



JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ

**EIGENSCHAFTEN HETEROTYPISCH  
INTERAGIERENDER TRANSMEMBRANHELICES  
ERMITTELT DURCH DEN EINSATZ EINER  
KOMBINATORISCHEN DNS-BIBLIOTHEK**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

**Dominik Steindorf**

geb. am 20. 10. 1981 in Wiesbaden

Mainz, Februar 2015

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2015

# 1 Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung .....	3
1.1 Die biologische Membran .....	3
1.2 Membranproteine .....	6
1.3 Faltung von Membranproteinen.....	9
1.4 Insertion von Membranproteinen.....	10
1.5 Interaktion transmembraner $\alpha$ -Helices.....	11
1.6 Interaktionsmotive in Transmembranproteinen.....	14
1.7 Detektion der Interaktion von Membranproteinen .....	16
1.8 Ziele dieser Arbeit .....	21
2 Materialien.....	23
2.1 Chemikalien und Lösungsmittel .....	23
2.2 Lösungen .....	23
2.3 Puffer.....	24
2.4 Enzyme .....	24
2.5 Nährmedien .....	25
2.6 Komplettsysteme ( <i>Kits</i> ) .....	26
2.7 <i>E. coli</i> -Stämme.....	27
2.8 DNS-Oligomere .....	27
2.8.1 DNS-Primer zur PCR.....	27
2.8.2 DNS-Primer zur ortsgerichteten Mutagenese .....	28
2.8.3 DNS-Oligomere zur Erstellung einer DNS-Bibliothek .....	28
2.8.4 DNS-Oligomere zur Erstellung von doppelsträngigen DNS-Kassetten ( <i>in vitro annealing</i> ) .....	29
2.8.5 Plasmide.....	30
2.8.6 DNS-Größenstandards für Agarosegele .....	32
2.8.7 Plasmidlösung der DNS-Pseudobibliothek.....	33
2.9 Geräte und Apparaturen.....	34
2.10 EDV-Programme.....	34
3 Methoden .....	36
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	36
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	36

---

3.1.2	TA-Klonierung.....	37
3.1.3	Herstellung kurzer doppelsträngiger DNS-Kassetten ( <i>In vitro annealing</i> ).....	38
3.1.4	Ergänzung eines DNS-Einzelstranges zum Doppelstrang.....	38
3.1.5	Erstellung von doppelsträngiger DNS mit glatten Enden.....	39
3.1.6	Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen.....	39
3.1.7	Dephosphorylierung von DNS.....	40
3.1.8	Reinigung von Restriktions-, PCR- und T4 DNS-Polymerase enthaltenden Ansätzen ...	40
3.1.9	Agarosegele zur Auftrennung von DNS-Strängen.....	40
3.1.10	Extraktion von DNS aus Agarosegelen .....	41
3.1.11	Konzentrationsbestimmung von DNS.....	41
3.1.12	Ligation von DNS-Fragmenten bei Klonierungen (generell) .....	41
3.1.13	Ligation von DNS-Fragmenten zur Erstellung der DNS-Bibliothek.....	42
3.1.14	DNS-Fällung.....	43
3.1.15	Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNS .....	43
3.2	Mikrobiologische Methoden.....	45
3.2.1	Substanzen in der mikrobiologischen Kultur.....	45
3.2.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	45
3.2.3	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen .....	46
3.2.4	Transformation durch Hitzeschock .....	46
3.2.5	Transformation durch Elektroporation .....	46
3.2.6	Transformation durch Elektroporation bei der Erstellung der DNS-Bibliothek .....	47
3.2.7	Mini-, Midi- und Maxipräparation .....	47
3.2.8	Der <i>malE</i> -Komplementationstest .....	48
3.3	Biochemische Methode .....	49
3.3.1	Der $\beta$ -Galactosidase-Test .....	49
3.4	Konstruktion der Plasmide des Systems zur Detektion der Interaktion transmembraner Helices.....	50
3.5	Konstruktion der Plasmide der DNS-Bibliothek.....	56
4	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>58</b>
4.1	Eigenschaften und Funktionsweise des entwickelten Reportersystems .....	58
4.2	Kontrollen.....	62
4.3	IPTG-Titration.....	64
4.4	Interaktion transmembraner Helices des <i>E. coli</i> -Aquaglyceroporins GlpF .....	66
4.5	Erstellung der DNS-Bibliothek .....	70
4.6	Durchführung des Screeningverfahrens .....	72
4.7	Verifizierung des Selektionsschrittes.....	76

---

4.8	DNS-Pseudobibliothek.....	76
4.9	Screening nach heterotypisch interagierenden Transmembrandomänen .....	79
4.10	Aminosäurereste an der Helix-Helix-Kontaktfläche in geringer Entfernung.....	87
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>91</b>
5.1	Aufbau des Systems.....	91
5.1.1	Kopienzahl der Plasmide .....	91
5.1.2	Vergleich des Reportersystems mit anderen Systemen .....	92
5.1.3	Unterschiede bei Interaktionsmessung und Screeningverfahren .....	96
5.2	IPTG-Konzentration und der Selektionsschritt des Screeningverfahrens.....	99
5.3	Interaktion der GlpF-Transmembranhelices .....	100
5.4	Screening nach heterotypisch interagierenden Transmembranhelices: Vorkommen und Verteilung der Aminosäurereste an der Helix-Helix-Kontaktfläche .....	105
5.4.1	Glycin.....	105
5.4.2	Serin .....	107
5.4.3	Alanin .....	109
5.4.4	Glycin, Serin, Alanin und das [klein]xxx[klein]-Motiv .....	110
5.4.5	Phenylalanin.....	112
5.4.6	Arginin.....	113
5.4.7	Cystein .....	114
5.4.8	Prolin .....	115
5.4.9	Valin, Isoleucin und Leucin .....	116
5.4.10	Threonin .....	117
5.4.11	Resümee .....	118
5.5	Aminosäurereste an der Helix-Helix-Kontaktfläche in geringer Entfernung.....	119
5.6	Aussagekraft der Ergebnisse.....	122
5.7	Fazit und Ausblick .....	123
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
6.1	Abkürzungen, generell.....	125
6.2	Abkürzungen DNS-Basen.....	127
6.3	Aminosäuren (Abkürzung, Ein-Buchstaben-Code) .....	128
<b>7</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>143</b>
<b>9</b>	<b>Veröffentlichungen und Präsentationen .....</b>	<b>162</b>

<b>10 Danksagung .....</b>	<b>163</b>
<b>11 Lebenslauf.....</b>	<b>164</b>

# 1. Zusammenfassung

Membranproteine sind für Medizin und Forschung von großer Bedeutung. Allerdings gestaltet sich die Forschung an diesen Proteinen oft umständlich und schwierig. Da Membranproteine nur in geringem Maße wasserlöslich sind, können konventionelle biochemische Methoden zur Proteinanalyse nur begrenzt Anwendung finden. Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Reportersystem entwickelt, das zur Analyse von transmembranen Proteinen eingesetzt werden kann. Das System ermöglicht die Untersuchung von Interaktionstendenzen transmembraner, helicaler Proteinelemente in der biologischen Membran des Bakteriums *Escherichia coli*. Interaktionen transmembraner  $\alpha$ -Helices sind bei der Signalweiterleitung über die zelluläre Membran von Bedeutung. So spielt beispielsweise bei vielen membranständigen Rezeptoren die Zusammenlagerung von einzelnen Einheiten zu Oligomeren für den Informationsfluss eine wichtige Rolle. Auch für die Faltung von Membranproteinen sind Interaktionen transmembraner  $\alpha$ -Helices relevant.

Eine Validierung des Reportersystems wurde durch gezielte Untersuchungen an dem bakteriellen Aquaglyceroporin GlpF vorgenommen. Bereits vorliegende Strukturdaten für GlpF ließen eine Interaktion der Helices 1 und 2 sowie 1 und 4 des Kanals vermuten, was mit Hilfe des entwickelten Reportersystems bestätigt werden konnte. Eine moderate Interaktionstendenz konnte für beide Helix-Helix-Paarungen festgestellt werden. In der weiterführenden Anwendung des Systems wurden die Eigenschaften der Helix-Helix-Kontaktfläche von heterotypisch interagierenden Transmembranhelices in Bezug auf deren Aminosäurekomposition betrachtet. Dazu wurde zunächst eine auf Plasmiden basierende, kombinatorische DNS-Bibliothek angelegt, die für transmembrane Helices mit zufällig auftretenden Aminosäureresten codierte. Die Anordnung der variablen Seitenketten erfolgte so, dass in Verbindung mit dem Reportersystem eine Helix-Helix-Kontaktfläche randomisierter Aminosäurereste generiert wurde. Um Paare interagierender Helices zu erhalten, wurde ein Selektionsdruck auf *E. coli*-Zellen erzeugt, in denen die Expression der Transmembranhelices erfolgte. Nur in Zellen mit interagierenden Helices kam es zu einer Aktivierung von Stoffwechselgenen, die das Wachstum in einem Minimalmedium gestattete. Infolge konnten Aminosäurereste und Interaktionsmotive identifiziert werden, die für heterotypische Interaktionen von  $\alpha$ -Helices in Membranen eine bedeutende Rolle

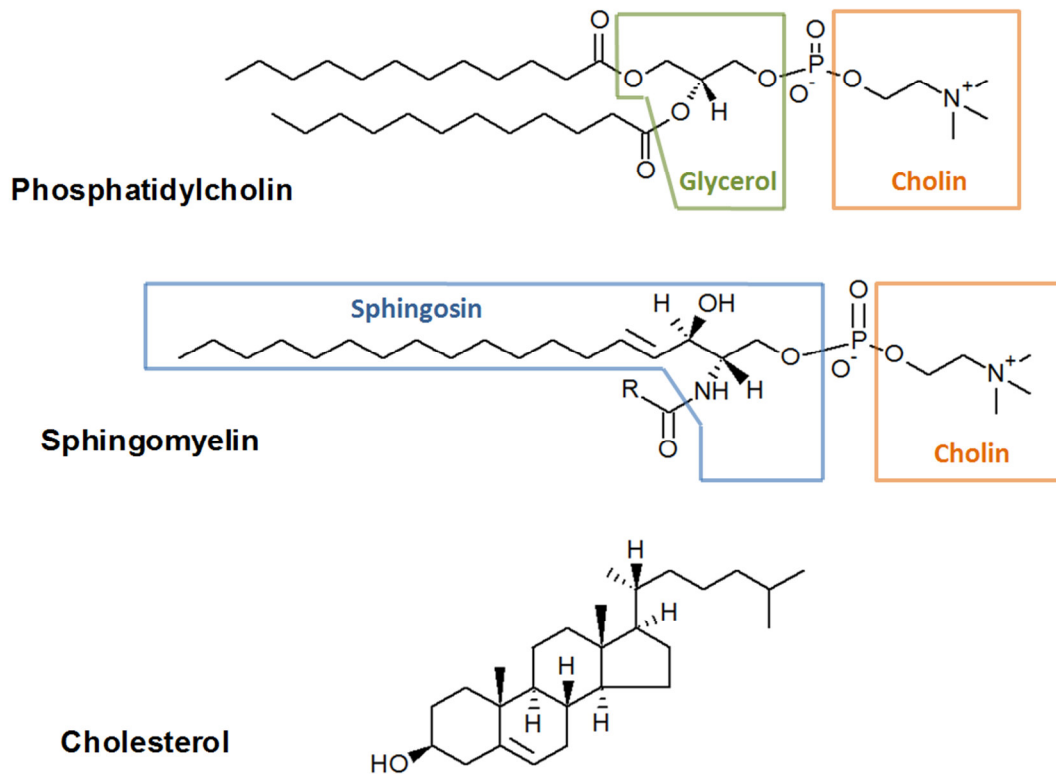
spielen. Den höchsten Grad an Überrepräsentation an der Helix-Helix-Kontaktfläche zeigten Glycinseitenketten. Weiterhin überrepräsentiert waren Phenylalanin-, Cystein- und Alaninreste. Auch zeigte sich sowohl die Bedeutung des aus dem humanen Glycophorin A (GpA) bekannten Aminosäure-Sequenzmotivs GxxxG, als auch die des Interaktionsmotivs [klein]xxx[klein], in dem Glycin-, Alanin- oder Serinreste in Positionen getrennt durch drei unbestimmte Seitenketten enthalten sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei der Ausbildung eines Helix-Helix-Dimers bestimmte Seitenketten häufiger als andere helixübergreifend in geringer Distanz zueinander auftraten. Hierbei hob sich in besonderem Maße die Paarung Glycin/Glycin hervor. Auch konnten die Paarungen Glycin/Cystein und Phenylalanin/Phenylalanin häufig vorgefunden werden. Darüber hinaus weist das häufige Auftreten von Glycinresten in geringer Distanz auf ein neuartiges Interaktionsmotiv hin. Anders als beim GxxxG-Motiv sind hierbei zwei Glycinreste nicht innerhalb einer Helix, sondern in zwei verschiedenen, interagierenden Transmembranhelices in geringem Abstand zueinander lokalisiert. Die Anwesenheit dieser kurzen Seitenketten in bestimmten Positionen könnte, ähnlich wie das GxxxG-Motiv, den Abstand zweier Helices zueinander verringern und so interhelicale Wechselwirkungen anderer Seitenketten begünstigen.



## 2. Einleitung

### 1.1 Die biologische Membran

Ohne biologische Membranen wäre das Leben, wie wir es kennen, kaum denkbar. Sie grenzen das Zellinnere vom umgebenden Milieu ab und sind wichtiger Bestandteil eukaryotischer Zellorganellen wie dem Endoplasmatischen Retikulum, dem Zellkern, den Chloroplasten und Mitochondrien, dem Golgi-Apparat sowie Vakuolen. Biologische Membranen bilden eine Barriere für ionische und polare Substanzen. Ihre Zusammensetzung basiert auf Lipid-, Protein- und Kohlehydratkomponenten. Schon vor etwa 90 Jahren wurde der grundsätzliche Aufbau der Lipidschicht beschrieben [1]. Lipide mit amphiphilem Charakter bilden eine Doppelschicht, wobei sich deren unpolare Fettsäurereste nach innen richten und von nicht-kovalenten Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Die polaren Kopfgruppen der Lipide hingegen sind zum wässrigen Milieu des Zellinneren und -äußeren bzw. zum Organellinneren hin orientiert. Der hydrophobe Kern der Lipiddoppelschicht misst etwa 30 Å von einer Seite zur andern, die Kopfgruppen an beiden Seiten sind etwa je 15 Å dick [2, 3]. Die bedeutendsten Lipide in eukaryotischen Membranen sind die Glycerophospholipide. Neben Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin ist Phosphatidylcholin (siehe auch Abb. 1) mit einem Anteil von über 50% der häufigste Vertreter in den meisten eukaryotischen Lipiddoppelschichten [4]. Des Weiteren enthalten Membranen Sphingolipide, welche nicht wie Glycerophospholipide auf Glycerol, sondern auf dem Aminoalkohol Sphingosin basieren. Sphingolipide können auch durch Saccharide modifiziert sein und werden dann als Glycosphingolipide bezeichnet [4]. Eine weitere Komponente der Membran sind die Sterole. Cholesterol stellt in Eukaryoten das häufigste Sterol dar, im Gegensatz zu bakteriellen Cytoplasmamembranen, in denen es überhaupt nicht vorkommt. Auch weisen bakterielle Membranen eine geringere Diversität bezüglich der Lipidkomposition auf: Die Anzahl verschiedener Phospholipide ist generell geringer als bei Eukaryoten [5]. Die innere Membran des Bakteriums *E. coli* setzt sich zum größten Teil aus den drei Glycerophospholipiden Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Cardiolipin zusammen. Des Weiteren kommen auch noch andere Lipide vor, jedoch in wesentlich geringeren Konzentrationen [6]. Lipiddoppelschichten zeigen in Zellen einen asymmetrischen Charakter. So tritt in der zur extrazellulären Seite orientierten Lipidschicht

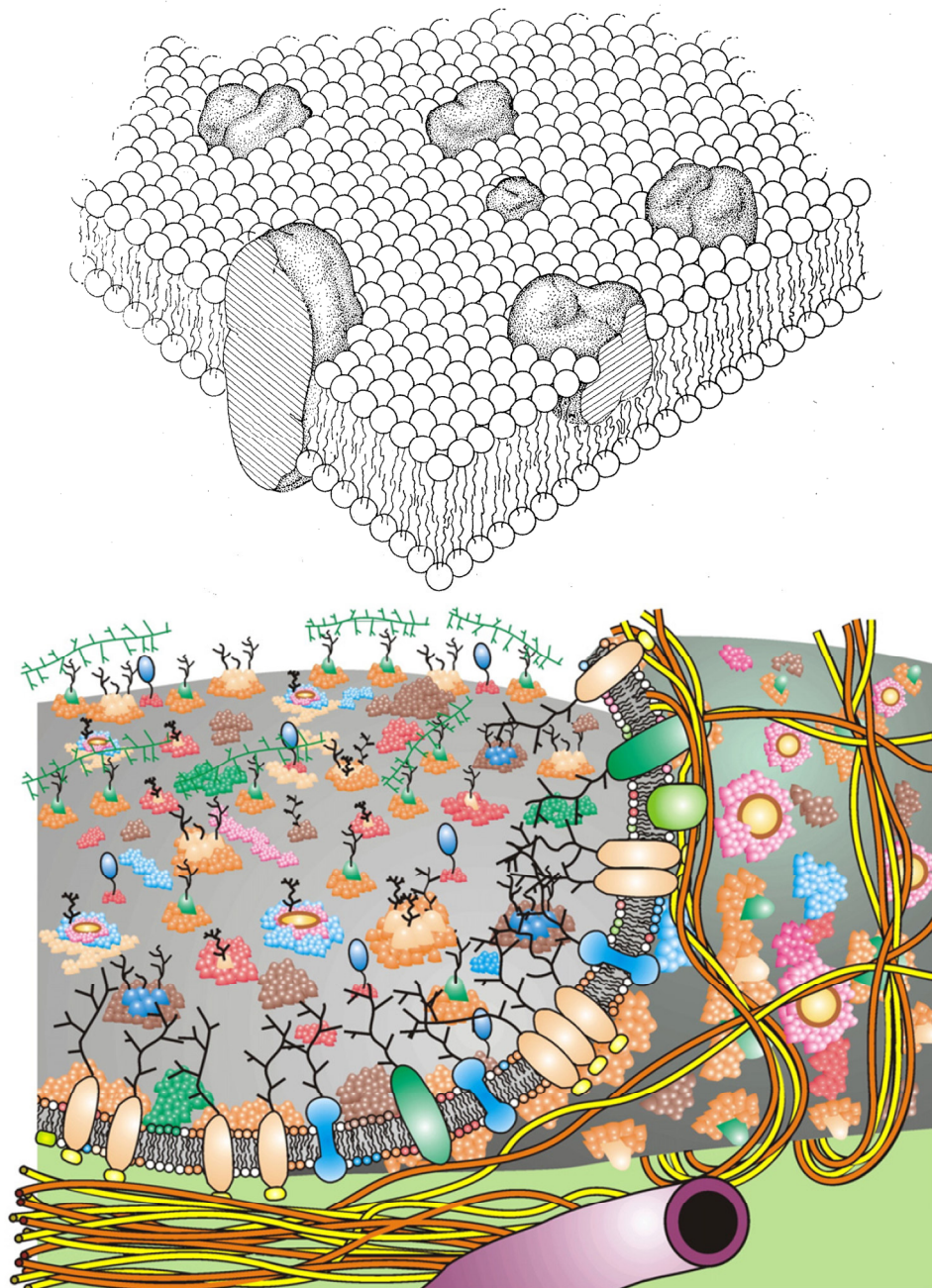


**Abb. 1: Wichtige Komponenten in biologischen Membranen.** Oben: Phosphatidylcholin, hier gezeigt mit zwei Laurin-Fettsäureresten. Mitte: Sphingomyelin mit Fettsäurerest (R) in undefinierter Länge. Unten: Cholesterol.

der Cytoplasmamembran eine andere Zusammensetzung von Lipiden auf, als bei der dem Cytoplasma zugewandten Seite [4, 7].

Neben Lipiden bestehen biologische Membranen zu einem beachtlichen Teil aus Proteinen. Der Proteingehalt beträgt typischerweise etwa 50% des Membranvolumens [8]. Je nach Membran- und Zelltyp kann der Proteingehalt variieren: So enthält die mitochondriale Membran mit 82 % einen wesentlich höheren Proteingehalt als die lipidreiche Schicht um die Myelinscheide, die Axone von Wirbeltier-Nervenzellen umschließt. In diesen Strukturen wurde ein Proteingehalt von deutlich unter 50% gefunden [9, 10].

Im Jahr 1972 wurde das Flüssig-Mosaik-Modell (*Fluid-Mosaik-Model*) vorgeschlagen, welches die Organisation von Lipiddoppelschichten in Zellen erklären sollte [11]. Es beschreibt eine Lipid-Matrix (siehe Abb. 2, oben), in der sich die Lipidmoleküle wie eine



**Abb. 2: Das Flüssig-Mosaik-Modell.** Oben: Klassisches Modell von 1972. Die dunklen Körper stellen zufällig verteilte, integrale Membranproteine dar, die in die Lipiddoppelschicht (weiße Kugeln symbolisieren die Kopfgruppen) eingebettet sind. Proteine und Lipidmoleküle können auf lateraler Ebene frei Diffundieren (entnommen aus [11]/From [11]. *Reprinted with permission from AAAS*). Unten: Ein aktualisiertes Modell von G. L. Nicolson, (entnommen aus [12]). Verschiedene Farben symbolisieren verschiedene Lipide, Membranproteine oder Oligosaccharide. Gelbe und orange Filamente stellen das Cytoskelett im Inneren der Zelle dar, welches Membranproteine in ihrer lateralen Bewegung einschränken kann. Es sind Anhäufungen von Lipiden in Form von Mikrodomänen dargestellt. Kohlehydratketten von Glycoproteinen sind durch schwarze, verästelte Strukturen zum äußeren Milieu hin angedeutet und die Bildung von Komplexen dieser modifizierten Proteine (unten links und mittig) sowie Polysaccharid-Glycoprotein-Komplexe (oben links) sind illustriert.

Flüssigkeit in zweidimensionaler Ausdehnung verhalten und laterale Diffusion sowie freie Rotation der Lipide möglich ist. In diese Matrix sind die membranständigen Proteine eingebettet, die ebenso der freien Bewegung in der Membran befähigt sein sollen [13]. Seither wurden viele neue Erkenntnisse bezüglich Membranproteinen und Lipiddoppelschichten gewonnen, welche in die Diskussion über den detaillierten Aufbau und die Dynamik von Membranen einfließen [12-14]. Es wurden Strukturen erkannt, welche auf einen höheren Ordnungsgrad der eukaryotischen Membran hinweisen. So konnte gezeigt werden, dass Elemente des Cytoskeletts die freie Diffusion von integralen Membranproteinen einschränken können [15]. Das angepasste, aktuelle Flüssig-Mosaik-Modell von G. L. Nicolson [12] (siehe auch Abb. 2, unten) beschreibt, dass Actinfilamente des Cytoskeletts an integrale Membranproteine binden, die dabei die Funktion von Zaunpfählen (*fenceposts, pickets*) innehaben. Diese Proteine sind durch die Filamente so verbunden, dass eine Vernetzung entsteht, die die laterale Bewegung anderer membrangebundener Proteine begrenzen kann. Auch kann die Bildung von Proteinkomplexen zu einer Einschränkung der freien Bewegung führen: Oligosaccharide können Glycoproteine über deren Zuckerreste verbinden und somit deren laterale Bewegung hemmen [12]. Ferner konnten Hinweise für die Existenz von Mikrodomänen in Membranen gefunden werden, welche für deren Heterogenität sprechen. *Lipid rafts* benannte Domänen zeichnen sich durch eine veränderte Lipidkomposition im Vergleich zu ihrer Umgebung aus; der Gehalt an Sphingolipiden und Sterolen ist in diesen Bereichen erhöht [16, 17] und bestimmte transmembrane und membranverankerte Proteine sind mit diesen Strukturen assoziiert [17-19], was einer freien Diffusion dieser Proteine entgegensteht. Jedoch ist die Rolle der *lipid rafts* noch nicht im Detail verstanden und bleibt kontrovers diskutiert [16, 20, 21].

## 1.2 Membranproteine

Membranproteine sind von großer Bedeutung für alle Bereiche des Lebens. Sie sind mit Membranen von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren assoziiert und nehmen eine wichtige Rolle beim Informationsfluss vom äußeren Milieu in das Innere der Zelle sowie beim Stofftransport über die Membran ein. Etwa ein Viertel des menschlichen Proteoms codiert für Membranproteine, was über 5500 Genen entspricht [22, 23]. Die hohe Relevanz dieser Proteine für Medizin und Forschung zeigt sich im Zusammenhang mit Wirkmechanismen von Medikamenten: Membranproteine sind Ansatzpunkt für etwa 60 %

der sich auf dem Markt befindenden Pharmazeutika [22, 24]. Man unterscheidet verschiedene Arten von membranassoziierten Proteinen: Periphere (oder extrinsische) Membranproteine binden meist durch elektrostatische Interaktionen mit den geladenen Kopfgruppen der Lipidschicht oder anderen Membranproteinen an die Oberfläche der Membran. Sie können durch spezielle Methoden leicht von der Membran abgetrennt werden. Integrale (oder intrinsische) Membranproteine sind in die Membran eingebettet und können nur mit einhergehender Zerstörung der Membran isoliert werden. Sie können die Lipiddoppelschicht einfach oder mehrfach durchspannen und werden dementsprechend als bitopische oder polytopische Membranproteine bezeichnet. Monotopische Membranproteine hingegen sind in die Membran eingebettet, durchspannen diese jedoch nicht in ihrer Gesamtheit. Lipid-verankerte Proteine – integrale oder periphere – sind über die Lipide kovalent mit der Membran verbunden. Dabei können sie mit Farnesyl-, Geranyl-, Myristoyl- oder Palmitoylresten modifiziert und verankert sein. Solche Verankerungen lassen sich bei Proteinen finden, die auf der intrazellulären Seite mit der Membran verbunden sind und sich somit im Zellinneren befinden. Membranassoziierte Proteine, die auf der extrazellulären Seite der Membran lokalisiert sind, können durch einen Glycosylphosphatidylinositolanker (GPI-Anker) mit der Lipiddoppelschicht verbunden sein [25].

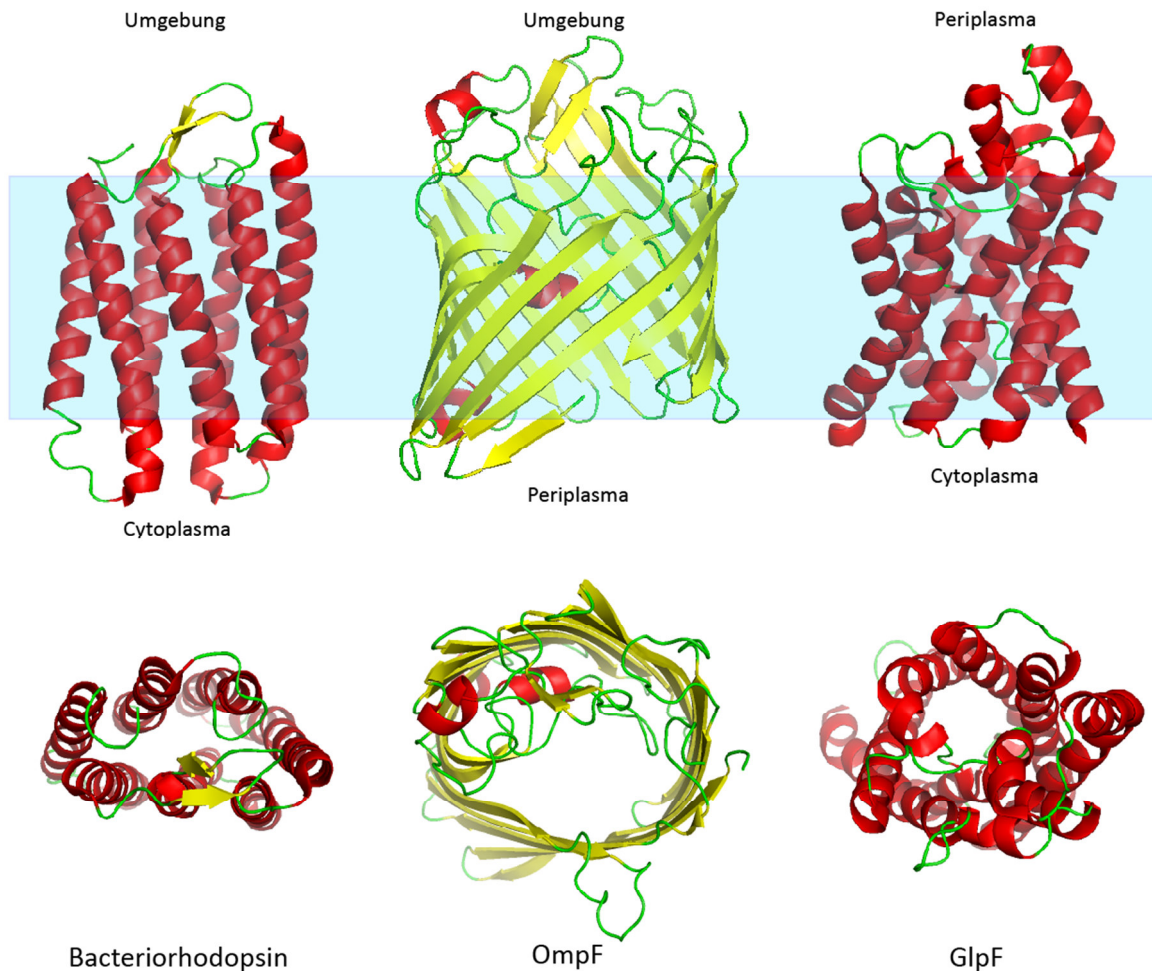
Membranproteine sind durch ihre Sekundärstruktur gekennzeichnet. Oftmals sind es  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter, die die Membran durchspannen und so das Protein verankern. Es kann sich dabei, wie im Fall eines bitopischen Transmembranproteins, um eine einzelne Helix handeln oder, bei einem polytopischen, um mehrere Helices. In der Lipiddoppelschicht können  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter Supersekundärstrukturen bilden. Ein Beispiel ist das polytopische Membranprotein Bacteriorhodopsin aus dem extremophilen Prokaryoten *Halobacter salinarum* [26-28]. Dieses Protein besteht aus einem zusammengelagerten Bündel von sieben  $\alpha$ -Helices und dient der Erzeugung eines Protonengradienten durch Licht und somit der Energiegewinnung. Ein weiteres Beispiel ist der Glyceroltransporter GlpF aus *E. coli*, der sich ebenfalls aus  $\alpha$ -helicalen Elementen zusammensetzt und zur Familie der Aquaporine gehört [29, 30]. So besteht ein GlpF-Monomer aus sechs Helices, welche die Membran komplett durchspannenden, und zwei kürzeren Helices, die sich nur etwa über die Hälfte der Membrandicke erstrecken. Es konnte gezeigt werden, dass der Kanal in tetramerer Form kristallisiert [31] und es gibt Hinweise auf eine *in vivo*-Oligomerisierung des Membranproteins [32]. Das primäre

Substrat des Kanals ist Glycerol, jedoch können auch lineare Polyalkohole (Alditole) durch GlpF transportiert werden.

In transmembranen Proteinen können sich  $\beta$ -Faltblätter zu  $\beta$ -Fässern zusammenlagern und so Kanäle bilden, die die Membran durchspannen. Dabei befinden sich tendenziell – bedingt durch die Tertiärstruktur des Proteins – unpolare Seitenketten an der Außenseite des  $\beta$ -Fasses und kommen mit der Umgebung der Lipidmembran in Kontakt. Polare Seitenketten hingegen sind im wässrigen Milieu des Fassinneren zu finden. Ein Beispiel für Membranproteine in  $\beta$ -Fass-Form ist die Omp-Proteinfamilie, deren Mitglieder beispielsweise in der äußeren Membran von *E. coli* zu finden sind [33]. Die Strukturen der drei oben vorgestellten Membranproteine sind in Abb. 3 veranschaulicht.

Neben den membranständigen Transportproteinen sind Membranrezeptoren von großer Bedeutung; sie nehmen eine Schlüsselposition in der Weiterleitung von Signalen über die Membran ein. Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) stellen die größte Superfamilie von membranständigen Rezeptoren dar. Meist werden sie durch Ligandenbindung aktiviert und leiten – bis auf wenige Ausnahmen in Fällen von direkter Aktivierung von Ionenkanälen – Signale über G-Proteine und sekundäre Botenstoffe (*second messenger*) wie cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) weiter. Allen Rezeptoren der GPCR-Familie sind sieben membrandurchspannende Helices gemein. Obgleich diese Familie im menschlichen Organismus mit über 800 Mitgliedern eine hohe Diversität aufzeigt [34], sind bitopische Transmembranproteine weitaus häufiger anzutreffen als jede polytopische Variante mit zwei oder mehr transmembranen Abschnitten [22]. Beinahe 50% der vom menschlichen Genom codierten Transmembranproteine sind bitopisch, wobei der Anteil bei weniger komplex organisierten Lebensformen jedoch geringer ist und beispielsweise bei *E. coli* nur etwa 15 % beträgt [35]. Ein Beispiel für ein bitopisches, membranständiges Protein ist GpA, welches in der Membran von roten Blutzellen vorkommt. Durch die Glycosylierung des Proteins wird die Blutzelle von einer Hülle aus geladenen, hydrophilen Zuckerverbindungen umgeben, die verhindern, dass die Zelle an Gefäßwänden oder anderen Blutzellen adhärirt.

Der Vollständigkeit halber sei hier noch die Wichtigkeit membranständiger Enzyme, wie beispielsweise die der Atmungskette, erwähnt. Auf diese soll hier jedoch nicht näher eingegangen werden.



**Abb. 3: Integrale Membranproteine.**  $\alpha$ -helicale Elemente (rot),  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (gelb) und Schleifen (grün) in schematischer Darstellung. Oben: Seitenansicht; das hellblaue Feld symbolisiert die Membran. Unten: Aufsicht, jeweils in Richtung des Zellinneren. Links: Bacteriorhodopsin aus *H. salinarum* ([36], Strukturdaten: RCSB Proteindatenbank-Identifikationsnummer: 1FBB). Mitte: OmpF-Porin in periplasmatischer Membran von *E. coli*. ([37], 2ZFG). Rechts: Glycerol-Transportprotein GlpF der cytoplasmatischen Membran von *E. coli* ([31], 1FX8).

### 1.3 Faltung von Membranproteinen

Zu Beginn der 1980er Jahre wurde die Hypothese aufgestellt, dass gefaltete Sekundärstrukturen, wie etwa zwei durch eine Haarnadelschleife (*hairpin loop*) verbundene  $\alpha$ -Helices, einfacher in das unpolare Milieu einer Lipiddoppelschicht eindringen können als das entsprechende, gänzlich ungefaltete Polypeptid [38]. Diese Hypothese wurde in das Zwei-Stufen-Modell (*two stage model*) übernommen [39, 40]. Stufe I dieses Modells beinhaltet die Einlagerung von durch Schleifen verbundenen, *per se* stabilen  $\alpha$ -Helices in eine Membran. Dieser Vorgang wird durch den hydrophoben Effekt begünstigt. In der zweiten Stufe lagern sich die Helices zusammen, um letztendlich das

fertig gefaltete Protein zu bilden. Bei diesem Prozess spielen diverse Faktoren eine Rolle, die für Interaktion von Helices transmembraner Proteine von Bedeutung sind. Dazu zählen Van der Waals-Wechselwirkungen, die durch eine enge Packung der Seitenketten eines Helix-Helix-Dimers verstärkt werden. Auch Wasserstoffbrücken- und Ionenbindungen, sowie aromatische Interaktionen können zur Stabilisierung von interagierenden Helices beitragen. Ebenfalls von Bedeutung sind extra- oder intrazelluläre Schleifen, die bei der Proteinstabilisierung eine wichtige Rolle spielen können. Dies wurde für die polytopischen Transmembranproteine Bakteriorhodopsin und Rhodopsin in ausführlichen Studien gezeigt [41]. Das zwei-Stufen-Modell wurde in den Jahren nach seiner Postulierung erweitert, um die Insertion von Helices in die Membran detaillierter zu beschreiben. Dabei werden die Stufen in weitere Schritte unterteilt: Zunächst erfolgt die Anlagerung der ungefalteten Polypeptidkette an die Oberfläche der Membran. Daraufhin bilden sich Sekundärstrukturen aus, während die Peptidkette noch an der Membranoberfläche lokalisiert ist. Das Polypeptid wird dann in die Membran inseriert und infolge findet die Zusammenlagerung der transmembranen Helices statt. Dieser Schritt kann weiterhin in die Dimerisierung zweier Helices und die darauf folgende Faltung des gesamten Proteins unterteilt werden. Für die Dimerisierung und Faltung spielen laterale Interaktionen von helicalen Elementen eine wesentliche Rolle [42-44].

#### **1.4 Insertion von Membranproteinen**

Der Prozess der Proteininsertion in die Membran steht in Zusammenhang mit einem Translokationskomplex (auch „Translokon“), welcher neben der Insertion auch am Proteintransport über die Membran beteiligt ist. In Eukaryoten bildet der Translokationskanal Sec61 in der Membran des Endoplasmatischen Reticulums das zentrale Element des Translokons. Der eukaryotische Translokationskomplex besteht neben dem Kanal noch aus weiteren Proteinkomplexen wie beispielsweise dem Oligosaccharyltransferase-Komplex, der an der cotranslationalen Glycosylierung von Proteinen beteiligt ist [45]. Proteine, die in die Membran inseriert oder auch über diese hinweg transportiert werden sollen, werden während der Translation beim Austritt aus dem Ribosom von dem Signalerkennungspartikel SRP (*signal recognition particle*) erkannt. Dieser Riboproteinkomplex bindet an eine hydrophobe Signalsequenz der neusynthetisierten Peptidkette und sorgt so für den Transport zum Translokon. An der Membran wird das Protein weiter synthetisiert und mit Hilfe des Translokons in die



Membran inseriert [46]. Ein weiterer Weg für die Insertion von Membranproteinen wurde mit dem GET (*guided entry of tail-anchored proteins*) -Weg in Eukaryoten gefunden. Hierbei erfolgt eine posttranslationale Insertion des Membranproteins. Nach der Translation wird das Protein zunächst über die hydrophobe, transmembrane Domäne an einen Proteinkomplex im Cytosol gebunden. In Hefezellen erfolgt der Transport dieses Komplexes einschließlich der synthetisierten Polypeptidkette über das dimere Get3-Protein zum membranständigen Get1/Get2-Komplex. Im Anschluss kommt es zur Insertion des Proteins in die Membran des Endoplasmatischen Reticulums [47, 48]. In Säugerzellen läuft der Vorgang ähnlich ab, jedoch unterliegen die entsprechenden Proteine einer anderen Namensgebung [47]. Des Weiteren wurden in Mitochondrien und Plastiden Membranproteine gefunden, welche die Funktion von Insertasen besitzen. Sie werden als Oxa1 bzw. Alb3 bezeichnet und sind relevant bei der Insertion von Proteinen in die innere Membran dieser Organellen [49, 50]. Auch in Prokaryoten existieren mit SecYEG in Eubakterien und SecYE $\beta$  in Archaeen entsprechende Translokationskomplexe, die für die Insertion und den Export von Proteinen eine zentrale Rolle spielen. Diese Komplexe sind dort mit der cytoplasmatischen Membran assoziiert. Ein weiteres System in bakteriellen Zellen, welches bei der Insertion von Proteinen in die Cytoplasmamembran eine Rolle spielt ist das YidC-System. So kann das membranständige Protein YidC in Zusammenhang mit dem Sec-System, und auch selbstständig, zum Prozess der Insertion beitragen [51, 52]. Das bakterielle Protein YidC und die eukaryotischen Proteine Oxa1 sowie Alb3 sind homolog und ähneln sich daher in ihrer Funktion [50]. Eine Insertion von Proteinen in Membranen ist auch durch das Twin-Arginin-Transportsystem möglich. Dieses System kann in der Thylakoidmembran von Chloroplasten oder in Membranen von Prokaryoten gefunden werden [53].

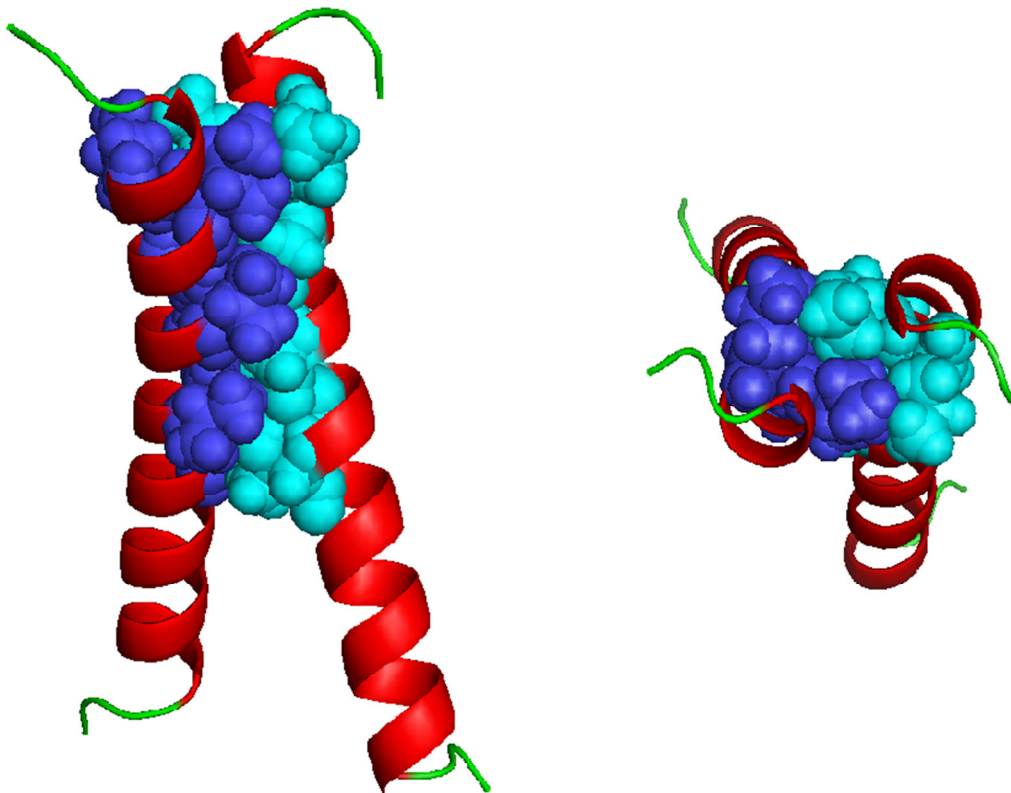
### 1.5 Interaktion transmembraner $\alpha$ -Helices

Wechselwirkungen  $\alpha$ -helicaler Elemente spielen nicht nur bei Faltungsvorgängen polytopischer Transmembranproteine eine wichtige Rolle, sie können auch bei Proteinen mit bitopischem Aufbau beobachtet werden. Schon seit den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurden Studien zur Dimerisierung des humanen GpA durchgeführt [54, 55]. Es konnte gezeigt werden, dass die Transmembrandomäne hierbei eine wichtige Rolle spielt [56]. Durch NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) -Spektroskopie wurde die dreidimensionale Struktur des Dimers aufgeklärt [57] und durch Mutationsstudien konnten

die an der Interaktion beteiligten Aminosäurereste der Transmembrandomäne determiniert werden [58, 59]. Es zeigte sich, dass das Motiv LIxxGVxxGVxxT die Dimerisierung zweier unabhängiger GpA-Monomere ermöglicht. Die sieben an der Interaktion beteiligten Reste liegen an der Helix-Helix-Kontaktfläche des Dimers, wie die NMR-Struktur belegt (siehe Abb. 4). Wie bereits erwähnt, begünstigen Van der Waals-Wechselwirkungen die Interaktionstendenz zweier transmembraner  $\alpha$ -Helices. Dies konnte im Fall des GpA-Dimers beobachtet werden. Besonders die Glycin- und Valinreste stehen in engem Kontakt: Die Valinseitenketten ragen in Vertiefungen der jeweils gegenüberliegenden Helix, die durch die kurzen Glycinreste verursacht worden sind. Bedingt dadurch ergibt sich eine große Fläche für interhelicale Van der Waals-Kontakte, und die Interaktionstendenz der Helices wird gestärkt. Dieses Prinzip wird als *knobs into holes packing* oder auch *ridges into grooves packing* bezeichnet und stellt einen wesentlichen Faktor bei der Interaktion transmembraner Helices dar: Lange Seitenketten der einen Helix ragen in Vertiefungen einer gegenüberliegenden Helix und umgekehrt [42, 44, 60, 61]. Es ergibt sich eine genaue Passform an der Schnittstelle der interagierenden Helices ähnlich dem Schlüssel-Schloss-Prinzip.

Neben den oben beschriebenen Van der Waals-Interaktionen kann auch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen einen Beitrag zu den Wechselwirkungen interagierender  $\alpha$ -Helices in Membranen leisten. Zum einen kennt man Bindungen, die zwischen polaren Resten der Helices entstehen können. Solche sind beispielsweise anhand der Röntgenkristallstruktur von Bakteriorhodopsin zu erkennen [28]. Zum anderen bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen auch zwischen einem an das  $C_{\alpha}$ -Atom des Proteinrückgrats gebundenem Wasserstoffatom und einem anderen Aminosäurerest aus. Diese Art von Wasserstoffbrückenbindung weist im Gegensatz zur zuvor erwähnten eine vergleichsweise niedrige Bindungsenergie auf [62]. Sie lassen sich beispielsweise in den Strukturen der Transmembrandomänen von GpA [63, 64] oder GlpF finden [64].

Auch Ionenbindungen, an deren Ausbildung geladene Seitenketten beteiligt sind, können zur Stabilisierung von Kontakten transmembraner Helices beitragen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei Motiven aus geladenen Seitenketten wie dem *charge zipper* [65].



**Abb. 4: Dimerisierte Transmembrandomäne des humanen GpA** (NMR-Struktur nach MacKenzie *et al.* [57], Strukturdaten: RCSB Proteindatenbank-Identifikationsnummer 1AFO). Die sieben Seitenketten des Interaktionsmotivs LIXXGVXXGVXXT einer Helix sind dunkelblau dargestellt, die der anderen sind cyanblau gefärbt. Links: Seitenansicht. rechts: Aufsicht, in Richtung des Zellinneren. Die Sequenzen beider Domänen wurden an ihren N-terminalen Enden, welche zum Zelläußeren hin orientiert sind, um sieben Aminosäuren gekürzt.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass Interaktionen von Seitenketten mit aromatischen Ringen durch Wechselwirkungen ihrer  $\pi$ -Elektronensysteme ebenfalls zur Stabilisierung von Helix-Helix Kontakten führen können [66-68]. Eine weitere Form der Interaktion ergibt sich aus dem Zusammenspiel von aromatischen Phenylalanin-, Tryptophan- und Tyrosinseitenketten mit den kationischen Arginin- oder Lysinresten. Diese Form der nicht-kovalenten Wechselwirkung trägt ebenfalls zur Stabilisierung von Helix-Helix-Kontakten in Membranen bei [66, 69].

Generell lassen sich Interaktionen transmembraner Elemente in zwei Kategorien einordnen. Zum einen können Kontakte zwischen Helices zur Stabilisierung eines gefalteten Proteins oder eines funktionalen Proteinkomplexes beitragen. Diese Interaktionen sind stark und eher statischer Natur (*static interactions*). Dynamische

Interaktionen (*switchable interactions*) sind tendenziell eher durch schwächere Van der Waals-Interaktionen gekennzeichnet als durch starke zwischenmolekulare Bindungskräfte, die von polaren oder geladenen Resten hervorgerufen werden. Interaktionen dieser Kategorie sind im geringeren Maße für die Stabilisierung von Proteinstrukturen von Bedeutung, vielmehr leisten sie einen Beitrag zur Feinabstimmung von dynamischen Systemen wie beispielsweise bei der Signalweiterleitung durch membranständige Rezeptoren. In diesen Systemen wechseln Membranproteine zwischen verschiedenen Zuständen. Folglich wäre eine zu starke Interaktionstendenz der Transmembrandomänen, welche das System in einem bestimmten Zustand festhält, hinderlich [70, 71].

## 1.6 Interaktionsmotive in Transmembranproteinen

Innerhalb der Lipiddoppelschicht vorkommende Helix-Helix-Dimere unterscheiden sich in ihrem Kreuzungswinkel, der positive oder negative Werte haben kann. Helices mit negativen Kreuzungswinkeln, auch als rechtshändige Paare (*right-handed pairs*) bezeichnet, sind oft durch ein sich wiederholendes Intervall von vier Aminosäuren (*tetrad repeat pattern*) gekennzeichnet [70, 72]. Dies spiegelt sich im bereits erwähnten Interaktionsmotiv LIxxGVxxGVxxT des humanen GpA wider. Die nicht an der Interaktion beteiligten Seitenketten, hier durch den Buchstaben „x“ dargestellt, sind im unpolaren Milieu der Membran lokalisiert. Die an der Interaktion beteiligten Reste, welche in der Sequenz im Einbuchstabencode dargestellt sind, befinden sich an der Kontaktfläche der interagierenden Helices. Die Sequenz zeigt ein vier Aminosäuren umfassendes Intervall bezüglich der interagierenden und nicht interagierenden Reste. Nach der Entdeckung des GpA-Interaktionsmotivs zeigte sich, dass das darin enthaltene Motiv GxxxG eine wichtige Rolle bei der Interaktion rechtshändiger Helix-Helix-Paare spielt: Es ist das bedeutendste und überrepräsentierteste Motiv, das in interagierenden Transmembranhelices identifiziert werden konnte [73, 74]. Eine erweiterte Variante des GxxxG-Motivs ist das [klein]xxx[klein]-Motiv (auch als „GAS<sub>right</sub>“ bezeichnet [72]), in dem nicht nur Glycin-, sondern auch Alanin- und Serinreste mit ihren kurzen Seitenketten vorkommen können. Dieses Motiv ist ebenfalls häufig in interagierenden Transmembranhelices zu finden [70, 72]. Neben dem GpA-Motiv wurden etliche weitere Motive gefunden, die in bitopischen Transmembranproteinen zu Interaktionen beitragen [75]. Oft ist das [klein]xxx[klein]-Motiv darin impliziert, jedoch scheint die Präsenz des Motivs an sich noch nicht auszureichen, um eine Interaktion zweier transmembraner Helices herbeizuführen [76]. So

konnten erweiterte Formen des GxxxG-Motivs gezeigt werden, in denen andere Reste das Motiv ergänzen. Als Beispiele sollen hier das Motiv FxxGxxxG [67] oder die Seitenkette Histidin in Verbindung mit dem GxxxG-Motiv genannt werden [77].

Linkshändige Helixpaare (*left-handed pairs*) in Membranen sind durch positive Kreuzungswinkel gekennzeichnet. Hier zeigt sich, dass ein sich gegebenenfalls auch wiederholendes Intervall von sieben Aminosäuren (*heptad repeat pattern*) die Kontaktfläche interagierender Helices charakterisiert. Diese Matrize zeigt die Form **axxdexg**, wobei die Buchstaben **a**, **d**, **e** und **g** unbestimmte Aminosäurereste symbolisieren, die zur gegenüberliegenden Helix hin orientiert sind und dadurch mit dieser in Interaktion treten können [68, 72, 78]. Interaktionen linkshändiger Helix-Helix-Paare zeigen sich beispielsweise bei Vertretern der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. So lässt die durch NMR-Spektroskopie aufgeklärte Struktur der dimerisierten Transmembrandomäne des Rezeptors FGFR3 ein sich wiederholendes Motiv von sieben Aminosäureresten erkennen [79]. Der Rezeptor PDGFβ, ebenfalls der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen zugeordnet, weist auch ein solches Motiv auf [80]. Auf einer sich wiederholenden Matrize von sieben Aminosäuren basiert auch der Serin-Reisverschluss (*serine-zipper*). Dieser kann in linkshändigen Helix-Helix-Paaren in Form des sich wiederholenden Motivs  $(Sx_6)_n$  enthalten sein und konnte in diversen polytopischen Membranproteinen identifiziert werden [81]. Auch für rechtshändige Helix-Helix-Paare können polare Serinseitenketten von Bedeutung sein. So belegt eine Studie, dass Serinreste in Form des Motivs SxxSSxxT oder SxxxSSxxT zur Homooligomerisierung von bitopischen Transmembranproteinen beitragen können [82]. Bereits das Auftreten eines einzigen polaren Aminosäurerestes in einer artifiziellen, ansonsten nur aus unpolaren Leucinresten bestehenden transmembranen Helix genügt, um eine Interaktion hervorzurufen [83].

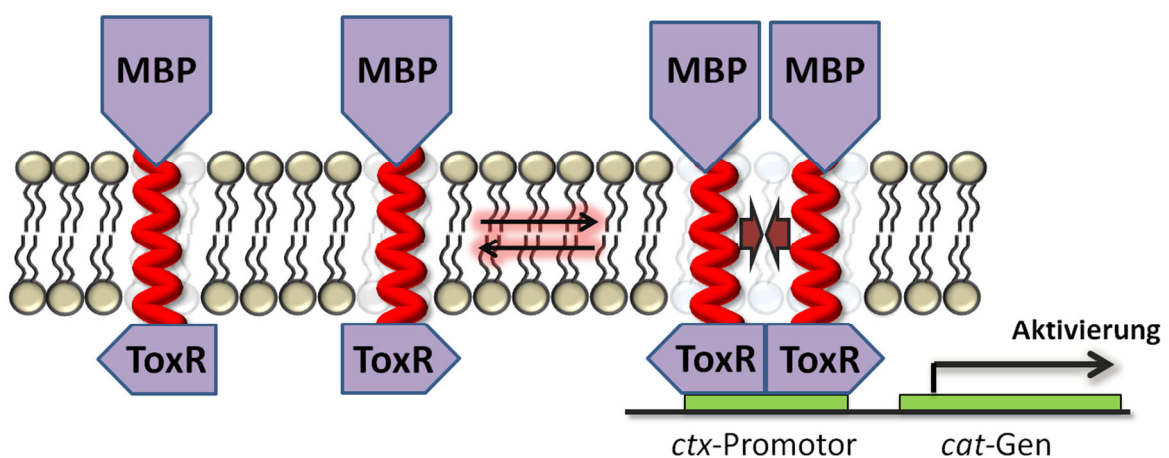
Ein weiteres Interaktionsmotiv, auf das man in jüngster Zeit aufmerksam wurde, ist der durch elektrostatische Interaktionen charakterisierte *charge zipper*. Geladene Aminosäurereste bilden mehrere Ionenbindungen zwischen transmembranen Helices aus, sodass sich dadurch eine leiterartige Struktur ergibt [65]. Postuliert wurde dieses Prinzip für das aus *E. coli* stammende membranständige Protein TisB, welches in Prozesse der Stressantwort involviert ist [84]. Auch TatA, Teil des Twin-Arginin-Transportsystems, weist das *charge zipper*-Motiv auf [85].

## 1.7 Detektion der Interaktion von Membranproteinen

Um Interaktionen transmembraner Proteine zu untersuchen, können diverse Methoden eingesetzt werden. Beispielsweise kann die klassische Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) genutzt werden, um das Oligomerisierungsverhalten von Membranproteinen zu untersuchen [86, 87]. Auch die analytische Ultrazentrifugation ist der Gewinnung von Kenntnissen über membranständige Proteine in diesem Sinne dienlich [88, 89]. Beim Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) wird Energie vom durch Licht angeregten Donormolekül auf das Akzeptormolekül übertragen. Dadurch kann die Emission von sekundärer Fluoreszenz erfolgen. Akzeptor und Donor können mit transmembranen Proteinelementen gekoppelt werden. Die Intensität der Fluoreszenz variiert mit der Distanz der beiden Moleküle und es kann so eine Aussage über mögliche Interaktion getroffen werden. Der FRET kann in artifiziellen Strukturen wie Micellen und Liposomen oder sogar in lebenden Zellen genutzt werden, um Interaktionen zu detektieren. So wurde mit dieser Methode ein vielfältiges Werkzeug gefunden, um Membranproteine zu untersuchen. [90-92]. Ein weiterer Ansatz zu deren Untersuchung bietet sich durch Methoden, die Disulfidbrücken nutzen. So können Gleichgewichte zwischen monomeren und verschiedenen oligomeren Formen von membranständigen Proteinelementen untersucht werden, welche durch die Ausbildung dieser Bindungen beeinflusst werden. Auf diesem Wege können Erkenntnisse bezüglich thermodynamischer Eigenschaften der Proteine erlangt werden [93, 94]. Auch über die sequenzielle Mutagenese von transmembranen Domänen durch Cysteinreste können Erkenntnisse gewonnen werden: So zeigt eine mögliche Bildung von Dimeren in nachfolgenden Analysen durch die SDS-PAGE die Ausbildung von Disulfidbrücken in Oligomeren und es kann eine Aussage bezüglich der räumlichen Positionierung der betreffenden Aminosäurereste getroffen werden [95]. Eine weitere Methode, um Interaktionen von Membranproteinen zu untersuchen, wird als *steric trap* bezeichnet. Hierzu wird das Dimerisierungsverhalten einer transmembranen Domäne in Anwesenheit einer kompetitiv dimerisierenden Transmembrandomäne beobachtet [96].

Dieter Langosch und Mitarbeiter stellten 1996 das ToxR-System vor, welches Detektion und Quantifizierung der Interaktion von transmembranen Domänen in einer lebendigen biologischen Membran ermöglicht [97]. Das System wurde von der Arbeitsgruppe um Donald Engelman modifiziert. Diese abgewandelte Variante liegt dem gleichen Funktionsprinzip wie das ToxR-System zugrunde und erhielt den Namen TOXCAT [98].

Das TOXCAT-System basiert auf bakteriellen Plasmiden: Eine zu untersuchende Transmembrandomäne wird als Teil eines Fusionsproteins in einer *E. coli* Zelle exprimiert. Die diesbezügliche genetische Information stammt von dem zuvor in die Zelle eingebrachten Plasmid. Ein solches Fusionsprotein enthält neben der membrandurchspannenden Domäne noch zwei weitere, eine im Periplasma und eine im Cytosol. Bei der periplasmatischen Domäne handelt es sich um das Maltose-bindende Protein (MBP), welches mit der transmembranen Domäne verbunden ist und durch das sich Kontrollen bezüglich Insertion und korrekter Ausrichtung des Fusionsproteins in der Membran durchführen lassen. Bei einer Oligomerisierung der transmembranen Domäne des Fusionsproteins erfolgt eine Dimerisierung der cytoplasmatischen Domäne. Bei dieser cytoplasmatischen Domäne handelt es sich um die DNS-bindende ToxR-Bindedomäne [99], welche in dimerisiertem Zustand zur Aktivierung eines Zielgenes befähigt ist. Das Zielgen *cat* befindet sich ebenfalls auf dem Plasmid. Die dimerisierte cytoplasmatische Domäne bindet am *ctx*-Promotor, welcher das *cat*-Gen reguliert und infolge wird dieses aktiviert (siehe auch Abb. 5).



**Abb. 5: Funktionsprinzip des TOXCAT-Systems** (Nach Russ und Engelman *et al.* [98]). Durch Interaktion transmembraner Helices des Fusionsproteins erfolgt eine Dimerisierung der ToxR-DNS-Bindedomäne im Cytoplasma. Infolge dessen wird das Reportergen *cat* über den *ctx*-Promotor aktiviert, welches die Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) codiert. Die Anwesenheit des Enzyms wird über dessen katalytische Aktivität in einer gesonderten Reaktion nachgewiesen. MBP: Maltose-bindendes Protein im Periplasma.

Detektion und Quantifizierung der Interaktion erfolgen nach dem Zellaufschluss, die Anwesenheit des Expressionsprodukts Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT), kann

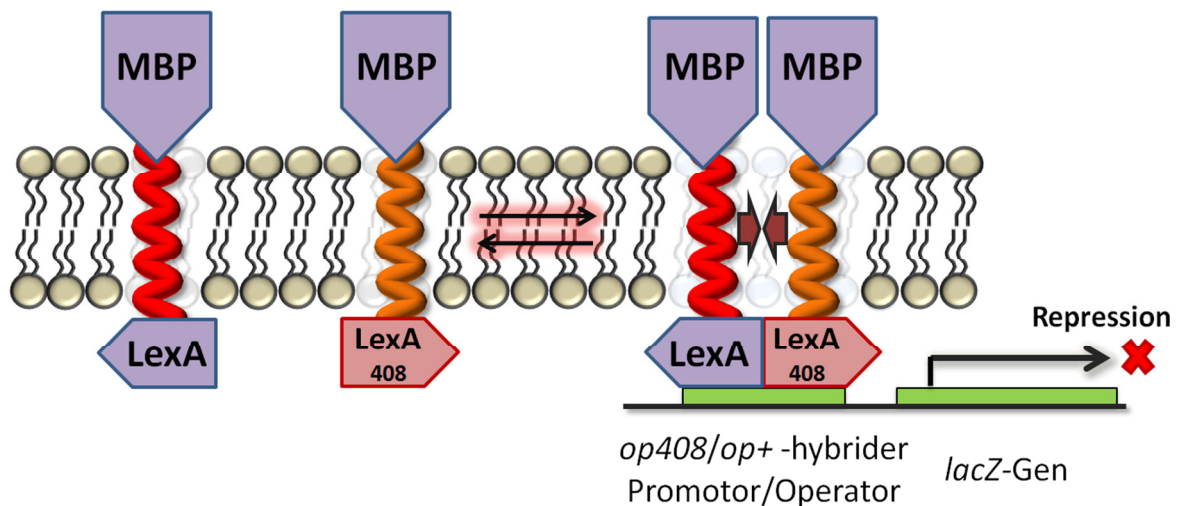
durch dessen katalytische Aktivität im Zelllysate photospektrometrisch nachgewiesen werden. Über die Konzentration eines Farbstoffs als Produkt einer durch die CAT katalysierten Reaktion können Rückschlüsse auf die Stärke der Interaktion gezogen werden. Die Konzentration der CAT ist verknüpft mit der Interaktionstendenz der transmembranen Domänen. Eine starke Interaktion führt zu einer relativ gesehen hohen Konzentration der CAT, schwache Interaktionen resultieren in niedrigen CAT-Konzentrationen.

Weiterhin existieren verschiedene Varianten von ToxR-basierenden Systemen [100], die im Funktionsprinzip dem TOXCAT-System ähnlich sind. Während es mit dem TOXCAT-System nur möglich ist, homotypische Interaktionen zu detektieren, machte es ein modifizierter Versuchsaufbau möglich, heterotypische Interaktionen transmembraner Helices zu berücksichtigen [101, 102]. So ist es mit Hilfe dieser Systeme möglich zu untersuchen, ob zwei verschiedene Helices zur Heterooligomerisierung oder eher zur Homooligomerisierung tendieren und zu welcher Interaktionsform sich das Reaktionsgleichgewicht verschiebt.

Das GALLEX-System bietet die Möglichkeit, sowohl homo- als auch heterotypische Interaktionen, jedoch im getrennten Versuchsaufbau, zu beobachten [76, 103, 104]. Hier wird ebenfalls die genetische Information über Plasmide in *E. coli*-Zellen eingebracht. Infolge werden, wie auch beim TOXCAT-System, Fusionsproteine exprimiert und in die innere Zellmembran inseriert (siehe Abb. 6). Bezüglich heterotypischer Interaktionen ist es hier im Gegensatz zu den ToxR-basierenden Systemen möglich, diese zu analysieren, ohne das oben beschriebene Gleichgewicht zwischen Hetero- und Homooligomeren zu berücksichtigen.

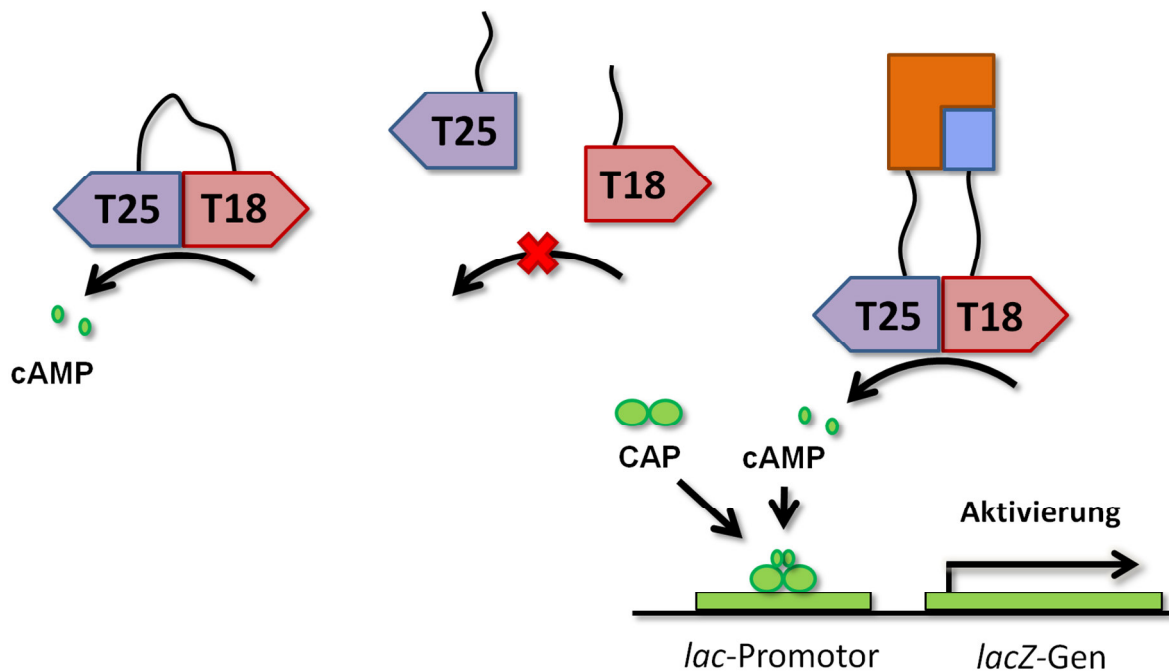
Im Jahr 1998 wurde das Funktionsprinzip eines genetischen Systems veröffentlicht, welches die Untersuchung von Interaktionstendenzen löslicher Proteine ermöglichte. Das BACTH (*bacterial two-hybrid*)-System [105, 106] basiert auf der katalytischen Domäne der Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis*. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Liegt es in Form zweier Fragmente vor, verliert es seine katalytische Aktivität. Die Enzymfragmente,





**Abb. 6: Funktionsprinzip des GALLEX-Systems zur Messung von heterotypischer Interaktion** (nach Schneider *et al.* [103]). Bei Interaktion der Transmembrandomänen der Fusionsproteine erfolgt eine Dimerisierung der wildtypischen DNS-Bindedomäne (LexA) mit der Mutante (LexA 408). Dieses Dimer bindet an den hybriden *op408/op+*-Promotor im Genom des Reporterstamms und reprimiert das *lacZ*-Reportergen.

die als T25 und T18 bezeichnet werden, sind in Abwesenheit von Calmodulin nicht der Lage, die Reaktion von ATP zu cAMP zu katalysieren [105, 107]. Die katalytische Aktivität des Enzyms kann jedoch wieder hergestellt werden, indem die zwei Fragmente in räumliche Nähe gebracht werden. Zur Anwendung des BACTH-Systems werden die Fragmente genetisch mit Proteinen fusioniert, die auf Interaktion geprüft werden sollen. Interagieren die Proteine miteinander, kommen die Fragmente in räumliche Nähe und der sekundäre Botenstoff cAMP wird synthetisiert. Dieses Reaktionsprodukt aktiviert zusammen mit dem *catabolite activator protein* (CAP) ein Reportergen (siehe auch Abb. 7). Die Detektion einer Interaktionstendenz kann ebenfalls photospektrometrisch erfolgen: Das Reportergen *lacZ* im Genom von *E. coli* codiert für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase. Die enzymatische Aktivität wird hier ebenfalls, wie bereits oben für das GALLEX-System beschrieben, über Produkte einer von der  $\beta$ -Galactosidase katalysierten Reaktion bestimmt. Auch hier kann von der Konzentration des Endproduktes auf die Stärke der Interaktion geschlossen werden. Im Gegensatz zur Repression beim GALLEX-System erfolgt im Fall des BACTH-Systems jedoch eine Aktivierung des Reportergens. Es konnte gezeigt werden, dass das BACTH-System auch verwendet werden kann, um Interaktionen transmembraner Domänen nachzuweisen [106, 108-112]. Der Aufbau des Systems ermöglicht die genetische Fusion der enzymatischen Komponente an N- oder C- Terminus



**Abb. 7: Funktionsprinzip des BACTH-Systems zur Detektion der Interaktion löslicher Proteine.** Links: Das Enzym Adenylatcyclase aus *B. Pertussis*, hier schematisch dargestellt durch die Fragmente T25 und T18, katalysiert die Umsetzung von ATP zu cAMP. Mitte: Liegt das Enzym in Form der Fragmente T25 und T18 getrennt vor, findet keine nennenswerte Umsetzung zum Reaktionsprodukt statt (Pfeil mit rotem Kreuz). Rechts: Die Fragmente T25 und T18 liegen als Fusionsproteine mit löslichen Domänen (orange und hellblau) vor. Durch die Interaktion der beiden löslichen, zu untersuchenden Domänen werden die Enzymfragmente in räumliche Nähe gebracht und die Katalyse der Reaktion zum Produkt cAMP kann stattfinden. Der sekundäre Botenstoff cAMP kann dann zusammen mit dem Aktivatorprotein CAP an den Promotor des *lac*-Operons im *E. coli* Genom binden. Infolge wird das Enzym  $\beta$ -Galactosidase exprimiert, dessen katalytische Aktivität dann als Nachweis zur Interaktion genutzt werden kann.

eines Proteins bzw. einer Transmembranhelix. Folglich kann eine Helix mit dem N- oder dem C-terminalen Ende zum Periplasma hin in die Membran eingefügt werden. Dadurch können transmembrane Helices in beiden möglichen Orientierungen in der Membran auf Interaktion geprüft werden. Ein bedeutender Nachteil des Versuchsaufbaus ist jedoch, dass keine periplasmatische Domäne wie beispielsweise die des MBPs vorhanden ist, die für Kontrollen genutzt werden kann. So kann der Einbau des Fusionsproteins in die Membran nicht hinreichend überprüft werden. Noch einmal hervorgehoben werden soll hier ein Unterschied zwischen den ToxR-basierenden Systemen, GALLEX und BACTH: Während die beiden erstgenannten das Reporter-gen über eine DNS-Bindedomäne aktivieren, geschieht dies beim BACTH-System über die Konzentration des Botenstoffes cAMP, dem Produkt einer enzymatischen Reaktion.

Das BACTH-System erlaubt auch ein Screening nach interagierenden Proteinen [105]. Ein solches Verfahren ist bereits von dem verwandten Hefe-Zwei-Hybrid-System [113] bekannt, mit dem Interaktionen von löslichen Proteinen mittels eukaryotischer Zellen untersucht werden können. So ist es mit diesem System möglich, Interaktionspartner, codiert in Bibliotheken komplementärer DNS (cDNS) oder künstlicher DNS, zu identifizieren. Auch mit dem BACTH-System sind ähnliche Screeningverfahren, beispielsweise mit Bibliotheken genomischer DNS, möglich. Eine solches Screening kann auch auf Membranproteine angewendet werden [114]. Screeningverfahren mit DNS-Bibliotheken bezüglich interagierender Transmembrandomänen können auch mit ToxR-basierenden Systemen erfolgen. Die diesbezüglichen Arbeiten beschränkten sich allerdings bisher auf homooligomerisierende Transmembranhelices [60, 67, 68, 77, 82, 115].

### **1.8 Ziele dieser Arbeit**

Die Membranproteinforschung ist im Vergleich zum Kenntnisstand in Bezug auf lösliche Proteine im Rückstand, wie schon die höchst unterschiedliche Anzahl an Röntgen- und NMR-Strukturdaten beider Klassen zeigt. Eine Ursache hierfür ist, dass sich die praktische Arbeit mit membranständigen Proteinen sehr aufwendig und zeitintensiv gestalten kann. So ist die auch schon in der Einleitung erwähnte Palette an Methoden, die zur analytischen Betrachtung von Membranproteinen eingesetzt werden kann, sehr überschaubar. Klassische proteinbiochemische Vorgehensweisen zur Proteinanalytik können nur in begrenztem Maße genutzt werden. Es bedarf daher neuer, alternativer Methoden zum Erkenntnisgewinn auf diesem Gebiet.

Die oben beschriebenen genetischen Systeme bieten eine Basis mit Erweiterungspotenzial zur Untersuchung membranständiger Proteine. Ein großer Vorteil ist, dass transmembrane Helices in der Umgebung einer lebendigen, biologischen Membran untersucht werden können. Dies ist bei klassischen biochemischen Methoden, oder solchen, die artifizielle Membranen zu diesem Zweck einsetzen, nicht möglich.

Ziel dieser Arbeit war die Erstellung eines neuen genetischen Reportersystems, mit dessen Hilfe Interaktionen transmembraner Helices mit gewünschter Primärsequenz untersucht werden können. Die Möglichkeit, verschiedene Helices bezüglich heterotypischer Interaktion zu untersuchen, sollte bei der Konstruktion berücksichtigt werden. Ein weiteres

Kriterium war, durch den Versuchsaufbau eine antiparallele Orientierung zweier Helices zueinander untersuchen zu können. So sollte es mit dem System auch möglich sein, Helices in der Orientierung in der Membran zu untersuchen, bei der der N-Terminus des Fusionsproteins sich im Periplasma befindet. Diese Möglichkeit wurde bisher von keinem der hier gezeigten genetischen Systeme zur Detektion interagierender Transmembrandomänen (das BACTH-System ausgeschlossen) geboten. Die Detektion des infolge von Interaktion resultierenden Genprodukts oder dessen katalytische Aktivität sollte einfach durch photospektrometrische Messungen erfolgen können.

Weiterhin sollte unter Einsatz des neuen Systems ein Screeningverfahren entwickelt werden, welches auf heterotypisch interagierende Transmembranhelices angewendet werden kann. Dabei war speziell die Zusammensetzung der Helices bezüglich der Aminosäurereste von Interesse. Die Kontaktfläche eines interagierenden Helix-Helix-Paares sollte im Focus dieser Untersuchung stehen und die Tendenz einzelner Seitenketten zur Beteiligung an den interhelicalen Wechselwirkungen sollte bestimmt werden. Auch das Auftreten von Interaktionsmotiven, die zur Interaktion transmembraner Helices beitragen können, sollte untersucht werden.

Durch die Untersuchung interagierender Transmembranhelices lassen sich Kenntnisse gewinnen, die wiederum auf den Prozess der Faltung von Membranproteinen übertragen werden können. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Erforschung dieser grundlegenden Prinzipien, da der Ablauf der Faltung transmembraner Proteine bisher allenfalls nur im Ansatz verstanden ist.

Zusammengenommen sollen die Ergebnisse einen kleinen Teil zum Verständnis im, allen bisher gewonnen Erkenntnissen zum Trotz, größtenteils Rätselhaft gebliebenen Universum der Membranproteine beitragen und die Grundlagenforschung auf diesem Gebiet vorantreiben.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Gängige Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Carl Roth, Sigma Aldrich, AppliChem, Fisher Scientific, Sarstedt und VWR International bezogen, falls nicht anders vermerkt.

### 2.2 Lösungen

Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit destilliertem Wasser oder in molekularbiologischen und proteinbiochemischen Ansätzen auch mit gereinigtem Wasser (erzeugt durch das Gerät Purelab Flex PFXXXM1 von ELGA/VEOLIA Water Technologies oder bezogen von Sigma-Aldrich) angesetzt.

gelöster Stoff	Ansatz
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-gal) -Lösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 % X-gal (w/v) in DMSO</li> </ul>
dNTP-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP und 10 mM dTTP</li> </ul>
Ethidiumbromid	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 200 <math>\mu</math>l einer 1 % igen Ethidiumbromidlösung auf 1 l H<sub>2</sub>O</li> </ul>
Glycerol/MOPS-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 mM MOPS</li> <li>• 15 % (v/v) Glycerol</li> </ul> Autoklavieren.
M9-Salze, 5x	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 64 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> * H<sub>2</sub>O</li> <li>• 15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>• 2,5 g NaCl</li> <li>• 5 g NH<sub>4</sub>Cl</li> </ul>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,5 M	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O</li> </ul> Sterilfiltrieren.
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung, 0,1 % ig	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,1 % SDS in H<sub>2</sub>O (w/v)</li> </ul>
PEG 4000, 50 % (w/v)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PEG 4000 in 50 % H<sub>2</sub>O (w/v)</li> </ul>

### 2.3 Puffer

Name	Herstellung
<i>In vitro annealing</i> -Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 200 mM Tris</li> <li>• 100 mM MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 500 mM NaCl</li> </ul> Den pH-Wert mit HCl auf 7,5 einstellen, sterilfiltrieren.
ONPG-Lösung (β-Galactosidase-Test)	4 mg ONPG pro ml 1x Z-Puffer
Probenpuffer für Agarosegele	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 30 % Glycerol</li> <li>• 5 mM EDTA</li> <li>• Xylencyanol und Bromphenolblau zugeben.</li> </ul>
TAE-Puffer (Laufpuffer für Agarosegele), 50x	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 242 g Tris</li> <li>• 57,1 g Essigsäure</li> <li>• 100 ml 0,5 M EDTA, pH Wert 8,0</li> </ul> Mit H <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen, pH-Wert auf 8,3 einstellen.
Z-Puffer, 5x (β-Galactosidase-Test)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 300 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li> <li>• 200 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>• 50 mM KCl</li> <li>• 5 mM MgSO<sub>4</sub></li> </ul> Sterilfiltrieren. Vor Gebrauch 2,7 µl β-Mercaptoethanol pro ml 1x Z-Puffer zugeben.

### 2.4 Enzyme

Enzym(e)	Hersteller
Antarctic Phosphatase (5 U/µl) und Puffer, 10x	New England Biolabs
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/µl) und Puffer HF	New England Biolabs
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase (400 U/µl) und Puffer, 10x	New England Biolabs
T4 DNA-Polymerase (3 U/µl) und Puffer	New England Biolabs
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl) und Puffer, 10x	New England Biolabs

## 2.5 Nährmedien

Medium	Zusammensetzung/Herstellung
2YT-Medium (flüssig)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 16 g Trypton</li> <li>• 10 g Hefeextrakt</li> <li>• 10 g NaCl</li> </ul> <p>Auf 1000 ml auffüllen, pH-Wert auf 7 einstellen, autoklavieren, abkühlen lassen, ggf. Antibiotika zugeben.</p>
LB-Agarplatten	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 g Trypton</li> <li>• 5 g Hefeextrakt</li> <li>• 10 g NaCl</li> <li>• 15 g Agar</li> </ul> <p>Auf 1000 ml auffüllen, pH-Wert auf 7 einstellen, autoklavieren, abkühlen lassen, ggf. Antibiotika zugeben. Auf 40 Petrischalen aufteilen.</p>
LB-Medium (flüssig)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 g Trypton</li> <li>• 5 g Hefeextrakt</li> <li>• 10 g NaCl</li> </ul> <p>Auf 1000 ml auffüllen, pH-Wert auf 7 einstellen, autoklavieren, abkühlen lassen, ggf. Antibiotika zugeben.</p>
M9-Agarplatten	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 750 ml H<sub>2</sub>O</li> <li>• 15 g Agar</li> </ul> <p>Autoklavieren, abkühlen lassen.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 200 ml M9 Salze, 5x (steril)</li> <li>• 2 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> (steril)</li> <li>• 20 ml Zuckerlösung (Maltose/Glucose, steril)</li> <li>• 0,1 ml CaCl<sub>2</sub> (steril)</li> </ul> <p>Mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml auffüllen, ggf. Antibiotika oder IPTG zugeben.</p>
M9-Medium (flüssig)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 750 ml H<sub>2</sub>O, autoklaviert</li> <li>• 200 ml M9 Salze, 5x (steril)</li> <li>• 2 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> (steril)</li> <li>• 20 ml Zuckerlösung (Maltose/Glucose, steril)</li> <li>• 0,1 ml CaCl<sub>2</sub> (steril)</li> </ul> <p>Auf 980 ml auffüllen, ggf. Antibiotika oder IPTG zugeben.</p>

Medium	Zusammensetzung/Herstellung
SOC-Medium (flüssig)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 g Trypton</li> <li>• 0,25 g Hefeextrakt</li> <li>• 0,025 g NaCl</li> </ul> In 40 ml H <sub>2</sub> O lösen. <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,5 ml 250 mM KCl</li> </ul> Den pH-Wert mit NaOH auf 7 einstellen. <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,2 g Glucose</li> <li>• 0,25 ml 2M MgCl<sub>2</sub></li> </ul> Mit H <sub>2</sub> O auf 50 ml auffüllen, sterilfiltrieren.
TSB-Medium (flüssig)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 g PEG 4000</li> <li>• 5 ml DMSO</li> <li>• 2 ml 1M MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 1 g Trypton</li> <li>• 0,5 g Hefeextrakt</li> <li>• 0,5 g NaCl</li> </ul> Auf 100 ml auffüllen, pH-Wert auf 6,5 einstellen, sterilfiltrieren.

## 2.6 Komplettsysteme (*Kits*)

Anwendung	Bezeichnung	Hersteller
Gelextraktion	Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Avegene/Geneaid
	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey Nagel
	NucleoTrap®	Macherey Nagel
Plasmid-Minipräparation	High-Speed Plasmid Mini Kit	Avegene/Geneaid
	NucleoSpin® Plasmid	Macherey Nagel
Plasmid-Midi- und Maxipräparation	JETSTAR™ 2.0 Plasmid Purification MIDI Kit	Genomed
	NucleoBond® Xtra Midi	Macherey Nagel
ortsgerichtete Mutagenese	QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene



## 2.7 *E. coli*-Stämme

Name	Genotyp	Referenz
BTH101	F- <i>cya-99 araD139 galE15 galK16 rpsL1 (Str<sup>R</sup>) hsdR2 mcrA1 mcrB1</i>	[105]
DH5 $\alpha$	F- <i>gyrA96 endA1 relA1 thi-1 hsdR17 glnV44(AS) deoR <math>\Delta</math>(argF-lac) U169 recA1 <math>\phi</math>80<math>\Delta</math>(lacZ)M15</i>	Life Technologies (Thermo Fischer Scientific)
DHM1	F- <i>glnV44(AS) recA1 endA gyrA96 thi-1 hsdR17 spoT1 rfbD1 cya-854</i>	[112]
NovaBlue Singles <sup>TM</sup>	<i>endA1 hsdR17 (r<sub>K12</sub><sup>-</sup> m<sub>K12</sub><sup>+</sup>) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>f</sup>ZAM15::Tn10] (Tet<sup>R</sup>)</i>	Novagen/Merck Millipore
NT326	F- <i>araD139 <math>\Delta</math>lacU1169 rpsL thi <math>\Delta</math>malE444 recA1</i>	[116]
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>f</sup> ZAM15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>)]</i>	Stratagene

## 2.8 DNS-Oligomere

Alle DNS-Oligomere wurden von den Firmen MWG Operon oder Biomers.net bezogen.

### 2.8.1 DNS-Primer zur PCR

Name	Nukleotidsequenz in 5' $\rightarrow$ 3' Richtung
ct_KNT25h_HindIII	CGATAAGCTTTATATCGATGGTGCAGCCC
ct_NoSt_T18Cv_NheI_2	GCTAGCTAGCAGATCCAGGACCTGATCCGTGGCG TTCCACTGCGCC
ct_NoSt_T25v_NheI	GCATGCTAGCAGTCGACCCTGCAGCCCG
ct_T18h_HindIII_2	CGATAAGCTTTATATCGATTGGCGTTCCACT
nt_KNT25h_EcoRI_NheI_BamHI	GCATGAATTCGCTAGCCAAGGGATCCTAATGACC ATGCAGCAATCGCA
nt_T18Cv_NdeI_2	CGATCATATGATGACCATGATTACGCCAAGC
nt_T18h_EcoRI_NheI_BamHI	GCATGAATTCGCTAGCCAAGGGATCCTAGCCGCC AGCGAGGCCA
nt_T25v_NdeI	GCATCATATGACCATGCAGCAATCGCA

## 2.8.2 DNS-Primer zur ortsgerichteten Mutagenese

Name	Nukleotidsequenz in 5' → 3' Richtung
NheQC_FpACYC184	CCGGACATCAGCGCTAACGGAGTGTATACTGGCT
NheQC_RpACYC184	AGCCAGTATACACTCCGTTAGCGCTGATGTCCGG
QC-GlpF-A55I-F	GCCTGGGCGTGGCGATGATTATTTATCTGACCGCGG
QC-GlpF-A55I-R	CCGCGGTCAGATAAATAATCATCGCCACGCCAGGC
QC-GlpF-G17I-F	GTGCATTGCGGAATTTCTGATCACCGGCCTGCTG
QC-GlpF-G17I-R	CAGCAGGCCGGTGATCAGAAATTCGCAATGCAC
QC-GlpF-G19I-F	GCGGAATTTCTGGGCACCATCCTGCTGATTTTTTTTGGC
QC-GlpF-G19I-R	GCCAAAAAAAATCAGCAGGATGGTGCCAGAAATTCGCG
QC-GlpF-G51I-F	CGTGATTTGGGGCCTGATCGTGCGGATGGC
QC-GlpF-G51I-R	GCCATCGCCACGATCAGGCCCCCAAATCACG
QC-GlpF-G96I-F	CGTTTATTGTGAGCCAGGTGGCGATCGCGTTTTGC
QC-GlpF-G96I-R	GCAAAACGCGATCGCCACCTGGCTCACAATAAACG
QC-GlpF-L21A-F	CTGGGCACCGGCCTGGCGATTTTTTTTGGCGTGG
QC-GlpF-L21A-R	CCACGCCAAAAAAAATCGCCAGGCCGGTGCCAG
QC-GlpF-T18A-F	GGAATTTCTGGGCGCCGGCCTGCTGATTTTTTTTGG
QC-GlpF-T18A-R	CCAAAAAAAATCAGCAGGCCGGCGCCAGAAATTCC

## 2.8.3 DNS-Oligomere zur Erstellung einer DNS-Bibliothek

Die Schnittstellen *Bam*HI und *Nhe*I, die zur Klonierung genutzt wurden, sind unterstrichen und die zu BGHrev komplementäre Sequenz in LEUscr2 ist kursiv dargestellt. Die Variable **N** steht nach IUPAC-Nomenklatur für die Nukleotidbasen G, C, T oder A, die Variable **B** für G, C oder T.

Name	Nukleotidsequenz in 5' → 3' Richtung
BGHrev	TAGAAGGCACAGTCGAGG
LEUscr2	AGTCGCTAGCCTGCTGNBNTBCTGCTGNBNTBCTGCTGNBNTBCTG CTGNBNTCTGCTGGGGATCCTCGACTGTGCCTTCTA

### 2.8.4 DNS-Oligomere zur Erstellung von doppelsträngigen DNS-Kassetten (*in vitro annealing*)

Name	Nukleotidsequenz in 5' → 3' Richtung
GlpF-TM1-F	CTAGCAGCCAGACCAGCACCCCTGAAAGGCCAGTGCATTGCGGAAT TTCTGGGCACCGGCCTGCTGATTTTTTTTTGGCGTGGGCTGCGTGGC GGCGCTGAAAGTGGCGGGCGCGAGCGG
GlpF-TM1-R	GATCCCGCTCGCGCCCGCCACTTTCAGCGCCGCCACGCAGCCCAC GCCAAAAAAATCAGCAGGCCGGTGCCAGAAATTCGCAATGC ACTGGCCTTTCAGGGTGCTGGTCTGGCTG
GlpF-TM2-F	CTAGCGCGGGCGCGAGCTTTGGCCAGTGGGAAATTAGCGTGATTT GGGGCCTGGGCGTGGCGATGGCGATTTATCTGACCGCGGGCGTGA GCGGCGCGGG
GlpF-TM2-R	GATCCCCGCGCCGCTCACGCCC GCGGTCAGATAAATCGCCATCGC CACGCCCAGGCCCAAATCACGCTAATTTCCCACTGGCCAAAGCT CGCGCCCGCG
GlpF-TM4-F	CTAGCGCGTGCTTTGATAAACGCAAAGTGATTCCGTTTATTGTGA GCCAGGTGGCGGGCGCGTTTTGCGCGGCGGCGCTGGTGTATGGCC TGTATTATAACGG
GlpF-TM4-R	GATCCCGTTATAATACAGGCCATACACCAGCGCCGCCGCGCAAAA CGCGCCCGCCACCTGGCTCACAATAAACGGAATCACTTTGCGTTT ATCAAAGCACGCG
GpA-G83I-17-F	CTAGCATTACCCTGATTATTTTTGGCGTGATGGCGATTGTGATTGG CACCATTCTGGG
GpA-G83I-17-R	GATCCCCAGAATGGTGCCAATCACAATCGCCATCACGCCAAAAAT AATCAGGGTAATG
GpA-TMR16-F	CTAGCATTACCCTGATTATTTTTGGCGTGATGGCGGGCGTGATTGG CACCATTGG
GpA-TMR16-R	GATCCCAATGGTGCCAATCACGCCC GCCATCACGCCAAAAATAAT CAGGGTAATG
GpA-TMR17-F	CTAGCATTACCCTGATTATTTTTGGCGTGATGGCGGGCGTGATTGG CACCATTCTGGG
GpA-TMR17-R	GATCCCCAGAATGGTGCCAATCACGCCC GCCATCACGCCAAAAAT AATCAGGGTAATG
GpA-TMR18-F	CTAGCATTACCCTGATTATTTTTGGCGTGATGGCGGGCGTGATTGG CACCATTCTGCTGGG
GpA-TMR18-R	GATCCCCAGCAGAATGGTGCCAATCACGCCC GCCATCACGCCAAA AATAATCAGGGTAATG

Name	Nukleotidsequenz in 5' → 3' Richtung
GpA-TMR19-F	CTAGCATTACCCTGATTATTTTTGGCGTGATGGCGGGCGTGATTGG CACCATTCTGCTGATTGG
GpA-TMR19-R	GATCCCATTTCAGCAGAATGGTGCCAATCACGCCCGCCATCACGCC AAAAATAATCAGGGTAATG

### 2.8.5 Plasmide

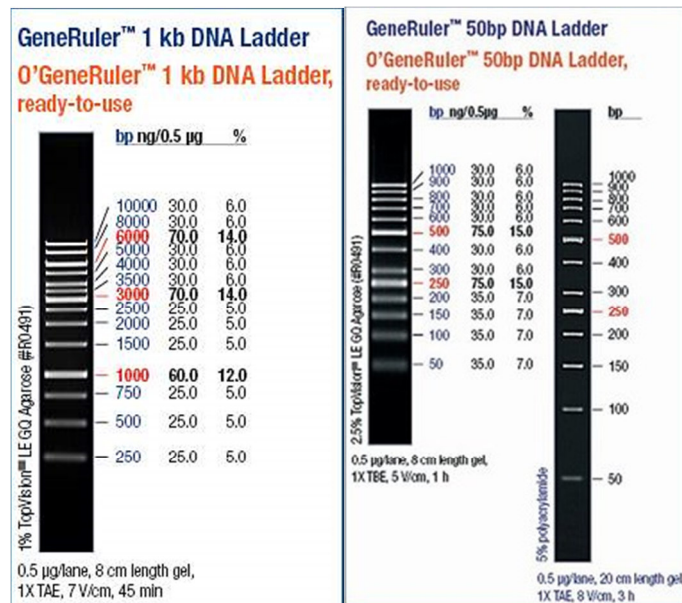
Name	Resistenzgen(e), Kommentar	Referenz
pKT25	Km <sup>R</sup> , codiert T25-Fragment der <i>B. pertussis</i> Adenylatcyclase (Aminosäuren 1-224), MCS am 3'-Ende des T25-Genabschnitts enthalten, Derivat von pSU40	[117]
pUT18	Amp <sup>R</sup> , codiert T18-Fragment der <i>B. pertussis</i> Adenylatcyclase (Aminosäuren 225-399), MCS am 5'-Ende der T18-codierenden Sequenz enthalten, Derivat von pUC19	[117]
pKNT25	Km <sup>R</sup> , MCS am 5'-Ende der T25-Fragment-codierenden Sequenz enthalten, Derivat von pSU40	[112]
pUT18C	Amp <sup>R</sup> , MCS am 3'-Ende der T18-Fragment-codierenden Sequenz enthalten, Derivat von pUC19	[117]
pMal-c2	Amp <sup>R</sup> , Expression des MBP ohne Signalsequenz zum Export ins Periplasma, Kontrolle	New England Biolabs
pMal-p2X	Amp <sup>R</sup> , Expression des MBP einschließlich Signalsequenz zum Export ins Periplasma, Kontrolle	New England Biolabs
pLexA-Km <sup>R</sup>	Derivat von pMal-p2X mit <i>lexA</i> -Gen und Km <sup>R</sup> -Genkassette	[32]
pACYC184	Km <sup>R</sup> , Klonierung/Kontrolle	[118]
pBR322	Tet <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Klonierung/Kontrolle	[119]
pSTBlue-1 AccepTor <sup>TM</sup>	TA-Klonierung	Novagen/Merck Millipore
pSTBlue-1_T25v	TA-Klonierung für Genabschnitt des Fragments <i>cyA</i> T25v	Diese Arbeit
pSTBlue-1_T18v	TA-Klonierung für Genabschnitt des Fragments <i>cyA</i> T18v	Diese Arbeit
pSTBlue-1_T25h	TA-Klonierung für Genabschnitt des Fragments <i>cyA</i> T25h	Diese Arbeit

Name	Resistenzgen(e), Kommentar	Referenz
pSTBlue-1_T18h	TA-Klonierung für Genabschnitt des Fragments <i>cyA</i> T18h	Diese Arbeit
pLT18	Klonierung des Genabschnitts <i>cyA</i> T18v in pLexA	Diese Arbeit
pLT25	Klonierung des Genabschnitts <i>cyA</i> T25v in pLexA	Diese Arbeit
pMT18	Klonierung des Genabschnitts <i>cyA</i> T18h in pMal-p2X	Diese Arbeit
pMT25	Klonierung des Genabschnitts <i>cyA</i> T25h in pMal-p2X	Diese Arbeit
pMT18K	Klonierung der Km <sup>R</sup> -Kassette aus pLexA-Km <sup>R</sup> in pMT18	Diese Arbeit
pMT25K	Klonierung der Km <sup>R</sup> -Kassette aus pLexA-Km <sup>R</sup> in pMT25	Diese Arbeit
pALT18ii-GpA16	Kontrollplasmid GpA-Transmembrandomäne, Länge: 16 Aminosäuren	Diese Arbeit
pALT18ii-GpA17	Kontrollplasmid GpA-Transmembrandomäne, Länge: 17 Aminosäuren	Diese Arbeit
pALT18ii-GpA18	Kontrollplasmid GpA-Transmembrandomäne, Länge: 18 Aminosäuren	Diese Arbeit
pALT18ii-GpA19	Kontrollplasmid GpA-Transmembrandomäne, Länge: 19 Aminosäuren	Diese Arbeit
pBLT25ii-GpA16	Kontrollplasmid GpA-Transmembrandomäne, Länge: 16 Aminosäuren	Diese Arbeit
pBLT25ii-GpA17	Kontrollplasmid GpA-Transmembrandomäne, Länge: 17 Aminosäuren	Diese Arbeit
pBLT25ii-GpA18	Kontrollplasmid GpA-Transmembrandomäne, Länge: 18 Aminosäuren	Diese Arbeit
pBLT25ii-GpA19	Kontrollplasmid GpA-Transmembrandomäne, Länge: 19 Aminosäuren	Diese Arbeit
pALT18ii-G83I	Kontrollplasmid GpA G83I-Transmembrandomäne, Länge: 17 Aminosäuren	Diese Arbeit
pBLT25ii-G83I	Kontrollplasmid GpA G83I-Transmembrandomäne, Länge: 17 Aminosäuren	Diese Arbeit
pBLT25ii-GlpFH1	Plasmid codiert für Fusionsprotein aus N-Term./Cya T25/GlpF-Helix 1/MBP/C-Term.	Diese Arbeit
pBLT25ii-GlpFH1-G17I	Wie pBLT25ii-GlpFH1, aber Substitution G17I	Diese Arbeit

Name	Resistenzgen(e), Kommentar	Referenz
pBLT25ii-GlpFH1-T18A	Wie pBLT25ii-GlpFH1, aber Substitution T18A	Diese Arbeit
pBLT25ii-GlpFH1-G19I	Wie pBLT25ii-GlpFH1, aber Substitution G19I	Diese Arbeit
pBLT25ii-GlpFH1-L21A	Wie pBLT25ii-GlpFH1, aber Substitution L21A	Diese Arbeit
pAMT18ii-GlpFH2	Plasmid codiert für Fusionsprotein aus N-Term./MBP/GlpF-Helix 2/cyaA T18/C-Term.	Diese Arbeit
pAMT18ii-GlpFH2-G51I	Wie pAMT18ii-GlpFH2, aber Substitution G51I	Diese Arbeit
pAMT18ii-GlpFH2-A55I	Wie pAMT18ii-GlpFH2, aber Substitution A55I	Diese Arbeit
pALT18ii-GlpFH4	Plasmid codiert für Fusionsprotein aus N-Term./cyaA T18/GlpF-Helix 4/MBP/C-Term.	Diese Arbeit
pALT18ii-GlpFH4-G96I	Wie pALT18ii-GlpFH4, aber Substitution G96I	Diese Arbeit
pALT18ii-GlpFH6	Plasmid codiert für Fusionsprotein aus N-Term./cyaA T18/GlpF-Helix 6/MBP/C-Term.	Diese Arbeit
pALT18iiLib	Plasmid der DNS-Bibliothek	Diese Arbeit
pLT25Lib	Plasmid der DNS-Bibliothek	Diese Arbeit
pLT25-GpA	Kontrollplasmid GpA-Transmembrandomäne, Länge: 17 Aminosäuren	Diese Arbeit

### 2.8.6 DNS-Größenstandards für Agarosegele

Name des Standards	Name des Herstellers
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific/Fermentas
GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	Thermo Scientific/Fermentas



**Abb. 8:** Verwendete DNS-Größenstandards für Agarosegele. Quelle: <http://www.thermoscientificbio.com>

### 2.8.7 Plasmidlösung der DNS-Pseudobibliothek

Alle Plasmide sind in gleichen Masseanteilen vorhanden, die Plasmidkonzentration beträgt 5 ng/µl für jedes Plasmid. So ergibt sich eine Gesamtkonzentration von 50 ng/µl. Die Plasmidlösung wurde in der folgenden Form zur Transformation der *E. coli* BTH101-Zellen eingesetzt:

Plasmid	codierte Transmembrandomäne
pALT18ii-GpA17	GpA
pBLT25ii-GpA17	GpA
pALT18ii-G83I	GpA G83I
pBLT25ii-G83I	GpA G83I
pACYC184	keine
pBR322	keine
pALT18ii-H4	GlpF Helix 4
pBLT25ii-H1	GlpF Helix 1
pBLT25ii-H1-G19I	GlpF Helix 1 G19I
pALT18ii-H6	GlpF Helix 6

## 2.9 Geräte und Apparaturen

Gerät/Einsatzbereich	Modellname	Hersteller
Elektrophorese-Netzgerät	PowerPac Basic™	BIORAD
Elektroporator	MicroPulser™	BIORAD
Geldokumentation, Aufnahmen von Agarplatten	Quantum-ST4 1100/26 MX	Peqlab
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Herstellung von reinem Wasser	Purelab Flex PFXXXXM1	ELGA/VEOLIA Water Technologies
Inkubator für bakterielle Kultur	Multitron-S triple	Buch & Holm
PCR-Thermocycler	TGradient Thermocycler 96	Biometra
	Primus Thermocycler	Peqlab
pH-Meter	pH211 Microprocessor	HANNA Instruments
Photospektrometer	Lambda 35 UV/VIS Spectrometer	Perkin Elmer
	Novaspec Plus visible spectrometer	Amersham Biosciences
Vakuum-Trockner für Reaktionsgefäße	Concentrator 5301	Eppendorf
Zentrifugen	Centrifuge 5415R	Eppendorf
	Centrifuge 5424	Eppendorf
	Centrifuge 5810R	Eppendorf

## 2.10 EDV-Programme

Zur Erstellung von Abbildungen dreidimensionaler Proteinstrukturen wurde das Programm „PyMOL molecular graphics system“ verwendet. Die Proteinstrukturdaten wurden von der RCSB Proteindatenbank ([www.rcsb.org/](http://www.rcsb.org/)) bezogen. Des Weiteren wurde MS Office 2010 von Microsoft zur Darstellung der Ergebnisse und zum Verfassen dieser Arbeit verwendet. Die Programme Illustrator (Version CS5) und Photoshop (Version 7.0.1) von Adobe wurde zum Erstellen von Grafiken genutzt. Die Software Expression von Genamics (Version 1.100) fand Anwendung beim Editieren von Plasmidsequenzen. Zum Verwalten von



Zitationen wurde das Programm Endnote (Version X6.0.1) von Thomson Reuters verwendet.

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die PCR ist es möglich, selbst sehr geringe Mengen DNS zu amplifizieren, damit diese dann in ausreichender Konzentration vorhanden ist. Dies geschieht durch wiederholte Neusynthese von DNS, welche komplementär zu vorhandenen Strängen erzeugt wird. Zwei DNS-Primer, einer bindet am codogenen, der andere am nicht-codogenen Strang, flankieren die Sequenz von Interesse und definieren somit das Amplifikat. Die Neusynthese des DNS-Fragments erfolgt durch die DNS-Polymerase in 5'-3' Richtung. Das bedeutet, dass die OH-Gruppe am C3-Atom der Ribose am Ende des vorhandenen Strangs mit der Phosphatgruppe am C5-Atom eines Nukleotidbausteins verknüpft wird. Ab dem zweiten Elongationszyklus bilden sich DNS-Stränge der gewünschten, von beiden Primern definierten Länge. Folgender Ansatz mit 50 µl Gesamtvolumen wurde typischerweise eingesetzt:

Komponente/Lösung/Lösungsmittel	Volumen
H <sub>2</sub> O	39,5 µl
Puffer <i>Taq</i> DNS-Polymerase, 10x	5 µl
DNS (~50 ng)	2 µl
Primer (10 pmol/µl), „vorwärts“	1 µl
Primer (10 pmol/µl), „rückwärts“	1 µl
10 mM dNTP-Lösung	1 µl
<i>Taq</i> DNS-Polymerase	0,5 µl

Die PCR-Ansätze wurden mit folgendem Programm im PCR-Thermocycler durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
1	95 °C	2 min	1
2	95 °C	1 min	35
3	57 °C	1 min	
4	72 °C	10 min	

### 3.1.2 TA-Klonierung

Die TA-Klonierung bietet die Möglichkeit, ein DNS-Fragment ohne die Verwendung von Restriktionsenzymen in einen Vektor zu klonieren. Zunächst wird ein gewünschter DNS-Abschnitt unter Verwendung geeigneter Primer durch eine PCR amplifiziert. Hierzu wird die *Taq* Polymerase des thermophilen Prokaryoten *Thermus aquaticus* verwendet. Diese Polymerase erzeugt bei der Neusynthese von DNS-Strängen Adenin-Überhänge an deren 3'-Enden. Ein kommerziell erhältliches, linearisiertes Plasmid (pSTBlue-1 AccepTor™) bietet einen Thymin-Überhang, sodass das einzufügende Fragment und der Vektor über die Basenpaarung Adenin/Thymin mit Hilfe des Enzyms T4 DNS-Ligase miteinander verknüpft werden können. Durch eine Hitzeschocktransformation wird das ligierte Plasmid in den *E. coli*-Stamm NovaBlue Singles™ eingebracht. Transformanten, bei denen ein DNS-Fragment in den Vektor pSTBlue-1 AccepTor™ einligiert wurde, können durch Blau-Weiß-Selektion erkannt werden. Hierzu befindet sich das *lacZ*-Gen auf dem Vektor, jedoch wird dieses durch die Ligation eines DNS-Fragments in die dafür vorgesehene Position zerstört. Der verwendete *E. coli*-Stamm besitzt kein funktionelles *lacZ*-Gen, sodass die Umsetzung des im Medium enthaltenen Substrates 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-gal) durch das Enzym  $\beta$ -Galactosidase nicht erfolgt. In diesem Fall zeigt sich auf der Agarplatte eine weiße Kolonie. Wird kein Fragment in den Vektor einligiert, ist das *lacZ*-Gen des Vektors und somit die  $\beta$ -Galactosidase funktional. Das Substrat X-gal kann umgesetzt werden und es bildet sich ein blauer Farbstoff. Blaue Kolonien zeigen also ein Plasmid ohne einligiertes DNS-Fragment an.

Für TA-Klonierungen wurde das AccepTor™ Vector Kit der Firma Merck Millipore mit den oben aufgezählten Komponenten genutzt. Das Vorgehen erfolgte nach dem

zugehörigen Protokoll. Die vorrangigere PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Für das weitere Vorgehen nach der Transformation wurden Zellen von weißen Kolonien in flüssiges LB-Medium mit Ampicillin überführt, bei 37 °C über Nacht inkubiert und im Anschluss eine Minipräparation der Plasmide durchgeführt.

### 3.1.3 Herstellung kurzer doppelsträngiger DNS-Kassetten (*In vitro annealing*)

Komponente/Lösung/Lösungsmittel	Volumen
Oligomer (10 pmol/μl), „vorwärts“	1 μl
Oligomer (10 pmol/μl), „rückwärts“	1 μl
<i>In vitro annealing</i> Puffer, 10x	5 μl
H <sub>2</sub> O	43 μl

Die Zusammensetzung des hierbei verwendeten Puffers ist im Kapitel „Material“ beschrieben. Um einen doppelsträngigen DNS-Strang aus zwei komplementären Einzelsträngen zu erhalten, wurde das Gemisch aus beiden Oligomeren zunächst für 15 min auf 95 °C erhitzt. Dadurch sollte eine vollständige Schmelzung der DNS erzielt und eventuell vorhandene Sekundärstrukturen aufgelöst werden. Es erfolgte eine langsame Abkühlung bei Raumtemperatur für 30 min. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Es wurden DNS-Oligomere eingesetzt, die von der Firma Eurofins-MWG bezogen wurden.

### 3.1.4 Ergänzung eines DNS-Einzelstranges zum Doppelstrang

Um einen Einzelstrang zum Doppelstrang zu ergänzen, wurde das Enzym T4 DNS-Polymerase eingesetzt. Dieses aus dem T4 Bacteriophagen stammende Enzym fungiert als 5′-3′ Polymerase und zeigt des Weiteren auch eine 3′-5′ Exonukleaseaktivität. Die Polymerase benötigt, wie auch andere Polymerasen, einen Primer, an dessen 3′-Ende die Synthese eines zur Matrize komplementären Stranges beginnen kann. Diese Reaktion wurde im Anschluss an das *in vitro annealing* durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Komponente/Lösung/Lösungsmittel	Volumen
<i>In vitro annealing</i> -Ansatz (Abschnitt 3.1.3)	50 µl
BSA-Lösung, 100x	0,5 µl
dNTP-Lösung, 10mM	2 µl
T4 DNS-Polymerase	2 µl

Die Inkubationszeit der Reaktion betrug 15 min bei 12 °C. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 75 °C für 5 – 15 min.

### 3.1.5 Erstellung von doppelsträngiger DNS mit glatten Enden

Für die Erstellung von glatten Enden (*blunt ends*) von linearisierter, doppelsträngiger DNS nach einer Spaltung durch Restriktionsenzyme und anschließender Extraktion aus einem Agarosegel wurde folgendes Protokoll eingesetzt:

Komponente/Lösung/Lösungsmittel	Volumen
DNS-Lösung aus Gelextraktion	30 µl
NEB-Puffer Nr. 2, 10x	5 µl
BSA-Lösung, 100x	0,5 µl
dNTP-Lösung, 10 mM	0,625 µl
T4 DNS-Polymerase	0,75 µl
H <sub>2</sub> O	13,125 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 12 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 75 °C für 5 – 15 min.

### 3.1.6 Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen

Alle zur Spaltung von DNS verwendeten Enzyme wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen und bezüglich Konzentration, Reaktionsdauer und -bedingungen wie vom

Hersteller beschrieben eingesetzt, sofern nicht anders vermerkt. Die Restriktionsenzyme wurden nach der Reaktion ggf. durch Hitze inaktiviert, die diesbezügliche Inkubation wurde ebenfalls wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt.

### 3.1.7 Dephosphorylierung von DNS

Die Entfernung einer Phosphatgruppe am 5' Ende eines DNS-Strangs erfolgte durch eine enzymatisch katalysierte Reaktion. Hierzu wurde das Enzym Antarctic Phosphatase sowie der zugehörige Puffer des Herstellers NEB verwendet.

Komponente/Lösung/Lösungsmittel	Volumen
Plasmidlösung oder Restriktionsansatz	50 µl
Antarctic Phosphatase Reaktionspuffer	5,6 µl
Antarctic Phosphatase	1 µl

Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 37 °C für 60 min. Anschließend wurde das Enzym für 20 min bei 65 °C inaktiviert.

### 3.1.8 Reinigung von Restriktions-, PCR- und T4 DNS-Polymerase enthaltenden Ansätzen

Um eine DNS-Lösung von unerwünschten Stoffen wie Salzen, Enzymen, Gelbestandteilen, anderen Verunreinigungen und unerwünschten DNS-Fragmenten zu befreien, wurden Produkte der Firmen AveGene/Geneaid und Macherey Nagel verwendet (genaue Bezeichnungen siehe Abschnitt 2.6). Die Produkte wurden nach Anleitung verwendet, optionale Schritte zur Erhöhung der Ausbeute wurden i.d.R. durchgeführt. Die DNS wurde mit 5 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8) von der Matrix eluiert.

### 3.1.9 Agarosegele zur Auftrennung von DNS-Strängen

Um DNS-Stränge nach ihrer Länge aufzutrennen, wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Gele wurden in Konzentrationen von 0,8 bis 4,5 % in 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE) -Puffer angesetzt. Die Gele wurden in den entsprechenden Laufkammern vollständig mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit Probenpuffer für

Agarosegele versetzt und in Taschen des Gels gefüllt. Nach Anlegen der Spannung (80 bis 150 V, je nach Geleigenschaft) bewegten sich die negativ geladenen DNS-Fragmente in Richtung Anode. Kürzere Fragmente bewegen sich dabei schneller als längere. Im Anschluss erfolgte die Inkubation des Gels in Ethidiumbromidlösung und die Detektion der DNS unter UV-Licht.

### **3.1.10 Extraktion von DNS aus Agarosegelen**

Hierbei wurden ebenfalls Produkte der Firmen AveGene/Geneaid sowie Macherey Nagel verwendet und es wurde dabei nach dem zugehörigen Protokoll vorgegangen. Auch wurden i.d.R. optionale Schritte zur Erhöhung der Ausbeute durchgeführt. Für die Extraktion von sehr kleinen DNS-Fragmenten (~50 bp) wurde das NucleoTrap®-System von Macherey Nagel eingesetzt, welches zur Bindung der DNS nicht, wie gängige Systeme, Membranen aus Kieselgel in Säulen verwendet, sondern eine Matrix aus Kieselgel, welche als Suspension vorliegt.

### **3.1.11 Konzentrationsbestimmung von DNS**

Hierzu wurden zwei Methoden eingesetzt. Zum einen wurde die Konzentration im Agarosegel anhand der Intensität der aus der Ethidiumbromidfärbung resultierenden Banden im Vergleich zum aufgetragenen DNS-Größenstandard abgeschätzt. Die Standard-Lösung beinhaltet DNS-Fragmente definierter Länge in bekannter Konzentration. So kann durch einen visuellen Vergleich der zu bestimmenden Banden mit den Banden des Standards die Konzentration abgeschätzt werden. Zum anderen wurden DNS-Konzentrationen von doppelsträngiger DNS photospektrometrisch bestimmt. Diese Bestimmung beruht auf folgender Formel [120]:

$$\text{Konzentration der Nukleinsäuren in } \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} = \text{OD}_{260\text{nm}} * 50$$

### **3.1.12 Ligation von DNS-Fragmenten bei Klonierungen (generell)**

Typischerweise wurden in Ligationsansätzen 50 – 100 ng Plasmid eingesetzt. Die eingesetzte Masse des Fragments, welches in den Vektor ligiert werden sollte, wurde anhand des molaren Verhältnisses zum Plasmid errechnet. Es wurden molare Verhältnisse

von 1:1, 1:3 und 1:10 (Plasmid : Fragment) genutzt. Reaktionsansätze wurden bei 16 °C über Nacht inkubiert. I.d.R. wurde bei Ligationen von Standardklonierungen folgender Ansatz verwendet:

Komponente/Lösung/Lösungsmittel	Volumen
H <sub>2</sub> O	Ergänzung auf 20 µl Gesamtvolumen
Plasmidlösung	variabel
Fragment („Insert“)	variabel
ATP 10 mM	1 µl
Ggf. PEG 4000, 50 % (m/v)	2 µl
T4 DNS-Ligase	0,5 – 2 µl
Puffer für T4 DNS-Ligase, 10x	2 µl

### 3.1.13 Ligation von DNS-Fragmenten zur Erstellung der DNS-Bibliothek

Es wurden hierbei molare Verhältnisse von 1:1, 1:3 und 1:10 (Plasmid : Fragment) genutzt, jedoch bewährte sich das Verhältnis 1:3 am besten. In diesem Ligationsansatz wurden jeweils 1000 ng der Plasmide und 25 ng des zu ligierenden Fragments (Verhältnis 1:3) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei 16 °C für 24 h inkubiert.

Komponente/Lösung/Lösungsmittel	Ansatz Ligation	Ansatz Kontrolle*
H <sub>2</sub> O	Ergänzung auf 20 µl Gesamtvolumen	Ergänzung auf 2 µl Gesamtvolumen
Plasmid	variabel	variabel
Fragment („Insert“)	variabel	-
ATP 10 mM	5 µl	0,5 µl
T4 DNS-Ligase	5 µl	0,5 µl
Puffer für T4 DNS-Ligase, 10x	5 µl	0,5 µl

\*Der Ansatz wurde wegen der geringen Volumina im doppelten Volumen (4 µl) angesetzt, dann aber im angegebenen Volumen (2 µl) weiterverwendet.



### 3.1.14 DNS-Fällung

Zum Entfernen von unerwünschten Salzen aus der DNS-Lösung wurde die Butanolfällung angewendet. Hierzu wurde der Ligationansatz zunächst auf 50 µl (Ligationen bei Klonierungen) aufgefüllt. Es erfolgte die Zugabe von 500 µl Butanol und anschließendes Mischen. Danach wurde der Ansatz bei 13.000 UpM (Centrifuge 5415R, Eppendorf) für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte die Reinigung des Pellets durch Waschen mit 75 %igem Ethanol und anschließend die Zentrifugation bei 13.000 UpM für 10 min bei Raumtemperatur. Das Pellet wurde daraufhin getrocknet und in H<sub>2</sub>O gelöst. Für die Ligation von DNS-Fragmenten zur Erstellung der Plasmidbibliothek wurden alle Volumina dieses Protokolls mit dem Faktor 6 multipliziert.

### 3.1.15 Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNS

Mutationen in Plasmid-DNS wurden nach dem Prinzip der QuikChange® Mutagenese [121] durchgeführt. Hierzu wurden zunächst DNS-Primer erstellt, die zu dem Sequenzabschnitt, in dem die Mutation eingeführt werden soll, bis auf die zu mutierenden DNS-Basen komplementär sind. Die einzuführende Mutation ist in der Sequenz der Primer enthalten. Die Primer wurden nach dem Stratagene Protokoll „QuikChange® Site-Directed Mutagenesis“ erstellt. Es folgte ein PCR-Ansatz im Gesamtvolumen von 50 µl nach folgendem Protokoll:

Komponente/Lösung/Lösungsmittel	Volumen
H <sub>2</sub> O	33 µl
Phusion® HF-Buffer, 5x	10 µl
DNS	1 µl
Primer (10 pmol/µl), „vorwärts“	1,25 µl
Primer (10 pmol/µl), „rückwärts“	1,25 µl
10 mM dNTP-Lösung	1 µl
DMSO	2 µl
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase	0,5 µl

Die Ansätze wurden mit folgendem Programm im PCR-Thermocycler durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
1	95 °C	0,5 min	1
2	95 °C	0,5 min	18
3	55 °C	1 min	
4	68 °C	7 min	
5	4 °C	> 2 min	1

Während der PCR lagern sich die Primer an die einzelsträngige DNS des Plasmids an. Durch die DNS-Polymerase werden Nukleotide komplementär zu den vorhandenen Strängen in 5'-3'-Richtung an das 3' Ende des Primers angeknüpft. Der neu synthetisierte Strang beinhaltet nun die durch den Primer eingeführte Mutation. Nach dem nächsten Verlängerungszyklus entstehen weitere, neu synthetisierte Stränge, welche ebenfalls die Mutation enthalten. So erhöht sich mit zunehmender Anzahl der Zyklen die Anzahl der mutierten Plasmide exponentiell, während die Anzahl der Plasmide ohne Mutation gleich bleibt.

Nach der PCR-Reaktion wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Amplifikation der DNS stattgefunden hat. Um die Plasmide, welche die Mutation nicht beinhalteten, aus dem Ansatz zu beseitigen, wurde die Gegebenheit genutzt, dass DNS in Bakterien methyliert vorliegt, die durch die Polymerase *in vitro* synthetisierte DNS jedoch nicht. So kann methylierte Plasmid-DNS in einem Restriktionsansatz von dem Restriktionsenzym *DpnI* erkannt und restringiert werden, wohingegen das nicht methylierte Plasmid, welches durch die PCR erzeugt wurde, ungespalten zurückbleibt.

Das ungespaltene Plasmid wurde im Anschluss durch Hitzeschocktransformation wie weiter oben beschrieben in bakterielle Zellen eingebracht und durch Minipräparation wieder isoliert. Der entsprechende Bereich der eingeführten Mutation wurde sequenziert, um das Vorhandensein der gewünschten Mutation in der Plasmidsequenz zu verifizieren. Die Sequenzierung erfolgte – wie auch alle anderen DNS-Sequenzierungen – bei der Firma Eurofins-MWG.

### 3.2 Mikrobiologische Methoden

Falls nicht anders vermerkt, wurden für die im Folgenden beschriebenen Methoden die *E. coli*-Stämme XL1-blue oder DH5 $\alpha$  verwendet.

#### 3.2.1 Substanzen in der mikrobiologischen Kultur

Die im Nachfolgenden genannten Substanzen wurden zunächst als Stammlösungen angesetzt und in den angegebenen Konzentrationen – falls nicht anders angegeben – in mikrobiologischen Nährmedien wie flüssigem Medium und Agarplatten eingesetzt.

Substanz	Eingesetzte Konzentration
Ampicillin	100 $\mu\text{g/ml}$
Chloramphenicol	25 $\mu\text{g/ml}$
Kanamycin	25 $\mu\text{g/ml}$
Tetracyclin	12,5 $\mu\text{g/ml}$
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	500 $\mu\text{M}$ (50 $\mu\text{M}$ bei M9-Agarplatten mit Maltose für das Screeningverfahren)
X-gal	35 $\mu\text{l}$ einer 4 %igen (w/v) X-gal-Lösung in DMSO je Agarplatte ausplattiert

#### 3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

*E. coli* besitzt keine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von DNS. Um Plasmide durch Hitzeschocktransformation in diese Zellen einzubringen, müssen diese zunächst kompetent gemacht werden. Dazu wurde aus zuvor vereinzelter *E. coli*-Zellen eine Vorkultur in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotika erstellt und bei 37 °C auf dem Schüttler über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 0,5 ml der Vorkultur in 50 ml frisches LB-Medium mit entsprechendem Antibiotika überführt. Diese Hauptkultur wurde bei 37 °C inkubiert, bis die optische Dichte (OD) bei 600 nm 0,5 betrug. Ab hier wurde die Kultur auf Eis gelagert und das weitere Arbeiten mit den Zellen erfolgte bei entsprechend niedriger Temperatur. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 10 min bei 4000 UpM (Centrifuge 5810R, Eppendorf) pelletiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen in 5 ml TSB-Medium resuspendiert. Zum Schluss erfolgte die

Aliquotierung der Zellsuspension zu 100 oder 50  $\mu$ l. Es folgte entweder eine direkte Verwendung der Zellen zur Transformation oder eine Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen**

Ebenso wie bei der Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden zunächst, wie bereits beschrieben, Vor- und Hauptkultur angesetzt und bis zum Erreichen der OD von 0,5 bei 600 nm bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Es erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 4000 UpM (Centrifuge 5810R, Eppendorf) und die Resuspendierung des Pellets in 5 – 10 ml Glycerol/MOPS-Lösung. Zentrifugation und Resuspendierung wurden im Anschluss zweimal wiederholt. Das Pellet wurde dann in 400  $\mu$ l Glycerol-MOPS Puffer resuspendiert und in Aliquots zu je 40  $\mu$ l aufgeteilt, direkt im Anschluss verwendet oder bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.2.4 Transformation durch Hitzeschock**

Zu 50 oder 100  $\mu$ l Suspension kompetenter *E. coli*-Zellen wurden i.d.R. 50 – 100 ng Plasmid zugeführt. Die Zellsuspension wurde daraufhin für 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte der Hitzeschock für 1 min bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  und die anschließende Inkubation für weitere 15 min auf Eis. Im Anschluss erfolgte nach Zugabe von 1 ml LB-Medium die Inkubation bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 30 – 60 min auf dem Schüttler. Danach wurde die Suspension auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert.

### **3.2.5 Transformation durch Elektroporation**

Bei der Elektroporation werden bakterielle Zellen durch einen Stromstoß für einen kurzen Zeitraum permeabilisiert, sodass ein oder auch mehrere Plasmide aufgenommen werden können. Die Transformationseffizienz ist im Vergleich zur Hitzeschocktransformation deutlich erhöht. Typischerweise wird für Küvetten mit 0,2 cm Spaltbreite bei der Elektroporation von *E. coli* eine Spannung von 12,5 kV/cm angelegt, was einer Spannung von 2,5 kV für diesen Küvettentyp entspricht. Das Programm „Ec2“ des Elektroporationsgerätes MicroPulser™, welches für die Transformation verwendet wurde, baut eine Spannung dieser Stärke für etwa 5 ms auf.

Für die Elektroporation mit zwei verschiedenen Plasmidvarianten wurden zu 40 µl eisgekühlter Suspension elektrokompeter Zellen 25 ng oder weniger jeder Plasmidvariante gegeben. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Küvette gefüllt und diese in den Elektroporator platziert. Es folgte die Abgabe des Stromimpulses und die sofortige Zugabe von 960 µl vorgewärmtem SOC-Medium (37 °C). Im Anschluss erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 60 min. Danach wurden 200 – 1000 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit Antibiotika, entsprechend den Resistenzgenen beider Plasmide, ausplattiert. Die Agarplatten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Bei der Durchführung des Screenings wurde ebenfalls die Elektroporation wie oben beschrieben angewandt, jedoch wurde anstelle des SOC-Mediums M9-Medium mit 0,05 % Maltose (w/v) im gleichen Volumen verwendet. Die nachfolgende Inkubation betrug ebenfalls 60 min bei 37 °C; dieser Ansatz wurde im Anschluss auf drei M9-Agarplatten mit 0,05 % Maltose (w/v), entsprechenden Antibiotika und 50 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) ausplattiert und für 3 bis 5 Tage bei 37 °C inkubiert.

### **3.2.6 Transformation durch Elektroporation bei der Erstellung der DNS-Bibliothek**

Zur Erstellung der DNS-Bibliothek wurden ebenfalls *E. coli*-Zellen durch Elektroporation transformiert, jedoch mit (im Vergleich zu Abschnitt 3.2.5) in einigen Punkten abgewandeltem Protokoll. So wurden hier kompetente Zellen des *E. coli*-Stamms XL1-blue verwendet. Des Weiteren wurde aufgrund der hohen DNS-Konzentration der vorangegangenen Ligation die Elektroporation auf 10 Ansätze aufgeteilt und diese nacheinander bearbeitet. Die Ansätze wurden nach Zugabe des SOC-Mediums wieder vereint. Die Vereinte Suspension wurde dann nach der Inkubation bei 37 °C zu gleichen Volumenanteilen auf 15 quadratischen Petrischalen mit 120 mm Seitenlänge ausplattiert. Diese wurden dann bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur Isolation der Plasmide wurden zunächst die Bakterienzellen nach Zugabe von 3 ml LB-Medium pro Platte resuspendiert. Die resultierende Zellsuspension wurde mit der Pipette aufgenommen und die Plasmide durch Maxipräparation isoliert.

### **3.2.7 Mini-, Midi- und Maxipräparation**

Um Plasmide aus bakteriellen Zellen zu isolieren, wurden Produkte verschiedener Firmen verwendet (genaue Bezeichnungen siehe Abschnitt 2.6). Diese nutzen das Prinzip der

alkalischen Lyse: Die Zellen werden durch Zugabe einer alkalischen Lösung aufgeschlossen und in Anwesenheit von chaotrophen Salzen an eine Kieselgelmatrix in einer Säule gebunden. Nach Reinigung der gebundenen DNS durch Waschpuffer kann diese durch Wasser oder 5 mM Tris/HCl-Puffer eluiert und wieder in Lösung gebracht werden. Für die Isolation kleinerer Mengen DNS bei Minipräparationen wurden Produkte von der Firmen Macherey Nagel und Avegene/Geneaid verwendet, für größere Mengen bei Midi- und Maxipräparation Produkte von Genomed und ebenfalls Macherey Nagel. Die Plasmid-beinhaltenen Zellen wurden vorangehend in flüssigem LB- oder 2YT-Medium mit entsprechenden Antibiotika kultiviert.

### 3.2.8 Der *malE*-Komplementationstest

Zur Kontrolle der korrekten Orientierung von Fusionsproteinen in der inneren *E. coli* Membran, welche im Zuge des  $\beta$ -Galactosidase-Tests exprimiert wurden, fand der *malE*-Komplementationstest Anwendung [122]. Der Test wurde mit dem MBP-defizienten *E. coli*-Stamm NT326 durchgeführt. Dieser ist durch das Fehlen des MBPs nicht in der Lage, Maltose in die Zelle aufzunehmen und zu verstoffwechseln. Andere Komponenten des Transportsystems [123], wie die Gene *malF*, *malG*, und *malK*, sind in diesem Stamm jedoch funktional. So bedarf es zum Wachstum auf Maltose-beinhaltenen Agarplatten der Komplementation durch das MBP im Periplasma. Dies wird durch die korrekte Insertion des Fusionsproteins in die innere Membran erreicht; die sich im Periplasma befindende MBP-Domäne eines korrekt inserierten Fusionsproteins übernimmt die Funktion des ansonsten in löslicher Form im Periplasma vorliegenden, jedoch im Stamm NT326 fehlenden MBPs.

Um die Plasmide in NT326-Zellen einzubringen, erfolgte die Transformation durch Hitzeschock. Obgleich die entsprechenden Plasmide für den  $\beta$ -Galactosidase-Test immer paarweise durch Elektroporation in *E. coli* BTH101-Zellen eingebracht wurden, erfolgte die Transformation der Plasmide hier jeweils einzeln, damit die codierten Fusionsproteine unabhängig voneinander überprüft werden konnten. Nach der Transformation wurden die Zellen zunächst, wie für die Methode der Hitzeschocktransformation beschrieben, auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Kolonien, die sich nach Inkubation über Nacht bei 37 °C bildeten, wurden auf M9-Agarplatten mit 0,2 % Maltose (w/v), 0,5 mM IPTG und entsprechendem Antibiotikum überführt und für 3-5 Tage bei

37 °C inkubiert. Als zusätzliche Kontrolle erfolgte die Überführung der Kolonien von den LB-Agarplatten in gleicher Weise auf 0,5 mM IPTG und ggf. entsprechende Antibiotika enthaltende LB-Agarplatten oder M9-Agarplatten mit 0,2 % Glucose (w/v). Die Agarplatten wurden im Anschluss über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.3 Biochemische Methode

#### 3.3.1 Der $\beta$ -Galactosidase-Test

Der  $\beta$ -Galactosidase-Test ( *$\beta$ -galactosidase-assay*) kann genutzt werden, um die katalytische Aktivität des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase zu bestimmen. Das Enzym ist im Genom von *E. coli* durch das *lacZ*-Gen codiert und wird sowohl in den Reportersystemen GALLEX, BACTH und Varianten ToxR-basierender Systeme [124] als auch in dem in dieser Arbeit vorgestellten System als Reporterenzym genutzt. Die Systeme – GALLEX ausgenommen – nutzen eine DNS-Bindedomäne (ToxR-basierende Systeme) oder einen sekundären Botenstoff (BACTH- und hier vorgestelltes System) zur Aktivierung des Reportergens. Interagieren die zu untersuchenden Proteinkomponenten, erfolgt die Expression der  $\beta$ -Galactosidase. Beim GALLEX-System erfolgt, wie in Abschnitt 1.7 dargelegt, eine Repression des Gens. Die Anwesenheit des Enzyms im Zelllysate wird über eine Farbreaktion gezeigt: Die Spaltung von *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG) zu Galactose und dem gelben Farbstoff *o*-Nitrophenol wird von der  $\beta$ -Galactosidase katalysiert. Das Absorptionsmaximum von *o*-Nitrophenol liegt bei 420 nm. Daher kann mit Hilfe des Photospektrometers die Anwesenheit des Farbstoffes bestimmt werden.

Zur Durchführung des Tests erfolgte zunächst die Transformation von *E. coli* DHM1- oder BTH101-Zellen durch Elektroporation mit zwei Plasmiden. Eines der Plasmide codierte stets ein Fusionsprotein, welches das *B. pertussis* Adenylatcyclasefragment T25 enthält, das andere codierte ein T18-Fragment-enthaltendes Protein. Dabei handelte es sich beispielsweise um die Kombination der Kontrollplasmide pALT18ii-GpA17 und pBLT25ii-GpA17. Mit den resultierenden Kolonien wurden zunächst Vorkulturen aus 3 ml LB-Medium und entsprechenden Antibiotika angesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dann erfolgte die Überführung von 0,25 ml der Vorkultur in 10 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika und (falls nicht anders erwähnt) 0,5 mM IPTG, gefolgt von einer Inkubation bei 37 °C. Bei einer OD<sub>600nm</sub> von etwa 0,6 wurde die Inkubation der

Kultur beendet und diese auf Eis gestellt. Danach wurde die  $OD_{600nm}$  zur späteren Auswertung noch photospektrometrisch exakt bestimmt.

Die enzymatische Reaktion fand in einem 2 ml Reaktionsgefäß statt. In dieses wurden zunächst 900  $\mu$ l 1x Z-Puffer sowie 100  $\mu$ l Zellsuspension der Hauptkultur vorgelegt. Dann erfolgte die Zellyse durch Zugabe von 10  $\mu$ l 0,1 %iger Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung und 2 Tropfen Chloroform (etwa 10  $\mu$ l). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 200  $\mu$ l ONPG-Lösung gestartet. Nach deutlicher Gelbfärbung des Ansatzes der Positivkontrolle erfolgte der Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 0,5 M  $Na_2CO_3$ . Danach wurden die Ansätze für 1 Minute bei 13.200 UpM (Centrifuge 5415R, Eppendorf) bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand zwecks photospektrometrischer Messung der  $OD_{420nm}$  und  $OD_{550nm}$  in Küvetten überführt. Alle Reaktionen eines Experiments wurden mit der gleichen Reaktionszeit durchgeführt und alle Ansätze wurden als Triplikate bearbeitet. Die Vorkulturen der Triplikate eines Ansatzes wurden mit verschiedenen Kolonien aus der entsprechenden Transformation angesetzt (ausgenommen hiervon sind die Messungen P1 – P240 der DNS-Bibliothek, hier wurde der  $\beta$ -Galactosidase Test ebenfalls in Triplikaten durchgeführt, jedoch wurden die jeweiligen 100  $\mu$ l Zellsuspension aus derselben Hauptkultur entnommen. Für die Proben P241 – P273 erfolgte nur eine Einzelbestimmung für jeden Ansatz. Siehe auch Abb. 30).

Die Berechnung der  $\beta$ -Galactosidase-Einheiten ( $\beta$ -Gal-Units), welche die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase widerspiegeln, wurde mithilfe folgender Formel berechnet [104]:

$$\beta - Gal - Units = 1000 * \frac{OD[420nm] - (1,75 * OD[550nm])}{t * v * OD[600nm]}$$

Hierbei entspricht t der Reaktionszeit in Minuten und v dem eingesetzten Volumen der Zellsuspension der Hauptkultur in Millilitern.

### **3.4 Konstruktion der Plasmide des Systems zur Detektion der Interaktion transmembraner Helices.**

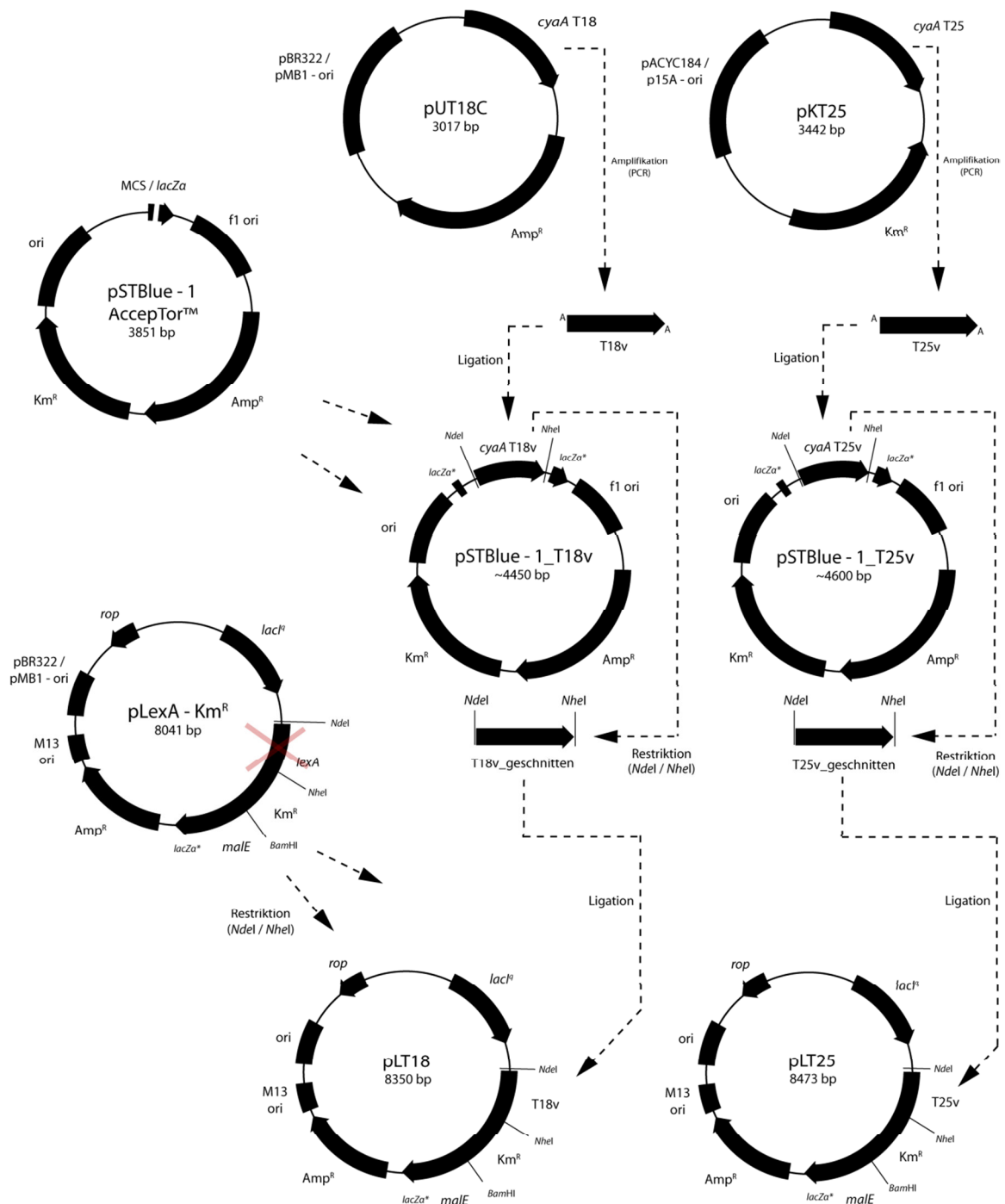
Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues genetisches Reportersystem konstruiert, welches auf dem Funktionsprinzip des BACTH-Systems basiert. Dieses System ermöglicht es, heterotypische Helix-Helix Interaktionen, sowie eine in Bezug auf die



Proteinsyntheserichtung antiparallele Orientierung zweier verschiedener Transmembranhelices in den Versuchsaufbau miteinzubeziehen. Des Weiteren kann durch die periplasmatische MBP-Domäne die korrekte Orientierung der Fusionsproteine in der inneren *E. coli*-Membran kontrolliert werden, was zuvor mit dem BACTH-System nicht möglich war.

Alle durch Klonierung hergestellten Plasmide wurden durch Sequenzierung auf Fehlerfreiheit kritischer Sequenzabschnitte überprüft. Alle Sequenzierungen wurden von der Firma MWG Operon durchgeführt. Auch Kontrollrestriktionen wurden genutzt, um Klonierungsschritte wie Ligationen oder Mutagenesen zu überprüfen.

Die im Folgenden erläuterten Klonierungsschritte sind zusätzlich in den Abbildungen 9-11 gezeigt. Die Fragmente T25 und T18 der *B. pertussis* Adenylatcyclase wurden zunächst durch PCR-Ansätze von den Plasmiden pKT25, pUT18, pKNT25 und pUT18C amplifiziert. Dazu wurden die DNS-Primer ct\_NoSt\_T25v\_NheI und nt\_T25v\_NdeI (für Plasmid pKT25), nt\_T18Cv\_NdeI\_2 und ct\_NoSt\_T18Cv\_NheI\_2 (für Plasmid pUT18C), nt\_KNT25h\_EcoRI\_NheI\_BamHI und ct\_KNT25h\_HindIII (für Plasmid pKNT25) sowie nt\_T18h\_EcoRI\_NheI\_BamHI und ct\_T18h\_HindIII\_2 (für Plasmid pUT18) verwendet. Die DNS-Fragmente, die von den Plasmiden pKT25 und pUT18C stammen, werden im Folgenden als T25v und T18v bezeichnet. Sie codieren nach Abschluss aller Klonierungsschritte das N-terminale Ende des jeweiligen Fusionsproteins. Fragmente, die auf Basis der Plasmide pKNT25 und pUT18 amplifiziert wurden, codieren für dessen C-terminales Ende und werden T25h und T18h genannt. Zusätzlich wurden über die PCR-Primer neue Schnittstellen zu Klonierungszwecken eingeführt: Die Fragmente T25v und T18v besitzen je eine *NdeI* und eine *NheI* Schnittstelle, in die Fragmente T25h und T18h wurden die Schnittstellen *EcoRI*, *NheI*, *BamHI* und *HindIII* eingefügt. Die vier Fragmente wurden anschließend mit dem TA-Klonierungssystem AccepTor™ Vector Kit (siehe auch Abschnitt 3.1.2) in den zugehörigen Vektor pSTBlue-1 AccepTor™ ligiert. Daraus ergaben sich die Plasmide pSTBlue-1\_T25v, pSTBlue-1\_T18v, pSTBlue-1\_T25h und pSTBlue-1\_T18h. Die Plasmide pSTBlue-1\_T25v und pSTBlue-1\_T18v wurden dann nachfolgend an den Schnittstellen *NheI* und *NdeI* restringiert, um die Fragmente T25v\_geschnitten und T18v\_geschnitten zu erhalten. Die Plasmide pSTBlue-1\_T25h und pSTBlue-1\_T18h wurden an den Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* restringiert, dies ergab



**Abb. 9: Konstruktion der Plasmide pLT18 und pLT25.** Bezeichnungen *cyA T18/cyA T25*: Sequenzabschnitte codieren die Adenylatcyclasefragmente T18 bzw. T25; *ori*: Replikationsursprung; *lacZa*: codiert für die  $\beta$ -Galactosidase; *lacZa\**: Gen durch Klonierung zerstört; *MCS*: multiple Klonierungsstelle; *lacI<sup>R</sup>*: codiert den Lac-Repressor; *rop*: codiert das Rop-Protein („repressor of primer“). pSTBlue-1 Acceptor<sup>TM</sup>: linearisierter Vektor mit T-Überhängen zur TA-Klonierung. Ist auf dem Pfad (unterbrochene Linie) ein Zwischenprodukt (lineare, doppelsträngige DNS) gezeigt, so wurde nach einer Restriktion das gezeigte, restringierte Fragment („Insert“) zur Erstellung des nächsten Klonierungsproduktes verwendet. Ist kein Zwischenprodukt gezeigt, so wurde der den Replikationsursprung beinhaltende Teil (linearisierter Vektor) zur Erstellung des nächsten Produkts weiterverwendet.

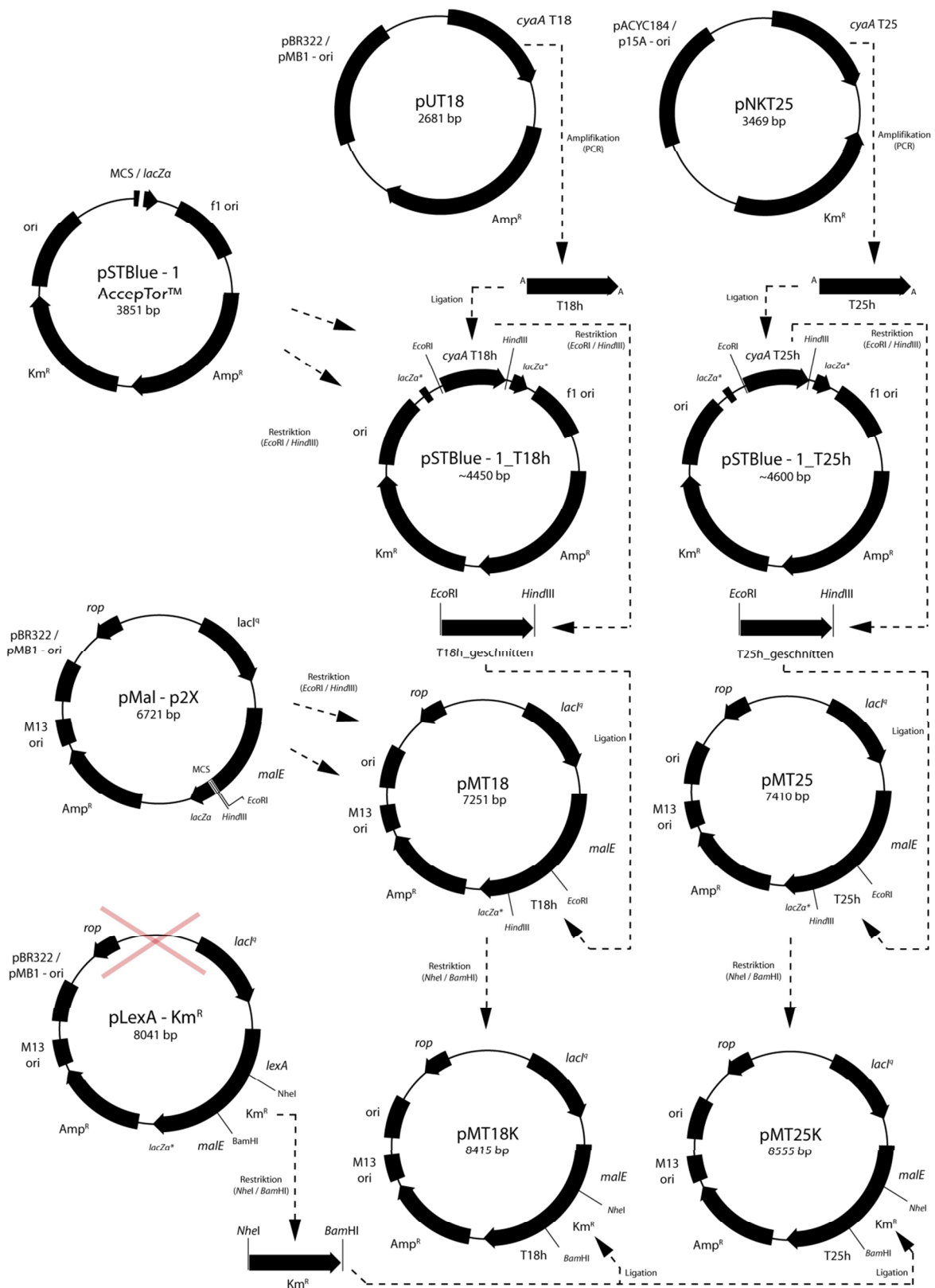


Abb. 10: Konstruktion der Plasmide pMT18K und pMT25K. *lexA*: codiert LexA-DNA-Bindedomäne; rotes Kreuz: Nach Restriktion nicht weiter verwendeter Teil des Plasmids.

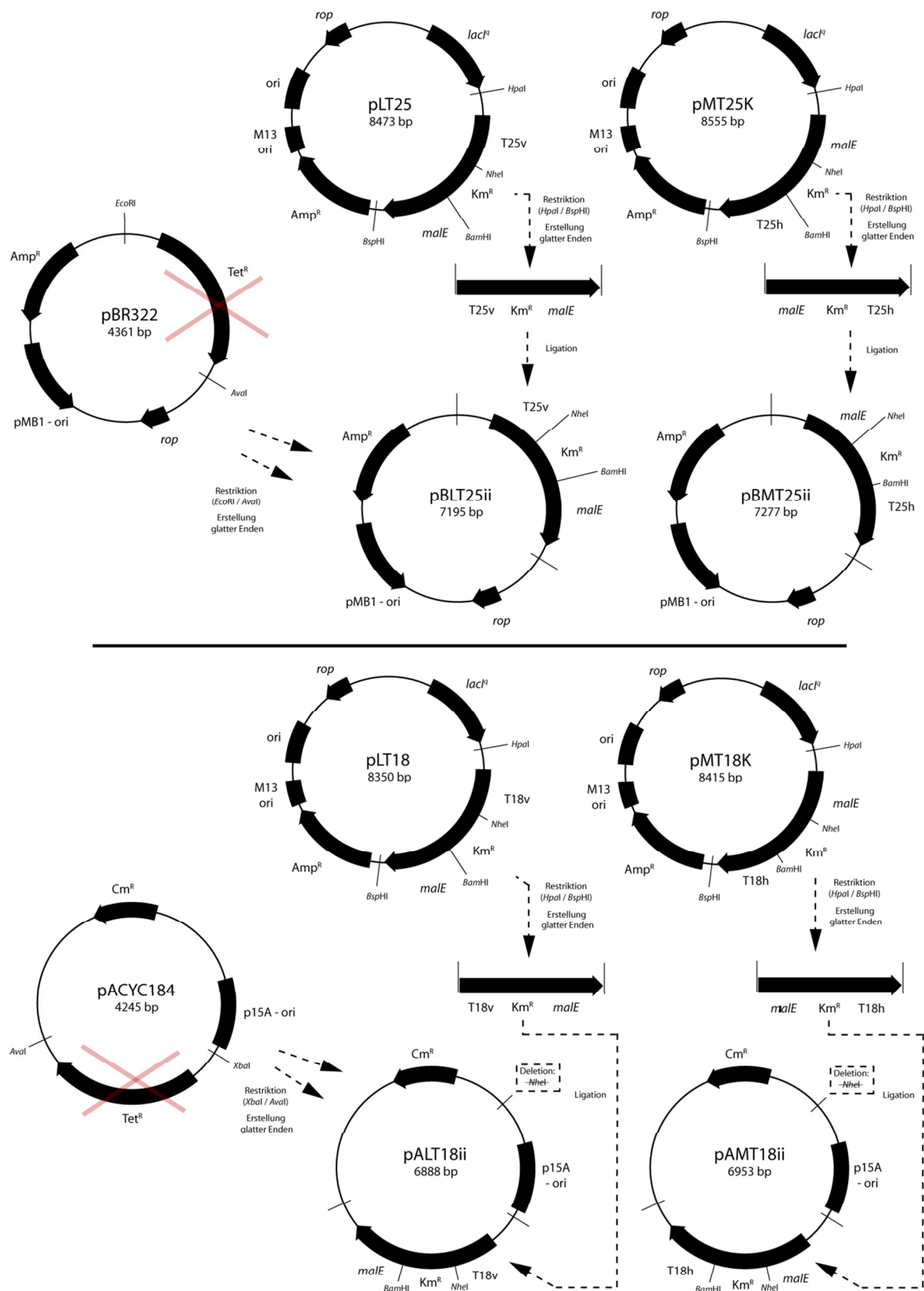


Abb. 11: Konstruktion der Plasmide pBLT25ii, pBMT25ii, pALT18ii und pAMT18ii. Deletion *NheI*: Schnittstelle wurde nach der Ligation durch Mutagenese entfernt.

die Fragmente T25h\_geschnitten und T18h\_geschnitten. Das Plasmid pMal-p2X wurde durch die Enzyme *EcoRI* und *HindIII* restringiert und die Fragmente T25h\_geschnitten und T18h\_geschnitten wurden über diese Schnittstellen in den Vektor einligiert. Dies ergab die Vektoren pMT25 und pMT18. Die Schnittstellen *NheI* und *NdeI* wurden genutzt, um den Vektor pLexA-Km<sup>R</sup> zu restringieren. Es folgte die Ligation der Fragmente T25v\_geschnitten und T18v\_geschnitten in den Vektor pLexA-Km<sup>R</sup>. Die so generierten Vektoren erhielten die Bezeichnungen pLT25 und pLT18. Um die für die Kanamycinresistenz (Km<sup>R</sup>) codierende Genkassette zu erhalten, erfolgte die Restriktion des Plasmids pLexA-Km<sup>R</sup> mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *BamHI*. Die Plasmide pMT25 und pMT18 wurden ebenfalls mit diesen Enzymen restringiert und die Km<sup>R</sup>-Genkassette in die Plasmide einligiert. Die erstellten Plasmide wurden als pMT25K und pMT18K bezeichnet. Anschließend wurden die Plasmide pLT25, pLT18, pMT25K und pMT18K durch die Enzyme *BspHI* und *HpaI* restringiert und an den Schnittstellen dieser für die Fusionsproteine codierenden DNS-Fragmente wurden glatte Enden (*blunt ends*) generiert. Das Plasmid pBR322 wurde an den Schnittstellen *AvaI* und *EcoRI* restringiert, gefolgt durch die Erstellung glatter Enden an diesen Schnittstellen. Durch die Ligation des restringierten Plasmids pBR322 und den aus pLT25 und pMT25K stammenden Fragmenten wurden dann die Plasmide pBLT25ii und pBMT25ii erstellt. Das Plasmid pACYC184 wurde durch die Enzyme *AvaI* und *XbaI* restringiert und es wurden ebenfalls glatte Enden generiert. Es erfolgte die Ligation der aus pLT18 und pMT18K stammenden, für die Fusionsproteine codierenden Fragmente in den restringierten Vektor pACYC184. Anschließend wurde in den beiden Vektoren jeweils eine *NheI* Schnittstelle durch Mutagenese deletiert. Hierzu wurde das Primerpaar NheIQC\_FpACYC184/NheIQC\_RpACYC184 verwendet. Die resultierenden Plasmide wurden pALT18ii und pAMT18ii benannt.

Die Transmembrandomäne des humanen GpA sollte als Positivkontrolle für starke Interaktionstendenz eingesetzt werden. Zunächst sollten verschiedene Längen dieser Domäne – von 16 bis 19 Aminosäuren – bezüglich ihrer Interaktionstendenzen getestet werden. Dazu wurden kurze doppelsträngige DNS-Kassetten aus den Oligomeren GpA-TMR16-F/GpA-TMR16-R bis GpA-TMR19-F/GpA-TMR19-R hergestellt. Die Plasmide pALT18ii und pBLT25ii wurden an den Schnittstellen *NheI* und *BamHI* restringiert und alle vier Varianten der DNS-Kassetten in jedes der beiden Plasmide einligiert. Die

Plasmide wurden pALT18ii-GpA16 bis pALT18ii-GpA19 und pBLT25ii-GpA16 bis pBLT25ii-GpA19 benannt.

Die Wildtyp-Variante der GpA-Transmembrandomäne zeigt eine starke Interaktionstendenz, wohingegen die GpA-Mutante G83I nur eine schwache Interaktionstendenz aufweist [122, 125]. Die Transmembrandomäne mit der Substitution G83I wurde ebenfalls zur Kontrolle eingesetzt. Dazu wurden die Plasmide pALT18ii und pBLT25ii an den Schnittstellen *NheI* und *BamHI* restringiert und eine doppelsträngige DNS-Kassette, welche zuvor aus den DNS-Oligomeren GpA-G83I-17-F und GpA-G83I-17-R hergestellt wurde, in beide Vektoren einligiert.

Andere für die Messung von Helix-Helix-Interaktionen konstruierte Plasmide wurden auf die gleiche Weise hergestellt wie die Kontrollplasmide, die für die GpA- und GpA G83I-Transmembrandomänen codieren: Die Schnittstellen *NheI* und *BamHI* werden universell genutzt, um doppelsträngige DNS-Kassetten, die für Transmembrandomänen codieren, in die Plasmide einzuligieren.

### 3.5 Konstruktion der Plasmide der DNS-Bibliothek

Zunächst wurde eine doppelsträngige DNS-Kassette aus den DNS-Oligomeren BGHrev und dem degenerierten Oligomer LEUscr2 erzeugt. Die Ergänzung fehlender Basen zum Doppelstrang wurde durch eine T4 DNS-Polymerase-katalysierte Reaktion durchgeführt. Danach wurde das doppelsträngige Oligomer sowie die Plasmide pLT25 und pALT18ii an den Schnittstellen *NheI* und *BamHI* restringiert und die DNS-Kassette in beide Plasmide einligiert. Dann erfolgte die Transformation von *E. coli* XL1-blue Zellen durch die Plasmide (Ligation und Transformation erfolgten nach einem modifizierten Protokoll, wie unter „Molekularbiologische Methoden“ und „Mikrobiologische Methoden“ beschrieben). Die Plasmid-DNS wurde durch Maxipräparation isoliert. Die so gewonnenen Plasmide stellen die DNS-Bibliothek dar und wurden pLT25Lib und pALT18iiLib benannt.

Zur Konstruktion eines weiteren Kontrollplasmids wurde das Plasmid pLT25 an den Schnittstellen *NheI* und *BamHI* restringiert und die aus den DNS-Oligomeren GpA-TMR17-F/GpA-TMR17-R hergestellte doppelsträngige DNS-Kassette in das Plasmid einligiert. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pLT25-GpA; es wurde zusammen mit

pALT18ii-GpA17 bei der Durchführung des Screeningverfahrens für einen Kontrollansatz verwendet.

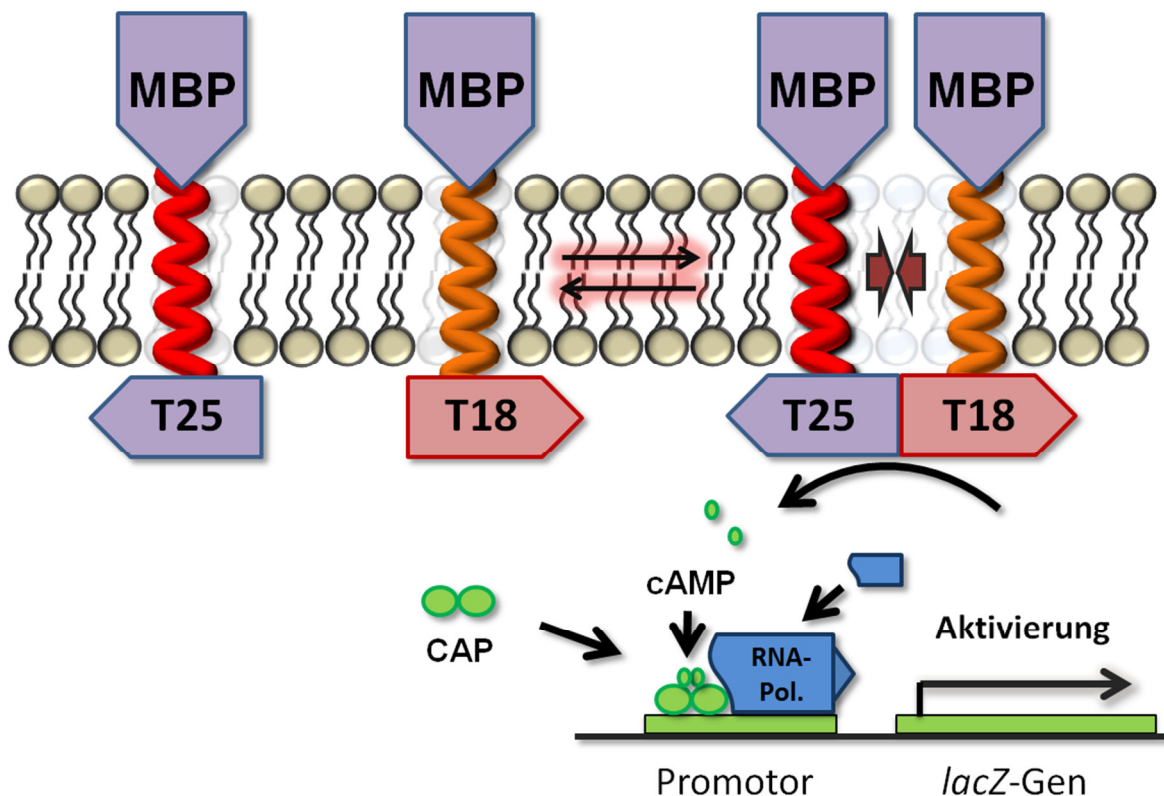
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Eigenschaften und Funktionsweise des entwickelten Reportersystems

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein genetisches System entwickelt, mit dem es möglich ist, Interaktionen transmembraner Helices zu untersuchen. Das Prinzip des Systems liegt der Beobachtung zugrunde, dass das Enzym Adenylatcyclase aus *B. pertussis* keine wesentliche katalytische Aktivität aufweist, wenn es in einer Zelle gespalten, also in Form von zwei unabhängigen Polypeptidketten, vorliegt. Erfolgt die genetische Fusion mit interagierenden Proteinen, werden die beiden Enzymfragmente durch die Interaktion der Proteine in räumliche Nähe gebracht, und die enzymatische Aktivität wird wiederhergestellt (siehe auch Abb. 7 und [105, 107]). Das hier konstruierte Reportersystem beruht auf Fusionsproteinen, die aus einer cytoplasmatischen, einer transmembranen und einer periplasmatischen Domäne bestehen (siehe Abb. 12). Jeweils ein Fragment der Adenylatcyclase (T18 oder T25) stellt die cytoplasmatische Domäne eines Fusionsproteins dar. Die Transmembrandomäne ist der zu untersuchende Teil des Proteins und kann beliebig gewählt werden. Vorgesehen sind Transmembranhelices, welche die Membran einmal komplett durchspannen und so ein bitopisches Transmembranprotein bilden. Die cytoplasmatische ist mit der periplasmatischen Domäne über die Transmembrandomäne verbunden. Bei der periplasmatischen Domäne handelt es sich um das Maltose-bindende Protein MBP. Dieses dient der Verankerung des Fusionsproteins in der Membran [98] und erlaubt des Weiteren Kontrollen zur Feststellung der korrekten Orientierung des Proteins in der Lipiddoppelschicht. Eine Interaktion der Transmembrandomänen bringt die cytoplasmatischen Komponenten in räumliche Nähe und stellt die katalytische Aktivität der Adenylatcyclase wieder her. Das Produkt der katalysierten Reaktion, der sekundäre Botenstoff cAMP, aktiviert daraufhin ein Reporterogen. Das System basiert auf Plasmiden: Die genetische Information wird durch Vektoren in die bakterielle Zelle eingebracht. Daraufhin werden die Fusionsproteine exprimiert und in die innere *E. coli*-Membran eingebaut. Das infolge der Oligomerisierung der Fusionsproteine aktivierte Reporterogen ist jedoch nicht auf den Plasmiden, sondern im bakteriellen Genom lokalisiert.

Für eine detektierbare enzymatische Aktivität der Adenylatcyclase bedarf es der Expression beider genetisch an die Fusionsproteine gekoppelten Fragmente – T25 und T18 – in einer bakteriellen Zelle, was die Anwesenheit von zwei verschiedenen Fusions-





**Abb 12: Funktionsprinzip des konstruierten Reportersystems.** Die Fragmente T25 und T18 der *B. pertussis* Adenylatcyclase kommen bei der Interaktion der transmembranen Domänen (rot und orange, Interaktion symbolisiert durch dunkelrote Pfeile) in räumliche Nähe. Dadurch wird cAMP synthetisiert, welches zusammen mit dem Aktivatorprotein CAP an die Promotorregion des *lacZ*-Gens im *E. coli*-Genom bindet. In Folge kann sich die RNA-Polymerase (RNA-Pol.) an die Promotorregion anlagern und die Transkription des *lacZ*-Reportergens erfolgt.

proteinen voraussetzt. Des Weiteren muss eine Interaktion der transmembranen Helices erfolgen, um die Fragmente in räumliche Nähe zu bringen. Sind beide Bedingungen erfüllt, erfolgt die Synthese von cAMP aus ATP. Durch diesen sekundären Botenstoff im Zusammenspiel mit dem Protein CAP wird das *lacZ*-Reportergen im *E. coli*-Genom, welches das Enzym  $\beta$ -Galactosidase codiert, aktiviert. Dadurch wird eine Detektion der Interaktion durch einen  $\beta$ -Galactosidase-Test möglich. Für diesen Test wird dem Zellysate ein synthetisches Substrat der  $\beta$ -Galactosidase zugesetzt und die durch das Reaktionsprodukt hervorgerufene Absorption bei 412 nm Wellenlänge photospektrometrisch bestimmt (eine detaillierte Beschreibung erfolgte in Abschnitt 3.3.1). Die Absorption wird zur Berechnung der  $\beta$ -Gal-Units genutzt, mit deren Hilfe eine Aussage über die Stärke der Interaktion der untersuchten Transmembrandomänen gemacht werden kann. Die  $\beta$ -Gal-Units stellen kein absolutes Maß dar, sondern müssen immer in

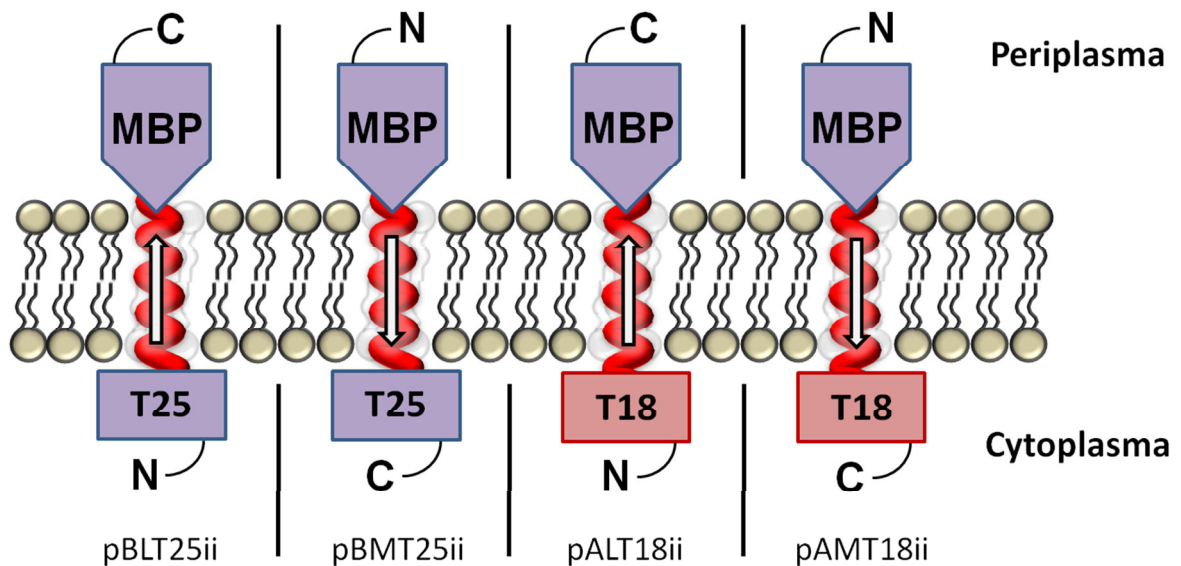
Abhängigkeit von den Kontrollen für starke und schwache Interaktion (siehe Abschnitt 4.2) betrachtet werden. Für die Detektion mit dem Reportersystem werden stets die *E. coli*-Stämme DHM1 oder BTH101 eingesetzt, welche Adenylatcyclase-defizient sind. Dies schließt eine Beeinträchtigung des cAMP-Spiegels durch die *E. coli*-eigene Adenylatcyclase aus.

Das Reportersystem ermöglicht die Detektion heterotypischer Interaktionen von Transmembranhelices. Es werden stets zwei Plasmide verwendet, von denen das eine das T25- und das andere das T18-Fragment der Adenylatcyclase codiert. Um die Interaktion von zwei verschiedenen Helices zu untersuchen, werden zunächst zwei Plasmide generiert, die die entsprechenden, für die Helices codierenden DNS-Fragmente beinhalten. Für diese Klonierungen werden die universell einsetzbaren Schnittstellen *NheI* und *BamHI* genutzt (siehe auch Abschnitt 3.4). Des Weiteren ist es möglich, Interaktionen zwischen zwei Helices zu untersuchen, die eine antiparallele Orientierung zueinander in der Membran einnehmen: Bei einer solchen Konstellation befindet sich das N-terminale Ende einer Transmembrandomäne im Peri-, das der anderen hingegen im Cytoplasma (siehe Abb. 13).

Die für das hier vorgestellte System konstruierten Plasmide wurden pBLT25ii, pBMT25ii, pALT18ii und pAMT18ii benannt. Sie codieren unter anderem für die Domänen der Fusionsproteine, nämlich die periplasmatische MBP-Domäne sowie die intrazelluläre, enzymatische Komponente in Form des Adenylatcyclasefragments T25 oder T18. Anstelle der für die Transmembrandomäne codierenden Sequenz enthalten die oben genannten Plasmide zu Klonierungszwecken eine Kanamycinresistenz ( $Km^R$ )-Genkassette. Diese kann durch die Restriktionsenzyme *NheI* und *BamHI* entfernt und durch ein Oligonukleotid, welches für eine beliebige Transmembranhelix codiert, ersetzt werden. Diese Transmembranhelix verbindet dann intra- und extrazelluläre Domäne des Fusionsproteins miteinander. Die diesbezüglichen Schnittstellen der Plasmide sind untereinander kompatibel: Ein mit dem Leserahmen eines der Systemplasmide kompatibles doppelsträngiges Oligonukleotid kann auch in die anderen Plasmide einligiert werden und so eine Sequenz erzeugen, die für ein Fusionsprotein codiert.

Um eine parallele Ausrichtung zweier Helices im Experiment zu betrachten, bieten sich zwei Plasmidkombinationen an: Sollen beide N-Termini im cytoplasmatischen Raum lokalisiert sein, so können die Plasmide pBLT25ii und pALT18ii verwendet werden (siehe

Abb. 13). Bei N-Termini, die sich im Periplasma befinden, bietet sich die Kombination pBMT25ii und pAMT18ii an. Zur Untersuchungen antiparalleler Orientierungen können die Kombinationen pBLT25ii und pAMT18ii oder pBMT25ii und pALT18ii genutzt werden.



**Abb. 13: Schematische Darstellung der Fusionsproteine in der Membran.** Hier sind die vier Varianten der Fusionsproteine gezeigt, die von den darunter angegebenen Plasmiden codiert werden, wenn ein für eine Transmembranhelix codierendes DNS-Fragment in das jeweilige Plasmid inseriert wurde (Die Plasmide pBLT25ii, pBMT25ii, pALT18ii und pAMT18ii enthalten noch keine für eine Transmembranhelix codierende Sequenz). N- und C-Termini der Fusionsproteine in Periplasma oder Cytoplasma sind durch die jeweiligen Buchstaben angedeutet. Die Pfeile veranschaulichen die Lage des Proteins, indem sie vom N- in Richtung C-Terminus deuten.

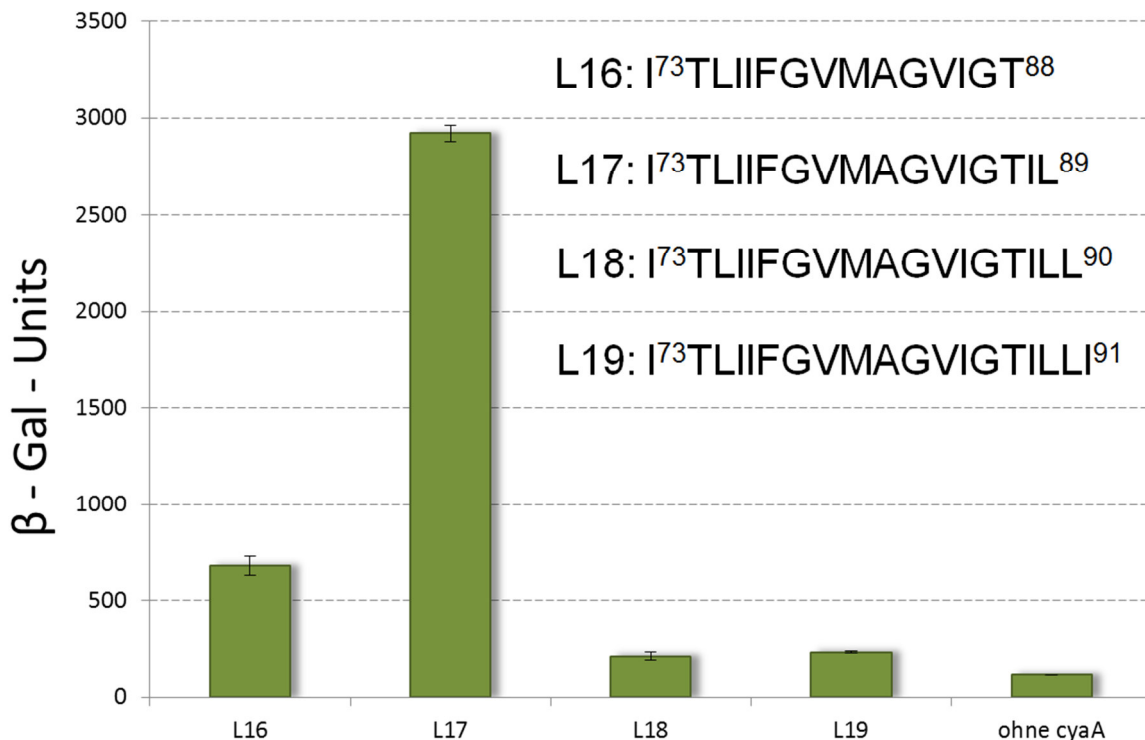
Da zur Nutzung des Systems stets zwei verschiedene Plasmide in der bakteriellen Zelle anwesend sein müssen, wurden für die betreffenden Vektoren diesbezüglich kompatible Replikationsursprünge gewählt. So basieren die Plasmide pALT18ii und pAMT18ii auf dem Vektor pACYC184 und besitzen den Replikationsursprung p15A. Die Kopienzahl des Vektors pro Zelle ist niedrig (*low copy vector*) und beträgt etwa 15 [126]. Die Vektoren pBLT25ii und pBMT25ii basieren auf dem Vektor pBR322, welcher ebenfalls in einer niedrigen Kopienzahl von etwa 20 vorliegt; verantwortlich für die Replikation des Plasmids ist der pMB1-Replikationsursprung. Die beiden Replikationsursprünge p15A und pMB1 sind kompatibel und können in einer Zelle gleichzeitig auftreten.

Bei dem Promotor, der die Expression der Fusionsproteine kontrolliert, handelt es sich um den aus dem Vektor pMal-p2X stammenden *tac*-Promotor. Dieser synthetische Promotor ist ein hybrides Konstrukt, welches auf den *lac*- und *trp*-Promotoren basiert [127]. Er ist für stärkere Expressionsraten als der *lac*-Promotor bekannt und kann ebenso wie dieser durch die Zugabe von IPTG induziert werden.

## 4.2 Kontrollen

Als Positivkontrolle wurde die Transmembranhelix des GpA gewählt, von der bekannt ist, dass sie eine starke homotypische Interaktionstendenz aufweist [58, 98, 122]. Um zu prüfen, welche Länge der Transmembrandomäne des GpA sich als geeignet erweist, wurden DNS-Oligomerkassetten, die für Helices in der Länge von 16 bis 19 Aminosäureresten codieren, in die Plasmide pALT18ii und pBLT25ii inseriert. Die Plasmide wurden pALT18ii-16 bis pALT18ii-19 und pBLT25ii-16 bis pBLT25ii-19 benannt. Die Vektoren, die für Helices gleicher Länge codierten, wurden durch Elektroporation paarweise in *E. coli* DHM1-Zellen eingebracht, um die Interaktionstendenzen bestimmen zu können. Die Ergebnisse des  $\beta$ -Galactosidase-Tests zeigten für eine Länge der GpA-Transmembranhelix von 17 Aminosäureresten den höchsten Wert in  $\beta$ -Gal-Units; für die Helices der Längen 16, 18 und 19 wurden deutlich niedrigere Werte gemessen (siehe Abb. 14). Für alle im Folgenden gezeigten Ergebnisse des  $\beta$ -Galactosidase-Tests wurde als Kontrolle stets die GpA-Transmembrandomäne mit einer Länge von 17 Aminosäureresten verwendet. Die entsprechenden Plasmide pALT18ii-GpA17 und pBLT25ii-GpA17 wurden für die Kontrollansätze der  $\beta$ -Galactosidase-Tests – mit Ausnahme der Ansätze des Screeningverfahrens – verwendet. Für die Kontrollansätze der  $\beta$ -Galactosidase-Tests des Screeningverfahrens wurden die Plasmide pALT18ii-GpA17 und pLT25-GpA in den Kontrollansätzen eingesetzt (siehe auch Abschnitt 5.1.3).

Des Weiteren wurde die Transmembrandomäne der GpA-Mutante G83I als Referenz für schwache Helix-Helix-Interaktion genutzt. Die schwache, jedoch noch vorhandene Interaktionstendenz konnte zuvor belegt werden [122, 125]. Zu diesem Zweck wurde ebenfalls jeweils eine DNS-Oligomerkassette in die Plasmide pALT18ii und pBLT25ii inseriert. Diese codiert für die GpA-Transmembranhelix von 17 Aminosäuren Länge, in der der im Wildtyp vorkommende Glycin-Rest an der Position 83 durch einen Isoleucinrest



**Abb. 14: Vergleich der Interaktionstendenzen von GpA-Transmembrandomänen verschiedener Länge.** Die GpA-Transmembranhelix wurde in Varianten von 16 (L16) bis 19 (L19) Aminosäuren Länge untersucht. Dargestellt sind die durch den  $\beta$ -Galactosidase-Test ermittelte  $\beta$ -Galactosidase-Einheiten ( $\beta$ -Gal-Units). Ein höherer Wert der  $\beta$ -Gal-Units beschreibt eine stärkere Interaktionstendenz. Die Primärsequenzen der verwendeten Transmembrandomänen L16-L19 sind jeweils gezeigt. Die Nummerierung der Reste entspricht der der GpA-Wildtyp Sequenz. Als Negativkontrolle (ohne *cyaA*) diente ein Ansatz ohne die enzymatischen Komponenten der Adenylatcyclase (Plasmide pACYC184 und pBR322).

ersetzt wurde. Die erzeugten Plasmide wurden pALT18ii-G83I und pBLT25ii-G83I benannt.

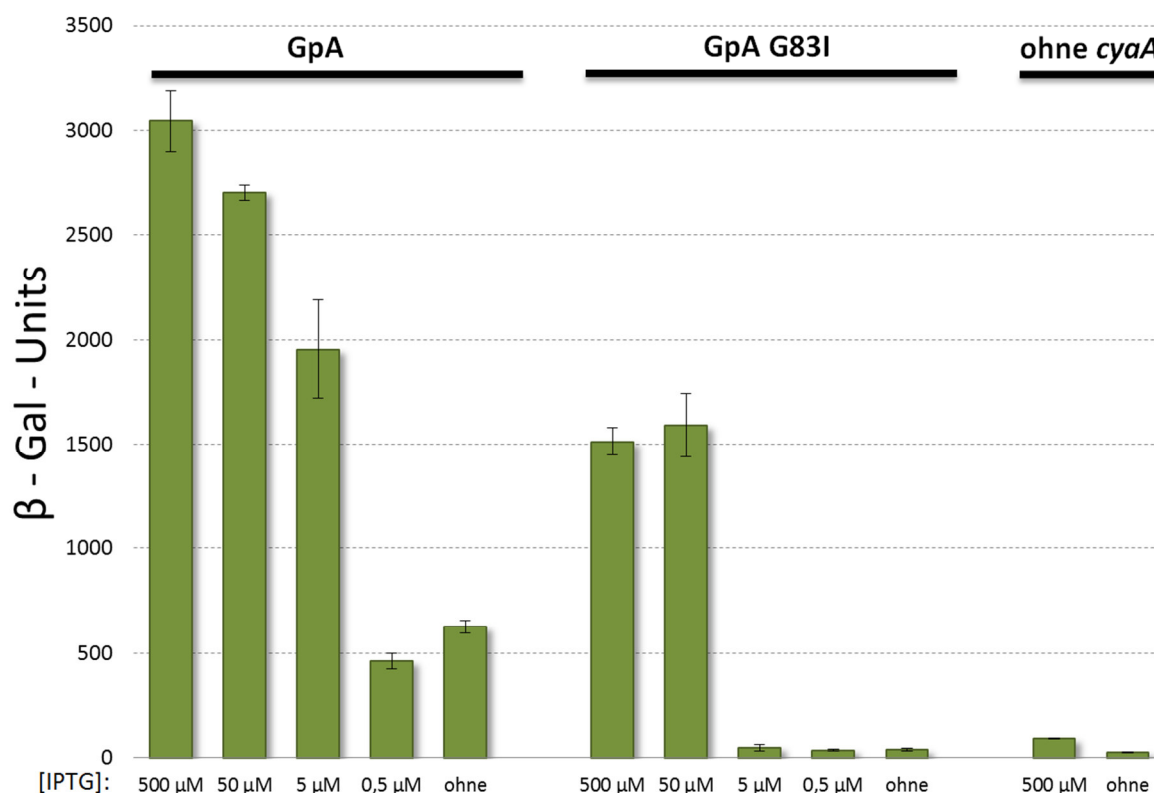
Als Negativkontrolle beim  $\beta$ -Galactosidase-Test wurden die parentalen Plasmide pACYC184 und pBR322 durch Elektroporation in den entsprechenden *E. coli*-Stamm eingebracht. Da diese Vektoren nicht für die Fragmente der Adenylatcyclase codieren, wird in diesem Ansatz keine Produktion von cAMP und somit auch keine deutliche Aktivierung des Reportergens erwartet. Eine gewisse  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität kann in der Negativkontrolle jedoch auftreten, als Gründe hierfür sind eine unvollständige Repression des *lacZ*-Reportergens sowie die nicht-enzymatische Hydrolyse von ONPG in Abwesenheit der Adenylatcyclase (siehe auch Abschnitt 3.3.1) anzuführen.

### 4.3 IPTG-Titration

Die Konzentration des Induktors IPTG spielt für das hier vorgestellte Reportersystem eine wesentliche Rolle, da durch diese die Stärke der Expression der Fusionsproteine und des Reporterenzym  $\beta$ -Galactosidase beeinflusst wird. Mit diesem Experiment wurde die Auswirkung unterschiedlicher IPTG-Konzentrationen auf die Ergebnisse des  $\beta$ -Galactosidase-Tests untersucht.

Das *lac*-Operon von *E. coli* besteht aus einem Repressorgen, einem Promotor, einem Operator und den Strukturgenen. Letztere beinhalten unter anderem das *lacZ*-Gen, welches für die  $\beta$ -Galactosidase codiert. Das Repressorprotein lagert sich an der Operatorregion an und verhindert so, dass die Strukturgene von der RNA-Polymerase abgelesen werden können. In Anwesenheit der Induktoren Allolactose oder IPTG löst sich der Repressor vom Operator. Die Strukturgene können exprimiert werden, wenn der Botenstoff cAMP ebenfalls vorhanden ist und zusammen mit dem Aktivatorprotein CAP an die Promotorregion bindet. In *E. coli*-Wildtyp-Zellen stellt sich ein hoher cAMP-Spiegel bei niedriger Glucosekonzentration ein. In den hier verwendeten, Adenylatcyclase-defizienten Stämmen DHM1 und BTH101 erhöht sich der cAMP-Spiegel jedoch nur, wenn eine Interaktion der Transmembrandomänen der Fusionsproteine stattfindet. Anhand der bekanntermaßen dimerisierenden GpA-Transmembrandomäne konnte die Funktion des Systems positiv getestet werden. Ein Anstieg des cAMP Spiegels in der Zelle, verursacht durch die Fragmente der Adenylatcyclase, wurde somit indirekt über die gesteigerte  $\beta$ -Galactosidase Aktivität nachgewiesen (siehe Abb. 15).

IPTG inaktiviert den *lac*-Repressor, sodass dieser nicht mehr an der Operator-Region des *lac*-Operons im Genom der für den  $\beta$ -Galactosidase-Test verwendeten *E. coli*-Stämme bindet. Die Vektoren, die das transmembrane Fusionsprotein codieren, beinhalten den *tac*-Promotor und die Expression des Proteins wird durch diesen gesteuert. Die Repression dieses *tac*-Promotors durch den *lac*-Repressor kann ebenfalls durch die Anwesenheit von IPTG aufgehoben werden. Bedingt durch die Konstruktion des Systems kann die Expression der  $\beta$ -Galactosidase also an zwei Ansatzpunkten durch die IPTG-Konzentration beeinflusst werden. Um den Einfluss der IPTG-Konzentrationen auf die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität zu untersuchen, wurde der  $\beta$ -Galactosidase-Test mit den Kontrollen für starke und schwache Interaktion mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen durchgeführt (siehe Abb. 15). Hierzu wurden die Plasmidkombinationen pALT18ii-GpA17/pBLT25ii-GpA17



**Abb. 15: Einfluss der IPTG-Konzentration auf den  $\beta$ -Galactosidase-Test.** Für die Transmembrandomänen von GpA (links) und der GpA G83I-Mutante (Mitte) wurden IPTG-Konzentrationen in den Hauptkulturen von 500, 50, 5 und 0,5  $\mu$ M und eine Referenz ohne IPTG getestet. Die Negativkontrolle ohne die enzymatischen Komponenten der Adenylatcyclase (rechts, „ohne *cyoA*“) wurde mit 500 $\mu$ M IPTG und ohne IPTG in der Hauptkultur durchgeführt.

und pALT18ii-G83I/pBLT25ii-G83I verwendet. In einem Kontrollansatz ohne Adenylatcyclase wurden die Plasmide pACYC184 und BR322 eingesetzt.

Wesentlicher Einflussfaktor auf die gemessene Enzymaktivität der  $\beta$ -Galactosidase ist im Fall der vollständigen Induktion durch IPTG der cAMP-Spiegel der Zelle, welcher von der Interaktionstendenz der Transmembranhelices der Fusionsproteine mit den Adenylatcyclasefragmenten bestimmt wird. Des Weiteren ist das von der IPTG-Konzentration abhängige Expressionsniveau der Fusionsproteine für die katalytische Aktivität von Bedeutung. In den  $\beta$ -Gal-Units der Ansätze für die GpA-Transmembrandomäne mit 500 und 50  $\mu$ M IPTG zeigt sich ein nur geringfügiger Unterschied; die GpA G83I-Variante weist für diese IPTG-Konzentrationen etwa gleiche Werte auf. Im Zustand der vollständigen Induktion lässt sich die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität auch durch Erhöhung der IPTG-Konzentration nicht steigern. Für diese Situation sprechen

die annähernd gleichen Werte der  $\beta$ -Gal-Units mit 50 und 500  $\mu$ M IPTG in den Ansätzen der GpA G83I-Transmembrandomäne. So wird bei einer Konzentration von 500  $\mu$ M IPTG von einer vollen Induktion in Bezug auf die Gene des Fusionsproteins und auch der  $\beta$ -Galactosidase ausgegangen. Bei der IPTG-Konzentration von 50  $\mu$ M ist eine volle Induktion möglicherweise nicht gewährleistet, da ein – wenn auch geringer – Unterschied zur Messung mit 500  $\mu$ M IPTG im Fall der GpA-Transmembrandomäne besteht.

Des Weiteren zeigte sich eine geringe  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität ( $\sim$ 500  $\beta$ -Gal-Units) im Fall der GpA-Domäne in Abwesenheit von IPTG. Eine vergleichbare Aktivität kann weder mit einer IPTG-Konzentration von 500  $\mu$ M im Ansatz „ohne *cyaA*“, noch bei 0 und 5  $\mu$ M IPTG im Ansatz „GpA G83I“ festgestellt werden. Von daher ist nicht davon auszugehen, dass in vergleichbaren Fällen von schwach- oder nicht-interagierenden Transmembrandomänen ein falsch-positives Signal erzeugt wird. Die Aktivität im Falle des GpA-Ansatzes ohne IPTG könnte auf nicht strikt regulierende *tac*- und *lac*-Promotoren zurückgeführt werden. Allerdings reicht die Stärke dieser basalen Expression nicht aus, um in Anwesenheit von 5  $\mu$ M IPTG und Transmembrandomänen mit schwacher Interaktionstendenz (GpA G83I) eine messbare Enzymaktivität zu erzeugen, die über dem Niveau der Negativkontrolle ohne IPTG und enzymatischer Komponente liegt.

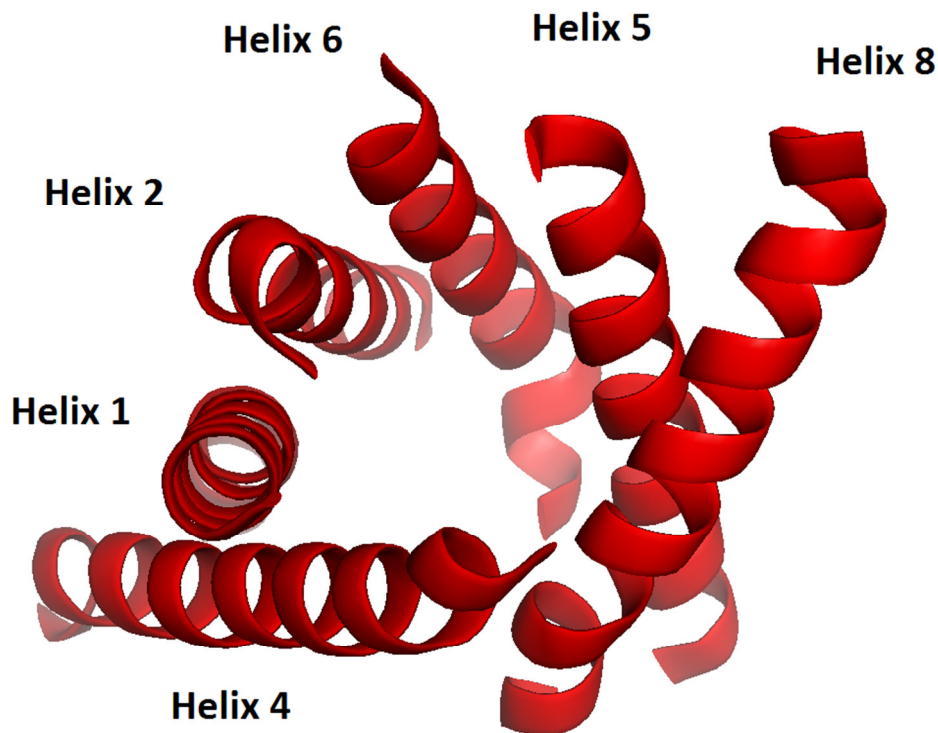
Das Experiment zeigt die Abhängigkeit  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität von der Konzentration des Induktors IPTG. Eine vollständige Induktion kann durch eine IPTG-Konzentration von 500  $\mu$ M erreicht werden.

#### **4.4 Interaktion transmembraner Helices des *E. coli*-Aquaglyceroporins GlpF**

Der Glycerolkanal GlpF besteht aus sechs transmembranen und zwei kürzeren, die Membran nicht vollständig durchspannenden  $\alpha$ -Helices. Durch die Anordnung dieser Helices wird ein Kanal für das Substrat gebildet. Viele der Seitenketten der Helices des Kanals stehen in Van der Waals-Kontakt miteinander, wie durch die Aufklärung der Struktur gezeigt werden konnte ([31] und Abb. 16).

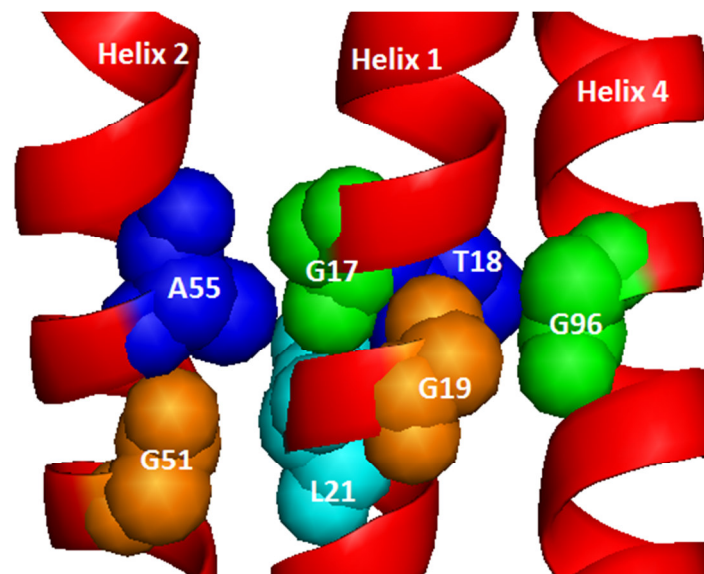
Um die Interaktionstendenzen zwischen den GlpF-Helices näher zu untersuchen, wurden entsprechende Vektoren hergestellt. Hierzu erfolgte die Insertion eines doppelsträngigen DNS-Oligomers, das für die jeweilige Transmembranhelix codiert, über die Schnittstellen





**Abb. 16: Die sechs Transmembranhelices von GlpF** (schematische Darstellung der transmembranen  $\alpha$ -Helices ohne Seitenketten). Alle nicht-helicalen Schleifen und Helices, die die Membran nicht komplett durchspannen (Helix 3 und 7) sind nicht in der Abbildung dargestellt. Die hier gezeigten Helices stehen durch Van der Waals-Wechselwirkungen vieler Seitenketten in Kontakt. Helix 1, 2 und 4 wurden für diese Arbeit bezüglich ihrer Interaktionstendenzen untersucht. (Strukturdaten: RCSB-Proteindatenbank-Identifikationsnummer: 1FX8)

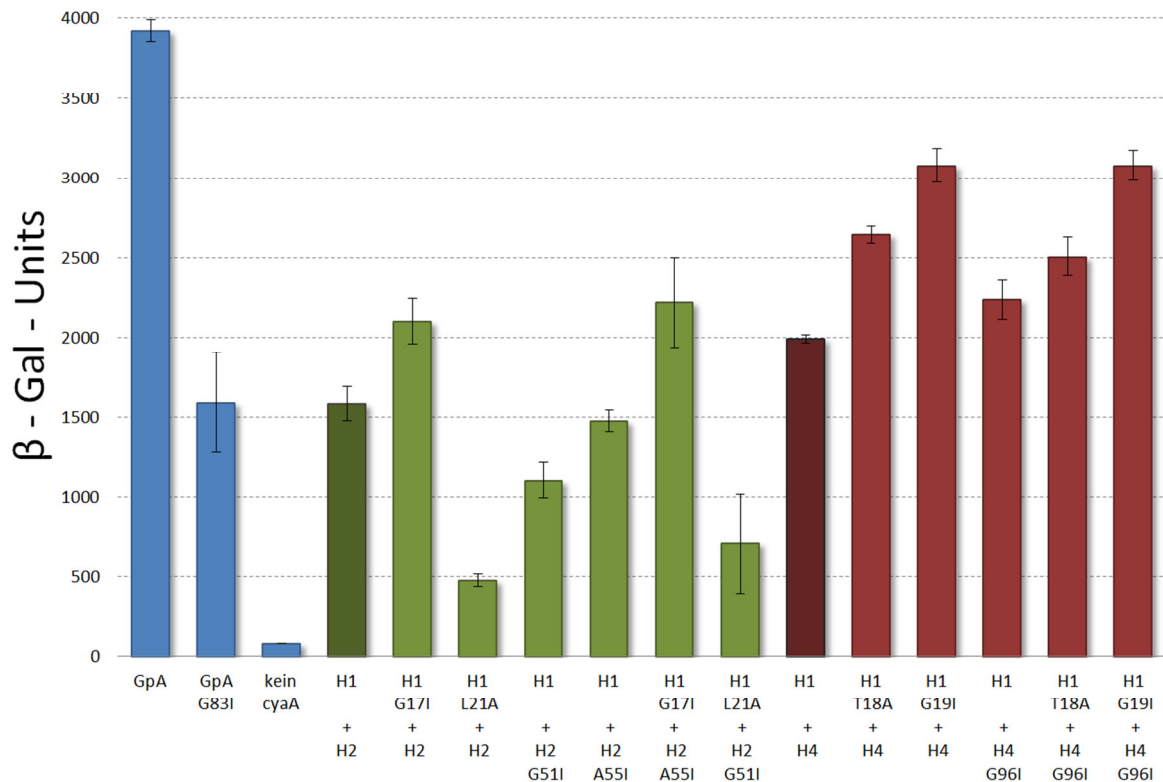
*NheI* und *BamHI* in die entsprechenden Plasmide. So wurden bezüglich der Helices 1, 2 und 4 die Vektoren pBLT25ii-GlpFH1, pAMT18ii-GlpFH2 und pALT18ii-GlpFH4 hergestellt. Zusätzlich zu den Helices mit den Wildtyp-Sequenzen wurden Mutanten mit Aminosäureaustausch erstellt. Eine Darstellung der substituierten Reste in Verbindung mit der Tertiärstruktur des Proteins ist in Abb. 17 gezeigt. Die Mutationen wurden durch ortsgerechte Mutagenese in die bereits erstellten Plasmide eingeführt. Bezüglich Helix 1 erfolgte die Herstellung der Mutanten G17I, T18A, G19I und L21A (Plasmide pBLT25ii-GlpFH1-G17I, pBLT25ii-GlpFH1-T18A, pBLT25ii-GlpFH1-G19I und pBLT25ii-GlpFH1-L21A). In Helix 2 wurden die Substitutionen G51I und A55I eingeführt (Plasmide pAMT18ii-GlpFH2 G51I und pAMT18ii-GlpFH2-A55I) und in Helix 4 konnte die Substitution G96I erstellt werden (Plasmid pALT18ii-GlpFH4-G96I).



**Abb. 17: Substituierte Aminosäurereste der Transmembranhelices des Aquaglyceroporins GlpF.** Die Abbildung zeigt die Aminosäurereste von Helix 1, 2 und 4, die ausgetauscht wurden, um die daraus resultierende Änderung der Interaktionstendenz zu beobachten (Strukturdaten: RCSB-Proteindatenbank-Identifikationsnummer 1FX8).

Die Ergebnisse des  $\beta$ -Galactosidase-Tests zeigen, dass die Interaktionstendenz der Wildtyp-Varianten der GlpF Helices 1 und 2 (H1/H2) in etwa vergleichbar mit der der GpA Mutante G83I ist (siehe Abb. 18). Die Substitution G17I (H1) zeigt zusammen mit H2 eine gegenüber dem Paar H1 und H2 leicht erhöhte Interaktionstendenz. Ein vergleichbares Ergebnis zeigt die Messung bezüglich der Substitution G17I (H1) in Kombination mit A55I (H2). Die Substitution A55I scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Interaktion von H1 und H2 zu haben, dies zeigt sich beim Vergleich der Interaktionstendenz von A55I (H1) und H2 mit der Interaktionstendenz von H1 und H2, welche als etwa gleich bestimmt wurden ( $\sim 1500$   $\beta$ -Gal-Units). Ein anderes Bild ergibt sich für den Fall des Austauschs L21A (H1): In Kombination mit H2 und auch mit der Substitution G51I (H2) zeigt sich eine deutliche Verminderung der Interaktionstendenz (etwa 500 bzw. etwa 750  $\beta$ -Gal-Units).

Der Wert der für den Ansatz der Wildtyp-Helices 1 und 4 (H1 und H4) bestimmten  $\beta$ -Gal-Units liegt mit etwa 2000 über dem der Kontrolle der GpA G83I-Transmembranhelices ( $\sim 1500$   $\beta$ -Gal-Units), sodass hier von einer Interaktion der beiden Helices ausgegangen werden kann. Die Interaktionstendenz der entsprechenden Mutanten liegt stets über dem



**Abb. 18: Interaktionstendenzen von GlpF-Transmembranhelices und deren Mutanten.** Gezeigt sind die Ergebnisse der Kombinationen Wildtyp-Helix 1 und 2 (H1 + H2, dunkelgrün) und deren Mutanten (hellgrün) sowie Wildtyp-Helix 1 und 4 (H1 + H4, dunkelrot) und auch deren Mutanten (hellrot). H1 und H2 sind antiparallel zueinander orientiert, H1 und H4 hingegen parallel. Ebenfalls gezeigt sind die Kontrollen für starke (GpA, blau) und schwache (GpA G83I, blau) Interaktionstendenz sowie ohne enzymatische Komponente der Adenylatcyclase (kein *cyaA*, blau).

Niveau der Wildtyp-Varianten, die Höchste wurde für die G19I (H1)-Mutante zusammen mit H4 sowie auch für G19I (H1) mit der Mutante G96I (H4) mit je etwa 3000  $\beta$ -Gal-Units bestimmt. Für die Mutante T18A (H1) in Interaktion mit H4 wurden etwa 2650, und für die Interaktion von T18A (H1) mit der Mutante G96I (H4) etwa 2250  $\beta$ -Gal-Units ermittelt.

Als Kontrolle für die korrekte Orientierung der Fusionsproteine mit den GlpF-Transmembranhelices in der inneren *E. coli*-Membran wurde der *malE*-Komplementationstest durchgeführt. Diesbezügliche Ergebnisse befinden sich im Anhang (Abb. 31).

#### 4.5 Erstellung der DNS-Bibliothek

Die hier konstruierte DNS-Bibliothek besteht aus Plasmiden, bei denen bestimmte Basen der codierenden Sequenz randomisiert sind. Dadurch können in den exprimierten Proteinen an bestimmten Positionen verschiedene Aminosäurereste auftreten. Bei den exprimierten Proteinen handelt es sich um Varianten der in Abschnitt 4.1 bereits beschriebenen Fusionsproteine, welche aus periplasmatischer MBP-Domäne, einer  $\alpha$ -helicalen Transmembrandomäne und den cytoplasmatischen T18- oder T25-Adenylatcyclasefragmenten bestehen. Die transmembrane Helix enthält die variablen Positionen in der Aminosäuresequenz. Die Sequenz ist so gewählt, dass sich die variablen Positionen an der Kontaktfläche zweier interagierender Helices befinden. Des Weiteren ist die variable Kontaktfläche so gestaltet, dass die Bildung rechtshändiger Helix-Helix-Paare (d.h. Paare mit negativen Kreuzungswinkeln, wie beispielsweise das GpA-Dimer [128]) begünstigt wird. Dazu wurde die Transmembrandomäne auf Basis einer Poly-Leucin-Helix mit der Primärsequenz „LLxxLLxxLLxxLLxLL“ erstellt, wobei der Buchstabe „x“ die variablen Positionen beschreibt. Die Sequenz wurde nach dem Vorbild der GpA-Transmembrandomäne gestaltet (siehe Abschnitt 1.5). Sie beinhaltet ein sich wiederholendes Intervall von vier Aminosäuren, in dem an interhelicalen Wechselwirkungen beteiligte Reste und unbeteiligte Seitenketten alternierend vorkommen. Dieses Muster ist Bestandteil von vielen rechtshändig interagierenden Transmembranhelices [70]. Um eine variable Position zu erzeugen, wurde auf DNS-Ebene stets das degenerierte Codon NBT (**N**: G/C/T oder A; **B**: G/C oder T) verwendet; folglich ist der Einbau von einer von 11 verschiedenen Aminosäuren (Serin, Glycin, Phenylalanin, Cystein, Alanin, Arginin, Valin, Threonin, Isoleucin, Leucin oder Prolin) in die entsprechenden Positionen des Proteins möglich. Durch die sieben variablen Positionen in der Proteinsequenz ergeben sich daher  $11^7$  ( $\approx 1,95 \cdot 10^7$ ) verschiedene Kombinationsmöglichkeiten für die von der DNS-Bibliothek codierten Transmembrandomänen.

Die Plasmide der Bibliothek wurden auf Basis der Vektoren pALT18ii und pLT25 erstellt. Dazu erfolgte die Insertion einer Genkassette, welche zuvor aus einem degenerierten DNS-Oligomer erstellt wurde, über die Schnittstellen *NheI* und *BamHI* in die beiden Plasmide. So wurden die Plasmide der DNS-Bibliothek pALT18iiLib und pLT25Lib erzeugt. Die Vektoren wurden zur Amplifikation mittels Transformation in *E. coli*-Zellen eingebracht,

mit deren Hilfe vervielfältigt und anschließend präparativ isoliert (Abschnitt 3.5). Das isolierte Plasmidgemisch stellte die DNS-Bibliothek dar.

Um eine Aussage bezüglich der tatsächlichen Diversität der DNS-Bibliothek machen zu können, erfolgte eine Abschätzung der Anzahl der Transformanten, welche durch die Transformation im Zuge der Konstruktion der DNS-Bibliothek (Transformation nach Insertion des degenerierten DNS-Oligomers) erzeugt wurden. Dazu wurden Verdünnungen des Transformationsansatzes nach der Transformation erstellt, ausplattiert und die resultierenden Kolonien ausgezählt. Die errechnete Gesamtzahl der Kolonien ist in Tab. 1 dargestellt. Es ist zu erwähnen, dass Zellteilungen, welche im Zeitraum nach der Transformation und vor der Ausplattierung stattfanden, möglicherweise einen Einfluss auf die Anzahl der Kolonien hatten.

Um die Anzahl an Religationen – also Plasmide ohne inseriertes DNS-Fragment, welches für eine Transmembrandomäne codiert – abzuschätzen, wurde ein zweiter Ligationsansatz zur Kontrolle erstellt. In diesem war das zu inserierende DNS-Fragment nicht enthalten. Dieser Ansatz wurde im Volumenverhältnis 1:10 hergestellt und eine Transformation erfolgte gleichermaßen wie beim Ansatz der DNS-Bibliothek (Der Transformationsansatz der Bibliothek wurde in 10 Ansätze aufgeteilt, die nacheinander bearbeitet wurden, sodass das Volumen einer einzelnen Transformation mit dem der Kontrolle übereinstimmte. Siehe auch Abschnitt 3.2.6). Die resultierenden Kolonien wurden ausgezählt und die Anzahl auf das Volumen der DNS-Bibliothek hochgerechnet. Die diesbezüglichen Ergebnisse sind in Tab. 2 dargestellt. Die Verhältnisse von Religanden zu Bibliotheksplasmiden wurden als 1:348 im Fall des Plasmids pALT18iiLib und 1:48 im Fall von pLT25Lib abgeschätzt.

An dieser Stelle soll vorweggenommen werden, dass sich unter sämtlichen Plasmiden, die im Zuge des Screenings durch DNS-Sequenzierung analysiert wurden (Anzahl:  $95 * 2 = 190$ ), keine einzige Religation befand.

**Tab. 1: Errechnung der Kolonienzahl zur Abschätzung der erhaltenen Transformanten bei der Konstruktion der DNS-Bibliothek.** Verdünnungen des Transformationsansatzes im Zuge der Erstellung der Bibliothek wurden ausplattiert und die Anzahl der resultierenden Kolonien auf das Gesamtvolumen der Bibliothek hochgerechnet.

Name Plasmid	Gesamtvolumen Transformationsansatz	Vom Transformationsansatz ausplattiert (verdünnt mit SOC-Medium)	Anzahl Kolonien Verdünnung	Kolonienzahl, Hochrechnung für Gesamtvolumen des Transformationsansatzes
pALT18iiLib	10 ml	3 $\mu$ l	534	$\sim 1,78 * 10^6$
pLT25Lib	10 ml	30 $\mu$ l	367	$\sim 1,22 * 10^5$

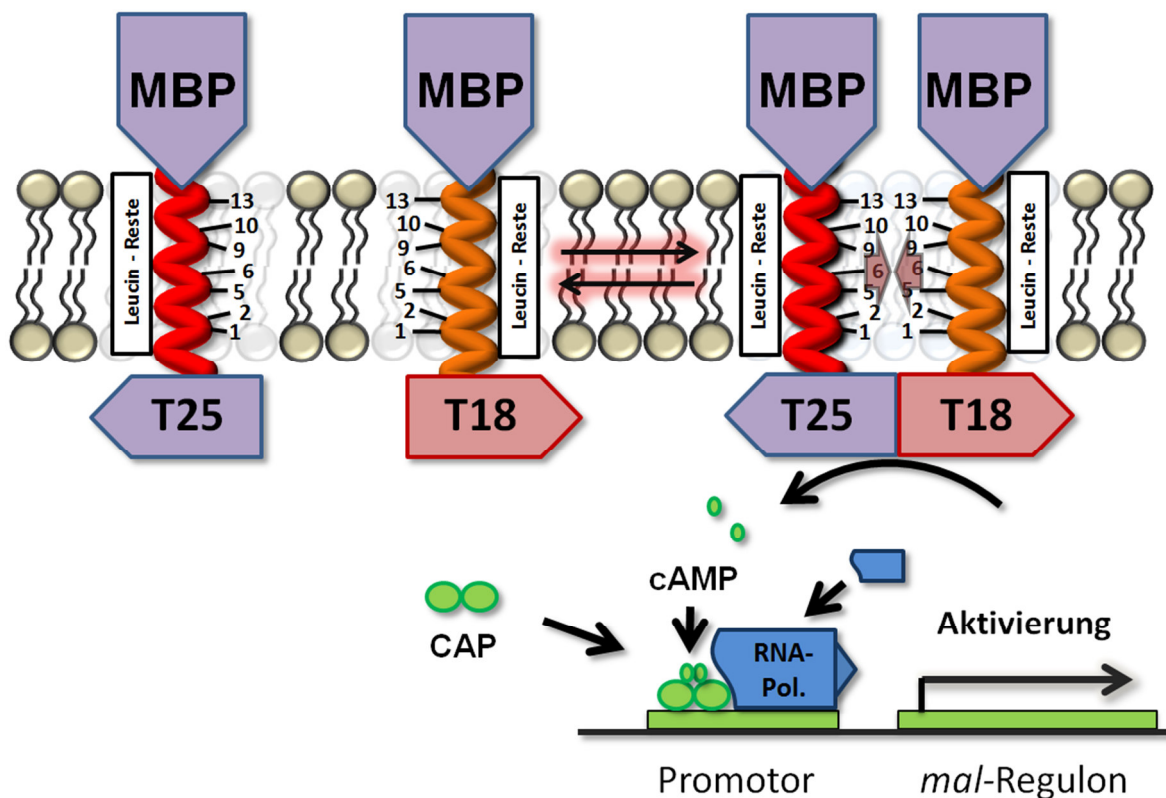
**Tab. 2: Errechnete Anzahl der religierten Plasmide der DNS-Bibliothek.** Das Volumen des Kontroll-Ligationsansatzes (ohne zu inserierendes DNS-Fragment) betrug, bezogen auf den zur Erstellung der Bibliothek genutzten Ansatz (siehe Abschnitt 3.1.13), nur  $\frac{1}{10}$  des Volumens (bei ansonsten gleichen Konzentrationen der anderen Komponenten). Dieser Faktor wurde bei der Hochrechnung auf die Gesamtzahl der Religanden in der Bibliothek berücksichtigt.

Plasmid Kontrollansatz	Gesamtvolumen Transformationsansatz	Vom Transformationsansatz ausplattiert	Anzahl Kolonien (Religanden)	Kolonienzahl Religanden, Hochrechnung für Gesamtvolumen des Transformationsansatzes der Bibliothek
pALT18ii	1 ml	150 $\mu$ l	77	$\sim 5133$
pLT25	1 ml	150 $\mu$ l	38	$\sim 2533$

#### 4.6 Durchführung des Screeningverfahrens

Im Zuge des Screeningverfahrens diente die Elektroporation dem gleichzeitigen Einbringen der beiden Bibliotheksplasmide in Zellen des *E. coli*-Stamms BTH101. Die Ausplattierung der Transformanten erfolgte auf M9-Agarplatten mit Maltose als einzige Kohlenhydratquelle und 50  $\mu$ M IPTG zur Geninduktion. Auf diesen Maltose-haltigen Minimalagarplatten fand die Selektion von *E. coli*-Zellen mit heterotypisch interagierenden Helix-Helix-Paaren statt. Zunächst erfolgte die Induktion des cAMP/CAP-unabhängigen *tac*-Promotors auf beiden Plasmiden durch Zugabe von IPTG. Infolge wurden die

entsprechenden Fusionsproteine exprimiert. Die Interaktion der Transmembrandomänen dieser Proteine in der Membran resultierte in enzymatischer Aktivität der Adenylatcyclasefragmente und damit in der Synthese von cAMP. Zusammen mit CAP aktivierte cAMP an den Promotoren des *mal*-Regulons die Gene zum Maltoseabbau [129], als Resultat erfolgte Zellwachstum und Kolonienbildung (siehe Abb. 19).



**Abb. 19: Prinzip des Screeningverfahrens.** Die variablen Positionen der transmembranen Helices sind mit 1, 2, 5, 6, 9, 10 und 13 nummeriert; die Aminosäurereste dieser Positionen sind der Helix-Helix-Kontaktfläche zugewandt. Leucinreste der Transmembrandomäne – hier schematisch als Balken dargestellt – sind in Richtung der unpolaren Phase der Lipidmoleküle orientiert. Die Interaktion zweier Helices resultiert in enzymatischer Aktivität der Adenylatcyclase und durch den infolge gebildeten sekundären Botenstoff cAMP werden die Gene des *mal*-Regulons aktiviert. Dies ermöglicht das Wachstum der *E. coli* BTH101-Zellen auf Nährboden mit Maltose als einzige Kohlenhydratquelle.

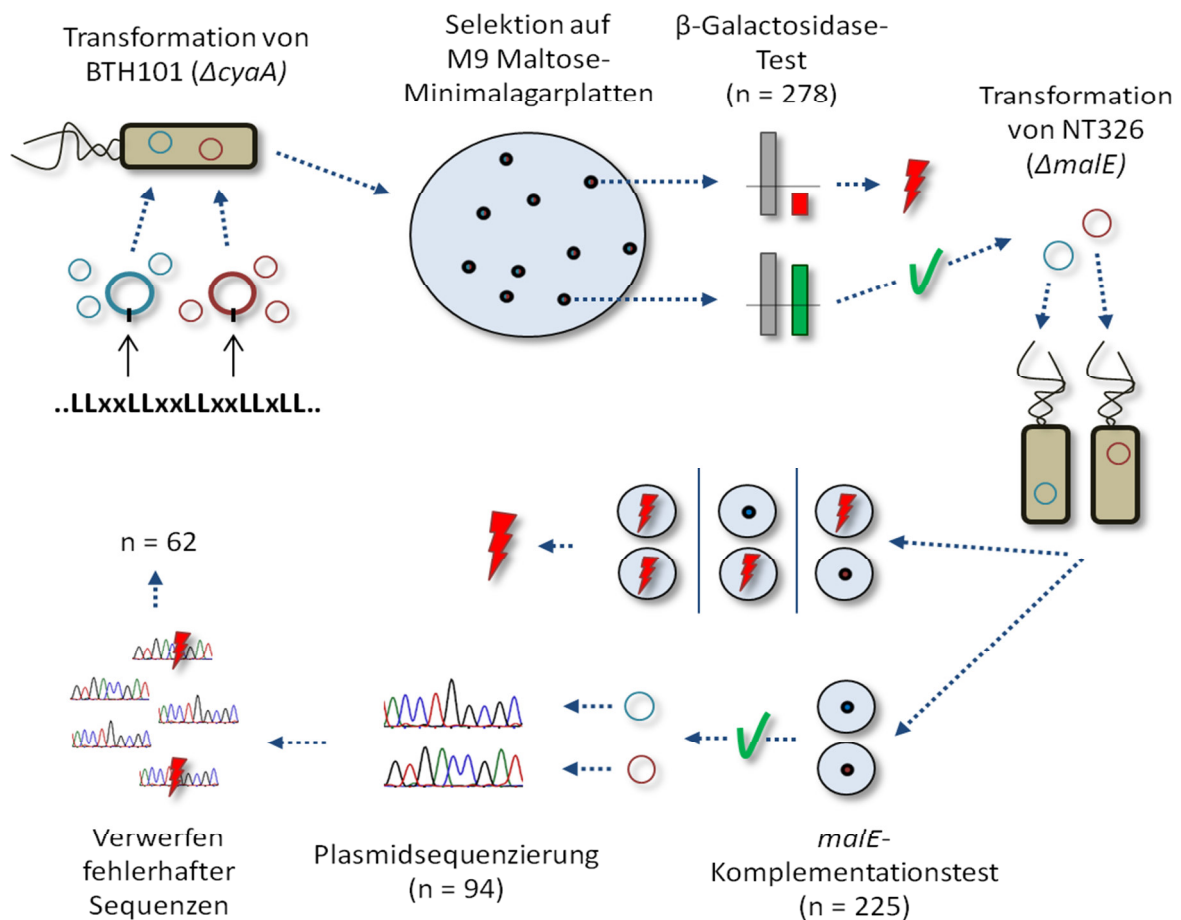
Um zu prüfen, ob tatsächlich ein Selektionsdruck auf *E. coli*-Zellen mit interagierenden Transmembranhelices besteht, wurde ein Transformationsansatz nach der Elektroporation auf eine M9-Agarplatte mit 0,05% (w/v) Maltose als einzige Kohlenhydratquelle und 50  $\mu$ M IPTG ausplattiert. Zusätzlich wurde ein vergleichbarer Ansatz erstellt, der jedoch Glucose in gleicher Konzentration enthielt. Es zeigten sich auf der M9-Maltose-Agarplatte

11 Kolonien. Im Gegensatz dazu konnten auf der Glucose-enthaltenden Agarplatte nach gleicher Inkubationszeit etwa 1100 Kolonien abgeschätzt werden. Dies zeigt, dass hier ein deutlicher Selektionsdruck auf Zellen mit interagierenden Transmembranhelices vorhanden ist, da die Anzahl der Kolonien auf den Maltose-Agarplatten um zwei Größenordnungen geringer als auf den Glucose-Agarplatten ausfiel.

Mit den im Zuge des Screeningverfahrens auf den Maltose-Minimalagarplatten erhaltenen *E. coli* BTH101-Kolonien wurde dann der  $\beta$ -Galactosidase-Test durchgeführt, um die Interaktion der enthaltenen Transmembrandomänen zu verifizieren. Ansätze, die aufgrund niedriger  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität eine als nicht ausreichend erachtete Interaktionstendenz aufwiesen, wurden an dieser Stelle verworfen. Anschließend wurden die Plasmide der Ansätze mit hinreichender enzymatischer Aktivität durch Minipräparationen isoliert. Dadurch wurde eine Plasmidlösung erhalten, die ein Gemisch der beiden Vektoren pALT18iiLib und pLT25Lib aus dem entsprechenden Ansatz beinhaltet. Zur Vereinzelung der Plasmide erfolgte im Anschluss die Hitzeschocktransformation *malE*-defizienter *E. coli* NT326-Zellen durch die Plasmidlösung und die Selektion durch Ausplattierung des Transformationsansatzes auf zwei verschiedene LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika. Die Vereinzelung der Plasmide diente dazu, im Anschluss jedes Fusionsprotein isoliert auf die richtige Orientierung in der inneren *E. coli*-Membran prüfen zu können. Resultierende Kolonien wurden zur Durchführung des *malE*-Komplementationstests (Abschnitt 3.2.8) auf Maltose-Minimalagarplatten überführt. Ein Zellwachstum mit Maltose als einzige Kohlenhydratquelle weist auf eine korrekte Orientierung des Fusionsproteins in der inneren *E. coli*-Membran hin, da dessen MBP-Domäne im Periplasma des *malE*-defizienten Stamms benötigt wird, um die Maltose ins Zellinnere zu transportieren.

Eine Übersicht über den Ablauf des Screeningverfahrens und die zugehörigen Kontrollexperimente ist in Abb. 20 dargestellt, eine tabellarische Übersicht aller Ansätze findet sich in Tab. 7 (Anhang). Die Ergebnisse des  $\beta$ -Galactosidase-Tests und des *malE*-Komplementationstests sind in Abb. 30 und Abb. 32 (Anhang) gezeigt. Nur solche Ansätze, die alle Kontrollexperimente positiv durchliefen, wurden einer Sequenzanalyse durch DNS-Sequenzierung und anschließender Verifikation der Sequenzen unterzogen. Sequenzen, die durch Deletion, Punktmutation oder eine mehrfache Insertion des doppel-





**Abb. 20: Überblick über das Screeningverfahren.** Zunächst erfolgte die Transformation von *E. coli* BTH101-Zellen mit den Bibliotheksplasmiden pALT18iiLib und pLT25Lib (oben links). Der Transformationsansatz wurde auf M9-Minimalagarplatten mit Maltose ausplattiert. Bei einer Interaktion der Transmembrandomänen der exprimierten Fusionsproteine erfolgte die Bildung von Kolonien. Diese wurden verwendet, um den  $\beta$ -Galactosidase-Test durchzuführen. Bei einer als ausreichend erachteten Interaktionstendenz erfolgte die Transformation von *E. coli* NT326 Zellen. Infolge wurden die Plasmide wieder vereinzelt. Mit den Transformanten wurde der *malE*-Komplementationstest durchgeführt, hierbei erfolgte die Aufnahme von Maltose als einzige Kohlenhydratquelle durch die im Fusionsprotein vorhandene MBP-Domäne. Eine Komplementation des ausgeschalteten, endogenen *malE*-Gens kann nur bei korrekter Orientierung des Fusionsproteins in der inneren Membran erfolgen. Der Test musste für beide Plasmide eines Ansatzes positiv ausfallen, ansonsten erfolgte dessen Ausschluss. Bei positivem Test beider Plasmide erfolgte die Sequenzierung der Plasmidregion, welche für die jeweilige Transmembrandomäne codierte. Ansätze mit fehlerhaften Sequenzen wurden verworfen. Die Anzahl der Ansätze ist angegeben (n). Ein Ansatz beinhaltet stets zwei Plasmide (pALT18iiLib und pLT25Lib). Roter Blitz: Kontrolle fehlgeschlagen durch zu geringe Interaktionstendenz oder ausbleibendes Wachstum in Flüssigkultur beim  $\beta$ -Galactosidase-Test, ausbleibendem Wachstum auf Maltose-Nährboden oder fehlerhafte DNS-Sequenz. Grüner Haken: Kontrolle positiv durchlaufen. Eine Übersicht über alle Ansätze und die zugehörigen Kontrollen (Tab. 7) sowie die Dokumentation der Ergebnisse des  $\beta$ -Galactosidase-Tests (Abb. 30) und des *malE*-Komplementationstests (Abb. 32) sind im Anhang gezeigt.

strängigen DNS-Oligomers fehlerbehaftet waren, wurden nicht in die weitere Auswertung einbezogen.

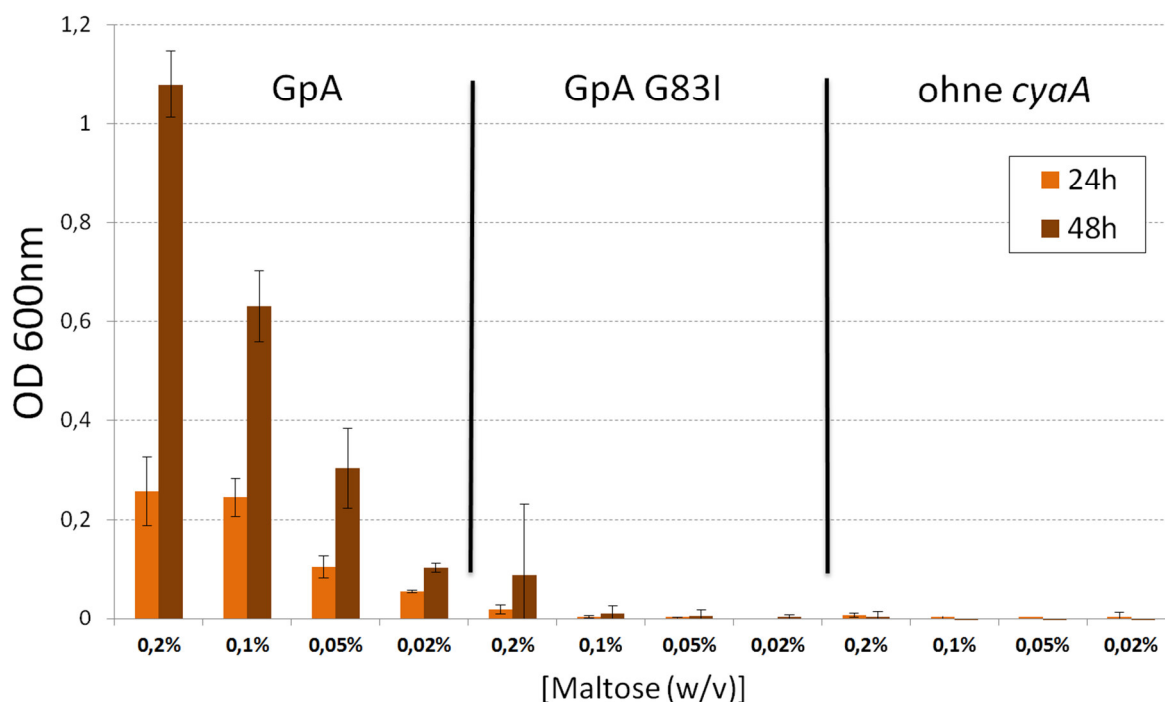
#### 4.7 Verifizierung des Selektionsschrittes

Zur Prüfung des Selektionsverfahrens, in dem Maltose die einzige Kohlenhydratquelle für die *E. coli* Zelle darstellt, erfolgte vor dem Screeningverfahren zunächst die Durchführung eines gesonderten Experiments. Hierzu wurden *E. coli* DHM1-Zellen mit den Plasmiden für die Kontrollen starker (pALT18ii-GpA17/pBLT25ii-GpA17) und schwacher Interaktion von Transmembrandomänen (pALT18ii-G83I/pBLT25ii-G83I) sowie den Plasmiden, die nicht für die enzymatischen Komponenten der Adenylatcyclase codieren (pACYC184/pBR322) transformiert. Zellen von resultierenden Kolonien wurden in flüssiges M9-Medium mit verschiedenen Maltosekonzentrationen und entsprechenden Antibiotika überführt und bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die photospektrometrische Messung der OD<sub>600nm</sub> des Flüssigmediums erfolgte nach 24 und 48 Stunden (siehe Abb. 21).

Für die Ansätze, welche die GpA-Transmembrandomäne enthielten, zeigte sich bereits nach 24 h selbst für geringe Maltosekonzentrationen von 0,02 % (w/v) ein Zellwachstum. Bei den Messungen mit der GpA G83I Transmembrandomäne zeigten sich nur minimale Veränderungen der OD<sub>600nm</sub> bei einer hohen Maltosekonzentration von 0,2 % (w/v). Dies bestätigt die Eignung des konstruierten Systems, stark interagierende Transmembrandomänen in Verbindung mit dem Wachstum mit Maltose als einzige Kohlenhydratquelle zu selektieren; schwach interagierende Transmembrandomänen führen im Vergleich zu stark interagierenden zu keinem signifikanten Zellwachstum. Aufgrund der Ergebnisse wurden für das weitere Screeningverfahren M9-Minimalagarplatten mit einer Maltosekonzentration von 0,05 % (w/v) eingesetzt.

#### 4.8 DNS-Pseudobibliothek

Es wurde ein weiterer Versuch zur Prüfung der Eignung des Selektionsschrittes durchgeführt. Dazu wurde ein Gemisch diverser Plasmide hergestellt, welche bereits zuvor zur Bestimmung von Interaktionstendenzen genutzt wurden. Diese Plasmide codieren für die Transmembranhelices von GpA, GpA G83I, GlpF (H1, H1 G19I, H4 und



**Abb. 21: Zellwachstum in Anwesenheit verschiedener Maltosekonzentrationen.** *E. coli* DHM1-Zellen wurden mit den Kontrollplasmiden für starke (GpA) und schwache Interaktion (GpA G83I) von Transmembrandomänen sowie den Plasmiden pBR322 und pACYC184, für einen Ansatz ohne enzymatischen Komponenten der Adenylatcyclase (ohne *cyaA*), transformiert. Das Zellwachstum erfolgte in flüssigem M9-Minimalmedium mit den Maltosekonzentrationen 0,2 %, 0,1 %, 0,05 % und 0,02 % (w/v) bei 37 °C. Die OD<sub>600nm</sub> wurde nach 24 h (orange) und 48 h (braun) gemessen.

H6, siehe auch Abschnitt 4.4). Ergebnisse zu Messungen bezüglich der GlpF H6 sind nicht in dieser Arbeit dargestellt, es konnten aber in Versuchen keine Interaktionstendenzen mit den angrenzenden GlpF H2 oder H5 mit Hilfe des in dieser Arbeit beschriebenen Reportersystems detektiert werden. Zur Erstellung der DNS-Pseudobibliothek wurde eine Lösung mit den entsprechenden Plasmiden (siehe Tab. 3 und Abschnitt 2.8.6) in gleichen Massenanteilen (je 5 ng/μl) erstellt. Auch Plasmide, welche nicht für eine Transmembrandomäne codierten, waren in der Lösung enthalten. *E. coli* BTH101-Zellen wurden durch diese Plasmidlösung transformiert und auf M9-Minimalagarplatten mit Maltose auf interagierende Transmembrandomänen selektiert. Es erfolgte die Sequenzanalyse der in den resultierenden Kolonien enthaltenen Plasmide. Es wurden so insgesamt acht Kolonien analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 dargestellt.

**Tab. 3: Durch das Screening mit der Pseudobibliothek gefundene Paare interagierender Transmembrandomänen.** Die Selektion erfolgte wie bei der eigentlichen Bibliothek durch Wachstum mit Maltose als einzige Kohlenhydratquelle. Die Tabelle zeigt die Kombination der Transmembrandomänen, welche durch das Screening auf M9-Minimalagarplatten mit Maltose selektiert werden konnten (auch andere, ggf. zu erwartende Kombinationen sind dargestellt, auch wenn diese nicht vorgefunden wurden). Die Transmembrandomänen waren durch Plasmide (in Klammern angegeben) codiert, welche in der DNS-Pseudobibliothek vertreten waren. Die Identifizierung erfolgte durch die Isolation der Plasmide aus den erhaltenen Kolonien und der anschließenden Sequenzierung der relevanten Sequenzabschnitte. Die Anzahl der gefundenen Paarung ist in der Spalte ganz rechts angegeben.

Paarung der Transmembrandomänen		Erwartete Interaktionstendenz	Anzahl in 8 Kolonien
Transmembrandomäne (pALT18ii-codiert)	Transmembrandomäne (pBLT25ii-codiert)		
GpA	GpA	stark	1
(pALT18ii-GpA17)	(pBLT25ii-GpA17)		
GlpF-H4	GlpF-H1 G19I	mittelstark	5
(pALT18ii-H4)	(pBLT25ii-H1-G19I)		
GlpF-H4	GlpF-H1	schwach	0
(pALT18ii-H4)	(pBLT25ii-H1)		
GpA G83I	GpA G83I	schwach	0
(pALT18ii-G83I)	(pBLT25ii-G83I)		
keine	keine	keine	0
(pACYC184)	(pBR322)		
GlpF-H6	?	unbekannt	0
(pALT18ii-H6)	?		
GlpF-H4	GpA	nicht erwartet	2
(pALT18ii-H4)	(pBLT25ii-GpA17)		

Es zeigte sich, dass von den acht analysierten Plasmidpaaren fünf für die Kombination GlpF-H4 und H1 G19I codierten. Diese Kombination zeigte in den zuvor gezeigten Messungen eine Interaktionstendenz, die deutlich über der des GpA G83I-Transmembrandomänen-Dimers und der der GlpF-H4 mit H1 lag, jedoch stand sie noch hinter der des GpA-Helix-Helix-Dimers zurück (siehe Abb 18). Diese Interaktionstendenz kann daher als mittelstark betrachtet werden. Sie führte aufgrund dessen beim

Selektionsprozess zur Koloniebildung. Die Interaktion zweier GpA-Transmembrandomänen trat nur in einem Fall auf. Interessanterweise fand sich zweimal die Kombination der transmembranen Domäne des GpA und der GlpF-H4. Eine Formation dieses Dimers wurde nicht erwartet, da GlpF ein bakterielles und GpA ein eukaryotisches Transmembranprotein ist und eine Interaktion der beiden Helices daher *in vivo* nicht vorkommt.

Bei diesem Experiment konnten mit Ausnahme des Paares der Transmembrandomäne von GpA und der GlpF-H4 ausschließlich solche detektiert werden, von denen eine starke bzw. mittelstarke Interaktionstendenz zu erwarten war. Eine Interaktion dieser beiden Helices kann als möglich erachtet werden. Helix-Helix-Dimere mit schwacher Interaktionstendenz wie GlpF-H1 und H4 oder GpA G83I wurden nicht isoliert und die Beteiligung der GlpF-H6 an einer Dimerformation konnte nicht festgestellt werden. Ebenso konnten die Plasmide, die für keine Transmembrandomäne codierten (pBR322 und pACYC184), in keinem Fall in den resultierenden Kolonien gefunden werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass der Screeningprozess tatsächlich zur Selektion interagierender Transmembranhelices geeignet ist.

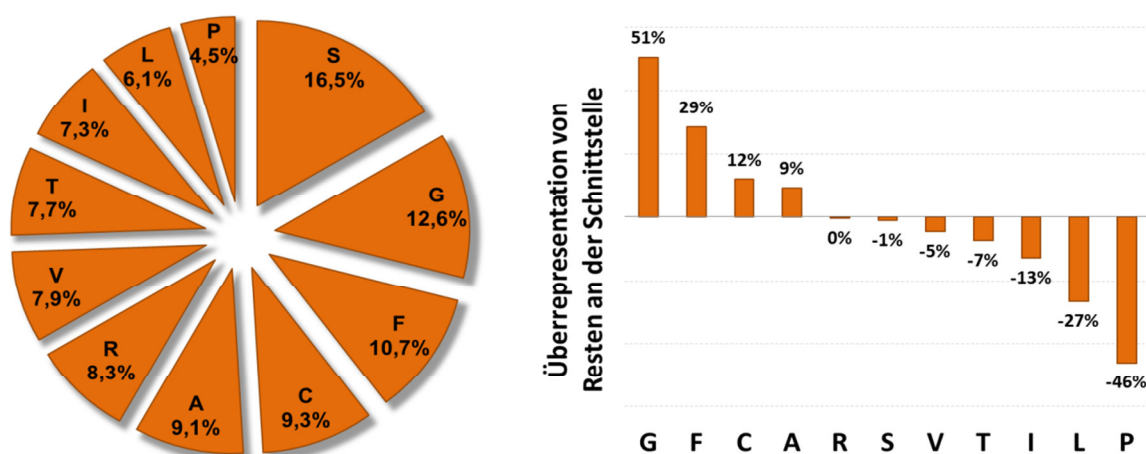
#### **4.9 Screening nach heterotypisch interagierenden Transmembrandomänen**

Der Screeningprozess wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Aus anfänglich 278 erstellten Ansätzen, mit denen der  $\beta$ -Galactosidase-Test durchgeführt wurde, wurden 53 verworfen, da ihre Aktivität als zu gering eingestuft wurde (siehe Abb. 30, Anhang) oder die Zellen in den Flüssigkulturen für den  $\beta$ -Galactosidase-Test kein Wachstum zeigten. Mit den verbleibenden 225 Ansätzen wurde der *malE*-Komplementationstest (siehe Abschnitt 3.2.8) durchgeführt, mit dem nicht korrekt in die Membran inserierte Fusionsproteine erkannt werden können.

Für die Durchführung des Tests mussten durch jedes der beiden im Ansatz enthaltenen Plasmide transformierte NT326-Zellen erzeugt werden, die zum Wachstum mit Maltose als einzige Kohlenhydratquelle befähigt waren. Von den zuvor 225 Ansätzen konnten so 94 verifiziert werden. Nach Überprüfung der Sequenzen durch DNS-Sequenzierung wurden Sequenzen von 62 Paaren heterooligomerisierender Transmembranhelices erhalten. Die Sequenzen dieser Paare sind in Tab. 4 dargestellt. Bei der Auswertung der Daten zeigte

sich, dass zwei Sequenzen doppelt vorhanden sind. Diese doppelt vorgefundenen Sequenzen werden in beiden Fällen von unterschiedlichen Plasmiden codiert und finden sich in verschiedenen Helix-Helix-Paaren. Es handelt sich dabei um die Sequenzen aus den Ansätzen P24 (pALT18iiLib)/P273 (pLT25Lib) und P38 (pALT18iiLib)/P135 (pLT25Lib), welche in Tab. 4 dargestellt sind.

Einen Überblick über die Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Aminosäurereste gibt Abb. 22 (links). Es zeigt sich, dass Serinreste mit einem Anteil von 16,5 % am häufigsten vertreten sind.



**Abb. 22: Vorkommen und Überrepräsentation von Aminosäureresten an der Helix-Helix-Schnittstelle.** Im Diagramm links sind die prozentualen Anteile der 11 vorkommenden Aminosäurereste in allen randomisierten Positionen der Helix-Helix-Schnittstelle gezeigt, wie sie durch das Screeningverfahren bestimmt werden konnten. Die rechte Abbildung stellt die Über- und Unterrepräsentation der Reste in Bezug auf deren erwartetes Auftreten dar; positive Prozentzahlen zeigen eine Überrepräsentation an, negative eine Unterrepräsentation.

Es folgen Glycin-, Phenylalanin-, Cystein- und Alaninreste, jeweils mit Anteilen zwischen 12,6 und 9,1 %. Die nicht genannten Seitenketten treten mit Anteilen unter 8,3 % auf.

**Tab. 4 (Legende, Tabelle umseitig) Aus dem Screeningverfahren erhaltene Primärsequenzen der Transmembrandomänen.** Die Sequenzen aus der DNS-Sequenzierung wurden in Proteinsequenzen übersetzt. Ganz Links: Bezeichnung des Ansatzes (Pxxx). Mittlere und rechte Spalte: Sequenzen der Plasmide pALT18iiLib und pLT25Lib. Die randomisierten Aminosäuren (variable Positionen 1, 2, 5, 6, 9, 10 und 13) sind durch Buchstaben in größerer Schrift hervorgehoben. Glycin-, Alanin- und Serinreste als Bestandteil eines [klein]xxx[klein]-Motivs wurden hellorange hinterlegt. Glycinreste, die zur Formation eines GxxxG-Motivs beitragen sind dunkelorange gekennzeichnet. Blaue Felder zeigen die Erweiterung eines GxxxG- zum LxxxGxxxG-Motiv.

Tab. 4 (Die Legende befindet sich auf der vorangehenden Seite).

Plasmid:	pALT18iiLib						pLT25Lib							
	1	2	5	6	9	10	13	1	2	5	6	9	10	13
P2	F	F	S	C	S	C	I	I	G	G	S	S	S	S
P3	V	G	I	S	V	T	C	T	F	T	T	F	V	S
P10	R	S	A	S	L	S	G	F	C	S	S	S	T	S
P13	F	R	C	P	P	A	C	G	C	T	S	S	R	A
P15	P	F	P	I	V	S	T	S	S	F	G	G	I	R
P20	A	P	T	G	P	I	A	F	S	S	T	G	S	S
P21	I	S	S	S	I	A	C	C	G	L	A	L	C	R
P23	S	T	S	S	P	R	R	T	T	F	T	V	F	V
P24	G	V	A	A	G	R	A	V	S	C	S	V	G	C
P27	C	I	G	T	R	R	G	P	F	P	L	I	C	S
P29	I	G	P	I	R	S	R	P	L	C	V	C	S	S
P30	F	G	G	S	F	F	G	S	C	F	F	C	S	C
P38	T	L	C	G	R	G	S	G	S	I	F	I	A	F
P47	V	S	A	L	C	C	A	L	L	G	G	G	T	R
P55	G	T	S	F	F	V	S	L	T	L	L	I	F	A
P63	S	G	I	F	C	L	I	F	T	S	S	S	S	A
P66	S	V	C	F	S	C	S	R	C	F	C	A	G	R
P73	L	I	P	P	A	T	C	G	C	I	L	I	R	S
P76	I	S	L	C	T	S	V	R	L	L	F	L	R	S
P86	S	I	F	A	F	I	I	C	V	C	P	P	S	I
P92	L	C	G	V	S	S	A	V	I	G	G	G	C	R
P93	G	G	G	F	G	A	C	I	I	G	C	R	S	R
P102	G	R	G	S	L	S	V	V	G	C	S	S	R	G
P103	C	T	L	P	V	S	F	T	G	T	V	R	P	A
P111	V	I	C	P	G	S	F	V	A	G	T	R	F	C
P114	S	R	I	V	G	F	V	C	I	C	A	L	G	R
P125	S	C	S	A	A	G	V	T	F	P	V	G	C	R
P127	F	V	T	L	F	T	F	S	T	T	I	A	R	S
P134	S	S	G	V	L	S	F	A	V	S	P	V	R	P
P135	I	G	S	V	G	I	L	T	L	C	G	R	G	S
P151	V	T	I	S	C	A	A	A	V	A	V	L	F	G
P155	R	I	A	T	S	F	I	I	G	S	G	L	F	R
P156	S	A	T	A	L	T	F	F	R	R	S	A	V	R
P158	V	T	A	C	V	F	V	R	C	C	A	S	R	G
P159	L	P	F	S	T	V	F	V	C	A	L	R	G	R
P161	C	S	L	T	I	P	A	L	A	I	A	L	L	A
P163	P	G	F	L	V	L	P	F	C	R	G	R	S	S
P168	F	I	I	G	A	S	I	T	V	G	G	F	T	R
P172	R	V	F	G	I	G	I	I	F	S	G	R	G	S
P173	P	S	F	F	C	S	S	F	S	A	V	A	V	R
P174	G	P	T	A	G	T	L	T	A	A	T	P	T	G
P176	F	V	T	F	S	C	S	A	C	S	F	F	P	P
P178	T	V	F	P	S	A	A	L	G	F	L	G	R	S
P182	R	C	A	V	F	C	F	F	C	T	V	S	V	R
P190	L	R	S	F	S	S	F	S	S	I	S	S	R	G
P198	C	F	G	V	A	G	S	R	A	I	L	G	R	S
P202	F	A	S	A	T	F	T	I	F	G	A	T	R	R
P207	G	I	G	T	C	S	I	V	A	V	C	C	R	A
P208	P	T	A	A	G	V	S	S	G	I	S	A	V	R
P211	A	S	I	P	V	T	I	G	C	G	F	G	C	R
P214	V	I	S	L	A	C	F	I	A	A	I	R	S	A
P215	G	P	S	L	G	F	A	A	F	R	L	V	G	L
P216	G	V	C	G	G	F	C	G	S	L	G	A	F	R
P218	S	F	C	S	A	S	G	I	F	A	S	T	T	T
P234	A	V	T	G	T	F	I	C	F	I	S	S	R	G
P257	F	I	G	I	C	C	S	G	L	L	C	G	S	I
P260	I	V	L	C	T	C	F	F	P	L	T	S	S	R
P263	A	F	I	S	G	L	C	V	S	S	P	S	S	S
P267	S	P	I	F	I	C	I	F	R	V	S	L	R	G
P273	F	R	F	G	S	C	V	G	V	A	A	G	R	A
P277	C	C	C	S	G	P	C	S	F	A	G	R	T	S
P278	V	R	G	F	G	A	V	F	F	V	T	R	P	S

Abb. 22 (rechts) zeigt die Über- bzw. Unterrepräsentation der entsprechenden Reste (Zur Berechnung der Überrepräsentation wurde der Quotient der jeweiligen Anzahl gezählter und nach der Zufallsverteilung erwarteter Aminosäurereste gebildet). Glycinreste sind mit 51 % am stärksten überrepräsentiert, dies bedeutet, dass der Aminosäurerest 1,51-mal so häufig wie erwartet auftritt. Es folgen Phenylalanin-, Cystein- und Alaninseitenketten mit Anteilen von 29 %, 12 % und 9 %. Alle anderen Reste sind unterrepräsentiert.

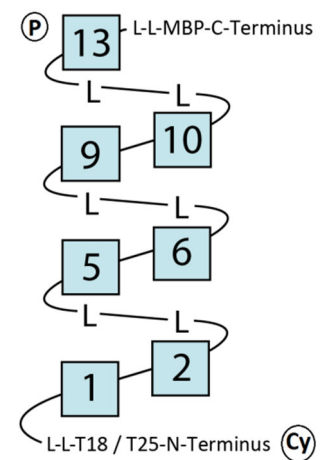
Die stärkste Unterrepräsentation zeigen Prolinreste mit -46 %, gefolgt von Leucinresten mit -27 %. Obwohl Serinseitenketten am häufigsten vertreten sind, treten diese nicht als überrepräsentiert hervor. Dies begründet sich im Vorkommen der für die variablen Reste codierenden Codons: Zwei der zwölf möglichen Codonvarianten codieren für Serinreste, während für alle anderen Reste nur eine Codonvariante existiert. Die errechnete Wahrscheinlichkeit für das zufällige Auftreten von Serinresten beträgt demnach – sowohl für jede einzelne Position als auch insgesamt –  $16,6\bar{6}\%$  und für die 10 anderen möglichen Reste jeweils  $8,3\bar{3}\%$ .

In Abb. 23 (oben) ist die Verteilung der Aminosäurereste an den randomisierten Positionen dargestellt. Serinreste treten an jeweils einer Position beider Helices um etwa die Hälfte häufiger auf als erwartet und sind damit besonders an diesen Positionen deutlich überrepräsentiert. Es handelt sich dabei um die dem Periplasma nahen Positionen 10 der pALT18iiLib-codierten, und Position 13 der pLT25Lib-codierten Helix. Des Weiteren zeigt sich, dass Glycinreste bis auf eine Ausnahme in jeder Position überrepräsentiert sind, jedoch häufiger an den Positionen zur Mitte der Helices auftreten als zu den Enden der Helix hin. So sind Glycinreste insbesondere in den Positionen 5 und 9 der pALT18iiLib-, sowie Positionen 6 und 9 der pLT25Lib-codierten Helix stärker vertreten als in den äußeren Positionen 1 und 2 sowie 10 und 13. Bemerkenswert ist das starke Auftreten von Argininresten in den Positionen 9, 10 und 13 der pLT25Lib-codierten Helix mit Anteilen von 16 %, 24 % und 32 %. Abgesehen von diesen Positionen und der Position 2 der pALT18iiLib-codierten Helix treten diese Reste ansonsten nur in geringen Anteilen oder auch gar nicht auf. Phenylalaninreste zeigen an der pLT25Lib-codierten Helix an den Positionen 1 und 2, welche zum Cytoplasma hin orientiert sind, mit Anteilen von jeweils 16 % eine deutliche Überrepräsentation im Gegensatz zu den anderen Positionen der Helix: Diese Seitenketten kommen dort etwa doppelt so häufig wie erwartet ( $8,3\bar{3}\%$ ) vor. Für die



Position → Rest ↓	Helix codiert von pALT18iiLib							Helix codiert von pLT25Lib							Rest ↓
	1	2	5	6	9	10	13	1	2	5	6	9	10	13	
S	16%	13%	16%	17%	13%	22%	13%	10%	13%	13%	19%	17%	19%	27%	S
G	13%	11%	16%	11%	19%	6%	8%	11%	11%	13%	16%	16%	11%	11%	G
F	14%	8%	11%	14%	8%	13%	16%	16%	16%	8%	8%	5%	10%	2%	F
C	8%	6%	11%	6%	10%	16%	13%	6%	17%	11%	6%	5%	8%	5%	C
A	6%	3%	11%	11%	10%	10%	13%	6%	10%	13%	10%	10%	2%	13%	A
R	6%	10%	0%	0%	5%	5%	3%	6%	3%	5%	0%	16%	24%	32%	R
V	11%	14%	0%	10%	10%	5%	11%	11%	8%	5%	10%	6%	8%	2%	V
T	8%	14%	13%	5%	6%	5%	14%	11%	5%	11%	3%	6%	2%	3%	T
I	3%	10%	10%	6%	8%	10%	3%	11%	6%	8%	11%	3%	10%	2%	I
L	6%	2%	6%	8%	6%	5%	3%	6%	8%	10%	11%	11%	2%	0%	L
P	6%	8%	5%	10%	5%	3%	2%	3%	2%	3%	5%	3%	5%	3%	P

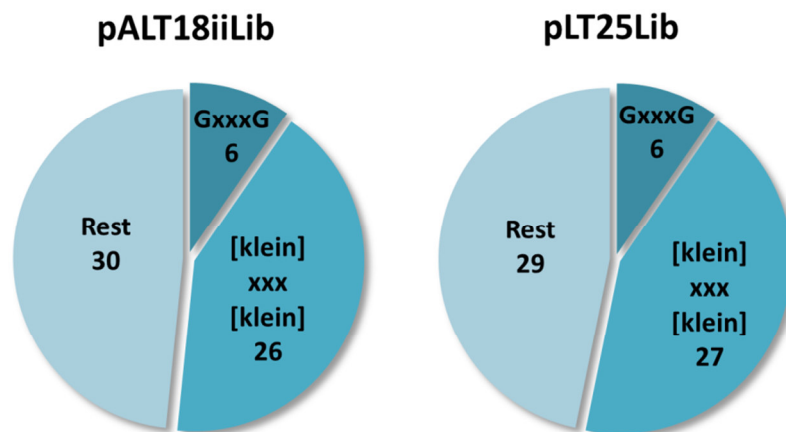
**Abb. 23: Verteilung der Aminosäurereste an den variablen Positionen der Helices.** Oben: Relative Häufigkeiten der auftretenden Reste an den jeweiligen randomisierten Positionen, gezeigt für die von den Plasmiden pALT18iiLib und pLT25Lib codierten Transmembranhelices. Die errechnete Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Serinrestes beträgt  $16,6\%$ , für alle anderen Reste  $8,3\%$ . Rechts: Schema einer von den Plasmiden codierten Transmembranhelix. Die variablen Positionen sind blau hinterlegt, deren Nummerierung entspricht der in der oberen Abbildung. P: Periplasma; Cy: Cytosol; L: Leucin-Rest; T18/T25: Proteinfragmente der *B. pertussis* Adenylatcyclase; MBP: Maltose-bindendes Protein.



pALT18iiLib-codierte Helix zeigt sich ein leicht differenziertes Bild: Hier sind Phenylalaninreste zwar an fünf von sieben Positionen überrepräsentiert, jedoch zeichnet sich eine Tendenz der Überrepräsentation nahe dem Cytosol nur an Position 1 ab (Anteil:  $14\%$ ). Auf beiden Helices gibt es je eine Position, an denen Cysteinreste deutlich zur Überrepräsentation tendieren (Position 10 der pALT18iiLib-codierten und Position 2 der pLT25Lib-codierten Helix), indem sie dort mit  $16\%$  bzw.  $17\%$  etwa zweimal häufiger als erwartet ( $8,3\%$ ) auftreten. Die anderen Positionen zeigen für Cysteinreste tendenziell Werte nahe der Erwartung oder eine nur leichte Über- oder Unterrepräsentation. Für Isoleucin- und Leucinreste lässt sich erkennen, dass ihr Vorkommen an dem zum Periplasma hin orientierten Enden beider Helices sehr gering ist. Dies trifft im Fall von Isoleucinseitenketten für die Positionen 13 beider Helices zu, bei Leucinresten für die Positionen 10 und 13, ebenfalls auf beiden Helices. Eine deutliche Unterrepräsentation zeigt sich für Prolinreste in allen Positionen mit Ausnahme von Position 6 der

pALT18iiLib codierten Helix, in dieser Position zeigt sich der Rest in etwa 10 % in allen durch das Screening ermittelten Sequenzen.

Tab. 4 zeigt neben den durch den Screeningprozess bestimmten Primärsequenzen der Transmembrandomänen auch das Vorkommen von bestimmten Sequenzmotiven. Wie in der Einleitung erwähnt, ist das GxxxG- Motiv eines der bedeutendsten Sequenzmotive interagierender Transmembranhelices. Auch das GxxxG-Motiv-implizierende [klein]xxx[klein]-Motiv, bei dem Glycin-, Serin- oder Alaninreste mit drei zwischenliegenden, variablen Seitenketten vorkommen, ist von Bedeutung [70, 72]. Die Häufigkeit des Auftretens dieser beiden Motive ist nochmals zusammenfassend in Abb. 24 illustriert.



**Abb. 24: Auftreten von Motiven beim Screeningprozess.** Es konnten für die pALT18iiLib-codierte Helix in 32, und für die pLT25Lib codierte Helix in 33 der Sequenzen mindestens ein [klein]xxx[klein]-Motiv identifiziert werden. In beiden Fällen befanden sich jeweils sechs GxxxG-Motive darunter. Rest: Anteil der Sequenzen ohne [klein]xxx[klein]-/GxxxG-Motiv.

Es wird deutlich, dass in über 50 % der von beiden DNS-Bibliotheksplasmiden codierten Sequenzen der Helices ein [klein]xxx[klein]-Motiv zu finden ist. Ein GxxxG-Motiv findet sich in 12 der insgesamt 124 Sequenzen, das mit dem GpA-Interaktionsmotiv L<sub>1</sub>xxGVxxGVxxT verwandte Motiv L<sub>1</sub>xxxGxxxG kommt darin drei mal vor. Von diesen drei gefundenen Motiven können zwei einer doppelt vorgefundenen Sequenz zugeordnet werden.

Die errechnete Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Motives in der Sequenz einer von den Bibliotheksplasmiden codierten Transmembranhelix berechnet sich wie folgt:

$$P_{Motiv\_Seq} = 1 - \left( \frac{[Anz.der\ Codons]^{[Anz.der\ Pos.]} - [Anz.Codons\ „Rest“]^{[Anz.der\ Pos.]}}{[Anz.der\ Codons]^{[Anz.der\ Pos.]}} \right)^{[Mögl.Anz.des\ Motivs]}$$

Diese Formel ist auf die variablen Positionen einer Transmembranhelix anzuwenden. Sie kann in dieser Form nur für Motive mit gleichen Resten (z. B. GxxxG) oder gleichen Mengen von Resten an den Schlüsselpositionen genutzt werden, wie sie beispielsweise das [klein]xxx[klein]-Motiv mit Glycin-, Serin- oder Alaninseitenketten an den beiden Positionen aufweist. So sei die Anzahl der Codons („Anz. der Codons“) die natürliche Zahl, die wiedergibt, wie viele verschiedene Codons, die für die entsprechenden Reste des Motivs codieren, insgesamt auftreten. Die im Zuge dieser Arbeit konstruierte DNS-Bibliothek gibt hier durch das degenerierte Codon NBT einen Wert von 12 vor (siehe Abschnitt 4.5). Die Anzahl der Positionen („Anz. der Pos.“) beschreibt, wie viele der variablen Positionen durch Reste des Motivs eingenommen werden: Im Falle des [klein]xxx[klein]- und auch des GxxxG-Motivs handelt es sich um jeweils zwei Positionen. „Anz. Codons „Rest““ bezeichnet die Anzahl der Codons, die für einen Rest oder mehrere möglicherweise auftretende Reste an einer Position des Motivs codieren. Für das GxxxG-Motiv entspricht dies einem Codon, für das [klein]xxx[klein]-Motiv sind es vier. Die mögliche Anzahl des Motivs („Mögl. Anz. des Motivs“) gibt wieder, wie viele Möglichkeiten existieren, das gesamte Motiv innerhalb der variablen Positionen einer Helix zu platzieren. Die hier konstruierte DNS-Bibliothek bietet für beide Motive jeweils fünf Möglichkeiten, das GxxxG-Motiv kann in den Formen LL[G<sub>1</sub>]xLL[G<sub>1</sub>]xLLxxLLxLL, LLx[G<sub>2</sub>]LLx[G<sub>2</sub>]LLxxLLxLL, usw. vorliegen.

So kann errechnet werden, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines GxxxG-Motivs beim hier durchgeführten Screeningverfahrens bei ~3,4 % liegt. Ein Auftreten des GxxxG-Motivs in sechs von 62 Sequenzen (10,3 %), wie es für die von beiden Bibliotheksplasmiden codierten Transmembranhelices im Zuge des Screeningprozesses ermittelt werden konnte, zeigt, dass dieses Motiv unter dem geschaffenen Selektionsdruck etwa dreimal so häufig wie erwartet auftritt und somit stark überrepräsentiert ist. Für das Auftreten des [klein]xxx[klein]-Motivs in einer Sequenz kann eine Wahrscheinlichkeit von 44,5 % berechnet werden (GxxxG-Motiv einbezogen). Durch den Screeningprozess wurde das Auftreten dieses Motivs mit 51,6 % für die pALT18ii-codierte, und mit 53,2 % für die pLT25-codierte Transmembranhelix determiniert. Hier zeigt sich eine, im Vergleich mit

dem GxxxG-Motiv weniger deutliche Überrepräsentation des Motivs in den erhaltenen Sequenzen.

Für das Motiv LxxxGxxxG wäre ein Vorkommen in 0,17 % aller Sequenzen zu erwarten gewesen. Das dreimalige Auftreten des Motivs in den 124 Sequenzen entspricht dem Vorkommen in 2,42 % der Sequenzen und liegt somit über der Erwartung.

In den Sequenzen befanden sich auch die erweiterten Formen des Motivs [klein]xxx[klein]xxx[klein] oder [klein]xxx[klein]xxx[klein]xxx[klein], sowie verschachtelte Varianten der Form [klein<sub>1</sub>][klein<sub>2</sub>]xx[klein<sub>1</sub>][klein<sub>2</sub>], was jedoch in die vorangehenden Berechnungen nicht einbezogen wurde. Die bisher geschilderte Analyse berücksichtigt, ob das Motiv in der Helix vorkommt oder nicht. Mehrfach vorkommende Motive werden nicht gezählt (Beispielsweise wurde im Fall des Motivs SxxxSxxSxxxS die Sequenz als [klein]xxx[klein]-enthaltend kategorisiert, was die Anwesenheit von zwei Motiven in der Sequenz nicht in die Berechnungen einfließen ließ). Im Folgenden soll das Auftreten des Motivs an allen möglichen Positionen der Sequenzen aus dem Screeningprozess betrachtet werden. Da jede der 62 erhaltenen Sequenzen einer Helix fünf mögliche Positionen für das Motiv bietet, ergeben sich so 310 mögliche Positionen für das Motiv. Bei der Auszählung an dieser Stelle wurde das [klein]xxx[klein]xxx[klein]-, das [klein]xxx[klein]xxx[klein]xxx[klein]- und das [klein<sub>1</sub>][klein<sub>2</sub>]xx[klein<sub>1</sub>][klein<sub>2</sub>]-Motiv als 2, 3 bzw. 2 [klein]xxx[klein]-Motive gewertet. So konnte für Helices beider Fusionsproteinvarianten jeweils ein Auftreten des Motivs an 47 von 310 Positionen festgestellt werden, was einem Anteil von 15,2 % entspricht. Des Weiteren ergibt sich für das Auftreten des [klein]xxx[klein]-Motivs an einer bestimmten Position nach

$$P_{Motiv\_Position} = \frac{[Anz. \text{ Codons „Rest“}]^{[Anz. der Pos.]}}{[Anz. der Codons]^{[Anz. der Pos.]}}$$

eine Wahrscheinlichkeit von 11,1̄ %, dies entspräche einem Auftreten des Motivs an etwa 34 der 310 Positionen. Nach dieser Berechnung ergibt sich eine Überrepräsentation des [klein]xxx[klein]-Motivs von 36,8 % (Überrepräsentation: [Quotient aus Auftreten und errechneter Wahrscheinlichkeit des Auftretens]-1). Allerdings muss bei dieser Betrachtung berücksichtigt werden, dass der Beitrag mehrerer gefundener Motive innerhalb einer Sequenz zur Helix-Helix-Interaktion möglicherweise nicht gegeben ist [130].

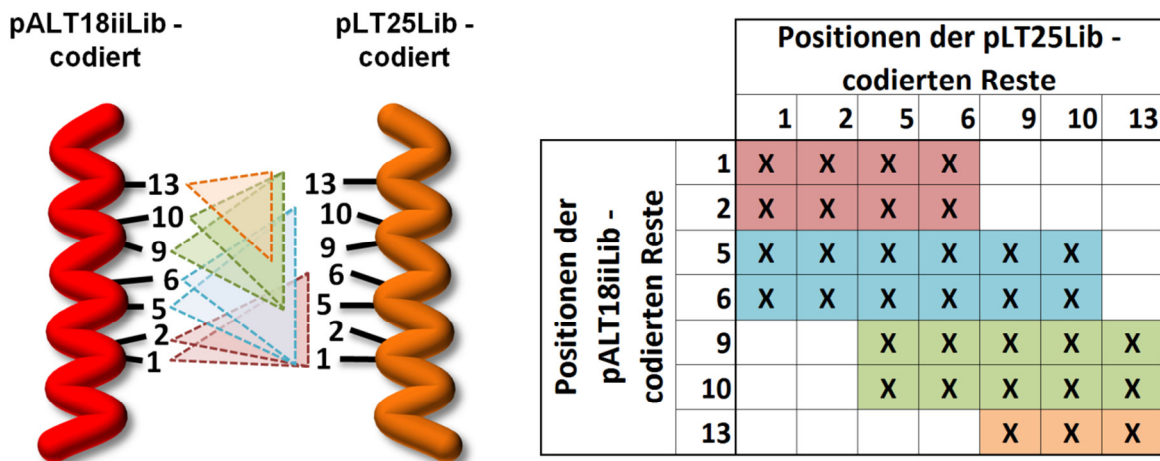
Ähnliches zeigte sich auch für das GxxxG-Motiv: In manchen Fällen konnte das Auftreten der erweiterten Variante GxxxGxxxG beobachtet werden. Auf weitere Berechnungen wurde in diesem Fall jedoch aufgrund der geringen Anzahl dieser Variante verzichtet.

Zusammenfassend betrachtet liefert das Screening folgende Ergebnisse: Es zeigte sich ein häufiges Auftreten von Serin-, Glycin-, Phenylalanin-, Cystein- und Alaninresten an der Kontaktfläche zweier interagierender Transmembranhelices. Dabei ist der am häufigsten vorgefundene Serinrest jedoch nicht, wie andere häufig auftretende Reste, überrepräsentiert. Prolin-, Leucin-, Isoleucin-, Threonin- und Valinreste traten an der Kontaktfläche unterrepräsentiert auf. Des Weiteren spielen für die Interaktion transmembraner Helices die Motive [klein]xxx[klein] und besonders das darin enthaltene Motiv GxxxG eine wichtige Rolle, wie ihre Überrepräsentation an der Helix-Helix-Kontaktfläche verdeutlicht. Auch traten zum Teil sehr deutliche Unterschiede in der lokalen Verteilung einzelner Reste an den variablen Positionen der Helices auf.

#### **4.10 Aminosäurereste an der Helix-Helix-Kontaktfläche in geringer Entfernung**

Für eine weitere Auswertung der Daten wurde überprüft, welche Reste der Helix-Helix-Paare, die durch den Screeningprozess nachgewiesen wurden, sich in geringer Entfernung zueinander befinden und somit potentiell an interhelicalen Kontakten beteiligt sein können. Da Kreuzungswinkel und Abstand der interagierenden Helices unbekannt sind, erfolgte eine Abschätzung, welche der randomisierten Positionen sich in geringer Entfernung befinden. Welche randomisierten Positionen der Seitenketten als in geringer Entfernung liegend erachtet wurden, ist in Abb. 25 verdeutlicht.

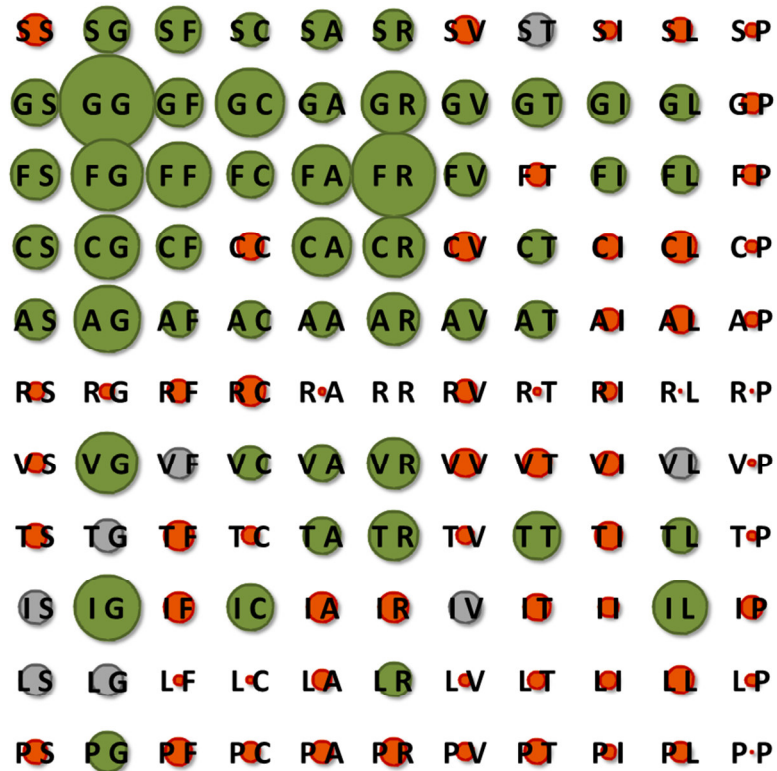
Im weiteren Vorgehen wurde das Auftreten der Reste an den Positionen in geringer Entfernung quantifiziert. Hierzu wurden die jeweiligen Paarungen von Aminosäureresten an jeder Kombination der in Abb. 25 (rechts) gezeigten Positionen ausgezählt; dies geschah für alle 62 Helix-Helix-Paare. Eine Darstellung der Ergebnisse ist in Abb. 26 zu sehen: Hier sind Über- bzw. Unterrepräsentation von auftretenden Paarungen von Aminosäureresten in geringer Entfernung veranschaulicht (Daten bezüglich der absoluten Häufigkeiten von Paarungen sind im Anhang in Tab. 8 gezeigt). Die diesbezüglichen Ergebnisse zeigen, dass die Paarung Glycin und Glycin mit 182 % am stärksten überrepräsentiert ist. An zweiter Stelle steht die Paarung Phenylalanin und Arginin (146 %



**Abb. 25: Seitenketten der interagierenden Transmembranhelices in geringer Entfernung.** Links: Schema der beiden interagierenden Helices. Die Dreiecke zeigen, welche Seitenketten als in geringer Entfernung liegend betrachtet werden. So zeigt beispielsweise das orange Dreieck oben, dass die pALT18iiLib-codierte Position 13 sich in geringer Entfernung der pLT25Lib-codierten Positionen 9, 10 und 13 der benachbarten Helix befindet. Rechts: Tabellarische Übersicht zur Abbildung 26 (links). „X“ bedeutet, dass die entsprechenden Reste als in geringer Entfernung liegend betrachtet werden. Die Farbgebung der Dreiecke aus der linken Abbildung wurde zur Übersichtlichkeit auch hier verwendet.

Überrepräsentation), gefolgt von den Paarungen Phenylalanin und Glycin (111 %) sowie Glycin und Cystein (104 %). Generell überrepräsentiert sind Paarungen, welche einzig Serin-, Glycin-, Phenylalanin-, Cystein- oder Alaninreste oder Kombinationen dieser Seitenketten enthalten. Es zeigen sich hierbei nur zwei Ausnahmen: Die Paarung Cystein und Cystein zeigt sich unterrepräsentiert (-16 %) und die Paarung Serin und Serin tritt beinahe so oft wie erwartet auf (-3%).

Gegeben durch den Versuchsaufbau existiert zu jeder der Paarungen ein Gegenstück, bei dem die zwei betreffenden Aminosäurereste in vertauschter Anordnung auf den jeweiligen Helices zu finden sind. So gibt es beispielsweise für die Paarung Glycin und Cystein zwei Varianten: Bei einer ist der Cysteinrest pALT18iiLib-codiert, bei der anderen codiert das Plasmid pLT25Lib für diesen Rest. Im Falle dieser Paarung weisen beide Varianten eine etwa gleiche starke, deutliche Überrepräsentation auf (104 % und 90 %). Für manche Paarungen zeigt sich jedoch eine starke Diskrepanz zwischen Über- bzw. Unterrepräsentation im Vergleich zum invertierten Gegenstück. Dies wird besonders für das Beispiel der beiden Varianten der Paarung von Phenylalanin und Arginin deutlich (146 % im Vergleich zu -30 % Über- bzw. Unterrepräsentation). Des Weiteren weisen die



		pLT25Lib - codierte Reste										
		S	G	F	C	A	R	V	T	I	L	P
pALT18ilLib - codierte Reste	S	0,97	1,37	1,37	1,02	1,16	1,20	0,84	1,02	0,56	0,74	0,46
	G	1,41	2,82	1,48	2,04	1,20	1,90	1,34	1,48	1,27	1,13	0,63
	F	1,48	2,11	1,90	1,41	1,76	2,46	1,27	0,70	1,06	1,13	0,63
	C	1,34	1,90	1,34	0,84	1,76	1,83	0,91	1,06	0,77	0,99	0,42
	A	1,20	1,97	1,06	1,13	1,06	1,55	1,20	1,13	0,70	0,84	0,49
	R	0,56	0,49	0,70	0,91	0,28	0,00	0,70	0,28	0,56	0,14	0,14
	V	0,63	1,83	0,99	1,06	1,13	1,55	0,91	0,91	0,77	0,99	0,28
	T	0,74	0,99	0,91	0,56	1,13	1,48	0,56	1,41	0,84	1,06	0,35
	I	1,02	1,97	0,91	1,41	0,91	0,91	0,99	0,84	0,63	1,62	0,70
	L	0,99	0,99	0,35	0,28	0,63	1,06	0,42	0,56	0,56	0,84	0,42
	P	0,74	1,20	0,84	0,63	0,70	0,84	0,56	0,77	0,49	0,63	0,14

Abb. 26 (Die Legende befindet sich auf der nächsten Seite).

---

**Abb. 26 (Abbildung auf vorheriger Seite): Über- und Unterrepräsentation von Paarungen der Aminosäurereste in geringer Entfernung.** Oben: Grafische Darstellung von über- und unterrepräsentierten Paarungen. Der erste der beiden gezeigten Reste in einer Blase ist vom Plasmid pALT18iiLib codiert, der Zweite von pLT25Lib. Der Durchmesser einer Blase ist proportional zum Quotienten aus der Anzahl auftretender und der Anzahl erwarteter Paarungen der jeweiligen Kombination zweier Seitenketten. Je größer der Durchmesser ist, desto höher ist der Grad der Überrepräsentation der Paarung. Blasen mit grüner Farbgebung zeigen eine Überrepräsentation der Paarung, orange Blasen deuten auf eine Unterrepräsentation hin. Graue Blasen zeigen an, dass weder Über- noch Unterrepräsentation auftritt (innerhalb einer Toleranzgrenze von 0,02 des Quotienten bzw. 2 % Über- oder Unterrepräsentation). Unten: Quotienten aus Anzahl der auftretenden und erwarteten Paarungen von Seitenketten in geringer Entfernung. Die Rohdaten zur Berechnung sind im Anhang in Tab. 8 aufgeführt.

---

Paarungen Threonin und Arginin (48 % bzw. -72 %), Leucin und Isoleucin (-44 % bzw. 62 %) sowie Cystein und Isoleucin (-23 % bzw. 41 %) diese deutlich asymmetrische Charakteristik auf.

Am häufigsten überrepräsentiert sind Paarungen, bei denen Glycinreste involviert sind. So sind 17 von 21 möglichen Paarungen, welche diesen Rest enthalten, überrepräsentiert. Gänzlich anders verhält es sich im Fall der Prolinrest-involvierenden Paarungen. Hier gibt es lediglich eine von 21 Paarungen, welche nicht unterrepräsentiert ist; diese beinhaltet Prolin- und Glycinreste. Eine als generell asymmetrisch zu charakterisierende Verteilung lässt sich für die Paarungen feststellen, die Argininreste enthaltenen: In den Fällen der pLT25Lib-codierten Argininreste sind acht von 11 möglichen Paarungen überrepräsentiert, jedoch gibt es für pALT18iiLib-codierte Argininreste keine einzige überrepräsentierte Paarung.

Insgesamt betrachtet zeigte sich, dass die Paarung Glycin/Glycin mit Abstand am häufigsten auftrat. Es folgen die Paarungen Phenylalanin/Arginin, Phenylalanin/Glycin und Glycin/Cystein. Generell zeigten Glycinrest-enthaltene Paarungen sehr oft eine Überrepräsentation, während Prolinrest-involvierte Paarungen fast immer unterrepräsentiert waren. Diese Ergebnisse bestätigen besonders die wichtige Rolle von Glycinresten an der Kontaktfläche von interagierenden Transmembranhelices.



## 5 Diskussion

### 5.1 Aufbau des Systems

#### 5.1.1 Kopienzahl der Plasmide

Wie bereits erläutert, wurde das BACTH-System zum ersten Mal 1998 beschrieben [105]. Später erfolgte die Modifikation des Systems, um die enzymatischen Komponenten der Adenylatcyclase aus *B. pertussis* an beide Enden – N- oder C-Terminal – des zu untersuchenden Proteins genetisch fusionieren zu können [117]. Im Zuge der Konstruktion dieser erweiterten BACTH-Variante wurden Plasmide mit anderen Replikationsursprüngen verwendet, als bei der vorangehenden Version. Die Vektoren der zweiten Variante unterscheiden sich untereinander erheblich in der Anzahl, in der sie in der Zelle vorliegen [117]: So basieren die Vektoren pUT18 und pUT18C, welche für das T18-Fragment der Adenylatcyclase codieren, auf dem pBR322-Derivat pUC19. Verursacht durch eine Punktmutation im Primertranskript RNA II, welches bei der Plasmidreplikation eine Rolle spielt, zeigt pUC19 eine Kopienzahl, die um ein vielfaches höher liegt als die von pBR322 [131]. Der für das T25-Fragment codierende Vektor pKT25 hingegen basiert auf dem pACYC184-Derivat pSU40 und liegt in wesentlich niedrigerer Kopienzahl als die Vektoren pUT18 und pUT18C vor [117]. So handelt es sich im Fall von pSU40/pACYC184-Derivaten um etwa 15 Kopien pro Zelle [126], bei den pUC19-basierenden Plasmiden um etwa 50 Kopien [131]. Die Plasmide, auf denen das in dieser Arbeit beschriebene System basiert, sind Derivate von pBR322 und pACYC184. Sie können aufgrund ihrer kompatiblen Replikationsursprünge gleichzeitig in derselben *E. coli*-Zelle vorhanden sein. Sie kommen in annähernd identischen Kopienzahlen von etwa 20 bzw. 15 in der bakteriellen Zelle vor, was zu einem möglichst gleichen Expressionsniveau beider Fusionsproteine in einer Zelle beitragen sollte. Die Anpassung der Kopienzahl der konstruierten Plasmide stellt eine Optimierung des neuen Systems gegenüber dem ursprünglichen BACTH-System dar, da hierbei für eine Ausgangssituation gesorgt wird, bei der beide Fusionsproteine ähnlich stark exprimiert werden. Des Weiteren soll eine universelle Verwendung des *tac*-Promotors, der in allen Plasmidvarianten die Expression der Fusionsproteine kontrolliert, zu einem angeglichenen Expressionsniveau beitragen.

Das DNS-Bibliotheksplasmid pLT25Lib ist eine Ausnahme in Bezug auf die anderen Plasmide des Systems. Als einziges Plasmid wurde es nicht direkt aus pBR322- oder pACYC184-Derivaten erstellt, sondern enthält den Replikationsursprung und andere Elemente des Plasmids pMal-p2X (siehe auch Abb. 9). Jedoch ist auch das Plasmid pMal-p2X ein pBR322-Derivat und daher ist mit einer ähnlichen Kopienzahl zu rechnen [132]. Allerdings ergibt sich aus ungeklärter Ursache für das Plasmid pMal-p2X nach einer Präparation oft eine niedrigere Ausbeute als für pBR322, weshalb auch eine niedrigere Kopienzahl denkbar wäre. Im Fall des Screeningverfahrens wurden diese möglichen Abweichungen in der Kopienzahl der Plasmide toleriert, da hierbei keine Priorität auf einer genauen Messung der Interaktionstendenzen lag, sondern nur eine Detektion stark interagierender Helix-Helix-Paare erfolgen sollte. Eine möglicherweise geringere Kopienzahl des pMal-p2X-Derivats pLT25Lib könnte sich eventuell in einem geringeren Wert gemessener  $\beta$ -Gal-Units auswirken. Hierdurch ist jedoch kein falsch-positives Ergebnis zu erwarten.

### 5.1.2 Vergleich des Reportersystems mit anderen Systemen

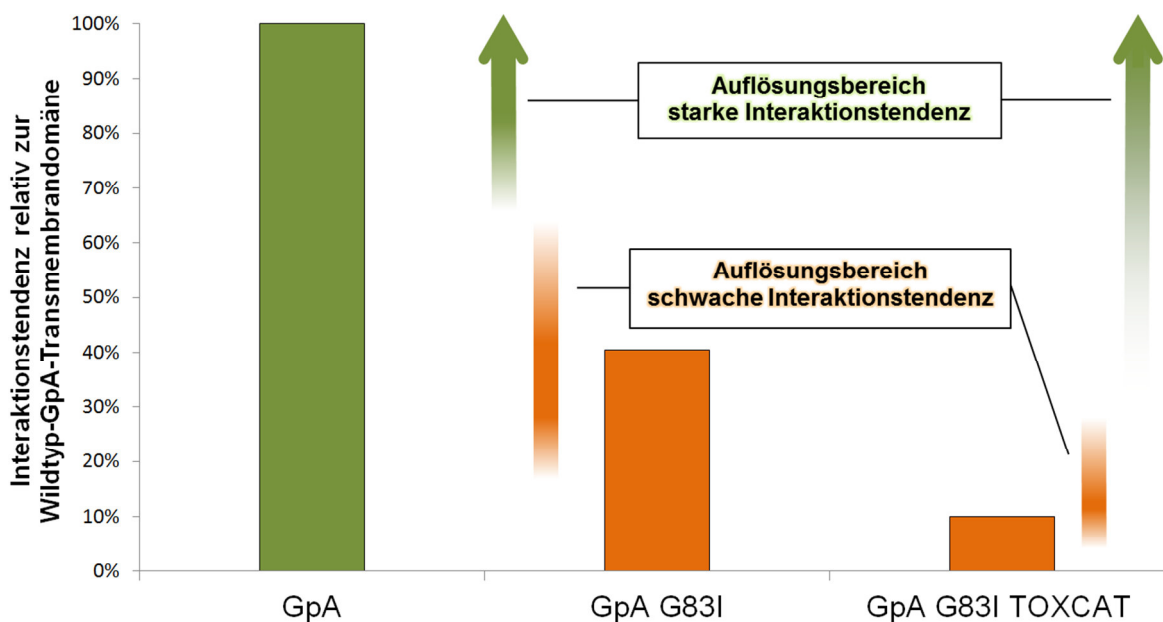
Die Expression der Fusionsproteine, welche durch die Plasmide des BACTH-Systems codiert werden, wird durch den *lacUV5*-Promotor gesteuert. Hierbei handelt es sich um eine Variante des *lac*-Promotors aus *E. coli*, der sich durch eine Doppelmutation im Bereich der Pribnow-Box von der Wildtyp-Variante unterscheidet. Der *lacUV5*-Promotor kann als mittelstarker Promotor betrachtet werden, er führt zu einer deutlich stärkeren Expression als die Wildtyp-Variante [133]. Ein weiterer Unterschied ist, dass der Promotor im Gegensatz zum Wildtyp unabhängig von der cAMP- oder CAP-Konzentration in der Zelle ist. So ist auch eine Expression in Abwesenheit dieses sekundären Botenstoffes möglich [105, 134]. Die Operatorregion des *lacUV5*-Promotors ist jedoch in Bezug auf den Lac-Repressor funktional. Eine negative Regulation durch den Repressor kann hier gleichermaßen wie beim Wildtyp stattfinden und eine Induktion durch IPTG oder Allolactose kann erfolgen, welche mit dem Ablösen des Repressors vom Operator verbunden ist.

Die Fusionsproteine, die durch das hier vorgestellte System exprimiert werden, stehen unter der Kontrolle des *tac*-Promotors. Dieser ist ein synthetisches, hybrides Konstrukt, welches sich auf genetischer Ebene aus Teilen des *lacUV5*- und des *trp*-Promotors, dem

Promotor des Tryptophan-Operons, zusammensetzt. Der *tac*-Promotor zeigt daher ähnliche Eigenschaften wie der *lacUV5*-Promotor: Er kann durch den Lac-Repressor reprimiert und durch IPTG bzw. Allolactose induziert werden. Allerdings zeigt sich für die beiden Promotoren ein unterschiedliches Expressionsniveau des entsprechenden Genprodukts, welches beim *tac*-Promotor deutlich höher als beim Promotor *lacUV5* liegt [127]. Daher kann im Fall des hier gezeigten Systems prinzipiell von einer stärkeren Expression der Fusionsproteine im Vergleich zum BACTH-System ausgegangen werden.

Das durch den starken *tac*-Promotor erzeugte, hohe Expressionsniveau könnte sich nachteilig auswirken, da überexprimierte Proteine in *E. coli* dazu tendieren, in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) vorzuliegen. Dies ist auch bei Membranproteinen der Fall [135]. Proteine in diesem aggregierten Zustand liegen zwar vollständig synthetisiert, jedoch meist in einer nicht-nativen, inaktiven Form vor [136]. Daher ist eine Beeinträchtigung des Systems durch diese Gegebenheit von eher geringer Wahrscheinlichkeit, jedoch nicht auszuschließen. Im ungünstigen Fall könnte ein aggregiertes Vorliegen der Proteine im Innern der Zelle das Messergebnis durch aktive katalytische Domänen der Adenylatcyclasefragmente verfälschen. Von einer vergleichbaren Situation wird jedoch beispielsweise bei der Anwendung des TOXCAT-Systems nicht ausgegangen [137]. Ein starker Promotor würde prinzipiell die Bildung von Einschlusskörperchen im Gegensatz zu einem schwachen Analogon begünstigen.

Ein Vergleich des für diese Arbeit erstellten Reportersystems mit dem TOXCAT-System (zum TOXCAT-System siehe auch Abb. 5) ist in Abb. 27 dargestellt. Hierzu wurden Messwerte bezüglich der Kontrollen GpA und der Mutante GpA G83I beider Systeme gegenübergestellt. Es zeigt sich, dass die Interaktionstendenz der GpA G83I-Transmembrandomänen bei TOXCAT-Messungen nur etwa 10 % [83, 98, 122] oder weniger [87, 138] von der GpA-Wildtypvariante beträgt. Ein anderes Bild bieten die durch diese Arbeit vorgestellten Messergebnisse: So zeigt die GpA G83I-Variante im Vergleich zu den TOXCAT-Messungen Werte, die etwa 40-50 % von denen des GpA-Wildtyps erreichen (siehe Abb. 15 und Abb. 18). Diese Betrachtung zeigt, dass hier neben einer gesteigerten Sensitivität auch eine wesentlich höhere Auflösung in Bezug auf weniger starke Interaktionstendenzen vorhanden ist. Dies scheint speziell für den Bereich von Messwerten schwach interagierender Helices zuzutreffen, zu dem sich auch die Kontrolle GpA G83I zuordnen lässt. So können Unterschiede schwacher Interaktionsten-



**Abb. 27: Vergleich von Auflösungsvermögen und Sensitivität zwischen dem in dieser Arbeit vorgestellten und dem TOXCAT-Reportersystem.** Gezeigt sind Interaktionstendenzen der Transmembrandomänen der schwach interagierenden GpA-Mutante G83I im Vergleich zu denen des GpA-Wildtyps (GpA). Die Daten bezüglich der GpA G83I Variante (GpA G83I) sind den Interaktionsmessungen der GlpF-Transmembranhelices dieser Arbeit entnommen (siehe Abb. 18). Die Interaktionstendenz der GpA G83I- relativ zu den GpA-Transmembrandomänen aus Messungen mit dem TOXCAT-System wurde hier als 10% definiert, ein Wert, der sich oft bei der Anwendung des TOXCAT-Systems zeigt [83, 98, 122]. Der höhere Wert, welcher in dieser Arbeit im Vergleich zu Messungen mit dem TOXCAT-System bestimmt wurde, lässt eine höhere Sensitivität des hier eingesetzten Systems zur Detektion schwacher Helix-Helix-Interaktion annehmen. Der Bereich, in dem sich schwache Interaktionen darstellen (symbolisiert durch orange Banden mit Farbverlauf), ist durch diese Gegebenheit gegenüber dem TOXCAT-System erweitert, sodass sich im Vergleich eine höhere Auflösung ergibt.

denzen beim TOXCAT-System wesentlich schlechter als bei dem hier gezeigten System erkannt werden, da der Bereich solcher Messwerte wesentlich enger definiert ist.

Eine erhöhte Sensitivität sowie eine höhere Auflösung des Systems könnten auch dazu führen, dass bereits kleine Schwankungen des Expressionsniveaus der Fusionsproteine starke Auswirkungen auf die jeweiligen Messwerte nach sich ziehen. Dies würde insbesondere bei vergleichenden Messungen von Wildtyp-Transmembrandomänen und entsprechenden Mutanten, wie im hier gezeigten Beispiel des GlpF, ins Gewicht fallen, wenn ein unterschiedliches Expressionsniveau der entsprechenden Fusionsproteine in der Zelle vorliegt. Eine Kontrolle des Expressionsniveaus durch Abschätzen der jeweils vorliegenden Konzentration des Fusionsproteins konnte im Zuge dieser Arbeit nicht

erfolgen. Daher können die Werte der verschiedenen Ansätze des  $\beta$ -Galactosidase-Tests nur unter Vorbehalt miteinander verglichen werden, da sich ein erhöhtes oder vermindertes Expressionsniveau bei gleicher Interaktionstendenz auf die katalytische Aktivität der Adenylatcyclase und somit auf den cAMP-Spiegel auswirkt und folglich auch in einer abweichenden enzymatischen Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase resultiert.

Ein weiterer Nachteil, der sich im Zusammenhang mit einer höheren Sensitivität des Systems einstellen könnte, ist eine mögliche Überinterpretation erhaltener Messwerte im Bereich der schwachen Interaktion. So darf ein Messwert, der im selben Experiment beispielsweise die Hälfte der  $\beta$ -Gal-Units der GpA-Transmembrandomänen erreicht, nicht überbewertet werden, denn, wie bereits oben beschrieben, erreichen bereits die GpA G83I-Domänen, welche als schwach interagierend angesehen werden, solche Werte (siehe Abb. 15 und Abb. 18). Es ist daher von hoher Wichtigkeit, stets Kontrollen für starke und schwache Interaktionstendenzen neben der eigentlichen Messung durchzuführen.

Neben einem hohen Expressionsniveau der Fusionsproteine begründet sich die Ursache für eine erhöhte Sensitivität des hier vorgestellten Systems gegenüber dem TOXCAT-System möglicherweise im Unterschied der Funktionsweise beider Systeme. TOXCAT nutzt ein Fusionsprotein, welches im Fall einer Homooligomerisierung der beinhaltenden Transmembrandomäne zur Dimerisierung der cytoplasmatischen DNS-Bindedomäne führt. Im dimerisierten Zustand bindet diese an den Promotor des Reportergens, welcher auf dem TOXCAT-Plasmid lokalisiert ist (siehe auch Abschnitt 1.7). Folglich muss zur Aktivierung stets ein Plasmid im juxtamembranen Raum verfügbar sein, an das die dimerisierte DNS-Bindedomäne binden kann. Auch findet sich nur jeweils ein Promotor als Zielsequenz auf jedem Plasmid, was die Wahrscheinlichkeit einer Bindung weiterhin gering hält. Bei dem BACTH- sowie auch dem hier vorgestellten System ist keine direkte Bindung an eine bestimmte DNS-Sequenz notwendig, die sich nahe der Membran befinden muss. Im Falle interagierender Transmembrandomänen der Fusionsproteine erfolgt die Synthese des sekundären Botenstoffes cAMP, welcher das Reportergen aktiviert. So scheint in diesen Systemen ein effizienterer Mechanismus zur Aktivierung des Reportergens vorzuliegen, der die Sensitivität bedeutend erhöht (siehe auch [139]).

### 5.1.3 Unterschiede bei Interaktionsmessung und Screeningverfahren

Das Plasmid pBLT25ii, welches ausschließlich im Zusammenhang mit Interaktionsmessungen Anwendung fand, und sein Pendant, das Plasmid pLT25, welches zur Konstruktion der DNS-Bibliothek verwendet wurde, weisen sowohl Gemeinsamkeiten als auch bedeutsame Unterschiede auf. Beide codieren nach Einfügen einer entsprechenden DNS-Oligomerkassette an den dafür vorgesehenen Schnittstellen für ein Fusionsprotein, welches in die innere *E. coli*-Membran inseriert wird und dessen N-terminale, cytoplasmatische Domäne das T25-Fragment der Adenylatcyclase darstellt. Auch wird bei beiden Vektoren die Expression dieses Proteins durch den *tac*-Promotor kontrolliert. Wie bereits erläutert, basiert das Plasmid pBLT25ii, welches unter anderem bei den Messungen bezüglich der GlpF-Transmembrandomänen verwendet wurde, auf pBR322; der Vektor pLT25 ist jedoch pMal-p2X-basierend und sein Derivat pLT25Lib wurde im Zuge des Screeningverfahrens eingesetzt. Die Plasmide pBR322 und pMal-p2X besitzen zwar den gleichen Replikationsursprung, dennoch ist nicht gesichert, ob sie auch in gleicher Kopienzahl vorliegen und sich somit ein Einfluss auf das Expressionsniveau der Fusionsproteine ergeben könnte (siehe auch Abschnitt 5.1.1). Viel wesentlicher ist jedoch das Vorhandensein eines zusätzlichen Gens auf dem Vektor pMal-p2X/pLT25: Das Gen *lacI<sup>q</sup>* codiert für den Lac-Repressor, jedoch liegt hier eine durch Mutation veränderte Promotorregion vor, welche zu einer erheblich stärkeren Expression als beim Wildtyp führt [140]. Zusätzlich ergibt sich die Situation, dass das Gen dieses Repressors durch seine Lage auf dem mehrfach vorhandenen Plasmid pLT25 in vielfacher Kopienzahl in der Zelle vorliegt. Dies führt infolge zu einer sehr starken Repression der *tac*-Promotor-kontrollierten Gene der Fusionsproteine auf beiden im Screeningverfahren eingesetzten Plasmiden pLT25Lib und pALT18iiLib (siehe Abb. 28). So lässt sich für diesen Fall ein geringeres Expressionsniveau der Fusionsproteine als in Anwesenheit eines Plasmids zur Messung von Interaktionstendenzen (z.B. pBLT25ii) vermuten. Des Weiteren erfolgt durch die erhöhte Konzentration des Lac-Repressors eine starke Repression des *lacZ*-Reportergens im *E. coli*-Genom. Dies hat Bedeutung für den  $\beta$ -Galactosidase-Test, welcher als zusätzliche Kontrolle beim Screeningverfahren eingesetzt wurde. Bei der Induktion durch IPTG erfolgt die Ablösung des Lac-Repressors von der Operatorregion. Jedoch kann vermutet werden, dass der Repressor in Anwesenheit des Plasmids pLT25 aufgrund der geschilderten Gegebenheiten in erheblich gesteigerter Konzentration gegenüber einem Ansatz mit dem Vektor pBLT25ii in der Zelle vorhanden ist und daher

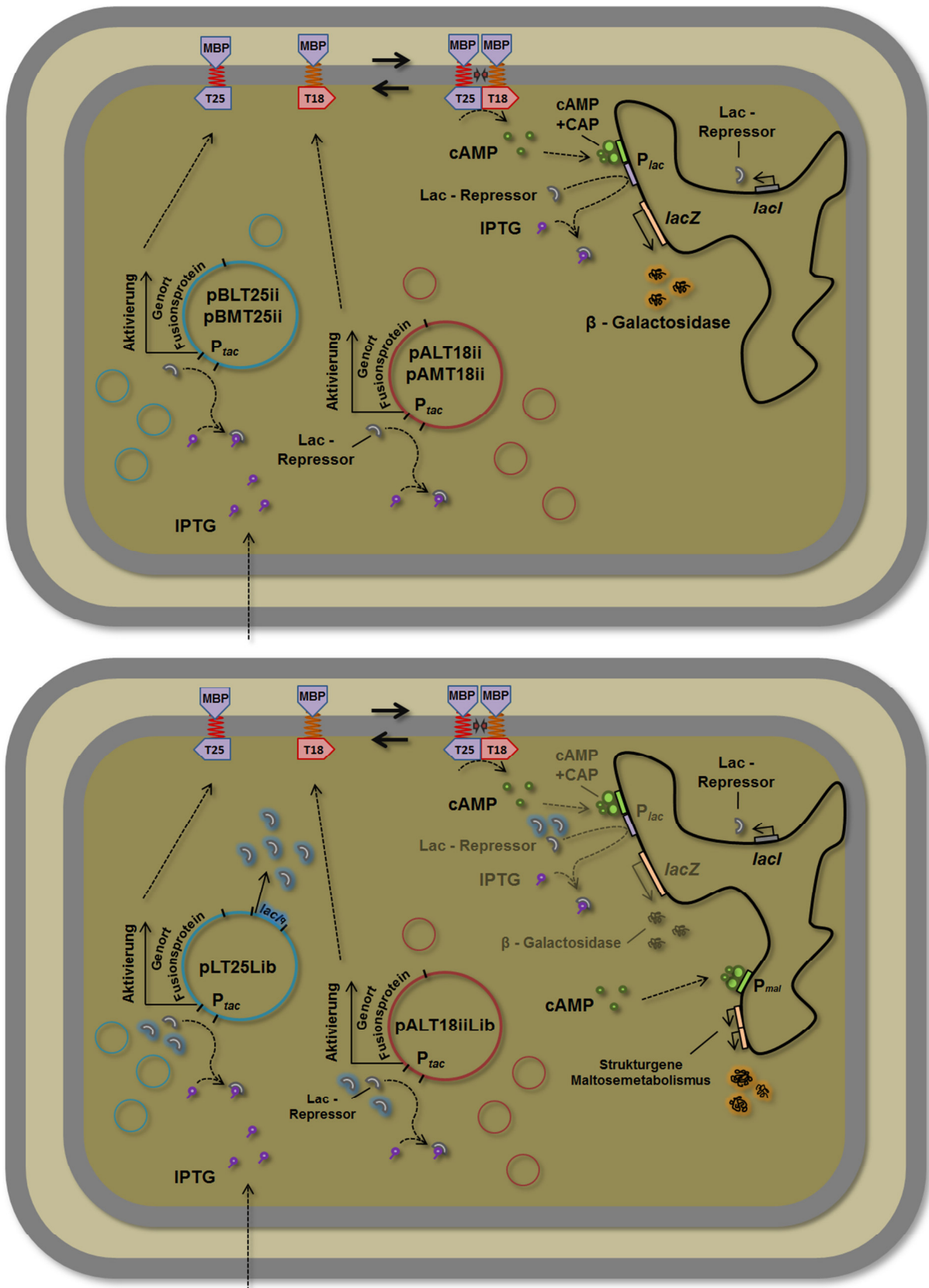


Abb. 28 (Die Legende befindet sich auf der nächsten Seite).

**Abb. 28: Übersicht über relevante Vorgänge in der *E. coli*-Zelle bezüglich der Bestimmung von Interaktionstendenzen und dem Screeningprozess.** Oben: Vorgänge, die für die Bestimmung von Interaktionstendenzen transmembraner Helices relevant sind. IPTG aus dem Kulturmedium führt zur Induktion der Gene der Fusionsproteine, die auf den Plasmiden pBLT25ii/pBMT25ii und pALT18ii/pAMT18ii (zuzüglich einer für eine Transmembrandomäne codierende Sequenz) lokalisiert sind. Dabei löst sich der Lac-Repressor von der Operatorregion des cAMP/CAP-unabhängigen *tac*-Promotors ( $P_{tac}$ ). Durch die Interaktion der transmembranen Fusionsproteine kann die Synthese von cAMP erfolgen, welches zusammen mit CAP einen Komplex bildet, der zur Genaktivierung an den *lac*-Promotor ( $P_{lac}$ ) des chromosomalen *lacZ*-Gens bindet. Der Lac-Repressor ist in Anwesenheit von IPTG nicht oder nur in vermindertem Maße an die Operatorregion des Gens gebunden. Unter diesen Bedingungen erfolgt die Expression der  $\beta$ -Galactosidase, deren enzymatische Aktivität anschließend zur Detektion der Fusionsprotein-Interaktion genutzt wird. Unten: Darstellung der Vorgänge, die für den Screeningprozess eine Rolle spielen. Die Plasmide pLT25Lib und pALT18iiLib codieren für Fusionsproteine mit variabler Transmembrandomäne. Bei einer Interaktion der Transmembrandomänen bindet der cAMP/CAP-Komplex an den Promotor des chromosomalen *mal*-Regulons ( $P_{mal}$ ). Die Strukturgene des Regulons können so exprimiert werden und ein Wachstum mit Maltose als einzige Kohlenhydratquelle wird möglich (nicht alle regulatorischen Faktoren des *mal*-Regulons sind aufgeführt [141]). Ein bedeutsamer Unterschied ist eine erhöhte Konzentration des Lac-Repressors in der pLT25Lib enthaltenen Zelle (unten). So befindet sich zusätzlich zum chromosomalen *lacI*-Gen das Allel *lacI<sup>f</sup>* auf diesem Plasmid, welches ebenfalls für den Lac-Repressor codiert. Durch eine Mutation zeigt sich hier jedoch eine erhöhte Expressionsrate gegenüber dem Wildtyp. Auch die hohe Kopienzahl des Vektors trägt zu der erhöhten Konzentration des Repressors bei. Als Resultat zeigen sich im Versuchsaufbau aus Abb. 27 (unten) ein verminderter Wert der  $\beta$ -Gal-Units im  $\beta$ -Galactosidase-Test für die Positivkontrolle im Vergleich zum Ansätzen unter Bedingungen wie in Abb. 27 (oben). Im Schema sind die vom Genom codierten Repressormoleküle grau, die vom Gen *lacI<sup>f</sup>* codierten zusätzlich blau hinterlegt.

im Vergleich eine stärkere Reprimierung erfolgt. Folglich wurden bei den  $\beta$ -Galactosidase-Tests, die in Verbindung mit dem Screeningprozess unter Einsatz des Vektors pLT25Lib durchgeführt wurden, geringere  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten erwartet, als im Fall der pBLT25ii-involvierenden Messungen. Diese Annahme steht in Einklang mit den experimentellen Ergebnissen: Wurden bei den Messungen bezüglich der Positivkontrolle der GpA-Transmembranhelix mit den Plasmiden pBLT25ii-GpA17 und pALT18ii-GpA17 oder pAMT18ii-GpA17 Werte zwischen 3000 und 4500  $\beta$ -Gal-Units festgestellt (Abb. 15 und Abb. 18), zeigten sich für Ansätze mit den Plasmiden pLT25-GpA und pALT18ii-GpA17 i.d.R. Werte um 500  $\beta$ -Gal-Units oder weniger (siehe Abb. 30, Anhang). Zu diesen abweichenden Aktivitäten kann zusätzlich die möglicherweise geringere Kopienzahl des Plasmids pLT25 im Vergleich zu pBLT25ii beigetragen haben.



Beim Selektionsprozess werden *E. coli*-Zellen, die Fusionsproteine mit interagierenden Transmembranhelices enthalten, auf Agarplatten mit Maltose als einzige Kohlenhydratquelle selektiert. Bei einer Interaktion der Helices werden die Gene des Maltosestoffwechsels aktiviert und ein Zellwachstum kann erfolgen. Dazu sei angemerkt, dass das *mal*-Regulon im Genom von *E. coli*, im Unterschied zum *lacZ*-Reportergen, zwar durch cAMP, nicht aber durch den Lac-Repressor reguliert wird [129, 141]. Dennoch findet auch hier eine Regulation durch den Repressor in oben beschriebener Weise am *tac*-Promotor der Plasmide statt, der die Expression der Fusionsproteine kontrolliert. Des Weiteren wird in den zur Selektion verwendeten Agarplatten anstelle einer IPTG-Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  wie in den Hauptkulturen des  $\beta$ -Galactosidase-Tests eine niedrigere Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eingesetzt, um den Selektionsdruck durch eine möglicherweise unvollständige Induktion des Fusionsprotein-Gens zu erhöhen (mehr dazu in Abschnitt 0). Durch diese geschilderten Gegebenheiten bieten sich beim Selektionsprozess nochmals andere Bedingungen in Bezug auf die Genaktivierung als bei den  $\beta$ -Galactosidase-Tests.

## 5.2 IPTG-Konzentration und der Selektionsschritt des Screeningverfahrens

Experimente bezüglich der Geninduktion des *lac*-Promotors in Verbindung mit dem GALLEX-System legen nahe, dass neben dem Zustand der annähernd vollständigen Repression und der vollständigen Induktion ein Zustand der unvollständigen Induktion existiert. Dieser Zustand tritt abhängig von der eingesetzten IPTG-Konzentration auf und zeigt sich bei diesen Versuchen für Konzentrationen von 1 bis 10  $\mu\text{M}$  [137].

Bei dem in dieser Arbeit beschriebenen System erfolgte die Induktion des *tac*-Promotors durch die Zugabe von IPTG. Für Messungen von Interaktionstendenzen durch den  $\beta$ -Galactosidase-Test wurde eine IPTG-Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  in der Hauptkultur gewählt, da hier nach den Ergebnissen der IPTG-Titration des Repressors mit einer vollen Induktion zu rechnen ist. Zur Induktion beim Screeningverfahren wurde lediglich eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  IPTG eingesetzt. Durch eine unvollständige Induktion beim Selektionsschritt des Screeningverfahrens kann ein erhöhter Selektionsdruck auf Zellen mit interagierenden Helices erwartet werden, da infolge einer geringeren Konzentration des Fusionsproteins und damit der Adenylatcyclasefragmente die Gene des Maltosestoffwechsels eine weniger starke Aktivierung erfahren. Das Wachstum von Zellen

mit mäßig stark interagierenden Fusionsproteinen wird so stärker gehemmt und Zellen mit stark interagierenden Fusionsproteinen treten durch schnelleres Wachstum in den Vordergrund. Die Ergebnisse der IPTG-Titration bezüglich der GpA-Transmembrandomäne (Abschnitt 4.3) schließen eine unvollständige Induktion bei 50 mM IPTG nicht aus, da sich hier geringe Unterschiede in den Messergebnissen im Vergleich mit einer Induktion durch 500  $\mu$ M IPTG zeigen. Durch die im Screeningverfahren gegenüber dem  $\beta$ -Galactosidase-Test stark erhöhte intrazelluläre Konzentration des Lac-Repressors, welche auf das *lacI<sup>q</sup>*-Allel des Plasmids pLT25Lib zurückzuführen ist, könnte der Schwellenwert der IPTG-Konzentration, der für eine vollständige Induktion notwendig ist, erhöht werden. So könnte eine unvollständige Induktion schon in Anwesenheit von 50  $\mu$ M IPTG auftreten und die Konzentration der exprimierten Fusionsproteine wäre gegenüber dem vollständig induzierten Zustand geringer. Dies würde zu einem größeren Unterschied der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten bei 50 und 500  $\mu$ M IPTG in einem Titrationsexperiment führen als in Abschnitt 4.3 gezeigt. Eine IPTG-Titration unter Verwendung des Bibliothek-Kontrollplasmids pLT25-GpA wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

### 5.3 Interaktion der GlpF-Transmembranhelices

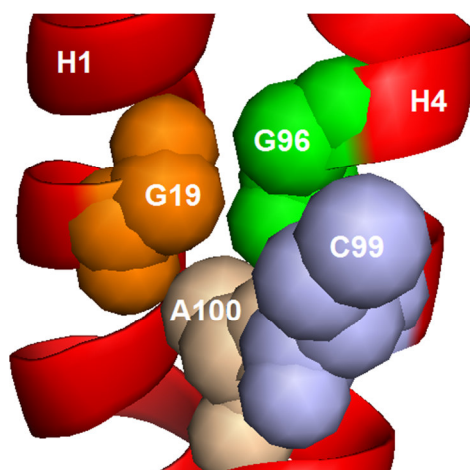
Im Zuge dieser Arbeit wurden die Interaktionstendenzen von transmembranen GlpF-Helices untersucht. Anhand der vorliegenden Strukturdaten des GlpF [31] konnte eine Interaktion der Helices im Vorfeld als wahrscheinlich eingeschätzt werden. Die Messungen mit GlpF wurden durchgeführt, um das konstruierte Reportersystem zu verifizieren. Das Protein wurde auch gewählt, da es antiparallel orientierte Helices beinhaltet. So konnte geprüft werden, ob das System zur Bestimmung von Interaktionstendenzen antiparalleler Helices geeignet ist.

Bei der Untersuchung des antiparallel orientierten Paares H1 und H2 sowie der parallelen Paarung H1 und H4 zeigt sich jeweils eine schwache Interaktionstendenz (Abb. 18). Zur weiteren Untersuchung der Proteineigenschaften wurden einzelne Aminosäuren der transmembranen Helices ausgetauscht, um die Auswirkungen auf die Interaktionstendenzen zu untersuchen. Es wurden dazu Aminosäurereste ausgewählt, die aufgrund ihrer Position im Protein bedeutsam für eine Interaktion erschienen. Basis für die Auswahl waren die GlpF-Strukturdaten, mit deren Hilfe entschieden wurde, welche Reste

zu einer Interaktion durch Van der Waals-Kontakte beitragen könnten. Auch wurden potentiell mögliche Ausbildungen von interhelicalen Wasserstoffbrücken zwischen den C<sub>α</sub>-gebundenen Wasserstoffatomen und den Sauerstoffatomen der Ketogruppen des Helix-Rückgrats berücksichtigt [64]. Die substituierten Aminosäurereste sind in Abb. 17 dargestellt.

Die Ergebnisse der Messung bezüglich mancher Mutanten weisen teils starke Abweichungen im Vergleich mit den wildtypischen Helices auf, andere wiederum haben vergleichbare Interaktionstendenzen (siehe Abb. 18). Bedeutend abgeschwächt gegenüber dem Wildtyp ist die Interaktionstendenz der Mutante L21A (H1) mit H2. Da hier der Leucinrest durch eine wesentlich kleinere Seitenkette ausgetauscht wurde, ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass die beiden Helices durch diese daran gehindert werden, in engen Kontakt zu kommen und dass die Stabilisierung eines Helix-Helix-Dimers durch Verminderung der Van der Waals-Kontakte anderer Reste oder sich nicht ausbildende Wasserstoffbrückenbindungen eingeschränkt oder verhindert wird. Eine Abschwächung der Interaktionstendenz könnte durch eine Verkleinerung der Van der Waals-Kontaktfläche der beiden Helices hervorgerufen werden, die durch die Reduzierung der molekularen Oberfläche aufgrund des Austauschs der großen Leucinseitenkette durch den kleineren Alaninrest erfolgt. Jedoch erscheint es fragwürdig, ob dieser im Vergleich zur Gesamtheit der Van der Waals-Wechselwirkungen eher geringe Beitrag für eine solch bedeutende Änderung verantwortlich sein kann. Auch ist denkbar, dass eine Änderung der Proteinkonformation infolge der Aminosäuresubstitution die Helix-Helix-Interaktion stört. Eine solche Veränderung könnte möglicherweise die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und bestimmten Van der Waals-Kontakten, die für eine Interaktion wichtig sind, einschränken oder verhindern.

Eine bedeutende Erhöhung der Interaktionstendenz ergibt sich für die Aminosäuresubstitution G19I in H1 bei der Dimerisierung mit H4. Die deutliche Steigerung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität als Maß der Interaktionstendenz könnte aus einer Vergrößerung der Van der Waals-Kontaktfläche resultieren: Für den durch die Mutation eingebrachten Isoleucinrest scheint genug Raum vorhanden, damit dieser den Abstand beider Helices zueinander nicht beeinträchtigt (siehe auch Abb. 29). Ferner könnte sich dem eingebrachten Isoleucinrest die Möglichkeit bieten, eine Position in engem Kontakt an der Seite der gegenüberliegenden Helix einzunehmen und somit die Van der Waals-Kon-



**Abb. 29: GlpF-Transmembranhelices 1 und 4.** Die Reste G19 der H1 sowie G96, C99 und A100 der H4 sind in der *spheres*-Darstellung des Programmes „PyMOL molecular graphics system“ gezeigt (Strukturdaten: RCSB-Proteindatenbank-Identifikationsnummer 1FX8).

taktfläche zu vergrößern. Begünstigt wird dieser Kontakt durch die kurzen Seitenketten der Reste C99 und A100, die eine Anwesenheit des Isoleucinrestes durch ihre geringe Größe zulassen könnten. Dies steht im Einklang mit der als *knobs into holes-packing* bezeichneten Situation, bei der Seitenketten einer Helix in Vertiefungen der gegenüberliegenden Helix hineinreichen, die durch deren Seitenketten entstanden sind. So kann eine Maximierung der Van der Waals-Kontaktfläche erfolgen [42, 44, 60, 61].

Der Aminosäurerest G96 liegt in der GlpF-Struktur in H4 und befindet sich in unmittelbarer räumlicher Nähe zum Rest G19 in H1. Jedoch scheint die Substitution des Restes G96 durch den wesentlich größeren Isoleucinrest keinen Einfluss auf die gemessene Interaktionstendenz zu haben, da in Anwesenheit dieser Substitution annähernd die gleiche  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität wie bei der Wildtyp-Variante festgestellt wurde. Auch zeigt sich für die Anwesenheit der Substitutionen G19I und G96I in einem Ansatz etwa die gleiche Interaktionstendenz wie für den Aminosäureaustausch G96I als einzige Substitution. Die Mutation G96I scheint keinen Einfluss auf die Interaktionstendenz von H1 und H4 zu haben. Bei Betrachtung der in Abb. 29 gezeigten Anordnung der Seitenketten ist dies ein unerwartetes Ergebnis, da Isoleucinreste an den Positionen 19 und 96 der GlpF H1 und H4 eine erheblich veränderte Situation in Bezug auf die Van der Waals-Kontakte erwarten lassen würden.

Für H4 mit der Mutation G96I und auch für H2 mit der Substitution A55I in Interaktion mit H1 wurden Interaktionstendenzen bestimmt, die nur geringfügig von denen der entsprechenden Wildtypen abweichen. Ein abweichendes Expressionsniveau kann jedoch auch hier nicht vollständig ausgeschlossen werden, auch wenn dies hier aufgrund der geringen Abweichung der Interaktionstendenzen von denen der Wildtyp-Varianten eher unwahrscheinlich erscheint. Die Mutationen G17I, G51I und T18A zeigen eine Abweichung der Interaktionstendenz, die jeweils um etwa 500  $\beta$ -Gal-Units stärker oder schwächer als die der entsprechenden Wildtypen ist. Eine solche Abweichung kann unter den Aspekten einer erhöhten Auflösung des Systems im Vergleich mit dem TOXCAT-System lediglich als geringfügiger Unterschied der Interaktionstendenz im Vergleich zum Wildtyp gedeutet werden.

Einige der substituierten Reste sind an der Ausbildung eines [klein]xxx[klein]- oder [klein]xxx[klein]xxx[klein]-Motivs an der jeweiligen Helix-Helix-Kontaktfläche der GlpF-Transmembranhelices beteiligt. So beinhaltet die Primärsequenz von H2 das Motiv G<sup>51</sup>xxxA<sup>55</sup>, dessen Seitenketten mit den Resten des H1-Motivs A<sup>13</sup>xxxG<sup>17</sup> in engem Kontakt stehen, was die GlpF-Strukturdaten veranschaulichen. Darüber hinaus sind die Reste des auf H4 lokalisierten Motivs S<sup>92</sup>xxxG<sup>96</sup>xxxA<sup>100</sup> in Richtung H1 ausgerichtet und können mit dessen Resten in Van der Waals-Kontakt treten. Diese beschriebenen Motive werden auch als Abwandlungen der sogenannten *glycine-zipper* betrachtet und finden sich ebenfalls in transmembranen Helices von anderen membranständigen, polytopischen Proteinen [142] und auch in den anderen, hier nicht ausführlich behandelten Transmembranhelices von GlpF [143]. Es wurde gezeigt, dass solche Motive eine wichtige Rolle bei der Oligomerisierung von transmembranen Helices spielen [72, 76, 142]. Die Bedeutsamkeit dieser Motive wird auch durch das Ergebnis des Screeningverfahrens in dieser Arbeit hervorgehoben. In Übereinstimmung mit dieser Erkenntnis wäre zu erwarten gewesen, dass Mutationen der entsprechenden Reste die Interaktionstendenzen der involvierten Helices herabsetzen würden. Dies scheint jedoch für die hier untersuchten Seitenketten nicht der Fall zu sein. Die Aminosäurereste G17, A55, und G96 sind Bestandteil solcher Motive, trotzdem resultiert deren Austausch nicht in einer deutlichen Verminderung der Interaktionstendenz. Lediglich im Fall von G51 ist eine leichte Abschwächung der Interaktionstendenz bemerkbar. Dass ein GxxxG- oder [klein]xxx[klein]-Motiv alleine nicht genügt oder nicht unbedingt notwendig ist, um eine Interaktion von transmembranen Helices hervorzurufen, wurde bereits gezeigt [44, 75, 76,

130, 144]. So kann gefolgert werden, dass noch andere Faktoren vorhanden sein müssen, die wie im hier behandelten Fall des GlpF trotz Zerstörung des Motivs zur Aufrechterhaltung der Interaktionstendenz beitragen.

Es konnte gezeigt werden, dass humane Aquaporine und Aquaglyceroporine durch ihre hochkonservierten Strukturen Ähnlichkeiten mit dem bakteriellen GlpF aufweisen [143]. Die Reste des GlpF G17, G51, A55 und G96 sind an den entsprechenden Positionen der eukaryotischen Kanäle jedoch nicht strikt konserviert und teilweise durch andere kleine Seitenketten wie Alanin- oder Serinreste substituiert. Der Austausch dieser kurzen Reste durch die bedeutend größere Isoleucinseitenkette, wie hier im Experiment gezeigt, kann die Interaktion der Helices nicht vollständig unterbinden. Diese Aspekte bestärken die Annahme, dass das Vorkommen der beschriebenen Reste an den jeweiligen Positionen nicht essentiell für eine Interaktion der GlpF-Transmembranhelices ist. Vielmehr ist denkbar, dass anstelle bestimmter Aminosäurereste eine gewisse Interaktionstendenz konserviert sein muss, um eine vorhandene Proteindynamik, die für die Funktion des Proteins von Bedeutung ist, beizubehalten. Eine solche Dynamik, wie sie beispielsweise für den Übergang zwischen zwei Proteinzuständen nötig ist, kann durch eine verstärkte Interaktionstendenz zerstört werden, da das Protein infolge in einer bestimmten Konformation festgehalten werden kann [70, 71]. Im Fall von GlpF könnte eine solche Dynamik für eine möglicherweise auftretende, aber bis heute noch nicht nachgewiesene Kooperativität der Monomere im Zusammenhang mit dessen Tetramerformation eine Rolle spielen. Eine Kooperativität, welche meist eine Konformationsänderung von Proteinuntereinheiten beinhaltet, wurde beispielsweise für das mit dem GlpF verwandte Aquaporin AQP0 nachgewiesen [145]. Für GlpF wurde gezeigt, dass eine bestimmte GlpF-Mutante, welche in ihren Oligomerisierungseigenschaften eingeschränkt ist, auch eine geringe Aktivität in Bezug auf den Stofftransport aufweist [32], was für einen Mechanismus im Sinne einer Kooperativität sprechen würde. Es ist im Fall dieser Mutante jedoch nicht auszuschließen, dass eine geringere Aktivität auf eine Änderung der Proteinstruktur, die durch die Mutation selbst ausgelöst wurde, zurückzuführen ist. Auf dynamische Vorgänge in Zusammenhang mit einer Konformationsänderung weisen auch die hier gezeigten, schwachen Interaktionstendenzen der GlpF-Wildtyphelices 1 und 2 sowie 1 und 4 hin. Wäre hier eine starke Interaktion vorgefunden worden, hätte dies auf eine starre, nicht-dynamische Situation im Protein hingewiesen, die gegen dynamische Vorgänge spräche.

Auch besteht weiterhin die Annahme, dass ein gewisses Maß an Dynamik und Flexibilität in der Proteinstruktur, verursacht durch weniger starke Interaktionen, für die Faltung von Membranproteinen von Bedeutung sein kann [146].

#### **5.4 Screening nach heterotypisch interagierenden Transmembranhelices: Vorkommen und Verteilung der Aminosäurereste an der Helix-Helix-Kontaktfläche**

Durch das Screening konnte das Auftreten von Aminosäureresten an der Kontaktfläche heterotypisch interagierender Transmembranhelices untersucht werden. Die diesbezüglich erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert. Die Gliederung erfolgt dabei nach den untersuchten Aminosäureresten.

##### **5.4.1 Glycin**

Glycinreste zeigen einen hohen Gesamtanteil bezüglich des Vorkommens an den variablen Positionen sowie die mit Abstand höchste Überrepräsentation von 51 %. Es wurde bereits vielfach gezeigt, dass Glycinreste für die Interaktion transmembraner Helices von Bedeutung sind. Dabei spielen das hier ebenfalls überrepräsentiert vorhandene GxxxG-Motiv [73, 74, 115, 147, 148], sowie auch komplexere, Glycin-enthaltende Motive [67, 142, 149-151] eine Rolle. Während in den früheren Arbeiten der Schwerpunkt auf der Untersuchung des GxxxG-Motivs in homotypisch interagierenden Transmembranhelices lag, konnte in den aktuelleren Arbeiten auch vermehrt das Vorkommen dieses Motivs in Zusammenhang mit heterotypisch interagierenden Transmembranhelices gezeigt werden. Hier soll das Beispiel der rechtshändigen, heterodimeren Transmembrandomäne der Integrinuntereinheiten  $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3 angeführt werden, deren Struktur durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt wurde [152]. Dieses Dimer weist das GxxxG-Motiv nur innerhalb der  $\alpha$ IIb-Helix auf, in der Sequenz der  $\beta$ 3-Helix kommt weder dieses, noch das verwandte [klein]xxx[klein]-Motiv vor. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das GxxxG-Motiv überrepräsentiert auftritt, jedoch in den meisten Fällen nur auf einer der interagierenden Helices zu finden ist. Diese beiden Befunde sprechen deutlich dafür, dass zur Förderung einer interhelicalen Interaktion bereits ein einzelnes GxxxG-Motiv ausreichend ist.

Zwei interagierende Helices bilden, wie beispielsweise im Fall des GpA-Transmembrandomänen-Dimers, durch ihre meist gekippte Position zueinander einen Kreuzungswinkel mit einem Drehpunkt. Durch kurze Glycinseitenketten in Schlüsselpositionen, welche sich vornehmlich in der Nähe dieses Drehpunktes befinden, kann der Abstand zweier Helices zueinander minimiert werden. Ein geringer Abstand begünstigt eine große Van der Waals-Kontaktfläche zwischen den Seitenketten beider Helices, da Aminosäurereste durch die geringere Entfernung mit größerer Wahrscheinlichkeit in Van der Waals-Kontakt treten und so zur Stabilisierung des interhelicalen Kontakts beitragen können [125]. Eine Tendenz des Vorkommens kürzerer Seitenketten an den Schnittstellen von interagierenden Helices konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden [153, 154]. Durch den so geschaffenen, engen Kontakt zweier Helices wird auch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen  $C_{\alpha}$ -Wasserstoffatomen der einen Helix und Sauerstoffatomen von Ketogruppen des Rückgrats der gegenüberliegenden Helix begünstigt. Diese Wasserstoffbindungen können ebenfalls zur Verstärkung der Interaktionstendenz beitragen [62-64, 149]. Die Verteilung von Glycinresten an den randomisierten Positionen der Helices (siehe Abb. 23) lässt die Tendenz erkennen, dass dieser Rest zur Mitte der Helix häufiger auftritt, als in den äußeren Positionen. Vermutet man den Drehpunkt der beiden Helices statistisch in deren Mitten, so kann man etwa die Positionen 5, 6 und 9 als in dessen Nähe liegend betrachten. So weisen diese drei mittleren Positionen bis auf eine Ausnahme jeweils höhere Glycinanteile als die beiden äußeren Positionen auf. Dies unterstützt die Annahme, dass eine Annäherung der beiden Helices eines Heterodimers durch die kurzen Glycinreste gefördert wird, um so die Van der Waals-Kontaktfläche zu maximieren und damit die Interaktionstendenz zu erhöhen.

Die besondere Bedeutung von Glycinresten im Zusammenhang mit der Interaktion transmembraner Helices wurde in der Literatur bereits eingehend beschrieben und durch diese Arbeit bestätigt. Insbesondere konnte hier die bedeutende Rolle des GxxxG-Motivs sowie die Wichtigkeit von Glycinresten auch ohne ein Auftreten dieses Motiv bei der Ausbildung von transmembranen Heterodimeren aufgezeigt werden.



### 5.4.2 Serin

Die durch das Screeningverfahren gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass Serinreste die am häufigsten vertretenen Aminosäurereste an der Helix-Helix-Kontaktfläche sind, sie kommen an 16,5 % aller Positionen vor. Es codieren jedoch auf DNS-Ebene zwei Codons für diesen Rest, im Gegensatz dazu existiert für die anderen 10 vorkommenden Reste nur jeweils ein Codon. Daher ergibt sich, dass dieser Rest trotz seiner Häufigkeit keine Überrepräsentation aufweist (siehe Abb. 22). Jedoch spricht das häufige Auftreten des Serinrestes *per se* bereits für seine Bedeutsamkeit für die Helix-Helix-Kontaktfläche.

Um zu veranschaulichen, dass ein Selektionsdruck vorlag, der das Auftreten von Serinresten als Bestandteil des [klein]xxx[klein]-Motivs begünstigte, sind in Tab. 5 die Verhältnisse der Anteile von Glycin-, Serin- und Alaninresten als Bestandteil des [klein]xxx[klein]-Motivs und der jeweils nicht in das Motiv involvierten Reste dargestellt. Der Quotient dieser beiden Anteile stellt das Verhältnis von in das Motiv involvierten und nicht-involvierten Resten dar. Es zeigt sich, dass etwa jeder zweite Serinrest (Verhältnis 0,49) an der Bildung eines [klein]xxx[klein]-Motivs (oder einer der erweiterten Varianten) beteiligt ist. Glycinreste weisen ein geringfügig größeres (0,54), Alaninreste ein marginal geringeres Verhältnis (0,43) auf. Wie in Abschnitt 4.9 geschildert, lag ein Selektionsdruck vor, welcher das Auftreten des [klein]xxx[klein]-Motivs förderte, was sich in dessen Überrepräsentation zeigte. Es kann vermutet werden, dass der Anteil der Serinreste, der an der Bildung dieses überrepräsentierten Motivs beteiligt ist geringer wäre, wenn sich das häufige Auftreten von Serinseitenketten nur in einer zufälligen Verteilung und nicht als Folge des Selektionsdrucks auf das Motiv begründen würde. So würde das Verhältnis des Anteils von Serinresten ohne den Selektionsdruck noch geringer als das von Alaninresten geschätzt werden. Da die Anteile von Serinresten an dem überrepräsentierten Motiv denen der anderen beteiligten Reste ähneln, kann zumindest in Bezug auf die Serinreste des [klein]xxx[klein]-Motivs von einem vorliegenden Selektionsdruck ausgegangen werden. Diese Gegebenheit sowie das generell erhöhte Vorkommen von Serinresten sprechen trotz nicht vorhandener Überrepräsentation für die Bedeutsamkeit dieser Seitenkette im Zusammenhang mit Interaktionen transmembraner Helices.

Des Weiteren fanden sich auf Serinresten basierende Interaktionsmotive beim Screening mit einer artifiziellen DNS-Bibliothek, die in ähnlicher Weise wie die hier gezeigte kon-

**Tab. 5: Anteile von Serin-, Glycin- und Alaninresten an [klein]xxx[klein]-Motiven beim Screeningprozess.** Gezeigt ist die Anzahl des jeweiligen Restes an allen variablen Positionen der Transmembranhelices aller interagierenden Helix-Helix-Paare sowie die Anzahl der Reste, die als Bestandteil des [klein]xxx[klein]-Motivs vorkommen (es wurden hier alle Reste gezählt, die zur Formierung des Motivs oder seiner erweiterten Formen beitragen). Das Verhältnis ist der Quotient aus Vorkommen im [klein]xxx[klein]-Motiv und dem Vorkommen an variablen Positionen insgesamt. Je größer das Verhältnis, desto häufiger ist der entsprechende Rest Teil des Motivs.

	Vorkommen an variablen Positionen insgesamt	Vorkommen im [klein]xxx[klein]-Motiv	Verhältnis
Serinreste	143	70	0,49
Glycinreste	109	59	0,54
Alaninreste	79	34	0,43

struiert und für die Interaktion rechtshändiger, homotypisch interagierender Helix-Helix-Paare ausgelegt wurde [82]. Die Bedeutsamkeit der Aminosäure Serin zeigt sich auch durch sein Vorkommen in pro- und eukaryotischen Transmembrandomänen in Form von Serin-Reisverschlüssen (*serine-zipper*) als Interaktionsmotiv [81, 155] oder in transmembranen Helices von GPCR-Proteinen, wo der Rest in der SxxxS-Form stark konserviert vorliegt [156]. Dieses Motiv ist in GPCR-Proteinen in seiner Funktion als Interaktionsmotiv jedoch noch nicht hinreichend untersucht. Serinreste zeigen an zwei randomisierten Positionen nahe dem Periplasma ein erhöhtes Vorkommen mit Anteilen von 27 % bzw. 22 % (erwartet:  $16,6\bar{6}$  %). Dies steht möglicherweise mit der kurzen Entfernung zwischen polaren Serinresten an diesen Positionen und der Region der ebenfalls polaren Lipidkopfgruppen der Membran in Zusammenhang. An dieser Stelle soll vorweggenommen werden, dass eine vergleichbare Beobachtung ebenfalls für Cystein- und Threoninreste in manchen randomisierten Positionen nahe den Lipidkopfgruppen gemacht werden konnte. Diese Charakteristik wurde bereits für polare Seitenketten in transmembranen Domänen beschrieben [157].

Serin weist also durch sein häufiges Vorkommen und sein Vorliegen in Form von Motiven eine große Bedeutung für die Interaktion transmembraner Helices auf. Der Beitrag des Restes zu einer Interaktion durch das Vorliegen in Form eines Motivs wird auch durch in der Literatur beschriebene, ähnliche Beobachtungen unterstützt.

### 5.4.3 Alanin

Alaninreste zeigen eine Überrepräsentation von 9 % und treten nach Serin-, Glycin-, Phenylalanin- und Cysteinresten als fünfthäufigste Seitenkette auf. Nach Glycinresten besitzen Alaninreste mit ihrer Methylgruppe die zweitkleinste Seitenkette der 11 möglicherweise vorkommenden Reste. Daher kann vermutet werden, dass eine Annäherung zweier transmembraner  $\alpha$ -Helices mit Alaninresten an Schlüsselpositionen wie im Fall von Glycinresten begünstigt wird, da auch hier durch eine geringe Distanz der Helices eine Maximierung der Van der Waals-Kontaktfläche erfolgen kann [158]. Allerdings muss dieser Effekt im Fall von Alanin aufgrund der größeren Seitenkette als geringer ausgeprägt eingeschätzt werden. Dies zeigt auch die Verteilung der Reste an den variablen Positionen. Die drei zentralen Positionen beider Helices zeigen stets Anteile zwischen 10 % und 13 %, wohingegen die Anteile der Glycinreste zwischen 11 % und 19 % liegen.

Es konnte anhand von Strukturdaten gezeigt werden, dass Alaninreste durch ihr häufiges Auftreten im Vergleich zu anderen Resten an Kontaktflächen interagierender Helices wichtiger Bestandteil löslicher und auch transmembraner Proteine sind [158]. Das Vorkommen des AxxxA-Motivs in  $\alpha$ -Helices löslicher Proteine konnte belegt werden [159], jedoch stehen umfangreiche Nachweise für dessen Bedeutsamkeit in transmembranen Domänen, wie sie für das GxxxG-Motiv erbracht wurden, noch aus. Ferner können Alaninreste auch Bestandteile komplexer Interaktionsmotive in homo- und heterotypisch interagierenden Transmembranhelices darstellen [75]. In einer weiteren, auf Strukturdaten beruhenden Studie, wurde die Komposition transmembraner Domänen untersucht, jedoch in Hinblick auf die Zusammensetzung der gesamten Domäne und nicht nur der Helix-Helix-Kontaktflächen allein [73]. So zeigten Alaninseitenketten in der Gesamtverteilung von 20 vertretenen Resten den vierthäufigsten Anteil, was deren Bedeutsamkeit für transmembrane Domänen ergänzend hervorhebt. Dies kann in diesem Fall in geringerem Maße dem Beitrag der Seitenkette zu Interaktionstendenzen als vielmehr dessen hydrophober Eigenschaft zugeschrieben werden, welche ein generelles Auftreten in der unpolaren Umgebung der Membran, auch ohne Beitrag zu einer Interaktion, begünstigt. Allerdings muss hierzu angemerkt werden, dass der Grad der Hydrophobizität von Alaninseitenketten als nicht gesichert eingestuft wird [160].

Meist ist bei transmembranen, rechtshändigen Helix-Helix-Paaren ein Kreuzungswinkel um etwa  $-40^\circ$  vorzufinden [161]. Einen solchen Winkel nehmen ebenfalls die Transmembranhelices des GpA-Dimers ein [57], nach deren Vorbild die im Screeningverfahren eingesetzten transmembranen Domänen gestaltet wurden. Bei der Anwendung des Screeningverfahrens könnten abweichende Winkel begünstigen, dass kleine Reste an den äußeren der randomisierten Positionen der interagierenden Helices nicht mehr in Van der Waals-Kontakt mit denen der gegenüberliegenden Helix stehen. In diesem Fall wäre ein Vorkommen von Alaninresten an solchen Positionen wahrscheinlich, da dessen Anwesenheit im Gegensatz zu polaren Resten durch das unpolare Milieu der Lipidmembran energetisch begünstigt ist. Folglich würden Serin-, Threonin- oder Cysteinreste an diesen Positionen deutlich seltener vorhanden sein. Tatsächlich zeigen Alaninreste in der äußersten variablen Position 13 beider Helices eine deutliche Überrepräsentation. Auffällig ist jedoch in diesem Zusammenhang das ebenfalls häufige Auftreten der polaren Serin- oder Threoninreste an dieser Position. Es kann gefolgert werden, dass das Vorkommen von polaren oder unpolaren Resten in interagierenden Transmembranhelices nahe des Cyto- oder Periplasmas möglicherweise in Abhängigkeit von Kreuzungswinkel und Position des Drehpunktes steht. Auch die Position der Helices selbst in Bezug zur Mitte der Membran kann möglicherweise variabel sein. So wäre es denkbar, dass polare Reste an der äußeren Position einer Helix neben einem Beitrag des Restes zur Interaktion auch in Helix-Helix-Dimeren mit abweichenden Kreuzungswinkeln und einer Verschiebung des Dimers in Richtung des polaren Milieus der Kopfgruppen auftreten.

Die Ergebnisse belegen, dass Alaninreste für die Interaktion transmembraner  $\alpha$ -Helices wichtig sind. Allerdings ist die genaue Rolle dieses Restes dabei nicht geklärt, was sich auch durch die diesbezüglich geringe Dichte der Literatur zeigt.

#### **5.4.4 Glycin, Serin, Alanin und das [klein]xxx[klein]-Motiv**

Durch die Arbeit von Senes *et al.* [73] wird deutlich, dass sich der Gesamtanteil an Serin- und Glycinresten in Transmembrandomänen deutlich von dem in dieser Arbeit dargelegten Anteil dieser Reste an der Helix-Helix-Kontaktfläche unterscheidet. Während Serin- und Glycinreste hier den häufigsten und zweithäufigsten Anteil der Helix-Helix-Kontaktflächen darstellen, zeigen sich diese Reste im Gesamtanteil der

Transmembrandomänenkomposition nur an sechst- und siebthäufigster Stelle. Dadurch lässt sich schlussfolgern, dass Glycin- und Serinreste in Transmembrandomänen zwar generell nur mit moderater Häufigkeit auftreten, an der Kontaktfläche jedoch eine signifikante Rolle spielen. Alaninreste sind, wie hier gezeigt, an der Helix-Helix-Kontaktfläche leicht überrepräsentiert und weisen auch generell in Transmembrandomänen eine hohe Präsenz auf. So kann gefolgert werden, dass Alaninreste grundsätzlich mit höherer Frequenz als Glycin- oder Serinreste an Bereichen einer Transmembranhelix auftreten, die dem unpolaren Milieu der Membran zugewandt sind und nicht zu Helix-Helix-Interaktionen beitragen. Nichtsdestotrotz belegen die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die angeführten Studien die Bedeutsamkeit von Alaninresten für transmembrane Helices und deren Interaktion, auch wenn die Bedeutung des Beitrags dieser Seitenketten zur Helix-Helix-Interaktion hinter dem von Glycin- und Serinresten zurückzustehen scheint.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ebenfalls, dass das [klein]xxx[klein]-Motiv durch seine Überrepräsentation von Bedeutung für heterotypische Interaktionen rechtshändiger Helix-Helix-Dimere ist. So kann es, in ähnlicher Weise wie auch das GxxxG-Motiv, durch das Begünstigen einer hohen Packungsdichte der anderen Seitenketten, zu einer Helix-Helix-Interaktion beitragen [70, 72]. In diesem Kontext konnte belegt werden, dass beim Austausch des GxxxG-Motivs der GpA-Transmembranhelix gegen die Variante AxxxG immer noch eine Dimerisierung erfolgen kann, auch wenn diese gegenüber dem Wildtyp abgeschwächt ist [58]. Ähnliche Eigenschaften zeigt das  $G^{972}xxxG^{976}$ -Motiv der Integrinuntereinheit  $\alpha$ IIb: In einem Sequenzvergleich von 18 humanen Integrin  $\alpha$ -Untereinheiten zeigte sich eine starke Konservierung des  $G^{976}$ -Restes, der nur in einem Fall durch einen Alaninrest ersetzt ist. Der  $G^{972}$ -Rest hingegen ist weniger stark konserviert und oft durch einen Alanin- oder Serinrest an dieser Position substituiert [152]. Diese aufgeführten Gegebenheiten deuten auf die Ähnlichkeit der Funktionalität der Motive GxxxG und [klein]xxx[klein] hin. Ein weiteres Beispiel für das Vorkommen des [klein]xxx[klein]-Motivs in transmembranen Helices ist das ErbB1/ErbB2-Heterodimer. Die transmembranen Domänen weisen die [klein]xxx[klein]-artigen Sequenzen  $G^{649}xxxA^{653}$  und  $S^{656}xxxG^{660}$  auf, deren Reste mit Seitenketten der jeweils gegenüberliegenden Helix in engem Van der Waals-Kontakt stehen [151].

Die hier präsentierten Ergebnisse stehen im Einklang mit den oben aufgeführten Literaturdaten und verdeutlichen, dass das [klein]xxx[klein]-Motiv eine ebenso wichtige

Funktion wie das GxxxG-Motiv in Bezug auf die Interaktion transmembraner Helices besitzen kann.

#### 5.4.5 Phenylalanin

Phenylalaninreste zeigen mit 29 % nach Glycinresten den zweithöchsten Grad an Überrepräsentation und weisen den dritthöchsten Anteil an den Resten der Helix-Helix-Schnittstelle auf. Die Bedeutung dieser Seitenkette zeigt sich beispielsweise auch in dessen Beitrag zur Interaktionstendenz der Transmembranhelices des Rezeptorproteins EphA2 [150] und der  $\zeta$ -Untereinheit des T-Zell-Rezeptor Komplexes [162]. Auch konnte die Relevanz dieses Aminosäurerestes für die Interaktion transmembraner Helices in Verbindung mit dem GxxxG-Motiv deutlich gemacht werden: So traten bei einem Screeningverfahren, bei dem unpolare oder nur schwach polare Reste an variablen Positionen transmembraner Helices eingesetzt wurden, Phenylalaninreste deutlich häufiger als erwartet auf. Als am bedeutendsten konnte dabei das Motiv FxxGxxxG identifiziert werden, da es sich am stärksten von seinem erwarteten Auftreten abhob [67]. Eine weitere Studie deutet darauf hin, dass Phenylalaninreste durch ihre Größe in Anwesenheit eines GxxxG-Motivs einen Beitrag zur Kommunikation zweier interagierender Helices auch noch über relativ große Distanzen hinweg leisten können [163]. In der Hälfte der Sequenzen mit GxxxG-Motiven, die durch das hier durchgeführte Screening ermittelt werden konnten (siehe Tab. 4), befindet sich auch ein Phenylalaninrest, jedoch niemals zwei oder mehr. Drei der 12 Motive zeichneten sich durch die erweiterte, dem GpA-Dimerisierungsmotiv ähnliche Sequenz LxxxGxxxG aus, in diesen Fällen trat auch niemals ein Phenylalaninrest auf. Dies bestärkt die Annahme, dass das GxxxG-Motiv generell dazu tendiert, im Kontext mit anderen Aminosäureresten aufzutreten, die eine Interaktion fördern. Auch moleküldynamische Simulationen weisen am Beispiel der Transmembrandomäne von ErbB2 auf die Bedeutung von Phenylalaninresten für die Dimerisierung transmembraner Helices im Zusammenhang mit dem GxxxG-Motiv hin [164]. So lässt die Simulation vermuten, dass sich die Phenylalaninseitenketten zunächst an der Kontaktfläche der beiden Helices befinden, dann aber durch eine Drehbewegung der Helices zum äußeren Milieu hin orientieren, was in einer höheren Packungsdichte der Helices resultiert. In einem anderen Ansatz, der ebenfalls auf computergestützten Berechnungen basiert, konnte die Bedeutung von Phenylalaninresten in Verbindung mit dem *knobs into holes*-Prinzip verdeutlicht werden: Die große Seitenkette hatte von den 20

untersuchten Resten die stärkste Tendenz, sich in Vertiefungen, die aus Resten einer gegenüberliegenden Helix geformt werden, zu befinden und somit zur Maximierung der Van der Waals-Kontaktfläche beizutragen [165]. Interaktionen, die aus Wechselwirkungen von  $\pi$ -Elektronensystemen entstehen, können ebenfalls von Bedeutung sein [66-68]. Dies konnte für die Phenylalaninreste des ErbB3-Homodimers gezeigt werden [166]. Auch Interaktionen zwischen dem  $\pi$ -Elektronensystemen von Phenylalaninresten und kationischen Seitenketten sind denkbar [66, 69]. Im Rahmen dieser Arbeit kommen für diese Art der Interaktion einzig Argininseitenketten in Frage (dazu siehe auch Abschnitt 5.5).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Phenylalaninreste häufig in transmembranen Domänen auftreten und dem Aminosäurerest eine wesentliche Rolle bei interhelicalen Interaktionen zukommt. Die Möglichkeiten, mit denen dieser Rest zu einer Interaktion beitragen kann, sind im Vergleich zu anderen, kürzeren Seitenketten überaus vielseitig.

#### 5.4.6 Arginin

Argininreste liegen insgesamt weder unter- noch überrepräsentiert vor. Dieses Ergebnis bedarf jedoch einer genaueren Betrachtung, da die Über- und Unterrepräsentation an den einzelnen Positionen der Helices stark abweicht. Während der Rest an den meisten Positionen stark unterrepräsentiert ist, zeigt sich als Ausnahme dessen auf der pLT25-codierten Helix an den Positionen 9, 10 und 13 eine beachtliche Überrepräsentation um etwa 100 %, 200 % und 300 %.

Die Erwartungen sprechen gegen ein hohes Vorkommen der geladenen Seitenketten von Arginin im Inneren der Membran, wie Analysen von transmembranen Domänen belegen [73, 157, 158, 167]. Auch weist der Rest in einer der oben bereits erwähnten Studien [165], die Strukturdaten von 14 membranständigen Proteinen einbezieht, die geringste Tendenz aller 20 Aminosäuren zur Ausbildung interhelicaler Kontakte auf. Grundsätzlich konnte eine Interaktion von kationischen Aminosäureresten mit den anionischen Kopfgruppen der Lipiddoppelschicht bereits vielfach für periphere Membranproteine [168, 169] oder auch für juxtamembrane Domänen von membranständigen Proteinen [170] gezeigt werden. Da das Einbringen eines kationischen Restes in die Region des unpolaren Kerns der Membran energetisch ungünstig ist, tendieren die langen Seitenketten dieser Reste als Bestandteil

transmembraner Helices dazu, sich in Richtung der polaren Grenzregion zu orientieren. Dieser Effekt wird als *snorkeling* bezeichnet [171]. In diesem Zusammenhang wurde ein möglicher Mechanismus postuliert, bei dem der kationische Argininrest mit den anionischen Kopfgruppen sowie Wassermolekülen, welche in dieser Umgebung vorhanden sein können, in Interaktion tritt. Dies soll die Positionierung des Restes stabilisieren und infolge dessen werden die Lipidkopfgruppen zum Inneren der Membran hin gezogen, was letztendlich sogar in einer Deformierung der Lipiddoppelschicht resultieren könnte [172, 173]. Bezogen auf die hier vorgefundene Situation ist die Ursache des häufigen Auftretens der Argininreste nahe dem Periplasma unklar, zumal nur eine der beiden Helixvarianten diese Charakteristik zeigt. Denkbar wäre, dass eine Interaktion des Argininrestes mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Membran stattfindet. Eine relativ starke Interaktion, verursacht durch die ionische Bindung, könnte einen stabilisierenden Einfluss auf das Fusionsprotein in der Membran haben, was sich wiederum verstärkend auf die Interaktionstendenz der beiden Transmembranhelices auswirken könnte. Auch kann in Betracht gezogen werden, dass Wechselwirkungen des  $\pi$ -Ringsystems der Phenylalaninreste mit der kationischen Argininseitenkette zu einer Verstärkung der Interaktionstendenzen beigetragen haben. Diese Vermutung wird von der Darstellung der Ergebnisse unterstützt, welche Paare von Resten zeigt, die häufig in geringer Entfernung zueinander auftreten. Dies wird im Abschnitt 5.5 diskutiert.

Insgesamt zeigen Argininreste einen eher als gering einzuschätzenden Beitrag zu interhelicalen Kontakten von Transmembranhelices, wie auch durch das geringe Vorkommen des Restes an den meisten Positionen der Helices zu erkennen ist. Lediglich durch die mögliche Interaktion mit den Kopfgruppen der Lipide oder mit Phenylalanin-Seitenketten kommt diesem Rest eine Bedeutung zu.

#### 5.4.7 Cystein

Cysteinreste zeigen eine Überrepräsentation von 12 % und sind die vierthäufigsten Aminosäurereste an den randomisierten Positionen der transmembranen Helices. Die Daten der im vorherigen Abschnitt bereits genannten Arbeiten zu diesem Aminosäurerest sind kontrovers. So kommt er einerseits nur selten in transmembranen Domänen vor [73, 158], andererseits wird ihm trotz seines geringen Vorkommens eine nicht unbedeutende Rolle zugeschrieben [157]. In einer Studie wurden Transmembrandomänen von in



Chordaten vorkommenden Proteinen bezüglich der Konservierung von Aminosäureresten an den Helix-Helix-Kontaktflächen untersucht. Cysteinreste liegen hier häufig konserviert vor und es konnte ein Zusammenhang zwischen unilateraler Konservierung der Helices und Interaktion der Reste gefunden werden [174]. Bei einer kombinierten Untersuchung der Strukturen von Bacteriorhodopsin, der Cytochrom-c-Oxidase, des photosynthetischen Reaktionszentrums von *Rhodobacter sphaeroides* und dem Kaliumkanal aus *Streptomyces lividans* wurde die Bedeutung von Cysteinresten an der Kontaktfläche interagierender Helices dargelegt, auch wenn dies von den Autoren nicht in den Vordergrund gestellt wurde [175]. So trat der Rest nur relativ selten auf, hatte jedoch in diesen wenigen Fällen die klare Präferenz, an der Helix-Helix-Kontaktfläche vorzuliegen. Die Bedeutung von Cysteinseitenketten neben Glycin-, Alanin- und Serinresten für eine hohe Packungsdichte an der Kontaktfläche konnte auch an anderer Stelle verdeutlicht werden [176]. Es kann gefolgert werden, dass Cysteinreste nur selten in einer transmembranen Domäne auftreten, jedoch in diesen Fällen mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit an einer Interaktion beteiligt sind. Dies steht im Gegensatz zu den für Alaninseitenketten beobachteten Gegebenheiten, die durch ein häufiges Auftreten des Restes in Transmembranhelices und einer im Gegensatz dazu eher moderaten Beteiligung an Interaktionen gekennzeichnet sind.

#### 5.4.8 Prolin

Prolinreste weisen insgesamt die stärkste Unterrepräsentation auf und zeigen den geringsten Anteil aller Seitenketten an den variablen Positionen. Es ist bekannt, dass das Vorkommen dieses Restes in der Mitte einer  $\alpha$ -Helix die helicale Struktur destabilisieren kann [177] und dabei eine Flexion der Helix hervorruft. Speziell in transmembranen Helices kann dies zu ungünstigen Voraussetzungen für eine Helix-Helix-Interaktion führen [178], was auch experimentell bestätigt werden konnte [179]. Diese Prolin-spezifische Eigenschaft könnte eine Ursache für die hier auftretende, starke Unterrepräsentation des Restes darstellen. Jedoch treten auch Fälle auf, bei denen ein Prolinrest in einer helicalen Struktur innerhalb des Milieus der Membran vorkommt: Beispielsweise zeigt die Struktur der Cytochrom-c-Oxidase eine Transmembranhelix, deren Verlauf in der Membran durch eine Flexion gekennzeichnet ist, welche der Anwesenheit eines Prolinrestes geschuldet ist. Hierbei ist dieser Rest relativ zentral in der Helixmitte bzw. der Mitte der Membran lokalisiert [40]. Auch das Einbringen eines Prolinrestes oder der Austausch durch einen alternativen Rest kann deutliche Auswirkungen auf Struktur oder Funktion einer

Transmembranhelix und damit auf das gesamte Protein haben. Es wurde jedoch auch in mehreren Fällen beobachtet, dass eine Funktion ungeachtet einer solchen Mutationen erhalten bleibt [147]. Letztendlich zeigen die hier präsentierten Ergebnisse zwar eine starke Unterrepräsentation von Prolinseitenketten, jedoch kommt der Rest immerhin an 4,5 % aller Positionen vor, was belegt, dass durch dessen Auftreten an der Kontaktfläche transmembraner Helices Interaktionen nicht gänzlich ausgeschlossen werden können. Interessanterweise zeigen Prolinreste nur an einer einzigen Position einer Helix eine Überrepräsentation, während der Rest an allen anderen Positionen meist stark unterrepräsentiert vorkommt. Prolinreste weisen an dieser zentral gelegenen Position 6 einen Gesamtanteil von 10 % aller Reste auf. So könnte eine Flexion, die durch den Rest in dieser Position verursacht wird, eine Interaktion begünstigen, indem sich die Helix durch ihre Krümmung der geraden Form der gegenüberliegenden Helix anpasst, sich bogenförmig um diese herum anlagert und so zu einer Vergrößerung der Van der Waals-Kontaktfläche oder der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen beiträgt.

Die Bedeutung des Vorkommens von Prolinresten liegt somit vermutlich in ihrem Einfluss auf die  $\alpha$ -helicale Sekundärstruktur. Die Anwesenheit der Seitenkette kann eine Interaktion oder eventuell auch Faltungsvorgänge transmembraner Proteine begünstigen, dies scheint jedoch eine relativ seltene Gegebenheit darzustellen.

#### **5.4.9 Valin, Isoleucin und Leucin**

Valin-, Isoleucin- und Leucinreste sind um -5 %, -13 % und -27 % unterrepräsentiert, was im Gegensatz zum generell häufigen Auftreten dieser Reste in Transmembrandomänen steht [73]. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass diese Reste, aufgrund ihrer Unterrepräsentation, für die Interaktion rechtshändiger Helix-Helix-Paare keine wichtige Rolle einnehmen. Die drei Seitenketten haben einen unpolaren Charakter, wodurch sie prinzipiell eine gute Eignung aufweisen, im Milieu der Lipidmembran, abgewandt von der Helix-Helix-Kontaktfläche, vorzuliegen. Die relativ große molekulare Oberfläche dieser Seitenketten, die zur Erzeugung einer großen der Van der Waals-Kontaktfläche beitragen kann, sowie deren Flexibilität sind prinzipiell gute Voraussetzungen, um einen Beitrag zu Helix-Helix-Interaktionen zu leisten [115]. So konnte gezeigt werden, dass ein Leucin-Oligomer eine Transmembranhelix darstellen kann, die sogar eine geringe Interaktionstendenz aufweist. Die Interaktionstendenz kann durch das Ersetzen eines

Leucinrestes durch einen Asparaginrest sogar noch wesentlich verstärkt werden [180]. Des Weiteren wurde das Motiv des *leucine-zippers* als relevant in Zusammenhang mit der Interaktion von transmembranen, linkshändigen Helix-Helix-Paaren beschrieben [78, 181]. Die Bedeutung aller drei verzweigt-kettigen Aminosäurereste zeigt sich beispielsweise durch ihr Vorkommen im GpA-Interaktionsmotiv LxxGVxxGVxxT, sowie im häufigen Auftreten in Verbindung mit dem [klein]xxx[klein]-Motiv, in dessen unmittelbarer Nähe die Anwesenheit der drei Reste als gehäuft beschrieben wurde [73]. So konnte auch im Zuge dieser Arbeit das aus dem GpA-Interaktionsmotiv abgeleitete Motiv LxxxGxxxG in drei Fällen gefunden werden. Jedoch trat das Motiv, im Gegensatz zum Homodimer GpA, immer nur auf einer der beiden Helices auf. Das LxxxGxxxG-Motiv kommt auch in Transmembrandomänen der GPCR-Familie vor [182]. Trotz dieser Erkenntnisse scheint der Beitrag von Leucin zu Interaktionen transmembraner Helices, unter den hier gegebenen Voraussetzungen, eher von geringer Bedeutung.

Die im Zuge dieses Screeningverfahrens eingesetzte Transmembranhelix stellt prinzipiell eine Oligo-Leucinhelix dar. Die Reste dieser Helix, die Bestandteil der mutmaßlichen Helix-Helix-Kontaktfläche sind, wurden durch andere, zufällig auftretende Reste ersetzt. Es ist nicht auszuschließen, dass die Leucinreste an den nicht randomisierten Positionen in manchen Fällen zu interhelicalen Wechselwirkungen beitragen, indem sie durch ihr hochfrequentes Vorkommen in Kontakt mit den randomisierten Seitenketten der gegenüberliegenden Helix treten. Auch können sich nicht-randomisierte Leucinreste mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Nähe eines [klein]xxx[klein]-Motivs befinden und so stabilisierend auf ein Helix-Helix-Dimer wirken, wie es beim LxxxGxxxG- oder, im weiteren Sinne, beim FxxGxxxG [67] -Motiv der Fall ist. Diese Gegebenheiten könnten zu einer Verzerrung der Statistik in Bezug auf Leucin- und eventuell auch auf Valin- und Isoleucinreste führen und deren Unterrepräsentation erklären. Diese möglicherweise auftretende Problematik des Versuchsaufbaus wurde bereits diskutiert [115].

#### 5.4.10 Threonin

Die polaren Threoninreste liegen mit -7 % leicht unterrepräsentiert vor. Ein Beitrag dieser Seitenketten zu Interaktionen transmembraner Helices konnte durch die bereits erwähnten Serin- und Threoninreste enthaltenden Interaktionsmotive gezeigt werden [82]. Nach Gimpelev *et al.* [158] treten Threoninreste mit einem Anteil von etwa 6 % an der

Kontaktfläche zweier interagierender, transmembraner Helices auf. Unter Berücksichtigung, dass vier der 61 für Aminosäuren codierende Basentriplets für Threoninreste codieren, ergibt sich für das zufällige Auftreten des Restes ein ähnlich hoher Wert von 6,6 %. Dies stimmt mit der in dieser Arbeit gemachten Beobachtung überein, da das Vorkommen des Restes an der Helix-Helix-Kontaktfläche sich mit einem Anteil von 8 % ebenfalls an den Wert eines zufälligen Auftretens ( $8,3\%$ ) annähert.

Für Threoninreste ergibt sich insgesamt ein stimmiges Bild: Die Reste können zu Interaktionen von  $\alpha$ -helicalen Elementen in der Membran beitragen, jedoch ist ihr Auftreten in transmembranen Domänen nicht mit großer Häufigkeit zu erwarten, was sich in den polaren Eigenschaften der Seitenkette begründen dürfte.

#### 5.4.11 Resümee

Eine zusammenfassende Betrachtung des Abschnitts 5.4 lässt den Schluss zu, dass polare Seitenketten prinzipiell von großer Bedeutung für Helix-Helix-Interaktionen in der Membran sind. Hierbei heben sich Threoninseitenketten, anders als Serin- und Cysteinreste, jedoch nicht hervor. Unpolare Phenylalaninreste spielen im Kontext interhelicaler Wechselwirkungen durch ihre vielfältigen Möglichkeiten zur Verstärkung einer Interaktionstendenz beizutragen eine überaus wichtige Rolle. Alaninreste treten häufiger als erwartet auf. Dies könnte sich jedoch auch darin begründen, dass dieser Rest an den randomisierten Positionen aufgrund seiner unpolaren Eigenschaft und geringen Größe auch ohne Van der Waals-Kontakt zu Seitenketten der proximalen Helix vorkommt. Argininreste könnten sowohl eine besondere Rolle durch die Interaktion mit Phenylalaninresten einnehmen, als auch eine Stabilisierung des Membranproteins durch die Interaktion mit den geladenen Kopfgruppen der Lipide bewirken. Prolinreste können durch den Einfluss auf die Sekundärstruktur einer transmembranen  $\alpha$ -Helix eine Interaktion begünstigen, im Allgemeinen kommen Prolinreste in einer solchen Struktur aber unterrepräsentiert vor. Glycinreste weisen die stärkste Überrepräsentation aller untersuchten Seitenketten auf und tragen in Form des GxxxG-Motivs durch ihre geringe Größe zu einem engen Helix-Helix-Kontakt mit hoher Packungsdichte bei. Die Motive GxxxG und [klein]xxx[klein] zeichnen sich durch ihre Bedeutsamkeit in Bezug auf Wechselwirkungen transmembraner Helices aus, auch wenn ihre Präsenz nicht unbedingt

maßgeblich für die Stärke der Interaktion ist, wie die Ergebnisse in Bezug auf die Interaktionsmessungen zu GlpF andeuten.

### 5.5 Aminosäurereste an der Helix-Helix-Kontaktfläche in geringer Entfernung

Im Rahmen der Auswertung der erhaltenen Sequenzen wurde weiterhin untersucht, welche Reste an der Helix-Helix-Kontaktfläche häufig in geringer räumlicher Entfernung zueinander auftraten. Dies sollte mögliche, häufig vorkommende Wechselwirkungen zwischen bestimmten Resten auf interhelicaler Ebene aufdecken. Zu diesem Zweck wurden die als in geringer Entfernung betrachteten Reste als Paare zusammengefasst und diese wiederum gezählt (siehe auch Abb. 25).

Abgesehen von Paaren, die zwei gleiche Aminosäurereste beinhalten, kann jede Paarung in zwei Varianten vorkommen. Die zweite Variante beinhaltet die gleichen Reste wie die erste, jedoch liegen die Reste bezüglich ihrer Positionen auf den Helices vertauscht vor (siehe auch Abb. 26). Hierzu sei das Beispiel des bereits oben erwähnten Paares Phenylalanin und Arginin angeführt. In einer Variante ist der Phenylalaninrest in der Helix lokalisiert, die von dem Plasmid pLT25Lib codiert wird, der Argininrest befindet sich in der pALT18iiLib-codierten Helix. In der zweiten Variante wird der Phenylalaninrest von pALT18iiLib codiert, der Argininrest hingegen von pLT25Lib. Um diese beiden Varianten voneinander zu unterscheiden, sei im Folgenden der erstgenannte Rest eines Paares der vom Plasmid pALT18iiLib codierte, der zweitgenannte Rest sei pLT25Lib-codiert. Bei der erwähnten Paarung stellt sich ein gravierender Unterschied in den Häufigkeiten beider Varianten dar: Während die Variante Phenylalanin/Arginin an zweiter Stelle der am stärksten überrepräsentierten Varianten steht (siehe Abb. 26), ist die Variante Arginin/Phenylalanin deutlich unterrepräsentiert. In Tab. 6 sind die 10 bedeutendsten Paare unter Berücksichtigung des Aspekts abweichender Werte der Überrepräsentation der verschiedenen Varianten gezeigt. Es erfolgte eine Sortierung nach dem – falls vorhanden – Mittel der beiden Werte der Überrepräsentation. So zeigt sich die Paarung aus zwei Glycinresten deutlich an erster Stelle, gefolgt von der Paarung Glycin/Cystein bzw. Cystein/Glycin an zweiter und dem Paar Phenylalanin/Phenylalanin an dritter Stelle.

Die Paarung Glycin/Glycin zeigt von allen möglichen Paaren die stärkste Überrepräsentation. Wie bereits dargelegt, können Glycinreste durch ihre geringe Größe

**Tab. 6: Die 10 bedeutendsten Paare von Aminosäureresten in geringer Entfernung.** Jedes Paar besitzt ein zugehöriges Gegenstück, bei dem die Reste in Bezug auf die Helices vertauscht sind. Der erstgenannte Rest wird stets von dem Plasmid pALT18iiLib codiert, der Zweite von pLT25Lib. Die Paare sind hier nach dem Mittel der Überrepräsentation beider Varianten geordnet. Im Falle gleicher Reste (Glycin/Glycin und Phenylalanin/Phenylalanin) existiert keine zweite Variante, daher wurde der Wert der Überrepräsentation direkt übernommen und nach diesem geordnet. Als am bedeutendsten wurde das Paar mit dem höchsten Mittel der Überrepräsentation gewertet. Rot hinterlegte Werte weisen auf eine Überrepräsentation hin, blau hinterlegte auf eine Unterrepräsentation.

Paarung	Überrepräsentation	Paarung	Überrepräsentation	Überrepräsentation Mittel
GG	182%			182%
GC	104%	CG	90%	97%
FF	90%			90%
GF	48%	FG	111%	79%
GI	27%	IG	97%	62%
GA	20%	AG	97%	58%
GV	34%	VG	83%	58%
FR	146%	RF	-30%	58%
CA	76%	AC	13%	44%
SF	37%	FS	48%	43%

dazu beitragen, dass zwei  $\alpha$ -Helices an ihrem Drehpunkt einen geringen Abstand zueinander besitzen. Dies führt wiederum zur Maximierung der Van der Waals-Kontaktfläche, sowie mit höherer Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken und so zu verstärkten Helix-Helix-Interaktionen. Die Überrepräsentation dieses Paares deutet darauf hin, dass nicht nur Glycinreste, die in Form des GxxxG-Motivs vorliegen, eine Annäherung zweier Helices fördern, vielmehr können auch einzelne Glycinreste, die sich in gegenüberliegender Position auf zwei Helices befinden, diesen Effekt hervorrufen. Es bedarf also in diesem Sinne nicht unbedingt, wie im Fall des GpA-Homodimers, zweier GxxxG-Motive als Rahmenbedingung für eine Interaktion. Die Anwesenheit eines Glycinrests pro Helix an Schlüsselpositionen könnte schon eine ähnliche, wenn auch vermutlich nicht ganz so stark ausgeprägte Wirkung haben. Diese Annahme wird auch durch die Studie von Eilers *et al.* [183] gestützt, in der eine vergleichbare Beobachtung in Bezug auf Glycin gemacht werden konnte. Hier dienten die Strukturdaten von 11 transmembranen Proteinen als Basis, um die interhelicalen Interaktionen der einzelnen Seitenketten an den Kontaktflächen der Helices zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass die Paarung Glycin und Glycin am häufigsten von

allen Paarungen auftrat. Dies ist auch insofern bemerkenswert, als dass Glycin die kürzeste aller Seitenketten der proteinogenen Aminosäuren aufweist und daher ein interhelicaler Kontakt dieser beiden Reste nur bei sehr geringer Distanz der Helices zueinander auftreten kann. Dies unterstreicht die potenzielle Bedeutung dieser Paarung in Bezug auf die geschilderte Situation.

Auch die Paarungen, die neben Glycin- auch Phenylalaninreste (vierte Stelle der bedeutendsten Paarungen) oder Alaninreste (sechste Stelle) enthielten, waren in der Studie von Eilers *et al.*, sowie auch in den hier gezeigten Ergebnissen häufig vorhanden. Dies trifft ebenfalls auf die Paarungen von Glycin und Valin zu, welche an siebter Stelle der bedeutendsten Paarungen stehen. Jedoch ist hierbei die generelle Unterrepräsentation von Valinresten im Ergebnisrahmen des Screeningprozesses anzumerken, was die Überrepräsentation dieser Paarungen zusätzlich bedeutender erscheinen lässt. Die Relevanz der Interaktion von Glycin- und Valinresten konnte auch im Zusammenhang mit dem GpA-Dimer gezeigt werden, bei dem diese Reste in Van der Waals-Kontakt stehen [57, 86]. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Überrepräsentation der Glycinrestenthaltenden Paare auch in Verbindung mit der generellen Überrepräsentation dieses Restes steht. In der ebenfalls auf Strukturdaten beruhenden Studie von Adamian *et al.* [165] konnte die wichtige Rolle von Cysteinresten in Zusammenhang mit Helix-Helix-Interaktionen deutlich gemacht werden. Obwohl die Arbeit nicht in allen Aspekten mit den hier gefundenen Ergebnissen übereinstimmt, konnten häufige Interaktionen von Cysteinresten mit Glycin-, Phenylalanin-, Alanin- und Serinresten gezeigt werden, wobei es sich hierbei um Paare handelt, die sich auch in dieser Arbeit ausschließlich überrepräsentiert darstellen. Durch eine weitere Studie, in der interhelicale Kontakte transmembraner Helices untersucht wurden, wurde die Bedeutung von Alaninresten, wie sie auch im Zuge dieser Arbeit gefunden wurde, teilweise bestätigt. Der Aminosäurerest zeigte in dieser Veröffentlichung eine Tendenz zur Interaktion mit Phenylalanin-, Valin- und auch Alaninseitenketten anderer Transmembranhelices [184]. Des Weiteren zeigte sich eine häufige Interaktion von Phenylalaninresten auf interhelicaler Ebene, was die Bedeutsamkeit von Interaktionen der  $\pi$ -Elektronensysteme dieser Seitenketten nochmals verdeutlicht. Ferner wurde der Kontakt zwischen zwei Leucinseitenketten als besonders häufig beschrieben, was durch die hier dargestellten Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden konnte.

Eine bemerkenswerte Situation ergibt sich für die Paarung aus zwei Threoninresten sowie für eine Variante des Paares Isoleucin und Leucin. Obwohl diese Reste insgesamt unterrepräsentiert vorliegen, zeigt sich in diesen Fällen eine Überrepräsentation der Paarung bzw. der Variante (siehe Abb. 26). Dies spricht für die Bedeutung von Wechselwirkungen dieser Seitenketten in Zusammenhang mit Helix-Helix-Interaktionen.

Insgesamt betrachtet zeigt die Auswertung, dass Glycinreste, die sich in kurzer Entfernung zueinander befinden, von großer Bedeutung für Helix-Helix-Interaktionen sind, auch wenn sie nicht in Form des Motivs GxxxG oder [klein]xxx[klein] vorliegen. Hierbei scheint nicht eine Verstärkung der Interaktionstendenz durch den Kontakt der Reste wichtig zu sein; vielmehr ist ein geringer Abstand zweier Helices zueinander in Anwesenheit der Reste an bestimmten Schlüsselpositionen für eine Interaktion durch interhelicale Van der Waals-Kontakte anderer Seitenketten relevant. Auch die interhelicale Interaktion von zwei Phenylalaninresten nimmt einen sehr hohen Stellenwert ein, wie die Darstellung der Ergebnisse belegt. Interhelicale Kontakte diverser Seitenketten mit Glycin können aufgrund des häufigen Vorkommens der entsprechenden Paarungen als bedeutsam eingestuft werden, besonders der Kontakt von Glycin- und Cysteinresten.

## 5.6 Aussagekraft der Ergebnisse

Das hier verwendete System bietet gegenüber artifiziellen Systemen zur Detektion der Interaktion von transmembranen Helices erhebliche Vorteile. So findet die Interaktion in der wirklichkeitsnahen Umgebung einer lebendigen biologischen Membran mit all ihren sonstigen Komponenten und dynamischen Vorgängen statt, im Gegensatz zu Messungen in Modellsystemen wie Liposomen oder Micellen. Jedoch müssen auch hier Einschränkungen in Bezug auf den Grad der naturgetreuen Umgebung einer untersuchten Helix gemacht werden. Dies gilt weniger für Transmembranhelices des bakteriellen Proteins GlpF, als für die eukaryotische Transmembrandomäne GpA. Für eukaryotische Transmembranproteine stellt die bakterielle Membran ein Milieu dar, das sich in Lipid- und Proteinzusammensetzung, sowie auch in anderen Gegebenheiten, von ihrer natürlichen Umgebung unterscheidet. Die Lipidkomposition kann neben ihren generellen Eigenschaften in Bezug auf das Milieu der Membran auch für Lipid-Proteininteraktionen von Bedeutung sein [185]. Des Weiteren wurde die DNS-Bibliothek für die Suche nach rechtshändigen Helix-Helix-Paaren optimiert. Somit beziehen sich die gewonnenen



Ergebnisse auf diese Gegebenheit. Darüber hinaus zeigen sich Unterschiede in der Verteilung von Aminosäureresten in polytopischen und bitopischen Transmembranproteinen [167], auf diese Unterschiede kann mit Hilfe des Systems in der hier genutzten Form nicht eingegangen werden.

Abgesehen von diesen Einschränkungen bieten die Ergebnisse, die mit Hilfe dieses Systems gewonnen wurden, die Basis für verlässliche Aussagen. Dies wird bestätigt durch die vielzitierte Anwendung von ähnlich aufgebauten Systemen, die in der Diskussion dieser Arbeit durch Literaturangaben belegt ist.

## **5.7 Fazit und Ausblick**

Durch die hier erbrachten Ergebnisse konnte eine grundlegende Charakterisierung von transmembranen rechtshändigen heterotypisch interagierenden Helix-Helix-Paaren erfolgen. Es wurde hierbei der Fokus auf die Beschaffenheit der Helix-Helix-Kontaktfläche gelegt. Bisher konnten in vergleichbaren Studien nur die Eigenschaften homotypisch interagierender Transmembranhelices untersucht werden. Diese Arbeit bietet durch die Untersuchung heterotypischer Helix-Helix-Paare im Vergleich zu den anderen Studien eine erweiterte Perspektive auf die Thematik. Etwa die Hälfte der Transmembranproteine, die vom menschlichen Genom codiert werden, sind polytopisch [35] und beinhalten daher potenziell heterotypisch interagierende Transmembranhelices. Für solche Proteine sind Interaktionen dieser Helices bei Faltvorgängen und auch bei möglichen Interaktionen zwischen monomeren Formen bei einer Oligomerformation wie beispielsweise im Fall des GlpF von Bedeutung. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, grundlegende Prinzipien, die diesen Vorgängen zugrunde liegen, besser zu verstehen, in dem sie zeigen, welche Eigenschaften transmembrane Helices, die interhelicale Kontakte eingehen, aufweisen.

Um weitere Erkenntnisse über interagierende Membranproteine zu erlangen, kann in einer zukünftigen Studie unter der Verwendung einer modifizierten DNS-Bibliothek die Untersuchung antiparalleler Helix-Helix-Paare erfolgen. Dadurch können Gemeinsamkeiten oder Unterschiede zu den hier gezeigten Ergebnissen festgestellt werden. Auch sind Studien zu linkshändigen Helix-Helix-Paaren denkbar. Das hier vorgestellte Reportersystem eignet sich bestens für die Durchführung solcher

Untersuchungen. Die Erkenntnisse, die dadurch gewonnen werden können, würden die hier gezeigten Ergebnisse sinnvoll ergänzen. Auch bietet sich das Reportersystem an, um weitere Untersuchungen am Glyceroltransporter GlpF durchzuführen. Es ist von Interesse, den Mechanismus der Oligomerisierung von GlpF Monomeren aufzuklären. Mit dem Reportersystem können transmembrane Helices dieses Proteins – auch in antiparalleler Orientierung zueinander – diesbezüglich untersucht werden.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

### 6.1 Abkürzungen, generell

Abkürzung	Bedeutung
μ	Mikro-
1x, 5x, 10x, 50x, 100x	ein-, fünf-, zehn-, fünfzig- und hundertfach
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Anz.	Anzahl
ATP	Adenosinriphosphat
<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAP	Katabolit-Aktivator-Protein
Cm	Chloramphenicol
CyaA	Adenylatcyclase
d. h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosinriphosphat
dCTP	Desoxycytidinriphosphat
dGTP	Desoxyguanosinriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidriphosphat
dTTP	Desoxytymidinriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere

Abkürzung	Bedeutung
g	Gramm
GET	<i>guided entry of tail-anchored proteins</i>
ggf.	gegebenenfalls
GlpF	<i>Escherichia coli glycerol facilitator</i>
GpA	humanes Glycophorin A
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo-
kbp	Kilobasenpaar(e)
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
m	Milli-
MBP	Maltose-bindendes Protein
MCS	multiple Klonierungsstelle ( <i>multiple cloning site</i> )
min	Minute
mögl.	mögliche
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
n	Nano-
NEB-Puffer	Puffer des Herstellers New England Biolabs
NMR	Kernspinresonanz ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
OD	optische Dichte
OmpF	<i>Outer membrane protein F</i>
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Ori	Replikationsursprung ( <i>origin of replication</i> )
p	Piko-
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )

Abkürzung	Bedeutung
PEG	Polyethylenglycol
Rop	Regulatorprotein Rop ( <i>repressor of primer</i> )
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SRP	<i>signal recognition particle</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Soja-Pepton-Medium ( <i>Tryptic Soy Broth</i> )
U	katalytische Einheit ( <i>Units</i> ), 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen/Volumen ( <i>volume/volume</i> )
w/v	Masse/Volumen ( <i>weight/volume</i> )
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
$\beta$ -Gal-Units	$\beta$ -Galactosidase-Einheiten

## 6.2 Abkürzungen DNS-Basen

Base	IUPAC Nucleotid Code
Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T
C oder G oder T	B
C oder G oder T oder A	N

**6.3 Aminosäuren (Abkürzung, Ein-Buchstaben-Code)**

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

## 7 Literatur

1. GORTER, E. & GREDEL, F. (1925) On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood, *J Exp Med*, 41, 439-43.
2. VON HEIJNE, G. (2007) The membrane protein universe: what's out there and why bother?, *J Intern Med*, 261, 543-57.
3. WHITE, S. H., LADOKHIN, A. S., JAYASINGHE, S. & HRISTOVA, K. (2001) How membranes shape protein structure, *J Biol Chem*, 276, 32395-8.
4. VAN MEER, G., VOELKER, D. R. & FEIGENSON, G. W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 112-24.
5. ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., UND WALTER P. (2007) Molecular Biology of the Cell, *Garland Science, Taylor & Francis Ltd., New York*, 5th Revised edition.
6. GARRETT, T. A., RAETZ, C. R., RICHARDSON, T., KORDESTANI, R., SON, J. D. & ROSE, R. L. (2009) Identification of phosphatidylserylglutamate: a novel minor lipid in *Escherichia coli*, *J Lipid Res*, 50, 1589-99.
7. DEVAUX, P. F., HERRMANN, A., OHLWEIN, N. & KOZIOV, M. M. (2008) How lipid flippases can modulate membrane structure, *Bba-Biomembranes*, 1778, 1591-1600.
8. MULLER, D. J., WU, N. & PALCZEWSKI, K. (2008) Vertebrate membrane proteins: structure, function, and insights from biophysical approaches, *Pharmacological reviews*, 60, 43-78.
9. GUIDOTTI, G. (1972) The composition of biological membranes, *Arch Intern Med*, 129, 194-201.
10. RISPOLI, P., CARZINO, R., SVALDO-LANERO, T., RELINI, A., CAVALLERI, O., FASANO, A., LIUZZI, G. M., CARLONE, G., RICCIO, P., GLIOZZI, A. & ROLANDI, R. (2007) A thermodynamic and structural study of myelin basic protein in lipid membrane models, *Biophys J*, 93, 1999-2010.
11. SINGER, S. J. & NICOLSON, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, 175, 720-31.
12. NICOLSON, G. L. (2014) The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years, *Biochim Biophys Acta*, 1838, 1451-66.
13. VEREB, G., SZOLLOSI, J., MATKO, J., NAGY, P., FARKAS, T., VIGH, L., MATYUS, L., WALDMANN, T. A. & DAMJANOVICH, S. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8053-8.

14. ENGELMAN, D. M. (2005) Membranes are more mosaic than fluid, *Nature*, 438, 578-80.
15. EDIDIN, M., ZUNIGA, M. C. & SHEETZ, M. P. (1994) Truncation mutants define and locate cytoplasmic barriers to lateral mobility of membrane glycoproteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 3378-82.
16. SONNINO, S. & PRINETTI, A. (2013) Membrane Domains and the "Lipid Raft" Concept, *Current Medicinal Chemistry*, 20, 4-21.
17. SIMONS, K. & IKONEN, E. (1997) Functional rafts in cell membranes, *Nature*, 387, 569-72.
18. SARGIACOMO, M., SUDOL, M., TANG, Z. & LISANTI, M. P. (1993) Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells, *J Cell Biol*, 122, 789-807.
19. SANGIORGIO, V., PITTO, M., PALESTINI, P. & MASSERINI, M. (2004) GPI-anchored proteins and lipid rafts, *Ital J Biochem*, 53, 98-111.
20. HANCOCK, J. F. (2006) Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 456-62.
21. LINGWOOD, D. & SIMONS, K. (2010) Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle, *Science*, 327, 46-50.
22. FAGERBERG, L., JONASSON, K., VON HEIJNE, G., UHLEN, M. & BERGLUND, L. (2010) Prediction of the human membrane proteome, *Proteomics*, 10, 1141-9.
23. KROGH, A., LARSSON, B., VON HEIJNE, G. & SONNHAMMER, E. L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes, *J Mol Biol*, 305, 567-80.
24. YILDIRIM, M. A., GOH, K. I., CUSICK, M. E., BARABASI, A. L. & VIDAL, M. (2007) Drug-target network, *Nat Biotechnol*, 25, 1119-26.
25. KINOSHITA, T., FUJITA, M. & MAEDA, Y. (2008) Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: recent progress, *J Biochem*, 144, 287-94.
26. HENDERSON, R. & SCHERTLER, G. F. (1990) The structure of bacteriorhodopsin and its relevance to the visual opsins and other seven-helix G-protein coupled receptors, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 326, 379-89.
27. PEBAY-PEYROULA, E., NEUTZE, R. & LANDAU, E. M. (2000) Lipidic cubic phase crystallization of bacteriorhodopsin and cryotrapping of intermediates: towards resolving a revolving photocycle, *Biochim Biophys Acta*, 1460, 119-32.
28. LUECKE, H., SCHOBERT, B., RICHTER, H. T., CARTAILLER, J. P. & LANYI, J. K. (1999) Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 angstrom resolution, *Journal of Molecular Biology*, 291, 899-911.



29. PARK, J. H. & SAIER, M. H. (1996) Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins, *J Membrane Biol*, 153, 171-180.
30. NEUMANN, J., KLEIN, N., OTZEN, D. E. & SCHNEIDER, D. (2014) Folding energetics and oligomerization of polytopic alpha-helical transmembrane proteins, *Arch Biochem Biophys*.
31. FU, D., LIBSON, A., MIERCKE, L. J., WEITZMAN, C., NOLLERT, P., KRUCINSKI, J. & STROUD, R. M. (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity, *Science*, 290, 481-6.
32. CYMER, F. & SCHNEIDER, D. (2010) A single glutamate residue controls the oligomerization, function, and stability of the aquaglyceroporin GlpF, *Biochemistry*, 49, 279-86.
33. TAMM, L. K., HONG, H. & LIANG, B. (2004) Folding and assembly of beta-barrel membrane proteins, *Biochim Biophys Acta*, 1666, 250-63.
34. KATRITCH, V., CHEREZOV, V. & STEVENS, R. C. (2013) Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53, 531-56.
35. WORCH, R., BOKEL, C., HOFINGER, S., SCHWILLE, P. & WEIDEMANN, T. (2010) Focus on composition and interaction potential of single-pass transmembrane domains, *Proteomics*, 10, 4196-208.
36. SUBRAMANIAM, S. & HENDERSON, R. (2000) Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin, *Nature*, 406, 653-7.
37. YAMASHITA, E., ZHALNINA, M. V., ZAKHAROV, S. D., SHARMA, O. & CRAMER, W. A. (2008) Crystal structures of the OmpF porin: function in a colicin translocon, *EMBO J*, 27, 2171-80.
38. ENGELMAN, D. M. & STEITZ, T. A. (1981) The Spontaneous Insertion of Proteins into and across Membranes - the Helical Hairpin Hypothesis, *Fed Proc*, 40, 1557-1557.
39. POPOT, J. L. & ENGELMAN, D. M. (1990) Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model, *Biochemistry*, 29, 4031-7.
40. POPOT, J. L. & ENGELMAN, D. M. (2000) Helical membrane protein folding, stability, and evolution, *Annu Rev Biochem*, 69, 881-922.
41. TASTAN, O., KLEIN-SEETHARAMAN, J. & MEIROVITCH, H. (2009) The effect of loops on the structural organization of alpha-helical membrane proteins, *Biophys J*, 96, 2299-312.
42. WHITE, S. H. & WIMLEY, W. C. (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 28, 319-65.
43. DEGRADO, W. F., GRATKOWSKI, H. & LEAR, J. D. (2003) How do helix-helix interactions help determine the folds of membrane proteins? Perspectives from the study of homo-oligomeric helical bundles, *Protein Sci*, 12, 647-65.

44. LI, E., WIMLEY, W. C. & HRISTOVA, K. (2012) Transmembrane helix dimerization: beyond the search for sequence motifs, *Biochim Biophys Acta*, 1818, 183-93.
45. PFEFFER, S., DUDEK, J., GOGALA, M., SCHORR, S., LINXWEILER, J., LANG, S., BECKER, T., BECKMANN, R., ZIMMERMANN, R. & FORSTER, F. (2014) Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon, *Nature communications*, 5, 3072.
46. WHITE, S. H. & VON HEIJNE, G. (2008) How translocons select transmembrane helices, *Annu Rev Biophys*, 37, 23-42.
47. HEGDE, R. S. & KEENAN, R. J. (2011) Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum, *Nat Rev Mol Cell Bio*, 12, 787-798.
48. DENIC, V., DOTSCH, V. & SINNING, I. (2013) Endoplasmic reticulum targeting and insertion of tail-anchored membrane proteins by the GET pathway, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5, a013334.
49. KRUGER, V., DECKERS, M., HILDENBEUTEL, M., VAN DER LAAN, M., HELLMERS, M., DREKER, C., PREUSS, M., HERRMANN, J. M., REHLING, P., WAGNER, R. & MEINECKE, M. (2012) The mitochondrial oxidase assembly protein1 (Oxa1) insertase forms a membrane pore in lipid bilayers, *J Biol Chem*, 287, 33314-26.
50. FUNES, S., KAUFF, F., VAN DER SLUIS, E. O., OTT, M. & HERRMANN, J. M. (2011) Evolution of YidC/Oxa1/Alb3 insertases: three independent gene duplications followed by functional specialization in bacteria, mitochondria and chloroplasts, *Biological chemistry*, 392, 13-9.
51. DRIESSEN, A. J. & NOUWEN, N. (2008) Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane, *Annu Rev Biochem*, 77, 643-67.
52. SEREK, J., BAUER-MANZ, G., STRUHALLA, G., VAN DEN BERG, L., KIEFER, D., DALBEY, R. & KUHN, A. (2004) Escherichia coli YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins, *Embo Journal*, 23, 294-301.
53. FROBEL, J., ROSE, P., LAUSBERG, F., BLUMMEL, A. S., FREUDL, R. & MULLER, M. (2012) Transmembrane insertion of twin-arginine signal peptides is driven by TatC and regulated by TatB, *Nature communications*, 3, 1311.
54. FURTHMAYR, H. & MARCHESI, V. T. (1976) Subunit structure of human erythrocyte glycoporphin A, *Biochemistry*, 15, 1137-44.
55. MARTON, L. S. & GARVIN, L. E. (1973) Subunit structure of the major human erythrocytes glycoprotein: depolymerization by heating ghosts with sodium dodecyl sulfate, *Biochem Biophys Res Commun*, 52, 1457-62.
56. BORMANN, B. J., KNOWLES, W. J. & MARCHESI, V. T. (1989) Synthetic peptides mimic the assembly of transmembrane glycoproteins, *J Biol Chem*, 264, 4033-7.
57. MACKENZIE, K. R., PRESTEGARD, J. H. & ENGELMAN, D. M. (1997) A transmembrane helix dimer: structure and implications, *Science*, 276, 131-3.

58. LEMMON, M. A., FLANAGAN, J. M., TREUTLEIN, H. R., ZHANG, J. & ENGELMAN, D. M. (1992) Sequence specificity in the dimerization of transmembrane alpha-helices, *Biochemistry*, 31, 12719-25.
59. LEMMON, M. A., TREUTLEIN, H. R., ADAMS, P. D., BRUNGER, A. T. & ENGELMAN, D. M. (1994) A dimerization motif for transmembrane alpha-helices, *Nat Struct Biol*, 1, 157-63.
60. GUREZKA, R. & LANGOSCH, D. (2001) In vitro selection of membrane-spanning leucine zipper protein-protein interaction motifs using POSSYCCAT, *J Biol Chem*, 276, 45580-7.
61. LANGOSCH, D. & HERINGA, J. (1998) Interaction of transmembrane helices by a knobs-into-holes packing characteristic of soluble coiled coils, *Proteins*, 31, 150-9.
62. BOWIE, J. U. (2011) Membrane protein folding: how important are hydrogen bonds?, *Curr Opin Struct Biol*, 21, 42-49.
63. MUELLER, B. K., SUBRAMANIAM, S. & SENES, A. (2014) A frequent, GxxxG-mediated, transmembrane association motif is optimized for the formation of interhelical Calpha-H hydrogen bonds, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E888-95.
64. SENES, A., UBARRETXENA-BELANDIA, I. & ENGELMAN, D. M. (2001) The Calpha --- H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 9056-61.
65. WALTHER, T. H. & ULRICH, A. S. (2014) Transmembrane helix assembly and the role of salt bridges, *Curr Opin Struct Biol*, 27C, 63-68.
66. JOHNSON, R. M., HECHT, K. & DEBER, C. M. (2007) Aromatic and cation-pi interactions enhance helix-helix association in a membrane environment, *Biochemistry*, 46, 9208-14.
67. UNTERREITMEIER, S., FUCHS, A., SCHAFFLER, T., HEYM, R. G., FRISHMAN, D. & LANGOSCH, D. (2007) Phenylalanine promotes interaction of transmembrane domains via GxxxG motifs, *J Mol Biol*, 374, 705-18.
68. RIDDER, A., SKUPIEN, P., UNTERREITMEIER, S. & LANGOSCH, D. (2005) Tryptophan supports interaction of transmembrane helices, *J Mol Biol*, 354, 894-902.
69. GALLIVAN, J. P. & DOUGHERTY, D. A. (1999) Cation-pi interactions in structural biology, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9459-64.
70. MOORE, D. T., BERGER, B. W. & DEGRADO, W. F. (2008) Protein-protein interactions in the membrane: sequence, structural, and biological motifs, *Structure*, 16, 991-1001.
71. QIU, J. X., PETERSSON, E. J., MATTHEWS, E. E. & SCHEPARTZ, A. (2006) Toward beta-amino acid proteins: a cooperatively folded beta-peptide quaternary structure, *J Am Chem Soc*, 128, 11338-9.

72. WALTERS, R. F. & DEGRADO, W. F. (2006) Helix-packing motifs in membrane proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 13658-63.
73. SENES, A., GERSTEIN, M. & ENGELMAN, D. M. (2000) Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions, *J Mol Biol*, 296, 921-936.
74. CURRAN, A. R. & ENGELMAN, D. M. (2003) Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins, *Curr Opin Struct Biol*, 13, 412-7.
75. CYMER, F., VEERAPPAN, A. & SCHNEIDER, D. (2012) Transmembrane helix-helix interactions are modulated by the sequence context and by lipid bilayer properties, *Biochim Biophys Acta*, 1818, 963-73.
76. SCHNEIDER, D. & ENGELMAN, D. M. (2004) Motifs of two small residues can assist but are not sufficient to mediate transmembrane helix interactions, *J Mol Biol*, 343, 799-804.
77. HERRMANN, J. R., PANITZ, J. C., UNTERREITMEIER, S., FUCHS, A., FRISHMAN, D. & LANGOSCH, D. (2009) Complex patterns of histidine, hydroxylated amino acids and the GxxxG motif mediate high-affinity transmembrane domain interactions, *J Mol Biol*, 385, 912-23.
78. GUREZKA, R., LAAGE, R., BROSIG, B. & LANGOSCH, D. (1999) A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments, *J Biol Chem*, 274, 9265-70.
79. BOCHAROV, E. V., LESOVOY, D. M., GONCHARUK, S. A., GONCHARUK, M. V., HRISTOVA, K. & ARSENEV, A. S. (2013) Structure of FGFR3 transmembrane domain dimer: implications for signaling and human pathologies, *Structure*, 21, 2087-93.
80. OATES, J., KING, G. & DIXON, A. M. (2010) Strong oligomerization behavior of PDGF beta receptor transmembrane domain and its regulation by the juxtamembrane regions, *Bba-Biomembranes*, 1798, 605-615.
81. NORTH, B., CRISTIAN, L., STOWELL, X. F., LEAR, J. D., SAVEN, J. G. & DEGRADO, W. F. (2006) Characterization of a membrane protein folding motif the ser zipper, using designed peptides, *Journal of Molecular Biology*, 359, 930-939.
82. DAWSON, J. P., WEINGER, J. S. & ENGELMAN, D. M. (2002) Motifs of serine and threonine can drive association of transmembrane helices, *J Mol Biol*, 316, 799-805.
83. ZHOU, F. X., MERIANOS, H. J., BRUNGER, A. T. & ENGELMAN, D. M. (2001) Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2250-5.
84. STEINBRECHER, T., PROCK, S., REICHERT, J., WADHWANI, P., ZIMPFER, B., BURCK, J., BERDITSCH, M., ELSTNER, M. & ULRICH, A. S. (2012) Peptide-Lipid Interactions of the Stress-Response Peptide TisB That Induces Bacterial Persistence, *Biophysical Journal*, 103, 1460-1469.

85. WALTHER, T. H., GOTTSSELIG, C., GRAGE, S. L., WOLF, M., VARGIU, A. V., KLEIN, M. J., VOLLMER, S., PROCK, S., HARTMANN, M., AFONIN, S., STOCKWALD, E., HEINZMANN, H., NOLANDT, O. V., WENZEL, W., RUGGERONE, P. & ULRICH, A. S. (2013) Folding and self-assembly of the TatA translocation pore based on a charge zipper mechanism, *Cell*, 152, 316-26.
86. LEMMON, M. A., FLANAGAN, J. M., HUNT, J. F., ADAIR, B. D., BORMANN, B. J., DEMPSEY, C. E. & ENGELMAN, D. M. (1992) Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices, *J Biol Chem*, 267, 7683-9.
87. SULISTIJO, E. S., JASZEWSKI, T. M. & MACKENZIE, K. R. (2003) Sequence-specific dimerization of the transmembrane domain of the "BH3-only" protein BNIP3 in membranes and detergent, *J Biol Chem*, 278, 51950-6.
88. FLEMING, K. G., ACKERMAN, A. L. & ENGELMAN, D. M. (1997) The effect of point mutations on the free energy of transmembrane alpha-helix dimerization, *J Mol Biol*, 272, 266-75.
89. LEBOWITZ, J., LEWIS, M. S. & SCHUCK, P. (2002) Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review, *Protein Sci*, 11, 2067-79.
90. LOURA, L. M. & PRIETO, M. (2011) FRET in Membrane Biophysics: An Overview, *Frontiers in physiology*, 2, 82.
91. STANGL, M., HEMMELMANN, M., ALLMERTH, M., ZENTEL, R. & SCHNEIDER, D. (2014) A Minimal Hydrophobicity Is Needed To Employ Amphiphilic p(HPMA)-co-p(LMA) Random Copolymers in Membrane Research, *Biochemistry*, 53, 1410-1419.
92. SEKAR, R. B. & PERIASAMY, A. (2003) Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations, *J Cell Biol*, 160, 629-33.
93. CRISTIAN, L., LEAR, J. D. & DEGRADO, W. F. (2003) Determination of membrane protein stability via thermodynamic coupling of folding to thiol-disulfide interchange, *Protein Sci*, 12, 1732-40.
94. CRISTIAN, L., LEAR, J. D. & DEGRADO, W. F. (2003) Use of thiol-disulfide equilibria to measure the energetics of assembly of transmembrane helices in phospholipid bilayers, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 14772-14777.
95. LUO, B. H., SPRINGER, T. A. & TAKAGI, J. (2004) A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand, *Plos Biology*, 2, 776-786.
96. HONG, H., BLOIS, T. M., CAO, Z. & BOWIE, J. U. (2010) Method to measure strong protein-protein interactions in lipid bilayers using a steric trap, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 19802-19807.
97. LANGOSCH, D., BROSIG, B., KOLMAR, H. & FRITZ, H. J. (1996) Dimerisation of the glycophorin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator, *J Mol Biol*, 263, 525-30.

98. RUSS, W. P. & ENGELMAN, D. M. (1999) TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 863-8.
99. MILLER, V. L., TAYLOR, R. K. & MEKALANOS, J. J. (1987) Cholera toxin transcriptional activator toxR is a transmembrane DNA binding protein, *Cell*, 48, 271-9.
100. KOLMAR, H., HENNECKE, F., GOTZE, K., JANZER, B., VOGT, B., MAYER, F. & FRITZ, H. J. (1995) Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures, *EMBO J*, 14, 3895-904.
101. LINDNER, E. & LANGOSCH, D. (2006) A ToxR-based dominant-negative system to investigate heterotypic transmembrane domain interactions, *Proteins*, 65, 803-7.
102. LINDNER, E., UNTERREITMEIER, S., RIDDER, A. N. & LANGOSCH, D. (2007) An extended ToxR POSSYCCAT system for positive and negative selection of self-interacting transmembrane domains, *J Microbiol Methods*, 69, 298-305.
103. SCHNEIDER, D. & ENGELMAN, D. M. (2003) GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane, *J Biol Chem*, 278, 3105-11.
104. CYMER, F., SANDERS, C. R. & SCHNEIDER, D. (2013) Analyzing oligomerization of individual transmembrane helices and of entire membrane proteins in E. coli: A hitchhiker's guide to GALLEX, *Methods Mol Biol*, 932, 259-76.
105. KARIMOVA, G., PIDOUX, J., ULLMANN, A. & LADANT, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 5752-5756.
106. BATESTI, A. & BOUVERET, E. (2012) The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in Escherichia coli, *Methods*, 58, 325-34.
107. LADANT, D., MICHELSON, S., SARFATI, R., GILLES, A. M., PREDELEANU, R. & BARZU, O. (1989) Characterization of the Calmodulin-Binding and of the Catalytic Domains of Bordetella-Pertussis Adenylate-Cyclase, *Journal of Biological Chemistry*, 264, 4015-4020.
108. EGUCHI, Y., ITOU, J., YAMANE, M., DEMIZU, R., YAMATO, F., OKADA, A., MORI, H., KATO, A. & UTSUMI, R. (2007) B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in Escherichia coli, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 18712-7.
109. ALIX, E. & BLANC-POTARD, A. B. (2008) Peptide-assisted degradation of the Salmonella MgtC virulence factor, *EMBO J*, 27, 546-57.
110. LIPPA, A. M. & GOULIAN, M. (2009) Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide, *PLoS Genet*, 5, e1000788.

111. WITAN, J., BAUER, J., WITTIG, I., STEINMETZ, P. A., ERKER, W. & UNDEN, G. (2012) Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units, *Mol Microbiol*, 85, 846-61.
112. KARIMOVA, G., DAUTIN, N. & LADANT, D. (2005) Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis, *J Bacteriol*, 187, 2233-43.
113. FIELDS, S. & SONG, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions, *Nature*, 340, 245-6.
114. KARIMOVA, G., ROBICHON, C. & LADANT, D. (2009) Characterization of YmgF, a 72-residue inner membrane protein that associates with the *Escherichia coli* cell division machinery, *J Bacteriol*, 191, 333-46.
115. RUSS, W. P. & ENGELMAN, D. M. (2000) The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association, *J Mol Biol*, 296, 911-9.
116. TREPTOW, N. A. & SHUMAN, H. A. (1985) Genetic evidence for substrate and periplasmic-binding-protein recognition by the MalF and MalG proteins, cytoplasmic membrane components of the *Escherichia coli* maltose transport system, *J Bacteriol*, 163, 654-60.
117. KARIMOVA, G., ULLMANN, A. & LADANT, D. (2001) Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system, *J Mol Microbiol Biotechnol*, 3, 73-82.
118. CHANG, A. C. & COHEN, S. N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid, *J Bacteriol*, 134, 1141-56.
119. BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R. L., GREENE, P. J., BETLACH, M. C., HEYNEKER, H. L., BOYER, H. W., CROSA, J. H. & FALKOW, S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system, *Gene*, 2, 95-113.
120. AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL K. (1994) Short Protocols in molecular biology, *John Wiley and Sons Inc., New York, USA*.
121. BRAMAN, J., PAPWORTH, C. & GREENER, A. (1996) Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates, *Methods Mol Biol*, 57, 31-44.
122. FINGER, C., ESCHER, C. & SCHNEIDER, D. (2009) The single transmembrane domains of human receptor tyrosine kinases encode self-interactions, *Sci Signal*, 2, ra56.
123. DAVIDSON, A. L., SHUMAN, H. A. & NIKAIDO, H. (1992) Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: transmembrane signaling by periplasmic binding proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 2360-4.
124. TOME, L., STEINDORF, D. & SCHNEIDER, D. (2013) Genetic systems for monitoring interactions of transmembrane domains in bacterial membranes, *Methods Mol Biol*, 1063, 57-91.

125. DOURA, A. K. & FLEMING, K. G. (2004) Complex interactions at the helix-helix interface stabilize the glycoporphin A transmembrane dimer, *J Mol Biol*, 343, 1487-97.
126. SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
127. DE BOER, H. A., COMSTOCK, L. J. & VASSER, M. (1983) The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 21-5.
128. FLINNER, N., MIRUS, O. & SCHLEIFF, E. (2014) The influence of fatty acids on the GpA dimer interface by coarse-grained molecular dynamics simulation, *International journal of molecular sciences*, 15, 14247-68.
129. SCHLEGEL, A., BOHM, A., LEE, S. J., PEIST, R., DECKER, K. & BOOS, W. (2002) Network regulation of the Escherichia coli maltose system, *J Mol Microbiol Biotechnol*, 4, 301-7.
130. DOURA, A. K., KOBUS, F. J., DUBROVSKY, L., HIBBARD, E. & FLEMING, K. G. (2004) Sequence context modulates the stability of a GxxxG-mediated transmembrane helix-helix dimer, *J Mol Biol*, 341, 991-8.
131. LIN-CHAO, S., CHEN, W. T. & WONG, T. T. (1992) High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II, *Mol Microbiol*, 6, 3385-93.
132. RIGGS, P. (2001) Expression and purification of maltose-binding protein fusions, *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, Chapter 16, Unit 16.6.
133. BROSIUS, J. & HOLY, A. (1984) Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic lac operator, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 6929-33.
134. MEIKLEJOHN, A. L. & GRALLA, J. D. (1989) Activation of the lac promoter and its variants. Synergistic effects of catabolite activator protein and supercoiling in vitro, *J Mol Biol*, 207, 661-73.
135. GEERTSMA, E. R., GROENEVELD, M., SLOTBOOM, D. J. & POOLMAN, B. (2008) Quality control of overexpressed membrane proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 5722-7.
136. YAMAGUCHI, H. & MIYAZAKI, M. (2014) Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies, *Biomolecules*, 4, 235-51.
137. FINGER, C., VOLKMER, T., PRODOHL, A., OTZEN, D. E., ENGELMAN, D. M. & SCHNEIDER, D. (2006) The stability of transmembrane helix interactions measured in a biological membrane, *J Mol Biol*, 358, 1221-8.



138. WEI, P., LIU, X., HU, M. H., ZUO, L. M., KAI, M., WANG, R. & LUO, S. Z. (2011) The dimerization interface of the glycoprotein Ib beta transmembrane domain corresponds to polar residues within a leucine zipper motif, *Protein Science*, 20, 1814-1823.
139. SCHNEIDER, D., FINGER, C., PRODOHL, A. & VOLKMER, T. (2007) From interactions of single transmembrane helices to folding of alpha-helical membrane proteins: analyzing transmembrane helix-helix interactions in bacteria, *Curr Protein Pept Sci*, 8, 45-61.
140. FARABAUGH, P. J. (1978) Sequence of the lacI gene, *Nature*, 274, 765-9.
141. HU, J. C. & GROSS, C. A. (1988) Mutations in Rpod That Increase Expression of Genes in the Mal Regulon of Escherichia-Coli K-12, *Journal of Molecular Biology*, 203, 15-27.
142. KIM, S., JEON, T. J., OBERAI, A., YANG, D., SCHMIDT, J. J. & BOWIE, J. U. (2005) Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 14278-83.
143. KLEIN, N., NEUMANN, J., O'NEIL, J. D. & SCHNEIDER, D. (2014) Folding and stability of the aquaglyceroporin GlpF: Implications for human Aqua(glycero)porin diseases, *Biochim Biophys Acta*.
144. HE, L. J., HOFFMANN, A. R., SERRANO, C., HRISTOVA, K. & WIMLEY, W. C. (2011) High-Throughput Selection of Transmembrane Sequences That Enhance Receptor Tyrosine Kinase Activation, *Journal of Molecular Biology*, 412, 43-54.
145. NEMETH-CAHALAN, K. L., CLEMENS, D. M. & HALL, J. E. (2013) Regulation of AQP0 water permeability is enhanced by cooperativity, *The Journal of general physiology*, 141, 287-95.
146. JOH, N. H., MIN, A., FAHAM, S., WHITELEGGE, J. P., YANG, D., WOODS, V. L. & BOWIE, J. U. (2008) Modest stabilization by most hydrogen-bonded side-chain interactions in membrane proteins, *Nature*, 453, 1266-U73.
147. SENES, A., ENGEL, D. E. & DEGRADO, W. F. (2004) Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs, *Curr Opin Struct Biol*, 14, 465-79.
148. BROSIG, B. & LANGOSCH, D. (1998) The dimerization motif of the glycoprotein A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues, *Protein Sci*, 7, 1052-6.
149. WEBER, M. & SCHNEIDER, D. (2013) Six amino acids define a minimal dimerization sequence and stabilize a transmembrane helix dimer by close packing and hydrogen bonding, *FEBS Lett*, 587, 1592-6.
150. BOCHAROV, E. V., MAYZEL, M. L., VOLYNSKY, P. E., MINEEV, K. S., TKACH, E. N., ERMOLYUK, Y. S., SCHULGA, A. A., EFREMOV, R. G. & ARSENEV, A. S. (2010) Left-Handed Dimer of EphA2 Transmembrane Domain: Helix Packing Diversity among Receptor Tyrosine Kinases, *Biophysical Journal*, 98, 881-889.

151. MINEEV, K. S., BOCHAROV, E. V., PUSTOVALOVA, Y. E., BOCHAROVA, O. V., CHUPIN, V. V. & ARSENIYEV, A. S. (2010) Spatial structure of the transmembrane domain heterodimer of ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases, *J Mol Biol*, 400, 231-43.
152. LAU, T. L., KIM, C., GINSBERG, M. H. & ULMER, T. S. (2009) The structure of the integrin alphaIIb beta3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling, *EMBO J*, 28, 1351-61.
153. JIANG, S. L. & VAKSER, I. A. (2000) Side chains in transmembrane helices are shorter at helix-helix interfaces, *Proteins-Structure Function and Genetics*, 40, 429-435.
154. JIANG, S. & VAKSER, I. A. (2004) Shorter side chains optimize helix-helix packing, *Protein Sci*, 13, 1426-9.
155. ADAMIAN, L. & LIANG, J. (2002) Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: polar clamps and serine zippers, *Proteins*, 47, 209-18.
156. CHELIKANI, P., HORNAK, V., EILERS, M., REEVES, P. J., SMITH, S. O., RAJBHANDARY, U. L. & KHORANA, H. G. (2007) Role of group-conserved residues in the helical core of beta2-adrenergic receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7027-32.
157. BAEZA-DELGADO, C., MARTI-RENOM, M. A. & MINGARRO, I. (2013) Structure-based statistical analysis of transmembrane helices, *European biophysics journal : EBJ*, 42, 199-207.
158. GIMPELEV, M., FORREST, L. R., MURRAY, D. & HONIG, B. (2004) Helical packing patterns in membrane and soluble proteins, *Biophys J*, 87, 4075-86.
159. KLEIGER, G., GROTHE, R., MALLICK, P. & EISENBERG, D. (2002) GXXXG and AXXXA: common alpha-helical interaction motifs in proteins, particularly in extremophiles, *Biochemistry*, 41, 5990-7.
160. NILSSON, I., JOHNSON, A. E. & VON HEIJNE, G. (2003) How hydrophobic is alanine?, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 29389-29393.
161. BOCHAROV, E. V., VOLYNSKY, P. E., PAVLOV, K. V., EFREMOV, R. G. & ARSENIYEV, A. S. (2010) Structure elucidation of dimeric transmembrane domains of bitopic proteins, *Cell adhesion & migration*, 4, 284-98.
162. CALL, M. E., SCHNELL, J. R., XU, C., LUTZ, R. A., CHOU, J. J. & WUCHERPFENNIG, K. W. (2006) The structure of the zeta zeta transmembrane dimer reveals features essential for its assembly with the T cell receptor, *Cell*, 127, 355-68.
163. MELNYK, R. A., KIM, S., CURRAN, A. R., ENGELMAN, D. M., BOWIE, J. U. & DEBER, C. M. (2004) The affinity of GXXXG motifs in transmembrane helix-helix interactions is modulated by long-range communication, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 16591-16597.
164. PRAKASH, A., JANOSI, L. & DOXASTAKIS, M. (2011) GxxxG motifs, phenylalanine, and cholesterol guide the self-association of transmembrane domains of ErbB2 receptors, *Biophys J*, 101, 1949-58.

165. ADAMIAN, L. & LIANG, J. (2001) Helix-helix packing and interfacial pairwise interactions of residues in membrane proteins, *J Mol Biol*, 311, 891-907.
166. MINEEV, K. S., KHABIBULLINA, N. F., LYUKMANOVA, E. N., DOLGIKH, D. A., KIRPICHNIKOV, M. P. & ARSENIYEV, A. S. (2011) Spatial structure and dimer--monomer equilibrium of the ErbB3 transmembrane domain in DPC micelles, *Biochim Biophys Acta*, 1808, 2081-8.
167. ARKIN, I. T. & BRUNGER, A. T. (1998) Statistical analysis of predicted transmembrane alpha-helices, *Biochim Biophys Acta*, 1429, 113-28.
168. LEMMON, M. A. (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 99-111.
169. MORAVCEVIC, K., OXLEY, C. L. & LEMMON, M. A. (2012) Conditional peripheral membrane proteins: facing up to limited specificity, *Structure*, 20, 15-27.
170. LI, L., SHI, X., GUO, X., LI, H. & XU, C. (2014) Ionic protein-lipid interaction at the plasma membrane: what can the charge do?, *Trends Biochem Sci*, 39, 130-40.
171. MISHRA, V. K., PALGUNACHARI, M. N., SEGREST, J. P. & ANANTHARAMAIAH, G. M. (1994) Interactions of synthetic peptide analogs of the class A amphipathic helix with lipids. Evidence for the snorkel hypothesis, *J Biol Chem*, 269, 7185-91.
172. LI, S., SU, Y., LUO, W. & HONG, M. (2010) Water-protein interactions of an arginine-rich membrane peptide in lipid bilayers investigated by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J Phys Chem B*, 114, 4063-9.
173. SCHOW, E. V., FREITES, J. A., CHENG, P., BERNSEL, A., VON HEIJNE, G., WHITE, S. H. & TOBIAS, D. J. (2011) Arginine in membranes: the connection between molecular dynamics simulations and translocon-mediated insertion experiments, *J Membr Biol*, 239, 35-48.
174. RIED, C. L., KUBE, S., KIRRBACH, J. & LANGOSCH, D. (2012) Homotypic interaction and amino acid distribution of unilaterally conserved transmembrane helices, *J Mol Biol*, 420, 251-7.
175. JAVADPOUR, M. M., EILERS, M., GROESBEEK, M. & SMITH, S. O. (1999) Helix packing in polytopic membrane proteins: role of glycine in transmembrane helix association, *Biophys J*, 77, 1609-18.
176. LIU, W., EILERS, M., PATEL, A. B. & SMITH, S. O. (2004) Helix packing moments reveal diversity and conservation in membrane protein structure, *J Mol Biol*, 337, 713-29.
177. CHOU, P. Y. & FASMAN, G. D. (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence, *Advan. Enzymol.*, 47, 45-148.
178. VON HEIJNE, G. (1991) Proline kinks in transmembrane alpha-helices, *J Mol Biol*, 218, 499-503.

179. HUBER, O., KEMLER, R. & LANGOSCH, D. (1999) Mutations affecting transmembrane segment interactions impair adhesiveness of E-cadherin, *J Cell Sci*, 112 ( Pt 23), 4415-23.
180. RUAN, W., LINDNER, E. & LANGOSCH, D. (2004) The interface of a membrane-spanning leucine zipper mapped by asparagine-scanning mutagenesis, *Protein Sci*, 13, 555-9.
181. RUAN, W., BECKER, V., KLINGMULLER, U. & LANGOSCH, D. (2004) The interface between self-assembling erythropoietin receptor transmembrane segments corresponds to a membrane-spanning leucine zipper, *J Biol Chem*, 279, 3273-9.
182. PARKER, M. S., SAH, R., BALASUBRAMANIAM, A., PARK, E. A., SALLEE, F. R. & PARKER, S. L. (2014) Dimers of G-protein coupled receptors as versatile storage and response units, *International journal of molecular sciences*, 15, 4856-77.
183. EILERS, M., PATEL, A. B., LIU, W. & SMITH, S. O. (2002) Comparison of helix interactions in membrane and soluble alpha-bundle proteins, *Biophys J*, 82, 2720-36.
184. STEVENS, T. J., MIZUGUCHI, K. & ARKIN, I. T. (2004) Distinct protein interfaces in transmembrane domains suggest an in vivo folding model, *Protein Sci*, 13, 3028-37.
185. LEE, A. G. (2011) Lipid-protein interactions, *Biochemical Society transactions*, 39, 761-6.

## 8 Anhang

**Tab. 7: Gesamtübersicht über die Ansätze des Screeningverfahrens.** Aufgeführt sind alle Ansätze, die mithilfe des  $\beta$ -Galactosidase-Tests überprüft wurden (P1 – P278, Ansätze nicht aufgeführter fortlaufender Probennummern zeigten kein Wachstum in Flüssigkultur). Ein Haken (✓) deutet an, dass die jeweilige Kontrolle positiv durchlaufen wurde, ein Kreuz (X) weist auf eine nicht bestandene Kontrolle hin. Im Fall des *malE*-Komplementationstests musste für beide Plasmide (pALT18iiLib und pLT25Lib) ein positives Ergebnis vorliegen, ansonsten erfolgte die Verwerfung des jeweiligen Ansatzes (verworfenen Ansätze sind zusätzlich jeweils orange markiert). Wurde die Fehlerfreiheit der für die Transmembrandomänen codierenden DNS-Abschnitte durch die Sequenzierung bestätigt, galt der Ansatz als verifiziert und die Sequenz wurde in die weitere Auswertung einbezogen. In der letzten Zeile der Tabelle ist die Anzahl der Ansätze gezeigt, die die jeweilige Kontrolle positiv durchliefen.

Ansatz	$\beta$ -Gal.-Test positiv	<i>malE</i> -Komplementationstest positiv			Sequenzierung fehlerfrei
		pALT18iiLib	pLT25Lib	beide	
P1	✓	✓	X	X	
P2	✓	✓	✓	✓	✓
P3	✓	✓	✓	✓	✓
P4	✓	✓	X	X	
P5	✓	✓	X	X	
P6	X				
P7	X				
P8	✓	✓	X	X	
P9	✓	X	X	X	
P10	✓	✓	✓	✓	✓
P11	✓	X	✓	X	
P12	✓	✓	X	X	
P13	✓	✓	✓	✓	✓
P14	X				
P15	✓	✓	✓	✓	✓
P16	✓	✓	X	X	
P17	X				
P18	✓	✓	X	X	
P19	X				
P20	✓	✓	✓	✓	✓
P21	✓	✓	✓	✓	✓
P22	✓	✓	X	X	
P23	✓	✓	✓	✓	✓
P24	✓	✓	✓	✓	✓
P25	✓	X	X	X	
P26	✓	✓	X	X	
P27	✓	✓	✓	✓	✓
P28	X				
P29	✓	✓	✓	✓	✓
P30	✓	✓	✓	✓	✓
P31	✓	✓	X	X	
P32	✓	X	X	X	
P33	X				
P34	✓	X	X	X	
P35	✓	✓	X	X	
P36	X				
P37	✓	X	X	X	
P38	✓	✓	✓	✓	✓
P39	✓	✓	X	X	
P42	X				
P47	✓	✓	✓	✓	✓
P51	X				
P54	X				
P55	✓	✓	✓	✓	✓
P57	X				
P59	X				
P61	X				
P63	✓	✓	✓	✓	✓
P64	✓	✓	X	X	
P65	✓	X	X	X	

Ansatz	β-Gal.-Test positiv	maE-Komplementationstest positiv			Sequenzierung fehlerfrei
		pALT18iiLib	pLT25Lib	beide	
P66	✓	✓	✓	✓	✓
P67	✓	✓	X	X	
P69	✓	✓	✓	✓	X
P71	X				
P72	✓	✓	X	X	
P73	✓	✓	✓	✓	✓
P74	✓	X	✓	X	
P75	X				
P76	✓	✓	✓	✓	✓
P77	✓	✓	X	X	
P78	✓	X	✓	X	
P79	✓	✓	X	X	
P80	✓	✓	✓	✓	X
P81	✓	✓	X	X	
P82	✓	X	X	X	
P83	✓	X	X	X	
P84	✓	✓	X	X	
P85	✓	X	X	X	
P86	✓	✓	✓	✓	✓
P87	✓	✓	✓	✓	X
P88	✓	X	X	X	
P89	✓	X	X	X	
P90	✓	X	✓	X	
P91	✓	✓	X	X	
P92	✓	✓	✓	✓	✓
P93	✓	✓	✓	✓	✓
P94	✓	✓	X	X	
P95	✓	✓	X	X	
P96	✓	✓	X	X	
P97	✓	✓	✓	✓	X
P98	✓	X	X	X	
P99	✓	✓	✓	✓	X
P100	✓	X	✓	X	
P101	✓	X	X	X	
P102	✓	✓	✓	✓	✓
P103	✓	✓	✓	✓	✓
P104	✓	✓	X	X	
P105	✓	✓	✓	✓	X
P106	✓	✓	✓	✓	X
P107	✓	✓	✓	✓	X
P108	✓	✓	✓	✓	X
P109	✓	✓	✓	✓	X
P110	✓	X	✓	X	
P111	✓	✓	✓	✓	✓
P112	✓	✓	✓	✓	X
P113	✓	✓	X	X	
P114	✓	✓	✓	✓	✓
P115	✓	✓	✓	✓	X
P116	✓	✓	X	X	
P117	X				
P118	✓	✓	✓	✓	X
P119	✓	✓	X	X	
P120	✓	X	✓	X	
P121	✓	✓	X	X	
P122	✓	✓	X	X	
P123	✓	✓	X	X	
P124	✓	✓	X	X	
P125	✓	✓	✓	✓	✓
P126	✓	✓	✓	✓	X
P127	✓	✓	✓	✓	✓
P128	✓	X	X	X	
P129	✓	X	✓	X	
P130	✓	✓	X	X	
P131	X				
P132	✓	X	✓	X	
P133	✓	✓	X	X	
P134	✓	✓	✓	✓	✓
P135	✓	✓	✓	✓	✓
P136	✓	✓	X	X	
P137	✓	X	X	X	
P138	✓	X	X	X	
P139	✓	✓	X	X	
P140	✓	X	X	X	
P141	✓	✓	✓	✓	X

Ansatz	β-Gal.-Test positiv	malE-Komplementationstest positiv			Sequenzierung fehlerfrei
		pALT18iiLib	pLT25Lib	beide	
P142	✓	✓	X	X	
P143	✓	✓	X	X	
P144	✓	✓	X	X	
P145	✓	✓	X	X	
P146	✓	✓	X	X	
P147	X				
P148	✓	X	✓	X	
P149	✓	X	X	X	
P150	✓	✓	X	X	
P151	✓	✓	✓	✓	✓
P152	✓	✓	X	X	
P153	✓	✓	X	X	
P154	✓	✓	✓	✓	X
P155	✓	✓	✓	✓	✓
P156	✓	✓	✓	✓	✓
P157	✓	X	✓	X	
P158	✓	✓	✓	✓	✓
P159	✓	✓	✓	✓	✓
P160	✓	✓	X	X	
P161	✓	✓	✓	✓	✓
P162	✓	✓	✓	✓	X
P163	✓	✓	✓	✓	✓
P164	✓	X	X	X	
P165	✓	✓	X	X	
P166	✓	✓	X	X	
P167	✓	✓	✓	✓	X
P168	✓	✓	✓	✓	✓
P169	✓	✓	✓	✓	X
P170	✓	✓	X	X	
P171	✓	✓	X	X	
P172	✓	✓	✓	✓	✓
P173	✓	✓	✓	✓	✓
P174	✓	✓	✓	✓	✓
P175	✓	✓	X	X	
P176	✓	✓	✓	✓	✓
P177	✓	✓	X	X	
P178	✓	✓	✓	✓	✓
P179	✓	✓	X	X	
P180	✓	✓	X	X	
P181	✓	✓	X	X	
P182	✓	✓	✓	✓	✓
P183	✓	✓	X	X	
P184	✓	X	X	X	
P185	✓	✓	✓	✓	X
P186	✓	X	X	X	
P187	✓	✓	X	X	
P188	✓	✓	✓	✓	X
P189	✓	✓	X	X	
P190	✓	✓	✓	✓	✓
P191	✓	X	X	X	
P192	✓	✓	X	X	
P193	✓	✓	✓	✓	X
P194	✓	✓	✓	✓	X
P195	✓	X	X	X	
P196	✓	✓	✓	✓	X
P197	✓	✓	X	X	
P198	✓	✓	✓	✓	✓
P199	✓	✓	X	X	
P200	✓	✓	✓	✓	X
P201	✓	✓	X	X	
P202	✓	✓	✓	✓	✓
P203	✓	X	X	X	
P204	✓	✓	X	X	
P205	✓	X	✓	X	
P206	✓	✓	X	X	
P207	✓	✓	✓	✓	✓
P208	✓	✓	✓	✓	✓
P209	✓	✓	✓	✓	X
P210	✓	X	✓	X	
P211	✓	✓	✓	✓	✓
P212	X				
P213	✓	X	✓	X	
P214	✓	✓	✓	✓	✓
P215	✓	✓	✓	✓	✓

Ansatz	β-Gal.-Test positiv	maE-Komplementationstest positiv			Sequenzierung fehlerfrei
		pALT18iiLib	pLT25Lib	beide	
P216	✓	✓	✓	✓	✓
P217	✓	✓	✓	✓	X
P218	✓	✓	✓	✓	✓
P219	✓	✓	X	X	
P220	✓	✓	X	X	
P221	✓	X	✓	X	
P222	✓	✓	X	X	
P223	✓	X	✓	X	
P224	✓	X	X	X	
P225	✓	✓	X	X	
P226	✓	✓	X	X	
P227	✓	✓	✓	✓	X
P228	✓	✓	X	X	
P229	✓	X	✓	X	
P230	✓	X	✓	X	
P231	✓	✓	X	X	
P232	✓	X	✓	X	
P233	✓	X	X	X	
P234	✓	✓	✓	✓	✓
P235	✓	✓	X	X	
P236	✓	✓	✓	✓	X
P237	✓	✓	X	X	
P238	✓	✓	X	X	
P239	✓	X	X	X	
P240	X				
P241	X				
P242	X				
P243	X				
P244	X				
P245	X				
P246	X				
P247	X				
P248	X				
P249	X				
P250	X				
P251	X				
P252	X				
P253	X				
P254	X				
P255	✓	✓	✓	✓	X
P256	✓	✓	X	X	
P257	✓	✓	✓	✓	✓
P258	✓	✓	X	X	
P259	✓	✓	✓	✓	X
P260	✓	✓	✓	✓	✓
P261	✓	✓	X	X	
P262	✓	✓	X	X	
P263	✓	✓	✓	✓	✓
P264	✓	✓	✓	✓	X
P265	✓	✓	X	X	
P266	✓	✓	X	X	
P267	✓	✓	✓	✓	✓
P268	X				
P269	✓	✓	✓	✓	X
P270	✓	X	X	X	
P271	✓	X	X	X	
P272	✓	X	X	X	
P273	✓	✓	✓	✓	✓
P274	✓	X	X	X	
P275	✓	✓	X	X	
P276	✓	✓	X	X	
P277	✓	✓	✓	✓	✓
P278	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Anzahl</b>	<b>225</b>	<b>→</b>	<b>→</b>	<b>95</b>	<b>62</b>



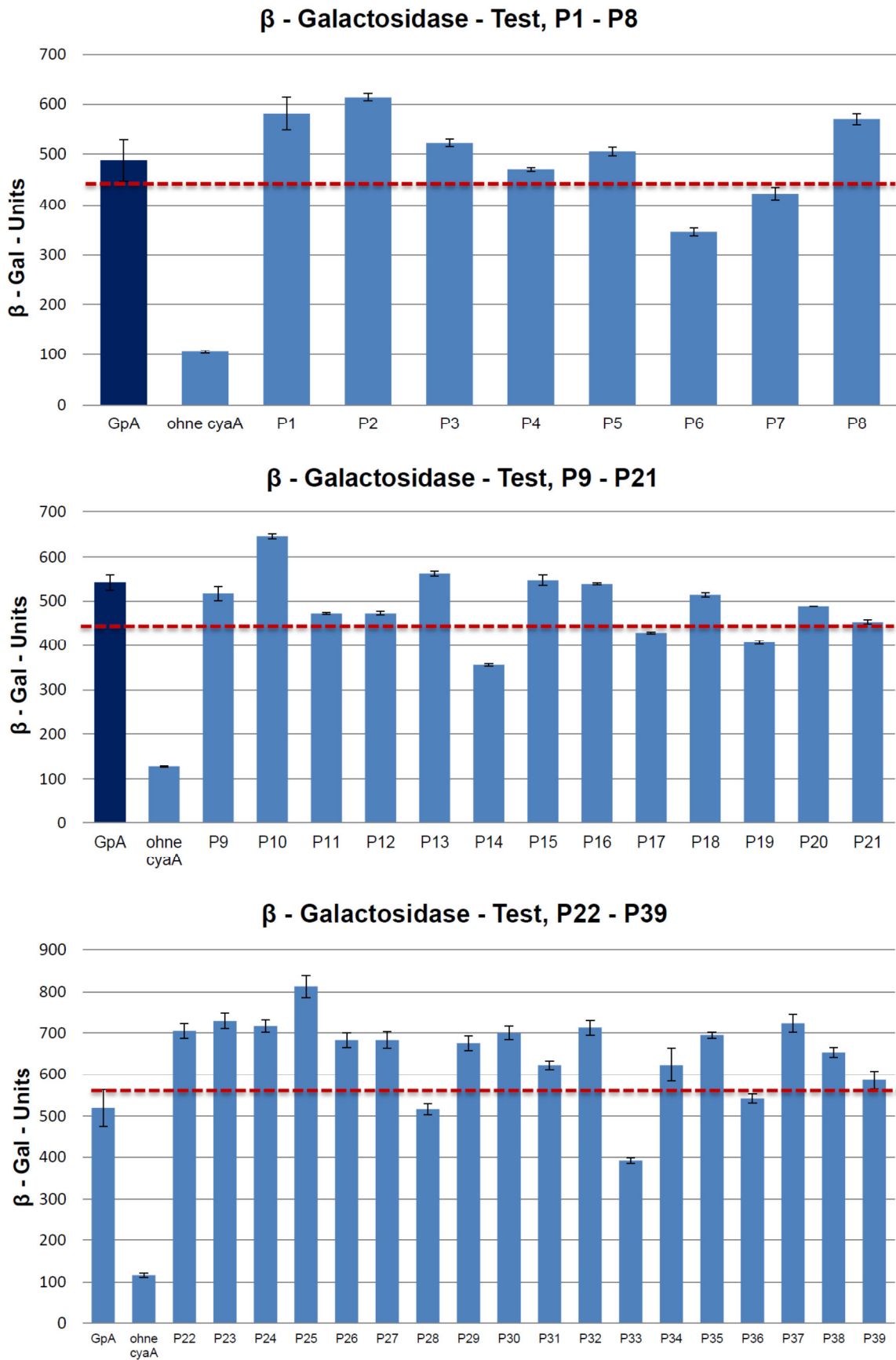


Abb. 30, Teil 1/4 (Die Legende befindet sich am Ende der Abbildung).

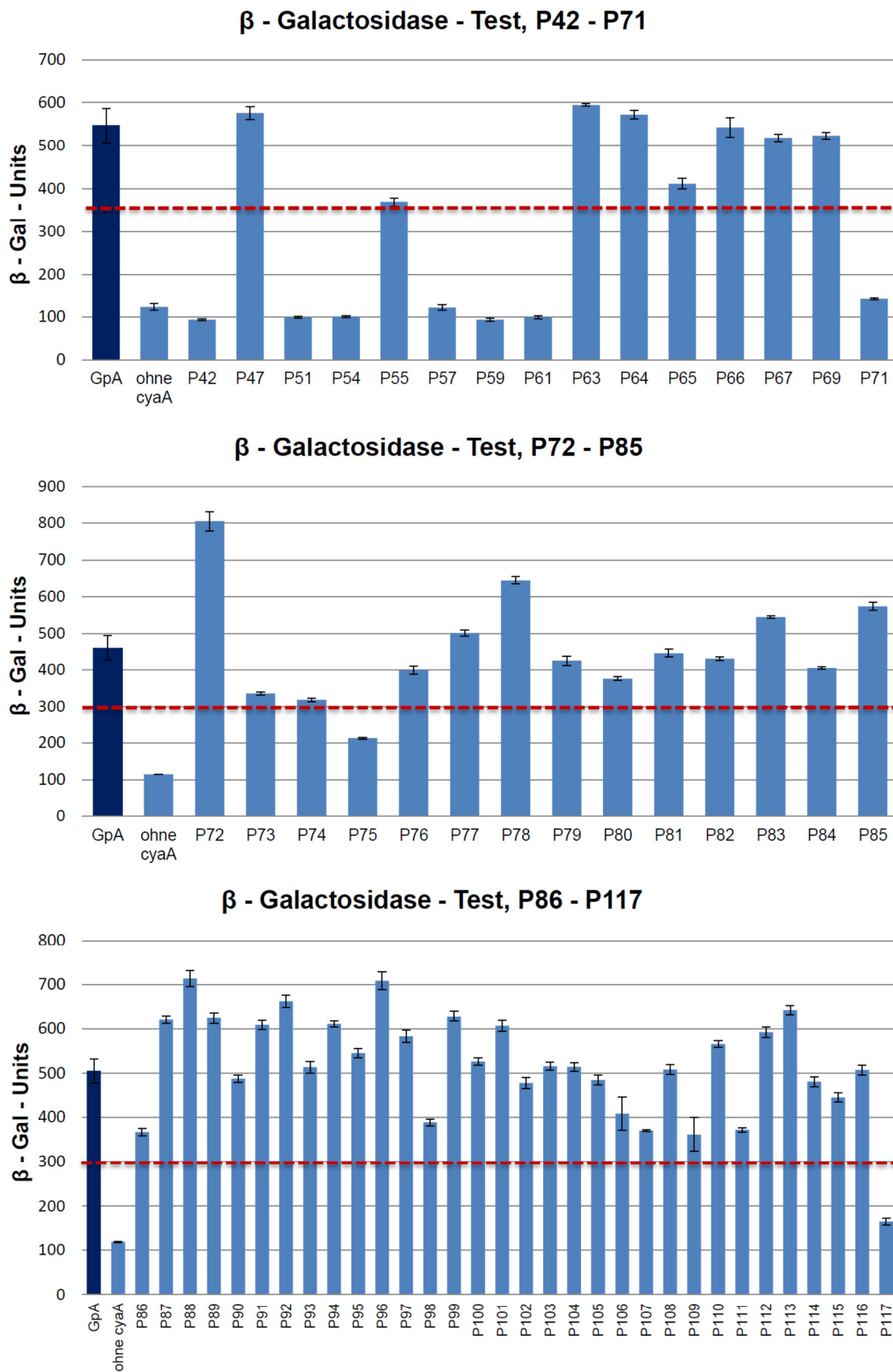


Abb. 30, Teil 2/4 (Die Legende befindet sich am Ende der Abbildung).

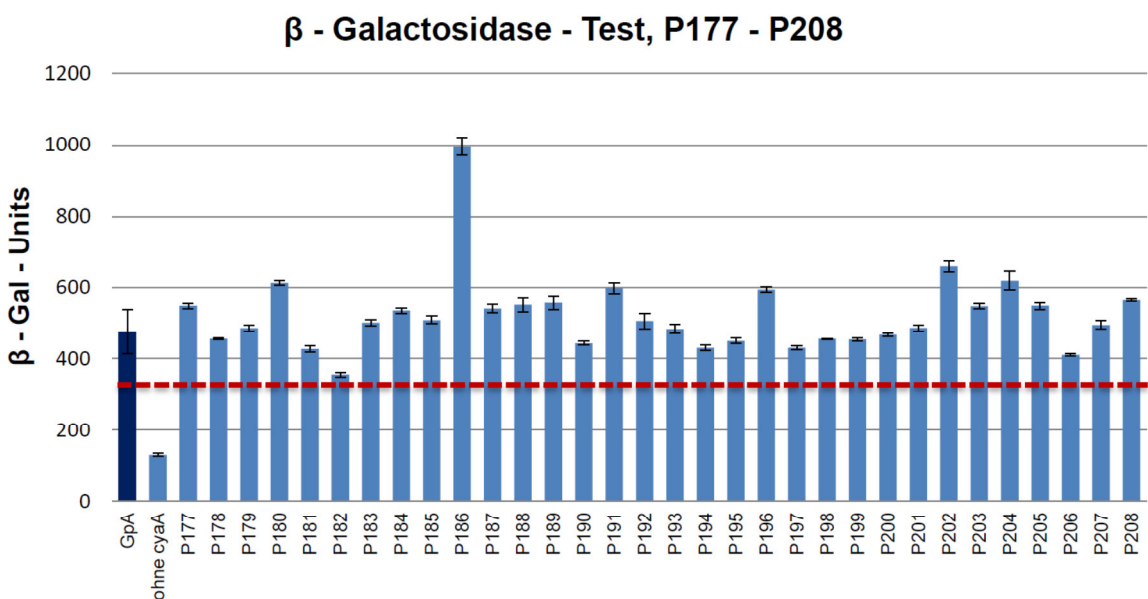
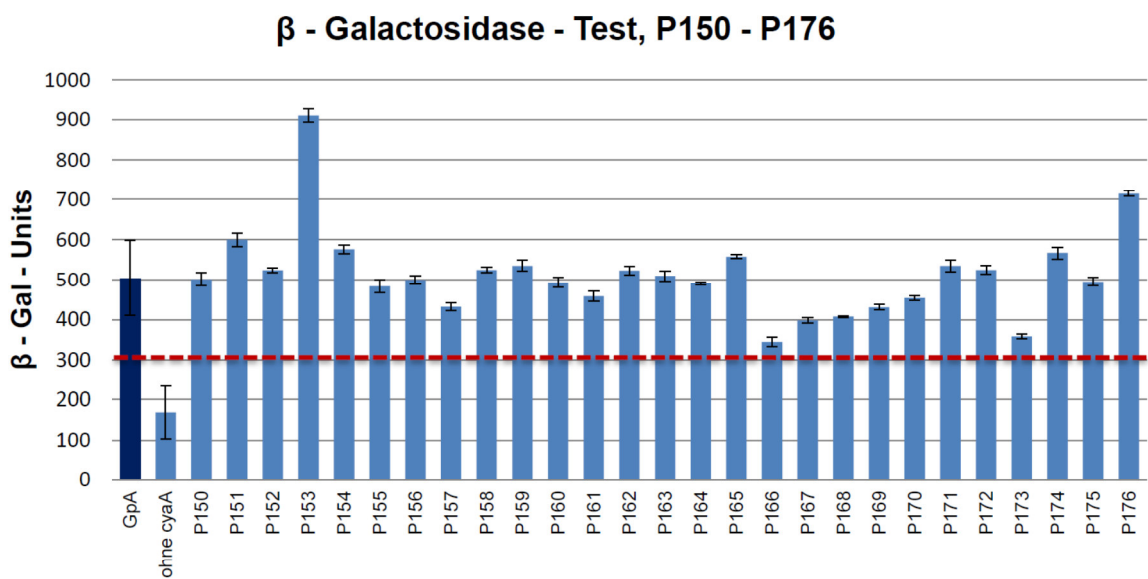
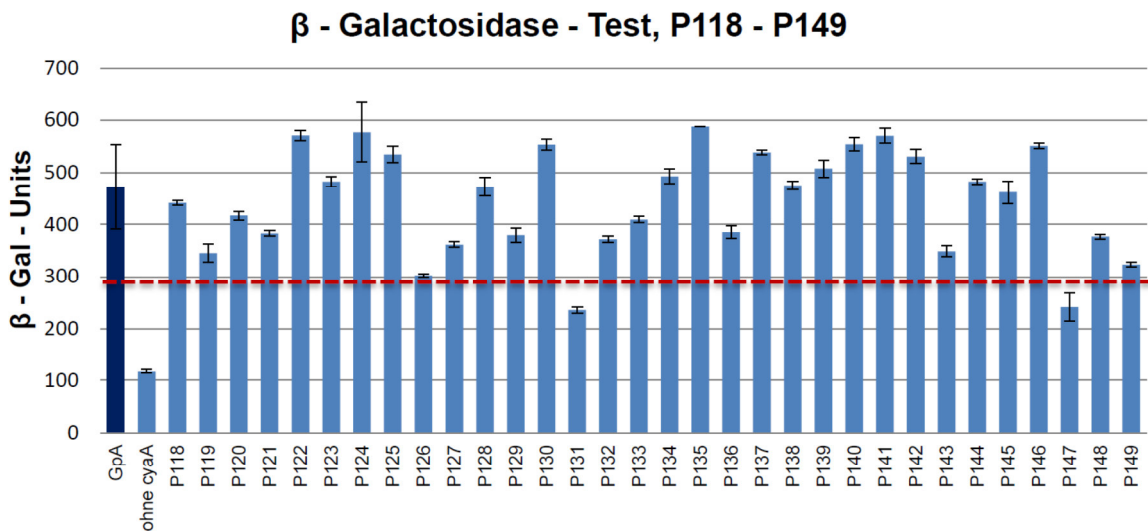


Abb. 30, Teil 3/4 (Die Legende befindet sich am Ende der Abbildung).

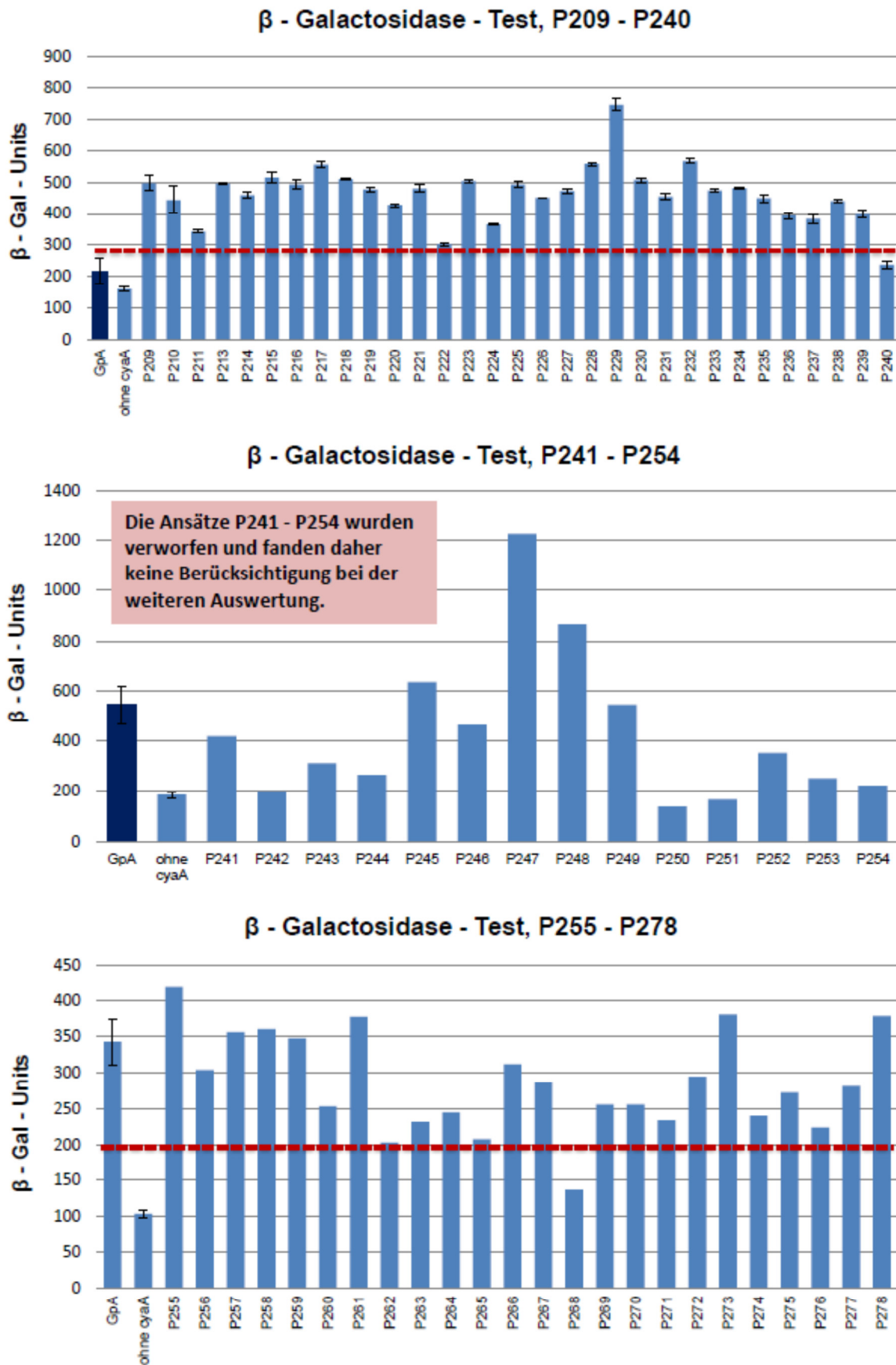
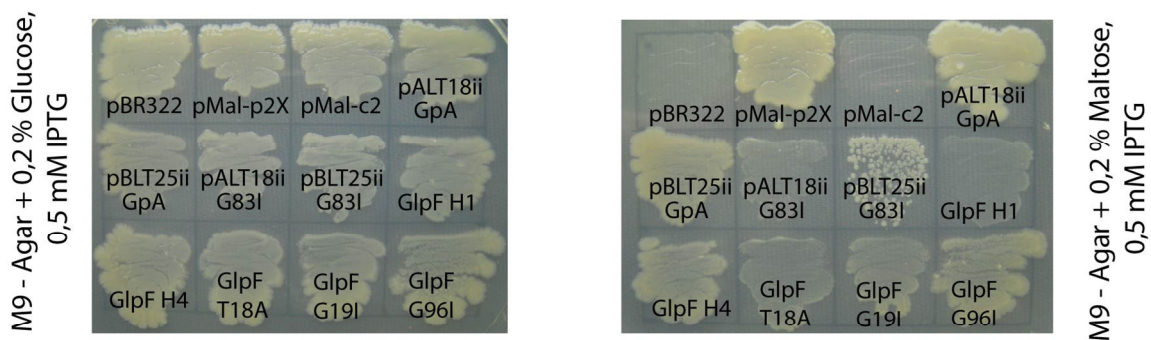


Abb. 30, Teil 4/4 (Die Legende befindet sich auf der nächsten Seite).

**Abb. 30: Ergebnisse der  $\beta$ -Galactosidase-Tests zum Screeningverfahren** (Die Abbildung befindet sich auf der vorangehenden Seite). Gezeigt sind die  $\beta$ -Gal-Units der jeweiligen Ansätze und der Kontrollen für starke (GpA) und schwache Interaktion (ohne *cyoA*). Die unterbrochenen roten Linien stellen die Schwellenwerte dar, anhand derer die Ansätze zur weiteren Bearbeitung ausgewählt wurden. Ansätze mit Werten unterhalb des jeweiligen Schwellenwerts wurden verworfen. Der Schwellenwert wurde auf etwa  $\frac{2}{3}$  oder höher der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität der GpA-Kontrolle gesetzt. Die Kontrollansätze für starke Interaktion wurden durch verschiedene Plasmidkombinationen erstellt. So symbolisiert ein hellblauer Balken die Kombination pALT18ii-GpA17 und pLT25-GpA, ein dunkelblauer Balken steht für die Kombination pALT18ii-GpA17 und pBLT25ii-GpA17. Da unter Verwendung des Plasmids pBLT25ii-GpA17 signifikant höhere Werte gemessen wurden als mit pLT25-GpA, erfolgte eine rechnerische Korrektur. Dazu wurde eine vergleichende Messung herangezogen, bei der die  $\beta$ -Gal-Units bezüglich beider Plasmidkombinationen gemessen wurden. Es zeigte sich, dass der pLT25-GpA-beinhalten Ansatz 13,7 % der  $\beta$ -Gal-Units des Ansatzes mit dem Plasmid pBLT25ii-GpA17 erreichte. Daher wurden die  $\beta$ -Gal-Units aller in dieser Abbildung gezeigten GpA-Kontrollansätze, die auf dem Plasmid pBLT25ii beruhen, mit dem Faktor 0,137 multipliziert. Die so veränderten Ansätze werden durch die dunkelblauen Balken dargestellt. Werte der GpA-Kontrollansätze in Verbindung mit dem Plasmid pLT25-GpA (hellblaue Balken) wurden nicht rechnerisch verändert. Zur Erläuterung der Ursache von abweichenden Messwerten bezüglich der Plasmide pBLT25ii und pLT25 siehe Abschnitt 5.1.3.



**Abb. 31: Der *malE*-Komplementationstest bezüglich der GlpF-Transmembranhelices.** Gezeigt ist das Wachstum von MBP-defizienten *E. coli* NT326-Zellen auf M9-Minimalagar mit Maltose oder Glucose (Kontrolle zur Zellviabilität) als einzige Kohlenhydratquelle. Die Zellen wurden durch folgende Plasmide transformiert: pBR322 (codiert nicht für eine Transmembrandomäne oder MBP), pMal-p2X (MBP im Periplasma vorhanden), pMal-c2 (MBP nur im Cytoplasma, kein Export ins Periplasma), pALT18ii-GpA17/pBLT25ii-GpA17 (Kontrollplasmide starke Interaktion, Beschriftung pALT18ii-GpA/pBLT25ii-GpA), pALT18ii-G83I/pBLT25ii-G83I (Kontrollplasmide schwache Interaktion), GlpF H1 und H4 (GlpF Transmembranhelices 1 und 4), GlpF T18A, G19I und G96F (Aminosäuresubstitutionen in den GlpF Transmembranhelices 1 und 4). Es wurden nicht alle Fusionsproteine, die zur Messung der Interaktionen der GlpF Transmembranhelices genutzt wurden, durch den *malE*-Komplementationstest überprüft.

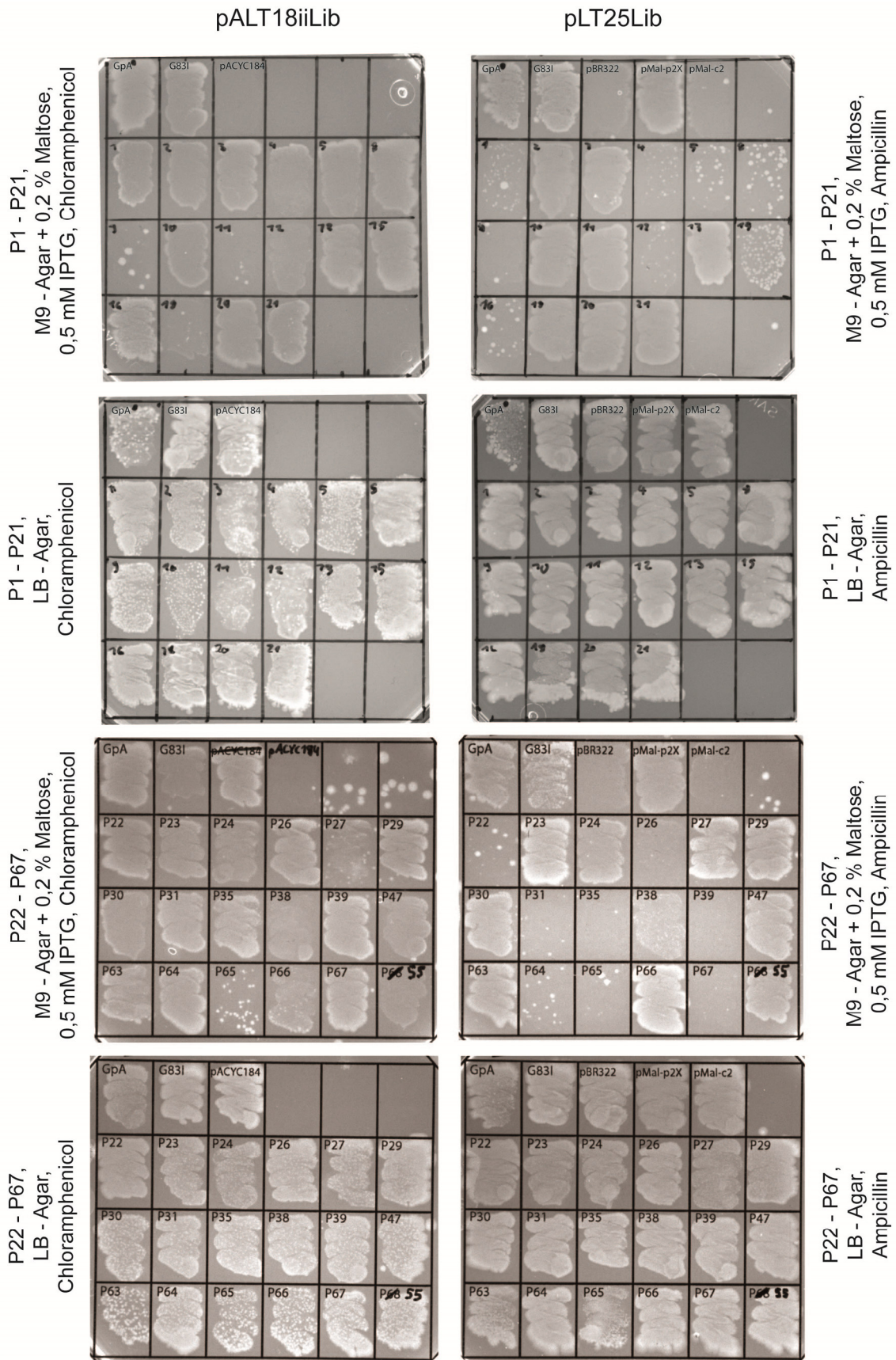


Abb. 32, Teil 1/7 (Die Legende befindet sich am Ende der Abbildung).

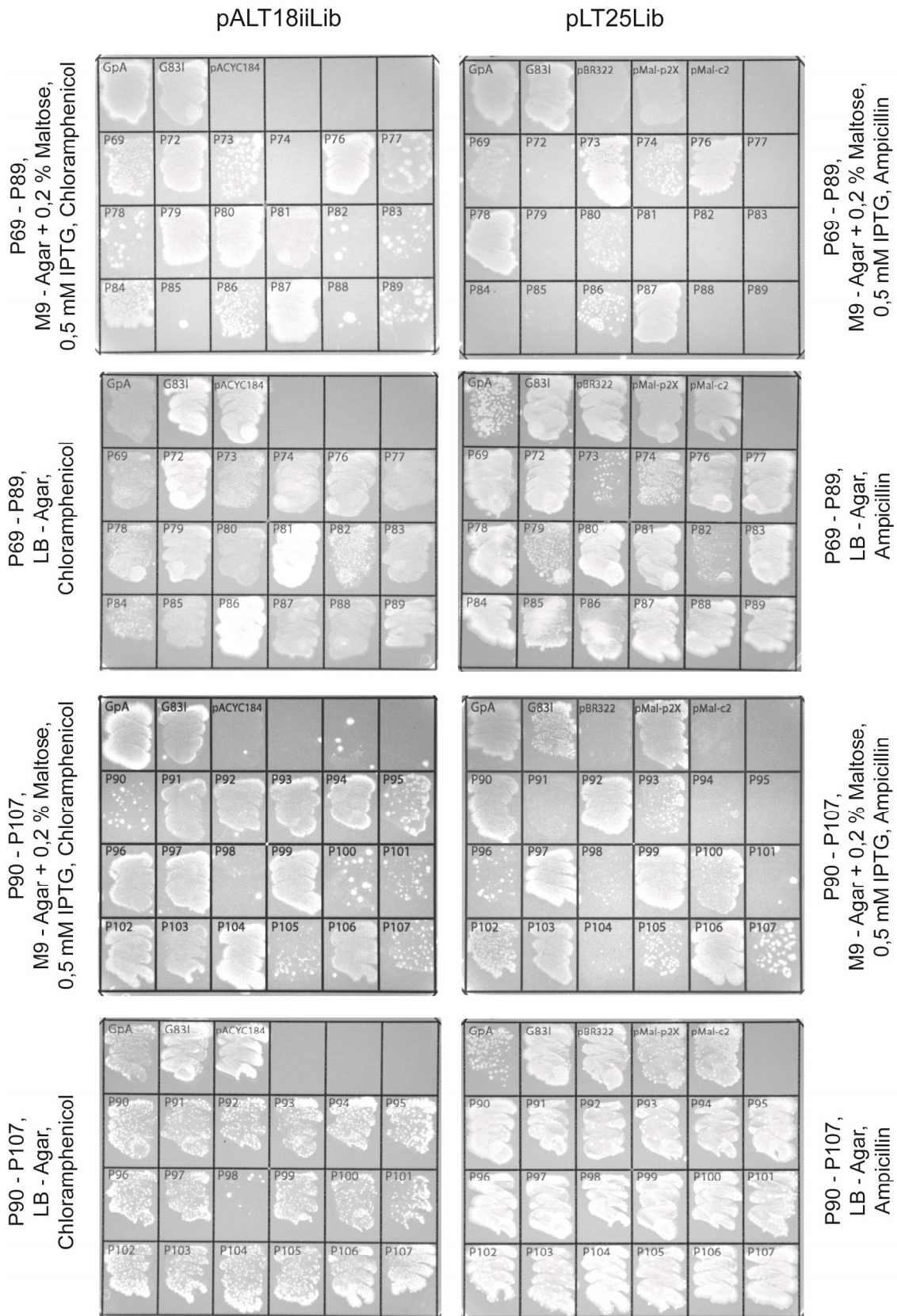


Abb. 32, Teil 2/7 (Die Legende befindet sich am Ende der Abbildung).

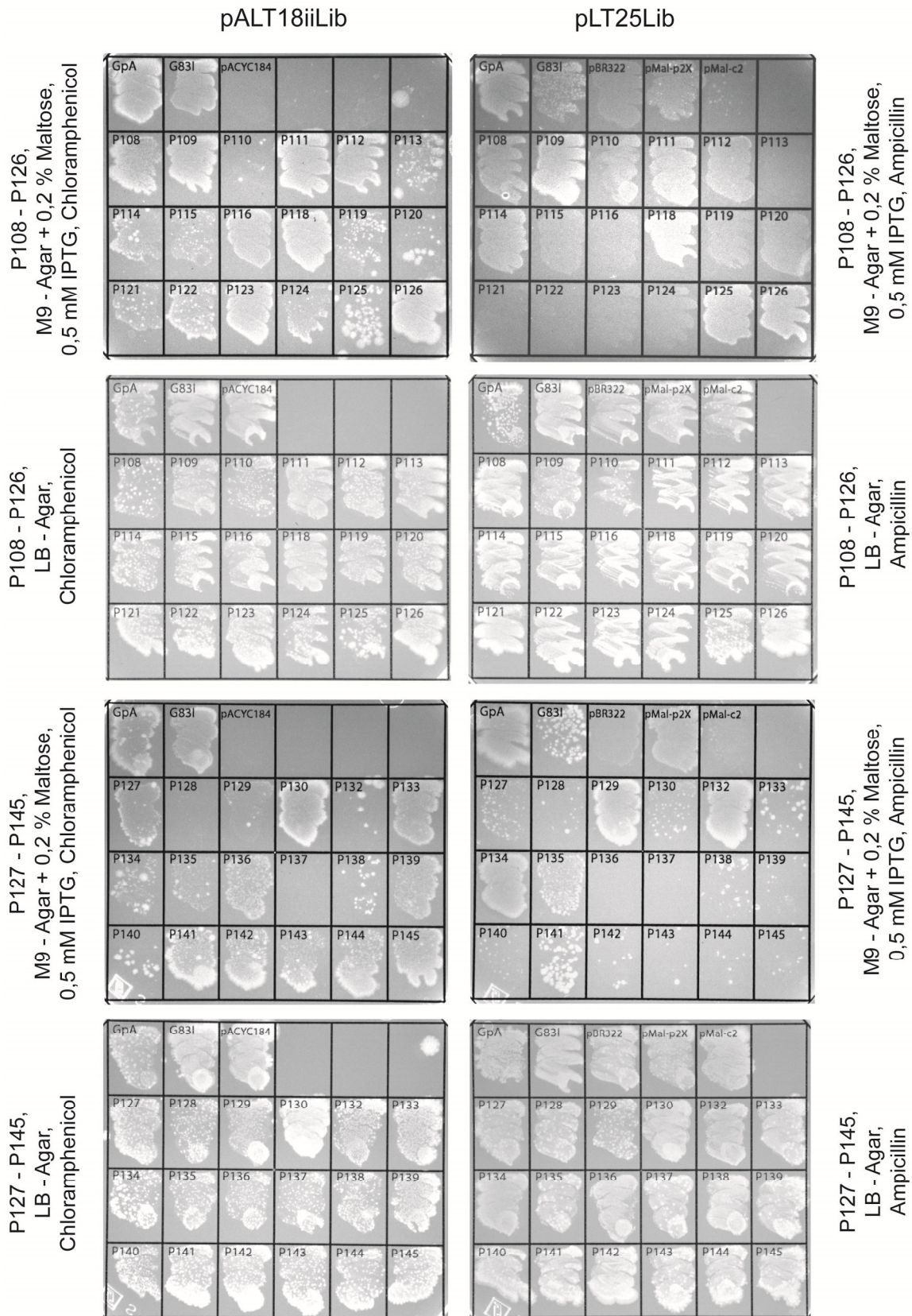


Abb. 32, Teil 3/7 (Die Legende befindet sich am Ende der Abbildung).



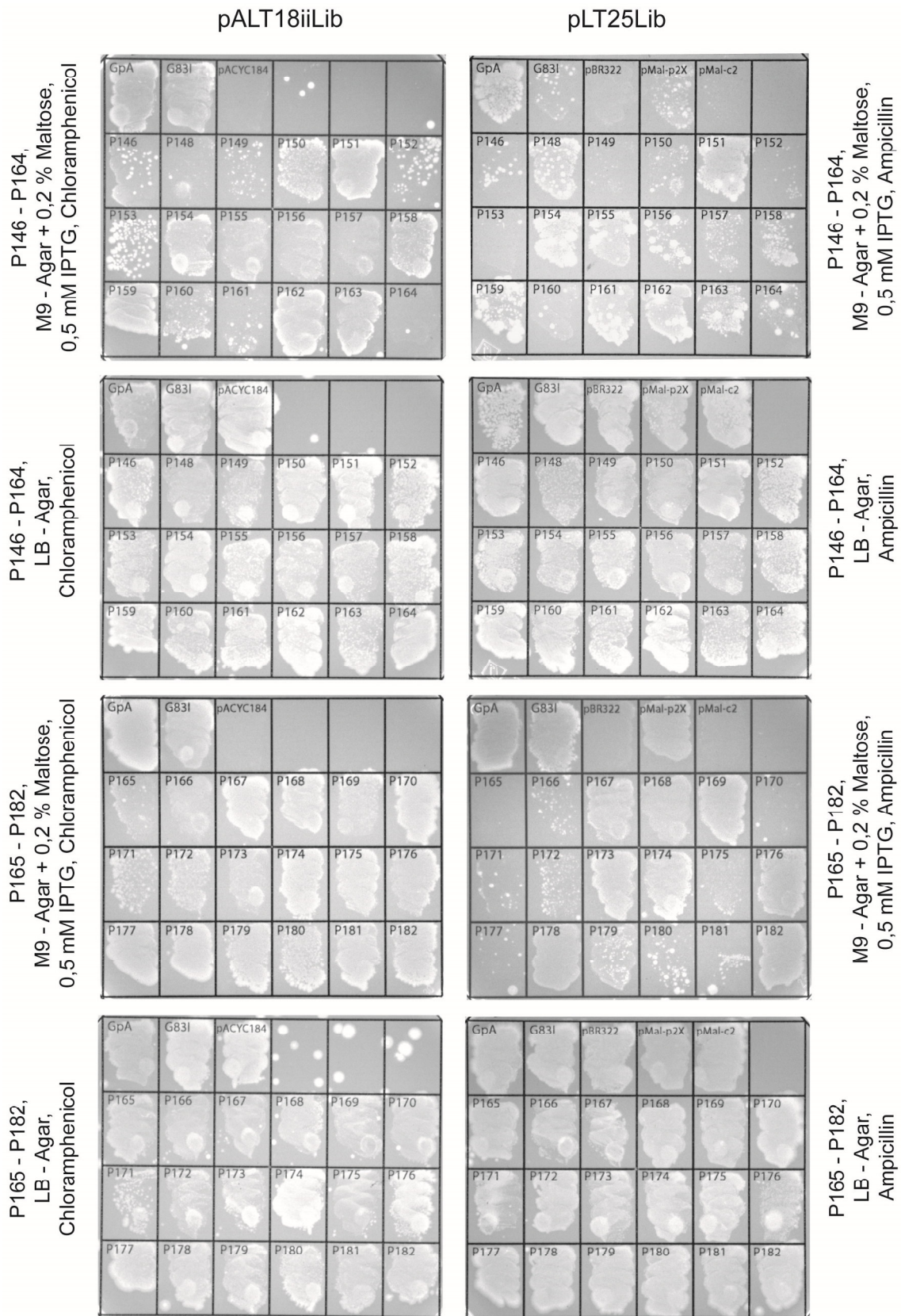


Abb. 32, Teil 4/7 (Die Legende befindet sich am Ende der Abbildung).

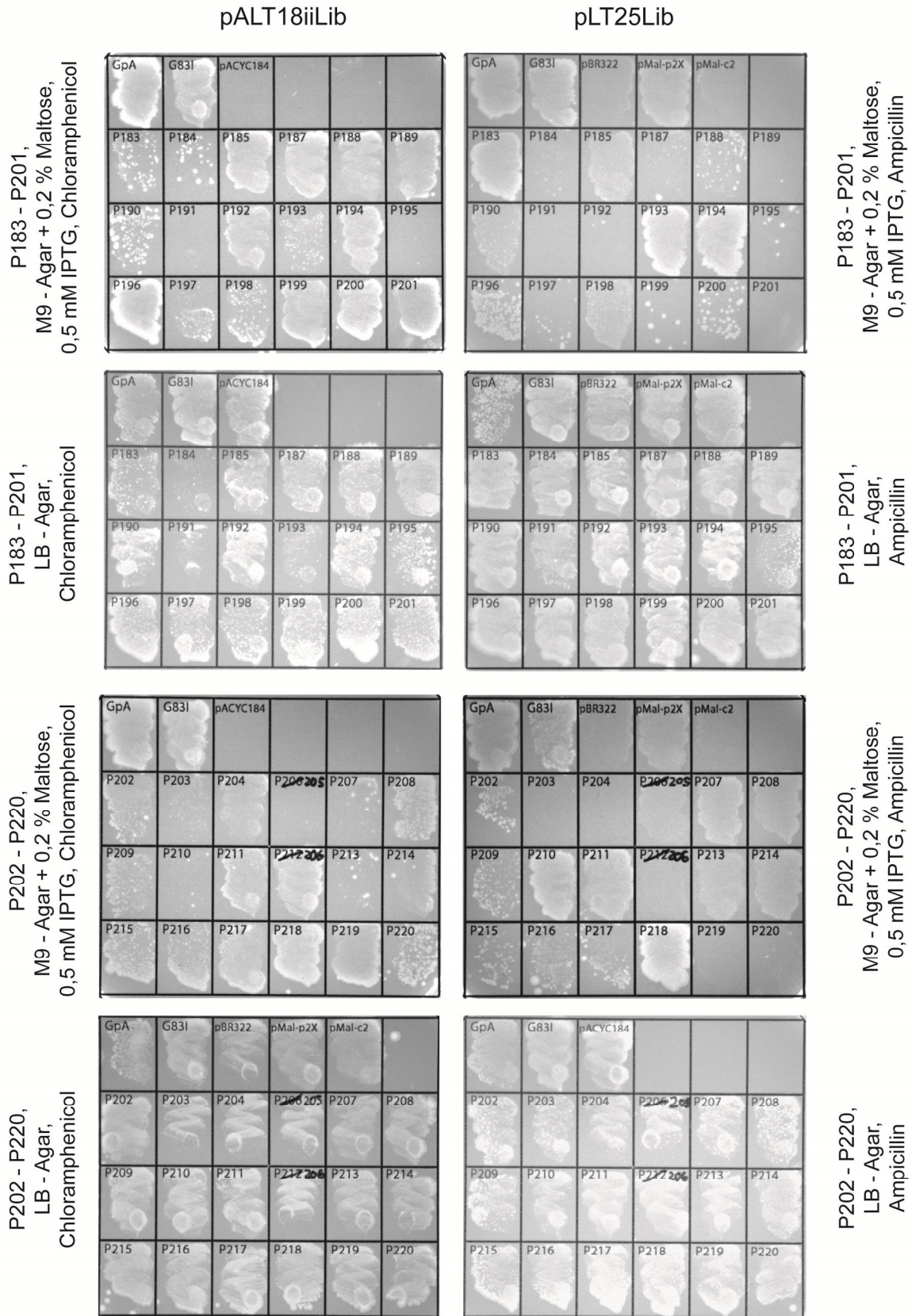


Abb. 32, Teil 5/7 (Die Legende befindet sich am Ende der Abbildung).

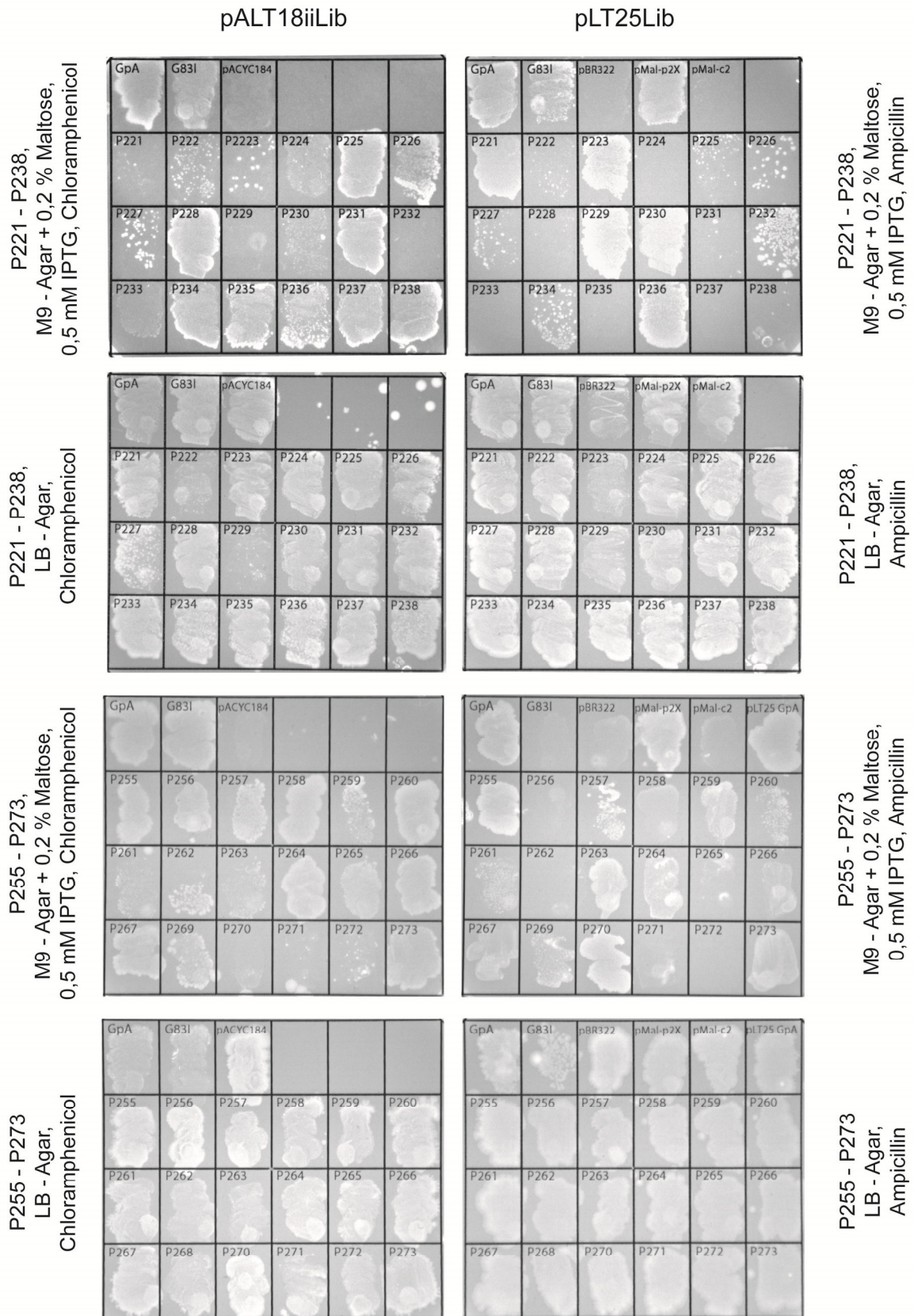
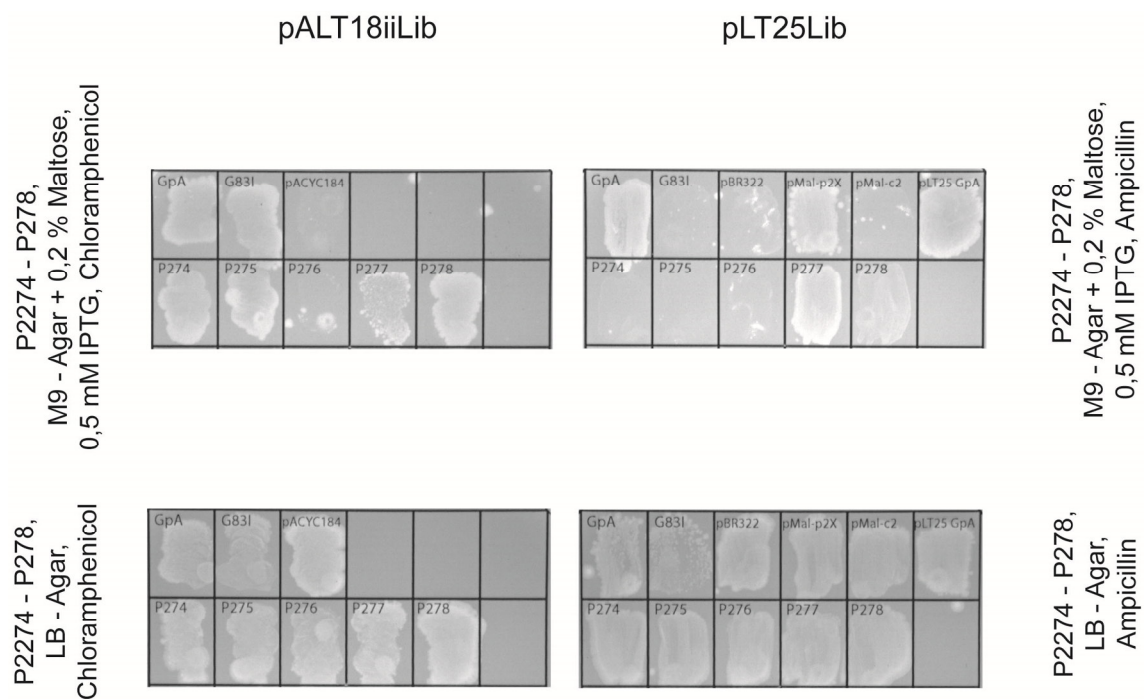


Abb. 32, Teil 6/7 (Die Legende befindet sich am Ende der Abbildung).



**Abb. 32 (Teil 7/7): Der *malE*-Komplementationstest (Screening).** Die Kontrollen entsprechen denen aus Abb. 31. Zusätzlich fand das Plasmid pACYC184 (codiert nicht für eine Transmembrandomäne oder MBP) Anwendung. Hier wurde als Kontrolle zur Zellviabilität LB-Agar (ohne IPTG-Zusatz) verwendet. Auch wurden hier im Unterschied zum in der vorangehenden Abbildung (Abb. 31) gezeigten *malE*-Komplementationstest Antibiotika eingesetzt.







## 9 Veröffentlichungen und Präsentationen

### Publikationen

1. Wiens M., Schröder H.C., Wang X.H., Link T., **Steindorf D.** & Müller W.E.G. (2011): Isolation of the silicatein- $\alpha$  interactor silintaphin-2 by a novel solid-phase pull-down assay. *Biochemistry* 50, 1981–1990.
2. Tome L.,\* **Steindorf D.**\* and Schneider D. (2013): Genetic systems for monitoring interactions of transmembrane domains in bacterial membranes, *Methods Mol. Biol.* 1063, 57-91.

\*) Autoren trugen gleichermaßen zu dieser Veröffentlichung bei.

### Posterpräsentationen

1. **Dominik Steindorf** and Dirk Schneider: Is signaling via members of the human Death Receptor family affected by interactions of their respective transmembrane domains? 8. Transportkolloquium 2012, 17.05.2012 – 18.05.2012 Schloß Rauschholzhausen, Deutschland, Transportkolloquium der Studiengruppe Biomembranen der GBM.
2. **Dominik Steindorf** and Dirk Schneider: Selection of transmembrane protein heterodimerization motifs from combinatorial libraries. 9. Transportkolloquium 2014, 08.05.2014 – 09.05.2014 Schloß Rauschholzhausen, Deutschland, Transportkolloquium der Studiengruppe Biomembranen der GBM.
3. **Dominik Steindorf** and Dirk Schneider: Selection of transmembrane protein heterodimerization motifs from combinatorial libraries. *Molecular Biophysics of Membranes*, 29.06.2014 – 04.07.2014 Big Sky, Montana, USA, Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB).



## **10 Danksagung**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## **11 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.