

# **Struktur und Funktion des Pinholins S<sup>21</sup>68 des Phagen φ21**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

**DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

**DISSERTATION**

von

M. Sc. Annika Kohlmeyer

aus

Heidenheim an der Brenz

1. Referentin: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

2. Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2020



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung -  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz (CC BY-SA 4.0):  
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.de>

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis habe ich in der jeweils gültigen Fassung beachtet. Weiterhin versichere ich, dass die elektronische Version dieser Arbeit mit der schriftlichen Version übereinstimmt und die Abgabe und Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. A (6) der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT beim Institut gesichert ist. Diese Arbeit wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Karlsruhe, den 09.12.2020

Annika Kohlmeyer

## Danksagungen

*Mein besonderer Dank gilt Prof. Anne S. Ulrich für die freundliche Aufnahme in Ihren Arbeitskreis, die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die zur Verfügung gestellten Ressourcen. Vielen Dank auch für die wertvollen Ratschläge.*

*Ein besonders großes Dankeschön gilt Dr. Torsten Walther für die hervorragende Betreuung während meiner Promotion, die stete Hilfsbereitschaft, die Geduld, die vielen Ratschläge und natürlich für das sorgfältige Korrekturlesen. Vielen lieben Dank!*

*Ein weiterer Dank gilt zudem Dr. Lena Steger für ihre Hilfsbereitschaft, die angenehme Zusammenarbeit, ihre Ratschläge im Labor und das Korrekturlesen. Zudem danke ich Anne Görner und Yannick Busch die mich im Zuge ihrer Abschlussarbeit unterstützt haben und mir ihre NMR- und (O)CD-Ergebnisse für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt haben.*

*Ein weiterer großer Dank geht an Dr. Erik Strandberg der mich hervorragend bei den fluoreszenzspektroskopischen Experimenten betreut hat, sich immer Zeit für mich genommen hat und mir mit Ratschlägen immer zur Seite stand. Vielen Dank auch für das sorgfältige Korrekturlesen.*

*Dr. Johannes Reichert möchte ich für die Einführung in die Fluoreszenzspektroskopie und die vielen hilfreichen Tipps bei der Durchführung der Experimente danken.*

*Bei Dr. Parvesh Wadhvani, Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck möchte ich für die Planung, die Synthese und die Aufreinigung der verwendeten Peptide bedanken.*

*Dr. Jochen Bürck, Bianca Posselt und Siegmund Roth möchte ich für die sehr gute Betreuung während meiner Messzeit an der Beamline und die stete Hilfsbereitschaft in allen Belangen bedanken. Vielen Dank auch für die Hilfe bei der Interpretation der (O)CD-Ergebnisse. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei der Synchrotron Strahlungsquelle KARA am Campus Nord (KIT) für die Möglichkeit der Aufnahme von SR(O)CD-Spektren am UV-CD12-Strahlrohr bedanken.*

*Dr. Sergiy Afonin möchte ich für die Durchführung der MALDI-TOF-Messungen und die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Zudem gilt mein Dank Dr. Stephan Grage für die Hilfsbereitschaft bei den NMR-Messungen und deren Auswertung.*

*Gabriele Buth und Dr. Tamta Turdzeladze möchte ich für die Hilfsbereitschaft in jeglichen organisatorischen Anliegen und die netten Gespräche danken. Auch Dr. Birgid Langer möchte ich an dieser Stelle für die netten Gespräche danken.*

*Für die schönen Mittagpausen am Campus Nord möchte ich mich auch herzlich bedanken, es war immer eine entspannte und unterhaltsame Pause. Vielen Dank auch für die tolle Arbeitsatmosphäre im Norden! Ein Dank geht an dieser Stelle auch an Kerstin Scheubeck für den ein oder anderen Knopersriegel und an Patrick Anders, der mich mit ausreichend*

*Süßigkeiten während der Arbeit versorgt hat. Ein großer Dank geht auch an Ronja Kammerichs für die schöne gemeinsame Zeit.*

*Danke natürlich auch für die schönen Mittagspausen am Campus Süd und die ebenso unterhaltsamen Gespräche, das ein oder andere Feierabendbier und die schönen abendlichen Unternehmungen.*

*Dem ganzen Arbeitskreis am Campus Süd und Nord möchte ich nochmals für die sehr freundliche Aufnahme, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft danken!*

*Vielen lieben Dank auch an euch Theresa, Katharina und Fabian für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit!*

*Ein großer Dank gilt Tim Schober, der mich gerade in meiner Endphase sehr unterstützt hat, mich immer mit Kaffee und süßen Stückchen versorgt hat und die langen Arbeitstage erträglicher machte.*

*Ein ebenso großer Dank geht an Katharina, die mich in den letzten Monaten sehr unterstützt hat und immer für mich da war! Vielen lieben Dank an dieser Stelle auch für das Zirbenkissen, ohne welches ich die letzten Wochen bei Weitem nicht so gut geschlafen hätte.*

*Vielen lieben Dank auch an Dodo, Fränzi, Dave, Sarah, Meli und Michi die in den letzten Jahren immer für mich da waren, mich unterstützt haben und wir tolle Momente miteinander erlebt haben. Natürlich danke ich auch meinem restlichen Freundeskreis, der mich außerhalb meines Laboralltags stets auf andere Gedanken gebracht hat.*

*Ein unglaublich großer Dank geht an Nadja und Theresa! Ihr gebt mir unglaublichen Halt und unterstützt mich wo es nur geht. Ihr seid mir in den letzten Jahren unglaublich ans Herz gewachsen und ich danke euch für die vielen schönen gemeinsamen Erlebnisse. Für euren Support gerade in den letzten Wochen möchte ich mich natürlich auch nochmal von Herzen bedanken!*

*Mein größter Dank gilt meinen Eltern Petra und Helmut sowie meiner Schwester Milena für ihre grenzenlose Unterstützung während meines gesamten Studiums und meiner Promotion! Danke, dass ihr immer an mich glaubt und für mich da seid! Auch möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bei meinen Eltern bedanken.*

*Es gibt kein größeres Geschenk als eine Familie wie euch zu haben!*

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Bakteriophagen .....	1
1.2	Lebenszyklen von Bakteriophagen .....	3
1.2.1	Lytischer Zyklus.....	3
1.2.2	Lysogener und pseudolysogener Zyklus .....	4
1.3	Freisetzungsstrategien von Bakteriophagen .....	6
1.3.1	Hemmung der Zellwandbiosynthese .....	9
1.3.2	Das kanonische Holin-Endolysin-System .....	9
1.3.3	Pinholin-SAR-Endolysin-System .....	11
1.4	Komponenten der lytischen Systeme .....	12
1.4.1	Holine .....	12
1.4.2	Endolysine .....	13
1.4.3	Spanine .....	16
1.5	Regulation der Lyse.....	18
1.5.1	Regulation im kanonischen Holin-Endolysin-System .....	19
1.5.2	Regulation im Pinholin-SAR-Endolysin-System.....	20
1.6	Mechanismus der Lochbildung von Pinholinen.....	23
1.6.1	Einfluss der TMD1 des Pinholins auf die Lochbildung .....	23
1.6.2	Topologie und strukturelle Dynamik des Pinholins.....	25
1.6.3	Oligomerisierungsgrad der Pinholine.....	29
1.6.4	Modell für die Lochbildung und die Rolle des Glycin-Zipper Motivs .....	30
2	Aufgabenstellung.....	32
3	Ergebnisse .....	33
3.1	Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der TMD2 des Pinholins S <sup>2168</sup> .....	33
3.1.1	Darstellung der TMD2 des Pinholins S <sup>2168</sup> .....	33
3.1.2	Sekundärstrukturanalyse der TMD2 des Pinholins S <sup>2168</sup> .....	35

3.1.3	Untersuchung der Membranorientierung der TMD2 des Pinholins S <sup>21</sup> 68 .....	38
3.1.3.1	Einfluss der hydrophoben Membrandicke und des Sättigungsgrads der Lipidacylketten auf die Orientierung der TMD2.....	39
3.1.3.2	Bestimmung des Neigungswinkels $\tau$ und des Rotationswinkels $\rho$ der TMD2 .....	47
3.1.3.3	Struktur und Orientierung der TMD2 in Membranen für die Funktionsanalyse .....	51
3.1.4	Funktionsanalyse der TMD2 des Pinholins S <sup>21</sup> 68 .....	53
3.1.4.1	Einfluss verschiedener Lipidsysteme auf den lochbildenden Charakter der TMD2 .....	56
3.1.4.2	Einfluss des Glycin-Zipper Motivs der TMD2 auf die Lochbildung.....	62
3.1.4.3	Untersuchung der Größe des durch die TMD2 gebildeten Lochs .....	70
3.1.4.4	Untersuchung des Oligomerisierungsgrads der TMD2.....	75
3.2	Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der TMD1 des Pinholins S <sup>21</sup> 68 .....	78
3.2.1	Darstellung der TMD1 des Pinholins S <sup>21</sup> 68 .....	78
3.2.2	Sekundärstrukturanalyse der TMD1 des Pinholins S <sup>21</sup> 68 .....	79
3.2.3	Funktionsanalyse der TMD1 des Pinholins S <sup>21</sup> 68 .....	81
4	Diskussion .....	85
4.1	Strukturelle Charakterisierung der TMD2 des Pinholins S <sup>21</sup> 68.....	85
4.2	Funktionelle Charakterisierung der TMD2 des Pinholins S <sup>21</sup> 68 .....	90
4.2.1	Einfluss verschiedener Lipidsysteme auf den lochbildenden Charakter der TMD2 .....	91
4.2.2	Einfluss des Glycin-Zipper Motivs der TMD2 auf die Lochbildung.....	93
4.2.3	Untersuchung der Größe des durch die TMD2 gebildeten Lochs .....	96
4.2.4	Untersuchung des Oligomerisierungsgrads der TMD2.....	98
4.3	Strukturelle Charakterisierung der TMD1 des Pinholins S <sup>21</sup> 68.....	99
4.4	Funktionelle Charakterisierung der TMD1 des Pinholins S <sup>21</sup> 68 .....	102
4.5	Struktur- und Funktionsmodell des Pinholins S <sup>21</sup> 68 des Phagen $\phi$ 21.....	103

5	Zusammenfassung .....	109
6	Material .....	110
6.1	Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	110
6.1.1	Geräte .....	110
6.1.2	Chemikalien .....	112
6.1.3	Verbrauchsmaterial .....	113
6.2	Puffer und Lösungen für die Fluoreszenzmessungen.....	114
6.2.1	ANTS/DPX-Leakage-Messungen.....	114
6.2.2	Fluorescein-Leakage-Messungen.....	114
6.2.3	FRET Messungen und Bindungsaffinitätsmessungen.....	115
6.3	Software.....	115
7	Methoden.....	116
7.1	Peptidsynthese.....	116
7.2	Methoden zur strukturellen Analyse .....	117
7.2.1	CD-Spektroskopie .....	117
7.2.2	OCD-Spektroskopie .....	118
7.2.3	Festkörper- <sup>15</sup> N-NMR-Spektroskopie .....	119
7.3	Methoden zur funktionellen Analyse .....	121
7.3.1	ANTS/DPX-Leakage-Experimente.....	121
7.3.2	Fluorescein-Leakage-Experimente.....	123
7.3.3	FRET-Spektroskopie .....	125
7.3.4	Bindungsaffinitätsmessungen .....	127
8	Abbildungsverzeichnis.....	130
9	Tabellenverzeichnis .....	133
10	Abkürzungsverzeichnis.....	134
11	Literaturverzeichnis .....	138
12	Anhang.....	151



12.1	SROCD-Spektren der TMD2 .....	151
12.2	Festkörper- <sup>31</sup> P-NMR Spektren .....	152
13	Publikationen.....	155
13.1	Beiträge in referenzierten Zeitschriften .....	155
13.2	Tagungsbeiträge.....	155

# 1 Einleitung

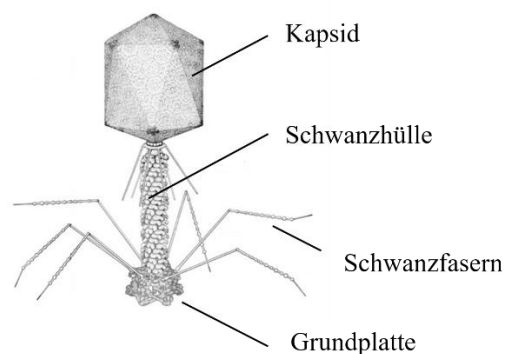
In der heutigen Zeit rückt die Resistenz verschiedener bakterieller Krankheitserreger (pathogene Bakterien) gegenüber vielen herkömmlichen Antibiotika immer mehr in den Fokus. Solche antibiotikaresistenten Bakterien entstehen durch übermäßigen und unsachgemäßen Gebrauch von Antibiotika<sup>1-4</sup>. Ein aktuelles und ernstzunehmendes Beispiel sind methicillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämme, welche ein zusätzliches Penicillin-bindendes Protein exprimieren und dadurch gegenüber allen  $\beta$ -Lactam Antibiotika resistent sind. Die Weltgesundheitsorganisation stuft MRSA mittlerweile als einen vorrangigen Krankheitserreger ein, welcher die Gesundheit der Menschen ernsthaft bedroht<sup>5,6</sup>. Die Entwicklung alternativer Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von bakteriellen Infektionen ist somit essentiell. In den letzten Jahren nahm daher die medizinische Relevanz von Bakteriophagen als möglicher Therapieansatz deutlich zu<sup>1-4</sup>. Bei Bakteriophagen, kurz Phagen, handelt es sich um Viren, die ausschließlich Bakterien oder Archaeen befallen. Deren letale Wirkung auf Bakterien wurde bereits im Jahre 1915 von Frederick Twort sowie von Félix d'Hérelle im Jahre 1917 beschrieben<sup>7,8</sup>. Bedeutend für den Einsatz von Bakteriophagen in der Medizin ist deren hohe Wirtsspezifität für bestimmte Bakterienspezies oder einem genotypischen Bakterienstamm<sup>1,9</sup>. Heutzutage besteht aber nicht nur Interesse an der antimikrobiellen Aktivität von Phagen, sondern sie können aufgrund ihrer Spezifität auch als gezielte Transportsubstanzen von Arzneimitteln oder Impfstoffen dienen<sup>4</sup>. Beispielsweise wurde der gentechnisch modifizierte Phage M13 zur Bildgebung von Tumorzellen sowie zur Abgabe von Arzneimittel an Prostatakrebszellen *in vitro* eingesetzt<sup>10</sup>. Auch in den Materialwissenschaften finden mittlerweile Phagen Anwendung. Der Phage M13 wurde dahingehend funktionalisiert, dass er verschiedene nanoskalige Materialien, wie Nanoringe oder Mikro- und Nanofasern, zusammenbauen kann<sup>11,12</sup>.

Für den effizienten Einsatz von Bakteriophagen, gerade in der Medizin, ist eine detaillierte Analyse der Wirkmechanismen von Bakteriophagen unausweichlich. Während dieser Doktorarbeit wurde ein von Phagen codiertes Protein, welches an der Lyse des Bakterienwirts beteiligt ist, strukturell und funktionell untersucht.

## 1.1 Bakteriophagen

Bakteriophagen sind Viren, die ausschließlich Prokaryoten als Wirte nutzen<sup>7,8</sup>. Diese infektiösen Partikel werden oftmals anhand des Wirtsorganismus den sie befallen, ihrer Morphologie oder des Aufbaus ihres Genoms klassifiziert<sup>13</sup>. Die offizielle taxonomische

Einordnung von Viren erfolgt durch das *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). Laut ihrem neusten Bericht (Juni 2019) sind derzeit 5560 Virenspezies in der Datenbank eingegliedert, die wiederum in 14 verschiedene Ordnungen untergeordnet sind<sup>14</sup>. Strukturell aufgebaut sind Bakteriophagen im allgemeinen aus einer Nukleinsäure, welche von einer Proteinhülle, dem sogenannten Kapsid, umgeben ist<sup>15,16</sup>. Diese Proteinhülle dient einerseits dem Schutz des Genoms des Phagen und andererseits verfügt sie über Rezeptoren, die für die Erkennung des Wirts erforderlich sind<sup>15,17</sup>. Die Phagen der T-Serie, welche momentan am besten strukturell charakterisiert sind, weisen untereinander nur kleine Unterschiede in ihrem Genom und ihrer Struktur auf<sup>18</sup>. Bakteriophagen dieser Serie sind aus einem ikosaedrischen Kapsid, in dem die doppelsträngige DNA eingeschlossen ist, einer Grundplatte und dem Injektionsapparat für die Penetration ihrer Nukleinsäure in den Bakterienwirt aufgebaut (Abb. 1). Die Grundplatte ist zusätzlich mit Schwanzfasern und Spikes besetzt, welche als Rezeptoren für die Wirtserkennung dienen<sup>15,18</sup>.



**Abbildung 1: Schematische Grundstruktur des Phagen T4**

Die doppelsträngige DNA des Bakteriophagen T4 liegt im ikosaedrischen Kapsid vor. Die Schwanzhülle umschließt das Schwanzrohr, welches die Nukleinsäure in den Bakterienwirt injiziert. Die Grundplatte mit den Schwanzfasern und Spikes dienen dem Phagen als Erkennungssensoren für den Wirt<sup>15,18</sup> (Abbildung verändert entnommen aus M. L. YAP *et al.*<sup>19</sup>).

Solch eine Grundstruktur weisen allerdings nicht alle Bakteriophagen auf, so unterscheidet sich beispielsweise die Morphologie des Phage M13 deutlich von denen der T-Serie. Der filamentöse Phage M13 verfügt über eine zirkuläre einzelsträngige DNA, welche von verschiedenen Hüllproteinen umgeben ist<sup>20</sup>. Neben den strukturellen Unterschieden weisen Bakteriophagen auch große Komplexitätsunterschiede zwischen ihren Genomen auf. Es reicht von kleinen kugelförmigen Phagen mit einem kleinen Genom, wie etwa der Phage  $\phi$ X174 mit rund 5000 Basenpaaren, bis hin zu einem großen und sehr komplexen Phagengenom, wie es der Phage  $\phi$ KZ mit etwa 280 000 Basenpaaren aufweist<sup>21,22</sup>.

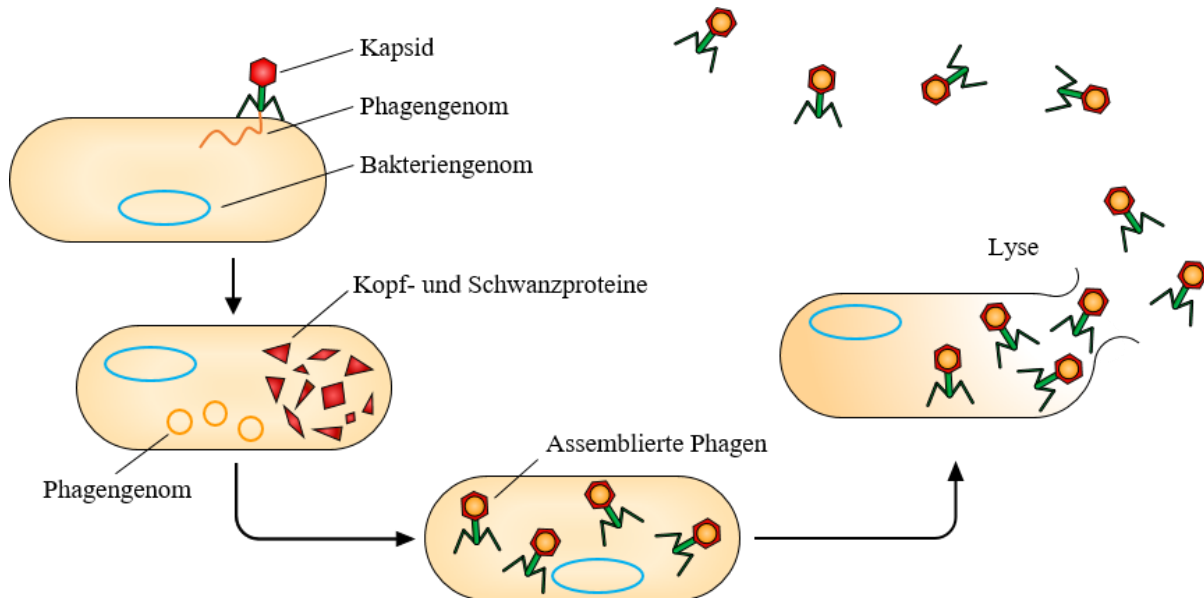
## 1.2 Lebenszyklen von Bakteriophagen

Bakteriophagen sind, wie alle Viren, nicht in der Lage sich selbst zu replizieren und sind daher auf den Syntheseapparat eines Wirtsorganismus angewiesen. Ein charakteristisches Merkmal von Phagen ist deren hohe Wirtsspezifität, wodurch sie auf bestimmte Bakterienspezies beziehungsweise Bakterienstämme beschränkt sind. In der ersten Phase ihres Vermehrungszyklus ermöglichen spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle die Adsorption des Phagen an seinen Wirt<sup>9,23,24</sup>. Als Phagenrezeptor können dabei nahezu alle Strukturen dienen, die sich auf der Oberfläche einer Bakterienzelle befinden<sup>23</sup>. Beispielsweise können Phagen an in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien verankerten Polysaccharidseitenketten binden oder an Teichonsäuren, den polymeren Bausteinen der Zellwand von Gram-positiven Bakterien<sup>23,25</sup>. Nach erfolgter Adsorption des Phagen wird dessen Nukleinsäure in den Wirt injiziert und die leere Proteinhülle des Phagen bleibt an der Außenseite der Zelle haften<sup>16</sup>. Die Penetration der Nukleinsäure ist dabei spezifisch für verschiedene Phagen<sup>26</sup>. Der Phage T4, welcher Gram-negative Bakterien befällt, erfährt nach seiner Adsorption zunächst eine Konformationsänderung seiner Grundplatte. Durch die nachfolgende Kontraktion der Schwanzhülle durchstößt dessen Schwanzrohr die äußere bakterielle Membran. Durch nachfolgende enzymatische Aktivität des Phagen T4 und der Fusion seiner Schwanzspitze mit der inneren Bakterienmembran wird die Phagen-DNA in den Wirt injiziert<sup>27-29</sup>. Je nach Phagenart wird nach dem Einschleusen der Nukleinsäure entweder der lytische oder der lysogene Vermehrungszyklus eingeschlagen. Phagenspezifische Proteine, welche nach der Infektion von dem Wirtsorganismus hergestellt werden, sind die Initiatoren für den entsprechenden Zyklus<sup>16,30</sup>.

### 1.2.1 Lytischer Zyklus

Virulente Bakteriophagen nutzen für ihre Vermehrung den lytischen Zyklus, welcher unumgänglich zur Lyse des bakteriellen Wirts führt (Abb. 2). Nach erfolgter Injektion ihrer Nukleinsäure gehen die Phagen in die sogenannte Latenzphase über. Während dieser Phase wird der gesamte Stoffwechsel des Bakterienwirts heruntergefahren. Die Wirtszelle wird dahingehend umprogrammiert, dass lediglich die einzelnen Phagenkomponenten synthetisiert werden<sup>16,30</sup>. Erst am Ende der Latenzphase erfolgt die Selbstassemblierung der Phagennachkommen, die dann zunächst intrazellulär akkumulieren<sup>30</sup>. Für die Freisetzung der neu assemblierten Phagen werden daraufhin weitere Phagen-codierte Proteine synthetisiert, welche für das Aufbrechen der Zellhülle der Bakterien notwendig sind<sup>31</sup>. In der letzten Phase

des lytischen Zyklus werden die Tochterphagen in die Umwelt entlassen, was in der Regel mit der Lyse des Bakterienwirts verbunden ist<sup>24,30</sup>. Die neuen Phagen können dann wiederum weitere Bakterien infizieren und ein neuer Vermehrungszyklus wird initiiert<sup>24</sup>.



**Abbildung 2: Lytischer Zyklus von Bakteriophagen**

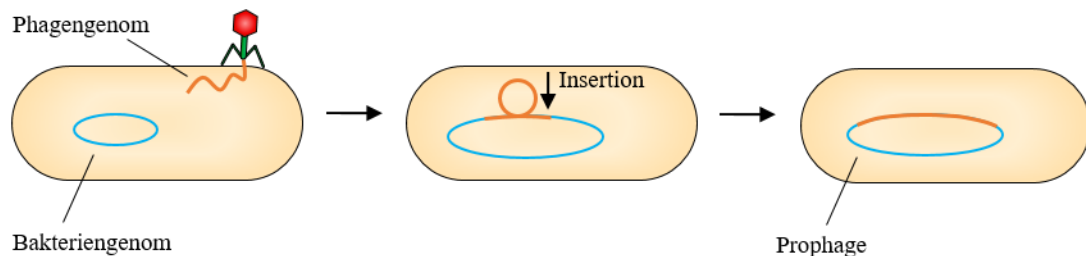
Virulente Bakteriophagen programmieren sofort nach der Penetration ihrer Nukleinsäure die Wirtszelle um, sodass diese mit der Produktion der Phagen nachkommen beginnt. In dieser Latenzphase stellt der Syntheseapparat des Bakterienwirts die notwendigen Kopf- und Schwanzproteine her und zudem wird das Phagen genom repliziert. Nach Selbstassemblierung der Tochterphagen akkumulieren diese zunächst in ihrem Wirt und durch anschließende Lyse der Bakterienzelle erfolgt deren Freisetzung<sup>16,24,30</sup> (Abbildung verändert entnommen aus R. FEINER *et al.*<sup>32</sup>).

### 1.2.2 Lysogener und pseudolysogener Zyklus

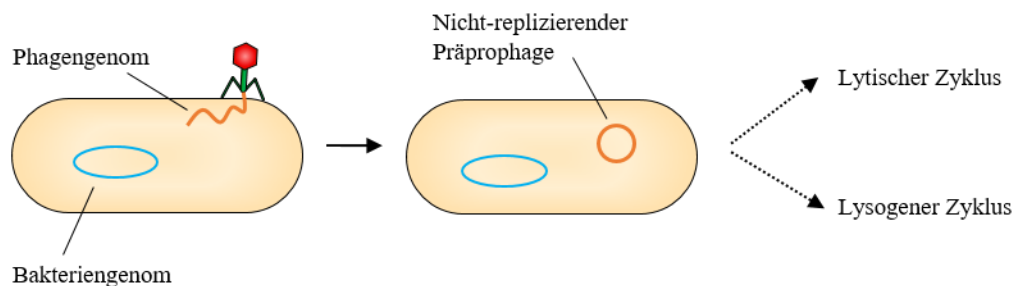
Temperente Bakteriophagen leiten hingegen nicht zwangsläufig die Lyse ihres Bakterienwirts ein, da sie neben dem lytischen Vermehrungszyklus auch den lysogenen Zyklus einschlagen können (Abb. 3A)<sup>33</sup>. Ein Großteil solcher Phagenpopulationen geht zunächst in den ruhenden, lysogenen Zyklus über und nur ein Bruchteil schlägt direkt zu Beginn den lytischen Zyklus ein<sup>16,33</sup>. Nach der Penetration ihrer Nukleinsäure in den Bakterienwirt integrieren temperente Phagen ihre Nukleinsäure in das bakterielle Genom. Der Phage ist in diesem Stadium nicht infektiös, sondern befindet sich in einer Art Ruhemodus. Phagenkomponenten werden in diesem Modus nicht von der Wirtszelle synthetisiert. Die Vermehrung solcher Phagen erfolgt im lysogenen Zyklus somit auf rein genetischer Ebene, da deren genetische Information synchron mit der bakteriellen Zellteilung verdoppelt und weitergegeben wird. Unter diesen Bedingungen wird der Phage als Prophage bezeichnet, der in dem lysogenen Bakterium die Fähigkeit zur Synthese neuer Bakteriophagen aufrechterhält<sup>33</sup>. Prophagen können aufgrund

verschiedener Umwelteinflüsse, wie beispielsweise UV-Licht, in den lytischen Vermehrungszyklus eintreten und mit der Produktion neuer Phagen beginnen<sup>16,33</sup>.

**A** Lysogener Zyklus



**B** Pseudolysogener Zyklus



**Abbildung 3: Lysogener und pseudolysogener Zyklus von Bakteriophagen**

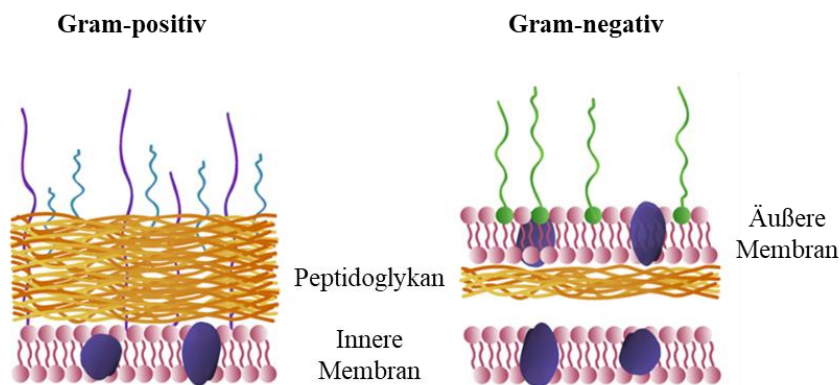
(A) Temperente Phagen können neben dem lytischen Zyklus auch den lysogenen Zyklus einschlagen. Die injizierte Nukleinsäure wird in das bakterielle Genom eingebaut, wodurch der Phage in einen ruhenden, nicht-infektiösen Zustand übergeht. Der sogenannte Prophage wird dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Bedingt durch verschiedene Umwelteinflüsse kann der Prophage in den lytischen Zyklus übergehen und mit der Produktion seiner Phagennachkommen durch die Wirtszelle beginnen<sup>16,33</sup>. (B) Bakteriophagen gehen in einen pseudolysogenen Zustand über, sofern ihr Bakterienwirt einem Nährstoffmangel ausgesetzt ist. Nach der Penetration ihrer Nukleinsäure erfolgt weder die Produktion der Phagennachkommen, noch wird das Phagen-genom in das bakterielle Genom integriert. Das Genom des Phagen verweilt im Bakterienwirt und wird als nicht-replizierender Präprophage bezeichnet. Sobald dem bakteriellen Wirt genügend Nährstoffe vorliegen, geht der Bakteriophage entweder in den lytischen oder lysogenen Zyklus über<sup>32-34</sup> (Abbildung verändert entnommen aus R. FEINER *et al.*<sup>32</sup>).

Bakteriophagen können hingegen auch in einen pseudolysogenen Zustand übergehen, bei dem sie sich in einem inaktiven, nicht-lysogenen Gleichgewicht mit ihrem Bakterienwirt befinden<sup>33,34</sup>. Sofern der Bakterienwirt einer Nährstoffknappheit ausgesetzt ist, schlagen Bakteriophagen eben diesen pseudolysogenen Zustand ein (Abb. 3B). Die unzureichende Nährstoffversorgung verhindert die Replikation der Nukleinsäure der Phagen sowie die Synthese der einzelnen Phagenkomponenten. Im Gegensatz zum lysogenen Zyklus wird das Phagen-genom auch nicht in das bakterielle Genom integriert, sondern verweilt als nicht-integrierter Präprophage<sup>32,34</sup>. Trotz ungünstiger Nährstoffbedingungen wird durch den pseudolysogenen Zustand das Überleben der Bakteriophagen ermöglicht. Sobald genügend Nährstoffe verfügbar sind, kann der Bakteriophage in den lytischen oder lysogenen Zustand

übergehen. Aufgrund fehlender Replikation während des pseudolysogenen Zyklus wird der Präprophage allerdings nach der Zellteilung an nur eine Tochterzelle weitergegeben<sup>34</sup>.

### 1.3 Freisetzungsstrategien von Bakteriophagen

Im letzten Schritt des lytischen Zyklus werden die neu assemblierten Bakteriophagen in die Umwelt freigesetzt. Hierzu müssen die Phagennachkommen die physischen Barrieren der Zellhülle ihrer Wirtsorganismen überwinden. Handelt es sich bei dem Wirt um Gram-positive Bakterien, so besteht deren Zellhülle aus der inneren Cytoplasmamembran sowie dem Peptidoglykan. Bei Gram-negativen Wirtszellen müssen die Phagen zusätzlich die äußere Membran durchdringen (Abb. 4)<sup>35</sup>.

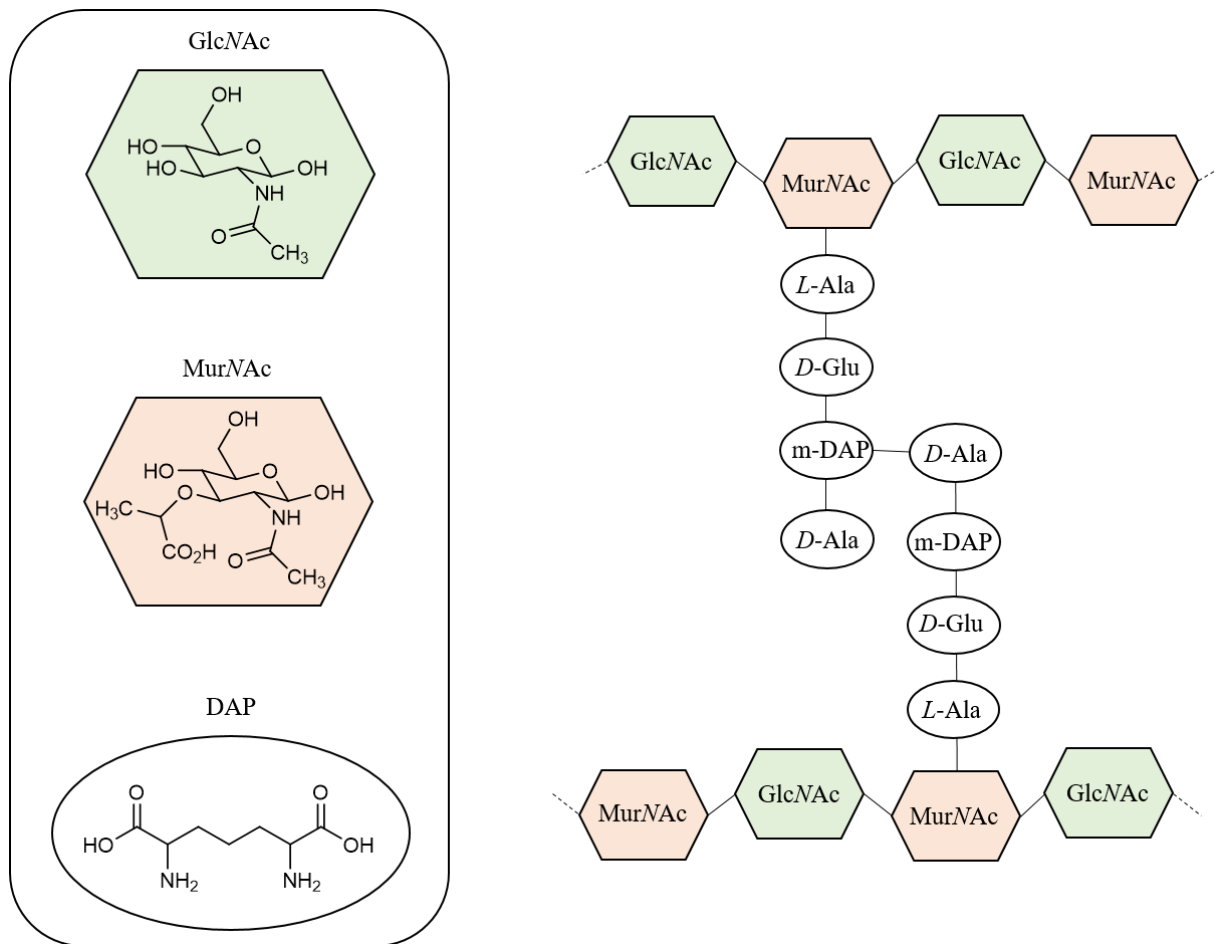


**Abbildung 4: Aufbau der Zellhülle von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien**

Die Zellhülle von Gram-positiven Bakterien ist aus der inneren Membran sowie dem Peptidoglykan aufgebaut. Gram-negative Bakterien verfügen über eine zusätzliche äußere Membran, weshalb ihre Peptidoglykanschicht wesentlich dünner ist, verglichen zu der in Gram-positiven Bakterien. Verschiedene in der Membran verankerte Proteine sind sowohl in der inneren als auch in der äußeren Membran integriert (lila). In Gram-positiven Bakterien ist das Peptidoglykan zusätzlich durch Lipoteichonsäuren (geschwungene lila Linien) und Wandteichonsäuren (türkis) vernetzt. Auf der Außenseite der äußeren Membran in Gram-negativen Bakterien befinden sich Lipopolysaccharide (grün)<sup>36-38</sup> (Abbildung verändert entnommen aus W. PAJERSKI *et al.*<sup>39</sup>).

Die innere Membran von Bakterien, auch Cytoplasmamembran genannt, ist eine hydrophobe Phospholipiddoppelschicht, in welcher verschiedenste Membranproteine integriert sind. Die genaue Lipidzusammensetzung der Membran variiert je nach Bakterium<sup>37</sup>, so setzt sich beispielsweise die innere Membran von *Escherichia coli* (*E. coli*) aus 70-80 % Phosphatidylethanolamin (POPE), 15-20 % Phosphatidylglycerol (POPG) und 5 % oder weniger Cardiolipin zusammen<sup>40,41</sup>. Bei den zusätzlich vorhandenen Membranproteinen handelt es sich entweder um integrale Membranproteine, welche über ihre  $\alpha$ -helikale Transmembrandomäne (TMD) in die Membran eingelagert sind, oder um Lipoproteine<sup>37</sup>. Ein weiteres wichtiges Element der Zellhülle von Bakterien stellt das Peptidoglykan (Murein)

dar, welches für die Stabilisierung der definierten Zellform sorgt und dem osmotischen Druck standhält. Je nach Bakterienart variiert dessen Schichtdicke und chemische Zusammensetzung<sup>25</sup>. Im Allgemeinen ist das Murein aus den beiden Zuckerderivaten *N*-Acetylglycosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc) aufgebaut, welche alternierend  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpft sind und das Polysaccharidrückgrat des Peptidoglykans bilden<sup>25,36</sup>. Des Weiteren wird das Rückgrat über die *D*-Lactylgruppe der *N*-Acetylmuraminsäure über kurze Peptide quervernetzt. Die häufigste Zusammensetzung dieser kurzen Peptidsequenz ist *L*-Ala-*D*-Glu-Diaminopimelinsäure (DAP)-*D*-Ala, wobei die Vernetzung mit einer anderen Glykankette über das *D*-Ala an Position 4 und dem m-DAP an Position 3 einer anderen Kette erfolgt (Abb. 5)<sup>25</sup>.



**Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Peptidoglykans am Beispiel von Gram-negativen *E. coli* Bakterien**

Das Peptidoglykan ist aus den beiden Zuckerderivaten *N*-Acetylglycosamin (GlcNAc, grün) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc, orange) aufgebaut. Diese sind alternierend  $\beta$ -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft und bilden das Polysaccharidrückgrat des Peptidoglykans. Die Quervernetzungen des Rückgrats über kurze Peptide verleihen dem Peptidoglykan seine Struktur und Stabilität<sup>25,36</sup> (Abbildung verändert entnommen aus M. LOESSNER *et al.*<sup>42</sup>).



Den größten Anteil der Zellhülle in Gram-positiven Bakterien stellt das Peptidoglykan dar. Neben den bereits erwähnten Vernetzungen der Glykanketten sind in Gram-positiven Bakterien zusätzliche Verankerungen über polyanionische Teichonsäuren vorhanden. Innerhalb des Peptidoglykans sind Wandteichonsäuren lokalisiert und Lipoteichonsäuren sind kovalent an Glycolipide der Zellmembran gebunden und durchspannen das Murein<sup>25,38</sup>. Gram-negative Bakterien verfügen hingegen über eine wesentlich dünnere Mureinschicht mit einem geringeren Vernetzungsgrad<sup>25</sup>. Als eine weitere Schutzbarriere verfügen sie daher über eine äußere Zellmembran, die einerseits als Diffusionsbarriere dient und andererseits den Transport gelöster Stoffe ermöglicht<sup>37</sup>. Bei dieser äußeren Membran handelt es sich um eine asymmetrische Lipiddoppelschicht, welche sich aus Phospholipiden auf der Innenseite und Lipopolysacchariden auf der Außenseite sowie verschiedenen Membranproteinen zusammensetzt<sup>37,43</sup>. Die Zusammensetzung der Phospholipide unterscheidet sich nur geringfügig von der inneren Bakterienmembran. Beispielsweise sind in der äußeren Membran mehr gesättigte Fettsäuren und Phosphatidylethanolamine angereichert<sup>44</sup>. Die auf der Außenseite der Membran lokalisierten Lipopolysaccharide sind aus dem Lipid A, einem kurzen Kern-Oligosaccharid und einem O-Antigen-Polysaccharid mit unterschiedlicher Länge aufgebaut. Bei dem Lipid A handelt es sich um ein  $\beta$ -1,6-glykosidisch verknüpftes Disaccharid aus *N*-Acetylglucosaminphosphat, welches einen acylierten Fettsäurerest trägt. Das Kern-Oligosaccharid ist aus 2-Keto-3-desoxyoctonsäure sowie Heptosen und Hexosen aufgebaut<sup>45</sup>. Die in der äußeren Membran vorhandenen Proteine lassen sich in zwei verschiedene Gruppen gliedern, die Lipoproteine und die integralen äußeren Membranproteine, welche die äußere Membran durchspannen. Bei den in der äußeren Membran lokalisierten Membranproteinen handelt es sich um  $\beta$ -Fass Strukturen aus amphiphatischen antiparallelen  $\beta$ -Strängen und nicht um  $\alpha$ -helikale Strukturen wie in der Cytoplasmamembran von Bakterien<sup>37,46</sup>.

Nach der Assemblierung der neuen Phagen nutzen die verschiedenen Phagenarten unterschiedliche Strategien für deren Freisetzung. Einige wenige Bakteriophagen codieren für ein eigenes spezielles Sekretionssystem, über welches sie ihre Tochterphagen kontinuierlich aus dem Bakterienwirt herausschleusen. Der filamentöse Phage M13, der *E. coli* befällt, nutzt beispielsweise genau solch eine Strategie, bei der die Bakterien die Infektion überleben<sup>47,48</sup>. Im Vergleich dazu geht die Freisetzung der meisten Phagen mit der Lyse des Bakterienwirts einher, welche zum einen durch die Hemmung der Zellwandbiosynthese ausgelöst werden kann oder zum anderen durch komplexe Mechanismen, bei denen die Phagen für mehrere Proteine codieren, welche die Lyse des Wirts regulieren<sup>31</sup>.

### **1.3.1 Hemmung der Zellwandbiosynthese**

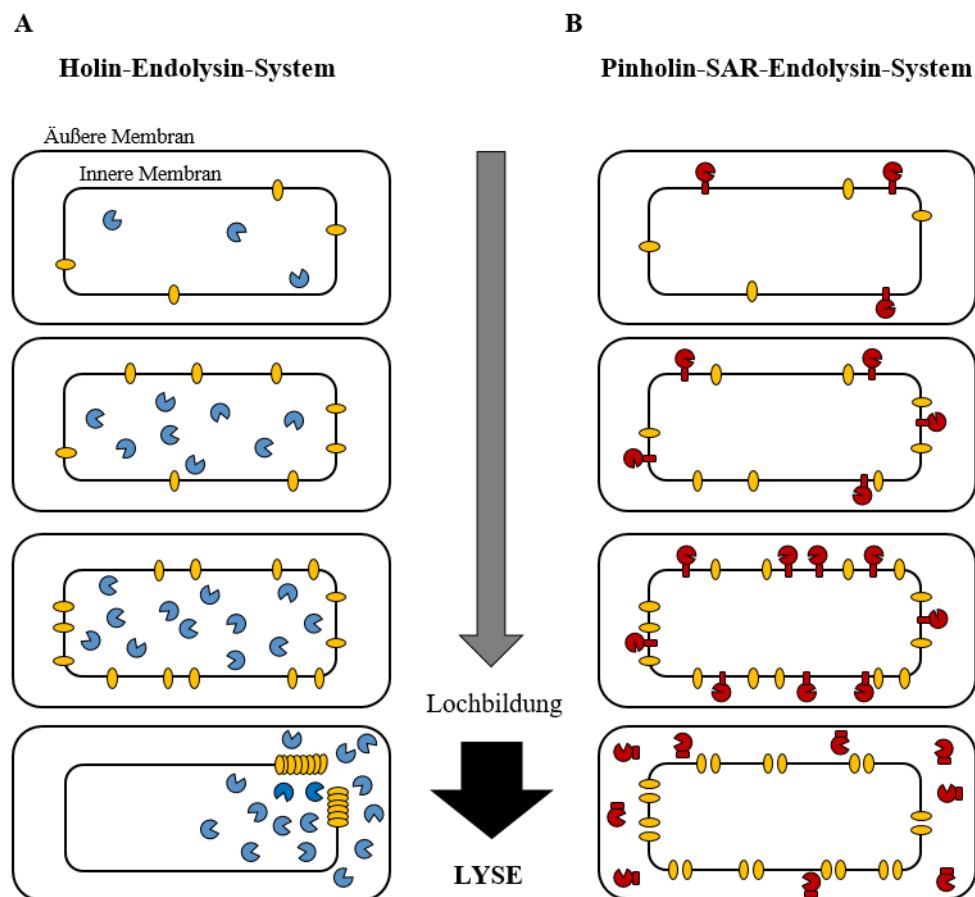
Kleine einzelsträngige RNA (ssRNA)- oder einzelsträngige DNA (ssDNA)-Phagen verwenden oftmals ähnliche Strategien wie manche bakterizide Antibiotika, welche die Zellteilung der Bakterien durch Inhibition der Zellwandbiosynthese beeinflussen<sup>49,50</sup>. Ein Beispiel stellt der ssDNA Coliphage  $\phi$ X174 dar, welcher für ein einziges Lyse-auslösendes Protein codiert. Bei diesem sogenannten E-Protein handelt es sich um ein Membranprotein, welches einen spezifischen Inhibitor der Phospho-MurNAc-pentapeptid-Translokase *MraY* darstellt. Dieses Enzym katalysiert die Synthese des Membran-assoziierten Intermediat Lipid I in der bakteriellen Zellwandsynthese. Aufgrund dieser Hemmung der Zellwandbiosynthese kann die Bakterienzelle dem inneren osmotischen Druck nicht mehr standhalten und es kommt schließlich zur Lyse der Wirtszelle und die Tochterphagen werden frei<sup>51,52</sup>.

### **1.3.2 Das kanonische Holin-Endolysin-System**

Eine häufige Strategie zur Freisetzung der neu assemblierten Phagen stellt das kanonische Holin-Endolysin-System dar. Lediglich zwei verschiedene Komponenten, das Holin und das Endolysin, sind hier an der Lyse der Wirtszelle beteiligt<sup>31,53</sup>. Detaillierte molekularbiologische und genetische Studien dieser beiden essentiellen Proteine, sowie Studien zur Regulation der Lyse wurden erstmals von R. YOUNG *et al.*<sup>31</sup> an dem Phagen  $\lambda$  durchgeführt.

Einige Minuten nach erfolgter Infektion der Wirtszelle mit dem Phagen  $\lambda$  beginnt diese mit der kontinuierlichen Expression der Gene der Lyse-Genkassette, welche zu den späten Genen gezählt werden. Bei dem exprimierten Holin S105 handelt es sich um ein kleines, aus 105 Aminosäuren bestehendes Membranprotein, welches sich während der Assemblierungsphase der Bakteriophagen in der Cytoplasmamembran seines Wirts als Homodimer einlagert<sup>53</sup>. Parallel dazu wird das kanonische Endolysin R synthetisiert. Dieses akkumuliert zunächst vollständig gefaltet und enzymatisch aktiv im Cytoplasma des Bakterienwirts. Endolysine sind muralytische Enzyme, welche unter anderem die  $\beta$ -1,4-glykosidischen Bindungen der Peptidoglykanschicht von bakteriellen Zellwänden hydrolysieren<sup>31,54</sup>. Etwa 50 min nach erfolgter Infektion haben die Holine eine kritische Konzentration in der Membran erreicht und die Lyse des Bakterienwirts wird durch Konformationsänderung der Holine eingeleitet. Durch die Umverteilung der kleinen Membranproteine bilden sich einige wenige unbewegliche Aggregate, sogenannte *Rafts*, die sich aus mehreren hunderten Holinen zusammensetzen<sup>54,55</sup>. R. WHITE *et al.*<sup>55</sup> postulieren, dass diese zweidimensionalen Holin-*Rafts* zu einer lokalen Depolarisation der Membran

führen, was wiederum eine erneute Änderung der Konformation bewirkt und sich Löcher mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 340 nm in der Cytoplasmamembran ausbilden<sup>56</sup>. Die entstandenen Löcher ermöglichen die Diffusion verschiedener Ionen und Proteine. Das kanonische Endolysin kann nun die innere Membran passieren und daraufhin mit dem Abbau des Peptidoglykans beginnen (Abb. 6A)<sup>55</sup>. Neben dem Phagen  $\lambda$  nutzen auch andere Bakteriophagen dieses System, so codieren sowohl der Phage P22, als auch der Coliphage P2 für ein entsprechendes Holin und ein kanonisches Endolysin<sup>57,58</sup>.



**Abbildung 6: Lysemechanismen zur Freisetzung der neu assemblierten Phagen**

Schematische Übersicht über zwei mögliche Strategien zur Freisetzung der Phagennachkommen, welche mit der Lyse des Bakterienwirts verbunden sind. (A) Im kanonischen Holin-Endolysin-System akkumulieren die Endolysine (blau) zunächst vollständig gefaltet und enzymatisch aktiv im Cytoplasma des Bakterienwirts. Die in der inneren Membran eingelagerten Holine (gelb) oligomerisieren, sobald sie eine kritische Konzentration erreicht haben. Durch diese Umverteilung der Holine bilden sich wenige große Löcher in der inneren Membran. Die kanonischen Endolysine können daraufhin die Membran passieren und das Peptidoglykan (hier nicht gezeigt) abbauen. (B) Im Pinholin-SAR-Endolysin-System sind hingegen die Endolysine (rot) über eine SAR-Domäne in einem inaktiven Zustand in der Membran verankert. Die Pinholine (gelb) oligomerisieren auch hier nach Erreichen einer kritischen Konzentration und bilden sehr kleine Läsionen, welche über die gesamte Membran verteilt sind. Infolgedessen kommt es zur Depolarisation der inneren Membran und die SAR-Endolysine werden freigesetzt, die dann entsprechend das Peptidoglykan abbauen<sup>31,59</sup> (Abbildung verändert entnommen aus R. YOUNG *et al.*<sup>59</sup>).

### 1.3.3 *Pinholin-SAR-Endolysin-System*

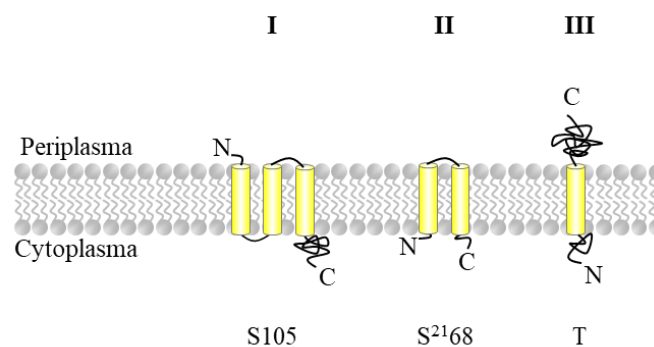
Über viele Jahre hinweg wurde das kanonische Holin-Endolysin-System als der universelle Mechanismus der Lyse von Bakterienzellen, die von doppelsträngigen DNA Phagen infiziert wurden, angesehen. Im Laufe der Zeit konnte jedoch gezeigt werden, dass eine größere Vielfalt an Endolysinen vorherrscht, welche unterschiedliche Lyse-Mechanismen nutzen. So verwenden einige Endolysine bei dem Transport über die innere Membran das wirtseigene Sekretionssystem. Das wohl bekannteste Beispiel eines Endolysins, welches über eine Exportsignalsequenz verfügt, ist das SAR (*Signal-Anchor-Release*)-Endolysin R<sup>21</sup> des lambdoiden Phagen  $\phi 21$ <sup>31,42,60</sup>. Dieses ist in seiner inaktiven Form über seine sogenannte SAR-Domäne in der inneren Membran verankert und wurde zuvor über das wirtseigene *sec*-Transportsystem über die innere Membran transportiert<sup>61-64</sup>. Erst durch die Depolarisation der inneren Bakterienmembran wird die N-terminale SAR-Domäne aus der Membran gelöst. Das freigesetzte und nun enzymatisch aktive Endolysin leitet daraufhin den Mureinabbau ein. Der Zeitpunkt der Lyse wird somit durch die Depolarisation der Membran und dem damit verbundenen Zusammenbruch der protonenmotorischen Kraft (PMF) eingeleitet<sup>63-65</sup>. Die Regulation dieses Zeitpunkts erfolgt bei dem Phagen  $\phi 21$  durch das Pinholin S<sup>21</sup><sup>68</sup>. Analog zu dem kanonischen Holin handelt es sich bei dem Pinholin um ein kleines Membranprotein, welches sich zunächst in seiner inaktiven Form in der Cytoplasmamembran anreichert. Nach Erreichen einer kritischen Konzentration der Pinholine in der Membran bilden diese Membranläsionen aus, welche in regelmäßigen Abständen über die innere Membran verteilt sind. Im Gegensatz zu kanonischen Holinen, welche wenige große Löcher ausbilden, weisen die von Pinholinen gebildeten Löcher lediglich einen Durchmesser von etwa 1,5 nm auf, weshalb sie auch als *pinholes* (Nadellöcher) bezeichnet werden. Letztendlich wird durch diese kleinen Löcher nur die Diffusion von Ionen über die Membran ermöglicht und größere Moleküle können diese Barriere nicht überwinden. Die innere Membran des Bakterienwirts wird folglich depolarisiert und die protonenmotorische Kraft bricht zusammen (Abb. 6B)<sup>31,63,66,67</sup>. Im Pinholin-SAR-Endolysin-System sind die für die Lyse notwendigen Gene ebenfalls auf einer Lyse-Genkassette gruppiert und werden zu den späten Genen gezählt<sup>60</sup>. Dieser Lysemechanismus wurde unter anderem auch in dem Bakteriophagen  $\phi$ KMV mit seinem Pinholin KMV44 und dem zunächst membrangebundenen Endolysin KMV45 entdeckt<sup>68</sup>.

## 1.4 Komponenten der lytischen Systeme

Bakteriophagen ist es nicht möglich sich selbst zu replizieren, weshalb sie hierfür die Proteinbiosynthesemaschinerie ihrer Wirtszelle nutzen. Die neu assemblierten Phagen müssen daraufhin die einzelnen Barrieren der Bakterienhülle überwinden<sup>35</sup>. Hierfür codieren Phagen verschiedene Komponenten, welche sich in ihrer Gesamtheit zu einem komplexen und fein aufeinander abgestimmten Lysesystem zusammensetzen<sup>31</sup>.

### 1.4.1 Holine

Holine sind kleine integrale Membranproteine, die über ihre  $\alpha$ -helikalen TMDs in die Cytoplasmamembran ihres Wirts eingelagert sind. Ihre Funktion besteht in der Regulation des Zeitpunkts der Lyse während des lytischen Zyklus von Bakteriophagen<sup>69,70</sup>. Die für Holine codierenden Gene weisen eine unglaubliche Diversität auf und besitzen dennoch alle dieselbe Funktion. Somit zählen Holine mit etwa 150 verschiedenen Holingenen zu der diversesten Gruppe an Genen in der Biologie, welche sich in 58 anerkannte Familien gliedern lassen<sup>71-73</sup>. Die Einteilung der Holine erfolgt in drei verschiedene Klassen, die sich bezogen auf die Anzahl an TMDs unterscheiden (Abb. 7)<sup>69,71</sup>.



**Abbildung 7: Holinklassen**

Holine sind kleine Membranproteine, die über TMDs in die innere Membran des Bakterienwirts eingelagert sind. Gegliedert werden Holine in drei unterschiedliche Klassen, wobei die Einteilung anhand der Anzahl putativer TMDs erfolgt. Prototyp der Holinklasse I, welcher über drei insertierte TMDs verfügt, ist das Holin S105 des Phagen  $\lambda$ . Das Pinholin S<sup>2168</sup> des Phagen  $\phi$ 21 mit seinen zwei TMDs ist der bekannteste Vertreter der Klasse II. Holine mit nur einer eingelagerten TMD werden in die Holinklasse III eingeteilt. Ein Beispiel für diesen Strukturtyp ist das Holin T des Phagen T4<sup>69,74</sup> (Abbildung verändert entnommen aus I. WANG *et al.*<sup>69</sup>).

Holine der Klasse I weisen drei, über  $\beta$ -Schleifen miteinander verbundene TMDs mit einer N<sub>out</sub>-C<sub>in</sub> Topologie auf. Sie verfügen über einen unstrukturierten, relativ langen C-Terminus und einem kurzen periplasmatischen Segment<sup>69,75</sup>. Der Prototyp dieser Holinklasse ist das kanonische Holin S105 des Phagen  $\lambda$ . Während des lytischen Zyklus des Bakteriophagen akkumulieren solche Holine zunächst inaktiv in der inneren Membran ihres Bakterienwirts.

Nach Erreichen einer kritischen Konzentration an Holinen oligomerisieren diese und bilden große Löcher aus. Diese Membranpermeabilisierung ermöglicht die Freisetzung der muralytischen Endolysine in das Periplasma<sup>54,55</sup>.

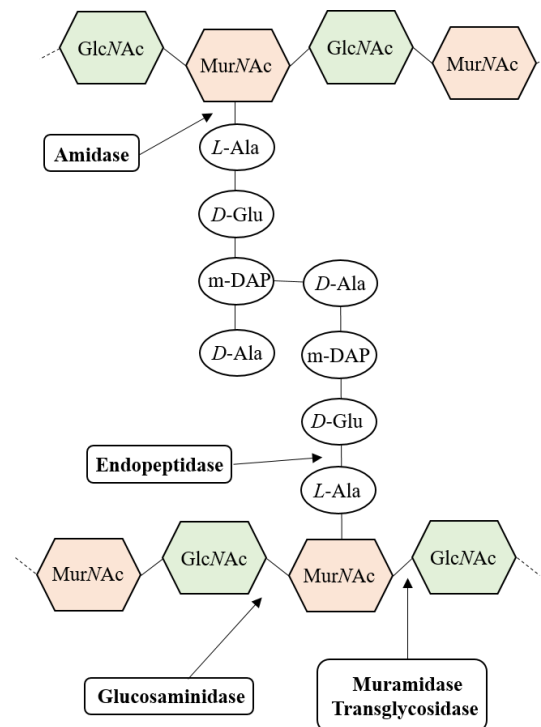
Sofern Holine über zwei TMDs verfügen werden sie in die Holinklasse II eingeteilt. Das bekannteste Beispiel ist das Pinholin S<sup>2168</sup> des Phagen  $\phi$ 21, dessen Termini beide ins Cytoplasma weisen (N<sub>in</sub>-C<sub>in</sub>-Topologie) und zunächst ebenfalls inaktiv in der Membran akkumuliert<sup>69,76</sup>. Im Gegensatz zu Holinen der Klasse I bilden Pinholine nach Erreichen einer kritischen Konzentration viele kleine Läsionen in der inneren Membran des Bakterienwirts aus, welche die Depolarisation der Membran zur Folge haben<sup>31,66,67</sup>. Das dazugehörige Endolysin ist über seine SAR-Domäne in der inneren Membran verankert und wird durch die Depolarisation der Membran ins Periplasma freigesetzt. Diese Holinart weist folglich eine rein regulatorische Funktion auf<sup>63-65</sup>.

Trotz lediglich einer TMD können sich Holine der Klasse III zu großen Löchern in der Cytoplasmamembran zusammenlagern. Dabei ist die große, zum Periplasma gerichtete C-terminale Domäne essentiell für die Oligomerisierung. Verglichen zu den Holinen der anderen beiden Klassen, ist das Holin T des Phagen T4 mit einer Länge von 218 Aminosäuren relativ groß und hydrophil<sup>74,77</sup>.

### **1.4.2 Endolysine**

Hydrolytische Enzyme, welche analog zu den Holinen von Phagen codiert werden und gegen das Peptidoglykan der Wirtszelle gerichtet sind, werden als Endolysine bezeichnet<sup>31</sup>. Endolysine greifen spezifisch unterschiedliche Bindungen im Peptidoglykan des bakteriellen Wirts an<sup>25,42</sup>. Durch die dadurch verursachte Degradation des Mureins wird dieses destabilisiert und letztendlich kann das Murein dem osmotischen Druck nicht mehr standhalten und die neu assemblierten Tochterphagen werden freigesetzt<sup>31</sup>. Die Klassifizierung dieser muralytischen Enzyme erfolgt auf Grundlage der Bindungsart, die sie im Peptidoglykan spalten (Abb. 8). Endolysine, welche die  $\beta$ -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen den beiden Zuckerderivaten *N*-Acetylglycosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc) spalten, werden als Glycosidasen bezeichnet. Sofern die glykosidischen *N*-Acetylmuramoyl- $\beta$ -1,4-*N*-acetylglucosamin Bindungen in dem Polysaccharidrückgrat des Peptidoglykans gespalten werden, werden die Endolysine als Muramidasen und Transglycosidasen bezeichnet. Die zweite glykosidische Bindung im Polysaccharidrückgrat, die *N*-Acetylglycosaminyl- $\beta$ -1,4-*N*-acetylmuramin Bindung, wird durch die entsprechende Glucosaminidase gespalten.

Andere Endolysine, wie die *N*-Acetylmuramoyl-*L*-alanin-amidase, wirken hingegen als Amidasen und hydrolysieren die Amidbindung zwischen den Zuckermolekülen und den Peptidresten. Die letzte Endolysinklasse weist eine Endopeptidase-Aktivität auf und spaltet die Bindungen zwischen den Peptiden im Peptidoglykan<sup>31,42</sup>. Der Großteil an Endolysinen kann lediglich eine spezifische Bindung des Peptidoglykans spalten. Einige wenige Endolysine verfügen jedoch über eine multiple enzymatische Aktivität. So wirkt beispielsweise das Endolysin des Phagen  $\phi 11$  sowohl als *D*-Alanin-glycyl-endopeptidase, als auch als *N*-Acetylmuramoyl-*L*-alanin-amidase<sup>78</sup>.

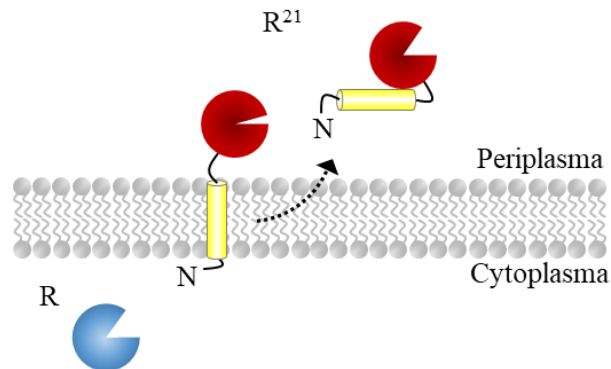


**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Angriffspunkte der Endolysine im Peptidoglykan von *E. coli***

Das Peptidoglykan ist unter anderem aus den beiden alternierend miteinander verknüpften Zuckerderivaten *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc) aufgebaut. Diese glykosidischen Bindungen des Polysaccharidrückgrats können durch *N*-Acetyl- $\beta$ -*D*-muramidasen und Transglycosidasen, sowie durch *N*-Acetyl- $\beta$ -*D*-glucosaminidasen gespalten werden. Amidasen hydrolysieren hingegen die Bindungen zwischen den Zuckermolekülen und den Peptiden. Endopeptidasen spalten die Peptidbindungen innerhalb des Peptidoglykans<sup>31,42</sup> (Abbildung verändert entnommen aus M. J. LOESSNER *et al.*<sup>42</sup>).

Die Regulation der enzymatischen Aktivität der Endolysine erfolgt durch ihr entsprechendes Holin. Beispielsweise akkumuliert das kanonische Endolysin R des Phagen  $\lambda$  zunächst enzymatisch aktiv im Cytoplasma der Wirtszelle (Abb. 9). Dessen Freisetzung ins Periplasma erfolgt im Endstadium des Reproduktionszyklus des Phagen durch die Bildung von großen Löchern in der inneren Bakterienmembran durch das Holin S105<sup>31,54,55</sup>. Das Endolysin R<sup>21</sup> des lambdoiden Phagen  $\phi 21$  verfügt hingegen über eine N-terminale SAR-Domäne, durch die es in der Cytoplasmamembran des Wirts verankert ist (Abb. 9). Nach erfolgter Expression des

Endolysins werden dieses durch das wirtseigene *sec*-Transportsystem über die innere Membran transportiert, wobei die SAR-Domäne als Erkennungssequenz dient. Nach der Sekretion bleibt das SAR-Endolysin einem membrangebundenen Zustand, da seine Transmembrandomäne im Vergleich zu anderen sekretorischen Enzymen nicht durch eine Peptidase abgespalten wird<sup>62,63,79</sup>. Erst durch eine Konformationsänderung, ausgelöst durch die Depolarisation der inneren Membran und der anschließenden Freisetzung der SAR-Domäne, kann das nun enzymatisch aktive Endolysin das Peptidoglykan des Bakterienwirts abbauen<sup>62,64,65</sup>. Die Depolarisation und somit der Zeitpunkt der Lyse wird genauestens durch das Pinholin S<sup>21</sup>68 reguliert. Dieses bildet kleine, über die gesamte innere Membran verteilte Läsionen aus, welche die Diffusion von Ionen ermöglichen und letztendlich den Zusammenbruch der PMF verursachen<sup>31,65</sup>.



**Abbildung 9: Prototypen der Endolysine**

Das kanonische Endolysin R (blau) des Phagen  $\lambda$  akkumuliert während des lytischen Zyklus zunächst enzymatisch aktiv im Cytoplasma des Bakterienwirts und kann erst durch die Bildung großer Löcher durch das Holin S105 die innere Membran überwinden<sup>31,54,69</sup>. Das von dem Phagen  $\phi$ 21 codierende Endolysin R<sup>21</sup> (rot) ist im Vergleich dazu in einer inaktiven Form über eine SAR-Domäne (gelb) in der inneren Membran verankert. Dessen Freisetzung ins Periplasma und die anschließende enzymatische Aktivierung durch eine Konformationsänderung erfolgt durch Depolarisation der Cytoplasmamembran, welche durch das Pinholin S<sup>21</sup>68 hervorgerufen wird<sup>60,65,69</sup> (Abbildung verändert entnommen aus R. YOUNG *et al.*<sup>59</sup>).

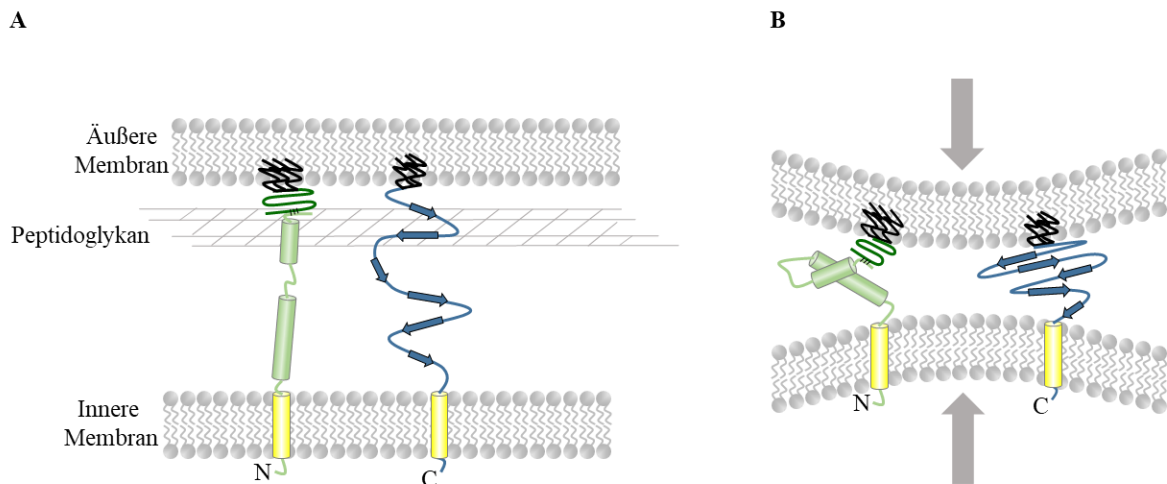
Im Laufe der Zeit wurden weitere Endolysine mit Exportsignalsequenzen entdeckt, welche teilweise unterschiedliche Wirkmechanismen aufweisen. Das Endolysin des Phagen  $\phi$ gle, welches *Lactobacillus plantarum* befällt, verfügt beispielsweise ebenfalls über eine intrinsische Signalsequenz, die den Transport über die innere Membran ermöglicht<sup>80</sup>. Interessanterweise wurden auch Endolysine entdeckt, wie von dem *E. coli* Phagen P1, die Holin-unabhängig die Wirtszelle lysieren können. Seine N-terminale Transmembrandomäne ist dabei sowohl für dessen Export über die Membran, als auch für die Freisetzung in das Periplasma essentiell<sup>61,62</sup>. Aufgrund der hohen Substratspezifität und ihrer beeindruckenden Effizienz finden Endolysine mittlerweile auch Anwendung in der Lebensmittelwissenschaft, der Biotechnologie sowie der Medizin<sup>81,82</sup>. Beispielsweise werden Endolysine während der



Lebensmittelproduktionskette hinzugefügt, um eine Kontamination der Lebensmittel durch pathogene Bakterien zu verhindern. Das Endolysin LysH5 des Bakteriophagen  $\phi$ H5 kann pasteurisierter Kuhmilch zugesetzt werden, wodurch das Wachstum von *Staphylococcus aureus* effektiv inhibiert wird<sup>83</sup>.

### 1.4.3 *Spanine*

Gram-negative Bakterien verfügen neben der inneren Membran und dem Peptidoglykan zusätzlich über eine äußere Membran, wodurch die Freisetzung der neu assemblierten Tochterphagen nicht allein durch Holine und Endolysine realisiert werden kann<sup>31,84</sup>. Diese asymmetrische Lipiddoppelschicht, bestehend aus Phospholipiden und Lipopolysacchariden, muss folglich ebenfalls zerstört werden, damit die Phagennachkommen in die Umwelt entlassen werden können<sup>43</sup>. Ermöglicht wird dies durch eine weitere funktionelle, von Phagen-codierte Proteinklasse, den Spaninen. Der aus zwei Untereinheiten bestehende RzRz1-Komplex der beiden gut untersuchten Phagen  $\lambda$  und  $\phi$ 21 zählt zu den bekanntesten und momentan am besten charakterisiertesten Spaninen<sup>84-86</sup>. Das *rz*-Gen codiert dabei für ein integrales Membranprotein mit einer periplasmatischen Domäne (i-Spanin). Seine N-terminale Transmembrandomäne ist in der inneren Membran des Bakterienwirts eingebettet und die beiden im Periplasma lokalisierten  $\alpha$ -Helices sind über einen Linker miteinander verbunden (Abb. 10A)<sup>84</sup>. Die zweite Untereinheit des Komplexes, ein über lipoylierte N-terminale Cysteinreste in der äußeren Membran verankertes Lipoprotein (o-Spanin), wird von dem *rzI*-Gen codiert<sup>84,87,88</sup>. Der RzRz1-Komplex wird durch Interaktionen der C-terminalen Enden der beiden Spanine miteinander gebildet und durchspannt das gesamte Periplasma. Über drei intermolekulare Disulfidbrückenbindungen bildet dieser Komplex Homodimere aus und aufgrund der Vernetzung im Peptidoglykan erweist sich der Komplex als relativ steif<sup>84,86,89</sup>. Nachdem die entsprechenden Endolysine die bakterielle Zellwand abgebaut haben, können die Spanin-Komplexe im Periplasma seitlich frei diffundieren und es erfolgt eine Konformationsänderung. Die beiden  $\alpha$ -helikalen Segmente der i-Spanine bilden nun polymere Doppelwendel (*coiled-coil*)-Strukturen aus. Vermutungen legen nahe, dass durch die Oligomerisierung der Spanine die äußere und innere Membran in räumliche Nähe gebracht werden und diese anschließend fusionieren können (Abb. 10B)<sup>59,90-93</sup>.



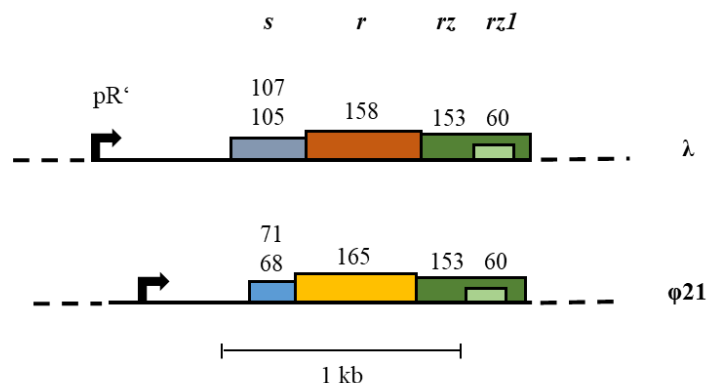
**Abbildung 10: Modell der Spanin-Strukturen und des Mechanismus der Zerstörung der äußeren Membran**  
**(A)** Spanine durchspannen das gesamte Periplasma und verbinden dadurch die innere und äußere Membran des Bakterienwirts miteinander. Das o-Spanin (dunkelgrün) des RzRz1-Komplex ist ein in der äußeren Membran verankertes Lipoprotein. Das i-Spanin (hellgrün) ist ein integrales Membranprotein mit einer  $\alpha$ -helikalen periplasmatischen Domäne. Über C-terminale Wechselwirkungen treten diese beiden Spanine in Kontakt. U-Spanine (dunkelblau) sind sowohl in der inneren als auch in der äußeren Membran verankert und ihre periplasmatische Domäne besteht aus ausgedehnten  $\beta$ -Strängen<sup>84,88,93</sup>. **(B)** Nach Abbau des Peptidoglykans können Spanine seitlich frei diffundieren und eine Konformationsänderung wird ermöglicht. Die dadurch vermittelte Oligomerisierung der Spanine ermöglicht vermutlich die Fusion der inneren und äußeren Membran<sup>84,91-93</sup> (Abbildung verändert entnommen aus R. YOUNG *et al.*<sup>59</sup>).

Die Mehrheit der Phagen, die Gram-negative Bakterien befallen, verfügt über eben dieses Zweikomponenten Spanin-System. Dennoch gibt es einige wenige Bakteriophagen bei denen lediglich ein einziges Spanin-Protein für die Zerstörung der äußeren Membran verantwortlich ist. Beispielsweise ist das unimolekulare Spanin (u-Spanin) gp11 des Phagen T1 zugleich in der inneren, als auch der äußeren Membran verankert. Durch eine C-terminale transmembrane Ankerregion ist es in die innere Membran eingelagert und lipoylierte N-terminale Cysteinreste ermöglichen die Einlagerung in die äußere Membran (Abb. 10A). Seine periplasmatische Domäne besteht aus ausgedehnten  $\beta$ -Strängen ( $\beta$ -strands)<sup>85,88,93</sup>. Es wird vermutet, dass die u-Spanine nach dem Endolysin-vermittelten Abbau des Peptidoglykans oligomerisieren und es dadurch zu einer Konformationsänderung kommt. Die nun vorliegenden  $\beta$ -Faltblätter oder  $\beta$ -Fässer ( $\beta$ -barrels) würden die Länge der periplasmatischen Domäne dramatisch verkürzen, was letztendlich eine Membranfusion ermöglichen würde (Abb. 10B)<sup>88,93</sup>. Analog zu dem RzRz1-Komplex wird somit die vollständige Lyse Gram-negativer Bakterienwirte ermöglicht und die neu assemblierten Tochterphagen können freigesetzt werden<sup>59</sup>.

### 1.5 Regulation der Lyse

Der letzte Schritt im Infektionszyklus von lytischen Bakteriophagen ist die Lyse der Bakterienwirtszelle, um die neu assemblierten Tochterphagen freizusetzen. Die Regulation des Zeitpunkts der Lyse ist dabei von enormer Bedeutung, da die Anzahl der Phagennachkommen davon abhängt. Bei verfrühter Lyse sind die einzelnen Phagenpartikel noch nicht vollständig assembliert und können nicht freigesetzt werden. Falls die Tochterphagen hingegen längere Zeit im Bakterienwirt verweilen, würde der Vermehrungsprozess der Phagen durch Neubefall weiterer Wirte verlangsamt. Zudem bestünde die Gefahr einer erneuten Infektion des Wirts, wodurch die eigentliche Produktion neuer Phagen gestört werden würde<sup>31,60,94</sup>.

Die Regulation der Lyse des Bakterienwirts beginnt durch die zeitlich abgestimmte Expression der Lyse-Gene bereits auf genomischer Ebene. Die verschiedenen Gene sind in einer sogenannten Lyse-Genkassette gruppiert, wo sie von dem späten Promotor pR' reguliert werden. Die Genkassetten aus den beiden gut untersuchten Lyse-Systemen des Phagen  $\lambda$  und des lambdoiden Phagen  $\phi 21$  sind aus vier verschiedenen Genen aufgebaut, welche für fünf Proteine codieren (Abb. 11)<sup>59,60</sup>.



**Abbildung 11: Lyse-Genkassette des Phagen  $\lambda$  und des lambdoiden Phagen  $\phi 21$**

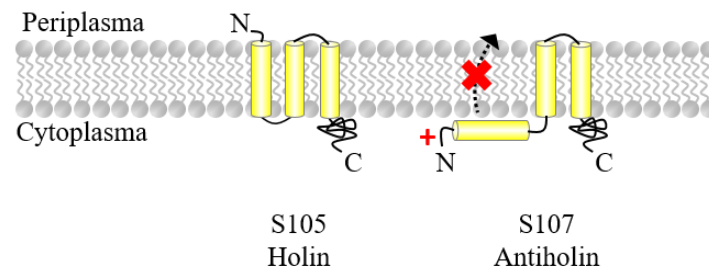
Die Lyse-Genkassette des Phagen  $\lambda$  (oben) und des Phagen  $\phi 21$  (unten) setzt sich aus vier verschiedenen Genen zusammen, die unter der Kontrolle des späten Promotors pR' stehen. Das *s*-Gen codiert für das Holin S105 des Phagen  $\lambda$  (blaugrau) beziehungsweise für das Pinholin S<sup>2168</sup> des Phagen  $\phi 21$  (blau). Aufgrund des doppelten Startmotivs des *s*-Gens codiert es zusätzlich für die Inhibitoren der Lyse, dem Antiholin S107 beziehungsweise dem Antipinholin S<sup>2171</sup>. Das *r*-Gen codiert für das entsprechende kanonische Endolysin R des Phagen  $\lambda$  (orange) und beim Phagen  $\phi 21$  für das SAR-Endolysin (gelb). Die *rz*- und *rzI*-Gene codieren jeweils für den Spanin-Komplex (grün, hellgrün). Die Länge der einzelnen Aminosäuresequenzen der Proteine kann aus den Zahlen über den Genbereichen entnommen werden<sup>31,59,60,84</sup> (Abbildung verändert entnommen aus R. YOUNG *et al.*<sup>59</sup>).

Das *s*-Gen ist das erste Gen der Lyse-Genkassette und codiert bei beiden Phagen für die Lyse-Effektoren. Bei dem Phagen  $\lambda$  ist dies das Holin S105 und bei dem Phagen  $\phi 21$  wird die Lyse durch das Pinholin S<sup>2168</sup> eingeleitet<sup>31,60</sup>. Die erste Besonderheit dieser Genkassette ist das doppelte Startmotiv des *s*-Gens. Durch ein zweites, vorgelagertes Methionin wird ein zweites Holin-Protein, das sogenannte Antiholin, synthetisiert. Das Antiholin S107 des Phagen  $\lambda$  und

das Antipinholin S<sup>21</sup>71 des Phagen  $\phi$ 21 besitzen einen inhibitorischen Charakter, da sie durch Dimerisierung mit ihren entsprechenden Holinen lytisch inaktive Heterodimere ausbilden und somit die Lochbildung in der Cytoplasmamembran verzögern. Die Antiholine regulieren durch die verzögerte Ausbildung der Löcher in der Cytoplasmamembran somit die Lyse des Bakterienwirts<sup>67,75,76,95</sup>. Durch das Zusammenspiel der Holine mit den Antiholinen kann die Lyse auch auf Proteinebene reguliert werden<sup>69</sup>. Auf das *s*-Gen der Lyse-Genkassette folgt das *r*-Gen, welches für ein muralytisches Enzym codiert. Das kanonische Endolysin R des Phagen  $\lambda$  und das SAR-Endolysin R<sup>21</sup> des Phagen  $\phi$ 21 bauen nach der Initiation der Lyse das Peptidoglykan des Bakterienwirts ab<sup>31,60</sup>. Im Falle von Gram-negativen Bakterien muss zusätzlich noch die äußere Membran permeabilisiert werden, was durch den Spanin-Komplex RzRz1 realisiert wird. Die dafür codierenden Gene liegen am Ende der Genkassette, wobei sich das Leseraster des *rzI*-Gens innerhalb des *rz*-Gens befindet, was eine weitere Besonderheit dieser Genkassette darstellt<sup>84,96,97</sup>.

### ***1.5.1 Regulation im kanonischen Holin-Endolysin-System***

Das kanonische Holin S105 aus dem Phagen  $\lambda$  ist mit seinen drei TMDs in der Cytoplasmamembran des Bakterienwirts lokalisiert (Abb. 12). Voraussetzung ihrer lytischen Aktivität ist dabei die Lokalisation aller TMDs mit einer N<sub>out</sub>-C<sub>in</sub> Topologie in der Membran<sup>31,69,76</sup>. Holine lagern sich zu Homodimeren zusammen, wodurch deren Oligomerisierung und die damit verbundene Aggregatbildung in der inneren Membran ermöglicht wird. Diese Aggregate bilden daraufhin einige wenige große Löcher in der inneren Membran des Bakterienwirts aus, wodurch diese permeabilisiert wird. Das dazugehörige, ebenfalls vom *s*-Gen codierende Antiholin S107 ist im Vergleich zum Holin N-terminal um die beiden Aminosäuren Methionin und Lysin verlängert<sup>55,60,75</sup>. Die zusätzliche positive Ladung am N-Terminus durch die Lysin-Seitenkette ermöglicht ionische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Lipiden der Cytoplasmamembran des Wirts. Diese Interaktion verhindert jedoch die Einlagerung der TMD1 des Antiholins in die innere Membran (Abb. 12)<sup>75</sup>. Dennoch kann das nicht vollständig in der Membran integrierte Antiholin dimerisieren, wobei es sich bevorzugt mit Holinen zusammenlagert. Die gebildeten Heterodimere sind jedoch nicht zu einer Oligomerisierung befähigt und erweisen sich dadurch als natürliche Inhibitoren. Diese lytisch inaktiven Heterodimere regulieren somit die Lyse des Bakterienwirts, da sie ein zu frühes Auslösen der Lyse verhindern<sup>60,75</sup>.



**Abbildung 12: Membrantopologie des Holins S105 und des Antiholins S107 des Phagen  $\lambda$**

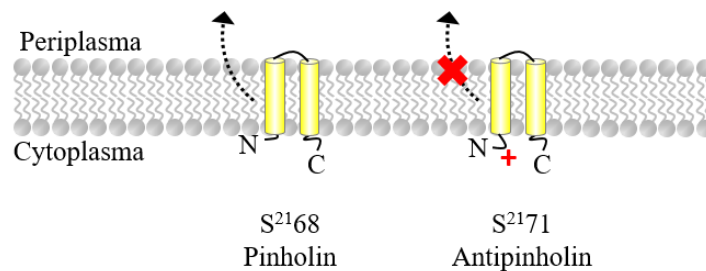
Die drei TMDs des kanonischen Holins S105 des Phagen  $\lambda$  sind mit einer  $N_{out}-C_{in}$  Topologie in der inneren Bakterienmembran lokalisiert. Sofern alle drei TMDs in der Membran eingebettet sind, wird die Ausbildung von Holin-Dimeren ermöglicht. Deren anschließende Oligomerisierung und *raft*-Bildung führen zur Ausbildung von großen Löchern in der Membran. Das Antiholin S107 ist N-terminal um zwei Aminosäuren verlängert, wodurch es eine zusätzliche positive Ladung erhält und die Einlagerung der TMD1 in die Membran verhindert wird. Das Antiholin bildet bevorzugt Heterodimere mit Holinen aus, welche sich jedoch als inaktiv erweisen und die Lyse verzögern<sup>59,60,75</sup> (Abbildung verändert entnommen aus R. YOUNG *et al.*<sup>59</sup>).

Sobald ein Überschuss an Holinen in der inneren Membran vorliegt und die aktiven Holin-Homodimere eine kritische Konzentration überschritten haben, wird deren Oligomerisierung eingeleitet. Die Cytoplasmamembran der Wirtszelle wird durch die *raft*-Bildung permeabilisiert und die Diffusion von Ionen, sowie größeren Molekülen über die Membran wird ermöglicht. Das kanonische Endolysin gelangt dadurch ins Periplasma des Bakterienwirts und beginnt dort mit dem Abbau des Peptidoglykans<sup>31,55,60,75</sup>. Die mit den Löchern assoziierte Depolarisation der Membran fördert vermutlich die Translokation des N-Terminus des Antiholins vom Cytoplasma über die innere Membran ins Periplasma. Aufgrund dieser Konformationsänderung wird eine Aktivierung der zuvor inaktiven Holin-Antiholin-Heterodimere ermöglicht. Die Lyse des Bakterienwirts wird hierdurch noch weiter verstärkt<sup>31,59,60,98</sup>.

### 1.5.2 Regulation im Pinholin-SAR-Endolysin-System

Der Phage  $\phi 21$  codiert für das Pinholin S<sup>2168</sup>, welches aus zwei TMDs aufgebaut ist<sup>31,76</sup>. Die Sekundärstruktur des Pinholins konnten D. L. DREW *et al.* nun erstmals mittels Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie bestätigen. Synthetisch rekonstituiertes Pinholin weist eine überwiegend  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur auf, wobei der  $\alpha$ -helikale Anteil mit 83 % genau dem vorhergesagten transmembranen Anteil des Pinholins entspricht<sup>99</sup>. In dem momentan postulierten Modell der Regulation im Pinholin-SAR-Endolysin-System dimerisieren die Pinholine S<sup>2168</sup> des Phagen  $\phi 21$  in der inneren Bakterienmembran und akkumulieren dort zunächst inaktiv. Die beiden TMDs des Pinholins sind in diesem inaktiven Zustand mit einer  $N_{in}-C_{in}$  Topologie in der Membran lokalisiert (Abb. 13)<sup>31,66</sup>. Die Lyse wird beim Pinholin-SAR-Endolysin System ebenfalls durch das Erreichen einer kritischen

Konzentration an Homodimeren initiiert. Wird dieser kritische Wert überschritten, wird postuliert, dass die TMD1 des Pinholins aus der Membran in Richtung Periplasma herausfliept<sup>59,63,66</sup>. Aufgrund dieser Konformationsänderung der TMD1 werden die Pinholin-Homodimere in ihren aktiven Zustand überführt. Die nun auf der Membranoberfläche liegenden TMDs können daraufhin miteinander interagieren und TMD2-TMD2 Wechselwirkungen in der Membran werden ermöglicht<sup>63,66,67</sup>. Auch der Phage  $\phi 21$  codiert für ein inhibitorisches Holin, dem Antipinholin S<sup>2171</sup>, welches N-terminal um die Aminosäuren Methionin, Lysin und Serin verlängert ist<sup>76,95</sup>. Das Antipinholin bildet, analog zum Antiholin S107, bevorzugt Heterodimere mit dem entsprechenden Pinholin in der Cytoplasmamembran aus. Aufgrund der zusätzlichen Lysin-Seitenkette am N-Terminus ist dieser positiv geladen, wodurch das Flippen der TMD1 aus der Membran verhindert wird (Abb. 13). Die gebildeten Pinholin-Antipinholin-Heterodimere erweisen sich daher als lytisch inaktiv und der Zeitpunkt der Lyse kann reguliert werden<sup>59,67,69</sup>.



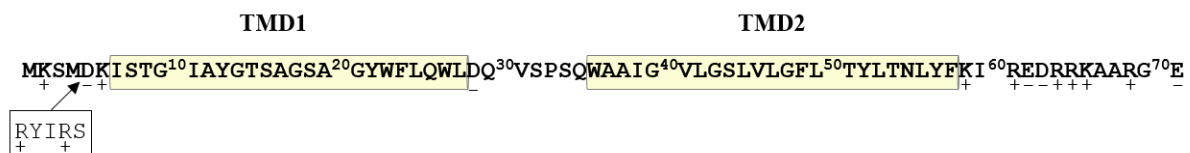
**Abbildung 13: Membrantopologie des Pinholins S<sup>2168</sup> und des Antipinholins S<sup>2171</sup> des Phagen  $\phi 21$**

Die beiden TMDs des Pinholins S<sup>2168</sup> des Phagen  $\phi 21$ , sowie des Antipinholins S<sup>2171</sup> sind mit einer N<sub>in</sub>-C<sub>in</sub> Topologie in der inneren Membran des Bakterienwirts eingelagert. Es wird postuliert, dass nach Erreichen einer kritischen Konzentration an Pinholinen in der Membran deren TMD1 in Richtung Periplasma herausfliept und die Lyse durch anschließende Ausbildung der *pinholes* eingeleitet wird. Aufgrund der zusätzlichen positiven Ladung am N-Terminus des Antipinholins kann dessen TMD1 nicht fliegen. Das Antipinholin ist somit lytisch inaktiv und verzögert die Lyse des Wirts durch die Bildung von Pinholin-Antipinholin-Heterodimeren<sup>59,63,65,66</sup> (Abbildung verändert entnommen aus R. YOUNG *et al.*<sup>59</sup>).

Nach einiger Zeit haben sich genügend aktive Pinholin-Homodimere in der inneren Membran angesammelt und durch topologische Änderung ihrer TMD1 können diese oligomerisieren und kleine Läsionen in der Membran ausbilden. Im Gegensatz zu Holinen, welche die Membran durch wenige große Löcher permeabilisieren, bilden Pinholine viele winzige Löcher aus<sup>66,100</sup>. Diese sogenannten *pinholes* sind über die gesamte Membran verteilt und weisen einen Durchmesser von nur etwa 1,5 nm auf. Die geringe Größe dieser Läsionen ermöglicht lediglich die Diffusion kleiner Ionen über die Cytoplasmamembran und eine Membrandepolarisation ist die Folge<sup>65,66</sup>. Die in der Membran zurückgehaltene TMD1 der Antipinholine kann daraufhin ebenfalls herausfliegen und es erfolgt eine Aktivierung der zuvor inaktiven Pinholin-Antipinholin-Heterodimere. Die Permeabilisierung der inneren Membran des Bakterienwirts

wird somit noch zusätzlich beschleunigt<sup>59</sup>. Die Depolarisation der Membran ermöglicht zudem die Freisetzung und Aktivierung des membrangebundenen SAR-Endolysins, welches daraufhin das Murein der Zellwände hydrolysieren kann<sup>65</sup>. Aufgrund dieses Regulationsmechanismus wird eine frühzeitige Lyse des Bakterienwirts und eine dadurch unvollständige Assemblierung der Phagennachkommen verhindert<sup>59,66</sup>.

Zur genauen Untersuchung der Regulation der Lyse durch das Pinholin S<sup>21</sup>68 und das Antipinholin S<sup>21</sup>71 des Phagen  $\phi$ 21 führten T. PANG *et al.* verschiedene Mutationsanalysen durch<sup>66,101</sup>. Hierfür wurde unter anderem die Mutante irsS<sup>21</sup>68 konstruiert, welche N-terminal um die fünf Aminosäuren RYIRS (Arg-Tyr-Ile-Arg-Ser) verlängert wurde (Abb. 14)<sup>63</sup>. D. L. DREW *et al.* untersuchten neben dem Pinholin Wildtyp auch die irsS<sup>21</sup>68 Mutante mittels CD-Spektroskopie und konnten zeigen, dass die synthetisch rekonstituierte irs-Mutante ebenfalls eine überwiegend  $\alpha$ -helikale Struktur, mit einem Anteil von 82 %, aufweist<sup>99</sup>.



**Abbildung 14: Primärstruktur des Antipinholins S<sup>21</sup>71 des Phagen  $\phi$ 21**

Die Aminosäuren der beiden postulierten TMDs (gelb), sowie die Ladung der einzelnen Aminosäuren sind gekennzeichnet. Das Startcodon des zugehörigen Pinholins S<sup>21</sup>68 ist das Methionin an Position 4. Die Pinholin-Mutante irsS<sup>21</sup>68 ist N-terminal um die fünf Aminosäuren RYIRS verlängert und dessen Startcodon ist analog zum Pinholin Wildtyp das Methionin an Position 4. Die Aminosäuresequenz der TMD1, sowie die beiden Aminosäuren an Position 5 und 6 wurden bei der S<sup>21</sup>68 <sub>$\Delta$ TMD1</sub> Mutante deletiert<sup>63,66</sup> (Abbildung verändert entnommen aus T. PANG *et al.*<sup>66</sup>).

Sofern nun Phagen für die irsS<sup>21</sup>68 Mutante codieren, konnten T. PANG *et al.*<sup>101</sup> aufzeigen, dass eine Lyse der Bakterien nicht möglich ist. Vermutlich verhindern hier die zusätzlichen positiven Ladungen der beiden Arginine das Flippen der TMD1 aus der Membran. Die irsS<sup>21</sup>68 Mutante weist folglich Eigenschaften eines Antipinholins auf und kann ebenfalls Heterodimere mit dem Pinholin Wildtyp in der Membran ausbilden. Zudem konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Charakter der irs-Mutante sogar stärker ausgeprägt ist als der des Antipinholins S<sup>21</sup>71<sup>63,66,100,101</sup>. Anhand der S<sup>21</sup>68 <sub>$\Delta$ TMD1</sub> Mutante, mit deletierter TMD1, konnte gezeigt werden, dass die Lyse des Wirts trotz Fehlen der TMD1 dennoch möglich ist<sup>63,67</sup>. Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass lediglich die TMD2-TMD2 Wechselwirkungen für die Lochbildung ausschlaggebend sind. Das Flippen der TMD1 aus der Membran scheint somit nur eine notwendige Bedingung zu sein, damit die in der Membran insertierten TMD2 miteinander interagieren können. Folglich nimmt die TMD1 vermutlich nur eine regulatorische Rolle während der Lochbildung ein<sup>63,66</sup>.

## 1.6 Mechanismus der Lochbildung von Pinholinen

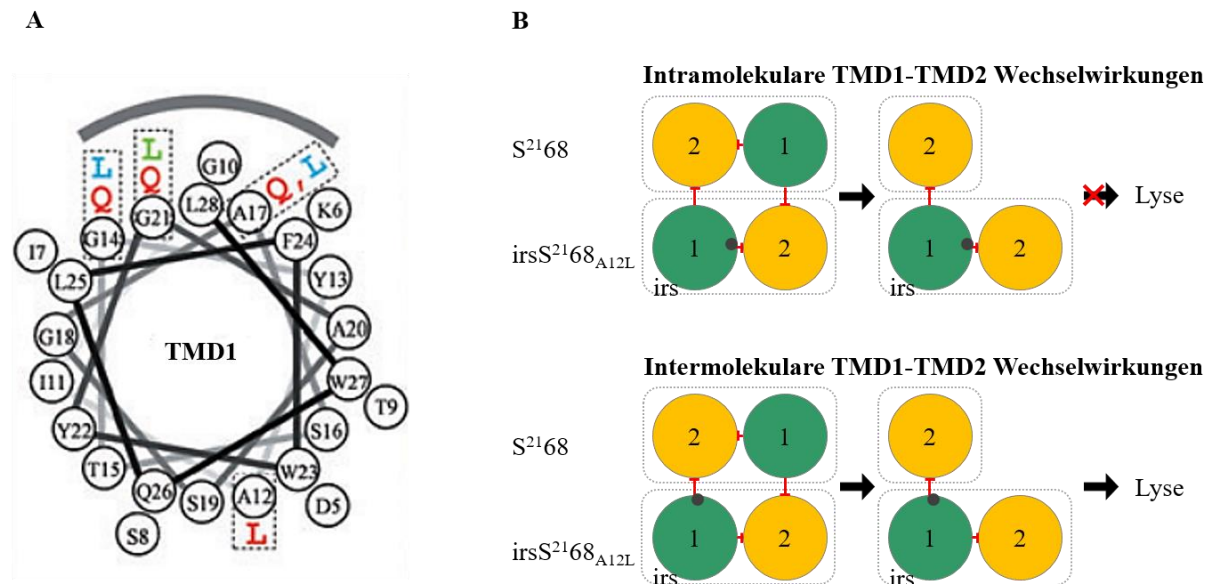
Inwiefern die Pinholine des Phagen  $\phi 21$  im inaktiven, sowie im aktiven Zustand miteinander wechselwirken, ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. T. PANG *et al.* führten zur Untersuchung der Topologie des Pinholins in der Membran und der Aufklärung des Mechanismus der Lochbildung verschiedene Mutationsanalysen sowie Cystein-Zugänglichkeits-Experimente (*Substituted-Cysteine Accessibility Method*, SCAM) durch<sup>66,67,101</sup>. Weitere Rückschlüsse auf die Topologie und die strukturelle Dynamik der beiden TMDs lieferten zudem die von T. AHAMMAD *et al.* durchgeführten EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*) Experimente<sup>102,103</sup>.

### 1.6.1 Einfluss der TMD1 des Pinholins auf die Lochbildung

Mittels weiterer Mutationsanalysen wurde der Einfluss der TMD1 des Pinholins S<sup>21</sup>68 auf die Lochbildung untersucht. T. PANG *et al.* konnten hierdurch zeigen, dass der Zeitpunkt der Lyse durch bestimmte Mutationen auf der TMD1 beeinflusst werden kann<sup>101</sup>. Durch Austausch der Aminosäuren G<sub>14</sub>, A<sub>17</sub>, und G<sub>21</sub> gegen das hydrophile Glutamin trat die Lyse deutlich früher ein. Eine Verringerung der Hydrophobizität führt somit erwartungsgemäß zu einer erhöhten Tendenz des Flippens der TMD1 aus der Membran. Sofern nun die erwähnten Aminosäuren gegen das hydrophobe Leucin ersetzt wurden, erfolgte eine Verzögerung beziehungsweise Blockierung der Lyse des Wirts. Wie erwartet, wird die TMD1 aufgrund der Erhöhung der Hydrophobizität in der Membran zurückgehalten und die Tendenz des Flippens wird deutlich verringert. Die entsprechenden Aminosäuren wurden ebenfalls bei der irsS<sup>21</sup>68 Mutante gegen Glutamin substituiert und die lytische Funktion der irs-Mutante konnte durch die Verringerung der Hydrophobizität sogar wiederhergestellt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aminosäuren G<sub>14</sub>, A<sub>17</sub>, und G<sub>21</sub> den Lipiden zugewandt sind. Bei solch einer Orientierung würde die Reduzierung der Hydrophobizität nämlich die Interaktionen mit den Lipiden stören und das Flippen der TMD1 erleichtern (Abb. 15A)<sup>101</sup>. Zusätzlich wurde auch die Pinholin S<sup>21</sup>68<sub>A12L</sub> Mutante untersucht, bei der sich die Mutation genau auf der anderen Seite der Helix befindet (Abb. 15A). Im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen wurde die Lyse durch die Erhöhung der Hydrophobizität nicht verlangsamt oder unterdrückt, sondern die Lyse wurde frühzeitig eingeleitet. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das A<sub>12</sub> der TMD1 nicht den Lipiden zugewandt ist. Die sperrige Seitenkette des Leucins scheint eine mögliche TMD1-TMD2 Interaktion zu stören, welche normalerweise die TMD1 in der Membran zurückhält. Die entsprechende Mutation bei der irsS<sup>21</sup>68 Mutante sollte Aufschluss darüber geben, ob das



A<sub>12</sub> intra- oder intermolekulare Wechselwirkungen im Pinholin-Dimer vermittelt. Die irsS<sup>21</sup>68 Mutante bildet bevorzugt lytisch inaktive Heterodimere mit dem Pinholin S<sup>21</sup>68 aus, da ihre TMD1 aufgrund der zusätzlichen positiven Ladung am N-Terminus nicht flippen kann. Sofern die TMD1 der irsS<sup>21</sup>68<sub>A12L</sub> Mutante mit der eigenen TMD2 wechselwirken würde, so wäre das S<sup>21</sup>68-irsS<sup>21</sup>68<sub>A12L</sub>-Heterodimer auch weiterhin deaktiviert. Bei solch einer intramolekularen Wechselwirkung würde keine Interaktionsstelle für die Dimerisierung beeinflusst werden und das gebildete Heterodimer wäre daher weiterhin lytisch inaktiv (Abb. 15B). Handelt es sich jedoch um intermolekulare Wechselwirkungen, so würde innerhalb des Heterodimers die Interaktion zum Pinholin S<sup>21</sup>68 gestört werden. Die irsS<sup>21</sup>68<sub>A12L</sub> Mutante wäre dann nicht mehr fähig mit dem Pinholin zu dimerisieren und infolgedessen könnten sich aktive Pinholin-Homodimere bilden und die Lochbildung initiiert werden (Abb. 15B). Die Experimente zeigten, dass die Lyse eingeleitet wurde und die irsS<sup>21</sup>68<sub>A12L</sub> Mutante somit durch die Mutation des A<sub>12</sub> ihren inhibitorischen Charakter verliert. Folglich ist das A<sub>12</sub> der TMD2 des Pinholins im S<sup>21</sup>68-irsS<sup>21</sup>68<sub>A12L</sub>-Heterodimer zugewandt und die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen TMD1 und TMD2 werden vermutlich durch das sperrige Leucin destabilisiert und die Lyse eingeleitet<sup>101</sup>.

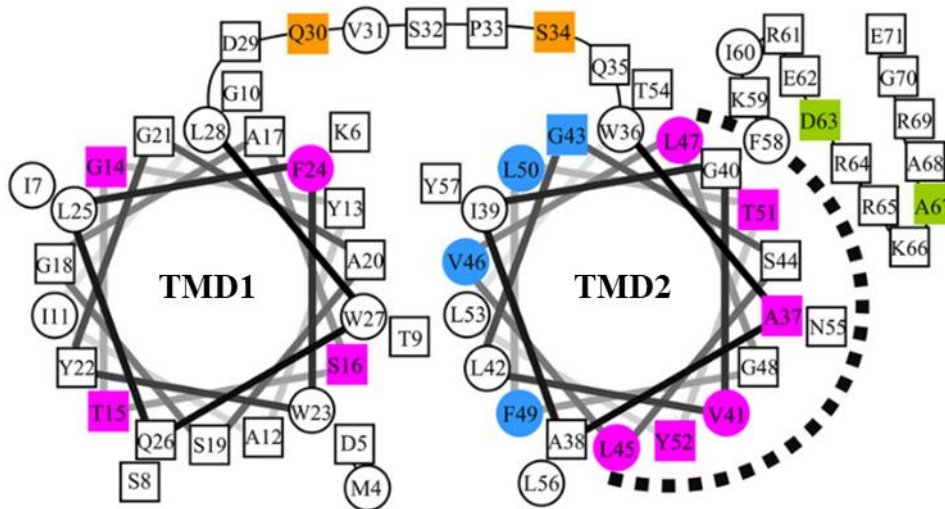


**Abbildung 15: Helical wheel plot der TMD1 und mögliche Wechselwirkungen zwischen der TMD1 und der TMD2**  
 (A) Darstellung der TMD1 des Pinholins in einem *helical wheel plot*. Farblich markiert sind die entsprechenden Substitutionen. Rot markierte Aminosäuren beschleunigten die Lyse, wohingegen blau markierte Aminosäuren die Lyse verzögerten und grüne unterdrückten die Lyse vollständig. Der Bereich, der vermutlich in Richtung der Lipide zeigt, ist durch einen grauen Bogen verdeutlicht. (B) Mögliche intra- oder intermolekulare TMD1-TMD2 Wechselwirkungen. Die TMD1 ist in grün und die TMD2 in gelb dargestellt. Heterodimere aus dem Pinholin S<sup>21</sup>68 und der lytisch inaktiven irsS<sup>21</sup>68<sub>A12L</sub> Mutante sind gezeigt. Mögliche TMD1-TMD2 Wechselwirkungen sind rot dargestellt und der graue Punkt markiert die Mutation der irsS<sup>21</sup>68<sub>A12L</sub> Mutante. Intramolekulare Wechselwirkungen würden den inhibitorischen Charakter der irs-Mutante nicht beeinflussen, folglich würde die Lyse nicht eingeleitet werden. Allerdings würden intermolekulare Wechselwirkungen die Interaktion mit dem Pinholin stören, wodurch das Pinholin sich letztendlich zu aktiven Homodimeren zusammenlagern könnte und die Lyse initiiert werden<sup>101</sup> (Abbildung verändert entnommen aus T. PANG *et al.*<sup>101</sup>).

### 1.6.2 Topologie und strukturelle Dynamik des Pinholins

Zur Untersuchung der Topologie des Pinholins S<sup>21</sup>68 in der inneren Membran führten T. PANG *et al.* Cystein-Zugänglichkeits-Experimente durch<sup>66</sup>. Solche Experimente in Kombination mit der ortsgerichteten Mutagenese ermöglichen die Bestimmung der Position der eingeführten Cysteinreste. Über deren Zugänglichkeit kann somit auf die räumliche Orientierung der ersetzten Aminosäuren geschlossen werden<sup>104</sup>. Durchgeführt wurden die Experimente an Mutanten des Pinholins S<sup>21</sup>68, irsS<sup>21</sup>68 und S<sup>21</sup>68<sub>ΔTMD1</sub>, bei welchen gezielt einzelne Aminosäuren zu Cystein mutiert wurden. Bakterienzellen, welche die entsprechenden Cystein-Mutanten exprimierten, wurden zunächst mit dem negativ geladenen MTSES (Natrium-(2-sulfonatoethyl)methanthiosulfonat) behandelt. Dieses membranimpermeable, hydrophile Reagenz kann die Membran nur passieren, wenn Löcher mit einem luminalen Durchmesser von etwa 1 nm vorhanden sind. Aufgrund seiner erhöhten Reaktivität gegenüber freien Thiolgruppen kann es an die mutierten Cysteine der Pinholine binden, sofern diese räumlich zugänglich sind. Nach Behandlung der Zellen mit MTSES wurden die Pinholine aus den Zellen extrahiert. Cysteine, die für das MTSES nicht zugänglich waren, wurden durch die Zugabe von Methoxypolyethylenglykolmaleimid (mPEG-Maleimid) abgesättigt und somit markiert. Die Analyse erfolgte daraufhin mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot. Die durch die PEGylierung hervorgerufene Erhöhung der Massen ermöglicht die Unterscheidung zwischen PEGylierten und nicht PEGylierten Proteinen. Alle auf der TMD1 des Pinholins S<sup>21</sup>68 mutierten Positionen waren für das membranimpermeable MTSES zugänglich (Abb. 16, magenta). Die TMD1 der lytisch inaktiven irsS<sup>21</sup>68 Mutante war hingegen räumlich nicht zugänglich. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die TMD1 während der Lochbildung aus der Membran in Richtung Periplasma herausfliept. Zudem liefern die Experimente einen Nachweis für den Verbleib der TMD1 der irsS<sup>21</sup>68 Mutante in der Membran, was auf ihre zusätzliche positive Ladung am N-Terminus zurückzuführen ist. Zur genaueren Betrachtung der durch die Pinholine gebildeten Löcher wurden auch Mutationen im Bereich der TMD2 und dem C-Terminus vorgenommen. Sofern die gebildeten *pinholes* einen Durchmesser von mindestens 1 nm aufweisen, kann das MTSES die Membran passieren. Cystein-Mutanten der TMD2 des Pinholins S<sup>21</sup>68 und S<sup>21</sup>68<sub>ΔTMD1</sub> zeigten eine gewisse Zugänglichkeit für das MTSES. Positionen, die für das MTSES zugänglich waren, weisen somit vermutlich in das Innere der Läsion (Abb. 16, magenta), nicht zugängliche Bereiche sind hingegen zur Membran hin ausgerichtet (Abb. 16, blau). Cysteine-Mutationen am cytoplasmatischen C-Terminus wurden vollständig durch MTSES abgesättigt (Abb. 16, grün).

Das Pinholin S<sup>21</sup>68 und S<sup>21</sup>68<sub>ΔTMD1</sub> bilden folglich Löcher in der Membran aus, welche für das MTSES groß genug sind, damit dieses ins Cytoplasma gelangen kann. Bei der irS<sup>21</sup>68 Mutante waren hingegen die Cystein-Mutationen am C-Terminus, sowie auf der TMD2 nicht zugänglich, wodurch ihre lytische Inaktivität erneut bewiesen werden kann<sup>66</sup>. Anhand der Cystein-Zugänglichkeits-Experimente wird die Hypothese bestärkt, dass das Herausflippen der TMD1 aus der Membran zwar notwendig ist, die eigentliche Lochbildung der Pinholine jedoch durch die TMD2 vollzogen wird und die TMD1 eine rein regulatorische Rolle einnimmt<sup>63,66</sup>.



**Abbildung 16: SCAM-Analyse verschiedener Cystein-Mutanten des Pinholins S<sup>21</sup>68**

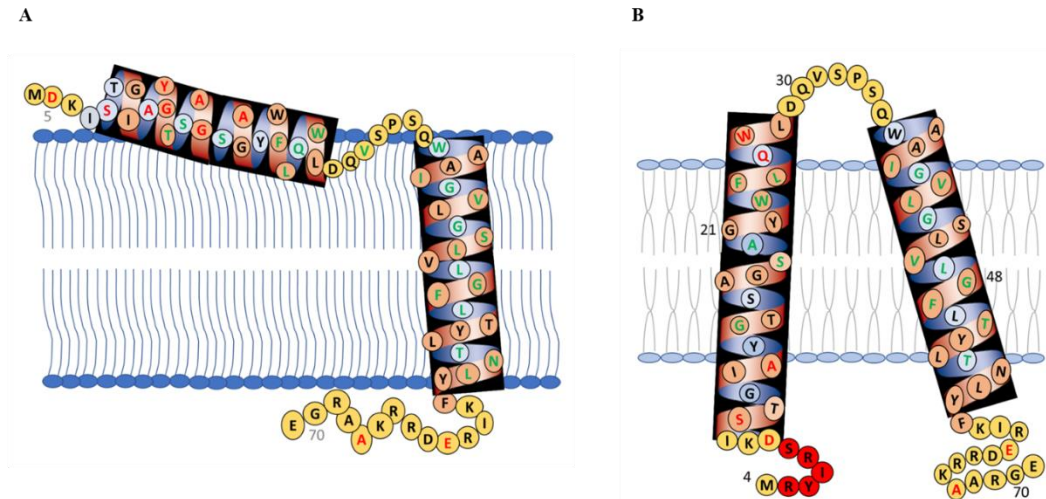
Die beiden TMDs des Pinholins S<sup>21</sup>68 sind als *helical wheel plot* dargestellt. Hydrophobe Aminosäuren sind als Kreise dargestellt, hydrophile als Quadrate. Magenta gefärbte Aminosäuren stellen Positionen dar, die für das membranimpermeable, hydrophile MTSES zugänglich waren. Die Bereiche der TMD2, die zugänglich waren, kleiden vermutlich das Innere des Lochs aus (gestrichelte Linie). Im Gegensatz dazu zeigen die blau gefärbten Aminosäuren in Richtung der Membran, da sie nicht zugänglich für das MTSES waren. Die zugänglichen Cystein-Mutationen des periplasmatischen Loops sind orange markiert und die des cytoplasmatischen C-Terminus grün<sup>66</sup> (Abbildung verändert entnommen aus T. PANG *et al.*<sup>66</sup>).

Neben den Cystein-Zugänglichkeits-Experimenten und diversen Mutationsanalysen von T. PANG *et al.*<sup>66,67,101</sup> wurde das Pinholin S<sup>21</sup>68 des Phagen  $\phi$ 21 erst kürzlich von T. AHAMMAD *et al.* mittels verschiedener *Continuous Wave* (CW)-EPR-Experimente in Kombination mit ortsgerechter Sp inmarkierung (*Site-Directed Spin Labeling*, SDSL) untersucht<sup>102</sup>. Als Spinmarkierung diente bei allen Messungen das Nitroxid S-(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methylmethanesulfonothioat (MTSL), welches über Cysteinseitenketten an spezifische Positionen in der Aminosäuresequenz binden kann<sup>102,105–107</sup>. Im Gegensatz zu den bisherigen Experimenten wurde das für die EPR-Messungen verwendete Pinholin mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt und in 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC) Proteoliposomen rekonstituiert<sup>102</sup>. Die Analyse der Linienbreite sowie der zentralen Resonanzlinie der CW-EPR-Messungen können Rückschlüsse auf die

strukturellen und dynamischen Eigenschaften von Peptiden beziehungsweise Proteinen geben<sup>105,106</sup>. Beide TMDs des Pinholins weisen, im Vergleich zu den beiden sehr beweglichen Termini, eine eingeschränkte Mobilität auf. Bei genauerer Betrachtung der TMDs zeigt sich, dass der N-terminale Bereich der TMD1 eine höhere Mobilität im Gegensatz zu den restlichen Bereichen der beiden TMDs aufweist. Die mäßige Mobilität des periplasmatischen Loops des Pinholins ist auf seine relativ kurze Aminosäuresequenz zurückzuführen, zudem ist er das Verbindungsstück zwischen den beiden recht unbeweglichen TMDs.

Die Zugänglichkeit verschiedener Positionen im Pinholin wurde durch Messungen der Sättigungsleistung mittels CW-EPR-Spektroskopie untersucht. Die einzelnen mit MTSL spinmarkierten Pinholine wurden hierzu mit dem lipidlöslichen paramagnetischen Sauerstoff und der wasserlöslichen paramagnetischen Nickel(II)-Ethylendiessigsäure (Ni(II)EDDA) versetzt<sup>102,107,108</sup>. Anhand solcher Experimente kann die Topologie von Peptiden beziehungsweise Proteinen in einer Lipiddoppelschicht bestimmt werden<sup>109</sup>. T. AHAMMAD *et al.* konnten zeigen, dass die gesamte TMD2 des Pinholins in der Membran insertiert vorliegt, da die Bereiche eher für den lipidlöslichen Sauerstoff zugänglich waren. Die TMD1 ist hingegen nicht aufrecht in der Membran insertiert, sondern ist auf der Membranoberfläche lokalisiert. Allerdings waren nicht alle Bereiche der TMD1 in gleicher Weise für das wasserlösliche Ni(II)EDDA zugänglich. Der N-terminale Bereich der TMD1, welcher auch eine höhere Mobilität als die restliche TMD1 aufweist, war zugänglich für das wasserlösliche Ni(II)EDDA und befindet sich somit außerhalb der Lipiddoppelschicht. Mittlere Bereiche der TMD1 waren nur teilweise zugänglich, was vermuten lässt, dass einige Seitenketten in der Lipiddoppelschicht lokalisiert sind. Der C-terminale Bereich der TMD1, sowie der periplasmatische Loop des Pinholins waren nicht mehr für das wasserlösliche Reagenz zugänglich und sind folglich in der Membran eingelagert. Basierend auf diesen Ergebnissen postulieren T. AHAMMAD *et al.*, dass die TMD1 des Pinholins S<sup>21</sup>68 lediglich partiell externalisiert ist und die TMD2 membrangebunden vorliegt (Abb. 17A)<sup>102</sup>. Diese postulierten Topologien der beiden TMDs des Pinholins in der Membran unterscheiden sich bezogen auf die exakte Lage der geflippten TMD1 von den bisherigen Ergebnissen von T. PANG *et al.*<sup>63,66,101</sup>. Zu beachten ist, dass die CW-EPR-Experimente auf synthetisch rekonstituierten Pinholin in Proteoliposomen basieren, wohingegen die Analysen von T. PANG *et al.* mit rekombinant hergestellten Pinholin in Bakterienzellen durchgeführt wurden. Neben den unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der Topologie wurden zudem teilweise auch unterschiedliche Aminosäuren des Pinholins betrachtet. Zusammenfassend zeigen die

Ergebnisse von T. PANG *et al.* und T. AHAMMAD *et al.* aber gleichermaßen, dass die TMD1 des Pinholins S<sup>21</sup>68 des Phagen  $\phi$ 21 aus der Membran flippt, wohingegen die TMD2 stabil in der Membran inseriert vorliegt<sup>63,66,101,102</sup>.



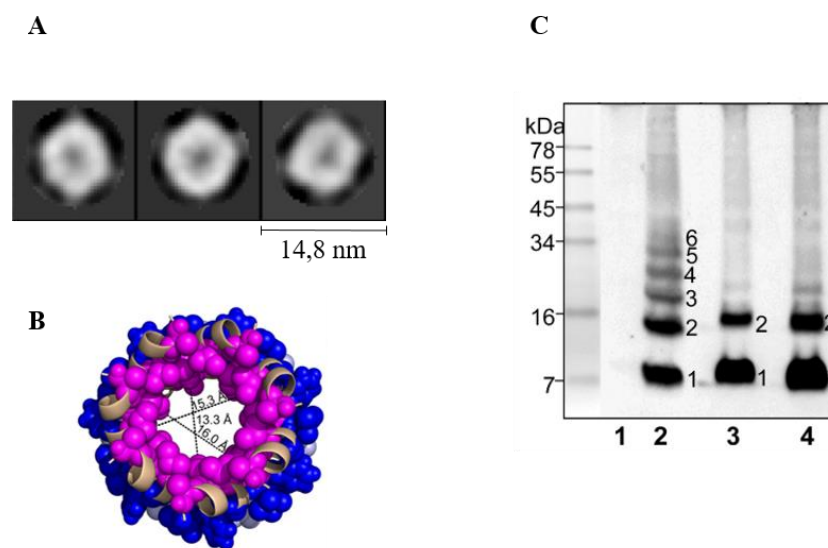
**Abbildung 17: Postulierte Topologie der TMDs des Pinholins S<sup>21</sup>68 und der irsS<sup>21</sup>68 Mutante**

Basierend auf den CW-EPR-Experimenten postulieren T. AHAMMAD *et al.* die Membrantopologie der beiden TMDs des Pinholins S<sup>21</sup>68 (A) und der irsS<sup>21</sup>68 Mutante (B), deren zusätzliche N-terminale Aminosäuren durch den rot gefüllten Kreis markiert sind. Farblich markierte Aminosäuren wurden durch MTSL spinmarkiert und mittels CW-EPR-Sättigungsleistungsmessungen wurde deren Zugänglichkeit für das wasserlösliche Ni(II)EDDA und dem lipidlöslichen Sauerstoff in Proteoliposomen bestimmt. Rot markierte Aminosäuren waren für das wasserlösliche Ni(II)EDDA zugänglich und sind folglich außerhalb der Membran lokalisiert. Hingegen sind die grün markierten Aminosäuren in der Membran eingelagert, da sie nicht zugänglich für das Ni(II)EDDA waren<sup>102,103</sup>. (A) Die TMD1 des Pinholins S<sup>21</sup>68 ist nur partiell externalisiert und die TMD2 ist vollständig in der Lipiddoppelschicht inseriert<sup>102</sup>. (B) Bei der lytisch inaktiven irsS<sup>21</sup>68 Mutante sind hingegen beide TMDs in der Membran eingelagert<sup>103</sup>. Der TMD1 dieser Mutante ist es folglich nicht möglich aus der Membran zu flippen, was die bisherigen Ergebnisse von T. PANG *et al.* stützt<sup>66,101</sup> (Abbildung verändert entnommen aus T. AHAMMAD *et al.*<sup>102,103</sup>).

Dieselben Experimente wurden mit der lytisch inaktiven irsS<sup>21</sup>68 Mutante durchgeführt, die ebenfalls mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt und mit MTSL spinmarkiert wurde. Die beiden TMDs der irs-Mutante weisen gleichermaßen eine eingeschränkte Mobilität auf, wohingegen die beiden Termini sehr beweglich sind. Zudem zeigen die Zugänglichkeitsmessungen, dass sowohl die TMD1 als auch die TMD2 der irsS<sup>21</sup>68 Mutante in der Membran inseriert sind (Abb. 17B)<sup>103</sup>. Diese Ergebnisse passen sehr gut mit der von T. PANG *et al.* bestimmten Topologie der beiden TMDs der irs-Mutante überein, deren TMD1 aufgrund der zusätzlichen positiven Ladung am N-Terminus nicht aus der Membran flippen kann<sup>63,66,101</sup>.

### 1.6.3 Oligomerisierungsgrad der Pinholine

Neben dem Einfluss der TMDs des Pinholins auf die Lochbildung untersuchten T. PANG *et al.* auch den oligomeren Zustand der Pinholine<sup>66</sup>. Es wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der von Pinholinen gebildeten Löcher aufgenommen, bei dem das Pinholin S<sup>21</sup>68<sup>His</sup> in Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM) rekonstituiert wurde (Abb. 18A). Des Weiteren wurde ein computergeneriertes Modell der Aufsicht des aus den TMD2 des Pinholins gebildeten Lochs konstruiert. Ein heptamer Lochmodell mit einem luminalen Lochdurchmesser von etwa 1,5 nm erwies sich dabei am kompatibelsten mit den Ergebnissen der Cystein-Zugänglichkeits-Experimenten (Abb. 18B)<sup>66</sup>.



**Abbildung 18: Visualisierung und Oligomerisierungsgrad der durch Pinholine gebildeten Löcher**

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von in DDM rekonstituiertem Pinholin S<sup>21</sup>68<sup>His</sup>. (B) Computergeneriertes Modell der Aufsicht eines heptameren Pinholin Lochs, welches basierend auf den Cystein-Zugänglichkeits-Experimenten von T. PANG *et al.*<sup>66</sup> erstellt wurde. Positionen auf der TMD2 die für MTSES bei der SCAM-Analyse zugänglich waren sind magenta gefärbt und die blau gefärbten Bereiche waren nicht zugänglich. (C) Immunoblot der Crosslink-Experimente zur Bestimmung des oligomeren Zustands der Pinholine. Die exprimierten Pinholine wurden mit dem membranpermeablen aminspezifischen Crosslinker DSP versetzt. Die Zahlen neben den Proteinbanden entsprechen dem Oligomerisierungsgrad. Als Kontrolle dienen Zellen ohne Pinholin (Laufspur 1). In Laufspur 2 ist das Pinholin S<sup>21</sup>68 und in Laufspur 3 die irsS<sup>21</sup>68 Mutante aufgetragen. Der Pinholin Wildtyp und die irs-Mutante wurden coexprimiert und in Laufspur 4 aufgetragen<sup>66</sup> (Abbildungen verändert entnommen aus T. PANG *et al.*<sup>66</sup>).

Zur weiteren Untersuchung des Oligomerisierungsgrads des Pinholins wurden Crosslink-Experimente durchgeführt, bei denen das exprimierte Pinholin S<sup>21</sup>68 sowie die irsS<sup>21</sup>68 Mutante mit einem Crosslinker behandelt wurden. Der verwendete membranpermeable Crosslinker DSP (Dithiobis(succinimidylpropionat)) bindet spezifisch an primäre Amine und kann dadurch die Pinholine entsprechend ihres oligomeren Zustands miteinander verknüpfen. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot. Der Pinholin Wildtyp S<sup>21</sup>68 oligomerisiert in der Membran, wobei Proteinbanden bis hin zu einem

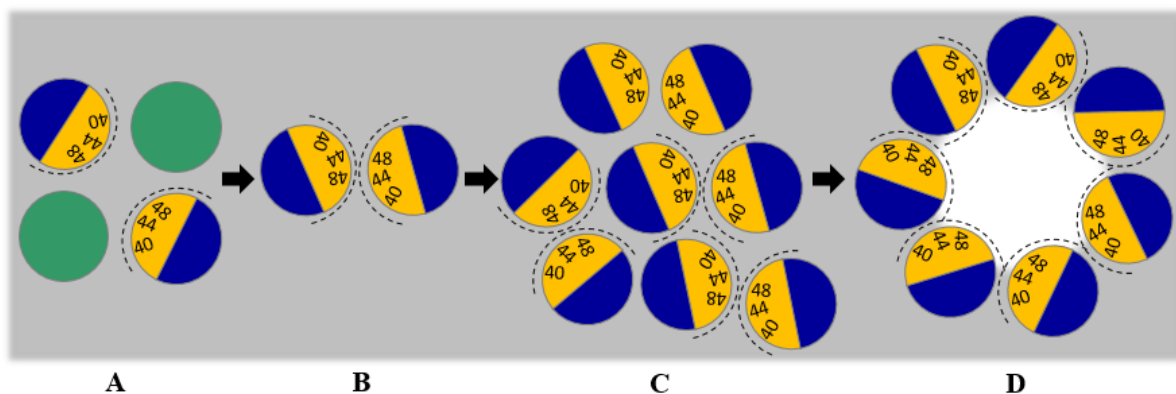


hexameren Komplex erkennbar sind (Laufspur 2 in Abb. 18C). Im Gegensatz dazu wird die Oligomerisierung der irsS<sup>21</sup>68 Mutante, dessen TMD1 nicht aus der Membran flippen kann, auf der Dimer-Ebene blockiert (Laufspur 3 in Abb. 18C). Sofern der Wildtyp und die lytisch inaktive irs-Mutante coexprimiert wurden, bilden sich lediglich Dimeren aus (Laufspur 4 in Abb. 18C)<sup>66,67</sup>. Diese Ergebnisse geben erste Informationen über den oligomeren Zustand des Pinholins S<sup>21</sup>68. Die Aussagen, dass die irsS<sup>21</sup>68 Mutante lytisch inaktiv ist und Heterodimere mit dem Pinholin Wildtyp bildet, welche ebenfalls nicht zur Lyse befähigt sind, werden anhand dieser Ergebnisse bestärkt. Die Resultate stützen zudem die Theorie, dass das Flippen der TMD1 aus der Membran notwendig ist, damit das Pinholin oligomerisieren kann und sich letztendlich Löcher in der Membran ausbilden<sup>63,66,101</sup>.

#### **1.6.4 Modell für die Lochbildung und die Rolle des Glycin-Zipper Motivs**

T. PANG *et al.* postulieren basierend auf ihren durchgeführten Analysen<sup>63,66,101</sup> ein Modell für den Mechanismus der Lochbildung des Pinholins S<sup>21</sup>68 des Phagen  $\phi$ 21 (Abb. 19)<sup>66,67</sup>. Bereiche auf der TMD2 die bei den SCAM-Experimenten für das MTSES zugänglich waren, sind dabei besonders in den Fokus geraten. Zwei verschiedene Oberflächen auf der TMD2 des Pinholins sollen demnach Helix-Helix Interaktionen ermöglichen, wobei ein Glycin-Zipper Motiv während der Lochbildung eine entscheidende Rolle einzunehmen scheint<sup>66</sup>. Glycin-Zipper Motive (GxxxG Motive) sind bekannte Dimerisierungsmotive von helikalen Segmenten<sup>110,111</sup>. Die Oberfläche A auf der TMD2 des Pinholins weist das Glycin-Zipper Motiv G<sub>40</sub>XXG<sub>43</sub>S<sub>44</sub>XXXG<sub>48</sub> auf und die ihr gegenüberliegende Oberfläche B wird von den sperrigen Aminosäuren L<sub>45</sub>, F<sub>49</sub> und Y<sub>52</sub> gebildet. Vor Beginn der Lyse des Bakterienwirts sind beide TMDs des Pinholins in der inneren Membran lokalisiert, wobei sich zunächst lytisch inaktive Pinholin-Dimere bilden (Abb. 19A)<sup>63,66</sup>. Aufgrund der insertierten TMD1 werden die TMD2-TMD2 Wechselwirkungen unterdrückt, weshalb eine Oligomerisierung der Pinholine zu diesem Zeitpunkt nicht möglich ist. Erst durch spontanes Flippen der TMD1 aus der inneren Membran in Richtung Periplasma werden die beiden TMD2 räumlich nähergebracht<sup>63,66,67,101</sup>. Diese nun aktiven Dimere gehen homotypische Wechselwirkungen über ihr Glycin-Zipper Motiv auf der Oberfläche A ein (Abb. 19B). Nachdem die aktiven Pinholin-Dimere eine kritische Konzentration in der Membran erreicht haben, wird deren Oligomerisierung eingeleitet (Abb. 19C). Durch einen Wechsel von homotypischen zu heterotypischen Wechselwirkungen zwischen Oberfläche A und B lagern sich die Oligomere zu einem

heptameren Loch um (Abb. 19D)<sup>66,67,101</sup>. Während der Lochbildung werden die sperrigen Seitenketten der Aminosäuren der Oberfläche B (L<sub>45</sub>, F<sub>49</sub> und Y<sub>52</sub>) von der durch das Glycin-Zipper-Motiv auf Oberfläche A ausgebildeten Tasche aufgenommen. Die Ausbildung dreier interhelikaler Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten von Serin (S<sub>44</sub>) beziehungsweise Threonin (T<sub>51</sub> und T<sub>54</sub>) und dem Carbonylrückgrat der gegenüberliegenden Helix begünstigen zudem den Prozess der Lochbildung<sup>66</sup>. Die hydrophilen Seitenketten kleiden somit die Innenseite der Löcher aus, wohingegen die hydrophoben Bereiche in Richtung der Membran weisen<sup>66,67</sup>.



**Abbildung 19: Postuliertes Modell für den Mechanismus der Lochbildung des Pinholins S<sup>2168</sup> des Phagen  $\phi 21$**

Aufsicht auf die Lipide (grau) der cytoplasmatischen Seite der Membran. Die TMD1 des Pinholins ist in grün und die TMD2 in gelb und blau dargestellt. Der gelb markierte Bereich entspricht der Oberfläche A, wobei die kleinen Zahlen für die Aminosäuren des Glycin-Zipper Motivs (G<sub>40</sub>XXXS<sub>44</sub>XXXG<sub>48</sub>) stehen. Der blau markierte Bereich ist entsprechend Oberfläche B. **(A)** Zu Beginn der Lyse sind beide TMDs in der Membran inseriert und das Pinholin liegt als inaktives Dimer vor. **(B)** Durch spontanes Flipping der TMD1 aus der Membran können die TMD2 homotypisch über ihr Glycin-Zipper Motiv auf der Oberfläche A miteinander interagieren. **(C)** Sofern genügend solcher aktiven Dimere vorliegen, können sich Oligomere durch heterotypische Wechselwirkungen zwischen der Oberfläche A und B ausbilden. **(D)** Letztendlich lagern sich die Pinholine zu einem heptameren Loch zusammen, wobei die hydrophilen Seitenketten die Innenseite des gebildeten Lochs auskleiden<sup>66,67,101</sup> (Abbildung verändert entnommen aus T. PANG *et al.*<sup>66</sup>).



## 2 Aufgabenstellung

Das Pinholin S<sup>21</sup>68 des Phagen  $\phi$ 21 ist ein kleines Membranprotein, welches aus zwei TMDs aufgebaut ist. Während des lytischen Zyklus des *E. coli* befallenden Phagen  $\phi$ 21 nimmt das Pinholin eine wichtige Rolle bei der Lyse des Bakterienwirts ein<sup>31,76</sup>. Pinholine akkumulieren zunächst inaktiv in der inneren Bakterienmembran und erst nach Erreichen einer kritischen Konzentration erfolgt ihre Aktivierung. Die damit einhergehende Oligomerisierung der Pinholine führt zur Ausbildung kleiner Löcher in der inneren Membran, wodurch die PMF zusammenbricht. Letztendlich initiiert das Pinholin so die Freisetzung eines Endolysins und somit die Lyse des Bakterienwirts<sup>63,66,67</sup>. Entscheidend für die Regulation und die Lochbildung sind dabei die beiden TMDs des Pinholins. Es wird postuliert, dass die TMD1 eine rein regulatorische Funktion einnimmt, indem die Lyse des Bakterienwirts erst durch Flippen der TMD1 aus der Membran in Richtung Periplasma initiiert wird. Dahingegen soll die TMD2 für die eigentliche Lochbildung verantwortlich sein<sup>63,66,67</sup>. Beide TMDs des Pinholins verfügen über ein Glycin-Zipper Motiv, welches ein bekanntes Dimerisierungsmotiv darstellt, wodurch inter- sowie intramolekulare Interaktionen zwischen den TMDs ermöglicht werden<sup>66,67,101</sup>.

Dieses postulierte Struktur- und Lochbildungsmodell basiert bisher lediglich auf Mutationsanalysen und ersten EPR-Studien, weshalb im Zuge dieser Arbeit erstmals die detaillierte Struktur sowie die Funktion des Pinholins S<sup>21</sup>68 mittels biophysikalischer Methoden untersucht werden soll. Hierzu sollen Fragmente des Pinholins mittels chemischer Peptidsynthese dargestellt werden. Die  $\alpha$ -helikale Faltung der verschiedenen Pinholin Fragmente in Lipidvesikeln soll mittels CD-Spektroskopie bestimmt werden. Durch kombinierte Anwendung von orientierter CD (OCD)-Spektroskopie und Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*)-Spektroskopie soll daraufhin die Membranorientierung der Fragmente in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten ermittelt werden. Darüber hinaus soll die Funktion des Pinholins mittels eines fluoreszenzbasierten Vesikel-Leckschlag (*Leakage*)-Experiments untersucht werden und so erste experimentelle Beweise für die rein regulatorische Funktion der TMD1 sowie den lochbildenden Charakter der TMD2 liefern. Inwieweit die Homo-Oligomerisierung der Pinholine während der Lochbildung über das Glycin-Zipper Motiv auf der TMD2 beeinflusst wird, soll zudem anhand verschiedener Mutanten, mit deletiertem Glycin-Zipper Motiv, ermittelt werden. Mittels eines gröbenselektiven Leakage-Experiments soll die Größe der von der TMD2 in der inneren Bakterienmembran gebildeten Löcher ermittelt werden.

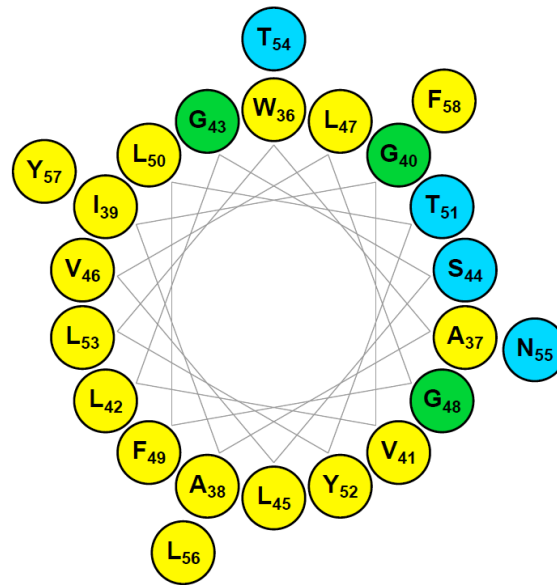
### 3 Ergebnisse

Im Zuge dieser Arbeit wurde das Pinholins S<sup>2168</sup> des Bakteriophagen  $\phi$ 21, welches sich in die innere Membran seines Bakterienwirts einlagert<sup>31,76</sup>, strukturell und funktionell untersucht. T. PARK *et al.* konnten zeigen, dass eine Pinholin Mutante mit deletierter TMD1 immer noch lytisch aktiv ist<sup>63</sup>, weshalb die TMD2 für die Lochbildung verantwortlich sein muss und die TMD1 vermutlich nur regulatorische Aufgaben übernimmt. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die beiden TMDs des Pinholins getrennt voneinander untersucht. Des Weiteren konnten die mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellten Pinholin Fragmente in deutlich größeren Ausbeuten erhalten werden, verglichen zu einem Pinholin Gesamtkonstrukt. Dies erwies sich als großer Vorteil, da gerade für die Festkörper-NMR-Spektroskopie große Mengen an markiertem Peptid benötigt werden.

#### 3.1 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der TMD2 des Pinholins S<sup>2168</sup>

##### 3.1.1 Darstellung der TMD2 des Pinholins S<sup>2168</sup>

Zu Beginn dieser Arbeit lag der Fokus auf der strukturellen und funktionellen Analyse der lochbildenden TMD2 des Pinholins S<sup>2168</sup>. Die postulierte Sequenz der TMD2 (W<sub>36</sub> bis F<sub>58</sub>)<sup>63</sup> wird von zwei aromatischen Aminosäuren flankiert. Solch eine Begrenzung einer TMD stellt ein allgemeines Merkmal von Membranproteinen dar, da sich aromatische Aminosäuren bevorzugt in die Lipid-Wasser-Grenzregion einlagern. Durch die Wechselwirkungen der aromatischen Seitenketten mit den Lipiden werden Membranproteine fest in der Membran verankert<sup>112-114</sup>. Bei genauerer Betrachtung der Sequenz der TMD2 in einem *helical wheel plot* (Abb. 20), welcher die Aufsicht auf eine Helix darstellt, ist erkennbar, dass es sich bei der TMD2 des Pinholins um eine amphiphile Helix handelt. Eine Seite der Helix ist komplett mit hydrophoben Aminosäuren (Abb. 20, gelbe Kreise) ausgekleidet, wohingegen sich auf der gegenüberliegenden Seite hauptsächlich polare Aminosäuren (Abb. 20, blaue Kreise) sowie Glycine (Abb. 20, grüne Kreise) befinden.



**Abbildung 20: Helical wheel plot der TMD2 des Pinholins S<sup>2168</sup>**

Erstellt wurde der *helical wheel plot* mittels der Protein-ORIGAMI-Webanwendung<sup>115</sup>. Hydrophobe Aminosäuren sind gelb markiert und polare Aminosäuren blau, Glycine sind in grün dargestellt.

Das für die Charakterisierung der TMD2 des Pinholins S<sup>2168</sup> verwendete Fragment umfasst die Sequenz der TMD2, wobei der C-Terminus um vier Aminosäuren (K<sub>59</sub>I<sub>40</sub>R<sub>41</sub>E<sub>42</sub>) aus der natürlichen Sequenz verlängert wurde (Tab. 1). Durch diese verlängerte Sequenz wurde die Polarität des Peptids erhöht und somit die Handhabung deutlich verbessert. Im weiteren Verlauf wird dieses Fragment als TMD2 bezeichnet.

**Tabelle 1: Aminosäuresequenzen der chemisch synthetisierten TMD2 Fragmente**

Die postulierte Sequenz der TMD2 des Pinholins<sup>63</sup> ist unterstrichen. Die für die Charakterisierung der TMD2 verwendeten Peptide sind aufgelistet. Für die späteren Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Messungen wurde die TMD2 an verschiedenen Positionen der Sequenz selektiv <sup>15</sup>N-markiert, wobei das <sup>15</sup>N-markierte Leucin in der Sequenz jeweils rot markiert ist. Die Peptide wurden mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese von Dr. Parvesh Wadhvani, Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck (KIT, IBG2) hergestellt, wobei das <sup>15</sup>N-markierte Leucin manuell gekoppelt wurde. Die Aufreinigung der Fragmente erfolgte mittels HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

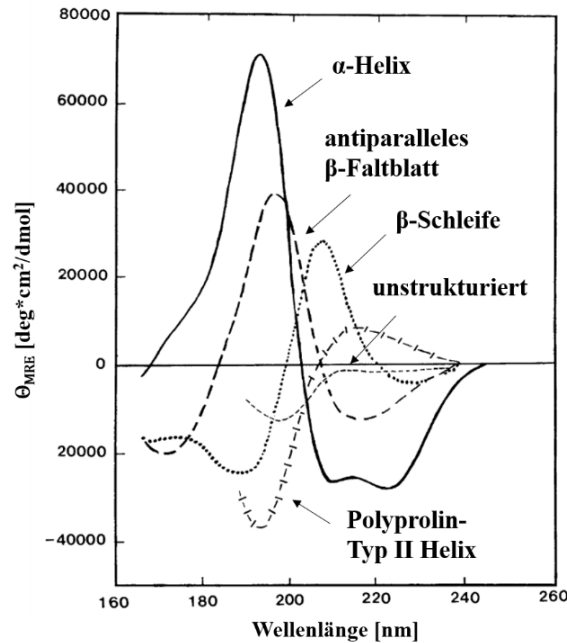
Peptid	Sequenz
TMD2	<u>WAAIGVLGSLVLGFLTYLTNLYFKIRE</u> -Amid
<sup>15</sup> N-L <sub>42</sub> TMD2	WAAIGV <b>L</b> GSLVLGFLTYLTNLYFKIRE-Amid
<sup>15</sup> N-L <sub>45</sub> TMD2	WAAIGVLG <b>S</b> LVLGFLTYLTNLYFKIRE-Amid
<sup>15</sup> N-L <sub>47</sub> TMD2	WAAIGVLGSLV <b>L</b> GFLTYLTNLYFKIRE-Amid
<sup>15</sup> N-L <sub>50</sub> TMD2	WAAIGVLGSLVLG <b>F</b> LTYLTNLYFKIRE-Amid
<sup>15</sup> N-L <sub>42,45,47,50</sub> TMD2	WAAIGV <b>L</b> G <b>S</b> L <b>V</b> L <b>G</b> F <b>L</b> T <b>L</b> T <b>N</b> L <b>Y</b> F <b>K</b> I <b>R</b> E-Amid

Für die späteren Festkörper-NMR-Messungen wurde der Kern <sup>15</sup>N gewählt, da dieser in der Peptidbindung isoliert vorliegt. Aufgrund der geringen relativen Häufigkeit dieses Kerns muss das Peptid allerdings mit diesem Isotop angereichert werden. Die Positionen der selektiven

<sup>15</sup>N-Markierungen in der Aminosäuresequenz wurden so gewählt, sodass sich auf jeder Seite der Helix eine <sup>15</sup>N-markierte Aminosäure befindet (Tab. 1, Abb. 20).

### 3.1.2 Sekundärstrukturanalyse der TMD2 des Pinholins S<sup>2168</sup>

Mittels Synchrotron-basierter (SR)CD-Spektroskopie wurde zunächst die Sekundärstruktur der TMD2 untersucht. Bei der CD-Spektroskopie handelt es sich um eine strukturebiologische Methode zur Bestimmung der globalen Sekundärstrukturanteile von Peptiden und Proteinen. Zur Analyse der Struktur eines Moleküls mittels CD-Spektroskopie ist das Vorhandensein eines Chromophors, welcher in der Nähe eines Chiralitätszentrums lokalisiert ist, erforderlich. Bei der Betrachtung von Peptiden und Proteinen ist dies durch die Amidbindung in der Nähe des chiralen C<sub>α</sub>-Atoms des Peptidrückgrats gewährleistet<sup>116</sup>. Die Grundlage dieser Methode bildet die Bestrahlung einer optisch aktiven Probe mit linear polarisiertem Licht, welches sich aus zwei zirkular polarisierten Komponenten zusammensetzt. Der Zirkulardichroismus basiert auf der unterschiedlich starken Absorption des links und rechts polarisierten Lichts von chiralen Molekülen. Nach Durchtritt des linear polarisierten Lichts durch die optisch aktive Probe und dessen unterschiedlichen Absorption wird elliptisch polarisiertes Licht erhalten<sup>117,118</sup>. Die Bestrahlung von Peptiden oder Proteinen mit linear polarisiertem Licht induziert zwei verschiedene elektronische Übergänge ( $n \rightarrow \pi^*$  und  $\pi_{nb} \rightarrow \pi^*$ ) der Bindungselektronen der Peptidbindung im fernen UV-Bereich. Aufgrund der unterschiedlichen Orientierung der Amidbindung in den verschiedenen Sekundärstrukturelementen werden charakteristische Absorptionsbanden erzeugt (Abb. 21)<sup>119,120</sup>



**Abbildung 21: CD-Basispektrern der reinen Sekundärstrukturelemente**

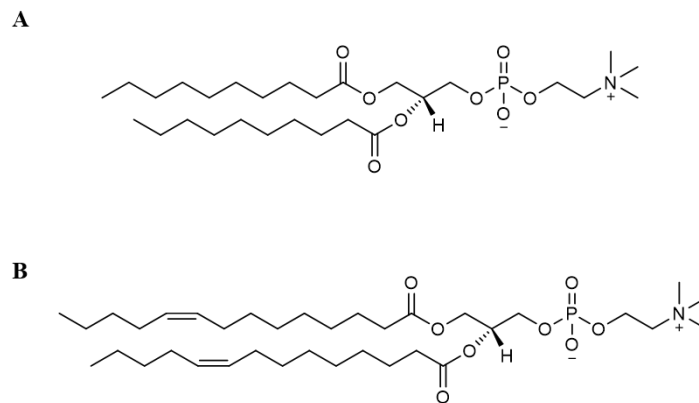
Das CD-Basispektrum einer  $\alpha$ -Helix weist drei charakteristische Banden auf, mit einer positiven Bande bei 193 nm sowie zwei negative Banden bei 208 nm und 222 nm. Antiparallele  $\beta$ -Faltblatt Strukturen weisen eine positive Bande bei etwa 195 nm und eine negative Bande bei etwa 218 nm auf. Sofern das Protein unstrukturiert vorliegt zeigt sich dies in einer negativen Bande bei etwa 198 nm. Des Weiteren kann mittels CD-Spektroskopie auch auf  $\beta$ -Schleifen oder auf eine Polyprolin-Typ II Helix geschlossen werden<sup>119,120</sup>(Abbildung verändert entnommen aus S. M. KELLY *et al.*<sup>119</sup>).

Für die SRCD-Spektroskopie wurden Lipidvesikel mit konstanter Peptidkonzentration hergestellt und das molare Peptid- zu Lipidverhältnis (P/L) betrug 1 zu 50. Die exakte Bestimmung der Peptidkonzentration erwies sich jedoch als sehr problematisch, da die TMD2 lediglich in 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol (HFIP) löslich ist. Da von Tryptophan und Tyrosin die Extinktionskoeffizienten in HFIP nicht verfügbar sind und zudem sich dieses Lösungsmittel als äußerst flüchtig erweist, konnte die Konzentration des Peptids in den Proben nicht bestimmt werden. Eine quantitative Sekundärstrukturbestimmung über die Berechnung der mittleren molaren Elliptizität pro Peptidbindung ( $\theta_{MRE}$ , *Mean Residue Ellipticity*), bei der die Peptidkonzentration sowie die Schichtdicke der Küvette miteinbezogen wird, ist daher lediglich bezogen auf die eingewogene Peptidmenge und nicht auf die exakt bestimmte Peptidkonzentration möglich. Da dieses Vorgehen jedoch relativ fehlerbehaftet ist, wurden für einen qualitativen Vergleich der Sekundärstruktur die SRCD-Spektren auf ihr Minimum normiert. Bei der Ermittlung der Sekundärstruktur der TMD2 wurden als Membran-imitierende Modellsysteme verschiedene Phosphoglyceride<sup>121</sup> verwendet. Durch die Verwendung unterschiedlicher Lipidsysteme konnte der Einfluss der Membrandicke sowie des Sättigungsgrads der Lipidacylketten auf die Faltung der TMD2 ermittelt werden (Tab. 2 und Abb. 22).

**Tabelle 2: Eigenschaften der verwendeten Lipide**

Die hydrophobe Membrandicke  $d_c$  wurde für die verschiedenen Lipide nach D. MARSH *et al.* berechnet<sup>122</sup>. Die angegebene Phasenübergangstemperatur ( $T_m$ ), bei der die Lipide von der Gelphase in die flüssigkristalline Phase übergehen, wurde von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) übernommen.

Lipid	Abkürzung	Kettenlänge	$d_c$ [Å]	$T_m$ [°C]
1,2-Didecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DDPC	di-C10:0	16,6	
1,2-Dimyristoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DMoPC	di-C14:1 ( $\Delta 9$ - <i>cis</i> )	19,2	
1,2-Dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DLPC	di-C12:0	21	-2
1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DPoPC	di-C16:1 ( $\Delta 9$ - <i>cis</i> )	23	-36
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DMPC	di-C14:0	25,4	24
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DOPC	di-C18:1 ( $\Delta 9$ - <i>cis</i> )	26,8	-17
1,2-Dieicosenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DEiPC	di-C20:1 ( $\Delta 11$ - <i>cis</i> )	30,6	-4
1,2-Dierucoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DERPC	di-C22:1 ( $\Delta 13$ - <i>cis</i> )	34,4	13

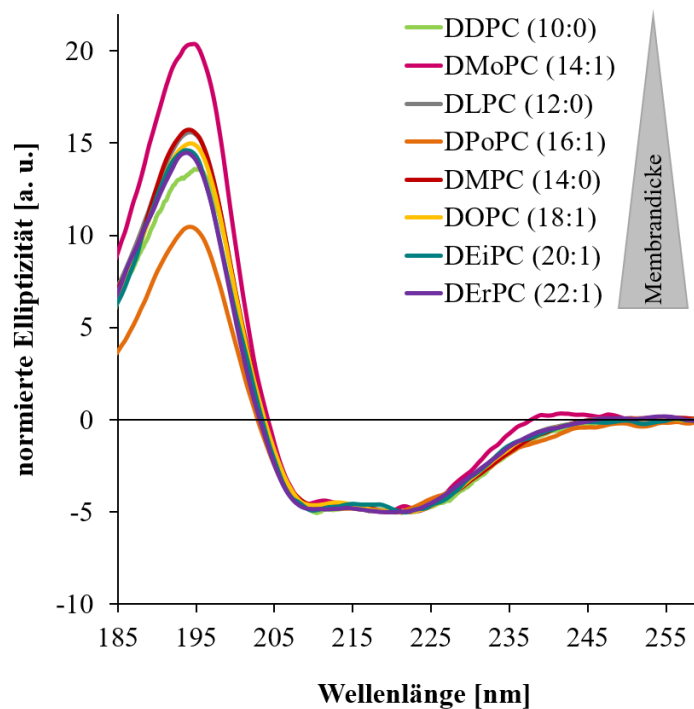


**Abbildung 22: Übersicht der Lipidstrukturen**

(A) Struktur des Phosphatidylcholinlipids DDPC (10:0), dessen Lipidacylketten vollständig gesättigt vorliegen. Die übrigen verwendeten Lipide mit gesättigten Lipidacylketten unterscheiden sich nur bezogen auf ihre Kettenlänge (siehe Tab. 2). (B) Struktur des Phosphatidylcholinlipids DMoPC (14:1), dessen Acylketten einfach ungesättigt sind. Die anderen Lipide mit einfach ungesättigten Lipidacylketten unterscheiden sich bezogen auf ihre Kettenlänge und der Position ihrer Doppelbindung (siehe Tab. 2).

In Abbildung 23 sind die erhaltenen (SR)CD-Spektren der TMD2 in Phosphatidylcholinlipiden mit unterschiedlicher Acylkettenlänge dargestellt. Alle Spektren wurden auf ihr Minimum im Bereich von 222 nm normiert. Die SRCD-Spektren der TMD2 in den unterschiedlichen Lipidsystemen wurden am UV-CD12 Strahlrohr (KIT, KARA) aufgenommen, lediglich das CD-Spektrum der TMD2 in DDPC Vesikeln wurde konventionell an einem Jasco J-815 CD-Spektropolarimeter aufgenommen. Aufgrund der schwächeren Lichtquelle des konventionellen CD-Spektropolarimeters ist die Qualität des Spektrums der TMD2 in DDPC (Abb. 23, grünes Spektrum) im Vergleich zu den übrigen Spektren qualitativ schlechter. Die Hintergrundabsorption von Lipiden, insbesondere von Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten, trägt vor allem im Bereich der kürzeren Wellenlängen zu einem erhöhten Rauschen im Spektrum bei. Die höhere Intensität der Lichtquelle bei den SRCD-Messungen verbessert

hingegen das Signal-zu-Rausch Verhältnis erheblich und liefert auch im Bereich der kürzeren Wellenlängen zuverlässige Spektren<sup>123–125</sup>. Alle (SR)CD-Spektren der TMD2 weisen die charakteristischen CD-Banden einer  $\alpha$ -Helix, mit einer positiven Bande bei etwa 194 nm und den beiden negativen Banden bei etwa 209 nm und 222 nm, auf (Abb. 23). Demnach liegt die TMD2 in den untersuchten Lipidsystemen  $\alpha$ -helikal gefaltet vor und die Sekundärstruktur wird somit weder durch die Membrandicke noch durch den Sättigungsgrad der Lipidacylketten stark beeinflusst.



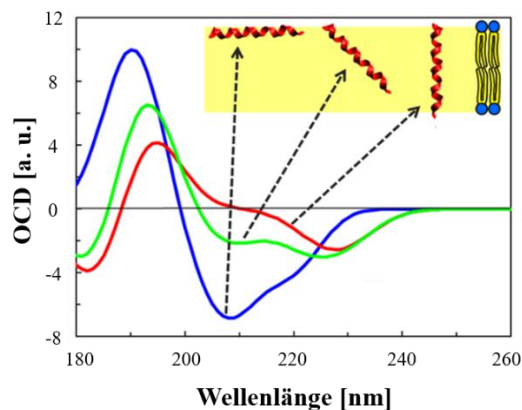
**Abbildung 23: Qualitative Sekundärstrukturanalyse der TMD2 in Lipidvesikeln mit unterschiedlicher Acylkettenlänge**  
 Die TMD2 wurde in Lipidvesikeln in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 rekonstituiert, wobei die Peptidmenge konstant gehalten wurde. Es wurden Lipide mit unterschiedlicher Acylkettenlänge verwendet. Die Spektren wurden am UV-CD12 Strahlrohr (KIT, KARA) aufgenommen, lediglich das Spektrum der TMD2 in DDPC (10:0) wurde konventionell an einem Jasco J-815 CD-Spektropolarimeter aufgenommen. Alle Messungen wurden bei 35 °C durchgeführt und die erhaltenen Spektren auf ihr Minimum im Bereich von 222 nm normiert. Die TMD2 zeigt in allen untersuchten Lipidsystemen die charakteristischen Linienformen einer  $\alpha$ -Helix mit einer positiven Bande bei 194 nm und zwei negativen Banden bei 209 nm und 222 nm. Die (SR)CD-Messungen der TMD2 in DDPC, DMoPC, DLPC, DPOPC sowie DErPC wurden von M. Sc. Anne C. Görner im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt.

### 3.1.3 Untersuchung der Membranorientierung der TMD2 des Pinholins S<sup>2168</sup>

Nachdem mittels CD-Spektroskopie die  $\alpha$ -helikale Faltung der TMD2 in verschiedenen Lipidsystemen belegt werden konnte, sollte daraufhin deren Orientierung in den analogen Lipiden ermittelt werden. Für die Bestimmung der Orientierung von Peptiden in Membranen bietet sich die kombinierte Anwendung der OCD- und Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Spektroskopie an.

### 3.1.3.1 Einfluss der hydrophoben Membrandicke und des Sättigungsgrads der Lipidacylketten auf die Orientierung der TMD2

Die orientierte CD-Spektroskopie stellt eine Abwandlung der konventionellen CD-Spektroskopie dar, bei der die Orientierung  $\alpha$ -helikaler Peptide in makroskopisch orientierten Modellmembranen untersucht werden kann<sup>126</sup>. Grundlage dieser Methode bildet die Moffitt-Theorie, welche besagt, dass die elektronischen Übergänge der Amidbindung einer  $\alpha$ -Helix in Übergangsdipolmomenten resultieren, welche entweder parallel oder senkrecht entlang der Helixachse polarisiert sind<sup>126,127</sup>. Da die Intensität der Absorption abhängig von der Ausrichtung der Helix in der Membran relativ zum zirkular polarisierten Licht ist, ergeben sich charakteristische OCD-Spektren für an orientierte Membranen ausgerichtete  $\alpha$ -helikale Peptide (Abb. 24). Sofern die Peptidhelix parallel zur Membranoberfläche ausgerichtet ist, spiegelt sich dies in einer ausgeprägten negativen Bande in der „Fingerabdruckregion“ bei etwa 208 nm wieder. Die Abwesenheit der Bande bei 208 nm ist hingegen charakteristisch für eine aufrechte transmembrane Orientierung der Helix. Eine in der Membran schräg geneigte Helix ist anhand einer weniger stark ausgeprägten Bande bei 208 nm ersichtlich<sup>128,129</sup>. Allerdings liefert die OCD-Spektroskopie nur globale Informationen über die Orientierung eines  $\alpha$ -helikalen Peptids in der Membran, da beim gleichzeitigen Auftreten von verschiedenen Membranausrichtungen lediglich ein Mischspektrum erhalten wird.



**Abbildung 24: Charakteristische OCD-Spektren von  $\alpha$ -helikalen Peptiden in Membranen**

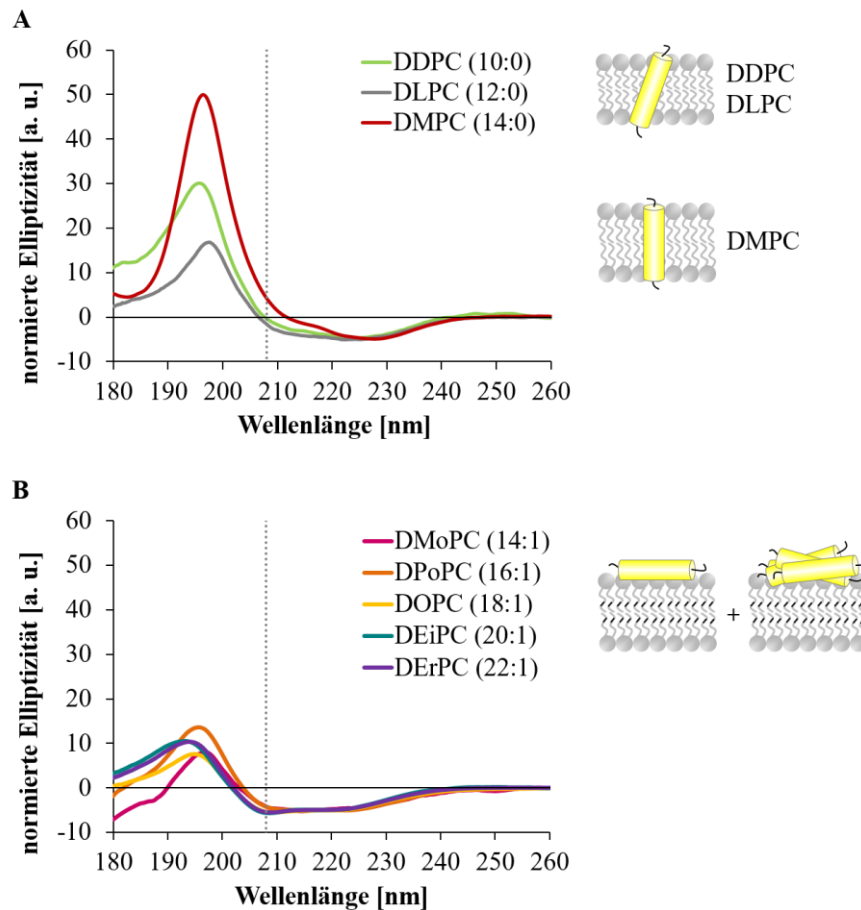
Anhand der spezifische Linienform eines OCD-Spektrums kann auf die Ausrichtung der Helix in Bezug auf die Membran geschlossen werden. Die „Fingerabdruckregion“ bei 208 nm gibt dabei Auskunft über die Orientierung des  $\alpha$ -helikalen Peptids in der Membran. Parallel zur Membranoberfläche ausgerichtete Peptide erzeugen eine intensive negative Bande bei 208 nm. Je positiver diese Bande wird, desto aufrechter ist die Helix in der Membran inseriert. Eine vollständig aufrechte transmembrane Orientierung spiegelt sich demnach in einer positiven Bande bei 208 nm wieder<sup>128,129</sup> (Abbildung verändert entnommen aus J. BÜRCK *et al.*<sup>129</sup>).

Für die Ermittlung der Orientierung der TMD2 in Membranen wurde diese in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 rekonstituiert. Zunächst wurde der Einfluss der Membrandicke und des Sättigungsgrads der



Acylketten auf die Orientierung der TMD2 untersucht. Abbildung 25 zeigt die entsprechenden SROCD-Spektren in Lipiddoppelschichten mit variierender hydrophober Dicke zwischen 16,6 Å und 34,4 Å (siehe Tab. 2)<sup>122</sup>. Zum besseren qualitativen Vergleich der Unterschiede, bezogen auf die charakteristische Bande bei etwa 208 nm, wurden die Spektren auf ihr Minimum im Bereich von 223 nm normiert. In Lipiden mit gesättigten Acylketten nimmt die TMD2 eine transmembrane Orientierung ein, da die charakteristische Bande bei 208 nm nicht beziehungsweise nur leicht ausgeprägt ist. Zudem weisen die positive und negative Bande, verglichen zu dem isotropen CD-Signal, eine Verschiebung zu längeren Wellenlängen auf, was ebenfalls charakteristisch bei Vorliegen einer transmembranen Orientierung der Helix ist (Abb. 25A). In DMPC Membranen (Abb. 25A, rotes Spektrum) mit einer moderaten hydrophoben Dicke von 25,4 Å ist die TMD2 aufrecht in der Membran inseriert<sup>130</sup>. In den dünneren Lipiddoppelschichten aus DLPC ( $d_c = 21$  Å, Abb. 25A, graues Spektrum) und DDPC ( $d_c = 16,6$  Å, Abb. 25A, grünes Spektrum) ist die TMD2 nicht mehr komplett aufrecht in der Membran eingelagert, sondern passt sich durch eine leicht geneigte Orientierung der hydrophoben Dicke der Membran an, um einen hydrophoben *mismatch* (Ungleichgewicht) zu vermeiden<sup>131-133</sup>. In Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten ist hingegen eine ausgeprägte negative Bande bei 208 nm erkennbar (Abb. 25B). Folglich ist die TMD2 in diesen Lipiden nicht in der Membran inseriert, sondern ist parallel zur Membranoberfläche orientiert. Die SROCD-Spektren lassen zudem eine Abflachung der Absorption im kurzwelligen Bereich erkennen, was vermutlich auf eine teilweise Aggregation des Peptids auf der Membranoberfläche zurückzuführen ist. Ungewöhnlicherweise scheint die TMD2 in Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten demnach auf die Membranoberfläche zu Flippen. Diese Beobachtung ist jedoch überraschend, da lediglich für die TMD1 ein Flippen aus der Membran postuliert wird<sup>63,67</sup>. Da es sich bei der TMD2 allerdings um eine amphiphile Helix (siehe *helical wheel plot*, Abb. 20) handelt, wäre eine Orientierung parallel zur Membranoberfläche ebenfalls energetisch günstig. Die hydrophobe Seite der TMD2 wäre im geflippten Zustand den Lipiden zugewandt und die polaren Aminosäuren wären der hydrophilen Umgebung ausgesetzt. Erstaunlicherweise korreliert das beobachtete Flippen der TMD2 nicht mit der hydrophoben Dicke der Membran, was ersichtlich wird bei dem Vergleich der SROCD-Daten der beiden Lipide DDPC und DLPC, deren Acylketten gesättigt sind, mit dem Lipid DMoPC (direkter Vergleich der Spektren siehe Anhang, Kapitel 12.1). In sehr dünnen Membranen aus DDPC mit einer hydrophoben Dicke von 16,6 Å passt sich die TMD2 dem hydrophoben *mismatch* durch Neigung an (Abb. 25A, grünes Spektrum). Die Membran

aus DMoPC ist mit einer hydrophoben Dicke von 19,2 Å im Vergleich etwas dicker, weshalb sich die Helix eigentlich weiter aufrichten sollte, allerdings ist die TMD2 in diesem Lipid, dessen Acylketten einfach ungesättigt sind, auf der Oberfläche lokalisiert (Abb. 25B, magentafarbenes Spektrum). Hingegen nimmt die TMD2 in der nächst dickeren DLPC Membran ( $d_c = 21$  Å) wieder eine transmembrane Orientierung ein (Abb. 25A, graues Spektrum), wobei die Helix etwas weniger geneigt ist als in dünneren DDPC Membranen.



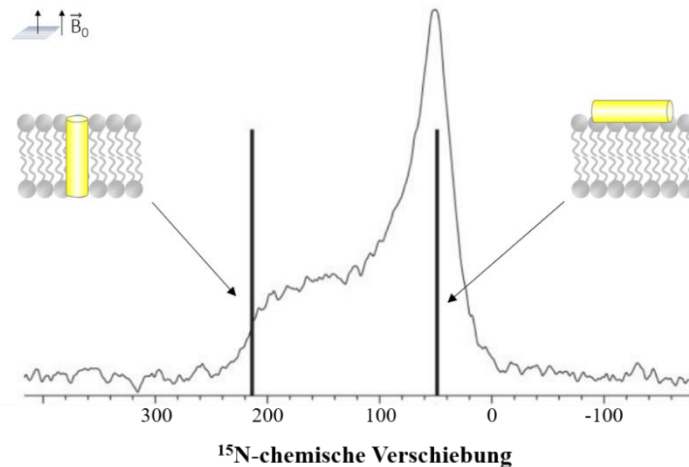
**Abbildung 25: SROCD-Spektren der TMD2 in Lipiden mit unterschiedlichem Sättigungsgrad der Lipidacylketten**

Die TMD2 wurde in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten rekonstituiert ( $P/L = 1:50$ ). Die Messungen wurden bei 35 °C durchgeführt und die erhaltenen Spektren wurden auf ihr Minimum im Bereich von 223 nm normiert. (A) In Lipiden mit gesättigten Acylketten ist die charakteristische Bande bei 208 nm nicht oder nur leicht ausgeprägt. Die TMD2 nimmt in diesen Membranen folglich eine transmembrane Orientierung ein, wobei sie sich dem hydrophoben *mismatch* durch Neigung anpasst. (B) Die SROCD-Spektren der TMD2 in Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten weisen alle eine negative Bande bei 208 nm auf, folglich liegt die TMD2 in einem geflippten Zustand vor. Zudem deutet die Abflachung der Absorption im kurzwelligen Bereich auf eine teilweise Aggregation der TMD2 auf der Oberfläche hin. Die SROCD-Messungen wurden von M. Sc. Anne C. Görner im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt. Auf der rechten Seite ist die schematische Orientierung der TMD2 (gelb) in Membranen (grau) dargestellt, wobei jeweils die Doppelbindung in den einfach ungesättigten Lipidacylketten schwarz markiert ist.

Die erhaltenen SROCD-Daten zeigen, dass die TMD2 des Pinholins in Lipiden mit gesättigten Acylketten eine transmembrane Orientierung einnimmt und sich der hydrophoben Dicke der Membran durch Neigung anpasst. Hingegen scheint die TMD2 in Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten, unabhängig von der hydrophoben Dicke der Membran, auf die

Membranoberfläche zu Flippen. Eventuell könnte das beobachtete Flippen der TMD2 aufgrund ihres amphiphilen Charakters lediglich ein Artefakt sein, da hier nur ein verkürztes TMD2 Fragment untersucht wurde und nicht das Pinholin Gesamtkonstrukt.

Neben der OCD-Spektroskopie wurden auch Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen zur Bestimmung der Membranorientierung der TMD2 durchgeführt. Bei beiden Methoden erfolgt die Rekonstitution des Peptids in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten, wodurch die Ergebnisse sehr gut miteinander vergleichbar sind. Die Festkörper-NMR-Spektroskopie erweist sich als attraktive Methode zur detaillierten Strukturaufklärung von Membranproteinen<sup>134–136</sup>, da durch die chemische Verschiebungsanisotropie (CSA, *Chemical Shift Anisotropy*), die dipolare Kopplung sowie die Quadrupolaufspaltung Informationen über die Orientierung gewonnen werden können. Bei der Flüssig-NMR-Spektroskopie wird hingegen die Richtungsabhängigkeit der CSA durch die schnellen Bewegungen der Moleküle zu isotropen Signalen ausgemittelt. Für die Festkörper-NMR-Messungen erweist sich beispielsweise der NMR-aktive Kern  $^{15}\text{N}$  als gut geeignet, da er einen Kernspin I von  $\frac{1}{2}$  besitzt und zudem isoliert in der Peptidbindung vorliegt. Da dessen natürliche Häufigkeit jedoch relativ gering ist, muss die Probe mit diesem Isotop angereichert werden. Die Orientierung eines selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierten  $\alpha$ -helikalen Peptids kann durch einfache Betrachtung des  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebungssignals bestimmt werden (Abb. 26). Hierfür muss das Peptid in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten rekonstituiert werden, wobei die Membrannormale typischerweise parallel zum statischen Magnetfeld  $B_0$  ausgerichtet wird. Das Pulverspektrum eines unorientierten  $\alpha$ -helikalen Peptids ergibt Signale im Bereich zwischen 60 ppm und 220 ppm, welches sich aus den Signalen aller möglichen Orientierungen der Helix zusammensetzt. Bei einer transmembranen Ausrichtung des Peptids ist dieses parallel zum Magnetfeld  $B_0$  und würde Signale bei einer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung zwischen 160 ppm bis 220 ppm liefern. Hingegen erzeugt ein auf der Oberfläche lokalisiertes Peptid Signale bei einer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung im Bereich von 60 ppm bis 100 ppm<sup>134</sup>.



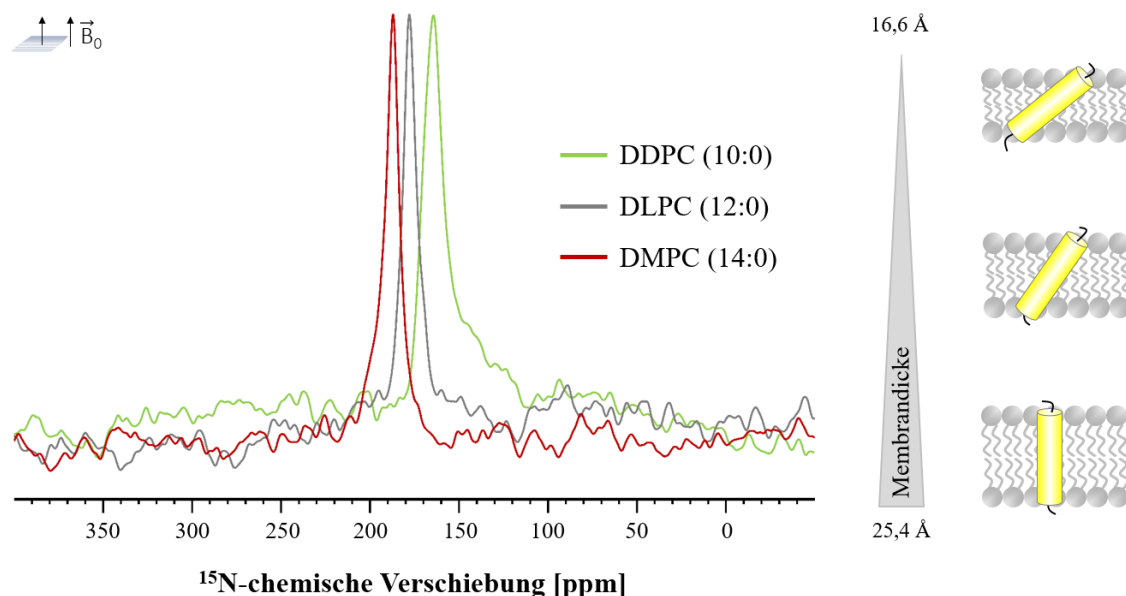
**Abbildung 26: 1D-Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum eines  $\alpha$ -helikalen Peptids in orientierten Lipiddoppelschichten**

Die Orientierung selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierter  $\alpha$ -helikaler Peptide in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten kann mittels 1D-Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie durch Betrachtung des  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebungssignals bestimmt werden. Das Pulverspektrum eines in der Membran unorientierten Peptids, welches sich aus Signalen aller möglichen Orientierungen zusammensetzt, liegt im Bereich zwischen 60 ppm und 220 ppm. Sofern das Peptid in einer transmembranen Orientierung vorliegt, liegt dessen  $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebung im Bereich von 160 ppm bis 220 ppm. Hingegen erzeugt eine auf der Oberfläche lokalisierte Helix ein Signal bei einer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung im Bereich von 60 ppm bis 100 ppm<sup>134</sup> (Abbildung verändert entnommen aus E. STRANDBERG *et al.*<sup>134</sup>).

Für die Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen wurde die  $^{15}\text{N}$ -L<sub>47</sub> markierte TMD2 in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 rekonstituiert. Die Messungen wurden bei einer 0°-Orientierung der Membrannormalen relativ zum statischen Magnetfeld  $B_0$  durchgeführt. Da als Membranimitierende Modellsysteme Phosphoglyceride, deren Kopfgruppe eine Phosphatgruppe aufweisen, verwendet wurden, konnte die Orientierung der Lipidmoleküle vor und nach den  $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR-Experimenten überprüft werden ( $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren siehe Anhang, Kapitel 12.2.). Sofern die Lipidmoleküle orientiert vorliegen sind diese bei der 0°-Orientierung der Membrannormalen parallel zum statischen Magnetfeld  $B_0$  ausgerichtet, weshalb sie einen schmalen Peak mit hoher Intensität bei einer  $^{31}\text{P}$ -chemischen Verschiebung von etwa 30 ppm erzeugen. Hingegen wäre ein ausgeprägtes Pulverspektrum, welches eine Überlagerung aller möglichen Orientierungen im Raum widerspiegelt, charakteristisch für den Verlust der Orientierung der Lipide. Die aufgenommenen  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren zeigen, dass die Orientierung der Lipidmoleküle während der gesamten Messdauer nicht stark beeinflusst wurde. In Abbildung 27 sind die  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>47</sub> markierten TMD2 in Lipiden mit gesättigten Acylketten und unterschiedlicher hydrophober Membrandicke dargestellt. Die  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren weisen ein Signal im Bereich von 160-220 ppm auf, was einer transmembranen Orientierung der TMD2 entspricht. In DMPC Lipiddoppelschichten (Abb. 27, rotes Spektrum) mit einer moderaten Membrandicke von 25,4 Å<sup>122</sup> durchspannt die TMD2 die

## ERGEBNISSE

Membran vollständig aufgerichtet, da sie ein scharfes Signal bei einer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung von 185 ppm aufweist<sup>130</sup>. In dünneren Membranen aus DLPC mit einer hydrophoben Dicke von 21 Å<sup>122</sup> liegt das Signal bei einer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung von 178 ppm, welches einer geneigten Helix in der Membran zugeordnet werden kann (Abb. 27, graues Spektrum). Das Signal bei einer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung von 165 ppm in den sehr dünnen DDPC Lipiddoppelschichten mit einer hydrophoben Dicke von 16,6 Å<sup>122</sup> entspricht einer noch stärker geneigten Helix (Abb. 27, grünes Spektrum). Demnach verschiebt sich das Signal mit abnehmender hydrophober Membrandicke ins Hochfeld, was einer zunehmenden Neigung der Helix in der Lipiddoppelschicht entspricht. Die TMD2 passt sich demnach der hydrophoben Membrandicke an, um den hydrophoben *mismatch* zu vermeiden<sup>131–133</sup>.



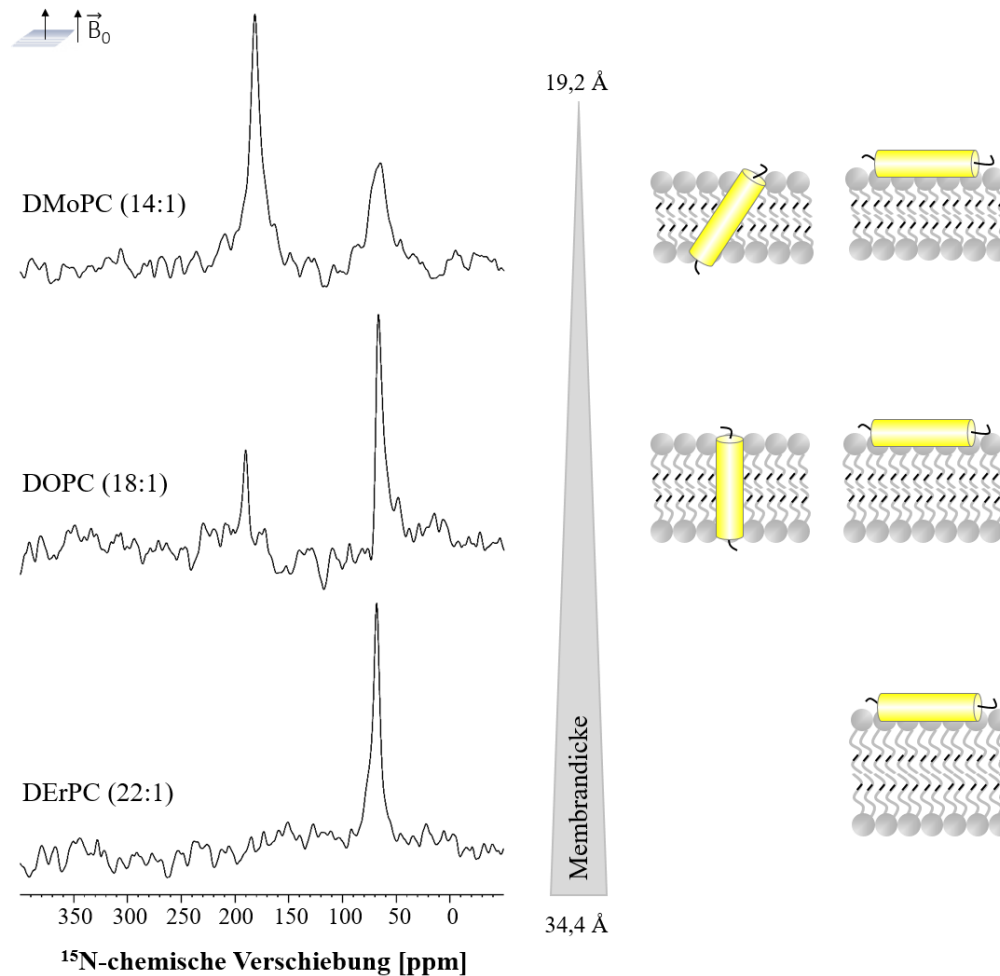
**Abbildung 27: Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>47</sub> markierten TMD2 in Lipiden mit gesättigten Acylketten**  
Die  $^{15}\text{N}$ -L<sub>47</sub> markierte TMD2 wurde in Lipiden mit gesättigten Acylketten und unterschiedlicher Kettenlänge rekonstituiert (P/L = 1:50) und die Messungen wurden bei 35 °C durchgeführt. In den untersuchten Membranen nimmt die TMD2 eine transmembrane Orientierung ein, da nur Signale im Bereich einer insertierten Helix vorliegen. Vollständig aufgerichtet liegt sie in DMPC Membranen (rotes Spektrum) vor, da ein scharfes Signal bei einer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung von 185 ppm erkennbar ist<sup>130</sup>. Mit abnehmender hydrophober Dicke der Membran verschiebt sich die  $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebung weiter ins Hochfeld, was einer Neigung der Helix in der Membran entspricht. In Lipiddoppelschichten aus DLPC (graues Spektrum) liegt das Signal bei 178 ppm und in DDPC (grünes Spektrum) bei 165 ppm. Die  $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen wurden von M. Sc. Anne C. Görner im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt. Die entsprechende Orientierung der Helix (gelb) in den unterschiedlich dicken Membranen (grau) ist schematisch auf der rechten Seite dargestellt.

Zur Untersuchung inwieweit der veränderte Sättigungsgrad die Orientierung der TMD2 in der Membran verändert, wurde die  $^{15}\text{N}$ -L<sub>47</sub> markierte TMD2 in makroskopisch orientierten Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten und unterschiedlicher Kettenlänge rekonstituiert (P/L = 1:50). In sehr dünnen Membranen aus DMoPC mit einer hydrophoben Dicke von 19,2 Å<sup>122</sup> zeigt das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum der TMD2 zwei deutlich voneinander getrennte

spektrale Bereiche auf (Abb. 28). Das intensivere Signal bei 184 ppm stammt von parallel zum Magnetfeld orientierten Peptidanteilen, wobei die TMD2 leicht geneigt insertiert vorliegt. Hingegen repräsentiert das zweite Signal bei einer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung von 62 ppm ein auf der Membranoberfläche lokalisiertes Peptid. Durch Erhöhung der hydrophoben Dicke der Membran mit  $26,8 \text{ \AA}^{122}$  in DOPC Lipiddoppelschichten richtet sich die TMD2 weiter auf, was an dem leicht tieffeldverschobenen Signal bei einer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung von 190 ppm ersichtlich ist (Abb. 28). Auch in den DOPC Membranen ist ein Signal einer oberflächenorientierten TMD2 bei einer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung von 67 ppm vorhanden. Da im Vergleich die Signalintensität des Signals der insertierten TMD2 geringer ist, liegt in DOPC Membranen ein größerer Peptidanteil geflippt vor (Abb. 28). Letztendlich liegt die TMD2 in den extrem dicken DErPC Membranen mit einer hydrophoben Dicke von  $34,4 \text{ \AA}^{122}$  sogar ausschließlich geflippt vor, da nur ein Signal bei 68 ppm erkennbar ist (Abb. 28). Die TMD2 liegt in Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten demnach sowohl insertiert als auch geflippt vor, wobei mit zunehmender hydrophober Dicke der Membran der geflippte Peptidanteil zunimmt. Eine mögliche Proteinaggregation des Peptids auf der Membranoberfläche, welche die Signale einer auf der Membranoberfläche lokalisierten TMD2 erklären würde, kann jedoch ausgeschlossen werden, da keine Pulveranteile in den  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren erkennbar sind. Eventuell ist dieses ungewöhnliche Flippen der TMD2 darauf zurückzuführen, dass hier nur ein TMD2 Fragment verwendet wurde und nicht ein Pinholin Gesamtkonstrukt.

Bei Vergleich der Signale der insertierten Peptidanteile mit der hydrophoben Dicke der Membran ist ersichtlich, dass die beobachtete Aufrichtung der Helix mit der zunehmenden Membrandicke korreliert. In den sehr dünnen Membranen aus DDPC ( $d_c = 16,6 \text{ \AA}^{122}$ ), dessen Acylketten gesättigt sind, ist die TMD2 sehr stark geneigt (Abb. 27, grünes Spektrum) und in DLPC ( $d_c = 21 \text{ \AA}^{122}$ ), dessen Lipidacylketten ebenfalls gesättigt sind, ist die TMD2 weniger stark geneigt (Abb. 27, graues Spektrum). Durch die Zunahme der hydrophoben Dicke der Membran richtet sich die TMD2 in DMOPC Membranen ( $d_c = 19,2 \text{ \AA}^{122}$ ), dessen Acylketten einfach ungesättigt sind, weiter auf, bis die Helix in Membranen aus dem DOPC ( $d_c = 26,8 \text{ \AA}^{122}$ ) aufrecht insertiert vorliegt (Abb. 28).

## ERGEBNISSE



**Abbildung 28: Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>47</sub> markierten TMD2 in Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten**

Die  $^{15}\text{N}$ -L<sub>47</sub> markierte TMD2 wurde in Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten mit unterschiedlicher Kettenlänge rekonstituiert (P/L = 1:50) und die  $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen wurden bei 35 °C durchgeführt. Das Signal bei 184 ppm in den sehr dünnen DMOPC Membranen entspricht einer leicht geneigten transmembranen Orientierung der TMD2. Zudem liegt ein geringer Peptidanteil geflippt vor, da ein zweites Signal bei 62 ppm erkennbar ist. Mit zunehmender hydrophober Dicke nimmt der Anteil an geflippter TMD2 in DOPC Membranen zu, da das Signal bei 67 ppm, welches der oberflächengebundenen TMD2 entspricht, intensiver ist als das Signal der aufrecht inserierten TMD2 bei 190 ppm. In den extrem dicken Membranen aus DErPC liegt die TMD2 vollständig auf der Membranoberfläche, da das Spektrum lediglich ein Signal bei 68 ppm zeigt. Eine Aggregation des Peptids auf der Oberfläche der Membran kann allerdings ausgeschlossen werden, da keine Pulveranteile erkennbar sind. Die  $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen wurden von M. Sc. Anne C. Görner im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt. Auf der rechten Seite ist die schematische Orientierung der TMD2 (gelb) in Membranen (grau) dargestellt, wobei jeweils die Doppelbindung in den ungesättigten Lipidacylketten in schwarz markiert ist.

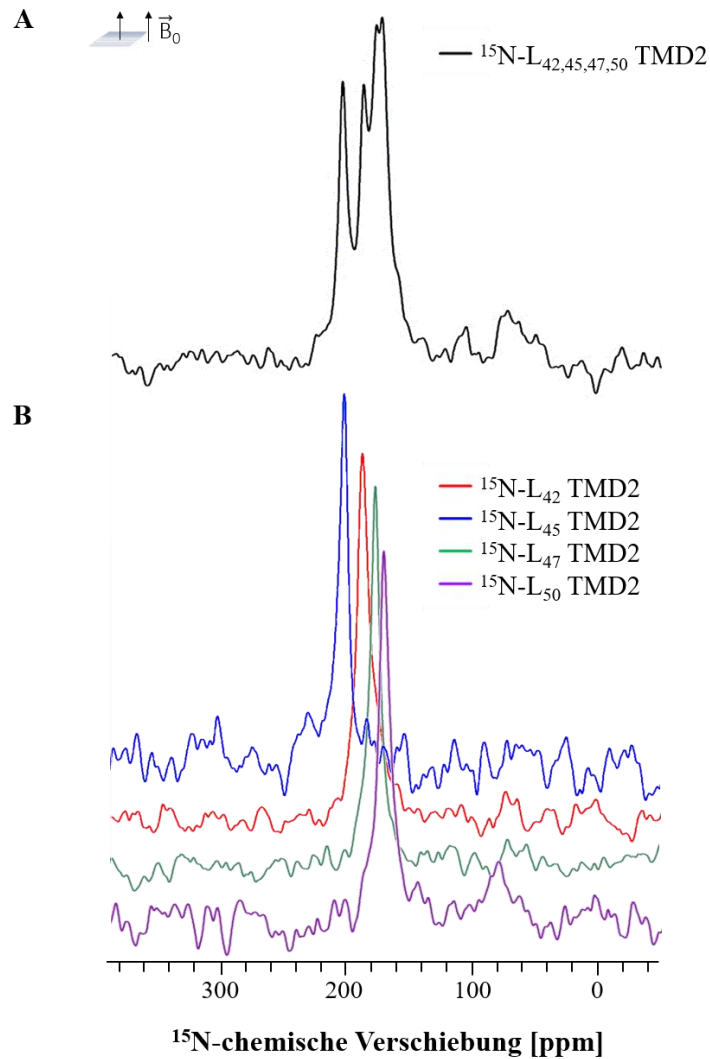
Zusammenfassend konnten die SROCD- und Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen zeigen, dass die hydrophobe Dicke der Lipiddoppelschichten sowie der Sättigungsgrad der Lipidacylketten die Orientierung der TMD2 in der Membran beeinflussen. In Lipiden mit gesättigten Acylketten sowie in denen mit einfach ungesättigten Acylketten passt sich die TMD2 durch Neigung der hydrophoben Dicke der Membran an. Neben der transmembranen Orientierung der TMD2 liegt diese allerdings in Membranen aus Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten zusätzlich in einem geflippten Zustand vor, wohingegen die TMD2 in Lipiden mit gesättigten Acylketten

eine vollständig transmembrane Orientierung einnimmt. Demnach scheinen die ungesättigten Lipidacylketten die TMD2 aus der Membran zu drücken, wobei dieser Effekt mit steigender hydrophober Membrandicke zunimmt. Bei dem beobachteten Flippen könnte es sich allerdings auch nur um ein Artefakt handeln, da hier nur ein TMD2 Fragment verwendet wurde.

### ***3.1.3.2 Bestimmung des Neigungswinkels $\tau$ und des Rotationswinkels $\rho$ der TMD2***

Für die detaillierte Bestimmung der Membranorientierung der TMD2 wurde daraufhin als Membran-imitierendes Modellsystem DMPC gewählt, da die TMD2 in diesem Lipidsystem vollständig aufrecht in der Membran insertiert vorliegt und ein Flippen auf die Oberfläche der Membran nicht beobachtet wurde. Zudem hat sich DMPC als etabliertes System für die Festkörper-NMR-Spektroskopie erwiesen<sup>137,138</sup>. Ein Vorteil von DMPC liegt in seiner guten Orientierung in der biologisch relevanten lamellaren Phase auf den Glasplättchen, welche zur Herstellung der orientierten Proben für die NMR-Messungen verwendet werden. Zudem behält DMPC seine Orientierung über einen weiten Bereich von Temperatur- und Hydratationsniveaus bei. Abbildung 29 zeigt die entsprechenden 1D-Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Spektren der vierfach <sup>15</sup>N-markierten TMD2 (Abb. 29A) sowie der vier einfach selektiv <sup>15</sup>N-markierten TMD2 (Abb. 29B)<sup>130</sup>. Die Signale aller <sup>15</sup>N-NMR-Spektren liegen im Bereich zwischen 180 ppm und 215 ppm, demnach nimmt die TMD2 eine transmembrane Orientierung in den DMPC Lipiddoppelschichten ein. Das <sup>15</sup>N-NMR-Spektrum der <sup>15</sup>N-L<sub>42,45,47,50</sub> markierten TMD2 (Abb. 29A, schwarzes Spektrum) weist vier unterschiedliche Signale auf. Anhand der Überlagerung der Spektren ist ersichtlich, dass jedes Signal dieser vier Signale einem der einfach <sup>15</sup>N-markierten TMD2 zugeordnet werden kann. Das Signal der <sup>15</sup>N-L<sub>42</sub> markierten TMD2 (Abb. 29B, rotes Spektrum) liegt bei einer <sup>15</sup>N-chemischen Verschiebung von 196 ppm, der <sup>15</sup>N-L<sub>45</sub> markierten TMD2 (Abb. 29B, blaues Spektrum) bei 213 ppm, der <sup>15</sup>N-L<sub>47</sub> markierten TMD2 (Abb. 29B, grünes Spektrum) bei 185 ppm und der <sup>15</sup>N-L<sub>50</sub> markierten TMD2 (Abb. 29B, lila Spektrum) bei 180 ppm<sup>130</sup>.





**Abbildung 29: Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren verschiedener selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierter TMD2 in DMPC Membranen**  
 Die verschiedenen selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierten Peptide wurden in makroskopisch orientierten DMPC-Doppelschichten ( $P/L = 1:50$ ) rekonstituiert und die Messungen wurden bei  $35^\circ\text{C}$  durchgeführt. (A) Das Spektrum der  $^{15}\text{N}$ - $L_{42,45,47,50}$  markierten TMD2 weist vier verschiedene Signale im Bereich zwischen 180 ppm und 215 ppm auf, demnach nimmt die TMD2 eine transmembrane Orientierung ein. (B) Das Signal der  $^{15}\text{N}$ - $L_{42}$  markierten TMD2 (rotes Spektrum) liegt bei einer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung von 196 ppm, der  $^{15}\text{N}$ - $L_{45}$  markierten TMD2 (blaues Spektrum) bei 213 ppm, der  $^{15}\text{N}$ - $L_{47}$  markierten TMD2 (grünes Spektrum) bei 185 ppm und der  $^{15}\text{N}$ - $L_{50}$  markierten TMD2 (lila Spektrum) bei 180 ppm<sup>130</sup>. Die Messungen wurden von M. Sc. Anne C. Görner im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt (Abbildung verändert entnommen aus L. M. E. STEGER *et al.*<sup>130</sup>).

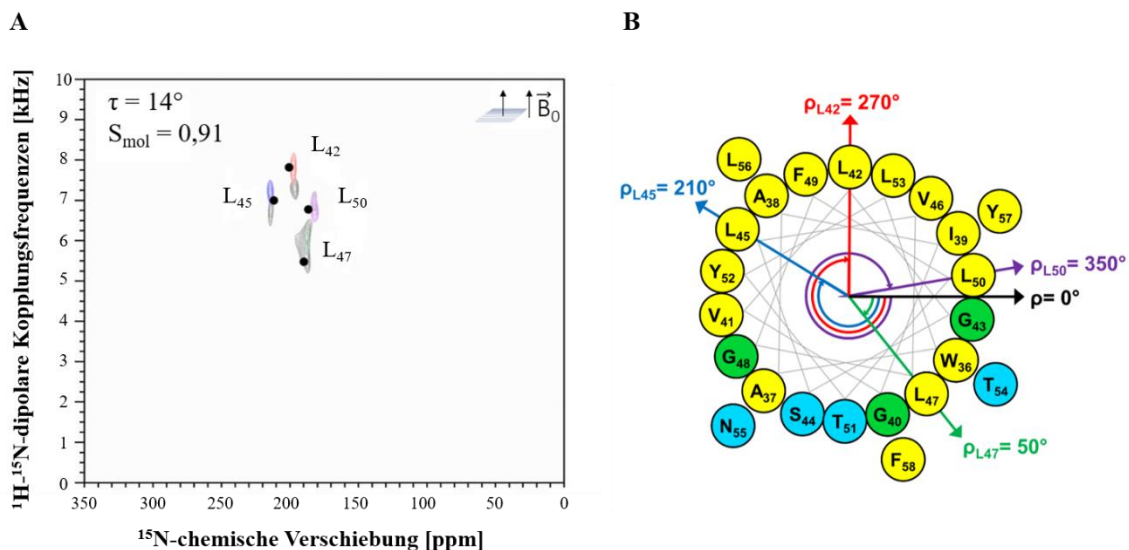
Des Weiteren wurden zur Ermittlung der Membranorientierung der TMD2 2D-SAMMY Experimente durchgeführt, bei denen die  $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebung mit der dipolaren  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Kopplungsfrequenz korreliert wird<sup>139,140</sup>. Solche 2D-SAMMY-Experimente ergeben für  $\alpha$ -Helices charakteristische ringförmige Signalmuster, welche als PISA (*Polarity Index Slant Angle*)-wheels bezeichnet werden. Anhand solcher PISA-wheels kann auf den Neigungswinkel  $\tau$  und den Rotationswinkel  $\rho$  einer Helix in der Membran geschlossen werden<sup>141–143</sup>. Zudem geben PISA-wheels Auskunft über die Beweglichkeit einer Helix in der Membran, da der Ordnungsparameter  $S_{\text{mol}}$  daraus ermittelt werden kann<sup>142,143</sup>.

Die Orientierung der Lipidmoleküle wurde vor und nach den Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR-Experimenten überprüft ( $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren siehe Anhang, Kapitel 12.2.). Zu Beginn der Messungen waren die Lipide in allen Proben orientiert. Einige der nach den  $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen aufgenommenen  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren deuten auf einen leichten Verlust der Orientierung der Lipide hin, was auf die Austrocknung der Probe sowie einem Lipidabbau zurückzuführen ist. Das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum der vierfach  $^{15}\text{N}$ -L<sub>42,45,47,50</sub> markierten TMD2 zeigt, dass die Orientierung der Lipide dieser Probe nicht stark beeinflusst wurde. Da die Signale der  $^{15}\text{N}$ -NMR-Messung der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>42,45,47,50</sub> markierten TMD2 sehr gut mit den Signalen der einfach selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierten TMD2 übereinstimmen, ist anzunehmen, dass die verschlechterte Orientierung der Lipide erst gegen Ende der Messung erfolgte und somit das Messergebnis nicht verfälschen<sup>130</sup>.

Die 2D-SAMMY-Messungen der vierfach markierten  $^{15}\text{N}$ -L<sub>42,45,47,50</sub> TMD2 sowie der vier verschiedenen einfach  $^{15}\text{N}$ -markierten TMD2 sind in Abbildung 30A gezeigt<sup>130</sup>. Analog zu der 1D-Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messung zeigt das 2D-Spektrum der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>42,45,47,50</sub> markierten TMD2 (Abb. 30A, schwarzes Spektrum) vier verschiedene Signale im Bereich von 180 ppm bis 213 ppm und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -dipolaren Kopplungsfrequenzen zwischen 5,8 kHz und 7,8 kHz, welche mit den Signalen der vier einfach  $^{15}\text{N}$ -markierten TMD2 übereinstimmen. Durch den Vergleich des Signalmusters des erhaltenen PISA-*wheels* mit simulierten Spektren, welche unter Annahme einer idealen Helix mittels des Programms *opisawheel* erstellt wurden, konnte für die  $\alpha$ -helikale TMD2 ein Neigungswinkel  $\tau$  von  $14^\circ$  mit einem Ordnungsparameter  $S_{\text{mol}}$  von 0,91 ermittelt werden. Demnach ist die TMD2 leicht geneigt und relativ steif in DMPC Membranen eingelagert<sup>130</sup>. Für die anschließende Bestimmung der Rotationswinkel  $\rho$ , welcher die Lage des  $\text{C}_\alpha$ -Atoms einer Aminosäure auf der Oberfläche einer Helix angibt, war die Zuordnung der vier verschiedenen Signale im 2D-Spektrum der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>42,45,47,50</sub> markierten TMD2 notwendig. Anhand der 2D-SAMMY-Messungen der vier einfach  $^{15}\text{N}$ -markierten Peptide konnten die Signale leicht zugeordnet werden. Das Signal bei 196 ppm und 7,8 kHz kann der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>42</sub> markierten TMD2 (Abb. 30A, rotes Spektrum) zugeordnet werden, das bei 213 ppm und 7,2 kHz der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>45</sub> markierten TMD2 (Abb. 30A, blaues Spektrum), das bei 185 ppm und 5,8 kHz der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>47</sub> markierten TMD2 (Abb. 30A, grünes Spektrum) und das bei 180 ppm und 6,8 kHz der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>50</sub> markierten TMD2 (Abb. 30A, lila Spektrum)<sup>130</sup>. Mittels des Programms *opisawheel* wurden anschließend die Rotationswinkel unter Annahme einer idealen  $\alpha$ -Helix, bei welcher die  $\text{C}_\alpha$ -Atome zweier benachbarter Aminosäuren um  $100^\circ$  verdreht sind, ermittelt (Definition des Rotationswinkels  $\rho$  siehe Methoden, Kapitel 7.2.3.). Hierfür wurden mit dem bereits

bestimmten Neigungswinkel und Ordnungsparameter der TMD2 verschiedene 2D-Spektren simuliert, wobei die Rotationswinkel entsprechend variiert wurden, sodass die Signalpositionen der  $^{15}\text{N}$ -markierten Leucine aus den 2D-Messungen der TMD2 am besten mit den simulierten Positionen übereinstimmen. Die schwarzen Punkte im SAMMY-Spektrum entsprechen dem simulierten Spektrum (Abb. 30A) der TMD2 in DMPC Membranen. Die bestimmten Rotationswinkel  $\rho$  betragen für  $L_{47}$   $50^\circ$ , für  $L_{45}$   $210^\circ$ , für  $L_{42}$   $270^\circ$  und für  $L_{50}$   $350^\circ$  (Abb. 30B)<sup>130</sup>. Mit dem festgelegten Rotationswinkel einer Aminosäure kann aufgrund der Periodizität einer idealen  $\alpha$ -Helix jeder einzelnen Aminosäure ihr entsprechender Rotationswinkel zugeordnet werden.

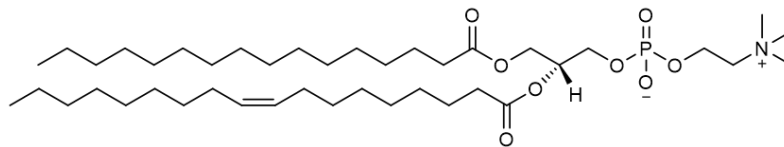
Die Strukturanalyse der TMD2 in DMPC Membranen zeigt, dass neben mehreren polaren Resten ( $T_{51}$ ,  $T_{54}$ ,  $N_{55}$ ) auch ein Glycin-Zipper-Motiv ( $G_{40}\text{XXXS}_{44}\text{XXXG}_{48}$ ) seitlich entlang der geneigten Helix positioniert ist.<sup>130</sup> Dieser polare Streifen, auf dessen Bedeutung T. PANG *et al.*<sup>66,67,101</sup> bereits hingewiesen haben, ist somit frei für Helix-Helix-Wechselwirkungen. Basierend auf der bestimmten Orientierung der TMD2 in der Membran ist die Ausbildung eines rechtsgängigen TMD2 Dimers über das Glycin-Zipper Motiv in der Membran möglich.



**Abbildung 30: 2D-SAMMY-Spektren verschiedener selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierter TMD2 und helical wheel plot der TMD2**  
 (A) Die 2D-SAMMY-Spektren der vierfach  $^{15}\text{N}$ - $L_{42,45,47,50}$  markierten TMD2 (schwarzes Spektrum) sowie der vier verschiedenen einfach  $^{15}\text{N}$ -markierten TMD2 sind gezeigt. Die Peptide wurden in makroskopisch orientierten DMPC-Doppelschichten rekonstituiert ( $P/L = 1:50$ ) und die Messungen wurden bei einer Temperatur von  $35^\circ\text{C}$  durchgeführt. Das 2D-SAMMY-Spektrum der vierfach  $^{15}\text{N}$ - $L_{42,45,47,50}$  markierten TMD2 (schwarzes Spektrum) zeigt vier unterschiedliche Signale, welche eine  $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebung im Bereich von 180 ppm bis 213 ppm und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -dipolare Kopplungsfrequenzen zwischen 5,8 kHz und 7,8 kHz aufweisen. Diese Signale stimmen mit den erhaltenen 2D-SAMMY-Spektren der vier verschiedenen einfach  $^{15}\text{N}$ -markierten TMD2 überein, wobei das Signal bei 196 ppm und 7,8 kHz der  $^{15}\text{N}$ - $L_{42}$  TMD2 (rotes Spektrum), das bei 213 ppm und 7,2 kHz der  $^{15}\text{N}$ - $L_{45}$  TMD2 (blaues Spektrum), das bei 185 ppm und 5,8 kHz der  $^{15}\text{N}$ - $L_{47}$  TMD2 (grünes Spektrum) und das bei 180 ppm und 6,8 kHz der  $^{15}\text{N}$ - $L_{50}$  TMD2 (lila Spektrum) zugeordnet werden kann. Die schwarzen Punkte entsprechen dem durch das Programm *opisawheel* simulierten Spektrum einer idealen  $\alpha$ -Helix mit  $\tau = 14^\circ$  und  $S_{\text{mol}} = 0,91$ <sup>130</sup>. (B) Die ermittelten Rotationswinkel  $\rho$  der verschiedenen  $^{15}\text{N}$ -markierten Leucine sind in dem *helical wheel plot* der TMD2, welches mittels der Protein-ORIGAMI-Webanwendung<sup>115</sup> erstellt wurde, gezeigt. Hydrophobe Aminosäuren sind gelb markiert und polare Aminosäuren blau, Glycine sind in grün dargestellt (Abbildung verändert entnommen aus L. M. E. STEGER *et al.*<sup>130</sup>).

### 3.1.3.3 Struktur und Orientierung der TMD2 in Membranen für die Funktionsanalyse

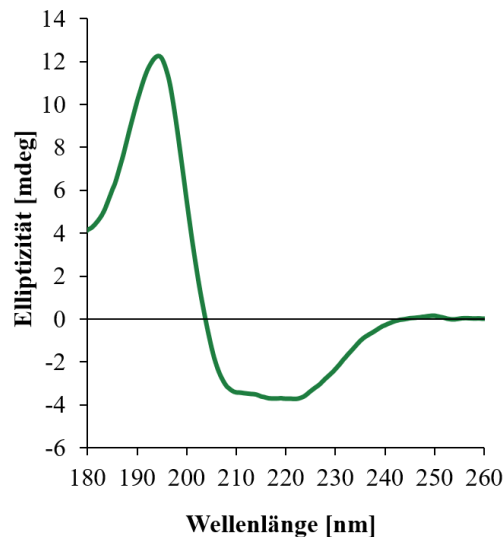
Für die nachfolgenden fluoreszenzbasierten Untersuchungen des lochbildenden Charakters der TMD2 war es allerdings nicht möglich als Membran-imitierendes Modellsystem das Lipid DMPC zu verwenden. Bei den Funktionsexperimenten sind stabile Vesikel essentiell, da die Undichtigkeit der Vesikel, hervorgerufen durch das Peptid, untersucht werden soll. Aufgrund der hohen Phasenübergangstemperatur von DMPC ist es allerdings nur schwer möglich die Lipide während der gesamten Probenvorbereitung in ihrer biologisch relevanten flüssigkristallinen Phase zu halten. Da sich die aus DMPC hergestellten Vesikel zudem als undicht erwiesen, wurde das Lipid POPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) für die fluoreszenzbasierten Messungen verwendet. Aus POPC hergestellte Vesikel erweisen sich als stabil und durch die niedrige Phasenübergangstemperatur ( $T_m = -2\text{ °C}$ ) bleiben die Lipide während der funktionellen Analyse in ihrer flüssigkristallinen Phase. Strukturell unterscheidet sich POPC von den bisherig verwendeten Lipiden bezogen auf seine Lipidacylketten. In POPC ist eine Acylkette gesättigt (16:0) und die andere, um zwei Kohlenstoffatome verlängerte Acylkette, liegt in einem einfach ungesättigten Zustand vor (18:1) (Abb. 31).



**Abbildung 31: Struktur von POPC (16:0-18:1)**

Das Phosphoglycerid POPC verfügt über eine gesättigte Lipidacylkette (16:0) sowie über eine einfach ungesättigte Lipidacylkette (18:1 ( $\Delta^9$ -*cis*)). Membranen aus POPC weisen eine hydrophobe Dicke von 27,1 Å auf<sup>144</sup> und die Phasenübergangstemperatur  $T_m$  von POPC liegt bei  $-2\text{ °C}$  ( $T_m$  von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) übernommen).

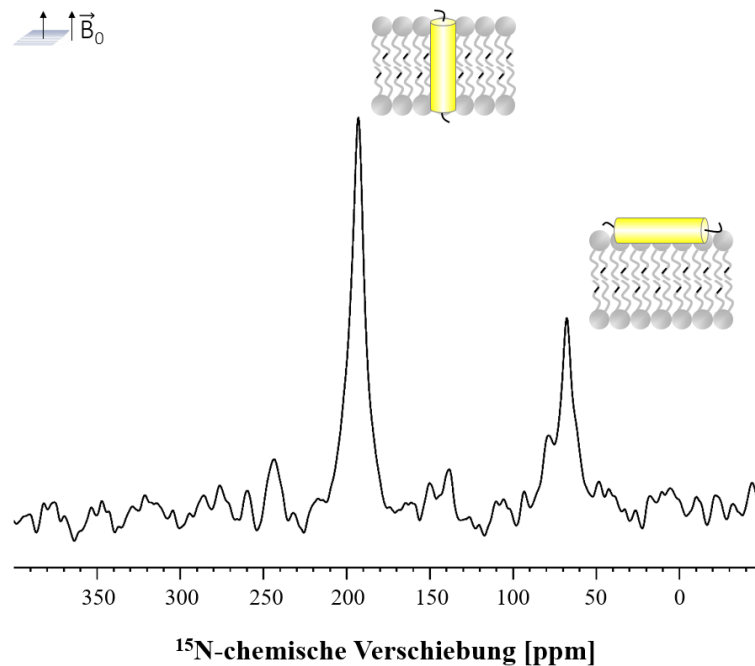
Vor der funktionellen Analyse der TMD2 wurde deren Faltung in POPC Vesikeln überprüft. Hierfür wurde die TMD2 in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 in POPC Vesikeln rekonstituiert. Das erhaltene SRCD-Spektrum weist ebenfalls die charakteristischen Banden einer  $\alpha$ -Helix mit einer positiven Bande bei 194 nm und den beiden negativen Banden bei 209 nm und 222 nm auf (Abb. 32).



**Abbildung 32: SRCD-Spektrum der TMD2 in POPC Vesikeln**

Die TMD2 wurde in POPC Vesikeln in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 rekonstituiert und die Messung wurde bei 22 °C durchgeführt. Das erhaltene SRCD-Spektrum der TMD2 weist eine positive Bande bei 194 nm und zwei negative Banden bei 209 nm und 222 nm auf. Diese Linienform ist charakteristisch für eine  $\alpha$ -helikale Faltung.

Nachdem die  $\alpha$ -helikale Faltung der TMD2 in POPC bestätigt werden konnte, wurde auch die Orientierung der TMD2 in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten ermittelt. Das Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>47</sub> markierten TMD2 zeigt, dass die TMD2 in POPC Membranen zwei verschiedene Orientierungen einnimmt. Das intensivere Signal bei 193 ppm zeigt, dass die TMD2 größtenteils aufrecht in der Membran inseriert vorliegt (Abb. 33). Ein gewisser Peptidanteil liegt jedoch geflippt vor, da ein Signal bei einer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung von 68 ppm zu erkennen ist. Eine auf der Oberfläche lokalisierte Orientierung wurde bereits in Lipiden, bei welchen beide Acylketten einfach ungesättigt sind, beobachtet (Abb. 28). Im weiteren Verlauf der NMR-Messung der TMD2 in POPC Membranen ist jedoch ein Wechsel der Signalintensitäten zu erkennen und am Ende der dreitägigen Messung ist die TMD2 vollständig auf der Membranoberfläche lokalisiert. Das Austrocknen der Probe während der  $^{15}\text{N}$ -NMR-Messung scheint demnach die Helix vermehrt aus der Membran herauszudrücken. Zu beachten ist, dass sich die Lipide während den fluoreszenzbasierten Funktionsexperimenten in einem vollständig hydratisierten Zustand befinden, da die Messungen in einer Vesikel-Lösung durchgeführt werden. Demnach ist anzunehmen, dass ein Großteil der TMD2 während der Funktionsanalyse eine transmembrane Orientierung einnimmt. Eventuell verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen inserierter und geflippter TMD2 aufgrund der vollständigen Hydratisierung sogar komplett auf die Seite der inserierten Helix.

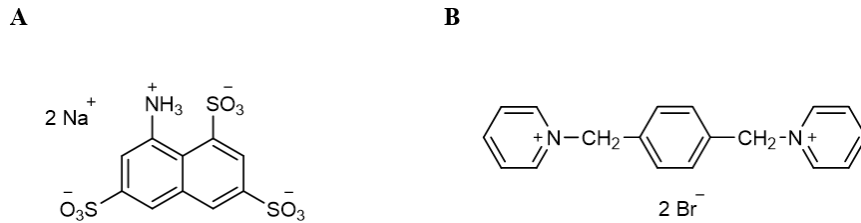


**Abbildung 33: Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messung der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>47</sub> markierten TMD2 in POPC**

Die TMD2 wurde in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten aus POPC rekonstituiert (P/L = 1:50) und die Messung wurde bei 35 °C durchgeführt. Die Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messung der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>47</sub> markierten TMD2 liefert ein Signal bei einer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung von 193 ppm, welches einer aufrecht insertierten Helix zugeordnet werden kann. Das zweite, weniger intensive Signal bei 68 ppm entspricht einer auf der Oberfläche lokalisierten TMD2. Der Intensitätsunterschied der beiden Signale zeigt, dass ein Großteil der TMD2 transmembran vorliegt. Die  $^{15}\text{N}$ -NMR-Messung wurde von M. Sc. Anne C. Görner im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt. Die schematische Orientierung der TMD2 (gelb) in der Membran (grau) ist dargestellt, wobei jeweils die Doppelbindung der einen ungesättigten Lipidacylkette von POPC schwarz markiert ist.

### 3.1.4 Funktionsanalyse der TMD2 des Pinholins S<sup>2168</sup>

Nachdem die  $\alpha$ -helikale Struktur sowie die Orientierung der TMD2 in diversen makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten ermittelt wurde, lag der Fokus auf verschiedenen fluoreszenzbasierten Experimenten zur Untersuchung des lochbildenden Charakters der TMD2 des Pinholins S<sup>2168</sup>. Inwieweit nun die TMD2 Löcher in Membranen induziert und durch welche Faktoren die Lochbildung beeinflusst wird, sollte mittels eines modifizierten fluoreszenzbasierten Vesikel-Leckschlag (*Leakage*)-Experiments untersucht werden. Die Grundlage dieses Experiments bildet die Messung der Fluoreszenz des Fluorophors 6-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonsäure (ANTS) bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und der Fluoreszenzlöschung durch den Quencher p-Xylol-bis(N-pyridiniumbromid) (DPX) (Abb. 34)<sup>145,146</sup>.



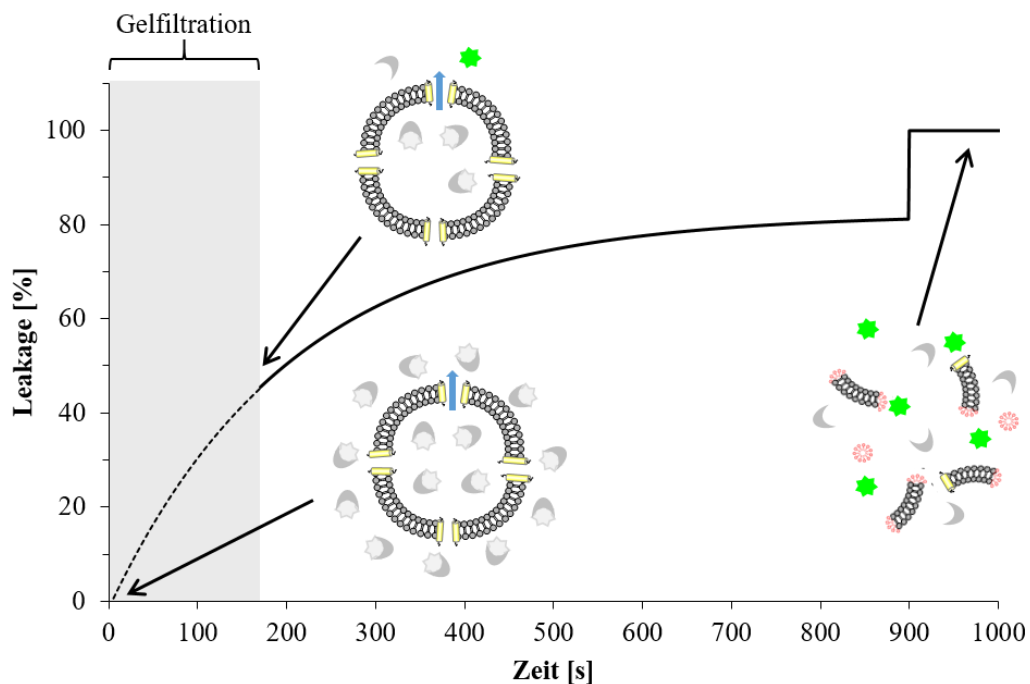
**Abbildung 34: Struktur des verwendeten Fluorophor-Quencher-Paares**

Zur Untersuchung des lochbildenden Charakters der TMD2 wurde der Fluoreszenzfarbstoff ANTS (A) und der Quencher DPX (B) verwendet.

Der Vorgang der Fluoreszenzlöschung wird auch als *Quenching* bezeichnet und beschreibt im Allgemeinen die Verringerung der Fluoreszenzintensität einer Probe. Beim molekularen Kontakt eines Fluorophors mit einem Quencher kehrt dieser ohne die Emission eines Photons zurück in den Grundzustand. Die Anregungsenergie des Fluorophors wird dabei strahlungslos auf den Quencher übertragen<sup>147</sup>.

Bei dem durchgeführten ANTS/DPX-Leakage-Experimenten werden der Farbstoff und der Quencher in LUVs (*Large Unilamellar Vesicles*) eingeschlossen. Zunächst wird innerhalb und außerhalb der Vesikel die Fluoreszenz des ANTS durch den Quencher DPX gequencht. Durch Entfernung der sich im Außenmedium befindlichen Fluorophore und Quencher mittels Gelfiltration kann ein Auslaufen der Vesikel (Leckschlag, *Leakage*) beobachtet werden, sofern das in der Membran eingelagerte Peptid Löcher darin ausbildet. Durch Entweichen der eingeschlossenen Fluorophor- und Quencher-Moleküle wird die Konzentration des DPX stark verdünnt, wodurch dessen *Quenching*-Effizienz abnimmt und die Fluoreszenz des ANTS detektiert werden kann. Bei der Untersuchung der Lochbildung von wasserlöslichen Peptiden wird das Peptid erst nach Entfernung der sich im Außenmedium befindlichen Fluorophore und Quencher zu den LUVs hinzugegeben. Die Grundfluoreszenz der Probe, bei der das Peptid noch nicht eingelagert ist und noch kein Leakage erfolgt, kann somit vor der jeweiligen Messung ermittelt werden. Jedoch erweist sich die TMD2 als wasserunlöslich, weshalb die Herstellung der LUVs durch Cosolubilisierung der TMD2 mit den Lipiden in organischen Lösungsmitteln erfolgt. Da in diesem Fall das Peptid von Beginn an in den LUVs eingelagert ist, bildet dieses bereits Löcher in der Membran aus. Bei der Entfernung der Fluorophore und Quencher erfolgt aufgrund des vorliegenden Konzentrationsgradienten das Leakage bereits auf der Gelfiltrationssäule. In der Zeitspanne in der sich die Probe auf der Gelfiltrationssäule befindet, kann allerdings die Fluoreszenz des ANTS nicht detektiert werden. Daher muss für die Ermittlung der Grundfluoreszenz, welche als 0 % Leakage definiert wird, eine Probe ohne Peptid gemessen werden. Über einen Zeitraum von 900 s wird die Zunahme der ANTS-Fluoreszenz einer Probe aufgenommen. Im Anschluss werden durch Zugabe des Detergenz

Triton X-100 die Vesikel vollständig zerstört und die erhaltene Fluoreszenzintensität entspricht der Gesamtfluoreszenz des in der Probe vorhandenen ANTS. Zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Messungen wird der erhaltene Leakage-Wert nach 900 s angegeben. Die Berechnung der Grundfluoreszenz und der Leakage-Werte kann den Methoden (Kapitel 7.3.1.) entnommen werden. In Abbildung 35 ist die schematische Darstellung der Durchführung des ANTS/DPX-Leakage-Experiments gezeigt.



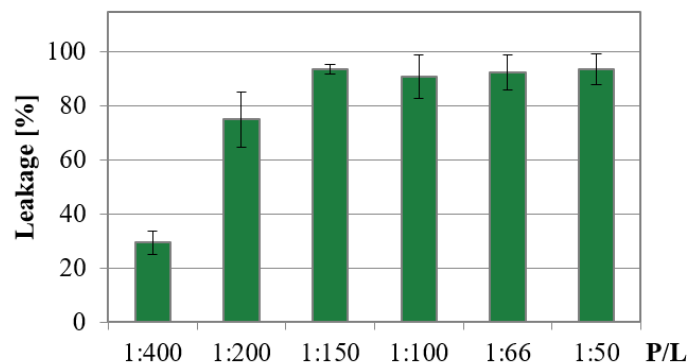
**Abbildung 35: Schematische Darstellung des ANTS/DPX-Leakage-Experiments**

Das Peptid (gelb) wird in LUVs rekonstituiert und die Fluorophore und Quencher befinden sich sowohl innerhalb als auch außerhalb der Vesikel. In dieser Konzentration wird die Fluoreszenz des ANTS (hellgrau) durch den Quencher DPX (grau) gequencht. Die sich im Außenmedium befindlichen ANTS-Fluorophore und die Quencher-Moleküle werden durch eine Gelfiltrationssäule entfernt. Da allerdings die TMD2 bereits vollständig aktiv eingelagert vorliegt und bereits Löcher ausgebildet hat, startet das Leakage bereits auf der Säule. Während der Gelfiltration kann jedoch die Fluoreszenz des ANTS nicht detektiert werden, weshalb die Grundfluoreszenz mittels einer Probe ohne Peptid (bei der eben kein Leakage erfolgt) ermittelt wird und als 0 % Leakage definiert wird. Durch die Freisetzung der ANTS- und DPX-Moleküle aus den LUVs wird die Konzentration des Quenchers im Außenmedium stark verdünnt. Dadurch wird die Fluoreszenz des ANTS nicht mehr gequencht und ein Anstieg der ANTS-Fluoreszenz (grün) kann detektiert werden. Nach 900 s wird das Detergenz Triton X-100 (rot) zur vollständigen Solubilisierung der Vesikel hinzugegeben. Dieser Fluoreszenzwert wird als 100 % Leakage definiert (Abbildung verändert entnommen aus L. M. E. STEGER *et al.*<sup>130</sup>).

Zur Untersuchung des lochbildenden Charakters der TMD2 wurde das Peptid zunächst in POPC LUVs in verschiedenen molaren Peptid- zu Lipidverhältnissen (P/L = 1:400, 1:200, 1:150, 1:100, 1:66, 1:50) rekonstituiert. Das durch die TMD2 induzierte Leakage nach 900 s in POPC LUVs ist in Abbildung 36 gezeigt. Bereits bei der niedrigsten Peptidkonzentration (P/L = 1:400) induziert die TMD2 etwa 30 % Leakage und bei einem molaren Peptid- zu



Lipidverhältnis von 1 zu 200 sind bereits etwa 77 % der Fluorophore aus den Vesikeln herausgeströmt. Bei weiterer Erhöhung der Peptidkonzentration sind im Wesentlichen alle Moleküle aus den LUVs entwichen, da annähernd die Gesamtfluoreszenz aller vorhandenen ANTS-Moleküle detektiert wurde. Die ANTS/DPX-Leakage-Messungen liefern somit den experimentellen Beweis, dass die TMD2 des Pinholins S<sup>21</sup>68 einen stark ausgeprägten lochbildenden Charakter aufweist<sup>130</sup>. Die postulierte Funktion der TMD2, welche bereits anhand einer Lyse-verursachenden Mutante mit deletierter TMD1 von T. PARK *et al.* untersucht wurde<sup>63,66</sup>, kann somit anhand einer biophysikalischen Methode erstmalig bestätigt werden.



**Abbildung 36: ANTS/DPX-Leakage-Messungen der TMD2 in POPC LUVs**

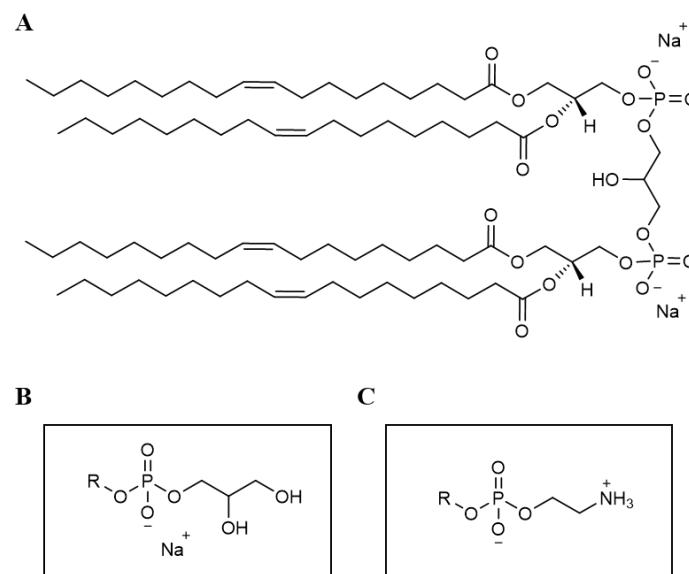
Die TMD2 wurde in POPC LUVs in unterschiedlichen molaren Peptid- zu Lipidverhältnissen (P/L) rekonstituiert und die Temperatur während den Messungen betrug 22 °C. Die Mittelwerte der Leakage-Werte nach 900 s aus drei unabhängigen Messreihen und deren Standardabweichung sind aufgetragen. Deutlich erkennbar ist, dass die TMD2 Löcher in der Membran ausbildet und das schon bei geringer Peptidkonzentration. Ab einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 150 sind im Wesentlichen bereits alle Fluorophore aus den Vesikeln herausgeströmt<sup>130</sup>.

### 3.1.4.1 Einfluss verschiedener Lipidsysteme auf den lochbildenden Charakter der TMD2

Nachdem der lochbildende Charakter der TMD2 des Pinholins S<sup>21</sup>68 mittels ANTS/DPX-Leakage-Messungen erstmalig experimentell bestätigt werden konnte, sollte der Einfluss verschiedener Lipidsysteme auf die Lochbildung näher betrachtet werden.

Da sich das Pinholin S<sup>21</sup>68 in die innere Membran des Bakterienwirts einlagert<sup>76</sup>, sollte zunächst der lochbildende Charakter der TMD2 in einem an die Zusammensetzung der inneren Membran angelehnten Lipidsystem untersucht werden. Zusammengesetzt ist die innere Membran von *E. coli* Bakterien aus 70-80 % POPE (1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin) sowie 15-20 % POPG (1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol)) und 5 % Cardiolipin<sup>40,41</sup>. Für die ANTS/DPX-Leakage-Messungen der TMD2 wurde daher das Lipidsystem POPE/POPG/TOCL (72:23:5, mol/mol/mol) gewählt und als Cardiolipin wurde das 1',3'-Bis(1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho)-glycerol (TOCL)

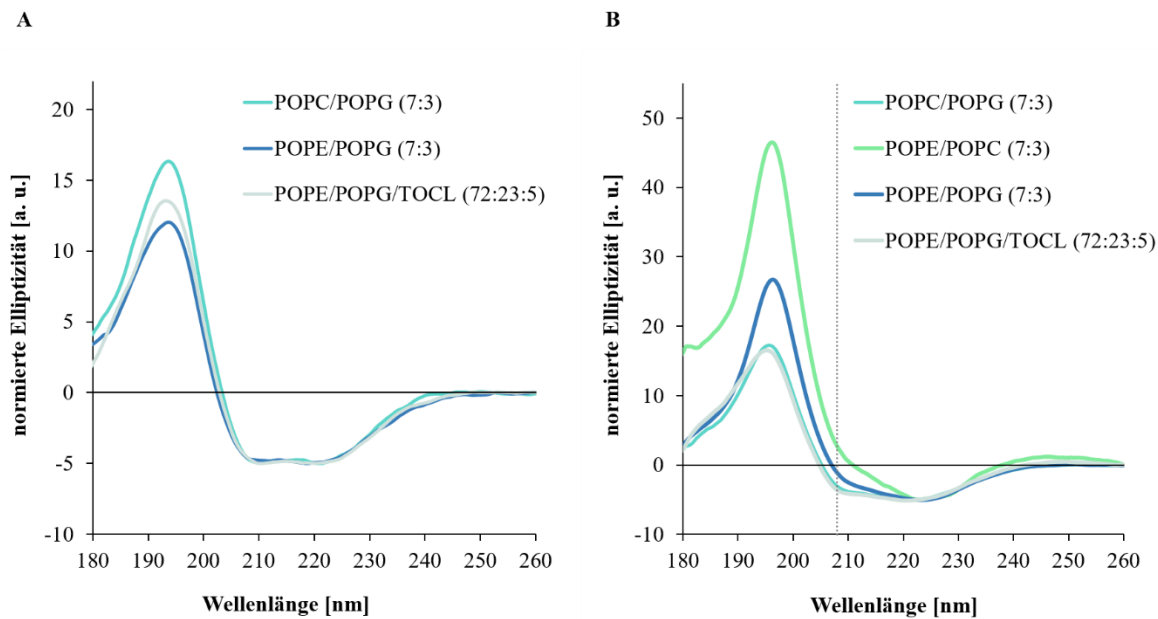
verwendet (Abb. 37A) Des Weiteren sollte der Einfluss verschiedener Lipidkopfgruppenstrukturen auf die Lochbildung der TMD2 in Vesikeln aus verschiedenen POPC, POPG und POPE Lipidmischungen untersucht werden. Das häufig in bakteriellen Membranen vorkommende POPG<sup>148</sup>, trägt im Gegensatz zu den bisher verwendeten Lipiden eine negativ geladene Lipidkopfgruppe (Abb. 37B). Die Ethanolamin-Kopfgruppe von PE-Lipiden ist hingegen vergleichsweise klein (Abb. 37C), weshalb die gebildeten Membranen eine ausgeprägte negative Krümmung aufweisen<sup>149</sup>. Eine Besonderheit von POPG (16:0-18:1) und POPE (16:0-18:1) sind deren unterschiedliche Lipidacylketten, da analog wie bei POPC (siehe Abb. 31) eine Acylkette gesättigt und die Andere einfach ungesättigt ist.



**Abbildung 37: Struktur des verwendeten Cardiolipins und Lipidkopfgruppenstruktur von verschiedenen Lipiden**  
 (A) Struktur des verwendeten Cardiolipins TOCL (18:1) sowie der Lipidkopfgruppenstruktur von PG-Lipiden (B) und PE-Lipiden (C).

Bevor die funktionelle Untersuchung der TMD2 in diesen Lipidsystemen durchgeführt wurde, erfolgte eine Überprüfung der Faltung der TMD2 sowie eine Bestimmung der Membranorientierung. Für die Ermittlung der Sekundärstruktur wurde die TMD2 in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 in den verschiedenen Lipidsystemen rekonstituiert. Die erhaltenen SRCD-Spektren wurden auf ihr Minimum im Bereich von 222 nm normiert und weisen alle die charakteristischen CD-Banden einer  $\alpha$ -Helix, mit einer positiven Bande bei 194 nm sowie den beiden negativen Banden bei 209 nm und 222 nm, auf (Abb. 38A). Somit wird die Sekundärstruktur der TMD2 weder durch die negative Lipidkopfgruppe von POPG, noch durch die spontane negative Krümmung der Membran, hervorgerufen durch das POPE, beeinflusst. Die Sekundärstruktur der TMD2 in POPE/POPC (7:3) Vesikeln konnte allerdings nicht ermittelt werden, da das Peptid bei der Herstellung der

für die SRCD-Messungen benötigten SUVs (*Small Unilamellar Vesicles*) präzipitierte. Nach der bestätigten  $\alpha$ -helikalen Faltung der TMD2 in diesen Lipidsystemen wurde deren Orientierung mittels SROCD-Spektroskopie in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten ermittelt. Die TMD2 wurde hierfür in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 in den verschiedenen Lipidsystemen rekonstituiert und die erhaltenen Spektren wurden auf ihr globales Minimum im Bereich von 223 nm normiert (Abb. 38B). Die SROCD-Spektren der TMD2 in den verschiedenen Lipidsystemen weisen eine negative Bande bei 208 nm auf, welche verglichen zu der Bande bei etwa 223 nm weniger stark ausgeprägt ist. Zu beachten ist, dass die OCD-Spektroskopie lediglich globale Informationen über die Orientierung eines  $\alpha$ -helikalen Peptids in der Membran liefert und daher bei Vorliegen verschiedener Orientierungen ein Mischspektrum erhalten wird. Ein in der Membran geneigtes Peptid würde daher dasselbe Spektrum liefern wie ein Peptid, welches sowohl insertiert als auch auf der Oberfläche lokalisiert ist. Da die  $^{15}\text{N}$ -NMR-Messung der TMD2 in POPC Membranen zeigte, dass diese sowohl transmembran als auch geflippt vorliegt (siehe Abb. 33), ist es sehr wahrscheinlich, dass sich die TMD2 in den hier untersuchten Lipidsystemen analog verhält. Die unterschiedlich stark ausgeprägte Bande bei 208 nm in den SROCD-Spektren weist darauf hin, dass je nach Lipidsystem der Anteil an insertierter TMD2 unterschiedlich hoch ist (Abb. 38B). Überwiegend insertiert scheint die TMD2 in POPE/POPC (7:3) Membranen vorzuliegen, da die Bande bei 208 nm einen positiven Wert annimmt (Abb. 38B, hellgrünes Spektrum). Je negativer hingegen die Bande bei 208 nm ist, desto höher scheint der Anteil an geflippter TMD2 zu sein. Da das beobachtete Flippen der TMD2 vermutlich auf das Austrocknen der Probe zurückzuführen ist und die Lipide in den fluoreszenzbasierten Experimenten vollständig hydratisiert vorliegen, nimmt die TMD2 vermutlich größtenteils eine transmembrane Orientierung bei den nachfolgenden Vesikel-Leakage Messungen ein.

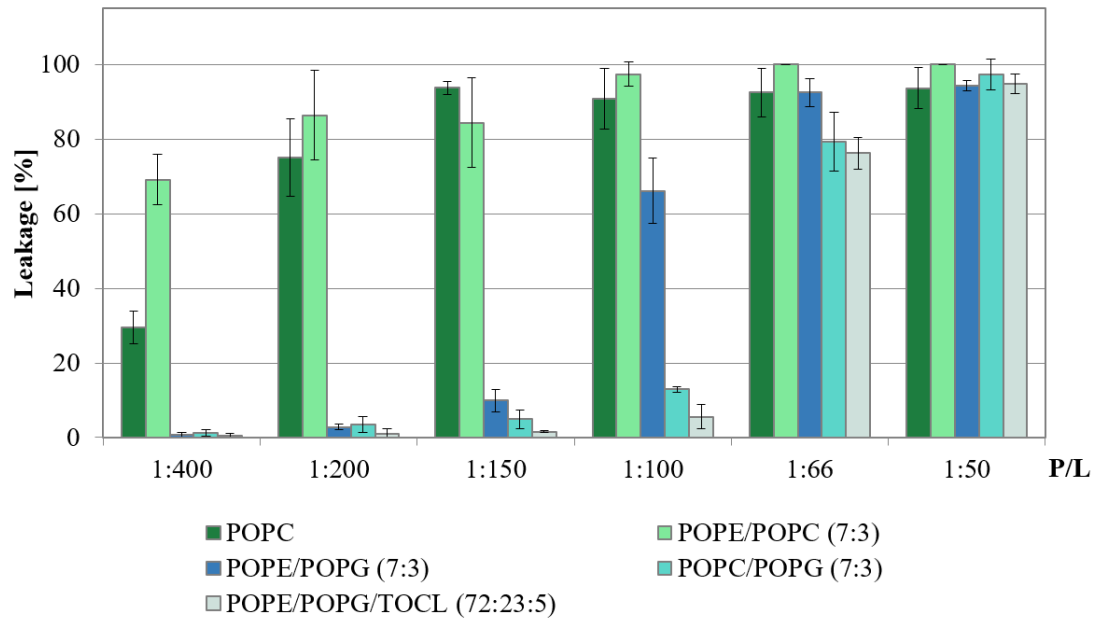


**Abbildung 38: SRCD- und SROCD-Spektren der TMD2 in Lipidsystemen mit unterschiedlichen Lipidkopfgruppen**

(A) Die TMD2 wurde in Lipidvesikeln in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 rekonstituiert. Die Messungen wurden bei 22 °C beziehungsweise bei POPE enthaltenen Lipidsystemen bei 35 °C durchgeführt, damit sich die POPE-Lipide während der Messung in ihrem flüssigkristallinen Zustand befanden ( $T_m(\text{POPE}) = 25 \text{ °C}$ ). Die erhaltenen Spektren wurden für den besseren Vergleich auf ihr Minimum im Bereich von 222 nm normiert. Die SRCD-Spektren zeigen die charakteristische Linienform einer  $\alpha$ -Helix auf, mit einer positiven Bande bei 194 nm und zwei negativen Banden bei 209 nm und 222 nm. Die SRCD-Messungen der TMD2 in POPE/POPC (7:3) Vesikeln war allerdings nicht möglich, da das Peptid während der Probenvorbereitung der SUVs präzipitierte. (B) Die Membranorientierung der TMD2 in den entsprechenden Lipidsystemen wurde mittels SROCD-Spektroskopie ermittelt. Hierfür wurde die TMD2 in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten rekonstituiert ( $P/L = 1:50$ ). Die Messungen erfolgten bei 22 °C beziehungsweise bei POPE enthaltenen Lipidsystemen bei 25 °C. Die Durchführung der SROCD-Messungen bei 35 °C, entsprechend zu den SRCD-Messungen, war nicht möglich, da die auf den Quarzglas-Plättchen aufgetragenen Proben flüssig wurden und eine orientierte Ausrichtung der Lipide nicht gewährleistet werden konnte. Die erhaltenen Spektren wurden auf ihr globales Minimum im Bereich von 223 nm normiert. Die TMD2 scheint in den Membranen sowohl inseriert als auch geflippt vorzuliegen, wobei der Anteil an geflippter TMD2 aufgrund der unterschiedlich stark ausgeprägten Bande bei 208 nm in den verschiedenen Lipidsystemen zu variieren scheint.

Nach der Untersuchung der Sekundärstruktur und der Membranorientierung der TMD2 wurde zunächst der lochbildende Charakter in POPE/POPG/TOCL (72:23:5) LUVs, dessen Zusammensetzung an die innere *E. coli* Membran angelehnt ist<sup>40,41</sup>, untersucht. Bei niedrigen Peptidkonzentrationen hat die TMD2 kaum Löcher in der Membran ausgebildet (Abb. 39, hellgraue Balken). Erst bei hohen Peptidkonzentrationen ( $P/L = 1:66$ ) ist ein deutliches Leakage erkennbar, wobei letztendlich nahezu alle Moleküle aus den Vesikeln entwichen sind ( $P/L = 1:50$ ). Inwieweit nun die negativ geladene Lipidkopfgruppe von POPG die durch die TMD2 induzierte Lochbildung beeinflusst, wurde zunächst im Lipidgemisch POPC/POPG (7:3) untersucht. Die ANTS/DPX-Leakage-Messungen zeigen, dass gerade bei niedrigen Peptidkonzentrationen das Ausströmen der Fluorophore und Quencher durch das Vorhandensein der negativen Lipidkopfgruppe in den LUVs deutlich reduziert wird (Abb. 39, türkise Balken), verglichen zu den Messungen in POPC Vesikeln (Abb. 39, dunkelgrüne Balken). Bei einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 150 wird weniger als 5 %

Leakage in POPC/POPG (7:3) LUVs induziert (Abb. 39, türkise Balken), wohingegen in POPC mit 94 % Leakage bereits nahezu alle Fluorophore und Quencher aus den Vesikeln entwichen sind (Abb. 39, dunkelgrüne Balken). Bei höheren Peptidkonzentrationen scheint die negativ geladene Lipidkopfgruppe allerdings keinen großen Einfluss mehr auf das durch die TMD2 induzierte Leakage zu nehmen und es sind nahezu alle Moleküle aus den LUVs herausgeströmt (Abb. 39, türkise Balken). Durch die Verwendung von POPE wurde untersucht, ob die gezielte Veränderung der spontanen Krümmung einer Lipiddoppelschicht auf die durch die TMD2 hervorgerufene Lochbildung einwirkt. Die Leakage-Messungen der TMD2 in POPE/POPC (7:3) LUVs zeigen, dass PE-Lipide die Tendenz des Ausströmens der Fluorophore und Quencher erhöhen (Abb. 39, hellgrüne Balken). Dies wird besonders deutlich bei der Betrachtung der Proben mit niedriger Peptidkonzentration (P/L = 1:400), da sich hier das Leakage mehr als verdoppelt, verglichen zu dem in POPC LUVs (Abb. 39, dunkelgrüne Balken). Mit steigender Peptidkonzentration ähnelt die Tendenz des Ausströmens in POPE/POPC (7:3) LUVs der in POPC Vesikeln. Hingegen wird bei der Mischung von POPE mit dem negativ geladenen POPG (7:3) bei niedrigen Peptidkonzentrationen kaum ein Leakage induziert (Abb. 39, blaue Balken) und das Lochbildungsverhalten der TMD2 ähnelt dem in POPC/POPG (7:3) LUVs (Abb. 39, türkise Balken). Erst bei einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 100 ist in POPE/POPG (7:3) mit 67 % Leakage ein beträchtlicher Anstieg der entweichenden ANTS- und DPX-Moleküle zu erkennen und mit weiter steigender TMD2 Konzentration sind letztendlich nahezu alle Moleküle aus den LUVs herausgeströmt (Abb. 39, blaue Balken). Zusammenfassend wird das durch die TMD2 induzierte Leakage durch die negative Ladung der PG-Lipidkopfgruppe verringert, wohingegen das am häufigsten in der inneren Membran von *E. coli* vorkommende POPE<sup>40,41</sup>, welches eine negative Krümmung der Membran induziert<sup>149</sup>, das Leakage erhöht.

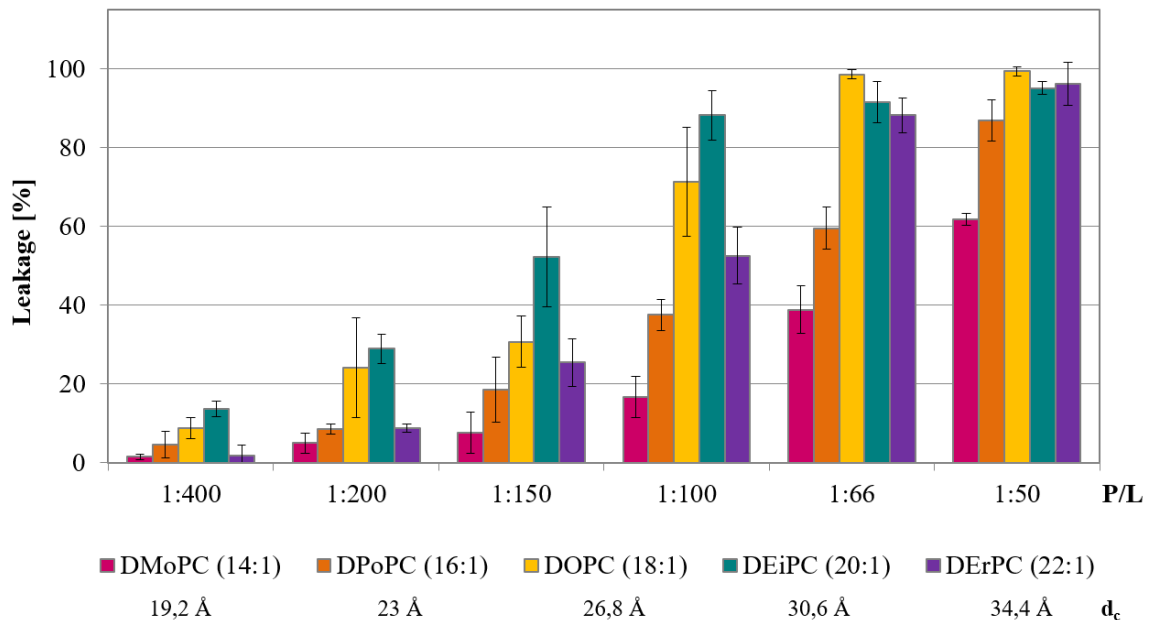


**Abbildung 39: Einfluss unterschiedlicher Lipidkopfgruppen auf das durch die TMD2 induzierte Leakage**

Die TMD2 wurde in verschiedenen Lipidsystemen in unterschiedlichen molaren Peptid- zu Lipidverhältnissen (P/L) rekonstituiert. Durchgeführt wurden die ANTS/DPX-Leakage-Messungen bei 22 °C beziehungsweise bei POPE enthaltenen LUVs bei 35 °C. Die Mittelwerte der Leakage-Werte nach 900 s aus zwei beziehungsweise drei unabhängigen Messreihen und deren Standardabweichung sind aufgetragen. Für den besseren Vergleich sind die ANTS/DPX-Leakage-Ergebnisse der TMD2 in POPC LUVs<sup>130</sup> erneut gezeigt (dunkelgrüne Balken). In der an die innere Membran von *E. coli* Bakterien angelehnten Lipidzusammensetzung (POPE/POPG/TOCL) erfolgt bei niedrigen Peptidkonzentrationen kein nennenswertes Leakage, erst durch die weiter steigende Konzentration der TMD2 (P/L = 1:66) konnte ein Auslaufen detektiert werden. Im Allgemeinen wird die Lochbildung der TMD2 durch PE-Lipide begünstigt, wohingegen die negative Ladung der PG-Kopfgruppe die Tendenz des Ausströmens verringert.

Nachdem der Einfluss unterschiedlicher Lipidkopfgruppenstrukturen auf das durch die TMD2 induzierte Leakage ermittelt wurde, sollten ANTS/DPX-Leakage-Messungen in Lipiden mit unterschiedlicher hydrophober Dicke durchgeführt werden. Die  $\alpha$ -helikale Faltung der TMD2 in den Lipiden mit einfach ungesättigten Lipidacylketten konnte bereits bestätigt werden (siehe Abb. 23). Die Membranorientierung der TMD2 in den Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten wird sowohl durch die hydrophobe Dicke Membran als auch durch den Sättigungsgrad der Lipidacylketten beeinflusst. Um einen hydrophoben *mismatch* zu vermeiden, passt sich die insertierte TMD2 durch Neigung der hydrophoben Dicke der Membran an. Allerdings ist in diesen Lipiden die TMD2 auch auf der Membranoberfläche lokalisiert, wobei mit steigender hydrophober Dicke der Membran der Anteil an geflippter TMD2 zunimmt (siehe Kapitel 3.1.3.1.). Vermutlich ist das beobachtete Flippen darauf zurückzuführen, dass lediglich ein TMD2 Fragment untersucht wurde und nicht das Pinholin Gesamtkonstrukt, welches die TMD2 in der Membran halten würde. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass das Flippen der TMD2 durch das Austrocknen begünstigt wird. Da sich die Lipide in den ANTS/DPX-Leakage-Messungen, im Gegensatz zu den SROCD- und Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Messungen, in einem vollständig hydratisierten Zustand befinden, ist

anzunehmen, dass sich das Gleichgewicht zwischen insertierter und geflippter TMD2 in den fluoreszenzbasierten Experimenten in Richtung insertierter TMD2 verschiebt und diese daher überwiegend transmembran vorliegt. Der Einfluss der hydrophoben Membrandicke auf das durch die TMD2 induzierte Leakage ist in Abbildung 40 gezeigt. Allgemein lässt sich der Trend erkennen, dass mit steigender hydrophober Dicke das durch die TMD2 induzierte Leakage zunimmt. Eine Ausnahme stellt das Leakage in den extrem dicken DErPC Lipiddoppelschichten (Abb. 40, lila Balken) dar, da hier bei niedrigen TMD2 Konzentrationen weniger Leakage induziert wurde, verglichen zu dem Leakage in den dünneren DEiPC (Abb. 40, petrolfarbene Balken) und DOPC (Abb. 40, gelbe Balken) Membranen. Bei hohen Peptidkonzentrationen sind letztendlich dennoch fast alle eingeschlossenen Moleküle aus den DErPC LUVs entwichen.



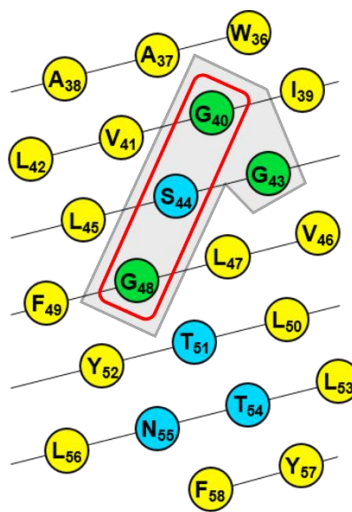
**Abbildung 40: Einfluss der hydrophoben Dicke der Membran auf das durch die TMD2 induzierte Leakage**

Die TMD2 wurde in Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten mit unterschiedlicher Kettenlänge in verschiedenen molaren Peptid- zu Lipidverhältnissen (P/L) rekonstituiert. Die hydrophoben Dicken  $d_c$  der Membranen sind jeweils angegeben<sup>122</sup>. Die ANTS/DPX-Messungen wurden bei 22 °C durchgeführt. Die Mittelwerte der Leakage-Werte nach 900 s aus zwei beziehungsweise drei unabhängigen Messreihen und deren Standardabweichung sind aufgetragen. Je dicker die Lipiddoppelschichten sind, desto stärker nimmt das durch die TMD2 induzierte Leakage zu. Lediglich die Leakage-Daten der TMD2 in den extrem dicken Membranen aus DErPC (lila Balken) folgen nicht mehr diesem Trend, da ein verringertes Leakage, verglichen zu dem in den dünneren Membranen aus DEiPC (petrolfarbene Balken) und DOPC (gelbe Balken), erkennbar ist.

### 3.1.4.2 Einfluss des Glycin-Zipper Motivs der TMD2 auf die Lochbildung

Die Strukturanalyse der TMD2 in makroskopisch orientierten DMPC Doppelschichten zeigte bereits, dass ein erweitertes Glycin-Zipper Motiv auf der TMD2 für laterale Helix-Helix Interaktionen frei zugänglich ist. In helikalen Segmenten erweisen sich solche GxxxG Motive

als bekannte Dimerisierungsmotive<sup>110,111</sup>. Bei dem von T. PANG *et al.* postulierten Mechanismus der Lochbildung steht solch ein Glycin-Zipper Motiv auf der TMD2 im Fokus. Nachdem die TMD1 aus der Membran geflippt ist, sollen die nun aktiven Pinholin-Dimere homotypisch über ihr Glycin-Zipper Motiv  $G_{40}XXXS_{44}XXXG_{48}$  auf der TMD2 miteinander wechselwirken. Durch den Wechsel dieser homotypischen Interaktionen zu heterotypischen soll letztendlich die Umlagerung der Oligomere zu einem heptameren Loch ermöglicht werden<sup>66,67,101</sup>. Bei Betrachtung des in Abbildung 41 dargestellten *helical mesh* der TMD2 ist neben dem bereits erwähnten Glycin Zipper Motiv  $G_{40}XXXS_{44}XXXG_{48}$  (rot umrandet) ein weiteres Glycin ( $G_{43}$ ), welches sich in unmittelbarer Nähe befindet, erkennbar.



**Abbildung 41: Helical mesh der TMD2 des Pinholins S<sup>2168</sup>**

Der hydrophile Streifen der TMD2 des Pinholins weist ein erweitertes rechtsgängiges Glycin-Zipper Motiv ( $G_{40}XXXS_{44}XXXG_{48}$ ) auf (rot umrandet), wobei sich in unmittelbarer Nähe ein weiteres Glycin ( $G_{43}$ ) befindet. Dieses mögliche Interaktionsmotiv der TMD2 ist grau umrandet. Erstellt wurde das *helical mesh* mittels der Protein-ORIGAMI-Webanwendung<sup>115</sup>, wobei die hydrophoben Aminosäuren gelb markiert sind, die polaren Aminosäuren blau und Glycine sind in grün dargestellt.

Zur Untersuchung dieses Interaktionsmotivs der TMD2 wurden unterschiedliche Mutanten mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese synthetisiert, welche in Tabelle 3 aufgelistet sind. Die Aminosäuren  $G_{40}$ ,  $G_{43}$ ,  $S_{44}$  und  $G_{48}$  wurden gegen Alanin substituiert, da so die Hydrophobizität der TMD2 nur geringfügig verändert wurde. Ausgehend von diesen Mutanten sollte untersucht werden, ob ein Glycin-Zipper Motiv auf der TMD2 für die Interaktionen der Helices während der Lochbildung verantwortlich ist. Sofern dieses Motiv tatsächlich den Prozess der Lochbildung beeinflusst, sollte dies zu einem verringerten Ausströmen der ANTS-Fluorophore und DPX-Quencher bei den Leakage-Experimenten führen und somit ein geringeres Leakage detektiert werden.



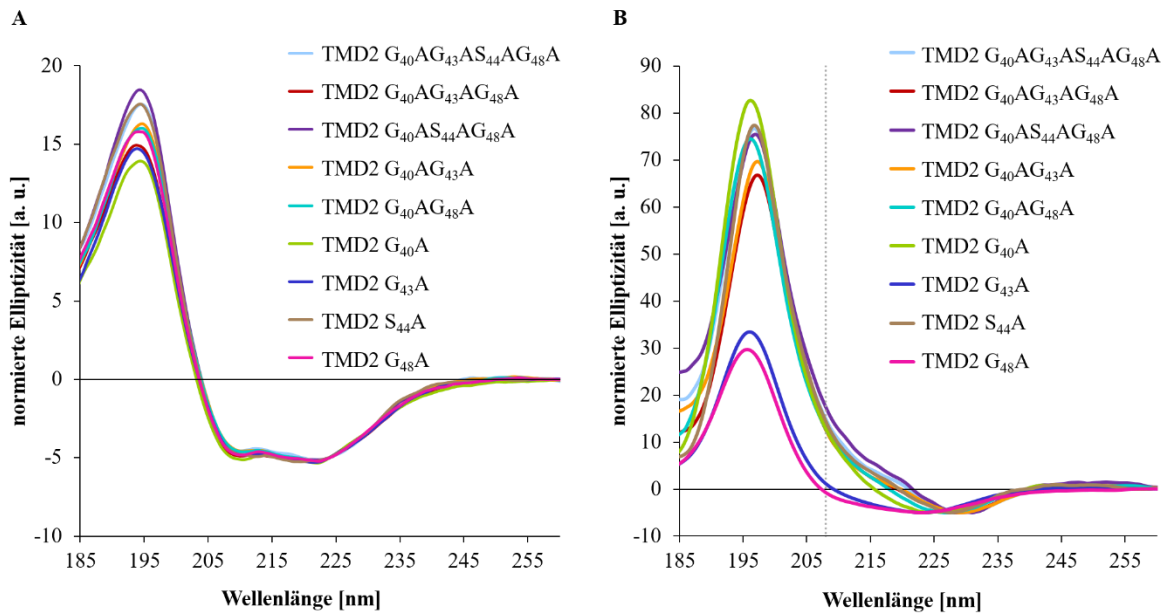
**Tabelle 3: Übersicht der verschiedenen Glycin-Zipper Mutanten der TMD2**

Die verschiedenen Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 wurden mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese von Dr. Parvesh Wadhvani, Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck (KIT, IBG2) hergestellt und die Aufreinigung erfolgte mittels HPLC. Die entsprechenden Mutationen sind in der Aminosäuresequenz rot markiert.

Peptid	Sequenz
TMD2 G <sub>40</sub> AG <sub>43</sub> AS <sub>44</sub> AG <sub>48</sub> A	WAAIAVLAAALVLAFLTYLTNLYFKIRE-Amid
TMD2 G <sub>40</sub> AG <sub>43</sub> AG <sub>48</sub> A	WAAIAVLASLVLAFLTYLTNLYFKIRE-Amid
TMD2 G <sub>40</sub> AS <sub>44</sub> AG <sub>48</sub> A	WAAIAVLGAALVLAFLTYLTNLYFKIRE-Amid
TMD2 G <sub>40</sub> AG <sub>43</sub> A	WAAIAVLASLVLGFLTYLTNLYFKIRE-Amid
TMD2 G <sub>40</sub> AG <sub>48</sub> A	WAAIAVLGSVLVAFLTYLTNLYFKIRE-Amid
TMD2 G <sub>40</sub> A	WAAIAVLGSVLGFLTYLTNLYFKIRE-Amid
TMD2 G <sub>43</sub> A	WAAIGVLAASLVLGFLTYLTNLYFKIRE-Amid
TMD2 S <sub>44</sub> A	WAAIGVLGAAVLGFLTYLTNLYFKIRE-Amid
TMD2 G <sub>48</sub> A	WAAIGVLSVLVAFLTYLTNLYFKIRE-Amid

Vor der funktionellen Untersuchung der verschiedenen Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 wurde zunächst deren Faltung mittels SRCD-Spektroskopie überprüft. Hierfür wurden die verschiedenen Mutanten der TMD2 in POPC Vesikeln rekonstituiert (P/L = 1:50). Für einen besseren qualitativen Vergleich wurden die erhaltenen SRCD-Spektren auf ihr Minimum im Bereich von 223 nm normiert. Alle SRCD-Spektren weisen eine typische  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur mit einer positiven Bande bei 194 nm und zwei negativen Banden bei 209 nm und 223 nm auf (Abb. 42A). Anhand der ermittelten  $\alpha$ -helikalen Faltung der verschiedenen Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 konnte sichergestellt werden, dass die eingefügten Mutationen keinen signifikanten Einfluss auf die Helizität der TMD2 besitzen.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 42: SRCD- und SROCD-Spektren der verschiedenen Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 in POPC**

(A) Für die SRCD-Messungen wurden die Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 in POPC Vesikeln rekonstituiert (P/L = 1:50). Die Messungen wurden bei 22 °C durchgeführt und die erhaltenen SRCD-Spektren wurden auf ihr Minimum im Bereich von 223 nm normiert. Die SRCD-Spektren aller Mutanten weisen die für  $\alpha$ -Helices charakteristische Linienform auf, mit einer positiven Bande bei 194 nm und zwei negativen Banden bei 209 nm und 223 nm. (B) Für die SROCD-Messungen wurden die Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 in makroskopisch orientierten POPC Doppelschichten rekonstituiert (P/L = 1:50). Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 22 °C durchgeführt und die erhaltenen Spektren wurden jeweils auf ihr globales Minimum normiert. In POPC Membranen sind die verschiedenen Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 aufrecht in der Membran inseriert, da die Bande bei 208 nm nicht vorhanden ist. Zudem liegt die positive Bande der SROCD-Spektren bei 197 nm und die negative Bande bei 227 nm, welche somit zu längeren Wellenlängen hin verschoben sind. Die TMD2 G<sub>43</sub>A (dunkelblaues Spektrum) und die TMD2 G<sub>48</sub>A (pinkes Spektrum) sind größtenteils in der Membran inseriert, wobei ein geringer Anteil geflippt vorliegt, da ihre Bande bei 208 nm gerade negativ ist beziehungsweise einen Wert von etwa null annimmt. Die veränderte Hydrophobizität durch die Mutationen scheint somit die TMD2 in der Membran zu verankern und ein Flippen zu verhindern.

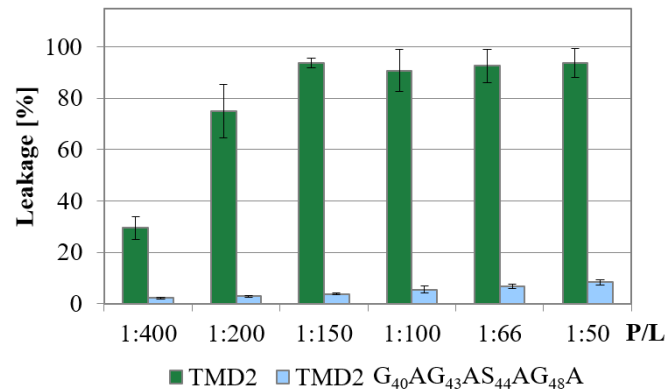
Nach erfolgter Überprüfung der  $\alpha$ -helikalen Faltung der verschiedenen Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 wurde mittels SROCD-Spektroskopie deren Orientierung in Membranen ermittelt. Hierfür wurden die Mutanten in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten aus POPC in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 rekonstituiert. Zum qualitativen Vergleich der Orientierung wurden die erhaltenen Spektren jeweils auf ihr globales Minimum normiert. Da die <sup>15</sup>N-NMR-Messung des TMD2 Wildtyps in POPC Membranen zeigte, dass die TMD2 größtenteils inseriert ist und nur ein geringer Anteil geflippt ist (siehe Abb. 33), ist zu erwarten, dass sich die Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 analog verhalten. Da die OCD-Spektroskopie allerdings nur globale Informationen über die Orientierung  $\alpha$ -helikaler Peptide in der Membran liefert, wird bei gleichzeitigen Vorliegen verschiedener Orientierungen ein Mischspektrum erhalten. Demnach würde ein Peptid, welches sowohl inseriert als auch geflippt vorliegt ein OCD-Spektrum einer geneigten Helix in der Membran liefern. Die Glycin-Zipper Mutanten TMD2 G<sub>43</sub>A (Abb. 42B, dunkelblaues Spektrum) und TMD2 G<sub>48</sub>A (Abb. 42B, pinkes Spektrum) zeigen solch ein SROCD-Spektrum, wobei die Bande bei 208 nm

nur sehr schwach ausgeprägt ist. Demnach nehmen die beiden TMD2 Mutanten in POPC Membranen eine größtenteils transmembrane Orientierung ein und nur ein geringer Anteil ist auf der Oberfläche lokalisiert. Hingegen ist bei allen anderen Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 die charakteristische Bande bei 208 nm in den SROCD-Spektren nicht vorhanden (Abb. 42B). Zudem sind die Banden, verglichen zu dem isotropen CD-Signal, zu längeren Wellenlängen verschoben, da die positive Bande bei 197 nm und die negative Bande bei 227 nm liegt. Folglich nehmen diese Glycin-Zipper Mutanten eine rein transmembrane Orientierung ein. Die leicht geänderte Hydrophobizität durch die mehrfache Substitution der Glycine beziehungsweise des Serins zu Alanin scheint somit die Helix in der Membran zu halten und ein Flippen auf die Oberfläche zu unterdrücken. Sofern lediglich ein Glycin zu Alanin mutiert wurde, wird die Hydrophobizität der TMD2 nicht stark verändert, weshalb sich die TMD2 Mutanten G<sub>43</sub>A (Abb. 42B, dunkelblaues Spektrum) und G<sub>48</sub>A (Abb. 42B, pinkes Spektrum) analog wie der TMD2 Wildtyp verhalten und aus der Membran flippen. Da bei der TMD2 Mutante G<sub>40</sub>A ebenfalls nur ein Glycin mutiert wurde, sollte sich diese eigentlich analog verhalten, allerdings nimmt die Mutante nur eine transmembrane Orientierung ein und flippt nicht aus der Membran (Abb. 42B, hellgrünes Spektrum). Bei der TMD2 Mutante S<sub>44</sub>A wurde zwar ebenfalls nur eine Aminosäure mutiert, allerdings wurde in diesem Fall die Hydrophobizität stärker verändert, weshalb die Mutante fest in der Membran verankert wird (Abb. 42, braunes Spektrum). Da es sich bei dem beobachteten Flippen der TMD2 vermutlich um ein Artefakt handelt, hervorgerufen durch die Verwendung eines TMD2 Fragments und dem Austrocknen der Proben, erweist sich der Effekt der Verankerung der TMD2 in der Membran, hervorgerufen durch die veränderte Hydrophobizität, als vorteilhaft.

Zur Untersuchung der Rolle des Glycin-Zipper Motivs auf der TMD2 während der Lochbildung wurden entsprechende ANTS/DPX-Leakage-Messungen durchgeführt. Hierfür wurden die verschiedenen Glycin-Zipper Mutanten jeweils in POPC LUVs in verschiedenen Peptid- zu Lipidverhältnissen rekonstituiert. Sofern ein Glycin-Zipper Motiv die Lochbildung beeinflusst, sollte dies durch eine verminderte Tendenz der Lochbildung ersichtlich sein.

Zunächst wurde die TMD2 Mutante betrachtet, bei welcher das Glycin-Zipper Motiv (G<sub>40</sub>XXXS<sub>44</sub>XXXG<sub>48</sub>) sowie das benachbarte Glycin (G<sub>43</sub>) deletiert wurden (TMD2 G<sub>40</sub>AG<sub>43</sub>AS<sub>44</sub>AG<sub>48</sub>A). Entsprechend den Erwartungen zeigen die Leakage Messungen ein sehr stark vermindertes Entweichen der eingeschlossenen ANTS- und DPX-Moleküle (Abb. 43, hellblaue Balken). Selbst bei hoher Peptidkonzentration (P/L = 1:50) sind bei dieser Mutante weniger als 10 % der eingeschlossenen Fluorophore aus den Vesikeln entwichen. Im Vergleich

dazu induziert der TMD2 Wildtyp bereits bei einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 150 annähernd 100 % Leakage (Abb. 43, dunkelgrüne Balken). Demnach scheint das Glycin-Zipper Motiv in Kombination mit dem direkt benachbarten G<sub>43</sub> eine entscheidende Rolle während der Lochbildung einzunehmen.



**Abbildung 43: ANTS/DPX-Leakage-Messungen der TMD2 G<sub>40</sub>AG<sub>43</sub>AS<sub>44</sub>AG<sub>48</sub>A in POPC**

Die TMD2 G<sub>40</sub>AG<sub>43</sub>AS<sub>44</sub>AG<sub>48</sub>A wurde in verschiedenen molaren Peptid- zu Lipidverhältnissen in POPC Vesikeln rekonstituiert und die Messungen wurden bei 22 °C durchgeführt. Für den besseren Vergleich sind die Leakage-Daten des TMD2 Wildtyps<sup>130</sup> (dunkelgrüne Balken) ebenfalls gezeigt. Die Mittelwerte der Leakage-Werte nach 900 s aus drei beziehungsweise zwei unabhängigen Messreihen sowie die entsprechenden Standardabweichungen sind angegeben. Die TMD2 G<sub>40</sub>AG<sub>43</sub>AS<sub>44</sub>AG<sub>48</sub>A (hellblaue Balken) hemmt die Lochbildung erheblich. Dieses Motiv hat somit einen großen Einfluss auf die Ausbildung der Löcher in der Membran.

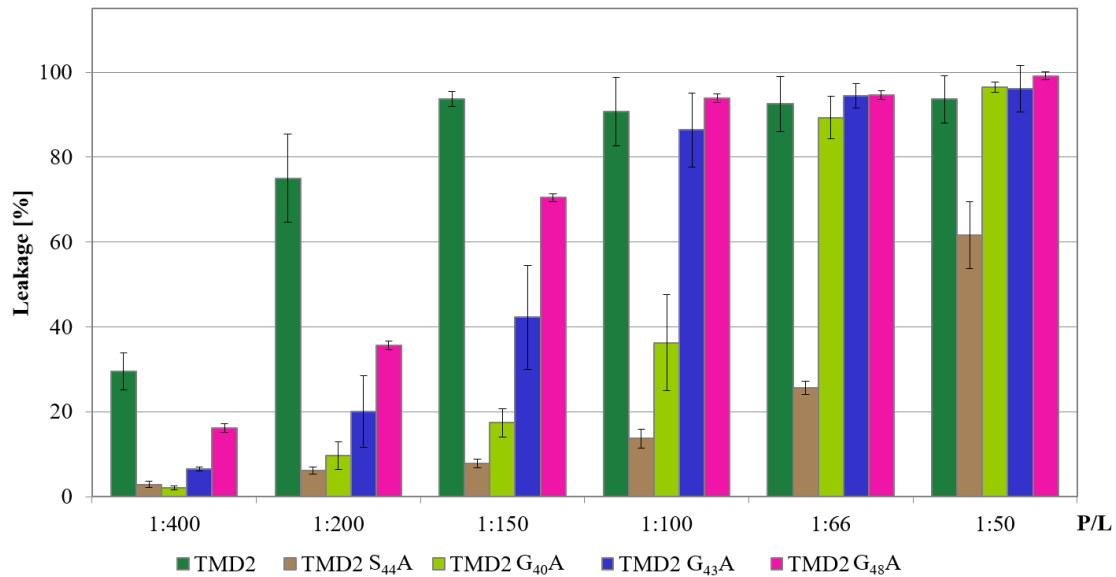
Zur Untersuchung, welchen Einfluss die einzelnen Aminosäuren dieses Interaktionsmotivs auf die Lochbildung haben, wurden Leakage-Messungen von TMD2 Mutanten durchgeführt, bei denen jeweils nur eine Aminosäure zu Alanin mutiert wurde (Abb. 44). Dem zentralen polaren Serin S<sub>44</sub> des Glycin-Zipper Motivs schrieben bereits T. PANG *et al.* eine entscheidende Rolle zu, da durch dessen Mutation zu Cystein die Lyse in lebenden Zellen vollständig gehemmt wurde<sup>66</sup>. Durch die Mutation des Serins zu Alanin (TMD2 S<sub>44</sub>A) sollten mögliche polare Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen im Inneren der hydrophoben Doppelschicht gehemmt werden. Die ANTS/DPX-Leakage Messungen der TMD2 S<sub>44</sub>A zeigen, dass gerade bei niedrigen Peptidkonzentrationen kein signifikantes Leakage induziert wird (Abb. 44, braune Balken)<sup>130</sup>. Die Lochbildung wird somit sehr stark durch diese Mutation beeinflusst und dies sogar bei einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 400 in demselben Ausmaß wie von der TMD2 G<sub>40</sub>AG<sub>43</sub>AS<sub>44</sub>AG<sub>48</sub>A (Abb. 43, hellblaue Balken). Erst durch die steigende Konzentration der TMD2 Mutante S<sub>44</sub>A ist eine höhere Lochbildungstendenz erkennbar und bei sehr hohen Peptidkonzentrationen (P/L = 1:50) sind dann sogar wieder mehr als 60 % der ANTS- und DPX-Moleküle aus den POPC LUVs entwichen (Abb. 44, braune Balken)<sup>130</sup>.

Auch die TMD2 G<sub>40</sub>A beeinflusst zunächst bei niedrigen Peptidkonzentrationen die Lochbildung sehr stark (Abb. 44, hellgrüne Balken), da kaum ein Leakage induziert wird.

Hingegen sind ab einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 66 nahezu alle Fluorophor- und Quencher-Moleküle aus den Vesikeln entwichen. Demnach hemmt die TMD2 G<sub>40</sub>A die Ausbildung der Löcher nicht so stark wie die TMD2 S<sub>44</sub>A. Die dritte Aminosäure des Glycin-Zipper Motivs (G<sub>48</sub>) scheint hingegen keinen großen Einfluss auf die Lochbildung zu haben. Zwar induziert die TMD2 G<sub>48</sub>A zunächst bei niedrigen Peptidkonzentration nur ein geringes Leakage (Abb. 44, pinke Balken), allerdings unterdrücken die TMD2 G<sub>40</sub>A (Abb. 44, hellgrüne Balken) und die TMD2 S<sub>44</sub>A (Abb. 44, braune Balken) die Ausbildung der Löcher in einem stärkeren Ausmaß. Bereits bei einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 100 sind bei der TMD2 G<sub>48</sub>A Mutante nahezu alle Fluorophore aus den Vesikeln entwichen (Abb. 44, pinke Balken) und das induzierte Leakage entspricht dem des TMD2 Wildtyps (Abb. 44, dunkelgrüne Balken).

Neben dem Glycin-Zipper Motiv der TMD2 befindet sich in unmittelbarer Nähe ein weiteres Glycin, das G<sub>43</sub>. Da durch dessen Mutation ebenfalls das Leakage abgeschwächt wurde (Abb. 44, dunkelblaue Balken), scheint offensichtlich dieses zusätzliche Glycin auch an der Ausbildung der Löcher in der Membran beteiligt zu sein. Die TMD2 G<sub>43</sub>A unterdrückt zwar die Ausbildung der Löcher in den POPC LUVs nicht so stark wie die beiden Mutanten TMD2 G<sub>40</sub>A (Abb. 44, hellgrüne Balken) und TMD2 S<sub>44</sub>A (Abb. 44, braune Balken), aber dennoch werden bei sehr niedrigen Peptidkonzentrationen (P/L = 1:400) nur etwa 7 % Leakage induziert. Ab einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis der TMD2 G<sub>43</sub>A von 1 zu 100 sind dann letztendlich nahezu alle Fluorophore aus den Vesikeln entwichen (Abb. 44, dunkelblaue Balken) und das induzierte Leakage gleicht dem des TMD2 Wildtyps (Abb. 44, dunkelgrüne Balken).

Generell zeigen die ANTS/DPX-Leakage-Messungen der vier verschiedenen Glycin-Zipper Mutanten der TMD2, dass das polare Serin die Lochbildung am stärksten beeinflusst. Demnach scheint die zentrale Aminosäure des Glycin-Zipper Motivs eine entscheidende Rolle während der Ausbildung der Löcher in der Membran einzunehmen. Zudem scheint das dem Glycin-Zipper Motiv benachbarte G<sub>43</sub> wichtig bei der Lochbildung zu sein, wohingegen das G<sub>48</sub>, welches Teil des Glycin-Zipper Motivs ist, den geringsten Einfluss auf die Lochbildung zu nehmen.

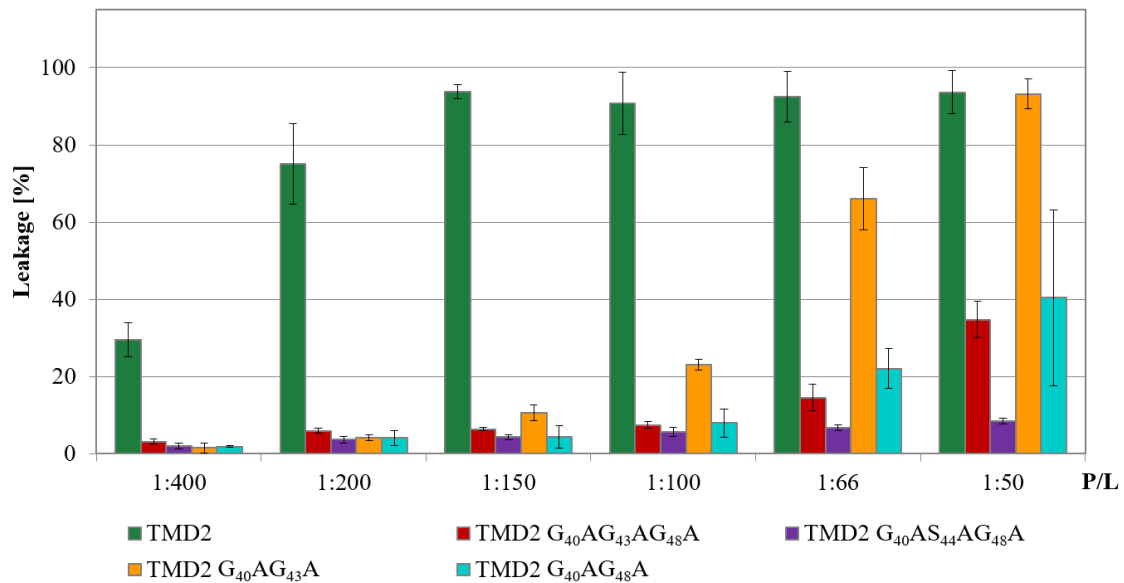


**Abbildung 44: ANTS/DPX-Leakage Messungen von Einfachmutanten der TMD2**

Die TMD2 Einfachmutanten, deren Mutationen das mögliche Interaktionsmotiv der TMD2 betreffen, wurden in verschiedenen molaren Peptid- zu Lipidverhältnissen (P/L) in POPC Vesikeln rekonstituiert und die Messungen wurden bei 22 °C durchgeführt. Für den besseren Vergleich sind die Leakage-Daten des TMD2 Wildtyps<sup>130</sup> (dunkelgrüne Balken) ebenfalls dargestellt. Die Mittelwerte der Leakage-Werte nach 900 s aus zwei unabhängigen Messreihen sowie die entsprechenden Standardabweichungen sind angegeben. Das zentrale polare Serin scheint eine entscheidende Rolle während der Ausbildung der Löcher einzunehmen<sup>130</sup>, da die TMD2 S<sub>44</sub>A Mutante die Lochbildung am stärksten hemmt (braune Balken).

Durch die Mutation der beiden direkt nebeneinanderliegenden Glycine (G<sub>40</sub>, G<sub>43</sub>) zu Alanin wird die Lochbildung zunächst bei niedrigen Peptidkonzentrationen deutlich gehemmt und bei einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 sind letztendlich nahezu alle Fluorophore aus den Vesikeln entwichen (Abb. 45, orangene Balken). Hingegen wird die Ausbildung der Löcher im Vergleich zu der TMD2 G<sub>40</sub>AG<sub>43</sub>A (Abb. 45, orangene Balken) durch die Mutation der beiden flankierenden Glycine (G<sub>40</sub>, G<sub>48</sub>) des Glycin-Zipper Motivs stärker gehemmt (Abb. 45, türkise Balken). Die TMD2 G<sub>40</sub>AG<sub>48</sub>A induziert bei hoher Peptidkonzentration (P/L = 1:50) sogar nur lediglich 40 % Leakage.

Bei der Mutante TMD2 G<sub>40</sub>AG<sub>43</sub>AG<sub>48</sub>A wurden alle drei Glycine deletiert und deren ANTS/DPX-Leakage-Messungen zeigen, dass die Lochbildung durch die dreifach-Mutation nochmals stärker negativ beeinflusst wird, da bei sehr hoher Konzentration der Mutante (P/L = 1:50) nur ein Leakage von 35 % erfolgt (Abb. 45, rote Balken). Die TMD2 Mutante G<sub>40</sub>AS<sub>44</sub>AG<sub>48</sub>A, bei welcher nur das Glycin-Zipper Motiv zerstört wurde, hemmt das Ausströmen aus den in den Vesikeln eingeschlossenen Fluorophoren und Quenchern erheblich (Abb. 45, lila Balken)<sup>130</sup>. Selbst bei einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 induziert die Mutante weniger als 9 % Leakage und hemmt somit in demselben Ausmaß die Lochbildung wie die TMD2 G<sub>40</sub>AG<sub>43</sub>AS<sub>44</sub>AG<sub>48</sub>A, bei der neben dem Glycin-Zipper Motiv auch das benachbarte Glycin (G<sub>43</sub>) deletiert wurde (Abb. 43, hellblaue Balken).

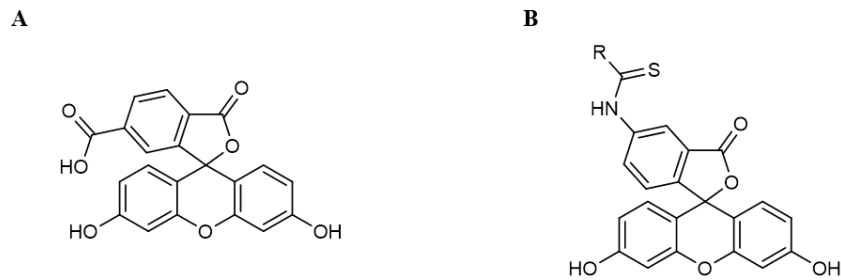


**Abbildung 45: ANTS/DPX-Leakage-Messungen verschiedener Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 in POPC LUVs**  
 Die Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 wurden in verschiedenen molaren Peptid- zu Lipidverhältnissen (P/L) in POPC Vesikeln rekonstituiert und die Messungen wurden bei 22 °C durchgeführt. Für den besseren Vergleich sind die Leakage-Daten des TMD2 Wildtyps<sup>130</sup> (dunkelgrüne Balken) ebenfalls dargestellt. Die Mittelwerte der Leakage-Werte nach 900 s aus zwei beziehungsweise drei unabhängigen Messreihen und deren Standardabweichung sind aufgetragen. Die TMD2 G<sub>40</sub>AS<sub>44</sub>AG<sub>48</sub>A (lila Balken) hemmt die Ausbildung der Löcher am stärksten, demnach nimmt das Glycin-Zipper Motiv (G<sub>40</sub>xxxS<sub>44</sub>xxxG<sub>48</sub>) eine entscheidende Rolle bei den Interaktionen zwischen den Helices ein<sup>130</sup>.

Die große Bedeutung des Glycin-Zippers (G<sub>40</sub>xxxS<sub>44</sub>xxxG<sub>48</sub>) während der Lochbildung konnte mit diesem fluoreszenzbasierten Funktionstest somit erstmalig bestätigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass gerade das zentrale polare Serin (S<sub>44</sub>) des Glycin-Zipper Motivs bedeutend für die Interaktion zwischen den Helices ist. Zudem scheint auch das dem Glycin-Zipper Motiv benachbarte G<sub>43</sub> eine entscheidende Rolle einzunehmen.

### 3.1.4.3 Untersuchung der Größe des durch die TMD2 gebildeten Lochs

Nachdem erstmalig mit einer biophysikalischen Methode der lochbildende Charakter der TMD2 und die Bedeutung des Glycin-Zipper Motivs auf der TMD2 bestätigt wurde, sollte die Größe der gebildeten Löcher näher betrachtet werden. Das hierfür verwendete modifizierte Leakage-Experiment basiert auf unterschiedlich großen, in Vesikeln eingeschlossenen Fluorescein-Derivaten, deren Fluoreszenz durch einen von außen zugegebenen Anti-Fluorescein-Antikörper gelöscht wird, sofern ein Leakage erfolgt<sup>150,151</sup>. Der kleinste hierfür verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist das 6-Carboxyfluorescein (CF) mit einem Molekulargewicht von 0,376 kDa (Abb. 46A). Bei den größeren Fluorophoren handelt es sich um an Fluorescein-isothiocyanat gekoppelte Dextrane (FITC-Dextrane, FDs) mit unterschiedlichen Molekulargewichten (Abb. 46B).



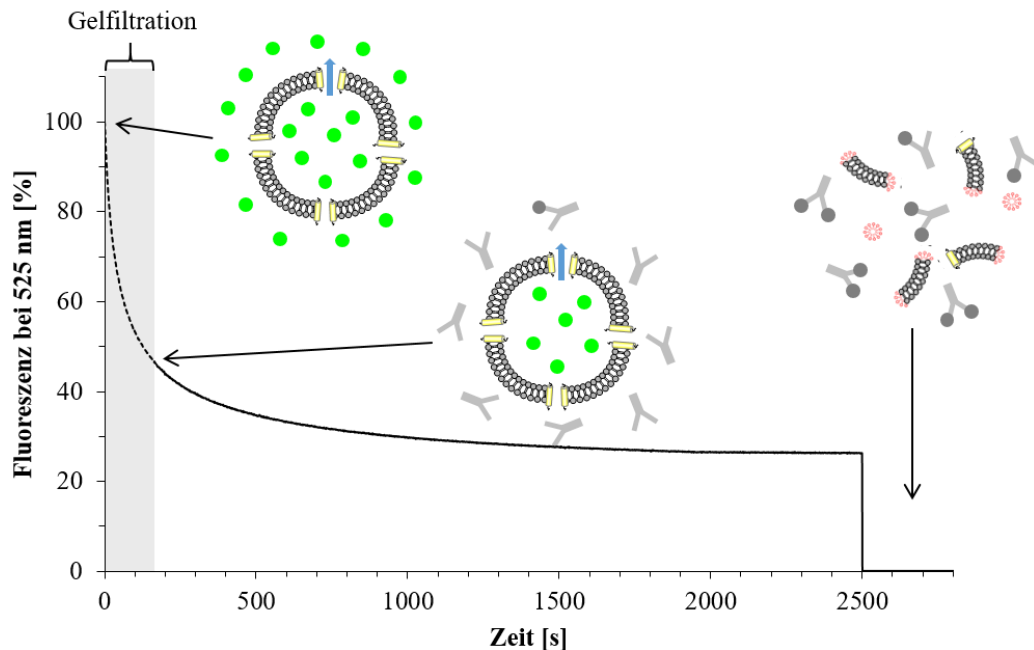
**Abbildung 46: Struktur der verwendeten Fluorescein-Fluorophore**

(A) Das 6-Carboxyfluorescein ist der kleinste verwendete Fluoreszenzfarbstoff. (B) An das gezeigte Fluorescein-isothiocyanat sind Dextrane (R) unterschiedlicher Größe gekoppelt.

Zuvor durchgeführte ANTS/DPX-Leakage-Messungen der TMD2 in POPC LUVs konnten zeigen, dass die TMD2 in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 100 bereits starkes Leakage ( $> 90\%$ ) induziert, weshalb für die Fluorescein-Leakage Messungen dieses Verhältnis gewählt wurde. Der schematische Ablauf der Fluorescein-Leakage-Messungen ist in Abbildung 47 dargestellt. Die Herstellung der LUVs erfolgt durch Cosolubilisierung der TMD2 mit den Lipiden in organischen Lösungsmitteln in Gegenwart eines Fluorescein-Derivats. Zunächst befinden sich daher die Fluorophore außerhalb und innerhalb der Vesikel. Damit ein Leakage beobachtet werden kann, müssen die sich außerhalb der Vesikel befindlichen Fluorophore entfernt werden. Hierfür werden die LUVs auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Da die TMD2 bereits in den Vesikeln rekonstituiert ist, startet zu diesem Zeitpunkt, analog wie bei den ANTS/DPX-Leakage-Experimenten, das Ausströmen der Fluorophore aus den durch die TMD2 gebildeten Löchern. Das Anfangssignal der Fluoreszenz der in den Vesikeln eingeschlossenen Fluorescein-Derivate kann daher nicht detektiert werden und muss abgeschätzt werden (gestrichelte Linie). Sofern lediglich geringes Leakage beobachtet wird, kann durch einen linearen Fit des gemessenen Fluoreszenzsignals die anfängliche Fluoreszenz ermittelt werden. Bei schnellem Ausströmen der Fluorophore aus den Vesikeln wird die Anfangsfluoreszenz unter Verwendung einer Probe ohne Peptid, bei der kein Leakage erfolgt, bestimmt. Eine detaillierte Erläuterung der Bestimmung der Anfangsfluoreszenz kann den Methoden (Kapitel 7.3.2.) entnommen werden. Nachdem die außerhalb der Vesikel lokalisierten Fluorophore mittels Gelfiltration entfernt wurden, erfolgt die Zugabe eines Anti-Fluorescein-Antikörpers. Falls nun die gebildeten Löcher groß genug für die eingeschlossenen Fluorophore sind, können diese aus den LUVs entweichen und deren Fluoreszenz wird durch den außerhalb befindlichen Antikörper, dem es bedingt durch seine Größe nicht möglich ist in die Vesikel zu gelangen, gelöscht. Die daraus resultierende Abnahme der Fluoreszenz wird über 2500 s hinweg detektiert. Durch anschließende Zugabe des



Detergenz Triton X-100 erfolgt die vollständige Solubilisierung der Vesikel und die Fluoreszenz des in der Probe vorhandenen Fluoresceins wird gelöscht.



**Abbildung 47: Schematischer Ablauf der Fluorescein-Leakage-Messungen**

Die Fluorescein-Leakage-Messungen basieren auf unterschiedlich großen, in Vesikeln eingeschlossenen Fluorescein-Derivaten, deren Fluoreszenz durch einen von außen zugegebenen Anti-Fluorescein-Antikörper gelöscht wird, sofern die gebildeten Löcher für die Fluorophore groß genug sind<sup>150,151</sup>. Die TMD2 (gelb) wird in LUVs in Gegenwart eines Fluorescein-Derivats (grün) rekonstituiert. Die Fluorophore befinden sich zunächst sowohl innerhalb als auch außerhalb der Vesikel. Zur Entfernung der nicht eingeschlossenen Fluorophore werden die Proben auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Da die TMD2 bereits vollständig aktiv eingelagert vorliegt und bereits Löcher ausgebildet hat, entweichen die Fluorophore teilweise schon auf der Säule aus den Vesikeln. Während dieser Zeitspanne kann jedoch die Fluoreszenz des Fluoresceins nicht detektiert werden, weshalb die Fluoreszenz zu Beginn ermittelt werden muss (gestrichelte Linie). Nachdem die im Außenmedium befindlichen Fluorescein-Derivate entfernt wurden, wird der Anti-Fluorescein-Antikörper (Y-förmig, hellgrau) hinzugefügt. Bei Freisetzung der eingeschlossenen Fluorophore aus den LUVs wird deren Fluoreszenz durch den Antikörper gequencht und eine Abnahme der Fluoreszenz ist detektierbar (dunkelgraue Kreise). Nach 2500 s wird das Detergenz Triton X-100 (rot) zur vollständigen Solubilisierung der Vesikel hinzugegeben (Abbildung verändert entnommen aus L. M. E. STEGER *et al.*<sup>130</sup>).

Zur Untersuchung der Größe des gebildeten Lochs wurden verschiedene Vesikelproben hergestellt, in denen jeweils ein anderer Fluorophor eingeschlossen wurde. Die hierfür verwendeten Fluorescein-Derivate unterscheiden sich bezogen auf ihre Größe. Die entsprechenden hydrodynamischen Radien der verwendeten Fluorophore können Tabelle 4 entnommen werden.

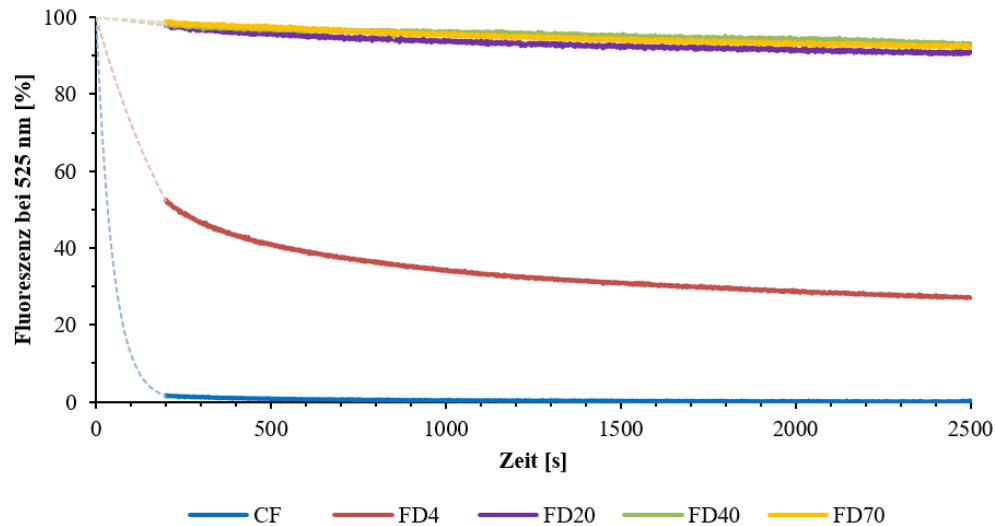
**Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Fluorescein-Derivate**

Für die Bestimmung der Größe des durch die TMD2 gebildeten Lochs wurden Fluorescein-Derivate unterschiedlicher Größe verwendet. Das entsprechende Molekulargewicht und die Stokes-Radien sind angegeben.

<b>Molekül</b>	<b>Molekulargewicht [kDa]</b>	<b>Stokes-Radius [nm]<sup>152,153</sup></b>
CF	0,376	0,63
FD4	≈ 4	1,4
FD20	≈ 20	3,3
FD40	≈ 40	4,5
FD70	≈ 70	6,0

In Abbildung 48 ist die zeitliche Abnahme der Fluoreszenz bei 525 nm verschiedener in POPC LUVs eingeschlossener Fluorescein-Derivate dargestellt<sup>130</sup>. Die gestrichelten Linien entsprechen den ermittelten Fluoreszenzsignalen während der Gelfiltration. Das in den Vesikeln eingeschlossene CF (Abb. 48, blaue Linie) konnte innerhalb der ersten 200 s nahezu vollständig aus den Vesikeln herausströmen, da bereits die nach der Gelfiltration detektierte Fluoreszenz, im Vergleich zu der Anfangsfluoreszenz der entsprechenden Probe ohne Peptid, sehr gering war. Das 4 kDa große FITC-Dextran (FD4, Abb. 48, rote Linie) zeigte einen exponentiellen Rückgang der Fluoreszenz auf 50 % innerhalb der ersten 200 s und erreichte am Ende der Messung etwa 30 %. Ein Großteil der FD4 Moleküle gelang es demnach aus den Vesikeln herauszuströmen, wobei sie die LUVs deutlich langsamer verlassen haben als die kleineren CF Moleküle. Alle größeren FDs (FD20, FD40, FD70) zeigten hingegen während der gesamten Messzeit nur eine geringfügige Abnahme der Fluoreszenz von weniger als 10 %, demnach konnten diese Fluorophore kaum aus den Vesikeln entweichen (Abb. 48, lila/grüne/gelbe Linie)<sup>130</sup>. Die geringfügige Abnahme der Fluoreszenz ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei Dextranen nicht um kugelförmige Moleküle handelt, sondern um Rotationsellipsoide. Solch ein Rotationsellipsoid weist zwei unterschiedlich lange Achsen auf, welche als Längsachse und Querachse bezeichnet werden. Demnach können die größeren Dextrane gelegentlich aus den Vesikeln entweichen, sofern sie entlang ihrer Längsachse auf das gebildete Loch treffen<sup>145,154</sup>.

Basierend auf den Fluorescein-Leakage Messungen der TMD2 muss demnach das durch die TMD2 gebildete Loch kleiner als der hydrodynamische Radius von FD20 sein, andererseits muss es aber groß genug sein, damit das FD4 die LUVs noch recht effektiv verlassen kann. Bezogen auf die Stokes-Radien der verschiedenen Fluorescein-Derivaten (Tab. 4)<sup>152,153</sup> weist das durch die TMD2 gebildete Loch somit einen Durchmesser von weniger als 2,8 nm auf<sup>130</sup>.

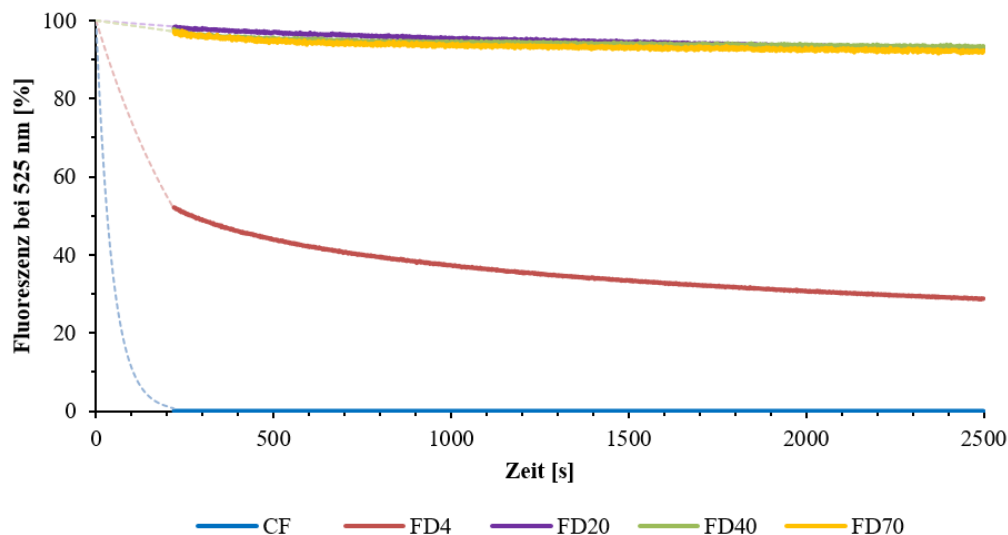


**Abbildung 48: Fluorescein-Leakage-Messungen der TMD2 in POPC LUVs**

Für die Messungen wurden fünf verschiedene Proben hergestellt, in denen die TMD2 in POPC Vesikeln (P/L = 1:100) mit jeweils einem anderen Fluorophor (CF, FD4, FD20, FD40, FD70) rekonstituiert wurde. Durchgeführt wurden die Fluorescein-Leakage Messungen bei 22 °C. Die zeitliche Abnahme der Fluoreszenz der Fluorescein-Derivate bei 525 nm ist gezeigt, wobei der Mittelwert aus zwei Messreihen aufgetragen ist. Die gestrichelten Linien entsprechen der Zeitspanne in der sich die Proben zur Entfernung der nicht in den Vesikeln eingeschlossenen Fluorophore auf der Gelfiltrationssäule befanden. Der kleinste Fluorophor (CF, blaue Linie) konnte binnen kürzester Zeit aus den Vesikeln entweichen und dessen Fluoreszenz wurde durch den im Außenmedium befindlichen Anti-Fluorescein-Antikörper gequencht. Die Fluoreszenz des FD4 (rote Linie) sank auf 30 % ab, wohingegen alle größeren Fluorophore (FD20, FD40, FD70) nur eine Abnahme der Fluoreszenz um weniger als 10 % aufzeigten<sup>130</sup> (Abbildung verändert entnommen aus L. M. E. STEGER *et al.*<sup>130</sup>).

Nachdem in POPC LUVs gezeigt werden konnte, dass die TMD2 Löcher mit einer definierten Größe ausbildet, wurden die analogen Messungen in DErPC (22:1) LUVs durchgeführt. Die Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Messungen zeigten, dass die TMD2 in makroskopisch orientierten POPC Doppelschichten überwiegend transmembran vorliegt (siehe Abb. 33), wohingegen sie in DErPC Membranen ausschließlich auf der Membranoberfläche lokalisiert ist (siehe Abb. 28). Da sich die Lipide in den fluoreszenzbasierten Experimenten in einer vollständig hydratisierten Umgebung befinden und das beobachtete Flippen vermutlich auf das Austrocknen der NMR-Probe zurückzuführen ist, ist anzunehmen, dass sich das Gleichgewicht zwischen insertierter und geflippter TMD2 auf die Seite des insertierten Peptids verschiebt. Die Fluorescein-Leakage-Messungen in DErPC sollten dennoch Aufschluss darüber geben, ob das von der TMD2 in DErPC LUVs induzierte Leakage bei hohen Peptidkonzentrationen lediglich auf einer unspezifischen Lochbildung aufgrund der Anhäufung der TMD2 auf der Vesikeloberfläche basiert<sup>155,156</sup>. In diesem Fall würden die verschieden großen Fluorescein-Derivate gleichermaßen aus den DErPC LUVs entweichen. Um diesen möglichen Effekt noch zu verstärken, wurde die TMD2 in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 in DErPC LUVs rekonstituiert. Abbildung 49 zeigt, dass die TMD2 auch in DErPC Vesikeln Löcher mit einer definierten Größe ausbildet. Die in ihrer Größe unterschiedlichen Fluorescein-

Derivate sind aus den DErPC LUVs in gleicher Weise wie aus den POPC LUVs entwichen. Das kleine CF strömte binnen weniger Sekunden fast vollständig aus den Vesikeln heraus (Abb. 49, blaue Linie) und die Fluoreszenz der FD4-Fluorophore sank auf 30 % ab (Abb. 49, rote Linie). Die größeren Fluorescein-Derivate (FD20, FD40, FD70) wurden gleichermaßen zurückgehalten und deren Fluoreszenz nahm um weniger als 10 % ab, demnach konnte nur ein geringer Anteil der ellipsoidförmigen Dextrane die DErPC Doppelschicht (Abb. 49, lila/grüne/gelbe Linie) passieren. Eine unspezifische Lochbildung durch die Anhäufung der TMD2 auf der Oberfläche der DErPC Vesikel kann daher ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis stützt somit auch die Annahme, dass die TMD2, sofern sich die Lipide in einer vollständig hydratisierten Umgebung befinden, eine überwiegend transmembrane Orientierung einnimmt und das beobachtete Flippen lediglich auf das Austrocknen der OCD- und Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Proben zurückzuführen ist.



**Abbildung 49: Fluorescein-Leakage-Messungen der TMD2 in DErPC LUVs**

Für die Messungen wurden fünf verschiedene Proben hergestellt, in denen die TMD2 in DErPC Vesikeln (P/L = 1:50) mit jeweils einem anderen Fluorophor (CF, FD4, FD20, FD40, FD70) rekonstituiert wurde. Durchgeführt wurden die Messungen bei 22 °C. Die zeitliche Abnahme der Fluoreszenz der Fluorescein-Derivate bei 525 nm ist gezeigt, wobei jeweils der Mittelwert aus zwei Messreihen aufgetragen ist. Die gestrichelten Linien entsprechen der Zeitspanne in der sich die Proben zur Entfernung der nicht in den Vesikeln eingeschlossenen Fluorophore auf der Gelfiltrationssäule befanden. Das CF konnte sehr schnell aus den Vesikeln entweichen, da dessen Fluoreszenz fast vollständig gequencht wurde (blaue Linie). Die Fluoreszenz des FD4 sank auf einen Wert von 30 % ab (rote Linie) und die größeren, an Fluorescein-isothiocyanat gekoppelten Dextrane (FD20, FD40, FD70) konnten die gebildeten Löcher der TMD2 nicht passieren.

#### 3.1.4.4 Untersuchung des Oligomerisierungsgrads der TMD2

Nachdem der lochbildende Charakter der TMD2 erstmalig mittels ANTS/DPX-Leakage-Messungen bestätigt wurde und die Größe des gebildeten Lochs grob abgeschätzt werden konnte, sollte mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Spektroskopie der

Oligomerisierungsgrad der TMD2 im gebildeten Loch näher betrachtet werden. Basierend auf ihren molekulardynamischen Simulationen und Crosslink-Experimenten postulieren T. PANG *et al.*, dass es sich bei dem aus der TMD2 gebildeten *pinhole* um ein Heptamer handelt<sup>66,101</sup>.

Der Förster-Resonanzenergietransfer beschreibt die strahlungslose Energieübertragung eines angeregten Fluorophors (Donor) über elektrische Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf einen zweiten Fluorophor (Akzeptor)<sup>157,158</sup>. Notwendige Bedingung für solch einen Energietransfer ist einerseits die spektrale Überlappung des Emissionsspektrums des Donor mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors und andererseits müssen sich die beiden Fluorophore in räumlicher Nähe befinden<sup>159</sup>. Die Effizienz des Energietransfers zwischen dem Donor- und Akzeptormolekülen ist dabei abhängig von dem sogenannten Förster-Abstand  $r_0$  des FRET-Paares und nimmt mit der sechsten Potenz des Abstands der Fluorophore ab. Der Abstand zwischen Akzeptor und Donor, bei welchem eine Energieübertragung von 50 % stattfindet, wird als Förster-Abstand  $r_0$  bezeichnet<sup>159,160</sup> und liegt bei dem in dieser Arbeit verwendeten FRET-Paar Tryptophan-Dansyl bei 21 Å<sup>161</sup>.

Für die Untersuchung des Oligomerisierungsgrads der TMD2 mittels FRET-Spektroskopie wird die sensibilisierte Emission des Akzeptors  $E_{app,se}$  gegen den Molenbruch des Donors  $x_D$  aufgetragen<sup>162,163</sup>. Die detaillierte Beschreibung zur Ermittlung des Oligomerisierungsgrads kann den Methoden (Kapitel 7.3.3.) entnommen werden. Als Donorpeptid wurde für die FRET-Messungen der TMD2 Wildtyp verwendet, da er in seiner natürlichen Sequenz über ein fluoreszierendes Tryptophan verfügt. Dansyl diente als Akzeptormolekül, welches N-terminal an den TMD2 Wildtyp gekoppelt wurde, wobei das voranstehende Tryptophan entfernt wurde, um einen Energietransfer innerhalb des Moleküls zu verhindern (Tab. 5).

**Tabelle 5: TMD2 Fragmente für die FRET-Spektroskopie**

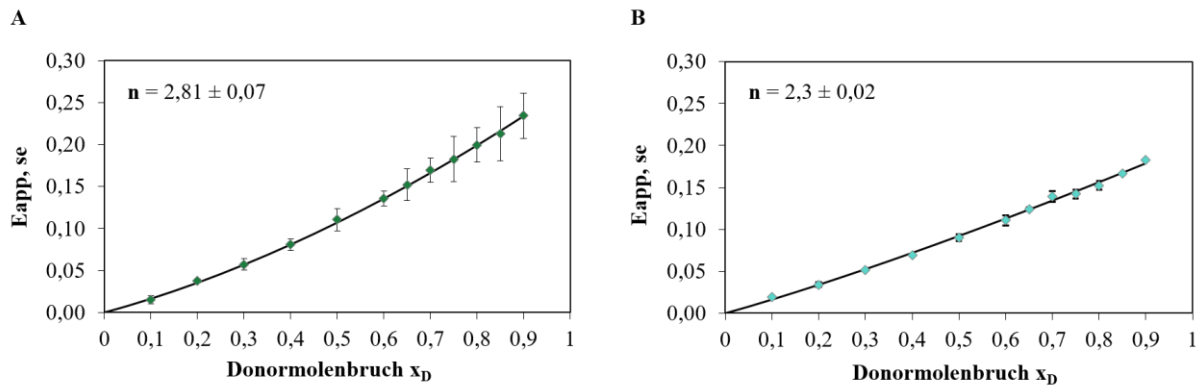
Für die FRET-Messungen wurde als Donorpeptid der TMD2 Wildtyp verwendet, da er in seiner natürlichen Sequenz über ein fluoreszierendes Tryptophan verfügt (rot markiert). Bei dem verwendeten Akzeptorpeptid wurde das N-terminale Tryptophan durch Dansyl substituiert. Die Peptide wurden mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese von Dr. Parvesh Wadhvani, Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck (KIT, IBG2) hergestellt, wobei das Dansyl manuell gekoppelt wurde. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mittels HPLC.

Peptid	Sequenz
TMD2 (Donor)	WAAIGVLGSLVLGFLTYLTNLYFKIRE-Amid
Dansyl-TMD2 (Akzeptor)	Dansyl-AAIGVLGSLVLGFLTYLTNLYFKIRE-Amid

Die beiden Donor- und Akzeptorpeptide wurden in verschiedenen molaren Verhältnissen in POPC Vesikeln rekonstituiert (siehe Methoden, Kapitel 7.3.3.). Insgesamt wurde das molare Peptid- zu Lipidverhältnis konstant bei 1 zu 150 gehalten, bei welchen die TMD2 bereits ein Leakage von über 90 % induziert. Dieses Verhältnis wurde gewählt, damit ausreichend Peptide

in der Membran für eine effektive Lochbildung vorhanden sind, diese sich aber nicht aufgrund zu hohen Peptidkonzentrationen generell schon sehr nahekommen. Zur Bestimmung der Anzahl der Untereinheiten  $n$  der TMD2 im gebildeten Loch wurde die Akzeptoremission  $E_{app,se}$  bestimmt und gegen den Donormolenbruch  $x_D$  aufgetragen (Abb. 50A). Je nach Steigung der an die Daten angefütteten Kurve kann somit auf den Oligomerisierungsgrad  $n$  geschlossen werden (siehe Methoden, Kapitel 7.3.3.). In POPC LUVs ist keine lineare Zunahme ( $n = 2$ ) der Emission des Akzeptors  $E_{app,se}$  in Abhängigkeit des entsprechenden Molenbruch  $x_D$  erkennbar, sondern die Akzeptoremission nimmt mit zunehmenden Donormolenbruch in einem stärkeren Ausmaß zu. Die FRET-Daten der TMD2 in POPC passen am besten mit einer angefütteten Kurve mit  $n = 2,81$  überein, was dem Oligomerisierungsgrad eines Trimers entspricht (Abb. 50A). Demnach konnte kein höheres Oligomer mittels FRET-Spektroskopie ermittelt werden. Dies könnte aber darauf zurückzuführen sein, dass die Abstände zwischen den Helices in dem gebildeten Loch zu groß sind und daher zu den weiter entfernten Helices kein effizienter Energieübertrag möglich ist.

Analoge FRET-Messungen der TMD2 wurden zudem in POPC/POPG (7:3) LUVs durchgeführt. Die TMD2 induziert in diesem Lipidsystem lediglich etwa 5 % Leakage ( $P/L = 1:150$ ), demnach sollte die TMD2 überwiegend als Dimer vorliegen und sich keine Löcher in der Membran ausgebildet haben. Die FRET-Daten in POPC/POPG (7:3) LUVs lassen eine nahezu lineare Zunahme ( $n = 2,3$ ) der Emission des Akzeptors  $E_{app,se}$  in Abhängigkeit des entsprechenden Molenbruch  $x_D$  erkennen, somit liegt die TMD2 in POPC/POPG (7:3) LUVs als Dimer vor (Abb. 50B). Anhand der FRET-Messungen kann somit zwischen der im Loch vorliegenden TMD2, welche sehr starkes Leakage induziert, und dem TMD2 Dimer, welches nicht zur Lochbildung befähigt ist, unterschieden werden.



**Abbildung 50: Analyse des Oligomerisierungsgrads der TMD2 in POPC und POPC/POPG Vesikeln mittels FRET**  
 Die TMD2 (Donor) und die Dansyl-TMD2 (Akzeptor) wurden in verschiedenen molaren Verhältnissen zueinander in POPC (A) und POPC/POPG (B) Vesikeln rekonstituiert (P/L = 1 zu 150). In POPC Vesikeln wurden die Messungen dreimal und in POPC/POPG (7:3) zweimal bei einer Temperatur von 22 °C durchgeführt und die entsprechenden Standardabweichungen sind angegeben. Die sensibilisierte Akzeptoremission  $E_{app,se}$  wurde berechnet und gegen den Donormolenbruch  $x_D$  der TMD2 aufgetragen. Anhand der an diese Daten angefütteten Kurve kann der Oligomerisierungsgrad  $n$  bestimmt werden.

### 3.2 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der TMD1 des Pinholins S<sup>2168</sup>

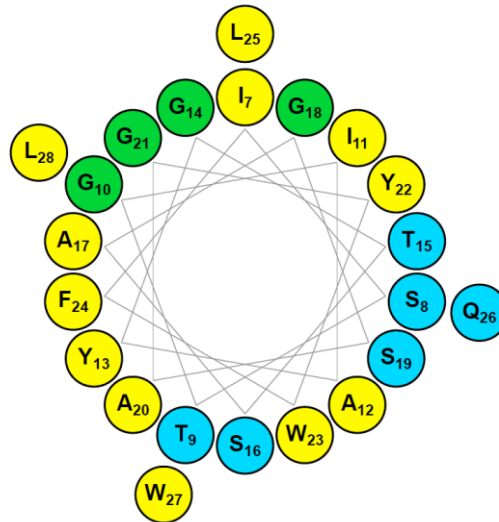
#### 3.2.1 Darstellung der TMD1 des Pinholins S<sup>2168</sup>

Nachdem erstmalig die Struktur sowie die lochbildenden Eigenschaften der TMD2 ermittelt werden konnten, sollte nun die TMD1 des Pinholins S<sup>2168</sup> näher betrachtet werden. Basierend auf diversen Mutationsanalysen postulieren T. PANG *et al.*, dass die TMD1 eine rein regulatorische Funktion während der Lochbildung in der inneren Bakterienmembran einnimmt. Solange die TMD1 in der Membran inseriert vorliegt, bilden sich inaktive Pinholin-Dimere aus und erst durch das Flippen der TMD1 aus der Membran in Richtung Periplasma wird die Lochbildung initiiert<sup>63,66,101</sup>. Für die folgende strukturelle und funktionelle Charakterisierung der vermutlich rein regulatorischen TMD1 wurde ein Fragment verwendet, bei welchem die postulierte Sequenz der TMD1 (I<sub>7</sub> bis L<sub>28</sub>)<sup>63</sup> N-terminal um die natürliche Sequenz des Antipinholins (M<sub>1</sub>K<sub>2</sub>S<sub>3</sub>M<sub>4</sub>D<sub>5</sub>K<sub>6</sub>) verlängert wurde. Zur weiteren Erhöhung der Polarität des Peptids und der damit verbundenen besseren Handhabung wurde es zusätzlich um die vier Aminosäuren D<sub>29</sub>Q<sub>30</sub>V<sub>31</sub>S<sub>32</sub> aus der natürlichen Sequenz am amidierten C-Terminus verlängert. Im weiteren Verlauf wird dieses Fragment als TMD1 bezeichnet (Tab. 6).

**Tabelle 6: Aminosäuresequenz des chemisch synthetisierten TMD1 Fragments**

Die Sequenz der TMD1 des Pinholins S<sup>2168</sup> ist unterstrichen und die Nettoladung des verwendeten TMD1 Fragments ist angegeben. Die Synthese erfolgte mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese von Dr. Parvesh Wadhvani, Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck (KIT, IBG2) und die Aufreinigung wurde mittels HPLC durchgeführt.

Peptid	Sequenz	Nettoladung
TMD1	MKSM <u>D</u> KISTG <u>I</u> AYGTSAGSAGYWFLQWLDQVS-Amid	+ 1



**Abbildung 51: Helical wheel plot der TMD1 des Pinholins S<sup>2168</sup>**

Erstellt wurde der *helical wheel plot* mittels der Protein-ORIGAMI-Webanwendung<sup>115</sup>. Hydrophobe Aminosäuren sind gelb markiert und polare Aminosäuren blau, Glycine sind in grün dargestellt.

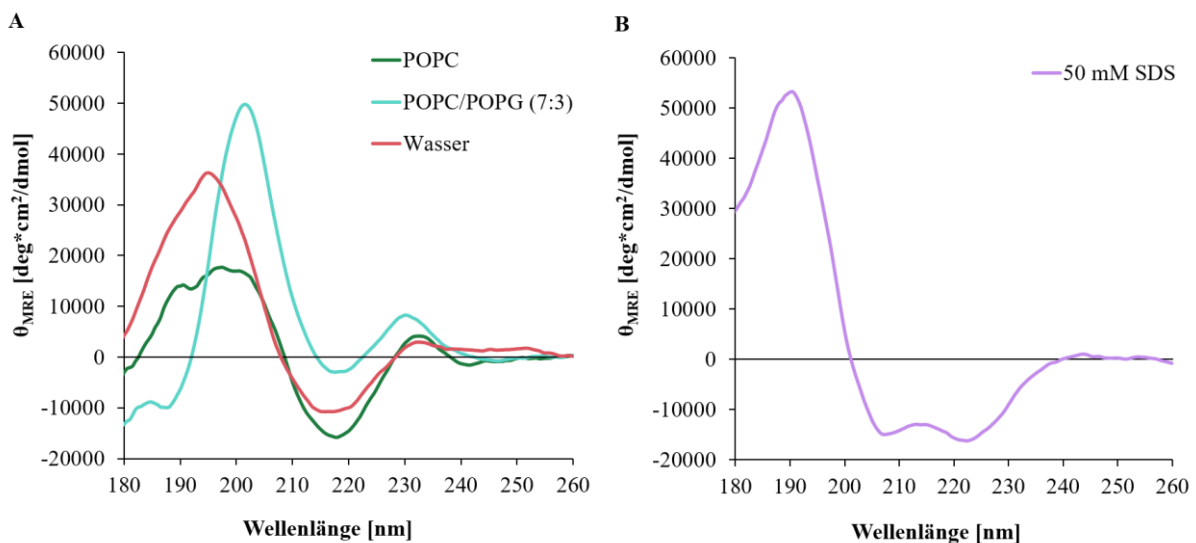
Bei genauerer Betrachtung der Sequenz der TMD1 in einem *helical wheel plot* (Abb. 51) ist erkennbar, dass eine Seite der Helix komplett mit polaren Aminosäuren (Abb. 51, blaue Kreise) ausgekleidet ist, wohingegen sich auf der gegenüberliegenden Seite hauptsächlich Glycine (Abb. 51, grüne Kreise) befinden.

### 3.2.2 Sekundärstrukturanalyse der TMD1 des Pinholins S<sup>2168</sup>

Zunächst sollte die Struktur der TMD1 mittels SRCD-Spektroskopie ermittelt werden. Aufgrund der Wasserlöslichkeit der TMD1 wurden die Proben nicht durch Cosolubilisierung von Peptid und Lipid hergestellt, sondern die in Wasser gelöste TMD1 konnte zu den zuvor hergestellten Vesikeln hinzugegeben werden. Die vorliegende Konzentration der wasserlöslichen TMD1 konnte über die UV-Absorption bei 280 nm bestimmt werden, wodurch die Berechnung der mittleren molaren Elliptizität pro Peptidbindung ( $\theta_{MRE}$ ) möglich ist. Zunächst wurde die Konformation der TMD1 in reinem Wasser (ohne Lipid) ermittelt. Das erhaltene SRCD-Spektrum weist die charakteristischen Banden eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts auf (siehe Abb. 21), mit einer positiven Bande bei 195 nm und einer negativen Bande bei 217 nm (Abb. 52A, rotes Spektrum). Die leicht positive Bande bei etwa 230 nm ist vermutlich auf die aromatische Aminosäure Tryptophan zurückzuführen. Insbesondere bei Peptiden, welche nur einen geringen Helixanteil aufweisen, können Tryptophane einen Beitrag zum Zirkulardichroismus im fernen UV-Bereich leisten und das entsprechende CD-Spektrum weist somit eine positive Bande im Bereich von 220 nm bis 230 nm auf<sup>164,165</sup>. Anschließend



wurde die TMD1 in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 zu Vesikeln gegeben. In POPC Vesikeln bildet die TMD1 ebenfalls antiparallele  $\beta$ -Faltblatt Strukturen aus, da eine positive Bande bei 197 nm und eine negative Bande bei 218 nm erkennbar sind (Abb. 52A, dunkelgrünes Spektrum). Die Absorptionsabflachung (*absorption flattening*) der positiven Bande könnte darauf hindeuten, dass die TMD1 teilweise aggregiert vorliegt<sup>166,167</sup>. In Vesikeln aus POPC/POPG (7:3) ist eine leichte Verschiebung der positiven Bande zu 202 nm erkennbar sowie eine Reduktion der Signalintensität der negativen Bande bei 218 nm (Abb. 52A, türkiseses Spektrum), was darauf hindeuten könnte, dass die TMD1 vermutlich in einem Gemisch aus antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und  $\beta$ -Schleifen vorliegt (siehe Abb. 21). Auch in den SRCD-Spektren der TMD1 in Lipidvesikeln ist eine positive Bande bei etwa 230 nm, welche vermutlich auf die Tryptophane der TMD1 zurückzuführen ist, erkennbar<sup>164,165</sup>. Das SRCD-Spektrum der TMD1 in SDS (Natriumdodecylsulfat)-Mizellen (50 mM) weist die charakteristischen Banden einer  $\alpha$ -Helix auf, mit einer positiven Bande bei 192 nm und den beiden negativen Banden bei 208 nm und 222 nm (Abb. 52B). Somit nimmt die TMD1 nur in SDS-Mizellen eine  $\alpha$ -helikale Konformation ein.



**Abbildung 52: SRCD-Spektren der TMD1**

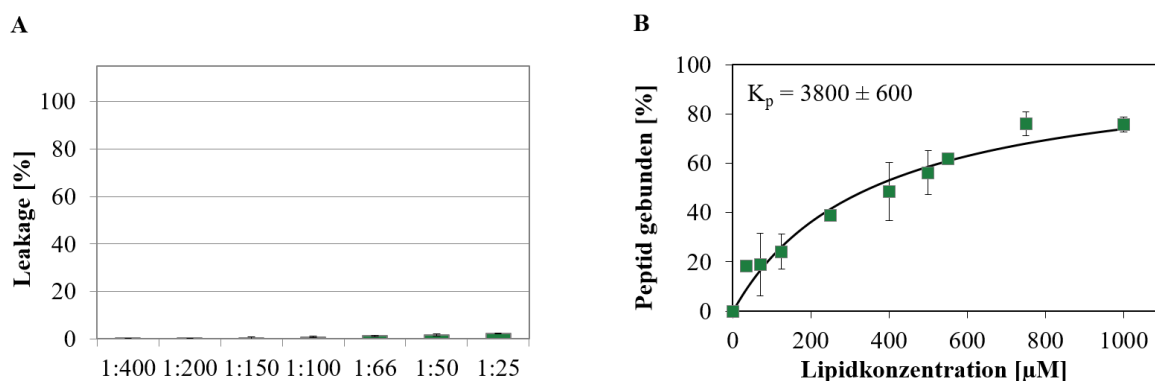
Die SRCD-Messungen der TMD1 wurden bei 22 °C durchgeführt. Die Konzentration der TMD1 wurde über die UV-Absorption bei 280 nm bestimmt, was die Berechnung der mittleren molaren Elliptizität pro Peptidbindung ( $\theta_{MRE}$ ) ermöglicht. (A) Die TMD1 liegt in reinem Wasser als antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt vor (rotes Spektrum), da das SRCD-Spektrum eine positive Bande bei 195 nm und eine negative Bande bei 217 nm aufweist. Die TMD1 wurde zudem in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 zu zuvor hergestellten Vesikeln gegeben. In POPC (dunkelgrünes Spektrum) liegt die TMD1 als antiparallele  $\beta$ -Faltblätter vor, wobei die verminderte Signalintensität der positiven Bande auf eine teilweise Aggregation auf der Membranoberfläche hindeuten könnte. In POPC/POPG (7:3) Vesikeln liegt die TMD1 vermutlich in einem Gemisch aus antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und  $\beta$ -Schleifen vor. Die in allen Spektren erkennbare, leicht positive Bande bei etwa 230 nm ist vermutlich auf die aromatische Aminosäure Tryptophan zurückzuführen<sup>165</sup>. (B) In 50 mM SDS weist das SRCD-Spektrum der TMD1 eine positive Bande bei 192 nm und zwei negative Banden bei 208 nm und 222 nm auf, demnach liegt die TMD1 in SDS-Mizellen  $\alpha$ -helikal gefaltet vor.

Da die Auswertung nicht  $\alpha$ -helikaler Peptide mittels OCD-Spektroskopie zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig entwickelt ist, wurde die Orientierung der TMD1 in Lipiddoppelschichten nicht bestimmt.

### 3.2.3 Funktionsanalyse der TMD1 des *Pinholins S<sup>2168</sup>*

Nachdem der lochbildende Charakter der TMD2 mittels ANTS/DPX-Leakage-Experimenten erstmalig experimentell bestätigt werden konnte, wurde untersucht, ob die TMD1 entsprechend keine Löcher in der Membran ausbildet. Sofern die TMD1 nicht an der Ausbildung der Löcher beteiligt ist, sollte diese kein Leakage induzieren. Die Probenvorbereitung sowie die Vorgehensweise der ANTS/DPX-Leakage-Messung unterscheidet sich von der bisherigen Durchführung bei der Untersuchung der TMD2, da die TMD1 im Gegensatz zur TMD2 wasserlöslich ist. Zunächst wurden LUVs ohne Peptid hergestellt und die nicht in den Vesikeln eingeschlossenen ANTS-Fluorophore und DPX-Quencher mittels einer Gelfiltrationssäule entfernt. Erst danach wurde die TMD1 in variierender Konzentration zur Einstellung der unterschiedlichen molaren Peptid- zu Lipidverhältnisse von außen zugegeben. Analog zu den Messungen der TMD2 wurde die zeitliche Zunahme der ANTS-Fluoreszenz detektiert und nach 900 s erfolgte die vollständige Solubilisierung der Vesikel durch Zugabe des Detergenz Triton X-100. Abbildung 53A zeigt die Leakage-Daten der TMD1 in POPC LUVs in unterschiedlichen molaren Peptid- zu Lipidverhältnissen. Da keine Zunahme der Fluoreszenz detektiert werden konnte, bildet die TMD1 folglich keine Löcher in der Membran aus. Selbst bei sehr hoher Peptidkonzentration ( $P/L = 1:25$ ) konnten nur etwa 2,5 % der eingeschlossenen Fluorophore aus den Vesikeln entweichen. Um zu überprüfen, ob das nicht induzierte Leakage lediglich darauf zurückzuführen ist, dass die von außen zugegebene TMD1 gar nicht an die Lipidvesikel bindet, wurde die Bindungsaffinität der TMD1 an POPC Vesikel ermittelt. Für die Untersuchung des Bindungsverhalten wurde sich zu Nutze gemacht, dass sich die Tryptophan-Fluoreszenz von membrangebundenen und ungebundenen Peptiden voneinander unterscheidet. Verglichen zu der Fluoreszenz eines ungebundenen Peptids lässt sich der membrangebundene Zustand durch eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums hin zu kürzeren Wellenlängen (*blue shift*) sowie einer Intensitätszunahme des Maximums erkennen<sup>168-170</sup>. Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein eines Tryptophans in der Aminosäuresequenz des Peptids, was im Fall der TMD1 durch die beiden Tryptophane W<sub>23</sub> und W<sub>27</sub> erfüllt ist. Gemessen wurde die Tryptophan-Fluoreszenz der TMD1 bei konstanter

Peptidmenge und variierender Lipidkonzentration. Die letztendlich erhaltene Bindungsisotherme der TMD1 ist in Abbildung 53B gezeigt und der ermittelte Verteilungskoeffizient  $K_p$  der TMD1 in POPC Vesikeln liegt etwa bei 3800. Die auf M. N. MELO *et al.*<sup>171</sup> und N. C. SANTOS *et al.*<sup>170</sup> basierende Bestimmung des Verteilungskoeffizients  $K_p$  ist in den Methoden (Kapitel 7.3.4.) genauer erläutert. Aus den Daten ist ersichtlich, dass relativ hohe Lipidkonzentrationen nötig waren, damit ein Großteil der TMD1 gebunden vorlag. Demnach ist die Affinität der TMD1 zur Membran nicht sehr hoch. Dennoch konnten die Messungen der Bindungsaffinität der TMD1 in POPC Vesikeln zeigen, dass die TMD1 mit den Lipiden interagiert, wenn auch nicht sehr stark.

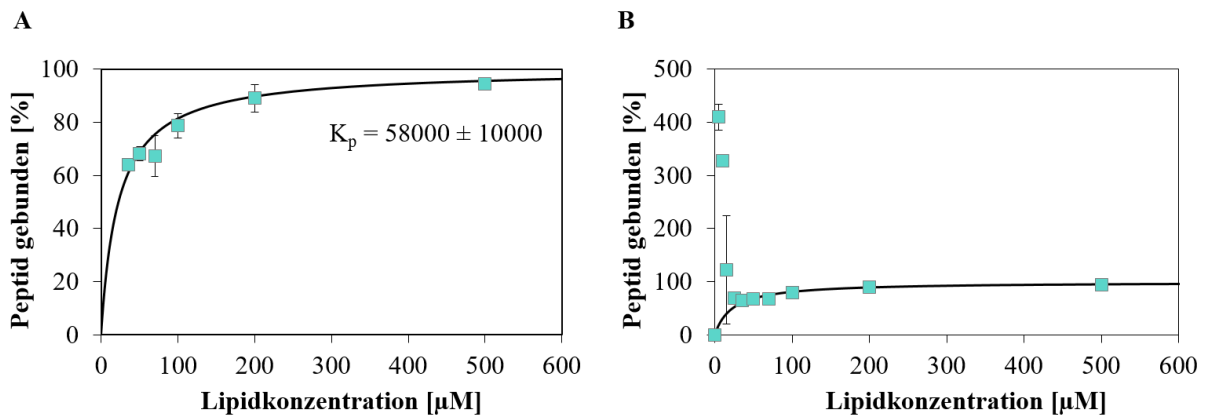


**Abbildung 53: ANTS/DPX-Leakage-Messungen und Bindungsisotherme der TMD1 in POPC LUVs**

(A) Aufgrund der Wasserlöslichkeit der TMD1 wurden bei den ANTS/DPX-Leakage-Messungen zuerst die nicht in den POPC Vesikeln eingeschlossenen Fluorophore und Quencher entfernt und erst danach erfolgte die Zugabe der TMD1 in variierender Konzentration zur Einstellung der verschiedenen Peptid- zu Lipidverhältnisse. Die Messungen wurden bei 22 °C durchgeführt und die Mittelwerte der Leakage-Werte nach 900 s zweier Messungen sowie deren Standardabweichung sind aufgetragen. Die Messungen zeigen, dass die TMD1 in POPC LUVs kein Leakage induziert. (B) Die Messungen der Fluoreszenz von Tryptophan bei konstanter Peptidmenge (1 µM) und variierender Lipidkonzentration wurde bei 22 °C durchgeführt. Die Bindungsisotherme (schwarze Linie) der TMD1 in POPC LUVs ergibt sich durch die Anpassung an die Datenpunkte aus zwei Messungen (dunkelgrüne Quadrate), deren Standardabweichung angegeben sind.

Aufgrund der geringen Bindungsaffinität der TMD1 an die POPC LUVs wurden analoge Messungen in POPC/POPG (7:3) LUVs durchgeführt. Die zusätzliche negative Ladung der Vesikel durch die negativ geladene Kopfgruppe des PG-Lipids sollte die Affinität der einfach positiv geladenen TMD1 an die Vesikel erhöhen. Wie erwartet bindet die TMD1 an die negativ geladenen LUVs deutlich stärker als an die neutralen POPC LUVs. Bereits bei niedriger Lipidkonzentration war mehr Peptid gebunden und der Verteilungskoeffizient liegt bei einem Wert von etwa 58000 (Abb. 54A), was einer 15-fach stärkeren Bindung an die POPC/POPG LUVs entspricht. Zu beachten ist hier jedoch, dass bei der Bestimmung der Bindungsisotherme die Datenpunkte bei sehr niedrigen Lipidkonzentrationen nicht verwendet werden konnten. Abbildung 54B zeigt, dass bei niedrigen Konzentrationen des Lipids scheinbar mehr als 100 % der Peptide gebunden vorlagen. Eine solch ungewöhnliche Zunahme der Bindungsaffinität

konnten M. N. MELO *et al.*<sup>171</sup> ebenfalls bei niedrigen Lipidkonzentrationen beobachten, als sie das antimikrobielle Peptid Omiganan in negativen Lipidvesikeln untersuchten. Dieser beobachtete Effekt kann zum derzeitigen Zeitpunkt allerdings nicht erklärt werden, vermutlich wird die Fluoreszenz nicht nur durch die veränderte Umgebung des Tryptophans beeinflusst, sondern andere, zusätzliche Interaktionen könnten zur Erhöhung des Fluoreszenzsignals geführt haben.

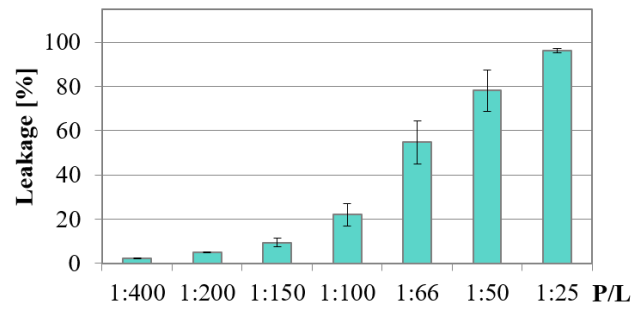


**Abbildung 54: Bindungsisotherme der TMD1 in POPC/POPG (7:3) LUVs**

Die Messungen der Tryptophan-Fluoreszenz der TMD1 erfolgten bei konstanter Peptidmenge (1 µM) und variierender Lipidkonzentration und wurden bei 22 °C durchgeführt. (A) Die Bindungsisotherme (schwarze Linie) der TMD1 in POPC/POPG (7:3) LUVs ergibt sich durch die Anpassung an die Datenpunkte aus zwei Messungen (türkisene Quadrate), deren Standardabweichung angegeben sind. Allerdings wurde die Bindungsisotherme nur an die nicht verfälschten Datenpunkte (hier nicht gezeigt) angepasst. (B) Die analoge Bindungsisotherme der TMD1 in POPC/POPG Vesikeln ist gezeigt, wobei die Datenpunkte gezeigt sind, welche nicht für den Fit verwendet wurden. Die scheinbare Zunahme der Bindungsaffinität bei niedrigen Lipidkonzentrationen beruht auf einem unbekanntem Effekt, den auch M. N. MELO *et al.* beobachteten<sup>171</sup>.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die TMD1 eine höhere Bindungsaffinität für die negativ geladenen POPC/POPG LUVs besitzt, wurden auch in diesem Lipidsystem entsprechende ANTS/DPX-Leakage-Messungen durchgeführt (Abb. 55). Überraschenderweise induziert die TMD1 in POPC/POPG LUVs ein Leakage. Bei niedrigen Peptidkonzentrationen sind relativ wenige ANTS-Fluorophore und DPX-Quencher aus den Vesikeln entwichen, wohingegen bei sehr hoher Konzentration die eingeschlossenen Moleküle vollständig herausgeströmt sind. Das in POPC/POPG LUVs induzierte Leakage der TMD1 ist eventuell aber auf die hohe Affinität für die negativ geladenen Vesikel zurückzuführen. Vermutlich bildet die TMD1 keine Löcher mit einer definierten Größe in der Membran aus, sondern permeabilisiert die Vesikel durch eine Anhäufung auf der Vesikeloberfläche.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 55: ANTS/DPX-Leakage-Messungen der TMD1 in POPC/POPG (7:3) LUVs**

Zunächst wurden die nicht in den POPC/POPG Vesikeln eingeschlossenen Fluorophore und Quencher mittels Gelfiltration entfernt, erst danach erfolgte die Zugabe der TMD1 in entsprechender Konzentration. Die Messungen wurden bei 22 °C durchgeführt und die Mittelwerte der Leakage-Werte nach 900 s zweier Messungen sowie deren Standardabweichung sind aufgetragen. Bei geringen Peptidkonzentrationen sind nur wenige Fluorophore und Quencher aus den Vesikeln entwichen und bei sehr hoher Konzentration der TMD1 (P/L = 1:25) sind nahezu alle Moleküle herausgeströmt.

## 4 Diskussion

Der Bakteriophage  $\phi 21$  nutzt das Pinholin-SAR-Endolysin-System für die Freisetzung seiner Phagennachkommen aus dem Bakterienwirt. Das aus zwei TMDs bestehende Pinholin S<sup>21</sup>68 reichert sich während der Phagenmorphogenese in der inneren Membran von *E. coli* Bakterien an und bildet darin kleine Löcher aus. Es wird postuliert, dass die TMD1 eine rein regulatorische Funktion einnimmt, indem sie den Zeitpunkt der Lyse durch das Flippen aus der Membran in Richtung Periplasma steuert. Hingegen soll lediglich die TMD2 für die eigentliche Lochbildung verantwortlich sein, wobei ein Glycin-Zipper Motiv auf der TMD2 dabei eine entscheidende Rolle einzunehmen scheint<sup>59,63,67,101</sup>. Dieses postulierte Strukturmodell basiert jedoch nur auf Mutationsanalysen von T. PANG *et al.*<sup>63,66,67,101</sup> und der detaillierte Mechanismus der Lochbildung sowie die exakte Struktur des Pinholins konnten noch nicht experimentell bewiesen werden. Kürzlich durchgeführte EPR-Studien geben lediglich erste Hinweise auf die Struktur des Pinholins<sup>102,103</sup>. Im Zuge dieser Arbeit sollte daher erstmals die detaillierte Struktur sowie die Funktion des Pinholins S<sup>21</sup>68 des Phagen  $\phi 21$  mittels verschiedener biophysikalischer Methoden untersucht werden, wobei zu Beginn die beiden TMDs des Pinholins getrennt voneinander untersucht wurden.

### 4.1 Strukturelle Charakterisierung der TMD2 des Pinholins S<sup>21</sup>68

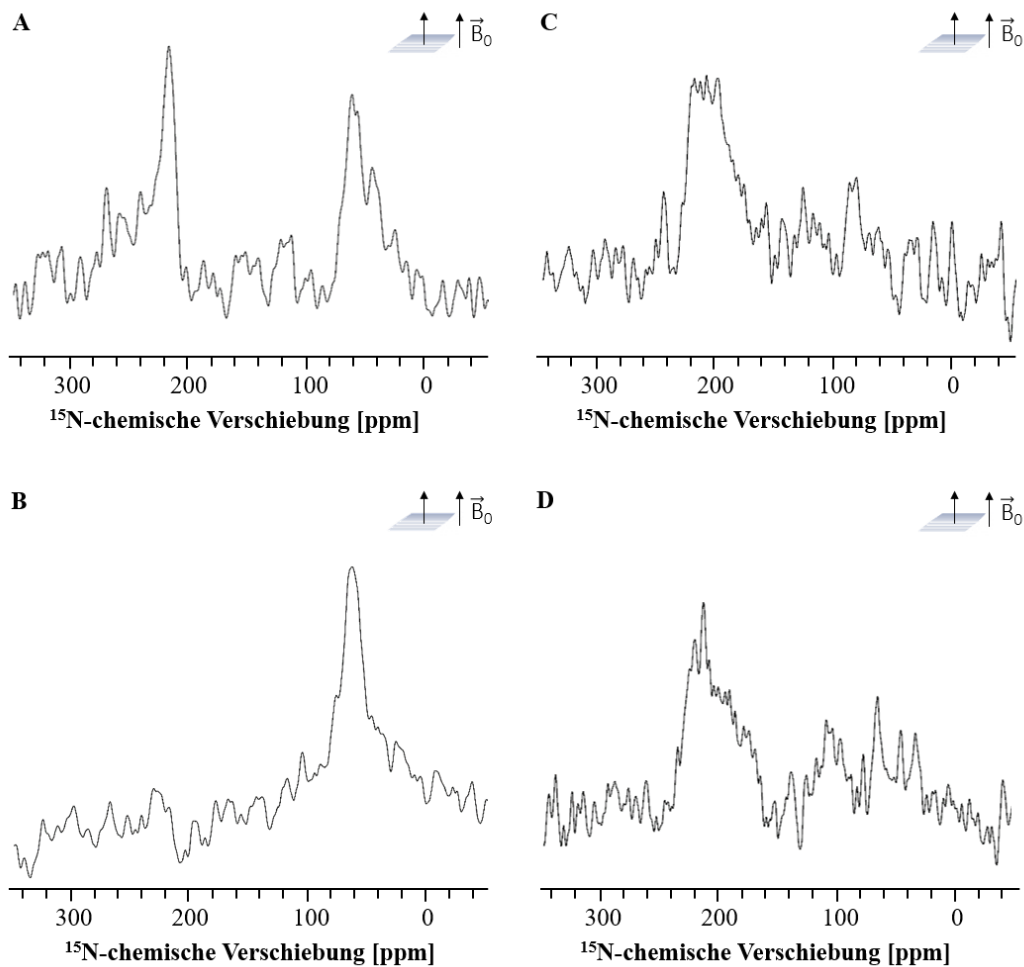
Die Sekundärstruktur des verwendeten TMD2 Fragments konnte mittels SRCD-Spektroskopie bestimmt werden. Die TMD2 faltet sich  $\alpha$ -helikal und behält diese Konformation auch in Membranen mit unterschiedlicher hydrophober Dicke, verändertem Sättigungsgrad der Lipidacylketten oder geänderter Lipidkopfgruppenstruktur bei (siehe Abb. 23/38A).

Neben der Untersuchung der Sekundärstruktur der TMD2 in verschiedenen Lipidsystemen wurde auch deren Orientierung in Membranen durch eine Kombination von SROCD- und Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die TMD2 nimmt in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten aus Lipiden mit gesättigten Acylketten eine transmembrane Orientierung ein (siehe Abb. 25A/27). Die ermittelte Orientierung der TMD2 stimmt mit den EPR-Studien eines Pinholin Gesamtkonstrukts von T. AHAMMAD *et al.* überein, welche eine insertierte TMD2 in DMPC Membranen zeigen<sup>102</sup>. Die Variation der hydrophoben Dicke der Membran zeigte, dass der Neigungswinkel der TMD2 in der Lipiddoppelschicht größer wird, je geringer die hydrophobe Membrandicke ist. Solch ein Neigungsverhalten von Helices in Membranen ist typisch, da dadurch verhindert wird, dass hydrophobe Bereiche der Helices in die wässrige Umgebung exponiert werden (*hydrophobic mismatch*)<sup>131,132</sup>. In DMPC

Membranen mit einer hydrophoben Dicke von  $25,4 \text{ \AA}^{122}$  ist die TMD2 relativ aufrecht in der Membran inseriert. Durch die Verringerung der hydrophoben Dicke der Membran hat sich das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Signal immer weiter ins Hochfeld verschoben, was einer immer stärker geneigten TMD2 in der Membran entspricht. In deutlich dünneren DDPC (10:0) Membranen mit einer hydrophoben Dicke von  $16,6 \text{ \AA}^{122}$  liegt die TMD2 stark geneigt vor (siehe Abb. 27). Neben der Ermittlung der Orientierung der TMD2 in Lipiden mit gesättigten Lipidacylketten wurde auch der Einfluss einfach ungesättigter Acylketten auf die Membranorientierung untersucht (siehe Abb. 25B/28). In dünnen Membranen aus DMOPC (14:1), mit einer hydrophoben Dicke von  $19,2 \text{ \AA}^{122}$ , ist die TMD2 leicht geneigt in der Membran inseriert. Durch die erhöhte hydrophobe Dicke in DOPC (18:1) Membranen mit  $26,8 \text{ \AA}^{122}$  richtet sich die inserierte TMD2 weiter auf (siehe Abb. 28). Demnach passt sich die TMD2 in analoger Weise wie in Lipiden mit gesättigten Lipidacylketten der hydrophoben Membrandicke durch Neigung an. Überraschenderweise zeigten die  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren der TMD2 in Membranen aus Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten ein zweites Signal bei einer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung im Bereich zwischen 62 ppm und 68 ppm. Signale in diesem Bereich können einer auf der Oberfläche lokalisierten Helix zugeordnet werden. Somit scheint die TMD2 in diesen Lipiden aus der Membran zu flippen, wobei mit zunehmender hydrophober Dicke der Anteil an geflippter TMD2 zunimmt. In den extrem dicken Membranen aus DERPC ( $d_c = 34,4 \text{ \AA}^{122}$ ) ist die TMD2 sogar ausschließlich auf der Membranoberfläche lokalisiert. Laut dem postulierten Wirkmechanismus des Pinholins soll jedoch nur die TMD1 aus der Membran flippen, wodurch der Zeitpunkt der Lyse des Bakterienwirts reguliert werden soll, und die TMD2 fest in der Membran verankert sein<sup>63,66,67</sup>. Eventuell handelt es sich aber bei dem beobachteten Flippen nur um ein Artefakt, da lediglich ein TMD2 Fragment untersucht wurde und nicht das gesamte Pinholin. Die TMD2 weist einen amphiphilen Charakter auf (siehe Abb. 20), daher kann sich das TMD2 Fragment auch unter bestimmten Bedingungen oberflächengebunden anordnen. Die polaren Seitenketten der TMD2 würden dabei zur hydrophilen Umgebung gerichtet sein und die hydrophoben Seitenketten in Richtung der Membran weisen. In dem Lipidsystem POPC (16:0-18:1), welches sowohl über eine gesättigte als auch eine einfach ungesättigte Acylkette verfügt, zeigt das Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>45</sub> markierten TMD2 ein scharfes Signal bei 217 ppm auf und ein etwas weniger intensives Signal bei 64 ppm (Abb. 56A). Demnach nimmt die TMD2 auch in diesem Lipidsystem eine transmembrane Orientierung ein und ein gewisser Anteil ist auf der Oberfläche der Membran lokalisiert. Die  $^{15}\text{N}$ -NMR-Messung in POPC zeigt weiterhin, dass das

Austrocknen der NMR-Probe die Helix aus der Membran zu drücken scheint, da ein Wechsel der Orientierung während der Messzeit beobachtet werden kann. Am Ende der dreitägigen Messung weist das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum nur ein Signal bei 64 ppm auf, demnach nimmt die TMD2 ausschließlich eine oberflächengebundene Orientierung ein (Abb. 56B). Die kürzlich durchgeführte Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messung eines synthetisch hergestellten Antipinholin Gesamtkonstrukts konnte nun Aufschluss darüber geben, ob es sich bei dem beobachteten Flippen der TMD2 tatsächlich nur um ein Artefakt handelt. Das Antipinholin S<sup>2171</sup> ist im Vergleich zum Pinholin S<sup>2168</sup> N-terminal um die Aminosäuren Methionin, Lysin und Serin verlängert<sup>76,95</sup>. T. PANG *et al.* postulieren, dass die TMD1 des Antipinholins aufgrund der zusätzlichen positiven Ladung am N-Terminus nicht aus der Membran flippen kann<sup>59,67,69</sup>. Das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum des Antipinholins, bei welchem sowohl die TMD1 ( $^{15}\text{N}$ -A<sub>12</sub>) als auch die TMD2 ( $^{15}\text{N}$ -L<sub>45</sub>) selektiv  $^{15}\text{N}$ -markiert wurden, weist in POPC Membranen nur Signale im Bereich einer insertierten Helix auf (Abb. 56C). Das Signal bei 217 ppm kann der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>45</sub> markierten TMD2 des Antipinholins zugeordnet werden und die Verbreiterung des Signals, verglichen zu dem Signal des  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrums des TMD2 Fragments (Abb. 56A), ist auf das zusätzliche Signal der insertierten  $^{15}\text{N}$ -A<sub>12</sub> markierten TMD1 des Antipinholins zurückzuführen. In diesem Konstrukt nimmt die TMD2 somit ausschließlich eine transmembrane Orientierung ein. Auch nach Ende der dreitägigen Messung weist das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum des Antipinholins nur Signale im Bereich einer insertierten Helix auf (Abb. 56D). Folglich wird die TMD2 im Gesamtkonstrukt trotz des Austrocknens der NMR-Probe fest in der Membran verankert und ein Flippen auf die Oberfläche der Lipiddoppelschicht kann nicht beobachtet werden.





**Abbildung 56: Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>45</sub> TMD2 und des  $^{15}\text{N}$ -A<sub>12</sub>, L<sub>45</sub> Antipinholins in POPC Membranen**

Die  $^{15}\text{N}$ -L<sub>45</sub> markierte TMD2 und das  $^{15}\text{N}$ -A<sub>12</sub>, L<sub>45</sub> markierte Antipinholin wurden jeweils in makroskopisch orientierten POPC-Doppelschichten rekonstituiert ( $P/L = 1:50$ ) und die Messungen wurden bei 35 °C durchgeführt. (A) Das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>45</sub> markierten TMD2 zu Beginn der Messung zeigt, dass die TMD2 sowohl insertiert (217 ppm), als auch auf der Oberfläche der Membran lokalisiert (64 ppm) ist. (B) Das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>45</sub> markierten TMD2 nach Ende der dreitägigen Messung zeigt hingegen, dass die TMD2 durch das Austrocknen der Probe aus der Membran flippt. (C) Das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum des  $^{15}\text{N}$ -A<sub>12</sub>, L<sub>45</sub> markierten Antipinholins zu Beginn der Messung zeigt, dass beide TMDs fest in der Membran verankert sind, da nur Signale im Bereich einer insertierten Helix vorhanden sind. (D) Das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum des  $^{15}\text{N}$ -A<sub>12</sub>, L<sub>45</sub> markierten Antipinholins nach Ende der dreitägigen Messung zeigt, dass die beiden TMDs trotz des Austrocknens der NMR-Probe stabil in der Membran insertiert bleiben. Die Messungen wurden von M. Sc. Anne C. Görner im Zuge ihrer Masterarbeit und von B. Sc. Yannick Busch im Zuge seiner Bachelorarbeit durchgeführt.

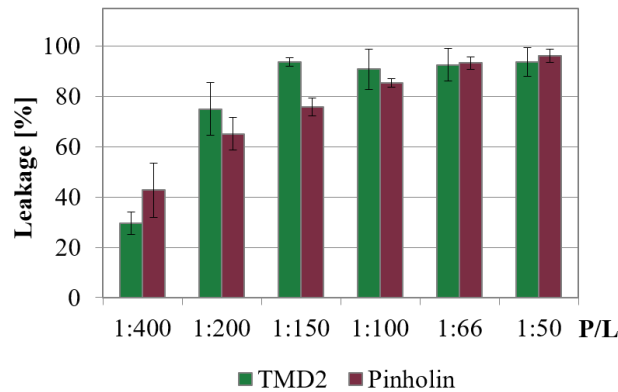
Bei dem beobachteten Flippen des TMD2 Fragments in ausgetrockneten oder sehr dicken Membranen aus Lipiden mit einfach ungesättigten Lipidacylketten handelt es sich somit nur um ein Artefakt. Da sich die Lipide bei den fluoreszenzbasierten Experimenten zur Funktionsanalyse der TMD2 allerdings in einem vollständig hydratisierten Zustand befinden, ist anzunehmen, dass ein Großteil der TMD2 eine transmembrane Orientierung einnimmt. Eventuell verschiebt sich unter diesen Bedingungen das Gleichgewicht zwischen insertierter und geflippter TMD2 sogar komplett auf die Seite der insertierten Helix.

Zur Ermittlung der detaillierten Orientierung der TMD2 in Membranen wurde die TMD2 an weiteren Positionen der Aminosäuresequenz selektiv  $^{15}\text{N}$ -markiert und mittels 2D-Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen untersucht (siehe Abb. 30). Die Messungen wurden in makroskopisch orientierten DMPC Lipiddoppelschichten durchgeführt, da dieses Lipid eine etablierte Modellmembran in der Festkörper-NMR-Spektroskopie darstellt<sup>137</sup> und die TMD2 darin eine vollständig transmembrane Orientierung einnimmt. Basierend auf der 2D-Festkörper-NMR-Messung der  $^{15}\text{N}$ -L<sub>40,42,47,50</sub> markierten TMD2 konnte der exakte Neigungswinkel der TMD2 mit  $\tau = 14^\circ$  in DMPC Membranen ermittelt werden, demnach nimmt die TMD2 eine nur geringfügig geneigte Position ein<sup>130</sup>. Die TMD2 des Pinholins umfasst 23 Aminosäuren, was einer Länge von  $34,5 \text{ \AA}$  entspricht, sofern von einer idealen  $\alpha$ -Helix mit  $1,5 \text{ \AA}$  pro Aminosäurerest entlang der Helixachse ausgegangen wird. Beim Vergleich der hydrophoben Dicke von DMPC Membranen mit  $25,4 \text{ \AA}$ <sup>122</sup> und der Länge der Helix der TMD2 fällt auf, dass die hydrophoben Bereiche der Lipiddoppelschicht aus DMPC zu dünn für die TMD2 sind und demnach die Helix eigentlich viel stärker geneigt sein müsste. Bei genauerer Betrachtung der Sequenz der TMD2 (W<sub>36</sub>AAIG<sub>40</sub>VLGSLVLGFL<sub>50</sub>TYLTNLYF<sub>58</sub>) fällt auf, dass gerade in der C-terminalen Region einige polare Seitenketten vorliegen. Diese könnten in die amphiphile Kopfgruppenregion der Membran hineinragen, was die nur leichte Neigung der Helix in DMPC Membranen erklären würde<sup>130</sup>. Auch T. AHAMMAD *et al.*<sup>102</sup> postulieren, basierend auf ihren EPR-Studien, dass sich die Aminosäurereste von N<sub>55</sub> und L<sub>56</sub> in der Grenzflächenregion der Lipide befinden. Zudem deuten deren Festkörper- $^2\text{H}$ -NMR-Studien auf eine lokale Zunahme der hydrophoben Dicke der Membran hin<sup>172</sup>. Die anhand der 2D-Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen durchgeführte Rotationsanalyse der TMD2 ergab, dass das erweiterte Glycin-Zipper Motiv auf der TMD2 (G<sub>40</sub>XXXS<sub>44</sub>XXXG<sub>48</sub>) zusammen mit weiteren polaren Resten (T<sub>51</sub>, T<sub>54</sub>, N<sub>55</sub>) seitlich entlang der geneigten Helix positioniert ist<sup>130</sup>. Dieser polare Streifen der TMD2 ist somit für laterale Helix-Helix Interaktionen frei zugänglich. Anhand der Mutationsstudien von T. PANG *et al.* wurde diesem Interaktionsmotiv bereits eine große Bedeutung während der Lochbildung zugeschrieben<sup>66,67,101</sup>. Des Weiteren konnte aus den 2D-Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen der Ordnungsparameter der TMD2, welcher Auskunft über die Beweglichkeit einer Helix in der Membran liefert, mit  $S_{\text{mol}} = 0,91$  bestimmt werden<sup>130</sup>. Für eine einzelne in der Membran eingelagerte Helix wäre dieser Wert überraschend groß, daher ist anzunehmen, dass sich die TMD2 zu Dimeren oder noch größeren oligomeren Strukturen zusammenlagert<sup>173</sup>.

## 4.2 Funktionelle Charakterisierung der TMD2 des Pinholins S<sup>2168</sup>

Neben der strukturellen Untersuchung der TMD2 lag der Fokus dieser Arbeit auf deren funktionellen Charakterisierung. T. PANG *et al.* postulieren, dass lediglich die TMD2 des Pinholins für die Lochbildung in der Bakterienmembran verantwortlich ist und die TMD1 eine rein regulatorische Funktion einnimmt<sup>66,67</sup>. Anhand ihrer Mutationsanalysen konnten sie bereits zeigen, dass eine Mutante mit deletierter TMD1 immer noch lytisch aktiv ist<sup>101</sup>. Der postulierte lochbildende Charakter der TMD2 des Pinholins konnte nun auch erstmalig durch ein fluoreszenzbasiertes Leakage-Experiment bewiesen werden<sup>130</sup>. Bereits bei einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 400 induziert die TMD2 in POPC LUVs etwa 30 % Leakage. Demnach wurden Löcher in der Vesikelmembran ausgebildet, durch welche die in den Vesikeln eingeschlossenen Fluorophore entweichen konnten (siehe Abb. 36). Ab einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 150 induziert die TMD2 dann ein massives Leakage in POPC LUVs<sup>130</sup>.

Um die biologische Relevanz des durch das TMD2 Fragment induzierten Leakage zu bestätigen, konnten kürzlich noch Messungen am Pinholin S<sup>2168</sup> durchgeführt werden. Die ANTS/DPX-Leakage-Messungen eines synthetisch hergestellten Pinholins zeigen, dass dieses in demselben Ausmaß ein Ausströmen aus den Vesikeln induziert wie das TMD2 Fragment (Abb. 57). Demnach scheint die im Pinholin Gesamtkonstrukt vorhandene TMD1 die Lochbildung nicht zu beeinflussen. Die postulierte regulatorische Funktion der TMD1 während der Lyse<sup>63,66,67</sup> konnte demnach nicht beobachtet werden, was aber daran liegen könnte, dass die TMD1 des Pinholins in POPC Membranen schon geflippt vorliegt. Die geflippte Orientierung der TMD1 des Pinholins zeigen auch die EPR-Messungen von T. AHAMMAD *et al.*<sup>102</sup>. Außerdem ist es möglich, dass sich die TMD1 des Pinholins bei der Rekonstitution in den Lipidvesikeln erst gar nicht einlagert, sondern direkt eine oberflächengebundene Orientierung einnimmt und somit das Pinholin in seinem lytisch aktiven Zustand vorliegt.



**Abbildung 57: ANTS/DPX-Leakage Messungen der TMD2 und des Pinholins S<sup>21</sup>68 in POPC LUVs**

Die TMD2 und das Pinholin wurden in verschiedenen molaren Peptid- zu Lipidverhältnissen (P/L) in POPC Vesikeln rekonstituiert und die Messungen wurden bei 22 °C durchgeführt. Die Mittelwerte der Leakage-Werte nach 900 s aus zwei beziehungsweise drei unabhängigen Messreihen und deren Standardabweichung sind aufgetragen. Das Pinholin induziert ebenfalls Leakage (dunkelrote Balken) und dies etwa in demselben Ausmaß wie die TMD2 (dunkelgrüne Balken<sup>130</sup>).

#### 4.2.1 Einfluss verschiedener Lipidsysteme auf den lochbildenden Charakter der TMD2

Nachdem zum ersten Mal mittels einer biophysikalischen Methode der lochbildende Charakter der TMD2 des Pinholins S<sup>21</sup>68 experimentell bestätigt werden konnte, wurde die Lochbildung in komplexeren Lipidsystemen untersucht. Da sich das Pinholin in die innere Bakterienmembran von *E. coli* einlagert<sup>63</sup>, wurde zunächst das Lochbildungsverhalten der TMD2 in Membranen, deren Zusammensetzung an die innere *E. coli* Membran angelehnt ist, analysiert (siehe Abb. 39). In diesem Lipidsystem (POPE/POPG/TOCL (72:23:5)) konnte zunächst bei niedrigen Peptidkonzentrationen kaum ein Auslaufen der Fluorophore aus den Vesikeln detektiert werden. Erst bei erhöhter Peptidkonzentration induziert die TMD2 ein massives Leakage. Demnach scheint die Lochbildung der TMD2 eine stark ausgeprägte Abhängigkeit von der vorhandenen Peptidkonzentration zu besitzen. Bei dem von T. PANG *et al.* postulierten Mechanismus des Pinholins ist die Ausbildung der Löcher in der Membran, also die Lyse des Bakterienwirts, ebenfalls konzentrationsabhängig. Demnach soll nach Erreichen einer kritischen Konzentration an inaktiven Pinholin-Homodimeren die Lochbildung durch das Flippen der TMD1 des Pinholins aus der Membran initiiert werden<sup>59,63,66</sup>. Bei den durchgeführten ANTS/DPX-Leakage-Messungen erfolgte jedoch keine Regulation durch die TMD1, da hier die lochbildende TMD2 isoliert betrachtet wurde. Eventuell wird jedoch der Zeitpunkt der Lyse des Bakterienwirts nicht nur durch das Flippen der TMD1 und durch das Antipinholin, welches einen inhibierenden Charakter besitzt, reguliert, sondern die Lipidzusammensetzung könnte die Lochbildung zusätzlich beeinflussen. Möglich sind Interaktionen des positiv geladenen C-Terminus der TMD2 mit der negativ geladenen

Lipidkopfgruppe von POPG. Diese Interaktion könnte die Oligomerisierung der TMD2 zunächst hemmen und erst bei Vorliegen einer hohen Peptidkonzentration würden sich die Helices generell schon sehr nahekommen und könnten leichter miteinander interagieren und effektiv Löcher ausbilden. Diese Hypothese wird zudem bekräftigt, da die Untersuchung des lochbildenden Charakters der TMD2 in Lipidsystemen mit unterschiedlichen Kopfgruppenstrukturen zeigte, dass die Lochbildung in PG-enhaltenen Vesikeln gerade bei Vorliegen von geringen Peptidkonzentrationen gehemmt wird. Hingegen fördern die vorhandenen PE-Lipide, welche über eine kleine Kopfgruppe verfügen und somit eine negative Krümmung der Membran bewirken<sup>149</sup>, das Austreten der eingeschlossenen Fluorophore (siehe Abb. 39).

Des Weiteren wurde der lochbildende Charakter der TMD2 auch bezogen auf den Einfluss der hydrophoben Dicke der Lipiddoppelschicht untersucht, wobei hierfür lediglich Lipide mit einfach ungesättigten Lipidacylketten verwendet wurden (siehe Abb. 40). Da die Phasenübergangstemperatur von Lipiden mit langen gesättigten Lipidacylketten vergleichsweise hoch ist und daher nicht gewährleistet werden konnte, dass sich die Lipide während der gesamten Messzeit in ihrer flüssigkristallinen Phase befinden, wurden diese Lipide nicht für die Funktionsanalyse der TMD2 verwendet. Im Allgemeinen lässt sich der Trend erkennen, dass mit zunehmender hydrophober Dicke der Membran die Tendenz der Lochbildung steigt. Die Korrelation dieser Beobachtung mit der Orientierung der TMD2 in diesen Lipiden zeigt, dass je aufrechter die TMD2 in der Membran inseriert ist, desto stärkeres Leakage wird induziert. Vermutlich können sich die Helices aufgrund ihrer geneigten Orientierung nicht so leicht zu einem Loch zusammenlagern. Erst die Leakage-Daten der TMD2 in den extrem dicken DERPC Membranen mit einer hydrophoben Dicke von  $34,4 \text{ \AA}$ <sup>122</sup> folgen nicht mehr diesem Trend. Das induzierte Leakage der TMD2 in DERPC LUVs ist geringer als in den dünneren Lipiddoppelschichten aus DEiPC ( $d_c = 30,6 \text{ \AA}$ <sup>122</sup>) und DOPC ( $d_c = 26,8 \text{ \AA}$ <sup>122</sup>). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die TMD2 die extrem dicke DERPC Membran nicht mehr vollständig durchspannen kann, da die hydrophobe Dicke der Membran gerade mit der Länge der TMD2 ( $34,5 \text{ \AA}$ ) übereinstimmt und somit eine Lochbildung erschwert würde. Auf der anderen Seite könnte dieses Ergebnis aber auch auf das beobachtete Artefakt des TMD2 Fragments zurückzuführen sein. Die TMD2 liegt aufgrund ihres amphiphilen Charakters sowohl transmembran als auch geflippt vor, wobei der Anteil an geflippter TMD2 mit zunehmender hydrophober Dicke steigt und ein Austrocknen der NMR-Probe diesen Effekt noch verstärkt. In den fluoreszenzbasierten Experimenten verschiebt sich das Gleichgewicht

zwischen insertierter und geflippter TMD2 wahrscheinlich auf die Seite der insertierten TMD2, da hier die Lipide in einer vollständig hydratisierten Umgebung vorliegen. Unter Berücksichtigung, dass das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum der TMD2 in DErPC Membranen nur ein Signal einer oberflächengebundenen Helix aufzeigte (siehe Abb. 28), ist anzunehmen, dass sich in den DErPC LUVs das Gleichgewicht nicht vollständig auf die Seite der insertierten TMD2 verschiebt. Demnach befindet sich die TMD2 vermutlich in den DErPC LUVs vermehrt in ihrem geflippten Zustand, was das verringerte Leakage, im Vergleich zu dem in DEiPC und DOPC, ebenfalls erklären würde.

#### 4.2.2 Einfluss des Glycin-Zipper Motivs der TMD2 auf die Lochbildung

Die Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen der TMD2 in DMPC Membranen zeigten, dass ein polarer Streifen, bestehend aus dem erweiterten rechtsgängigen Glycin-Zipper Motiv  $\text{G}_{40}\text{XXXS}_{44}\text{XXXG}_{48}$  und drei polaren Aminosäuren ( $\text{T}_{51}$ ,  $\text{T}_{54}$ ,  $\text{N}_{55}$ ), seitlich entlang der geneigten Helix positioniert ist<sup>130</sup>. Aufgrund dieser Orientierung der Helix ist das Glycin-Zipper Motiv auf der TMD2 frei für laterale Helix-Helix Interaktionen. Um zu untersuchen, ob die Dimerisierung und anschließende Oligomerisierung der TMD2 tatsächlich durch ein Glycin-Zipper Motiv vermittelt wird und welche Aminosäuren dabei essentiell sind, wurden verschiedene TMD2 Mutanten generiert. Durch entsprechende Mutationen der Glycine beziehungsweise des Serins zu Alanin wurde dieses mögliche Interaktionsmotiv ganz oder teilweise zerstört. Die Ermittlung der Sekundärstruktur der verschiedenen Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 zeigte, dass die eingefügten Mutationen die  $\alpha$ -helikale Faltung der TMD2 nicht beeinflussen (siehe Abb. 42A). Die Untersuchung der Membranorientierung der Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 zeigte, dass einige Mutationen die TMD2 stärker in der Membran verankern (siehe Abb. 42B). Das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum des TMD2 Wildtyps zeigte, dass zwar ein Großteil der TMD2 in POPC Membranen eine aufrechte transmembrane Orientierung einnimmt, aber auch ein geringer Anteil auf der Oberfläche der Membran lokalisiert ist (siehe Abb. 33). Im Gegensatz dazu sind fast alle untersuchten Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 fest in der Membran insertiert, da die entsprechenden SROCD-Spektren keine Bande bei 208 nm aufzeigten (siehe Abb. 42B). Demnach scheint diese, wenn auch nur leicht veränderte Hydrophobizität der Mutanten die Helix besser in der Membran zu verankern und ein Flippen auf die Oberfläche zu unterdrücken. In der Hydrophobizitätsskala nach D. EISENBERG *et al.* wird Glycin ein Wert von 0,48 zugeschrieben und der Wert der hydrophoberen Aminosäure Alanin beträgt 0,62<sup>174,175</sup>. Bei Betrachtung der Differenz zwischen den beiden Werten wird

deutlich, dass sich deren Hydrophobizität nicht stark voneinander unterscheidet. Die TMD2 Mutanten, bei denen nur ein Glycin zu Alanin mutiert wurde, verhalten sich daher auch analog wie der TMD2 Wildtyp und flippen aus der Membran. Unerwartet ist jedoch, dass die TMD2 Mutante G<sub>40</sub>A nicht aus der Membran flippt, was vermuten lässt, dass das Alanin an dieser Position stabilere hydrophobe Interaktionen eingehen kann und daher in der Membran gehalten wird. Bei der TMD2 Mutante S<sub>44</sub>A wurde ebenfalls nur eine Aminosäure mutiert, allerdings ist diese Aminosäure mit einem Wert von -0,18 nach der Hydrophobizitätsskala nach D. EISENBERG *et al.* deutlich hydrophiler<sup>174,175</sup>, weshalb durch die Mutation zu Alanin das Flippen der Mutante auf die Oberfläche der Membran verhindert wird. Sofern mehrere Glycine beziehungsweise zusätzlich das Serin substituiert wurden, wird die Hydrophobizität der TMD2 Mutanten stärker beeinflusst, weshalb diese fest in der Membran verankert werden. Durch das Einfügen der Mutationen wurde folglich das artifizielle Flippen des TMD2 Fragments aus der Membran unterdrückt.

Basierend auf den ANTS/DPX-Leakage-Messungen der verschiedenen Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 konnte erstmalig mittels einer biophysikalischen Methode bewiesen werden, dass ein Glycin-Zipper Motiv auf der TMD2 eine entscheidende Rolle während der Lochbildung in der Membran einnimmt. Sofern das Glycin-Zipper Motiv (G<sub>40</sub>XXXS<sub>44</sub>XXXG<sub>48</sub>) sowie das direkt benachbarte Glycin G<sub>43</sub> zerstört wurden (TMD2 G<sub>40</sub>AG<sub>43</sub>AS<sub>44</sub>AG<sub>48</sub>A), konnte nahezu kein Auslaufen der in den Vesikeln eingeschlossenen Fluorophore detektiert werden (siehe Abb. 43). Demnach wird die Wechselwirkung zwischen den TMD2 des Pinholins über ein Glycin-Zipper-Motiv, welches ein bekanntes Interaktionsmotiv von helikalen Segmenten darstellt<sup>110,111</sup>, vermittelt. Die Leakage-Messungen der TMD2 G<sub>40</sub>AS<sub>44</sub>AG<sub>48</sub>A (siehe Abb. 45), bei welcher nur das Glycin-Zipper Motiv deletiert wurde, zeigten, dass die Mutante das Entweichen der in den Vesikeln eingeschlossenen Fluorophore in demselben Ausmaß hemmt. Folglich ist das Glycin-Zipper Motiv der TMD2 das entscheidende Interaktionsmotiv zwischen den Helices bei der Ausbildung des Lochs.

Anhand der Einfachmutanten der TMD2 konnte abgeschätzt werden, welche der Aminosäuren eine entscheidende Rolle während der Ausbildung der Löcher einzunehmen scheint. Die beiden Glycine G<sub>40</sub> und G<sub>48</sub> sind beide Teil des Glycin-Zipper Motivs, jedoch unterdrückt die TMD2 G<sub>40</sub>A Mutante die Lochbildung in einem stärkeren Ausmaß als die TMD2 G<sub>48</sub>A (siehe Abb. 44). Überraschenderweise zeigte die TMD2 G<sub>43</sub>A, welche dem Glycin-Zipper Motiv nur benachbart ist, einen relativ starken Effekt und hemmt die Ausbildung der Löcher sogar stärker als die TMD2 G<sub>48</sub>A (siehe Abb. 44). Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, dass das G<sub>43</sub> auch am

Aufbau des aktiven Dimers beteiligt sein könnte. Im aktiven Pinholin-Dimer, welches sich nach dem Flippen der TMD1 aus der Membran gebildet hat, würde das V<sub>41</sub> der zweiten TMD2 perfekt in die durch das G<sub>43</sub> gebildete Tasche passen und das Dimer stabilisieren. Die beiden Aminosäuren G<sub>43</sub> und G<sub>48</sub> sind vermutlich am Aufbau des Lochs beteiligt und könnten dieses durch Interaktionen zwischen V<sub>41</sub>-G<sub>43</sub> sowie G<sub>48</sub>-L<sub>50</sub> stabilisieren. Interessanterweise erhielten T. PANG *et al.* tatsächlich Lyse-defekte Pinholine, sofern die Aminosäuren G<sub>43</sub> und G<sub>48</sub> mutiert wurden<sup>101</sup>.

Neben den drei verschiedenen Glycinen wurde auch das zentrale Serin des Glycin-Zipper Motivs zu Alanin mutiert. T. PANG *et al.* konnten bereits anhand ihrer Mutationsanalyse zeigen, dass durch die Mutation des Serins zu Cystein die Lyse in lebenden Zellen vollständig gehemmt wurde<sup>66</sup>. Die ANTS/DPX-Leakage-Messungen der TMD2 S<sub>44</sub>A Mutante konnten bestätigen, dass das zentrale Serin des Glycin-Zipper Motivs eine entscheidende Rolle während der Lochbildung einnimmt und demnach Interaktionen der Helices vermittelt. Verglichen zu den anderen Einfachmutanten hemmt die TMD2 S<sub>44</sub>A Mutante zudem die Lochbildung in einem deutlich stärkeren Ausmaß. Die Mutation einer einzigen Aminosäure beeinflusst den lochbildenden Charakter der TMD2 derart stark, dass selbst bei hohen Peptidkonzentrationen ein Leakage von 60 % induziert wird (P/L = 1:50). Bei niedrigen Peptidkonzentrationen induziert die Mutante nur sehr geringes Leakage (siehe Abb. 44)<sup>130</sup>. Basierend auf den durchgeführten NMR-Studien der TMD2 zeigt die Seitenkette des S<sub>44</sub> direkt in das Innere des Lochs, weshalb das zentrale Serin vermutlich eher am Aufbau der aktiven Pinholin-Dimere beteiligt ist und nicht an der eigentlichen Ausbildung des Lochs. Da sich bei hohen Peptidkonzentrationen die Helices generell schon sehr nahekommen, wäre die vorherige Bildung eines aktiven Dimers hier nicht so kritisch. Sofern allerdings die Konzentration an Pinholinen relativ gering ist, ist vermutlich die spezifische Bildung der aktiven Dimere von größerer Bedeutung. Die Tendenz der Mutante bei hohen Peptidkonzentrationen trotzdem Löcher auszubilden, könnte demnach auch auf das Verdichten der Helices in der Membran zurückzuführen sein<sup>130</sup>. Diese Hypothese würde zudem auch die Bedeutung der Konzentration an Pinholinen in der inneren Bakterienmembran bekräftigen<sup>67</sup>.

Die TMD2 G<sub>40</sub>AG<sub>48</sub>A Mutante, bei welcher die beiden äußeren Aminosäuren des Glycin-Zipper Motivs gegen Alanin substituiert wurden, hemmt die Lochbildung relativ stark. Im Gegensatz dazu nimmt die TMD2 G<sub>40</sub>AG<sub>43</sub>A, bei welcher ebenfalls zwei Aminosäuren mutiert wurden, keinen so großen Einfluss (siehe Abb. 45). Anhand dieses Vergleichs wird deutlich, dass das Glycin-Zipper Motiv das entscheidende Interaktionsmotiv bei der



Ausbildung der Löcher ist. Des Weiteren kann ein Vergleich der TMD2 G<sub>40</sub>AS<sub>44</sub>AG<sub>48</sub>A Mutante mit der TMD2 G<sub>40</sub>AG<sub>43</sub>AG<sub>48</sub>A, bei welcher lediglich die drei Glycine deletiert wurden, die große Bedeutung des S<sub>44</sub> während der Lochbildung ebenfalls bestätigen (siehe Abb. 45). Obwohl in beiden Fällen drei Aminosäuren mutiert wurden, wird die Lochbildung der TMD2 G<sub>40</sub>AG<sub>43</sub>AG<sub>48</sub>A nicht so stark beeinflusst wie bei der TMD2 G<sub>40</sub>AS<sub>44</sub>AG<sub>48</sub>A.

Die ANTS/DPX-Leakage Messungen konnten demnach zeigen, dass das Glycin-Zipper Motiv eine entscheidende Rolle während der Lochbildung einnimmt, wobei gerade dem zentralen Serin des Glycin-Zipper Motivs eine große Bedeutung zugeschrieben werden kann.

#### 4.2.3 Untersuchung der Größe des durch die TMD2 gebildeten Lochs

Elektronenmikroskopische Aufnahmen in Lipid-freier Umgebung und molekulardynamische Simulationen von T. PANG *et al.* postulieren, dass das durch Pinholine gebildete Loch einen Durchmesser von etwa 1,5 nm besitzt<sup>66</sup>. Zur Untersuchung der tatsächlichen Größe des in der Membran ausgebildeten Lochs wurde ein modifiziertes Leakage-Experiment durchgeführt. Hierfür wurden unterschiedlich große Fluorophore in Vesikeln eingeschlossen und deren Fluoreszenz wurde durch einen von außen zugegebenen Antikörper gequencht, sofern diese durch die gebildeten Löcher entweichen konnten. Das Carboxyfluorescein mit einem Durchmesser von etwa 1 nm konnte ungehindert aus den durch die TMD2 gebildeten Löchern in den POPC LUVs entweichen. Der etwas größere Fluorophor FD4, ein an Fluorescein-isothiocyanat gekoppeltes Dextran mit einem Molekulargewicht von etwa 4 kDa, entwich etwas langsamer, aber dennoch wurde die Fluoreszenz von 70 % der FD4 Moleküle gequencht. Hingegen war es den größeren Fluorophoren (FD20, FD40, FD70) nicht möglich, effektiv aus den Vesikeln zu entweichen (siehe Abb. 48)<sup>130</sup>. Basierend auf dem geschätzten hydrodynamischen Radius des verwendeten FITC-Dextrans FD4 mit 1,4 nm<sup>153</sup>, sollte der Durchmesser des von der TMD2 gebildeten Lochs nicht größer als 2,8 nm sein. Somit konnte erstmalig experimentell bestätigt werden, dass Pinholine tatsächlich nur winzige Löcher, sogenannte *pinholes*, mit einer definierten Größe ausbilden<sup>66,100</sup>. Die Diffusion kleiner Moleküle und Ionen über die Membran wird demnach ermöglicht, wohingegen es für Proteine mit einer typischen Größe zwischen 3 nm und 6 nm zu klein ist<sup>176</sup>. Im biologischen System bricht aufgrund der durch die *pinholes* ermöglichten Diffusion der Ionen über die innere Bakterienmembran die PMF zusammen und letztendlich wird die Lyse des Bakterienwirts eingeleitet<sup>65,66</sup>. Die Tatsache, dass die aus den Fluorescein-Leakage-Messungen bestimmte Lochgröße einen etwas größeren Wert annimmt als der von T. PANG *et al.* postulierte<sup>66</sup>, kann

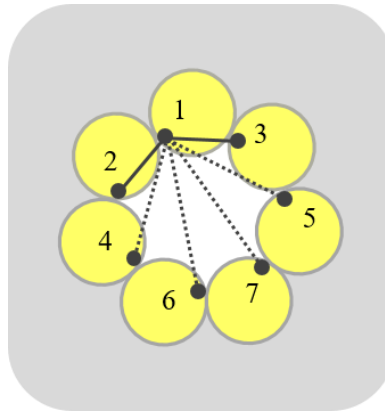
darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei den verwendeten FITC-Dextranen nicht um kugelförmige Moleküle, sondern um Ellipsoide handelt<sup>154</sup>. Solche Rotationsellipsoide weisen zwei verschiedene Radien auf, einen entlang der Längsachse und einen zweiten entlang der Querachse. Der Radius der langen Achse liegt für FD4 bei 2,4 nm und der der kurzen Achse bei 1,1 nm<sup>145</sup>. Je größer das Dextran, desto extremer werden die Unterschiede zwischen den Radien der Längs- und Querachse. Die ermittelten Radien des FITC-Dextrans FD20 weichen mit 13,7 nm und 1,6 nm bereits deutlich voneinander ab. Somit definieren die vom Hersteller angegeben hydrodynamischen Radien nicht exakt die Radien der verwendeten Dextrane. Das gebildete Loch könnte demnach gerade groß genug sein, dass das FD4 entlang seiner Längsachse mit einem effektiven Durchmesser von etwa 2 nm hindurchtreten kann. Des Weiteren ist zu vermerken, dass die Produktspezifikation des gekauften FD4 zeigt, dass es sich hier um ein Gemisch aus den FITC-Dextranen FD3, FD4 und FD5 handelt, sodass hier höchstwahrscheinlich hauptsächlich das kleinere FD3 in einer signifikanten Menge aus den Vesikeln entweichen konnte<sup>130</sup>.

Das gröbenselektive Fluorescein-Leakage-Experiment wurde ebenfalls in den extrem dicken Membranen aus DErPC durchgeführt. Die Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Messung der TMD2 in diesem Lipid zeigte, dass die TMD2 vollständig auf der Oberfläche lokalisiert ist (siehe Abb. 28). Wie bereits erwähnt, ist das beobachtete Flippen der TMD2 in Lipiden mit ungesättigten Lipidacylketten allerdings ein Artefakt aufgrund der Verwendung eines TMD2 Fragments, welches einen amphiphilen Charakter aufweist. Dieser Effekt wird zudem durch das Austrocknen der NMR-Probe noch verstärkt. Da sich die Lipide allerdings während den Fluoreszenzmessungen in einem vollständig hydratisierten Zustand befinden, sollte ein Großteil der TMD2 trotzdem noch insertiert sein. Um dennoch auszuschließen, dass das beobachtete Auslaufen der DErPC Vesikel bei hohen Peptidkonzentrationen durch Leckschlagung durch oberflächengebundene Peptidanteile hervorgerufen wurde<sup>155,156</sup> (siehe Abb. 40), wurde das gröbenselektive Fluorescein-Leakage-Experiment ebenfalls in DErPC durchgeführt. Die Messungen zeigten, dass die TMD2 auch in diesem Lipidsystem Löcher mit einer definierten Größe ausbildet (siehe Abb. 49). Die Tendenz des Ausströmens der unterschiedlich großen Fluorophore entspricht der in POPC LUVs, demnach weisen die in DErPC und POPC gebildeten Löcher dieselbe Größe auf. Eine durch die oberflächengebundene TMD2 ausgelöste unspezifische Lochbildung in Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten kann demnach ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis stützt somit die Aussage, dass die TMD2, sofern die Lipide in einer vollständig hydratisierten Umgebung vorliegen, wie bei den

fluoreszenzbasierten Leakage-Experimenten, eine überwiegend transmembrane Orientierung einnimmt und das beobachtete Flippen auf das Austrocknen der OCD- und Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Proben zurückzuführen ist.

#### **4.2.4 Untersuchung des Oligomerisierungsgrads der TMD2**

Mittels FRET-Spektroskopie sollte der Oligomerisierungsgrad der TMD2 in dem gebildeten Loch ermittelt werden. T. PANG *et al.* postulieren, basierend auf ihren molekulardynamischen Simulationen und Crosslink-Experimenten, ein heptamer Loch<sup>66</sup>. Die durchgeführten Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Messungen der TMD2 sowie die gröbenselektiven Fluorescein-Leakage-Messungen wären ebenfalls mit einem heptameren Loch kompatibel. Für die FRET-Messungen wurde ein Peptid- zu Lipidverhältnis gewählt, bei dem einerseits ausreichend Peptide für eine effektive Lochbildung in der Membran vorhanden sind und andererseits die Peptidkonzentration nicht zu hoch ist, damit sich die Peptide nicht generell schon sehr nahekommen. Bei dem verwendeten molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 150 konnte bereits gezeigt werden, dass die TMD2 in POPC LUVs über 90 % Leakage induziert (siehe Abb. 36), daher konnte angenommen werden, dass sich die TMD2 überwiegend zu einem Oligomer zusammengelagert hat und die Bestimmung des Oligomerisierungsgrads des gebildeten Lochs unter diesen Bedingungen möglich sein sollte. In POPC LUVs ergab sich aus den FRET-Messungen für die TMD2 der Oligomerisierungsgrad eines Trimers (siehe Abb. 50A). Bei genauerer Betrachtung eines heptameren Lochs in der Membran fällt auf, dass die Helices bei einer heptameren Anordnung untereinander relativ weit voneinander entfernt sind und sich daher nicht alle in unmittelbarer Nähe befinden. Voraussetzung für einen Energieübertrag ist jedoch die räumliche Nähe des Donormoleküls zu seinem Akzeptormolekül. Zudem würde bei einer heptameren Anordnung der TMD2, welche auf den durchgeführten <sup>15</sup>N-NMR-Studien der TMD2 basiert, das Tryptophan (W<sub>36</sub>) der TMD2 zur nächsten Helix gerichtet sein und demnach nicht direkt ins Innere des Lochs weisen. Somit sind die Abstände zwischen den Helices in dem ausgebildeten Loch für einen effektiven Energietransfer zu groß und daher ist lediglich der Energietransfer zu den nächsten Nachbarn möglich. Demnach kann mittels FRET-Spektroskopie auch bei Vorliegen eines oligomeren Lochs lediglich ein Trimer detektiert werden (Abb. 58).



**Abbildung 58: Interpretation der FRET-Ergebnisse der TMD2**

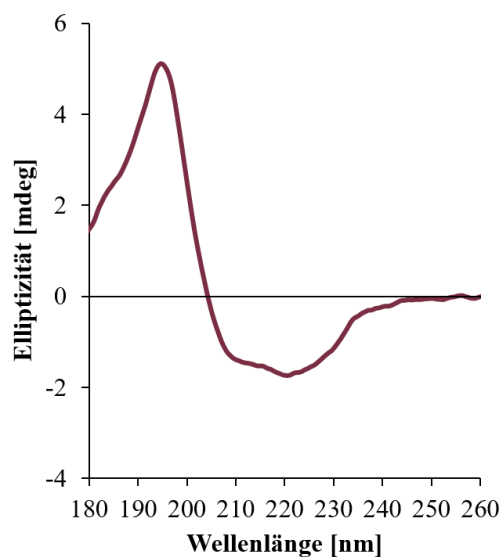
Gezeigt ist die Aufsicht eines aus der TMD2 (gelb) gebildeten heptameren Lochs in der Membran (grau), welches von T. PANG *et al.*<sup>66</sup> postuliert wird. Bei solch einer heptameren Anordnung würde laut den durchgeführten NMR-Studien der TMD2 das Tryptophan W<sub>36</sub> (kleiner schwarzer Punkt) nicht in das Innere des gebildeten Lochs weisen, sondern zur nächsten Helix gerichtet sein. Bei dieser Anordnung sind jedoch die Abstände zwischen den Helices für einen effektiven Energietransfer untereinander zu groß. Aus diesem Grund kann bei den FRET-Messungen nur ein Trimer detektiert werden (durchgezogene Linien) und die anderen vorhandenen Helices können nicht detektiert werden (gestrichelte Linien).

Interessant sind die FRET-Ergebnisse der TMD2 in POPC/POPG (7:3) LUVs, welche auf ein Dimer hindeuten (siehe Abb. 50B). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den ANTS/DPX-Leakage-Messungen, welche zeigten, dass die TMD2 in POPC/POPG (7:3) LUVs weniger als 5 % Leakage induziert ( $P/L = 1:150$ ) (siehe Abb. 39), kann darauf geschlossen werden, dass die TMD2 in diesem Lipidsystem keine Löcher in der Membran ausgebildet hat, sondern als aktives Dimer vorliegt. Demnach konnte mittels FRET-Spektroskopie zwischen dem aktiven Dimer und dem gebildeten Loch unterschieden werden. Allerdings war es nicht möglich den exakten Oligomerisierungsgrad der TMD2 im Loch zu bestimmen, da die Abstände der Helices für einen effektiven Energieübertrag untereinander zu groß sind und daher lediglich ein Trimer detektiert wurde.

### 4.3 Strukturelle Charakterisierung der TMD1 des Pinholins S<sup>2168</sup>

Neben der vollständigen Charakterisierung der TMD2 wurde auch die TMD1 des Pinholins strukturell und funktionell untersucht. Das verwendete Fragment der TMD1 erwies sich im Gegensatz zu dem TMD2 Fragment als wasserlöslich, was für TMDs eher ungewöhnlich ist. Die SRCD-Spektroskopie zeigte, dass die TMD1 in Wasser allerdings nicht unstrukturiert vorliegt, sondern sich zu antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern zusammenlagert (siehe Abb. 52A). Auch bei einer Zugabe der TMD1 zu Vesikeln aus POPC beziehungsweise POPC/POPG (7:3) nimmt sie nicht die erwartete  $\alpha$ -helikale Struktur ein, sondern lagert sich zu antiparallelen, vermutlich teilweise aggregierten  $\beta$ -Faltblättern zusammen, wobei sie in POPC/POPG (7:3) Vesikeln anteilig auch als  $\beta$ -Schleifen vorliegt (siehe Abb. 52A). Unter Berücksichtigung, dass

die TMD1 des Pinholins dazu befähigt sein soll aus der Membran zu flippen<sup>63,67</sup>, ist es wahrscheinlich, dass sich die TMD1 in den untersuchten Membran-imitierenden Modellsystemen gar nicht erst in die Membran einlagert, sondern direkt eine oberflächengebundene Orientierung einnimmt. Sofern die TMD1 allerdings in Detergenz-Mizellen aus SDS vorliegt, nimmt sie eine  $\alpha$ -helikale Struktur ein (siehe Abb. 52B). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die TMD1 nur  $\alpha$ -helikal gefaltet vorliegt, sofern sie sich in einer hydrophoben Umgebung befindet. Durch das Flippen der Helix auf die Oberfläche könnte es zu einer Umfaltung des Peptids zu antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern kommen. Zudem zeigt auch das SRCD-Spektrum des Pinholin Gesamtkonstrukts kein reines  $\alpha$ -helikales Spektrum, sondern deutet auf einen gewissen Anteil an antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt Strukturen hin, da die negative Bande bei 209 nm nur schwach ausgeprägt ist und zudem die zweite negative Bande zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben ist (Abb. 59). Dies ist vermutlich auf eine Umfaltung der geflippten TMD1-Anteile zurückzuführen.



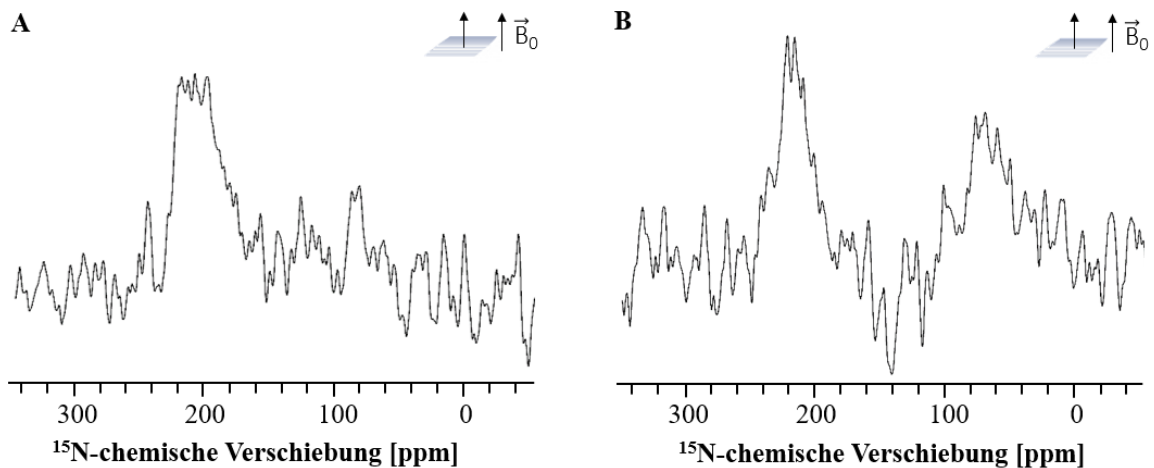
**Abbildung 59: SRCD-Spektrum des Pinholins S<sup>2168</sup> in POPC Vesikeln**

Das synthetisch hergestellte Pinholin wurde in POPC Vesikeln rekonstituiert (P/L = 1:50) und die Messung wurde bei 22 °C durchgeführt. Das erhaltene SRCD-Spektrum weist eine positive Bande bei 195 nm und zwei negative Banden bei 209 nm und 220 nm auf. Da die negative Bande bei 209 nm allerdings schwächer ausgeprägt ist und die zweite negative Bande zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben ist, scheint das Pinholin in einem gewissen Anteil auch als antiparallele  $\beta$ -Faltblätter vorzuliegen.

Die strukturelle Charakterisierung der TMD1 und die Ergebnisse aus der Analyse des Pinholins deuten somit stark darauf hin, dass die TMD1 lediglich in ihrer transmembranen Orientierung  $\alpha$ -helikal gefaltet vorliegt. Sobald die TMD1 aus der Membran flippt und daraufhin eine oberflächengebundene Orientierung einnimmt, erfolgt vermutlich eine Umfaltung zu

antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt Strukturen. Diese Umfaltung würde eine erneute Insertion der TMD1 in die Membran verhindern und so das von der TMD2 gebildete Loch stabilisieren.

Mittels EPR-Messungen untersuchten T. AHAMMAD *et al.* die Membranorientierung der TMD1 im Pinholin S<sup>21</sup>68 sowie in einer lytisch inaktiven *irs*-Mutante<sup>102,103</sup>. Die *irs*-Mutante des Pinholins sollte durch seine zusätzlichen positiven Ladungen am N-Terminus (siehe Abb. 14) den inhibitorischen Charakter eines Antipinholins verstärken. T. PANG *et al.* konnten bereits anhand ihrer Mutationsanalysen zeigen, dass solch eine *irs*-Mutante lytisch inaktiv ist<sup>63,67,101</sup>. Die EPR-Studien von T. AHAMMAD *et al.* konnten nun zeigen, dass beide TMDs der inaktiven *irs*-Mutante in der Membran insertiert sind<sup>103</sup>. Im Gegensatz dazu nimmt im aktiven Pinholin nur die TMD2 eine transmembrane Orientierung ein, während die TMD1 in einem geflippten Zustand auf der Membranoberfläche vorliegt<sup>102</sup>. Kürzlich konnten zudem erste Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Messungen eines synthetisch hergestellten Antipinholins S<sup>21</sup>71 und eines Pinholins S<sup>21</sup>68 in POPC Membranen durchgeführt werden, wobei jeweils deren TMD1 (<sup>15</sup>N-A<sub>12</sub>) und TMD2 (<sup>15</sup>N-L<sub>45</sub>) selektiv <sup>15</sup>N-markiert wurden. In dem <sup>15</sup>N-NMR-Spektrum des Antipinholins sind lediglich Signale im Bereich einer insertierten Helix erkennbar, demnach nehmen beide TMDs des lytisch inaktiven Antipinholins eine transmembrane Orientierung ein (Abb. 60A). Das <sup>15</sup>N-NMR-Spektrum des Pinholins weist ebenfalls Signale im Bereich einer insertierten Helix auf, welche der TMD2 des Pinholins zugeordnet werden können (Abb. 60B). Zudem sind nun auch Signale erkennbar, welche auf der Oberfläche lokalisierten Peptidanteilen zugeordnet werden können. Folglich ist die TMD1 des Pinholins in POPC Membranen nicht mehr in der Membran insertiert, sondern liegt in ihrem geflippten Zustand auf der Oberfläche der Membran vor. Erstmals konnte mittels Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Spektroskopie die Membranorientierung des Antipinholins und des Pinholins bestimmt werden, welche mit der ermittelten Orientierung aus den EPR-Messungen von T. AHAMMAD *et al.* übereinstimmen<sup>102,103</sup>. Diese Ergebnisse liefern somit den ersten experimentellen Beweis für das postulierte Modell von T. PANG *et al.*, bei der die TMD1 zur Aktivierung auf die Membran flippt. Die ermittelte Membranorientierung steht zudem im Einklang mit den Ergebnissen der ANTS/DPX-Leakage Messungen, welche zeigten, dass das Pinholin Löcher in der Membran ausbildet (siehe Abb. 57). Da die TMD1 auf die Oberfläche geflippt ist, liegen die Pinholine in ihrem lytisch aktiven Zustand vor und die Lochbildung wird nicht durch die TMD1 reguliert.



**Abbildung 60: Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen des selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierten Antipinholins und Pinholins in POPC**  
 Das synthetisch hergestellte  $^{15}\text{N}$ -A<sub>12</sub>, L<sub>45</sub> markierte Antipinholin (A) sowie das  $^{15}\text{N}$ -A<sub>12</sub>, L<sub>45</sub> markierte Pinholin (B) wurden in makroskopisch orientierten POPC-Doppelschichten rekonstituiert (P/L = 1:50). Die Messungen wurden bei 35 °C von B. Sc. Yannick Busch im Zuge seiner Bachelorarbeit durchgeführt.

#### 4.4 Funktionelle Charakterisierung der TMD1 des Pinholins S<sup>2168</sup>

T. PANG *et al.* postulieren, dass die TMD1 eine rein regulatorische Rolle während der Lochbildung einnimmt, indem die Lyse des Bakterienwirts durch das Flippen der TMD1 aus der Membran initiiert wird<sup>63,67</sup>. Demnach sollte die TMD1 allein nicht dazu befähigt sein, Löcher in der Membran auszubilden. Um diese These zu bestätigen, wurden fluoreszenzbasierte Vesikel-Leakage-Messungen durchgeführt. Die ANTS/DPX-Leakage-Messungen konnten zeigen, dass kein Auslaufen der in den POPC Vesikeln eingeschlossenen Fluorophore erfolgte und somit die TMD1 keine Löcher in der Membran ausbildet. Die Untersuchung der Bindungsaffinität der TMD1 zeigte allerdings, dass die TMD1 nur relativ schwach an die POPC Vesikel bindet. Aufgrund der geringen Bindungsaffinität wurde die TMD1 auch in POPC/POPG (7:3) LUVs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die positiv geladene TMD1 stärker an die negativen POPC/POPG (7:3) Vesikel bindet. Überraschenderweise induziert die TMD1 in den POPC/POPG (7:3) LUVs bei sehr hohen Peptidkonzentrationen (P/L = 1:25) allerdings nahezu 100 % Leakage, wohingegen sie bei sehr niedrigen Konzentrationen (P/L = 1:400) kein Leakage induziert. Basierend auf den SRCD-Daten, die auf  $\beta$ -Faltblatt/ $\beta$ -Schleifen Strukturen hindeuten, und der hohen Bindungsaffinität an die Vesikel liegt die Vermutung nahe, dass die hohe Tendenz des Ausströmens der in den Vesikeln eingeschlossenen Fluorophore auf eine unspezifische Zerstörung der Vesikel, hervorgerufen durch die Anhäufung der TMD1 auf der Oberfläche, zurückzuführen ist. A. LADOKHIN *et al.*

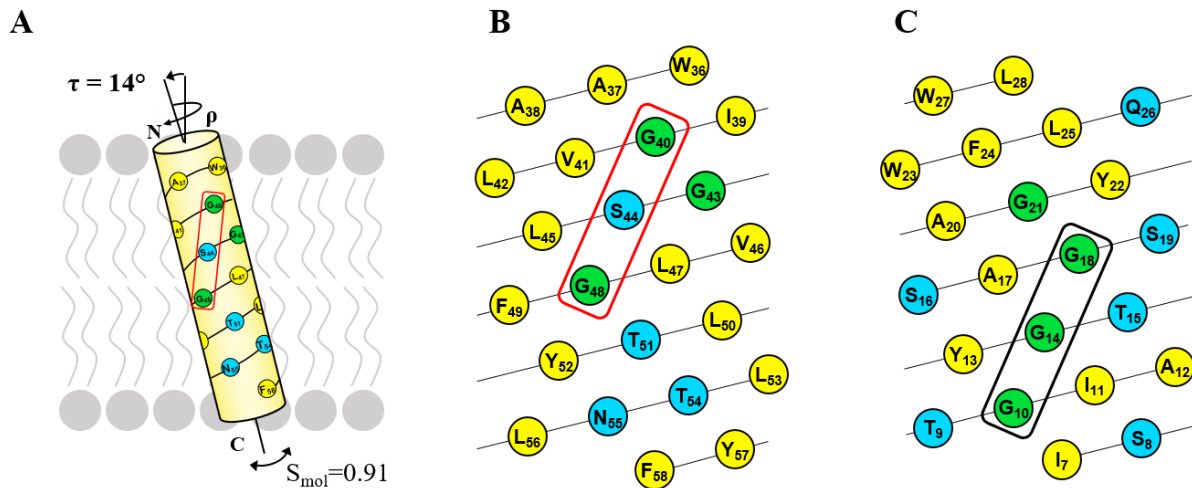
konnten basierend auf einem solchen Experiment zeigen, dass in POPC Vesikel rekonstituiertes Melittin Poren mit einer definierten Größe ausbildet, wohingegen in negativen POPG Vesikeln ein nicht selektives, detergentartiges Leakage erfolgt<sup>155</sup>. Auch M. N. MELO *et al.* beobachteten, dass sich das Bindungsverhalten des antimikrobiellen Peptids Omiganan ändert, sofern die Vesikel negative PG-Lipide enthalten. Die Untersuchung der Bindungsaffinität des Omiganan in POPG Vesikeln zeigte bei niedrigen Lipidkonzentrationen eine unerklärliche, massive Zunahme der Bindungsaffinität<sup>171</sup>. Solch ein Verhalten wurde auch bei der TMD1 in POPC/POPG LUVs beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass die negative Lipidkopfgruppe von POPG das Verhalten von Peptiden relativ stark beeinflusst.

#### 4.5 Struktur- und Funktionsmodell des Pinholins S<sup>2168</sup> des Phagen $\phi$ 21

Das bisher von T. PANG *et al.* postulierte Modell für den Mechanismus der Lochbildung des Pinholins S<sup>2168</sup> beruht auf unterschiedlichen Mutationsanalysen<sup>63,66,67,101</sup>. Sie postulieren, dass zunächst beide TMDs des Pinholins in der inneren Membran des Bakterienwirts inseriert vorliegen und sich lytisch inaktive Pinholin-Homodimere ausbilden<sup>63,66</sup>. Erst durch das spontane Flippen der TMD1 aus der Membran in Richtung Periplasma werden die beiden TMD2 in räumliche Nähe gebracht und die nun aktiven Dimere können homotypisch über ihr Glycin-Zipper Motiv (G<sub>40</sub>XXXS<sub>44</sub>XXXG<sub>48</sub>) miteinander interagieren<sup>63,66,67,101</sup>. Nach Erreichen einer kritischen Konzentration solcher aktiven Dimere in der Membran oligomerisieren diese und lagern sich letztendlich zu einem heptameren Loch um<sup>66,67,101</sup>.

Basierend auf der strukturellen und funktionellen Charakterisierung der TMD2 und der TMD1 postulieren wir ein neues Struktur- und Funktionsmodell für das Pinholin S<sup>2168</sup> des Phagen  $\phi$ 21<sup>130</sup>. Die Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Studien der TMD2 ermöglichten die Bestimmung der Membranausrichtung der TMD2 und zeigten, dass ein Glycin-Zipper Motiv (G<sub>40</sub>XXXS<sub>44</sub>XXXG<sub>48</sub>) sowie weitere polare Reste (T<sub>51</sub>, T<sub>54</sub>, N<sub>55</sub>) seitlich entlang der um 14° geneigten Helix positioniert sind (Abb. 61A/B). Dieser hydrophile Streifen ist somit frei zugänglich für Helix-Helix Interaktionen<sup>130</sup>. Trotz der fehlenden TMD1 des Pinholins in dem untersuchten TMD2 Fragment kann über dessen Struktur im inaktiven Dimer spekuliert werden. Die Mutationsanalysen von T. PANG *et al.* deuten darauf hin, dass A<sub>37</sub>, A<sub>38</sub>, V<sub>41</sub>, S<sub>44</sub>, L<sub>47</sub> sowie G<sub>48</sub> der TMD2 mit der TMD1 interagieren<sup>67,101</sup>. Diese Aminosäuren sind, bis auf A<sub>38</sub>, um das Glycin-Zipper Motiv herum positioniert beziehungsweise Teil des Motivs. Neben der TMD2 verfügt auch die TMD1 über ein Glycin-Zipper Motiv (G<sub>10</sub>XXXG<sub>14</sub>XXXG<sub>18</sub>) sowie über einen auf der gegenüberliegenden Seite der Helix befindlichen polaren Streifen (Abb. 61C).





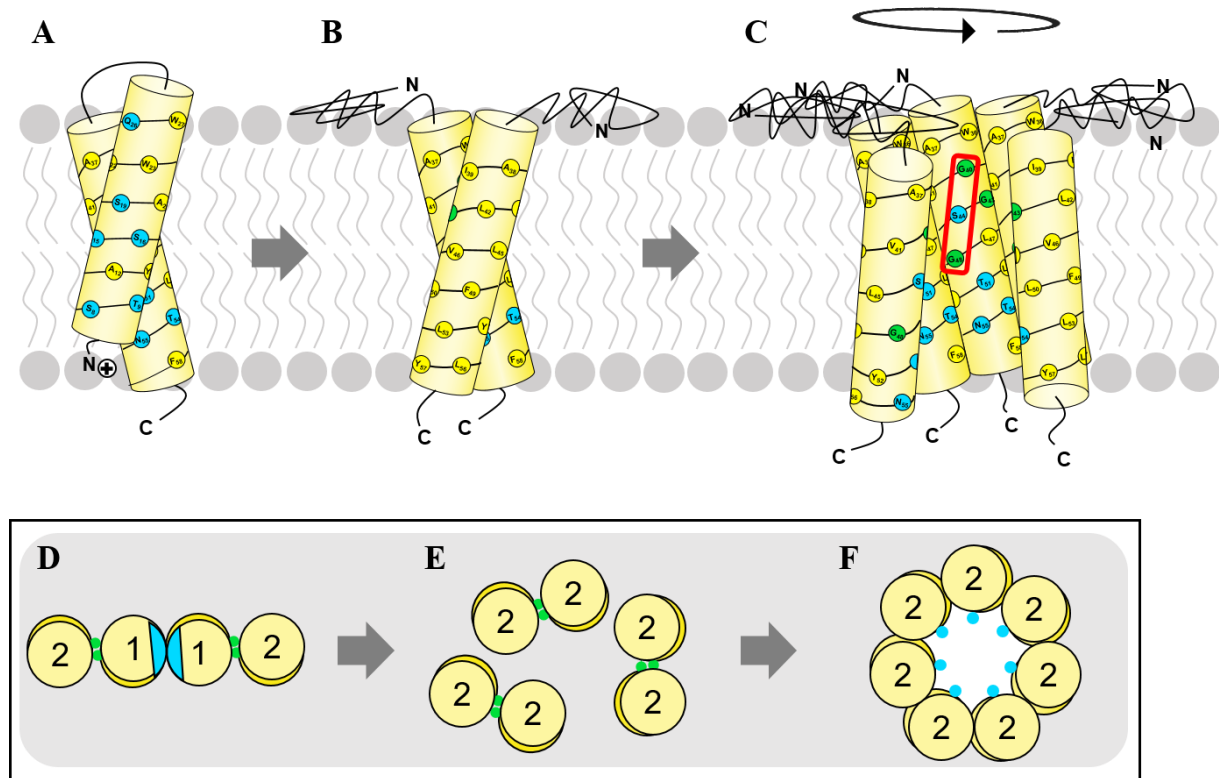
**Abbildung 61: Membranausrichtung der TMD2 sowie helical mesh der TMD2 und TMD1 des Pinholins S<sup>2168</sup>**

Hydrophobe Aminosäuren sind in gelb, hydrophile in blau dargestellt und Glycine sind grün markiert. (A) Basierend auf den durchgeführten NMR-Studien der TMD2 konnte gezeigt werden, dass die TMD2 um  $14^\circ$  geneigt und relativ steif in der Membran eingelagert vorliegt. Die Rotationsanalyse der TMD2 ergab, dass ein Glycin-Zipper Motiv (rot umrandet) sowie mehrere polare Reste seitlich entlang der geneigten Helix positioniert sind und diese somit frei für Helix-Helix Interaktionen sind<sup>130</sup>. (B) Das helical mesh der TMD2 ist gezeigt, wobei das Glycin-Zipper Motiv rot umrandet ist. (C) Das helical mesh der TMD1 zeigt, dass diese ebenfalls ein Glycin-Zipper Motiv ( $G_{10}xxxG_{14}xxxG_{18}$ ) aufweist (schwarz umrandet) und zudem auf der gegenüberliegenden Seite der Helix (links und rechts auf der helical mesh Projektion) mehrere polare Reste vorliegen. Erstellt wurden die beiden helical mesh mittels der Protein-ORIGAMI-Webanwendung<sup>115</sup> (Abbildung verändert entnommen aus L. M. E. STEGER *et al.*<sup>130</sup>).

T. PANG *et al.* postulieren, basierend auf ihren Mutationsanalysen, dass der Großteil des Glycin-Zipper Motivs ( $G_{10}$ ,  $G_{14}$ ,  $G_{17}$ ,  $G_{21}$ ,  $L_{28}$ ) auf der TMD1 zu den Lipiden gerichtet ist. Diese Annahme beruht darauf, dass eine Erhöhung der Hydrophobizität dieser Aminosäuren durch entsprechende Mutationen zu Leucin das Flippen der TMD1 verzögerte. Hingegen wurde durch die Mutation zu Glutamin die Polarität erhöht und das Flippen der TMD1 beschleunigt<sup>101</sup>. Diese Anordnung der TMD1 im inaktiven Dimer erweist sich jedoch als energetisch ungünstig, da nach Flippen der TMD1 aus der Membran die hydrophilen Aminosäuren den Lipiden ausgesetzt wären. Vielmehr können diese Mutationsdaten auch einfach darauf zurückzuführen sein, dass es energetisch ungünstiger ist im geflippten Zustand der TMD1 die hydrophoberen mutierten Aminosäuren der hydrophilen Umgebung auszusetzen. Daher postulieren wir, dass das rechtsgängige Glycin-Zipper Motiv auf der TMD1 mit dem frei zugänglichen Glycin-Zipper Motiv auf der TMD2 interagiert (Abb. 62A)<sup>130</sup>. Aufgrund dieser Orientierung der TMD1 ist dessen polarer Streifen frei für intermolekulare Interaktion mit einem weiteren inaktiven Pinholin. In der Mitte dieser polaren Oberfläche der TMD1 liegt das  $A_{12}$  und durch Mutationsstudien von T. PANG *et al.* konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Antipinholin Charakter der *irs*-Mutante durch Mutation dieses Alanins zu Leucin (*irs*S<sup>2168</sup> $A_{12}L$ ) beeinträchtigt wurde, sofern diese Mutante zusammen mit dem Pinholin Wildtyp vorlag und Heterodimere ausgebildet hat<sup>101</sup>. Demnach muss das  $A_{12}$  an intermolekularen

Wechselwirkungen im inaktiven Dimer beteiligt sein, was auch in unserem postulierten Modell der Fall wäre. Im Gegensatz zu dem bisher postulierten Helix-Bündel von T. PANG *et al.*<sup>66,101</sup> sind die Helices der beiden inaktiven Pinholine nun allerdings in einer Linie angeordnet (Abb. 62D)<sup>130</sup>.

Ausgehend von dem neuen inaktiven Pinholin Modell ist es der TMD1 nicht möglich die Lipiddoppelschicht komplett zu durchspannen, wodurch dessen geladener N-Terminus ins Innere der Membran gezogen wird. Diese energetisch ungünstige Anordnung würde somit die transmembrane Orientierung der TMD1 destabilisieren und auch die Rolle der verlängerten Antipinholin Sequenz gut erklären<sup>130</sup>. Bisher postulieren T. PARK *et al.*, dass der inhibitorische Charakter des Antipinholins auf seiner zusätzlichen Ladung am N-Terminus zurückzuführen ist<sup>63</sup>. Der N-Terminus des Pinholins besteht aus den Aminosäuren M<sub>4</sub>D<sub>5</sub>K<sub>6</sub> und im Antipinholin sind es die Aminosäuren M<sub>1</sub>K<sub>2</sub>S<sub>3</sub>M<sub>4</sub>D<sub>5</sub>K<sub>6</sub>. Allerdings ist fraglich, ob das Flippen der TMD1 derart stark durch eine einzige zusätzliche Ladung beeinflusst wird, zumal der N-Terminus des Pinholins bereits eine negative und positive Ladung trägt. Basierend auf dem hier präsentierten Strukturmodell für das inaktive Pinholin wäre der geladene N-Terminus der verlängerten TMD1 des Antipinholins nicht mehr in der Lipiddoppelschicht lokalisiert, wodurch die transmembrane Orientierung stabilisiert würde<sup>130</sup>. Das Antipinholin würde die Ausbildung aktiver Pinholin-Dimere verzögern, da seine transmembrane Orientierung der TMD1 nicht destabilisiert ist. Die verlängerte Sequenz um das polare Serin und das basische Lysin scheint von Natur aus eine gute Wahl zu sein, da diese in die Kopfgruppenregion der Membran hineinragen könnten und die Hydrophobizität nicht erhöht wird, weshalb immer noch ein verzögertes Flippen der TMD1 möglich ist<sup>130</sup>.



**Abbildung 62: Neues Struktur- und Funktionsmodell des Pinholins S<sup>2168</sup> des Phagen  $\phi$ 21**

Basierend auf der strukturellen und funktionellen Charakterisierung der TMD2 und der TMD1 stellen wir ein neues Struktur- und Funktionsmodell des Pinholins S<sup>2168</sup> des Phagen  $\phi$ 21 auf<sup>130</sup>. (A) Gezeigt ist die vorgeschlagene Struktur des inaktiven Pinholin-Dimers, bei welchem das Glycin-Zipper Motiv auf der TMD1 G<sub>10xxx</sub>G<sub>14xxx</sub>G<sub>18</sub> mit dem Glycin-Zipper G<sub>40xxx</sub>S<sub>44xxx</sub>G<sub>48</sub> auf der TMD2 interagiert<sup>130</sup>. (B) Das Modell des aktiven Dimers ist gezeigt, bei welchem die TMD1 aus der Membran geflippt ist und sich zu antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern auf der Membranoberfläche umgefaltet hat. Das Glycin-Zipper Motiv auf der TMD2 vermittelt die Ausbildung eines rechteckigen Dimers. Stabilisiert wird diese Anordnung der Helices durch Interaktionen zwischen V<sub>41</sub>-G<sub>43</sub> sowie Wechselwirkungen der polaren Aminosäuren T<sub>51</sub>-T<sub>51</sub>, N<sub>55</sub>-N<sub>55</sub> und T<sub>54</sub>-Y<sub>52</sub><sup>130</sup>. (C) Gezeigt ist das vorgeschlagene heptamere *pinhole* (nur fünf Pinholine sind gezeigt), in welchem sich die TMD2 zu einem rechteckigen Loch zusammenlagert und der polare Streifen der TMD2 ins Innere des Lochs zeigt (Glycin-Zipper Motiv ist rot umrandet). Stabilisiert wird das *pinhole* durch Interaktionen zwischen V<sub>41</sub>-G<sub>43</sub> und G<sub>48</sub>-L<sub>50</sub><sup>130</sup> sowie vermutlich durch die oberflächengebundene TMD1, welche als aggregierte  $\beta$ -Faltblätter vorliegt. (D) Aufsicht auf zwei zusammengelagerte inaktive Dimere. Über den polaren Streifen auf der TMD1 (blau) können zwei inaktive Dimere, welche jeweils über das Glycin-Zipper Motiv (grüne Punkte) auf der TMD1 und der TMD2 interagieren, miteinander wechselwirken. (E) Aufsicht auf das aktive TMD2/TMD2 Dimer und die Wechselwirkung über ihr Glycin-Zipper Motiv (grüne Punkte), wobei die geflippte TMD1 nicht gezeigt ist. (F) Aufsicht auf das durch rechteckig angeordnete TMD2 gebildete *pinhole*, bei welchem das polare Serin (blauer Punkt) in das Innere des Lochs weist. Die geflippte TMD1 ist nicht gezeigt<sup>130</sup> (Abbildung verändert entnommen aus L. M. E. STEGER *et al.*<sup>130</sup>).

Nach dem Flippen der TMD1 des Pinholins aus der Membran kann sich das seitlich zugängliche Glycin-Zipper Motiv auf der TMD2 mit einer zweiten TMD2 zu einem rechteckigen aktiven Dimer zusammenlagern (Abb. 62B/E)<sup>130</sup>. Basierend auf diversen Mutationsstudien postulieren T. PANG *et al.* ebenfalls solch ein aktives, über das Glycin-Zipper Motiv interagierendes Pinholin-Dimer<sup>66,67,101</sup>. Die leichte Neigung der Helix um 14° ermöglicht zudem stabilisierende Interaktionen zwischen T<sub>51</sub>-T<sub>51</sub>, N<sub>55</sub>-N<sub>55</sub> und T<sub>54</sub>-Y<sub>52</sub> und das V<sub>41</sub> würde perfekt in die durch das G<sub>43</sub> gebildete Tasche passen<sup>130</sup>. Bisher wurde angenommen, dass die geflippte TMD1 auf der Membranoberfläche ihre  $\alpha$ -helikale Faltung beibehält. Allerdings zeigte die SRC-D-Messung der isolierten TMD1, dass sich diese zu antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern

zusammenlagert, wobei die geringe Signalintensität der positiven Bande auf oberflächengebundene Aggregate hindeutet (siehe Abb. 52A). Das SRCD-Spektrum des Pinholins entspricht zudem keinem reinen  $\alpha$ -helikalen Spektrum, sondern deutet aufgrund der nur schwach ausgeprägten negativen Bande bei 209 nm und der Verschiebung der zweiten negativen Bande zu kürzeren Wellenlängen auf einen gewissen Anteil an antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern hin (siehe Abb. 59). Demnach scheint lediglich die TMD2 des Pinholins  $\alpha$ -helikal gefaltet in der Membran eingelagert zu sein, wohingegen die oberflächengebundene TMD1 sich zu antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern zusammenlagert. Basierend auf diesen Ergebnissen postulieren wir, dass sich die TMD1 umfaltet, nachdem sie aus der Membran geflippt ist und so eine erneute Insertion in die Membran verhindert wird.

Nachdem die aktiven Pinholin-Dimere eine kritische Konzentration in der Membran erreicht haben, sollen diese laut T. PANG *et al.* in der inneren Membran oligomerisieren und sich zu einem Loch zusammenlagern, wobei sie, basierend auf ihren elektronenmikroskopischen Aufnahmen und MD Simulationen, ein Heptamer vorschlagen<sup>66,67</sup>. Solch ein heptameres *pinhole* würde auch mit den Ergebnissen des gröÙenselektiven Fluorescein-Leakage-Experiments übereinstimmen. Allerdings sind die Ergebnisse aus den Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Messungen der TMD2 nur mit einer rechtsgängigen Anordnung der Helices in der Membran kompatibel<sup>130</sup> und nicht mit der postulierten linksgängigen oligomeren Struktur nach T. PANG *et al.*, bei welcher die Helix zudem auch deutlich stärker geneigt ist<sup>66</sup>. In beiden Modellen zeigt der polare Streifen der TMD2, welcher das Glycin-Zipper Motiv enthält, zur Innenseite des Lochs und die hydrophoben Aminosäuren sind zur Membran gerichtet (Abb. 62C/F)<sup>66,67,130</sup>. In unserem Modell wird dieses heptamere Loch vermutlich durch Helix-Helix Interaktionen zwischen V<sub>41</sub>-G<sub>43</sub> sowie G<sub>48</sub>-L<sub>50</sub> stabilisiert, da die hydrophoben Seitenketten perfekt in die von den Glycinen gebildeten Taschen passen. Des Weiteren sind polare Wechselwirkungen zwischen Y<sub>52</sub> und T<sub>54</sub> denkbar<sup>130</sup>. Interessanterweise erhielten T. PANG *et al.* tatsächlich Lyse-defekte Pinholine, sofern die Aminosäuren G<sub>43</sub>, G<sub>48</sub> und T<sub>54</sub> mutiert wurden<sup>101</sup>. Zusätzliche Stabilität wird dem gebildeten Loch vermutlich durch der auf der Membranoberfläche lokalisierten TMD1, welche sich zu aggregierten  $\beta$ -Faltblatt Strukturen zusammenlagert, verliehen.

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten strukturellen und funktionellen Charakterisierung der TMD1 und der TMD2 konnte somit ein neues Struktur- und Funktionsmodell des Pinholins S<sup>21</sup>68 des Phagen  $\phi$ 21 aufgestellt werden<sup>130</sup>. Wir postulieren ein lytisch inaktives Dimer, bei welchem die beiden TMDs des Pinholins über ihre Glycin-Zipper Motive miteinander

## DISKUSSION

interagieren und die Helices zweier inaktiver Pinholine in einer Linie angeordnet sind. Nach dem Flippen der TMD1 aus der Membran faltet sich diese zu antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern um und im nun aktiven Dimer werden TMD2-TMD2 Wechselwirkungen über das Glycin-Zipper Motiv ermöglicht. Nach Erreichen einer kritischen Konzentration an aktiven Dimeren bildet sich letztendlich das rechtsgängige heptamere Loch aus.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Pinholin S<sup>21</sup>68 des Phagen  $\phi$ 21 erstmals mittels verschiedener biophysikalischer Methoden strukturell und funktionell charakterisiert werden. Hierzu wurden die beiden TMDs des Pinholins getrennt voneinander betrachtet, wozu diese mittels chemischer Peptidsynthese hergestellt wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass die TMD2 des Pinholins  $\alpha$ -helikal gefaltet vorliegt und sie diese Konformation auch in allen untersuchten Lipidsystemen beibehält. Mittels SROCD- und Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Spektroskopie konnte die transmembrane Orientierung der TMD2 nachgewiesen werden, wobei sich die Helix durch Neigung der hydrophoben Dicke der Membran anpasst. Zudem konnte anhand 2D-<sup>15</sup>N-NMR-Messungen in DMPC Membranen der exakte Neigungswinkel der TMD2 mit  $\tau = 14^\circ$  und einem Ordnungsparameter der TMD2 mit  $S_{\text{mol}} = 0,91$  bestimmt werden<sup>130</sup>. Die Rotationsanalyse ergab, dass seitlich entlang der geneigten Helix ein polarer Streifen, bestehend aus einem Glycin-Zipper Motiv (G<sub>40</sub>XXXS<sub>44</sub>XXXG<sub>48</sub>) und den polaren Aminosäuren T<sub>51</sub>, T<sub>54</sub>, N<sub>55</sub>, positioniert ist, welcher somit frei zugänglich für Helix-Helix Interaktionen ist<sup>130</sup>. Anhand fluoreszenzbasierter Vesikel-Leakage-Experimente konnte erstmals der postulierte lochbildende Charakter der TMD2 experimentell bewiesen werden, wobei die Lochbildung durch die Variation der Lipidzusammensetzung und der hydrophoben Dicke der Membran beeinflusst wird. Des Weiteren konnte erstmals experimentell bewiesen werden, dass das Glycin-Zipper Motiv auf der TMD2 entscheidend für die Ausbildung der Löcher ist, wobei dem zentralen Serin S<sub>44</sub> des Motivs eine große Bedeutung zugeschrieben werden kann. Die Größe des gebildeten Lochs konnte mit einem Durchmesser von kleiner als 2 nm grob abgeschätzt werden, demnach konnte erstmals bewiesen werden, dass das Pinholin lediglich, entsprechend seiner Funktion die PMF zu entkoppeln, kleine Löcher in der Membran ausbildet<sup>130</sup>. Die Strukturuntersuchung der TMD1 deutet darauf hin, dass die TMD1 nur in ihrer transmembranen Orientierung  $\alpha$ -helikal gefaltet vorliegt und sich, nachdem sie aus der Membran geflippt ist, zu antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern umlagert. Erste Ergebnisse aus den Vesikel-Leakage-Experimenten deuten zudem darauf hin, dass die TMD1 wie erwartet keinen lochbildenden Charakter aufweist.

Basierend auf diesen Ergebnissen konnte ein neues Struktur- und Funktionsmodell des Pinholins S<sup>21</sup>68 des Phagen  $\phi$ 21 aufgestellt werden, mit einem lytisch inaktiven Dimer (Glycin-Zipper basierte TMD2/TMD1-TMD1/TMD2 Wechselwirkungen), dem aktiven rechtsgängigen Dimer (Glycin-Zipper basierte TMD2/TMD2 Wechselwirkungen) und einem oligomeren Loch (rechtsgängige heptamere TMD2 Anordnung)<sup>130</sup>.

## 6 Material

### 6.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

#### 6.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Chromatographiesäule	PerfectSil Semiprep, C4 10 µm, 250 x 10 mm, Vydac, MZ Analysetechnik
Extruder	Avanti® Mini Extruder, Avanti® Polar Lipids
Flockeneisbereiter	AF80, Scotsman®
Halb-Mikroküvette, Quarzglas Suprasil®, 10 mm, schwarz (1,4 ml)	Hellma® Analytics
HPLC: Detektor Pumpe Thermostat Steuerbox	MD-2010 Plus, Jasco PU-2087 Plus, Jasco CO-2060 Plus, Jasco LC-NetII/ADC, Jasco
Hydratationsofen	BS042, Thermo Scientific Heraeus
Kälte- und Wärmethermostat	Ministat, Huber
Kühlschränke 4 °C -20 °C -80 °C	LABEX®, Kirsch Siemens AEG LGUex 1500 MediLine, Liebherr HERAfreeze®, Thermo Scientific HF 286 Basic, Heraeus
Langpassfilter GG395, 3 mm	Schott
Langpassfilter GG495, 3 mm	Schott
LC-MS	1100 Serie, Agilent Bruker Daltonics
Lyophilisator	Alpha 2-4 LD, Christ
Magnetrührer	IKAMAG RCT, IKA® Labortechnik RH basic 2, IKA® Labortechnik
Makroküvette, Quarzglas Suprasil®, 10 mm, (3,5 ml)	Hellma® Analytics
Mikroliterspritze	1700er Serie, Hamilton Company 700er Serie, Hamilton Company
NMR-Spektrometer	Avance, 600 MHz (Ultrashield™), Bruker Biospin
NMR-Probenkopf	HFP Flatcoil (Bruker, modifiziert) HX LowE Flatcoil (Eigenbau)
Peptidsynthesizer	Syro II, MultiSynTech GmbH
pH-Messgerät	PCE-BPH-1, PCE Instruments pH 3310, WTW

MATERIAL

Pipetten 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml	Reference, Eppendorf Research, Eppendorf Research plus, Eppendorf
Quarzglaspobenträger, Suprasil <sup>®</sup> , 20 nm	Hellma <sup>®</sup> Optics
Reinstwasseranlage	Milli-Q, Millipore
Rundküvette (CaF <sub>2</sub> , zerlegbar), 12,44 µm, 7,43 µm	Hellma <sup>®</sup>
Spektrofluorimeter	Fluorolog, HORIBA Jobin Yvon FluoroMax 2, HORIBA Jobin Yvon
Spektropolarimeter	J-815, Jasco Labor- und Datentechnik (GmbH) UV-CD12-Strahlrohr, KARA (KIT) (Synchrotron-basiertes CD-Instrument)
Ultraschallgeräte	Branson Sonifier 250, G. Heinemann, Ultraschall und Labortechnik Sonorex Digitec, Bandelin Ultrasonic Cleaner USC600T, VWR
UV-Vis Spektrophotometer	Ultrospec 7000, GE Healthcare UV-2600, Shimadzu
Vakuumpumpe	2522C-02, Welch Iilmvac Vaccubrand
Vortexer	TopMix FB15024, Fisher Scientific Genie 2, Bender und Hobein AG Vortex Genius 3, IKA <sup>®</sup> Labortechnik
Waagen	AE 260 DeltaRange <sup>®</sup> , Mettler Toledo BP 301S, Sartorius ME5, Sartorius M2P, Sartorius PB 3001, Mettler Toledo
Wasserbad	B-480, Büchi SC 100, Thermo Fisher Scientific S 14P, Thermo Fisher Scientific
Zentrifugen	2-6, Sigma 5415, Eppendorf Biofuge fresco, Heraeus Instruments MiniSpin Plus, Eppendorf PerfectSpin 24R, Peqlab
Zentrifugenrotoren	11030, Sigma 13034, Sigma F-45-12-11, Eppendorf
Zentrifugensäulen (0,8 ml; 5 ml)	Pierce <sup>™</sup> , Thermo Fisher Scientific



## 6.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	Actu-All Chemicals, Fischer Scientific
6-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonsäure, Dinatriumsalz (ANTS)	Invitrogen
Anti-Fluorescein/Oregon Green™, rabbit IgG fraction	Invitrogen
1',3'-Bis(1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho(-glycerol (Natriumsalz) (TOCL)	Avanti® Polar Lipids
6-Carboxyfluorescein	Sigma Aldrich
Chloroform	Uvasol® Merck
1,2-didecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DDPC)	Avanti® Polar Lipids
1,2-Dieicosenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DEiPC)	Avanti® Polar Lipids
1,2-Dierucoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DErPC)	NOF Corporation
1,2-Dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DLPC)	Avanti® Polar Lipids
1,2-Dimyristoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DMoPC)	Avanti® Polar Lipids
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DMPC)	NOF Corporation
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DOPC)	NOF Corporation
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-(lissamin-rhodamin B sulfonyl) (Ammoniumsalz) (18:1 Liss Rhod PE), in Chloroform	Avanti® Polar Lipids
1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DPoPC)	Avanti® Polar Lipids
D(+)-Saccharose	Acros Organics
Ethanol	VWR Chemicals
Fluorescein-isothiocynat-dextran FD4	Sigma Aldrich
Fluorescein-isothiocynat-dextran FD20	Sigma Aldrich
Fluorescein-isothiocynat-dextran FD40	Sigma Aldrich
Fluorescein-isothiocynat-dextran FD70	Sigma Aldrich
1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol (HFIP)	Merck, Roth
Kaliumsulfat (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Roth
Methanol	Uvasol® Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Sigma Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Fluka® Analytical, Roth
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (POPC)	NOF Corporation
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine (POPE)	NOF Corporation, Avanti® Polar Lipids

## MATERIAL

1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol) (Natriumsalz) (POPG)	NOF Corporation
1,4-Piperazindiethansulfonsäure Dinatriumsalz (PIPES-Na <sub>2</sub> )	Acros Organics, Sigma Aldrich
Phosphatpuffer-Konzentrat für 500 ml Puffer	Titrisol <sup>®</sup> , Merck
Salzsäure (HCl)	Fisher Scientific, Fluca <sup>®</sup> Analytical, Roth
Sheep Anti-FITC-UNLB IgG	Southern Biotech
Sephacryl <sup>®</sup> 100-HR	Sigma Aldrich
Sephacryl <sup>®</sup> 500-HR	Sigma Aldrich
Triton X-100	Sigma Aldrich
<i>p</i> -Xylol-bis(N-pyridiniumbromid) (DPX)	Invitrogen

### 6.1.3 Verbrauchsmaterial

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläser (7,5 mm × 12 mm)	Marienfeld-Superior
Einmalspritzen (20 ml)	BD Discardit <sup>™</sup>
Filterpapier (NMR)	Macherey-Nagel
Frischhaltefolie (Polyethylenfolie)	Sarogold
Kanülen	Sterican <sup>®</sup> B. Braun
Labortücher (20,5 cm × 20 cm, 11 cm × 21 cm)	KIMTECH Science
Nitril Schutzhandschuhe ergo	LLG <sup>®</sup> Labware
Nucleopore <sup>™</sup> Polycarbonatmembran (Porengröße: 100 nm)	Whatman <sup>®</sup> -GE Healthcare
Parafilm <sup>®</sup>	Bemis
Petrischalen (94 mm × 16 mm)	Greiner bio-one
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Spritzenvorsatzfilter 0,20 µm (Ø 0,25 mm)	LLG <sup>®</sup> Labware

## 6.2 Puffer und Lösungen für die Fluoreszenzmessungen

### 6.2.1 ANTS/DPX-Leakage-Messungen

#### **Innerer Puffer (ANTS/DPX-Puffer)**

---

ANTS (12,5 mM)	53,4 mg
DPX (45 mM)	190 mg
PIPES-Na <sub>2</sub> (10 mM)	34,6 mg
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 10 ml auffüllen
	pH 7 einstellen, Lagerung bei 4 °C

---

#### **Äußerer Puffer**

---

D(+)-Saccharose (190 mM)	13 g
PIPES-Na <sub>2</sub> (10 mM)	693 mg
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 200 ml auffüllen
	pH 7 einstellen

---

### 6.2.2 Fluorescein-Leakage-Messungen

#### **PIPES-Na<sub>2</sub> Puffer**

---

PIPES-Na <sub>2</sub> (50 mM)	3,46 g
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 200 ml auffüllen
	pH 7 einstellen

---

#### **CF-Lösung (1 mM)**

---

6-Carboxyfluorescein	564 µg
	mit PIPES-Na <sub>2</sub> (50 mM) auf 1,5 ml auffüllen
	Lagerung bei 4 °C

---

## MATERIAL

### **CF-Lösung (50 $\mu$ M)**

---

CF-Lösung (1 mM)	200 $\mu$ l
	mit PIPES-Na <sub>2</sub> (50 mM) auf 4 ml auffüllen, Lagerung bei 4 °C

---

### **Triton X-100-Lösung (20%)**

---

Triton X-100	2 ml
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 10 ml auffüllen

---

## **6.2.3 FRET Messungen und Bindungsaffinitätsmessungen**

### **PIPES-Na<sub>2</sub> Puffer**

---

PIPES-Na <sub>2</sub> (10 mM)	693 mg
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 200 ml auffüllen pH 7 einstellen

---

## **6.3 Software**

ChemDraw Professional 16.0	PerkinElmer
ExPASy	Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)
FluorEssence V3.8	HORIBA, Jobin Yvon
ProCD12	selbstgeschriebenes Programm (Siegmar Roth, KIT, IBG2), angelehnt an CDToolX (Departement Biological Sciences, Birkbeck)
ProtParam	Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)
Steuerungssoftware CD/OCD	selbstgeschrieben (Siegmar Roth, KIT, IBG2)
TopSpin 4.0.6	Bruker Biospin
UVProbe 2.51	Shimadzu

## 7 Methoden

### 7.1 Peptidsynthese

Die Synthese sowie die anschließende Aufreinigung der verschiedenen Pinholin Konstrukte wurde von Dr. Parvesh Wadhvani, Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck (KIT, IBG2) durchgeführt.

Die Herstellung der Peptide erfolgt mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese nach einem Standard-Festphasen Fmoc Protokoll und anschließender Aufreinigung mittels HPLC. Alle hierfür verwendeten Chemikalien stammen von Merck, Biosolve BV, Actu-All chemicals, Iris Biotech und Eurisotop. Für die Synthese wird ein niederbeladenes Rink-Amid Harz verwendet, wobei ein 50  $\mu\text{mol}$  Ansatz gewählt wird. Es erfolgt eine Doppelkupplung jeder einzelnen Fmoc-geschützten Aminosäure für 30 min bei Raumtemperatur, welche mit jeweils 8 Äquivalenten an Fmoc-Aminosäure, HBTU (2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat), HOBt (*N*-Hydroxybenzotriazol) und 16 Äquivalenten DIPEA (*N,N*-Diisopropylethylamin) in DMF (*N,N*-Dimethylformamid) durchgeführt wird. Lediglich das  $^{15}\text{N}$ -markierte Leucin wird manuell unter Verwendung von 2 Äquivalenten über Nacht gekoppelt. Die Fmoc-Schutzgruppe wird jeweils durch Inkubation mit 20 % Piperidin in DMF für 20 min entfernt. Zwischen den einzelnen Kupplungs- und Entschützungs-schritten wird mit DMF gewaschen. Nach erfolgter Synthese wird das Harz mit DMF und Methanol gewaschen und 1 h unter verminderten Druck getrocknet. Das Peptid wird durch Zugabe einer Lösung aus 77,5 vol% TFA (Trifluoressigsäure), 5 vol% Triisopropylsilan, 5 vol% Thioanisol, 5 vol% Phenol, 2,5 vol% Ethandithiol und 5 vol% ddH<sub>2</sub>O vom säurelabilen Harz abgespalten. Pro 100 mg Harz werden 1 ml dieser Abspaltungslösung hinzugefügt und für 4 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Abtrennung des Harzes und der Entfernung des TFAs wird der Rückstand mit Diethylether versetzt und dieser nach Zentrifugation abdekantiert. Zuletzt wird das erhaltene Pellet in Acetonitril/Wasser (1/1, v/v) gelöst und am Lyophilisator getrocknet.

#### *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*

Die HPLC ist ein computergesteuertes Chromatographiesystem, welches zur Aufreinigung von Peptiden genutzt werden kann. Für die Aufreinigung der verschiedenen mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellten Pinholin Konstrukte wird eine semipräparative C4-Säule verwendet. Das Rohmaterial wird mittels Wasser/Acetonitril Gradienten, welche 5 mM HCl (Salzsäure) enthalten, bei einer Temperatur von 35 °C aufgereinigt. Mittels einem

analytischen Flüssigchromatographiesystem (LC-MS), welches mit einem  $\mu$ TOF Massenspektrometer verbunden ist, wird das Molekulargewicht der aufgereinigten Peptide überprüft. Zur Entfernung des Lösungsmittels werden die Peptide lyophilisiert.

## 7.2 Methoden zur strukturellen Analyse

### 7.2.1 CD-Spektroskopie

Die Synchrotron-basierten CD-Messungen werden an dem UV-CD12-Strahlrohr der Synchrotronstrahlungsquelle KARA (KIT) durchgeführt. Die Peptide werden hierfür in SUVs rekonstituiert. Hergestellt werden die SUVs durch Cosolubilisierung der Peptide und Lipide in organischen Lösungsmitteln in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50. Die Peptidstammlösungen werden in HFIP angesetzt und die Lipidstammlösungen in MeOH/CHCl<sub>3</sub> (1/1, v/v). Die Lösungsmittel werden im N<sub>2</sub>-Strom evaporiert und deren vollständige Entfernung erfolgt durch weitere 3 h im Vakuum. Die getrockneten Peptid-Lipid-Filme werden in 25  $\mu$ l Phosphatpuffer (10 mM, pH 7) aufgenommen und die Homogenisierung der Proben erfolgt durch 10 Gefrier-Tau-Zyklen. Durch anschließende 5-minütige Ultraschallbehandlung werden die SUVs generiert. Nach analogem Vorgehen werden Referenzproben ohne Peptid hergestellt. 3,5  $\mu$ l der Suspension (2 mg/ml) wird jeweils in eine zerlegbare Calciumfluorid Rundküvette mit einer Schichtdicke von 12,44  $\mu$ m beziehungsweise 7,43  $\mu$ m gefüllt<sup>177</sup>. Die exakte Schichtdickenbestimmung der Rundküvetten erfolgte mittels Interferometrie durch eine Mehrfachbestimmung, welche von dem CD-Team von Dr. Jochen Bürck (KIT, IBG2) durchgeführt wurden. Die Messungen werden bei 22 °C oder 35 °C durchgeführt, je nachdem wie hoch die Phasenübergangstemperatur  $T_m$  der verwendeten Lipide ist. Die Spektren werden in 0,5 nm Intervallen im Bereich von 175-275 nm aufgenommen, wobei die Scangeschwindigkeit 18 nm/min und die spektrale Bandbreite 1 nm betragen. Die *dwell time* beträgt 1500 ms und die *lock-in time* 300 ms. Es werden von jeder Probe drei Spektren aufgenommen und diese gemittelt. Von dem gemittelten Peptidspektrum wird das gemittelte Referenzspektrum der reinen Lipidprobe abgezogen. Zur Korrektur der Basislinie wird diese im Bereich um 260 nm auf null gesetzt und zudem werden die Spektren geglättet. Zum qualitativen Vergleich der Spektren werden diese normiert. Für die Ermittlung der Sekundärstruktur werden die Spektren mit den Basisspektren reiner Sekundärstrukturelementen nach S. M. KELLY *et al.*<sup>119</sup> verglichen.

Bei wasserlöslichen Peptiden erfolgt die Herstellung der SUVs analog wie gerade beschrieben, wobei das Peptid erst nach der Ultraschallbehandlung hinzugefügt wird und die Probe anschließend 30 min inkubiert wird. Die Konzentration der PeptidstammLösung wird zuvor anhand der UV-Absorption bei 280 nm ermittelt, wodurch eine konzentrationsunabhängige Sekundärstrukturanalyse über die Berechnung der mittleren molaren Elliptizität pro Peptidbindung  $\theta_{MRE}$  möglich ist:

$$\theta_{MRE} = \frac{100 \cdot \theta}{c_r \cdot d} \left[ \frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right] \quad \text{mit } c_r = \frac{c \cdot n}{M} \quad (1)$$

$\theta$  = Elliptizität [deg]

$d$  = Schichtdicke der Küvette [cm]

$c_r$  = molare Konzentration pro Peptidbindung [mol/l]

$c$  = Peptidkonzentration [g/l]

$M$  = Molekulargewicht [g/mol]

$n$  = Anzahl der Peptidbindungen

### 7.2.2 OCD-Spektroskopie

Durchgeführt werden die SROCD-Messungen an dem UV-CD12-Strahlrohr der Synchrotronstrahlungsquelle KARA (KIT). Die Peptide werden hierfür in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten rekonstituiert. Das Peptid und die Lipide werden in organischem Lösungsmittel in einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis von 1 zu 50 cosolubilisiert, wobei die Peptidmenge konstant gehalten wird. Die PeptidstammLösungen werden in HFIP angesetzt und die LipidstammLösungen in MeOH/CHCl<sub>3</sub> (1/1, v/v). Die Lösungsmittel werden daraufhin im N<sub>2</sub>-Strom evaporiert und deren vollständige Entfernung erfolgt durch weitere 3 h im Vakuum. Die erhaltenen Peptid-Lipid-Filme werden jeweils in einer kleinen Menge an HFIP aufgenommen und ein Aliquot (7,5 µg Peptid) wird auf ein Quarzglasprobenträger (d = 20 nm) kreisförmig und mittig in einen Durchmesser von 12 nm aufgetragen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wird dieses durch weitere 3 h Vakuum vollständig entfernt. Die Quarzglasprobenträger werden in den Probenhalter eingespannt, welcher danach in eine Hydratationszelle eingebaut wird. Die Probe wird darin über Nacht bei der Messtemperatur und 96-97 % relativer Luftfeuchtigkeit (gesättigte K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung) hydratisiert. Nach analogem Vorgehen werden Referenzproben ohne Peptid hergestellt. Für die Messungen werden die Proben in eine speziell entwickelte Messzelle

eingebaut, welche senkrecht zum Strahl steht und automatisiert um den Lichtstrahl rotiert. Die Spektren werden in 0,5 nm Intervallen im Bereich von 175-275 nm aufgenommen, wobei die Scangeschwindigkeit 16 nm/min und die spektrale Bandbreite 1 nm betragen. Die *dwell time* beträgt 1500 ms und die *lock-in time* 300 ms. Die Messzelle wird während den Messungen schrittweise um 45 ° rotiert, wodurch letztendlich 8 Scans erhalten werden und diese gemittelt werden. Von dem Peptidspektrum wird das Referenzspektrum der reinen Lipidprobe abgezogen. Die Basislinie wird im Bereich um 260 nm null gesetzt und das Spektrum geglättet. Die charakteristische Bande bei 208 nm der erhaltenen SROCD-Spektren gibt Auskunft über die Orientierung der Helix in der Membran<sup>128,129</sup>. Zum qualitativen Vergleich der Spektren werden diese auf ihr Minimum im Bereich von 222 nm normiert.

### 7.2.3 Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Spektroskopie

Für die Festkörper-NMR-Messungen werden selektiv <sup>15</sup>N-markierte Peptide in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen rekonstituiert. Das molare Peptid- zu Lipidverhältnis beträgt 1 zu 50, wobei die Lipidmenge von 18 mg pro Probe konstant gehalten wird. Sowohl die Peptide als auch die Lipide werden in HFIP gelöst und anschließend gleichmäßig auf 20 Glasplättchen (7,5 mm × 12 mm × 0,06 mm) aufgetragen. Nach Trocknung an der Luft werden die Glasplättchen über Nacht im Exsikkator unter vermindertem Druck inkubiert. Am nächsten Tag werden die Plättchen vorsichtig gestapelt, wobei ein zusätzliches Plättchen ohne Probe den Abschluss bildet. Durch Hydratisierung über Nacht bei 48 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 96 % (gesättigte K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung) erfolgt die Ausbildung der orientierten Lipiddoppelschichten. Anschließend wird der Stapel mit zwei Schichten Parafilm sowie Polyethylenfolie verpackt, um das Austrocknen der Probe während der Messung zu verhindern. Alle Messungen erfolgen bei einer Temperatur von 309 K an einem Bruker Ultrashield™ 600 MHz Spektrometer. Für die <sup>31</sup>P-NMR-Messungen wird ein modifizierter Bruker HFP Flatcoil Probenkopf verwendet und ein im Arbeitskreis gebauter HX lowE Flatcoil Probenkopf wird für die <sup>15</sup>N-NMR-Messungen genutzt. In der <sup>1</sup>H-Dimension werden alle Spektren über die Wasserlinie bei 4,7 ppm referenziert und außerdem wird an der Wasserlinie die Magnetfeldhomogenität optimiert<sup>178,179</sup>. Vor und nach den <sup>15</sup>N-NMR-Messungen wird jeweils ein <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum aufgenommen, um die Qualität der makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten zu überprüfen. Die <sup>15</sup>N-NMR-Spektren werden mit Kreuzpolarisation aufgenommen, wobei hier die CP-MOIST Pulssequenz angewendet wird<sup>180</sup>. Für die heteronukleare <sup>1</sup>H-Entkopplung wird die SPINAL-16 Pulssequenz



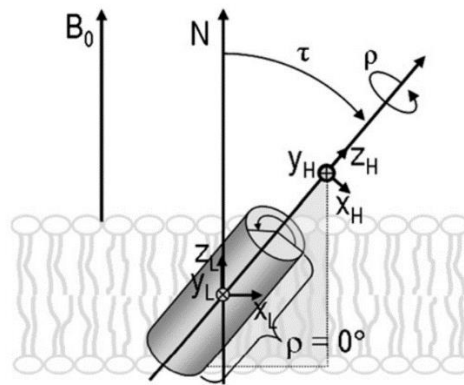
(*Small Phase Incremental Alternation*) und eine  $^1\text{H}$ -Entkopplungsfeldstärke von 30 kHz gewählt<sup>181,182</sup>. Die  $^{15}\text{N}$ -Trägerfrequenz (*carrier frequency*) wird auf 110 ppm gesetzt und die  $^1\text{H}$ -Trägerfrequenz auf 9 ppm.

Das 2D-SAMMY Experiment<sup>139</sup> wird für NMR-Experimente, bei denen die  $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebung mit der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -dipolaren Kopplungsfrequenz korreliert, verwendet, wobei dieses mit der verbesserten SAMP14 Pulssequenz<sup>140</sup> durchgeführt wird. Für die 2D- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen werden dieselben Trägerfrequenzen wie bei den 1D- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen verwendet. Die  $^1\text{H}$ - $B_1$ -Feldstärke liegt bei 51 kHz und mit einer Feldstärke von 30 kHz wird während der 10 ms Acquisitionszeit entkoppelt. Die aufgenommenen Daten werden *zero-filled* und die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -dipolare Kopplungsdimension wird nach A. A. NEVZOROV *et al.*<sup>140</sup> skaliert. Für die Bestimmung des Neigungswinkels  $\tau$ , des Ordnungsparameters  $S_{\text{mol}}$  sowie der Rotationswinkel der Aminosäuren werden simulierte PISEMA (*Polarization Inversion Spin Exchange at Magic Angle*) Spektren berechnet und diese mit den aufgenommenen Spektren verglichen. Für die Simulationen der PISA-*wheels* wird das Programm *opisawheel* (von Dr. Stephan Grage, KIT, IBG2) verwendet. Die Simulationen beruhen auf der Annahme einer idealen  $\alpha$ -Helix mit uniformen dihedralen Winkeln ( $\Phi = -60.7^\circ$ ;  $\Psi = -44.7^\circ$ ), uniformen chemischen Verschiebungshauptachsenelementen ( $\sigma_{11\text{N}} = 64$  ppm;  $\sigma_{22\text{N}} = 77$  ppm;  $\sigma_{33\text{N}} = 222$  ppm), einer N-H-Bindungslänge von 1,07 Å sowie einem uniformen Winkel von  $\delta = 18,5^\circ$  zwischen dem N-H-Bindungsvektor und der Tensorhauptachse  $\sigma_{33\text{N}}$ <sup>138,183</sup>.

### Definition des Rotationswinkels $\rho$

Der Rotationswinkel  $\rho$  kann als Rechtsdrehung um die Achse der Helix beschrieben werden und gibt folglich die Lage des  $C_\alpha$ -Atoms einer Aminosäure auf der Helixoberfläche an. Das rechtshändige Koordinatensystem der Membran wird durch die Achsen  $x_N$ ,  $y_N$  und  $z_N$  wiedergegeben, wobei die Achse  $z_N$  der Membrannormalen  $N$  entspricht. Das ebenfalls rechtsgängige Koordinatensystem der Helix bilden entsprechend die Achsen  $x_H$ ,  $y_H$  und  $z_H$ , wobei die Achse  $z_H$  parallel zur Helixachse vom N-Terminus in Richtung C-Terminus der  $\alpha$ -Helix verläuft. Die  $y$ -Achse beider Koordinatensysteme weist in die Papierebene hinein ( $y_H = y_N$ ) und bildet die Drehachse für den Neigungswinkel  $\tau$ , welcher festgelegt ist als eine Rechtsdrehung von der Membrannormalen  $N$  um die  $y$ -Achse.

Der Rotationswinkel  $\rho = 0$  wird in der vorliegenden Arbeit als Kreuzprodukt der Drehachse des Neigungswinkels  $\tau$  ( $\vec{y}_N$  beziehungsweise  $\vec{y}_H$ ) und der Helixachse ( $\vec{z}_H$ ) festgelegt. Daraus ergibt sich der Vektor  $\vec{y}_H$ , welcher zusammen mit dem Vektor  $\vec{z}_H$  eine Ebene aufspannt.



**Abbildung 63: Definition des Rotationswinkels  $\rho$**

Die Abbildung wurde entnommen aus S. D. MÜLLER *et al.*<sup>184</sup>

### 7.3 Methoden zur funktionellen Analyse

Alle fluoreszenzspektroskopischen Messungen werden an einem Fluorolog Spektrofluorimeter (HORIBA Jobin Yvon) durchgeführt.

#### 7.3.1 ANTS/DPX-Leakage-Experimente

Für die Messungen werden die Peptide in LUVs rekonstituiert. Die Vesikel werden durch Cosolubilisierung von Peptid und Lipiden in organischen Lösungsmitteln hergestellt. Die Lipidstammlösungen (10 mM) werden in MeOH/CHCl<sub>3</sub> (1/1, v/v) angesetzt und mit 0,01 mol% Rhodamin-PE versetzt, um den Verlust an Lipid während der Probenvorbereitung zu quantifizieren (Anregungswellenlänge: 540 nm, Emissionswellenlänge: 587 nm). Die Peptide werden in HFIP gelöst und eine 2 mM Stammlösung hergestellt. Es werden Lipide und Peptid in definierten molaren Peptid- zu Lipidverhältnissen zusammenpipettiert, wobei die Lipidmenge konstant gehalten wird (200  $\mu$ l der Stammlösung). Zudem wird eine sogenannte *Blank* Probe ohne Peptid vorbereitet, welche für die spätere Auswertung der Daten benötigt wird und durch welche zudem erkannt werden kann, ob die Vesikel *per se* intakt sind. Die Lösungsmittel werden anschließend im N<sub>2</sub>-Strom evaporiert und durch weitere 3 h im Vakuum vollständig entfernt. Die erhaltenen Peptid-Lipid-Filme werden in jeweils 200  $\mu$ l ANTS/DPX-Puffer aufgenommen und anschließend 10 Gefrier-Tau-Zyklen durchgeführt. Für die Herstellung der LUVs werden die Proben anschließend 21-mal durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 100 nm extrudiert. Die erhaltenen Vesikel-Lösungen werden über Nacht im Dunkeln gelagert. Am darauffolgenden Tag werden die ANTS/DPX-Messungen in einer Quarzküvette mit einem Gesamtvolumen von 1,5 ml durchgeführt. Die zeitliche Änderung der ANTS-Fluoreszenz wird bei 515 nm detektiert

(Anregung: 355 nm; Spaltbreite 3,5 nm beziehungsweise 4 nm). Durch den Einsatz eines GG395 Langpassfilters (3 mm) werden Störungen durch die Anregungswellenlänge vermieden. Die Messungen erfolgen unter ständigen Rühren bei 22 °C beziehungsweise bei 35 °C, sofern das Lipid POPE enthalten ist ( $T_m(\text{POPE}) = 25^\circ\text{C}$ ). Die POPE enthaltenen Proben werden zudem auf einer Heizplatte extrudiert und anschließend bei 35 °C im Heizblock gelagert. Durch Größenausschlusschromatographie werden die sich außerhalb der Vesikel befindlichen ANTS-Fluorophore und DPX-Quencher entfernt. Hierfür werden 60 µl der Vesikel-Lösung auf eine mit äußerem Puffer (10 mM PIPES- $\text{Na}_2$ , 190 mM Saccharose, pH 7) equilibrierte Sephacryl 100-HR Minisäule aufgetragen und für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Hier ist zu beachten, dass ein Auslaufen der in den Vesikeln eingeschlossenen Moleküle auf der Gelfiltrationssäule beginnt, da das Peptid bereits in den LUVs eingelagert ist und somit die Löcher schon ausgebildet sind. Daher werden die Fluoreszenzmessungen zeitgleich mit der Zentrifuge gestartet. Direkt nach erfolgter Entfernung der sich im Außenmedium befindlichen Moleküle werden 40 µl der zentrifugierten Vesikel-Lösung im Dunkeln in die Küvette überführt, in welcher äußerer Puffer vorliegt ist. Nach einer Messdauer von 900 s werden 20 µl einer 20 %igen Triton X-100-Lösung zur vollständigen Solubilisierung der Vesikel hinzugefügt. Für die Datenanalyse der ANTS/DPX-Leakage-Messungen wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Leakage} [\%] = \frac{I - I_0}{I_{\text{Triton}} - I_0} * 100 \quad (2)$$

$I$  = Fluoreszenz der Probe

$I_0$  = Grundfluoreszenz der Probe

$I_{\text{Triton}}$  = Fluoreszenz nach Zugabe von Triton X-100 (100 % Leakage)

Zu beachten ist, dass die Grundfluoreszenz der Peptidproben berechnet werden muss, da ein Auslaufen der in den Vesikeln eingeschlossenen Fluorophore bereits auf der Säule beginnt und somit die Grundfluoreszenz nicht detektiert werden kann. Für die Ermittlung der Grundfluoreszenz der Peptidprobe ( $I_0(\text{Peptidprobe})$ ) wird folgende Formel verwendet:

$$I_0(\text{Peptidprobe}) = I_0(\text{Blank}) * \frac{I_{\text{Triton}}(\text{Peptidprobe})}{I_{\text{Triton}}(\text{Blank})} \quad (3)$$

Da es sich bei der *Blank* Probe lediglich um eine Lipidprobe handelt, wird kein Leakage induziert, weshalb als Grundfluoreszenz der Wert nach der Gelfiltration verwendet werden

kann. Für den besseren Vergleich der ANTS/DPX-Messungen werden die erhaltenen Leakage-Werte nach 900 s angegeben.

Für ANTS/DPX-Leakage-Messungen wasserlöslicher Peptide werden nach dem eben beschriebenen Vorgehen LUVs hergestellt, jedoch ohne Peptid. Die Lipidproben werden 41-mal durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 100 nm extrudiert. Mittels Gelfiltrationschromatographie werden die nicht eingeschlossenen Fluorophore und Quencher entfernt. Da es sich hier um Proben ohne Peptid handelt, kann die tatsächliche Lipidkonzentration in der Küvette durch Aufnahme eines Rhodamin-Emissionsspektrums (Anregung: 540 nm, Emission: 587 nm) vor der Extrusion und nach der Gelfiltration ermittelt werden. Das Peptid wird in Wasser gelöst und die exakte Konzentration der Stammlösung wird anhand seiner UV-Absorption bei 280 nm ermittelt. Bei den Messungen wird die Lipidkonzentration in der Küvette auf 100  $\mu\text{M}$  eingestellt und das Peptid wird in variierender Menge hinzugefügt, um die entsprechenden molaren Peptid- zu Lipidverhältnisse einzustellen. Zu Beginn der Messung werden in der Küvette zunächst der äußere Puffer und das Peptid vorgelegt und bei einer Temperatur von 22 °C stetig gerührt. Nach 100 s werden die LUVs hinzugefügt und über einen Zeitraum von 900 s die zeitliche Zunahme der ANTS-Fluoreszenz detektiert. Zur vollständigen Solubilisierung werden 20  $\mu\text{l}$  der 20 %igen Triton X-100-Lösung hinzugefügt. Für die Datenanalyse der ANTS/DPX-Leakage-Messungen wird Formel (3) verwendet. Da das Peptid von außen zugegeben wird, entspricht die Grundfluoreszenz der Fluoreszenzintensität nach Zugabe der Vesikel und muss demnach nicht berechnet werden.

### ***7.3.2 Fluorescein-Leakage-Experimente***

Die Präparation der LUVs erfolgt analog zu denen der ANTS/DPX-Leakage-Messungen (Kapitel 7.3.1.), wobei unterschiedlich große Fluorophore darin eingeschlossen werden. Es werden Proben in nur einem molaren Peptid- zu Lipidverhältnis hergestellt ( $P/L = 1:100$  beziehungsweise  $P/L = 1:50$ ). Zusätzlich werden Proben ohne Peptid hergestellt. Die erhaltenen Peptid-Lipid-Filme werden in jeweils 200  $\mu\text{l}$  Fluorophor-Puffer aufgenommen. Für die Herstellung der in ihrer Größe variierenden Fluorophor-Puffer werden die verschiedenen FITC-Dextrane in 50 mM PIPES- $\text{Na}_2$  (pH 7) gelöst und deren Fluoreszenzintensität an die Intensität einer 50  $\mu\text{M}$  CF-Lösung angepasst. Hierfür wird ein Emissionsspektrum über den Bereich von 490-700 nm bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm aufgenommen. Nach der bereits beschriebenen Herstellung der LUVs werden diese zur Entfernung der sich außerhalb befindlichen Fluorophore auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Als Säulenmaterial wird

Sephacryl 500-HR verwendet und der äußere Puffer ist 50 mM PIPES-Na<sub>2</sub> (pH 7). Analog zu den ANTS/DPX-Leakage-Messungen wird die Messung zeitgleich mit der Zentrifuge gestartet und das Gesamtvolumen in der Küvette beträgt 1,5 ml. Nach der Entfernung der sich im Außenmedium befindlichen Fluorophore wird ein Anti-Fluorescein-Antikörper hinzugefügt, welcher die Fluoreszenz der ausströmenden Fluorophore quencht. Die zeitliche Abnahme der Fluoreszenz des Fluoresceins wird bei 525 nm (Spaltbreite 14 nm beziehungsweise 10 nm) detektiert (Anregung: 490 nm, Spaltbreite: 1,25 nm). Durch den Einsatz eines GG495 Langpassfilters (3 nm) werden Störungen durch die Anregungswellenlänge vermieden. Nach einer Messdauer von 2500 s werden 50 µl einer 20 %igen Triton X-100-Lösung zur vollständigen Solubilisierung der Vesikel hinzugefügt. Zu beachten ist, dass die *Quenching*-Effizienz des Antikörpers lediglich bei 90 % liegt. Für die Datenanalyse wird das erhaltene Fluoreszenzsignal nach Zugabe von Triton X-100 jedoch als 100 % Leakage gesetzt. Nach jeder Messung wird zudem ein Rhodamin-Emissionsspektrums (Anregung: 540 nm, Emission: 587 nm) aufgenommen. Für die Ermittlung, von wie viel Prozent der vorliegenden Fluorescein-Derivaten die Fluoreszenz durch den Antikörper gequencht wird, wird folgende Berechnung vorgenommen:

$$\text{Fluoreszenz bei 525 nm [\%]} = \frac{I - I_{\text{Triton}}}{I_0 - I_{\text{Triton}}} * 100 \quad (6)$$

*I* = Fluoreszenz der Probe

*I*<sub>0</sub> = Gesamtfluoreszenz der Probe zu Beginn

*I*<sub>Triton</sub> = Fluoreszenz nach Zugabe von Triton X-100

Die Fluoreszenz nach der Zugabe von Triton X-100 wird als 100 % Leakage und somit als 0 % Fluoreszenz bei 525 nm definiert. Die Gesamtfluoreszenz zu Beginn der Messung muss auch bei diesen Experimenten ermittelt werden, da das Auslaufen der in den LUVs eingeschlossenen Fluorophoren bereits auf der Säule beginnt. Sofern während der Messung die Fluoreszenz der Probe kaum abnimmt, kann die Gesamtfluoreszenz durch einen linearen Fit bestimmt werden. Sofern ein Großteil der Fluorophore aus den Vesikeln entwichen ist, was sich in nur einer geringen Abnahme der Fluoreszenz nach der Zugabe von Triton X-100 widerspiegelt, muss die Gesamtfluoreszenz mittels folgender Formel berechnet werden:

$$I_0 = I_{Rho} * \frac{I_0(Blank)}{I_{Rho}(Blank)} \quad (7)$$

Hierbei entspricht  $I_{Rho}$  der Fluoreszenz des Rhodamins (Anregung: 540 nm, Emission 587 nm) der Peptidprobe nach Beendigung der Messung.  $I_0$  entspricht der Fluoreszenz der Probe ohne Peptid (*Blank*) nachdem der Antikörper hinzugefügt wurde und  $I_{Rho}$  ist die Fluoreszenz des Rhodamins der *Blank* Probe nach Ende der Messung.

### 7.3.3 FRET-Spektroskopie

Für die FRET-Experimente werden die Peptide in LUVs rekonstituiert. Die Vesikel werden durch Cosolubilisierung von Peptiden und Lipiden in organischen Lösungsmitteln hergestellt. Die Lipidstammlösungen (8 mM) werden in MeOH/CHCl<sub>3</sub> (1/1, v/v) angesetzt und mit 0,01 mol% Rhodamin-PE versetzt. Das Donorpeptid sowie das Akzeptorpeptid werden in HFIP gelöst und jeweils eine 107 µM Stammlösung hergestellt. Da die genaue Peptidkonzentration in der HFIP Stammlösung nicht bestimmt werden kann, wird zuvor ein Konzentrationsfaktor ermittelt. Hierfür wird jeweils eine kleine Menge des Donor- als auch des Akzeptorpeptids in Acetonitril/Wasser (1/1, v/v) gelöst und die Konzentration anhand der UV-Absorption bei 280 nm ermittelt. Aus jeweils drei unabhängigen Stammlösungen wird dann ein Konzentrationsfaktor des Peptids bestimmt und dieser dann entsprechend bei dem Ansetzen der Peptidstammlösungen in HFIP berücksichtigt. Bei den FRET-Messungen beträgt das molare Peptid- zu Lipidverhältnis 1 zu 150, wobei die Peptide und Lipide nach folgendem Schema zusammenpipettiert werden:

Tabelle 7: Pipettierschema für die Herstellung der Proben für die FRET-Messungen

$x_D$ (Donormolenbruch)	Donor [ $\mu$ l]	Akzeptor [ $\mu$ l]	Lipid [ $\mu$ l]
<i>Blank</i>	0	0	200
0	0	100	200
0,1	10	90	200
0,2	20	80	200
0,3	30	70	200
0,4	40	60	200
0,5	50	50	200
0,6	60	40	200
0,65	65	35	200
0,7	70	30	200
0,75	75	25	200
0,8	80	20	200
0,85	85	15	200
0,9	90	10	200
1	100	0	200

Die Lösungsmittel werden anschließend im N<sub>2</sub>-Strom evaporiert und durch weitere 3 h im Vakuum vollständig entfernt. Die erhaltenen Peptid-Lipid-Filme werden in jeweils 250  $\mu$ l 10 mM PIPES-Na<sub>2</sub> (pH 7) aufgenommen und 5 Gefrier-Tau-Zyklen durchgeführt. Für die Herstellung der LUVs werden die Proben anschließend jeweils 21-mal durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 100 nm extrudiert. Die erhaltenen Vesikel-Lösungen werden über Nacht im Dunkeln gelagert. Am darauffolgenden Tag werden 70  $\mu$ l der extrudierten Probe mit 1930  $\mu$ l Phosphatpuffer (10 mM PIPES-Na<sub>2</sub>, pH 7) gemischt und eine Stunde inkubiert. Von jeder Probe werden daraufhin bei 22 °C drei verschiedene Emissionsspektren aufgenommen:

- Anregung des Tryptophans bei 290 nm (Emission: 305-555 nm)
- Anregung des Dansyls bei 345 nm (Emission: 360-650 nm)
- Anregung des Rhodamins bei 540 nm (Emission: 560-700 nm)

Von allen erhaltenen Spektren wird der entsprechende Lipiduntergrund, also das Spektrum einer Probe ohne Peptid, abgezogen. Für die Datenanalyse wird die sensibilisierte Emission des Akzeptors  $E_{app,se}$  nach folgender Gleichung, welche auf K. KAWANO *et al.*<sup>163</sup> basiert, berechnet:

$$E_{app,se} = \left( \frac{F_{AD}}{F_A} - 1 \right) * \frac{\varepsilon_A(\lambda_D^{ex})}{\varepsilon_D(\lambda_D^{ex})} \quad (4)$$

$F_{AD}$  = Fluoreszenzintensität des Akzeptors in Gegenwart des Donors

$F_A$  = Fluoreszenzintensität des Akzeptors in Abwesenheit des Donors

$\varepsilon_A(\lambda_D^{ex})$  = Extinktionskoeffizient des Akzeptors bei der Anregungswellenlänge des Donors

$\varepsilon_D(\lambda_D^{ex})$  = Extinktionskoeffizient des Donors bei seiner Anregungswellenlänge

mit  $\varepsilon_A(\lambda_D^{ex})/\varepsilon_D(\lambda_D^{ex}) = 0,345$

Diese ermittelte sensibilisierte Emission des Akzeptors  $E_{app,se}$  wird gegen den Molenbruch des Donors  $x_D$  aufgetragen. An diese Daten wird eine Kurve angefitet, welche auf folgender Gleichung nach K. KAWANO *et al.*<sup>163</sup> basiert:

$$E_{app,se} = E * \frac{x_D}{1-x_D} * (1 - x_D^{n-1}) \quad (5)$$

$E$  = FRET-Effizienz

$x_D$  = Molenbruch des Donors

$n$  = Oligomerisierungsgrad

Ausgehend von dieser Kurvenanpassung kann der Oligomerisierungsgrad  $n$  bestimmt werden.

### 7.3.4 Bindungsaffinitätsmessungen

Für die Messungen werden LUVs ohne Peptid, wie bereits in Kapitel 7.3.1. für wasserlösliche Peptide beschrieben, hergestellt. Bei dem inneren und dem äußeren Puffer handelt es sich bei den Bindungsaffinitätsmessungen um 10 mM PIPES-Na<sub>2</sub> (pH 7). Zunächst werden, wie bereits in Kapitel 7.3.1. für wasserlösliche Peptide beschrieben, die Lipidkonzentration sowie die Konzentration des Peptids bestimmt. Die Messungen werden bei 22 °C und einem Gesamtvolumen von 1,5 ml in der Küvette unter ständigem Rühren durchgeführt. Die Anregungswellenlänge beträgt 280 nm und das Emissionsspektrum wird über den Bereich von 300-540 nm aufgenommen. Es werden verschiedene Spektren mit variierender Lipidkonzentration aufgenommen, wobei die Peptidkonzentration in der Küvette konstant bei 1 µM gehalten wird. Der äußere Puffer wird vorgelegt und nach Zugabe der LUVs wird die Probe zur Einstellung des Gleichgewichts 5 min inkubiert und danach direkt ein Vesikelspektrum aufgenommen. Nach der Zugabe des Peptids und einem weiteren 5-minütigen Inkubationsschritt wird erneut ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen, von welchem das



korrespondierende Vesikelspektrum abgezogen wird. Um einen Basiswert zu erhalten wird zudem auch ein reines Pufferspektrum aufgenommen und durch Zugabe des Peptids wird das Spektrum eines ungebundenen Peptids in Lösung erhalten. Die Lipidkonzentration wird nun soweit erhöht, bis keine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums mehr ersichtlich ist. Das Spektrum, welches bei der höchsten Lipidkonzentration aufgenommen wird, entspricht dem eines vollständig gebundenen Peptids. Bei allen Spektren wird der Fluoreszenzwert bei der Wellenlänge abgelesen, bei welcher das Fluoreszenzmaximums des vollständig gebundenen Zustands des Peptids liegt. Die Datenanalyse erfolgt basierend auf M. N. MELO *et al.*<sup>171</sup> und N. C. SANTOS *et al.*<sup>170</sup>. Die verschiedenen Fluoreszenzwerte  $F(c_L)$  werden gegen die entsprechende Lipidkonzentration  $c_L$  aufgetragen, wobei ein Fit, welcher einer Adsorptionsisotherme entspricht, an die folgende Funktion gelegt wird:

$$F(c_L) = F_L \frac{c_L K_a}{(1+c_L K_a)} + F_P \quad (8)$$

$F(c_L)$  = Tryptophan-Fluoreszenz bei einer Lipidkonzentration  $c_L$

$F_L$  = Tryptophan-Fluoreszenz des lipidgebundenen Peptids ( $c_L \rightarrow \infty$ )

$c_L$  = gegebene Lipidkonzentration [mol/l]

$K_a$  = Assoziationskonstante [l/mol]

$F_P$  = Tryptophan-Fluoreszenz des Peptids in reinem Puffer

Für die Bestimmung des molaren Anteils an lipidgebundenen Peptids  $x_L$  wird von den Fluoreszenzwerten  $F(c_L)$  die Fluoreszenz des Peptids in Puffer  $F_P$  subtrahiert und anschließend durch den Grenzwert der Adsorptionsisotherme  $F_L$  dividiert. Somit gilt:

$$x_L = \frac{c_L K_a}{(1+c_L K_a)} \quad (9)$$

Somit kann aus der durch den Fit erhaltenen Adsorptionsisotherme die Assoziationskonstante  $K_a$  ermittelt werden und anhand nachfolgender Gleichung kann der Verteilungskoeffizient  $K_p$  berechnet werden:

$$K_a = K_p * \gamma_L \quad (10)$$

$K_p$  = Verteilungskoeffizient

$\gamma_L$  = molares Volumen der Lipide in ihrer flüssigkristallinen Phase [ $M^{-1}$ ]

## METHODEN

Für die Ermittlung des molaren Volumens der Lipide in ihrer flüssigkristallinen Phase wird als Näherung die Dichte von Wasser verwendet<sup>185</sup>.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Grundstruktur des Phagen T4 .....	2
Abbildung 2: Lytischer Zyklus von Bakteriophagen .....	4
Abbildung 3: Lysogener und pseudolysogener Zyklus von Bakteriophagen .....	5
Abbildung 4: Aufbau der Zellhülle von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien.....	6
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Peptidoglykans am Beispiel von Gram-negativen <i>E. coli</i> Bakterien .....	7
Abbildung 6: Lysemechanismen zur Freisetzung der neu assemblierten Phagen .....	10
Abbildung 7: Holinklassen .....	12
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Angriffspunkte der Endolysine im Peptidoglykan von <i>E. coli</i> .....	14
Abbildung 9: Prototypen der Endolysine .....	15
Abbildung 10: Modell der Spanin-Strukturen und des Mechanismus der Zerstörung der äußeren Membran .....	17
Abbildung 11: Lyse-Genkassette des Phagen $\lambda$ und des lambdoiden Phagen $\phi 21$ .....	18
Abbildung 12: Membrantopologie des Holins S105 und des Antiholins S107 des Phagen $\lambda$ ..	20
Abbildung 13: Membrantopologie des Pinholins S <sup>21</sup> 68 und des Antipinholins S <sup>21</sup> 71 des Phagen $\phi 21$ .....	21
Abbildung 14: Primärstruktur des Antipinholins S <sup>21</sup> 71 des Phagen $\phi 21$ .....	22
Abbildung 15: <i>Helical wheel plot</i> der TMD1 und mögliche Wechselwirkungen zwischen der TMD1 und der TMD2.....	24
Abbildung 16: SCAM-Analyse verschiedener Cystein-Mutanten des Pinholins S <sup>21</sup> 68.....	26
Abbildung 17: Postulierte Topologie der TMDs des Pinholins S <sup>21</sup> 68 und der irs <sup>21</sup> 68 Mutante .....	28
Abbildung 18: Visualisierung und Oligomerisierungsgrad der durch Pinholine gebildeten Löcher .....	29
Abbildung 19: Postuliertes Modell für den Mechanismus der Lochbildung des Pinholins S <sup>21</sup> 68 des Phagen $\phi 21$ .....	31
Abbildung 20: <i>Helical wheel plot</i> der TMD2 des Pinholins S <sup>21</sup> 68.....	34
Abbildung 21: CD-Basisspektren der reinen Sekundärstrukturelemente.....	36
Abbildung 22: Übersicht der Lipidstrukturen.....	37
Abbildung 23: Qualitative Sekundärstrukturanalyse der TMD2 in Lipidvesikeln mit unterschiedlicher Acylkettenlänge.....	38

Abbildung 24: Charakteristische OCD-Spektren von $\alpha$ -helikalen Peptiden in Membranen....	39
Abbildung 25: SROCD-Spektren der TMD2 in Lipiden mit unterschiedlichem Sättigungsgrad der Lipidacylketten .....	41
Abbildung 26: 1D-Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum eines $\alpha$ -helikalen Peptids in orientierten Lipiddoppelschichten .....	43
Abbildung 27: Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren der $^{15}\text{N}$ -L <sub>47</sub> markierten TMD2 in Lipiden mit gesättigten Acylketten.....	44
Abbildung 28: Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren der $^{15}\text{N}$ -L <sub>47</sub> markierten TMD2 in Lipiden mit einfach ungesättigten Acylketten.....	46
Abbildung 29: Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren verschiedener selektiv $^{15}\text{N}$ -markierter TMD2 in DMPC .....	48
Abbildung 30: 2D-SAMMY-Spektren verschiedener selektiv $^{15}\text{N}$ -markierter TMD2 und <i>helical wheel plot</i> der TMD2.....	50
Abbildung 31: Struktur von POPC (16:0-18:1) .....	51
Abbildung 32: SRCD-Spektrum der TMD2 in POPC Vesikeln.....	52
Abbildung 33: Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messung der $^{15}\text{N}$ -L <sub>47</sub> markierten TMD2 in POPC.....	53
Abbildung 34: Struktur des verwendeten Fluorophor-Quencher-Paares .....	54
Abbildung 35: Schematische Darstellung des ANTS/DPX-Leakage-Experiments.....	55
Abbildung 36: ANTS/DPX-Leakage-Messungen der TMD2 in POPC LUVs .....	56
Abbildung 37: Struktur des verwendeten Cardiolipins und Lipidkopfgruppenstruktur von verschiedenen Lipiden .....	57
Abbildung 38: SRCD- und SROCD-Spektren der TMD2 in Lipidsystemen mit unterschiedlichen Lipidkopfgruppen .....	59
Abbildung 39: Einfluss unterschiedlicher Lipidkopfgruppen auf das durch die TMD2 induzierte Leakage .....	61
Abbildung 40: Einfluss der hydrophoben Dicke der Membran auf das durch die TMD2 induzierte Leakage .....	62
Abbildung 41: <i>Helical mesh</i> der TMD2 des Pinholins S <sup>21</sup> 68.....	63
Abbildung 42: SRCD- und SROCD-Spektren der verschiedenen Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 in POPC .....	65
Abbildung 43: ANTS/DPX-Leakage-Messungen der TMD2 G <sub>40</sub> AG <sub>43</sub> AS <sub>44</sub> AG <sub>48</sub> A in POPC .	67
Abbildung 44: ANTS/DPX-Leakage Messungen von Einfachmutanten der TMD2.....	69

Abbildung 45: ANTS/DPX-Leakage-Messungen verschiedener Glycin-Zipper Mutanten der TMD2 in POPC LUVs.....	70
Abbildung 46: Struktur der verwendeten Fluorescein-Fluorophore .....	71
Abbildung 47: Schematischer Ablauf der Fluorescein-Leakage-Messungen.....	72
Abbildung 48: Fluorescein-Leakage-Messungen der TMD2 in POPC LUVs .....	74
Abbildung 49: Fluorescein-Leakage-Messungen der TMD2 in DErPC LUVs.....	75
Abbildung 50: Analyse des Oligomerisierungsgrads der TMD2 in POPC und POPC/POPG Vesikeln mittels FRET .....	78
Abbildung 51: <i>Helical wheel plot</i> der TMD1 des Pinholins S <sup>21</sup> 68.....	79
Abbildung 52: SRCD-Spektren der TMD1 .....	80
Abbildung 53: ANTS/DPX-Leakage-Messungen und Bindungsisotherme der TMD1 in POPC LUVs .....	82
Abbildung 54: Bindungsisotherme der TMD1 in POPC/POPG (7:3) LUVs .....	83
Abbildung 55: ANTS/DPX-Leakage-Messungen der TMD1 in POPC/POPG (7:3) LUVs ....	84
Abbildung 56: Festkörper- <sup>15</sup> N-NMR-Messungen der <sup>15</sup> N-L <sub>45</sub> TMD2 und des <sup>15</sup> N-A <sub>12</sub> , L <sub>45</sub> Antipinholins in POPC Membranen .....	88
Abbildung 57: ANTS/DPX-Leakage Messungen der TMD2 und des Pinholins S <sup>21</sup> 68 in POPC LUVs .....	91
Abbildung 58: Interpretation der FRET-Ergebnisse der TMD2.....	99
Abbildung 59: SRCD-Spektrum des Pinholins S <sup>21</sup> 68 in POPC Vesikeln .....	100
Abbildung 60: Festkörper- <sup>15</sup> N-NMR-Messungen des selektiv <sup>15</sup> N-markierten Antipinholins und Pinholins in POPC.....	102
Abbildung 61: Membranausrichtung der TMD2 sowie <i>helical mesh</i> der TMD2 und TMD1 des Pinholins S <sup>21</sup> 68 .....	104
Abbildung 62: Neues Struktur- und Funktionsmodell des Pinholins S <sup>21</sup> 68 des Phagen $\phi$ 21.	106
Abbildung 63: Definition des Rotationswinkels $\rho$ .....	121
Abbildung 64: SROCD-Spektren der TMD2 in Lipiden mit gesättigten und einfach ungesättigten Lipidacylketten.....	151
Abbildung 65: Festkörper- <sup>31</sup> P-NMR Spektren der <sup>15</sup> N-L <sub>47</sub> markierten TMD2 in verschiedenen Lipiden .....	152
Abbildung 66: Festkörper- <sup>31</sup> P-NMR Spektren der <sup>15</sup> N-L <sub>47</sub> markierten TMD2 in verschiedenen Lipiden .....	153
Abbildung 67: Festkörper- <sup>31</sup> P-NMR Spektren selektiv <sup>15</sup> N-markierter TMD2 in DMPC.....	154

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aminosäuresequenzen der chemisch synthetisierten TMD2 Fragmente .....	34
Tabelle 2: Eigenschaften der verwendeten Lipide .....	37
Tabelle 3: Übersicht der verschiedenen Glycin-Zipper Mutanten der TMD2.....	64
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Fluorescein-Derivate.....	73
Tabelle 5: TMD2 Fragmente für die FRET-Spektroskopie.....	76
Tabelle 6: Aminosäuresequenz des chemisch synthetisierten TMD1 Fragments.....	78
Tabelle 7: Pipettierschema für die Herstellung der Proben für die FRET-Messungen.....	126

**10 Abkürzungsverzeichnis**

°	Grad
%	Prozent
Å	Angström
Abb.	Abbildung
ANTS	6-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonsäure
a. u.	<i>arbitrary units</i>
°C	Grad Celsius
CSA	<i>Chemical Shift Anisotropy</i>
CD	<i>Circular Dichroism</i> , Zirkulardichroismus
CF	Carboxyfluorescein
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
CP	<i>Cross Polarisation</i>
C-terminal	Carboxyterminus
CW	<i>Continous Wave</i>
d	Durchmesser
D	dimensional
Da	Dalton
DAP	2,6-Diaminopimelinsäure
d <sub>c</sub>	Hydrophobe Dicke
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DDM	Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid
DDPC	1,2-Didecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
deg	<i>degree</i>
DEiPC	1,2-Dieicosenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DErPC	1,2-Dierucoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DLPC	1,2-Dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
DMoPC	1,2-Dimyristoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPoPC	1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DPX	p-Xylol-bis(N-pyridiniumbromid)
DSP	Dithiobis(succinimidylpropionat)
E <sub>app,se</sub>	sensibilisierte Akzeptoremission
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPR	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i>
FD	Fluorescein-isothiocyanat Dextran
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
K <sub>p</sub>	Verteilungskoeffizient
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kaliumsulfat
l	Liter
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicle</i>
M	Molar
MD	<i>Molecular Dynamics</i> (Molekulardynamik)
mdeg	<i>millidegree</i>
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MRE	<i>Mean Residue Ellipticity</i>
MRSA	methicillinresistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MTSES	Natrium-(2-sulfonatoethyl)methanthiosulfonat



ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MTSL	S-(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methylmethanesulfonothioat
n	Oligomerisierungsgrad
Ni(II)EDDA	Nickel(II)-Ethylendiamindiessigsäure
nm	Nanometer
N-terminal	Aminoterminal
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernspinresonanz)
OCD	<i>Oriented Circular Dichroism</i> (orientierter Zirkulardichroismus)
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PISA	<i>Polarity Index Slant Angle</i>
PISEMA	<i>Polarization Inversion Spin Exchange at Magic Angle</i>
P/L	Peptid- zu Lipidverhältnis
PMF	protonenmotorische Kraft
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
ppm	<i>parts per million</i>
$\rho$	Rotationswinkel
$r_0$	Förster-Abstand
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
s	Sekunde(n)
SAR	<i>Signal Anchor Release</i>
SCAM	<i>Substituted-Cysteine Accessibility Method</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodiumdodecylsulfate</i> )
SDSL	<i>Site-Directed Spin Labeling</i>
<i>sec</i>	sekretorischer Translokationsweg
$S_{mol}$	Ordnungsparameter
SPINAL	<i>Small Phase Incremental Alternation</i>
SR	<i>Synchrotron Radiation based</i> (Synchrotron basiert)
ss	<i>singel stranded</i>
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicle</i>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\tau$	Neigungswinkel
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
$T_m$	Phasenübergangstemperatur des Hauptübergangs der Lipide (Übergang von der Gelphase in die flüssigkristalline Phase)
TMD(s)	Transmembrandomäne(n)
TOCL	1',3'-Bis[1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho]-glycerol
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{mol}$	Mikromol
UV	Ultraviolett
$x_D$	Donormolenbruch

## 11 Literaturverzeichnis

1. Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L. & Turner, P. E. Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host Microbe* **25**, 219–232 (2019).
2. Levy, S. B. & Marshall, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **10**, S122–S129 (2004).
3. Neu, H. C. The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**, 1064–1073 (1992).
4. Pires, D. P., Cleto, S., Sillankorva, S., Azeredo, J. & Lu, T. K. Genetically engineered phages: a review of advances over the last decade. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**, 523–543 (2016).
5. Craft, K. M., Nguyen, J. M., Berg, L. J. & Townsend, S. D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *MedChemComm* **10**, 1231–1241 (2019).
6. World Health Organization (WHO). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.* (2017).
7. Twort, F. W., Lond, L. R. C. P. & S., M. R. C. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet* **186**, 1241–1243 (1915).
8. D’Hèrelle, F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C. R. Acad. Sci* **165**, 373–375 (1917).
9. Duckworth, D. H. & Gulig, P. A. Bacteriophages: Potential treatment for bacterial infections. *BioDrugs* **16**, 57–62 (2002).
10. Ghosh, D., Kohli, A. G., Moser, F., Endy, D. & Belcher, A. M. Refactored M13 bacteriophage as a platform for tumor cell imaging and drug delivery. *ACS Synth. Biol.* **1**, 576–582 (2012).
11. Nam, K. T., Peelle, B. R., Lee, S. W. & Belcher, A. M. Genetically driven assembly of nanorings based on the M13 virus. *Nano Lett.* **4**, 23–27 (2004).
12. Lee, S. W., Lee, S. K. & Belcher, A. M. Virus-based alignment of inorganic, organic, and biological nanosized materials. *Adv. Mater.* **15**, 689–692 (2003).
13. Rippon, J. E. The classification of bacteriophages lysing staphylococci. *J. Hyg. (Lond).* **54**, 213–226 (1956).
14. Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Dempsey, D. M., *et al.* Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Arch. Virol.* **164**, 2417–2429 (2019).
15. Leiman, P. G., Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F. & Rossmann, M. G. Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2356–2370 (2003).

16. Campbell, A. The future of bacteriophage biology. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 471–477 (2003).
17. Edgar, R., Rokney, A., Feeney, M., Semsey, S., Kessel, M., *et al.* Bacteriophage infection is targeted to cellular poles. *Mol. Microbiol.* **68**, 1107–1116 (2008).
18. Wurtz, M. Bacteriophage structure. *Electron Microsc. Rev.* **5**, 283–309 (1992).
19. Yap, M. L., Klose, T., Arisaka, F., Speir, J. A., Veesler, D., *et al.* Role of bacteriophage T4 baseplate in regulating assembly and infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 2654–2659 (2016).
20. Makowski, L. Phage display: Structure, assembly and engineering of filamentous bacteriophage M13. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 225–230 (1994).
21. Sanger, F., Coulson, A. R., Friedmann, T., Air, G. M., Barrell, B. G., *et al.* The nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174. *J. Mol. Biol.* **125**, 225–246 (1978).
22. Mesyanzhinov, V. V., Robben, J., Grymonprez, B., Kostyuchenko, V. A., Bourkaltseva, M. V., *et al.* The genome of bacteriophage  $\phi$ KZ of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **317**, 1–19 (2002).
23. Lindberg, A. A. Bacteriophage receptors. *Annu. Rev. Microbiol.* **27**, 205–241 (1973).
24. Ellis, E. L. & Delbrück, M. The growth of bacteriophages. *J. Gen. Physiol.* **22**, 365–384 (1939).
25. Vollmer, W., Blanot, D. & De Pedro, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 149–167 (2008).
26. Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Szwajcer Dey, E. & Novik, G. I. Bacteriophage Receptors, Mechanisms of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell. *Polish J. Microbiol.* **59**, 145–155 (2010).
27. Moody, M. F. Sheath of bacteriophage T4. III. Contraction mechanism deduced from partially contracted sheaths. *J. Mol. Biol.* **80**, 613–635 (1973).
28. Hu, B., Margolin, W., Molineux, I. J. & Liu, J. Structural remodeling of bacteriophage T4 and host membranes during infection initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, E4919–E4928 (2015).
29. Maghsoodi, A., Chatterjee, A., Andricioaei, I. & Perkins, N. C. How the phage T4 injection machinery works including energetics, forces, and dynamic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 25097–25105 (2019).
30. Wang, I. N., Dykhuizen, D. E. & Slobodkin, L. B. The evolution of phage lysis timing. *Evol. Ecol.* **10**, 545–558 (1996).
31. Young, R. Bacteriophage lysis: Mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.* **56**, 430–481 (1992).
32. Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., *et al.* A new perspective on lysogeny: Prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 641–650 (2015).

33. Lwoff, A. Lysogeny. *Bacteriol. Rev.* **17**, 269–337 (1953).
34. Ripp, S. & Miller, R. V. The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiology* **143**, 2065–2070 (1997).
35. Catalão, M. J., Gil, F., Moniz-Pereira, J., São-José, C. & Pimentel, M. Diversity in bacterial lysis systems: Bacteriophages show the way. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 554–571 (2013).
36. Schleifer, K. H. & Kandler, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**, 407–477 (1972).
37. Ruiz, N., Kahne, D. & Silhavy, T. J. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 57–66 (2006).
38. Neuhaus, F. C. & Baddiley, J. A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 686–723 (2003).
39. Pajerski, W., Ochonska, D., Brzychczy-Wloch, M., Indyka, P., Jarosz, M., *et al.* Attachment efficiency of gold nanoparticles by Gram-positive and Gram-negative bacterial strains governed by surface charges. *J. Nanopart. Res.* **21**, (2019).
40. Yasuhiro, K., Yuzuru, A. & Shoshichi, N. Composition and turnover of the phospholipids in Escherichia coli. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Lipids Lipid Metab.* **144**, 382–390 (1967).
41. Yamagami, A., Yoshioka, T. & Kanemasa, Y. Wild in Strains Phospholipid and of Certain Composition Enteric between Streptomycin Resistant Bacteria. *Japan J. Microbiol.* **14**, 174–176 (1970).
42. Loessner, M. J. Bacteriophage endolysins - current state of research and applications. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 480–487 (2005).
43. Smit, J., Kamio, Y. & Nikaido, H. Outer membrane of Salmonella typhimurium: Chemical analysis and freeze-fracture studies with lipopolysaccharide mutants. *J. Bacteriol.* **124**, 942–958 (1975).
44. Lugtenberg, E. J. J. & Peters, R. Distribution of lipids in cytoplasmic and outer membranes of Escherichia coli K12. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Lipids Lipid Metab.* **441**, 38–47 (1976).
45. Nikaido, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593–656 (2003).
46. Schulz, G. E. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1565**, 308–317 (2002).
47. Rakonjac, J., Bennett, N. J., Spagnuolo, J., Gagic, D. & Russel, M. Filamentous bacteriophage: Biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr. Issues Mol. Biol.* **13**, 51–76 (2011).

48. Russel, M. Moving through the membrane with filamentous phages. *Trends Microbiol.* **3**, 223–228 (1995).
49. Spratt, B. G. Biochemical and genetical approaches to the mechanism of action of penicillin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **289**, 273–283 (1980).
50. Bernhardt, T. G., Wang, I. N., Struck, D. K. & Young, R. Breaking free: ‘Protein antibiotics’ and phage lysis. *Res. Microbiol.* **153**, 493–501 (2002).
51. Bernhardt, T. G., Struck, D. K. & Young, R. The lysis protein E of  $\phi$ X174 is a specific inhibitor of the MraY-catalyzed step in peptidoglycan synthesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 6093–6097 (2001).
52. Zheng, Y., Struck, D. K., Bernhardt, T. G. & Young, R. Genetic analysis of MraY inhibition by the  $\phi$ X174 protein E. *Genetics* **180**, 1459–1466 (2008).
53. Altman, E., Altman, R. K., Garrett, J. M., Grimaila, R. J. & Young, R. S gene product: Identification and membrane localization of a lysis control protein. *J. Bacteriol.* **155**, 1130–1137 (1983).
54. Garrett, J. M. & Young, R. Lethal action of bacteriophage  $\lambda$  S gene. *J. Virol.* **44**, 886–892 (1982).
55. White, R., Chiba, S., Pang, T., Dewey, J. S., Savva, C. G., *et al.* Holin triggering in real time. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 798–803 (2011).
56. Savva, C. G., Dewey, J. S., Moussa, S. H., To, K. H., Holzenburg, A., *et al.* Stable micron-scale holes are a general feature of canonical holins. *Mol. Microbiol.* **91**, 57–65 (2014).
57. Rennell, D. & Poteete, A. R. Phage P22 lysis genes: Nucleotide sequences and functional relationships with T4 and  $\lambda$  genes. *Virology* **143**, 280–289 (1985).
58. To, K. H., Dewey, J., Weaver, J., Park, T. & Young, R. Functional analysis of a class I holin, P2 Y. *J. Bacteriol.* **195**, 1346–1355 (2013).
59. Young, R. Phage lysis: Do we have the hole story yet? *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 790–797 (2013).
60. Young, R., Wang, I. N. & Roof, W. D. Phages will out: Strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol.* **8**, 120–128 (2000).
61. Xu, M., Arulandu, A., Struck, D. K., Swanson, S., Sacchettini, J. C., *et al.* Disulfide isomerization after membrane release of its SAR domain activates P1 lysozyme. *Science* **307**, 113–117 (2005).
62. Xu, M., Struck, D. K., Deaton, J., Wang, I. N. & Young, R. A signal-arrest-release sequence mediates export and control of the phage P1 endolysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 6415–6420 (2004).
63. Park, T., Struck, D. K., Deaton, J. F. & Young, R. Topological dynamics of holins in programmed bacterial lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 19713–19718 (2006).

64. Sun, Q., Kutty, G. F., Arockiasamy, A., Xu, M., Young, R., *et al.* Regulation of a muralytic enzyme by dynamic membrane topology. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1192–1194 (2009).
65. Park, T., Struck, D. K., Dankenbring, C. A. & Young, R. The pinholin of lambdoid phage 21: Control of lysis by membrane depolarization. *J. Bacteriol.* **189**, 9135–9139 (2007).
66. Pang, T., Savva, C. G., Fleming, K. G., Struck, D. K. & Young, R. Structure of the lethal phage pinhole. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 18966–18971 (2009).
67. Pang, T., Park, T. & Young, R. Mapping the pinhole formation pathway of S<sup>21</sup>. *Mol. Microbiol.* **78**, 710–719 (2010).
68. Briers, Y., Peeters, L. M., Volckaert, G. & Lavigne, R. The lysis cassette of bacteriophage  $\phi$ KMV encodes a signal-arrest-release endolysin and a pinholin. *Bacteriophage* **1**, 25–30 (2011).
69. Wang, I.-N., Smith, D. L. & Young, R. Holins: The protein clocks of bacteriophage infections. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 799–825 (2000).
70. Young, R. & Bläsi, U. Holins: Form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**, 191–205 (1995).
71. Young, R. Bacteriophage holins: Deadly diversity. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**, 21–36 (2002).
72. Saier, M. H. & Reddy, B. L. Holins in bacteria, eukaryotes, and archaea: Multifunctional xenologues with potential biotechnological and biomedical applications. *J. Bacteriol.* **197**, 7–17 (2015).
73. Reddy, B. L. & Saier Jr, M. H. Topological and phylogenetic analyses of bacterial holin families and superfamilies. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828**, 2654–2671 (2013).
74. Ramanculov, E. & Young, R. Genetic analysis of the T4 holin: Timing and topology. *Gene* **265**, 25–36 (2001).
75. Graschopf, A. & Bläsi, U. Molecular function of the dual-start motif in the  $\lambda$  S holin. *Mol. Microbiol.* **33**, 569–582 (1999).
76. Bonovich, M. T. & Young, R. Dual start motif in two lambdoid S genes unrelated to  $\lambda$  S. *J. Bacteriol.* **173**, 2897–2905 (1991).
77. Lu, M. J. & Henning, U. Lysis protein T of bacteriophage T4. *Mol. Gen. Genet.* **235**, 253–258 (1992).
78. Navarre, W. W., Ton-That, H., Faull, K. F. & Schneewind, O. Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage  $\phi$ 11: Identification of a D-alanyl-glycine endopeptidase activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 15847–15856 (1999).
79. Kutty, G. F., Xu, M., Struck, D. K., Summer, E. J. & Young, R. Regulation of a phage endolysin by disulfide caging. *J. Bacteriol.* **192**, 5682–5687 (2010).

80. Kakikawa, M., Yokoi, K. J., Kimoto, H., Nakano, M., Kawasaki, K. I., *et al.* Molecular analysis of the lysis protein Lys encoded by *Lactobacillus plantarum* phage  $\phi$ g1e. *Gene* **299**, 227–234 (2002).
81. Schmelcher, M. & Loessner, M. J. Bacteriophage endolysins: Applications for food safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* **37**, 76–87 (2016).
82. Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G. & Maciejewska, B. Bacteriophages and phage-derived proteins - application approaches. *Curr. Med. Chem.* **22**, 1757–1773 (2015).
83. Obeso, J. M., Martínez, B., Rodríguez, A. & García, P. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage  $\phi$ H5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* **128**, 212–218 (2008).
84. Berry, J., Summer, E. J., Struck, D. K. & Young, R. The final step in the phage infection cycle: The Rz and Rz1 lysis proteins link the inner and outer membranes. *Mol. Microbiol.* **70**, 341–351 (2008).
85. Berry, J., Rajaure, M., Pang, T. & Young, R. The spanin complex is essential for lambda lysis. *J. Bacteriol.* **194**, 5667–5674 (2012).
86. Cahill, J., Rajaure, M., O’Leary, C., Sloan, J., Marrufo, A., *et al.* Genetic analysis of the lambda spanins Rz and Rz1: Identification of functional domains. *G3 Genes, Genomes, Genet.* **7**, 741–753 (2017).
87. Kędzierska, S., Wawrzynów, A. & Taylor, A. The Rz1 gene product of bacteriophage lambda is a lipoprotein localized in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Gene* **168**, 1–8 (1996).
88. Summer, E. J., Berry, J., Tran, T. A. T., Niu, L., Struck, D. K., *et al.* Rz/Rz1 lysis gene equivalents in phages of Gram-negative hosts. *J. Mol. Biol.* **373**, 1098–1112 (2007).
89. Berry, J. D., Rajaure, M. & Young, R. Y. Spanin function requires subunit homodimerization through intermolecular disulfide bonds. *Mol. Microbiol.* **88**, 35–47 (2013).
90. Jahn, R., Lang, T. & Südhof, T. C. Membrane fusion. *Cell* **112**, 519–533 (2003).
91. Rajaure, M., Berry, J., Kongari, R., Cahill, J. & Young, R. Membrane fusion during phage lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 5497–5502 (2015).
92. Berry, J., Savva, C., Holzenburg, A. & Young, R. The lambda spanin components Rz and Rz1 undergo tertiary and quaternary rearrangements upon complex formation. *Protein Sci.* **19**, 1967–1977 (2010).
93. Kongari, R., Snowden, J., Berry, J. D. & Young, R. Localization and regulation of the T1 unimolecular spanin. *J. Virol.* **92**, 1–17 (2018).
94. Wang, I. N. Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics* **172**, 17–26 (2006).
95. Barenboim, M., Chang, C. Y., Dib Hajj, F. & Young, R. Characterization of the dual start motif of a class II holin gene. *Mol. Microbiol.* **32**, 715–727 (1999).



96. Zhang, N. & Young, R. Complementation and characterization of the nested Rz and Rz1 reading frames in the genome of bacteriophage  $\lambda$ . *Mol. Gen. Genet.* **262**, 659–667 (1999).
97. Hanych, B., Kędzierska, S., Walderich, B., Uznański, B. & Taylor, A. Expression of the Rz gene and the overlapping Rz1 reading frame present at the right end of the bacteriophage lambda genome. *Gene* **129**, 1–8 (1993).
98. Graschopf, A. & Bläsi, U. Functional assembly of the  $\lambda$  S holin requires periplasmic localization of its N-terminus. *Arch. Microbiol.* **172**, 31–39 (1999).
99. Drew, D. L., Ahammad, T., Serafin, R. A., Butcher, B. J., Clowes, K. R., *et al.* Solid phase synthesis and spectroscopic characterization of the active and inactive forms of bacteriophage S21 pinholin protein. *Anal. Biochem.* **567**, 14–20 (2019).
100. Pang, T., Fleming, T. C., Pogliano, K. & Young, R. Visualization of pinholin lesions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E2054–E2063 (2013).
101. Pang, T., Park, T. & Young, R. Mutational analysis of the S21 pinholin. *Mol. Microbiol.* **76**, 68–77 (2010).
102. Ahammad, T., Drew, D. L., Sahu, I. D., Serafin, R. A., Clowes, K. R., *et al.* Continuous wave electron paramagnetic resonance spectroscopy reveals the structural topology and dynamic properties of active pinholin S<sup>21</sup>68 in a lipid bilayer. *J. Phys. Chem. B* **123**, 8048–8056 (2019).
103. Ahammad, T., Drew, D. L., Khan, R. H., Sahu, I. D., Faul, E., *et al.* Structural dynamics and topology of the inactive form of S21 holin in a lipid bilayer using continuous-wave electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **124**, 5370–5379 (2020).
104. Zhu, Q. & Casey, J. R. Topology of transmembrane proteins by scanning cysteine accessibility mutagenesis methodology. *Methods* **41**, 439–450 (2007).
105. Altenbach, C., Flitsch, S. L., Khorana, H. G. & Hubbell, W. L. Structural studies on transmembrane proteins. 2. Spin labeling of bacteriorhodopsin mutants at unique cysteines. *Biochemistry* **28**, 7806–7812 (1989).
106. Hubbell, W. L. & Altenbach, C. Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 566–573 (1994).
107. Altenbach, C., Froncisz, W., Hemker, R., Mchaourab, H. & Hubbell, W. L. Accessibility of nitroxide side chains: Absolute Heisenberg exchange rates from power saturation EPR. *Biophys. J.* **89**, 2103–2112 (2005).
108. Altenbach, C., Marti, T., Khorana, H. G. & Hubbell, W. L. Transmembrane protein structure: Spin labeling of bacteriorhodopsin mutants. *Science* **248**, 1088–1092 (1990).
109. Altenbach, C., Greenhalgh, D. A., Khorana, H. G. & Hubbell, W. L. A collision gradient method to determine the immersion depth of nitroxides in lipid bilayers: Application to spin-labeled mutants of bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1667–1671 (1994).

110. Kim, S., Jeon, T. J., Oberai, A., Yang, D., Schmidt, J. J., *et al.* Transmembrane glycine zippers: Physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 14278–14283 (2005).
111. Russ, W. P. & Engelman, D. M. The GxxxG motif: A framework for transmembrane helix-helix association. *J. Mol. Biol.* **296**, 911–919 (2000).
112. Granseth, E., Von Heijne, G. & Elofsson, A. A study of the membrane-water interface region of membrane proteins. *J. Mol. Biol.* **346**, 377–385 (2005).
113. Ulmschneider, M. B., Sansom, M. S. P. & Di Nola, A. Properties of integral membrane protein structures: Derivation of an implicit membrane potential. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **59**, 252–265 (2005).
114. Von Heijne, G. Membrane-protein topology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 909–918 (2006).
115. Reißer, S., Prock, S., Heinzmann, H. & Ulrich, A. S. Protein ORIGAMI: A program for the creation of 3D paper models of folded peptides. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **46**, 403–409 (2018).
116. Greenfield, N. J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.* **235**, 1–10 (1996).
117. Berova, N., Nakanishi, K. & Woody, R. W. *Circular dichroism: Principles and applications*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2000).
118. Pelton, J. T. & McLean, L. R. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal. Biochem.* **277**, 167–176 (2000).
119. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1751**, 119–139 (2005).
120. Greenfield, N. J. Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis. *Trends Anal. Chem.* **18**, 236–244 (1999).
121. Warschawski, D. E., Arnold, A. A., Beaugrand, M., Gravel, A., Chartrand, É., *et al.* Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808**, 1957–1974 (2011).
122. Marsh, D. Energetics of hydrophobic matching in lipid-protein interactions. *Biophys. J.* **94**, 3996–4013 (2008).
123. Bürck, J., Roth, S., Windisch, D., Wadhvani, P., Moss, D., *et al.* UV-CD12: Synchrotron radiation circular dichroism beamline at ANKA. *J. Synchrotron Radiat.* **22**, 844–852 (2015).
124. Miles, A. J. & Wallace, B. A. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 39–51 (2006).

125. Kumagai, P. S., DeMarco, R. & Lopes, J. L. S. Advantages of synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy to study intrinsically disordered proteins. *Eur. Biophys. J.* **46**, 599–606 (2017).
126. Wu, Y., Huang, H. W. & Olah, G. A. Method of oriented circular dichroism. *Biophys. J.* **57**, 797–806 (1990).
127. Moffitt, W. Optical rotatory dispersion of helical polymers. *J. Chem. Phys.* **25**, 467–478 (1956).
128. Bürck, J., Roth, S., Wadhvani, P., Afonin, S., Kanithasen, N., *et al.* Conformation and membrane orientation of amphiphilic helical peptides by oriented circular dichroism. *Biophys. J.* **95**, 3872–3881 (2008).
129. Bürck, J., Wadhvani, P., Fanghänel, S. & Ulrich, A. S. Oriented circular dichroism: A method to characterize membrane-active peptides in oriented lipid bilayers. *Acc. Chem. Res.* **49**, 184–192 (2016).
130. Steger, L. M. E., Kohlmeyer, A., Wadhvani, P., Bürck, J., Strandberg, E., *et al.* Structural and functional characterization of the pore-forming domain of pinholin S<sup>2168</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 29637–29646 (2020).
131. Windisch, D., Ziegler, C., Grage, S. L., Bürck, J., Zeitler, M., *et al.* Hydrophobic mismatch drives the interaction of E5 with the transmembrane segment of PDGF receptor. *Biophys. J.* **109**, 737–749 (2015).
132. Strandberg, E., Esteban-Martín, S., Ulrich, A. S. & Salgado, J. Hydrophobic mismatch of mobile transmembrane helices: Merging theory and experiments. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**, 1242–1249 (2012).
133. Muhle-Goll, C., Hoffmann, S., Afonin, S., Grage, S. L., Polyansky, A. A., *et al.* Hydrophobic matching controls the tilt and stability of the dimeric platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) beta transmembrane segment. *J. Biol. Chem.* **287**, 26178–26186 (2012).
134. Strandberg, E. & Ulrich, A. S. NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides. *Concepts Magn. Reson. Part A* **23A**, 89–120 (2004).
135. Opella, S. J., Nevzorov, A., Mesleh, M. F. & Marassi, F. M. Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy. *Biochem Cell Biol.* **80**, 597–604 (2002).
136. Marassi, F. M., Ramamoorthy, A. & Opella, S. J. Complete resolution of the solid-state NMR spectrum of a uniformly <sup>15</sup>N-labeled membrane protein in phospholipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 8551–8556 (1997).
137. Jean-Francois, F. L., Dai, J., Yu, L., Myrick, A., Rubin, E., *et al.* Binding of MgtR, a Salmonella transmembrane regulatory peptide, to MgtC, a Mycobacterium tuberculosis virulence factor: A structural study. *J. Mol. Biol.* **426**, 436–446 (2014).
138. Lange, C., Müller, S. D., Walther, T. H., Bürck, J. & Ulrich, A. S. Structure analysis of the protein translocating channel TatA in membranes using a multi-construct approach. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1768**, 2627–2634 (2007).

139. Nevzorov, A. A. & Opella, S. J. A 'Magic Sandwich' pulse sequence with reduced offset dependence for high-resolution separated local field spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **164**, 182–186 (2003).
140. Nevzorov, A. A. & Opella, S. J. Selective averaging for high-resolution solid-state NMR spectroscopy of aligned samples. *J. Magn. Reson.* **185**, 59–70 (2007).
141. Wang, J., Denny, J., Tian, C., Kim, S., Mo, Y., *et al.* Imaging membrane protein helical wheels. *J. Magn. Reson.* **144**, 162–167 (2000).
142. Marassi, F. M. & Opella, S. J. A solid-state NMR index of helical membrane protein structure and topology. *J. Magn. Reson.* **144**, 150–155 (2000).
143. Marassi, F. M. & Opella, S. J. Simultaneous assignment and structure determination of a membrane protein from NMR orientational restraints. *Protein Sci.* **12**, 403–411 (2003).
144. Kučerka, N., Tristram-Nagle, S. & Nagle, J. F. Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. *J. Membr. Biol.* **208**, 193–202 (2006).
145. Wimley, W. C., Selsted, M. E. & White, S. H. Interactions between human defensins and lipid bilayers: Evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* **3**, 1362–1373 (1994).
146. Ellens, H., Bentz, J. & Szoka, F. C. H<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-Induced Fusion and Destabilization of Liposomes. *Biochemistry* **24**, 3099–3106 (1985).
147. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer Science+Business Media, 2006).
148. Epand, R. M. & Epand, R. F. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *J. Pept. Sci.* **17**, 298–305 (2011).
149. Strandberg, E., Tiltak, D., Ehni, S., Wadhvani, P. & Ulrich, A. S. Lipid shape is a key factor for membrane interactions of amphipathic helical peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**, 1764–1776 (2012).
150. Stutzin, A. A fluorescence assay for monitoring and analyzing fusion of biological membrane vesicles in vitro. *FEBS Lett.* **197**, 274–280 (1986).
151. Ladokhin, A. S., Selsted, M. E. & White, S. H. Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: Pore formation by melittin. *Biophys. J.* **72**, 1762–1766 (1997).
152. Clark Wooten, M. K., Koganti, V. R., Zhou, S., Rankin, S. E. & Knutson, B. L. Synthesis and nanofiltration membrane performance of oriented mesoporous silica thin films on macroporous supports. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 21806–21815 (2016).
153. Merck KGaA, Darmstadt & Germany and/or its affiliates. Fluorescein Isothiocyanate-Dextran. *Zugriffsdatum* 27.7.2020 <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/fluorescein-isothiocyanate-dextran.html#ref>.

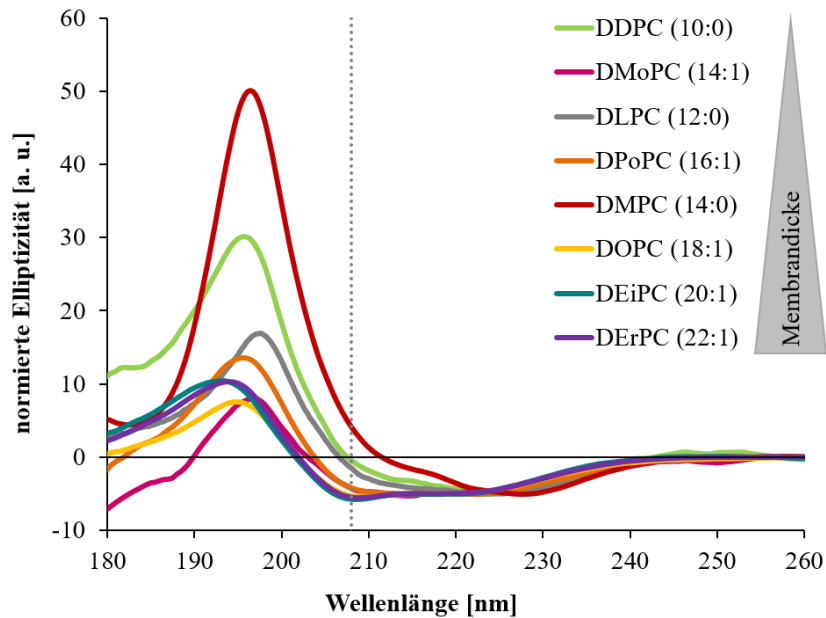
154. Bohrer, M. P., Deen, W. M., Robertson, C. R., Troy, J. L. & Brenner, B. M. Influence of molecular configuration on the passage of macromolecules across the glomerular capillary wall. *J. Gen. Physiol.* **74**, 583–593 (1979).
155. Ladokhin, A. S. & White, S. H. ‘Detergent-like’ permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1514**, 253–260 (2001).
156. Bechinger, B. Structure and function of membrane-lytic peptides. *Crit. Rev. Plant Sci.* **23**, 271–292 (2004).
157. Förster, T. Experimentelle und theoretische Untersuchung des zwischenmolekularen Übergangs von Elektronenanregungsenergie. *Zeitschrift für Naturforsch. A* **4**, 321–327 (1949).
158. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **437**, 55–75 (1948).
159. Sahoo, H. Förster resonance energy transfer - a spectroscopic nanoruler: Principle and applications. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **12**, 20–30 (2011).
160. Stryer, L. & Haugland, R. P. Energy transfer: A spectroscopic ruler. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **58**, 719–726 (1967).
161. Wu, P. G. & Brand, L. Resonance energy transfer: Methods and applications. *Anal. Biochem.* **218**, 1–13 (1994).
162. Adair, B. D. & Engelman, D. M. Glycophorin a helical transmembrane domains dimerize in phospholipid bilayers: A resonance energy transfer study. *Biochemistry* **33**, 5539–5544 (1994).
163. Kawano, K., Yano, Y., Omae, K., Matsuzaki, S. & Matsuzaki, K. Stoichiometric analysis of oligomerization of membrane proteins on living cells using coiled-coil labeling and spectral imaging. *Anal. Chem.* **85**, 3454–3461 (2013).
164. Woody, R. W. Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. *Eur. Biophys. J.* **23**, 253–262 (1994).
165. Grishina, I. B. & Woody, R. W. Contributions of tryptophan side chains to the circular dichroism of globular proteins: Exciton couplets and coupled oscillators. *Faraday Discuss.* **99**, 245–262 (1994).
166. Wallace, B. A. & Mao, D. Circular dichroism analyses of membrane proteins: An examination of differential light scattering and absorption flattening effects in large membrane vesicles and membrane sheets. *Anal. Biochem.* **142**, 317–328 (1984).
167. Miles, A. J. & Wallace, B. A. Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 4859–4872 (2016).
168. Dufourcq, J. & Faucon, J. F. Intrinsic fluorescence study of lipid-protein interactions in membrane models. Binding of melittin, an amphipathic peptide, to phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **467**, 1–11 (1977).

169. Jain, M. K., Rogers, J., Simpson, L. & Gierasch, L. M. Effect of tryptophan derivatives on the phase properties of bilayers. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **816**, 153–162 (1985).
170. Santos, N. C., Prieto, M. & Castanho, M. A. R. B. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: An emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1612**, 123–135 (2003).
171. Melo, M. N. & Castanho, M. A. R. B. Omiganan interaction with bacterial membranes and cell wall models. Assigning a biological role to saturation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1768**, 1277–1290 (2007).
172. Drew, D. L., Butcher, B., Sahu, I. D., Ahammad, T., Dixit, G., *et al.* Active S2168 and inactive S211RS pinholin interact differently with the lipid bilayer: A <sup>31</sup>P and <sup>2</sup>H solid state NMR study. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1862**, 183257 (2020).
173. Strandberg, E., Tremouilhac, P., Wadhvani, P. & Ulrich, A. S. Synergistic transmembrane insertion of the heterodimeric PGLa/magainin 2 complex studied by solid-state NMR. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1788**, 1667–1679 (2009).
174. Eisenberg, D., Weiss, R. M., Terwilliger, T. C. & Wilcox, W. Hydrophobic moments and protein structure. *Faraday Symp. Chem. Soc.* **17**, 109–120 (1982).
175. Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. & Wall, R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* **179**, 125–142 (1984).
176. Milo, R. & Phillips, R. *Cell Biology by the Numbers*. (Garland Science, Taylor and Francis Group, 2015).
177. Wien, F. & Wallace, B. A. Calcium fluoride micro cells for synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **59**, 1109–1113 (2005).
178. Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., *et al.* <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* **6**, 135–140 (1995).
179. Markley, J. L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C. W., Kaptein, R., *et al.* Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. *Eur. J. Biochem.* **12**, 1–23 (1998).
180. Levitt, M. H., Suter, D. & Ernst, R. R. Spin dynamics and thermodynamics in solid-state NMR cross polarization. *J. Chem. Phys.* **84**, 4243–4255 (1986).
181. Sinha, N., Grant, C. V, Wu, C. H., De Angelis, A. A., Howell, S. C., *et al.* SPINAL modulated decoupling in high field double- and triple-resonance solid-state NMR experiments on stationary samples. *J. Magn. Reson.* **177**, 197–202 (2005).
182. Fung, B. M., Khitrin, A. K. & Ermolaev, K. An improved broadband decoupling sequence for liquid crystals and solids. *J. Magn. Reson.* **142**, 97–101 (2000).

183. Sinha, N., Grant, C. V., Park, S. H., Brown, J. M. & Opella, S. J. Triple resonance experiments for aligned sample solid-state NMR of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N labeled proteins. *J. Magn. Reson.* **186**, 51–64 (2007).
184. Müller, S. D., De Angelis, A. A., Walther, T. H., Grage, S. L., Lange, C., *et al.* Structural characterization of the pore forming protein TatAd of the twin-arginine translocase in membranes by solid-state <sup>15</sup>N-NMR. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1768**, 3071–3079 (2007).
185. Nagle, J. F. & Tristram-Nagle, S. Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1469**, 159–195 (2000).

## 12 Anhang

### 12.1 SROCD-Spektren der TMD2

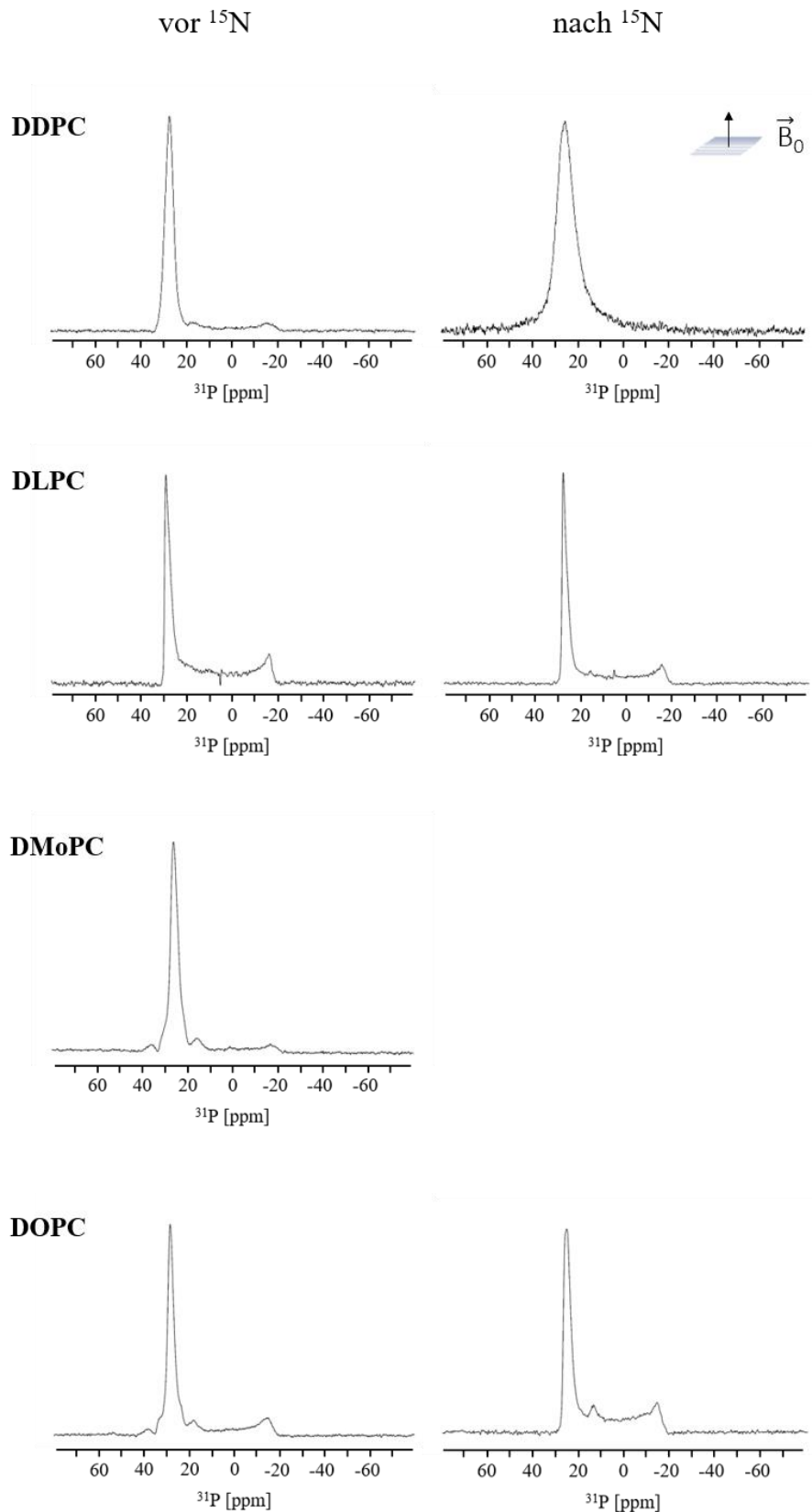


**Abbildung 64: SROCD-Spektren der TMD2 in Lipiden mit gesättigten und einfach ungesättigten Lipidacylketten**

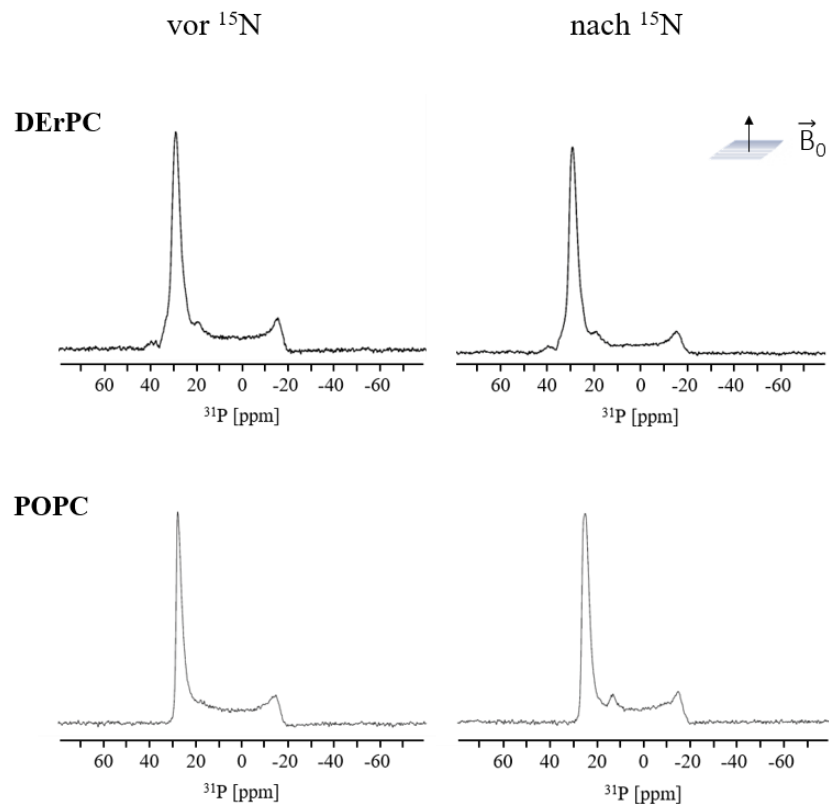
Die TMD2 wurde in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten rekonstituiert ( $P/L = 1:50$ ) und die Messungen wurden bei  $35\text{ °C}$  durchgeführt. Alle SRCD-Spektren wurden auf ihr Minimum im Bereich von  $223\text{ nm}$  normiert. Die Messungen wurden von M. Sc. Anne C. Görner im Zuge ihrer Masterarbeit aufgenommen.



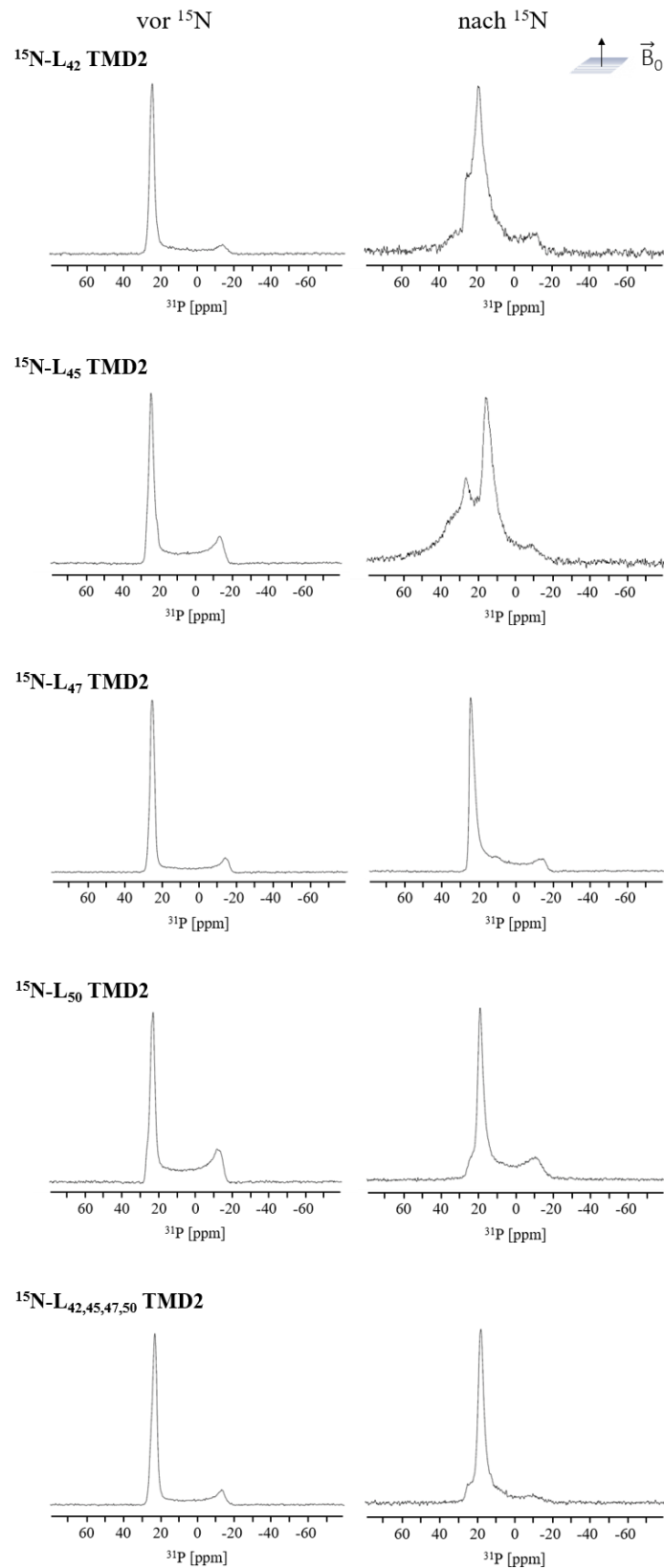
## 12.2 Festkörper-<sup>31</sup>P-NMR Spektren



**Abbildung 65: Festkörper-<sup>31</sup>P-NMR Spektren der <sup>15</sup>N-L<sub>47</sub> markierten TMD2 in verschiedenen Lipiden**  
 Vor und nach den Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Messungen wurden zur Überprüfung der Orientierung der Lipide <sup>31</sup>P-NMR Spektren aufgenommen. Die Messungen wurden alle bei 35 °C von M. Sc. Anne C. Görner im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt.



**Abbildung 66: Festkörper-<sup>31</sup>P-NMR Spektren der <sup>15</sup>N-L<sub>47</sub> markierten TMD2 in verschiedenen Lipiden**  
 Vor und nach den Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Messungen wurden zur Überprüfung der Orientierung der Lipide <sup>31</sup>P-NMR Spektren aufgenommen. Die Messungen wurden alle bei 35 °C von M. Sc. Anne C. Görner im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt.



**Abbildung 67: Festkörper- $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierter TMD2 in DMPC**

Vor und nach den Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen wurden zur Überprüfung der Orientierung der Lipide  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren aufgenommen. Die Messungen wurden alle bei 35 °C von M. Sc. Anne C. Görner im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt (Abbildung verändert entnommen aus L. M. E. STEGER *et al.*<sup>130</sup>).

## 13 Publikationen

### 13.1 Beiträge in referenzierten Zeitschriften

„*Structural and functional characterization of the pore-forming domain of pinholin S<sup>21</sup>68*“

L. M. E. Steger, A. Kohlmeyer, P. Wadhvani, J. Bürck, E. Strandberg, J. Reichert, S. L. Grage, M. Kempfer, A. C. Görner, J. Koch, T. H. Walther, A. S. Ulrich

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **117**, 29637-29646 (2020)

### 13.2 Tagungsbeiträge

„*Structural and functional characterization of the pinholin S<sup>21</sup>68 from bacteriophage 21*“

A. Kohlmeyer, L. M. E. Steger, A. C. Görner, E. Strandberg, J. Reichert, J. Bürck, S. L. Grage, P. Wadhvani, T. H. Walther, A. S. Ulrich

EMBO Workshop: „Tools for structural biology of membrane proteins“

Oktober 2019, Hamburg (Deutschland)