

# Elektrostatische Charge Zipper in membranständigen Proteinen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Biol. Sebastian Prock

aus

Rastatt

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Anne Ulrich

Korreferent: Prof. Dr. Marcus Elstner

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2013

## Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle meinen herzlichen Dank an alle richten die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Anne Ulrich, welche mir mit dem hier bearbeiteten Thema eine spannende und herausfordernde Aufgabe übertragen hat.

Auch möchte ich Herrn Dr. Sergii Afonin, Dr. Jochen Bürck, Dr. Stephan Grage und Herrn Dr. Johannes Reichert danken, die mich bei der Anwendung verschiedenster Methoden eingewiesen und unterstützt haben.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Hartmut Heinzmann und Herrn Johannes Peters für die Beantwortung verschiedenster Fragen rund um das Thema Informatik und Programmierung.

Auch allen Mitgliedern des Arbeitskreises Ulrich möchte ich für die freundschaftliche und tolle Arbeitsatmosphäre während all der Jahre danken.

Insbesondere Herrn Dr. Dirk „DerekBobChuck“ Windisch und Herrn Colin „Hulk“ Ziegler für die anregenden und informativen Gespräche während des BK Donnerstags.

Mein Dank gilt auch dem Land Baden-Württemberg für die Gewährung meines Promotionsstipendiums.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und meiner Lebensgefährtin Kerstin. Ohne deren Hilfe und Unterstützung wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

## **Eidstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen meiner Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, habe ich in jedem Fall unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht. Dasselbe gilt sinngemäß für Tabellen und Abbildungen. Diese Arbeit hat in dieser oder einer ähnlichen Form noch nicht im Rahmen einer anderen Prüfung vorgelegen.

Karlsruhe, den 6.11.2013

Sebastian Prock

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Packungsprinzipien von Sekundärstrukturen . . . . .	1
1.2 Sekundärstrukturinteraktionen in wässriger Umgebung . . . . .	4
1.3 Sekundärstrukturinteraktionen in biologischen Membranen . . . . .	6
1.4 TatA <sub>d</sub> und die Charge Zipper Hypothese . . . . .	9
<b>2 Hintergrund und Ziel der Arbeit</b>	<b>13</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>14</b>
3.1 Methoden . . . . .	14
3.1.1 Molekularbiologische Methoden . . . . .	14
3.1.2 Generelle Methoden zur DNA Manipulation . . . . .	15
3.1.3 Generelle Methoden zur Protein Manipulation . . . . .	17
3.1.4 Chromatographie . . . . .	19
3.1.5 Agardiffusionsassays . . . . .	21
3.1.6 Fluoreszenzspektroskopische Methoden . . . . .	21
3.1.7 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie . . . . .	24
3.1.8 Festkörper-Kernspinnmagnetresonanz-(ssNMR)-Spektroskopie . . . . .	26
3.1.9 Bioinformatische Methoden . . . . .	27
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>28</b>
4.1 Datenbankanalyse . . . . .	28
4.1.1 Datenbanken als Quelle von Proteinsequenzen . . . . .	28
4.1.2 SEQUENZ - Ein Programm zur Identifizierung von hypothetischen Charge Zipper Motiven . . . . .	29
4.1.3 Mathematisches Modell zur Erwartungswertberechnung von hypothetischen Charge Zipper Motiven . . . . .	31
4.1.4 Hypothetische Charge Zipper Motive in der UNIPROT Datenbank . . . . .	33
4.1.5 Statistische Wahrscheinlichkeit des zufälligen Auftretens eines hypothetischen Charge Zipper Motivs . . . . .	37
4.1.6 TatA <sub>d</sub> ähnliche Proteine . . . . .	40
4.1.7 Hypothetische Charge Zipper Motive in antimikrobiellen und membranassoziierten Proteinen . . . . .	41
4.1.8 Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	47
4.2 Dermcidin . . . . .	59
4.2.1 Einleitung . . . . .	59
4.2.2 Expression und Aufreinigung von Dermcidin . . . . .	63

4.2.3	Agardiffusionsassays zur Überprüfung der antimikrobiellen Aktivität von Dermcidin . . . . .	69
4.2.4	Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Dermcidin . . . . .	70
4.2.5	Membranorientierung von Dermcidin . . . . .	74
4.2.6	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	79
4.3	TisB . . . . .	88
4.3.1	Einleitung . . . . .	88
4.3.2	Bioinformatische Analyse von TisB . . . . .	89
4.3.3	Ermittlung der Sekundärstrukturzusammensetzung von TisB . . . . .	91
4.3.4	Membranorientierung von TisB . . . . .	95
4.3.5	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an TisB . . . . .	97
4.3.6	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	106
<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>126</b>
6.1	Material . . . . .	126
6.2	Helical Wheel und Helical Net Darstellungen (m=2) . . . . .	138
6.3	Helical Wheel und Helical Net Darstellungen (m=3) . . . . .	157
6.4	Helical Wheel und Helical Net Darstellungen (m≤4) . . . . .	162
6.5	Sequenzierergebnisse . . . . .	169
6.6	Bestimmung des pH-Werts in Vesikeln . . . . .	169
6.7	Analysedaten und Skripte . . . . .	171

## Abbildungsverzeichnis

1	Möglichkeiten der Helix-Helix Packung . . . . .	2
2	$\beta$ -Stränge und $\beta$ -Faltblätter . . . . .	4
3	Leucin-Zipper von GCN4 aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	5
4	Das GXXXG Motiv in der Transmembrandomäne von Glycophorin A . . . . .	7
5	Der Charge Zipper in der Primärstruktur von TatA <sub>d</sub> . . . . .	10
6	Der Charge Zipper in TatA <sub>d</sub> als inter- und intramolekulares Assemblierungs- motiv . . . . .	11
7	Möglichkeiten der strukturellen Realisierung von Charge Zippern . . . . .	12
8	Algorithmus zur Identifizierung von hypothetischen Charge Zipper Motiven	31
9	Aminosäuren- und Längenverteilung in Proteindatenbanken . . . . .	34
11	Mittlere Anzahl von HCZ-Motiven je 100 AS . . . . .	35
10	Hypothetische Charge Zipper Motiv Verteilungen in Proteindatenbanken . .	36
12	Vergleich der HCZ-Motiv Verteilung mit artifiziellen Datenbanken . . . . .	39
13	Alignment der letzten 60 C-terminalen Reste des E <sup>rns</sup> Proteins mit anderen BVDV Stämmen . . . . .	52
14	Das HCZ-Motiv im E <sup>rns</sup> Protein liegt in der $\alpha$ -helikalen, C-terminalen Re- gion des Proteins. . . . .	53
15	Mögliche Rolle des PCZ-Motivs im E <sup>rns</sup> Protein . . . . .	54
16	<i>Helical Wheel</i> Darstellungen von Dermcidin, SP-BN und Im-1. . . . .	56
17	<i>Helical Wheel</i> und <i>Helical Net</i> Projektion von Delta-Lysin I . . . . .	57
18	Sequenzalignment von Dermcidin aus verschiedenen Organismen . . . . .	61
19	Das HCZ-Motiv in Dermcidin . . . . .	62
20	Strukturmodelle von Dermcidin . . . . .	63
21	Illustration der Dermcidinaufreinigung . . . . .	64
22	Rekombinante Expression von Dermcidin . . . . .	65
23	Gelfiltration und finale Affinitätschromatographie von Dermcidin . . . . .	66
24	Zusammenfassung der Dermcidinaufreinigung . . . . .	67
25	Massenspektren . . . . .	68
26	Agardiffusionsassays von Dermcidin . . . . .	69
27	CD-Spektren von Dermcidin in verschiedenen Lösungsmitteln . . . . .	71
28	CD-Spektren von Dermcidin bei unterschiedlichen pH-Werten . . . . .	73
29	<sup>31</sup> P-NMR Spektrum von Dermcidin in orientierten Lipiddoppelschichten . .	74
30	<sup>15</sup> N-NMR Spektrum von Dermcidin in orientierten Lipiden . . . . .	75
31	<sup>15</sup> N-NMR Spektrum von Dermcidin in orientierten Lipiddoppelschichten mit Zinkzusatz . . . . .	76
32	<sup>15</sup> N-NMR Spektrum von Dermcidin in orientierten Lipiden mit Zink . . . .	77
33	Mögliche Rolle des Charge Zippers in der antimikrobiellen Funktion von Dermcidin . . . . .	79
34	Vergleich der Ausbeute von rekombinantem Dermcidin . . . . .	80

35	Vorgeschlagenen Kristallstruktur und Funktionsmechanismus von Dermcidin	84
36	CD-Spektren von TisB in verschiedenen Detergenzien und Lösungsmitteln	91
37	CD-Spektren von TisB in verschiedenen Lipiden	92
38	SRCD-Spektren von TisB in verschiedenen Lipidvesikeln	94
39	OCD-Spektren von TisB	95
40	Temperaturabhängige Membranorientierung von TisB	97
41	Übersicht der fluoreszenzspektroskopischen Versuche	98
42	ANTS/DPX Leakage Experimente mit TisB	99
43	ANTS/DPX Leakage Vergleich zwischen membranaktiven Peptiden und TisB	100
44	Abbau des Kaliumpotentials durch TisB in DOPC Vesikeln	101
45	Vergleich der Kaliumpotentialverringerung zwischen membranaktiven Peptiden und TisB	102
46	Abbau eines Protonengradienten in Abhängigkeit von der TisB Konzentration	103
47	Vergleich des Abbaus eines Protonengradienten zwischen TisB und membranaktiven Peptiden	104
48	Bestimmung des Hill-Koeffizienten von TisB	105
49	Hypothetisches Charge Zipper Motiv in der TisB Sequenz von <i>E. coli</i> K12	106
50	TisB Sequenzvergleich	106
51	<i>Helical Wheel</i> und <i>Helical Net</i> Projektionen von TisB	109
52	Postulierter Mechanismus der TisB Membrantkopplung	110
53	Direkter Nachweis der biologischen Relevanz des Charge Zippers in TisB	111
54	Verwendete Plasmide zur Herstellung von rekombinantem Dermcidin	137
55	Veranschaulichung der Umrechnung Fluoreszenzsignal in pH-Wert	171

## Tabellenverzeichnis

1	PCR Ansatz . . . . .	16
2	Temperaturzyklen der PCR . . . . .	16
3	Restriktionsverdauansätze . . . . .	17
4	Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele . . . . .	18
5	Messparameter für die CD- und SRCD-Spektroskopie . . . . .	25
6	Messparameter für die OCD-Spektroskopie . . . . .	26
7	TatA <sub>d</sub> ähnliche Proteine in der UNIPROT Datenbank . . . . .	40
8	$\alpha$ -helikale Proteine mit einem HCZ-Motiv der Länge $m \geq 4$ . . . . .	43
9	HCZ-Motiv tragende Proteine mit $m = 2$ und $m = 3$ . . . . .	44
10	Antimikrobielles Spektrum von Dermcidin und seinen Derivaten . . . . .	59
11	Dekonvolution von Dermcidin in verschiedenen Lösungsmitteln . . . . .	72
12	Dekonvolution von Dermcidin bei unterschiedlichen pH-Werten . . . . .	73
13	Sekundärstrukturvorhersage von TisB . . . . .	90
14	Vorhersage von transmembranen Bereichen in der TisB Primärstruktur . . . . .	90
15	Dekonvolution von TisB in verschiedenen Lösungsmitteln . . . . .	92
16	Dekonvolution von TisB in Lipidvesikeln (CD-Daten) . . . . .	93
17	Dekonvolution von TisB in Lipidvesikeln (SRCD-Daten) . . . . .	94
18	Gerätschaften und Verbrauchsmaterial . . . . .	126
19	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	128
20	Kommerzielle molekularbiologische Kits . . . . .	130
21	Verwendete Enzyme und Proteine . . . . .	130
22	Sequenzen und physikalische Daten der verwendeten Proteine . . . . .	131
26	Verwendete DNA Oligonukleotide . . . . .	138
27	Sequenzierung des Plasmids pETGB1 $\alpha$ -DCD1L . . . . .	169



## Abkürzungsverzeichnis

$\epsilon$ .....	Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i> .....	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i> .....	<i>Staphylococcus aureus</i>
ad .....	auffüllen auf
AMP .....	Antimikrobielles Peptid
Amp .....	Ampicillin
APD .....	Antimicrobial Peptide Database
APH .....	Amphipathische Helix
APS .....	Ammoniumpersulfat
AS .....	Aminosäure
bidest. ....	Reinstwasser
bp .....	Basenpaare
CD-Spektroskopie .....	Zirkulardichroismus-Spektroskopie
DCR .....	Densely charged region
ddH <sub>2</sub> O .....	Reinstwasser
DDM .....	Dodecylmaltosid
DTT .....	Dithiothreitol
EDTA .....	Ethylendiamintetraacetat
ER .....	Endoplasmatisches Retikulum
etc. ....	Et cetera
fwd .....	forward
GpA .....	Glycophorin A
HCZ-Motiv .....	Hypothetisches Charge Zipper Motiv
HMM .....	Hidden Markov Model
IMAC .....	Immobilized metal affinity chromatography
IPTG .....	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb .....	Kilobasenpaare
LB .....	Lysogeny broth
MALDI/TOF .....	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight
OCD-Spektroskopie .....	Orientierte Zirkulardichroismus-Spektroskopie
OD <sub>600</sub> .....	Optische Dichte bei 600 nm
ORF .....	Open reading frame
PCR .....	Polymerase chain reaction
PCZ-Motiv .....	Potentielles Charge Zipper Motiv
ppm .....	Parts per million
RCZ-Motiv .....	Realisiertes Charge Zipper Motiv
rev .....	reverse
SDS .....	Sodiumdodecylsulfat
SEC .....	Size exclusion chromatography
SRCD-Spektroskopie .....	Synchrotronstrahlungszirkulardichroismus-Spektroskopie
TA-System .....	Toxin/Antitoxin-System
TAE .....	Tris-Acetat-EDTA
TEMED .....	Tetramethylethylendiamin
TFE .....	Trifluorethanol
v/v .....	Volumen pro Volumen
w/v .....	Gewicht pro Volumen

## Zusammenfassung

Der sogenannte „Charge Zipper“ stellt ein neuartiges Assemblierungsmotiv für membranständige Proteine dar, welches kürzlich in der Proteintranslokase Tat, in Form einer „Leiter“ oder eines „Reißverschlusses“ von Salzbrücken in den porenbildenden Segmenten entdeckt wurde. Basierend auf dieser Beobachtung sollten in dieser Arbeit weitere Charge Zipper Motive enthaltende Proteine identifiziert werden. Zusätzlich sollten an ausgewählten Beispielen die Relevanz der gefundenen Charge Zipper Motive für deren jeweilige Proteinstruktur und Funktion überprüft werden.

Hierzu war es zu Beginn nötig, einen entsprechenden Algorithmus zu entwickeln, der anhand von Primärstrukturen Charge Zipper Motive auffinden kann. Dies konnte entsprechend realisiert werden, und dadurch war es möglich, alle etwa 540000 Proteinsequenzen in der UNIPROT Datenbank, sowie die etwa 2200 Sequenzen in der APD auf Charge Zipper Motive zu untersuchen. Es konnten dabei etwa 6100 TatA<sub>d</sub> ähnliche Proteine identifiziert werden. Leider lagen für diese Proteine keine hochauflösenden Strukturen vor, so dass nicht überprüft werden konnte, ob die entsprechenden Aminosäuren tatsächlich miteinander Salzbrücken ausbilden. Diese etwa 6100 Proteine stellen allerdings eine Grundlage für viele Jahre Forschung auf dem Gebiet der Proteininteraktion in Membranen über geladene Reste dar. Unter anderem konnten das Protein E<sup>rns</sup> aus dem bovinen Virusdiarrhoe-Virus, humanes Dermcidin und das membranaktive Peptid TisB identifiziert werden.

Die Rolle des Charge Zippers im E<sup>rns</sup> Protein wird hier auf Basis der bisherigen Literaturdaten zu Struktur und Funktion von E<sup>rns</sup> diskutiert, wohingegen TisB und Dermcidin auch experimentell untersucht wurden.

Zur strukturellen Charakterisierung des antimikrobiellen Proteins Dermcidin aus menschlichem Schweiß wurde dieses rekombinant in *E. coli* hergestellt. Hierbei konnte im Vergleich zu Literaturwerten die höchste bisher erreichte Ausbeute erhalten werden. Auch die antimikrobielle Aktivität des rekombinanten Dermcidins wurde überprüft. Hierbei konnte im Gegensatz zu den Literaturdaten keine antimikrobielle Aktivität von Dermcidin festgestellt werden, obwohl die Masse den Literaturwerten entspricht. Anschließend wurde Dermcidin strukturell mittels CD-Spektroskopie untersucht. Hierbei konnte ein hoher  $\alpha$ -helikaler Anteil in membranitierenden Detergezien bestimmt werden. Ebenfalls sollte die

Membranorientierung von Dermcidin über Festkörper-NMR-Experimente ermittelt werden. Dermcidin nimmt dabei einen oberflächlich gebundenen Zustand auf orientierten Lipiddoppelschichten ein. Da hier kein Transmembran-Zustand beobachtet wurde, konnte noch keine abschließende Aussage zur biologischen Relevanz des Charge Zippers in Dermcidin getroffen werden.

Weiterhin wurde das bakterielle „Stress-response“ Peptid TisB aus *E. coli* strukturell und funktionell untersucht. TisB faltet sich in eine amphipathische  $\alpha$ -Helix, die sich in Abhängigkeit von der Temperatur und der Proteinkonzentration senkrecht in eine orientierte Lipiddoppelschicht einlagert. Fluoreszenzspektroskopische Messungen ergaben, dass TisB keine großen Poren wie andere, bekannte membranaktive Peptide bildet, sondern lediglich einen Protonengradienten abbauen kann. Mit diesen und anderen Ergebnissen aus dem Arbeitskreis ist es möglich, einen Funktionsmechanismus für TisB auf Basis der Charge Zipper Theorie zu erstellen. Hierbei lagern sich zwei TisB Moleküle antiparallel unter Ausbildung von vier Salzbrücken zusammen und können dadurch in der Membran einen polaren Pfad bilden. Durch diesen können Protonen oder  $\text{OH}^-$  entlang eines Wasserfadens und entlang ihres Konzentrationsgradienten wandern und somit den Potenzial- und pH-Gradienten der inneren bakteriellen Membran entkoppeln. Auf diese Weise leitet TisB bei *E. coli* die Bildung von dormanten Zellen und Biofilmen ein, und das Charge Zipper Motiv ist somit nicht nur ein strukturbildendes sondern auch ein neues mechanistisches Prinzip in Membranproteinen.

## 1 Einleitung

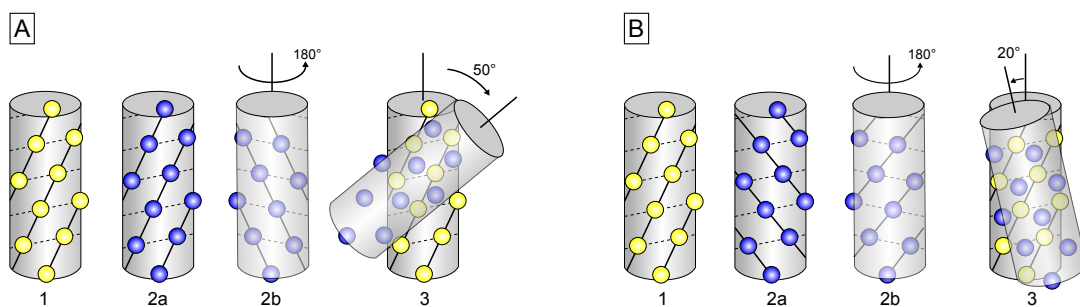
Interaktionen zwischen Proteinen müssen hochspezifisch sein, damit ein bestimmtes Signal, beispielsweise vermittelt durch Rezeptor/Ligand Wechselwirkung, auch die betreffende Wirkung erzielen kann. Diese spezifische Eigenschaft wird unter anderem über komplementäre Oberflächen der beteiligten Proteine gewährt, so dass wie bei einem Puzzlespiel ein Teilchen ins andere passen muss, um eine bestimmte Aktion auszulösen. Diese Interaktion kann lediglich stattfinden, wenn sich die beteiligten Proteine in einem äußerst komplexen Prozess vom linearen Polypeptid in ein strukturell und funktionelles Protein falten [1]. Nur dadurch sind spezifische Interaktionen mit anderen Proteinen gewährleistet.

Zuerst müssen sich aus Polypeptidketten, Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Stränge bilden, bevor sich diese Strukturen wiederum in die finale Tertiärstruktur eines Proteins anordnen können. Es kann durch die Zusammenlagerung von mehreren Proteinen ein sogar noch höherer Organisationsgrad erreicht werden. Diese Quartärstrukturen spielen bei fast allen zellulären Prozessen eine Rolle. Ohne diese makromolekularen Proteinassamblierungen wäre es unmöglich einen Organismus am Leben zu erhalten. Solche funktionellen Quartärstrukturen sind jedoch nur möglich, wenn sich die beteiligten Tertiärstrukturen und damit die Sekundärstrukturen sehr dicht zusammenlagern, um beispielsweise das katalytische Zentrum eines Enzyms zu bilden. Damit solch eine Ebene der Proteinintegrität erreicht werden kann, muss die dichte Packung von Sekundärstrukturen über spezifische Interaktionen stabilisiert werden. Hierzu zählen hydrophobe Interaktionen, beziehungsweise der hydrophobe Effekt, kovalente Bindungen über Isopeptidbindungen oder Disulfidbrücken, Wasserstoffbrücken und elektrostatische Interaktionen über komplementär geladene Seitenketten. Letztere spielen eine permanente Rolle in dieser Arbeit.

### 1.1 Packungsprinzipien von Sekundärstrukturen

Neben Schleifen stellen helikale und  $\beta$ -Strang Faltungen den Großteil der Sekundärstrukturen in Proteinen dar. Vor allem die  $\alpha$ -Helix ist nahezu omnipräsent in Proteinen. Die  $\alpha$ -Helix nimmt dabei eine hochkondensierte, zylinderartige Struktur ein, über welche es dem Protein möglich ist, sich sehr dicht zu packen. Die Seitenketten der beteiligten Aminosäuren zeigen dabei in einer helikalen Anordnung weg vom Zylinder. Stabilität gewinnt die

$\alpha$ -Helix durch Wasserstoffbrücken zwischen jedem Carboxylsauerstoffatom der Aminosäure an Position  $i$  und dem Amidproton der Aminosäure an Position  $i + 4$  im Proteinerückgrat. Diese sich wiederholende Anordnung führt zu etwa 3,6 Aminosäuren pro  $360^\circ$  Drehung und einem  $100^\circ$  Winkel zwischen benachbarten Aminosäuren im Bezug auf des Zentrum der Helix. Daher liegen benachbarte Aminosäuren annähernd auf gegenüberliegenden Seiten der Helix, während Aminosäuren die durch 3 oder 4 Reste voneinander entfernt sind, auf der selben helikalen Seite positioniert sind.



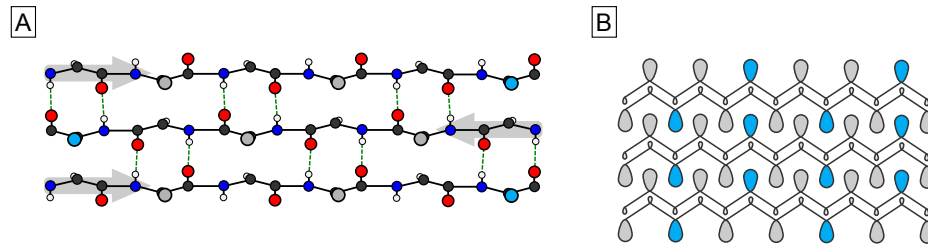
**Abbildung 1** – Möglichkeiten der Helix-Helix Packung. (A) Die Erhöhungen von zwei  $\alpha$ -Helices getrennt durch vier Reste sind jeweils gelb und blau gekennzeichnet (1, 2a). Um zu interagieren muss Helix 2 um  $180^\circ$  gedreht werden (2b). Um nun die Erhöhungen von Helix 2 in den Vertiefungen von Helix 1 zu positionieren, muss Helix 2 um etwa  $50^\circ$  gedreht werden. (B) In Helix 1 sind die Erhöhungen um vier Reste voneinander getrennt (1), während in Helix zwei die Erhöhungen drei Reste voneinander getrennt sind (2a). Um die Erhöhungen von Helix 2 in den Vertiefungen von Helix 1 zu positionieren, muss Helix 2 wiederum um  $180^\circ$  gedreht werden (2b). Anschließend können diese in die Vertiefungen von Helix 1 gelangen, wenn Helix 2 um etwa  $20^\circ$  gedreht wird. Modifiziert nach [2]

Durch diese Arrangement von Aminosäuren entsteht eine besondere Topologie der Helix. Es entstehen Erhöhungen und Vertiefungen auf der Oberfläche der Helix, die eine sehr dichte Packung zulassen. Dabei werden zwei Helices so positioniert, dass die Erhöhungen einer Helix, in die Vertiefungen einer anderen Helix zeigen.

Dabei sind zwei Arten von Erhöhungen zu beobachten. Erhöhungen die durch Aminosäuren entstehen, die drei Reste voneinander entfernt sind und Erhöhungen die durch vier Reste voneinander getrennt sind. Dieser Unterschied führt prinzipiell zu zwei verschiedenen Arten, wie sich Helices zusammenlagern können (Abbildung 1). Wenn die Erhöhungen durch vier Reste voneinander getrennt sind und diese in den Vertiefungen von einer anderen Helix positioniert werden, so nehmen die Helices einen Winkel von etwa  $50^\circ$  entlang der Helixachsen ein (Abbildung 1A). Dieses Packungsprinzip wird in globulären Proteinen

wie beispielsweise Hämoglobin in humanen Erythrozyten beobachtet [3]. Die andere Art, wie Helices sehr dicht gepackt werden können, besteht darin die Erhöhungen die durch drei Reste voneinander entfernt sind in den Vertiefungen einer anderen Helix zu positionieren. Hierdurch entsteht ein Winkel von etwa  $20^\circ$  (Abbildung 1B). Diese Art der Helixanordnung wird in der prominenten 4-Helixbündelanordnung, wie sie beispielsweise in Cytochromen vorkommen, beobachtet. Auch ermöglicht diese Anordnung hydrophobe Interaktionen von amphipathischen Helices in wässriger Umgebung wie dem Zytoplasma [2,4].

Neben  $\alpha$ -Helices können sich  $\beta$ -Stränge beziehungsweise  $\beta$ -Faltblätter ebenfalls sehr dicht aneinander lagern. Die  $\beta$ -Strang Konfiguration besteht dabei aus einer regelmäßigen Abfolge von Aminosäuren, deren Seitenketten abwechselnd um  $180^\circ$  gedreht sind und somit alternierend im Bezug zum Proteinerückgrat nach oben und unten zeigen. Diese Stränge können sich dann, verknüpft durch Wasserstoffbrücken zwischen den Carbonylsauerstoffatomen eines Stranges und den Amidprotonen eines anderen Stranges, zu  $\beta$ -Faltblättern zusammenlagern (Abbildung 2). Dies kann entweder parallel oder antiparallel erfolgen. Dieses Packungsprinzip ist zum Beispiel nahezu perfekt in Spinnenseide realisiert. Spinnenseide aus *Bombyx mori* besteht aus zwei Proteinen: Sericin und Fibroin. Dabei besitzt Fibroin in seiner Primärstruktur ein hochkonserviertes Sequenzmotiv aus sechs Aminosäuren: GAGAGS. Dieses Motiv kommt in sehr hohen Wiederholungsraten in Fibroin vor und bildet antiparallele  $\beta$ -Faltblätter, welche über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Der Hauptgrund weshalb Spinnenseide ein so extrem robustes Material ist, liegt in der Art und Weise begründet, wie diese antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter gepackt sind. Dabei interkalieren die gegenüberliegenden, voluminöseren Alanin- und Serinreste und die kleineren Glycinreste gleiten aneinander vorbei. So bilden sich eng gepackte  $\beta$ -Faltblattschichten, die die feste Struktur und hohe Materialstärke von Spinnenseide erklären [5].



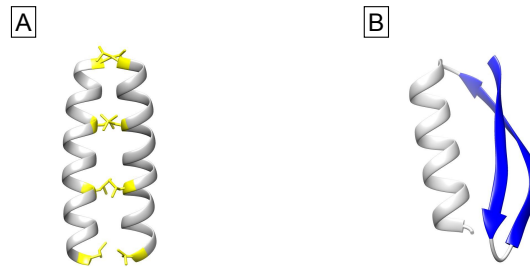
**Abbildung 2** –  $\beta$ -Stränge und  $\beta$ -Faltblätter des Seidenfibroins. (A) Antiparallele  $\beta$ -Stränge sind über Wasserstoffbrücken (grün) verknüpft. Es bilden sich große, antiparallele  $\beta$ -Faltblätter. (B) Die „Glitschigkeit“ des Seidenfibroins wird durch die enge Packung von geschichteten  $\beta$ -Faltblättern ermöglicht, indem die Glycin-Ebenen aneinander vorbei gleiten können und die voluminöseren Seitenketten von Alanin (grau) bzw. Serin (blau), welche sich gegenüber liegen, interkalieren.

## 1.2 Sekundärstrukturinteraktionen in wässriger Umgebung

Sekundärstrukturinteraktionen im Zytoplasma sind allgegenwärtig. Nur durch entsprechende räumliche Anordnung können Proteine miteinander interagieren. Dimerisierungsmotive ermöglichen beispielsweise die Interaktion von  $\alpha$ -Helices. Eines davon ist die so genannte Heptadwiederholung. Eine Heptadwiederholung ist üblicherweise dadurch charakterisiert, dass eine regelmäßige Wiederholung von sieben Aminosäuren **abcdefg** in der Primärstruktur der betreffenden Proteine auftritt. Helikale Proteine, die diese Heptadwiederholung enthalten, können sich umeinander winden und somit eine Supersekundärstruktur einnehmen. Solch eine spiralförmige Anordnung der gewundene Helices wird auch als *coiled-coil* bezeichnet.

Eine bekannte *coiled-coil* Proteinklasse sind die Leucin-Zipper Proteine. Bei ihnen treten an jeder Position **d** der Heptadwiederholung die unpolaren Aminosäuren Leucin, Valin oder Isoleucin auf. Diese konstante Wiederholung der Heptadsequenz führt zu einer amphipathischen Helix, die auf einer Seite die polaren Reste trägt, und auf der anderen Seite der Helix die unpolaren Aminosäuren Leucin, Valin und Isoleucin. Diese amphipathischen Helices winden sich dann zu einem *coiled-coil* umeinander, indem die unpolaren Aminosäurenseitenketten der beiden Helices miteinander in Wechselwirkung treten [6]. Die großen Seitenketten der unpolaren Aminosäuren sind dann wie bei einem Reißverschluss ineinander verzahnt, was zu einer starken Interaktion der beiden Helices führt. Hierbei wird der hydrophobe Effekt ausgenutzt, da die unpolaren Seitenketten nicht mehr gegenüber dem polaren Medium exponiert sind [7]. Leucin-Zipper können dadurch doppelsträngige DNA

binden und sind aus diesem Grund in Transkriptionsfaktoren stark vertreten. In Abbildung 3A ist exemplarisch der Leucin-Zipper des Transkriptionsfaktors GCN4 aus *S. cerevisiae* dargestellt.



**Abbildung 3** – Leucin-Zipper des Proteins GCN4 aus *S. cerevisiae* (A) und Protein G aus *S. aureus*. (A) Die hydrophoben Leucine in GCN4 interagieren miteinander und sorgen für eine stabile Supersekundärstruktur. (B) Immunglobulin-Bindedomäne aus Protein G besitzt ein Helix-Turn-Sheet Motiv. Die Leucinreste in GCN4 sind gelb markiert, das  $\beta$ -Faltblatt in Protein G blau. Aus [8,9]

Eine weitere bekannte Supersekundärstruktur ist die Helix-Turn-Sheet Struktur. Diese kommt beispielsweise in der Immunglobulin-Bindedomäne des Protein G aus *Streptococcus spec.* vor (Abbildung 3B). Dieses Protein besitzt eine hohe Affinität zu  $F_c$ -Regionen von Antikörpern des Typs IgG [10]. Die Supersekundärstruktur lässt sich am einfachsten als Helix, gefolgt von einer Schleife aus 2 bis 4 Aminosäuren und einem anschließenden anti-parallel  $\beta$ -Faltblatt aus zwei  $\beta$ -Strängen beschreiben. Die  $\beta$ -Stränge interagieren dabei über Wasserstoffbrücken im Rückgrat der Polypeptidkette. Ebenfalls stabilisieren Wasserstoffbrücken und Dipol-Dipol Wechselwirkungen die Supersekundärstruktur.

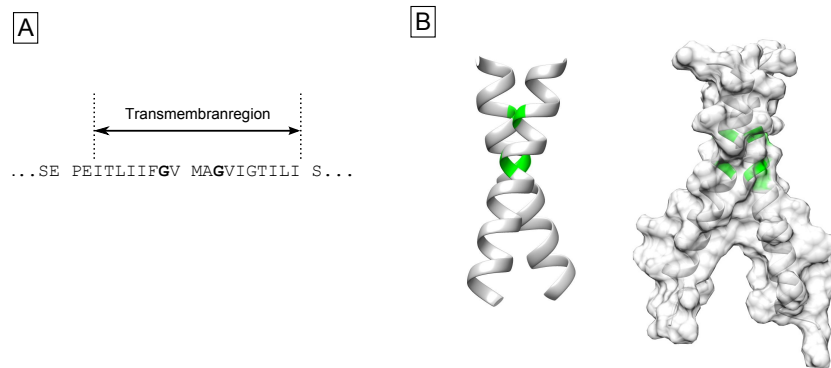


### 1.3 Sekundärstrukturinteraktionen in biologischen Membranen

Die Interaktion von Sekundärstrukturen in biologischen Membranen unterscheidet sich von Interaktionen in wässriger Umgebung. Während in hydrophiler Umgebung polare Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken oder van-der-Waals Kräfte vornehmlich an der Interaktion beteiligt sind, so scheint es zunächst energetisch unvorteilhaft für die Zelle zu sein, polare Aminosäuren in der hydrophoben Membranumgebung unterzubringen. Gleichzeitig sind aber Sekundärstrukturinteraktionen, vermittelt durch polare Wechselwirkungen, aufgrund der hydrophoben Membranumgebung und der daraus resultierenden sehr niedrigen Permittivität, thermodynamisch wesentlich stabiler. Auch lassen sich immer mehr Proteine identifizieren, deren transmembrane Regionen über polare oder geladene Reste miteinander interagieren [11]. Aus diesem Grund stehen elektrostatische Interaktionen in hydrophober Membranumgebung, im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Neben Heptadsequenzen wie sie in Abschnitt 1.2 beschrieben wurden, vermitteln spezielle Dimerisierungsmotive Helix-Helix Interaktionen in Membranen. Hierzu zählt beispielsweise das **GXXXG** Motiv [12]. Hier steht **G** für die Aminosäure Glycin und **X** für eine beliebige Aminosäure. Nichtkovalente Helix-Helix Interaktionen können dabei sehr stark sein, dass es sogar möglich ist in denaturierenden SDS-PAGE Experimenten Dimere nachzuweisen. So auch für das Transmembranprotein Glycophorin A (GpA). Ein Sialoglykoprotein in humanen Erythrozyten [13]. Es wurde durch Mutagenese und Deletion von Aminosäuren gezeigt, dass lediglich die  $\alpha$ -helikale Transmembranregion von GpA zur Dimerisierung notwendig ist. Die Mutation von unter anderem Gly79 und Gly83 in der Transmembranregion des Proteins durch andere hydrophobe Aminosäuren ist dabei ausreichend die Dimerisierung vollständig zu verhindern. So konnten diese beiden Glycin-Reste als Interaktionsstelle identifiziert werden [14]. Die Strukturaufklärung des Dimers brachte ein rechtsgängiges *coiled-coil* hervor und sorgte für ein besseres Verständnis der starken Interaktion der beiden Monomere [15]. Den beiden identifizierten Glycin-Reste in der Transmembranregion kommt dabei besondere Bedeutung zu. Diese sehr kleinen Aminosäuren sind dabei durch drei Reste getrennt und liegen damit auf der selben Seite der Helix. Durch die geringe Größe der Glycine entsteht eine Vertiefung in der Helix. Über diese Vertiefung und mit der Vertiefung der anderen Helix, ist es dem GpA Dimer möglich sehr eng zu packen und

damit stabile Dimere zu bilden (Abbildung 4).



**Abbildung 4** – Das GXXXG Motiv in der Transmembrandomäne von Glycophorin A. (A) Aminosäureabfolge der Transmembrandomäne von GpA. Die beiden Glycine sind fett markiert. (B) Struktur des Transmembrandimers von GpA. Die beiden Glycin-Reste des Dimerisierungsmotivs sind grün hinterlegt. Modifiziert nach [15]

Das GXXXG Motiv ist dabei auch in der Lage künstliche Transmembransequenzen zu dimerisieren. Wird dieses Motiv in Poly-leucin-Helices eingebracht, so beobachtet man auch hier eine starke Dimerisierung [16]. Genomweite Suchen haben überdies ergeben, dass das GXXXG Motiv in Transmembranproteinen überrepräsentiert ist und somit ein allgemeines Prinzip für Helix-Helix Interaktionen in Membranen darstellt [12].

Neben dem GXXXG Motiv können auch polare Seitenketten eine Interaktion von Transmembrandomänen bewirken. Das Motiv QXXS in der Transmembranregion des bakteriellen Aspartatrezeptors Tar ist essentiell für die Dimerisierung dieses Proteins [17]. Werden diese beiden Aminosäuren durch unpolare Reste ersetzt, so kann keine Dimerisierung mehr stattfinden. Interessanterweise führte das Einbringen eines GXXXG Motivs nicht zu einer Dimerisierung, während die Umkehr des QXXS Motivs in ein SXXQ Motiv das Dimer genauso stabilisierte. Die Autoren begründeten dies mit der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Glutamin und Serin-Resten zwischen den Interaktionsflächen der beiden Helices. Neben Serin und Glutamin können auch Histidin-Reste  $\alpha$ -helikale transmembrane Helix-dimere stabilisieren. Dies wird allerdings nur bei Anwesenheit eines GXXXG Dimerisierungsmotivs beobachtet [18].

Salzbrücken tragen ebenfalls zur Interaktion von Sekundärstrukturen in Membranproteinen bei. Die Lactosepermease LacY in *E. coli* besteht aus insgesamt 417 Aminosäuren und

besitzt dabei 12 Transmembranregionen. Über extensive Mutationsstudien wurde nachgewiesen, dass zwischen den Resten Asp237 in der transmembranen Helix VII und Lys358 in Helix XI, sowie Asp240 in Helix VII und Lys319 in Helix X, Salzbrücken entstehen. Werden diese Reste durch unpolare Aminosäuren ersetzt, so kommt es zu einem Verlust der Transportaktivität. Werden jedoch an Stelle der komplementär geladenen Reste Cysteine eingefügt, wird eine vollständige Wiederherstellung des Lactosetransports beobachtet. Die Autoren schlossen aus ihrer Arbeit, dass die Salzbrücken nicht nur wichtig für die strukturelle Integrität der Permease sind, sondern auch effektiv zur Funktion des Transporters beitragen [19–21].

Transporter und Poren können nicht nur von  $\alpha$ -helikalen Strukturen ausgebildet werden, sondern auch von  $\beta$ -Strang-haltigen Proteinen. Dabei bilden  $\beta$ -Stränge, wie in Abschnitt 1.1 bereits beschrieben, amphiphile Strukturen aus, indem abwechselnd polare und unpolare Reste in der Primärstruktur auftreten. Dabei zeigen die unpolaren Reste zur hydrophoben Membranumgebung, während die polaren Seitenketten im Inneren der Pore positioniert sind. Mehrere  $\beta$ -Stränge lagern sich über Wasserstoffbrücken zusammen und bilden eine geschlossene Pore. Somit entsteht ein polarer Kanal, durch welchen ein Stoffaustausch stattfinden kann.

Solche Strukturen werden als  $\beta$ -barrels bezeichnet und werden durch zwei grundsätzliche Parameter beschrieben. Die Anzahl an  $\beta$ -Strängen die an der Pore beteiligt sind ( $n$ ) und die Schiebung  $S$ , welche ein Maß für den Versatz der  $\beta$ -Stränge im  $\beta$ -Faltblatt darstellt. Diese beiden Parameter legen dabei die Steigung der  $\beta$ -Faltblätter und den Porendurchmesser fest. Damit sich Wasserstoffbrücken zwischen den  $\beta$ -Strängen ausbilden können, müssen diese zusätzlich noch gebeugt und gedreht werden.

Prominente  $\beta$ -barrels kommen in bakteriellen Porinen vor. Diese befinden sich in der äußeren Membran von Gram negativen Bakterien und ermöglichen die Diffusion von hydrophilen Stoffen, ohne dabei eine Substratspezifität zu zeigen [22]. Das wohl bekannteste  $\beta$ -barrel Protein ist das Homotrimer OmpF aus *E. coli* [23]. Es besteht aus insgesamt 16 transmembranen  $\beta$ -Strängen, die es dem Protein erlauben, eine wassergefüllte Pore über die Ionen und Nährstoffe ausgetauscht werden, zu bilden.

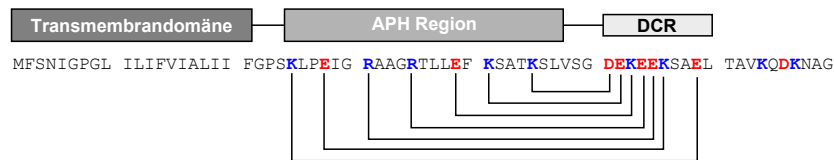
## 1.4 TatA<sub>d</sub> und die Charge Zipper Hypothese

Ein weiteres Transmembranprotein, in welchem Salzbrücken zur Struktur und Funktion beitragen, ist das TatA<sub>d</sub> Protein aus *Bacillus subtilis*. TatA<sub>d</sub> ist dabei eine Komponente des *twin-arginine-transport* (Tat)-Systems in Bakterien, Archäen und pflanzlichen Chloroplasten. Im Zusammenspiel mit TatC bilden TatA Proteine einen multimeren Komplex in der bakteriellen Membran von *B. subtilis*. In Gram negativen Organismen wie *E. coli* ist ein weiteres Protein am Tat-System beteiligt: TatB.

Der TatA(B)C Komplex hat die Aufgabe gefaltete Proteine über biologische Membranen zu transportieren [24]. Die Fracht wird dabei über ein Doppelargininmotiv in der Signalsequenz des zu transportierenden Proteins erkannt [25]. Das TatA<sub>d</sub> Protein lässt sich strukturell in drei verschiedene Regionen einteilen: Ein N-terminales  $\alpha$ -helikales Transmembransegment, welches über eine flexible Region mit einer amphipathischen Helix (APH) verbunden ist und ein unstrukturierter, stark geladener C-Terminus (densly charged region, DCR) [26–28].

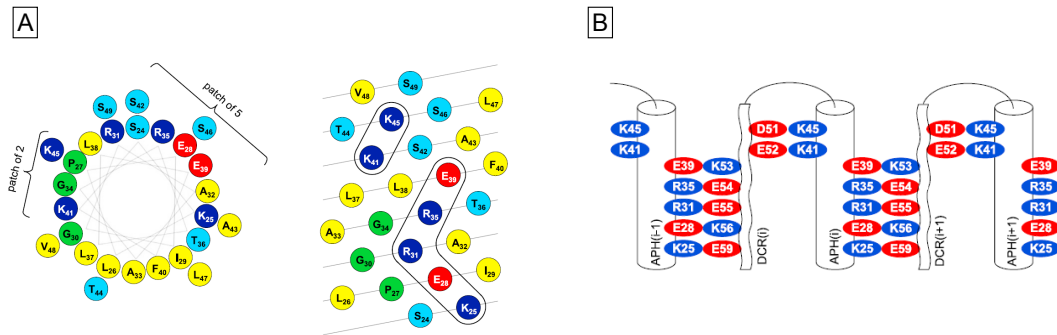
Der Tat-Komplex kann transiente Poren mit variablen Durchmessern bilden. Wie genau dies bewerkstelligt wird, ist noch nicht genau geklärt. Daher existieren mehrere Modelle um die Funktion des Tat-Komplexes zu erklären. Unter anderem der sogenannte Falltür-Mechanismus: Nachdem das zu exportierende Protein mit seinem Doppelargininmotiv an den Tat-Komplex gebunden hat, integriert die APH Region zusammen mit dem C-terminalen Bereich in die Membran. Dadurch entsteht eine hydrophile Pore, die es erlaubt das Protein nach außen zu transportieren [29]. Bisher wurde dieses Modell nicht experimentell nachgewiesen. Vor kurzem jedoch konnte über Mutationsstudien und Immunoblotting Techniken sowie MD Simulationen ein neuartiger Mechanismus für den Proteinexport durch das Tat-System beschrieben werden [30]. Hierbei fanden Walther et al. eine spezielle Anordnung von komplementär geladenen Aminosäuren in der Primärstruktur von TatA<sub>d</sub>. Wirft man einen genaueren Blick auf die Anordnung der geladenen Reste in TatA<sub>d</sub>, so kann man erkennen, dass die Ladungen der Reste an einer imaginären Spiegelebene komplementär abgebildet sind. Diese komplementär geladenen Aminosäurepaare könnten sich zu Salzbrücken aneinander lagern. Ein so bezeichneter „Charge Zipper“ könnte die Bildung einer Pore erklären (Abbildung 5). Die DCR Region könnte sich dabei mit Hilfe von intra-

molekularen Salzbrücken auf die APH-Region zurückfalten. Dadurch wären die Ladungen neutralisiert und die Integration in die Membran erleichtert. Ein großporiger Kanal könnte nun durch intermolekulare Salzbrücken entstehen, indem die noch freien geladenen Reste nun Salzbrücken mit ihren Charge Zipper Partnern auf benachbarten TatA<sub>d</sub> Molekülen ausbilden.



**Abbildung 5** – Der Charge Zipper in der Primärstruktur von TatA<sub>d</sub>. Die komplementär geladenen Aminosäurepaare sind mittels Klammern verbunden. Negativ geladene Reste sind rot markiert, während positiv geladene Reste blau markiert sind. Modifiziert nach [30]

Bildet man die APH Region aus TatA<sub>d</sub> in der *Helical Wheel* und der *Helical Net* Projektion ab, so lassen sich zwei Regionen an geladenen Resten auf der Oberfläche der Helix erkennen. Diese beiden Bereiche liegen dabei auf der selben Seite der Helix und sind lediglich durch Leu38 voneinander getrennt (Abbildung 6A). Durch diese sterische Voraussetzung könnte ein Bereich für die intramolekularen Salzbrücken mit dem C-terminalen Teil von TatA<sub>d</sub> sorgen, während der andere Bereich die intermolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen mit den am Charge Zipper beteiligten Aminosäuren eines benachbarten TatA<sub>d</sub> Moleküls ausbilden kann (Abbildung 6B). Durch Substitutions- und Abstoßungsmutanten, sowie durch MD Simulationen konnte gezeigt werden, dass dieses Modell der Porenbildung sterisch und energetisch sinnvoll ist.

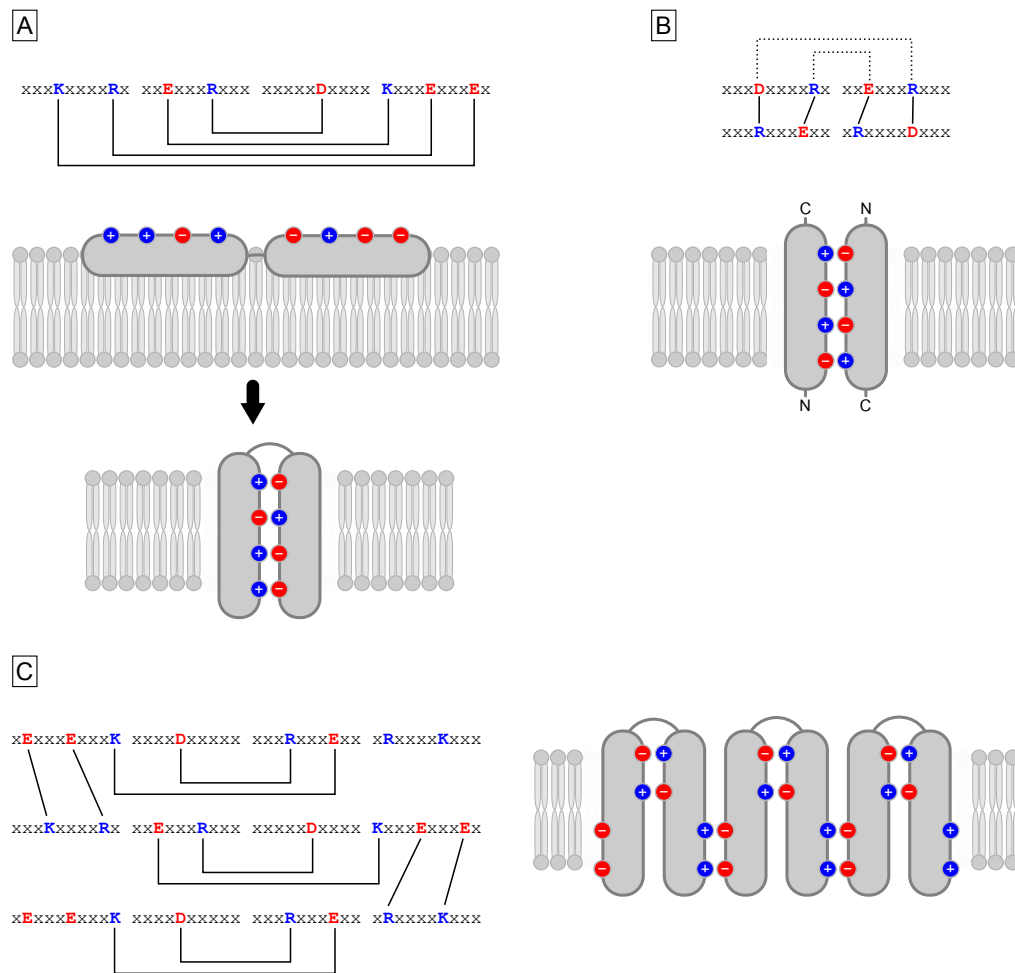


**Abbildung 6** – Der Charge Zipper in TatA<sub>d</sub> als inter- und intramolekulares Assemblierungsmotiv. (A) *Helical Wheel* und *Helical Net* Darstellung der APH Domäne von TatA<sub>d</sub>. Deutlich sind zwei Bereiche mit hoher Ladungsdichte zu erkennen. (B) Multimerisierung von TatA<sub>d</sub> Molekülen in der Membran, stabilisiert durch inter- und intramolekulare Salzbrücken. Aus [30]

Allgemein lassen sich Charge Zipper als eine lineare Abfolge von komplementär geladenen Aminosäuren in der Primärstruktur von Proteinen beschreiben, die eine imaginäre Spiegelebene in der Mitte der Charge Zipper Sequenz tragen, so dass die einander gegenüberliegenden geladenen Reste sich gegenseitig neutralisieren können.

Die Entdeckung von Charge Zippern in der Primärsequenz von TatA<sub>d</sub> lässt vermuten, dass auch andere Proteine über solch ein Motiv verfügen. Mit dessen Hilfe wäre es für Proteine möglich, über die Verbrückung von amphipathischen  $\alpha$ -Helices ihre Ladungen zu neutralisieren und so die großen Unterschiede in den Dielektrizitätskonstanten des Cytosols und der Membran zu überwinden. So könnten diese Proteine in die Membran integrieren oder sie sogar durchqueren.

Es sind mehrere Möglichkeiten denkbar, wie ein Charge Zipper solch eine Konstellation ermöglichen könnte: Zum einen könnten Charge Zipper die Ausbildung von  $\alpha$ -helikalen Haarnadelschleifen ermöglichen, die nun äußerlich gänzlich unpolar sind und somit leicht in die Membran eindringen könnten. Zum anderen könnten sie in kürzeren Helices die gerade einmal lang genug sind um die Membran zu durchspannen, als Multimerisierungsmotiv dienen. Über einen Charge Zipper könnten sich so Dimere oder höhere Oligomere bilden, welche dann zum Beispiel Poren in der Membran ausbilden (Abbildung 7). Der Charge Zipper führt in dieser Konstellation zu intermolekularen Salzbrücken, während beim ersten Fall intramolekulare Salzbrücken ausgebildet werden. Auch eine gleichzeitige Ausbildung von inter- und intramolekularen Salzbrücken, wie sie höchstwahrscheinlich in TatA<sub>d</sub> vorkommen, ist denkbar.



**Abbildung 7** – Möglichkeiten der strukturellen Realisierung von Charge Zippeln (A) Die Ausbildung einer  $\alpha$ -helikalen Haarnadelschleife könnte über intramolekulare Ausbildung von Salzbrücken zwischen den am Charge Zipper beteiligten geladenen Aminosäuren zu Stande kommen. Dies würde es dem Protein ermöglichen in die Membran einzudringen. (B) Der Charge Zipper als Multimerisationsmotiv. Über den Charge Zipper könnten sich kurze  $\alpha$ -helikale Proteine antiparallel zusammenlagern und dadurch in die Membran integrieren. Der Charge Zipper bildet in diesem Beispiel intermolekulare Salzbrücken aus. (C) Denkbar sind ebenso Mischformen wie sie in TatA<sub>4</sub> vorkommen und die dann zu höheren Oligomeren führen würden. Hier finden sich intra- und intermolekulare Salzbrücken.

## 2 Hintergrund und Ziel der Arbeit

Die in TatA<sub>d</sub> gefundene Abfolge an komplementär geladenen Aminosäuren, auch als Charge Zipper Motiv bezeichnet, wurde erst kürzlich als Membranproteinassemblierungsmotiv beschrieben [30]. Walther et al. haben gezeigt, dass der Charge Zipper in anderen TatA Proteinen weitestgehend konserviert ist und damit sogar ein allgemeines Prinzip darstellen könnte, wie Proteine einen Übergang zwischen den unterschiedlichen Dielektrizitätskonstanten des Cytosol und in der hydrophoben Membran bewältigen können.

Dabei können Charge Zipper theoretisch auf unterschiedliche Arten eine Membranintegration von Proteinen induzieren. Zum einen können durch intramolekulare Ausbildung von Salzbrücken die geladenen Reste von amphipathischen Molekülen neutralisiert werden und somit den Energiebedarf für eine Insertion in die Lipiddoppelschicht herabsetzen. Des Weiteren kann das Charge Zipper Motiv auch als Multimerisierungsmotiv genutzt werden, indem sich beispielsweise kurze  $\alpha$ -helikale Proteine über ihren Charge Zipper komplementär aneinanderlagern und somit eine Integration in die Membran über Ladungsneutralisation herbeiführen.

Vor diesem Hintergrund sollten in dieser Arbeit weitere Charge Zipper tragende Proteine identifiziert werden. Hierzu musste zuerst ein geeigneter Algorithmus zur Suche der entsprechenden Proteine entwickelt werden. Im Anschluss daran sollte mittels Proteindatenbanken eine genomweite Suche nach Charge Zippern durchgeführt werden. Dabei sollte ein besonderes Augenmerk auf Proteine gelegt werden, welche ähnliche strukturelle Eigenschaften wie TatA<sub>d</sub> aus *B. subtilis* haben. Neben dieser speziellen Suche sollte auch allgemein nach Proteinen gesucht werden, bei denen ein Charge Zipper möglicherweise eine tragende Rolle in der Struktur und Funktion spielt. Ebenfalls sollte die Identifizierung von Charge Zipper haltigen Proteinen auf die Antimicrobial Peptide Database (APD) ausgeweitet werden.

Wenn bei der Suche entsprechende Sequenzen gefunden werden sollten, so sollten diese Proteine auch experimentell untersucht werden. Um dazu größere Mengen an Protein zur Verfügung zu haben, sollten ausgewählte Proteine rekombinant hergestellt werden. Insbesondere sollten Strukturuntersuchungen mittels Zirkulardichroismus- und Festkörper-NMR-Spektroskopie durchgeführt werden, um die biologische Relevanz der postulierten Charge Zipper in den jeweiligen Proteinen zu überprüfen.



## 3 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien finden sich in Anhang 6.1 wieder.

### 3.1 Methoden

#### 3.1.1 Molekularbiologische Methoden

**Zellkultivierung** Zur Herstellung von Vorkulturen für die Proteinexpression und generelle Manipulation von DNA wurden zu 20 mL LB-Medium mit einem entsprechenden Antibiotikum supplementiert und mit einem Kryokügelchen, welches die transformierten *E. coli* Zellen trug, inokuliert. Alternativ wurde eine Kultur von einer Agarplatte mittels einer Pipettenspitze gepickt und damit das Medium inokuliert. Die Herstellung der Kryokügelchen erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Die Kultur wurde danach über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Für eine Expressionskultur wurde am nächsten Morgen zu 1 L LB- oder M9-Medium in einem 2 L Erlenmeyerkolben, ein entsprechendes Antibiotikum und 1 mL der Vorkultur gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7. Anschließend wurde die Proteinexpression gestartet (Abschnitt 3.1.3).

**Transformation von *E. coli* Zellen** Zur Hitzeschocktransformation wurden 60 µL Aliquots von kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden etwa 100 ng Plasmid-DNA zugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das Wasserbad auf 42 °C erwärmt. Nach der Inkubationszeit auf Eis wurde die Zell-/DNA-Suspension für 1 min im Wasserbad erwärmt. Daraufhin wurden sofort 900 µL vorgewärmtes, steriles LB-Medium zugegeben und das Ganze für 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 3000 rpm für 3 min zentrifugiert, 900 µL Überstand verworfen und das Pellet im restlichen Überstand resuspendiert. Die Zellsuspension wurde danach auf einer LB-Platte, die mit dem entsprechenden Antibiotikum supplementiert war, ausplattiert.

**Vermehrung und Isolation von Plasmid DNA** Wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, wurde eine 5 mL *E. coli* Zellkultur hergestellt. Die Übernachtskultur anschließend in ein

15 mL Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Im Anschluß daran wurde zur Plasmidisolierung das Quiagen MiniPrep Kit, nach Angaben des Herstellers, verwendet.

**Herstellung von hitzekompetenten Zellen** *E. coli* DH5 $\alpha$  und BL21 (DE3) hitzekompetente Zellen wurden nach der Inoue-Methode hergestellt [31].

### 3.1.2 Generelle Methoden zur DNA Manipulation

**Agarose Gelelektrophorese** Zur Längenauftrennung von DNA wurden Agarosegele mit 0,8 %, 1 % und 1,5 % Agarose (w/v) verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge an Agarose abgewogen und mit TAE Puffer, durch Erhitzen in der Mikrowelle, aufgelöst. Nachdem sich die Lösung auf etwa 70 °C abgekühlt hatte, wurden zu 50 mL Lösung, 5  $\mu$ L Ethidiumbromidlösung gegeben, dreimal invertiert und anschließend in den vorbereiteten Gelgießstand gefüllt. Zur Herstellung von Taschen zur Probenapplikation, wurde ein Kamm in die Lösung gesteckt. Nachdem das Gel vollständig erstarrt war, wurde die Gelkassette in die Elektrophoreseapparatur eingebracht, vollständig mit TAE Puffer bedeckt und der Kamm gezogen. Nun wurden die DNA Proben mit einem Fünftel ihres Volumen an 6 $\times$  DNA Ladepuffer versetzt, gevortext und in die Geltaschen pipettiert. Zur Auftrennung wurden 100 V für etwa 50 min angelegt.

**Polymerase Kettenreaktion (PCR)** Um DNA Abschnitte zu amplifizieren wurde die Polymerase Kettenreaktion verwendet. Für gewöhnlich wurde ein 50  $\mu$ L Reaktion angesetzt (Tabelle 1). Bei mehreren 50  $\mu$ L Ansätzen wurde die Menge an Komponenten mit dem Faktor 1,1 multipliziert. Die Temperaturzyklen zur eigentlichen Amplifizierung der parentalen DNA sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 1 – PCR Ansatz

Bestandteil	Menge für 1× Ansatz
Parentale DNA	100 ng
Primer fwd (10 µmol)	1 µL
Primer rev (10 µmol)	1 µL
Puffer (10×)	5 µL
dNTPs (10 mmol)	1 µL
Taq Polymerase	0,5U
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µL

Tabelle 2 – Temperaturzyklen der PCR

Abfolge	Zyklen	Beschreibung	Temperatur °C	Zeit min
1	1	Denaturierung	95	5
2	30	Denaturierung	95	0,5
		Annealing	55	0,5
		Elongation	74	0,75
3	1	Elongation	74	5

**Sequenzierung** Nach erfolgreicher PCR und visueller Bestätigung einer Bande, die der Größe des zu inserierenden Fragment, entsprach, wurde eine Probe des Vektors zur Firma Eurofins geschickt, die die Sequenzierung durchführte (siehe Anhang 27).

**Bestimmung der DNA Konzentration in Lösung** Zur DNA Konzentrationsbestimmung wurde ein Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer verwendet. Hierzu wurde mit Elutionspuffer ein Referenzwert bestimmt und die Konzentration gegen diesen Wert ermittelt.

**Restriktionsverdau** Tabelle 3 gibt die Menge an verwendeter DNA und Restriktionsenzym an. Als Puffer wurden die jeweiligen empfohlenen Puffer der Firma Fermentas ver-

wendet. Die Inkubation des Verdaus erfolgte für 3 h bei 37 °C.

**Tabelle 3** – Restriktionsverdauansätze

<b>Bestandteil</b>	<b>25 µL Ansatz</b>	<b>50 µL Ansatz</b>
DNA	1 µg	8 µg
Puffer 5 ×	5 µL	10 µL
Nuklease	1 µL	5 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µL	ad 50 µL

**Ligation** Zur Ligation von DNA wurde das RapidLigation Kit der Firma Fermentas verwendet und nach dessen Protokoll vorgegangen. Das Vektor zu Insert Verhältnis betrug 3:1. Der Ligationsschritt wurde zur Wahrung einer konstanten Temperatur im PCR Cycler durchgeführt. Anschließend wurde nicht wie im Kit angegeben 2 µL bis 5 µL verwendet, sondern die gesamten 20 µL.

### 3.1.3 Generelle Methoden zur Protein Manipulation

**Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung** Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung wurde das Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer verwendet und die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm gemessen. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten (siehe Anhang Tabelle 21) konnte die Konzentration photometrisch bestimmt werden. Bei Proteinen die keinen Extinktionskoeffizienten besitzen wurde die Konzentration über die Einwaage bestimmt.

**Massenspektrometrie (MALDI-TOF) von Proteinen** Zum Nachweis und zur Reinheitsüberprüfung von Proteinen wurden MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight) Messungen durchgeführt. Hierzu wurde eine sehr geringe Menge an lyophilisierten Protein mit etwa 15 µL bis 25 µL Wasser versetzt. Hierzu wurde eine Matrixlösung von gesättigter 2,5-Dihydroxybenzoesäure im Verhältnis 1:3 zugegeben. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 5000 rpm für 10 min. Daraufhin wurde 1 µL der Lösung auf das Target (Metallträger) pipettiert. Nach dem Eintrocknen der Probe wurde das Target in den Spektrometer platziert und die Messungen durchgeführt.

**Coomassie Färbung** Nach der SDS-PAGE wurde das Gel aus der Elektrophoreseapparatur ausgebaut und das Sammelgel entfernt. Das Trenngel wurde anschließend 30 min schüttelnd in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Gel über Nacht in Färbelösung inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Färbelösung verworfen und das Gel in Entfärbelösung gewaschen. Das Gel wurde anschließend mit einem Gerät digitalisiert.

**Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)** Zur SDS-PAGE wurden Polyacrylamidgele nach Tabelle 4 hergestellt. Nach dem Aufbau der Glasplatten und des Gelgießstandes, wurden zuerst alle Komponenten des Trenngels gemischt und anschließend zur Polymerisation in den Gelgießstand pipettiert. Die Lösung wurde daraufhin mit H<sub>2</sub>O bidest. überschichtet. Nach der Polymerisation wurden die Komponenten des Sammelgels gemischt, das Wasser welches das Trenngel überschichtet entfernt und die Sammelgellösung auf das polymerisierte Trenngel gegeben. Zuletzt wurde ein Kamm der für die Aussparungen zum Auftragen der Proteinproben sorgt, zwischen die Glasplatten gesteckt.

Nach der Polymerisation wurden die Glasplatten aus dem Gelgießstand ausgebaut und in die Elektrophoreseapparatur eingebaut. Der Kamm wurde gezogen und die vorbereiteten Proben in die Aussparungen pipettiert. Daraufhin wurden Anoden- und Kathodenpuffer in die entsprechenden Aussparungen gegeben. Zuletzt wurde die Apparatur verschlossen und eine Spannung von 150 V über einen Zeitraum von 4,5 h angelegt.

**Tabelle 4** – Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele nach [32]

<b>Bestandteil</b>	<b>Trenngel (16 %) mL</b>	<b>Sammelgel (4,5 %) mL</b>
Acrylamid/Bisacrylamid	5,2	0,68
Trenngelpuffer pH 8,45	3,3	–
Sammelgelpuffer pH 6,8	–	1,29
Glyzerin	1,7	–
ddH <sub>2</sub> O	0,4	3,2
TEMED	0,005	0,005
APS	0,035	0,035

**Pufferaustausch und Aufkonzentrieren von Proteinen** Zum Entsalzen und zum Austausch von Puffern bei Proteinlösungen wurden Amicon Konzentratoren der Firma MerckMillipore, in 3 kDa und 10 kDa Porendurchmesser, verwendet. Diese wurden jeweils bei 5000 rpm und 30 min bzw. 45 min verwendet.

**Proteinexpression und Zellernte** Nachdem die Vorkultur entsprechend Abschnitt 3.1.1 vorbereitet wurde und die Zellkultur eine  $OD_{600}$  von 0,7 erreicht hatte, wurde die Kultur 15 min bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden 300  $\mu$ L einer 1 M IPTG Lösung zugegeben (finale IPTG Konzentration von 300  $\mu$ M) und die Kultur bei 220 rpm und 18 °C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Morgen erfolgte die Zellernte, wobei die Kultur in zwei 1 L Zentrifugenbecher aufgeteilt und bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in 30 mL kalten Lysispuffer resuspendiert. Im Anschluß daran erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4 °C und 5000 rpm. Auch hier wurde ebenfalls der Überstand verworfen und das Zellpellet, sofern es nicht sofort weiterverarbeitet wurde, bei -20 °C gelagert.

**Zellaufschluss** Frisches oder 30 min auf Eis aufgetautes Zellpellet (Abschnitt 3.1.3) wurde in 25 mL kalten Lysispuffer resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Ultraschallgefäß überführt und 2 – 3  $\times$  3 min bei 70 % der maximalen Leistung sonifiziert. Die Sonifizierung erfolgte unter Kühlung im Eisbad. Zwischen den Durchgängen lag eine Pause von 2 min. Im Anschluss an den Zellaufschluss wurde das Lysat 2 h bei 4 °C und 26 000 rpm zentrifugiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde nur der Überstand verwendet.

### 3.1.4 Chromatographie

**Nickel-Affinitätschromatographie zur Vorreinigung von Dermcidin** Das Zellysats aus Abschnitt 3.1.3 wurde mittels eines 0,22  $\mu$ m Filters filtriert und in eine 50 mL Ladeschleife gegeben. Im Vorfeld wurden 3  $\times$  5 mL HisTrap Säulen verschraubt und an die FPLC Anlage angeschlossen. Die insgesamt nun 15 mL Säule wurde bei einer Flussrate von 5 mL min<sup>-1</sup> mit 50 mL Lysispuffer äquilibriert. Daraufhin wurde über die Ladeschleife der FPLC Anlage das Zellysats aufgebracht, als Laufmittel diente ebenfalls Lysispuffer (Flussrate 1 mL min<sup>-1</sup>). Nach dem Auftragen des Zellysats wurde die Flussrate auf 5 mL min<sup>-1</sup>

erhöht, bis die  $A_{280}$  unter 0,2 AU lag. Daraufhin wurde mit 3 Säulenvolumen Waschpuffer und im Anschluss 3 Säulenvolumen Lysispuffer äquilibriert (jeweils  $5 \text{ mL min}^{-1}$ ). Nun erfolgte die Elution des His-getaggten Konstrukts über mehrere Stufen. Durch den Gradientenmischer der FPLC Anlage wurde nacheinander mit 5 %, 15 % und 30 % Elutionspuffer eluiert. Das gewünschte Protein eluierte quantitativ erst bei 30 % Elutionspuffer. Als komplementierendes Laufmittel diente Lysispuffer. Die Elutionsflussrate lag bei  $5 \text{ mL min}^{-1}$ . Im Anschluss daran wurde das Eluat, welches das Dermcidinkonstrukt enthielt, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben auf etwa  $5 \text{ mL}$  aufkonzentriert.

**Größenausschlusschromatographie und Enterokinaseverdau von Dermcidin** Vor der weiteren Aufreinigung des Dermcidinkonstrukts wurde eine HiLoad 26/60 Superdex 200 Säule mit  $600 \text{ mL}$  an Enterokinasepuffer äquilibriert ( $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ). Das aufkonzentrierte Eluat aus Abschnitt 3.1.4 wurde daraufhin mittels einer  $50 \text{ mL}$  Ladeschleife auf die äquilibrierte Säule aufgebracht und bei einer Flussrate von  $1,75 \text{ mL min}^{-1}$  eluiert. Die Elution des Dermcidinkonstrukts erfolgte nach etwa  $200 \text{ mL}$ . Als Laufmittel diente ebenfalls Enterokinasepuffer. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem  $50 \text{ mL}$  Falcon Tube vereinigt und die Proteinkonzentration, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, bestimmt. Anschließend wurden pro  $\text{mg}$  Protein,  $0,5 \text{ U}$  Enterokinase hinzugegeben. Der Verdau inkubierte bei Raumtemperatur, über Nacht und bei  $15 \text{ rpm}$  auf einem Tischschüttler.

**Nickel-Affinitätschromatographie zur finalen Aufreinigung von Dermcidin** Natives Dermcidin wurde nun mittels einer finalen Nickel-Affinitätschromatographie vom abgespaltenen Tag befreit, in dem wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben 3 HisTrap Säulen vorbereitet wurden. Die Verdaulösung wurde ebenfalls über eine  $50 \text{ mL}$  Probenschleife auf die Säule aufgebracht ( $1 \text{ mL min}^{-1}$  Flussrate). Nachdem die Verdaulösung vollständig aufgebracht wurde, wurde mit  $20 \text{ mL}$  Lysispuffer gespült. Der komplette Durchfluss enthielt natives Dermcidin und wurde aufgefangen. Im Anschluss daran wurde die Säule regeneriert, indem zuerst über den Gradientenmischer mit 50 % Elutionspuffer eluiert ( $50 \text{ mL}$ ) und danach mit  $50 \text{ mL}$  ethanolischer Lösung (20 % ( $v/v$ )) gespült wurde. Der erhaltene Durchfluss von der Auftragung des Verdaus und dem anschließenden Spülvorgang wurde aufkonzentriert, entsalzt und letztendlich lyophilisiert.

### 3.1.5 Agardiffusionsassays

Zur Durchführung von Agardiffusionsassays wurde eine Übernachtskultur hergestellt (siehe Abschnitt 3.1.1). Diese Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen auf eine  $OD_{550}$  von 0,2 mit Hilfe von sterilem LB-Medium verdünnt. Die verdünnte Kultur wurde bis zu einer  $OD_{550}$  von etwa 2, für 3 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf eine  $OD_{550}$  von 0,2 (*S. aureus*) und 0,125 (*E. coli*) mit sterilem LB-Medium verdünnt. Danach wurden 100  $\mu$ L dieser Zellsuspension zu 17 mL geschmolzenem LB-Agar gegeben, vermischt und in eine Petrischale gegossen. Nach dem Erstarren des Agars wurde mit Hilfe eines kleinen Metallrohres, pro Probe, ein etwa 9 mm breites Loch in den Agar gestanzt. Jedes Loch wurde im Anschluss daran mit 50  $\mu$ L Lösung befüllt, für ungefähr eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen und im Anschluss, über Nacht, bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Durchmesser der Hemmhöfe um die gestanzten Löcher gemessen.

### 3.1.6 Fluoreszenzspektroskopische Methoden

**Vesikelpräparation** Zur Vorbereitung der fluoreszenzspektroskopischen Methoden wurden Lipidvesikel (LUVs) präpariert. Die entsprechenden Mengen an Lipid wurden eingewogen (bei heterogenen Membranen im molaren Verhältnis) und Rhodamin markiertes PE im molaren Verhältnis von  $1:10^{-4}$  zugegeben. Hierdurch konnte spektroskopisch die Lipidmenge nach der Vesikelpräparation genau bestimmt werden. Die eingewogenen Lipide wurden daraufhin in Chloroform gelöst, unter einem milden  $N_2$ -Strom das Chloroform abgedampft. Schlussendlich wurde über Nacht, im Vakuum, die Lipide vom restlichen Chloroform befreit. Nun wurde zu den getrockneten Lipiden der entsprechende Puffer gegeben und gründlich gevortext ( $10 \times 1$  min). Nachdem nun eine milchige Suspension entstand, wurden Gefrier-/Tauzyklen durchgeführt, indem die Suspension abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und daraufhin in einem temperierten Wasserbad (40 °C) aufgetaut wurde. Nach dem vollständigen Verschwinden von Eiskristallen wurde die Suspension für weitere 3 min im Wasserbad inkubiert. Dieser Ablauf wurde  $8 \times$  wiederholt. Um nun LUVs zu generieren, wurde die Suspension mittels eines Extruder und einer Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 100 nm, extrudiert. Dabei wurde die Suspension so



lange abwechselnd durch die Membran gedrückt, bis eine deutliche Klärung der Suspension zu erkennen war, mindestens jedoch  $31 \times$ . Im Anschluss daran wurde die nun klare Vesikelsuspension mittels einer 0,5 mL Gelfiltrationssäule vom überschüssigen Farbstoff befreit, indem 65  $\mu$ L Suspension auf die Säule gegeben wurden und 2 min bei 1500 g zentrifugiert wurde. Der Durchfluss enthielt die gereinigten Vesikel. Die Gelfiltrationssäule wurde im Vorfeld mit dem entsprechenden Puffer der zur Messung verwendet wurde, äquilibriert.

**ANTS/DPX Leakage-Assays** Für die ANTS/DPX Leakage Experimente wurde wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben, Vesikel mit ANTS/DPX-Lösung verwendet. Zur Lipidmengenbestimmung wurde vor jeder Messung die Lipidkonzentration mittels Rhodaminfluoreszenz bestimmt, so dass das Volumen an hinzugegebener Vesikelmenge, um final eine 200  $\mu$ M Lipidkonzentration zu erreichen, bestimmt werden konnte. Das entsprechende Volumen an gewaschenen Lipidvesikeln (zwischen 30  $\mu$ L bis 45  $\mu$ L wurde in eine 1,5 mL Quarzglasküvette gegeben und mittels ANTS/DPX freiem Puffer auf 1,5 mL aufgefüllt. Der Küvetteninhalt wurde mit Hilfe eines Magnetrührers während der Messung ständig homogenisiert. Die Anregungswellenlänge lag bei 422 nm (6 mm Spaltbreite), während die Emissionswellenlänge bei 515 nm (Spaltbreite 6 mm) detektiert wurde. Zur Vermeidung von Artefakten durch Streuung, wurde ein optischer Kantenfilter verwendet. Die Messtemperatur lag bei 30 °C, bei einer Messdauer von 30 min nach Zugabe des Peptids. Peptide wurden aus einer 500  $\mu$ M Stammlösung hinzugegeben. Zur Beendigung der Messung wurden 0,5 vol% Triton-X-100 zugegeben. Die im Anschluss daran gemessene Fluoreszenz stellte gleichzeitig den 100 % Leakagewert dar.

**Kaliumleakage-Assays** Für Kaliumleakage Experimente wurden wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben, Vesikel hergestellt. Als Puffer diente hier Kaliumpuffer. Für das eigentliche Experiment wurde der Farbstoff 1,1',3,3',3',3'-hexamethylindo-dicarbocyanin Iodid (DiIC, Invitrogen) verwendet. Vor der Messung wurde die Lipidkonzentration über die Rhodaminfluoreszenz bestimmt. In einer 1,5 mL Quarzglasaküvette wurde unter Rühren zuerst Natriumpuffer vorgelegt, anschließend der Farbstoff in 2 mol% zu den Vesikeln (4  $\mu$ M), hinzugegeben. Der Farbstoff wurde in einer 90 % ethanolischen Lösung gelöst. Nachdem sich das Fluoreszenzsignal stabilisiert hatte, wurde die entsprechende Menge an Vesikeln hinzu-

gegeben (200  $\mu\text{M}$ ). Durch die Zugabe der Vesikel stieg das Fluoreszenzsignal ebenfalls an. Nach der erneuten Stabilisierung des Signals wurden 80 nM Valinomycin in die Küvette pipettiert. Auch hier erhöhte sich ebenfalls das Fluoreszenzsignal ein weiteres mal. Nachdem sich das Signal stabilisiert hat, wurden verschiedene Konzentration an Peptid (aus 500  $\mu\text{M}$  Stammlösung) zugegeben, jedoch immer 20  $\mu\text{L}$ , so dass das finale Volumen in der Küvette stets 1,5 mL betrug (siehe [33]). Der 100 % Potentialverlustwert wurde erreicht, indem 40  $\mu\text{M}$  Alamethicin hinzugegeben wurden. Die Anregung des Farbstoffes erfolgte bei 620 nm und Emission bei 680 nm. Die Temperatur betrug bei allen Messungen stets 30 °C.

**Protonenleakage-Assays** Zur Messung des Abbaus eines Protonengradienten wurden Vesikel nach Abschnitt 3.1.6 hergestellt. Diese Vesikel enthielten im inneren einen HPTS-haltigen MES Puffer mit pH 6,5. Durch Messung der Rhodaminfluoreszenz nach der Aufreinigung der Vesikel wurde die entsprechende Vesikelmenge für eine Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  berechnet. Üblicherweise betrug die Menge zwischen 30  $\mu\text{L}$  und 45  $\mu\text{L}$ . Die entsprechende Vesikelmenge wurde in eine Quarzglasküvette gegeben und mit pH 7,5 HEPES Puffer auf 1500 mL aufgefüllt. Daraufhin wurde die Absorption von HPTS um 512 nm bei Anregungswellenlängen von 403 nm und 454 nm bestimmt. Aus den ermittelten Werten wurde dann nach Anhang 6.6 der pH Wert der Vesikel vor und nach der Messzeit von 30 min bestimmt. Die Messung wurde durch die Zugabe von jeweils 48  $\mu\text{L}$  Peptidlösung (mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen) gestartet. Die Messtemperatur betrug bei allen Messungen stets 30 °C. Die Umrechnung des erhaltenen Fluoreszenzsignals in pH-Einheiten erfolgte wie in Abschnitt 6.6 beschrieben.

**Bestimmung des Hill-Koeffizienten** Zur Bestimmung des Hill-Koeffizienten wurden die Anfangssteigungen der ANTS/DPX Leakagesignale bei der Zugabe von unterschiedlichen TisB Konzentrationen bestimmt. Hierzu dienten die ersten 30 s des Signalverlaufs. An das Fluoreszenzsignal der ersten 30 s wurde mittels Microsoft EXCEL manuell eine Gerade angelegt, aus welchen die Steigungen entnommen werden konnten. Diese Anfangsgeschwindigkeiten wurden gegen die verwendeten TisB Konzentrationen aufgetragen und mittels der Software ORIGIN (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) eine im Programm hinterlegte Hill-Funktion (Gleichung 1) angefitet. Der Fit lieferte unter ande-

rem den Hill-Koeffizienten  $n$ .

$$V(c) = V_{\max} \times \left( \frac{c^n}{k^n + c^n} \right) \quad (1)$$

### 3.1.7 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie

**Vesikelpräparation** Zur Herstellung von CD- und SRCD-Proben wurden Lipidstamm-  
lösungen von  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  in Methanol/Chloroform (1:1) hergestellt. Zur Probenvorberei-  
tung von TisB Proben wurden dem entsprechenden P/L Verhältnis nach, TisB in Me-  
thanol ( $60 \mu\text{M}$  bis  $120 \mu\text{M}$ ) und eine entsprechende Menge an Lipidstamm-  
lösung in einem 2 mL Schraubdeckelglass vereinigt. Unter mildem Stickstoffstrom wurde das Lösemittel  
anschließend abgedampft. Zur vollständigen Entfernung des Lösemittels wurden die ein-  
getrockneten Proben für 4 h ins Vakuum gestellt. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe  
des Puffers (gewöhnlich 10 mM Phosphatpuffer). Die Suspension wurde daraufhin 10 min  
gevoxt und anschließend 8 Gefrier-/Tauzyklen unterzogen (siehe 3.1.6). Danach erfolgte  
eine Ultraschallbehandlung für  $3 \times 3 \text{ min}$ .

Für Dermcidin Proben wurden die Vesikel ohne Dermcidin hergestellt. Dieses wurde nach  
der Ultraschallbehandlung aus einer  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  Stammlösung zugegeben.

**CD- und SRCD-Spektroskopie** Nachdem die Probe, wie im Abschnitt 3.1.7 beschrie-  
ben, vorbereitet wurde, wurden zur Messung  $250 \mu\text{L}$  Probe in eine  $0,1 \text{ cm}$  Messküvette  
gegeben und diese in das Spektrometer eingebracht. Vor jeder Messung wurde die Mess-  
kammer mit Stickstoff gespült (Flussrate  $15 \text{ L min}^{-1}$ ) und während der Messung aufrecht  
erhalten (Flussrate  $3 \text{ L min}^{-1}$ ). Diejenige Verdünnung wurde zur Datenauswertung ver-  
wendet, bei welcher die HT bei  $185 \text{ nm}$ , einen maximalen Wert von etwa  $500 \text{ V}$  annahm,  
damit auch Daten im niedrigen Wellenlängenbereich zur Auswertung verwendet werden  
konnten (normalerweise eine  $10 \times$  Verdünnung). Nach der Messung wurde die Probe aus  
der Küvette entnommen und in einem  $1,5 \text{ mL}$  Reaktionsgefäß bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert (nur CD-  
Spektroskopie). Tabelle 5 gibt die verwendeten Messparameter bei der CD-, als auch bei der  
SRCD-Spektroskopie wieder. Vor jeder Messung wurde ein Referenzwert vom verwendeten  
Puffer aufgenommen, der durch die Software (*SpektraManager* der Firma Jasco) direkt  
vom Messwert abgezogen wurde. Zur Prozessierung wurde das ebenfalls durch die Software

aus drei Einzelspektren gemittelt und das Spektrum geglättet und die Basislinie korrigiert. Hierbei wird die ermittelte Elliptizität bei 260 nm auf den Wert 0 gesetzt.

**Tabelle 5** – Messparameter für die CD- und SRCD-Spektroskopie

Parameter	CD-Wert	SRCD-Wert
Probenvolumen	250 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
Küvette	0,1 cm	13,1 $\mu\text{m}$
Temperatur	30 $^{\circ}\text{C}$	30 $^{\circ}\text{C}$
Messbereich	180 nm bis 260 nm	170 nm bis 240 nm
Response	8 s	8 s
Spektrale Breite	1 nm	1 nm
Aufnahmen	3	3
Messgeschwindigkeit	10 nm $\text{min}^{-1}$	10 nm $\text{min}^{-1}$

Um die einzelnen Sekundärstrukturanteile mit Hilfe des erhaltenen Spektrums zu bestimmen, war es nötig die Elliptizitätswerte der Spektren, gemessen in mdeg in mittlere, molare Elliptizitätswerte pro Peptidbindung umzurechnen ( $[\Theta]_{\text{MRE}}$ ). Dieses geschah mittels Gleichung 2. Die  $[\Theta]_{\text{MRE}}$  Werte wurden anschließend mittels hinterlegter Algorithmen auf dem DICHROWEB Server dekonvolviert [34–36]. Zur Dekonvolution gewöhnlicher CD Daten, diente der CONTINLL Algorithmus [37, 38]. Als Referenzproteinset diente Set 7 für konventionelle CD-Daten und für SRCD-Daten das Set SP175 [39]. Die beiden Dekonvolutionsergebnisse mit dem besten Fit wurden gemittelt.

$$[\Theta]_{\text{MRE}} = \frac{\Theta}{10 \times n \times M \times d} \quad (2)$$

Hierbei gilt:

$\Theta$  = Elliptizität in mdeg

$n$  = Anzahl der Aminosäuren im Protein

$M$  = Molare Masse in  $\text{g mol}^{-1}$

$d$  = Schichtdicke der Küvette in cm

**Orientierte CD-Spektroskopie (OCD)** Für OCD Proben wurden Vesikel wie für die CD-Spektroskopie vorbereitet. Die entsprechende Mengen an Peptid/Vesikel Suspension wurde daraufhin auf ein kreisförmiges Quarzglasplättchen pipettiert und unter dem Abzug eintrocknete. Für gewöhnlich wurden maximal 170  $\mu\text{g}$  Lipid und die nach dem P/L Verhältnis entsprechende Menge an Peptid aufgetragen. Nach dem Eintrocknen wurden die Glasplättchen in die OCD-Messzelle eingebaut, welche mit einer gesättigten  $\text{K}_2\text{SO}_4$ -Lösung befüllt war. Hierdurch wurde über Nacht die Probe hydratisiert. Gleichzeitig fand eine Temperierung durch den angeschlossenen Thermostaten statt.

Zum Starten der Messung wurde die Messzelle in das Spektrometer eingebaut und die Feuchtigkeit der Probe ermittelt. Die eingestellten Parameter finden sich in Tabelle 6 wieder. Zur Auswertung wurden die Spektren der verschiedenen Winkel der OCD Zelle geglä-

**Tabelle 6** – Messparameter für die OCD-Spektroskopie

Parameter	Wert
Proteinmenge	<15 $\mu\text{g}$
Lipidmenge	<17 $\mu\text{g}$
Temperatur	30 °C
Messbereich	180 nm bis 260 nm
Response	8 s
Spektrale Breite	1 nm
Aufnahmen	3
Gemessene Winkel	0°, 45°, 90°, 135°, 180°, 225°, 270° und 315°
Messgeschwindigkeit	10 nm min <sup>-1</sup>

tet, gemittelt und basislinienkorrigiert. Hierzu wurde wiederum der Messwert bei 260 nm auf 0 gesetzt.

### 3.1.8 Festkörper-Kernspinnmagnetresonanz-(ssNMR)-Spektroskopie

Für Festkörper NMR-Messungen wurden 1 mg <sup>15</sup>N-markiertes Dermcidin in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß abgewogen. Im Anschluss wurde eine dem molaren Verhältnis entsprechende Menge an Lipid in ein separates 1,5 mL Reaktionsgefäß abgewogen. Zu den Lipiden wurde nun 450  $\mu\text{L}$  Puffer zugegeben, und  $10 \times 1$  min mit Ultraschall behandelt. Nach der Ultraschallbehandlung wurde die abgewogene Menge an Dermcidin in 50  $\mu\text{L}$  Puffer gelöst und zu den entstandenen Vesikeln gegeben. Nun folgte eine Inkubationszeit von 30 min und

erneut  $2 \times 1$  min Ultraschallbad.

Daraufhin wurden jeweils 50  $\mu$ L der Peptid/Vesikelsuspension auf 10 zuvor mit Methanol gereinigte Glasplättchen gegeben (7,5 mm  $\times$  9 mm). Die Glasplättchen wurden eingetrocknet, gestapelt und zuletzt mit einem weiteren Glasplättchen der selben Größe als Deckel versehen. Die gestapelten Plättchen wurden anschließend in eine Hydratationskammer mit gesättigter  $K_2SO_4$ -Lösung gegeben. Diese wurde verschlossen und über Nacht im Brutschrank bei 48 °C inkubiert. Hierdurch entstanden orientierte Lipiddoppelschichten. Zur Messung im Spektrometer wurden die Glasplättchen zuerst mittels Parafilm luftdicht verschlossen und anschließend mit drei Schichten Klarsichtfolie unwickelt.

Die Messungen erfolgten an einem Bruker 500 MHz Spektrometer. Als Probenkopf diente ein HXY-Modell ebenfalls von der Firma Bruker. An diesem Probenkopf war zur Probenaufnahme eine Flachspule für Glasplättchen montiert. Für die Messungen der  $^{31}P$ -NMR-Spektren wurde die Protonen-entkoppelnde Hahn-Echo-Pulssequenz verwendet. Referenziert wurden die  $^{31}P$ -NMR-Spektren über 85% Phosphorsäure. Hierzu wurde das Intensitätsmaximum des erhaltenen Spektrums auf 0 ppm gesetzt. Die eindimensionalen  $^{15}N$ -Spektren wurden durch die Benutzung eines Kreuzpolarisationspulsprogramms aufgenommen [40]. Während der Akquisition fand eine heteronukleare  $^1H$ - $^{15}N$ -Entkopplung statt. Dies geschah über die SPINAL-16 Pulssequenz [41]. Zur Referenzierung diente bei den  $^{15}N$  Messungen, festes  $^{15}NH_4SO_4$ , wobei das Intensitätsmaximum auf 26,8 ppm festgelegt wurde. Protonen wurden auf 4,7 ppm für Wasser referenziert. Die Prozessierung und Visualisierung Der Daten erfolgte mit der Software *Topspin* der Firma Bruker.

### 3.1.9 Bioinformatische Methoden

Das Programm *SEQUENZ* wurde mit Hilfe des Programmes Microsoft *Visual Studio 2010* in der Programmiersprache *C++* geschrieben. Die Datenaufbereitung und die Erstellung von artifiziellen Datenbanken wurde mit dem Programm *Eclipse* in der Sprache *Python* durchgeführt. Alle Skripte zur Datenprozessierung, sowie die Rohdaten der Analyse, das Programm *Protein Origami* und *SEQUENZ* stehen zum Download unter der in Anhang 6.7 angegebenen Adresse zur Verfügung.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Datenbankanalyse

#### 4.1.1 Datenbanken als Quelle von Proteinsequenzen

Um global nach Charge Zippeln in membranständigen oder membranaktiven Proteinen zu suchen, werden zunächst einmal große Datenbanken mit möglichst vielen Proteinsequenzen aus unterschiedlichsten Organismen benötigt. Eine Datenbank, die diese Kriterien erfüllt, ist die größte bioinformatische Datenbank für Proteine aller Lebewesen und Viren, die *Universal Protein Database* (UNIPROT) [42]. Diese Datenbank enthält auch viel Information über die Proteinfunktionen, sowie über die Proteinstrukturen. Die UNIPROT Datenbank stellt ein Konsortium aus dem *European Bioinformatics Institute* (EBI), dem *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB) und der *Protein Information Resource* (PIR), der *National Biomedical Research Foundation* (NBRF) dar.

Die UNIPROT Datenbank beinhaltet drei Elemente, die es dem Anwender erlauben, je nach spezifischem Gebrauch, darauf zuzugreifen: Die UNIPROT Reference Cluster ermöglicht einen schnellen Zugriff auf nicht redundante Proteinsequenzen. Hierbei ist der Informationsgehalt geringer, jedoch über Querverknüpfungen leicht einsehbar. Das UNIPROT Archive dient zur Speicherung aller öffentlich erhältlichen Proteinsequenzdaten und beinhaltet bis auf die Proteinsequenz relativ wenig Information zum gesuchten Protein. Als dritte Subdatenbank enthält UNIPROT die UNIPROT Knowledge Database (UNIPROTKB). Sie stellt die zentrale und ausführlichste Datenbank innerhalb der UNIPROT Umgebung dar. Hier finden sich detaillierte Informationen zu Funktion, Struktur und Klassifikation der gesuchten Proteine. Unter anderem auch Einträge zur subzellularen Lokalisation des entsprechenden Proteins, sofern bekannt, aber auch eine genaue Annotation der Proteinsequenz, welche Aminosäuren sich beispielsweise in  $\alpha$ -helikaler Konformation befinden und welche Reste zu einer gegebenenfalls vorhandenen Transmembranregion gehören. Neben all diesen funktionellen und strukturellen Informationen bietet die UNIPROTKB auch eine ausführliche Literaturliste zum gesuchten Protein an.

Jedes der Mitglieder des Konsortium pflegt diese Datenbank, so dass sie in regelmäßigen Rhythmus erneuert wird. Im Moment umfasst die UNIPROTKB Datenbank etwa 540000

Proteinsequenzen (Stand August 2013). Hierdurch erfüllt die Uniprot Datenbank alle Kriterien die benötigt werden, um nach Charge Zippern zu suchen. Die Daten wurden im Flat File Format heruntergeladen, was gewisse Vorteile mit sich bringt. Durch das Voranstellen von zweibuchstabigen Tags, kann direkt nach den entsprechenden Funktionen des Proteins innerhalb der Flat File Datei zugegriffen werden. Dies ist bei der Auswertung der Daten von großem Vorteil.

Neben der UNIPROT Datenbank bildet die *Antimicrobial Peptide Database* (APD) die Grundlage für weitere Ergebnisse in dieser Arbeit [43]. Die APD stellt eine Sammlung von derzeit etwa 2100 antimikrobiellen Peptiden dar, für die zum großen Teil weder die Struktur noch der genaue Wirkmechanismus bekannt sind. Da antimikrobielle Peptide für gewöhnlich die Membranintegrität durch die Ausbildung von Poren stören, und so ihre Wirkung entfalten können, liegt es durchaus auf der Hand, dass Interaktionen zur Ausbildung einer Pore über geladene Reste und damit über beispielsweise Charge Zipper entstehen. Auf dieser Grundlage dient die APD als weitere Quelle an potentiell Charge Zipper tragenden Proteinen.

#### **4.1.2 SEQUENZ - Ein Programm zur Identifizierung von hypothetischen Charge Zipper Motiven**

In dieser Arbeit wird zwischen drei verschiedenen Charge Zipper Definitionen unterschieden: Hypothetische Charge Zipper Motive (HCZ-Motive) beschreiben das Auftreten der komplementär geladenen Aminosäureanordnung in der Primärstruktur eines Proteins. Potentielle Charge Zipper Motive (PCZ-Motive) sind aufgrund der Sekundärstrukturen, auf welchen die am HCZ-Motiv beteiligten Reste zu finden sind, theoretisch in der Lage ihre Ladungen gegenseitig zu neutralisieren, während der Begriff realisiertes Charge Zipper Motiv (RCZ-Motiv) für tatsächlich ausgebildete Salzbrücken steht, welche aufgrund der räumlichen Anordnung der am PCZ-Motiv beteiligten Reste, entstehen.

Es liegt auf der Hand, dass sehr große Datenmengen, wie sie in der UNIPROT Datenbank vorliegen, nicht manuell auf HCZ-Motive durchsucht werden können. Aus diesem Grund war es nötig eine Software zu entwickeln, die diese Aufgabe in ansprechender Zeit und mit absoluter Genauigkeit erledigt. Hierzu wurde in Zusammenarbeit mit Hartmut Heinzmann und Johannes Peters vom Institut für Biologische Grenzflächen 2 (IBG2) am KIT



das Programm *SEQUENZ* erstellt. Dieses erfüllt alle erforderlichen Aufgaben mit hoher Präzision.

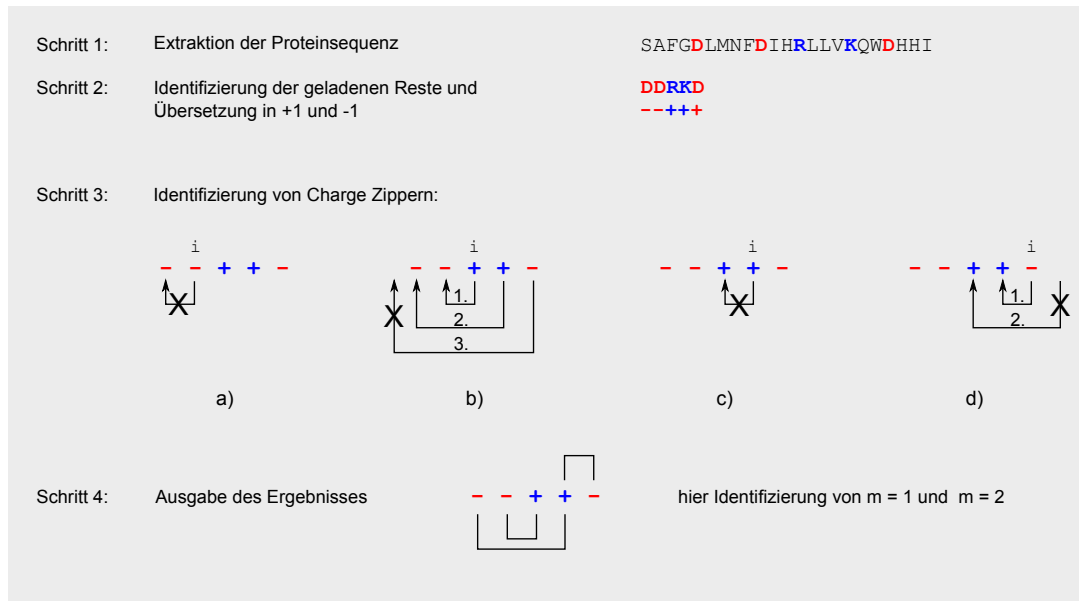
### **Algorithmus zur Identifikation von hypothetischen Charge Zipper Motiven**

Der Algorithmus zur Identifizierung von HCZ-Motiven arbeitet in vier Schritten (Abbildung 8). Zuerst wird aus den Flat File Dateien der UNIPROT Datenbank die entsprechende Primärstruktur extrahiert (Schritt 1). Anschließend werden in der Primärstruktur geladene Aminosäuren markiert (Asp, Glu, Lys und Arg). Diese werden von der restlichen Proteinsequenz in ihrer jeweils auftretenden Reihenfolge ausgelagert und entsprechend ihrer Ladung in eine Abfolge von +1 und -1 übersetzt. Dabei werden Asp und Glu in -1, sowie Lys und Arg in +1 umgewandelt (Schritt 2). Im nächsten Schritt erfolgt die eigentliche Suche nach einer HCZ-Motiv.

Beginnend an der N-terminalen Position 2 der Sequenz (Position  $i$ ), startet das Programm mit der Suche, indem die entsprechende Zahl mit der Zahl an Position  $i - 1$  multipliziert wird. In Abbildung 8 entspricht Position  $i = -1$  und Position  $i - 1$  ebenfalls -1. Das Ergebnis dieser Multiplikation ist +1 und entspricht somit keinem Aminosäurenpaar mit komplementärer Ladung. Anschließend verschiebt das Programm die Startposition auf die Position  $i + 1$ , die nun neu als Position  $i$  definiert wird. Nun wird ebenfalls eine Multiplikation mit dem Rest  $i - 1$  durchgeführt. Dieser ist im besprochenen Beispiel in Abbildung 8 -1, was zu dem Ergebnis -1 nach der Multiplikation führt (Position  $i = 1$ ). Hier handelt es sich also um ein Paar mit komplementärer Ladung. Ist so ein Paar ausgemacht worden, so werden die Flanken des Paares nach weiteren komplementären Ladungspaaren abgesucht. Es findet nun zuerst eine Multiplikation der Reste  $i + 1$  und  $i - 2$  statt. Ergibt das Ergebnis der Multiplikation ebenfalls -1, so wird weiter gesucht, indem die Reste  $i + 2$  und  $i - 3$  miteinander multipliziert werden. Im Falle der Abbildung 8 gibt es keinen Rest  $i - 3$ , was zum Abbruch der Flankensuche führt und die ursprüngliche Position  $i + 2$  als Position  $i$  neu definiert. Die Flankensuche würde ebenfalls abbrechen, sofern es den Rest  $i - 3$  geben und die Multiplikation zum Ergebnis +1 führen würde.

Die nun neu definierte Position  $i$  wird wiederum mit Position  $i - 1$  multipliziert. Im abgebildeten Beispiel kann hier kein komplementäres Ladungspaar identifiziert werden und die Position  $i$  wird erneut um einen Rest C-terminal verschoben. Wiederum findet eine

Multiplikation mit dem Rest  $i - 1$  statt. Das Ergebnis der Multiplikation ist  $-1$ , so dass auch hier die Flanken des Paares abgesucht werden. In diesem Fall gibt es keinen Rest  $i + 1$ . Damit endet die Analyse der Proteinsequenz, und die Suchergebnisse werden in Form von Klammern zwischen den identifizierten Ladungspaaren ausgegeben.



**Abbildung 8** – Algorithmus zur Identifizierung von hypothetischen Charge Zipper Motiven. Schritt 1 extrahiert die Sequenz aus der Proteindatei, Schritt 2 übersetzt die geladenen Reste in  $+1$  und  $-1$ , Schritt 3 führt dann ausgehend von Position  $i$  eine Multiplikation mit dem Rest  $i - 1$  durch und ermittelt über das Ergebnis der Multiplikation ein eventuelles HCZ-Motiv. Schlussendlich wird das Ergebnis in Schritt 4 ausgegeben.

#### 4.1.3 Mathematisches Modell zur Erwartungswertberechnung von hypothetischen Charge Zipper Motiven

Nachdem eine Datenbank die Proteinsequenzen enthält ausgewählt und ein Algorithmus entwickelt wurde, der diese Proteinsequenzen auf HCZ-Motive untersucht, stellt sich die Frage wie wahrscheinlich es ist, dass ein Protein mit einer Anzahl an positiv geladenen Resten und einer Anzahl an negativ geladenen Resten ein HCZ-Motiv ausbilden kann. Alternativ lässt sich das Ganze auch als Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer Primärstruktur beschreiben, die eine definierte Abfolge von geladenen Resten trägt.

Um diese Wahrscheinlichkeit zu beschreiben, beziehungsweise eine einen Erwartungswert für ein HCZ-Motiv mit der Anzahl an komplementären Ladungspaaren  $m$  vorherzusagen, wurde von Stephan Grage am IBG2 empirisch eine Formel entwickelt, die dies erfüllt. Als

Grundlage dieser Formel dient der Binomialkoeffizient  $\binom{n}{k}$ :

$$\binom{n}{k} = \frac{n!}{k! \cdot (n-k)!}$$

Der Binomialkoeffizient gibt an, auf wieviele verschiedene Arten man  $k$  Objekte aus einer Menge von  $n$  verschiedenen Objekten auswählen kann, ohne diese zurückzulegen und ohne Beachtung der Reihenfolge.

Mit Hilfe des Binomialkoeffizienten war es nun möglich Erwartungswerte vorherzusagen. Hierzu müssen allerdings drei verschiedene Fälle unterschieden werden. In Abhängigkeit der Variablen  $n$ ,  $p$  und damit auch  $N$ , kann der Erwartungswert  $N_m$  eines HCZ-Motivs der Länge  $m$  vorhergesagt werden. Es gelten folgende Definitionen:

$N$  = Summe der geladenen Aminosäuren

$n$  = Anzahl negativ geladener Aminosäuren

$p$  = Anzahl positiv geladener Aminosäuren

$m$  = Anzahl der komplementären Ladungspaare, bzw. Länge des HCZ-Motivs

Fall 1:  $n \geq m + 2$  und  $m \leq p \leq m + 1$ :

$$N_m = 2^m \cdot (N - 2) \cdot (m - 1) \cdot \binom{N - 2m}{p - m} + 2 \cdot \binom{N - 2m}{p - m} \quad (3)$$

Fall 2:  $m \leq n \leq m + 1$  und  $p \geq m + 2$ :

$$N_m = 2^m \cdot (N - 2) \cdot (m - 1) \cdot \binom{N - 2m}{p - m - 2} + 2 \cdot \binom{N - 2m}{p - m} \quad (4)$$

Fall 3: Trivialer Fall, hier ist  $m$  gleich die Anzahl an  $n$  und  $p$ :

$$N_m = 2^m \quad (5)$$

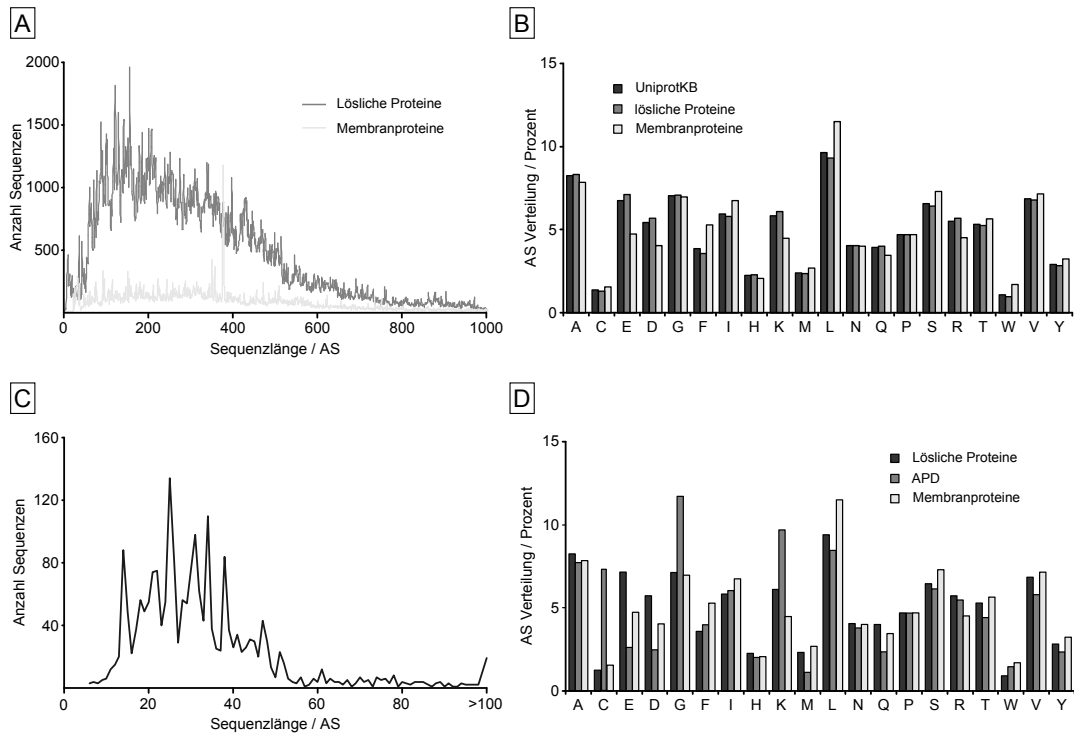
#### 4.1.4 Hypothetische Charge Zipper Motive in der UNIPROT Datenbank

Bevor spezifisch nach TatA<sub>d</sub> Analoga gesucht wurde, wurde zuerst das allgemeine Auftreten von Charge Zippern in der UNIPROT Datenbank und der APD untersucht. Hierzu wurden zu Beginn der Analyse die etwa 540000 Sequenzen der UNIPROT Datenbank in zwei Gruppen eingeteilt: Lösliche Proteine und Membranproteine. Als Kriterium für die Einordnung in die entsprechende Gruppe diente das Vorhandensein einer nachgewiesenen oder potentiellen Transmembranregion, was im entsprechenden Proteineintrag hinterlegt ist. Findet sich ein entsprechender Eintrag, so wird das Protein der Membranproteinfraction zugewiesen. Wird ein solcher Eintrag nicht gefunden, wird es in die lösliche Fraktion eingeteilt. Durch die Tatsache, dass die antimikrobiellen Peptide der APD selbst membranaktiv sind um ihre Wirkung zu entfalten, wurden diese nicht gruppiert.

Nachdem die Gruppierung anhand dieses Kriteriums abgeschlossen war, konnten für die lösliche Fraktion 466934 Proteine identifiziert werden, wohingegen die Gruppe der Membranproteine 73612 Proteine umfasste. Die UNIPROT Datenbank enthält somit 86,4% lösliche Proteine und 13,6% Membranproteine. Neben der Einteilung in transmembrane und nicht transmembrane Proteine, wurde auch die Längenverteilung und die prozentuale Aminosäurezusammensetzung untersucht (Abbildung 9). Dieses dient als Grundlage für die spätere Generierung von artifiziellen Datenbanken, welche ebenfalls auf das Auftreten von HCZ-Motiven untersucht werden, um somit eventuell eine Aussage zur biologischen Relevanz von HCZ-Motiven treffen zu können (Abschnitt 4.1.5).

Abbildung 9A zeigt die Längenverteilung der Aminosäuresequenzen der gefundenen löslichen und transmembranen Proteine. Hierbei liegt die mittlere Länge für transmembrane Proteine bei etwa 200 AS und für lösliche Proteine bei etwa 190 AS. Der prozentuale Anteil an vorkommenden Aminosäuren unterscheidet sich ebenfalls. Die hauptsächlichen Unterschiede zwischen löslichen und transmembranen Proteinen liegen in den geladenen und unpolaren Aminosäuren. Während der Anteil an geladenen Aminosäuren (E, D, K und R) bei den löslichen Proteinen deutlich größer ist, so ist der Anteil an unpolaren Aminosäuren (I, L und V) bei den transmembranen Proteinen erhöht. Interessanterweise ist der Anteil an polaren Aminosäuren wie beispielsweise S und T, bei den Membranproteinen höher, als bei den löslichen Proteinen.

Die selben Analysen wurden auch für die APD durchgeführt. Hier ergibt sich eine mittlere Länge von etwa 30 AS. Die Aminosäurezusammensetzung unterscheidet sich überraschenderweise stark von der der Membranproteine. Extreme Unterschiede bestehen im hohen Anteil an C, G und K, im Vergleich zu Membranproteinen, während der Anteil an Leucin (L) im Vergleich zu den transmembranen Proteinen geringer ist. Im nächsten Schritt wur-



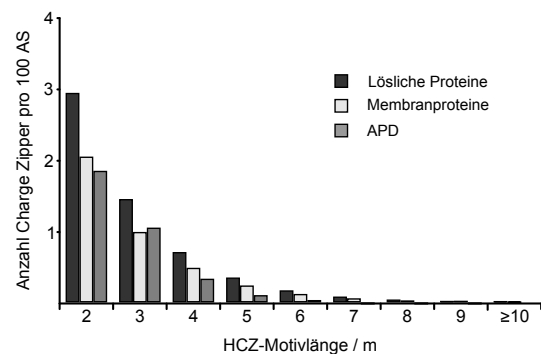
**Abbildung 9** – Aminosäuren- und Längenverteilung in Proteindatenbanken. (A) Aminosäuresequenzlängenverteilung von löslichen und transmembranen Proteinen. Proteine mit mehr als 1000 AS wurden in dieser Darstellung nicht berücksichtigt. (B) Vergleich des Aminosäurenprofils zwischen löslichen und transmembranen Proteinen. (C) Aminosäuresequenzlängenverteilung in der APD. (D) Vergleich des Aminosäurenprofils zwischen der APD und transmembranen Proteinen und löslichen Proteinen aus der UNIPROT Datenbank.

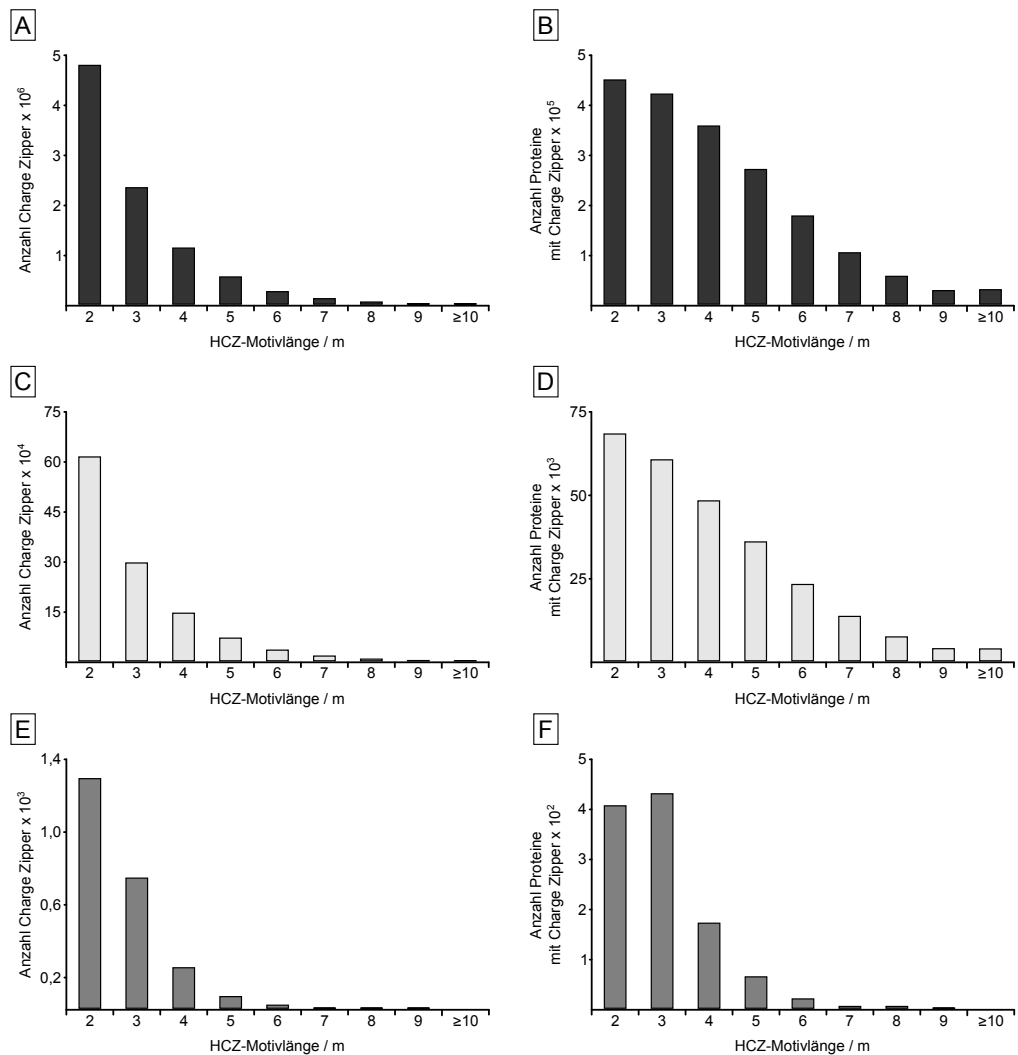
den die drei Datenbanken (lösliche Proteine, Membranproteine und antimikrobielle Peptide der APD) auf HCZ-Motive untersucht (Abbildung 10), das heißt ob sie eine dafür geeignete Reihenfolge von geladenen Aminosäuren in ihrer Sequenz aufweisen. Dabei wurden die Ergebnisse für  $m = 1$ , was den trivialen Fall von einer positiv geladenen Aminosäure und einer negativ geladenen Aminosäure darstellt, nicht berücksichtigt. In Abbildung 10A und B finden sich die Ergebnisse für die löslichen Proteine wieder. Wie nach dem Binomialkoeffizienten zu erwarten war, nimmt die Gesamtanzahl der HCZ-Motive mit steigender Länge  $m$  ab. Während die Abnahme für die Gesamtanzahl an HCZ-Motiven eher exponentiell

abnimmt, so nimmt die Zahl an Proteinen mit einem HCZ-Motiv der Länge  $m$  sigmoidal ab (Abbildung 10B). Dabei wurden HCZ-Motive mit einer Länge von bis zu  $m = 59$  sowohl für lösliche als auch für transmembrane Proteine gefunden. Auch die Gruppe der Membranproteine zeigt die selbe HCZ-Motiv Verteilung (Abbildung 10C und D). Ebenfalls wurde in der APD eine große Anzahl an HCZ-Motiven entdeckt (Abbildung 10E und F). Interessanterweise ist hier entgegen der Wahrscheinlichkeitsverteilung durch den Binomialkoeffizienten die Anzahl an Proteinen mit einem HCZ-Motiv der Länge  $m = 3$  größer als die Anzahl an Proteinen mit einem HCZ-Motiv der Länge  $m = 2$ . In dieser Datenbank wurden keine HCZ-Motive gefunden, die länger als  $m = 9$  sind.

Um nun die Verteilung der HCZ-Motive zwischen den drei Datensätzen zu vergleichen, wurde das Auftreten der mittleren Anzahl an HCZ-Motiven der Länge  $m$ , je 100 Aminosäuren ermittelt. Um dies zu ermöglichen wurde die Gesamtanzahl an HCZ-Motiven in den einzelnen Datenbanken durch die Gesamtanzahl an Aminosäuren geteilt. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 11 dargestellt. Während es in löslichen Proteinen zum Auftreten von etwa 3 HCZ-Motiven der Länge  $m = 2$  je 100 AS kommt, so liegt diese Zahl bei den Proteinen in der APD und den Membranproteinen bei etwa 2. Generell gleicht das Auftreten der HCZ-Motive in der APD eher dem der Membranproteine. Erst ab einer Länge von  $m = 4$  unterscheiden sich auch Membranproteine und APD Proteine deutlich voneinander. Das Auftreten von HCZ-Motiven der Länge  $m$  ist in löslichen Proteinen daher wahrscheinlicher, als in den Proteinsequenzen der APD und der Membranproteine, wahrscheinlich weil erstere prozentual mehr geladene Aminosäuren besitzen, wie in 9 deutlich wird.

**Abbildung 11** – Mittlere Anzahl von HCZ-Motiven je 100 AS in Membranproteinen, löslichen Proteinen und den Proteinen der APD.





**Abbildung 10** – Hypothetische Charge Zipper Motiv Verteilungen in Proteindatenbanken. Gesamtanzahl an HCZ-Motiven der Länge  $m$  und der Anzahl an Proteinen mit HCZ-Motiven der Länge  $m$  in löslichen Proteinen (A, B), Membranproteinen (C, D) und den Proteinen der APD (E, F). Für die Abbildungen B, D und F werden HCZ-Motive der Länge  $m$  nicht mehrfach gezählt, also erscheinen nicht unter  $m - 1$ ,  $m - 2$ , etc.

#### 4.1.5 Statistische Wahrscheinlichkeit des zufälligen Auftretens eines hypothetischen Charge Zipper Motivs

Um Aussagen über die tatsächliche Häufigkeit von HCZ-Motiven in Aminosäuresequenzen von Proteinen zu treffen, war es nötig die statistische Wahrscheinlichkeit zu berechnen, mit der ein HCZ-Motiv rein zufällig in einer Proteinsequenz auftritt. Es liegt nahe, dass HCZ-Motive rein statistisch auftreten, ohne dabei eine biologische Relevanz zu besitzen. Je länger ein Protein ist und umso mehr geladene Aminosäuren vorkommen, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für ein HCZ-Motiv.

Es wurden artifizielle Datenbanken erstellt, die sowohl in der Längenverteilung als auch in der Aminosäureverteilung mit der zu testenden Datenbank übereinstimmen. Hierbei unterscheiden sich die zu überprüfende Datenbank und die artifiziellen Datenbank lediglich in der zufälligen Abfolge von Aminosäuren in den Sequenzen der artifiziellen Datenbank. Dadurch war es möglich Aussagen über eine eventuelle Bevorzugung von Charge Zippern der Länge  $m$  in der zu untersuchenden Datenbank zu treffen.

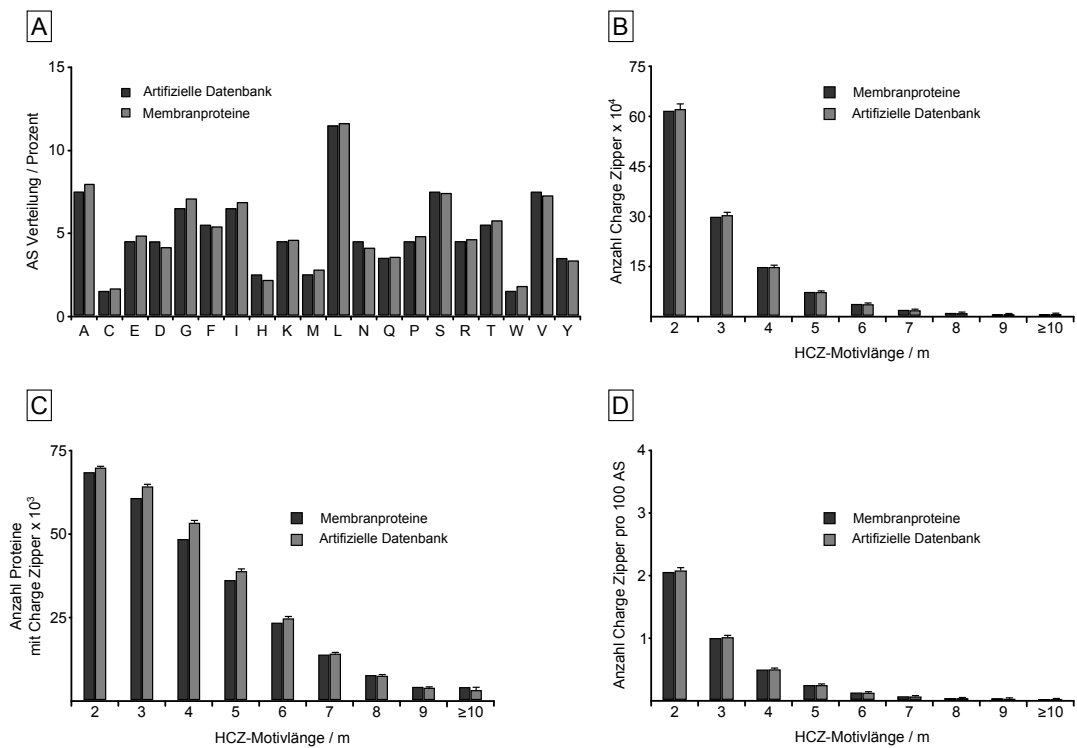
Die Längenverteilung konnte dabei exakt umgesetzt werden, wohingegen die Aminosäureverteilung lediglich annähernd die Werte der Vergleichsgruppe annehmen konnte. Zur Erstellung der künstlichen Datenbanken wurde ein spezieller Algorithmus verwendet. Durch Vorgaben der zu verwendenden Aminosäuren und deren prozentualen Anteilen in der Vergleichsgruppe, wurden auf dieser Grundlage die Sequenzen der artifiziellen Datenbank erstellt. Dabei ging der Algorithmus folgendermaßen vor: Aus dem Pool der zu verwendenden Aminosäuren wurde willkürlich eine Aminosäure gezogen. Anschließend erfolgte ebenfalls die zufällige Ziehung einer Zahl zwischen Null und Eins. Hierbei entspricht die Zahl Null 0% und Eins 100% prozentualen Auftreten. Im nächsten Schritt wurde die ermittelte Zahl mit der vorgegebenen Aminosäurenverteilung verglichen. Lag die ermittelte Zahl über dem prozentualen Anteil, so wurde diese Aminosäure verworfen und eine andere Aminosäure gezogen. Es erfolgte wiederum die Ermittlung einer Zahl zwischen Null und Eins. Lag diese ermittelte Zahl nun unter dem Wert des prozentualen Anteils der neu gezogenen Aminosäure, oder waren beide Werte identisch, so wurde diese Aminosäure an die zu erstellende Sequenz angehängt. Dies geschah so lange bis die Anzahl an Aminosäuren für die entsprechende Längenvorgabe erreicht wurde. Dies wurde so oft wiederholt, bis die



vorgegebene Anzahl  $n$  an Proteinen mit der Länge  $l$  Aminosäuren erstellt worden sind. So konnten alle Längen an Proteinen in entsprechender Anzahl generiert werden.

Zum Vergleich mit der Kontrollgruppe wurden drei artifizielle Datenbanken erstellt, deren Mittelwerte in Abbildung 12 zu sehen sind. Wie bereits erwähnt unterscheiden sich die Aminosäurezusammensetzungen der artifiziellen Datenbank und der der Membranproteine. Zum einen auf Grund der Tatsache, dass lediglich  $3 \times 73612$  Sequenzen erstellt wurden, so dass die Anzahl an Sequenzen relativ gering ist, um die Verteilung der Aminosäurezusammensetzung von Membranproteinen exakt wieder zu spiegeln und zum anderen durch die Tatsache, dass in Membranproteinen auch andere, nicht kanonische Aminosäuren, zu finden sind. Desweiteren gibt es auch einen sehr geringen Anteil an Sequenzen in der Gruppe der Membranproteine, für die nicht die komplette Sequenz vorliegt und daher Fehlstellen zu finden sind. Diese Fehlstellen an denen nicht genau bestimmt ist, welche Aminosäure auftritt, tragen ebenfalls zu einer leicht abweichenden Aminosäurenverteilung bei.

Wie in Abbildung 12B zu erkennen ist, unterscheiden sich die HCZ-Motiv Längenverteilungen der Membranproteine und der artifiziellen Datenbanken nicht voneinander. Falls doch, so liegen die Werte der artifiziellen Datenbank innerhalb der Fehlertoleranz. Der Vergleich der gefundenen Proteine mit einem HCZ-Motiv der Länge  $m$  (Abbildung 12C) zeigt hier ein etwas anderes Bild. So ist die Anzahl an Proteinen mit einem HCZ-Motiv der Länge  $m$  in der artifiziellen Datenbank leicht erhöht. Erst ab  $m = 6$  liegen die Werte für die artifizielle Datenbank innerhalb der Fehlertoleranz. Die Anzahl an HCZ-Motiven je 100 Aminosäuren (Abbildung 12D) ist – im Gegensatz zur Anzahl an Proteinen mit einem HCZ-Motiv der Länge  $m$  – nahezu identisch mit der der artifiziellen Datenbank.



**Abbildung 12** – Vergleich der HCZ-Motiv Verteilung mit artifiziiellen Datenbanken. (A) Aminosäureverteilung in Membranproteinen und der artifiziiellen Datenbank. (B) Gefundene HCZ-Motive in Membranproteinen und der artifiziiellen Datenbank. (C) Anzahl der Proteine mit einem HCZ-Motiv der Länge  $m$  in Membranproteinen und der artifiziiellen Datenbank. (D) HCZ-Motive je 100 AS in Membranproteinen und der artifiziiellen Datenbank.

#### 4.1.6 TatA<sub>d</sub> ähnliche Proteine

Nachdem die allgemeine Analyse des Auftretens von HCZ-Motiven in der UNIPROT Datenbank und in der APD abgeschlossen wurde, wurde speziell nach TatA<sub>d</sub> ähnlichen Proteinen gesucht. So wurden zur Suche spezifische strukturelle Eigenschaften von TatA<sub>d</sub> zu Grunde gelegt: Zuerst musste eine nachgewiesene oder potentielle transmembrane Region in der Primärsequenz des Proteins vorhanden sein. Dieses Kriterium schränkt die Anzahl an Treffern erheblich ein. Es wurden daher lediglich die 73612 identifizierten Membranproteine als Grunddatensatz verwendet. Als nächstes sollten die gesuchten Proteine ein HCZ-Motiv mit einer minimalen Länge von  $m = 5$  besitzen, wobei die Länge des Charge Zippers in TatA<sub>d</sub>  $m = 7$  beträgt. Dabei stellte sich heraus, dass dies auf 30034 Proteine zutrifft.

**Tabelle 7** – TatA<sub>d</sub> ähnliche Proteine in der UNIPROT Datenbank

	<b>Kriterium</b>	<b>Anzahl Proteine</b>
Schritt 1	Transmembranregion	73612
Schritt 2	Charge Zipper $\geq m = 5$	30034
Schritt 3	Charge Zipper maximal 10 Reste von der Transmembranregion entfernt	10618
Schritt 4	Bereinigung um homologe Proteine	6437
Schritt 5	Strukturelle Informationen vorhanden	158
Schritt 6	Strukturelle Informationen des Bereichs des Auftreten des Charge Zippers	0

Die Anzahl an Proteinen konnte weiter eingeschränkt werden, indem ein weiteres strukturelles Kriterium des TatA<sub>d</sub> Proteins zu Grunde gelegt wurde. In TatA<sub>d</sub> beginnt das HCZ-Motiv 4 Aminosäuren entfernt vom C-Terminus der letzten an der Transmembranregion beteiligten Aminosäure. Dieser Abstand wurde auf maximal 10 Aminosäuren gesetzt. Um nun die HCZ-Motive der verbliebenen 30034 Proteine auf diese Eigenschaft hin zu überprüfen, wurde das Programm *SEQUENZ* erweitert. Es lieferte nun nicht mehr nur die HCZ-Motiv Anzahl und Lokalisation in der Primärstruktur eines Proteins, sondern konnte

auch über die in der Datenbank hinterlegte Information der Position der Transmembranregion die relative Position des HCZ-Motivs bestimmen. Des Weiteren konnte auch bestimmt werden, ob sich das HCZ-Motiv C- oder N-terminal von der Transmembranregion befindet. Durch diese Programmerweiterung wurde die Anzahl an potentiellen Treffern noch einmal wesentlich eingeschränkt. Es wurden 10618 Proteine ermittelt, die den strukturellen Eigenschaften des TatA<sub>d</sub> Proteins entsprechen könnten.

Um diese Anzahl an Sequenzen weiter einzuschränken, wurde die Sequenzliste um homologe Proteine aus verschiedenen Spezies bereinigt. Es verblieben noch 6437 Sequenzen von unterschiedlichen Proteinen. Diese Proteinliste findet sich in Anhang 6.7. Nachfolgend wurde nun untersucht, ob für diese Proteine (und für die zuvor entfernten Homologen) strukturelle Informationen in Form von Röntgenkristallographie- oder NMR-Daten vorliegen. Dies war nur für 158 Proteine der Fall. Eine weitere Eingrenzung fand statt, indem untersucht wurde, ob strukturelle Information für den Bereich des Proteins vorliegt, der auch das HCZ-Motiv trägt. Dies war bei keinem der identifizierten Membranproteinen der Fall, da die Kristall- oder NMR-Strukturen häufig ohne die Transmembransegmente und deren Umgebung gelöst worden waren. Es konnte somit nicht überprüft werden, ob in TatA<sub>d</sub> ähnlichen Proteinen ein CZ-Motiv vorliegt. Eine Übersicht der Identifizierung findet sich in Tabelle 7 wieder.

#### 4.1.7 Hypothetische Charge Zipper Motive in antimikrobiellen und membranassoziierten Proteinen

Neben der Suche nach TatA<sub>d</sub> ähnlichen Proteinen wurde des Weiteren ein spezieller Fokus auf membranassoziierte und membranaktive Proteine gelegt. Hierbei dienten ebenfalls Informationen des jeweiligen UNIPROT Datenbankeintrags als Auswahlkriterium. Neben dieser funktionellen Bedingung, sollte auch ein HCZ-Motiv mit mindestens  $m = 6$  vorhanden sein. Hierbei wurde nicht nur die UNIPROT Datenbank durchsucht, sondern auch die APD. Unter den Ergebnissen der UNIPROT Datenbank fand sich unter anderem (siehe Anhang 6.7) eine interessante Proteinfamilie identifiziert: Die E<sup>rns</sup> Proteine der Pestiviren. Das E<sup>rns</sup> Protein stellt dabei mit einer einzigartigen RNase Funktion ein Hüllprotein des Virions, dar. Es besitzt ein HCZ-Motiv der Größe  $m = 6$ . Dieser ist für die 185 Datenbankeinträge der E<sup>rns</sup> Proteinfamilie weitestgehend konserviert. Dabei befindet sich das

HCZ-Motiv im E<sup>rns</sup> Protein auf einem relativ langen  $\alpha$ -helikalen Bereich und kann deshalb als PCZ-Motiv betrachtet werden. Aus diesen Gründen wird die Rolle des PCZ-Motivs im E<sup>rns</sup> Protein in Abschnitt 4.1.8 genauer untersucht.

Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben wurde, können PCZ-Motive nicht nur als intramolekulares Assemblierungsmotiv, sondern potentiell auch als intermolekulare Erkennungssequenz zur Multimerisierung dienen. Um membranaktive Proteine zu identifizieren, die dieses Sequenzmotiv als intermolekulares Signal zur Multimerisierung nutzen, wurde ebenfalls die UNIPROT Datenbank durchsucht. Hierbei wurden Randbedingungen verwendet, die es ermöglichen, spezifische Proteine aus der unzähligen Menge an Proteinen zu identifizieren. Das PCZ-Motiv durfte hierbei nicht länger als  $m = 3$  (dies entspricht sechs geladenen Aminosäuren) sein und auf der nachgewiesenen oder vorhergesagten transmembranen Region des Proteins liegen. Die typische Länge einer Transmembranhelix beträgt etwa 23 AS. Zusätzlich wurde eine nachgewiesene oder vorhergesagte  $\alpha$ -helikale Konformation des Proteins an der Stelle des Auftretens des HCZ-Motivs vorausgesetzt. Um die Wahrscheinlichkeit eines PCZ-Motivs als Multimerisierungssequenz zu erhöhen, wurde als letzte Randbedingung festgesetzt, dass das Protein nicht aus mehr als 35 Aminosäuren bestehen soll, also die Membran nur einmal durchspannen kann.

Diesen Randbedingungen entspricht ein weiteres interessantes Protein: TisB aus *E. coli*. TisB spielt eine essentielle Rolle bei der Ausbildung von persistenten Zellen und damit bei der Biofilmentstehung. Die TisB Sequenz besteht aus 29 Aminosäuren, wobei hier ein HCZ-Motiv mit  $m = 2$  vorliegt. Strukturelle Eigenschaften für TisB sind bisher nur in der Arbeitsgruppe Ulrich untersucht worden, und eine transmembrane,  $\alpha$ -helikale Konformation wurde vorausgesagt [44, 45]. TisB besitzt also ein PCZ-Motiv. Da TisB als Beispiel für eine über das PCZ-Motiv vermittelte Multimerisationssequenz dient, wird es in Abschnitt 4.3 strukturell und funktionell genauer untersucht.

Auch die APD wurde auf PCZ-Motive durchforstet. Hier wurden die selben Kriterien angewandt, wie sie auch für das E<sup>rns</sup> Proteins zutreffen und zusätzlich musste eine nachgewiesene oder vorhergesagte  $\alpha$ -helikale Konformation vorhanden sein. Um mögliche membranaktive Proteine zu identifizieren, bei denen das PCZ-Motiv als intramolekulares Assemblierungsmotiv dienen könnte, wurde die maximale Länge auf 80 Aminosäuren festgelegt. Über das PCZ-Motiv wäre es für diese Proteinen möglich, eine  $\alpha$ -helikale Haarnadelschleife zu bil-

den, die über Salzbrücken stabilisiert wird. Damit könnten die antimikrobiellen Peptide beispielsweise in die Membran integrieren und Poren ausbilden. Von gegenwärtig 2295 Einträgen in der APD (Stand September 2013) haben 58 Proteine eine zumindest teilweise  $\alpha$ -helikale Konformation (Anhang 6.7). Von dieser Menge an Proteinen besitzen lediglich 7 Proteine ein HCZ-Motiv mit der Länge  $m \geq 4$  (Tabelle 8).

**Tabelle 8** –  $\alpha$ -helikale Proteine mit einem HCZ-Motiv der Länge  $m \geq 4$

Name	Sequenz	$m$	$N_m$
Amoebapore C	IPVLCPVCTS LVGKLIDLVL GGAVDKVTDY LETLCADKADG LVETLCTKIV SYGIDKLIK ILEGGSAKLI CGLIHAC	4	$6,4 \cdot 10^{-7}$
Caenopore 5	RSALSCQMCE LVVKKYEGSA DKDANVIKKD FDAECKKLFH TIPFGTREC D HYVNSKVDPI IHELEGGTAP KDVCTKLN E C P	6	$1,9 \cdot 10^{-3}$
Dermcidin	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLD S V	7	$2,6 \cdot 10^{-3}$
Im-1	FSFKRLKGFA KKLWNSKLAR KIRTKGLKYV KNFAKDMLSE GEEAPPAE P PVEAPQ	6	$1,9 \cdot 10^{-3}$
Porcine NK-Lysin	GLICESCRKI IQKLEDMVGP QPNEDTVTQA ASQVCDK LKI LRGLCKKIMR SFLRRISWDI LTGKKPQAIC VDIKICKEKT GLI	5	$2,3 \cdot 10^{-6}$
SP-BN	AGANDLCQEC EDIVHLLTKM TKEDAFQDTI RKFLEQECDI LPLKLLVPRC RQVLDVYLPL VIDYFQGQIK PKAICSHVGL C	7	$7,2 \cdot 10^{-5}$
Vejovine	GIWSSIKNLA SKAWNSDIGQ SLRNKAAGAI NKFVADKIGV TPSQAASMTL DEIVDAMYD	4	$3,5 \cdot 10^{-3}$

So konnte beispielsweise Caenopore 5 aus *C. elegans* identifiziert werden. Dieses Protein trägt ein HCZ-Motiv mit  $m = 6$ . Desweiteren Im-1, ein antimikrobielles Peptid aus dem Skorpion *Isometrus maculatus*. Im-1 enthält ebenfalls ein HCZ-Motiv mit  $m = 6$ . Ein weiteres interessantes Protein mit einem HCZ-Motiv der Länge  $m = 7$  ist Dermcidin. Dermcidin ist ein antimikrobielles Peptid aus dem menschlichen Schweiß. Durch die  $\alpha$ -helikale Konformation, die sehr kurze Proteinsequenz und das Vorhandensein eines sehr langen HCZ-Motivs, stellt Dermcidin ein Protein dar, bei welchem die Wahrscheinlichkeit

eines RCZ-Motivs hoch ist. Der Charge Zipper könnte, wie auch beim E<sup>rms</sup> Protein, eine  $\alpha$ -helikale Haarnadelschleife verbrückt durch das PCZ-Motiv ausbilden, wodurch Dermcidin als oligomere Pore seine antimikrobielle Aktivität entfalten könnte. Aus diesem Grund wurde Dermcidin in dieser Arbeit strukturell und funktionell untersucht. Die Ergebnisse finden sich in Abschnitt 4.2.

Neben der Suche nach HCZ-Motiven tragenden Proteinen die sich in  $\alpha$ -helikaler Konformation auf sich selbst zurückfalten und dadurch antimikrobiell wirken könnten, wurde die APD noch auf TisB ähnliche Proteine untersucht. In diesem Fall wurde speziell auf das Vorhandensein eines HCZ-Motivs der Längen  $m = 2$  und  $m = 3$  Wert gelegt. Darüber hinaus sollte die Nettoladung nicht mehr als  $\pm 2$  betragen, so dass mindestens zwei Drittel der geladenen Aminosäuren am Charge Zipper beteiligt sind. Des weiteren sollten die gesuchten Proteine eine  $\alpha$ -helikale Konformation besitzen und aus nicht mehr als 35 AS bestehen.

Proteine die diesen Anforderungen entsprechen finden sich in Tabelle 9 wieder. Ebenfalls sind die Erwartungswerte  $N_m$  angegeben. Es konnten insgesamt 37 Proteine mit  $m = 2$  identifiziert werden und 9 Proteine mit  $m = 3$ . Darunter finden sich antimikrobielle Peptide von Fröschen wie Cearine, Dermaseptine oder Brevinine. Auch konnte Isracidin aus der Rindermuttermilch ausgemacht werden. Die *Helical Wheel* Darstellungen der in Tabelle 9 auftretenden Proteine sind in Anhang 6.2 und 6.3 zu finden.

**Tabelle 9** – HCZ-Motiv tragende Proteine mit  $m = 2$  und  $m = 3$

Name	Sequenz	AS	$N_m$
<i>m = 2</i>			
Odorrainin-N1	DEKGPKWKR	9	$8,3 \cdot 10^{-2}$
Histone H6-like protein	PKRKSATKGD EPA	13	$8,3 \cdot 10^{-2}$
Metalnikowin I	VDKPDYRPRP RPPNM	15	$8,3 \cdot 10^{-2}$
Metalnikowin IIA	VDKPDYRPRP WPRPN	15	$8,3 \cdot 10^{-2}$
Metalnikowin IIB	VDKPDYRPRP WPRNMI	16	$8,3 \cdot 10^{-2}$
Metalnikowin III	VDKPDYRPRP WPRPNM	16	$8,3 \cdot 10^{-2}$
$\alpha$ -Basrubrin	GADFQECMKE HSQKQHQQG	20	0,125
Andersonin-X1	GLFSKFAGKG IVNFLIEGVE	20	0,25
Ocellatin-4	GLLDFVTGVG KDIFAQLIKQ I	21	0,25
Salivaricin A	KRGSGWIATI TDDCPNSVFV CC	22	0,25
Caerin 4.1	GLWQKIKSAA GDLASGIVEG IKS	23	0,125

Tabelle 9 – HCZ-Motiv tragende Proteine mit  $m = 2$  und  $m = 3$  (Fortsetzung)

Name	Sequenz	AS	$N_m$
Caerin 4.2	GLWQKIKSAA GDLASGIVEA IKS	23	0,125
Caerin 4.3	GLWQKIKNAA GDLASGIVEG IKS	23	0,125
Isracidin	RPKHPIKHQG LPQEVLNENL LRF	23	$8,3 \cdot 10^{-2}$
Brevinin-1-OR3	IDPFVAGVAA EMMQHVYCAA SKKC	24	0,25
Brevinin-1-OR6	IIPFVAGVAA EMMEHVYCAA SKKC	24	0,25
Brevinin-1-OR8	ILPFVAGVAA EMMEHVYCAA SKKC	24	0,25
Brevinin-1-OR9	ILPFVAGVAA MEMEHVYCAA SKKC	24	0,25
Brevinin-2-OA4	GLLDTFKNLA INAAESAGVS VLNSLSCKLS KTC	33	0,125
Delta-Lysin I	MAADIISTIG DLVKLIINTV KKFQK	25	$8,3 \cdot 10^{-2}$
Dermaseptin-DI5	GLWSKIKEAA KTAGLMAMGF VNDMV	25	0,125
Dermaseptin-H15	GLWSKIKDVA AAAGKAALGA VNEAL	25	0,125
Dermaseptin-H7	GLWSKIKDVA AAAGKAALGA VNEAL	25	0,125
Dermaseptin-H4	GLWSTIKNVG KEAAIAAGKA ALGALGEQ	28	0,125
Dermaseptin-H5	GLWSTIKNVG KEAAIAAGKA VLGSLGEQ	28	0,125
Dermaseptin-H8	GLWSTIKQKG KEAAIAAACA AGQAVLNSAS EAL	33	$8,3 \cdot 10^{-2}$
Dermaseptin-H9	GLWSTIKQKG KEAAIAAACA AGQAALNAAS EAL	33	$8,3 \cdot 10^{-2}$
Maculatin 3.1	GLLQTIKEKL ESLESLAKGI VSGIQA	26	$6,3 \cdot 10^{-2}$
Enterocin NKR-5-3D	TPGGIDFISG GPHVAQDVLN AIKNFFK	27	0,25
Hyen A	CGESCXYIPC TVTALLGCSC KDKVCYKN	28	0,125
Plantaricin W	KCKWWNISC D LGNNGHVCTL SHECQVSCN	29	0,25
Staphylococcin C55	CSTNTFSLSD YWGNKGNWCT ATHECMSWCK	30	0,25
Vhl-1	SISCGESCAM ISFCFTEVIG CSCKNKVCYL N	31	0,25
Dermatoxin A1	SLGSFMKGVG KGLATVGKIV ADQFGKLEA GQG	33	$8,3 \cdot 10^{-2}$
Dolabellanin B2	SHQDCYEALH KCMASHSKPF SCSMKFHMCL QQQ	33	0,125
Hb- $\beta$ -P-1	AANFGPSVFT PEVHETWQKF LNVVVAALGK QYH	33	0,25
Sushipeptide 3	HAEHKVKIGV EQKYGFPPQG TEVYTCSGN YFLM	34	$6,3 \cdot 10^{-2}$
$m = 3$			
Caerin 3.1	GLWQKIKDKA SELVSGIVEG VK	22	$6,3 \cdot 10^{-2}$
Eryngin	ATRVVYCNRR SGSVVGGDDT VYYEG	25	$6,3 \cdot 10^{-2}$



**Tabelle 9** – HCZ-Motiv tragende Proteine mit  $m = 2$  und  $m = 3$  (Fortsetzung)

Name	Sequenz	AS	$N_m$
Ocellatin-2	GVLDFKDAK QILAHAAEK QI	22	$6,3 \cdot 10^{-2}$
Ocellatin-5	AVLDILKDVG KLLSHFMEK V	21	$6,3 \cdot 10^{-2}$
Ocellatin-V3	GVLDTLTGAG KLLAHALSK LSEKV	25	$6,3 \cdot 10^{-2}$
Odorrainin-F-OA3	GFMDTAKNVA KNEAGNLLDN LKCKITKAC	29	$4,2 \cdot 10^{-2}$
Ranatuering-2 CPa	GIMDTIKDTA KTVAVGLLDK IKCKITGC	28	$4,2 \cdot 10^{-2}$
Ranatuering-2 PLb	GIMDTVKNAA KDLAQQLLDK LKCRITGC	28	$4,2 \cdot 10^{-2}$
Ranatuering-2 PLf	GIMDTVKNAA KDLAQQLDKL KCRITGC	27	$4,2 \cdot 10^{-2}$

#### 4.1.8 Zusammenfassung und Diskussion

Dass RCZ-Motive zur Stabilisierung von Membranproteinen beitragen, stellt ein neues Konzept der Interaktion von Proteinen in Membranen dar. Hierbei kommt es durch die komplementär geladenen Reste zur Bildung von Salzbrücken die die Ladungen neutralisieren und es somit dem Protein ermöglichen, sich in die unpolare Umgebung der Membran zu integrieren. Die Besonderheit dieses Assemblierungsmotivs liegt in der Tatsache begründet, dass die Einbringung von einzelnen polaren oder sogar geladenen Resten in die hydrophobe Membranumgebung grundsätzlich einen energetisch sehr ungünstigen Zustand darstellt [46]. In der Vergangenheit wurden verschiedene Hydrophobizitätsskalen entwickelt, um die benötigte Energie zur Integration von geladenen Resten in hydrophobe Membranen zu bestimmen [47, 48]. Es stellte sich heraus, dass für das Einbringen einer einzigen polaren Gruppe, wie sie in Serin oder Threonin-Seitenketten vorkommen, ein Energieaufwand von etwa  $0,3 \text{ kcal mol}^{-1}$  bis  $1 \text{ kcal mol}^{-1}$  aufgebracht werden muss. Die Integration einer ungeschützten Peptidbindung oder gar einer geladenen Seitenkette benötigt im Vergleich dazu einen noch höheren Energieaufwand ( $2 \text{ kcal mol}^{-1}$  bis  $6 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). In einer Studie zur Berechnung von Solvatationsenergien konnte allerdings gezeigt werden, dass die Ausbildung einer Salzbrücke und die damit verbundene Neutralisation der Ladungen den energetischen Aufwand um etwa  $0,4 \text{ kcal mol}^{-1}$  heruntersetzen kann [49]. Dies gilt ebenso für Wasserstoffbrückenbildung zwischen polaren Resten in der hydrophoben Membran.

Aktuell ist der Wissenstand auf dem Gebiet der Helix-Helix Interaktion, vermittelt über geladene Reste, noch sehr gering. Während man bis vor einiger Zeit davon ausging, dass diese eine Dimerisierung ihrer ungeladenen Form positiv beeinflussen können, so mehren sich neuerdings die Hinweise auf eine Interaktion zwischen geladenen Resten [50]. Dabei können Helix-Helix Interaktionen vermittelt über geladene Seitenketten und damit über eine Salzbrückenausbildung, durchaus vorkommen. Ob nun geladene Reste von artifiziellen Transmembrandomänen zur Dimerisierung und damit zur Helix-Helix Interaktion in biologischen Membranen beitragen können, wurde von Herrmann et al. überprüft [51]. Die Autoren testeten mittels TOXCAT-Assays die Fähigkeit zur Dimerisierung von  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen über geladene Reste. Dabei stellte sich heraus, dass Salzbrücken durchaus zur Stabilität von Helix-Helix Interaktion in biologischen Membranen beitragen

können. Eine  $\alpha$ -helikale Transmembrandomäne die genügend hydrophobe Aminosäuren enthielt um in die Membran zu integrieren, diente dabei als Ausgangssequenz. Zusätzlich enthielt diese Sequenz ein **GXXXG** Dimerisierungsmotiv. In diese Sequenz wurden an unterschiedlichen Positionen Ladungsmutationen eingefügt und die Fähigkeit zur Dimerisierung überprüft. Interessanterweise konnten nur die Mutanten dimerisieren, bei welchen sich die gegensätzlich geladenen Reste auf der selben Höhe und in großer räumlichen Nähe auf der Helix befanden. Dabei konnten Dimerisierungen zwischen Transmembranregionen beobachtet werden, die jeweils bis zu vier komplementär geladene Reste enthielten. Die Interaktion konnte allerdings nur bei gleichzeitigem Vorhandensein eines **GXXXG** Motivs beobachtet werden. Wurde die Dimerisierung von Abstoßungsmutanten überprüft, so konnte trotz der Anwesenheit eines **GXXXG** Motivs, eine deutliche Verminderung der Dimerisierungsfähigkeit beobachtet werden. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen nicht nur, dass Salzbrücken zur Dimerisierung von Transmembranhelices dienen können, sondern auch, dass zur Ausbildung eines Dimers, die geladenen Reste korrekt auf der Helix positioniert sein müssen. Diese Positionierung könnte möglicherweise durch das **GXXXG** Motiv unterstützt werden.

Faltung und Assemblierung von Proteinen, vor allem von Transmembranproteinen, stellt einen sehr komplexen Prozess dar [52,53]. Dabei müssen Proteine intramolekulare als auch intermolekulare Wechselwirkungen eingehen. So konnte für das Protein TatA<sub>d</sub> gezeigt werden, dass RCZ-Motive sowohl über inter- als auch intramolekulare Salzbrücken ausgebildet werden und somit zur Struktur und Funktion der Pore beitragen [30]. Auf dieser Grundlage wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen nach TatA<sub>d</sub> ähnlichen und zum anderen nach sonstigen  $\alpha$ -helikalen Proteinen gesucht, die einen möglicherweise biologisch relevanten Charge Zipper tragen.

Hierzu wurde die UNIPROT Datenbank in transmembrane Proteine und lösliche Proteine aufgeteilt. Es stellte sich heraus, dass etwa 13 % der hinterlegten Proteine eine nachgewiesene oder vorhergesagte Transmembranregion besitzen. Diese Zahl ist ungefähr nur halb so groß wie postuliert, da bekanntlich etwa 30 % der ORFs (open reading frames) von Organismen für Membranproteine codieren [54]. Dieser Unterschied lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die UNIPROT Datenbank lediglich die Summe aller hinterlegten Proteinsequenzen darstellt. Diese sind offensichtlich recht ungleichmäßig verteilt. Während

nahezu alle Proteine die in *E. coli* vorkommen hinterlegt sind, so ist dies für andere, weniger beachtete Organismen nicht der Fall.

Neben der Einteilung in Membranproteine und lösliche Proteine, wurde auch die Aminosäurenverteilung in den einzelnen Gruppen analysiert. Dies wurde ebenfalls für die Proteine in der APD durchgeführt. Wie zu erwarten, waren hydrophobe Aminosäuren in Transmembranproteinen überrepräsentiert, wohingegen in der APD es einen drastisch höheren Anteil von Cystein und positiv geladenen Aminosäuren (Lys, Arg) gab. Eine typische Eigenschaft von antimikrobiellen Peptiden ist eine positive Nettoladung, um mit der negativ geladenen bakteriellen Membran zu interagieren [55]. Dies begründet den erhöhten Anteil an positiv geladenen Aminosäuren. Der hohe Cysteinanteil rührt von der großen Anzahl an zirkulären Peptiden her. Diese können entweder über den N- und C-Terminus zyklisiert werden, oder aber durch Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten. Letztere spielen vor allem bei pflanzlichen Cyclotiden eine Rolle [56]. Die Ergebnisse zur Aminosäurenverteilung in dieser Arbeit scheinen sich auf den ersten Blick von einer Studie von Arkin und Brunger zu unterscheiden [57]. Diese führten ebenfalls eine Analyse der Aminosäurenverteilung in Transmembranproteinen durch und ermittelten einen deutlich höherer Anteil an unpolaren Aminosäuren als in dieser Studie. Dieser ist darin begründet, dass Arkin und Brunger lediglich die transmembranen Bereiche der Proteine analysiert haben. Durch die Einbeziehung aller Bereiche der Membranproteine lassen sich die abweichenden Ergebnisse in dieser Arbeit erklären.

Die generelle Aminosäurenverteilung von Proteinen wurde auch schon von Eitner *et al.* untersucht [58]. Hierbei konnte eine nahezu identische Verteilung zu der in dieser Arbeit gefundenen Verteilung, beobachtet werden. Ebenfalls nutzten die Autoren die UNIPROT Datenbank als Grundlage, allerdings bestand diese zum Zeitpunkt der Analyse (2010) lediglich aus etwa 450000 Sequenzen.

Ziel dieses Kapitels war die gezielte Suche nach HCZ-Motiven. Diese nehmen in ihrer Häufigkeit ab, je mehr Aminosäurenpaare daran beteiligt sind. Salzbrücken tragen dabei zur Stabilität von Proteinen durchaus bei, indem die gegensätzlich geladenen Aminosäuren eine elektrostatische Wechselwirkung eingehen. Generell werden Salzbrücken als solche bezeichnet, wenn sich die beteiligten chemischen Gruppen innerhalb einer Distanz von 4 Å befinden. Kumar und Nussinov [59] untersuchten hierzu die Kristallstrukturen von 36 nicht

homologen Proteinen. Es konnten im Mittel etwa 3 Salzbrücken pro 100 AS identifiziert werden. In Proteinen von thermophilen Organismen ist die Anzahl an Salzbrücken pro 100 AS etwas erhöht [60]. Die Anzahl an Salzbrücken hängt nicht nur von der Häufigkeit polarisierbarer Reste ab, sondern auch von der Anzahl an Aminosäuren, die in der Primärsequenz zwischen den beteiligten Resten liegen [61]. Etwa 80 % der identifizierten Salzbrücken liegen nicht mehr als 5 Reste auseinander.

Über artifizielle Datenbanken sollte hier nun überprüft werden, ob statistische Abweichungen im Vergleich zur UNIPROT Datenbank auftreten, um daraus Rückschlüsse auf die strukturelle Relevanz von HCZ-Motiven ziehen zu können. Der Verteilungsvergleich zeigte jedoch kein gehäuftes Auftreten von HCZ-Motiven im Vergleich mit der artifiziellen Datenbank. HCZ-Motive treten wie in der Einführung bereits erwähnt auch statistisch auf, so dass es durchaus möglich ist, dass eine Subgruppe von Proteinen, bei welchen RCZ-Motive vorkommen, überdeckt werden. Um dies genauer zu eruieren, wäre es nötig, die sehr große Datenbank in kleinere Gruppen anhand spezieller Kriterien zu gruppieren.

Ein erster Ansatz zur Bestimmung solcher Kriterien war es, nach TatA<sub>d</sub> ähnlichen Proteinen zu suchen. Dabei konnten etwa 6000 Proteine identifiziert werden, die den Suchkriterien entsprachen. Allerdings lagen für die gefundenen Proteine keine dreidimensionalen Strukturinformationen vor, so dass nicht überprüft werden konnte, ob diese Proteine RCZ-Motive tragen. Höchstwahrscheinlich müssen die gefundenen Proteine noch weiter untergruppiert werden, da vermutlich nur in sehr wenigen der gefundenen Proteine, aufgrund der zufälligen Verteilung der Ladungen, ein RCZ-Motiv realisiert ist.

Neben TatA<sub>d</sub> ähnlichen Proteinen wurde auch generell nach HCZ-Motiven in der UNIPROT und der APD gesucht. Dabei fand sich in der UNIPROT Datenbank das bakterielle Stress-response Protein TisB, welches in Abschnitt 4.3 genauer besprochen wird. Auch das E<sup>rns</sup> Protein aus dem bovinen Virusdiarrhoe-Virus CP7 wurde identifiziert.

**Das E<sup>rns</sup> Protein** Die Genome von Pestiviren codieren für mehrere Proteine, darunter auch das Hüllprotein-RNase-secreted (E<sup>rns</sup>). Dieses stellt ein essentielles Protein im Genom von Pestiviren dar. Hierbei nimmt es die Funktion eines Hüllproteins ein, und ist dort ein wesentlicher Bestandteil des Virions [62].

E<sup>rns</sup> besteht aus 227 Aminosäuren (25,7 kDa). Dabei liegt E<sup>rns</sup> über ein Cystein verknüpft

als Homodimer vor. Desweiteren ist das E<sup>rns</sup> Dimer sehr stark glykosyliert [63]. Die genomische RNA von Pestiviren codiert für ein etwa 4000 AS großes Polypeptid, welches co- und posttranslational prozessiert wird. Mindestens 12 Proteine sind codiert: N<sup>pro</sup>, C, E<sup>rns</sup>, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Am N-terminalen Ende des Polyproteins ist eine Protease (N<sup>pro</sup>) lokalisiert. Diese kann sich autokatalytisch abspalten. Dadurch entsteht der N-Terminus des Protein C [64]. Weiter C-terminal folgt eine Signalsequenz, die die Translokation der Strukturproteine E<sup>rns</sup>, E1 und E2 ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) initiiert. Im ER erfolgt die Prozessierung der Proteine. Hierbei wird das Polyprotein in die einzelnen Proteine mittels Signalpeptidasen zerlegt [63]. Interessanterweise schneiden Signalpeptidasen nur an transmembranen Bereichen in Proteinen, aber auf dem E<sup>rns</sup> Protein befindet sich im Gegensatz zu den Proteinen E1 und E2, keine derartige Sequenz, die für eine transmembrane Insertion sorgen könnte [65,66]. Trotzdem wird E<sup>rns</sup> von der Signalpeptidase geschnitten und bleibt anschließend peripher auf der Virushülle gebunden. Dieses ungewöhnliche Phänomen könnte durch das im E<sup>rns</sup> Protein identifizierte HCZ-Motiv erklärt werden.

**Eine mögliche Rolle des HCZ-Motivs im E<sup>rns</sup> Protein** Trotz allgemein sehr hohen Mutationsraten in RNA Viren zeigen die BVDV Stämme eine nahezu 100% Sequenzhomologie in E<sup>rns</sup> [67]. In Abbildung 13 findet sich ein Vergleich der Primärstrukturen der Proteine aus verschiedenen BVD Virenstämmen. Das HCZ-Motiv ist in diesen Sequenzen weitestgehend konserviert. Im Vergleich zur CP7 Sequenz weisen beispielsweise die Stämme *Braidwood* und *Oregon C24V* eine Mutation in Aminosäure 170 des E<sup>rns</sup> Proteins auf. Hierbei fand eine Umwandlung von Asp zu Glu statt, und damit eine Konservierung der Ladung. Dies trifft nicht nur für negativ geladene Reste zu, sondern auch für positiv geladene Aminosäuren. In den Stämmen *Bega* und *Trangie Y546* fand eine Substitution des Restes 207 von Lys zu Arg statt. Dies bedeutet, dass nicht nur die Hydrophilie wichtig für diesen Teil des Proteins sein muss, sondern auch die Nettoladung.

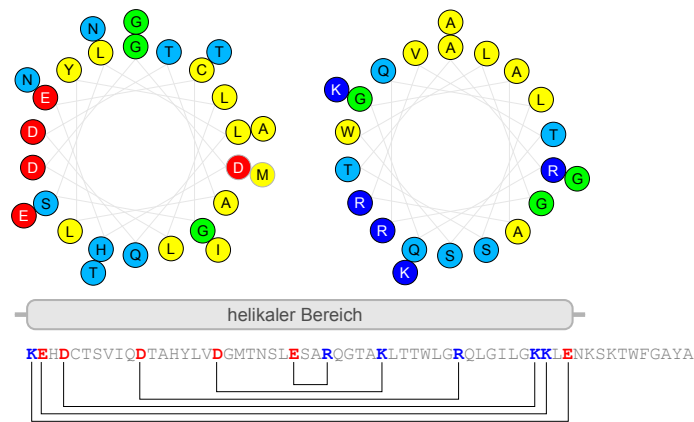
Neben den verschiedenen BVD Virenstämmen findet sich auch in der E<sup>rns</sup> Sequenz anderer Pestiviren ein HCZ-Motiv. Sowohl in der CSFV Sequenz als auch in der BDV Sequenz ist dieses Ladungsmuster konserviert. Auch Giraffen, Antilope und Rentier Erreger tragen ein HCZ-Motiv.

Erns BVDV 1-CP7	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV type 1b	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV 839cp	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV 799cp	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV 799ncp	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV 839ncp	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV type 1a	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV strain Braidwood	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV strain Bega	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV strain Trangie Y546	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV 1-SD1	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV strain Oregon C24V	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV 1 strain ZM-95	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV 1-Osloss	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV 1-NADL	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV 2	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV type 2	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV 1 Ind S1456	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV 2-New York'93	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV 1 Ind S1226	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV 1 Ind S1449	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
Erns BVDV 3 Th/04_KhonKaen	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY
CSFV Alfort	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY A
BDV	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY A
PV reindeer-1 V60-Krefeld	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY AA
PV Giraffe-1	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY AA
PV Pronghorn antelope	KEHDCTSVIQ	DTAHYLV	DGM	TNSLES	AROG	TAKLTTWLGR	QLGILGKKLE	NKSKTWFGAY AA

**Abbildung 13** – Alignment der letzten 60 C-terminalen Reste des  $E^{\text{rns}}$  Proteins mit anderen BVDV Stämmen und weiteren Pestiviren. Positiv geladene Reste sind blau und negativ geladene Reste sind rot hinterlegt.

Für den C-terminalen Bereich des  $E^{\text{rns}}$  Proteins, wo das HCZ-Motiv liegt, konnte ein langer  $\alpha$ -helikaler Bereich nachgewiesen werden, welcher amphipathische Eigenschaften besitzt [68]. Dieser Bereich ist verantwortlich für die Bindung an die ER Membran [69] und konnte auf die letzten etwa 60 C-terminalen Reste des  $E^{\text{rns}}$  Proteins aus dem Schweinepestivirus *Alfort* mit Hilfe von Deletionsmutanten festgelegt werden. Dabei zeigt diese Art von Membrananker ungewöhnliche Eigenschaften. Durch verschiedene Extraktionsmethoden konnte gezeigt werden, dass  $E^{\text{rns}}$  sich weder so leicht von der Membran löst, wie ein übliches peripheres Protein, noch so fest wie ein transmembranes Protein verankert ist [70]. Interessanterweise befindet sich das HCZ-Motiv im  $E^{\text{rns}}$  Protein in der selben Region, für die auch eine  $\alpha$ -helikale Faltung nachgewiesen wurde (Abbildung 14). Durch die amphipathische Eigenschaft dieser  $\alpha$ -helikalen Region liegen die am HCZ-Motiv beteiligten Reste auf der selben Seite der Helix, so dass sich ohne sterische Probleme Salzbrücken zwischen den beteiligten Resten ausbilden könnten. Durch dieses PCZ-Motiv würde sich ein Mechanismus der  $E^{\text{rns}}$  Prozessierung und Membranaffinität erklären lassen.

Nach der Translokation ins ER Lumen interagiert die amphipathische Helix im C-terminalen Bereich von  $E^{\text{rns}}$  mit der ER Membran. Dabei könnte sich ein Gleichgewicht einstellen, in

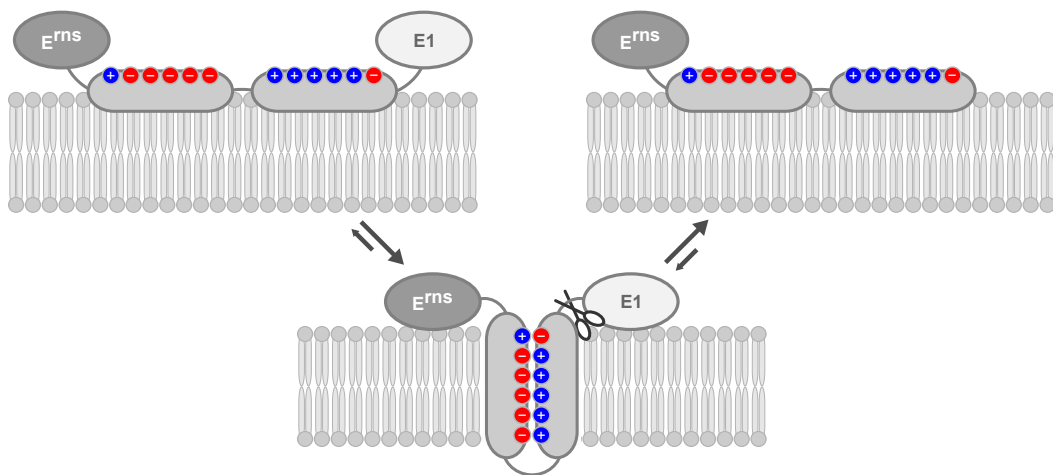


**Abbildung 14** – Das HCZ-Motiv im  $E^{rns}$  Protein liegt in der  $\alpha$ -helikalen, C-terminalen Region des Proteins. Zur Verdeutlichung der amphipatischen Struktur sind *Helical Wheels* über den entsprechenden Bereichen dargestellt.

dem es zur Ausbildung der Salzbrücken und zur reversiblen Insertion in die hydrophobe ER Membran kommen könnte. Dieses Modell wird durch die Tatsache unterstützt, dass etwa 20 Reste in  $\alpha$ -helikaler erforderlich sind, um eine biologische Membran zu durchspannen. Da der helikale Teil im C-Terminus von  $E^{rns}$  aus etwa 60 Aminosäuren besteht, könnten sich zwei amphipatische Bereiche ausbilden, eine C-terminale, vorwiegend anionische Helix und eine N-terminale kationische Helix. Diese beiden Helices könnten nun über die Ausbildung von Salzbrücken zwischen den Resten des PCZ-Motivs, eine  $\alpha$ -helikale Haarnadelschleife bilden. Diese könnte, bedingt durch die Neutralisation der Ladungen im amphipatischen Bereich, unter geringerem energetischen Aufwand in die Membran insertieren. Daraufhin wäre es für die Signalpeptidase möglich, das Polyprotein zu prozessieren. Nach erfolgter Prozessierung wäre es denkbar, dass die Haarnadelschleife ihr Gleichgewicht zwischen integriertem Zustand und oberflächlich gebundenem Zustand nach rechts verschiebt. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtungen, dass zum einen  $E^{rns}$  im Serum von befallenen Rinder nachgewiesen werden konnte, also nicht fest an die ER Membran bindet, wie beispielsweise Transmembranproteine, und dass die Prozessierung durch die Signalpeptidase länger dauert als der Signalpeptidaseschnitt zwischen dem E1 und dem E2 Protein [63, 71]. Während dieser zeitlichen Verzögerung könnte sich zuerst die C-terminale Region in ihre  $\alpha$ -helikale „Hairpin“-Konformation falten und anschließend wie beschrieben in die ER Membran integrieren. Um diesen vorgeschlagenen  $E^{rns}$  Prozessierungsmechanismus experimentell zu untersuchen, müsste der C-terminale Teil des Proteins



rekombinant oder peptidsynthetisch hergestellt werden. Mit Hilfe der OCD-Spektroskopie könnte unter der Verwendung verschiedener Lipidumgebungen die relative Orientierung des C-terminalen Bereichs zur Membrannormalen relativ leicht bestimmt werden. Zusätzlich könnte mit Hilfe von Festkörper-NMR-Spektroskopie ebenfalls die Membranorientierung untersucht werden. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, dass nicht wie in der OCD-Spektroskopie eine qualitative Aussage, also ein Mittel über alle Orientierungen ermittelt werden kann, sondern auch einzelne Zustände erfasst werden können, so dass man durch eine Messung auch Aussagen darüber treffen kann, ob mehrere Orientierungen gleichzeitig vorliegen. Hierdurch wäre es möglich genauere Aussagen über ein Gleichgewicht zwischen oberflächlich orientierten und transmembranen Zustand des C-terminalen  $E^{rns}$  Bereichs zu treffen.

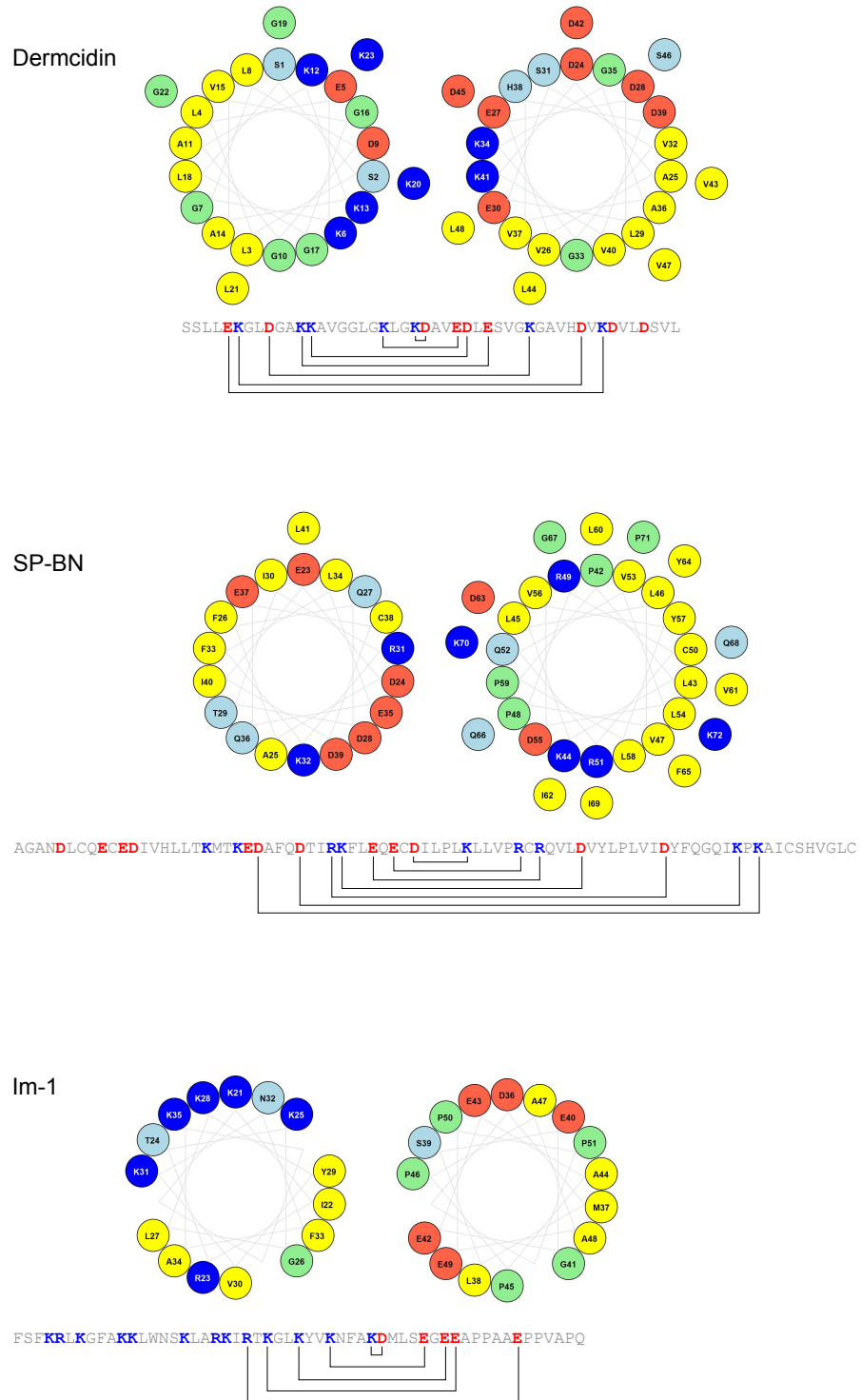


**Abbildung 15** – Mögliche Rolle des PCZ-Motivs im  $E^{rns}$  Protein. Nach der Translokation ins ER Lumen interagiert die amphipathische Helix im C-terminalen Bereich von  $E^{rns}$  mit der ER Membran (*links*). Daraufhin kommt es zur Ausbildung der Salzbrücken im PCZ-Motiv und der Insertion in die Membran. Nun kann die Signalpeptidase das Polyprotein weiter prozessieren (*Mitte*). Nach erfolgter Prozession lagert sich der amphipathische, helikale C-Terminus von  $E^{rns}$  wieder parallel zur Membran an (*rechts*). Die Schere symbolisiert die Signalpeptidase.

**HCZ-Motive in der APD** In der APD wurden HCZ-Motiv tragende Proteine über zwei Analysen mit unterschiedlichen Randbedingungen gesucht. Zum einen sollte nach E<sup>rms</sup> ähnlichen Proteinen gesucht werden ( $\alpha$ -helikale Proteine mit  $m \geq 6$ ) und zum anderen nach TisB ähnlichen Proteinen. Hier sollten die Proteine ebenfalls  $\alpha$ -helikal gefaltet sein und zusätzlich nicht mehr als insgesamt 6 bzw. 8 Ladungen tragen, wobei  $m = 2$  bzw.  $m = 3$  gefordert und die Länge auf maximal 35 Aminosäuren begrenzt wurde.

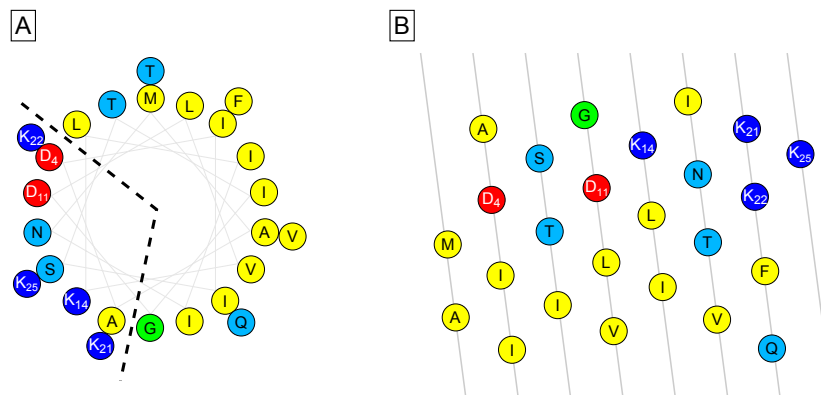
So ergab sich eine Reihe an interessanten Proteinen die in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Zum einen Dermcidin, welches dem E<sup>rms</sup> Typ entspricht und in Abschnitt 4.2 genauer besprochen wird. Desweiteren wurde SP-BN, ein Protein aus *M. musculus*, gefunden, welches den N-terminalen Bereich des SPB (surfactant protein B) darstellt. Dabei besitzt es antimikrobielle Aktivität nur bei sauren pH-Werten [72]. Hier zeigte sich ein HCZ-Motiv der Länge  $m = 7$ . Betrachtet man die Primärsequenz von SP-BN so fällt auf, dass relativ viele Proline, vor allem im C-terminalen Bereich, wo sich auch das HCZ-Motiv befindet, vorkommen. Proline sind dafür bekannt, dass sie helikale Strukturen stören und Brüche in der Sekundärstruktur verursachen [7]. Es ist daher anzunehmen, dass das identifizierte HCZ-Motiv in SP-BN aufgrund sterischer Hinderung nicht realisiert werden kann (Abbildung 16).

Neben SP-BN wurde auch Im-1, ein antimikrobielles Peptid aus dem Skorpion *Isometrus maculatus* identifiziert. Der Charge Zipper hier hat eine Länge von  $m = 6$ . Im-1 besitzt neben einer antimikrobiellen Aktivität auch eine Toxizität gegenüber Insekten. Wie schon in SP-BN kommen auch in Im-1 sehr viele Proline im Bereich des Charge Zippers vor. Allerdings sind diese auf die letzten 12 C-terminalen Reste konzentriert. Es könnte hier beispielsweise durch die Entstehung einer Polyprolinhelix zur Ausbildung der Salzbrücken im Charge Zipper kommen. Leider sind sowohl für SP-BN als auch für Im-1 weder hochauflösende Strukturen noch genauere Funktionsuntersuchungen bekannt.



**Abbildung 16** – *Helical Wheel* Darstellungen von Dermcidin, SP-BN und Im-1. Die beiden komplementären Seiten der HCZ-Motive sind über der entsprechenden Primärsequenz als *Helical Wheel* Projektion dargestellt. Weitere Abbildungen aus Tabelle 8 finden sich im Anhang.

Proteine, die zu kurz sind um sich auf sich selbst zurückzufalten und dadurch über Multi-merisierung via Charge Zipper ihre Wirkung entfalten könnten, wurden ebenfalls gefunden (TisB ähnliche Proteine). Insgesamt wurden 37 Proteine mit dieser Eigenschaft ( $m = 2$ ) identifiziert. Darunter Delta-Lysin I aus *Staphylococcus warneri*. Delta-Lysin I besitzt eine antimikrobielle Aktivität gegenüber Gram negativen Organismen, sowie eine deutliche hämolytische Aktivität [73]. Für Delta-Lysin I kennt man noch keinen genauen Wirkmechanismus. Stellt man Delta-Lysin I in der *Helical Wheel* Projektion dar, so erkennt man eine perfekte amphipathische Helix, bei welcher die geladenen Reste gleichmäßig über die polare Seite der Helix verteilt sind (Abbildung 17). Wird das Protein in der *Helical Net* Projektion dargestellt, so lässt sich wie auch bei TisB (Abschnitt 4.3), eine Anordnung der geladenen Reste entlang eines schmalen Streifens beobachten. Über diesen polaren Streifen könnte Delta-Lysin I mit anderen Delta-Lysin Molekülen ein RCZ-Motiv ausbilden und so seine antimikrobielle Aktivität entfalten.



**Abbildung 17** – *Helical Wheel* und *Helical Net* Projektion von Delta-Lysin I. (A) Delta-Lysin I faltet sich womöglich in eine amphipathische Helix. (B) *Helical Net* Projektion von Delta-Lysin. Die geladenen Reste sind nicht komplett über die Helixbreite verteilt.

Legt man die Ergebnisse von Herrmann et al. zu Grunde, dann ergeben sich für zukünftige Forschungsprojekte weitere Kriterien, die erfüllt sein sollten, damit ein RCZ-Motiv gefunden werden kann. Dies wäre zum einen eine korrekte Positionierung der Reste in der richtigen Höhe der transmembranen Helix und zum einen die räumliche Nähe. Diese kann sehr leicht über über Darstellungen der Transmembranregion mittels *Helical Wheel* Projektion herausgefunden werden. Dies könnte helfen, die mehr als 6000 TatA<sub>d</sub> ähnlichen Proteine zu gruppieren und dadurch weitere Sequenzen zu identifizieren, bei welchen

Charge Zipper Motive eine tragende Rolle für Struktur und Funktion der entsprechenden Proteine spielen.

## 4.2 Dermcidin

### 4.2.1 Einleitung

Eines der identifizierten Proteine, die einen Charge Zipper tragen, ist das humane Dermcidin. Zu Beginn des Jahrtausends wurde ein Gen gefunden, welches in humanen, merokrinen Schweißdrüsen exprimiert und anschließend in den Schweiß sekretiert wird [74]. Es handelt sich um Dermcidin, ein antimikrobielles Peptid auf der Haut von Menschen. Hierbei wird Dermcidin sehr restriktiv exprimiert. Die Expression findet lediglich in der Haut statt [75]. Genauer in den dunklen mukösen Zellen des Sekretionsganges der merokrinen Schweißdrüsen. Hier ist das Dermcidin Präprotein im Golgi Komplex und den sekretorischen Vesikeln lokalisiert. Das Präprotein wird dabei konstant in den menschlichen Schweiß abgegeben und sehr schnell in kleinere Fragmente prozessiert [76]. Typische Schweißkonzentrationen für Dermcidin und seine Derivate unterschieden sich von Mensch zu Mensch und betragen für den Schweiß an der Stirn etwa  $70 \mu\text{g mL}^{-1}$  [77]. Nachdem das 19 Aminosäuren lange Signalpeptid abgespalten wurde, wird das Protein weiter zerlegt. Hierbei entsteht eine Prodomäne und das 48 Aminosäuren lange Dermcidin (DCD1L). Ausgehend von DCD1L entstehen durch weitere Spaltung bis zu 13 weitere DCD1L Derivate [78].

**Tabelle 10** – Antimikrobielles Spektrum von Dermcidin und seinen Derivaten

Organismus	DCD1/DCD1L IC <sub>90</sub>	SSL25 IC <sub>90</sub>	Literatur
<i>S. aureus</i> (MSSA)	9 bis 45	9 bis 48	[79–84]
<i>S. aureus</i> (MRSA)	8	35	[81]
<i>S. epidermidis</i>	10 bis 50	6	[81, 85]
<i>E. coli</i>	45 bis 84	10	[79–81]
<i>P. aeruginosa</i>	95 bis 200	15 bis 200	[81, 82]
<i>C. albicans</i>	10 bis 477	nb	[79, 80]
<i>S. typhimurium</i>	68	nb	[80]
<i>L. monocytogenes</i>	108	nb	[80]
<i>P. putida</i>	0,5 (IC <sub>50</sub> )	nb	[79]

Inhibitorische Konzentration, die 90% der Mikroorganismen im Versuch abtötet (IC<sub>90</sub>), Angaben in  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , nb: nicht bestimmt. Modifiziert nach [86]

Dermcidin und seine Abkömmlinge besitzen dabei ein breites Spektrum an antimikrobieller Aktivität und dabei gleichzeitig keine hämolytische Aktivität. Am höchsten im Schweiß

konzentriert sind die anionischen Peptide DCD1L und das Derivat DCD1 (um ein Leucinrest verkürzt), sowie die kationischen Peptide SSL25 und SSL23. Alle Peptide zeigen unabhängig von ihrer Nettoladung ein breites und überlappendes antimikrobielles Spektrum (Tabelle 10). Die Peptide sind gegen pathogenen Mikroorganismen wie beispielsweise *P. aeruginosa* oder *C. albicans* aktiv [84]. Darüber hinaus besitzen sie sogar antimikrobielle Aktivität gegenüber gefährlichen Stämmen wie methicillin-resistente *S. aureus*.

Ebenfalls besitzt rekombinant hergestelltes Dermcidin antimikrobielle Aktivität, obwohl durch den Expressionsprozess einzelne Aminosäuren am N- bzw. C-Terminus verblieben sind [79,80]. Allerdings besitzen diese Peptide wesentlich geringere antimikrobielle Aktivität im Vergleich zu den aus Schweiß gewonnenen oder synthetisch hergestellten Dermcidinen. Der Mechanismus von Dermcidin, der zum Absterben der Bakterien führt ist noch nicht ganz aufgeklärt. Unabhängig von der Nettoladung des Peptids interagiert es mit Phospholipidmembranen. Dabei führt dies zum Absterben von Gram negativen Bakterien, ohne größere Poren in der Membran zu bilden [81,82]. Diese Eigenschaft und die Tatsache, dass DCD1L ein anionisches Peptid, im Gegensatz zu den meisten anderen antimikrobiellen Peptiden (AMPs) ist, legt nahe dass sich der Wirkmechanismus von anderen AMPs unterscheidet. Desweiteren bleibt die antimikrobielle Aktivität auch über einen breiten pH-Bereich, sowie unter hohen Salzkonzentrationen, die den Bedingungen im menschlichen Schweiß sehr nahe kommen, erhalten.

Die Struktur von DCD1L wurde in verschiedenen Umgebungen bestimmt. Dermcidin besteht in 50 % TFE aus vier helikale Bereichen: Reste 5 bis 7 (Helix 1), Reste 10 bis 12 (Helix 2), Reste 27 bis 31 (Helix 3) und Reste 37 bis 43 (Helix 4). Dabei ist die Gesamtstruktur sehr flexibel, vor allem der N-Terminus (Reste 1 bis 23) [87]. In Abschnitt 4.2.6 wird genauer darauf eingegangen. Auch konnte gezeigt werden, dass DCD1L bevorzugt mit negativ geladenen Phospholipiden interagiert. Durch OCD-Experimente konnte die Orientierung von Dermcidin in negativ geladenen DMPC/DMPG (3:1) Vesikeln bestimmt werden. Hierbei nimmt Dermcidin bei einem P/L-Verhältnis von 1:50 eine parallel zur Membran gelegene Orientierung (S-state) ein. Bei der Interaktion mit der Lipiddoppelschicht bildet Dermcidin einen oligomeren Komplex, der wahrscheinlich durch divalente Kationen wie  $Zn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  stabilisiert wird. Hierzu führten Paulmann et al. antimikrobielle Assays mit und ohne zweiwertige Kationen durch. Bei Anwesenheit von  $Zn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  war die antimikrobielle

Aktivität um ein Vielfaches höher. Ebenfalls konnte bei höheren TFE Konzentrationen und der Zugabe von  $\text{Zn}^{2+}$  eine höhere Anzahl an DCD1L Oligomeren beobachtet werden als im Versuch ohne  $\text{Zn}^{2+}$ . Durch Anwesenheit von zweiwertigen Kationen entsteht vermutlich ein Ionenkanal der die antimikrobielle Aktivität begründet [88].

Homo sapiens	SSLLEKGLDG	AKKAVGGLGR	LGRDAVEDLE	SVGRGAVHDV	KDVLDSVL
Pan troglodytes	SSLLEKGLDG	AKKAVGGLGR	LGRDAVEDLE	SVGRGAVHDV	KDVLDSVL
Gorilla gorilla	SSLLEKGLDG	AKKAVGGLGR	LGRDAVEDLE	SVGRGAVHXV	KDVLDSVL
Pongo abelii	SSLLEKGLDG	AKKAVGGLGN	LGRDAVEDLE	SVGRGAVHDV	KDILDSVL
Macaca mulatta	ASLLEKGLDG	AKNTLGGGLN	LGRDAVEDLE	SVGRGAVHDV	KDVLDSVL
Papio hamadryas	ASLLEKGLDG	AKNTLGGGLN	LGRDAVEDLE	SVGRGAVHDV	KDVLDSVL
Callithrix jacchus	SSLLEKGLDG	-----LEN	LGRDAVDNLE	NTGKETIHDA	KDVLDSALQ

**Abbildung 18** – Sequenzalignment von Dermcidin aus verschiedenen Organismen. Negativ geladene Reste sind rot hinterlegt, wohingegen positiv geladene Aminosäuren blau hinterlegt sind. Modifiziert nach [86]

Bisher konnten keine homologen Gene oder Proteine im Menschen identifiziert werden. Allerdings kommt Dermcidin in anderen Primaten vor (Abbildung 18). Homologe Proteine konnten lediglich für sehr nahe Verwandte des Menschen identifiziert werden, wobei die Sequenzübereinstimmung auf Proteinebene für Schimpanse und Gorilla (*P. troglodytes* und *G. gorilla*) 100% beträgt. Bei evolutionär etwas weiter entfernten Verwandten wie dem Orang-Utan (*P. abelii*) oder Makaken (*M. mulatta*) besteht Dermcidin zwar auch aus 48 Aminosäuren und die Sequenz ist weitgehend identisch mit der humanen Sequenz, jedoch ist Lys20 in der Orang-Utan Sequenz zu Asn (Nettoladung: -3) und in der Makaken Sequenz sogar ein weiterer Lysinrest (Lys13) ebenfalls zu Asn mutiert (Nettoladung: -4). Dadurch haben diese beiden Sequenzen kein perfektes HCZ-Motiv mehr. Die Sequenzhomologie nimmt mit der Entfernung der evolutionären Verwandtschaft weiter ab. So verschwindet das HCZ-Motiv in der Pavian Sequenz (*P. hamadryas*) ebenfalls durch Mutation von Lys13 und Lys20 zu Asn. Die Dermcidinsequenz des Weißbüschelaffen (*C. jacchus*) hat nicht nur eine geringere Anzahl an Aminosäuren als die humane Sequenz (Deletion von 7 Resten), sondern auch zwei zusätzliche Mutationen, bei denen zwei Glycin Reste (Gly19 und Gly35 der humanen Sequenz) zu den negativ geladenen Resten Glu und Asp mutiert sind. Damit weist diese Dermcidinsequenz eine Nettoladung von -6 auf. Das HCZ-Motiv ist hier definitiv nicht mehr realisiert. Interessanterweise ist der N-terminale und der C-terminale Bereich zwischen den Spezies hochkonserviert (Reste 1 bis 10 und 40 bis 48). Der Bereich dazwischen weist eine höhere Mutationsrate auf, wobei die positiv geladenen Reste weniger

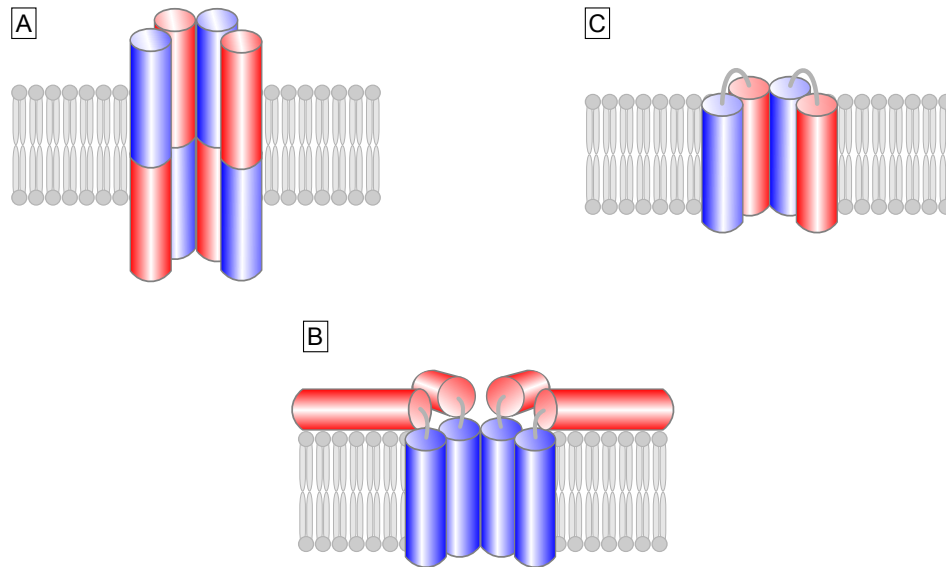


konserviert sind als die negativ geladenen Reste. Je weiter der evolutionäre Abstand zum Menschen ist, desto negativer wird die Nettoladung der Dermcidinhomologe.



**Abbildung 19** – Ds HCZ-Motiv in Dermcidin umfasst 7 Ladungspaare. Negativ geladene Reste sind rot, während positiv geladene Reste blau markiert sind.

Wie genau Dermcidin einen Ionenkanal bildet wurde experimentell noch nicht eindeutig nachgewiesen. Als ursprüngliches Modell und Arbeitshypothese könnte Dermcidin mit Hilfe des vorhandenen HCZ-Motivs (Abbildung 19) eine oligomere Pore bilden. Das HCZ-Motiv in Dermcidin umfasst sieben Ladungspaare. Diese sieben Ladungspaare könnten sich über eine Rückfaltung auf sich selbst innerhalb des Dermcidinmoleküls gegenseitig neutralisieren, und es könnte eine über Salzbrücken verbrückte  $\alpha$ -helikale Haarnadelschleife entstehen. Diese Haarnadelschleife würde dann als Grundeinheit für einen oligomeren Dermcidinkomplex dienen, wobei sich durch intra- und intermolekulare Salzbrücken ein höheres Oligomer bilden könnte. Dieses Oligomer wäre nun in der Lage einen Kanal zu bilden und somit die antimikrobielle Wirkungsweise von Dermcidin zu erklären. Eine weitere Arbeitshypothese wäre, dass nur der kationische N-Terminus eine toroidale Pore bildet [88]. Aufgrund einer Kristallstruktur von Dermcidin die während dieses Projekts publiziert wurde, ist auch ein drittes Modell zur Struktur und Funktion möglich [89]. Auf dieses wird in Abschnitt 4.2.6 genauer eingegangen. Eine Zusammenfassung der Modelle zur antimikrobiellen Wirkweise von Dermcidin findet sich in Abbildung 20.



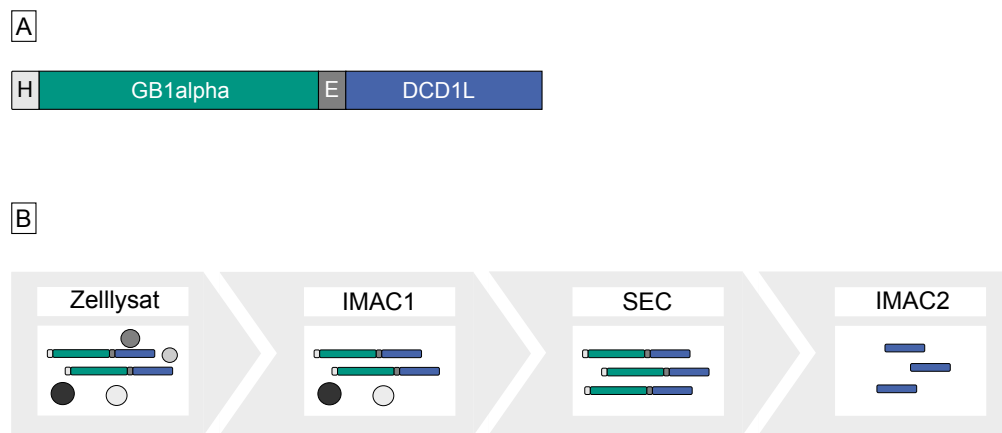
**Abbildung 20** – Strukturmodelle von Dermcidin. (A) Modell anhand der Kristallstruktur von Song et al.. Dermcidin bildet eine hexamere Pore mit gestreckten,  $\alpha$ -helikalen Monomeren aus [89] (B) Modell nach Paulmann et al.. Nur der kationische N-Terminus integriert in die Membran und bildet eine toroidale Pore [88] (C) Charge Zipper Modell von Dermcidin. Über komplementär geladene Aminosäurenpaare bildet sich eine Pore die durch inter- und intramolekulare Salzbrücken stabilisiert wird. Der N-terminale Bereich ist blau dargestellt und der C-terminale Bereich rot. Modifiziert nach [88, 89]

#### 4.2.2 Expression und Aufreinigung von Dermcidin

Für nachfolgende Struktur- und Funktionuntersuchungen an Dermcidin um die drei Modelle eindeutig zu unterscheiden, war es nötig größere Mengen an Protein herzustellen. Hierzu boten sich zwei Möglichkeiten: Zum einen mittels Peptidsynthese und zum anderen über rekombinante Expression in Bakterien. Aufgrund der geplanten  $^{15}\text{N}$ -NMR Experimente wurde Dermcidin rekombinant hergestellt.

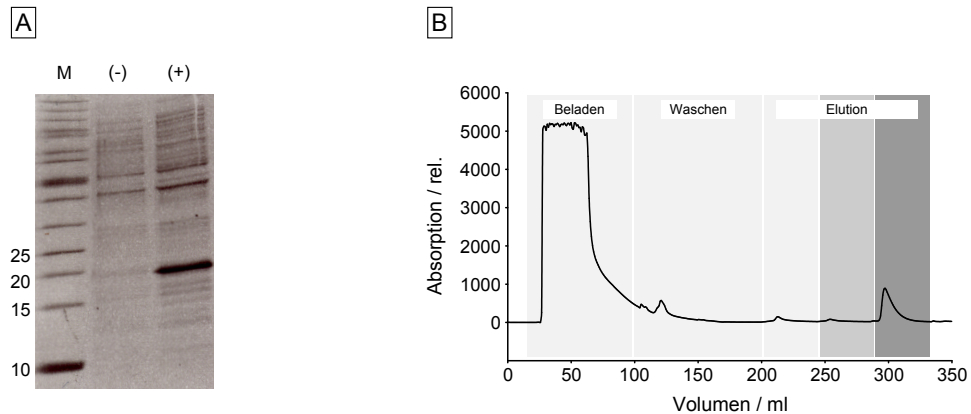
Zur Expression und Aufreinigung wurde das Plasmid pETGB1 $\alpha$  verwendet, das einen N-terminalen His-Tag und einen nachfolgenden GB1-Tag enthält, gefolgt von einer TEV-Schnittstelle und der MCS-Region, in die das Gen für humanes Dermcidin eingebracht wurde. Die TEV-Protease schneidet zwar sehr effizient, jedoch führt die Verwendung dieses Enzyms zu C- bzw. N-terminal verbleibenden Aminosäuren. Dieser Nachteil wurde überwunden, indem die TEV-Schnittstelle durch eine Enterokinase-Schnittstelle ersetzt wurde. Enterokinase schneidet C-terminal hinter ihrer Erkennungssequenz, was zu keinen zusätzlichen Aminosäureresten führt [90].

Die Aufreinigungsstrategie ergibt sich nun aus den einzelnen Funktionen des Dermcidinkonstrukts. Zuerst wurde eine erste Nickel-Affinitätschromatographie (IMAC1) durchgeführt, um die Expressionskonstrukte aus dem Zellysate zu extrahieren. Für die Strukturuntersuchungen war es nötig sehr reines Dermcidin zu gewinnen, da nachfolgende Experimente empfindlich auf Verunreinigungen reagieren und dies zu verfälschten Ergebnissen führen könnte. Aus diesem Grund wurde das Expressionskonstrukt mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) weiter von Verunreinigungen befreit. Im letzten Schritt wurde der GB1 $\alpha$ -Tag proteolytisch entfernt und von nativem Dermcidin mittels einer weiteren IMAC (IMAC2) abgetrennt. Die Abbildung 21 zeigt das Schema der Aufreinigung von Dermcidin.



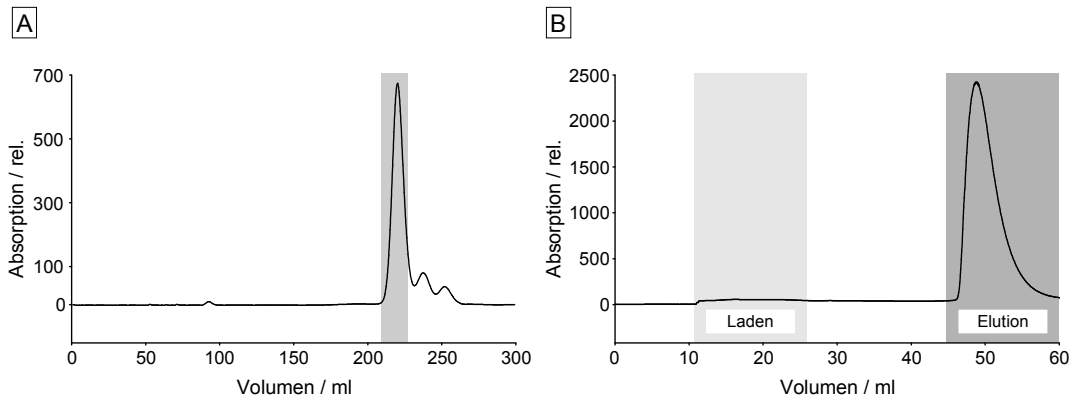
**Abbildung 21** – Illustration der Aufreinigung von Dermcidin. (A) Schematische Darstellung des Dermcidin-Expressionskonstruktes. H = His-Tag, E = Enterokinaseschnittstelle, DCD1L = Dermcidin. (B) Aufreinigung von Dermcidin. Nach dem Zellaufschluss erfolgt eine Vorreinigung des Expressionskonstrukts über eine erste IMAC. Daran schließt sich eine SEC an, auf die der proteolytische Verdau mit Enterokinase folgt. Zuletzt wird natives Dermcidin über eine zweite IMAC vom abgespaltenen Tag abgetrennt.

Nach erfolgreicher Klonierung und Transformation in *E. coli* BL21 Zellen wurde mit der rekombinanten Herstellung von Dermcidin begonnen. Abbildung 22A zeigt die Expression in *E. coli* BL21 Zellen vor und nach der Induktion der Proteinexpression. Im Anschluss an Expression und Zellaufschluss konnte eine erste IMAC durchgeführt werden (Abbildung 22B). Das mit einem His-Tag versehene Konstrukt wurde hierdurch spezifisch aufkonzentriert und grob von Proteinverunreinigungen befreit.



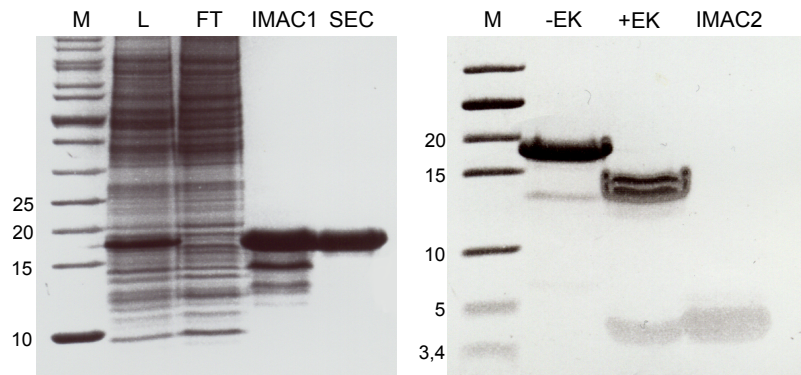
**Abbildung 22** – Expression von Dermcidin und erste Aufreinigung von Dermcidin. (A) Nach der Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 300  $\mu$ M IPTG (+) entsteht im Vergleich zur nicht induzierten Probe (-) eine Proteinbande bei etwa 20 kDa (Probe 16 h nach IPTG Zugabe). (B) Nach dem Laden der Säule und anschließendem Abfall der Absorption bei 280 nm wurde die Säule mit sehr salzhaltigen Puffer gespült. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass weitere Verunreinigungen von der Säule gespült wurden. Mittels eines Imidazolgradienten von 32 mM, 54 mM und 97 mM wurde eluiert (entspricht 7,5 %, 15 % und 30 % Elutionspuffer), wobei bei einer Imidazolkonzentration von etwa 97 mM das Expressionskonstrukt quantitativ von der Säule eluierte. Expression in M9-Medium; 16 % Tris-Tricin Gel; M = Größenstandard, Angaben in kDa

Nach der ersten IMAC wurde eine SEC durchgeführt, um das Dermcidinkonstrukt weiter aufzureinigen (Abbildung 23A). Dies war nötig, da eventuelle Verunreinigungen zu fehlerhaften Ergebnissen bei nachfolgenden Struktur- und Funktionsuntersuchungen führen könnten.



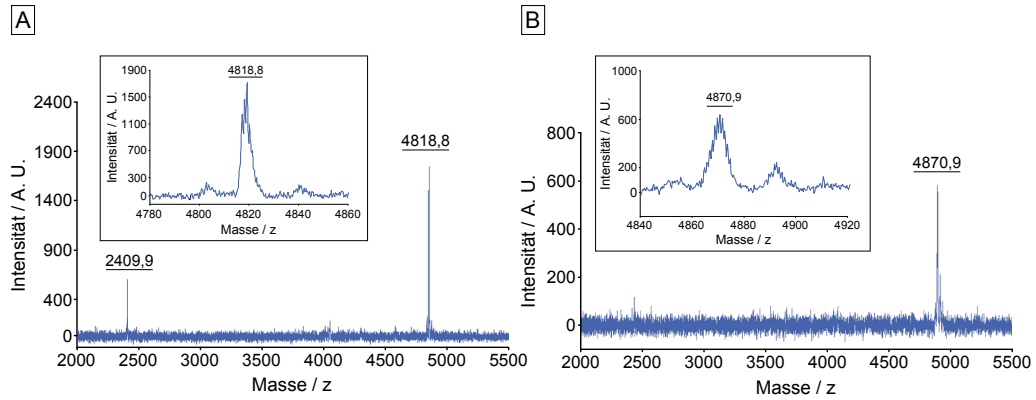
**Abbildung 23** – Gelfiltration und finale Affinitätschromatographie von Dermcidin. (A) Nach etwa 200 mL (Flussrate  $1,75 \text{ mL min}^{-1}$ ) eluiert das Expressionskonstrukt. Deutlich zu erkennen sind die beiden nachfolgenden Peaks bei etwa 230 mL und 250 mL. Die Fraktionen des grau unterlegten Bereichs enthielten das getaggte Dermcidin. Diese wurden vereinigt. (B) Nach dem Auftragen auf die Säule, konnte bei etwa 10 mL ein leichter Anstieg der Absorption bei 280 nm beobachtet werden, welcher hauptsächlich auf die unterschiedlichen Pufferbedingungen der aufgetragenen Proteine zurückzuführen ist. Ab diesem Zeitpunkt wurde begonnen 30 mL des Durchflusses zu sammeln. Ein größerer Anstieg der Absorption konnte nicht beobachtet werden, was auf eine sehr hohe Reinheit des Proteins zurückschließen lässt. Schlussendlich wurde der abgetrennte Tag von der Säule eluiert (Elution).

Nach der Gelfiltration wurde eine ausreichende Reinheit erhalten, so dass der Tag mit Hilfe von Enterokinase entfernt werden konnte. Durch die Behandlung mit Enterokinase entstehen zwei Spezies: natives Dermcidin, welches keine aromatischen Aminosäuren besitzt, die bei 280 nm absorbieren, und der Expressionstag, bestehend aus His- und GB1 $\alpha$ -Tag. Der GB1 $\alpha$ -Tag enthält eine bei 280 nm absorbierende Aminosäure, so dass die Reinheit leicht bei einer zweiten IMAC überprüft werden konnte. Da durch diesen zweiten Affinitätschromatographieschritt der GB1 $\alpha$ -Tag von Dermcidin getrennt werden sollte, wurde der Durchfluss beim Beladen der Säule gesammelt, in welchem sich aufgereinigtes Dermcidin befand. Im Anschluss daran, wurde der Tag von der Säule eluiert (Abbildung 23B). Während die Absorption beim Beladen der Säule fast nicht ansteigt, erhöht sie sich erwartungsgemäß bei der finalen Elution des GB1 $\alpha$ -Tags.



**Abbildung 24** – Zusammenfassung der Dermcidinaufreinigung. Während im Zellysate die Expressionskonstruktbande (bei etwa 18 kDa) zu sehen ist, so wurde nach der Beladung der Affinitssäule das Konstrukt fast quantitativ aus dem Lysat entfernt (FT). Die erste IMAC führte zu einer Anreicherung des Konstrukts, wobei hauptsächlich Verunreinigungen niedrigerer Massen zu erkennen sind (IMAC1). Diese Verunreinigungen konnten durch einen Gelfiltrationsschritt nahezu quantitativ entfernt werden (SEC/-EK). Die Zugabe von Enterokinase bewirkte dann einen Verlust der Proteinbande bei etwa 18 kDa (+EK) und dem Auftreten der Dermcidinbande bei etwa 5 kDa. Dies geschieht durch eine quantitative Umsetzung des Expressionskonstrukts in Dermcidin und Tag. Die finale IMAC führte dann zur vollständigen Entfernung des abgespaltenen Tags und einer Anreicherung der Dermcidinbande bei etwa 5 kDa. L = Zellysate, FT = Durchfluss nach der ersten IMAC, IMAC1 = Elutionsfraktionen der ersten IMAC, SEC/-EK = Fraktionen nach der SEC, +EK = Nach Enterokinaseverdau, IMAC2 = Nach Tag-Abtrennung, M = Marker, 16 % Tris-Tricin Gel

Der gesamte Aufreinigungsprozess und damit die Reinheit des gewünschten Dermcidins kann in Abbildung 24 nachverfolgt werden. Während nach der ersten IMAC noch Verunreinigungen vorhanden sind, konnten diese fast quantitativ nach der darauf folgenden SEC entfernt werden. Abbildung 24 zeigt auch, dass der nachfolgende Schritt, der Enterokinaseverdau zur Tag-Entfernung, quantitativ ablief. Nach Aufreinigung, Umpuffern und Lyophilisation wurde zur Überprüfung der Reinheit und des Molekulargewichts ein Massenspektrum von unmarkierten und  $^{15}\text{N}$  vollmarkierten Dermcidin aufgenommen (Abbildung 25). Sowohl für das unmarkierte als auch für das markierte Dermcidin konnten die zu erwartenden Massen (siehe Abschnitt 6.1) nachgewiesen werden. Die finale Ausbeute betrug pro Liter Zellkultur  $13,9 \pm 1,1$  mg ( $^{15}\text{N}$  markiert:  $7,5 \pm 0,9$  mg).

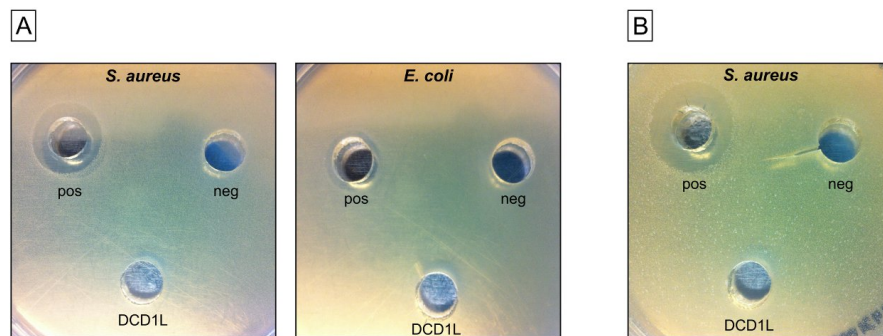


**Abbildung 25** – Massenspektren von nativen (A) und <sup>15</sup>N markierten Dermcidin (B). Die Kästen oben links in den Spektren zeigen eine Vergrößerung der Bereiche um den jeweiligen Hauptpeak. Neben den beiden Hauptmassenpeaks ist bei der unmarkierten Probe das zweifach geladene Dermcidinmolekül zu identifizieren, während es bei der markierten Probe nur angedeutet zu erkennen ist.

### 4.2.3 Agardiffusionsassays zur Überprüfung der antimikrobiellen Aktivität von Dermcidin

Zur Überprüfung der antimikrobiellen Aktivität des rekombinanten Dermcidins wurden Agardiffusionsassays durchgeführt (Abbildung 26). Hierbei werden Petrischalen mit Agar ausgegossen, der mit einer bestimmten Konzentration an Bakterien beimpft ist. Nach dem Erkalten werden Löcher ausgestanzt, in welche die auf antimikrobielle Aktivität zu testende Substanz, in Lösung, eingefüllt wird. Nach Inkubation über Nacht bilden sich, sofern eine antimikrobielle Aktivität vorhanden ist, Hemmhöfe um die gestanzten Löcher. Je größer der Hemmhof ist, desto aktiver ist die Substanz gegen die getesteten Bakterien im Agar.

Während eine Gramicidin S Lösung sowohl bei *S. aureus* und auch *E. coli* zu Hemmhöfen führt, so konnten für Dermcidinkonzentration bis zu  $40 \text{ mg mL}^{-1}$ , unabhängig vom Lösungsmittel, keine Hemmhöfe beobachtet werden.



**Abbildung 26** – Exemplarische Ergebnisse der Agardiffusionsassays. Während es bei einer Gramicidin S Konzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  (pos) bei *S. aureus* und *E. coli* zu Hemmhöfen kommt, so konnten diese für Dermcidin, unabhängig von Konzentration, nicht beobachtet werden. Auch die verwendeten Lösungsmittel Wasser (A) und künstlicher Schweiß (B) zeigten keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität von Dermcidin. DCD1L: Dermcidin  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ , neg: Lösungsmittel ohne Dermcidin.

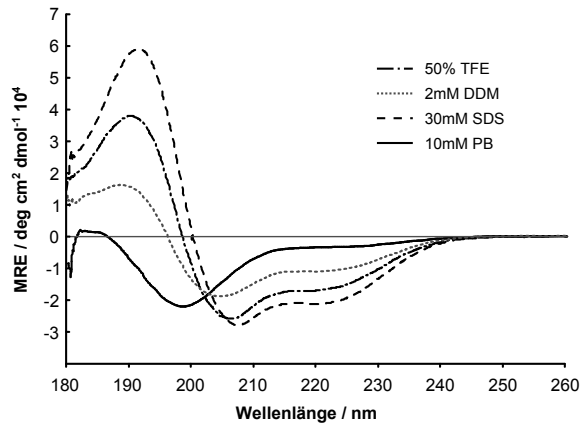


#### 4.2.4 Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Dermcidin

Zur Ermittlung der quantitativen Sekundärstrukturzusammensetzung von Proteinen, bietet sich die gut etablierte optische Methode der Zirkulardichroismus-(CD)-Spektroskopie an. Hierbei wird linear polarisiertes Licht verwendet. Dies entsteht durch die Überlagerung zweier gegenläufiger, links und rechts zirkularpolarisierter Komponenten die sich in gleicher Phase befinden und die selbe Frequenz aufweisen. Das CD-Spektrum stellt die Elliptizität  $\Theta$  (in mdeg), die proportional zur Absorptionsdifferenz von links und rechts zirkular polarisiertem Licht ist, als Funktion der Wellenlänge, dar.

Von besonderem Interesse in Proteinen sind hauptsächlich die Peptidbindungen (Absorption unter 240 nm) und manchmal werden auch Disulfidbrücken und die Seitenketten von aromatischen Aminosäuren (Absorption 320 nm bis 260 nm) betrachtet. Wenn sich solche Chromophore in räumlicher Nähe von chiralen Komponenten wie beispielsweise dem C $_{\alpha}$ -Atom von Aminosäuren, befinden, so können sie links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich absorbieren, was zu Banden im CD-Spektrum führt. Unterschiedliche Sekundärstrukturelemente von Proteinen führen zu charakteristischen CD-Spektren. Werden beispielsweise die Elektronen des nicht-bindenden  $\pi$ -Orbitals der Peptidbindung und des  $n$ -Orbital des freien Elektronenpaares des Sauerstoffs angeregt, so gelangen diese in das anti-bindende  $\pi^*$ -Orbital. In einer  $\alpha$ -helikalen Konformation führt dies zu den charakteristischen Banden eines  $\alpha$ -helikalen Spektrums bei 193 nm (Maximum), 208 nm (Minimum) und 222 nm (Minimum). Um nun mittels des CD-Spektrums den spezifischen Anteil von einzelnen Sekundärstrukturelementen zu bestimmen, stehen eine Reihe von Algorithmen zur Verfügung, die darauf beruhen, das Spektrum in Linearkombinationen aus verschiedenen Termen zu zerlegen. Die einzelnen Terme der Linearkombinationen entsprechen dann jeweils 100 % Anteil an einer Sekundärstruktur und es ist möglich, die prozentualen Anteile zu berechnen. Solche Algorithmen sind beispielsweise CONTINLL [37,38], Selcon3 [91,92] und K2D [93]. Diese Algorithmen verwenden als Grundlage ihrer Berechnungen Strukturinformationen von Proteinen, deren dreidimensionalen Strukturen mittels Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie aufgeklärt worden sind.

**Abbildung 27** – Normierte CD-Spektren von Dermcidin in verschiedenen Lösungsmitteln und Detergenzien. Abhängig vom verwendeten Detergenz faltet sich Dermcidin in eine  $\alpha$ -helikale Konformation.



In Abbildung 27A finden sich die CD-Spektren von Dermcidin in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Neben dem anionischen Detergenz SDS wurde die Konformation von DCD1L in 10 mM Phosphatpuffer, dem ungeladenen Detergenz Dodecylmaltosid (DDM) und in 50 % TFE (Trifluorethanol)-Lösung untersucht. Die Spektren können unabhängig von der Proteinkonzentration verglichen werden, da die CD-Daten in MRE-Werte angegeben sind. Hier ist zu erkennen, dass DCD1L in der Umgebung von negativ geladenen SDS-Detergenzmolekülen eine dominierende  $\alpha$ -helikale Konformation einnimmt. Ein Maximum bei etwa 193 nm und zwei charakteristische Minima bei 208 nm und 222 nm belegen dies. Zusätzlich liegt das Verhältnis der beiden Minima bei 208 nm und 222 nm bei etwa 2:1 was auf einen sehr hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil hindeutet. In 50 % TFE zeigen sich fast die gleichen  $\alpha$ -helikale Charakteristika wie in SDS Umgebung, allerdings sind die Minima und Maxima leicht in den niederwelligen Bereich verschoben, was auf einen im Vergleich zu SDS niederen Helixanteil schließen lässt. Zusätzlich ist der Absolutwert des Maximums im Vergleich zur SDS-Probe deutlich geringer. Ebenfalls ist das Verhältnis zwischen globalem Maximum und globalem Minimum nicht 2:1 wie in 100 % helikalen Spektren, sondern eher 1,5:1. Diese beiden Punkte deuten auf einen höheren Anteil an unstrukturierten Bereichen. Diese Beobachtungen treffen verstärkt auch auf das Spektrum mit DDM Umgebung zu. Hier sind die Banden noch weiter nach links verschoben, während die Intensität und das Verhältnis der globalen Mini- und Maxima weiter abnimmt. Der unstrukturierte Anteil ist hier bedeutend höher als in SDS-Umgebung. Eine nahezu komplett unstrukturierte Konformation zeigt DCD1L in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,2). Hier findet sich kein Maximum mehr und das

globale Minimum liegt bei etwa 198 nm. Auch nimmt die absolute Intensität des Spektrums ab.

**Tabelle 11** – Dekonvolution von Dermcidin in verschiedenen Lösungsmitteln. Angaben in Prozent, NRMSD Wert ohne Einheit.

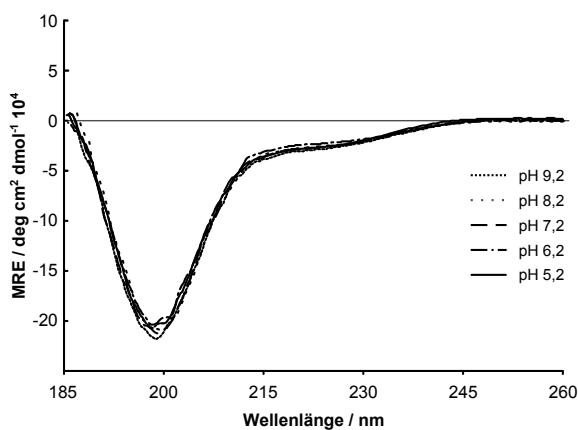
Lösungsmittel	Helices	$\beta$ -Strands	Turns	Coil	NRMSD
10 mM PB	5,1 %	8,4 %	7,8 %	78,7 %	0,016
2 mM DDM	32,8 %	4,5 %	14,6 %	48,1 %	0,045
30 mM SDS	74,9 %	2,4 %	8,7 %	14,0 %	0,048
50 % TFE	53,9 %	3,6 %	11,8 %	29,8 %	0,092

Tabelle 11 gibt die Dekonvolutionsergebnisse wieder. Hierbei spiegeln sich die Aussagen zu den einzelnen Spektren wieder. Während der Helixanteil von Dermcidin, gelöst in anionischen SDS Micellen, bei etwa 75 % liegt, so ist er in 50 % TFE Lösung bei nur 54 %. Der unstrukturierte Anteil ist hier gegenüber der SDS Probe doppelt so hoch (14 % in SDS, 30 % in 50 % TFE). Auch im ungeladenen Detergenz DDM überwiegt der unstrukturierte Anteil, während sich so wie auch aus Abbildung 27 ersichtlich, Dermcidin in 10 mM Phosphatpuffer im fast vollständig ungeordneten Zustand befindet (knapp 80 %).

Die NRMSD Werte geben Auskunft über die Qualität der Dekonvolution. Für den hier angewendeten Algorithmus CONTINLL sollte dieser nicht über 0,1 liegen. Für alle 4 Dekonvolutionen lag dieser stets unter 0,1, so dass auf ein verlässliches Ergebnis geschlossen werden kann.

Neben der Konformation in unterschiedlichen, membranimitierenden Detergenzien, wurde auch die Abhängigkeit der Sekundärstruktur von Dermcidin in verschiedenen Puffersystemen mit unterschiedlichem pH-Wert untersucht (Abbildung 28). Dermcidin liegt sowohl im sauren Bereich als auch im basischen Bereich ungeordnet vor. Tabelle 12 gibt die Dekonvolutionsergebnisse wieder.

**Abbildung 28** – CD-Spektren von Dermcidin in wässrigem Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten. Unabhängig vom pH-Wert liegt Dermcidin in wässrigem Puffer ungeordnet vor.

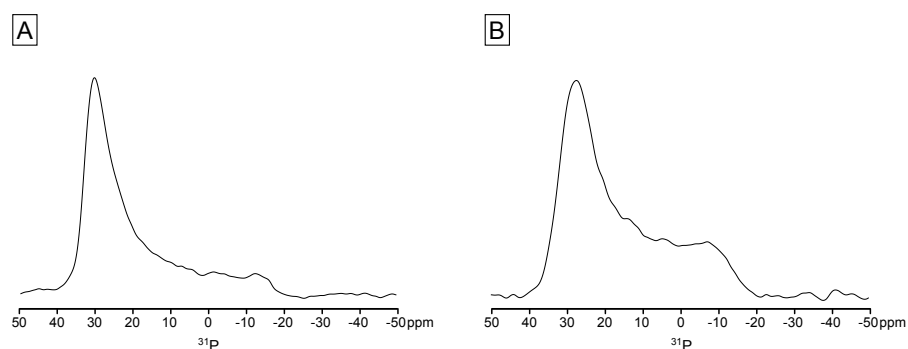


**Tabelle 12** – Dekonvolution von Dermcidin bei unterschiedlichen pH-Werten.

Vesikel	Helices	$\beta$ -Strands	Turns	Coil	NRMSD
pH 5,2	7,4 %	9,6 %	8,0 %	77,7 %	0,018
pH 6,2	4,5 %	10,2 %	7,5 %	77,8 %	0,025
pH 7,2	4,6 %	8,5 %	7,3 %	79,6 %	0,022
pH 8,2	4,2 %	9,2 %	7,4 %	79,2 %	0,028
pH 9,2	4,4 %	8,7 %	7,3 %	79,6 %	0,024

#### 4.2.5 Membranorientierung von Dermcidin

Um die Orientierung von Dermcidin in Lipidmembranen zu untersuchen, wurden Festkörper-NMR-Experimente durchgeführt und die chemische Verschiebung der  $^{15}\text{N}$  Isotopenmarkierungen analysiert. Diese ist dabei abhängig von der Orientierung der zu messenden Moleküle im Magnetfeld. In Flüssigkeiten kommt es aufgrund der schnellen Reorientierung der Probe zu einer Mittelung aller Orientierungen und damit zu einer isotropen chemischen Verschiebung. Im Festkörper hingegen ist diese Mittelung der Orientierung eingeschränkt und somit stellt das erhaltene Spektrum die Summe aller Orientierungen der Moleküle dar (anisotrope chemische Verschiebung). In einer makroskopisch orientierten Membranprobe kann nun über die chemischen Verschiebungen des erhaltenen Spektrums Auskunft darüber erhalten werden, welche Orientierungen die Peptide relativ zur Lipiddoppelschicht einnehmen.

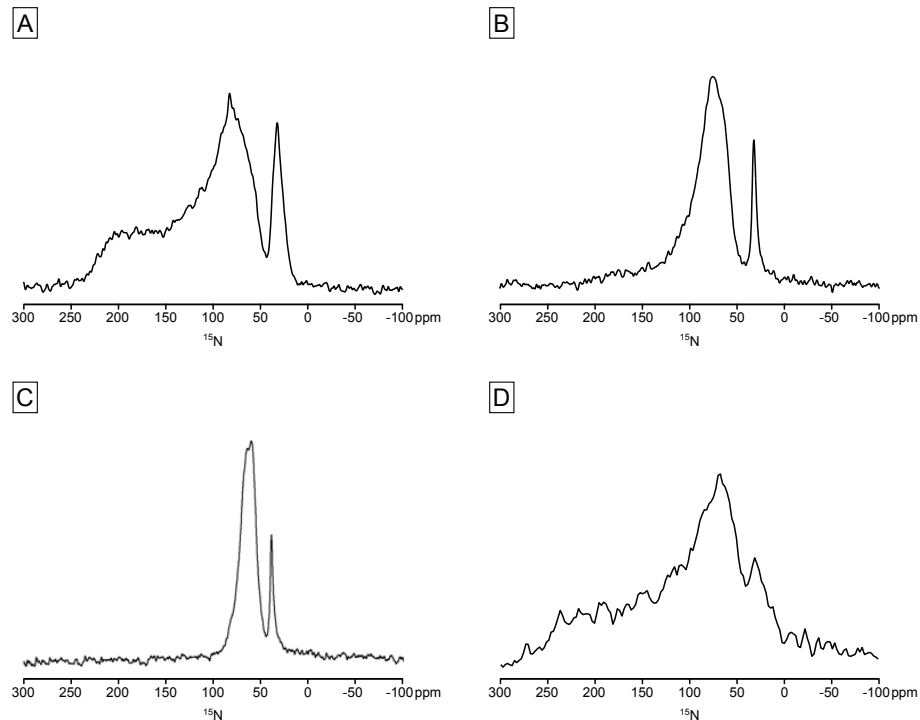


**Abbildung 29** –  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum von Dermcidin rekonstituiert in DMPC (A) und DMPC/PG (B) Lipiddoppelschichten. P/L=1:100, T=37 °C

Dermcidin wurde in orientierten Lipiddoppelschichten rekonstituiert. Vor der  $^{15}\text{N}$ -NMR Messung musste sichergestellt werden, dass es sich auch um eine gut orientierte Probe handelt. Dazu musste zunächst die Orientierung der Phospholipide in der Probe bestimmt werden. In Abbildung 29 sind die  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren von Dermcidin rekonstituiert in DMPC und in DMPC/PG (3:1) Lipiden dargestellt. Da sich die Hauptintensitäten der beiden Signale bei etwa 30 ppm links von der isotropen Position (bei 0 ppm) befinden, zeigen die  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren eine ausreichend gute uniaxiale Orientierung der Phospholipide mit der Membrannormalen parallel zum Magnetfeld. Es konnten lediglich geringe Intensitäten von unorientierten Lipiden bis etwa -15 ppm detektiert werden, was somit bedeutet,

dass die Lipide orientierte Doppelschichten ausgebildet haben.

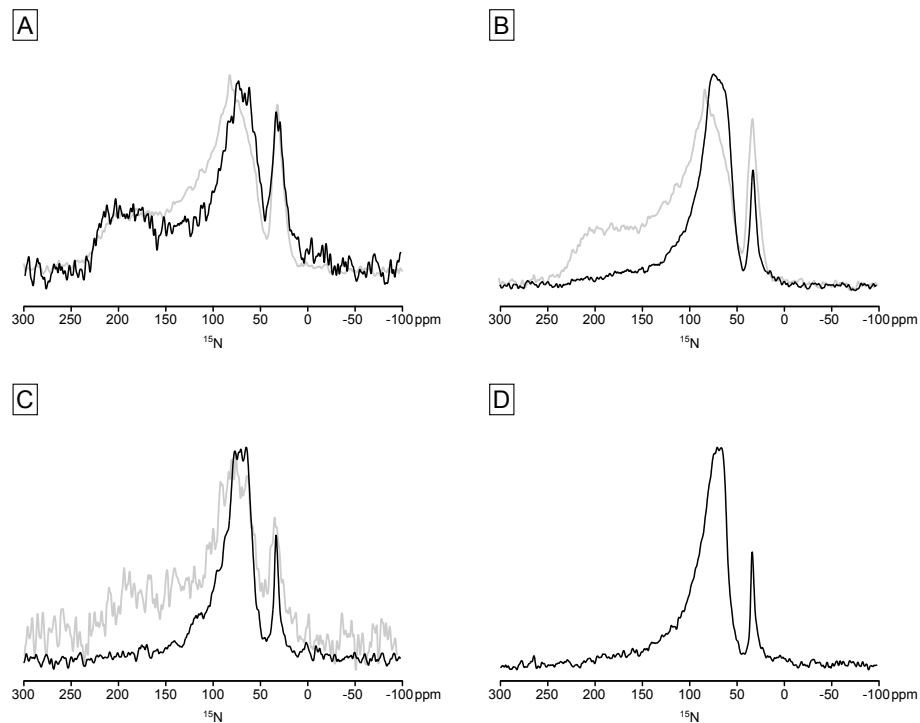
Nachdem sichergestellt wurde, dass sich die Probe im orientierten Zustand befand, wurden die eigentlichen  $^{15}\text{N}$ -NMR Messungen zur Orientierungsbestimmung von Dermcidin in Lipidumgebung durchgeführt. Hierzu wurden Experimente an  $^{15}\text{N}$  vollmarkiertem Dermcidin durchgeführt. Wenn ein  $\alpha$ -helikales Protein einen transmembranen Zustand einnimmt und dadurch aufrecht in die Membran eingebettet ist, so zeigt sich eine typische anisotrope chemische Verschiebung im Bereich von etwa 150 ppm bis 220 ppm. Nimmt es im Gegensatz dazu einen oberflächlich gebundenen Zustand ein und damit eine parallele Orientierung zur Membran, so äußert sich das in einer anisotropen chemischen Verschiebung von etwa 70 ppm bis 100 ppm.



**Abbildung 30** –  $^{15}\text{N}$ -NMR Spektrum von Dermcidin in orientierten Lipiddoppelschichten. Dermcidin wurde bei diesen Messungen in DMPC (A), DErPC (B) und DMPC/lyso MPC 3:1 rekonstituiert (C). Abbildung D zeigt das nicht orientierte Pulverspektrum von Dermcidin (gemessen als lyophilisiertes Dermcidin im Glasröhrchen). P/L=1:100, T=37 °C

In Abbildung 30 sind  $^{15}\text{N}$  Spektren von Dermcidin in orientierten Lipiddoppelschichten dargestellt. Das Spektrum von Dermcidin in DMPC (Abbildung 30A) zeigt dabei ein sehr breites Signal zwischen 70 ppm und 220 ppm, welches den kompletten Bereich der anisotropen chemischen Verschiebung umfasst. Die sehr hohe Signalintensität zwischen 70 ppm und

100 ppm, sowie eine mittlere Intensität in den Bereichen zwischen 100 ppm und 230 ppm deutet daraufhin, dass das Protein in einem nicht orientierten Zustand vorliegt. Als Vergleich hierzu dient das reine Pulverspektrum von Dermcidin in Abbildung 30D. Hier wurde unorientiertes Dermcidin ohne Lipide direkt gemessen. Dieses Spektrum zeigt eine sehr ähnliche Linienform wie die DMPC Probe. Die hohe Intensität des Signals bei etwa 40 ppm stammt von der Aminogruppe in den Seitenketten der in Dermcidin vorkommenden Lysine. Im Unterschiede zum DMPC Spektrum zeigt rekonstituiertes Dermcidin im längeren Lipid DErPC (di-C20:1) ein schmales Signal bei 60 ppm–110 ppm. Das nahezu vollkommene Fehlen von Intensität zwischen 130 ppm und 230 ppm lässt auf einen oberflächlich an die Membran gebundenen Zustand schließen. Dies wird in DMPC/lysoMPC (3:1) Lipiddoppelschichten beobachtet (Abbildung 30C). Hier ist das Signal sogar noch schärfer als im DErPC Spektrum. In diesem Spektrum wurden ausschließlich Intensitäten zwischen etwa 70 ppm und 90 ppm (Lysinseitenkettensignal ausgenommen) beobachtet.

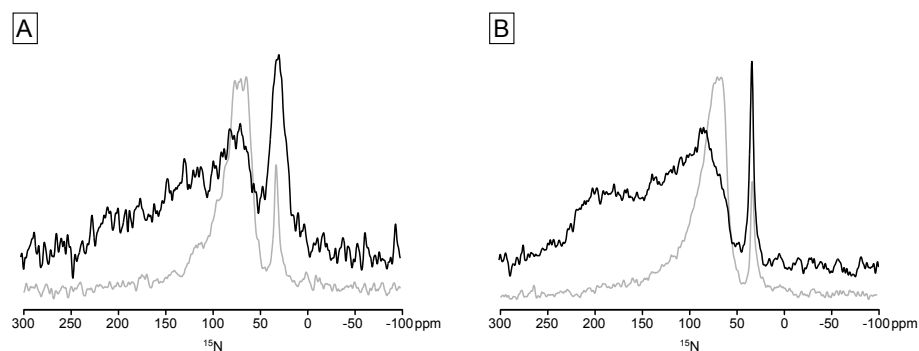


**Abbildung 31** –  $^{15}\text{N}$ -NMR Spektrum von Dermcidin in orientierten Lipiddoppelschichten mit Zinkzusatz. (A) DMPC Lipiddoppelschichten mit 0,1 molaren Äquivalenten (zum Peptid) Zinksulfat (Spektrum ohne  $\text{Zn}^{2+}$  in grau). (B) DMPC Lipiddoppelschichten mit 3 molaren Äquivalenten Zinksulfat (Spektrum ohne  $\text{Zn}^{2+}$  in grau). (C) Dermcidin rekonstituiert in DMPC/DMPG (3:1) Lipiddoppelschichten und Zusatz von 3 Äquivalenten Zinksulfat (Spektrum ohne  $\text{Zn}^{2+}$  in grau). (D) POPC/POPG (3:1) Lipiddoppelschichten mit 3 Äquivalenten Zinksulfat in MES Puffer pH 6,0. P/L=1:100, T=37 °C

Wie in Abschnitt 4.2.1 bereits erwähnt, spielen  $\text{Zn}^{2+}$  und andere zweiwertige Kationen eine Rolle bei der antimikrobiellen Aktivität von Dermcidin. Desweiteren konnte mittels der CD-Ergebnisse aus Abschnitt 4.2.4 bestimmt werden, dass Dermcidin eine zumindest in Lösung negativ geladene Detergenzumgebung benötigt, um sich in seine  $\alpha$ -helikale Konformation zu falten. Aus diesem Grund wurden Proben in negativ geladenen Lipiddoppelschichten mit verschiedene molaren Äquivalenten an Zinkionen gemessen (Abbildung 31).

Der Zusatz von 0,1 molaren Äquivalenten an Zinksulfat (in Bezug auf die Peptidmolarität) in DMPC Lipiddoppelschichten brachte keine großen Veränderungen in den Intensitäten der anisotropen chemischen Verschiebung im Vergleich zur DMPC Probe ohne Zink (Abbildung 31A). Eine Erhöhung der Zinkmenge auf 3 molare Äquivalente zeigte hingegen eine Änderung im Spektrum. Die Signalintensität zwischen etwa 150 ppm und 230 ppm wurde erheblich reduziert. Die Änderungen lassen darauf schließen, dass sich durch Zinkzusatz Dermcidin oberflächlich orientiert hat (Abbildung 31B).

Die Verwendung von negativ geladenen DMPC/DMPG (3:1) orientierten Lipiddoppelschichten mit 3 molaren Äquivalenten Zinksulfat resultierte ebenfalls in einer oberflächlichen Orientierung von Dermcidin in Bezug auf die Lipiddoppelschicht (Abbildung 31C). In Abbildung 31D ist das Spektrum von Dermcidin in negativ geladenen POPC/POPG (3:1) Lipiddoppelschichten mit 3 Äquivalenten Zinkionen zu sehen. Im Unterschied zu allen anderen Messungen wurde hier nicht Phosphatpuffer pH 7,0 verwendet, sondern MES Puffer mit einem pH von 6,0. Auch diese Änderung im pH Wert und der Dicke der Lipiddoppelschichten resultierte ebenfalls in einer oberflächlichen Orientierung von Dermcidin.



**Abbildung 32** – Vergleich der  $^{15}\text{N}$ -NMR Spektrum von Dermcidin in orientierten Lipiddoppelschichten. (A) Dermcidin DMPC/PG Lipiddoppelschichten bei  $0^\circ$  (grau) und  $90^\circ$  (schwarz) Probenorientierung. (B) Dermcidin in POPC/PG Lipiddoppelschichten bei  $0^\circ$  (grau) und  $90^\circ$  (schwarz) Probenorientierung. P/L=1:100, T=37 °C

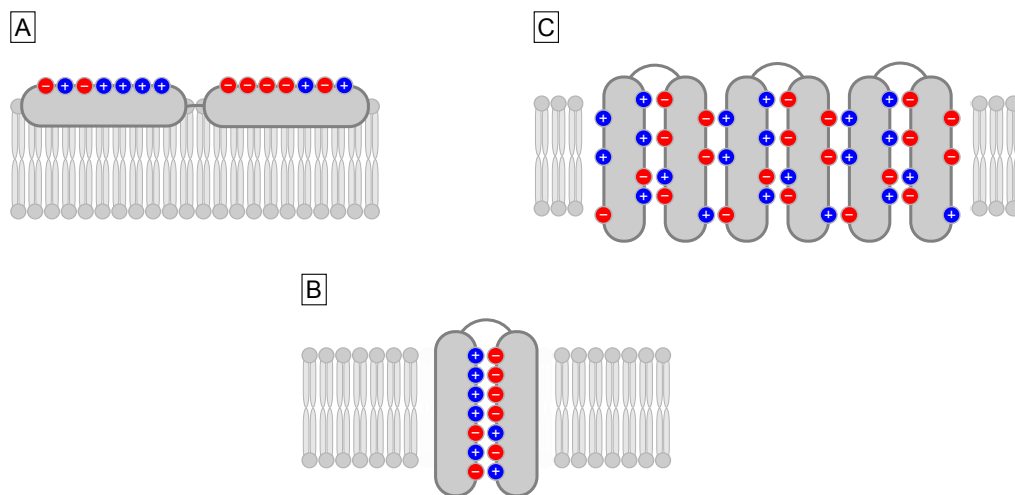


Um nun die laterale Beweglichkeit und Diffusion von Dermcidin in der Membranebene zu untersuchen, wurden Experimente mit einer  $90^\circ$  Ausrichtung der Probe in Bezug auf das Magnetfeld durchgeführt. Wird die Probe in einem  $90^\circ$  Winkel zum Magnetfeld gemessen, so verschieben sich bei einem frei diffundierenden Peptid die Signale von orientierten Anteilen um die isotrope Position (120 ppm) um den Faktor  $-1/2$ . Im Gegensatz dazu verschieben sich die Signalintensitäten von immobilisierten Molekülen zu einer anderen, breiteren Linienform. Das Pulverspektrum von unorientierten Molekülen sollte sich hingegen nicht verändern. Somit sollten sich in beiden Fällen von orientierten Peptiden (mobil und immobilisiert) von Dermcidin die  $90^\circ$  Spektren deutlich von den  $0^\circ$  Spektren unterscheiden. Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse dieser Messserie im Vergleich zu den  $0^\circ$  Messungen für DMPC/DMPG und POPC/POPG Lipiddoppelschichten.

Bei beiden Spektren ist zu erkennen, dass im Gegensatz zu den  $0^\circ$  Spektren sich die Signalintensitäten zwischen 130 ppm und 230 ppm verstärkt haben, während sich die Signale um die oberflächliche Orientierung nicht verändert haben. Die deutlich breiteren Linienformen bei den  $90^\circ$  Messungen von Dermcidin in Abbildung 32 weisen auf eine Immobilisierung hin.

### 4.2.6 Zusammenfassung und Diskussion

Antimikrobielle Peptide stellen für ihre Wirtsorganismen einen wichtigen Bestandteil der Pathogenabwehr dar. So auch das antimikrobielle Peptid Dermcidin auf der Haut von Menschen. Dermcidin wurde in dieser Arbeit als ein Protein identifiziert, welches einen HCZ-Motiv der Länge  $m = 7$  trägt. Durch den hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil in der Sekundärstruktur von Dermcidin, liegen die am HCZ-Motiv beteiligten Reste auf der selben Seite der Helix (siehe Abbildung 16). Dadurch besitzt der Dermcidin einen amphipathische Struktur.



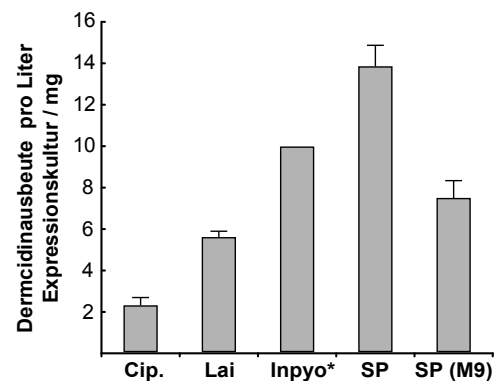
**Abbildung 33** – Die mögliche Rolle des Charge Zippers in der antimikrobiellen Funktion von Dermcidin. Nach der Anlagerung an bakterielle Membranen könnte sich Dermcidin in eine  $\alpha$ -helikale Konformation falten (A). Daraufhin wäre es möglich, dass die am Charge Zipper beteiligten Aminosäurepaare untereinander Salzbrücken ausbilden. Es kommt zu einer Haarnadelschleife die in die Membran integriert (B). Anschließend kann es zur Oligomerisierung von Haarnadelschleifen kommen, die über intermolekulare Salzbrücken eine Pore ausbilden könnten (C).

Da der genaue Wirkmechanismus von Dermcidin bisher noch unbekannt ist, ist es möglich mittels des PCZ-Motivs in Dermcidin eine Hypothese zur Wirkweise aufzustellen. Sobald der kationische N-Terminus von Dermcidin mit negativ geladenen Membranen, wie sie in Bakterien vorkommen in Kontakt tritt, faltet es sich in seine  $\alpha$ -helikale Konformation. Die dadurch entstehende amphiphile Helix legt sich entsprechend ihrer Polarität an die Membran (Abbildung 33A). Nun könnten die 7 am Charge Zipper Motiv beteiligten Aminosäurepaare Salzbrücken ausbilden. Diese Salzbrücken würden bewirken, dass sich eine  $\alpha$ -helikale Haarnadelschleife ausbildet, die nun durch die Neutralisation der geladenen Reste und der Abschirmung mittels der unpolaren Seiten der beiden Teilhelices, in die

Membran eintauchen könnte (Abbildung 33B). Daraufhin könnte es mittels mehrerer verbrückten Helices zu einer oligomeren Pore kommen, indem sich teilweise Salzbrücken lösen und die beteiligten Aminosäuren sich mit ihren komplementären Charge Zipper Partnern auf benachbarten Dermcidinmolekülen verbinden. Die so entstandenen intermolekularen Salzbrücken könnten eine Pore stabilisieren und dadurch für die antimikrobielle Aktivität des Dermcidinmoleküls sorgen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde Dermcidin rekombinant hergestellt. Die Expression erfolgte sowohl in Komplexmedium als auch in  $^{15}\text{N}$  markiertem Minimalmedium. Sowohl im Komplex- als auch im Minimalmedium konnten ausreichende Mengen an Dermcidin für Strukturuntersuchungen gewonnen werden. Die Ausbeute pro Liter betrug für die Expression in Komplexmedium  $13,9 \text{ mg} \pm 1,1 \text{ mg}$ , wohingegen sie im Minimalmedium  $7,5 \text{ mg} \pm 0,9 \text{ mg}$  betrug. Ebenfalls konnten die theoretischen Massen des unmarkierten und  $^{15}\text{N}$  markierten Dermcidins zweifelsfrei nachgewiesen werden, so dass sichergestellt ist, dass keine fehlerhaften Expressionsprodukte für nachfolgende Strukturuntersuchungen verwendet worden sind.

**Abbildung 34** – Vergleich der Ausbeute von rekombinantem Dermcidin mit Literaturwerten. SP/SP(M9) = Ergebnisse in dieser Arbeit. \*: keine Angabe der Standardabweichung



Bisher sind drei Veröffentlichungen zu finden, in welchen Dermcidin rekombinant hergestellt wurde. Cipakova et al. nutzen zur rekombinanten Herstellung eine Strategie über Inclusion Bodies [80]. Hierbei wurde Dermcidin hinter einen KSI-Tag kloniert, der dafür sorgt, dass das Expressionskonstrukt in Inclusion Bodies zu finden ist. Anschließend erfolgte eine Renaturierung und die Abspaltung des KSI-Tags mittels Cyanbromid. Hierdurch entstand ein Homoserinlacton am C-Terminus von Dermcidin. Die Ausbeute lag bei et-

wa 2,5 mg Dermcidin pro Liter Kulturmedium. Inpyo et *al.* griffen zur Herstellung auf einen Ansatz basierend auf der autokatalytischen Aktivität von Inteinen zurück [94]. Nach der Expression konnte durch Zugabe eines Reduktionsmittels die Autokatalyse und Freisetzung von Dermcidin induziert werden. Über Dialyse konnten danach etwa 10 mg pro Liter Kulturmedium erhalten werden. Wie auch schon bei Cipakova et *al.* enthielt das finale Dermcidinprodukt eine im Vergleich zum Wildtyp zusätzliche chemische Modifikation. Hier verblieb ein Methioninrest am N-Terminus von Dermcidin. Eine Methode zur rekombinanten Herstellung von Dermcidin ohne zusätzliche Aminosäuren oder chemische Modifikationen schafften Lai et *al.* [79]. Diese nutzen eine Kombination aus Expressionstag und enzymatische Spaltung. Dabei wurde ein Thioredoxin-Tag N-terminal an das Dermcidin kloniert. Zwischen Thioredoxin und Dermcidin wurde zusätzlich eine Schnittstelle für Faktor Xa eingebracht. Die hydrolytische Spaltung durch dieses Enzym findet dabei am C-Terminus der Erkennungsstelle statt. Somit verbleibt keine zusätzliche Aminosäure am N-Terminus der Zielproteine.

Ein ähnlicher Ansatz wurde in dieser Arbeit verfolgt. Dermcidin wurde dabei C-terminal an einen GB1-Tag kloniert. Dieser wurde von Protein G aus *Streptococcus spec.* abgeleitet und bindet nativ an die F<sub>c</sub>-Regionen von Immunglobulinen [10]. Hierbei ergaben sich gleich mehrere Vorteile: Zum einen induziert der GB1-Tag eine wesentlich höhere Expressionsrate, zum anderen fördert er durch die B1 Domäne die Löslichkeit des zu exprimierenden Proteins. Des weiteren ist er auch relativ klein, so dass er für Strukturuntersuchungen an größeren Proteinen nicht zwangsläufig abgespalten werden muss [95,96]. Zwischen GB1-Tag und Dermcidin wurde zusätzlich eine Erkennungssequenz für Enterokinase kloniert. Wie auch schon Faktor Xa, schneidet Enterokinase C-terminal von der Erkennungssequenz und hinterlässt somit keine zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus von Dermcidin [90]. Allerdings ist die Effektivität der Enterokinasespaltung abhängig von der ersten Aminosäure die C-terminal auf die Erkennungssequenz folgt. In der Literatur wird dabei die Effizienz bei einem Schnitt mit nachfolgendem Serin, wie es bei Dermcidin der Fall ist, mit lediglich 78% angegeben [90]. Es sollte also beim Enterokinaseverdau noch etwa ein Viertel an ungeschnittenem Expressionskonstrukt zu detektieren sein. Dies war nach Abbildung 24 nicht der Fall. Hier konnte ein quantitativer Enterokinaseverdau beobachtet werden. Ein Vergleich der Ausbeuten der drei verschiedenen Arbeiten findet sich in Abbildung 34. Im

Vergleich zu den Literaturwerten konnten in dieser Arbeit (SP) die höchsten Ausbeuten an rekombinantem Dermcidin erhalten werden.

Nach erfolgreicher Expression wurden zur Überprüfung der antimikrobiellen Aktivität, Agarplattendiffusionstests für unterschiedliche Konzentration von Dermcidin und in verschiedene Lösungsmittel an *E. coli* und *S. aureus* Stämmen durchgeführt. Erstaunlicherweise konnte unabhängig von der Konzentration und des verwendeten Lösungsmittels weder an *E. coli* noch an *S. aureus* Stämmen eine antimikrobielle Aktivität für Dermcidin nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu den publizierten Ergebnissen in Tabelle 10. In diesen Veröffentlichungen zur rekombinanten Herstellung von Dermcidin waren auch antimikrobielle Funktionsprüfungen an den rekombinanten Produkten durchgeführt worden. Cipakova et al. führten ebenfalls Agarplattendiffusionstests durch. Hier konnte für den Stamm *E. coli ML-35p* bei einer Konzentration von  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  ein Hemmhof beobachtet werden. Für den Stamm *S. aureus 29/58* musste die Konzentration auf etwa  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  erhöht werden, um einen Hemmhof zu beobachten. Als Lösungsmittel diente hier Wasser. Auch das rekombinante Dermcidin von Lai et al. zeigte eine antimikrobielle Aktivität. Hier wurde der  $\text{LC}_{50}$  Wert ermittelt. Er gibt an, ab welcher Konzentration an Protein 50 % der Bakterien absterben. Für das rekombinante Dermcidin konnte für den Stamm *E. coli CMCC(B)44102* ein  $\text{LC}_{50}$  Wert von  $1,8 \mu\text{g mL}^{-1}$  ermittelt werden. In der Studie von Inpyo et al. wurde für das rekombinante Dermcidin mit N-terminalem Methioninrest ebenfalls antimikrobielle Aktivität nachgewiesen. Hier wurden sogar identische Versuchsbedingungen wie in dieser Arbeit verwendet. Bei einer Konzentration von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  konnte dort ein deutlicher Hemmhof gefunden werden.

Trotz all dieser positiven Ergebnissen bezüglich der antimikrobiellen Aktivität von Dermcidin konnte in einer anderen Studie über Schweiß, keine antimikrobielle Aktivität für synthetisch hergestelltes Dermcidin festgestellt werden [97]. Hierbei untersuchten Murataki et al. HPLC Fraktionen von menschlichem Schweiß. Dort konnte zweifelsfrei Dermcidin nachgewiesen werden. Die Dermcidin enthaltende HPLC Fraktion wurde qualitativ auf antimikrobielle Aktivität überprüft, wobei eine geringe Hemmhofbildung beobachtet wurde. In weiteren Versuchen wurde synthetisch hergestelltes Dermcidin, neben anderen menschlichen Peptiden (LL-37 und dessen Fragmente), untersucht. Hierbei zeigte sich weder für Gram positive, noch für Gram negative Stämme eine antimikrobielle Aktivität für Derm-

cidin. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnisse, dass LL-37 in menschlichem Schweiß weiter prozessiert wird und die entsprechenden Derivate wesentlich aktiver sind als das Proprotein. Schlussfolgerungen im Bezug auf die fehlende antimikrobielle Aktivität von Dermcidin blieben die Autoren allerdings schuldig.

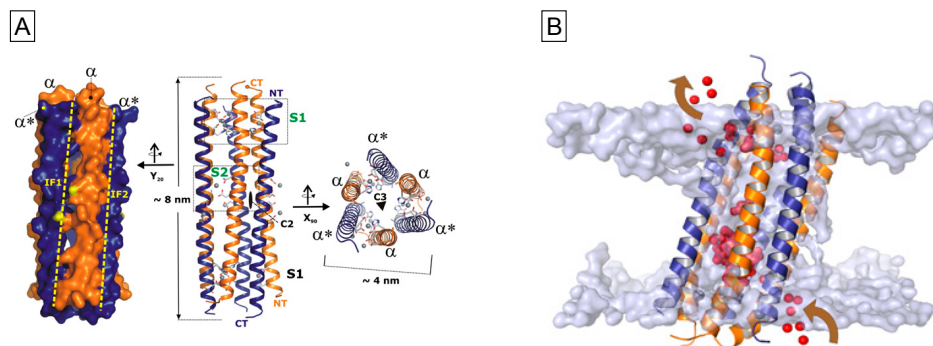
Dermcidin könnte ebenfalls posttranslational modifiziert und dadurch erst antimikrobiell aktiv werden. Eine Acetylierung an Lys6 wurde mittels Massenspektrometrie an Dermcidin in einem Hochdurchsatzverfahren ermittelt [98]. In dieser Studie testeten die Autoren ein neues Verfahren zur Identifizierung von Acetylierungsstellen im menschlichen Proteom. Dabei wurde Dermcidin als acetyliertes Protein identifiziert. Möglicherweise befinden sich im menschlichen Schweiß Acetylasen, die Dermcidin spezifisch acetylieren und somit antimikrobiell aktiv werden lassen. Es stellt sich darüber hinaus grundsätzlich die Frage, ob das 48 Aminosäuren lange Dermcidin überhaupt eine antimikrobielle Funktion besitzt. Denn neben einer angeblichen antimikrobiellen Aktivität wurde auch eine immunstimulatorische Wirkung für Dermcidin beschrieben [99]. Niyonsaba et al. konnten zeigen, dass Dermcidine (DCD und DCD1L) humane Keratinozyten durch Induktion der proinflammatorischen Cytokine TNF- $\alpha$ , IL-8, CXCL10 und CCL20 aktivieren. Somit könnte Dermcidin lediglich der Regulation der unspezifischen Immunabwehr der Haut dienen, die auch über eine Membranbindung vermittelt werden könnte.

So wurde hier nun auch die Sekundärstruktur von Dermcidin mittels CD-Spektroskopie untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass negativ geladene Detergenzien nötig sind, um Dermcidin in  $\alpha$ -helikale Konformation zu bringen. Ebenfalls konnte ein hoher  $\alpha$ -helikaler Anteil in TFE-haltiger Lösung beobachtet werden. Der pH-Wert der Umgebung scheint für die Sekundärstruktur von Dermcidin keine Rolle zu spielen. Weder im sauren Bereich, noch im alkalischen Bereich konnte mittels CD-Spektroskopie eine Faltung beobachtet werden. Dermcidin lag hier unter allen getesteten Bedingung ungeordnet vor.

Diese Ergebnisse entsprechend weitestgehend den Literaturdaten [87]. Jung et al. fanden ebenfalls nur für negativ geladene Detergenzmoleküle und TFE-haltige Lösungen eine  $\alpha$ -helikale Konformation von rekombinantem Dermcidin. Desweiteren zeigten auch NaCl Konzentrationen bis zu 150 mM und die Anwesenheit von negativ geladenen DOPC/DOPG Vesikeln (pH 7,0) keine Änderung der ungeordneten Konformation [81]. Dieses Verhalten ist typisch für antimikrobielle Peptide, welche in wässriger Umgebung überwiegend

unstrukturiert vorliegen [55]. Zur Bestimmung der relativen Ausrichtung von Dermcidin in orientierten Lipiddoppelschichten wurden Festkörper-NMR-Experimente durchgeführt. In DMPC Doppelschichten konnte keine spezielle Orientierung von Dermcidin festgestellt werden. Dermcidin lag nicht orientiert vor. Wurde die Dicke der Lipiddoppelschicht durch die Verwendung von länger-kettigen Lipiden erhöht, so fand sich ein oberflächlich, parallel zur Membran ausgerichteter Zustand für  $\alpha$ -helikales Dermcidin. Das selbe konnte bei Zugabe von höheren Mengen an Zink-Ionen beobachtet werden. Nach Zugabe von Zink zeigte Dermcidin auch in kürzer-kettigen DMPC Lipiddoppelschichten eine oberflächliche Orientierung. Wenn die Membran durch eine 3:1 molare Mischung aus ungeladenen und negativ geladenen Lipidmolekülen besteht (DMPC/DMPG und POPC/POPG), konnte ebenfalls eine Orientierung die parallel zur Membran verläuft, beobachtet werden. Um diesen Zustand genauer zu untersuchen, wurden die Proben im  $90^\circ$  Winkel gemessen. Es stellte sich heraus, dass die Orientierungsänderung der Probe, in Bezug auf das Magnetfeld, zu einer Linienverbreiterung im Spektrum führt.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass es bei Zusatz von Zinkionen zu einer planaren Assemblierung der Dermcidinmoleküle parallel zur Membranoberfläche kommt, die dazu führt, dass die Moleküle in der Membranebene nicht mehr lateral beweglich und dadurch Diffusion und Rotation eingeschränkt sind.



**Abbildung 35** – Vorgeschlagene Kristallstruktur und Funktionsmechanismus von Dermcidin. (A) Kristallstruktur von Dermcidin. Dermcidin bildet dabei ein Trimer aus antiparallelen Dimeren. Hierbei sind zwei Interaktionsflächen der Dimere zu beobachten (IF1 und IF). (B) Vorgeschlagener Funktionsmechanismus von Dermcidin auf der Basis von MD Simulationen. Entnommen aus [89]

Vor kurzem wurde eine Kristallstruktur für Dermcidin zusammen mit einem möglichen

Funktionsmechanismus vorgeschlagen [89]. Song et al. haben ein Trimer aus  $\alpha$ -helikalen, antiparallelen Dermcidin Dimeren beobachtet (Abbildung 35). Das entstandene Hexamer hat eine Höhe von etwa 8 nm und einen Durchmesser von 4 nm. Das Hexamer wird durch  $\text{Zn}^{2+}$  Ionen stabilisiert. Diese verbinden die drei antiparallelen Dimere. Die Reste Glu5 und Asp11 von einem Peptid sowie Asp41 und His38 vom benachbarten Peptid sind an der Zinkbindung beteiligt. Aminosäurepaare die sich nach dem Charge Zipper Modell mittels Salzbrücken verbinden sollten, sind in der Kristallstruktur nicht realisiert.

Mittels MD Simulationen wurde überprüft, ob und wie diese Kristallstruktur Poren in Membranen bilden könnte. Es wurde ein neuartiger, bisher in der Literatur nicht bekannter Mechanismus vorgeschlagen. Hierbei scheint es nach den MD Simulationen denkbar, dass Ionen seitlich am Dimerinterface 1 (IF1 Abbildung 35A) eindringen können, den Kanal durchqueren und seitlich auf der extrazellulären Seite des Dermcidinkanals austreten (Abbildung 35B).

Wirft man einen genaueren Blick auf die Kristallstruktur, so scheint es jedoch relativ unwahrscheinlich, dass Dermcidin auf die vorgeschlagene Art und Weise eine antimikrobielle Aktivität entfaltet. Mit 8 nm Länge wäre der porenbildende Dermcidinkomplex etwa doppelt so lang wie die Dicke einer typischen bakteriellen Membran (3 nm bis 4 nm) [100]. Dies hätte zur Folge, dass nach Abbildung 35B der obere und untere Bereich des Kanals aus der Lipiddoppelschicht zeigen würden. Dies wäre energetisch eine ungünstige Position, da die Kristallstruktur für das Äußere des Kanals lediglich unpolare Aminosäuren beschreibt. Diese Problematik ist in Abbildung 35B zu erkennen. Die grauen Bereiche um den Kanal repräsentieren dabei Wassermoleküle, während lediglich die freien Bereiche zwischen den Wasserschichten die Membran definieren.

Weiter wurden in der Veröffentlichung von Song et al. ebenfalls  $^{15}\text{N}$ - und  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Experimente durchgeführt. Im Unterschied zu dieser Studie jedoch wurde zum einen synthetisches DCD1L verwendet und zum anderen lediglich eine  $^{15}\text{N}$  Markierung an Gly22. Die Ergebnisse stimmen mit der in dieser Arbeit gefundenen Orientierung von Dermcidin überein. In negativ geladenen POPE/POPG (3:1) Lipiddoppelschichten zeigte Dermcidin sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Zink-Ionen eine oberflächliche Orientierung. Die oberflächliche Orientierung von Dermcidin war auch schon in OCD-Experimenten mit negativ geladenen Lipiddoppelschichten gezeigt worden [88].



Neben der Kristallstruktur und den Festkörper-NMR-Experimenten wurden auch elektro-physiologische Patch-Clamp Messungen an Dermcidin in Diphytanoylphosphatidylcholin (DPhPC)/Cholesterol (9:1) Membranen durchgeführt. Hier konnte für Membranen in Abwesenheit von  $\text{Zn}^{2+}$  eine sehr geringe Leitfähigkeit ermittelt werden, wohingegen Zinkzusatz die Leitfähigkeit erhöhte. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass in der Gegenwart von Zink spezifische Dermcidinkanäle geformt wurden.

Die Verwendung der Patch-Clamp Methode setzt voraus, dass ein Membranpotential vorhanden ist. Möglicherweise benötigt Dermcidin ein Membranpotential um einen funktionellen, membrandurchspannenden Kanal zu bilden. Dies würde die Abwesenheit von transmembranen Zuständen in den NMR- und OCD-Experimenten erklären. Aufgrund der sehr hohen Sensibilität der Patch-Clamp Methode zur Leitfähigkeitsmessung kann alternativ angenommen werden, dass nur sehr wenige Dermcidinmoleküle in der Gesamtpopulation überhaupt einen funktionellen Kanal bilden. Die NMR- und OCD-Spektroskopie kann dahingegen sehr geringe Populationen an membrandurchspannender Orientierung nicht sehr gut wiedergeben. Die aufgenommenen Spektren zeigen die Orientierung aller Moleküle, und somit kann das sehr geringe Signal der funktionellen Moleküle im Spektrum möglicherweise nicht erkennbar sein.

Abschließend könnten auch die bisher verwendeten artifiziellen Membranen und chemischen Umgebungen nicht die richtigen sein, um eine transmembrane Orientierung von Dermcidin in artifiziellen Membranen zu erreichen. So spielen neben der Art der verwendeten Lipide auch die Nettoladung der Lipiddoppelschicht, die Temperatur und damit der Aggregatzustand der Lipide, das Hydratationsniveau und auch die Peptidkonzentration eine Rolle bei der Orientierung von antimikrobiellen Peptiden [55, 101]. So benötigt beispielsweise das antimikrobielle Peptid PGLa negativ geladene Lipiddoppelschichten und ein P/L-Verhältnis von mindestens 1:100, sowie eine Temperatur unter der Phasenübergangsgrenze zum flüssig-kristallinen Zustand des verwendeten Lipids, um senkrecht in die Membran zu integrieren [102, 103].

Die fehlende antimikrobielle Aktivität im rekombinant hergestellten Protein wirft zusätzliche Fragen zur Funktion des Proteins auf. So könnte es durchaus sein, dass es durch den Aufreinigungsprozess oder die anschließende Lyophilisation zu Umlagerungen oder gar chemischen Modifikationen gekommen ist. Ebenfalls könnte das natürliche Peptid post-

translationale Modifikationen erfordern. Vor diesem Hintergrund kann daher noch keine endgültige Aussage zur Rolle des Charge Zipper Motivs in Dermcidin getroffen werden.

## 4.3 TisB

### 4.3.1 Einleitung

Ein weiteres interessantes Protein, bei dem ein HCZ-Motiv eine bedeutende Rolle in der Struktur und damit in der biologischen Funktion spielen könnte, ist das in *E. coli* vorkommende Protein TisB. TisB ist Teil der Stress-Antwort in *E. coli*, was die Wissenschaft bei der Entwicklung von wirksamen Medikamenten gegen bakterielle Erkrankungen vor große Probleme stellt, da in ihrer Folge Biofilme entstehen können. Auslöser in diesem Fall ist ein Toxin/Antitoxin-(TA)-System. TA-Module bestehen aus mindestens zwei Genen, bei dem eines als Toxin und das andere als Antitoxin dient [104]. Üblicherweise werden durch das freie Toxin wichtige zelluläre Funktionen wie Replikation oder Transkription herunterreguliert. Im Komplex mit dem Antitoxin jedoch wird das Toxin auf RNA Ebene inaktiviert. Bisher wurden 33 TA-Systeme in *E. coli* identifiziert [105]. Diese TA-Module können auf unterschiedliche Weise induziert werden, beispielsweise durch die DNA-schadeninduzierte SOS Antwort. Hierbei kommt es nach dem Auftreten von vermehrten DNA-Schäden zur Expression von LexBox haltigen Genen. Unter diesen Genen befindet sich auch das *tisAB/istR1* Modul, welches kürzlich direkt mit der Entstehung von Biofilmen in Verbindung gebracht wurde [106]. Der Genlocus kodiert für zwei Proteine: TisA, welches nicht exprimiert wird und TisB, welches in Abschnitt 4.1.6 als Protein mit einem HCZ-Motiv identifiziert wurde.

Das Antitoxin *istR1* stellt eine nichtcodogene RNA dar, die unabhängig von *tisAB* transkribiert wird, mit *tisB* mRNA einen Komplex bilden kann und dadurch die Translation von TisB verhindert [107, 108]. Desweiteren induziert *istR1* den Abbau des gebildeten Komplex mit *tisB* RNA durch RNaseIII [109, 110]. Um *E. coli* unter Stressbedingungen zu schützen wird vermehrt TisB exprimiert, welches daraufhin an der inneren bakteriellen Membran lokalisiert. Nachfolgend führt dieser Prozess zu einem Zusammenbruch des Protonengradienten über der inneren, bakteriellen Membran und der Verringerung der ATP Konzentration in der Zelle [44]. Dieses wiederum führt schlussendlich zu zellulärer Dormanz und der Entstehung von antibiotikaresistenten persistenten Zellen.

Die Art und Weise wie TisB die zelluläre ATP Konzentration verringert und seine biologische Rolle erfüllt, sind bisher nicht bekannt. Eine Absenkung der ATP Konzentration

lässt allerdings darauf schließen, dass TisB wohlmöglich einen Ionen-Kanal in der inneren bakteriellen Membran bilden könnte und es so zu einem Zusammenbruch der protonenmotorischen Kraft kommt. Um nun einen Kanal zu bilden, müsste das Molekül multimerisieren. Diese Multimerisation könnte mit Hilfe des identifizierten HCZ-Motivs erfolgen. Hierzu wurden im Folgenden verschiedene Experimente durchgeführt um Struktur und Funktion von TisB genauer zu untersuchen.

#### 4.3.2 Bioinformatische Analyse von TisB

Zur Vorhersage von Sekundärstrukturelementen wurde TisB mit unterschiedlichen Algorithmen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Es wurden jeweils  $\alpha$ -helikale Anteile von etwa 70 % bis 85 % ermittelt. Die verwendeten Vorhersageprogramme basieren zumeist auf der Technik der artifiziellen neuronalen Netzwerke (ANN) oder auf dem Hidden Markov Model (HMM). Hierbei stellt die ANN ein Netzwerk von Programmkomponenten dar, welches lernfähig ist [111]. Das Netzwerk lernt, indem es mit einem großen Datensatz aus Proteinsequenzen und den dazugehörigen, experimentell nachgewiesenen Sekundärstrukturen, einem sogenannten Trainings-Satz, gespeist wird. Beim HMM wird von einem Ausgangszustand aus einer Reihe von Zuständen ausgegangen, die durch Übergangswahrscheinlichkeiten miteinander in Verbindung stehen [112]. Im Falle der Proteinsekundärstrukturvorhersage werden Übergangswahrscheinlichkeiten bestimmt, indem das Vorkommen einer kurzen Abfolge von Aminosäuren in der untersuchten Sequenz mit bekannten Sequenzen verglichen wird. Aus diesem Grund sind große Datenbanken von Proteinen mit bereits bekannten Strukturen nötig. Dies gilt ebenfalls für ANN, da in diesem Fall eine größere Anzahl an Trainingssätzen zu einer genaueren Vorhersage führen kann [113, 114].

**Tabelle 13** – Sekundärstrukturvorhersage von TisB

<b>Programm</b>	<b><math>\alpha</math>-Helix</b>	<b><math>\beta</math>-Strang</b>	<b>Turn</b>	<b>Ungeordnet</b>	<b>Literatur</b>
Porter	86 %	–	–	14 %	[115]
GOR	69 %	10 %	–	–	[116]
Jnet	79 %	–	–	21 %	[117]
PredictProtein	90 %	–	–	10 %	[118]
CFSSP	97 %	–	–	3 %	[119]

Da TisB an der inneren *E. coli* Membran lokalisiert, ist es mit weiteren *in silico* Analysen auch möglich, transmembrane Anteile an der Primärsequenz von TisB zu bestimmen. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 14 gelistet. Jedes der sechs verschiedenen Programme und damit Algorithmen sagt für TisB einen transmembranen Anteil voraus.

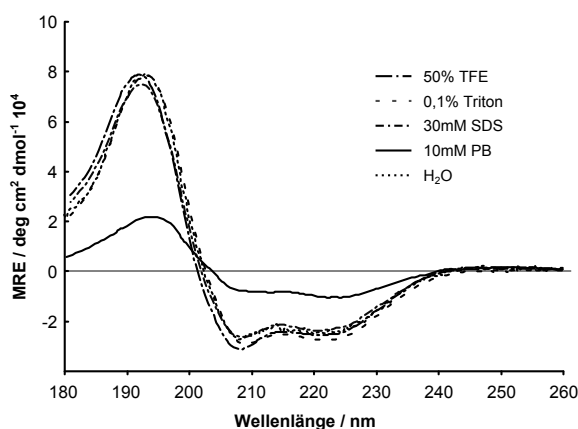
**Tabelle 14** – Vorhersage von transmembranen Bereichen in der TisB Primärstruktur

<b>Programm</b>	<b>Beginn TM-Region</b>	<b>Ende TM-Region</b>	<b>Literatur</b>
TMPred	Leu3	Leu21	[120]
TopPred	Met1	Leu21	[121]
HMMTop	Ile6	Val25	[122]
TMHMM	Ile6	Leu28	[123]

### 4.3.3 Ermittlung der Sekundärstrukturzusammensetzung von TisB

Zur Ermittlung der Sekundärstrukturzusammensetzung wurde TisB, wie auch in Abschnitt 4.2.4 an Dermcidin durchgeführt, mit Hilfe von CD-Messungen untersucht. Daraus wurde die Sekundärstrukturzusammensetzung TisB in unterschiedlichen Detergenzien und Lipidvesikeln berechnet. Die Auswirkungen von verschiedenen Detergenzien auf die Sekundärstruktur von TisB sind in Abbildung 36 zu sehen.

**Abbildung 36** – CD-Spektren von TisB in verschiedenen Detergenzien und Lösungsmitteln. Dermcidin nimmt mit Ausnahme der Probe in Phosphatpuffer, überwiegend eine  $\alpha$ -helikale Konformation ein.



TisB zeigt – mit Ausnahme der Probe in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) – in jeder Probe ein deutlich  $\alpha$ -helikales Spektrum mit den charakteristischen Minima bei 208 nm und 222 nm, sowie einem Maximum bei etwa 193 nm. Die Linienformen lassen auf sehr hohe helikale Anteile schließen. Einzig die Probe in 10 mM Phosphatpuffer zeigte ein abweichendes Spektrum. Während die absolute Intensität des Spektrums um etwa ein Drittel niedriger ist als bei den restlichen Proben, so ist auch die relative Lage der beiden Minima bei 208 nm und 222 nm unterschiedlich. Hier ist die 208 nm Bande positiver als die 222 nm Bande, was auf eine teilweise Aggregation von TisB schließen lässt. Hierbei kommt es zu einer ungleichmäßigen Verteilung und Abschattungseffekten der Chromophore innerhalb der Probe. Dies führt zu einer Absorptionsabflachung im Spektrum (*absorption flattening*).

Tabelle 15 gibt die prozentuale Sekundärstrukturzusammensetzung von TisB in unterschiedlichen Detergenzien und Lösungsmitteln wieder. Mit Ausnahme der 10 mM Phosphatpuffer Probe führen alle getesteten Konditionen zu einem helikalen Anteil zwischen 83 % und 90 %. Auch die zugehörigen NRMSD Werte lagen alle im zulässigen Bereich von  $\leq 0,1$ . Der helikale Anteil in der Phosphatpufferprobe lag trotz *absorption flattening* noch bei etwa

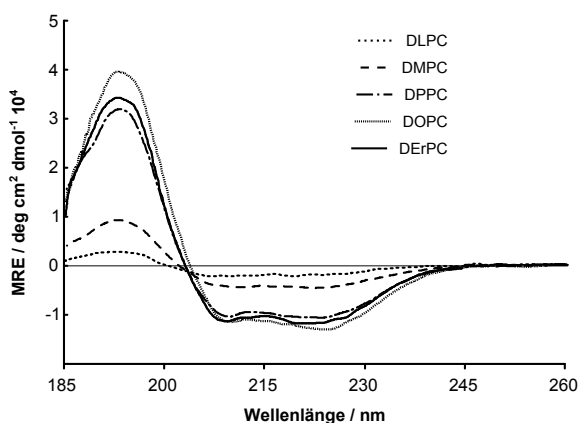
40 %. Bei der Bewertung dieses Ergebnisses muss man allerdings den zugehörigen NRMSD Wert berücksichtigen. Dieser liegt gerade an der Grenze zu einer verlässlichen Dekonvolution (0,1).

**Tabelle 15** – Dekonvolution von TisB in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	Helices	$\beta$ -Strands	Turns	Coil	NRMSD
H <sub>2</sub> O	83,3 %	0,2 %	8,9 %	8,4 %	0,074
10 mM PB	39,5 %	11,3 %	11,7 %	31,2 %	0,1
0,1 % Triton	89,7 %	–	10,4 %	–	0,036
30 mM SDS	88,0 %	0,3 %	10,9 %	0,9 %	0,081
50 % TFE	88,9 %	–	10,8 %	0,1 %	0,072

Neben verschiedenen Detergenzien wurde die Sekundärstruktur von TisB auch für verschiedene Lipidvesikelumgebungen bestimmt. Durch die Verwendung von Lipiden mit unterschiedlicher Kettenlänge konnte die Abhängigkeit der TisB Sekundärstruktur von der Membrandicke bestimmt werden. Abbildung 37 zeigt die Ergebnisse.

**Abbildung 37** – CD-Spektren von TisB in verschiedenen Lipidvesikeln. Trotz dem Auftreten von *absorption flattening* in den CD-Messungen, zeigt TisB überwiegend  $\alpha$ -helikale Konformation in Lipidvesikeln. Das P/L-Verhältnis betrug bei allen Messungen 1:100.



Jedes der unterschiedlichen Vesikelspektren von TisB zeigt eine generelle  $\alpha$ -helikale Grundform. Auch die Verhältnisse der absoluten positiven und negativen Intensitäten von etwa 2:1 finden sich in den Spektren wieder. Trotz der helikalen Grundform sind die prozentualen Anteile an der Sekundärstruktur von TisB in allen fünf Spektren niedriger als in den Detergenzspektren. Dies liegt an den Intensitäten der 208 nm und 222 nm Banden. Die

208 nm Bande ist in jedem Fall positiver als die 222 nm Bande, was ein deutliches Anzeichen für Proteinaggregation und damit *absorption flattening* ist. Die Spektren der kurzkettigen Lipide DMPC (di-C14:0) und DLPC (di-C12:0) haben nur eine geringe Intensität, was sich auch in der anschließenden Dekonvolution bemerkbar macht (Tabelle 16). Hier liegen die zugehörigen NRMSD-Werte über dem kritischen Wert von 0,1, so dass die Dekonvolution für diese beiden Proben als nicht zuverlässig gilt. Die längerkettigen Vesikelproben mit DPPC (di-C16:0), DOPC(di-C18:1) und DErPC (di-C20:1) ergeben helikale Anteile von etwa 44 %, 54 % und 49 %. Hier liegen die NRMSD-Werte im verlässlichen Bereich.

**Tabelle 16** – Dekonvolution von TisB in Lipidvesikeln (CD-Daten)

Vesikel (P/L)	Helices	$\beta$ -Strands	Turns	Coil	NRMSD
DLPC (1:100)	6,4 %	35,5 %	18,9 %	39,3 %	0,616
DMPC (1:100)	16,9 %	28,4 %	18,7 %	36,1 %	0,174
DPPC (1:100)	43,5 %	17,1 %	16,5 %	22,9 %	0,069
DOPC (1:100)	54,1 %	14,1 %	13,7 %	18,2 %	0,052
DEPC (1:100)	48,8 %	14,4 %	15,5 %	21,5 %	0,087

Das Auftreten von *absorption flattening* in allen erhaltenen Spektren lässt eine korrekte Aussage zur Sekundärstrukturzusammensetzung von TisB in Lipidvesikeln nicht zu. Deshalb war es nötig mittels Synchrotronstrahlung-CD-(SRCD)-Spektroskopie die Sekundärstrukturanteile in Lipidvesikeln zu bestimmen. SRCD-Spektroskopie bietet Vorteile gegenüber konventioneller CD-Spektroskopie, da neben dem zusätzlichen Informationsgehalt im niederwelligen Bereich auch das Signal-/Rausch-Verhältnis verbessert wird, was es ermöglicht wesentlich weniger Protein einzusetzen und damit mögliche Proteinaggregationen zu umgehen [124, 125].



**Abbildung 38** – SRCD-Spektren von TisB in verschiedenen Lipidvesikeln. TisB zeigt in den gewonnenen SRCD-Daten eine nahezu vollkommene  $\alpha$ -helikale Konformation. Das P/L-Verhältnis betrug bei allen Messungen 1:100.

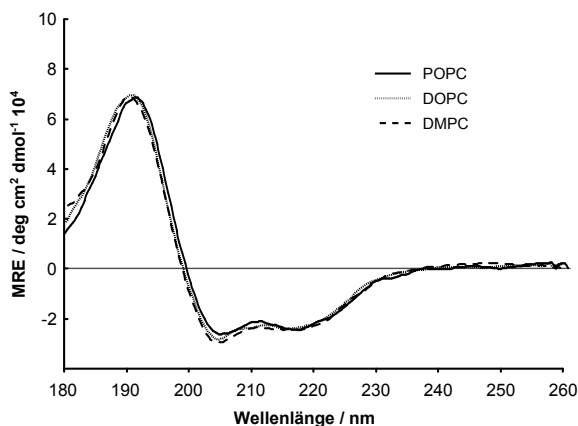


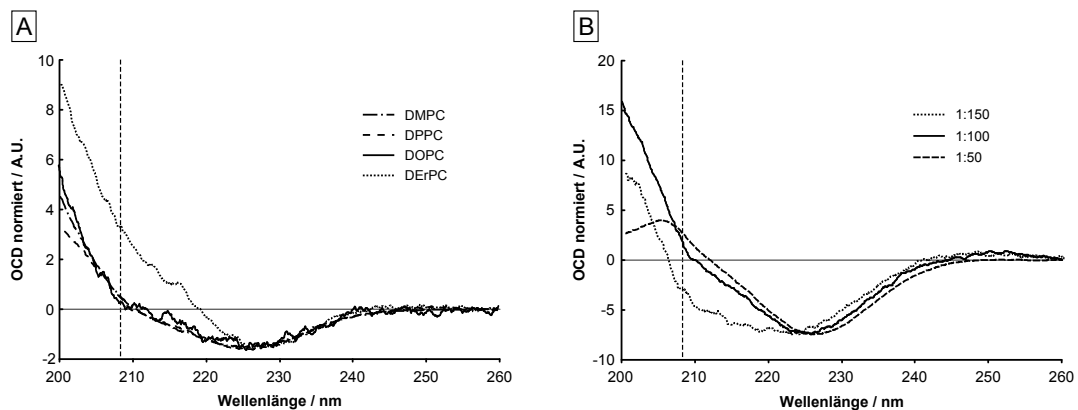
Abbildung 38 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten SRCD-Experimente. Hierzu wurden unilamellare DMPC, POPC und DOPC Vesikel nach Abschnitt 3.1.7 hergestellt und die Proben entsprechend vorbereitet. Die Messungen wurden an der Beamline UVCD-12 am ANKA Synchrotron des KIT durchgeführt. Die erhaltenen Spektren zeigen für alle drei Proben fast ideale  $\alpha$ -helikale Spektren, die nahezu deckungsgleich sind. Sehr gut sind die Intensitäten der beiden Minima bei 208 nm und 222 nm zu erkennen, wobei im Unterschied zu den CD-Proben in Abbildung 36B kein *absorption flattening* zu beobachten ist. Die Intensität der 208 nm Bande ist negativer als die der 222 nm Bande und das Verhältnis nahezu 2:1. Auch das Maximum bei 193 nm ist bei allen drei Spektren deutlich ausgeprägt, wobei das Verhältnis der absoluten positiven und negativen Intensitäten mit 2:1 als ideal angesehen werden kann. Die Dekonvolutionsergebnisse geben diese Beobachtungen wieder. Alle drei Spektren weisen einen sehr hohen helikalen Anteil auf (74 % bis 78 %). Hier liegen die berechneten NRMSD Werte alle deutlich unter der kritischen Grenze von 0,1. Die Dekonvolution ist somit als zuverlässig zu bezeichnen (Tabelle 17).

**Tabelle 17** – Dekonvolution von TisB in Lipidvesikeln (SRCD-Daten)

Vesikel (P/L)	Helices	$\beta$ -Strands	Turns	Coil	NRMSD
DMPC (1:100)	78,3 %	–	9,7 %	12,0 %	0,048
POPC (1:100)	73,8 %	1,4 %	8,7 %	16,1 %	0,042
DOPC (1:100)	77,0 %	0,3 %	8,2 %	14,5 %	0,035

#### 4.3.4 Membranorientierung von TisB

Mit Hilfe der Orientierten CD-Spektroskopie (OCD-Spektroskopie), deren Grundlagen auf der CD-Spektroskopie beruhen, ist es möglich qualitative Aussagen über die Struktur und die relative Orientierung von Helices in orientierten Lipiddoppelschichten zu treffen [126, 127]. Hierbei ist das Auftreten und die Intensität der charakteristischen "Fingerabdruckbande" um 208 nm von besonderem Interesse. Anhand dieser Bande ist es möglich abzuschätzen, ob ein Protein waagrecht auf einer orientierten Lipiddoppelschicht aufliegt (Surface-(S)-state), ob ein Protein schräg in die Membran integriert ist (Tilted-(T)-state), oder ob das Protein senkrecht zur Membrannormalen in die Lipiddoppelschicht eingebettet ist (Inserted-(I)-state). Nimmt die 208 nm Bande vergleichbare negative Werte wie bei 225 nm an, so liegt ein S-state vor, während man bei einer negativen Bande bei 208 nm und einem Intensitätsverhältnis von 1:2 zwischen dieser und der 225 nm Bande, von einem T-state spricht. Beträgt die Intensität der 208 nm Null oder nimmt diese gar positive Werte an, so liegt ein I-state vor.

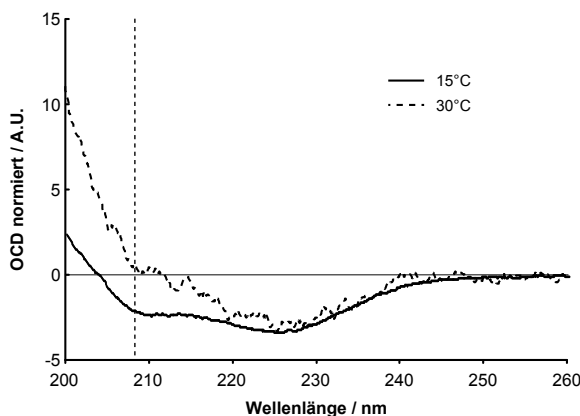


**Abbildung 39** – OCD-Spektren von TisB. (A) Einfluss der Kettenlänge auf die relative Orientierung von TisB. (B) Einfluss der Proteinkonzentration auf die Orientierung von TisB. Falls nicht anders angegeben, betrug das P/L-Verhältnis 1:100. Zur vergleichbaren Darstellung wurden die Spektren auf 225 nm normalisiert. Die 208 nm Bande wird durch die senkrechte, gestrichelte Linie hervorgehoben.

Abbildung 39A zeigt die Ergebnisse der OCD-Spektroskopie von TisB in unterschiedlichen Lipiden mit verschiedener Kettenlänge. Hierzu wurde TisB nach Abschnitt 3.1.7 in verschiedenen Lipiden rekonstituiert, die alle im flüssig-kristallinen Zustand vorlagen. Beginnend mit dem kurzen DMPC (di-C14:0) über die längeren DPPC (di-C16:0) und DOPC (di-C18:1), bis hin zum langen DErPC (di-C20:1). In all diesen Lipiden mit unterschied-

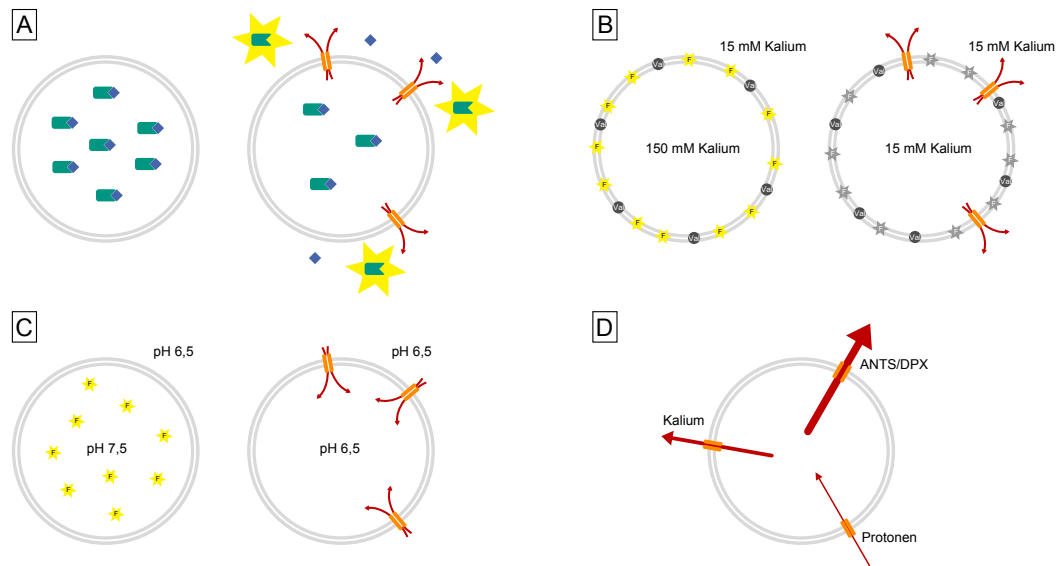
licher Kettenlänge und damit verschiedener Membrandicke, zeigte TisB unabhängig vom verwendeten Lipid eine Intensität der Bande bei 208 nm von größer Null und damit einen senkrecht zur Normalen, insertierten Zustand (I-state). Im Kurvenverlauf unterscheiden sich DMPC, DOPC und DPPC kaum, was den Schluss zulässt, dass TisB in allen der drei Lipidumgebungen einen ähnlichen Neigungswinkel einnimmt. Einzig in der DErPC Umgebung nimmt das Spektrum ab etwa 220 nm positivere Werte an, was auf einen noch senkrechteren Zustand von TisB im Vergleich zu den anderen drei Lipiden schließen lässt. Überdies ist zu beobachten, dass bei identischem P/L-Verhältnis, das DMPC Signal wesentlich mehr Rauschen zeigt als die übrigen drei Spektren. Die schlechte Qualität des Spektrums rührt vermutlich von Streuartefakten und damit von Proteinaggregation her. Darüber hinaus zeigt TisB auch eine konzentrationsabhängige Orientierung in DOPC Lipidmembranen (Abbildung 39B). Während man bei einem P/L-Verhältnis von 1:50 eine positive Bande um 208 nm beobachten kann und damit einen senkrecht insertierten Zustand (I-state) vorfindet, so nimmt die Intensität der Bande bei sinkender Proteinkonzentration ab. Ab einem P/L-Verhältnis von 1:100 nimmt die 208 nm Bande negative Werte an und TisB damit einen auf der Membran aufliegenden Zustand (S-state). Neben der Konzentrationsabhängigkeit in Bezug auf die relative Membranorientierung, zeigt auch die Temperatur einen Einfluss auf die Orientierung von TisB in DMPC Lipiddoppelschichten. Während bei einer Temperatur um 15 °C eine negative Intensität der 208 nm Bande zu beobachten ist, so nimmt die Intensität bei einer Temperatur von 30 °C einen leicht positiven Wert an. Dies rührt vom unterschiedlichen Aggregatzustand von DMPC bei diesen beiden Temperaturen her. Während sich DMPC bei 15 °C im Gelzustand befindet, so hat sich der Aggregatzustand bei 30 °C in den flüssig-kristallinen und damit in den physiologisch bedeutsamen Zustand umgewandelt.

**Abbildung 40** – Temperaturabhängige Membranorientierung von TisB in DMPC Lipiddoppelschichten. Abhängig von der Temperatur nimmt TisB einen nur leicht geneigten Zustand bei 15 °C ein, aber einen I-state bei 30 °C. Das P/L-Verhältnis betrug 1:100. Zur vergleichbaren Darstellung wurden die Spektren auf 225 nm normalisiert. Die 208 nm Bande wird durch die senkrechte, gestrichelte Linie hervorgehoben.



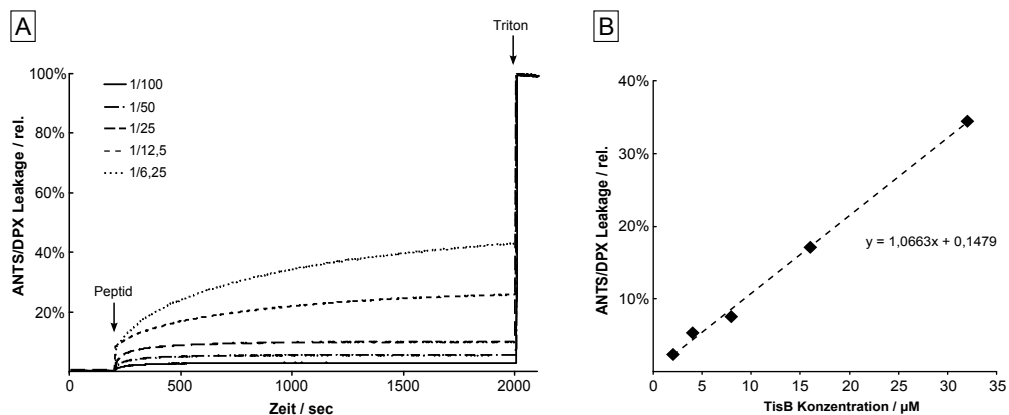
#### 4.3.5 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an TisB

Nachdem Sekundärstruktur und Membranorientierung von TisB bestimmt worden waren, wurden fluoreszenzspektroskopische Messungen zur Untersuchung der Funktion von TisB durchgeführt. Da TisB die ATP Konzentration in der Zelle senkt und in der inneren Membran von *E. coli* lokalisiert, liegt es sehr nahe, dass TisB eine Pore in der inneren Membran bilden könnte. Um diese Möglichkeit genauer zu untersuchen, wurden drei verschiedene Arten von „Leckschlagung“ untersucht: Leakage des Fluorophor/Quencher Paares ANTS/DPX, Kaliumleakage und Protonenleakage (Abbildung 41). Diese drei verschiedenen Leakage-Experimente lassen qualitative Rückschlüsse auf die Größe und Struktur einer eventuellen TisB Pore zu, indem sukzessiv kleiner werdende Moleküle im Verlauf der drei Assays durch die Poren dringen. Das relativ voluminöse ANTS/DPX Paar, die kleineren Kaliumionen und sehr kleine Protonen. Hierüber ist es nicht nur möglich, eine Selektivität für bestimmte Molekülgrößen zu bestimmen und damit Aussagen über Struktur und Funktion einer TisB Pore zu treffen, sondern auch über den zeitlichen Verlauf der Änderung des Fluoreszenzsignals Rückschlüsse auf die Kinetik der Porenbildung zu treffen.



**Abbildung 41** – Übersicht der fluoreszenzspektroskopischen Versuche. (A) ANTS/DPX Lipidvesikelassays vor (*links*) und nach der Zugabe (*rechts*) von membranaktiven Peptiden. (B) Kaliumleakageassay: Durch den Zusammenbruch des Potentials (*rechts*) erniedrigt sich die Fluoreszenz (C) Protonenleakageassays: Nach Zugabe von Peptid sinkt der intravesikuläre pH-Wert und damit die Fluoreszenz (*links*) (D) Sensibilität der Assays gegenüber der Größe des entweichenden Stoffes. Während für den Austritt von ANTS/DPX eine Pore mit großem Durchmesser entstehen muss, so sinkt der notwendige Porendurchmesser über den Kaliumleakageassay bis hin zum Protonengradientenassay kontinuierlich.

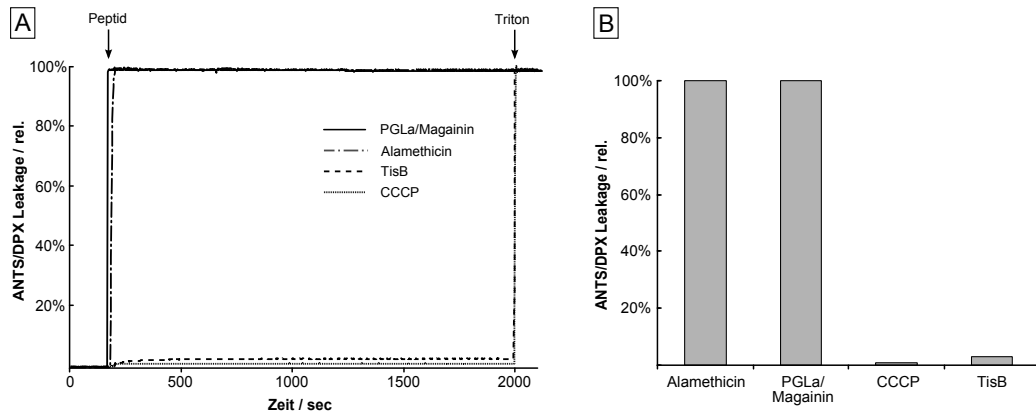
**ANTS/DPX Leakage** Zu Beginn der Funktionsuntersuchungen an TisB wurden Messungen mit dem ANTS/DPX Fluorophor/Quencher Paar durchgeführt. Hierzu wurden unilamellare Vesikel wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben hergestellt. Die ANTS/DPX-haltigen Vesikel wurden bei laufender Messung in iso-osmolaren Puffer gegeben, wobei dadurch das Fluoreszenzsignal anstieg. Nach 200 s wurde TisB in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Fluoreszenzsignal für 30 min gemessen. Membranaktive Peptide führen im Laufe der Messung zu einem Anstieg der Fluoreszenz, da die Integrität der Lipidvesikel die das Fluorophor/Quencher Paar enthalten, gestört wird. Nach 30 min erfolgte die Zugabe des Detergenz Triton X-100, durch welches die Lipidvesikel aufgelöst werden. Die Signalintensität nach der Zugabe von Triton entspricht dem 100 % Leakage Wert. Anhand der Signalintensität bei Zugabe der Peptide und der Signalintensität nach Tritonbehandlung kann die relative Leakageaktivität eines Peptids berechnet werden (Abbildung 42).



**Abbildung 42** – Ergebnisse der ANTS/DPX Leakage Experimente mit TisB. Fluoreszenzsignal umgerechnet in relatives Leakage in Abhängigkeit vom P/L-Verhältnis (A). Linearer Anstieg des relativen Leakages in Abhängigkeit von der TisB Konzentration (B). 200 µM DOPC Vesikel, 30 °C, Messdauer 30 min.

Die Leakageaktivität von TisB ist deutlich vom verwendeten P/L-Verhältnis abhängig. Während bei niedrigen Konzentrationen die Leakageaktivität im einstelligen Prozentbereich liegt, so steigt die TisB Leakageaktivität mit zunehmender TisB Konzentration linear an. Um Referenzwerte zu erhalten, wurde die Leakageaktivität von TisB mit anderen membranaktiven Peptiden und Substanzen verglichen. Während das antimikrobielle Alamethicin und das synergistisch wirkende Paar PGLa und Magainin zu einem sofortigen

Anstieg des Fluoreszenzsignal bis hin zu 100 % führen, so zeigt der niedermolekulare Protonencarrier CCCP nach Zugabe nahezu keine Änderung des Fluoreszenzsignals (Abbildung 43).

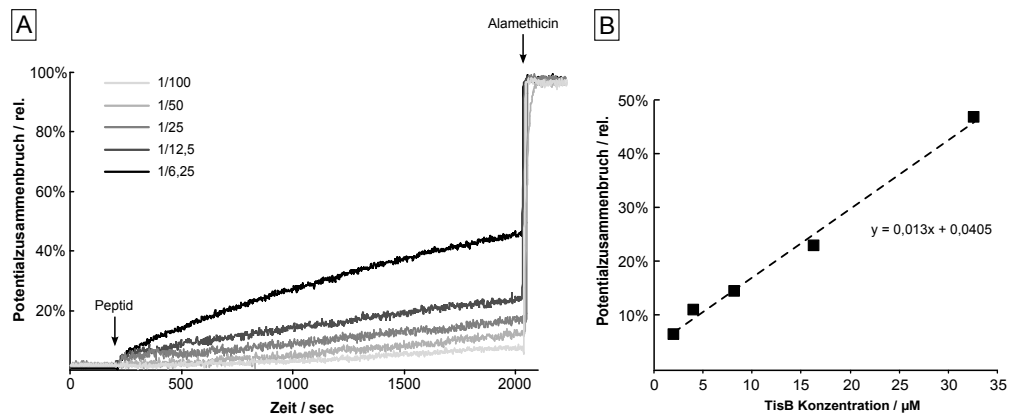


**Abbildung 43** – ANTS/DPX Leakage Vergleich zwischen membranaktiven Peptiden und TisB in DOPC Vesikeln. Während die Zugabe der porenbildenden antimikrobiellen Peptide Alamethicin und PGLa/Magainin (1:1) zur sofortigen Freisetzung des Farbstoffs aus den Vesikeln führt, so führt die Zugabe von TisB und CCCP in der selben Konzentration kaum zum Anstieg der Fluoreszenz und damit zum Farbstoffaustritt (A). Vergleich der Leakagewerte von Alamethicin, PGLa/Magainin, CCCP und TisB (B). P/L-Verhältnis 1:100, 200  $\mu$ M DOPC Vesikel, 30 °C, Messdauer 30 min.

**Kaliumleakage** Neben ANTS/DPX Leakage Assays wurden auch Kaliumleakage Messungen durchgeführt. Diese stellen ein sensibleres System im Bezug auf die Molekülgröße des auszutretenden Stoffes dar. Während bei den vorherigen Leakagemessungen der Austritt des recht großen Moleküls ANTS verfolgt wurde, so wurde hier die Veränderung der Fluoreszenz durch den Austritt kleiner Kaliumionen gemessen. Hierbei werden Vesikel wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben mit Kaliumpuffer hergestellt. Zu Beginn der Messung wird der potentialabhängige und hydrophobe Farbstoff DilC vorgelegt. Anschließend erfolgt die Zugabe von Natriumpuffer und den Vesikeln mit Kaliumpuffer. Zuletzt wird Valinomycin zugegeben, welches selektiv Kaliumionen über die Membran transportiert.

Durch die unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen innerhalb und ausserhalb der Vesikel entsteht mit Hilfe des selektiven  $K^+$ -Ionophors Valinomycin ein Potential für Kalium, welches etwa  $-60$  mV (innen) beträgt. Die Fluoreszenz ist nun am stärksten und stellt gleichzeitig den 0% Leakagewert dar. Nachdem das System äquilibriert wurde, wurde TisB in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Eine auftretende Pore oder ein Kanal führt zum Austritt von Kalium und damit zu einer Erniedrigung des Potentials. Dies hat zur

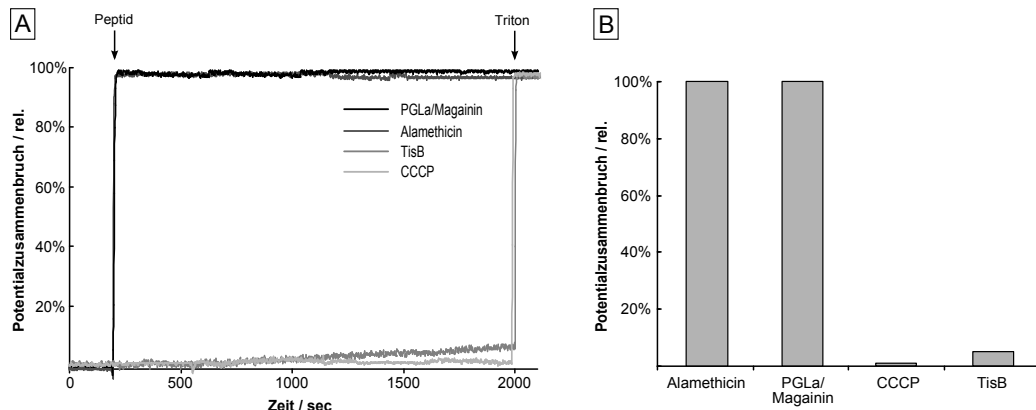
Folge, dass die Fluoreszenzintensität abnimmt. Nach einer Messdauer von 30 min wurde Triton zugegeben, woraufhin es zur sofortigen Freisetzung der Kaliumionen innerhalb der Vesikel kommt und damit zum sofortigen Zusammenbruch des Potentials. Die Intensität der Fluoreszenz nach der Zugabe von Triton stellt den 100 % Kaliumleakagewert dar. Wie auch schon bei den ANTS/DPX Leakagemessungen beobachtet werden konnte, so führt auch die Zugabe von verschiedenen Mengen an TisB zu den DOPC Vesikeln zu einer konzentrationsabhängigen Fluoreszenzerniedrigung. In Abbildung 44 sind die Ergebnisse dargestellt. Während niedrige P/L-Verhältnisse und damit geringe TisB Konzentrationen zu keiner nennenswerten Veränderung des Potentials führen, so wird das Potential mit steigender Konzentration linear erniedrigt.



**Abbildung 44** – Abbau des Kaliumpotentials durch TisB in DOPC Vesikeln. Das Kaliumpotential verringert sich in Abhängigkeit von der TisB Konzentration (A). Der Abbau des Potentials erfolgt linear in Abhängigkeit von der Konzentration (B). 200 µM DOPC Vesikel, 30 °C, Messdauer 30 min.

Ebenfalls wurde der Einfluss von anderen membranaktiven Peptiden auf das Kaliumpotential mit TisB verglichen. Wie auch schon bei den vorangegangenen Messungen konnte nach Zugabe von Alamethicin beziehungsweise einem äquimolaren Verhältnis von PGLa und Magainin ein sofortiger Fluoreszenzabfall und damit ein sofortiger Abbau des Kaliumpotentials beobachtet werden. Die Zugabe des Protonenentkopplers CCCP führte zu keiner nennenswerten Veränderung des Kaliumpotentials (Abbildung 45).

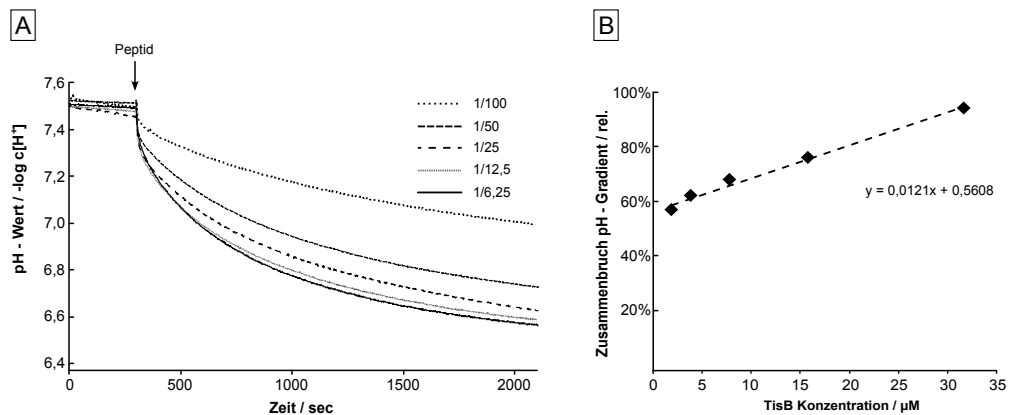




**Abbildung 45** – Vergleich der Kaliumpotentialverringering zwischen membranaktiven Peptiden und TisB. Alamethicin und PGLa/Magainin (1:1) führen sofort nach der Zugabe zu einem Verlust des Kaliumpotentials (A). Die Potentialerniedrigung durch CCCP und TisB liegen bei 1 % und 5 % (B). P/L-Verhältnis 1:100, 200  $\mu$ M DOPC Vesikel, 30 °C, Messdauer 30 min.

**Protonenleakage** In der Zelle erniedrigt TisB die protonenmotorische Kraft über der inneren Zellmembran, was zu einer Erniedrigung der ATP-Konzentration führt [44]. Aus diesem Grund wurden fluoreszenzspektroskopische Messungen durchgeführt, die genau diese Situation widerspiegeln sollen. Die Verfolgung eines eventuellen Abbaus eines Protonengradienten stellt die sensibelste Methode im Bezug auf die zu transportierende Stoffgröße dar.

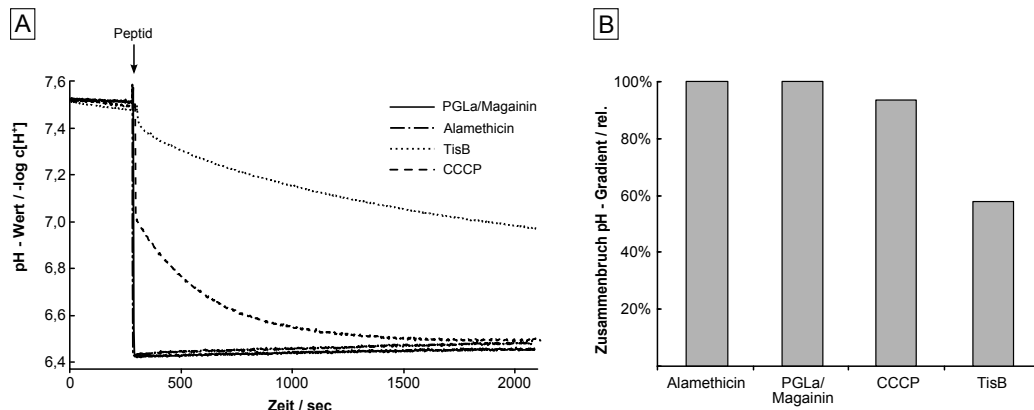
Hierbei wurden Lipidvesikel wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben mit einem Puffer hergestellt, der den pH-Wert von 7,5 hat. Diese Vesikel enthalten zusätzlich den pH-abhängigen Farbstoff Pyranin. Mit Hilfe dieses Farbstoffes lässt sich der pH-Wert im Inneren der Vesikel bestimmen, so dass zur Auswertung das Fluoreszenzsignal in pH-Einheiten umgerechnet werden kann. Zur eigentlichen Messung wurden die Vesikel in einen MES-Puffer gegeben, welcher einen pH-Wert von 6,5 hat und somit eine um den Faktor 10 höhere Konzentration an Protonen gegenüber dem intravesikulären Puffer. Bei der Zugabe von membranaktiven Peptiden ist nun ein Abfallen des Fluoreszenzsignals und damit des pH-Werts innerhalb der Vesikel zu erwarten.



**Abbildung 46** – Abbau eines Protonengradienten in Abhängigkeit von der TisB Konzentration. Schon eine Konzentration von  $2\ \mu\text{M}$  TisB (P/L:1/100) führt zu einem Abbau des Protonengradienten um etwa 55 %. Das Fluoreszenzsignal wurde zur besseren Veranschaulichung in pH-Einheiten umgerechnet (Anhang 6.6) (A). Höhere TisB Konzentrationen verursachen einen schnelleren pH-Ausgleich. Der Abbau des Protonengradienten korreliert positiv mit der TisB Konzentration (B).  $200\ \mu\text{M}$  DOPC Vesikel,  $30\ ^\circ\text{C}$ , Messdauer 30 min.

In Abbildung 46 ist die Auswirkung unterschiedlicher TisB Konzentrationen auf den intravesikulären pH-Wert als Funktion der Zeit aufgeführt. Schon sehr geringe Konzentrationen an TisB führen zu einer Erniedrigung des pH-Werts innerhalb der Vesikel, jedoch nicht zu einer völligen Angleichung gegenüber dem extravesikulären Wert. Erst die Zugabe von höheren TisB Konzentrationen ( $>32\ \mu\text{M}$ ) führt zu einem vollständigen Ausgleich des pH-Werts innerhalb und ausserhalb der Vesikel.

Abbildung 47 zeigt den Vergleich von TisB mit Alamethicin, PGLa/Magainin und CCCP in Bezug auf den Abbau des angelegten Protonengradienten. Wie zu erwarten war führte schon die Zugabe von geringen Mengen an Alamethicin und PGLa/Magainin (1:1) zu einem sofortigen Abbau des Gradienten. Ebenfalls wurde erwartet, dass es bei einer Zugabe von CCCP zu einem Abbau des Gradienten kommt. Die äquimolare Menge an TisB (in Bezug zu CCCP) jedoch, schaffte es nicht ganz den Protonengradienten innerhalb der Messzeit abzubauen. Während die Zugabe von CCCP einen Abbau des Protonengradienten von etwa 94 % bewirkte, so kam es bei TisB Applikation lediglich zu einem Zusammenbruch des Gradienten von 55 %. Im Unterschied zu Alamethicin und PGLa/Magainin, die zu einem sofortigen Abbau des Gradienten führen, ähneln sich die langsamen Abbaukinetiken von CCCP und TisB.

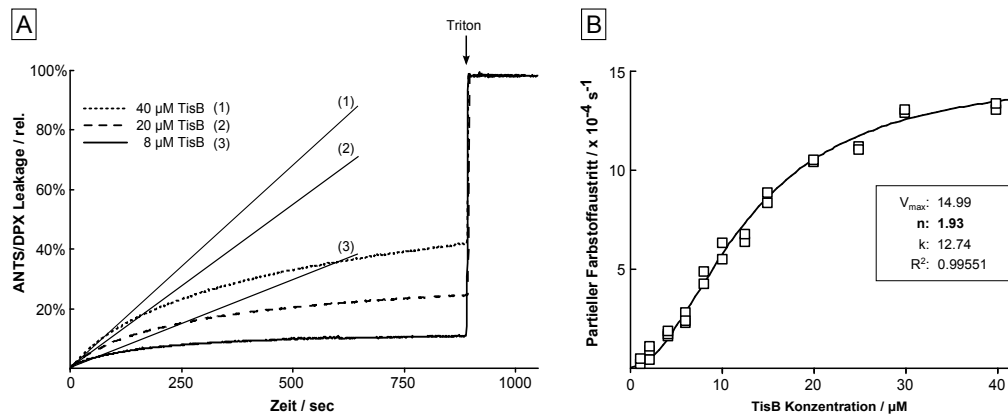


**Abbildung 47** – Vergleich des Abbaus eines Protonengradienten zwischen TisB und membran-aktiven Peptiden. Niedrige Konzentrationen an Alamethicin und PGLa/Magainin bauen den angelegten Protonengradienten sehr schnell ab, während die Zugabe von CCCP zwar auch zu einem fast vollständigen Abbau des Gradienten führt, so findet dies graduell über die gesamte Messzeit statt (A). Eine TisB Konzentration von  $2\ \mu\text{M}$  führt zu einem Abbau von 55 %, während die selbe Konzentration an CCCP im Verlauf der Messung zu einem Zusammenbruch des Gradienten von 94 % führt (B). P/L-Verhältnis 1/100,  $200\ \mu\text{M}$  DOPC Vesikel,  $30\ ^\circ\text{C}$ , Messdauer 30 min.

**Bestimmung des Hill-Koeffizienten** Anhand der ANTS/DPX Leakage-Messungen lassen sich nicht nur Aussagen über den Porendurchmesser von TisB treffen, sondern anhand der Kinetiken auch Aussagen über die Kooperativität des Leakageprozesses. Unter Kooperativität versteht man in der Biochemie generell, dass die Bindungsstärke eines Liganden davon abhängt, ob andere Untereinheiten bereits einen Liganden tragen. Im Falle von TisB also, ob am Prozess des Farbstoffaustritts TisB als Monomermer involviert ist, oder ob der Farbstoffaustritt durch die Bildung von TisB Multimeren zustande kommt. Eine geeignete Methode um Kooperativitäten zu messen, ist die Erstellung eines Hill-Diagramms und der Bestimmung des Hill-Koeffizienten. Über den Hill-Koeffizienten  $n$  lassen sich dann Aussagen zur Kooperativität tätigen. Wird  $n = 1$  erhalten, so bedeutet dies, dass TisB keine kooperativen Eigenschaften besitzt. Erhält man einen Hill-Koeffizienten von  $n > 1$ , so bedeutet dies positive Kooperativität. Im Falle von TisB würde das bedeuten, dass nicht das Monomer alleine für die Bildung eines Kanals zuständig ist, sondern dass mindestens ein weiteres TisB Molekül am Transport beteiligt sein muss. Aufgrund der mathematischen Bedingungen, kann  $n$  nicht größer sein als die Anzahl der Untereinheiten.

Zur Bestimmung des Hill-Koeffizienten wurde die Anfangssteigung des Fluoreszenzsignals der ANTS/DPX Leakage Messungen für verschiedene TisB Konzentrationen bestimmt. Diese wurden umgerechnet in Farbstoffaustritt pro Sekunde. Diese Anfangsgeschwindig-

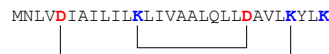
keiten wurden gegen die jeweilige TisB Konzentration aufgetragen und mit Hilfe der Hill-Gleichung eine Kurve angelegt (Abbildung 48, Einzelheiten siehe Abschnitt 3.1.6). Es stellte sich heraus, dass TisB für den Austritt von ANTS/DPX aus DOPC Vesikeln, einen Hill-Koeffizienten von 1,93 besitzt, was wiederum positive Kooperativität bedeutet.



**Abbildung 48** – Bestimmung des Hill-Koeffizienten von TisB. Exemplarische Darstellung der Anfangssteigungsbestimmung des TisB-induzierten ANTS/DPX Leakage in DOPC Vesikeln (A). Zur Ermittlung der mittleren Steigung zu Beginn wurden die ersten 30 s nach Zugabe von TisB verwendet. Die Anfangsgeschwindigkeit des ANTS/DPX Austritts als Funktion der TisB Konzentration (B). Die gefittete Hill-Kurve ergab einen Koeffizienten von  $n = 1,93$ .

### 4.3.6 Zusammenfassung und Diskussion

Eine der großen medizinischen Herausforderung heutzutage stellt die Bekämpfung von bakteriellen Biofilmen dar. Ursache dieses Problems sind sogenannte persistenten Zellen. Obwohl diese Zellen genetisch identisch mit gewöhnlichen bakteriellen Zellen sind, können sie sich in einem dormanten Zustand begeben. Dieser ist durch einen anderen Phänotyp gekennzeichnet, welcher über eine sehr hohe Toleranz gegenüber konventionellen Antibiotika verfügt. Leider ist der Mechanismus der Entstehung von persistenten Zellen und damit von Biofilmen bisher nicht richtig verstanden [128]. Eine Hauptrolle bei der Entstehung von persistenten Zellen spielt das Protein TisB aus *E. coli*. In diesem Protein wurde in dieser Arbeit ein HCZ-Motiv identifiziert, mit der Länge  $m = 2$  (Abbildung 49).



**Abbildung 49** – Hypothetisches Charge Zipper Motiv in der TisB Sequenz von *E. coli* K12.

Vergleicht man die Primärsequenz von TisB aus *E. coli* K12 mit den Sequenzen von homologen Proteinen aus anderen Prokaryoten, so lässt sich feststellen, dass die Anordnung der geladenen Aminosäuren konserviert ist (Abbildung 50).

Escherichia coli K12	MNLVDIAIILIKLIVAALQLLDAVLKYLK
Escherichia coli O103:H4	MSLVDIAIILIKLIVAALQLLDAVLKYLK
Citrobacter freundii	MSLVDIAIILIKLIVAALQLLDAVLKYVK
Citrobacter rodentium	MSLVDIILIKLIVAVMQLLDAVLKYFK
Enterobacter sp. SST3	MSVVDIVVILIKLIVAVLQLLDAVLKQVR
Klebsiella oxytoca	MGAVDIAIILIKLIVAVLQLLDAVLKQVR
Klebsiella pneumonia	MGGMDIILIKLIVAVLQLLDAVLKQVR
Salmonella choleraesuis	MSVVDIILIKLIVAALQLLDAVLKYLK
Salmonella enterica	MSVVDIILIKLIVAALQLLDAVLKYLK
Salmonella paratyphi	MSVVDIILIKLIVAALQLLDAVLKYLK
Salmonella typhimurium	MSVVDIILIKLIVAALQLLDAVLKYLK
Shigella flexneri	MSLVDIAIILIKLIVAALQLLDAVLKYLK

**Abbildung 50** – TisB aus *E. coli* K12 im Vergleich mit TisB Homologen aus unterschiedlichen Prokaryoten. Das HCZ-Motiv ist in den homologen Proteinen konserviert. Negativ geladene Aminosäuren sind rot unterlegt, während positiv geladenen Aminosäuren blau unterlegt sind. Gln19 ist ebenfalls konserviert (hellblau hinterlegt).

Die TisB Sequenzen bestehen dabei hauptsächlich aus unpolaren Aminosäuren, die einen wesentlich geringeren Konservierungsgrad zeigen als die geladenen Reste. Gleichzeitig ist zu

erkennen, dass ein Glutaminrest (Gln19) ebenfalls konserviert ist. Die Konservierung des Charge Zippers Motivs deutet die Wichtigkeit dieser Ladungsabfolge für die Funktion von TisB an.

Zu Beginn wurde die TisB Primärsequenz mittels *in silico* Methoden sowohl auf die Sekundärstrukturzusammensetzung als auch auf das potentielle Vorhandensein einer Transmembranregion untersucht. Hierbei wurde ein  $\alpha$ -helikaler Anteil zwischen 70 % und 90 % vorausgesagt. Auch die Integration in eine biologische Lipiddoppelschicht scheint nach den erhaltenen Daten wahrscheinlich zu sein.

Zur Ermittlung der Sekundärstrukturzusammensetzung wurde TisB mittels CD-Spektroskopie untersucht. Dabei konnte bereits eine  $\alpha$ -helikale Faltung in der Abwesenheit von Lipiden beobachtet werden. Der  $\alpha$ -helikale Anteil in wässriger Umgebung beträgt für TisB etwa 83 %. Dies ist relativ untypisch für membranaktive Peptide, wie beispielsweise antimikrobielle Peptide. Diese sind in wässrigen Umgebungen weitestgehend unstrukturiert, wohingegen erst die Anwesenheit von negativ geladenen Lipidvesikeln eine Induktion der  $\alpha$ -helikalen Faltung bewirkt [55,129]. Doch nicht nur  $\alpha$ -helikale Peptide zeigen dieses Verhalten, auch Peptide mit  $\beta$ -Strang Konformation. So ist beispielsweise KIGAKI, ein künstlich hergestelltes antimikrobielles Peptid, in Lösung ungeordnet und nimmt erst in der Gegenwart von Membranen eine  $\beta$ -Strang Konformation ein. Wird die Peptidkonzentration erhöht, so bilden sich immobilisierte KIGAKI  $\beta$ -Faltblätter [130].

Desweiteren wurden aufgrund des Auftretens von *absorption flattening* SRCD-Experimente von TisB, rekonstituiert in Lipidvesikeln, durchgeführt. Hier konnten in ungeladenen DOPC, POPC und DMPC Vesikeln ebenfalls sehr hohe  $\alpha$ -helikale Anteile bestimmt werden (etwa 80 %). Diese experimentellen Nachweise stimmen sehr gut mit den durch *in silico* Analysen erhaltenen Daten überein.

Die Tatsache einer  $\alpha$ -helikalen Konformation in wässriger Lösung lässt den Schluss zu, dass TisB eventuell bereits vor der Interaktion mit einer biologischen Membran multimerisiert. Dies könnte zum Beispiel über elektrophoretische Methoden herausgefunden werden. Über eine Nativ-PAGE sollten TisB Multimere erkennbar sein. Alternativ bietet sich auch eine analytische Ultrazentrifugation an.

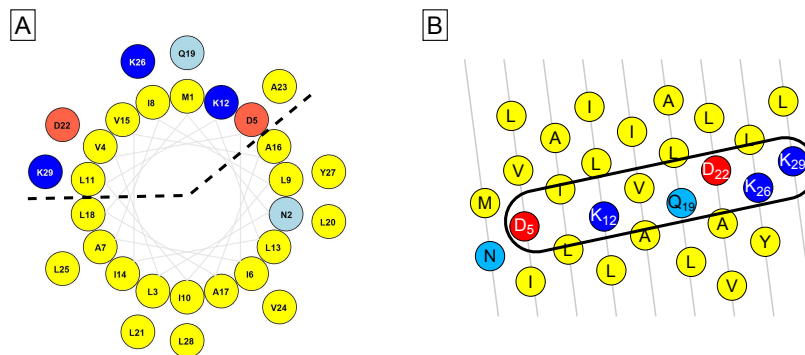
Nachdem experimentell nachgewiesen wurde, dass TisB nahezu vollständig  $\alpha$ -helikal vorliegt, wurde die Membranorientierung von TisB bestimmt. Hierzu wurden OCD-Experi-

mente durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass TisB unabhängig vom verwendeten Lipid senkrecht in die Membran integriert. Faktoren die die relative Orientierung von TisB in Bezug auf biologische Membranen beeinflussen, sind die Proteinkonzentration und die Temperatur. Während höhere Konzentrationen zu einer senkrechten Orientierung führen, so konnte beobachtet werden, dass geringe Konzentrationen an TisB zu einer oberflächlichen, beziehungsweise leicht schrägen Orientierung in der Membran führen. Diese Eigenschaft ist weit verbreitet unter membranaktiven Peptiden. Das porenbildende antimikrobielle Peptid PGLa muss hierzu ein P/L Verhältnis von mindestens 1:100 erreichen, um vom oberflächlich gebundenen Zustand in einen T-state überzugehen [131]. In Bezug auf die Temperaturabhängigkeit verhält sich das Peptid PGLa entgegengesetzt zu TisB. Während bei TisB das Absenken der Temperatur unter den Phasenübergang vom Gelzustand in den flüssig-kristallinen Zustand das Peptid hindert eine transmembrane Orientierung einzunehmen, so bewirkt das Absenken der Temperatur bei PGLa das Gegenteil. Dieser physiologisch nicht relevante Aggregatzustand der Lipide ermöglicht es PGLa einen transmembranen Zustand (I-state) anzunehmen. In der flüssig-kristallinen und damit physiologisch relevanten Lipidphase, liegt lediglich eine schräge Orientierung (T-state) von PGLa vor [103].

Nachdem Sekundärstruktur und Orientierung in Lipiddoppelschichten bestimmt worden waren, wurden Funktionsuntersuchungen mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass TisB weder große Poren bilden kann um beispielsweise das Fluorophor/Quencherpaar ANTS/DPX aus Vesikeln zu entlassen, noch dass Kaliumionen durch die Pore treten können. Im Unterschied dazu, zeigte TisB erhöhte Aktivität bei Protonenleakageversuchen. Hier konnte eine drastische Absenkung des intravesikulären pH-Werts beobachtet werden. Eine größere Pore verursacht durch antimikrobielle Peptide wie PGLa/Magainin, Alamethicin oder durch bakterielle Toxine wie beispielsweise  $\alpha$ -Hämolysin aus *S. aureus*, konnte also nicht beobachtet werden.  $\alpha$ -Hämolysin wird von *S. aureus* sekretiert und verursacht Zelllysis, indem es zuerst an die Membran bindet und anschließend oligomerisiert. Dies führt zu einer wassergefüllten Pore. Diese Pore ist durchlässig für Ionen und andere cytosolisch gelöste Stoffe, so dass dies zum Absterben der betroffenen Zelle führt [132].

Aus diesem Grund muss der Porendurchmesser von TisB relativ klein sein. Für eine Pore

mit kleinem Durchmesser würden auch weniger TisB Moleküle benötigt, so dass der Oligomerisierungsgrad von TisB sehr gering sein sollte. Um dies zu überprüfen, wurde anhand der Anfangssteigungen der ANTS/DPX Leakagemessungen, der Hill-Koeffizient  $n$  bestimmt. Dieser gibt Hinweise auf den Oligomerisierungszustand des aktiven TisB Proteins. Er stellte sich heraus, dass dieser bei etwa 2 liegt und somit TisB in Dimerform die Membran entkoppeln könnte. Ob es sich nun um ein paralleles oder antiparalleles Dimer handelt kann daraus nicht bestimmt werden. Hauptanwendung findet der Hill-Koeffizient in der Enzymkinetik, wo er zur Bestimmung der Kooperativität zwischen Enzym und Ligand eingesetzt wird. Soong et al. konnten erfolgreich zeigen, dass sich das Anwendungsgebiet durchaus erweitern lässt. Sie untersuchten dabei die Transmembrandomäne des FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3) Proteins. Hier wurde ein Hill-Koeffizient von 1,2 in Lipiddoppelschichten bestimmt, was in diesem Fall einer Dimerisierung entspricht. Desweiteren schlossen sie aus ihren Ergebnissen, dass der Hill-Koeffizient ein durchaus geeignetes Mittel darstellt um Helix-Helix Interaktionen in Membranen zu untersuchen [133].

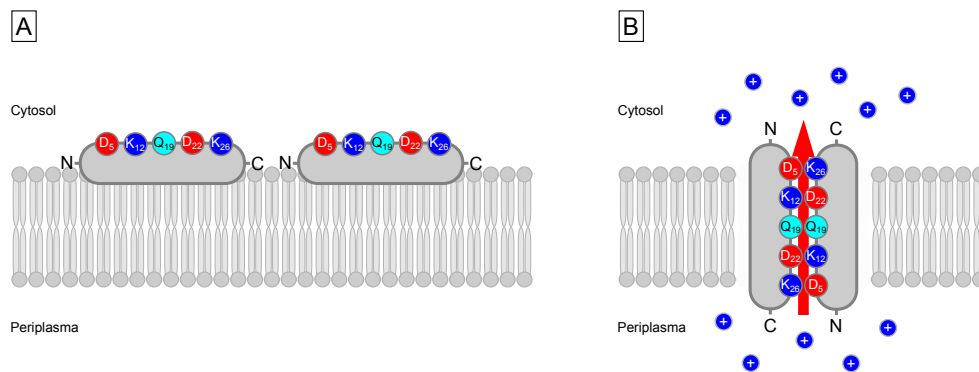


**Abbildung 51** – *Helical Wheel* und *Helical Net* Projektionen von TisB. (A) *Helical Wheel* von TisB. TisB faltet sich in eine amphipathische Helix. (B) *Helical Net* Projektion von TisB. Die geladene und polare Aminosäuren sind entlang eines schmalen Streifens entlang der TisB Helix angeordnet (schwarzer Kasten).

Betrachtet man die *Helical Wheel* Darstellung von TisB in Abbildung 51 so fällt auf, dass TisB sich in eine amphipathische Helix faltet, bei welcher die geladenen Reste über die polare Seite der Helix verteilt sind (Abbildung 51A). Faltet man nun diese Helix auf und betrachtet die *Helical Net* Darstellung (Abbildung 51B), so sind die geladenen Reste und Gln19 nicht über die gesamte Breite der Helix verteilt, sondern bilden einen sehr schmalen, polaren Streifen entlang der Helix. So lässt sich mit dem PCZ-Motiv in TisB und den



erhaltenen experimentellen Ergebnissen ein Mechanismus aufstellen, der die Membrankopplung in Bakterien erklären könnte.

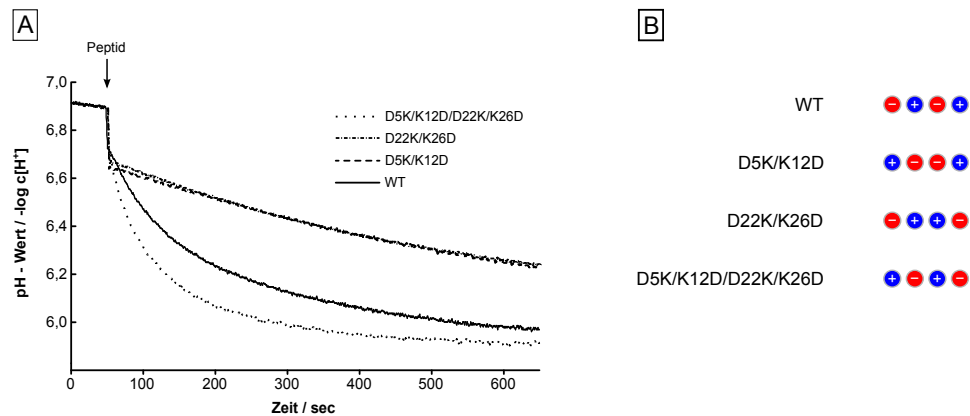


**Abbildung 52** – Postulierter Mechanismus der TisB Membrankopplung. (A) Die amphipatische TisB Helix lagert sich entsprechend ihrer Polarität an die Membran an. Steigt die Konzentration an TisB Molekülen, so findet über das PCZ-Motiv und Gln19 eine Dimerisierung und die Integration in die Membran statt (B). Dies führt zur Entkopplung des H<sup>+</sup>-Gradienten über die Membran und zur Bildung von persistenten Zellen.

Die amphipathische TisB Helix lagert sich entsprechend ihrer Polarität an die Membran an (Abbildung 52). Sobald eine Schwellenkonzentration an TisB Molekülen überschritten ist, findet über den Charge Zipper eine antiparallele Dimerisierung statt. Diese wird über den sehr schmalen Streifen an geladenen Aminosäuren entlang der TisB Helix realisiert. Dieses Dimer kann dann durch Ausbildung von Salzbrücken und die damit verbundene Neutralisation der geladenen Reste in die Membran integrieren (Abbildung 52B). Es entsteht ein schmaler polarer Pfad entlang der Leiter aus Salzbrücken, welcher nach Außen durch die großen, unpolaren Reste gegenüber der hydrophoben Membrenumgebung abgeschirmt wird. Über diesen wahrscheinlich hydratisierten Pfad können nun möglicherweise Protonen oder OH<sup>-</sup>-Ionen mittels eines Grotthuß Mechanismus entlang ihres Konzentrationsgradienten ins Zellinnere gelangen [45]. Das Dimer könnte dabei zusätzlich über eine Wasserstoffbrücke zwischen Gln19 der beiden TisB Monomere stabilisiert werden. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass Wasserstoffbrücken zwischen polaren Resten innerhalb einer Transmembranhelix zur Stabilisierung eines Dimers beitragen können. Allerdings nur in relativ geringem Umfang [134].

Das Auftreten von geladenen Resten in der unpolaren Lipiddoppelschicht ist ein energetisch sehr aufwändiger und damit unwahrscheinlicher Zustand. Trotzdem sind solche strukturel-

len Anordnungen durchaus möglich vor allem wenn die freien Ladungen durch Salzbrücken kompensiert werden. Die Fähigkeit zur Dimerisierung von  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen, die geladene Reste tragen, wurde von Shigematsu *et al.* überprüft [135]. Hierbei verwendeten die Autoren das  $\alpha$ -helikale Modellpeptid P<sub>24</sub>. Zusätzlich wurden in P<sub>24</sub> fluoreszente Gruppen eingebracht, über welche eine Dimerisierung verfolgt werden konnte. Es stellte sich heraus, dass die Einbringung von geladenen Resten in die unpolare Transmembransequenz eine Dimerisierung verstärken kann.



**Abbildung 53** – Direkter Nachweis der biologischen Relevanz des Charge Zippers in TisB. (A) Protonenleakageassays der Ladungsmutanten von TisB im Vergleich zum Wildtyp. (B) Ladungsabfolge der TisB Mutanten. Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Benjamin Zimpfer (KIT) zur Verfügung gestellt.

Vor kurzem wurde der direkte Beweis erbracht, dass das HCZ-Motiv in TisB wichtig für die Funktion ist. Hierbei wurden Ladungsaustauschmutanten von TisB synthetisiert und mittels Protonenleakageassays untersucht (Abbildung 53A). Es konnte gezeigt werden, dass bei identischer Nettoladung im Vergleich zum Wildtyp, allerdings mit einer Ladungsabfolge die kein HCZ-Motiv zulässt (Abbildung 53B), die Protonenleakageaktivität drastisch erniedrigt wird (Benjamin Zimpfer, KIT, unveröffentlichte Ergebnisse). Tauscht man jedoch alle Ladungen in TisB gegen ihre jeweils komplementären Ladungen aus, so entsteht ebenfalls ein HCZ-Motiv. Diese Mutante zeigte wieder eine vergleichbare Protonenleakageaktivität wie der Wildtyp. Durch ein realisiertes Charge Zipper Motiv lässt sich somit die membranenkoppelnde Aktivität von TisB erklären.

Membranentkoppler sind in der Natur weit verbreitet. Vor allem die UCP (uncoupling proteins) Proteinfamilie spielt dabei eine tragende Rolle. UCPs kommen in der inneren mitochondrialen Membran vor und regulieren dort die oxidative Phosphorylierung [136].

Obwohl viel über die Regulation dieser Entkoppler bekannt ist, gibt es noch kein allgemein akzeptiertes Modell des genauen Entkopplungsmechanismus oder gar deren Struktur. Zur Debatte stehen das Flip-Flop Modell, das Kofaktor-Modell und das funktionale Kompetitionsmodell [137]. Im Kofaktor-Modell dienen Fettsäureanionen als Aktivator des Protonentransports in die mitochondrielle Matrix. Das funktionale Kompetitionsmodell beschreibt den Transport von Protonen über eine allosterische Wechselwirkung der Fettsäureanionen mit den UCPs. Hierdurch wird eine negative Regulation durch Nukleotide überwunden und der Kanal damit aktiviert. Beim Flip-Flop-Modell werden konjugierte Fettsäuren in ihrer anionischen Form exportiert. Diese werden daraufhin protoniert und das anschließend neutrale Molekül kann via Flip-Flop auf die Matrixseite gelangen, von wo das Proton wieder abdissoziieren kann.

Eine solche Art und Weise des indirekten Protonentransports ist durchaus auch für TisB denkbar. Neuere MD Simulationen liefern Hinweise darauf, dass nicht Protonen durch den TisB Kanal dringen, sondern  $\text{OH}^-$ -Ionen. Dabei wurde die PMF (Potential of Mean Force) berechnet. Diese beschreibt, wie sich der Energiezustand eines Systems entlang eines Reaktionskoordinatenparameters verändert [138]. Dabei wurden verschiedene Moleküle wie Wasser oder  $\text{OH}^-$ -Ionen und auch Protonen mit Hilfe eines Kraftfeldes durch die TisB Dimerkontaktfläche gezogen. Hierbei zeigte sich, dass die Wahrscheinlichkeit einer  $\text{OH}^-$  Wanderung durch den Kanal höher ist, als die für Protonen (Thomas Steinbrecher, KIT, unveröffentlichte Ergebnisse).

Dies unterstützt die Tatsache, dass Gurnev et al. zeigen konnten, dass der TisB Kanal selektiv Anionen passieren lässt [139]. Die Autoren schlossen weiterhin aus ihren Experimenten an planaren Lipiddoppelschichten, an welche ein Potential angelegt wurde, dass die TisB Pore zum einen sehr klein sein muss und zum anderen es sehr wahrscheinlich ist, dass antiparallele TisB Moleküle an der Kanalbildung beteiligt sind.

Weitere Experimente zum Nachweis eines antiparallelen Dimers könnten zum einen mittels Fluoreszenzexperimenten durchgeführt werden. Hierbei würden fluoreszente Moleküle an N- und oder C-Terminus synthetisch angebracht und mittels FRET Messungen in Lipidvesikeln untersucht werden. Alternativ bieten sich verschiedene NMR-Experimente an. So beispielsweise REDOR Experimente, um die Abstände zwischen den am Charge Zipper beteiligten Aminosäuren zu bestimmen [140].

TisB stellt damit den bisher kleinsten bekanntesten Ionen-Kanal dar und repräsentiert neben TatA<sub>d</sub> ein weiteres Beispiel zur biologischen Relevanz von Charge Zippeln.

---

## 5 Literatur

- [1] Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181(4096)**:223–230.
- [2] Chothia, C., Levitt, M., Richardson, D. (1977) Structure of proteins: packing of alpha-helices and pleated sheets. *Proc Natl Acad Sci*, **74(10)**:4130–4134.
- [3] Perutz, M.F., Rossmann, M., Cullis, A.F., Muirhead, H., Will, G. (1960) Structure of hemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å. resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, **185**:416–422.
- [4] Esposti, M.D., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T., Meyer, A. (1993) Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *BBA-Bioenergetics*, **1143(3)**:243–271.
- [5] Gosline, J.M., DeMont, M.E., Denny, M.W. (1986) The structure and properties of spider silk. *Endeavour*, **10(1)**:37–43.
- [6] Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, **240(4860)**:1759–1764.
- [7] Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2006) *Biochemistry, International Edition*. WH Freeman & Co. New York.
- [8] O'Shea, E.K., Klemm, J.D., Kim, P.S., Alber, T. (1991) X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science*, **254(5031)**:539–544.
- [9] Gronenborn, A.M., Filpula, D.R., Essig, N.Z., Achari, A., Whitlow, M., Wingfield, P.T., Clore, G. (1991) A novel, highly stable fold of the immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G. *Science*, **253(5020)**:657–661.
- [10] Björck, L., Kronvall, G. (1984) Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol*, **133(2)**:969–974.
- [11] Li, E., Wimley, W.C., Hristova, K. (2012) Transmembrane helix dimerization: Beyond the search for sequence motifs. *BBA-Biomembranes*, **1818(2)**:183–193.
- [12] Russ, W.P., Engelman, D.M. (2000) The GXXXG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol*, **296(3)**:911–919.
- [13] Furthmayr, H., Marchesi, V. (1976) Subunit structure of human erythrocyte glycophorin A. *Biochemistry (Mosc)*, **15(5)**:1137–1144.
- [14] Treutlein, H.R., Lemmon, M.A., Engelman, D.M., Brunger, A. (1992) The glycophorin A transmembrane domain dimer: Sequence-specific propensity for a right-handed supercoil of helices. *Biochemistry (Mosc)*, **31(51)**:12726–12732.

- 
- [15] MacKenzie, K.R., Prestegard, J.H., Engelman, D.M. (1997) A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science*, **276(5309)**:131–133.
- [16] Lemmon, M.A., Treutlein, H.R., Adams, P.D., Brünger, A.T., Engelman, D.M. (1994) A dimerization motif for transmembrane  $\alpha$ -helices. *Nat Struct Biol*, **1(3)**:157–163.
- [17] Sal-Man, N., Gerber, D., Shai, Y. (2004) The composition rather than position of polar residues (QXXS) drives aspartate receptor transmembrane domain dimerization *in vivo*. *Biochemistry (Mosc)*, **43(8)**:2309–2313.
- [18] 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(51)**:51950–51956.
- [19] Dunten, R.L., Sahin-Toth, M., Kaback, H.R. (1993) Role of the charge pair aspartic acid-237-lysine-358 in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc)*, **32(12)**:3139–3145.
- [20] Sahin-Toth, M., Dunten, R.L., Gonzalez, A., Kaback, H.R. (1992) Functional interactions between putative intramembrane charged residues in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*, **89(21)**:10547–10551.
- [21] Lee, J.I., Hwang, P.P., Hansen, C., Wilson, T.H. (1992) Possible salt bridges between transmembrane alpha-helices of the lactose carrier of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **267(29)**:20758–20764.
- [22] Koebnik, R., Locher, K.P., Van Gelder, P. (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol*, **37(2)**:239–253.
- [23] Cowan, S., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Paupit, R., Jansonius, J., Rosenbusch, J. (1992) Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. *Nature*, **358(6389)**:727–733.
- [24] Palmer, T., Berks, B.C. (2012) The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol*, **10(7)**:483–496.
- [25] Fröbel, J., Rose, P., Müller, M. (2012) Twin-arginine-dependent translocation of folded proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **367(1592)**:1029–1046.
- [26] Walther, T.H., Grage, S.L., Roth, N., Ulrich, A.S. (2010) Membrane alignment of the pore-forming component TatAd of the twin-arginine translocase from *Bacillus subtilis* resolved by solid-state NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc*, **132(45)**:15945–15956.
- [27] Hu, Y., Zhao, E., Li, H., Xia, B., Jin, C. (2010) Solution NMR structure of the TatA component of the twin-arginine protein transport system from gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *J Am Chem Soc*, **132(45)**:15942–15944.

- 
- [28] Lange, C., Müller, S.D., Walther, T.H., Bürck, J., Ulrich, A.S. (2007) Structure analysis of the protein translocating channel TatA in membranes using a multi-construct approach. *BBA-Biomembranes*, **1768(10)**:2627–2634.
- [29] Chan, C.S., Haney, E.F., Vogel, H.J., Turner, R.J. (2011) Towards understanding the Tat translocation mechanism through structural and biophysical studies of the amphipathic region of TatA from *Escherichia coli*. *BBA-Biomembranes*, **1808(9)**:2289–2296.
- [30] Walther, T.H., Gottselig, 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(1-2)**:316–326.
- [31] Sambrook, J., Russell, D.W., Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor New York.
- [32] Schägger, H., von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166(2)**:368–379.
- [33] Apell, H.J., Marcus, M.M., Anner, B.M., Oetliker, H., Läuger, P. (1985) Optical study of active ion transport in lipid vesicles containing reconstituted Na,K-ATPase. *J Membr Biol*, **85(1)**:49–63.
- [34] Whitmore, L., Wallace, B.A. (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, **89(5)**:392–400.
- [35] Whitmore, L., Wallace, B.A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res*, **32(Web Server issue)**:W668–W673.
- [36] Lobley, A., Whitmore, L., Wallace, B.A. (2002) DICHROWEB: an interactive web-site for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics*, **18(1)**:211–212.
- [37] Provencher, S.W., Glöckner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry (Mosc)*, **20(1)**:33–37.
- [38] van Stokkum, I.H., Spoelder, H.J., Bloemendal, M., van Grondelle, R., Groen, F.C. (1990) Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Anal Biochem*, **191(1)**:110–118.

- 
- [39] Abdul-Gader, A., Miles, A.J., Wallace, B.A. (2011) A reference dataset for the analyses of membrane protein secondary structures and transmembrane residues using circular dichroism spectroscopy. *Bioinformatics*, **27(12)**:1630–1636.
- [40] Levitt, M., Suter, D., Ernst, R. (1986) Spin dynamics and thermodynamics in solid-state NMR cross polarization. *The Journal of chemical physics*, **84**:4243.
- [41] Sinha, N., Grant, C.V., Wu, C.H., De Angelis, A.A., Howell, S.C., Opella, S.J. (2005) SPINAL modulated decoupling in high field double- and triple-resonance solid-state NMR experiments on stationary samples. *J Magn Reson*, **177(2)**:197–202.
- [42] Apweiler, R., Martin, M.J., O’Donovan, C., Magrane, M., Alam-Faruque, Y., Antunes, R., Barrell, D., Bely, B., Bingley, M., Binns, D., et al. (2010) The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Res*, **38(Database issue)**:D142–8.
- [43] Wang, G., Li, X., Wang, Z. (2009) APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res*, **37(suppl 1)**:D933–D937.
- [44] Unoson, C., Wagner, E.G.H. (2008) A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **70(1)**:258–270.
- [45] Steinbrecher, T., Prock, S., Reichert, J., Wadhvani, P., Zimpfer, B., Bürck, J., Berditsch, M., Elstner, M., Ulrich, A.S. (2012) Peptide-lipid interactions of the stress-response peptide TisB that induces bacterial persistence. *Biophys J*, **103(7)**:1460–1469.
- [46] White, S.H., Wimley, W.C. (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **28(1)**:319–365.
- [47] Wimley, W.C., White, S.H. (1996) Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol*, **3(10)**:842–848.
- [48] Hessa, T., Meindl-Beinker, N.M., Bernsel, A., Kim, H., Sato, Y., Lerch-Bader, M., Nilsson, I., White, S.H., von Heijne, G. (2007) Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon. *Nature*, **450(7172)**:1026–1030.
- [49] Wimley, W.C., Gawrisch, K., Creamer, T.P., White, S.H. (1996) Direct measurement of salt-bridge solvation energies using a peptide model system: implications for protein stability. *Proc Natl Acad Sci*, **93(7)**:2985–2990.
- [50] Lew, S., Ren, J., London, E. (2000) The effects of polar and/or ionizable residues in the core and flanking regions of hydrophobic helices on transmembrane conformation and oligomerization. *Biochemistry (Mosc)*, **39(32)**:9632–9640.



- 
- [51] Herrmann, J.R., Fuchs, A., Panitz, J.C., Eckert, T., Unterreitmeier, S., Frishman, D., Langosch, D. (2010) Ionic interactions promote transmembrane helix-helix association depending on sequence context. *J Mol Biol*, **396(2)**:452–461.
- [52] Phillip, Y., Schreiber, G. (2013) Formation of protein complexes in crowded environments—from *in vitro* to *in vivo*. *FEBS Lett*, **587(8)**:1046–1052.
- [53] MacKenzie, K.R. (2006) Folding and stability of  $\alpha$ -helical integral membrane proteins. *Chem Rev*, **106(5)**:1931–1977.
- [54] Wallin, E., von Heijne, G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci*, **7(4)**:1029–1038.
- [55] Brogden, K.A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, **3(3)**:238–250.
- [56] Göransson, U., Burman, R., Gunasekera, S., Strömstedt, A.A., Rosengren, K.J. (2012) Circular proteins from plants and fungi. *J Biol Chem*, **287(32)**:27001–27006.
- [57] Arkin, I.T., Brunger, A.T. (1998) Statistical analysis of predicted transmembrane alpha-helices. *Biochim Biophys Acta*, **1429(1)**:113–128.
- [58] Eitner, K., Koch, U., Gaweda, T., Marciniak, J. (2010) Statistical distribution of amino acid sequences: a proof of Darwinian evolution. *Bioinformatics*, **26(23)**:2933–2935.
- [59] Kumar, S., Nussinov, R. (1999) Salt bridge stability in monomeric proteins. *J Mol Biol*, **293(5)**:1241–1255.
- [60] Karshikoff, A., Ladenstein, R. (2001) Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a „traffic rule“ for hot roads. *Trends Biochem Sci*, **26(9)**:550–557.
- [61] Kumar, S., Nussinov, R. (2002) Close-range electrostatic interactions in proteins. *Chembiochem*, **3(7)**:604–617.
- [62] Collett, M.S., Larson, R., Belzer, S.K., Retzel, E. (1988) Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology*, **165(1)**:200–208.
- [63] Rümnapf, T., Unger, G., Strauss, J.H., Thiel, H.J. (1993) Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol*, **67(6)**:3288–3294.
- [64] Rümnapf, T., Stark, R., Heimann, M., Thiel, H.J. (1998) N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J Virol*, **72(3)**:2544–2547.

- 
- [65] Hulst, M.M., Moormann, R.J. (2001) E<sup>rns</sup> protein of pestiviruses. *Methods Enzymol*, **342**:431–440.
- [66] Auclair, S.M., Bhanu, M.K., Kendall, D.A. (2012) Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci*, **21**(1):13–25.
- [67] Lauring, A.S., Frydman, J., Andino, R. (2013) The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nat Rev Microbiol*, **11**(5):327–336.
- [68] Burrack, S., Aberle, D., Bürck, J., Ulrich, A.S., Meyers, G. (2012) A new type of intracellular retention signal identified in a pestivirus structural glycoprotein. *FASEB J*, **26**(8):3292–3305.
- [69] Tews, B.A., Meyers, G. (2007) The pestivirus glycoprotein E<sup>rns</sup> is anchored in plane in the membrane via an amphipathic helix. *J Biol Chem*, **282**(45):32730–32741.
- [70] Hulst, M.M., Moormann, R.J. (1997) Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E<sup>rns</sup> and E2 of classical swine fever virus: E<sup>rns</sup> and E2 interact with different receptors. *J Gen Virol*, **78** ( Pt 11):2779–2787.
- [71] Bintintan, I., Meyers, G. (2010) A new type of signal peptidase cleavage site identified in an RNA virus polyprotein. *J Biol Chem*, **285**(12):8572–8584.
- [72] Yang, L., Johansson, J., Ridsdale, R., Willander, H., Fitzen, M., Akinbi, H.T., Weaver, T.E. (2010) Surfactant protein B propeptide contains a saposin-like protein domain with antimicrobial activity at low pH. *J Immunol*, **184**(2):975–983.
- [73] Verdon, J., Berjeaud, J.M., Lacombe, C., Héchard, Y. (2008) Characterization of anti- Legionella activity of Warnericin RK and Delta-Lysin I from *Staphylococcus warneri*. *Peptides*, **29**(6):978–984.
- [74] Schitteck, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G., Garbe, C. (2001) Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol*, **2**(12):1133–1137.
- [75] Stewart, G.D., Skipworth, R.J., Ross, J.A., Fearon, K.C., Baracos, V.E. (2008) The dermcidin gene in cancer: role in cachexia, carcinogenesis and tumour cell survival. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **11**(3):208–213.
- [76] Rieg, S., Seeber, S., Steffen, H., Humeny, A., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Kimura, A., Garbe, C., Schitteck, B. (2006) Generation of multiple stable dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of different body sites. *J Invest Dermatol*, **126**(2):354–365.

- [77] Rieg, S., Steffen, H., Seeber, S., Humeny, A., Kalbacher, H., Dietz, K., Garbe, C., Schitteck, B. (2005) Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin *in vivo*. *J Immunol*, **174**(12):8003–8010.
- [78] Baechle, D., Flad, T., Cansier, A., Steffen, H., Schitteck, B., Tolson, J., Herrmann, T., Dihazi, H., Beck, A., Mueller, G.A., Mueller, M., Stevanovic, S., Garbe, C., Mueller, C.A., Kalbacher, H. (2006) Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L. *J Biol Chem*, **281**(9):5406–5415.
- [79] Lai, Y.P., Peng, Y.F., Zuo, Y., Li, J., Huang, J., Wang, L.F., Wu, Z.R. (2005) Functional and structural characterization of recombinant Dermcidin-1L, a human antimicrobial peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, **328**(1):243–250.
- [80] Cipáková, I., Gasperík, J., Hostinová, E. (2006) Expression and purification of human antimicrobial peptide, dermcidin, in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, **45**(2):269–274.
- [81] Steffen, H., Rieg, S., Wiedemann, I., Kalbacher, H., Deeg, M., Sahl, H.G., Peschel, A., Götz, F., Garbe, C., Schitteck, B. (2006) Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**(8):2608–2620.
- [82] Senyürek, I., Döring, G., Kalbacher, H., Deeg, M., Peschel, A., Wolz, C., Schitteck, B. (2009) Resistance to dermcidin-derived peptides is independent of bacterial protease activity. *Int J Antimicrob Agents*, **34**(1):86–90.
- [83] Li, M., Rigby, K., Lai, Y., Nair, V., Peschel, A., Schitteck, B., Otto, M. (2009) *Staphylococcus aureus* mutant screen reveals interaction of the human antimicrobial peptide Dermcidin with membrane phospholipids. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**(10):4200–4210.
- [84] Senyürek, I., Paulmann, M., Sinnberg, T., Kalbacher, H., Deeg, M., Gutschmann, T., Hermes, M., Kohler, T., Götz, F., Wolz, C., Peschel, A., Schitteck, B. (2009) Dermcidin-derived peptides show a different mode of action than the cathelicidin LL-37 against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**(6):2499–2509.
- [85] Vuong, C., Voyich, J.M., Fischer, E.R., Braughton, K.R., Whitney, A.R., DeLeo, F.R., Otto, M. (2004) Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol*, **6**(3):269–275.
- [86] Schitteck, B. (2012) The multiple facets of dermcidin in cell survival and host defense. *J Innate Immun*, **4**(4):349–360.

- 
- [87] Jung, H.H., Yang, S.T., Sim, J.Y., Lee, S., Lee, J.Y., Kim, H.H., Shin, S.Y., Kim, J.I. (2010) Analysis of the solution structure of the human antibiotic peptide dermcidin and its interaction with phospholipid vesicles. *BMB Rep*, **43(5)**:362–368.
- [88] Paulmann, M., Arnold, T., Linke, D., Özdirekcan, S., Kopp, A., Gutschmann, T., Kalbacher, H., Wanke, I., Schuenemann, V.J., Habeck, M., Bürek, J., Ulrich, A.S., Schitteck, B. (2012) Structure-activity analysis of the dermcidin-derived peptide DCD-1L, an anionic antimicrobial peptide present in human sweat. *J Biol Chem*, **287(11)**:8434–8443.
- [89] Song, C., Weichbrodt, C., Salnikov, E.S., Dynowski, M., Forsberg, B.O., Bechinger, B., Steinem, C., de Groot, B.L., Zachariae, U., Zeth, K. (2013) Crystal structure and functional mechanism of a human antimicrobial membrane channel. *Proc Natl Acad Sci*, **110(12)**:4586–4591.
- [90] Terpe, K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, **60(5)**:523–533.
- [91] Sreerama, N., Woody, R.W. (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem*, **209(1)**:32–44.
- [92] Sreerama, N., Venyaminov, S.Y., Woody, R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Anal Biochem*, **287(2)**:243–251.
- [93] Andrade, M.A., Chacón, P., Merelo, J.J., Morán, F. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng*, **6(4)**:383–390.
- [94] Hong, I., Kim, Y.S., Choi, S.G. (2010) Simple purification of human antimicrobial peptide dermcidin (MDCD-1L) by intein-mediated expression in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, **20(2)**:350–355.
- [95] Zhou, P., Lugovskoy, A.A., Wagner, G. (2001) A solubility-enhancement tag (SET) for NMR studies of poorly behaving proteins. *J Biomol NMR*, **20(1)**:11–14.
- [96] Huth, J.R., Bewley, C.A., Jackson, B.M., Hinnebusch, A.G., Clore, G.M., Gronenborn, A.M. (1997) Design of an expression system for detecting folded protein domains and mapping macromolecular interactions by NMR. *Protein Sci*, **6(11)**:2359–2364.
- [97] Murakami, M., Lopez-Garcia, B., Braff, M., Dorschner, R.A., Gallo, R.L. (2004) Postsecretory processing generates multiple Cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J Immunol*, **172(5)**:3070–3077.

- 
- [98] Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., Mann, M. (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, **325(5942)**:834–840.
- [99] Niyonsaba, F., Suzuki, A., Ushio, H., Nagaoka, I., Ogawa, H., Okumura, K. (2009) The human antimicrobial peptide dermcidin activates normal human keratinocytes. *Br J Dermatol*, **160(2)**:243–249.
- [100] Clark, D.P., Dunlap, P., Madigan, M., Martinko, J. (2009) *Brock Biology of Microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Pearson.
- [101] Grage, S.L., Afonin, S., Ulrich, A.S. (2010) Dynamic transitions of membrane-active peptides. In *Antimicrobial Peptides*, 183–207. Springer.
- [102] Tremouilhac, P., Strandberg, E., Wadhvani, P., Ulrich, A.S. (2006) Conditions affecting the re-alignment of the antimicrobial peptide PGLa in membranes as monitored by solid state 2H-NMR. *Biochim Biophys Acta*, **1758(9)**:1330–1342.
- [103] Afonin, S., Grage, S.L., Ieronimo, M., Wadhvani, P., Ulrich, A.S. (2008) Temperature-dependent transmembrane insertion of the amphiphilic peptide PGLa in lipid bilayers observed by solid state 19F NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc*, **130(49)**:16512–16514.
- [104] Hayes, F. (2003) Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science*, **301(5639)**:1496–1499.
- [105] Yamaguchi, Y., Park, J.H., Inouye, M. (2011) Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Genet*, **45**:61–79.
- [106] Dörr, T., Vulic, M., Lewis, K. (2010) Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol*, **8(2)**:e1000317.
- [107] Vogel, J., Argaman, L., Wagner, E.G.H., Altuvia, S. (2004) The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Curr Biol*, **14(24)**:2271–2276.
- [108] Darfeuille, F., Unoson, C., Vogel, J., Wagner, E.G.H. (2007) An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Mol Cell*, **26(3)**:381–392.
- [109] Weel-Sneve, R., Bjørås, M., Kristiansen, K.I. (2008) Overexpression of the LexA-regulated tisAB RNA in *Escherichia coli* inhibits SOS functions; implications for regulation of the SOS response. *Nucleic Acids Res*, **36(19)**:6249–6259.
- [110] Sharma, C.M., Vogel, J. (2009) Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA. *Curr Opin Microbiol*, **12(5)**:536–546.
- [111] Pirovano, W., Heringa, J. (2010) Protein secondary structure prediction. In *Data Mining Techniques for the Life Sciences*, 327–348. Springer.

- 
- [112] Wu, J., Xie, J. (2010) Hidden Markov model and its applications in motif findings. In *Statistical Methods in Molecular Biology*, 405–416. Springer.
- [113] Rauhut, R. (2012) *Bioinformatik: Sequenz-Struktur-Funktion*. Wiley-Blackwell.
- [114] Prock, S. (2010) NMR-Untersuchungen zur Wechselwirkung von Ubiquitin mit Etp1 und Spc25 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Karlsruhe Institut für Technologie (KIT).
- [115] Pollastri, G., McLysaght, A. (2005) Porter – A new, accurate server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics*, **21(8)**:1719–1720.
- [116] Garnier, J., Gibrat, J.F., Robson, B. (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol*, **266**:540–553.
- [117] Cole, C., Barber, J.D., Barton, G.J. (2008) The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res*, **36(Web Server issue)**:W197–W201.
- [118] Rost, B., Yachdav, G., Liu, J. (2004) The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res*, **32(Web Server issue)**:W321–W326.
- [119] Chou, P.Y., Fasman, G.D. (1974) Prediction of protein conformation. *Biochemistry (Mosc)*, **13(2)**:222–245.
- [120] Hofmann, K., Stoffel, W. (1993) TMbase – A database of membrane spanning proteins segments. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*, **374**:166.
- [121] von Heijne, G. (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol*, **225(2)**:487–494.
- [122] Tusnády, G.E., Simon, I. (1998) Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Biol*, **283(2)**:489–506.
- [123] Sonnhammer, E.L., von Heijne, G., Krogh, A. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, **6**:175–182.
- [124] Miles, A.J., Wallace, B.A. (2006) Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics. *Chem Soc Rev*, **35(1)**:39–51.
- [125] Wallace, B.A. (2009) Protein characterisation by synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. *Q Rev Biophys*, **42(4)**:317–370.
- [126] Wu, Y., Huang, H.W., Olah, G.A. (1990) Method of oriented circular dichroism. *Biophys J*, **57(4)**:797–806.

- 
- [127] Bürck, J., Roth, S., Wadhvani, P., Afonin, S., Kanithasen, N., Strandberg, E., Ulrich, A.S. (2008) Conformation and membrane orientation of amphiphilic helical peptides by oriented circular dichroism. *Biophys J*, **95**(8):3872–3881.
- [128] Lewis, K. (2010) Persister cells. *Annu Rev Microbiol*, **64**:357–372.
- [129] Maloy, W.L., Kari, U.P. (1995) Structure–activity studies on Magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*, **37**(2):105–122.
- [130] Wadhvani, P., Strandberg, E., Heidenreich, N., Bürck, J., Fanghänel, S., Ulrich, A.S. (2012) Self-assembly of flexible beta-strands into immobile amyloid-like beta-sheets in membranes as revealed by solid-state  $^{19}\text{F}$  NMR. *J Am Chem Soc*, **134**(15):6512–6515.
- [131] Glaser, R.W., Sachse, C., Dürr, U.H.N., Wadhvani, P., Afonin, S., Strandberg, E., Ulrich, A.S. (2005) Concentration-dependent realignment of the antimicrobial peptide PGLa in lipid membranes observed by solid-state  $^{19}\text{F}$ -NMR. *Biophys J*, **88**(5):3392–3397.
- [132] Song, L., Hobaugh, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., Gouaux, J.E. (1996) Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*, **274**(5294):1859–1866.
- [133] Soong, R., Merzlyakov, M., Hristova, K. (2009) Hill coefficient analysis of transmembrane helix dimerization. *J Membr Biol*, **230**(1):49–55.
- [134] 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**(7199):1266–1270.
- [135] Shigematsu, D., Matsutani, M., Furuya, T., Kiyota, T., Lee, S., Sugihara, G., Yamashita, S. (2002) Roles of peptide-peptide charge interaction and lipid phase separation in helix–helix association in lipid bilayer. *BBA-Biomembranes*, **1564**(1):271–280.
- [136] Jezek, P., Záčková, M., Rozicka, M., Skobisová, E., Jaborek, M. (2004) Mitochondrial uncoupling proteins—facts and fantasies. *Physiol Res*, **53 Suppl 1**:S199–S211.
- [137] Porter, R.K. (2008) Uncoupling protein 1: a short-circuit in the chemiosmotic process. *J Bioenerg Biomembr*, **40**(5):457–461.
- [138] Allen, T.W., Andersen, O.S., Roux, B. (2006) Molecular dynamics - Potential of mean force calculations as a tool for understanding ion permeation and selectivity in narrow channels. *Biophys Chem*, **124**(3):251–267.
- [139] Gurnev, P.A., Ortenberg, R., Dörr, T., Lewis, K., Bezrukov, S.M. (2012) Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers. *FEBS Lett*, **586**(16):2529–2534.

- [140] Hohlweg, W., Kosol, S., Zangger, K. (2012) Determining the orientation and localization of membrane-bound peptides. *Curr Protein Pept Sci*, **13(3)**:267–279.
- [141] Heidenreich, N. (2012) Struktur- und Funktionsuntersuchung des antimikrobiellen Peptids Temporin A und Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln mit alpha-helikalen antimikrobiellen Peptiden. Dissertation, Karlsruhe Institut für Technologie (KIT).



## 6 Anhang

### 6.1 Material

#### Gerätschaften und Verbrauchsmaterial

Die in Tabelle 18 aufgeführten Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien wurden für diese Arbeit verwendet.

**Tabelle 18** – Gerätschaften und Verbrauchsmaterial

Gerätschaft	Verwendung	Hersteller
Äkta Purifier 10	Chromatographiegerät für IMAC und SEC	GE Healthcare
Alufolie	Abdeckung von Gefäßen	Roth
Autoklav VX-95	Autoklavieren von Lösungen und Feststoffen	Systec
Autoklavierband	Indikation von sterilen Bedingungen	3M
Brutschrank Incucell	Inkubationsraum	Medcenter Einrichtungen GmbH
CD-Messküvette Suprasil QS 0,1 cm	Messgefäß für CD-Messungen	Hellma Optik
CD-Spektropolarimeter	Gerät für CD-Spektroskopie	Jasco Industries
Chromatographiesäule HisTrap 5 mL	Nickel-Affinitätschromatographie	GE Healthcare
Chromatographiesäule HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade	Gelfiltrationssäule	GE Healthcare
Einmal-Spritzen Inject 5 mL, 10 mL und 20 mL	Probenaufnahme, Injektion	B. Braun
Einmal-Filter 0,22 µm, steril	Filtern von Proben	Roth
Einmal-Handschuhe latex, nitril	Arbeitssicherheit, steriles Arbeiten	VWR
Elektrophorese Stromversorger E455	Netzteil für die Elektrophoresekammer	Consort
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Agarosegelelektrophorese	PeqLab Biotechnology GmbH
Extruder	Herstellung von LUVs	Avanti Polar Lipids
Falcon Tubes 15 mL und 50 mL	Reaktions- und Lagergefäße	Sarstedt

Tabelle 18 – Gerätschaften und Verbrauchsmaterial (Fortsetzung)

Gerätschaft	Verwendung	Hersteller
Gelgießstand mit Einsätzen	Gelgießstand	PeqLab Bio- technologie GmbH
Halbmikroküvetten 0,1 mL	Messgefäß zur OD-Bestimmung	Sarstedt
Heizblock HB-2	Denaturierung von SDS-PAGE Proben	Wealtec Corp.
MALDI-TOF Massenspektrome- ter autoflexx III smartbeam	Massenbestimmung von Protei- nen	Bruker Dalto- nics
Mikrowelle M1712N	Erhitzen von Gelen	Samsung
Nanodrop ND-1000	Bestimmung von Protein- und DNA-Konzentrationen in Lösung	Labtech Int.
NMR-Spektrometer 500 MHz	NMR-Messungen	Bruker Dalto- nics
Parafilm Laboratory film	Abdichtung von Gefäßen	American Na- tional Can
Pasteur Pipetten	pH-Wert Einstellung	WU Mainz
PCR Cycler PCR Express Hybaid	Durchführung von PCRs	Labsystems GmbH
Petrischalen	Herstellung von Agarplatten	Sarstedt
pH-Messgerät pH 315i	pH-Wert Messung	WTW
Pipetten 10 µL, 100 µL, 1000 µL und 5000 µL	Volumenabmessungen	Eppendorf
Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1000 µL und 5000 µL	Volumenabmessungen	Sarstedt
Pipettenspitzen 5 ml	Volumenabmessungen	Finnpipette
Polycarbonatmembran (100 nm Porengröße	Herstellung von LUVs	Avanti Polar Lipids
Reaktionsgefäße 0,5 mL, 1,5 mL und 2 mL	Allgemeine Reaktionsgefäße	Sarstedt
Reinraumbank Herasafe	Steriles Arbeiten	Heraeus Instru- ments
Reinstwasseranlage	Produktion von entionisierten Wasser	Millipore
SDS-PAGE Elektrophoresekam- mer und Zubehör	SDS-PAGE	BioRad
SDS-PAGE Netzteil POWER PACK 300	SDS-PAGE	BioRad

Tabelle 18 – Gerätschaften und Verbrauchsmaterial (Fortsetzung)

Gerätschaft	Verwendung	Hersteller
Transilluminator TCP-20-M	Visualisierung von ethidiumbromidbehandelter DNA	PeqLab Biotechnologie GmbH
Trockenschrank	Sterilisation von Glasgeräten	Memmert GmbH
Ultraschallgerät BANDELIN Sonoplus GM2200	Zellaufschluss, Lösen von Substanzen	BANDELIN electronic
UV/VIS-Spektrophotometer Smart Spec 3000	OD-Messungen von Zellsuspensionen	BioRad
Videogeldokumentationssystem 215-SI	Auswertung und Dokumentation von SDS-Gelen	PeqLab Biotechnologie GmbH
Vortexer Genie K-550-GE	Lösen und Mischen von Substanzen	Bender und Hobein AG
Waage CP 64	Abwaage von Feststoffen	Sartorius
Waage M2P	Abwaage von Feststoffen	Sartorius
Wägeschälchen	Abwaage von Feststoffen	Roth
Wasserbad 006T	Erwärmen von Lösungen	Lauda
Wasserbad Thermostat A100	Transformation von Bakterien	Lauda
Zentrifuge 5415 C	Zentrifugation	Eppendorf
Zentrifuga Sigma 3-18K	Zentrifugation	Sigma-Aldrich
Zentrifuge RC 5B Plus mit Rotor SS34	Zentrifugation	Sorvall

## Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 19 – Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
1,1',3,3,3',3'-hexamethylindodicarbocyanin Iodid (DiIC)	Invitrogen
8-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonsäure (ANTS)	Invitrogen
8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure (HPTS)	Sigma-Aldrich
Acrylamid (30 %)	AppliChem
Agar	Roth

Tabelle 19 – Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung)

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat <sup>15</sup> N 99 %	Spectra Stable Isotopes
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem
Ampicillin-Natriumsalz	Roth
Bactotrypton	Roth
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Roth
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol	AppliChem
DNA Standard GeneRuler 1 kb	Fermentas
DNA Standard GeneRuler 0,1 kb	Fermentas
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Glucose	Fluka
Glyzerin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Imidazol	Roth
Isopropanol	Fisher Scientific
IPTG	AppliChem
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem
Kanamycin	Roth
Magnesiumsulfat	Merck
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid	Fisher Scientific
Natriumhydroxid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka
p-Xylen-bis-pyridiniumbromid (DPX)	Invitrogen
Salzsäure	AppliChem
Thiamin-Hydrochlorid	AppliChem
Tricin	AppliChem
Tris	Roth
DMPC	Avanti Polar Lipids
DMPG	Avanti Polar Lipids
DOPC	Avanti Polar Lipids
POPC	Avanti Polar Lipids
DOPC	Avanti Polar Lipids

**Tabelle 19** – Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung)

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
DErPC	Avanti Polar Lipids
DNPC	Avanti Polar Lipids
POPG	Avanti Polar Lipids
MES	Roth
Zinksulfat	Roth

### Molekularbiologische Kits

In Tabelle 20 finden sich kommerzielle Kits wieder, welche in dieser Arbeit verwendet wurden. Entgegen der Anleitung zum QIAprep Spin Midiprep Kit, wurde das pegGOLD XChange Plasmid Purification Kit zur finalen Aufreinigung von Plasmid DNA verwendet.

**Tabelle 20** – Kommerzielle molekularbiologische Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
pegGOLD XChange Plasmid Purification Kit	PeqLab Biotechnologie GmbH
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	Quiagen
QIAquick PCR Purification Kit (50)	Quiagen
QIAquick Spin Midiprep Kit (50)	Quiagen
QIAquick Spin Miniprep Kit (50)	Quiagen
Rapid Ligation Kit	Fermentas

### Enzyme und Proteine

In Tabelle 21 finden sich die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Proteine. Die Sequenzen und theoretischen Massen des Expressionskonstruktes zur Aufreinigung von Dermcidin vor und nach der Behandlung mit Enterokinase finden sich in Tabelle 22 wieder.

**Tabelle 21** – Verwendete Enzyme und Proteine

<b>Enzym/Protein</b>	<b>Herkunft</b>
Benzonase (>250 U/ $\mu$ L)	Sigma-Aldrich
Restriktionsenzyme	Fermentas
T4 DNA Ligase	Fermentas
Enterokinase	New England Biolabs

Tabelle 22 – Sequenzen und physikalische Daten der verwendeten Proteine

Name	Sequenz	AS	Masse	$\epsilon$
HisGB1 $\alpha$ - DCD1L	MKHHHHHHPM KQYKLILNGK TLKGETTTEA VDAATAEKVF KQYANDNGVD GEWTYDDATK TFTVTEGSGS GSENLVYFQGA MADYKDDDDK SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDSVL	138	14883,4	12950
His-GB1 $\alpha$	MKHHHHHHPM KQYKLILNGK TLKGETTTEA VDAATAEKVF KQYANDNGVD GEWTYDDATK TFTVTEGSGS GSENLVYFQGA MADYKDDDDK	90	10082,9	12950
DCD1L	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDSVL	48	4818,5	–
<sup>15</sup> N DCD1L	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDSVL	48	4875,5	–
TisB	MNLVDIAILI LKLIVAALQL LDAVLKYLK	29	3222,1	1490
Alamethicin	Ac-UPUAUAQUVU GLUPVUUQQ-Pho1	20	1964,31	–
PGLa	GMASKAGAIA GKIAKVALKA L-NH <sub>2</sub>	21	1984,4	–
Magainin	GIGKFLHSAK KFGKAFVGEI MNS	23	2466,9	–

## Medien und Nährböden

- Lysogeny broth (LB)-Medium
  - 20 g Trypton
  - 5 g Hefeextrakt
  - 5 g NaCl
  - ad 1 L H<sub>2</sub>O bidest.
  - pH 7,5
- LB-Agar
  - 20 g Trypton
  - 5 g Hefeextrakt
  - 5 g NaCl
  - 10 g Agar-Agar
  - ad 1 L H<sub>2</sub>O bidest.
  - pH 7,5

- Müller Hinton (MH)-Medium
  - 23 g MH-Medium
  - ad 1 L H<sub>2</sub>O bidest.
  - pH 7,4
- MH-Agar
  - 23 g MH-Medium
  - 15 g Difco Noble Agar
  - ad 1 L H<sub>2</sub>O bidest.
  - pH 7,4
- M9-Minimalmedium
  - 100 mL M9-Salzlösung (10×)
  - 10 mL Spurenelementlösung (100×)
  - 20 mL 20 % Glucose (w/v)
  - 1 mL MgSO<sub>4</sub> (1 M)
  - 0,3 mL CaCl<sub>2</sub> (1 M)
  - 1 mL Biotin (1 mg mL<sup>-1</sup>)
  - 1 mL Thiamin-HCl (1 mg mL<sup>-1</sup>)
  - ad 1 L H<sub>2</sub>O bidest.
  - pH 7,5
- LB-Agar salzfrei
  - 10 g Trypton
  - 5 g Hefeextrakt
  - ad 1 L H<sub>2</sub>O
  - 15 g Difco Noble Agar
  - pH 7

## Lösungen

- Spurenelemente-Lösung (100×)
  - 5 g EDTA
  - 830 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$
  - 84 mg  $\text{ZnCl}_2$
  - 13 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
  - 10 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
  - 1,6 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
  - ad 1 L  $\text{H}_2\text{O}$
  - pH 7,5
  - steril filtrieren
- KIT-Schweißlösung
  - 4 g NaCl
  - 1 g KCl
  - 276 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
  - 17 mg  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
  - 155 mg  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
  - 96 mg  $\text{Na}_2\text{SO}_4$
  - 7,5 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_3$
  - 525 mg  $\text{NH}_4\text{Cl}$
  - 2,25 g L-(+)-Milchsäure
  - 170 mg Glucose
  - 300 mg Harnstoff
  - 520 mg L-Serin
  - 270 mg L-Alanin
  - 230 mg L-Glycin
  - 210 mg L-Citrullin
  - 160 mg L-Histidin
  - 220 mg Glycerol Trioleat
  - 40 mg Tween 80
- $\text{CaCl}_2$  (1 M)
  - 11 g  $\text{CaCl}_2$
  - ad 100 mL  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.
  - steril filtrieren
- $\text{MgSO}_4$  (1 M)
  - 12 g  $\text{MgSO}_4$
  - ad 100 mL  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.
  - steril filtrieren



- Thiamin-HCl ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ )
  - 25 mg Thiamin-HCl
  - ad 25 mL  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.
  - steril filtrieren
- Glucose (20 % (w/v))
  - 10 g Glucose
  - ad 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.
  - steril filtrieren
- Ampicillin ( $1000\times$ ,  $75 \text{ mg mL}^{-1}$ )
  - 750 mg Ampicillin-Natriumsalz
  - ad 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.
  - Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$
- Kanamycin ( $1000\times$ ,  $50 \text{ mg mL}^{-1}$ )
  - 500 mg Kanamycin
  - ad 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.
  - Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$
- IPTG-Lösung (1 M)
  - 2,38 g IPTG
  - ad 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.
  - Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$
- Ethanol-Lösung 20 % (v/v)
  - 200 mL Ethanol, vergällt
  - ad 1 L  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

### Puffer

- TAE-Puffer ( $50\times$ )
  - 242 g Tris-Cl
  - 57,1 mL Essigsäure
  - 100 mL 0,5 M EDTA-Lösung
  - ad 1 L  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.
- Ethidiumbromid-Lösung
  - 10 mg Ethidiumbromid
  - ad 1 L  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

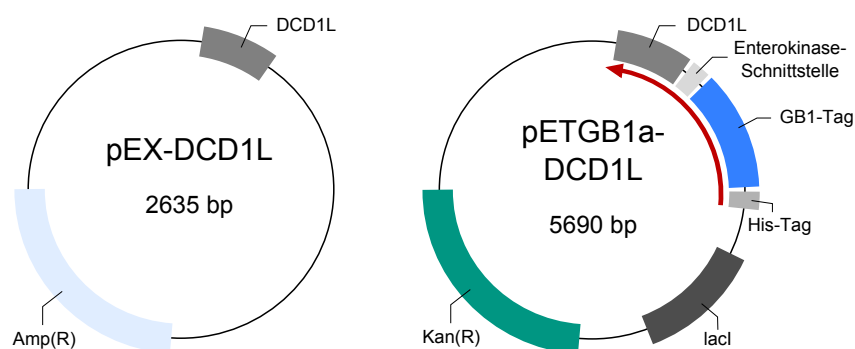
- Anodenpuffer
  - 121,1 g Tris-Cl
  - ad 5 L H<sub>2</sub>O bidest.
  - pH 8,9
- Kathodenpuffer
  - 12,1 g Tris-Cl
  - 17,9 g Tricin
  - 1 g SDS
  - ad 1 L H<sub>2</sub>O bidest.
- Sammelgelpuffer
  - 6,05 g Tris-Cl
  - ad 100 mL H<sub>2</sub>O bidest.
  - pH 6,8 mit HCl (1 M)
  - steril filtrieren
  - 0,4 g SDS zugeben
- Trenngelpuffer
  - 182 g Tris-Cl
  - ad 5 L H<sub>2</sub>O bidest.
  - pH 8,45 mit HCl (1 M)
  - steril filtrieren
  - 1,5 g SDS zugeben
- SDS-Probenpuffer (2×, reduzierend)
  - 1,75 mL 1 M Tris-Cl pH 6,8
  - 1,5 mL Glyzerin
  - 5 mL SDS 10 % (w/v)
  - 0,24 g DTT
  - ad 10 mL H<sub>2</sub>O bidest.
  - eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau
- Ammoniumpersulfat-Lösung (10 % (w/v))
  - 100 µg Ammoniumpersulfat
  - ad 1 mL H<sub>2</sub>O bidest.
- Fixierlösung
  - 500 mL Ethanol, vergällt
  - 100 mL Essigsäure
  - ad 1 L H<sub>2</sub>O bidest.
- Färbelösung
  - 250 mg Coomassie Brilliant Blue R250
  - 50 mL Essigsäure
  - 450 mL Ethanol, vergällt
  - ad 1 L H<sub>2</sub>O bidest.

- Entfärbelösung
  - 250 mL Ethanol, vergällt
  - 50 mL Essigsäure
  - ad 1 L H<sub>2</sub>O bidest.
- Lösung zum Lagern von Polyacrylamidgelen
  - 50 mL Essigsäure
  - ad 1 L H<sub>2</sub>O bidest.
- Lysispuffer
  - 20 mM Tris
  - 10 mM Imidazol
  - 150 mM NaCl
  - pH 8,0
- Waschpuffer
  - 20 mM Tris
  - 10 mM Imidazol
  - 1 M NaCl
  - pH 8,0
- Elutionspuffer
  - 20 mM Tris
  - 300 mM Imidazol
  - 150 mM NaCl
  - pH 8,0
- Enterokinase-Puffer
  - 20 mM Tris
  - 50 mM NaCl
  - 2 mM CaCl<sub>2</sub>
  - pH 8,0
- Phosphatpuffer
  - 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - pH-Werte 6 bis 8
- ANTS/DPX-Lösung 1, 2×
  - 15 mM ANTS
  - 54 mM DPX
  - 32 mM NaCl
  - in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,4

- Natriumpuffer
  - 72,5 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - 15 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - 1 mM EDTA
  - 10 mM HEPES
  - pH 7,5 mit 1 M NaOH, Na<sup>+</sup> final: 150 mM
- Kaliumpuffer
  - 72,5 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - 15 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - 1 mM EDTA
  - 10 mM HEPES
  - pH 7,4 mit 1 M KOH, K<sup>+</sup> final: 150 mM
- MES Puffer
  - 20 mM MES
  - 0 mM HPTS
  - 1 mM EDTA
  - pH 6,5 mit 0,1 M KOH
- HEPES Puffer
  - 10 mM HEPES
  - 1 mM EDTA
  - pH 7,5 mit 0,1 M KOH

### Plasmide und Gensynthese

Zur Herstellung von rekombinantem Dermcidin wurden in dieser Arbeit zwei Plasmide verwendet. pEX-DCD1L diente als Trägerplasmid für das synthetisierte Dermcidin Gen, während pETGB1 $\alpha$  als Expressionsplasmid verwendet wurde. Abbildung 54 zeigt die Plasmidkarte von pEX-DCD1L und pETGB1 $\alpha$ . Die Gensynthese wurde von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg durchgeführt.



**Abbildung 54** – Verwendete Plasmide zur Herstellung von rekombinantem Dermcidin

## DNA Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 26 aufgeführten DNA Oligonukleotide verwendet.

**Tabelle 26** – Verwendete DNA Oligonukleotide

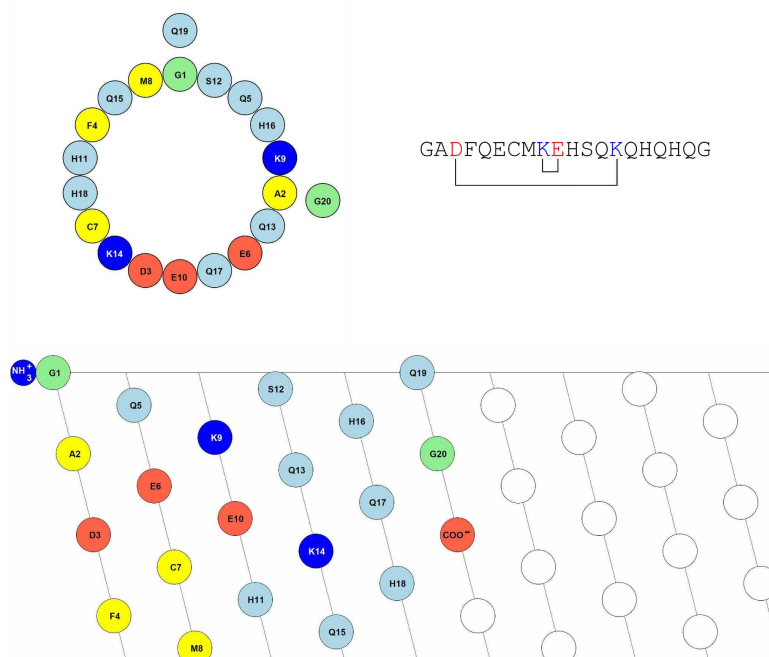
Bezeichnung	Sequenz [5'-3']	Verwendung
DCD1L fwd	AAG CCC ATG GCA GAC TAT AAG GAC GAT	DCD1L Primer in downstream-Richtung
DCD1L rev	AGG TGG ATC CTT ACA GCA CCG AAT C	DCD1L Primer in upstream-Richtung

## Bakterienstämme

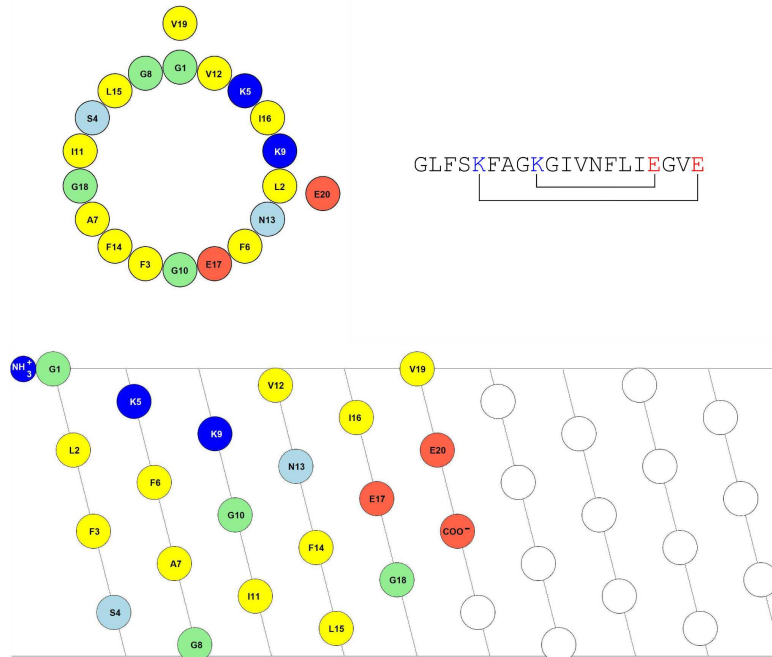
Zu Klonierungs- und Plasmidamplifikationszwecken wurden *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen verwendet, während zur Proteinexpression *E. coli* BL21(DE3) Zellen verwendet wurden.

## 6.2 Helical Wheel und Helical Net Darstellungen (m=2)

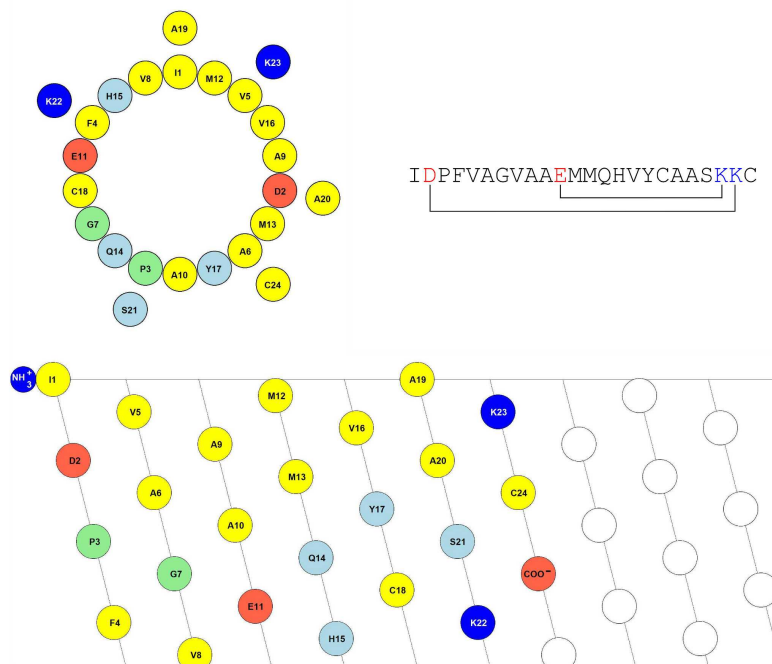
### $\alpha$ -Basrubin



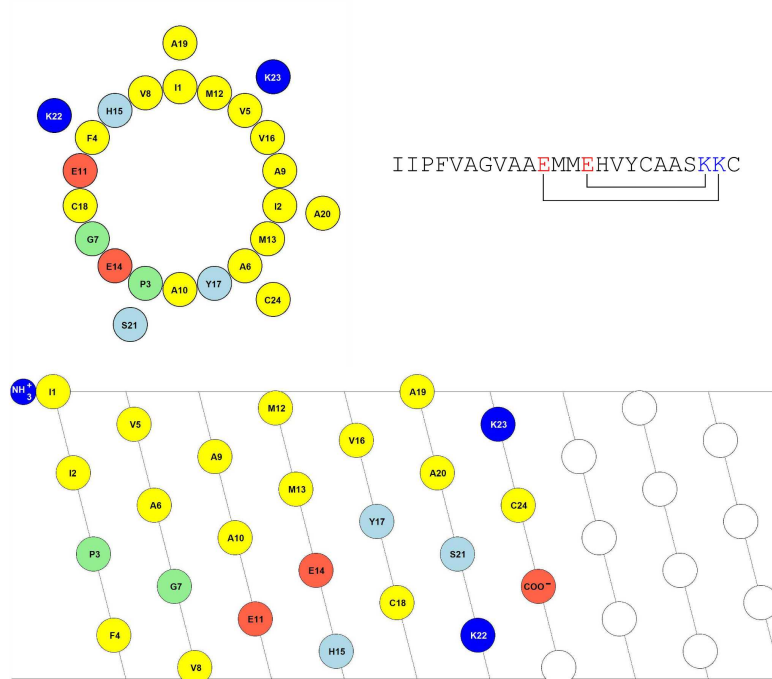
## Andersonin-X1



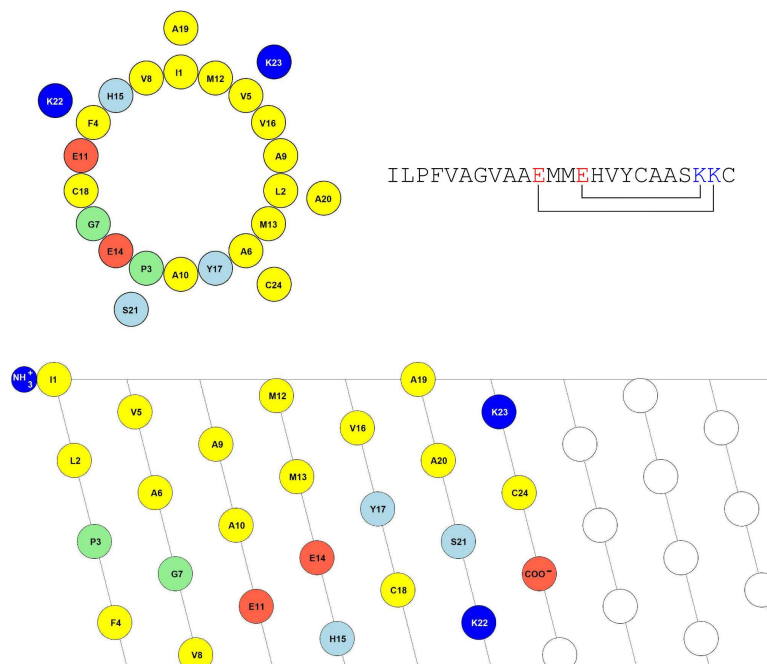
## Brevinin-1-OR3



## Brevinin-1-OR6



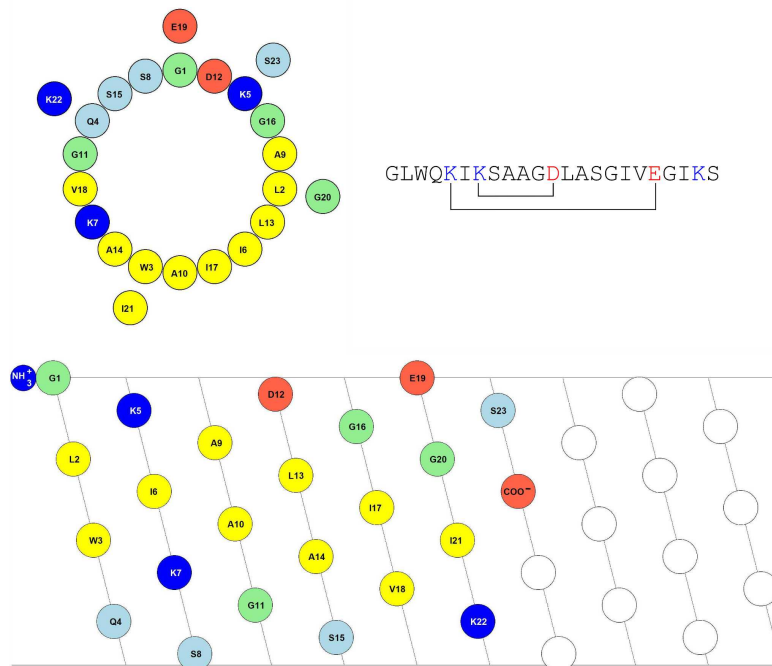
## Brevinin-1-OR8



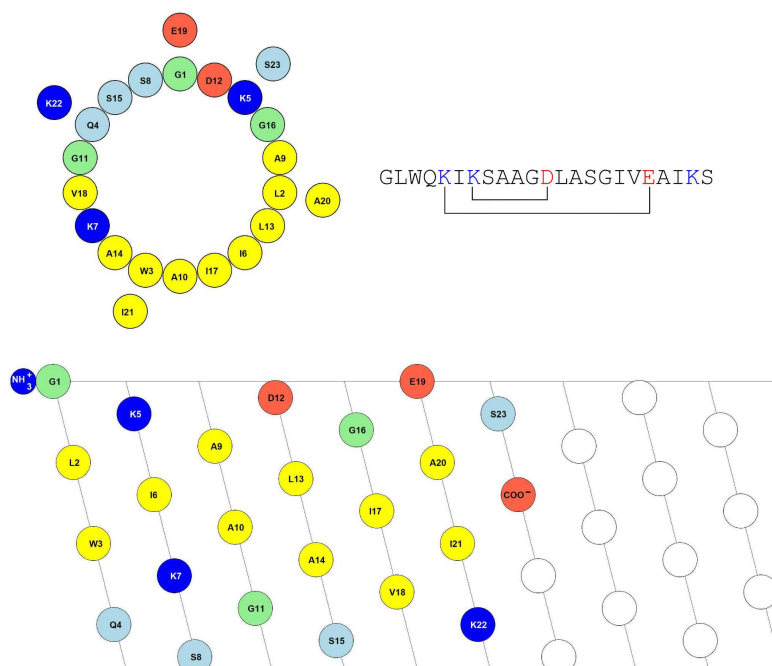




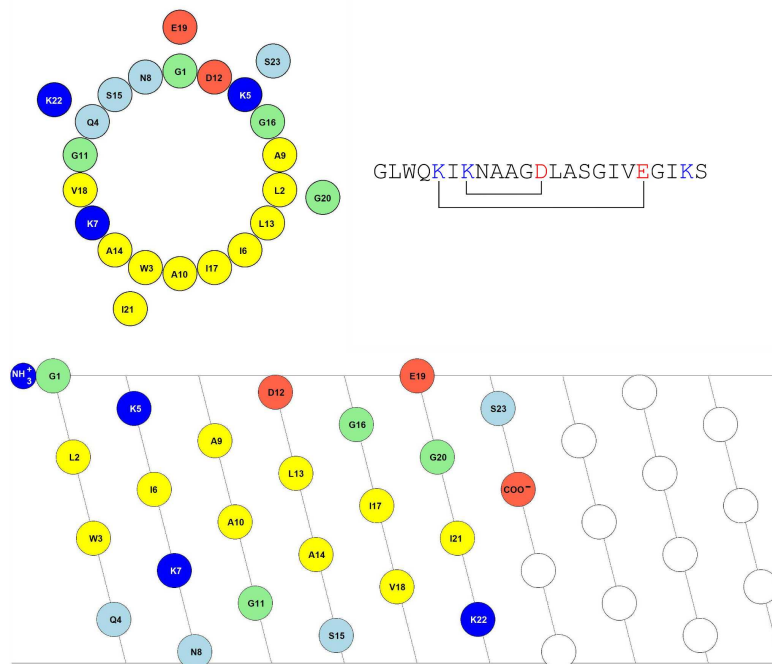
## Caerin 4.1



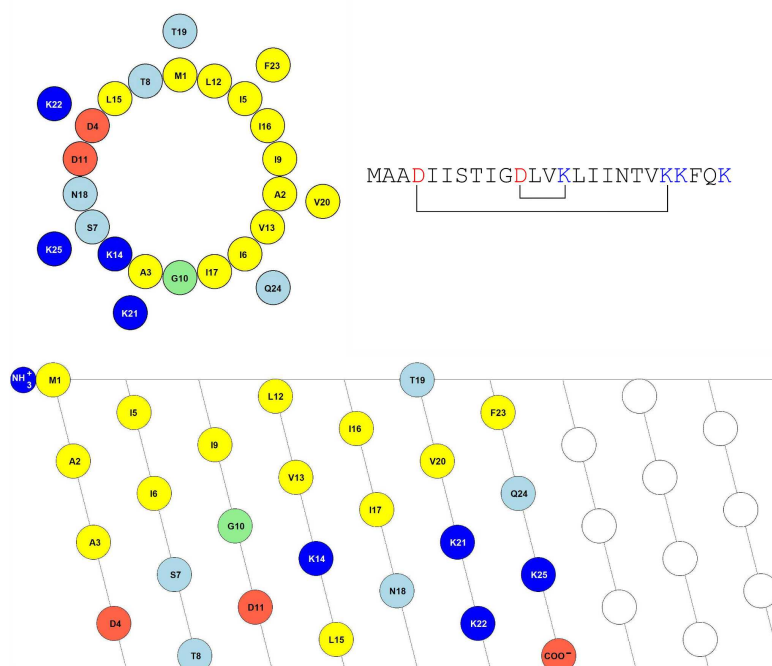
## Caerin 4.2



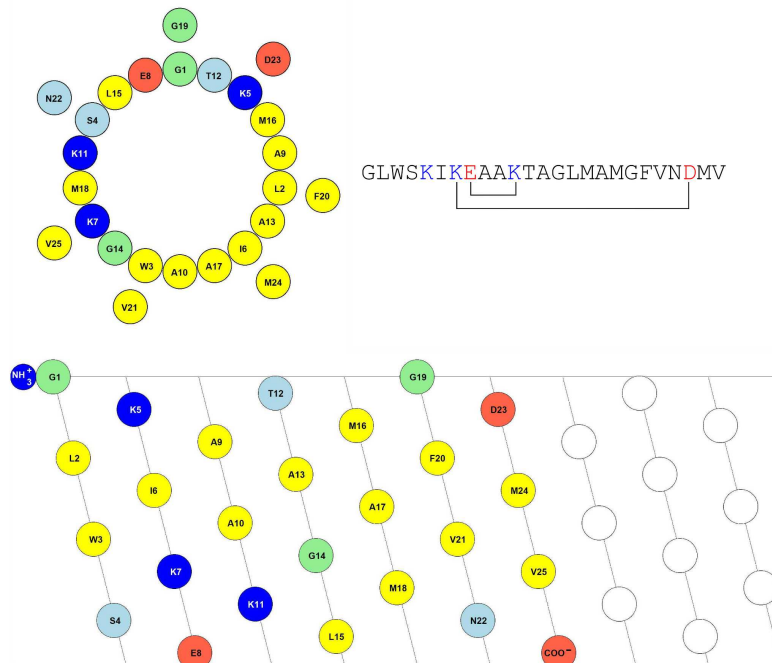
Caerin 4.3



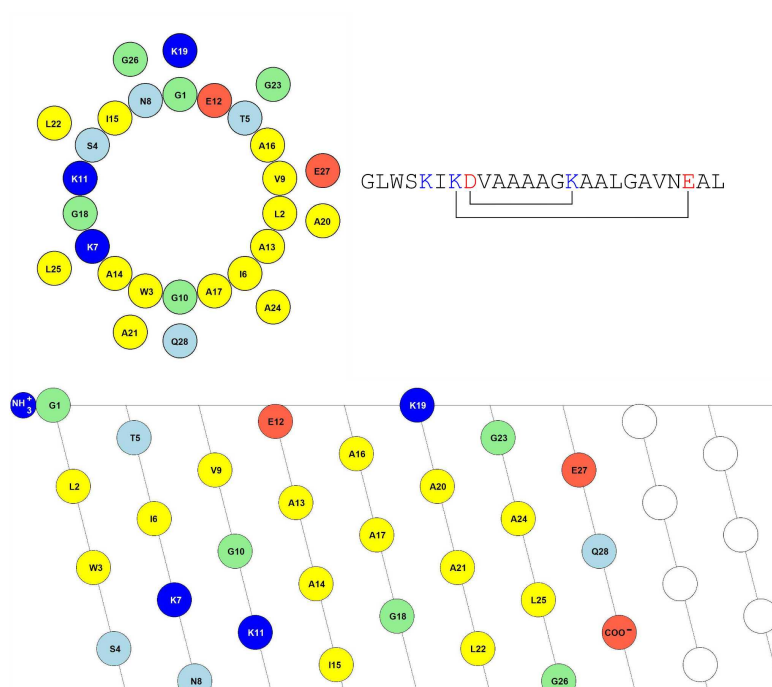
Delta Lysin



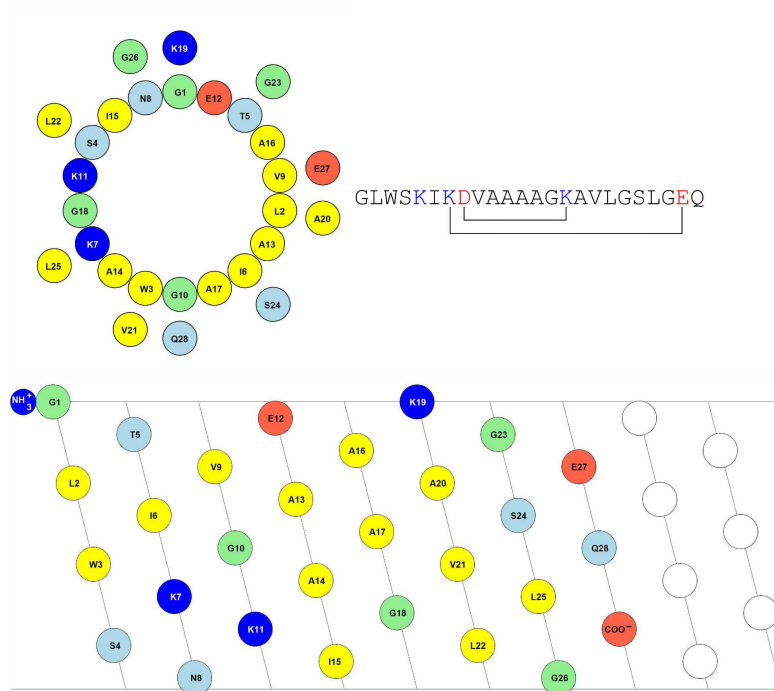
## Dermaseptin DI5



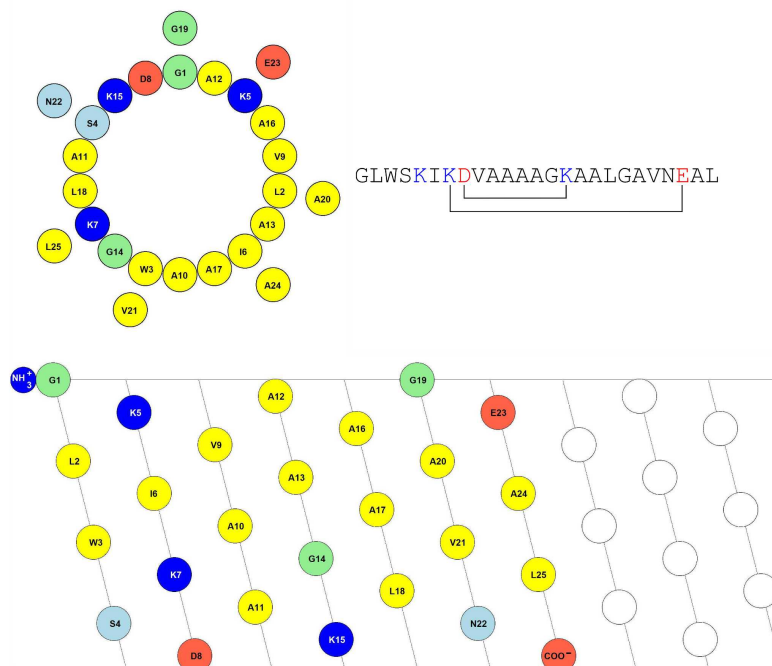
## Dermaseptin H4



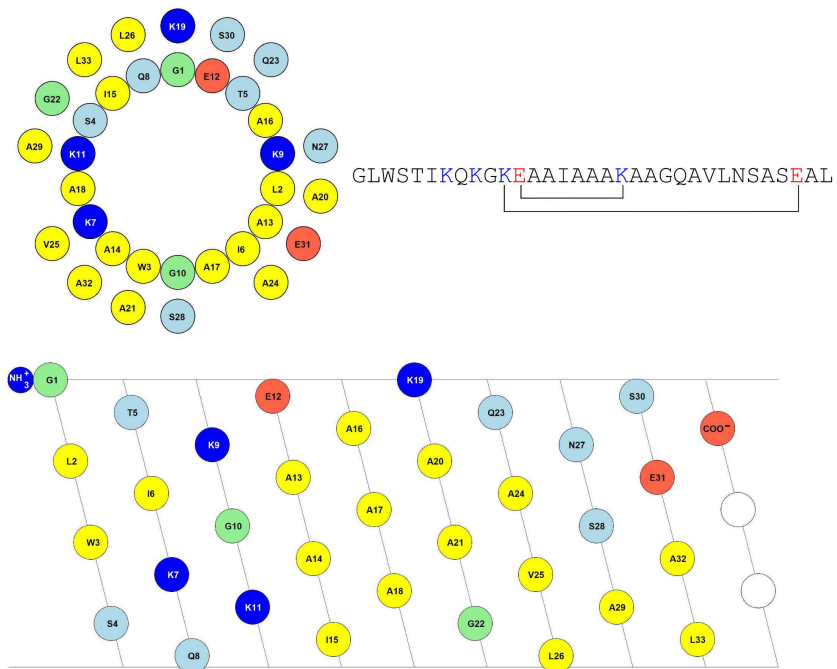
## Dermaseptin H5



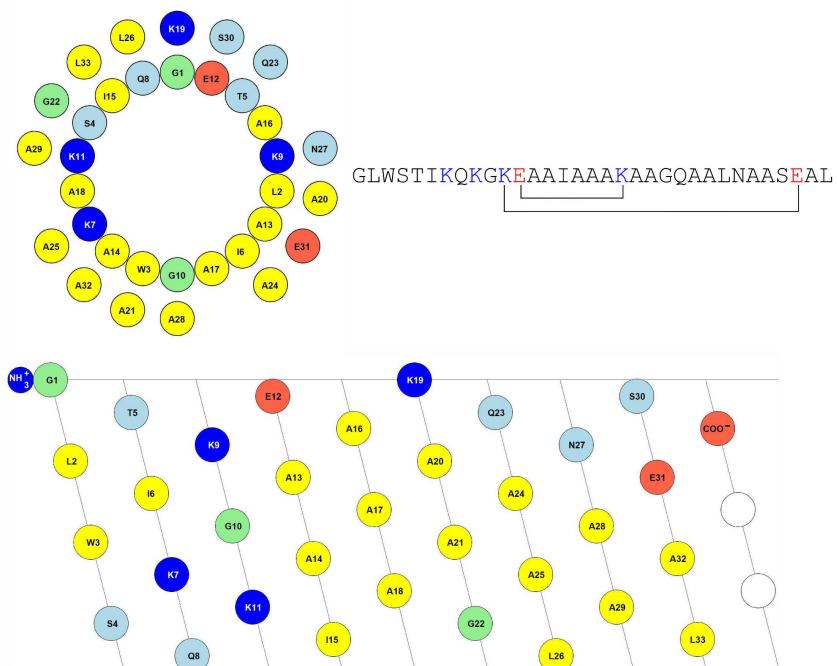
## Dermaseptin H7



## Dermaseptin H8

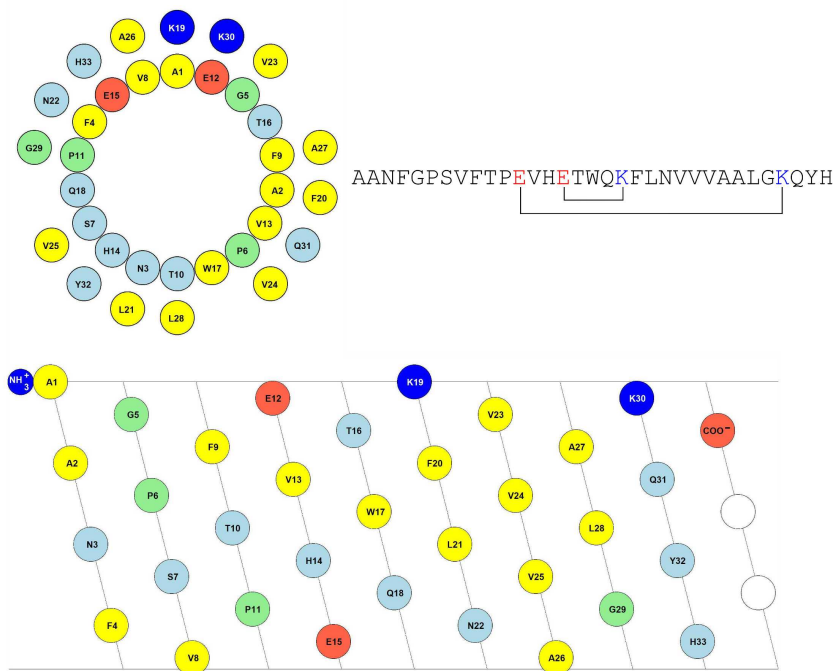


## Dermaseptin H9

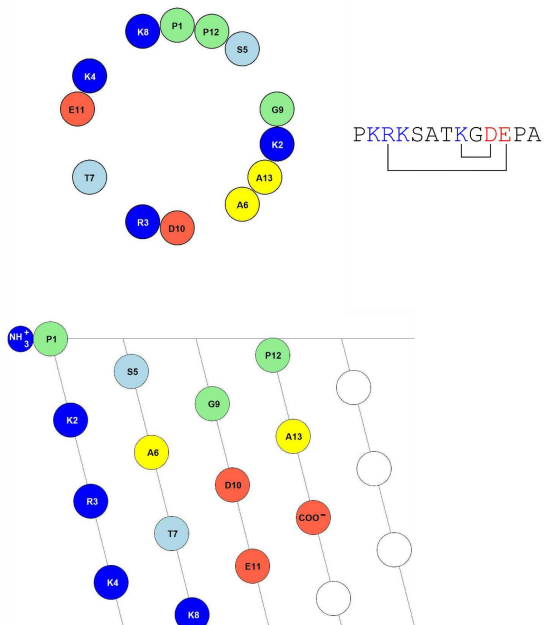






Hb- $\beta$ -P-1

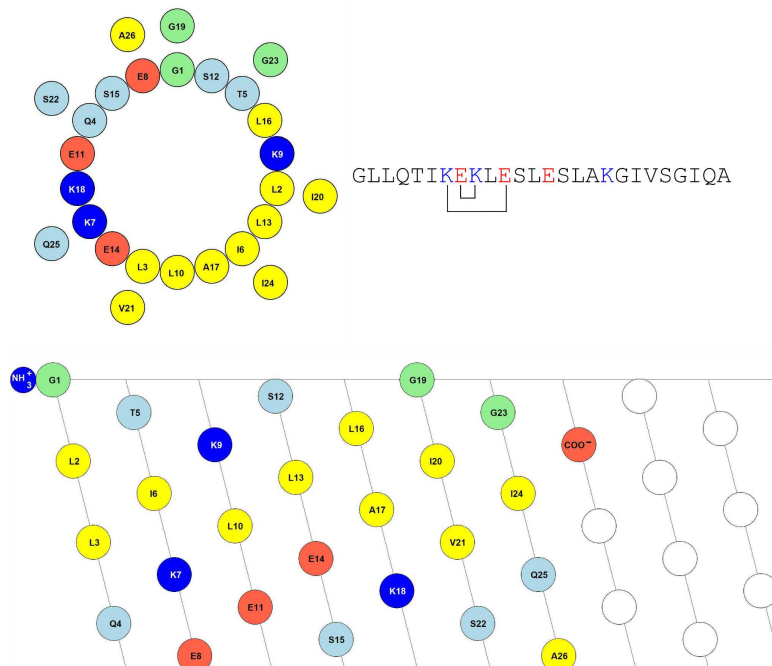
## Histone H6-like protein



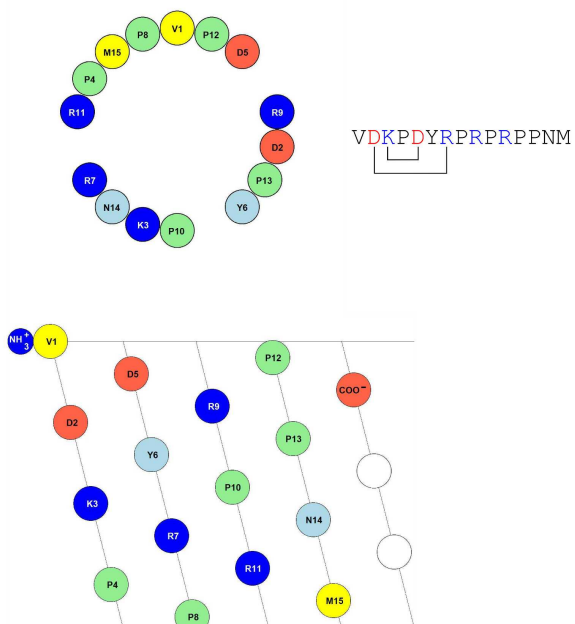




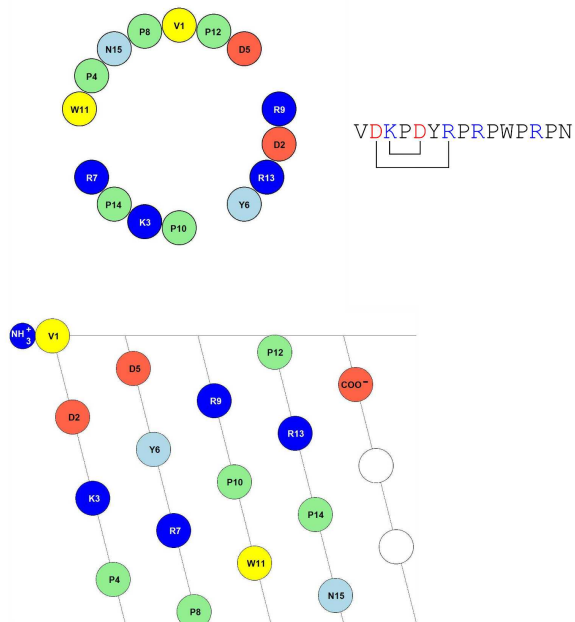
## Maculatin 3.1



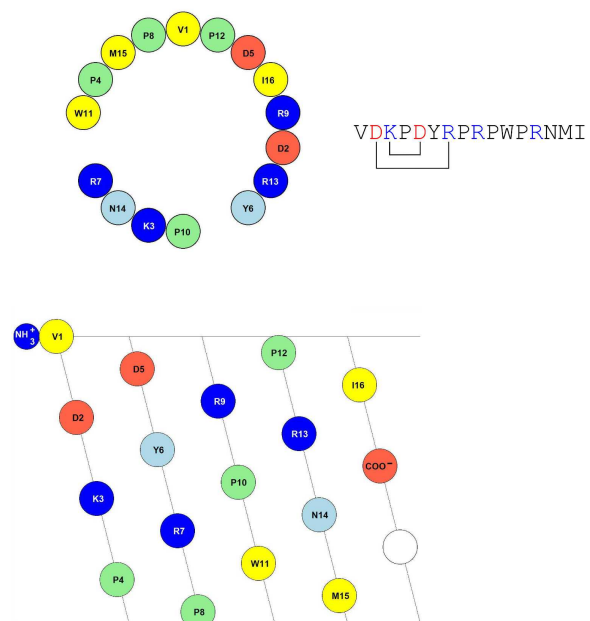
## Metalnikowin I



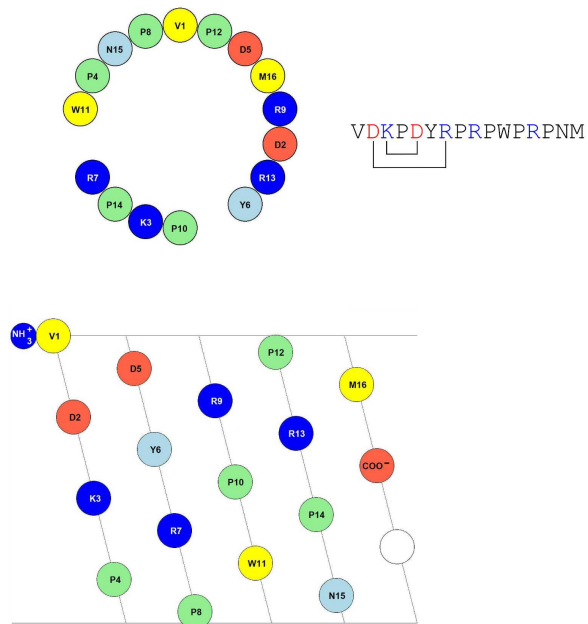
## Metalnikowin IIA



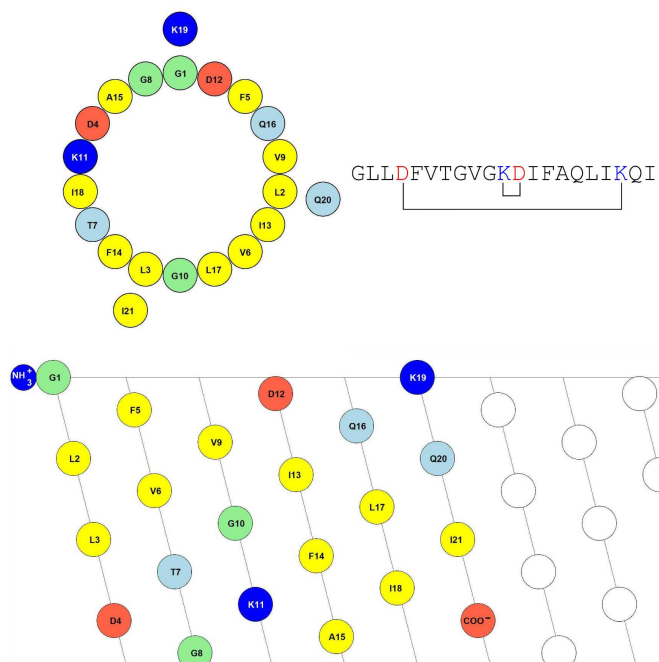
## Metalnikowin IIB



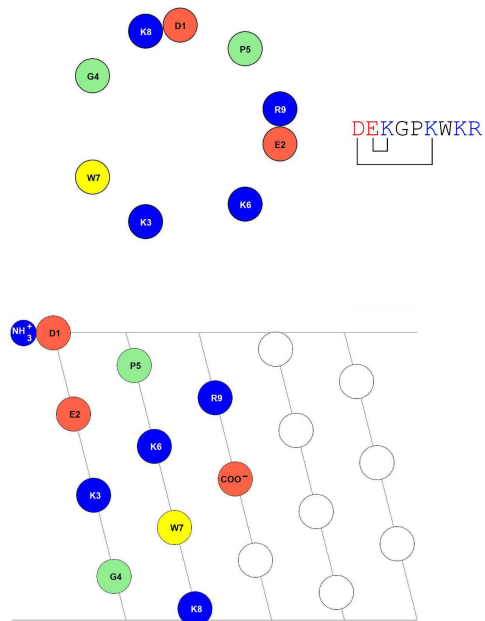
Metalnikowin III



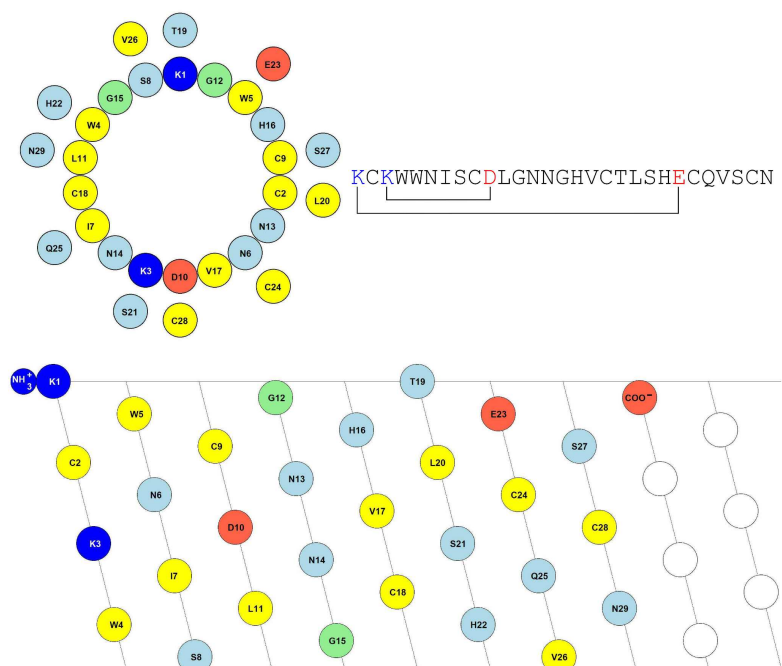
Ocellatin-4



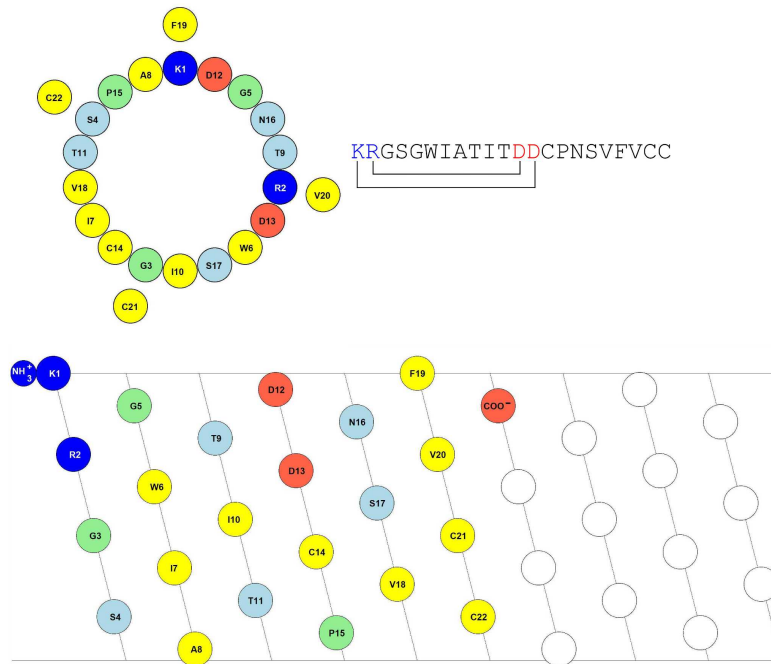
### Odorranain-N1



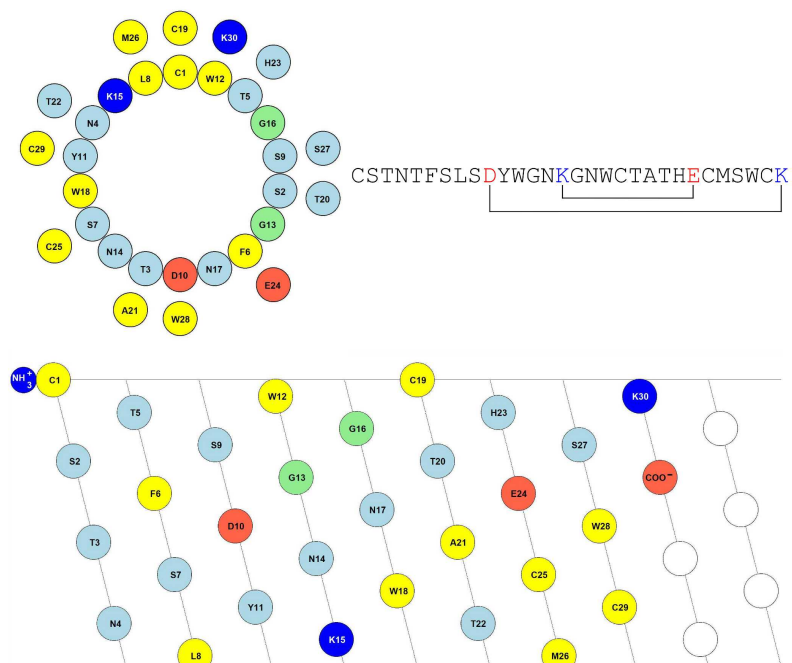
### Plantaricin W



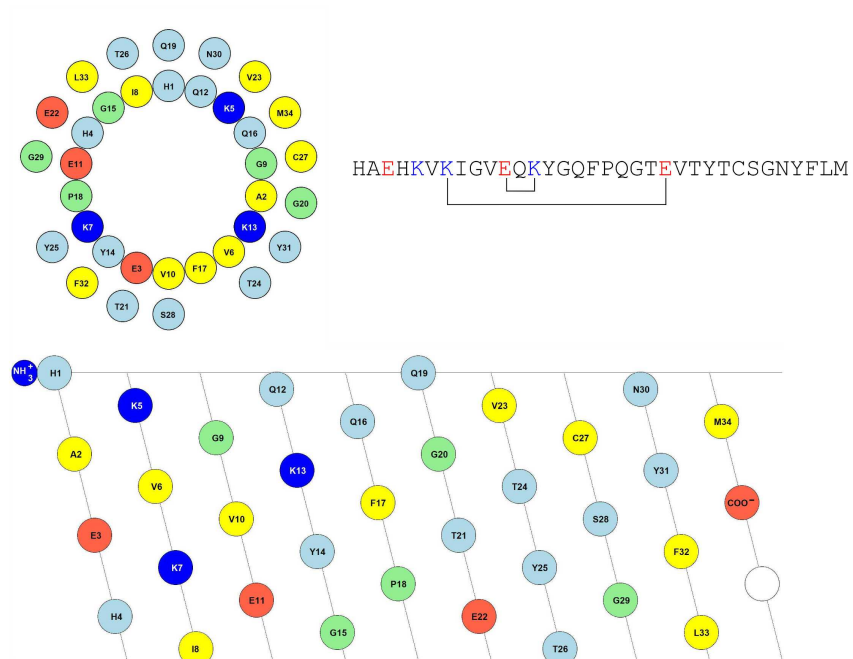
## Salivaricin A



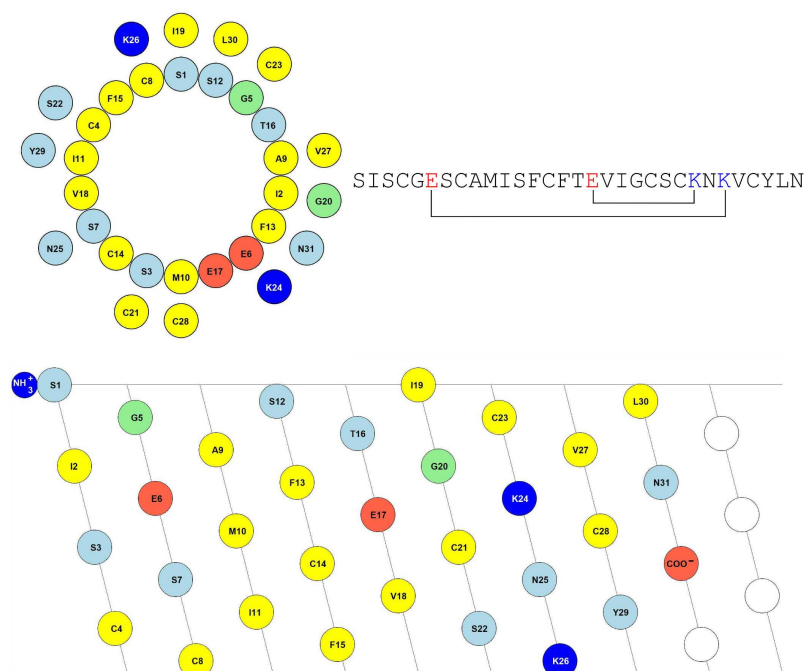
## Staphylococcin C55



## Sushipeptide 3

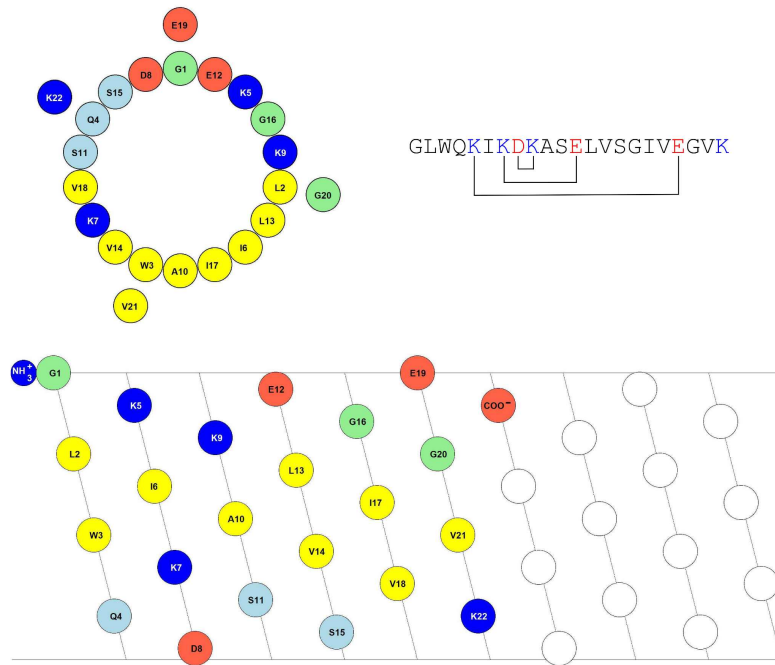


## Vhl-1



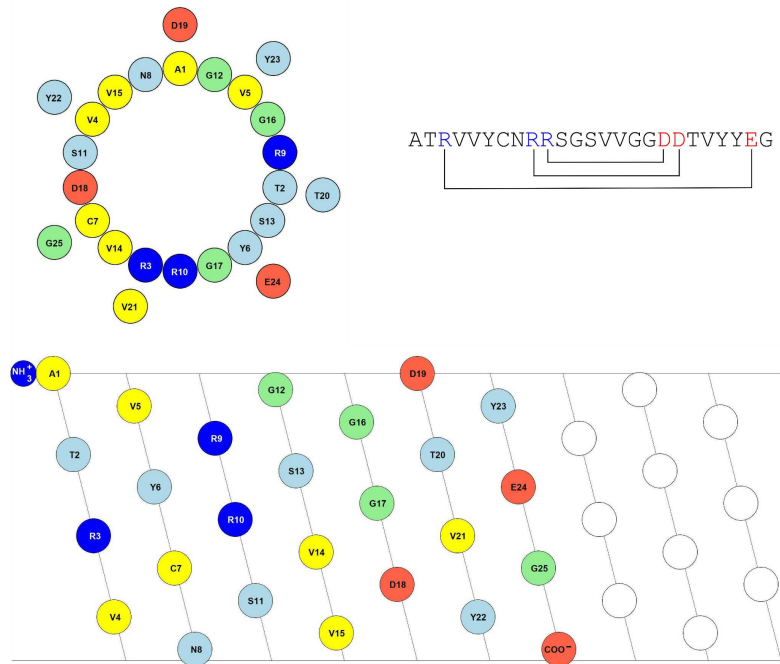
### 6.3 Helical Wheel und Helical Net Darstellungen (m=3)

#### Caerin 3.1

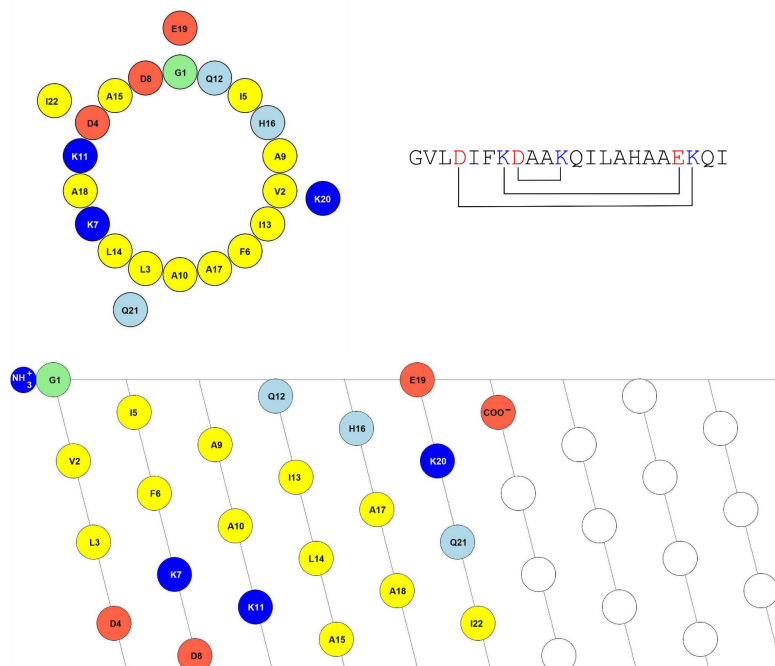




## Eryngin

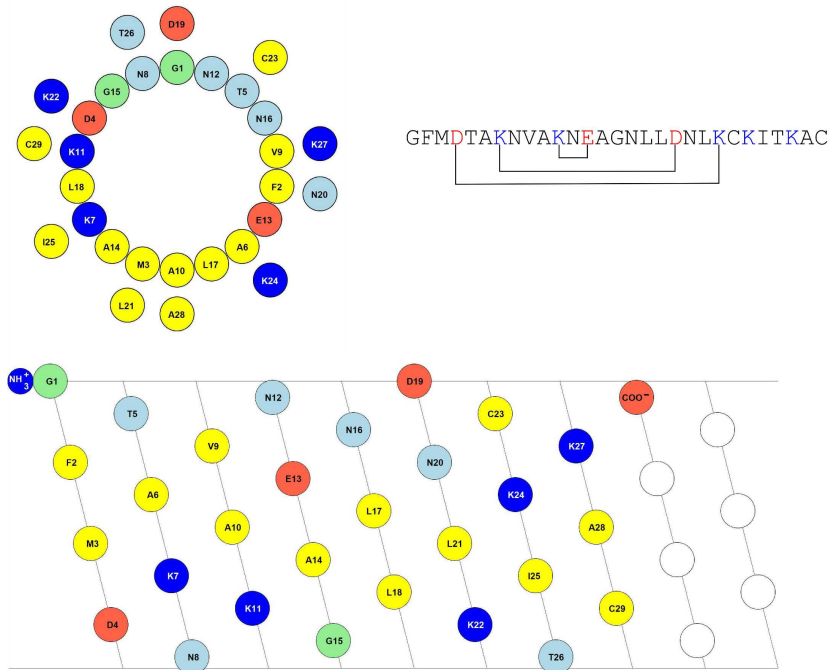


## Ocellatin-2

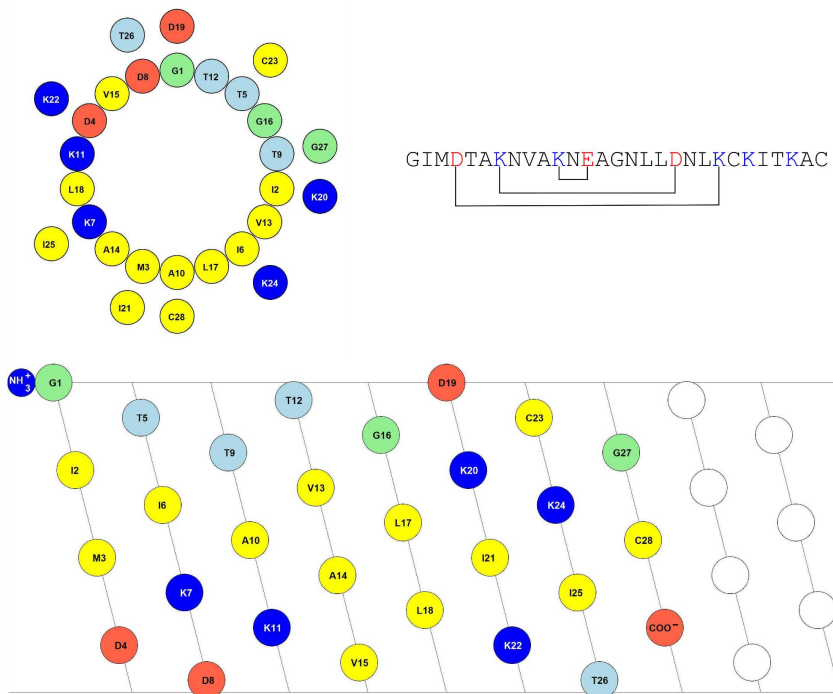




Odorrainin-F-OA3



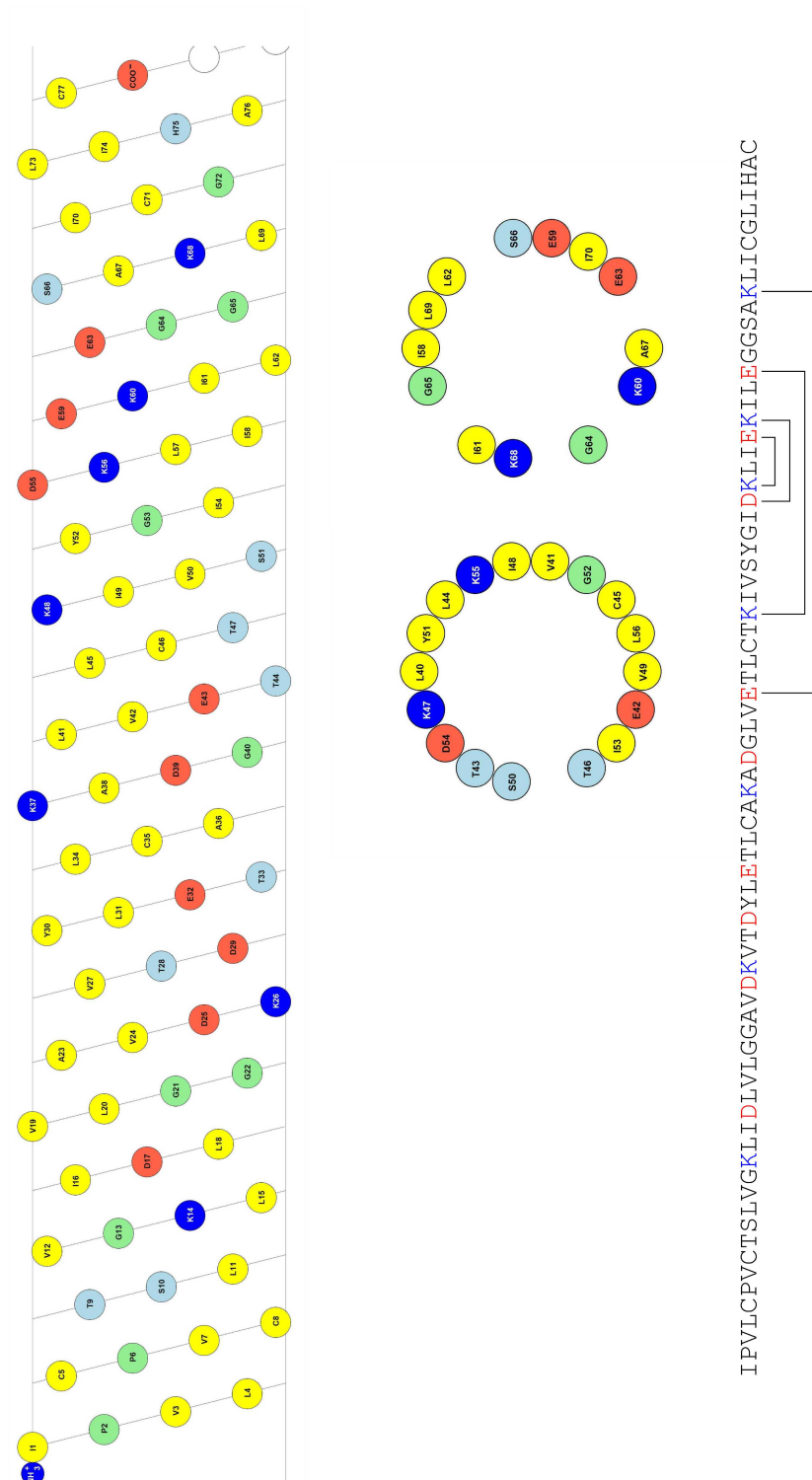
Ranatuerin-2-CPa



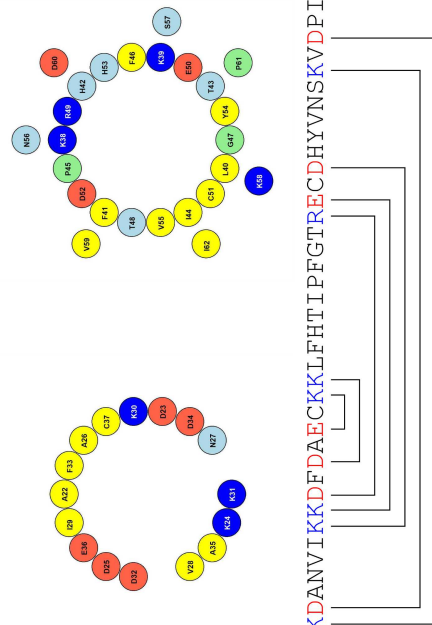
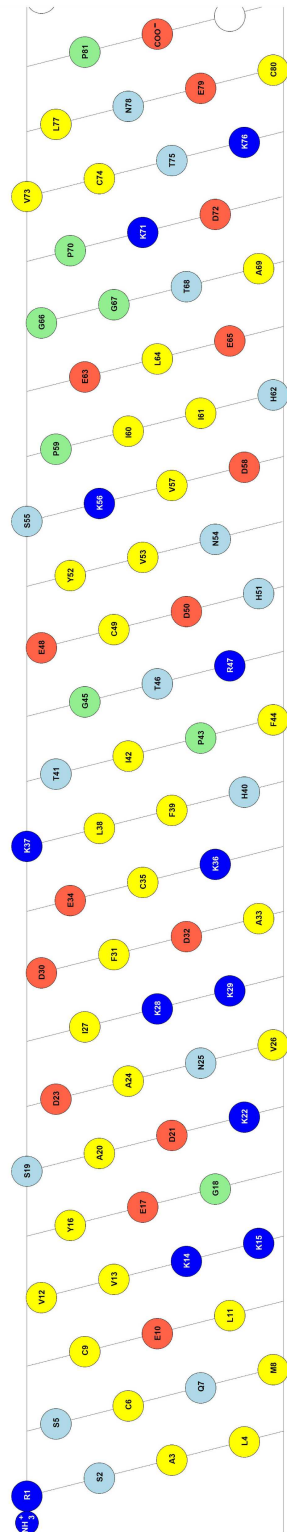


### 6.4 Helical Wheel und Helical Net Darstellungen ( $m \leq 4$ )

#### Amoebapore C

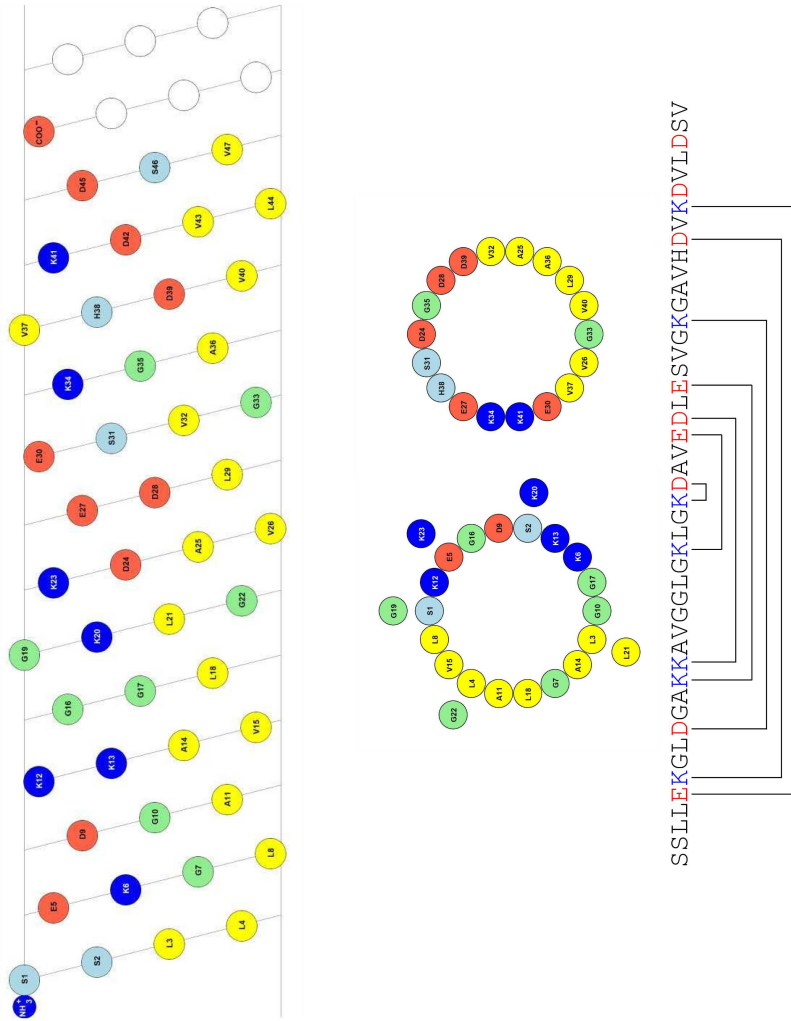


Caenopore 5

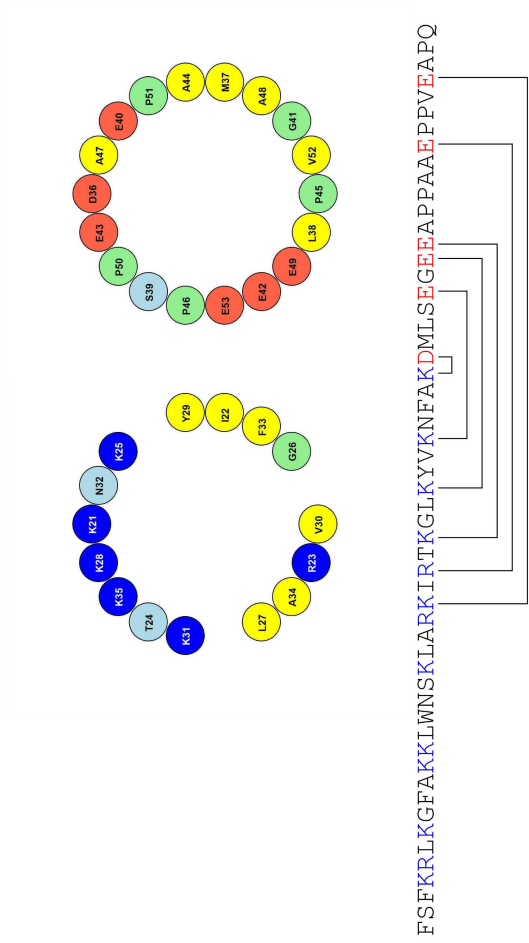
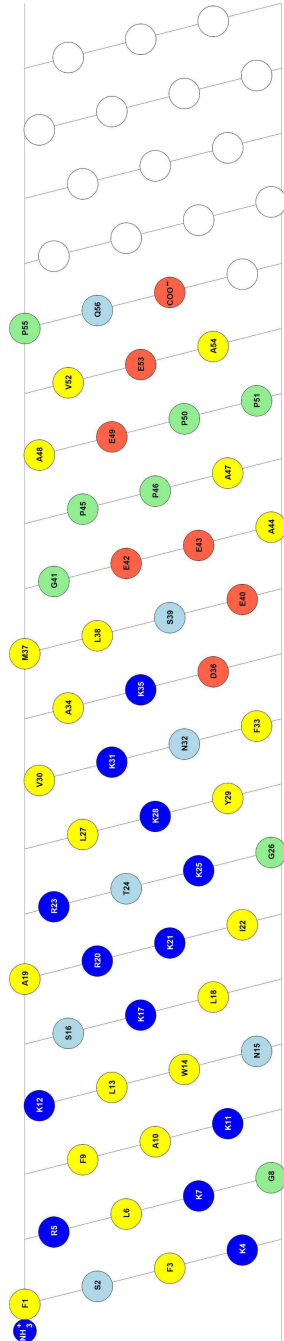


RSALSQMC**EL**WVKK**YEG**SADK**DAN**V**IKK**DF**DA**E**CK**KL**FHT**I**PF**GT**RE**CD**H**YVNS**KV**DP**II**HE**LE**GGTAP**KD**V**CT**K**IN**EC**P**

Dermcidin

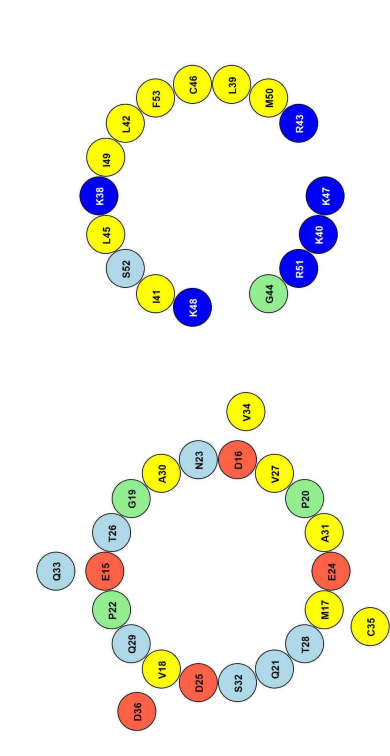
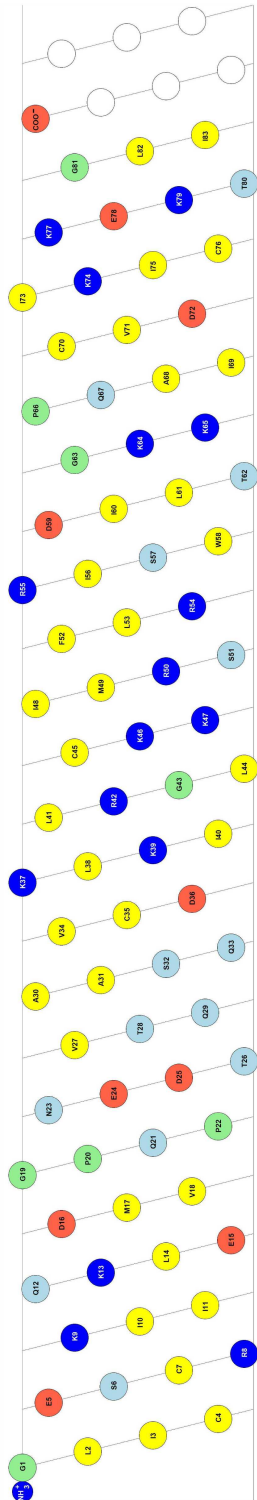


Im-1



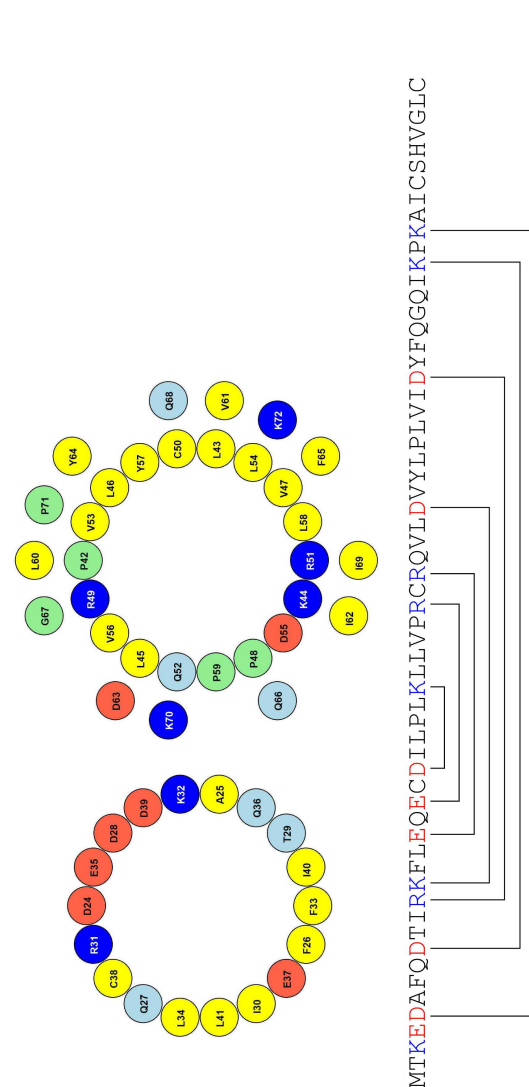
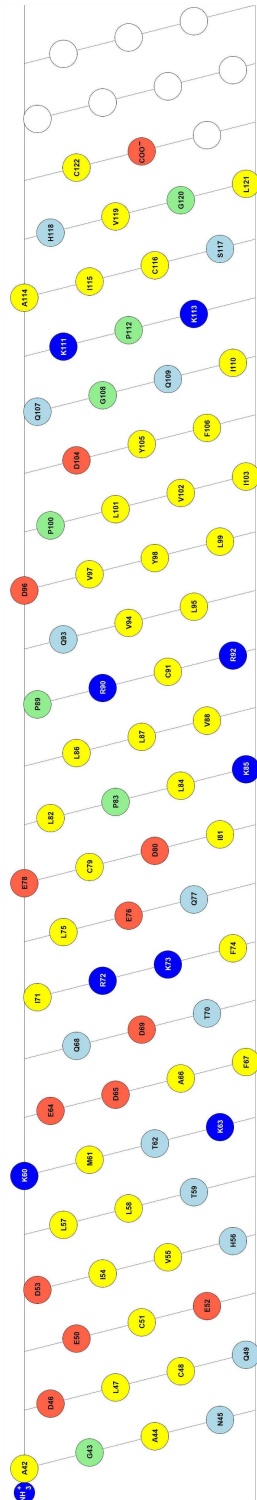


Porcine-NK Lysin



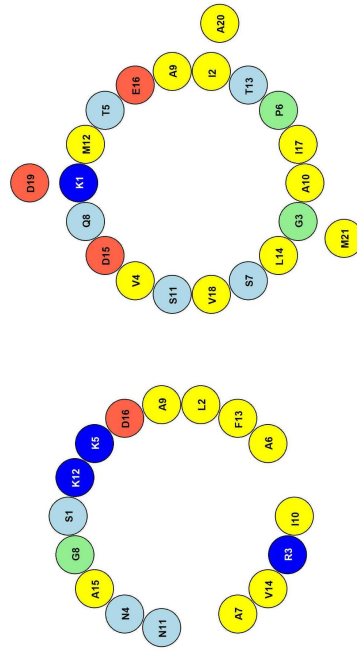
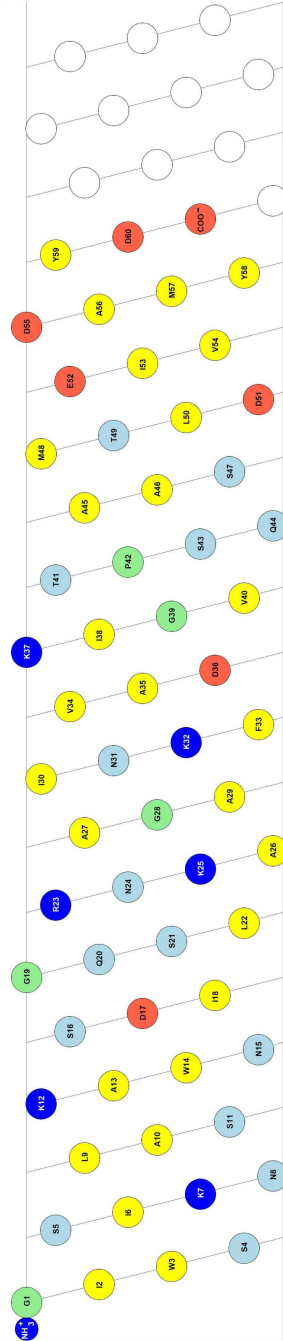
GLICE**S**CRKII**Q**KL**E**DMVGPQ**P**NE**D**TVTQAASQ**V**CD**K**LK**I**LRGLCKKIMRSFLRRIS**W**DIL**T**GGKK**P**QAIC**V**D**I**KICK**E**KTGLI

SP-BN

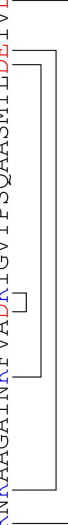


AGANDLCECEDIVHLLTKMTKEDAFQDTIRKFLREQCDLILPKLLVPRCRQVLDVILPLVIDYFQGGQIKPKAICSHVGLC

Vejovine



GIWSSIKNIASKAWNSDIGQSLRNKAAGAINKFVADKIKIGVTTPSQAAASMTILDEIVDAMYYD



## 6.5 Sequenzierergergebnisse

Sequenzierung des Plasmids pETGB1 $\alpha$ -DCD1L:

**Tabelle 27** – Sequenzierung des Plasmids pETGB1 $\alpha$ -DCD1L

Basenabfolge von 5' nach 3'					
GTCTGGTTCT	CATCATCATC	ATCATCATAG	CAGCGGCATC	GAAGGCCGCG	GCCGCTTAAT
TAAACATATG	ACCATGGCAG	ACTATAAGGA	CGATGACGAC	AAAAGCTCCT	TACTGGAGAA
AGGCCTTGAT	GGTGCCAAGA	AAGCTGTTGG	AGGTTTGGGG	AAACTCGGCA	AAGATGCGGT
AGAAGATCTG	GAAAGTGTTG	GCAAAGGTGC	AGTCCATGAT	GTGAAAGATG	TGCTGGATTC
GGTGCTGTAA	GGATCCGGTA	ACTAACTAAG	ATCCGGTAAG	ATCCGGCTGC	TAACAAAGCC
CGAAAGGAAG	CTGAGTTGGC	TGCTGCCACC	GCTGAGCAAT	AACTAGCATA	ACCCCTTGGG
GCCTCTAAAC	GGGTCTTGAG	GGGTTTTTTG	CTGAAAGGAG	GAACTATATC	CGGATATCCA
CAGGACGGGT	GTGGTCGCCA	TGATCGCGTA	GTCGATAGTG	GCTCCAAGTA	GCGAAGCGAG
CAGGACTGGG	CGGCGGCCAA	AGCGGTCGGA	CAGTGCTCCG	AGAACGGGTG	CGCATAGAAA
TTGCATCAAC	GCATATAGCG	CTAGCAGCAC	GCCATAGTGA	CTGGCGATGC	TGTCGGAATG
GACGATATCC	CGCAAGAGGC	CCGGCAGTAC	CGGCATAACC	AAGCCTATGC	CTACAGCATC
CAGGGTGACG	GTGCCGAGGA	TGACGATGAG	CGCATTGTTA	GATTTCATAC	ACGGTGCCTG
ACTGCGTTAG	CAATTTAACT	GTGATAAACT	ACCGCATTAA	AGCTTATCGA	TGATAAGCTG
TCAAACATGA	GAATTCGTAA	TCATGTCATA	GCTGTTTCTT	GTGTGAAATT	GTTATCCGCT
CACAATTCCA	CACAACATAC	GAGCCGGAAG	CATAAAGTGT	AAAGCCTGGG	GTGCCTAATG
AGTGAGCTAA	CTCACATTAA	TTGCGTTGCG	CTCACTGCCC	GCTTTCCAGT	CGGGAAACCT
GTCGTGCCAG	CTGCATTAAT	GAATCGGCCA	ACGCGCGGGG		

## 6.6 Bestimmung des pH-Werts in Vesikeln

Zur Bestimmung des pH-Werts in den Vesikeln wurde pH-sensitive Farbstoff Pyranin (8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure) verwendet. Er zeigt bei den beiden Anregungswellenlängen 404 nm und 454 nm eine negativ korrelierte Zu- beziehungsweise Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 512 nm. Durch Erstellung einer Kalibrationskurve kann hierdurch unabhängig von der Farbstoffkonzentration der pH-Wert im inneren von Vesikeln berechnet

werden.

Die Erstellung der Kalibrierkurve erfolgte mit POPC/POPG Vesikeln bei 7:3 molaren Verhältnis (Abschnitt 3.1.6). Zur Abdeckung eines pH-Bereichs von pH 5,0 bis 10,0 wurden diese mit MES, HEPES und AMPSO Puffer (jeweils 20 mM) hergestellt. Zum Ausgleich des pH-Wertes der Vesikel mit dem des verwendeten extravasikulären Puffers, wurden 5  $\mu$ M CCCP und 50 nM Valinomycin zugegeben. Der Ausgleich fand innerhalb von 5 min statt. Mittels eines einfachen Henderson-Hasselbalch Ansatz wurde die Berechnung des Quotienten durchgeführt (Gleichung 6)

$$R([H^+]) = R_{\max} \times \left(1 - \frac{[H^+]}{[H^+] + K_s}\right) \quad (6)$$

Über einen Fit wurden die Parameter des Maximalwertes  $R_{\max}$  ( $3,00 \pm 0,02$ ) und der Säurekonstante  $K_s$  beziehungsweise des  $pK_s$  ( $7,93 \pm 0,03$ ) erhalten. Der Regressionskoeffizient betrug 0,99963.

Durch diese Parameter konnte mit Hilfe des Programmes EXCEL der Firma Microsoft die Umkehrfunktion berechnet werden, welche es erlaubt nach der Messung der Spektren und Bestimmung des Quotienten  $R$  den pH-Wert in den Vesikeln zu berechnen.

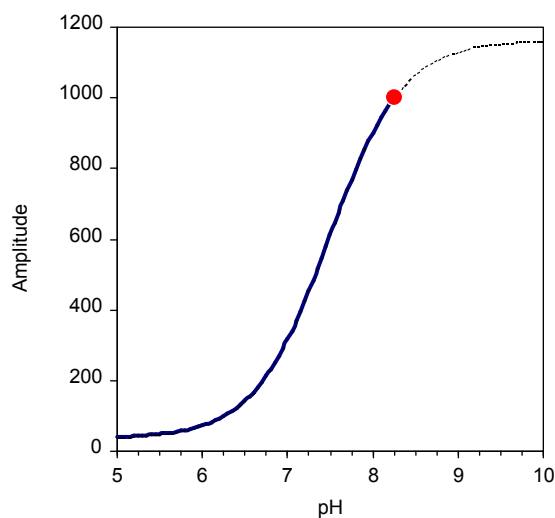
Ebenfalls wurde mittels einer zweiten Kalibrierkurve die Parameter für die Umrechnung der Fluoreszenzamplitude in pH-Einheiten bestimmt. Dazu diente wiederum ein Henderson-Hasselbalch Ansatz (Gleichung 7)

$$F([H^+]) = F_{\max} \times \left(1 - \frac{[H^+]}{[H^+] + K_s}\right) \quad (7)$$

Für den  $pK_s$  lieferte der Fit einen leicht unterschiedlichen Wert ( $7,48 \pm 0,02$ ). Der Regressionskoeffizient jedoch stellt mit 0,99925 eine sehr gute Anpassung dar. In dieser Anpassung stellt der Amplitudenwert  $F_{\max}$  einen reinen Skalierungsfaktor dar, für welchen ebenso mit Hilfe von EXCEL eine Umkehrfunktion berechnet wurde.

Um nun den Signalverlauf der Fluoreszenzamplitude in pH-Einheiten umzurechnen, sind zwei Schritte notwendig: Zu Beginn einer Messung musste der Quotient  $R$  und durch diesen der pH-Wert im vesikelinneren bestimmt werden. Anschließend konnte mit diesem Wert  $F_{\max}$  bestimmt werden mittels welchem jede Fluoreszenzamplitude in den entsprechenden

pH-Wert umgerechnet werden konnte (Abbildung 55) [141].



**Abbildung 55** – Veranschaulichung der Umrechnung Fluoreszenzsignal in pH-Wert. Am Anfang einer Messung wird zum Beispiel ein innerer pH-Wert von 8,25 bestimmt (roter Punkt). Um diesen Fixpunkt (Amplitude = 1000 cts) lässt sich nun für jeden Amplitudenwert der entsprechende pH-Wert berechnen.

## 6.7 Analysedaten und Skripte

Tabellen mit den identifizierten Charge Zipper tragenden Proteinen, Analyseskripte, sowie die Programme Sequenz und Protein Origami können unter

[https://www.dropbox.com/sh/8be15lw3k52pn75/9EkBk\\_0csq](https://www.dropbox.com/sh/8be15lw3k52pn75/9EkBk_0csq)

heruntergeladen werden. Die Datei „Übersicht.txt“ enthält nähere Informationen zum Inhalt der Ordner und Dateien.

## Publikationen

### Wissenschaftliche Artikel

- **Prock, S., Heinzmann, H., Peters, J. und Ulrich, A. S. (2013)** Protein ORIGAMI – A versatile tool for protein secondary structure visualization. In Vorbereitung
- **Walther, T.H., Gottselig, 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., Wenzel, W., Ruggerone, P. und Ulrich, A.S. (2013)** Folding and self-assembly of the TatA translocation pore based on a charge zipper mechanism, *Cell*, **153**:316–326.
- **Steinbrecher, T., Prock, S., Reichert, J., Wadhvani, P., Zimpfer, B., Bürck, J., Berditsch, M., Elstner, M. und Ulrich, A.S. (2012)** Peptide-lipid interactions of the stress-response peptide TisB that induces bacterial persistence, *Biophys J*, **103**:1–10.

### Poster und Konferenzbeiträge

- **Prock, S. et al.** Structure analysis and MD simulation of the biofilm-inducing peptide TisB from *E. coli*. Poster Biophysical Society Meeting 2012, San Diego, USA.
- **Prock, S. et al.** The biofilm-inducing peptide TisB. Poster Exzellenzinitiative des KIT 2012, Karlsruhe, Deutschland.
- **Prock, S. et al.** The bacterial stress-response peptide TisB forms a miniature proton-conductive channel. Poster Summer School Nano Biology 2011, Bad Herrenalb, Deutschland.