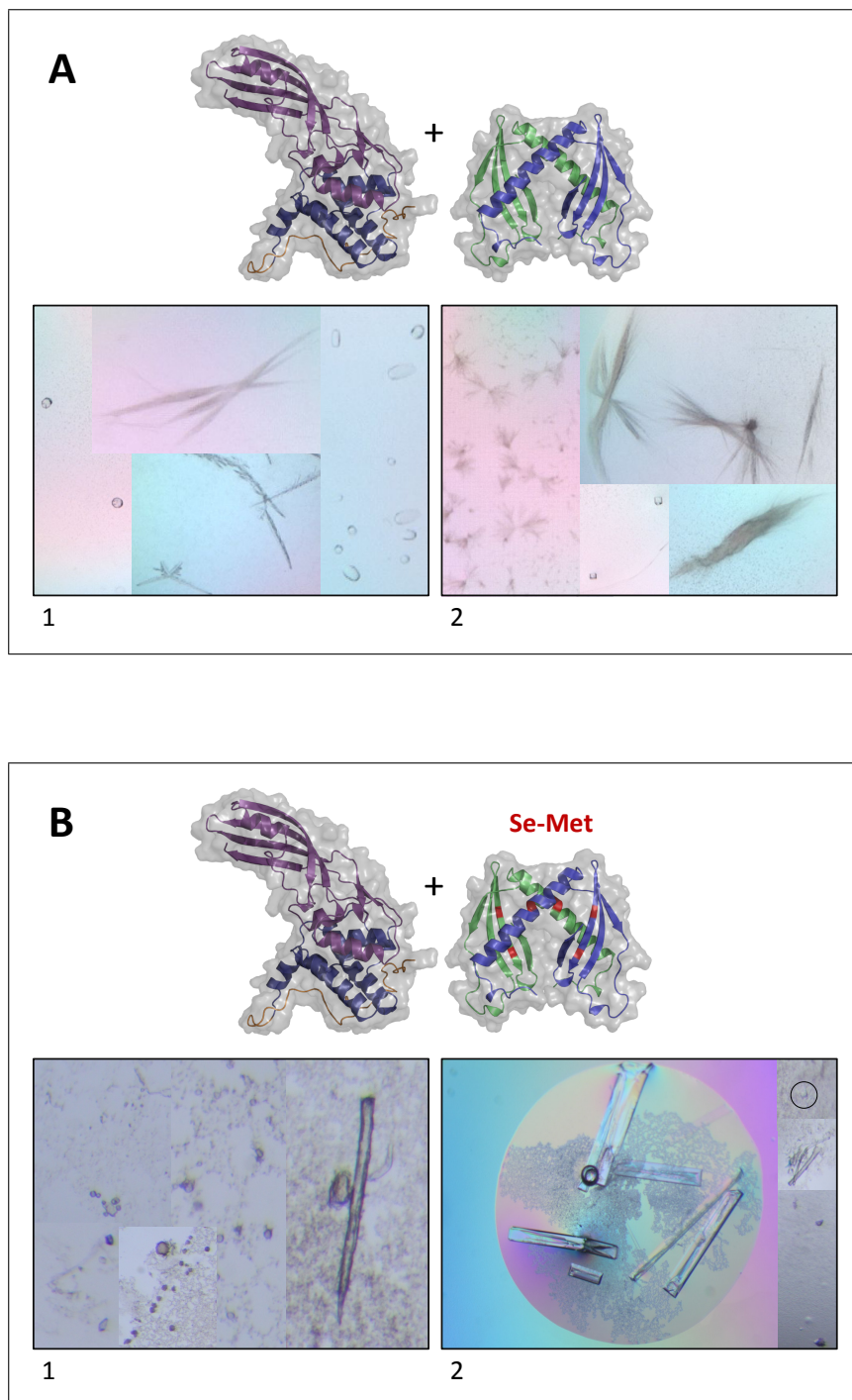


Abbildung 3.32: **Kristalle der Ko-Kristallisation von Colicin M (Cma) mit Immunitätsprotein (Cmi).**
A Colicin M und Colicin M-Immunitätsprotein im Sitting Drop.
B Colicin M und selenometioninmarkiertes Colicin M-Immunitätsprotein im Hanging Drop. Die Ansätze wurden jeweils reproduziert (1,2). Die Strukturen wurden mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt. Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136], Cmi (diese Arbeit)

3.3.2 Ko-Elution von Colicin M und seinem Immunitätsprotein

Neben der Ko-Kristallisation stellt die Ko-Elution beider Proteine eine weitere Möglichkeit der *in vitro* Bindungsuntersuchung von Colicin M und seinem Immunitätsprotein dar. Das mit His₆-Tag versehene Colicin M - Immunitätsprotein wird dabei an eine Nickel-Säule gebunden. Anschließend wird Colicin M ohne His₆-Tag auf die mit Immunitätsprotein beladene Säule gegeben. Deren Bindung soll dann mittels SDS-PAGE und Western-Blotting nachgewiesen werden.

Dazu wurden zunächst Rohextrakte beider Proteine hergestellt (siehe Abb. 3.33). Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) wurde mit dem Plasmid pHP751 *cma* ohne His₆-Tag transformiert und zunächst testweise im 50 ml-, dann im 10l-Maßstab wie in Abschnitt 3.1.1.1 auf Seite 50 überexprimiert. Nach dem Zellaufschluss mittels fünffacher French Press, anschließender Zentrifugation und Filtration konnte der Rohextrakt für die Bindungsstudien verwendet werden. Zur Expression von Colicin M - Immunitätsprotein wurde *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pSP130/42 (siehe Abschnitt 3.2.1 auf Seite 78) transformiert, analog Colicin M wie in Abschnitt 3.2.2 auf Seite 79 überexprimiert und nach French Press, Zentrifugation und Filtration auf die Nickelsäule für die Bindung des Colicin M -Immunitätsproteins aufgetragen.

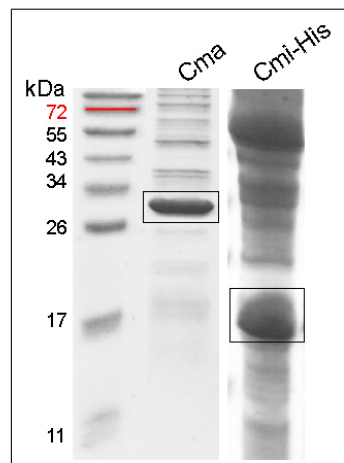


Abbildung 3.33: **SDS-PAGE der Rohextrakte von Colicin M (Cma) und Colicin M - Immunitätsprotein (Cmi).** Auftrag: 5 µl Marker, 5 µl Probe mit 5 µl SDS-Auftragspuffer und 5 µl H₂O_{dest.}

Zur generellen Überprüfung des Bindungsverhaltens wurden die Rohextrakte in Vortests zunächst in unbekannter Konzentration verwendet. Es zeigte sich eine Bindung beider Proteine (siehe Abb. 3.34). So enthalten die Eluierungsfractionen beide Proteine und auf dem FPLC-Schreiber sind während der Eluierung des Proteins zwei Peaks erkennbar. Der

3.3 Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein

eine Peak stellt dabei die Ko-Elution von Colicin M mit Colicin M - Immunitätsprotein, der andere Peak das restliche an die Säule gebundene Immunitätsprotein dar. Die schwache Bande von Colicin M kann auch durch unspezifische Bindung an die Säule hervorgerufen werden, weshalb noch keine eindeutige Aussage über die Bindung möglich ist.

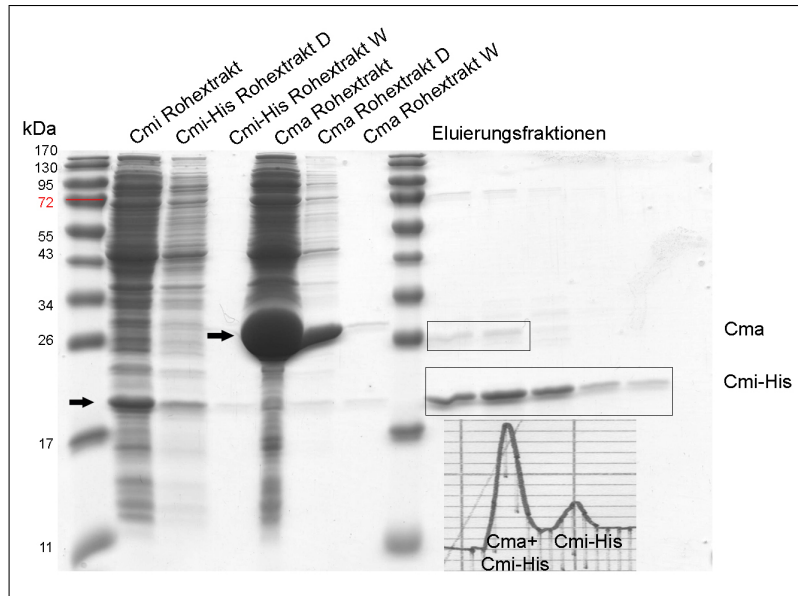


Abbildung 3.34: **SDS-PAGE der Ko-Elution von Colicin M (Cma) ohne His₆-Tag und Colicin M - Immunitätsprotein (Cmi) mit His₆-Tag.** Unter den Eluierungsfractionen ist der Absorptionspeak des FPLC-Schreibers dargestellt. D Durchlauf, W Waschfraction. Auftrag SDS-PAGE: 5 µl Marker, 5 µl Probe mit 5 µl SDS-Auftragungspuffer und 5 µl H₂O_{dest.}

Durch Variation der Mengenverhältnisse wurde die unspezifische Bindung von Colicin M ohne His₆-Tag untersucht (siehe Tab. 3.15).

Tabelle 3.15: **Ko-Elution von Cmi-His₆ & Cma mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cma**

Cmi-His ₆ [µl]	Cma [µl]	Bindung Cmi-His ₆ & Cma	unspezifische Bindung Cma an Nickel-NTA
100	100	+	+
100	10	+	+
100	2,5	+	+
100	1	+	-
100	0,1	+	-

Das Immunitätsprotein (Cmi) wurde an 500 µl Nickel-NTA gebunden und mit unterschiedlichen Mengen Colicin M (Cma) versetzt. Kontrolle ohne Cmi-His₆. Elution: 200 mM Imidazol. Nachweis: SDS-PAGE, Western Blot.

3 Ergebnisse

Dazu wurden 100 μl Immunitätsprotein via His₆-Tag an eine Nickel-NTA spin column (500 μl) gebunden und mit 100, 10, 2,5, 1, 0,5 und 0,1 μl Colicin M versetzt, bzw. nur Colicin M aufgetragen. Nach der Eluierung mit 200 μl Imidazol wurden die Proben mit SDS-PAGE und Western Blot ausgewertet. Ab dem Einsatz von 1 und 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Colicin M konnte keine unspezifische Bindung von Colicin M beobachtet werden (siehe Abb. 3.35) und Colicin M mit dem Colicin M - Immunitätsprotein koeluiert werden.

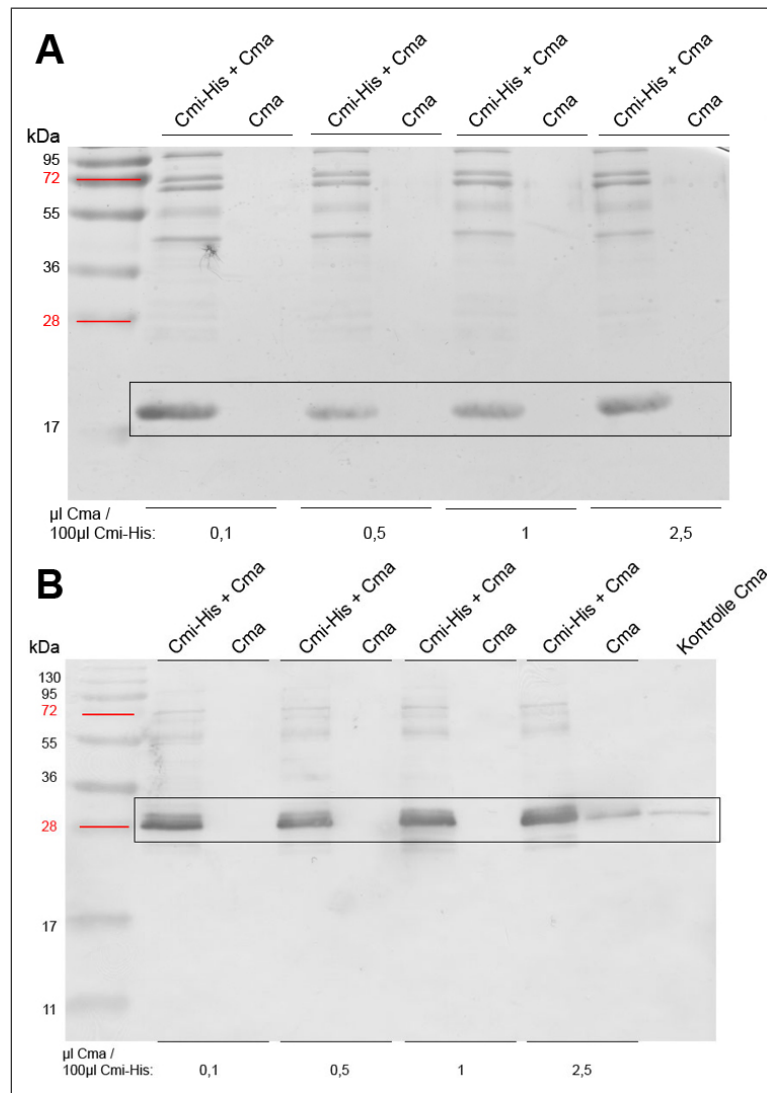


Abbildung 3.35: **Ko-Elution von Colicin M (Cma) ohne His₆-Tag und Colicin M - Immunitätsprotein (Cmi) mit His₆-Tag.** **A Nachweis von Cmi mittels SDS-PAGE** Die SDS-PAGE ist nicht sensitiv genug für den Nachweis von Cma, sodass nur Cmi-His₆ als Bande erkennbar ist. **B Nachweis von Cma mittels Western Blot** Die SDS-PAGE wurde anschließend geblottet und mit Cma-Antikörpern versetzt, sodass die Cma-Bande detektiert wurde. Gel und Blot weisen die Bindung beider Proteine mittels Ko-Elution nach, wobei durch geringe Konzentration an Colicin M eine unspezifische Bindung an die Nickelsäule ausgeschlossen werden konnte. Auftrag SDS-PAGE: 5 μl Marker, 5 μl Probe mit 5 μl SDS-Auftragspuffer und 5 μl H₂O_{dest.}

3.3 Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein

Nach dem Nachweis der Bindung beider Proteine via Ko-Elution sowie dem Ausschluss unspezifischer Bindungen wurde die Konzentration quantitativ bestimmt. Dazu wurde der eingesetzte Rohextrakt von Colicin M mit gereinigtem Protein bekannter Konzentration mittels Western Blots verglichen (siehe Abb. 3.36) und auf 0,01 mg/ml bestimmt.

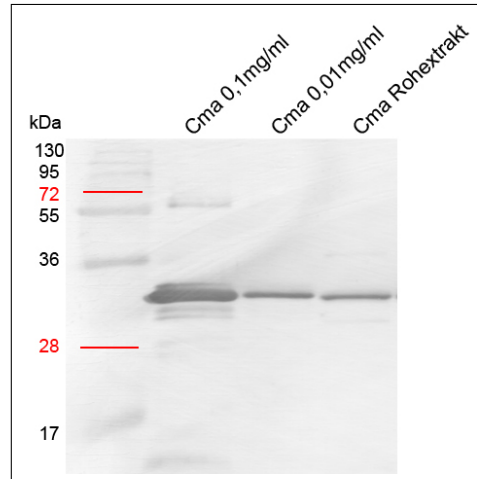


Abbildung 3.36: **Western Blot für die Quantifizierung des Rohextraktes von Colicin M anhand von gereinigtem Colicin bekannter Konzentration.**

Auftrag SDS-PAGE: 5 μ l Marker, 5 μ l Probe mit 5 μ l SDS-Auftragspuffer und 5 μ l H₂O_{dest.}

Zur Quantifizierung des Immunitätsproteins wurden die Versuche statt mit dem Rohextrakt mit gereinigtem Protein wiederholt. Dazu wurde pSP130/42 (siehe Abschnitt 3.2.1 auf Seite 78) frisch mit *E. coli* BL21(DE3) transformiert und, wie in Abschnitt 3.2.2 ab Seite 79 beschrieben, überexprimiert und gereinigt. Die Ko-Elutionsversuche wurden anschließend mit 0,01, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 und 1 mg/ml Colicin M - Immunitätsprotein mehrfach wiederholt (siehe Tab. 3.16). Dabei reichten 0,01 μ l des Immunitätsproteins nicht zur Bindung an eine 500 μ l Nickelsäule. Zur reproduzierten Bindung beider Moleküle mussten mindestens 0,1 mg/ml Immunitätsprotein für 0,1 μ g/ml Colicin M eingesetzt werden. Das Colicin M - Immunitätsprotein musste in 1000-fachem Überschuss an die Nickelsäule gebunden werden, damit 1/1000 des Colicin M ohne unspezifische Bindung binden konnte.

Tabelle 3.16: **Ko-Elution von gereinigtem Cmi-His₆ & Rohextrakt von Cma**

Cmi-His ₆ [mg/ml]	0,01	0,1	0,25	0,5	0,75	1
Bindung Cmi-His ₆ an Cma	-	+	+	+	+	+

Das Immunitätsprotein (Cmi) wurde in unterschiedlichen Konzentrationen an 500 μ l Nickel-NTA gebunden. Die Colicin M - Konzentration betrug konstant 0,1 μ g/ml. Nachweis mittels SDS-PAGE und Western Blot.

3.3.3 Auftropftests von Colicin M und seinem Immunitätsprotein

Die *in vitro* Bindung von Colicin M und seinem Immunitätsprotein sollte auch *in vivo* nachgewiesen werden. Die beiden Proteine wurden inkubiert, um Colicin M zu inaktivieren und anschließend auf Colicin M - sensitive Zellen auf Nähragarschalen aufgetropft.

Dazu wurde *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pSP130/1 bzw pSP130/7 (siehe Abschnitt 3.2.1 auf Seite 78) transformiert und überexprimiert, das Protein anschließend aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.2.2 ab Seite 79) und auf Aktivität überprüft (siehe Abschnitt 3.2.3 auf Seite 84). Colicin M mit His₆-Tag wurde wie in Abschnitt 3.1.1 ab Seite 50 frisch transformiert, überexprimiert und gereinigt. Nach Bestimmung der Konzentration mittels BCA-Test wurden beide Proteine bei Raumtemperatur im Verhältnis Cma:Cmi: 10:1, 5:1, 1:1 und 1:10 gemischt und 10 min inkubiert. Anschließend wurden jeweils 10 µl des Proteinmix auf Colicin M - sensitiven *E. coli* AB2847 aufgetropft. Die Zellen wurden von einer Platte in 200 µl LB-Medium resuspendiert und mit 3 ml Topagar versetzt. Nach Übernachtkultur bei 37 °C wurde auf durch Colicin M induzierte Hemmhöfe untersucht.

Werden Colicin M und sein Colicin M - Immunitätsprotein *in vitro* inkubiert, wird die Toxizität von Colicin M bei Auftropftests auf sensitiven Zellen *in vivo* reduziert (siehe Tab. 3.18). Colicin M in erhöhter Konzentration im Verhältnis 10:1, 5:1 und auch 1:1 konnte nicht vom Immunitätsprotein gehemmt werden, die sensitiven Zellen wurden vergleichbar zu reinem Colicin lysiert. Sobald das Immunitätsprotein aber im Überschuss vorlag, wurde die Toxizität von Colicin M auf ein gerade noch sichtbares Minimum reduziert. Die Zellen konnten durch den aufhebenden toxischen Effekt von Colicin M durch das Immunitätsprotein wachsen. Das Colicin M-Immunitätsprotein hatte folglich an Colicin M gebunden. Verglichen mit der Ko-Elution reicht bereits ein 10-facher Überschuss an Immunitätsprotein, um Colicin M weitgehend zu hemmen.

Tabelle 3.17: **Inkubation und Auftropftest von Colicin M (Cma) und seinem Immunitätsprotein (Cmi).** 3 ml Topagar + 50 µl AB2847 Vorkultur, Tropfen: 10 µl. Der Versuch wurde 3x reproduziert.

	Protein	[mg/ml]	Einsatz	[µl]			
	Cmi	0,2	10	10	10	10	0
	Cma	4	5	2,5	0,5	0,05	10
entspricht Verhältnis	Cma:Cmi		10:1	5:1	1:1	1:10	1:0
Hemmhof [mm]			12	11	10	5**	13

**sehr trüb

3.3.4 Herstellung von nicht an das Immunitätsprotein bindenden Colicin M - Mutanten

Nachdem durch die Ko-Kristallisation von Colicin M und seinem Immunitätsprotein keine Aussage über deren Bindungsstelle getroffen werden konnte (siehe Abschnitt 3.3.1 auf Seite 93), sollte diese über Mutagenese charakterisiert werden. Dabei wurden erstens rund 10.000 zufällige Klone mittels unspezifischer Mutagenese (siehe 3.3.4.1) hergestellt und auf Interaktion mit dem Colicin M - Immunitätsprotein gescreent. Zweitens wurden mittels bioinformatischer Interaktions-Modellierung von Kornelius Zeth wahrscheinliche Bindungsstellen identifiziert, die im Labor mit spezifischer Mutagenese (siehe 3.3.4.2 auf Seite 102) verifiziert werden sollten.

3.3.4.1 Randommutagenese und Screening

Mittels unspezifischer Mutagenese kann ein Gen unter dATP-Unterschuss mutiert werden. Von der Mutation ist aber auch der Vektor betroffen, sodass das gewünschte Gen herausgeschnitten und in einen nicht mutierten Vektor überführt werden muss. Es wurden 1000 Klone verwendet, die von Silke Patzer hergestellt worden waren. *E. coli* BL21 *fhuA* wurde mit der mutierten Population des Plasmids pMLD237 transformiert, die Klone abgestempelt, zur Freisetzung von Colicin M mit Chloroform bedampft, mit Topagar und mit einem Colicin M - Immunitätsprotein-produzierenden Stamm (*E. coli* AB2847+pPG773) überschichtet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Analog wurde der Versuch mit unmutiertem pMLD2847 zur Kontrolle durchgeführt.

Auf diese Weise wurden 10.000 Klone getestet. Keiner der Klone zeigte auf Topagar mit Immunitätsprotein einen durch Colicin M hervorgerufenen Hemmhof. Das Colicin M - Immunitätsprotein hob dessen Wirkung in allen Fällen auf, Colicin M und sein Immunitätsprotein haben stets aneinander gebunden. In den Kontrollen ohne Immunitätsprotein war Colicin M stets toxisch. Durch zufällige Mutationen konnte diese Bindung nicht verhindert werden und somit auch keine Aussage über definitive Bindungspositionen getroffen werden. Colicin M - produzierende Zellen, die aufgrund einer Mutation nicht mehr vom Immunitätsprotein inaktiviert wurden, sollten den Colicin M - Immunitätsprotein - Stamm lysieren. Solche Klone wurden nicht beobachtet. Zur Überprüfung der Mutagenese-Effizienz wurden 10 *cmA* Gene sequenziert. 3 von 10 Klonen trugen eine *cmA* Mutation, die anderen enthielten stumme Mutationen oder den leeren Vektor. Unter den 10.000 Klonen wurden so rund 3400 Mutanten untersucht.

3.3.4.2 Spezifische Mutagenese

Das makromolekulare Docking (Rosetta-Dock, siehe Abb. 3.37) ist eine rechnerische Modellierung der Quartärstruktur von Komplexen mit mehreren Interaktionen. Es wurde von Kornelius Zeth in 10 Modellen durchgeführt. In allen Modellen bindet das Colicin M-Immunitätsprotein an eine überlappende Stelle von Colicin M. Laut der Vorhersagen bevorzugen die Reste Arginin in Position 115, Lysin 120 und Glutamat 143 die Bindung von Colicin M an das Immunitätsprotein (siehe Abb. 3.38 auf Seite 103). Diese Hypothese sollte experimentell mit spezifischer Mutagenese von Colicin M geprüft werden.

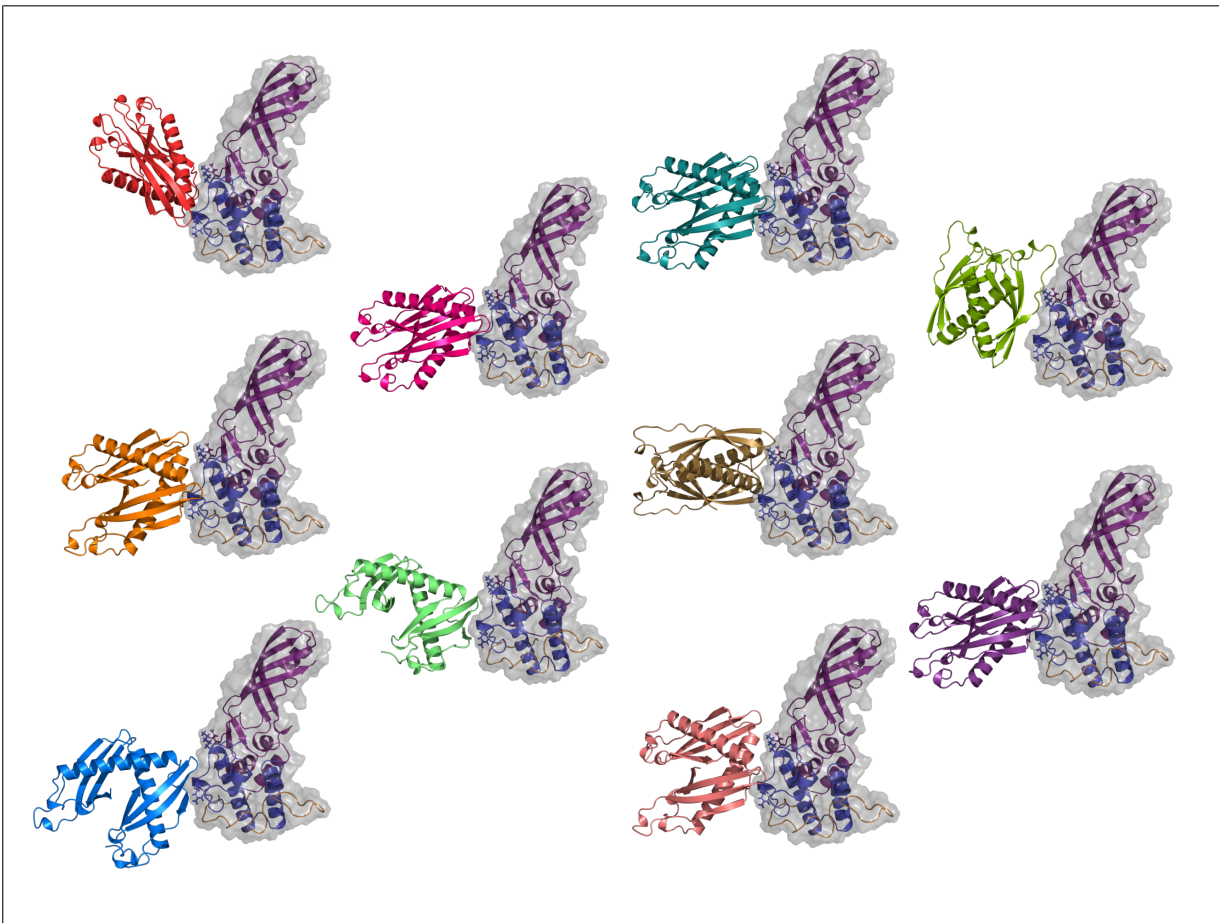


Abbildung 3.37: **Bindungsvorhersagen des Rosetta-Dock für Colicin M (Cma) mit Immunitätsprotein (Cmi) (Kornelius Zeth).** Die Abb. wurde mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt. Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136], Cmi (diese Arbeit, unveröffentlicht)

Dazu wurden diese Reste jeweils gegen Alanin ersetzt, indem mit jeweiligen Primern PCR-Mutagenese, sich anschließender Gelkontrolle und *DpnI*-Verdau durchgeführt wurde. *E. coli* DH5 α wurde mit den Plasmiden transformiert und aus deren Klonen DNA

3.3 Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein

extrahiert. Nach Kontrolle mittels Sequenzierung wurde *E. coli* BL21(DE3) wiederum transformiert und aus den Klonen Colicin M im 15 ml-Maßstab gewonnen. Induziert wurde mit 0,1 mM IPTG bei einer OD_{578nm} von 0,5 für 3 Stunden. Der Rohextrakt wurde mit Ultraschallaufschluss gewonnen und abschließend im Auftropftest auf Interaktion mit dem Immunitätsprotein geprüft. Für die sensitiven Zellen im Auftropftest wurde *E. coli* AB2847 mit dem das Immunitätsprotein enthaltene Plasmid pPG773 transformiert. Als Kontrolle diente *E. coli* AB2847, der kein Immunitätsprotein bildet. Die Hemmhöfe wurden nach Übernachtinkubation bei 37 °C ausgewertet. Neben den drei durch die rechnerische Interaktions-Modellierung begründeten Mutanten wurden auch bereits von Stephanie Helbig hergestellte Colicin M - Punktmutanten auf Interaktion getestet.

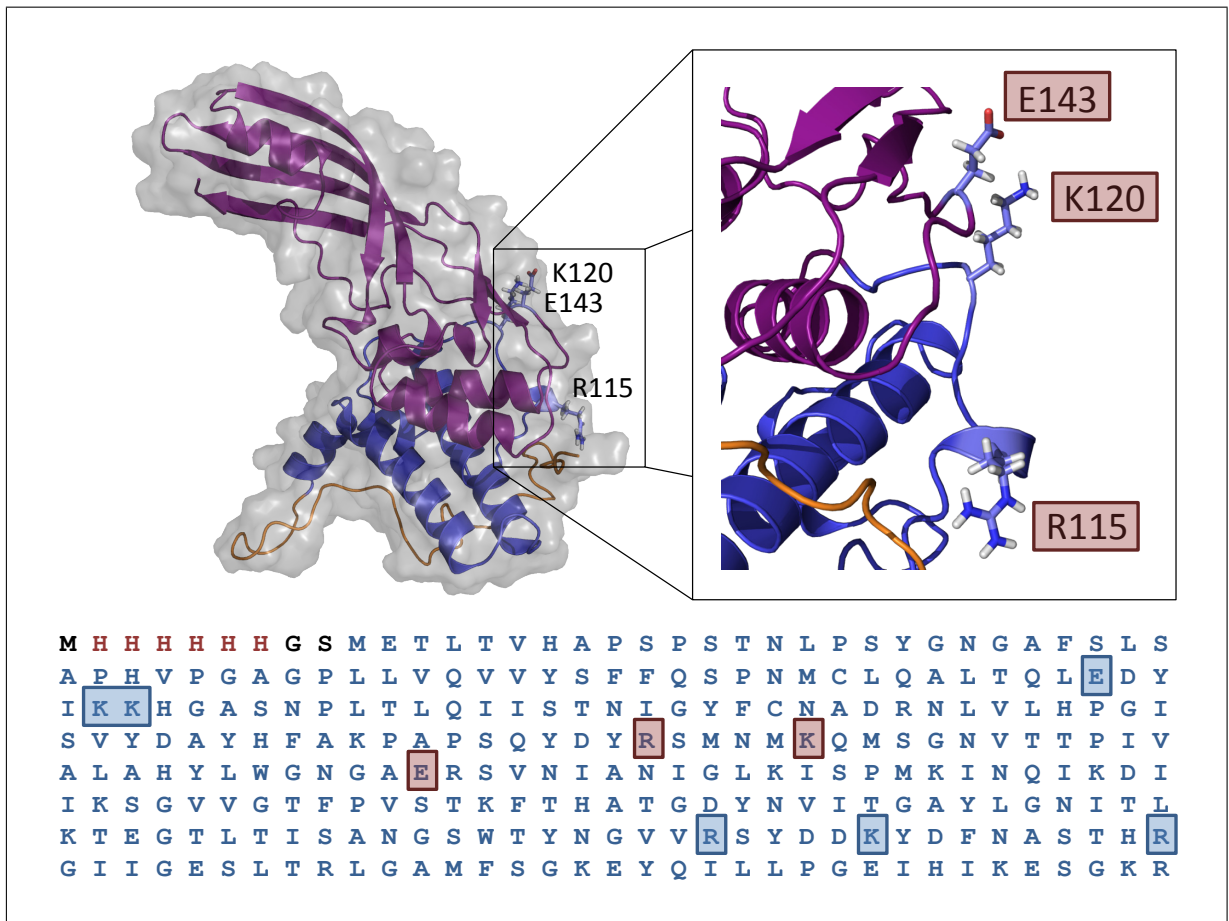


Abbildung 3.38: **Colicin M - Mutanten.** Ausschnitt der Sequenz von pMLD237, codierend für Colicin M (Cma). Der His₆-Tag ist in roten, *cma* in blauen Lettern dargestellt. Die drei durch die rechnerische Interaktions-Modellierung begründeten Mutanten sind in der Sequenz mit roten Kästchen markiert und in der Struktur vergrößert dargestellt. Die zufälligen Mutanten sind mit blauen Kästchen unterlegt. Die Abb. wurde mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt. Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136]

3 Ergebnisse

Tabelle 3.18: **Auftropftest der mutierten Colicin M - Proteine.** Interaktion mit dem Immunitätsprotein. Die Werte sind gemittelt und ergeben sich aus 2-facher Reproduktion, wobei jede Mutante doppelt vorlag und parallel getestet wurde. 3 ml Topagar + 50 µl AB2847 Vorkultur, Tropfen: 10 µl

Plasmid	Mutation WT-AA an Position zu AA	Hemmhof [mm] auf <i>E. coli</i> AB2847+pPG773						
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
pCR1	R115A	0	0	0	0	0	0	0
pCR3	K120A	0	0	0	0	0	0	0
pCR5	E143A	0	0	0	0	0	0	0
pCR6	R115A E143A	0	0	0	0	0	0	0
pCR8	K120 E143A	0	0	0	0	0	0	0
pCR16	R115A K120A	0	0	0	0	0	0	0
pCR22	R115A K120A E143A	0	0	0	0	0	0	0
pSH53	E59A	*	0	0	0	0	0	0
pSH61	K64A	0	0	0	0	0	0	0
pSH63	K63A K64A	0	0	0	0	0	0	0
pSH73	K227A	0	0	0	0	0	0	0
pSH89	R236A	0	0	0	0	0	0	0
pSH121	R222A	*	0	0	0	0	0	0
pCR12	E59A R222A	0	0	0	0	0	0	0
pMLD237	-	0	0	0	0	0	0	0

		Hemmhof [mm] auf <i>E. coli</i> AB2847						
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
pCR1	R115A	12	10	8	*	0	0	0
pCR3	K120A	14	12	9	*	0	0	0
pCR5	E143A	14	12	9	*	0	0	0
pCR6	R115A E143A	13	11	9	0	0	0	0
pCR8	K120 E143A	15	13	10	*	0	0	0
pCR16	R115A K120A	14	12	8	0	0	0	0
pCR22	R115A K120A E143A	13	11	9	*	0	0	0
pSH53	E59A	15	13	10	9	7*	0	0
pSH61	K64A	20	17	15	12	10	7*	0
pSH63	K63A K64A	18	16	14	11	8	*	0
pSH73	K227A	16	14	12	10	*	0	0
pSH89	R236A	15	14	12	9	*	0	0
pSH121	R222A	17	13	12	9	8*	0	0
pCR12	E59A R222A	15	13	11	9	*	0	0
pMLD237	-	16	14	12	9	7	7*	7**

* trüb, ** sehr trüb, pCR Plasmid dieser Arbeit, pSH Plasmid von Stephanie Helbig, WT Wildtyp, AA Aminosäure

3.3 Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein

Die vom Rosetta-Docking Programm vorhergesagten Bindungsreste R115, K120 und E143 von Colicin M haben keinen Einfluss auf die Bindung beider Moleküle. Sämtliche getestete Mutanten, ob aus dem Rosetta-Docking hergeleitet oder zufällig generiert, wurden durch das Immunitätsprotein gehemmt (siehe Tab. 3.18 auf Seite 104). Es waren keine Hemmhöfe erkennbar, sodass die toxische Aktivität von Colicin M durch das Immunitätsprotein aufgehoben wurde. Lediglich die mutierten Plasmide pSH53 und pSH121 zeigten unverdünnt einen trüben Hemmhof. Demgegenüber zeigten die Kontrollen ohne immunitätsaktive Zellen die typische durch Colicin M hervorgerufene Zelltoxizität in Form klarer Hemmhöfe. Einige Colicin M-Mutanten waren weniger aktiv. Die Bindungsstelle beider Moleküle konnte weder durch Ko-Kristallisation noch durch unspezifische oder spezifische Mutagenese nach Zufallsprinzip oder bioinformatischer Vorhersagen nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

Colicin M bindet den Rezeptor FhuA [13][39] und wird mithilfe der vom Ton-System bereitgestellten Energie durch die äußere Membran transportiert [102][103][40][14]. Es hat damit sein Angriffsziel im Periplasma erreicht und inhibiert dort die Biosynthese von Murin [58]. Als Phosphatase verhindert Colicin M die Regenerierung des Lipidüberträgers Bactoprenol [47] und lysiert die Zellen [15].

Bereits in den achtziger Jahren wurde der Import von Schaller *et al.* [116] untersucht. Sie haben festgestellt, dass nur frei vorliegendes Colicin M gegenüber der Protease Trypsin resistent ist und gebundenes gespalten wird [116][110]. Colicin M besitzt somit zwei unterschiedliche Konformationen. Ob Colicin M aber durch spezifische Bindung an FhuA trypsinempfindlich wird oder ob eine unspezifische Interaktion mit den Zellen genügt, blieb fraglich.

Colicin M ändert seine Konformation nur bei der spezifischen Bindung an seinen Rezeptor FhuA. Durch Reproduktion und Erweiterung der Trypsinversuche [116] konnte diese Fragestellung beantwortet werden. Die Untersuchung von Colicin M aus einem FhuA-Wildtyp und einer FhuA-Mutante weisen unspezifisch gebundenes Colicin M als trypsinunempfindlich nach. Nur rezeptorgebundenes Colicin M wird von Trypsin gespalten. In den Vortests konnte mithilfe der Hemmung von Trypsin die einzusetzende Konzentration Colicin M für Wildtypzellen ermittelt werden. Durch diese an die Rezeptoren angepasste Konzentration, die Trypsininhibitorkontrolle und mehrfaches Waschen der Zellen vor deren Aufschluss mit Dodecylmaltosid kann ein durch überschüssiges Colicin M verfälschtes Ergebnis ausgeschlossen werden. Das aus den Zellen isolierte Colicin M des Wildtyps mit Rezeptor weist ohne Trypsinbehandlung stets normale Aktivität auf. Bei Behandlung mit der Protease verliert Colicin M seine Wirksamkeit. Isoliertes Colicin M der Mutante ohne Rezeptor dagegen ist auch nach Trypsin-Behandlung weiterhin aktiv. Trypsinempfindliche Bereiche werden durch die Bindung an FhuA exponiert (siehe Abb. 3.7 auf Seite 54). Wenn Colicin M durch FhuA die äußere Membran passiert, ändert es seine Konformation und entfaltet vermutlich. Das Ergebnis zeigt darüber hinaus, dass Colicin M auch ohne Rezeptor an Zellen bindet. Siehe Abb. 4.1 auf Seite 109.

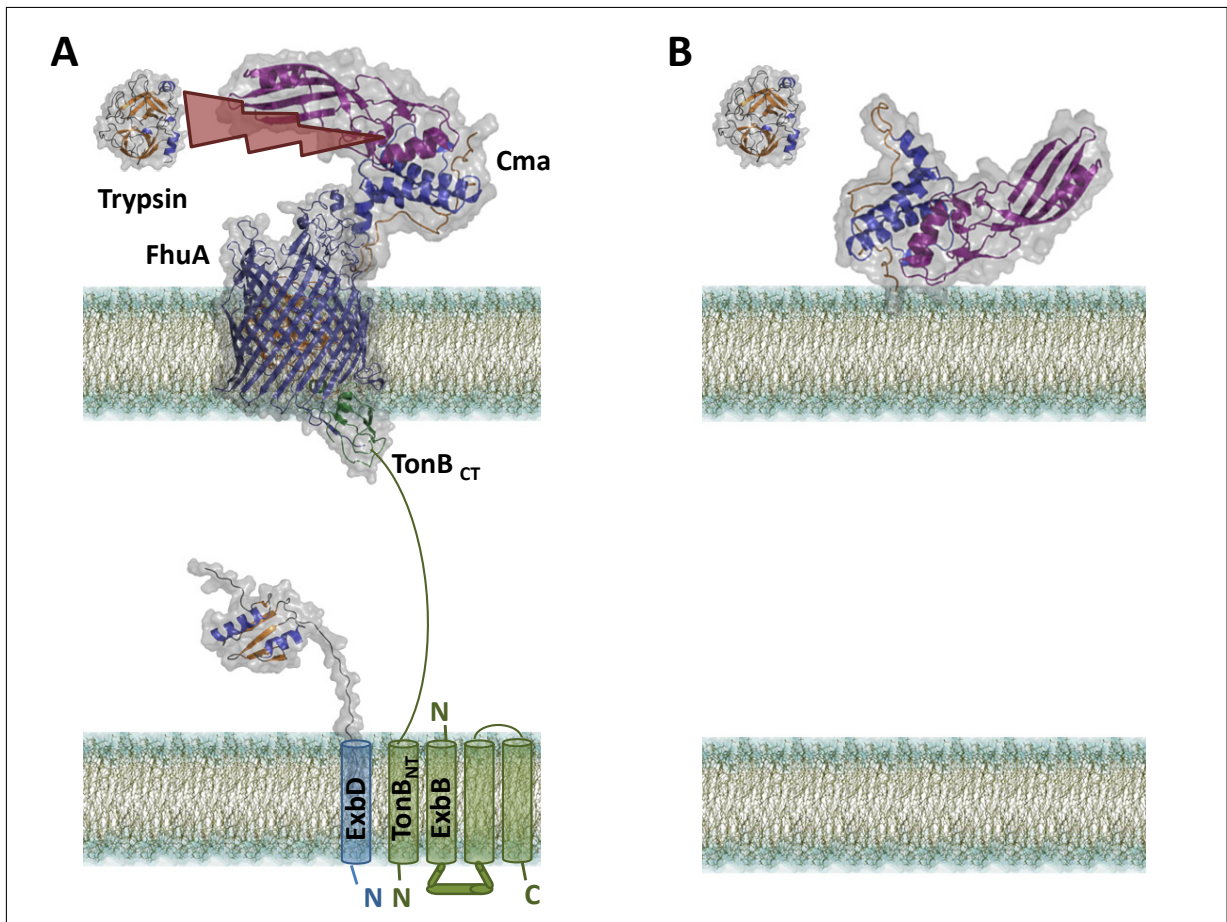


Abbildung 4.1: **Konformationsänderung von Colicin M (Cma) bei der Bindung an FhuA.**

Eine unspezifische Interaktion mit den Zellen genügt nicht für die Konformationsänderung von Colicin M (**B**). Colicin M muss dafür an FhuA gebunden sein (**A**). Die Strukturen wurden mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt (maßstabsgetreu). FhuA-TonB (PDB 2GRX [99]), ExbD (PDB 2PFU [44]), Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136], Trypsin (PDB 1DPO) [73]

Die Konformationsänderung von Colicin M bei der spezifischen Bindung an FhuA ist möglicherweise auch von TonB und FkpA abhängig. Die Konformationsänderung von Colicin M kann durch Bindung an FhuA bereits an der Zelloberfläche hervorgerufen werden. Es ist aber auch möglich, dass Colicin M in die Zellen eintreten muss, was eine Abhängigkeit von TonB impliziert. Der Rezeptor FhuA hat zwei verschiedene Konformationen, eine TonB-abhängige und eine TonB-unabhängige [57]. Die Zweikonformationshypothese ergibt sich aus dem Befund, dass die Phagen T1 und ϕ 80 nur an energetisierte TonB-Wildtypzellen binden. Für Colicin M ist nicht geklärt, ob es eine TonB-abhängige oder -unabhängige FhuA Konformation verlangt. Deshalb wurden die etablierten Versuche der FhuA-Mutante ebenso auf eine TonB-Mutante angewendet. Die Ergebnisse der TonB-Mutante sind nicht so eindeutig wie der Unterschied zwischen FhuA-

4 Diskussion

Mutante und -Wildtyp. Die Aktivität des isolierten Colicin M bleibt auf sensitiven Zellen sowohl mit als auch ohne Trypsin weitgehend aber nicht vollständig erhalten. Die Trypsinempfindlichkeit von Colicin M könnte folglich auch von TonB abhängen (siehe Abb. 4.2 A). Die Bedeutung des Chaperons FkpA für Colicin M liegt in der Rückfaltung der importbedingten Entfaltung des Toxins [69]. Ob FkpA auch die Trypsinempfindlichkeit von Colicin M beeinflusst, wurde anhand einer FkpA-Mutante untersucht. Die Ergebnisse entsprechen denen der TonB-Mutante. Die Aktivität des isolierten Colicin M bleibt auf sensitiven Zellen sowohl mit als auch ohne Trypsin weitgehend erhalten (siehe Abb. 4.2 B). Die Aktivität ist aber wieder geringer und nur in trüben statt üblichen klaren Hemmhöfen im Auftropftest detektierbar. Für eine eindeutige Aussage, ob die Colicin M - Trypsinempfindlichkeit von TonB und FkpA abhängt, sind weitere Versuche notwendig.

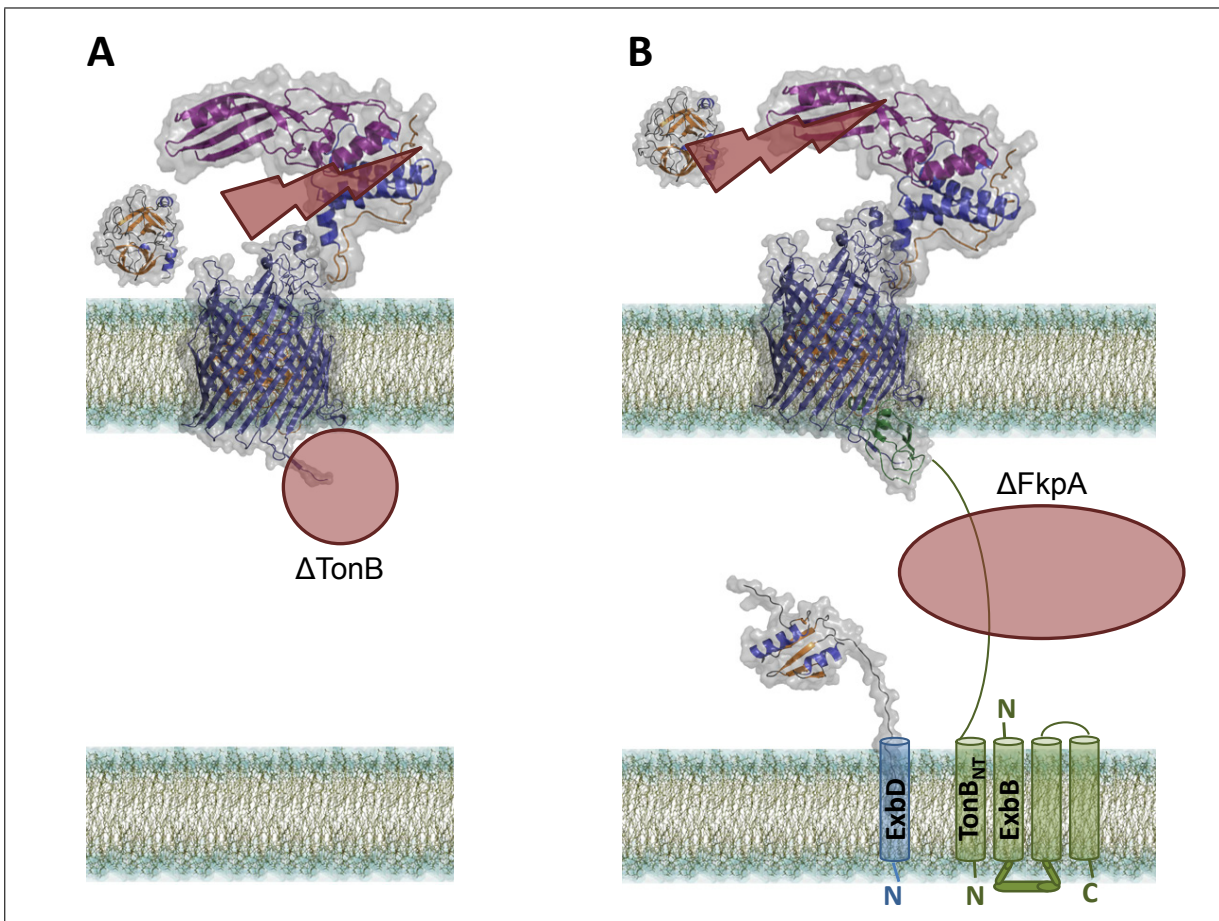


Abbildung 4.2: **Konformationsänderung von Colicin M (Cma) bei der Bindung an FhuA.** Die Trypsinempfindlichkeit von Colicin M ist möglicherweise auch von TonB (A) und FkpA (B) abhängig. Die Strukturen wurden mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt (maßstabsgetreu). FhuA-TonB (PDB 2GRX [99]), ExbD (PDB 2PFU [44]), Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136], Trypsin (PDB 1DPO) [73]

4.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

Colicin M wird aktiv aus lysierten Zellen gewonnen. Nachdem Colicin M in die sensitive Zelle importiert wurde, besitzt es eine hohe Toxizität. Es ist in Auftropftests auf sensitiven Zellen in den Verdünnungsbereichen bis zu 10^{-5} aktiv. Kultivierte Zellen werden nach Zugabe von Colicin M binnen kürzester Zeit lysiert und geben das Colicin M wieder frei. Ob dieses noch aktiv ist, um erneut Zellen lysieren zu können und wo es in den Zellen lokalisiert ist, konnte in dieser Arbeit beantwortet werden. Lysebedingtes freiwerdendes Colicin M ist z.T. membrangebunden, weshalb es im Auftropftest auf sensitiven Zellen nur unverdünnt und schwach aktiv ist (siehe Abb. 4.3). Wahrscheinlich wird so wenig Colicin M von sensitiven Zellen aufgenommen, dass seine erneute Freisetzung bei Lyse der Zellen zu geringer Toxizität führt.

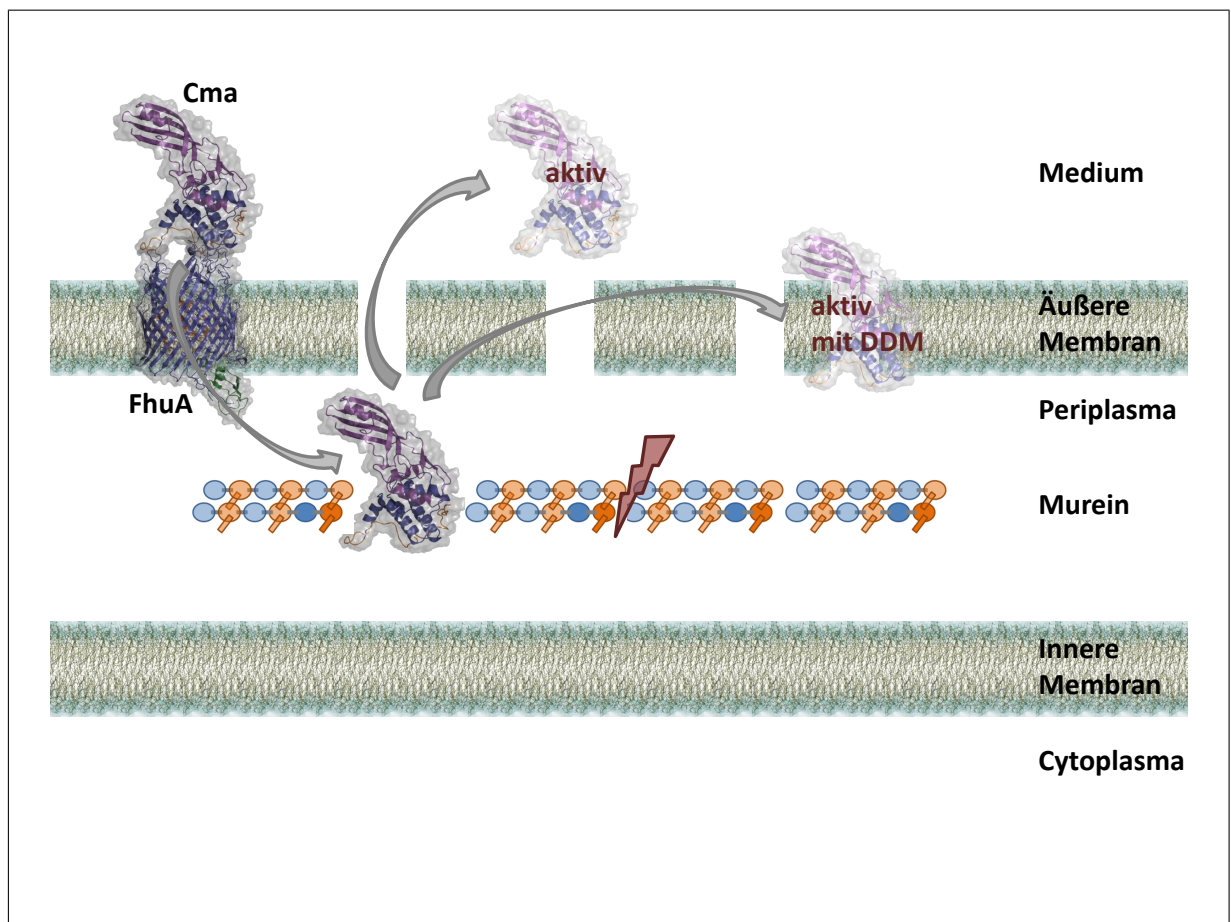


Abbildung 4.3: **Freisetzung von aktivem Colicin M aus lysierten Zellen.** Die Strukturen wurden mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt. FhuA-TonB-Komplex (PDB 2GRX) [99], Cma (PDB 2XMX, 3DA3)[136]

4 Diskussion

Importiertes Colicin M aus dem Periplasma kann nur in zu geringen Konzentrationen gewonnen werden, um Strukturuntersuchungen durchführen zu können. Wenn Colicin M aus dem Periplasma und der äußeren Membran isolierbar ist und im Periplasma von FkpA aktiviert wird, ist fraglich, ob resistente FkpA-Mutanten ungefaltetes, inaktives und extrahierbares Colicin M enthalten. Ohne FkpA kann in die Zelle importiertes Colicin M nicht zurückgefaltet werden und müsste inaktiv vorliegen. Die Extraktionsversuche von Colicin M aus Zellen waren vor allem darauf ausgelegt, Colicin M aus dem Periplasma von FkpA⁺- und FkpA⁻-Zellen zu isolieren und den strukturellen Unterschied zwischen aktivem und inaktivem Colicin M zu bestimmen.

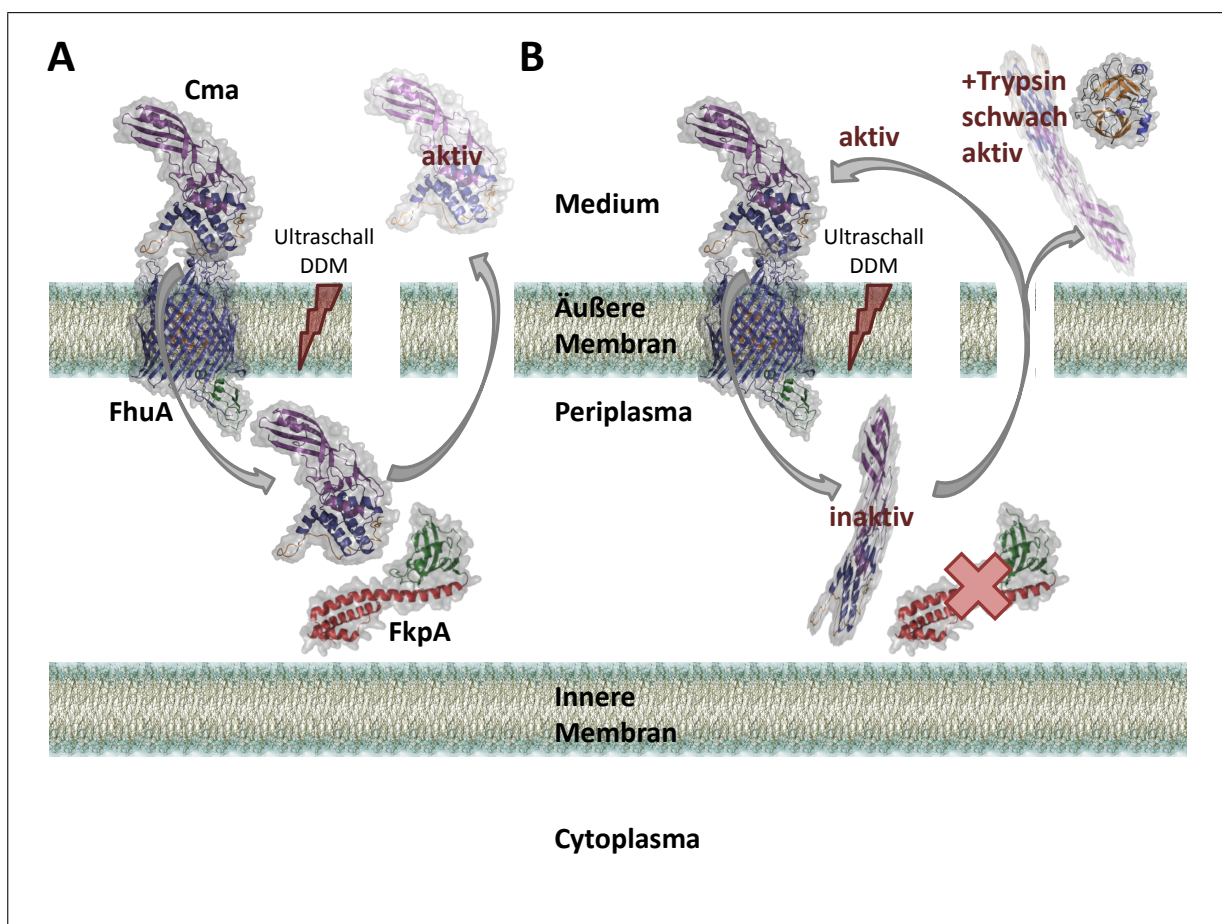


Abbildung 4.4: **Extraktion von Colicin M aus dem Periplasma.**

A. Importiertes Colicin M wird von FkpA in die aktive Form überführt. Durch Ultraschall und 0,2% Dodecylmaltosid (DDM) lysierte Zellen geben aktives Colicin M frei.

B Die *fkpA*- Mutante kann entfaltetes Colicin M nicht ohne Chaperonaktivität aktivieren. Die durch Ultraschall und 0,2% Dodecylmaltosid (DDM) lysierten Zellen enthalten noch rezeptorgebundenes, aktives Colicin M. Wird dieses durch Trypsin verhindert, ist im Periplasma schwach aktives Colicin M zu finden.

Die Strukturen wurden mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt. Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136], FhuA-TonB-Komplex (PDB 2GRX) [99], FkpA (PDB 1Q6U) [115], Trypsin (PDB 1DPO) [33]

4.1 Import- und Wirkungsmechanismus von Colicin M

Die Ergebnisse ergeben, dass aus dem Periplasma isoliertes Colicin M eines FkpA-Wildtyps aktiv ist. Colicin M aus dem Periplasma einer FkpA-Mutante dagegen ist schwach aktiv (siehe Abb. 4.4). Diese Ergebnisse müssten aber mit ausreichend aus Zellen extrahiertem Colicin M geprüft werden, da zu wenig importiertes Colicin M extrahiert werden konnte.

Der Import von Colicin M dauert bei 37 °C mindestens 5 und höchstens 10 Minuten. Bis zu 3 Minuten ist die Translokation reversibel. Ab 5 Minuten ist dieser Vorgang teilweise reversibel, ab 8 Minuten irreversibel.

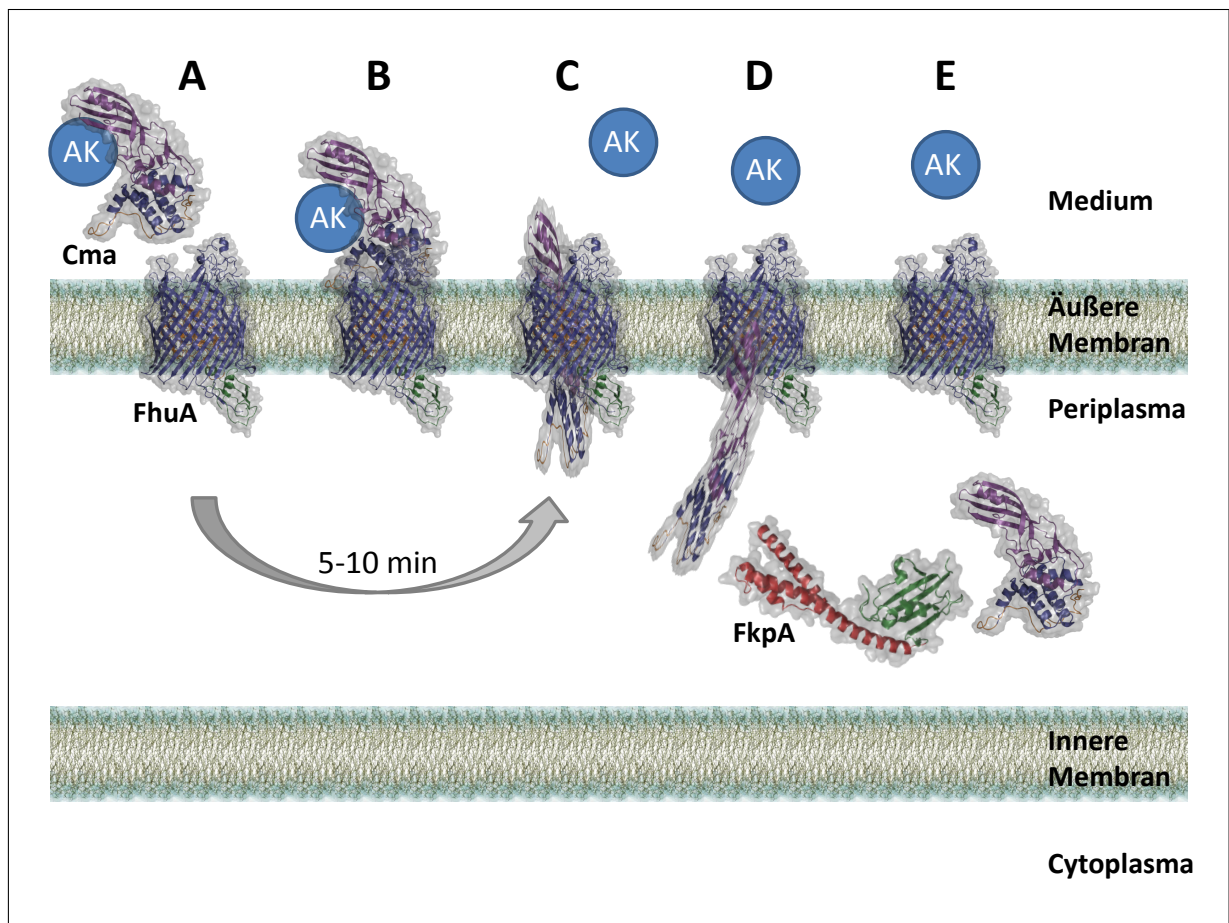


Abbildung 4.5: **Translokation von Colicin M.**

Im Medium vorliegendes (A) und am Rezeptor gebundenes frei zugängliches (B) Colicin M wird vom AK gebunden. Der Translokationsmechanismus ist nach ca. 10 min abgeschlossen, sodass der AK Colicin M nicht mehr binden kann (C-E). In die Zelle eintretendes, entfaltetes inaktives Colicin M (C,D) wird von FkpA zurückgefaltet (E) und liegt aktiv im Periplasma vor.

AK Antikörper. Die Strukturen wurden mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt. Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136], FhuA-TonB-Komplex (PDB 2GRX) [99], FkpA (PDB 1Q6U) [115]

4 Diskussion

Der zeitliche Ablauf des Imports von Colicin M war bereits bei Schaller *et al.* Gegenstand von Untersuchungen. Sie konnten mit Colicin M behandelte Zellen innerhalb von 4-5 Minuten mit Trypsin oder SDS retten [116]. Zu einem späteren Zeitpunkt war Colicin M für inaktivierende Reagenzien nicht mehr zugänglich, dadurch blieb bei diesen Untersuchungen offen, wie weit Trypsin und SDS in die äußere Membran eindringen. Deshalb wurde die Hemmung von Colicin M durch spezifische Antikörper getestet, die nur an der Zelloberfläche gebundenes Colicin M erfassen. Es konnte beobachtet werden, dass mit Zugabe der Antikörper die Wirkung von Colicin M zeitabhängig gehemmt wird. Wenn die Zellkultur innerhalb der ersten 3 Minuten nach Zugabe von Colicin M mit Antikörpern versetzt wird, wachsen die Zellen normal. Nach 5 Minuten wird das Zellwachstum gehemmt, was sich nach 8 Minuten verstärkt. Je eher die Zellen mit den Antikörpern versetzt wurden, desto geringer ist die Toxizität. Die Antikörper hemmen die Translokation von Colicin M. Hat Colicin M die äußere Membran nach etwa 5 Minuten teilweise und nach 8 Minuten fast vollständig passiert, kann es nicht mehr durch die Antikörper inhibiert werden (siehe Abb. 4.5 auf Seite 113). Dieser Befund ist auch unter dem Gesichtspunkt interessant, dass allgemein angenommen wird, dass Teile der Colicine nach deren Aufnahme in Zellen rezeptorgebunden bleiben [20]. Entweder trifft diese Annahme für Colicin M nicht zu oder das polyklonale Antiserum enthält keine Antikörper gegen den im Rezeptor verbleibenden Bereich.

Die Translokation von Colicin M ist bei einer Erhöhung der Temperatur reversibel. Schaller *et al.* [116] isolierten eine Mutante, die bei 30 °C sensitiv und bei 42 °C resistent gegen Colicin M ist. Die Mutation wurde genetisch kartiert, konnte jedoch keiner Funktion zugeordnet werden. Hullmann *et al.* wiesen dann nach, dass die Mutation im Strukturgen der periplasmatischen Prolyl-*cis-trans*-Isomerase / dem Chaperon FkpA liegt [69]. Ist FkpA bei 30 °C aktiv, aktiviert es ins Periplasma aufgenommenes Colicin M. Ist FkpA bei 42 °C inaktiv, unterbleibt die Aktivierung (Rückfaltung). Bei 30 °C importiertes, trypsin- und SDS-resistentes Colicin M wurde bei 42 °C wieder trypsin- und SDS-sensitiv. Um auszuschließen, dass bei 42 °C die äußere Membran für Trypsin und SDS permeabel wurden und aus diesem Grund Colicin M inaktiviert wurde, wurden die Versuche mit Anti-Cma-Antiserum wiederholt. Die Translokationsstudien von Colicin M mit der temperatursensitiven FkpA-Mutante konnten in dieser Arbeit mit Antikörpern verifiziert werden. In die Zellen importiertes Colicin M wird bei Erhöhung der Temperatur an die Zelloberfläche transportiert, den Antikörpern im Medium zugänglich gemacht und inaktiviert (siehe Abb. 4.6 auf Seite 115).

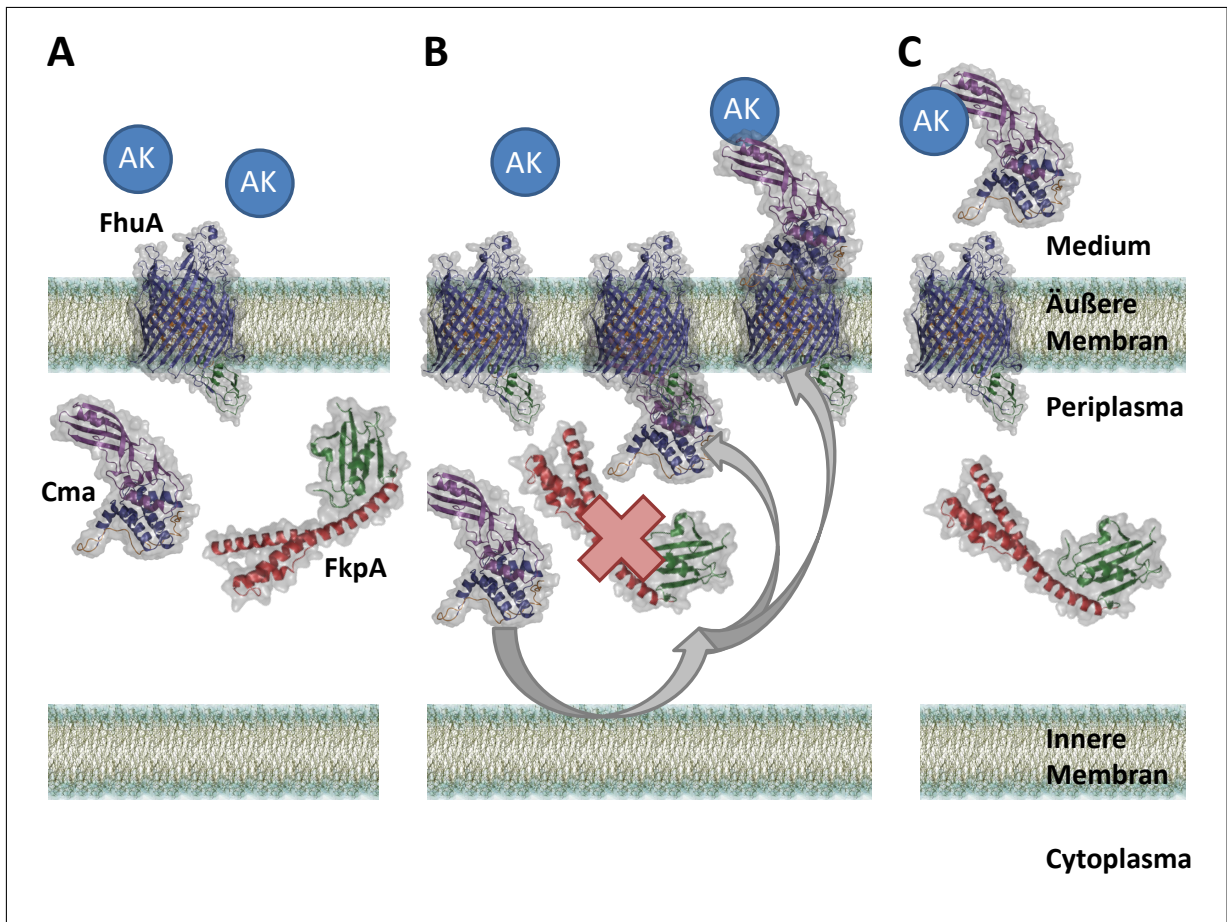


Abbildung 4.6: **Reversible Translokation von Colicin M.** Bei 30 °C (**A**) und aktivem FkpA bleibt Colicin M in den Zellen aktiv. Bei einer kurzen Erhöhung der Temperatur auf 42 °C (**B**) und inaktivem FkpA wird Colicin an die Zelloberfläche transportiert und vom Antiserum inaktiviert. Bei erneuten 30 °C und aktivem FkpA liegt Colicin M vom Antiserum inaktiviert rezeptorgebunden oder im Medium vor (**C**). AK Antikörper. Die Strukturen wurden mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt (maßstabsgetreu). Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136], FkpA (PDB 1Q6U) [115], FhuA-TonB-Komplex (PDB 2GRX) [99]

Colicin M verbleibt bei der reversiblen Translokation durch Erhöhung der Temperatur zellgebunden und wird nicht ins Medium abgegeben. Bei einer Erhöhung der Temperatur von 30 auf 42 °C wird Colicin M an die Zelloberfläche transportiert und von Trypsin, SDS und Antikörpern inaktiviert. Dabei ist fraglich, ob Colicin M an der Zelle gebunden bleibt oder nach außen abgegeben wird, was in Auftropftests, Western Blots und Wachstumsverläufen untersucht wurde. Colicin M verbleibt demnach bei einem Temperaturshift FkpA-temperatursensitiver Zellen von 30 auf 42 °C an den Zellen (siehe Abb. 4.7). Es war kein Colicin M im Überstand nachweisbar. Der Überstand von bei 42 °C an die Oberfläche transportiertem Colicin M wies in Auftropftests auf sensitiven Zellen keine Aktivität auf, nachdem unspezifisch gebundenes oder im Medium enthaltenes

4 Diskussion

Colicin M abgewaschen wurde. Die Zellen geben demzufolge zu wenig, kein oder inaktives Colicin M ins Medium ab. Die Zellen selbst dagegen enthalten Colicin M, das mittels Ultraschall und LDAO zugänglich gemacht und mit Western Blot detektiert wurde. Zellen mit an die äußere Membran gebundenem Colicin M (42 °C) enthalten das Toxin genauso wie Zellen mit periplasmatischem Colicin M (30 °C). Mithilfe von Wachstumsverläufen von Zellen, die nach mehrfachem Waschen in neues Medium überführt wurden, konnte die Frage zum Verbleib von bei 42 °C an die Oberfläche transportiertem Colicin M geklärt werden. Colicin M verbleibt nach dem Temperaturshift in den Zellen, die durch dessen Wirkung lysieren. Nach Überführung der Zellen in neues Medium sterben die bei 42 °C behandelten Zellen ab, was auf in der Zelle verbleibendes Colicin M zurückzuführen ist.

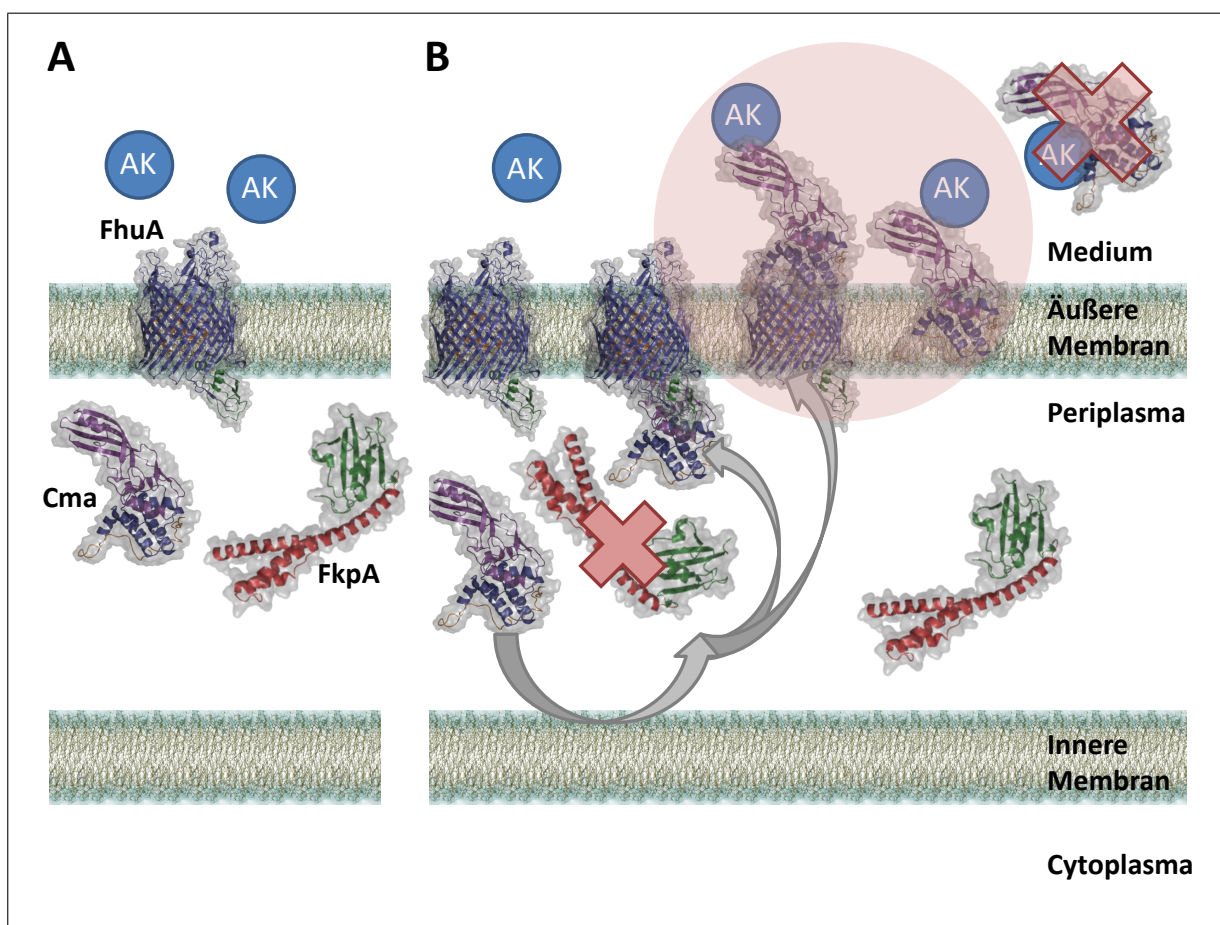


Abbildung 4.7: **Reverse Translokation von Colicin M.** Bei 30 °C (A) und aktivem FkpA bleibt Colicin M (Cma) in den Zellen aktiv. Bei einer kurzen Erhöhung der Temperatur auf 42 °C (B) und inaktivem FkpA wird Colicin an die Zelloberfläche transportiert und vom Antiserum (AK) inaktiviert. Colicin M verbleibt bei einem Temperaturshift FkpA-temperatursensitiver Zellen von 30 °C auf 42 °C an den Zellen. Es liegt entweder unspezifisch oder am Rezeptor gebunden vor. Die Strukturen wurden mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt. Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136], FkpA (PDB 1Q6U) [115], FhuA-TonB-Komplex (PDB 2GRX) [99]

4.2 Struktur des Colicin M - Immunitätsproteins

Colicin M produzierende Zellen werden vom Colicin M-Immunitätsprotein geschützt, sodass Colicin M inaktiviert wird bevor es seine Zielstruktur erreicht. Wie dieser Mechanismus der Inaktivierung von Colicin M durch sein Immunitätsprotein funktioniert, ist bislang nicht bekannt. Die Struktur des Colicin M-Immunitätsproteins sollte deshalb einen ersten Schritt zur Aufklärung der Interaktion beider Proteine darstellen.

Da das Immunitätsprotein mit seinem hydrophoben, N-terminalen Membrananker schwer zu isolieren und kristallisieren ist, wurde auf diesen für die Kristallisationsexperimente verzichtet. Ohne den hydrophoben N-Terminus ist das Colicin M-Immunitätsprotein gut exprimierbar und zu reinigen. In 20 mM Tris und 50 mM NaCl (pH 7,4) und auf 5 mg/ml einkonzentriert konnte es im Sitting Drop Verfahren mit 0,2 M Ammoniumsulfat und 30 % (w/v) PEG 4000 innerhalb einer Woche kristallisieren. Der nadelförmige Kristall hatte im Röntgenbeugungsexperiment eine Auflösung von 1,9 Å erreicht. Mangels weiterer ausreichend auflösender Kristalle war die Bestimmung der Phasen nicht möglich. Trotz Soaking, dem Tauchen des Proteins in Schwermetall-Lösung, bei dem diese Ionen zur Erhöhung des detektierten Signals an definierten Positionen im Protein eingebaut werden, konnte das Phasenproblem nicht gelöst werden. Deshalb wurde das Colicin M - Immunitätsprotein bereits während seiner Expression mit Selenomethionin kultiviert, sodass die drei enthaltenen Methionine durch Selenomethionin ersetzt wurden. Da der Proteinkristall aber nicht reproduzierbar war, war sein Datensatz ohne Selenomethionin die einzige Grundlage für eine mögliche Strukturbestimmung. Ein molekulares Replacement anhand bereits bekannter ähnlicher Strukturen war nicht möglich, weil keine Strukturen ähnlicher Proteine bekannt sind. Mithilfe einer kürzlich veröffentlichten Software ARCIMBOLDO [112] und einem 12-Reste langen α -helikalen Fragment konnte die Struktur letztlich *de novo* von Dayté Rodriguez, Isabel Usón-Finkenzeller (Instituto di Biología Molecular de Barcelona, Spanien) und Kornelius Zeth (MPI Tübingen) gelöst werden. Die anschließende Interpretation der Daten beruht auf dem Manuskript „Crystal structure of the colicin M immunity protein“ von Kornelius Zeth, Christin Römer, Silke I. Patzer, Reinhard Albrecht, Dayté Rodriguez, Isabel Usón-Finkenzeller und Volkmar Braun. Zeitgleich zu unseren Erkenntnissen über das Colicin M - Immunitätsprotein wurde dessen Struktur mit weiteren Analysen von Gérard *et al.* veröffentlicht [50]. Deren Struktur unterscheidet sich aber von der von uns ermittelten und wird vergleichend diskutiert.

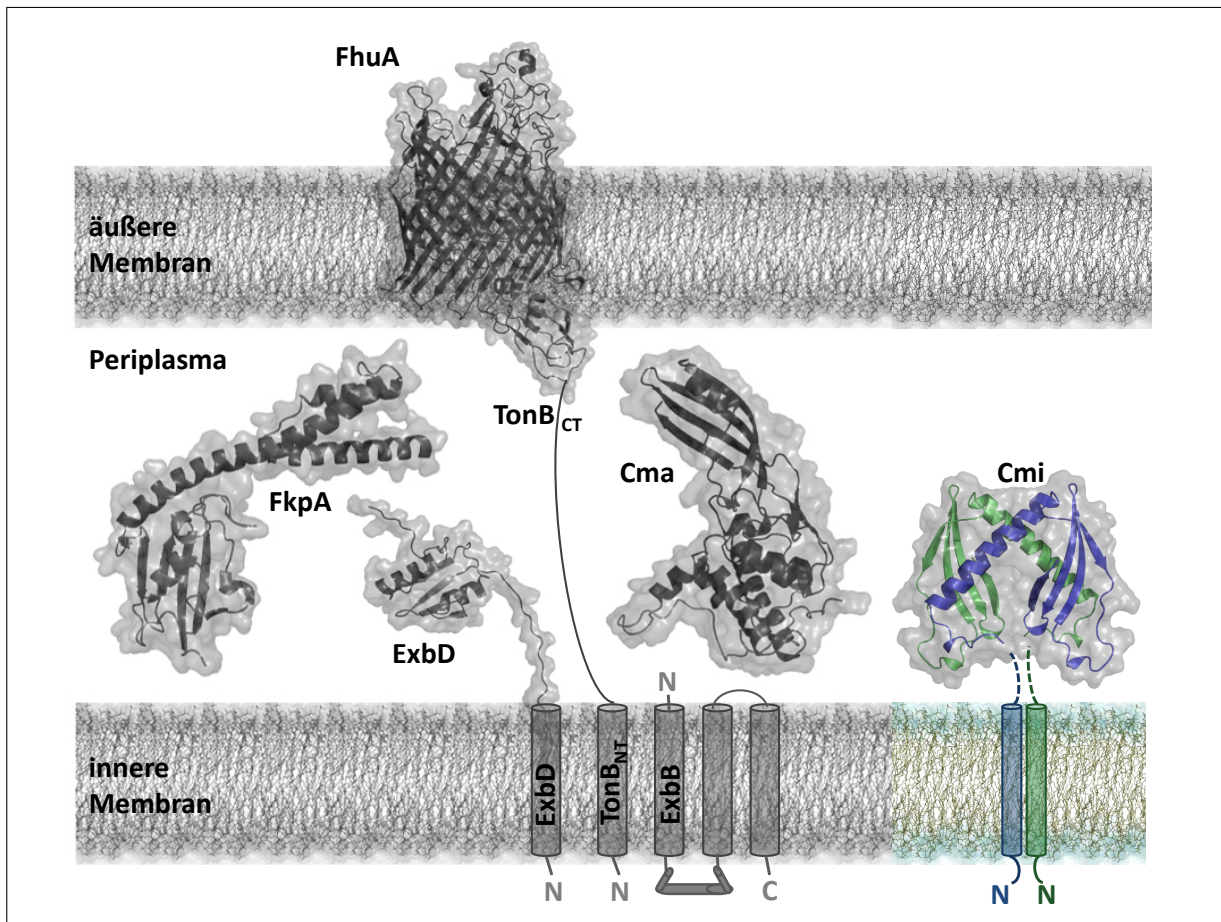


Abbildung 4.8: **Struktur von Cmi Δ 1-23** im Kontext aller bekannten beteiligten Proteine. Die Monomere sind in blau und grün dargestellt, der fehlende N-Terminus (NT) in der inneren Membran wurde schematisch ergänzt. Die Strukturen wurden mit PyMOL (www.pymol.org) erstellt und stehen in exakter Relation zueinander. FhuA-TonB-Komplex (PDB 2GRX) [99], ExbD (PDB 2PFU) [44], Cma (PDB 2XMX, 3DA3) [136], FkpA (PDB 1Q6U) [115], Cmi (unveröffentlicht)

Das Colicin M-Immunitätsprotein bildet ein Dimer, das über zwei Disulfidbrücken, eine Vielzahl von Wasserstoffbrücken und eine Salzbrücke miteinander verknüpft ist. Das Immunitätsprotein von Colicin M kristallisierte als asymmetrisches Monomer, sodass das Dimer mit kristallographischer Symmetrie konstruiert wurde. Die Struktur des 9 kDa großen Proteins ist ein Dimer (siehe Abb. 3.29 auf Seite 90). Das Monomer ist aus einer 26 Aminosäurereste langen α -Helix, an die ein viersträngiges, antiparalleles β -Faltblatt anschließt, aufgebaut. Die langen β -Stränge (β 2, β 3) werden von zwei kleinen Strängen (β 1, β 4) eingeschlossen und zwischen den β -Strängen 1 und 2 befindet sich eine erweiterte Loop-Struktur. Das kleine β -Faltblatt wickelt sich um die N-terminale Helix des zweiten Moleküls im Dimer. In dem Dimer stehen die beiden α -Helices in einem Winkel von ca. 90° zueinander und bilden zusammen mit dem kleinen

4.2 Struktur des Colicin M-Immunitätsproteins

β -Faltblatt einen kleinen Hohlraum, wobei die zwei Arginine R50 und R50' mit zwei Sulfat-Molekülen über ionische Wechselwirkungen interagieren. Das Sulfat ergibt sich dabei aus dem Ammoniumsulfat im Kristallisationspuffer. Beide Monomere sind kovalent durch Disulfidbrücken zwischen den Resten C31 und C107' bzw. C31' und C107 verknüpft. Diese beiden Reste sind auch in einem Cluster von ähnlichen, sekretierten Proteinen hoch konserviert (siehe Abb. 3.31 auf Seite 92). Neben der Disulfidbrücke wird das Molekül durch eine Vielzahl von Wasserstoffbrücken, einer einzigen Salzbrücke zwischen D36 und R75 und einem hydrophoben Kontakt zwischen den symmetrisch benachbarten Y111-Resten stabilisiert.

Zur gleichen Zeit unserer Studien wurde die Struktur vom Colicin M -Immunitätsprotein von Gérard *et al.* veröffentlicht [50]. Auch sie haben ohne den hydrophoben Membrananker experimentiert. Die Kristalle, die die Grundlage ihres Strukturmodells bildeten, entstanden nicht wie bei uns in 0,2 M Ammoniumsulfat und 30% (w/v) PEG 4000, sondern in 100 mM MES Puffer (pH 6,5) und 12% PEG 20.000 und konnten mit 90 mM CdSO₄ verbessert werden. Ihre ebenfalls nadelförmigen Kristalle erreichten aber nur eine Auflösung von 2,7 Å statt unserer 1,9 Å. Das Strukturmodell von Gérard *et al.* unterscheidet sich von unserem (siehe Abb. 4.9 auf Seite 120), indem die α -Helix, die wir als einen Strang identifizierten, in 4 α -Helices aufgebrochen ist. Ihre 4 β -Faltblätter entsprechen den unsrigen. Durch die gebrochene α -Helix verändert sich das Verhältnis der Ketten zueinander, sodass die Struktur von Gérard *et al.* viel kompakter als unsere ist. Unsere identifizierten Disulfidbrücken zwischen den Resten C31 und C107 sind ebenfalls Bestandteil ihres Modells. Bei ihnen verknüpfen sie nicht wie bei uns zwei Monomere zu einem Dimer, sondern die Disulfidbrücke ist intramolekular. Der N-Terminus der Helix α 1 wird über diese Disulfidbrücken mit dem Loop, der die β -Faltblätter β 3 and β 4 verbindet, miteinander verknüpft, sodass ihr Modell ein Monomer darstellt. Welches der Modelle ein Artefakt der Kristallisationsbedingungen ist, ist gegenwärtig nicht zu beantworten. Für eine Aussage über die exakte Struktur müssten erneut mehrere Kristalle mittels Röntgenstrukturanalyse miteinander verglichen werden oder zusätzliche Methoden wie z.B. NMR hinzugezogen werden. Da unsere Auflösung des Colicin M - Immunitätsproteinkristalls im Röntgenbeugungsexperiment aber fast um 1 Å höher ist, bevorzugen wir das Modell des Dimers.

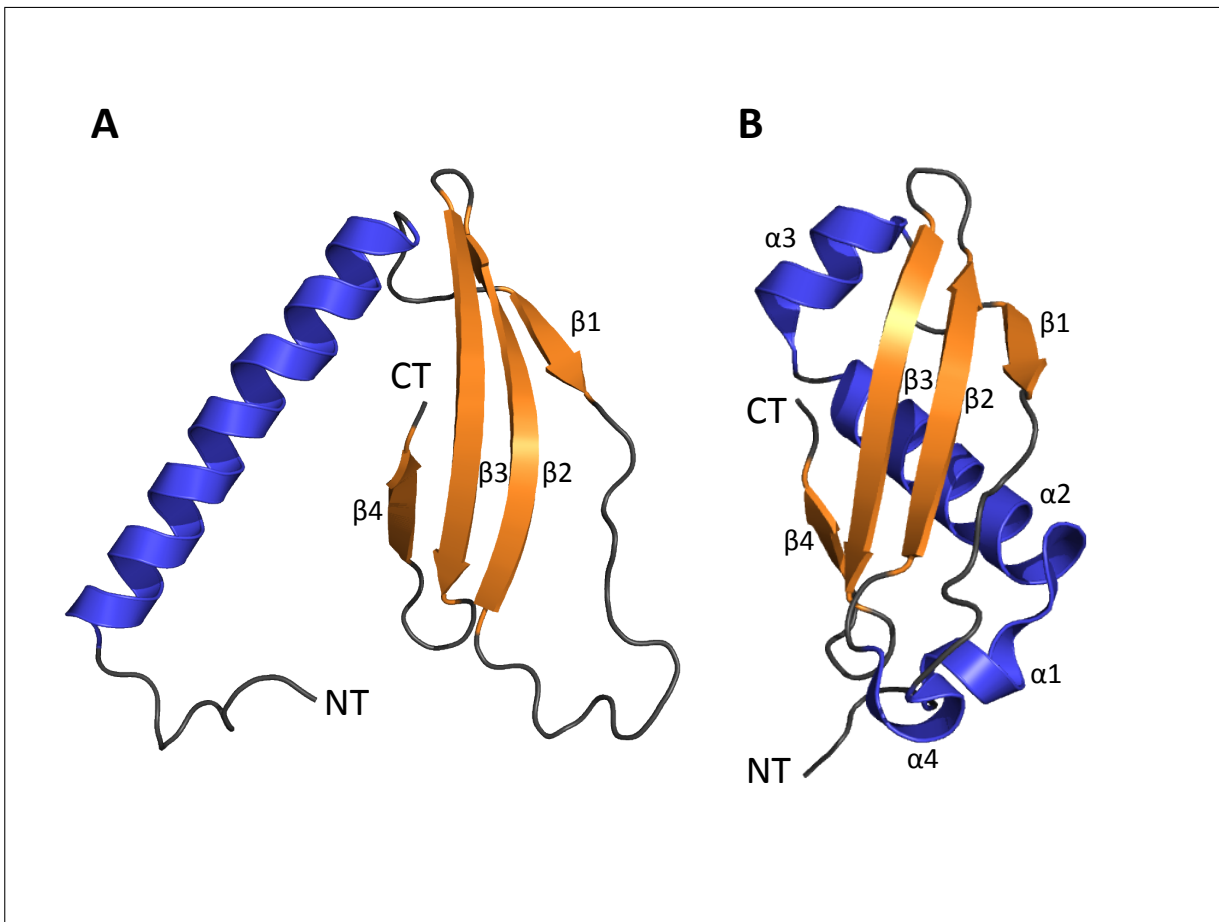


Abbildung 4.9: **Struktur vom Colicin M - Immunitätsprotein (Cmi Δ 1-23)**

A Cmi von uns. **B** Cmi von Gérard *et al.* [50] (PDB 2XGL).

NT N-Terminus, CT C-Terminus, α Helix, β Faltblatt. Die Strukturen wurden mit PyMOL (www.pymol.org)

Das Colicin M - Immunitätsprotein ist ein stark geladenes Protein mit einem hohen Anteil an negativen Ladungen. Die Analyse der Oberflächenladungen ergab, dass die Nettoladung -7 beträgt und der isoelektrische Punkt bei 4,7 liegt. Es gibt zwei dominierende negative Cluster. Das erste wird durch Paare der Reste D54, E63, D92 und D95 mit einer Gesamtnettoladung von -8 gebildet. Das zweite befindet sich auf der gegenüberliegenden Seite und besteht aus den Resten D78, E80, D81, E107 und E108 mit einer Gesamtnettoladung von -10. Die Verteilung dieser Ladungen könnte für die Interaktion des Moleküls mit Colicin M interessant sein, weil dieses gegenteilig positiv geladen ist. Somit könnte die Wechselwirkung beider Moleküle durch gegensätzlich gerichtete Ladungen vermittelt werden, was in Abschnitt 4.3 ab Seite 121 Gegenstand der Betrachtung ist.

4.3 Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein

Die Sequenz des Colicin M - Immunitätsproteins ähnelt der von YebF Um das Phasenproblem zu umgehen und mögliches molekulares Replacement anwenden zu können, wurde die Sequenzähnlichkeit von Colicin M zu anderen Proteinen untersucht. Es besitzt keine Ähnlichkeit zu bekannten Strukturen, sodass keine Rückschlüsse auf bereits bekannte Strukturbereiche zur Lösung der Struktur mittels molekularen Replacements gezogen werden konnten. Es ist aber eine hohe Ähnlichkeit zu YebF von *E. coli*, einem Protein unbekannter Funktion und Struktur, vorhanden, wobei 30 der 117 Aminosäuren identisch (35,1 %) sind. YebF wird als Carrier-Protein für die Translokation durch die Zellhülle [137] vermutet, sodass YebF und das Colicin M - Immunitätsprotein außer der vielleicht zufälligen Sequenzähnlichkeit funktionell nichts miteinander verbindet.

In Produzenten von Colicin M - Homologen ist bioinformatisch kein Immunitätsprotein nachweisbar. Es kann erwartet werden, dass Colicin M - Homologe durch Immunitätsproteine geschützt werden und diese neben Colicin M kodieren, wie es für alle Colicine zutrifft. Colicin M - Homologe sind in *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa* und verschiedenen *Burkholderia*-Stämmen zu finden. Eine Sequenzanalyse der Aminosäuren ergab aber, dass in keinem der dem Colicin M ähnlichen Stämme eine Ähnlichkeit mit dem Colicin M - Immunitätsprotein nachweisbar war. Wenn die Colicin M - Homologen für eine mögliche, ähnliche Toxizität in anderen Stämmen codieren, besitzen sie zumindestens keine durch das Colicin M - Immunitätsprotein vermittelte, ähnliche Immunität. Dieser Befund ist unerwartet, da Immunitätsproteine durch Bindung an die Aktivitätsdomänen Colicine inaktivieren, die bei den Colicin M - Homologen sequenzähnlich sind. Die Rezeptor- und Translokationsdomänen sind dagegen stammspezifisch verschieden.

4.3 Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein

Die am intensivsten studierten Immunitätsproteine sind die der enzymatischen Nuklease-Colicine. Ihre Bindung zueinander ist so stark, dass sie zu den bislang am stärksten gemessenen Protein-Protein-Interaktionen zählen [77]. Die Wechselwirkung von Colicin M mit seinem Immunitätsprotein dagegen ist nach bisherigen Befunden schwach. Da eine Bindung beider Moleküle nicht ausreichend nachgewiesen werden konnte [86][54], ist nicht geklärt, ob Colicin M und sein Immunitätsprotein in direkte Interaktion treten müssen oder ob die Inaktivierung von Colicin M indirekt über andere Mechanismen stattfindet. Dieser Frage wurde mit Ko-Kristallisation, Ko-Elution und Auftropftests nachgegangen.

4 Diskussion

Colicin M bindet sein Immunitätsprotein. Mittels Ko-Kristallisation allein konnte die Frage, ob Colicin M an sein Immunitätsprotein bindet, nicht beantwortet werden. Eine die *in vitro* Bindung nachweisende Ko-Kristallisation von Colicin M und seinem Immunitätsprotein war nicht möglich. Die erhaltenen Proteinkristalle bestanden stets aus Colicin M. Die Bindung vom Immunitätsprotein an Colicin M konnte *in vitro* durch Ko-Elution von Colicin M mit seinem Immunitätsprotein gezeigt werden. Diese konnte durch Auftropftests *in vivo* bestätigt werden.

Ko-Elution Das Immunitätsprotein mit His-Tag bindet Colicin M ohne His-Tag an eine Nickel-Säule und ist mit seinem Immunitätsprotein koelulierbar. Durch entsprechend geringe Konzentration an Colicin M konnte eine unspezifische Bindung von Colicin M an die Säule als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Das Immunitätsprotein muss aber mindestens in 100-fachem Überschuss eingesetzt werden, um Colicin M binden zu können. Die schwache Bindung erklärt, warum die Ko-Kristallisation beider Proteine im Verhältnis 1:1 nicht erfolgreich war.

Auftropftests Für einen *in vivo* Nachweis der Bindung wurden Colicin M und sein Colicin M - Immunitätsprotein *in vitro* inkubiert und in anschließenden Auftropftests auf Bindung untersucht. Auch hierbei konnte eine Bindung beider Proteine nachgewiesen werden, weil die Toxizität von Colicin M bei Auftropftests auf sensitiven Zellen reduziert wird. Der durch Colicin M hervorgerufene Hemmhof wird durch die Zugabe von Colicin M - Immunitätsprotein aufgehoben. Verglichen mit der Ko-Elution reichte bereits ein 10- statt 100-facher Überschuss an Immunitätsprotein zur schwachen Bindung beider Proteine. Eine mögliche Erklärung für die schwache Bindung des Immunitätsproteins könnte sein, dass es an ungefaltetes oder partiell gefaltetes Colicin M, wie es zunächst im Periplasma vorliegt, bindet. Weiterführende Versuche könnten deshalb mit diesem ungefalteten bzw. teilweise gefalteten Colicin M statt des bislang gefaltet verwendeten durchgeführt werden. Dieses kann jedoch nicht, wie in Abschnitt 3.1.4.2 ab Seite 60 beschrieben, inaktiv und somit entfaltet aus dem Periplasma gewonnen werden, sodass für Versuche dieser Art ein anderer Ansatz gewählt werden müsste.

Die Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein wird nicht über die durch makromolekulares Docking vorhergesagten Reste R115, K120 und E143 vermittelt. Colicin M ist ein basisches, das Colicin M-Immunitätsprotein ein saures Protein. Es ist wahrscheinlich, dass die beiden Proteine über positiv geladene Aminosäuren an Colicin M und negativ geladene Aminosäuren am Colicin M-Immunitätsprotein miteinander binden.

4.3 Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein

Die in meiner Diplomarbeit aufgeklärte Struktur von Colicin M und die in dieser Arbeit gelöste Struktur seines Immunitätsproteins ermöglichen eine räumliche Vorstellung beider Proteine. Kenntnisse über ihre Faltung und ihre Oberflächenladungen geben erste Hinweise auf den Mechanismus der Inaktivierung von Colicin M durch sein Immunitätsprotein. Colicin M besitzt an seiner Oberfläche mehrere Stellen positiv geladener Aminosäuren. Die zwei positiv geladenen Bereiche Lys168, Lys270, Arg271 und Lys180, Lys202, Arg222 kommen dafür infrage. Im Colicin M-Immunitätsprotein gibt es die zwei negativen Cluster D54, E63, D92, D95 und D78, E80, D81, E107, E108 mit einer Gesamtnettoladung von -10. Diese könnten die Interaktion mit Colicin M vermitteln. Diese Hypothese wurde von Kornelius Zeth mittels rechnerischer Modellierung der Quartärstruktur von Komplexen mit Interaktionen (Rosetta Dock) geprüft. Seine Bindungsvorhersagen für Colicin M an das Immunitätsprotein identifizierten die Reste R115, K120 und E143, weshalb Colicin M an diesen möglichen Bindungsstellen mutiert wurde. Die Bindung von Colicin M wurde aber durch die gezielten Einfach-, Doppel- und Dreifachmutanten nicht beeinträchtigt, sodass die durch makromolekulares Docking hergeleiteten Mutanten keinen Einfluss auf die Bindung der Moleküle haben.

Im Zusammenhang der durch die rechnerischen Interaktions-Modellierung begründeten Mutanten wurden auch 6 von Stephanie Helbig zu Alanin umgewandelte Colicin M - Punktmutanten (E59, K64, K63/K64, K227, R236, R222) auf eine mögliche Bindung von Colicin M an sein Immunitätsprotein getestet. Für die Aminosäurereste R222 und K227 von Colicin M sagt das makromolekulare Docking zwar keine Beteiligung im aktiven Zentrum an der Bindung aus, aber bei Barreteau *et al.* [5] wird die klonierte Phosphatase vom Colicin M - Immunitätsprotein inaktiviert. Nur die Bindungsreste E59 und R222 scheinen einen sehr geringen Einfluss auf die Bindung beider Moleküle zu haben. Sie zeigen unverdünnt statt keinen einen sehr trüben Hemmhof, was für eine minimale Aufhebung der Interaktion von Colicin M und seinem Immunitätsprotein spricht. Da die Aufhebung der Interaktion jedoch nicht zu einem klar erkennbaren Hemmhof im Auftropftest auf sensitiven Zellen führt, wurden diese Punktmutanten nicht weiter im Zusammenhang der Bindung betrachtet. Auch die Prüfung von unspezifisch hergestellten Colicin M - Mutanten ergab keine Mutante, die vom Colicin M-Immunitätsprotein nicht mehr gehemmt wurde. Anhand der durchgeführten Mutagenesen vermuten wir, dass die Bindung von Colicin M und seinem Immunitätsprotein nicht auf einzelne Aminosäurereste sondern einen größeren Bereich zurückzuführen ist. Zur Charakterisierung der Interaktion könnte neben Colicin M auch das Immunitätsprotein mutiert und damit deren Bindung untersucht werden.

Literaturverzeichnis

- [1] J. P. Arié, N. Sassoon, and J. M. Betton. Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 39(1):199–210, Jan 2001.
- [2] K. A. Armstrong, V. Hershfield, and D. R. Helinski. Gene cloning and containment properties of plasmid Col E1 and its derivatives. *Science*, 196(4286):172–174, Apr 1977.
- [3] T. Arnold, K. Zeth, and D. Linke. Structure and function of colicin S4, a colicin with a duplicated receptor-binding domain. *J Biol Chem*, 284(10):6403–6413, Mar 2009.
- [4] T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*, 2:2006.0008, 2006.
- [5] H. Barreteau, A. Bouhss, F. Gérard, D. Duché, B. Boussaid, D. Blanot, R. Llobès, D. Mengin-Lecreulx, and T. Touzé. Deciphering the catalytic domain of colicin M, a peptidoglycan lipid II-degrading enzyme. *J Biol Chem*, 285(16):12378–12389, Apr 2010.
- [6] H. Benedetti, C. Lazdunski, and R. Llobès. Protein import into *Escherichia coli*: colicins A and E1 interact with a component of their translocation system. *EMBO J*, 10(8):1989–1995, Aug 1991.
- [7] J. E. Blanco, M. Blanco, A. Mora, and J. Blanco. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J Clin Microbiol*, 35(11):2953–2957, Nov 1997.

- [8] R. Boetzel, B. Morel, C.J. Macdonald, C.S. Le Duff, C.A.E.M. Spronk, A.J.J.M. Bonvin, R. James, C. Kleanthous, and G.R. Moore. Structural models for non cognate complexes of the DNase domain of colicin E9 and colicin immunity proteins. *to be published*.
- [9] H. Bothmann and A. Pluckthun. 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(22):17100–17105, Jun 2000.
- [10] L. D. Bowler and B. G. Spratt. Membrane topology of penicillin-binding protein 3 of Escherichia coli. *Mol Microbiol*, 3(9):1277–1286, Sep 1989.
- [11] M. Braun, F. Endriss, H. Killmann, and V. Braun. In vivo reconstitution of the FhuA transport protein of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol*, 185(18):5508–5518, Sep 2003.
- [12] V. Braun, J. Frenz, K. Hantke, and K. Schaller. Penetration of colicin M into cells of Escherichia coli. *J Bacteriol*, 142(1):162–168, Apr 1980.
- [13] V. Braun, K. Hantke, and W. Köster. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met Ions Biol Syst*, 35:67–145, 1998.
- [14] V. Braun, S. Patzer, and K. Hantke. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie*, 84(5-6):365–380, 2002.
- [15] V. Braun, K. Schaller, and M. R. Wabl. Isolation, characterization, and action of colicin M. *Antimicrob Agents Chemother*, 5(5):520–533, May 1974.
- [16] J. K. Broome-Smith and B. G. Spratt. A vector for the construction of translational fusions to TEM beta-lactamase and the analysis of protein export signals and membrane protein topology. *Gene*, 49(3):341–349, 1986.
- [17] S. K. Buchanan, P. Lukacik, S. Grizot, R. Ghirlando, M. M. U. Ali, T. J. Barnard, K. S. Jakes, P. K. Kienker, and L. Esser. Structure of colicin I receptor bound to the R-domain of colicin Ia: implications for protein import. *EMBO J*, 26(10):2594–2604, May 2007.
- [18] Z. Cao and P. E. Klebba. Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins. *Biochimie*, 84(5-6):399–412, 2002.

- [19] S. Carr, D. Walker, R. James, C. Kleanthous, and A. M. Hemmings. Inhibition of a ribosome-inactivating ribonuclease: the crystal structure of the cytotoxic domain of colicin E3 in complex with its immunity protein. *Structure*, 8(9):949–960, Sep 2000.
- [20] E. Cascales, S. K. Buchanan, D. Duché, C. Kleanthous, R. Lloubès, K. Postle, M. Riley, St. Slatin, and D. Cavard. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(1):158–229, Mar 2007.
- [21] D. Cavard. Effects of temperature and of heat shock on the expression and action of the colicin A lysis protein. *J Bacteriol*, 177(17):5189–5192, Sep 1995.
- [22] P. Chames, J. Fieschi, and D. Baty. Production of a soluble and active MBP-scFv fusion: favorable effect of the leaky tolR strain. *FEBS Lett*, 405(2):224–228, Mar 1997.
- [23] B. C. H. Chu, R. S. Peacock, and H. J. Vogel. Bioinformatic analysis of the TonB protein family. *Biometals*, 20(3-4):467–483, Jun 2007.
- [24] T. Clavel, J. C. Lazzaroni, A. Vianney, and R. Portalier. Expression of the tolQRA genes of *Escherichia coli* K-12 is controlled by the RcsC sensor protein involved in capsule synthesis. *Mol Microbiol*, 19(1):19–25, Jan 1996.
- [25] J. W. Coulton. The ferrichrome-iron receptor of *Escherichia coli* K-12. Antigenicity of the fhuA protein. *Biochim Biophys Acta*, 717(1):154–162, Jul 1982.
- [26] P. N. Danese and T. J. Silhavy. The sigma(E) and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 11(9):1183–1193, May 1997.
- [27] F. K. de Graaf and P. Klaasen-Boor. Purification and characterization of a complex between cloacin and its immunity protein isolated from *Enterobacter cloacae* (Clo DF13). Dissociation and reconstitution of the complex. *Eur J Biochem*, 73(1):107–114, Feb 1977.
- [28] F. K. de Graaf, M. J. Stukart, F. C. Boogerd, and K. Metselaar. Limited proteolysis of cloacin DF13 and characterization of the cleavage products. *Biochemistry*, 17(6):1137–1142, Mar 1978.
- [29] W. de Witt and D. R. Helinski. Colicinogenic factor from a non-induced and mitomycin C-induced *Proteus* strain. *J.Mol.Biol.*, 13:692–703, 1965.

- [30] C. A. Dennis, H. Videler, R. A. Pauptit, R. Wallis, R. James, G. R. Moore, and C. Kleanthous. A structural comparison of the colicin immunity proteins Im7 and Im9 gives new insights into the molecular determinants of immunity-protein specificity. *Biochem J*, 333 (Pt 1):183–191, Jul 1998.
- [31] G. Dougan, M. Saul, G. Warren, and D. Scherratt. A functional map of plasmid ColE1. *Mol.Gen.Genet.*, 158:325–327, 1978.
- [32] R. Dreher, V. Braun, and B. Wittmann-Liebold. Functional domains of colicin M. *Arch Microbiol*, 140(4):343–346, Jan 1985.
- [33] T. Earnest, E. Fauman, C. S. Craik, and R. Stroud. 1.59 Å structure of trypsin at 120 K: comparison of low temperature and room temperature structures. *Proteins*, 10(3):171–187, 1991.
- [34] P. Emsley and K. Cowtan. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60(Pt 12 Pt 1):2126–2132, Dec 2004.
- [35] F. Endriss, M. Braun, H. Killmann, and V. Braun. The ferrichrome-iron receptor of *Escherichia coli* K-12. Antigenicity of the fhuA protein. *J Bacteriol*, 185(16):4683–4692, Aug 2003.
- [36] F. Endriss and V. Braun. Loop deletions indicate regions important for FhuA transport and receptor functions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 186(14):4818–4823, Jul 2004.
- [37] J. M. Eraso and G. M. Weinstock. Anaerobic control of colicin E1 production. *J Bacteriol*, 174(15):5101–5109, Aug 1992.
- [38] A. D. Ferguson, V. Braun, H. P. Fiedler, J. W. Coulton, K. Diederichs, and W. Welte. Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA. *Protein Sci*, 9(5):956–963, May 2000.
- [39] A. D. Ferguson, E. Hofmann, J. W. Coulton, K. Diederichs, and W. Welte. Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science*, 282(5397):2215–2220, Dec 1998.
- [40] E. Fischer, K. Günter, and V. Braun. Involvement of ExbB and TonB in transport across the outer membrane of *Escherichia coli*: phenotypic complementation of Exb mutants by overexpressed TonB and physical stabilization of TonB by ExbB. *J Bacteriol*, 171(9):5127–5134, Sep 1989.

- [41] G. Fischer, H. Bang, and C. Mech. Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed Biochim Acta*, 43(10):1101–1111, 1984.
- [42] P. Fredericq. Recherche sur l'origine des mutants de Escherichia coli V produisant la colicin M. *C.R.Soc.Biol.*, 145:930–933, 1951.
- [43] P. Fredericq. Colicins and colicinogenic factors. *Symp Soc Exp Biol*, 12:104–122, 1958.
- [44] A. Garcia-Herrero, R. S. Peacock, S. P. Howard, and H. J. Vogel. 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(4):872–889, Nov 2007.
- [45] V. Geli and C. Lazdunski. An alpha-helical hydrophobic hairpin as a specific determinant in protein-protein interaction occurring in Escherichia coli colicin A and B immunity systems. *J Bacteriol*, 174(20):6432–6437, Oct 1992.
- [46] S. E. Gerchman, V. Graziano, and V. Ramakrishnan. Expression of chicken linker histones in E. coli: sources of problems and methods for overcoming some of the difficulties. *Protein Expr Purif*, 5(3):242–251, Jun 1994.
- [47] M. El Ghachi, A. Bouhss, H. Barreteau, T. Touzé, G. Auger, D. Blanot, and D. Mengin-Lecreulx. Colicin M exerts its bacteriolytic effect via enzymatic degradation of undecaprenyl phosphate-linked peptidoglycan precursors. *J Biol Chem*, 281(32):22761–22772, Aug 2006.
- [48] O. Gillor, A. Etzion, and M. A. Riley. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 81(4):591–606, Dec 2008.
- [49] M. Graille, L. Mora, R. H. Buckingham, H. van Tilbeurgh, and M. de Zamaroczy. Structural inhibition of the colicin D tRNase by the tRNA-mimicking immunity protein. *EMBO J*, 23(7):1474–1482, Apr 2004.
- [50] F. Gérard, M. A. Brooks, H. Barreteau, T. Touzé, M. Graille, A. Bouhss, D. Blanot, H. van Tilbeurgh, and D. Mengin-Lecreulx. X-ray structure and site-directed mutagenesis analysis of the Escherichia coli colicin M immunity protein. *J Bacteriol*, Oct 2010.

- [51] A. Gratia and P. Fredericq. Diversité des souches antibiotiques de *Bacterium coli* et étendue variable de leur champ d'action. *C.R.Soc.Biol. (Paris)*, 140:1032–1033, 1946.
- [52] P. Groß. Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Colicin M - Immunitätsproteins (Cmi). *Dissertation Universität Tübingen*, 1996.
- [53] J. Grodberg and J. J. Dunn. OmpT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol*, 170(3):1245–1253, Mar 1988.
- [54] P. Gross and V. Braun. Colicin M is inactivated during import by its immunity protein. *Mol Gen Genet*, 251(3):388–396, Jun 1996.
- [55] S. K. Guterman. Colicin B: mode of action and inhibition by enterochelin. *J Bacteriol*, 114(3):1217–1224, Jun 1973.
- [56] D. Hanahan. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4):557–580, Jun 1983.
- [57] R. E. Hancock and V. Braun. The colicin I receptor of *Escherichia coli* K-12 has a role in enterochelin-mediated iron transport. *FEBS Lett*, 65(2):208–210, Jun 1976.
- [58] R. E. Harkness and V. Braun. Colicin M inhibits peptidoglycan biosynthesis by interfering with lipid carrier recycling. *J Biol Chem*, 264(11):6177–6182, Apr 1989.
- [59] R. E. Harkness and V. Braun. Colicin M is only bactericidal when provided from outside the cell. *Mol Gen Genet*, 222(1):37–40, Jun 1990.
- [60] R. E. Harkness and T. Ölschläger. The biology of colicin M. *FEMS Microbiol Rev*, 8(1):27–41, Jul 1991.
- [61] S. Helbig and V. Braun. Mapping functional domains of colicin M. *J Bacteriol*, 193(4):815–821, Feb 2011.
- [62] H. R. Herschman and D. R. Helinski. Comparative study of the events associated with colicin induction. *J Bacteriol*, 94(3):691–699, Sep 1967.
- [63] J. L. Hilsenbeck, H. Park, G. Chen, B. Youn, K. Postle, and C. H. Kang. Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 Å resolution. *Mol Microbiol*, 51(3):711–720, Feb 2004.

- [64] A. Hiniker and J. C. A. Bardwell. In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem*, 279(13):12967–12973, Mar 2004.
- [65] A. Hirose, J. Kumagai, and K. Imahori. Dessociation and reconstitution of colicin E3 and immunity substance complex. *J Biochem*, 79(2):305–311, Feb 1976.
- [66] H. Hoffmann, E. Fischer, H. Kraut, and V. Braun. Preparation of the FhuA (TonA) receptor protein from cell envelopes of an overproducing strain of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol*, 166(2):404–411, May 1986.
- [67] S. M. Horne and K. D. Young. Escherichia coli and other species of the Enterobacteriaceae encode a protein similar to the family of Mip-like FK506-binding proteins. *Arch Microbiol*, 163(5):357–365, May 1995.
- [68] K. Hu, V. Galius, and K. Pervushin. Structural plasticity of peptidyl-prolyl isomerase sFkpA is a key to its chaperone function as revealed by solution NMR. *Biochemistry*, 45(39):11983–11991, Oct 2006.
- [69] J. Hullmann, S. I. Patzer, C. Römer, K. Hantke, and V. Braun. Periplasmic chaperone Fkpa is essential for imported colicin M toxicity. *Mol Microbiol*, Jun 2008.
- [70] K. S. Jakes and N. D. Zinder. Highly purified colicin E3 contains immunity protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(9):3380–3384, Sep 1974.
- [71] B. Janowski, S. Wöllner, M. Schutkowski, and G. Fischer. A protease-free assay for peptidyl prolyl cis/trans isomerases using standard peptide substrates. *Anal Biochem*, 252(2):299–307, Oct 1997.
- [72] T. J. Johnson, S. J. Johnson, and L. K. Nolan. Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic Escherichia coli suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. *J Bacteriol*, 188(16):5975–5983, Aug 2006.
- [73] D. H. Juers, R. H. Jacobson, D. Wigley, X. J. Zhang, R. E. Huber, D. E. Tronrud, and B. W. Matthews. High resolution refinement of beta-galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for alpha-complementation. *Protein Sci*, 9(9):1685–1699, Sep 2000.
- [74] W. Kabsch. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66(Pt 2):125–132, Feb 2010.
- [75] C. K. Kennedy. Induction of colicin production by high temperature or inhibition of protein synthesis. *J Bacteriol*, 108(1):10–19, Oct 1971.

- [76] H. Killmann, G. Videnov, G. Jung, H. Schwarz, and V. Braun. Identification of receptor binding sites by competitive peptide mapping: phages T1, T5, and phi 80 and colicin M bind to the gating loop of FhuA. *J Bacteriol*, 177(3):694–698, Feb 1995.
- [77] O. O. Kolade, S. B. Carr, U. C. Kühlmann, A. Pommer, C. Kleanthous, C. A. Boucheinsky, and A. M. Hemmings. Structural aspects of the inhibition of DNase and rRNase colicins by their immunity proteins. *Biochimie*, 84(5-6):439–446, 2002.
- [78] J. Konisky and F. M. Richards. Characterization of colicin Ia and colicin Ib. Purification and some physical properties. *J Biol Chem*, 245(11):2972–2978, Jun 1970.
- [79] W. J. Krone, P. de Vries, G. Koningstein, A. J. de Jonge, F. K. de Graaf, and B. Oudega. Uptake of cloacin DF13 by susceptible cells: removal of immunity protein and fragmentation of cloacin molecules. *J Bacteriol*, 166(1):260–268, Apr 1986.
- [80] I. Kuhar and D. Zgur-Bertok. Transcription regulation of the colicin K cka gene reveals induction of colicin synthesis by differential responses to environmental signals. *J.Bacteriol.*, 181:7373–7380, 1999.
- [81] U. C. Kuhlmann. Crystal structure of the E.coli colicin E9 DNase domain with its cognate immunity protein Im9. *Thesis*, 2008.
- [82] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, Aug 1970.
- [83] P. C. Lau, R. W. Rowsome, R. J. Watson, and L. P. Visentin. The immunity genes of colicins E2 and E8 are closely related. *Biosci Rep*, 4(7):565–572, Jul 1984.
- [84] C. S. Leduff, H. Videler, R. Boetzel, M. Czisch, R. James, C. Kleanthous, and G. R. Moore. Non-cognate protein-protein interaction: The NMR structure of the colicin E8 inhibitor protein Im8 and its interaction with the DNase domain of colicin E9. *to be published*.
- [85] T. Ölschläger and V. Braun. Sequence, expression, and localization of the immunity protein for colicin M. *J Bacteriol*, 169(10):4765–4769, Oct 1987.
- [86] T. Ölschläger, A. Turba, and V. Braun. Binding of the immunity protein inactivates colicin M. *Mol Microbiol*, 5(5):1105–1111, May 1991.

- [87] C. Luna-Chávez, Y. Lin, and R. H. Huang. Molecular basis of inhibition of the ribonuclease activity in colicin E5 by its cognate immunity protein. *J Mol Biol*, 358(2):571–579, Apr 2006.
- [88] J. A. Mankovich, C. H. Hsu, and J. Konisky. DNA and amino acid sequence analysis of structural and immunity genes of colicins Ia and Ib. *J Bacteriol*, 168(1):228–236, Oct 1986.
- [89] H. Masaki and T. Ogawa. The modes of action of colicins E5 and D, and related cytotoxic tRNases. *Biochimie*, 84(5-6):433–438, 2002.
- [90] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, and R. J. Read. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*, 40(Pt 4):658–674, Aug 2007.
- [91] J. Mende and V. Braun. Import-defective colicin B derivatives mutated in the TonB box. *Mol Microbiol*, 4(9):1523–1533, Sep 1990.
- [92] J. E. Mogensen and D. E. Otzen. Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol Microbiol*, 57(2):326–346, Jul 2005.
- [93] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, and E. J. Dodson. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 53(Pt 3):240–255, May 1997.
- [94] M. Nakamura, I. N. Maruyama, M. Soma, J. Kato, H. Suzuki, and Y. Horota. On the process of cellular division in *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the gene for penicillin-binding protein 3. *Mol Gen Genet*, 191(1):1–9, 1983.
- [95] H. C. Neu and L. A. Heppel. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J Biol Chem*, 240(9):3685–3692, Sep 1965.
- [96] A. Norman, L. H. Hansen, and S. J. Sørensen. Construction of a ColD cda promoter-based SOS-green fluorescent protein whole-cell biosensor with higher sensitivity toward genotoxic compounds than constructs based on recA, umuDC, or sulA promoters. *Appl Environ Microbiol*, 71(5):2338–2346, May 2005.
- [97] Y. Ohno-Iwashita and K. Imahori. Assignment of the functional loci in the colicin E1 molecule by characterization of its proteolytic fragments. *J Biol Chem*, 257(11):6446–6451, Jun 1982.

- [98] M. W. Parker, F. Pattus, A. D. Tucker, and D. Tsernoglou. Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature*, 337(6202):93–96, Jan 1989.
- [99] P. D. Pawelek, N. Croteau, C. Ng-Thow-Hing, C. M. Khursigara, N. Moiseeva, M. Allaire, and J. W. Coulton. Structure of TonB in complex with FhuA, E. coli outer membrane receptor. *Science*, 312(5778):1399–1402, Jun 2006.
- [100] H. Pilsl, C. Glaser, P. Gross, H. Killmann, T. Ölschläger, and V. Braun. Domains of colicin M involved in uptake and activity. *Mol Gen Genet*, 240(1):103–112, Jul 1993.
- [101] A. Plückthun and J. R. Knowles. The consequences of stepwise deletions from the signal-processing site of beta-lactamase. *J Biol Chem*, 262(9):3951–3957, Mar 1987.
- [102] K. Postle and R. J. Kadner. Touch and go: tying TonB to transport. *Mol Microbiol*, 49(4):869–882, Aug 2003.
- [103] K. Postle and R. A. Larsen. TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals*, 20(3-4):453–465, Jun 2007.
- [104] V. Ramakrishnan, J. T. Finch, V. Graziano, P. L. Lee, and R. M. Sweet. Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature*, 362(6417):219–223, Mar 1993.
- [105] K. Ramm and A. Plückthun. The periplasmic Escherichia coli peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. II. isomerase-independent chaperone activity in vitro. *J Biol Chem*, 275(22):17106–17113, Jun 2000.
- [106] K. Ramm and A. Plückthun. High enzymatic activity and chaperone function are mechanistically related features of the dimeric E. coli peptidyl-prolyl-isomerase FkpA. *J Mol Biol*, 310(2):485–498, Jul 2001.
- [107] M. A. Riley. Molecular mechanisms of colicin evolution. *Mol Biol Evol*, 10(6):1380–1395, Nov 1993.
- [108] M. A. Riley and J. E. Wertz. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol*, 56:117–137, 2002.
- [109] A. E. Rizzitello, J. R. Harper, and T. J. Silhavy. Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of Escherichia coli. *J Bacteriol*, 183(23):6794–6800, Dec 2001.

- [110] C. Römer. Kristallstruktur von Colicin M und dessen Abhängigkeit vom periplasmatischen Chaperon FkpA. *Diplomarbeit Universität Tübingen*, 2007.
- [111] C. Römer, S. I. Patzer, R. Albrecht, K. Zeth, and V. Braun. Expression, purification and crystallization of the Cmi immunity protein from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 67(Pt 4):517–520, Apr 2011.
- [112] D. D. Rodríguez, C. Grosse, S. Himmel, C. González, I. M. de Ilarduya, S. Becker, G. M. Sheldrick, and I. Usón. Crystallographic ab initio protein structure solution below atomic resolution. *Nat Methods*, 6(9):651–653, Sep 2009.
- [113] J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, 2nd edit., 1989.
- [114] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–5467, Dec 1977.
- [115] F. A. Saul, J-P. Arié, B. Vulliez le Normand, R. Kahn, J-M. Betton, and G. A. Bentley. Structural and functional studies of FkpA from *Escherichia coli*, a cis/trans peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity. *J Mol Biol*, 335(2):595–608, Jan 2004.
- [116] K. Schaller, R. Dreher, and V. Braun. Structural and functional properties of colicin M. *J Bacteriol*, 146(1):54–63, Apr 1981.
- [117] K. Schaller, J. V. Höltje, and V. Braun. Colicin M is an inhibitor of murein biosynthesis. *J Bacteriol*, 152(3):994–1000, Dec 1982.
- [118] K. Schaller, A. Krauel, and V. Braun. Temperature-sensitive, colicin M-tolerant mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 147(1):135–139, Jul 1981.
- [119] H. Schöffler and V. Braun. 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(2-3):378–383, Jun 1989.
- [120] T. R. Schneider and G. M. Sheldrick. Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58(Pt 10 Pt 2):1772–1779, Oct 2002.
- [121] G. M. Sheldrick. Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66(Pt 4):479–485, Apr 2010.

- [122] J. Smarda and D. Smajs. Colicins—exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol (Praha)*, 43(6):563–582, 1998.
- [123] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1):76–85, Oct 1985.
- [124] S. Soelaiman, K. J., N. Wu, C. Li, and M. Shoham. Crystal structure of colicin E3: implications for cell entry and ribosome inactivation. *Mol Cell*, 8(5):1053–1062, Nov 2001.
- [125] F. W. Studier and B. A. Moffatt. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189(1):113–130, May 1986.
- [126] F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and J. W. Dubendorff. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, 185:60–89, 1990.
- [127] S. Tabor and C. C. Richardson. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. 1985. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(4):1074–1078, Feb 1985.
- [128] D. G. Thanassi and S. J. Hultgren. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol*, 12(4):420–430, Aug 2000.
- [129] G. Thumm, T. Ölschläger, and V. Braun. 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(1):75–82, Jul 1988.
- [130] B. Torres, S. Jaenecke, K. N. Timmis, J. L. García, and E. Díaz. A dual lethal system to enhance containment of recombinant micro-organisms. *Microbiology*, 149(Pt 12):3595–3601, Dec 2003.
- [131] F. J. van der Wal, J. Luirink, and B. Oudega. Bacteriocin release proteins: mode of action, structure, and biotechnological application. *FEMS Microbiol Rev*, 17(4):381–399, Dec 1995.
- [132] F. J. van der Wal, C. M. ten Hagen-Jongman, B. Oudega, and J. Luirink. Optimization of bacteriocin-release-protein-induced protein release by *Escherichia coli*:

- extracellular production of the periplasmic molecular chaperone FaeE. *Appl Microbiol Biotechnol*, 44(3-4):459–465, Dec 1995.
- [133] I. R. Vetter, M. W. Parker, A. D. Tucker, J. H. Lakey, F. Pattus, and D. Tsernoglou. Crystal structure of a colicin N fragment suggests a model for toxicity. *Structure*, 6(7):863–874, Jul 1998.
- [134] M. Wiener, D. Freymann, P. Ghosh, and R. M. Stroud. Crystal structure of colicin Ia. *Nature*, 385(6615):461–464, Jan 1997.
- [135] M. R. Wormald, A. R. Merrill, W. A. Cramer, and R. J. Williams. Solution NMR studies of colicin E1 C-terminal thermolytic peptide. Structural comparison with colicin A and the effects of pH changes. *Eur J Biochem*, 191(1):155–161, Jul 1990.
- [136] K. Zeth, C. Römer, S. I. Patzer, and V. Braun. Crystal structure of colicin M, a novel phosphatase specifically imported by *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, Jul 2008.
- [137] G. Zhang, S. Brokx, and J. H. Weiner. Extracellular accumulation of recombinant proteins fused to the carrier protein YebF in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 24(1):100–104, Jan 2006.

Publikationen

- 2011 **Expression, purification and crystallization of the Cmi immunity protein from *Escherichia coli***
C. Römer, S.I. Patzer, R. Albrecht, K. Zeth and V. Braun
Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications
- 2008 **Crystal structure of colicin M, a novel phosphatase specifically imported by *Escherichia coli***
K. Zeth, C. Römer, S.I. Patzer and V. Braun
Journal of Biological Chemistry
- 2008 **Periplasmic chaperone FkpA is essentiell for imported Colicin M toxicity**
J. Hullmann, S.I. Patzer, C. Römer and V. Braun
Molecular Microbiology

