

**Untersuchungen zur Acylierung, Struktur und
Glykanbindung des RTX-Toxins Hämolysin A aus
*Escherichia coli***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sandra Peherstorfer

aus

Linz, Österreich

Düsseldorf, April 2017

aus dem **Institut für Biochemie**
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Lutz Schmitt
Korreferent: Prof. Dr. med. Walter Däubener

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	IV
Zusammenfassung in englischer Sprache (Summary)	VI
1 Einleitung	1
1.1 Hämolyysin A (HlyA) - ein universelles Toxin aus uropathogenen <i>Escherichia coli</i>	1
1.2 Die funktionellen Domänen von HlyA im Überblick	2
1.2.1 Der N-terminale hydrophobe Bereich	2
1.2.2 Die Repeats-In-Toxin (RTX) Domäne.....	3
1.2.3 Das C-terminale Sekretionssignal	4
1.3 Die Acylierung durch Hämolyysin C (HlyC) – eine einzigartige Acyltransferase aus Gram-negativen Bakterien	5
1.3.1 Die Struktur und das aktive Zentrum von HlyC.....	6
1.3.2 Das Acylgruppen-tragende Protein (ACP).....	8
1.3.3 Die zwei postulierten Reaktionsmechanismen des HlyC.....	10
1.3.4 Häm als möglicher regulatorischer Faktor von HlyC	11
1.3.5 Häm-Aufnahmesysteme in Gram-negativen Bakterien	13
1.4 Der Export von HlyA erfolgt durch ein Typ 1 Sekretionssystem	14
1.5 Die Interaktion von HlyA mit Zielzellen	16
1.5.1 Unterschiedliche Wirkmechanismen von HlyA – zytolytische, zytotoxische und immunregulatorische Funktionen	16
1.5.2 Eine mögliche, spezifische Zuckerbindung von HlyA	17
1.6 Die Rolle von HlyA bei Harnwegsinfektionen	19
2 Ziele der Arbeit	22
3 Kapitel 1: Acylierung durch HlyC	23
3.1 Material und Methoden	25
3.1.1 Allgemeine Materialien	25
3.1.2 Allgemeine Methoden	32
3.1.3 Klonierung von HlyC H151A H152A.....	34
3.1.4 Expression und Reinigung von HlyC	35
3.1.5 Expression und Reinigung von HlyC H151A H152A	37
3.1.6 Massenspektrometrische Analyse der Bande zwischen 10 und 15 kDa	39
3.1.7 Expression und Reinigung von proHlyA und Herstellung des Acyl-ACP Rohextraktes...39	
3.1.8 Standardmethode: <i>In vitro</i> Acylierung basierend auf Thomas <i>et al.</i> (2014).....	40
3.1.9 Vorversuche zur <i>in vitro</i> Acylierung durch HlyC	41
3.1.10 Enzymkinetik von HlyC für proHlyA.....	42

3.1.11	Enzymaktivität von HlyC in Anwesenheit von Hämin	42
3.1.12	Enzymaktivität von HlyC in Anwesenheit verschiedener PPIX-Derivate	44
3.1.13	Enzymaktivität von HlyC H151A H152A in Anwesenheit von Hämin	44
3.2	Ergebnisse	45
3.2.1	Klonierung von HlyC H151A H152A	45
3.2.2	Expression und Reinigung von HlyC	45
3.2.3	Expression und Reinigung von HlyC H151A H152A	47
3.2.4	Massenanalyse der Bande zwischen 10 und 15 kDa	48
3.2.5	Expression und Reinigung von proHlyA und Herstellung des Acyl-ACP Rohextraktes...50	
3.2.6	Vorversuche zur <i>in vitro</i> Acylierung durch HlyC	51
3.2.7	Enzymkinetik von HlyC für proHlyA	53
3.2.8	Enzymaktivität von HlyC in Anwesenheit von Hämin	55
3.2.9	Enzymaktivität von HlyC in Anwesenheit verschiedener PPIX-Derivate	58
3.2.10	Enzymaktivität von HlyC H151A H152A in Anwesenheit von Hämin	59
4	<u>Kapitel 2: Kristallisation von HlyA</u>	62
4.1	Material und Methoden	63
4.1.1	Allgemeine Materialien	63
4.1.2	Allgemeine Methoden	69
4.1.3	Expression und Reinigung von proHlyA	71
4.1.4	Kristallisation von proHlyA	72
4.1.5	Röntgenstrukturanalyse	78
4.2	Ergebnisse	80
4.2.1	Expression und Reinigung von proHlyA	80
4.2.2	Kristallisation von proHlyA	81
4.2.3	Röntgendiffraktion der proHlyA Kristalle	86
	Anhang: Kristallisation von OpuBC mit verschiedenen Substraten	88
5	<u>Kapitel 3: Glykanbindung durch HlyA</u>	93
5.1	Material und Methoden	94
5.1.1	Allgemeine Materialien	94
5.1.2	Allgemeine Methoden	101
5.1.3	Klonierung von verschiedenen proHlyA-Cys Varianten	103
5.1.4	Expression und Reinigung der proHlyA-Cys Varianten	104
5.1.5	Expression und Reinigung von HlyC und Herstellung des Acyl-ACP Rohextraktes.....	105
5.1.6	<i>In vitro</i> Acylierungsassay zur Aktivitätsüberprüfung der Proteine.....	106
5.1.7	Markierung von proHlyA-Cys mit Alexa-Fluorophoren	107
5.1.8	ProHlyA Fluoreszenz-Blot mit Nierenepithelzelllysat	107
5.1.9	ProHlyA Glykosphingolipidbindung in GUVs (<i>giant unilamellar vesicles</i>).....	109
5.1.10	ProHlyA Glykan Array zur Identifizierung von Zuckerinteraktionen.....	110
5.2	Ergebnisse	111
5.2.1	Klonierung von verschiedenen proHlyA-Cys Varianten	111
5.2.2	Expression und Reinigung der proHlyA-Cys Varianten	111

5.2.3	<i>In vitro</i> Acylierungsassay zur Aktivitätsüberprüfung der Proteine	112
5.2.4	Markierung von proHlyA-Cys mit Alexa-Fluorophor	114
5.2.5	ProHlyA Fluoreszenz-Blot mit Nierenepithelzellsat	115
5.2.6	ProHlyA Glykosphingolipidbindung in GUVs (<i>giant unilamellar vesicles</i>).....	117
5.2.7	ProHlyA Glykan Array zur Identifizierung von Zuckerinteraktionen	118
6	Diskussion	122
6.1	Acylierung von proHlyA durch die Acyltransferase HlyC	123
6.1.1	Ein verändertes Expressions- und Reinigungsprotokoll für HlyC ermöglicht die Koaufrreinigung von ACP	123
6.1.2	Enzymkinetik von HlyC für das Substrat proHlyA und Implikationen für den Reaktionsmechanismus.....	125
6.1.3	Ein optimierter <i>in vitro</i> Acylierungsassay zur Aktivitätsmessung von HlyC in Anwesenheit von Hämin	126
6.1.4	Inhibierung der Enzymaktivität von HlyC durch Hämin und andere Häm-Derivate	128
6.1.5	Ein neues Modell zur Relevanz der Hemmung von HlyC durch Hämin vor dem Hintergrund der Hämolyse.....	134
6.2	Kristallisation und Strukturanalyse von proHlyA	136
6.3	Untersuchungen zur Glykanbindung durch proHlyA.....	139
6.3.1	ProHlyA Fluoreszenz-Blot zur Analyse einer zuckerabhängigen Bindung an Nierenepithelzellen	140
6.3.2	Untersuchungen zur Bindung von proHlyA an Glykosphingolipide	141
6.3.3	Glykan Array zur Identifizierung von proHlyA Zuckerinteraktionen	143
7	Referenzen	144
8	Abkürzungsverzeichnis	155
	Danksagung	158
	Eidesstattliche Versicherung	160
	Curriculum vitae	161

Zusammenfassung

Hämolyysin A (HlyA) ist ein Proteintoxin aus uropathogenen *Escherichia coli* und gehört zur Familie der sekretierten Repeats-In-Toxin (RTX) Toxine. Diese Proteinfamilie aus Gram-negativen Bakterien zeichnet sich durch das Vorhandensein eines charakteristischen, Calciumionen-bindenden Motives sowie der Sekretion durch ein Typ 1 Sekretionssystem aus. Die biologischen und biochemischen Funktionen von RTX-Toxinen reichen von zytolytischen bis hin zu proteolytischen und anderen enzymatischen Aktivitäten. HlyA aus uropathogenen *Escherichia coli* besitzt hämolytische, zytolytische sowie zytotoxische und immunregulatorische Wirkungen auf unterschiedliche Wirtszellen. Für die Aktivierung, des als Protoxin hergestellten, Toxins ist die intrazelluläre, bakterielle Acyltransferase Hämolyysin C (HlyC) verantwortlich. Dabei katalysiert HlyC den posttranslationalen Transfer von Acylgruppen von dem Acylgruppen-tragenden Protein (ACP) auf zwei spezifische Lysinseitenketten des Protoxins. Diese Dissertation beschäftigt mit der Regulation der Acyltransferaseaktivität von HlyC durch Eisen-Protoporphyrin IX (Fe-PPIX, Häm/Hämin) sowie der Strukturaufklärung und Funktionsanalyse von HlyA in Zusammenhang mit einer möglichen Bindung an Zelloberflächenglykane.

Das erste Kapitel beschäftigt sich mit der Wirkung von Häm auf die Enzymaktivität von HlyC mit Bedeutung in Hinblick auf die hämolytische Aktivität von HlyA. Grundlage bildete die Beobachtung der Bindung von Häm an ein postuliertes, Häm-regulierendes Peptidmotiv, welches in der Aminosäuresequenz von HlyC vorhanden ist. Nachdem die Bindung von Häm auf Proteinebene bestätigt werden konnte, wurde in dieser Arbeit ein bereits etablierter *in vitro* Acylierungsassay für die Untersuchungen der Acyltransferaseaktivität in Anwesenheit von Hämin adaptiert. Durch die Aktivitätsmessungen des gereinigten Proteins mit Hämin konnte eine inhibitorische Wirkung von Hämin auf die Enzymaktivität von HlyC gezeigt werden. Der IC_{50} -Wert für Hämin liegt mit $5 \mu\text{M}$ im Bereich der bereits früher, für andere durch Hämin gehemmten Enzyme, erhobenen Daten. Weiterhin wurde durch eine zielgerichtete Mutagenese das postulierte Häm-Bindemotiv in HlyC verändert und die Aktivitätsmessungen wiederholt. Zwei potentielle Koordinationsstellen im postulierten Häm-Bindemotiv konnten dadurch jedoch nicht bestätigt werden und mögliche weitere Koordinationsstellen in HlyC müssen in Betracht gezogen werden.

Kapitel zwei und drei beschäftigen sich mit der Struktur- und Funktionsanalyse von HlyA. Im Fokus stehen die Kristallisation des Protoxins sowie die Untersuchung einer möglichen Bindung des Protoxins an die Oberflächenglykane von Wirtszellen. Trotz erfolgreicher Kristallisation des Proteins im Rahmen dieser Dissertation, sind weitere Optimierungsschritte zur

Verbesserung der Kristallqualität und Bestimmung der dreidimensionalen Raumstruktur von HlyA nötig. Hinweise auf eine mögliche Erkennung von Zuckerstrukturen auf den Zielzellen durch HlyA stammen aus bereits früher publizierten Forschungsarbeiten. Um daher die Rolle von Glykanen bei der Interaktion von HlyA mit (humanen) Zielzellmembranen zu untersuchen, wurde das gereinigte Protoxin zunächst über ein eingebautes Cystein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Weitere Analysen mit dem markierten Protein konnten eine zuckerabhängige Bindung an Nierenepithelzellen und Glykosphingolipide nicht bestätigen. Weiterhin zeigte das markierte proHlyA in einem zur Identifizierung von Zuckerinteraktionspartnern durchgeführten Glykan Array nur sehr schwache Bindungen an die getesteten Glykane. Über deren Bedeutung *in vivo* kann an dieser Stelle noch keine Aussage getroffen werden. In dieser Dissertation wurden die zwei Proteine HlyA und HlyC aus uropathogenen *Escherichia coli* charakterisiert, die im Verlauf von Harnwegsinfektionen eine wichtige Rolle spielen. Ergebnisse daraus können möglicherweise auf andere RTX-Toxine übertragen werden und sind dadurch möglicherweise in einer Vielzahl von Infektionen relevant.

Zusammenfassung in englischer Sprache (Summary)

Hemolysin A (HlyA) is a protein toxin from uropathogenic *Escherichia coli* strains that belongs to the family of secreted repeats-in-toxin (RTX) toxins. This protein family from Gram-negative bacteria is characterized by the existence of a characteristic calcium ion binding motif and the secretion via a type 1 secretion system. The biological and chemical functions of RTX toxins include not only cytolytic but also proteolytic and other enzymatic activities. HlyA from uropathogenic *Escherichia coli* exhibits hemolytic, cytolytic as well as cytotoxic and immunoregulatory functions on different host cells. For the activation of the protoxin proHlyA, the intracellular bacterial acyltransferase Hemolysin C (HlyC) is required. HlyC catalyzes the posttranslational transfer of acyl groups from the acyl-carrier protein (ACP) onto two specific lysine residues of the protoxin. This doctoral thesis is dedicated to the regulation of the acyltransferase activity of HlyC by iron protoporphyrin IX (Fe-PPIX, heme/hemin) as well as the structure determination and functional analysis of HlyA in the context of a potential binding on cell surface glycans.

The first chapter deals with the effect of heme on the enzymatic activity of HlyC with regard to the hemolytic activity of HlyA. The observation of heme binding to a postulated heme-regulating peptide motif in the amino acid sequence of HlyC provided the basis for this research. After confirming the binding of heme on the protein level, an established *in vitro* acylation assay was successfully adapted for the investigation of the acyltransferase activity in presence of heme in the course of this thesis. By measuring the activity of the purified protein together with hemin, an inhibitory effect of hemin on the enzymatic activity of HlyC could be shown. The IC₅₀-value for hemin of 5 µM is in the range of already published data for other enzymes inhibited by hemin. Furthermore, the postulated binding motif in HlyC was modified using site-directed mutagenesis and the activity measurements were repeated. Thereby, two potential coordination sites in the postulated heme-binding motif, however, could not have been confirmed and other potential coordination sites in HlyC must be considered.

Chapters two and three are dedicated to the structural and functional analysis of HlyA. The focus here are the crystallization of the protoxin and the exploration of a proposed binding of the toxin to surface glycans on host cells. Although the protein was successfully crystallized in the course of this thesis, further optimization steps are required to increase the crystal quality and determine the three-dimensional structure of HlyA. Indications for a potential recognition of sugar structures on the target cells by HlyA are provided in literature. To elucidate the role of glycans in the interaction of HlyA with (human) cell membranes, the purified protoxin was fluorescently labeled via an artificial cysteine. Further analysis with the labeled

protein, however, could not confirm a binding to kidney epithelial cell or glycosphingolipids. Moreover, only weak binding of proHlyA was observed with the tested glycans in a glycan array destined to identify sugar-based interaction partners. No statement about the relevance of these interactions *in vivo* can be made yet.

In summary, the two proteins HlyA and HlyC from uropathogenic *Escherichia coli* strains, which play an important role in the course of urinary tract infections, were characterized in this thesis. Results from that may be transferred to other RTX toxins and may become relevant in multiple other infections in the future.

1 Einleitung

1.1 Hämolysin A (HlyA) - ein universelles Toxin aus uropathogenen *Escherichia coli*

Exotoxine sind neben verschiedenen Systemen zur Nährstoffaufnahme, Strukturen zur Adhäsion an Wirtszellen und Mechanismen zur Immunevasion häufig an bakteriellen Infektionserkrankungen beteiligte Virulenzfaktoren [1]. Eine wichtige Gruppe dieser sekretierten Proteintoxine ist die Repeats-In-Toxin (RTX) Familie aus Gram-negativen Bakterien [2]. Ihre Gemeinsamkeit ist das Vorhandensein eines charakteristischen Proteinstrukturelements, bestehend aus Wiederholungen einer bestimmten Konsensussequenz in der sogenannten RTX-Domäne, sowie der Export über ein Typ 1 Sekretionssystem [3]. Ein Prototyp der RTX-Proteinfamilie ist das Hämolysin A (auch α -Hämolysin genannt, HlyA, das nicht identisch mit α -Hämolysin aus *Staphylococcus aureus* ist) aus uropathogenen *Escherichia coli*. Hämolytische und nicht-hämolytische Bakterienstämme wurden bereits sehr früh in Zusammenhang mit Harnwegsinfektionen beschrieben [4]. Früh war auch ein hämolytischer Faktor („Hämolysin“) in den Überständen von Bakterienkulturen bekannt [5] [6] [7] [8]. Anfang der 1980er Jahre wurden erstmals die entsprechenden Gene aus *Escherichia coli* isoliert und kloniert [9] [10] und die Funktion von Hämolysin A in Bezug auf seine porenbildende Wirkung in Wirtszellmembranen untersucht [11]. Seither gilt es als ein klassisches porenbildendes Toxin, dennoch wurden die Poren von HlyA nie visualisiert. Die zytotoxischen Wirkungen von HlyA beschränken sich keineswegs auf Erythrozyten, sondern umfassen verschiedene Zelltypen wie Fibroblasten, Nierenzellen, Monozyten, Granulozyten, Endothelzellen und Lymphozyten diverser Säugertierspezies [12] [13] [14] [15] [16] [17]. Neben seiner bestens bekannten Funktion als porenbildendes Toxin besitzt HlyA auch eine regulatorische Funktion, welche durch sublytische Toxinkonzentrationen realisiert wird. In der Folge kann es zum Beispiel zu einer Beeinträchtigung einer Rezeptorfunktion, einer veränderten Signaltransduktion und Apoptose oder einer verminderten Immunantwort der Wirtszellen kommen [18] [19] [20]. Andere bekannte porenbildende Toxine (PFT, *pore-forming toxins*) aus der RTX-Proteinfamilie sind zum Beispiel das Adenylatzyklasetoxin (CyaA) aus *Bordetella pertussis*, ApxA aus *Actinobacillus pleuropneumoniae*, MbxA aus *Moraxella bovis*, MmxA aus *Morganella morganii*, PvxA aus *Proteus vulgaris*, PaxA aus *Pasteurella aerogenes* und die zellspezifischeren Leukotoxine LtxA aus *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

und LktA aus *Mannheimia haemolytica* [3]. Ein Virulenzfaktor aus enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) ist das Enterohämolysin EhxA [21].

1.2 Die funktionellen Domänen von HlyA im Überblick

Die Basis dieser Dissertation bildet die Proteinsequenz des plasmidkodierten HlyA aus dem uropathogenen *Escherichia coli* (UPEC) Stamm UT189, der ursprünglich aus einem Patienten mit Zystitis isoliert wurde [22] [23]. Die wichtigsten funktionellen Domänen des Proteins umfassen einen hydrophoben Bereich in der N-terminalen Hälfte, eine charakteristische RTX-Domäne in der C-terminalen Hälfte und ein C-terminales Exportsignal/Sekretionssignal (Abbildung 1). Die Seitenketten der beiden in schwarz dargestellten Lysine (K564 und K690) werden durch die Acyltransferase HlyC posttranslational acyliert und sind der erste entscheidende Schritt zur Aktivierung des Protoxins (proHlyA). In diesem Abschnitt wird auf die einzelnen Proteinabschnitte und Domänen von HlyA näher eingegangen. Die Acylierung wird in Kapitel 1.3 gesondert behandelt.

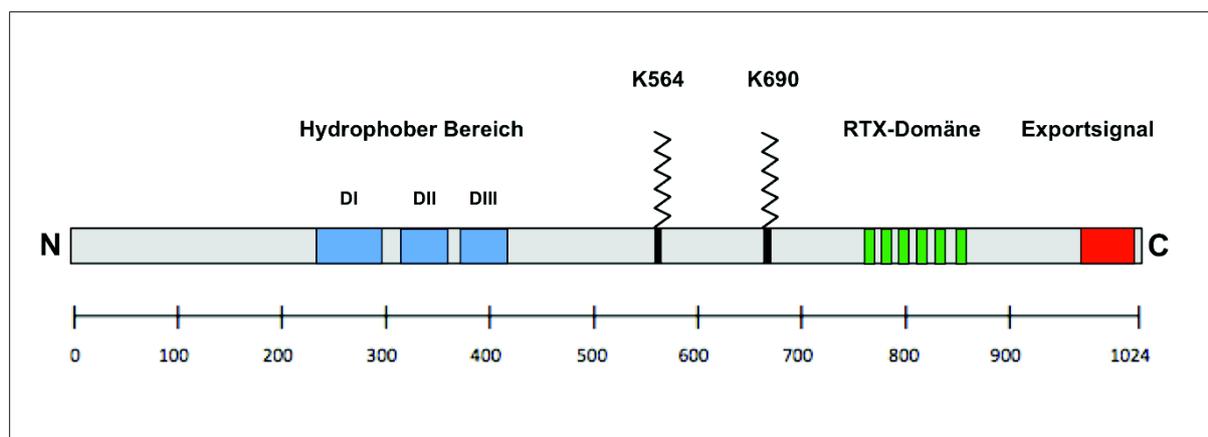


Abbildung 1: Die Domänenstruktur von HlyA

HlyA besitzt einen Bereich aus hydrophoben Aminosäuren in der N-terminalen Hälfte und eine charakteristische RTX-Domäne in der C-terminalen Hälfte. Die beiden Lysine K564 und K690 werden durch die Acyltransferase HlyC posttranslational acyliert. Das Exportsignal (Sekretionssignal) befindet sich am C-Terminus des Proteins. Der Zahlenstrahl stellt Abschnitte von jeweils 100 Aminosäuren dar.

1.2.1 Der N-terminale hydrophobe Bereich

In der N-terminalen Hälfte von HlyA dominieren hydrophobe Aminosäuren. Hydrophobe Bereiche sind in Proteinen häufig mit Membranen assoziiert oder in die Lipiddoppelschicht von Membranen integriert. Zusammen mit den zwei kovalent an HlyA gekoppelten Acylgruppen kann davon ausgegangen werden, dass dieser Bereich die benötigte Fettlöslichkeit für die Insertion in die Wirtszellmembranen des ansonsten hydrophilen

und löslichen Proteins vermittelt. Die hydrophoben Domänen von HlyA sind essentiell für seine hämolytische Aktivität und an der Permeabilisierung der Wirtszellmembranen durch das Toxin beteiligt [24] [25]. Basierend auf Sekundärstrukturvorhersagen besteht der N-terminale Abschnitt von HlyA überwiegend aus α -Helices, von denen voraussichtlich zwei oder drei transmembrane Helices sind [26] [27]. Mögliche weitere Sekundärstrukturelemente im hydrophoben Bereich sind eine amphipatische α -Helix und β -Faltblatt-Strukturen [28] [29].

1.2.2 Die Repeats-In-Toxin (RTX) Domäne

Die RTX-Domäne besteht aus mehreren Wiederholungen einer Konsensussequenz aus den Aminosäuren Glycin und Asparaginsäure, die ein charakteristisches Sekundärstrukturmotiv erzeugt (Abbildung 2). Die Konsensussequenz GGxG[N/D]Dx[L/I/F]_x der RTX-Proteinfamilie besteht im Wesentlichen aus einmal zwei und einmal einem Glycin sowie einer Asparaginsäure, gefolgt von jeweils einer beliebigen (x) oder einer bestimmten [N/D] oder [L/I/F] Aminosäure und ist nicht streng definiert [3] [30] [31]. Die ersten sechs Aminosäuren bilden jeweils eine Calciumionen-bindende Schleife, wobei die Aminosäuren Glycin und Asparaginsäure von zwei Schleifen häufig an der Bindung eines Calciumions beteiligt sind. Die letzten drei Aminosäuren mit einem hydrophoben mittleren Rest [L/I/F] formen einen kurzen β -Strang zwischen zwei aufeinanderfolgenden Schleifen. Neben der hier beispielhaft dargestellten Raumstruktur der RTX-Domäne des Adenylatzyklasetoxins CyaA aus *Bordetella pertussis* [32], sind die RTX-Proteinstrukturen der alkalischen Protease (AP) aus *Pseudomonas aeruginosa* [31], der Metalloprotease PrtC aus *Erwinia chrysanthemi* [33] und der Lipase LipA aus *Serratia marcescens* [34] bekannt. In HlyA finden sich je nach Auslegung der Konsensussequenz sechs bis 13 Wiederholungen der beschriebenen Konsensussequenz (auch GG-Wiederholungen genannt) innerhalb von 130 Aminosäuren (723-852) [30]. Die Dissoziationskonstante (K_d) für die Calciumbindung von HlyA beträgt $\approx 0,1$ mM [35] und liegt zwischen der niedrigen zytosolischen Calciumkonzentration in *Escherichia coli* von etwa 90 nM [36] und der interstitiellen Calciumkonzentration von etwa 1,3 mM [37]. Die wesentliche Funktion der RTX-Domäne beruht auf der Bindung von Calciumionen und den daraus resultierenden, strukturellen Änderungen des Proteins zur Faltung und Annahme seiner nativen Konformation und ist Voraussetzung für die Bindung an die Zielzellen [34] [38] [39] [40] [41] [42]. Die Bindung von Calciumionen in der RTX-Domäne ist neben der Acylierung somit der zweite entscheidende Schritt für die Funktionalität von HlyA.

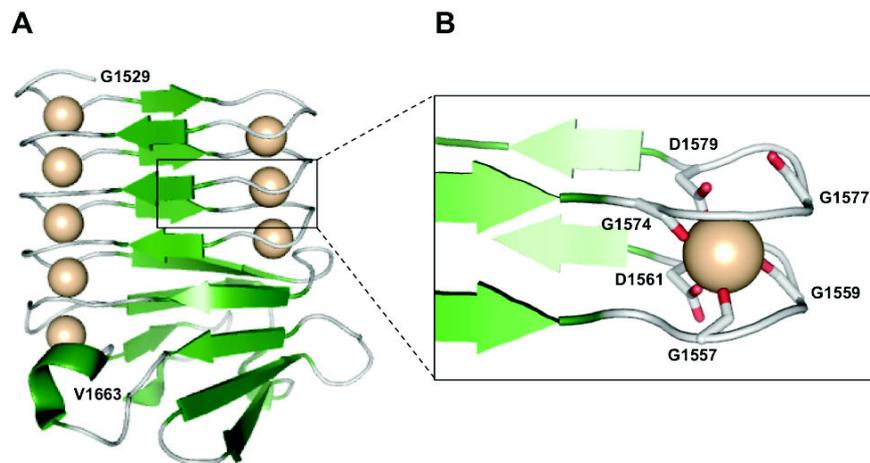


Abbildung 2: Kristallstruktur der RTX-Domäne von CyaA aus *Bordetella pertussis*

Dargestellt ist die RTX-Domäne von CyaA aus *Bordetella pertussis* (PDB Eintrag 5CVW). A) Die sogenannten GG-Wiederholungen GGxGxDxxx bilden eine charakteristische parallele β -Roll-Struktur (auch β -Rolle oder β -Helix genannt) bestehend aus mehreren Schleifen mit gebundenen Ca^{2+} -Ionen und β -Faltblättern. B) Detailansicht der Bindung eines Calciumions: Ein Sequenzmotiv bildet eine Schleife aus den Aminosäuren [GGxGxD] und einen kurzen β -Strang [xxx], wobei jeweils die Aminosäuren von zwei Motiven an der Bindung eines Ca^{2+} -Ions beteiligt sind. Die Abbildung wurde in Anlehnung an [32] erstellt.

1.2.3 Das C-terminale Sekretionssignal

In vivo ist der Export des Toxins ein weiterer Schlüsselprozess für seine Wirkung auf die Wirtszellen, wobei sowohl proHlyA als auch HlyA von *Escherichia coli* sekretiert werden [43]. Das sogenannte Export- oder Sekretionssignal von HlyA besteht aus den C-terminalen 50 bis 60 Aminosäuren und ist alleine für die Sekretion ausreichend [44] [45]. Studien zu den Sekundärstrukturelementen in diesem Bereich weisen vor allem auf helikale Strukturen hin und postulieren die Erkennung eines Sekundärstrukturmotivs durch den Transporter [46] [47] [48] [49]. Der Bereich kann in eine amphipatische Helix ([LIN]EISKIIS[AAGS]), einen eher hydrophoben Abschnitt (AASLLQLSGNA) und eine terminale Gruppierung aus Aminosäuren mit Hydroxylgruppen (SITLTTS) eingeteilt werden. Zudem wurden mehrere Aminosäuren im Sekretionssignal identifiziert, die den Transport von HlyA stark beeinflussen [46] [50] [51]. Demnach kommt es unter anderem durch den Austausch der Aminosäure F990 am Ende der postulierten amphipatischen Helix zu einem nahezu vollständigen Erliegen der Sekretion [51]. Ein konserviertes Motiv auf Primärsequenzebene in verwandten, sekretierten Proteintoxinen ist nicht bekannt.

1.3 Die Acylierung durch Hämolyisin C (HlyC) – eine einzigartige Acyltransferase aus Gram-negativen Bakterien

Im Zuge der Identifizierung der für die hämolytische Wirkung von HlyA verantwortlichen Gene aus *Escherichia coli* wurde Mitte der 1980er Jahre erkannt, dass für die Aktivität von HlyA zusätzlich das Genprodukt des am 5'-Ende vom *hlyA*-Gen liegende *hlyC*-Gens benötigt wird [43]. Das entsprechende 20 kDa große Protein wird benötigt um das hämolytisch inaktive proHlyA durch eine posttranslationale Modifikation zu aktivieren, obgleich sowohl proHlyA als auch das hämolytisch aktive HlyA von *Escherichia coli* sekretiert werden. Darüber hinaus wurde mit dem Acylgruppen-tragendem Protein (ACP, *acyl carrier protein*) ein weiterer zytosolischer Faktor identifiziert, der ebenfalls für die Aktivierung von proHlyA benötigt wird [52] [53]. Bei HlyC handelt es sich dementsprechend um eine bakterielle Acyltransferase, die in etwa äquimolarem Verhältnis zu proHlyA in *Escherichia coli* produziert wird und gesättigte Acylgruppen von acyl-ACP auf proHlyA überträgt [54]. Dabei werden zwei spezifische Lysinseitenketten (K564 und K690) im Protoxin unabhängig voneinander erkannt und jeweils mit einer Acylgruppe modifiziert, die beide für die Aktivität des Toxins erforderlich sind [55] [56] [57]. Die zwei Erkennungsdomänen, die die beiden Lysine flankieren und ausreichend für deren Acylierung sind, weisen keinerlei Primärsequenzähnlichkeiten untereinander oder mit den Acylierungsregionen anderer verwandter Toxine auf [58]. Für eine vollständige Acylierung *in vitro* wird eine Sequenzlänge von mindestens 50–80 Aminosäuren um die jeweilige Acylierungsstelle benötigt [58]. *In vitro* ist eine Acylierung von proHlyA mit C₁₂-C₁₈ Acylgruppen möglich, wobei die stärkste hämolytische Aktivität aus der Acylierung mit Myristinsäure (C₁₄) resultiert [53]. Massenspektrometrische Analysen zeigten außerdem, dass es sich bei der Acylierung *in vivo* vor allem um gesättigte C₁₄-Gruppen (68 %) und C₁₅-Gruppen (26 %) und zu einem geringen Anteil um C₁₇-Gruppen (6 %) handelt, die über eine Amidbindung an die ε-Aminogruppe der beiden Lysine gekoppelt sind [59]. Die Acylierung wird durch einen Überschuss an Calciumionen inhibiert und erfolgt somit, im Einklang mit der niedrigen zytosolischen Calciumkonzentration in *Escherichia coli*, in einem weitestgehend ungefalteten Zustand des Protoxins (siehe Kapitel 1.2.2) [58]. Die Modifizierung von Proteinen mit Acylgruppen wird im Allgemeinen im Zusammenhang mit der Vermittlung von Hydrophobizität zur Membraninteraktion, zur Verankerung von Proteinen in biologischen Membranen sowie zur Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen im Zuge der Oligomerisierung von Proteinen in den Membranen diskutiert [60]. Die exakte Rolle der Acylierung von HlyA ist nicht restlos geklärt. HlyC und andere verwandte bakterielle Toxin-aktivierende Acyltransferasen (TAAT, *toxin activating*

acyltransferases) unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz, Struktur und Funktion deutlich von den gut charakterisierten, eukaryontischen und prokaryontischen Acyltransferasen und konstituieren in diesem Sinne eine eigenständige und einzigartige Enzymklasse [60] [61]. Die erste dreidimensionale Raumstruktur einer bakteriellen Toxinaktivierenden Acyltransferase wurde vor kurzem gelöst und wird im folgenden Kapitel erläutert (Kapitel 1.3.1).

1.3.1 Die Struktur und das aktive Zentrum von HlyC

Die Kristallstruktur von ApxC aus *Actinobacillus pleuropneumoniae* wurde 2015 von Greene *et al.* publiziert und ist bisher die einzige bekannte Struktur einer bakteriellen Toxinaktivierenden Acyltransferase [61]. ApxC teilt eine 70%ige Sequenzidentität mit HlyC aus *Escherichia coli* und kann diese *in vivo* direkt substituieren um proHlyA zu aktivieren. Das in diesem Zusammenhang aus der dreidimensionalen Struktur von ApxC abgeleitete Homologiemodell für HlyC ist in Abbildung 3 dargestellt [61].

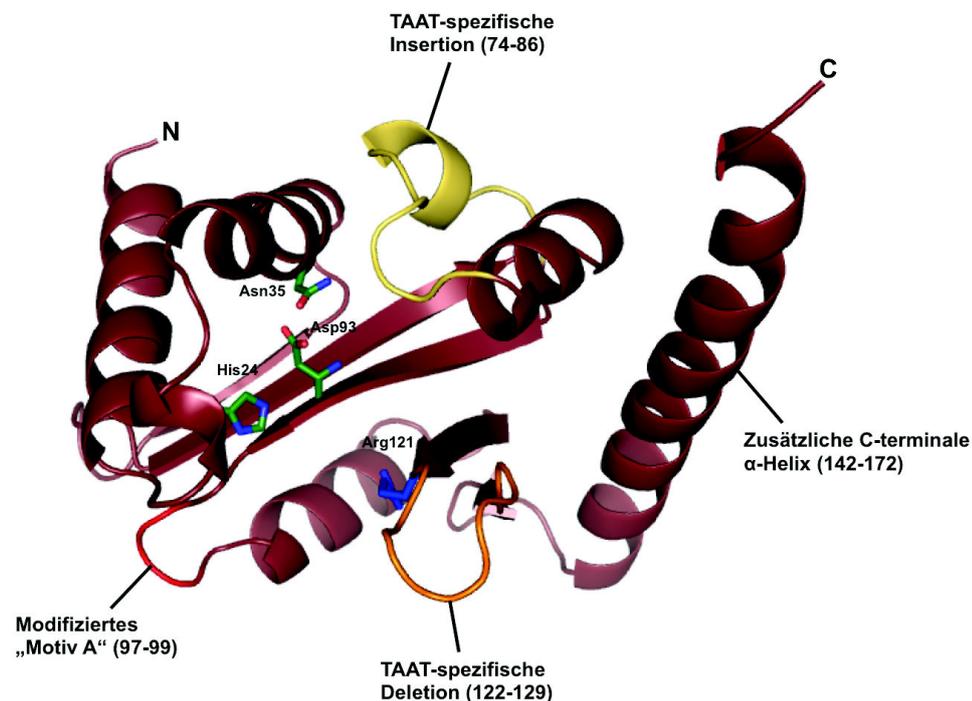


Abbildung 3: Homologiemodell für HlyC

Das gezeigte Homologiemodell für HlyC basiert auf der Struktur der Toxinaktivierenden Acyltransferase (TAAT) ApxC aus *Actinobacillus pleuropneumoniae* (PDB-Eintrag: 4WHN, Primärsequenzhomologie 70 %) [61]. TAATs unterscheiden sich von GCN5-verwandten N-Acetyltransferasen (GNAT) durch die in gelb, orange und rot hervorgehobenen Motive und eine zusätzliche C-terminale α -Helix. Die Abbildung wurde basierend auf dem Homologiemodell aus [61] erstellt.

ApxC, und demnach TAATs im Allgemeinen bestehen aus einem zentralen β -Faltblatt aus fünf β -Strängen (β 1- β 5) mit einem charakteristischen Spalt zwischen den Strängen β 3 und β 4, die von sechs α -Helices (α 1- α 6) umgeben sind [61]. Trotz der fehlenden Ähnlichkeit auf Primärsequenzebene, weist die Gesamtfaltung eine große Ähnlichkeit mit der Familie der prokaryontischen und eukaryontischen GCN5-verwandten N-Acetyltransferasen (GNAT, *GCN5-like N-acetyltransferase*) auf, zu deren bekannten Vertretern die Histonacetyltransferasen zählen [62] [63] [64]. Im Einzelnen unterscheidet sich das HlyC Strukturmodell jedoch von GNATs [61]: Das in GNATs konservierte Motiv A zur Bindung von Coenzym A (rot, Aminosäuren 97-99) sowie ein ebenfalls in allen GNATs vorkommendes, helikales Element zur Interaktion mit Coenzym A (orange, Aminosäuren 122-129) fehlen in HlyC. Ferner besitzt HlyC wahrscheinlich ein zusätzliches, helikales Element (gelb, Aminosäuren 74-86), das in den meisten GNATs abwesend ist, und eine zusätzliche, C-terminale α -Helix (α 6, Aminosäuren 142-172). TAATs unterscheiden sich außerdem von GNATs im verwendeten Acylgruppendonator: Während HlyC ausschließlich Acylgruppen von acyl-ACP auf den Akzeptor (hier das Substrat proHlyA) überträgt, verwenden GNATs acetyl-Coenzym A (acetyl-CoA) als Fettsäuredonor [53] [63]. Die in Abbildung 3 ebenfalls dargestellten, wichtigen Aminosäuren für HlyC sind His24, Asn35, Asp93 (grün) und Arg121 (blau) und basieren teilweise auf den Untersuchungen zur Aktivität der ApxC-Mutanten [61]. Aufgrund der chemischen Eigenschaften der identifizierten Aminosäuren wird vermutet, dass Asn35 nicht an der enzymatischen Reaktion an sich beteiligt ist, sondern vielmehr eine wichtige Rolle in der Positionierung und Orientierung des Substrates im aktiven Zentrum übernimmt, während His24 und Asp93 die wahren katalytischen Reste sind [61]. Die essentielle Bedeutung der Aminosäure His24 (entspricht His23 in älteren Publikationen) ist für die Aktivität von HlyC durch verschiedene Mutationsstudien sehr gut belegt [65] [66] [67]. Im diesem Zusammenhang wurde ebenfalls eine transiente Bindung der zu übertragenden Acylgruppe an den Imidazolring von His24 in Betracht gezogen [68] [69]. Ergänzend zu Asn35 scheint die Funktion von Arg121 (blau) in der Interaktion mit dem Acylgruppendonator ACP zu liegen, da die entsprechende ApxC Alaninmutante (R121A), im Gegensatz zu den anderen drei Mutanten (H24A, N35A, D93A), nicht mehr in der Lage ist, ACP zu binden [61]. Wie zudem aus einer frühen Studie mit einer Leserasterverschiebung an der Aminosäureposition 141 hervorgeht, ist auch die C-terminale α -Helix (Aminosäuren 142-172) für die Aktivität von HlyC von Bedeutung [70]. Der zugrunde liegende Reaktionsmechanismus für die Übertragung von Acylgruppen durch TAATs ist jedoch nur rudimentär verstanden. Die zwei gängigsten Theorien dazu werden in Kapitel 1.3.3 behandelt (Seite 10). In Lösung liegt HlyC als Homodimer vor, was dem vermeintlich aktiven Zustand der Acyltransferase ent-

spricht [53] [61]. Das in Abbildung 4 gezeigte Homologiemodell des HlyC Dimers sowie die Untersuchungen zur Anordnung und Interaktion der beiden Monomere basieren auf den Untersuchungen der homologen TAAT ApxC aus *Actinobacillus pleuropneumoniae* mit einer Primärsequenzhomologie von 70 % [61].

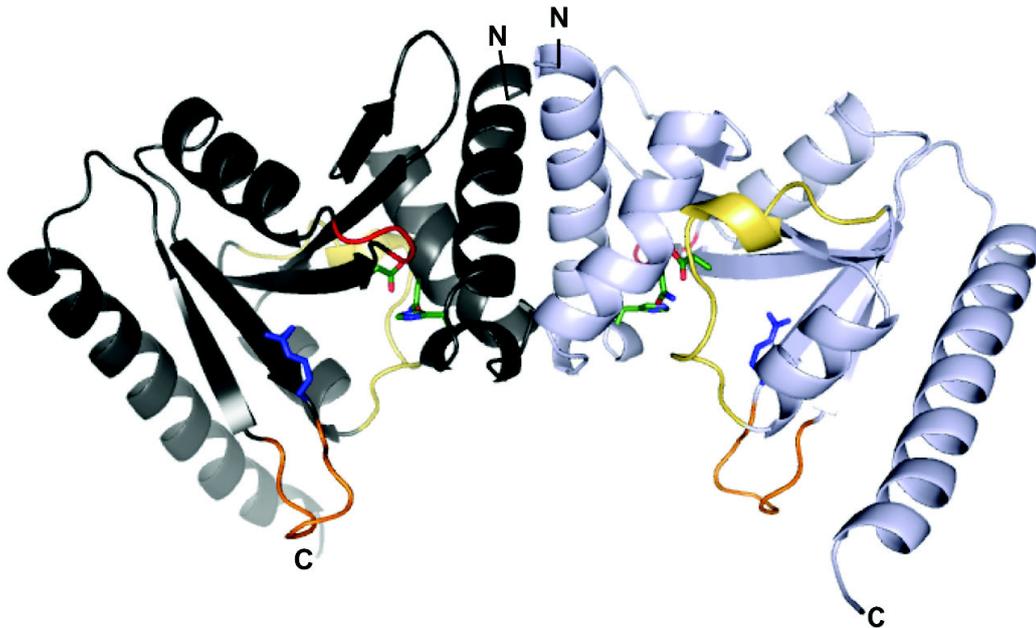


Abbildung 4: Homologiemodell für das HlyC Dimer

Die Acyltransferase HlyC liegt, wie andere, Toxin-aktivierende Acyltransferasen (TAATs) auch, löslich in Form eines Dimers vor [53]. Die postulierte Interaktion der N-terminalen α -Helices basiert auf den Untersuchungen der homologen TAAT ApxC aus *Actinobacillus pleuropneumoniae* [61]. Die farblich hervorgehobenen Elemente entsprechen denen in Abbildung 3. Die Abbildung wurde basierend auf dem Homologiemodell aus [61] erstellt.

1.3.2 Das Acylgruppen-tragende Protein (ACP)

Das Acylgruppen-tragende Protein (ACP, *acyl-carrier protein*) aus *Escherichia coli* ist ein kleines, lösliches und multifunktionales Protein mit einem Molekulargewicht von < 10 kDa, welches unter anderem als Acylgruppendonor für die Aktivierung von Protoxinen fungiert [53] [71] [72]. ACP liegt in Lösung als Monomer vor und ist entsprechend seinem isoelektrischen Punkt (4,1) negativ geladen [73]. Neben seiner bekannten Funktion als Fettsäuredonor in der Biosynthese von Phospholipiden und der Lipid A Einheit von Lipopolysacchariden, besitzt es weitere wichtige Funktionen [74] [75] [76] [77]. So dient es beispielsweise als Donor von Liponsäure, einem wichtigen Cofaktor in verschiedenen Enzymkomplexen [78] und spielt eine Rolle bei der Synthese von periplasmatischen Oligosacchariden zur Regulation der Osmolarität in Gram-negativen Bakterien [79] [80].

Weitreichende Funktionen haben auch homologe Proteine: Sie sind zum Beispiel in der Biosynthese von Polyketiden [81], der Synthese von Lipoteichonsäure in Gram-positiven Bakterien [82] oder in der Substratsynthese für Biolumineszenz-erzeugende Enzyme beteiligt [83]. ACPs sind außerdem in der Fettsäurebiosynthese von Pflanzen- und Säugtierzellen von essentieller Bedeutung [84] [85]. Die Strukturen und Funktionen von ACPs werden ausführlich in [86] diskutiert. Die dreidimensionale Raumstruktur von acyl-ACP aus *Escherichia coli* wurde mit unterschiedlichen Acylgruppen gelöst und ist in Abbildung 5 exemplarisch mit gebundener Decansäure (C₁₀) dargestellt [87] [88]. ACP besteht aus einem Bündel von drei annähernd parallelen α -Helices (α 1, α 2 und α 4) und einer weiteren α -Helix (α 3), sowie einem indirekt über eine prosthetische Gruppe gebundenen Acylrest [88]. An die OH-Gruppe von Serin 36 ist über eine Phosphodiesterbindung die prosthetische Gruppe Phosphopantethein (4'-PP) gebunden [72] [89]. 4'-PP wird posttranslational durch die Holo-ACP Synthase (ACPS) von acetyl-CoA auf apo-ACP übertragen und erzeugt holo-ACP, welches als Ausgangspunkt für viele, zelluläre Prozesse dient [90]. Die Acyl-ACP Synthetase (AasS) katalysiert die Bildung einer Thioesterbindung unter ATP-Hydrolyse zur Umwandlung von holo-ACP zu acyl-ACP durch die Übertragung von Fettsäuren auf die terminale SH-Gruppe von 4'-PP [91] [92]. Acyl-ACP kann mit Acylgruppen mit einer Länge von bis zu 18 C-Atomen modifiziert sein [93]. Der Acylrest wird dabei in der zentralen, hydrophoben Tasche des Proteins gehalten, wobei innen liegende, hydrophobe Seitenketten von allen vier Helices (α 1- α 4) und deren Schleifen an deren Bindung beteiligt sind [88]. Die Öffnung zur hydrophoben Tasche hin wird durch polare Seitenketten der Helices α 2 und α 3 und deren umliegende Schleifen ausgekleidet [88]. Im Vergleich zu Strukturen mit kurzkettigen Fettsäuren, wie zum Beispiel mit Buttersäure (C₄), ist der Zugang zur zentralen, hydrophoben Tasche bei langkettigen Fettsäuren weiter geöffnet [87]. In *Escherichia coli* liegen in der exponentiellen Wachstumsphase etwa 8-12 % des gesamten ACPs in acylierter Form vor [74]. Der überwiegende Teil davon trägt Acylgruppen mit einer Länge von bis zu 14 C-Atomen und nur ein sehr geringer Teil (in etwa 0,1 %) trägt Acylgruppen mit einer Länge von über 15 C-Atomen [74]. Grundsätzlich kann die Bindung einer Acylgruppe an Proteine direkt oder indirekt erfolgen [60]. Indirekt erfolgt die Bindung über prosthetische Gruppen, die an die OH-Gruppe von Serinseitenketten oder am C-Terminus des Proteins gebunden sind [60]. Eine direkte Bindung ist **I**) über eine Esterbindung als Oxyester an die OH-Gruppe von Serinseitenketten oder als Thioester an die SH-Gruppe von Cysteinseitenketten, **II**) über eine Etherbindung durch eine C-terminale Farnesylierung oder Geranylgeranylierung oder **III**) über eine Amidbindung an die terminale NH-Gruppe von Lysinseitenketten oder am N-Terminus des Proteins möglich [60].

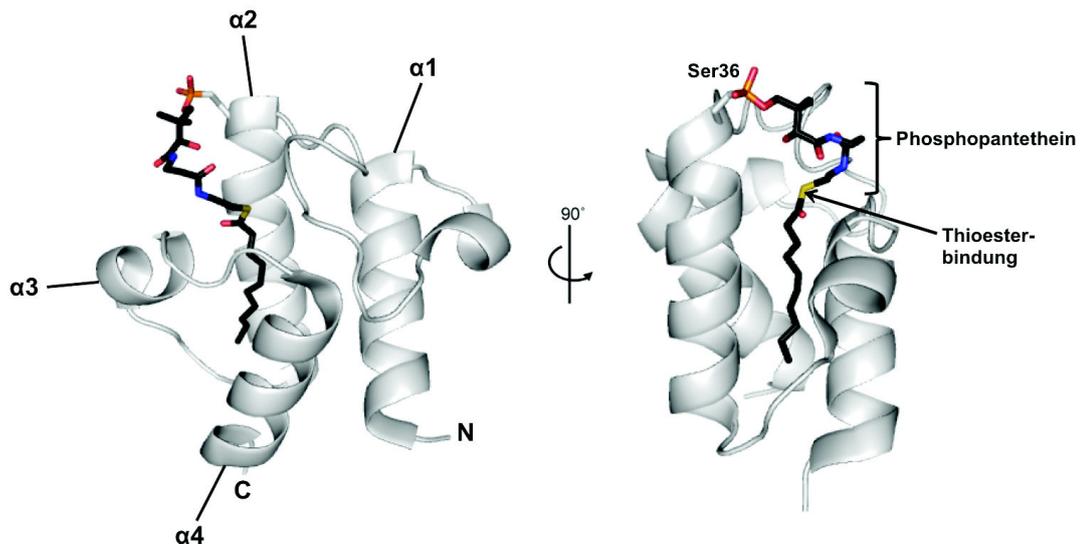


Abbildung 5: Das Acylgruppen-tragende Protein (ACP) aus *Escherichia coli*

ACP besteht aus einem Bündel von vier α -Helices und bindet über die an Serin 36 gekoppelte Phosphopantethein-Gruppe verschiedene Acylgruppen [88]. Dargestellt ist die Kristallstruktur von ACP aus *E. coli* mit gebundener Decansäure (PDB Eintrag: 2FAE). Die Abbildung wurde basierend auf [88] erstellt.

1.3.3 Die zwei postulierten Reaktionsmechanismen des HlyC

Die beiden für HlyC postulierten Reaktionsmechanismen basieren auf verschiedenen Untersuchungen zur Enzymkinetik, Thermodynamik und Struktur des Enzyms [61] [94] [95] [96]. Die Struktur der homologen bakteriellen Acyltransferase ApxC und deren große strukturelle Ähnlichkeit zu Acetyltransferasen der GNAT-Familie wurde in Kapitel 1.3.1 behandelt (Seite 6). Der Transfer von verschiedenen Acylgruppen von acyl-ACP auf proHlyA durch die Acyltransferase HlyC aus *Escherichia coli* wird vollständig durch eine Michaelis-Menten Kinetik beschrieben [94]. Die kinetischen Parameter für den Transfer von Myristinsäure (C_{14}) wurden für HlyA mit einem K_m -Wert (Michaelis-Menten Konstante) von $0,94 \mu\text{M}$ und einer v_{max} (maximale Reaktionsgeschwindigkeit) von $7,5 \text{ pmol Myristinsäure/min}$ und für acyl-ACP mit einem K_m -Wert von $0,48 \mu\text{M}$ und einer v_{max} von $6,9 \text{ pmol Myristinsäure/min}$ bestimmt [95]. Die kinetischen Parameter für den Transfer von Palmitinsäure (C_{16}) wurden in einer anderen Studie für HlyA mit einem K_m -Wert von $0,027 \mu\text{M}$, für palmitoyl-ACP mit einem K_m -Wert von $0,260 \mu\text{M}$ und für beide Substrate mit einer v_{max} von $\approx 115 \text{ nmol Palmitinsäure/min}$ bestimmt und legen eine Reaktion beider Substrate mit dem Enzym vor der Freisetzung der Produkte nahe [94]. In beiden Untersuchungen wurde ein transientes acyl-HlyC Zwischenprodukt beobachtet [94] [95]. Thermodynamische Studien zerlegen des Weiteren die Gesamtreaktion in eine durch Entropie getriebene erste Teilreaktion (acyl-ACP + HlyC) zur Bildung des acyl-HlyC Zwischenprodukts und eine durch Enthalpie getriebene zweite Teilreaktion (acyl-HlyC +

proHlyA) zur Bildung von acyl-HlyA [96]. Die katalytischen Reste in den beiden postulierten Mechanismen zur Übertragung von Acylgruppen durch HlyC sind His24 und Asp93 (Abbildung 6) [61]. Der erste Reaktionsmechanismus setzt eine Bildung eines ternären Komplexes aus HlyC und den beiden Substraten proHlyA und acyl-ACP voraus [94]. Der zweite Reaktionsmechanismus beschreibt die sequenzielle Übertragung der Acylgruppe von acyl-ACP auf HlyC im ersten Schritt und von acyl-HlyC auf proHlyA im zweiten Schritt [96]. Analog zum Mechanismus in GNATs fungiert in den beiden für HlyC postulierten Reaktionsmechanismen Asp93 als generelle Base zur Deprotonierung des Substratlysins in proHlyA [61].

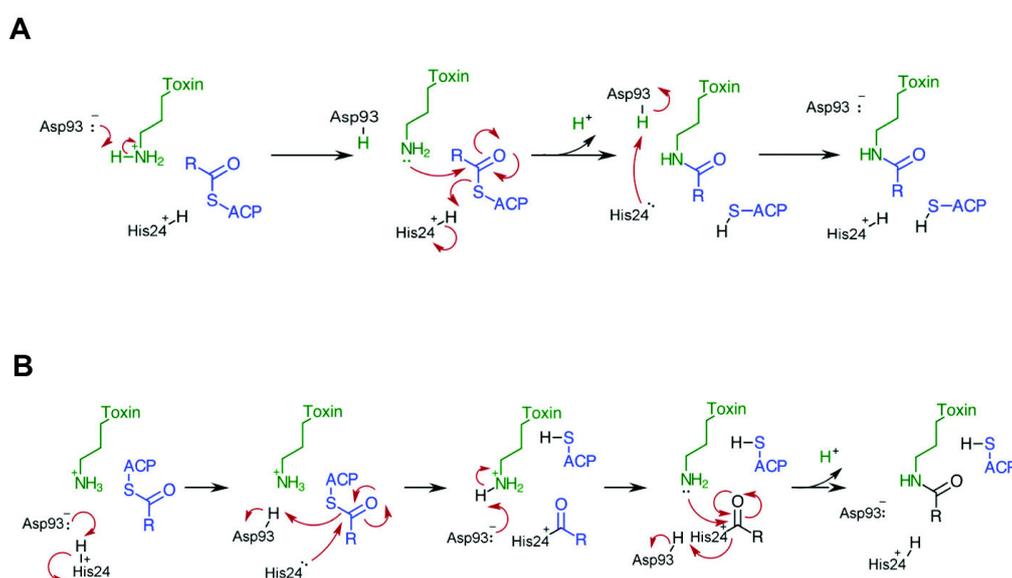


Abbildung 6: Zwei postulierte Reaktionsmechanismen für HlyC

Dargestellt sind zwei mögliche Reaktionsmechanismen für den Transfer von Acylgruppen vom Acylgruppendonor ACP (blau) auf die Lysinseitenketten von proHlyA (grün) durch die bakterielle Acyltransferase HlyC (schwarz) [61]. **A**) Direkter Mechanismus über einen ternären Komplex durch den nucleophilen Angriff des proHlyA Lysins auf den acyl-ACP Thioester. **B**) Sequenzieller Reaktionsmechanismus über ein kovalentes acyl-HlyC Zwischenprodukt und anschließend, nucleophilen Angriff des proHlyA Lysins auf den acyl-HlyC Thioester. Die Abbildung ist entnommen aus [61].

1.3.4 Häm als möglicher regulatorischer Faktor von HlyC

Häm ist in Säugern bestens bekannt als prosthetische Gruppe in Hämoglobinen und Cytochromen [97]. Bei Hämen handelt es sich um Komplexverbindungen aus einem zentralen Eisenatom und einem Porphyrinring (zum Beispiel FeII/III-Protoporphyrin IX, Häm b oder einfach nur Häm genannt), die vorübergehend auch in freier Form im Organismus vorkommen [98]. Dabei besitzt freies Häm unter anderem auch eine regulatori-

sche Funktion, welche durch eine transiente Bindung an Proteine realisiert wird. Sogenannte Häm-regulierte Proteine (HRP, *heme-regulated proteins*) sind zum Beispiel im Zusammenhang mit der Zellzykluskontrolle und der DNA-Reparatur (p53), dem Eisenmetabolismus (IRP2), der Hämoglobin-Synthese (eIF2 α), der Kontraktion der glatten Muskulatur (Slo1) und der Alzheimer-Krankheit (β -Amyloid) beschrieben [99] [100] [101] [102] [103]. In Bakterien spielen HRPs häufig eine zentrale Rolle in Eisen- und Hämtransport (HrtR, HmuT, FeoB) [104] [105] [106]. Für die Bindung von Häm an Proteine müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein, die von der Forschungsgruppe von Frau Prof. Diana Imhof untersucht werden. Die Vorhersage potentiell Häm-bindender Proteine basiert dabei auf spezifischen Bindemotiven um die zentralen Aminosäuren Cys, His oder Tyr, die alle drei in der Lage sind eine koordinative Bindung mit dem zentralen Häm-Eisenatom einzugehen, obgleich die Seitenketten der umliegenden Aminosäuren einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung zeigen [106] [107] [108]. So erstellte Konsensussequenzen erlauben eine Klassifizierung von Häm-regulierten Motiven (HRMs, *heme-regulatory motifs*) in drei verschiedene Gruppen (entsprechend der koordinierenden Aminosäure Cys, His oder Tyr) und insgesamt acht verschiedene Klassen (entsprechend der umgebenden Aminosäuren Pro, His und Tyr in der Cys-Gruppe bzw. der umgebenden Aminosäuren His und Tyr in den His- und Tyr-Gruppen) [108]. Durch die Bindung ist eine Penta- oder Hexakoordination des Häm-Fe(III)-Zentralatoms möglich, je nachdem ob ein Peptid/Protein eine freie Koordinationsstelle am Häm-Eisenatom belegt (Pentakoordination) oder ein oder zwei Peptide/Proteine die zwei freien Koordinationsstellen am Häm-Eisenatom belegen (Hexakoordination) [107]. Ein auf einem His-HRM basierendes, kürzlich entdecktes HRP ist die Chloramphenicol Acetyltransferase CAT aus *Escherichia coli*, welche durch Eisen(III)-Protoporphyrin IX (Häm) inhibiert wird (IC₅₀-Wert 57,69 \pm 4,37 μ M) [108]. CAT katalysiert die zweifache Acetylierung von Chloramphenicol durch die Übertragung von Acetylgruppen von acetyl-CoA auf die beiden OH-Gruppen von Chloramphenicol, wodurch die antibakterielle Wirkung der Substanz verloren geht [109] [110]. Ein weiterer Kandidat aus dieser Gruppe ist die Acyltransferase HlyC aus *Escherichia coli* mit dem postulierten Bindemotiv FKQYH¹⁵¹HELI [108]. Eine Bindung von Häm an das entsprechende Nonapeptid wurde mittels UV-Vis Spektroskopie gezeigt (K_d = 0,24 \pm 0,17 μ M) [108]. Das postulierte Häm-Bindemotiv befindet sich in dem von ApxC abgeleiteten Homologiemodell für HlyC in der C-terminalen α -Helix (Abbildung 3). Kapitel 1 dieser Dissertation befasst sich mit der Wirkung von Häm auf HlyC. Die Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe von Frau Prof. Diana Imhof vom Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1.3.5 Häm-Aufnahmesysteme in Gram-negativen Bakterien

Freies Eisen in seiner reduzierten Form (Fe(II)) ist ein starker Radikalbildner (Fenton-Reaktion) und kommt im Gewebe überwiegend gebunden an prosthetische Gruppen und in Proteinen vor [111] [112]. Das verfügbare Eisen im Gewebe ist daher limitiert und Bakterien und Wirtszellen haben gleichermaßen eine Vielzahl an Strategien zur Bindung, Anreicherung und Aufnahme von Eisen entwickelt [113]. Bekannte, von Bakterien produzierte und sekretierte, niedermolekulare Verbindungen zur Bindung von Eisen sind Siderophore [114] [115]. Des Weiteren liegt komplexiertes Eisen vorübergehend in Form von freiem Häm im Organismus vor [98]. Die freie Hämkonzentration im Blutplasma liegt dabei bei einer Infektion mit hämolytischen uropathogenen *Escherichia coli* mit 15 bis 60 μM deutlich über der beobachteten Konzentration bei einer nicht-hämolytischen Infektion [116]. Sowohl Siderophore als auch Häm werden über komplexe Transportsysteme von Bakterien aktiv aufgenommen [117]. Ein aktiver Transport über biologische Membranen erfolgt zum Beispiel über die ATP-bindenden Kasette Transporter (ABC Transporter), wobei die Hydrolyse von ATP eine freie Energie von $-37,5 \text{ kJ/mol}$ liefert [118] [119]. Diese befinden sich in Bakterien in der zytosolischen Membran und sind zentraler Bestandteil von vielen Import- und Exportsystemen (Abbildung 7) [120]. An der direkten Aufnahme von Häm in Gram-negative Bakterien sind verschiedene Proteine und Proteinkomplexe beteiligt: Ein Häm-Rezeptor in der äußeren Membran zur Bindung von Häm und Hämoproteinen (braun), welcher, abhängig vom TonB-ExbB-ExbD Komplex (grau) in der inneren Membran, Häm in das Periplasma transportiert, periplasmatische Häm-Bindeproteine (grün), ein klassischer ABC-Transporter in der inneren Membran sowie zytoplasmatische Häm-bindende Proteine [121] [122] [123]. Wichtige Häm-Rezeptoren in *Escherichia coli* sind Chua [124] [125] und speziell in uropathogenen *Escherichia coli* Hma [126]. Im Zytoplasma wird Häm durch die Häm-Oxygenase zu Biliverdin, Kohlenmonoxid und Eisen abgebaut [127]. Die Regulation der Expression vieler Eisentransport-assoziiierter Gene erfolgt durch den Transkriptionsfaktor Fur [128].

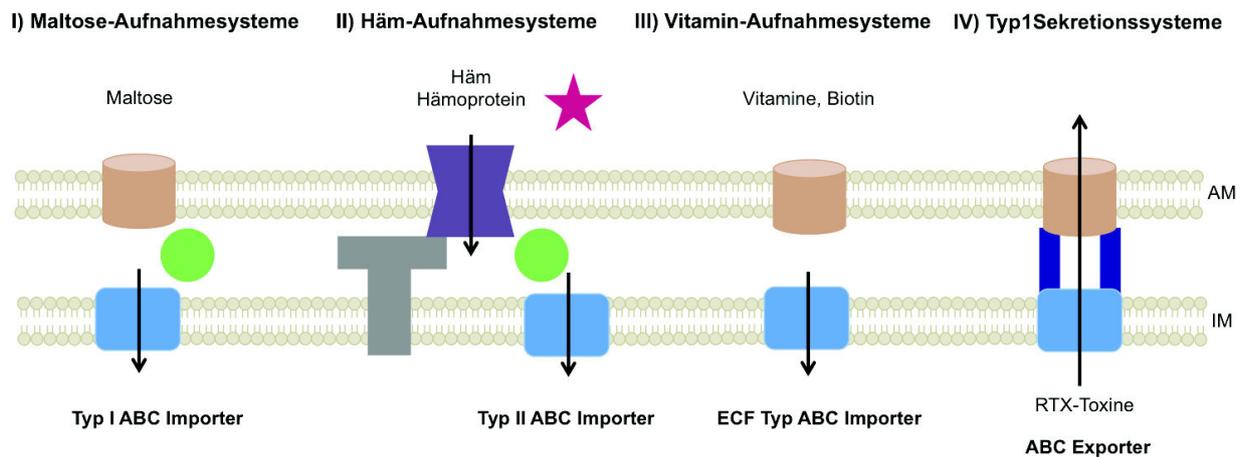


Abbildung 7: Transportsysteme und ABC-Transporter in Gram-negativen Bakterien

Der Transport in Bakterien erfolgt durch eine transmembranöse Diffusion, spezifische und unspezifische Kanäle in der äußeren Membran (braun), verschiedene Proteine im Periplasma (grün) und unterschiedliche ABC-Transporter in der inneren Membran (blau) [120] [129] [130]. **I)** Typ I ABC Importer zur Aufnahme von kleinen, löslichen Verbindungen wie zum Beispiel Maltose [131]. **II)** Typ II ABC Importer in Häm-Transportsystemen [121]. **III)** ECF Typ ABC Importer zur Aufnahme von niedermolekularen, lipophilen Verbindungen wie zum Beispiel Vitaminen [132]. **IV)** ABC-Exportier in Typ 1 Sekretionssystemen zur Sekretion von Proteintoxinen mit einem Porin in der äußeren Membran (braun) und einem Adapterprotein im Periplasma (dunkelblau) [133].

1.4 Der Export von HlyA erfolgt durch ein Typ 1 Sekretionssystem

Anfang der 1980er Jahre wurden in dem für die zytolytischen Wirkungen von HlyA verantwortlichen DNA-Abschnitt insgesamt vier Gene identifiziert und erstmals sequenziert [134] [135]. Das sogenannte *hlyCABD* Operon umfasst die Abfolge der Gene *hlyC*, *hlyA*, *hlyB* und *hlyD*. Während *hlyC* für die bakterielle Acyltransferase zur Umwandlung des inaktiven Protoxins (proHlyA) in das hämolysisch aktive HlyA kodiert, kodieren *hlyD* und *hlyB* für zwei Komponenten in der inneren Bakterienmembran des Typ 1 Sekretionssystems (T1SS) [43] [136] [137]. Die dritte Komponente des Transportsystems, TolC, befindet sich in der äußeren Membran und wird außerhalb dieses Operons kodiert [138]. Typ 1 Sekretionssysteme aus Gram-negativen Bakterien bestehen dementsprechend aus drei Komponenten (Abbildung 7): einem Porin in der äußeren Membran, einem Adapterprotein im Periplasma und der inneren Membran, wie auch einem ABC-Transporter in der inneren Membran [139]. Für das HlyA T1SS sind dies im Einzelnen der ABC-Transporter HlyB, das Adapterprotein HlyD (MFP, *membrane fusion protein*) und das Porin TolC [133]. HlyB besteht aus einer Transmembrandomäne (TMD, *transmembrane domain*), einer Nukleotid-bindenden Domäne (NBD, *nucleotide binding domain*) sowie einer zusätzlichen N-terminalen Domäne, der sogenannten C39-ähnlichen Domäne

(CLD, *C39-like domain*) [133]. Da ein funktioneller ABC-Transporter aus mindestens zwei TMDs und zwei NBDs besteht und in diesem Fall ein Gen nur für die Hälfte des funktionellen Transporters kodiert, handelt es sich bei HlyB um einen sogenannten „half-size“ Transporter [140]. HlyB liegt in der Membran als Homodimer vor, in dem die beiden NBDs an ihrer Grenzfläche ATP binden, und bildet zusammen mit HlyD den zentralen Bestandteil in der inneren Membran des Sekretionssystems [141] [142] [143]. Um ein durchgängiges System vom Zytosol des Bakteriums bis hin an dessen Oberfläche zu gewährleisten, wird in Anwesenheit des Substrates HlyA das Porin TolC in der äußeren Membran rekrutiert [133]. TolC ist in Gram-negativen Bakterien an vielen Transportprozessen, wie zum Beispiel auch an der Vermittlung von Medikamentenresistenzen durch das Ausschleusen von antibakteriellen Substanzen, beteiligt [144]. Das HlyA T1SS transportiert proHlyA und HlyA über beide bakteriellen Membranen ohne periplasmatisches Zwischenprodukt und ohne Abspaltung der Sekretionssequenz [145]. Für den Transport ist das C-terminale Sekretionssignal ausreichend, wobei das Substrat zuerst mit den zytoplasmatischen Komponenten des Transportsystems interagiert und dann, mit dem Sekretionssignal zuerst, an die Oberfläche des Bakteriums gelangt [45] [146] [147] [148] [149]. Es wird angenommen, dass HlyA in einem weitestgehend ungefalteten Zustand transportiert wird und erst nach Erreichen der Zelloberfläche durch die Bindung von Calciumionen in der RTX-Domäne seine native Konformation annimmt [42] [147]. Die Sekretion des Toxins in einem gefalteten Zustand ist aufgrund des inneren Porendurchmessers des äußeren Membranporins TolC von knapp 20 Å in seinem geöffneten Zustand sehr unwahrscheinlich [144] [150] [151] [152]. Der äußere Durchmesser einer α -Helix beträgt im Vergleich dazu in etwa 10-12 Å [153]. Die Substrate von T1SS reichen im Allgemeinen von kleinen Peptiden bis hin zu Proteinen mit einer Größe von über 500 kDa [3]. So wird zum Beispiel das Bakterizid Colicin V aus *Escherichia coli* mit einem Molekulargewicht von 10 kDa und auch das Cholera-toxin aus *Vibrio cholerae* aus der Familie der multifunktionalen, autoprozessierenden RTX-Toxine (MARTX, *multifunctional autoprocesing RTX toxin*) mit einem Molekulargewicht von annähernd 500 kDa durch ein T1SS transloziert [154] [155]. Für das HlyA T1SS sind die drei-dimensionalen Raumstrukturen von TolC, einem periplasmatischen Fragment von HlyD, der NBD und der CLD von HlyB bekannt [141] [147] [150] [156].

1.5 Die Interaktion von HlyA mit Zielzellen

1.5.1 Unterschiedliche Wirkmechanismen von HlyA – zytolytische, zytotoxische und immunregulatorische Funktionen

Nach dem Transport über die beiden bakteriellen Membranen nimmt HlyA über die Bindung von Calciumionen in der RTX-Domäne seine native Konformation an (Kapitel 1.2.2). Es wird davon ausgegangen, dass HlyA daraufhin in einem dreistufigen Prozess mit den biologischen Membranen von Wirtszellen interagiert: **I.)** Bindung des Toxins an die Zielzelle **II.)** Insertion in die Lipiddoppelschicht der Membran und **III.)** Permeabilisierung der Membran wie zum Beispiel durch eine Porenbildung [157] [158]. Im ersten Schritt sind sowohl proHlyA als auch HlyA in der Lage, an artifiziale Membranen mit definierter und undefinierter Lipidkomposition zu binden [159] [160] [161]. Die Bindung ist unabhängig von der Membraninsertion und der Zellyse zu betrachten und wird im Hinblick auf eine mögliche Rezeptorabhängigkeit in der Literatur kontrovers diskutiert [162] [163] [164]. Obgleich eine möglicherweise nicht zu sättigende Bindung von HlyA an Erythrozyten als rezeptorunabhängige Bindung interpretiert wurde, sind verschiedene Bindepartner für HlyA auf den Zielzellen bekannt. Neben einer spezifischen Bindung an Cholesterin als ubiquitären Bestandteil einer jeden eukaryontischen Plasmamembran [165] involvieren diese zum Beispiel das in Erythrozytenmembranen reichlich vorhandene Glykoprotein Glykophorin (Binderegion in HlyA zwischen den Aminosäuren 914 und 936) [166] [167] und den spezifisch auf T-Lymphozyten vorkommenden Integrinrezeptor $\alpha_L\beta_2$ (CD11a/CD18, LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen 1*) [168] [169]. Im zweiten Schritt der Interaktion erfolgt die Umwandlung des löslichen Proteins in ein integrales Membranprotein [170] [171] [172]. Es ist allgemein akzeptiert, dass die Insertion von HlyA in die Membran irreversibel ist und mit größeren strukturellen Änderungen im Protein einhergeht. Im finalen Schritt, der Zellyse, kommt es schließlich zur Permeabilisierung der Membran und den direkt und indirekt daraus resultierenden Wirkungen [158]. Es wird angenommen, dass HlyA nicht-selektive, für Kationen durchlässige, transiente Poren (zum Beispiel für Kalium- oder Calciumionen) in reinen Lipidmembranen und in biologischen Membranen bildet und die Oligomerisierung des Proteins in der Membran in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt [173] [174] [175] [176]. *In vivo* kommt es unter Einwirkung von HlyA zu Calciumionenoszillationen und einem Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration in den Zielzellen [177] [178]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass eine HlyA-abhängige Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration in Erythrozyten durch den P2X-Rezeptor vermittelt wird und in Epithelzellen auch

durch die Freisetzung von Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum erfolgen kann [179] [180]. Ein Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration führt in Erythrozyten zu einer Öffnung von calciumabhängigen Kalium- und Chloridionenkanälen (K(Ca)_{3.1} und TMEM16A), wodurch es ebenfalls zu einem Ausstrom von Kaliumionen aus den Zellen kommt [181]. Neben den hohen lytischen Toxinkonzentrationen im Bereich von nM bis mM sind sublytische Konzentration im Bereich von wenigen pM für die zytotoxischen und immunregulatorischen Wirkungen von HlyA mitunter ausreichend (50 % Hämolyse bei einer Toxinkonzentration von 9,5 pM) [18]. Geringere Toxinkonzentrationen werden insbesondere im Zusammenhang mit einer immunregulatorischen Funktion auf Granulozyten, einer modulatorischen Wirkung auf verschiedene Signaltransduktionsprozesse, einer Aktivierung von Wirtsproteasen zur Exfoliation von Blasenepithelzellen und verschiedenen apoptotischen Prozessen diskutiert [19] [20] [182] [183]. Kapitel 3 dieser Dissertation beschäftigt sich mit einer möglichen, zuckerabhängigen Bindung von HlyA an Wirtszellen, weswegen im Folgenden näher auf die verschiedenen Glykosylierungsmöglichkeiten auf den Zelloberflächen eingegangen wird.

1.5.2 Eine mögliche, spezifische Zuckerbindung von HlyA

Die Plasmamembran grenzt Zellen als funktionelle Einheiten von ihrer Außenwelt ab und besteht aus einem komplexen Gefüge von Proteinen und Lipiden. [184]. Sowohl Proteine als auch Lipide können mit unterschiedlichen Zuckereinheiten und unterschiedlich langen Zuckerketten modifiziert sein (Abbildung 8) [185]. In Proteinen ist eine Amidbindung an die Seitenkette von Asparagin (N-Glykosylierung), eine glykosidische Bindung (O-Glykosylierung) an die Seitenketten von Serin/Threonin, Hydroxylysin (Kollagen) und Tyrosin (Glykogenin), eine C-C Bindung an die C2-Position des Tryptophans (C-Mannosylierung) oder eine Kopplung an Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) als Verbindungselement zwischen dem Protein und der Membran möglich [185]. Bei den glykosylierten Lipiden handelt es sich vor allem um Glykosphingolipide [186]. In diesen erfolgt die Bindung von Monosacchariden über eine Kopplung an die Ceramideinheit des Sphingolipids [186]. Häufig sind dies Glucose (Glucosylceramid) oder Galactose (Galactosylceramid), an die weitere Zuckereinheiten angehängt werden. Glykosphingolipide tragen in der Regel kürzere und weniger komplexe Zuckerketten als Proteine [186]. Einfachzucker werden über glykosidische Bindungen zu hochkomplexe Zuckerstrukturen zusammengesetzt, von denen es einer Schätzung zufolge über 7,000 verschiedene Varianten im humanen Genom gibt, die von Glykan-bindenden Proteinen (GBP, *glycan binding protein*) erkannt werden [187]. Durch die verschiedenen Möglichkeiten an Verzwei-

gungen und anomeren Konfigurationen entsteht eine große Diversität an Zuckerverbindungen, deren Zustandekommen vor allem vor dem Hintergrund der Evolution von Wirt-Pathogen-Beziehungen betrachtet wird und verstärkt in den terminalen Zuckerresten der Glykane auftritt [188] [189]. Darüber hinaus verändern sich die Glykosylierungsmuster von Zellen während der Ontogenese und sind daher nicht nur spezifisch für bestimmte Spezies sondern auch für bestimmte Zelltypen und Gewebe [190] [191].

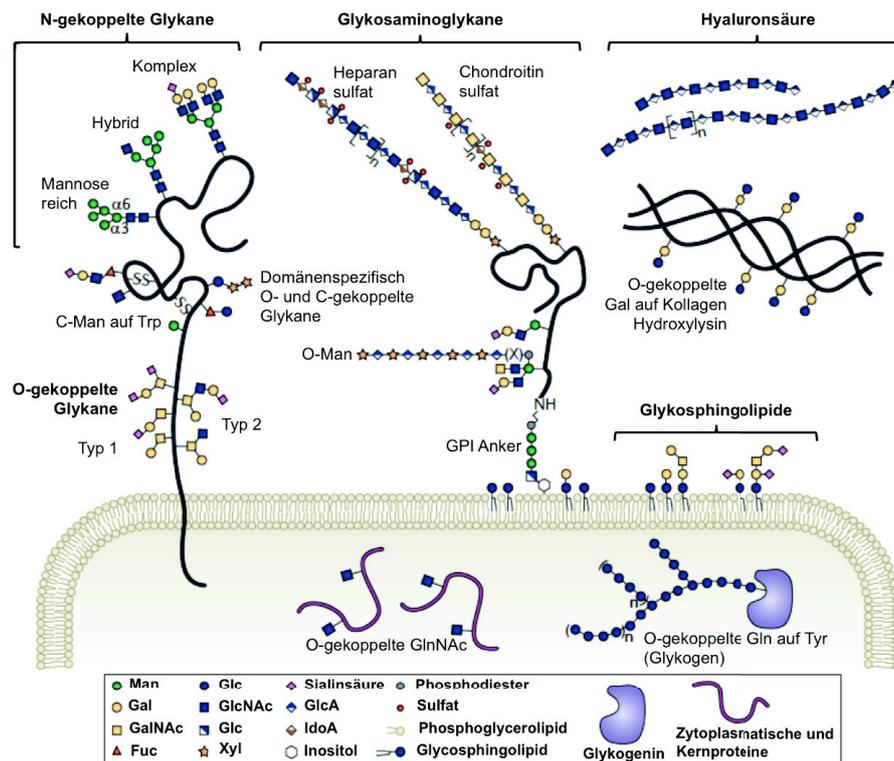


Abbildung 8: Verschiedene Glykosylierung auf den Zelloberflächen von Vertebraten

Kohlenhydrate dienen unter anderem der Erkennung von Wirtszellen durch Pathogene [185]. Häufige auf Zellen vorkommende Formen der Glykosylierung sind N- oder O-Glykosylierungen von Proteinen (links). Bei Glykosaminoglykanen (GAGs) handelt es sich um O-gekoppelte Glykane, die aus einem spezifischen Tetrasaccharid und mehreren Wiederholungen eines Disaccharids bestehen, wobei Glykoproteine mit einer oder mehreren GAG-Ketten als Proteoglykane bezeichnet werden (mittig). Zusätzlich zu Proteinen sind die meisten eukaryontischen Zellmembranen mit Glykosphingolipiden ausgestattet (rechts). Die Abbildung ist entnommen aus [185].

Viele Bakterien und Viren nutzen die spezifischen Glykosylierungen von Proteinen und Lipiden zu Erkennung und Adhäsion an die Wirtszellmembran [192]. Ein Beispiel hierfür ist das Cholera toxin aus *Vibrio cholerae*, welches spezifisch an das Pentasaccharid GM1 bindet [193]. Andere sehr bekannte Beispiele sind Lektine: Beispielsweise bindet das Lektin PA-IL (*IecA*) aus *Pseudomonas aeruginosa* an Galactoseeinheiten und das Glykolipid Globotriaosylceramid (Gb3) [194] [195] und das Lektin PA-IIL (*IecB*) an Fucoseinheiten und das Blutgruppenantigen Lewis^a [196] [197]. Auch pathogene *Escherichia coli*

verwenden spezifische Zuckerbindungen um zum Beispiel an die Wirtszellen anzuhaf-ten: Ein gut erforschtes Beispiel ist die Bindung von FimH, einem auch von uropathoge-nen *Escherichia coli* (UPEC) exprimierten, Typ 1 Pili assoziierten, Adhäsın, an die Man-noseeinheiten von verschiedenen Glykoproteinen [198] [199]. Beispiele für Glykan-bindende, sekretierte Proteintoxine aus *Escherichia coli* sind der Virulenzfaktor Stx (auch Verocytotoxin, VT genannt) aus enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC), wel-cher an das Glykolipid Gb3 bindet, ebenso wie das strukturell und funktionell eng mit dem Cholera-toxin verwandte, hitzelabile Enterotoxin (LT) aus enterotoxischen *Escherichia coli* (ETEC), welches auch an das Glykosphingolipid GM1 und außerdem an Sialinsäuren bindet [200] [201] [202]. Für das nah mit HlyA verwandte Adenylatzyklase-toxin (AC) aus *Bordetella pertussis* aus der RTX-Proteinfamilie wurde gezeigt, dass die N-gekoppelten Oligosaccharide am $\alpha_L\beta_2$ Integrinrezeptor (CD11a/CD18, LFA-1) essenti-ell für die Bindung an die Wirtszellen sind [169]. Dieser Zusammenhang hat zuletzt zu der Annahme geführt, dass an der Bindung von HlyA an die Zielzellen ebenfalls Zucker beteiligt sind. Untersuchungen in diesem Zusammenhang zeigten, dass die den Integrin-rezeptor exprimierenden T-Lymphozyten nach einer unspezifischen Deglykosylierung mit einer Mischung aus verschiedenen Glykosidasen eine stärkere Resistenz gegen das Toxin aufwiesen als die unbehandelten Zellen [169]. Ferner ist die durch Sialinsäuren bewirkte negative Ladung auf den Zelloberflächen von Lymphozyten für die Aktivität des Leukotoxins LtxA aus *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* von Bedeutung [203]. Ein bekannter Rezeptor für HlyA auf Erythrozyten ist das sehr stark glykosylierte Glykopho-rin, obwohl hier keinerlei Hinweis auf eine zuckerabhängige Bindung vorliegt [166] [204]. Die in den frühen Experimenten zur Untersuchung der Porenbildung von HlyA verwende-ten Asolektin-Lipidmischungen aus Sojabohnen waren wesentlich anfälliger für das To-xin als die reinen Lipiddoppelschichten und enthalten ebenfalls zu einem geringen Anteil Mono- und Digalactosylglyceride [173] [175] [205].

1.6 Die Rolle von HlyA bei Harnwegsinfektionen

Harnwegsinfektionen zählen zu den häufigsten Infektionserkrankungen weltweit [206]. Etwa 70 % der Infektionen werden durch uropathogene *Escherichia coli* (UPEC) verur-sacht [207]. Andere Erreger der Harnwegsinfektion sind *Klebsiella pneumoniae*, *Staphy-lococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, Streptokokken der Gruppe B, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und verschiedene *Candida*-Arten. Mit dem Fortschreiten und Aufsteigen der Infektion unterscheidet man insgesamt vier verschiedene Stadien: I) Urethritis (Entzündung der Harnröhre), II) Zystitis (Entzün-

derung der Harnblase), III) Ureteritis (Entzündung der Harnleiter) und IV) Pyelonephritis (Entzündung des Nierenbeckens und/oder des Nierenparenchyms) [1].

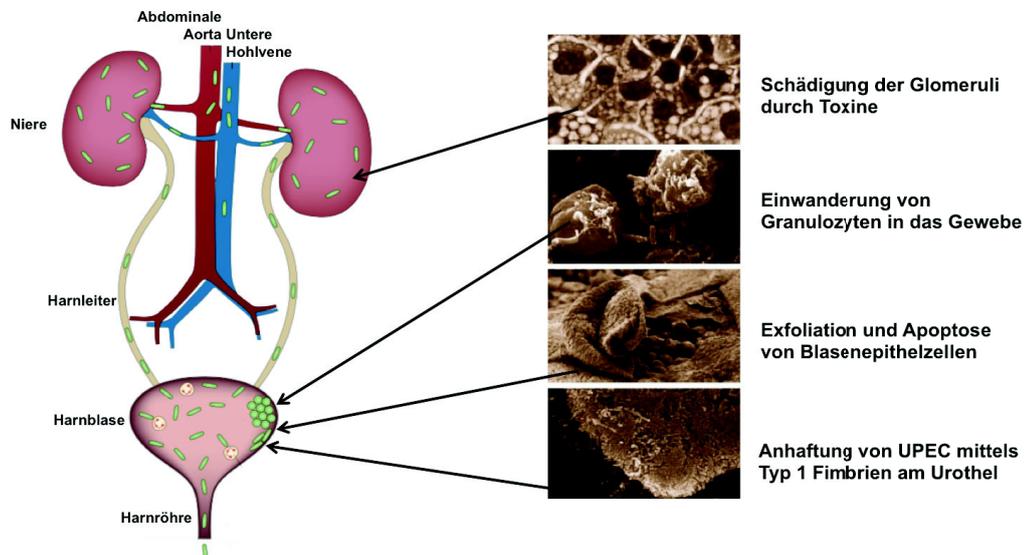


Abbildung 9: Harnwegsinfektionen

Dargestellt ist schematisch der Verlauf einer Harnwegsinfektion mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus unterschiedlichen Stadien der Infektion: Uropathogene *Escherichia coli* (UPEC) besiedeln die Harnröhre und Blase und können über die Harnleiter bis in die Nieren aufsteigen, wobei ein Übertritt in das Blut eine Sepsis auslösen kann. Die Abbildungen sind aus [207] und [208] entnommen und wurden modifiziert.

Am Beginn der Infektion steht häufig eine Kontamination im Bereich der Harnröhrenöffnung mit intestinalen *Escherichia coli* und deren Kolonisation der Harnblase [209]. Selektionskriterien in diesem Stadium sind mitunter die Expression von Fimbrien (Adhäsion vs. Migration), Mechanismen zur Immunevasion, Systeme zur Nährstoffaufnahme und die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen, die insbesondere unter Eisenrestriktion beobachtet wird [210] [211] [212]. In der Folge kann es zu einem Aufstieg der Bakterien über die Harnleiter bis in die Nieren und einer Schädigung der Epithelzellen durch die bakteriellen Toxine und Proteasen kommen [208]. Ein Durchqueren der Blut-Harn-Schranke in den Glomeruli der Nierenkörperchen kann schließlich bis zur Sepsis führen. UPEC können währenddessen nicht nur extrazellulär, sondern auch intrazellulär in Form von sogenannten metabolisch aktiven, intrazellulären Gemeinschaften (IBC, *intracellular bacterial communities*) und in sogenannten latenten intrazellulären Reservoirs (QIR, *quiescent intracellular reservoirs*) vorkommen [213] [214]. Pathogene *Escherichia coli* unterscheiden sich von kommensal lebenden Bakterien durch den Besitz bestimmter Virulenz-assoziiierter Gene [215] [216]. Klinische UPEC Isolate besitzen beispielsweise im Vergleich zu intestinalen, kommensalen *Escherichia coli* Isolaten deutlich häufiger

das *hlyCABD* Operon für die Expression und Sekretion von HlyA [215] [216]. Eine klassische Rolle von HlyA wird durch seine Hämolysefähigkeit in der Nährstoffversorgung der Bakterienpopulation mit essentiellm Eisen aus Erythrozyten gesehen. In einem ähnlichen Zusammenhang kann die Exfoliation von Epithelzellen und das Vordringen in tieferliegende Gewebeschichten interpretiert werden [182] [217]. Des Weiteren können die Wirkungen von HlyA auf Zellen des Immunsystems wie neutrophile Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen als Abwehrmechanismen von Effektormechanismen der angeborenen und adaptiven Immunität interpretiert werden [17] [218] [219] [220] [221]. Neueste Forschungsergebnisse zeigen außerdem, dass freies Häm im Gewebe sehr effektiv die Phagozytosefunktion von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten hemmt [116]. Dies erlaubt ein neues Verständnis der Hämolyse im Sinne einer Strategie zur Freisetzung von Häm aus Erythrozyten als Schutz vor Phagozytose.

2 Ziele der Arbeit

HlyA ist ein Prototyp aus der Gruppe der RTX-Toxine aus Gram-negativen Bakterien. Diese sind häufig in Genklustern, bestehend aus den Genen für ein RTX-Toxin, eine RTX-Toxin-aktivierende Acyltransferase und den Genen für die Proteine eines T1SSs, organisiert. So vielfältig die Funktionen von RTX-Toxinen im Einzelnen auch sind, so ist eine ihrer Gemeinsamkeiten die posttranslationale Aktivierung durch eine intrazelluläre Acyltransferase sowie die Interaktion mit eukaryontischen Wirtszellen nach erfolgter Sekretion. Ziel dieser Arbeit ist die *in vitro* Charakterisierung des RTX-Toxins HlyA sowie die Charakterisierung der korrespondierenden, HlyA-aktivierenden Acyltransferase HlyC aus uropathogenen *Escherichia coli*.

Das erste Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung eines möglichen Regulationsmechanismus zur Aktivierung von proHlyA durch die Acyltransferase HlyC. Ansatzpunkt hierfür ist die Funktion von HlyC. In diesem Zusammenhang soll zunächst ein bereits etablierter *in vitro* Acylierungsassay für die Enzymaktivitätsmessungen von gereinigtem HlyC in Anwesenheit von Hämin adaptiert werden. Anschließend soll damit ein möglicher Einfluss von Hämin auf die Acyltransferaseaktivität von HlyC aufgeklärt werden. Des Weiteren soll gegebenenfalls die Bindung von Hämin an die postulierte Koordinationsstelle im Häm-Bindemotiv von HlyC als ursächlich für den Einfluss auf die Enzymaktivität bestätigt werden.

Das zweite Ziel dieser Dissertation ist die strukturelle und funktionelle Analyse von HlyA in Hinblick auf eine mögliche Bindung des Toxins an spezifische Zuckerstrukturen auf den Zielzellen. Ansatzpunkt hierfür ist das Protoxin proHlyA. Zum einen soll die dreidimensionale Raumstruktur von HlyA mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden und zum anderen sollen funktionelle Daten zur Glykanbindung die Ergebnisse der strukturellen Untersuchungen ergänzen und untermauern. Um potentielle, zuckerbasierte Liganden von proHlyA zu identifizieren, soll eine mögliche, zuckerabhängige Bindung von gereinigtem und fluoreszenzmarkiertem proHlyA mit unterschiedlichen, biochemischen Methoden untersucht werden.

3 Kapitel 1: Acylierung durch HlyC

In diesem Kapitel wird der Einfluss von Eisen(III)-Protoporphyrin IX (Hämin) auf die Enzymaktivität von HlyC untersucht. Hierfür wurde gereinigtes Protein in einem optimierten proHlyA *in vitro* Acylierungsassay, basierend auf Thomas *et al.* (2014), eingesetzt [222].

Inhaltsverzeichnis

3	<u>Kapitel 1: Acylierung durch HlyC</u>	23
3.1	Material und Methoden	25
3.1.1	Allgemeine Materialien	25
3.1.2	Allgemeine Methoden	32
3.1.3	Klonierung von HlyC H151A H152A	34
3.1.4	Expression und Reinigung von HlyC	35
3.1.5	Expression und Reinigung von HlyC H151A H152A	37
3.1.6	Massenspektrometrische Analyse der Bande zwischen 10 und 15 kDa	39
3.1.7	Expression und Reinigung von proHlyA und Herstellung des Acyl-ACP Rohextraktes	39
3.1.8	Standardmethode: <i>In vitro</i> Acylierung basierend auf Thomas <i>et al.</i> (2014)	40
3.1.9	Vorversuche zur <i>in vitro</i> Acylierung durch HlyC	41
3.1.10	Enzymkinetik von HlyC für proHlyA	42
3.1.11	Enzymaktivität von HlyC in Anwesenheit von Hämin	42
3.1.12	Enzymaktivität von HlyC in Anwesenheit verschiedener PPIX-Derivate	44
3.1.13	Enzymaktivität von HlyC H151A H152A in Anwesenheit von Hämin	44
3.2	Ergebnisse	45
3.2.1	Klonierung von HlyC H151A H152A	45
3.2.2	Expression und Reinigung von HlyC	45
3.2.3	Expression und Reinigung von HlyC H151A H152A	47
3.2.4	Massenanalyse der Bande zwischen 10 und 15 kDa	48
3.2.5	Expression und Reinigung von proHlyA und Herstellung des Acyl-ACP Rohextraktes	50
3.2.6	Vorversuche zur <i>in vitro</i> Acylierung durch HlyC	51
3.2.7	Enzymkinetik von HlyC für proHlyA	53
3.2.8	Enzymaktivität von HlyC in Anwesenheit von Hämin	55
3.2.9	Enzymaktivität von HlyC in Anwesenheit verschiedener PPIX-Derivate	58
3.2.10	Enzymaktivität von HlyC H151A H152A in Anwesenheit von Hämin	59

Die in diesem Kapitel dargestellten Messungen der Enzymkinetik von HlyC, der Aktivität von HlyC und HlyC H151A H152A in Anwesenheit von Hämin und verschiedenen PPIX-Derivaten sowie die Auswertung der Messdaten erfolgte in Zusammenarbeit mit Henning Brewitz vom Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn aus der Forschungsgruppe von Frau Prof. Diana Imhof. Ein Manuskript zu diesem Kapitel zur wissenschaftlichen Publikation ist zur Zeit in Vorbereitung.

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Allgemeine Materialien

Chemikalien, Geräte und andere Materialien

Die in diesem Kapitel eingesetzten Chemikalien, Biochemikalien, Geräte und anderen Materialien sind in den Tabellen 1 und 2 aufgelistet.

Tabelle 1: Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalien	Abkürzung, Summenformel	Reinheit/Qualität	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES, C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	für die Molekularbiologie	Fisher Scientific
Agar Agar, Pulver, hohe Gelstärke	(C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n	reinst	Serva
Agarose Standard Gelstärke ≥ 1100 g/cm ²	Agarose	für die DNA/RNA-Elektrophorese	Carl Roth
Aluminiumsulfat 18-Hydrat	Al ₂ (SO ₄) ₃ • 18 H ₂ O	reinst	AppliChem
Ammoniumperoxidsulfat	APS, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	zur Analyse	Carl Roth
Ampicillin Natriumsalz	Amp, C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S	≥ 97 %	Carl Roth
Bromphenolblau	C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S	n. a.	Merck
Calciumchlorid Dihydrat	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	≥ 99,5 %	Fluka
Coomassie [®] Brilliant Blau R250	CBB-R250, C ₄₅ H ₄₄ N ₃ NaO ₇ S ₂	n. a.	Serva
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat	FeCl ₃ • 6 H ₂ O	zur Analyse	J.T. Baker
Essigsäure	C ₂ H ₄ O ₂	technisch	unbekannt
Ethanol	EtOH, C ₂ H ₆ O	technisch	unbekannt
Ethidiumbromid Lösung, 10 mg/ml in H ₂ O	EtBr, C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃	für die Molekularbiologie	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz	EDTA, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈	zur Analyse	AppliChem
Glucose Monohydrat	Gluc, C ₆ H ₁₄ O ₇	n. a.	Caleo
Glycerin	C ₃ H ₈ O ₃	zur Analyse	Fisher Scientific
Glycin	C ₂ H ₅ NO ₂	n. a.	VWR
Harnstoff	CH ₄ N ₂ O	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich
Imidazol	C ₃ H ₄ N ₂	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	IPTG, C ₉ H ₁₈ O ₅ S	≥ 99 %	Carl Roth
Kaliumchlorid	KCl	reinst	AppliChem
Kanamycinsulfat	Kan, C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ • H ₂ SO ₄	≥ 750 I.E./mg	Carl Roth

Magnesiumsulfat Heptahydrat	MgO ₄ S • 7 H ₂ O	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-ethyldiamin	TEMED, C ₆ H ₁₆ N ₂	zur Analyse	Merck
Natriumchlorid	NaCl	zur Analyse	Fisher Scientific
Natriumdodecylsulfat	SDS, C ₁₂ H ₂₅ O ₄ S • Na	≥ 99,0 %	Serva
Natriumhydroxid (Plätzchen)	NaOH	zur Analyse	AppliChem
Nickel(II)-chlorid Hexahydrat	NiCl ₂ • 6 H ₂ O	≥ 98,0 %	Roth
Phosphorsäure	H ₃ PO ₄	zur Analyse	Fisher Scientific
Protoporphyrin IX	PPIX, C ₃₄ H ₃₄ N ₄ O ₄	≥ 95,0 %	Frontier Scientific
Eisen(III)-Protoporphyrin IX Chlorid	Hämin, Fe(III)PPIX, C ₃₄ H ₃₂ ClFeN ₄ O ₄	≥ 97,0 %	Sigma-Aldrich
Cobalt(III)-Protoporphyrin IX Chlorid	Co(III)PPIX, C ₃₄ H ₃₂ CoN ₄ O ₄ Cl	n. a.	Sigma-Aldrich
Zink(II)-Protoporphyrin IX	Zn(II)PPIX, C ₃₄ H ₃₂ N ₄ O ₄ Zn	n. a.	Frontier Scientific
Gallium(III)-Protoporphyrin IX Chlorid	Ga(III)PPIX, C ₃₄ H ₃₂ ClGaN ₄ O ₄	n. a.	Frontier Scientific
Rotiphorese [®] Gel aus 30%iger, wässriger Acrylamidstamm- lösung und 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 : 1	Acrylamidlösung	n. a.	Carl Roth
Salzsäure	HCl	reinst	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃	zur Analyse	VWR
Xylencyanol FF	C ₂₅ H ₂₇ N ₂ O ₇ S ₂ • Na	Spuren möglich	Serva
Biochemikalien	Abkürzung	Anmerkung	Hersteller
Complete [™] Proteaseinhibitormischung: Pankreasextrakt, Thrombolyse, Chymotrypsin, Trypsin, Papain	Proteaseinhibitormix	EDTA-frei	Roche Diagnostics
Deoxynukleotidmix aus 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP	dNTP Mix	für die Molekularbiologie	New England BioLabs
Gene Ruler [™] 1 kb DNA Ladder	DNA-Marker	0,5 µg/µl	Thermo Scientific
Hefeextrakt für die Bakteriologie	Hefeextrakt	mikrogranuliert	Carl Roth
PageRuler [™] Plus Proteinmarker	Proteinmarker	10-250 kDa	Thermo Scientific
PageRuler [™] Proteinmarker	Proteinmarker	10-170 kDa	Thermo Scientific
PageRuler [™] Proteinmarker	Proteinmarker	10-200 kDa	Thermo Scientific
Pfu DNA Polymerase	DNA-Polymerase	2,5 U/µl (rekombinant)	Thermo Scientific
Pfu DNA Polymerase Puffer	DNA-Polymerase Puffer	mit MgSO ₄ , 10×	Thermo Scientific
Plasmid Miniprep Kit NucleoSpin [®]	Plasmid Miniprep Kit	–	Macherey-Nagel
Restriktionsenzym DpnI	DpnI	20 U/µl	New England BioLabs

Restriktionsenzympuffer CutSmart®	CutSmart® Puffer	10×	New England BioLabs
Schafblut	–	Vollblut, defibriniert	Thermo Scientific
T4 DNA Ligase	DNA-Ligase	5 U/μl	Thermo Scientific
T4 DNA Ligase Puffer	DNA-Ligase Puffer	10×	Thermo Scientific
Trypton/Pepton aus Casein	Trypton/Pepton Casein	pankreatisch verdaut	Carl Roth

Tabelle 2: Geräte und andere Materialien

Gerätebezeichnung	Hersteller, Firmensitz
ÄKTA™ Purifier Flüssigkeitschromatographiesystem bestehend aus Box-900, UPC-900, P-900, Frac-920 und CU-950	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Autoklav Systec VX-120 und VX-150	Systec GmbH, Linden, DE
Einstrahlphotometer HeAios δ, variabler Wellenlängenbereich von 190–1100 nm	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
Heizblöcke Thermomixer compact und comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Inkubationsschüttler Multitron Standard und Ecotron	Infors AG, Bottmingen, CH
Inkubator für Zellkulturen bei 37°C	Heraeus GmbH, Hanau, DE
Laborwaage ABT I20-5DM (42 g; 120 g ± 0,00002 g; 0,0001 g)	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Laborwaage Modell EW 2200-2NM (max: 2200 g ± 0,01 g)	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Lumia Imaging System: Chemi Genius ² Bio Imaging System	Synoptics (Syngene), Cambridge, UK
Mehrkanalpipette Transferpette® S-12 20–200 μl	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, DE
Milli-Q Wasseraufbereitungsanlage	Merck (Millipore) KGaA, Darmstadt, DE
NanoDrop™ ND-1000 Spektralphotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
PCR Gerät π Gradient Thermocycler	Analytic Jena AG (Biometra), Jena, DE
Peristaltikpumpe Minipuls®3	Gilson, Middleton, WI, USA
pH-Meter pHenomenal pH1000L	VWR, Radnor, PA, USA
Pipettensatz Pipetman Classic® mit variablen Volumina: 1000 μl, 200 μl, 100 μl, 20 μl und 2 μl	Gilson, Middleton, WI, USA
Plattenphotometer FLUOstar Optima	BMG Labortechnik GmbH, Ortenberg, DE
Sorvall Zentrifugenrotor SLC-6000 und Rotor SS-34	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spannungsquelle Consort EV215 für SDS-Gele	Cleaver Scientific, Warwickshire, UK
Spannungsquelle EPS 500/400 für Agarosegele	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Spektrophotometer Ultrospec10 zur Bestimmung der Zelldichte	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Vakuumpumpe Typ MZ2C NT 2AK	Vacuubrand GmbH + CO KG, Wertheim, DE

Vortexer Typ REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Zellaufschlussgerät Microfluidics System M-110P	Microfluidics, Westwood, MA, USA
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R für 15 ml und 50 ml Röhren	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Modell Centrifuge 5415D für 1,5 ml Reagiergefäße	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge Sorvall Evolution RC für SLC-6000 und SS-34 Rotor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Andere Materialien	Hersteller
Amicon Ultra Filtereinheiten MWCO 10 kDa und 100 kDa	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Bechergläser Duran® 500 ml, 100 ml, 50 ml	Schott AG, Mainz, DE
Flaschenaufsatzfilter Nalgene®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glasflaschen Duran® 1 L, 0,5 L, 250 ml, 100 ml und 50 ml	Schott AG, Mainz, DE
Glaskolben Duran® 2 L, 150 ml, 100 ml und 50 ml	Schott AG, Mainz, DE
Glasröhrchen 10 ml für Fraktionssammler	Hersteller unbekannt
HighLoad™ Superdex™ 200 prep grade Säule	GE Healthcare, Boston, MA, USA
HighLoad™ Superdex™ 75 10/60 prep grade Säule	GE Healthcare, Boston, MA, USA
HighTrap® Chelating HP Affinitätssäule	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Küvetten aus Polystyrol, 1 cm Schichtdicke	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Membranfilter Supor®-200 0,2 µm und 0,45 µm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Messzylinder 500 ml, 250 ml, 100 ml, 50 ml	VITLAB GmbH, Grossostheim, DE
Mikrotestplatten mit 96 Kavitäten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Reagiergefäße (1,5 ml) und Röhren (15 ml und 50 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Spritzen und Einmalkanülen 10 ml und 1 ml	Unterschiedliche Hersteller
Sterile Einwegpipetten 50 ml, 20 ml, 10 ml und 5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Sterilfilter Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Superdex™ 75 10/300 Säule	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Einwegpipettenspitzen und Agarschalen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Zentrifugenbecher für die Zellkultur, 1 L	Hitachi-Koki, Chiyoda, Tokyo, JP

Standardpuffer, Stammlösungen und Nährmedien

Die in diesem Kapitel verwendeten Puffer, Stammlösungen und Nährmedien sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammensetzung von Puffern, Stammlösungen und Nährmedien

Puffer	Zusammensetzung	Nährmedien	Zusammensetzung
HlyC Resuspensionspuffer	20 mM Hepes pH 8,0 (20°C) 150 mM KCl 20 % Glycerin (v/v) + 1 Tablette/1 L Proteaseinhibitor	LB Medium (1 L) In Anlehnung an [223]	5 g Hefeextrakt 10 g Trypton/Pepton 5 g NaCl
HlyC IMAC Waschpuffer	20 mM Hepes pH 8,0 (20°C) 150 mM KCl 20 % Glycerin (v/v) 10 mM Imidazol	LB-Glucose Medium (1 L)	5 g Hefeextrakt 10 g Trypton/Pepton 5 g NaCl 10 g Glucose Monohydrat
HlyC IMAC Elutionspuffer	20 mM Hepes pH 8,0 (20°C) 150 mM KCl 20 % Glycerin (v/v) 500 mM Imidazol	LB Agar (1 L)	5 g Hefeextrakt 10 g Trypton/Pepton 5 g NaCl 5 g Agar Agar
HlyC SEC Puffer	20 mM Hepes pH 8,0 (20°C) 150 mM KCl 20 % Glycerin (v/v)	2× YT Medium (1 L)	10 g Hefeextrakt 16 g Trypton/Pepton Casein 5 g NaCl
HlyC Reaktionspuffer	20 mM Hepes pH 8,0 (20°C) 150 mM KCl	Stammlösung	Zusammensetzung
ProHlyA SEC Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 (20°C) 150 mM NaCl	Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in H ₂ O Arbeitskonzentration: 100 µg/ml
ACP Puffer	150 mM Tris-HCl pH 7,4 (10°C) 150 mM NaCl		
ProHlyA Denaturierungspuffer	6,4 M Harnstoff 20,0 mM EDTA 12,5 mM Tris-HCl pH 7,5 (20°C) 75,0 mM NaCl	Kanamycin (Kan)	30 mg/ml in H ₂ O Arbeitskonzentration: 30 µg/ml
Schafblut Waschpuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 (20°C) 155 mM NaCl 20 mM CaCl ₂ 5 mM KCl 2 mM MgSO ₄	IPTG	1 M in H ₂ O Arbeitskonzentration: 1 mM bis 0,1 mM (variabel)
Acyl-HlyA Solubilisierungspuffer	20 mM Hepes pH 7,4 (20°C) 20 mM NaCl 6 M Harnstoff		

Die Nährmedien wurden für 20 min bei 121°C steril autoklaviert. Die Ampicillin-, Kanamycin- und IPTG-Stammlösungen wurden durch einen 0,2 µm Sterilfilter filtriert.

Escherichia coli Stämme, Plasmide und Primer

Die für die Expression von HlyC und HlyA verwendeten *E. coli* Stämme und Plasmide sind in Tabelle 4 beschrieben. Außerdem sind in der Tabelle die Primer für die Klonierung und Sequenzierung der HlyC Doppelmutante H151A H152A aufgelistet.

Tabelle 4: Escherichia coli Stämme, Plasmide und Primer

<i>E. coli</i> Stamm	Hersteller		Verwendung
<i>E. coli</i> BL21(DE)	Stratagene California, La Jolla, CA, USA		Expression von HlyC, HlyC H151A H152A, proHlyA und acyl-HlyA
<i>E. coli</i> DH5α	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™)		Herstellung des Acyl-ACP Rohextraktes und Amplifizierung diverser Plasmide
<i>E. coli</i> XL1-blue	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™)		Amplifizierung des ligierten PCR-Produktes bei der Klonierung von HlyC H151A H152A
Plasmid	Selektion	Promotor	Beschreibung
pET28b- <i>hlyC</i> -His (5959 bp)	Kan	T7	Ausgangsplasmid für die Expression von HlyC. Das Plasmid wurde in der Doktorarbeit von Sabrina Thomas angefertigt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt [224]. Das Plasmid enthält die komplette HlyC Sequenz entsprechend dem Eintrag Q1R2T4 in der UniProt Datenbank [225]. HlyC wird jedoch aufgrund einer zusätzlichen Ribosomenbindestelle im 5'-Bereich der Sequenz erst ab dem fünften Methionin synthetisiert [222].
pET28b- <i>hlyC</i> -His H151A H152A (5959 bp)	Kan	T7	Das in dieser Arbeit aus dem pET28b- <i>hlyC</i> -His Plasmid hergestellte Plasmid zur Expression der HlyC H151A H152A Doppelmutante.
pSU- <i>hlyA</i> (6960 bp)	Amp	lac	Plasmid für die Expression von proHlyA basierend auf der Sequenz mit dem UniProt Datenbank Eintrag P08715 [225]. Zusammen mit dem Plasmid pSK184- <i>hlyBD</i> wird proHlyA von <i>E. coli</i> sekretiert. Das pSU- <i>hlyA</i> Plasmid stammt von Soloaga <i>et al.</i> [226].
pSU- <i>hlyC</i> -His- <i>hlyA</i> (7572 bp)	Amp	lac	Plasmid für die Expression von proHlyA und HlyC. ProHlyA wird durch HlyC in <i>E. coli</i> acyliert. Zusammen mit dem Plasmid pSK184- <i>hlyBD</i> wird acyl-HlyA von <i>E. coli</i> sekretiert. Das pSU- <i>hlyC</i> -His- <i>hlyA</i> Plasmid stammt von Thomas <i>et al.</i> [222].
pSK184- <i>hlyBD</i> (6033 bp)	Kan	lac	Plasmid für die Expression der T1SS Transportproteine HlyB und HlyD. Das Plasmid stammt von Bakkes <i>et al.</i> [227].
Primer	Sequenz		T _m
HlyC H151A	5'-CGAATAAAAATTTTTAAACAATATGCCACGAGTTAATAACT-3' 5'-AGTTATTAACCTCGTGGGCATATTGTTTAAAAATTTTATTTCG-3'		60°C
HlyC H152A	5'-CGAATAAAAATTTTTAAACAATATCACGCCGAGTTAATAACTG-3' 5'-CAGTTATTAACCTCGGCGTGATATTGTTTAAAAATTTTATTTCG-3'		61°C

HlyC H151A H152A	5'-GCGAATAAAATTTTAAACAATATGCCGCCGAGTTAATAACTGAAG-3' 5'-CTTCAGTTATTAAC TCGGCGGCATATTGTTTAAAAATTTTATTCGC-3'	58°C
Die Primer wurden als unmodifizierte Oligonukleotide bei der MWG-Biotech AG (Ebersberg, DE) bestellt und auf eine Endkonzentration von 100 pmol/μl in H ₂ O verdünnt.		
pET-RP (reverse primer)	5'-CTAGTTATTGCTCAGCGG-3' Primer für die Plasmidsequenzierung durch die GATC Biotech AG (Konstanz, DE)	

Proteine und deren Eigenschaften

Die Aminosäuresequenz von HlyC und die mit dem Programm *ExpPASy ProtParam* ermittelten theoretischen Eigenschaften von HlyC sind in Tabelle 5 zusammengefasst [228]. Die Sequenz basiert auf dem chromosomal kodierten Protein aus dem UPEC-Stamm UTI89 mit dem UniProt Datenbank Eintrag Q1R2T4 [225].

Tabelle 5: Eigenschaften und Proteinsequenz von HlyC vor (HlyC-His) und nach (HlyC) Abspaltung der C-terminalen 6×His-Sequenz durch die TEV-Protease

	HlyC-His	HlyC
Aminosäuren (Anzahl)	186	178
Molekulargewicht (Da)	21734,65	20669,63
Theoretischer isoelektrischer Punkt (pI)	7,22	7,84
Extinktionskoeffizient bei 280 nm in H ₂ O (M ⁻¹ cm ⁻¹)	50420,00	50420,00

10	20	30	40	50	60
MNMNPLEVLGHVSWLWASSPLHRNWPVSLFAINVLP AIRANQYALLTRDNPVAYCSWA					
70	80	90	100	110	120
NLSLENEIKYLNDVTS LVAEDWTS GDRKWFIDWIAPFGDNGALYK YMRKKFPDELFR AIR					
130	140	150	160	170	180
VDPKTHVGVSEF HGGKIDKQLANKI FKQYHHELI TEVKNKTD FNFSLTGS ENLYFQIIG					
188					↑
					↑
LEHHHHHH					
			↑		
			Postuliertes		
			Häm-Bindemotiv		
				↑	
				TEV-Protease	
				Erkennungssequenz	
				und Schnittstelle	

Die Aminosäuresequenz von HlyA wird in Kapitel 2 dargestellt. Die Proteineigenschaften von HlyA und ACP sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Angaben wurden mit dem Programm *ExpPASy ProtParam* ermittelt und beruhen auf der jeweiligen Primärsequenz ohne Berücksichtigung einer möglichen Acylierung [228]. Die HlyA Sequenz basiert auf dem plasmidko-

dierten Protein aus dem UPEC-Stamm UTI89 mit dem UniProt Datenbank Eintrag P08715; die dem ACP zugrunde liegende Sequenz stammt aus dem *E. coli* Laborstamm K12 mit dem UniProt Datenbank Eintrag P0A6A8 [225].

Tabelle 6: Eigenschaften von HlyA und ACP

	HlyA	ACP
Aminosäuren (Anzahl)	1024	78
Molekulargewicht (Da)	110144,62	8539,52
Theoretischer isoelektrischer Punkt (pI)	5,32	3,98
Extinktionskoeffizient bei 280 nm in H ₂ O (M ⁻¹ cm ⁻¹)	81600,00	1490,00

3.1.2 Allgemeine Methoden

SDS-PAGE

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden SDS-haltige Gele mit 10 % oder 15 % Acrylamid hergestellt. Die Zusammensetzung der SDS-Gele sowie die dafür benötigten Puffer sind in Tabelle 7 angegeben. Die Mengenangaben beziehen sich auf die Herstellung von 10 Gelen mit den jeweiligen Abmessungen 10,5 × 7,5 × 0,1 cm.

Tabelle 7: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel der 10 und 15%igen SDS-Gele

Komponente	Sammelgel (4,5 %)	Trenngel (10 %)	Trenngel (15 %)
Trenngelpuffer (ml)	0	18,75	18,75
Sammelgelpuffer (ml)	8,75	0	0
H ₂ O (ml)	21,00	31,25	18,75
30 % Acrylamidlösung in H ₂ O (ml)	6,00	25,00	37,50
TEMED (µl)	70	70	70
10 % APS (µl)	210	300	300
Zusammensetzung Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 6,8 mit 0,4 % SDS (w/v)		
Zusammensetzung Sammelgelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,85 mit 0,4 % SDS (w/v)		

Für die Analyse von HlyC wurden 15%ige SDS-Gele verwendet, für die Analyse von proHlyA und acyl-HlyA 10%ige. Im Zuge der Reinigung der Proteine wurden jeweils 20 µl der zu analysierenden Probe mit 5 µl des 5× SDS Ladepuffers versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Von dieser Lösung wurden jeweils 20 µl auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 160 V für 1 h 30 min in 1× Elektrophoresepuffer. Anschließend wurden die Gele mit normaler oder kolloidaler Coomassie Färbelösung gefärbt. Die verwendeten Proteinmarker sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die weiteren, in der SDS-PAGE zur Auftrennung und

für die Färbung der Proteine im Gel verwendeten, Puffer und Lösungen sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: Puffer und Färbelösungen für die SDS-PAGE

Puffer	Zusammensetzung	Färbelösung	Zusammensetzung
5× SDS Ladepuffer	10 ml Sammelgelpuffer 10 ml SDS (16 % in H ₂ O) 20 ml Glycerin (100 %) 10 ml H ₂ O 40 mg Bromphenolblau	Coomassie Färbelösung Entfärbelösung	50 % EtOH (v/v) 10 % Essigsäure (v/v) und 0,1 % CBB-R250 (w/v) 30 % EtOH (v/v) und 7 % Essigsäure (v/v)
10× Elektrophorese Laufpuffer	1,9 M Glycin 0,25 M Tris 1,0 % SDS (w/v) pH 8,3 (ohne Einstellen)	Kolloidale Coomassie Färbelösung	5 % Aluminiumsulfat (w/v) 10 % EtOH (v/v) 0,02 % CBB-R250 (w/v) 2,35 % Phosphorsäure (v/v)

Agarosegelelektrophorese

Für die Klonierung der HlyC Doppelmutante H151A H152A wurde ein 1%iges Agarosegel in TAE-Puffer verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 110 V für 50 min.

Tabelle 9: Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

DNA Ladepuffer	Zusammensetzung	Laufpuffer/Färbelösung	Zusammensetzung
5× DNA Ladepuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 30 % Glycerin (v/v) 1 mM EDTA pH 8,0 0,25 % Bromphenolblau (w/v) 0,25 % Xylencyanol FF (w/v)	50× TAE Puffer	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA (pH 8,0)
		EtBr Lösung	1 µg/ml in H ₂ O Endkonzentration

Das Gel wurde anschließend 30 min in EtBr-Lösung geschwenkt und die Fluoreszenz in einem Lumia Imaging System detektiert. Die Zusammensetzung der EtBr-Lösung und des TAE-Puffers sind in Tabelle 10 angegeben. Der verwendete DNA-Marker (1 kb) ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels NanoDrop über den Absorptionswert bei 280 nm anhand der in den Tabellen 5 und 6 angegebenen Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten der Proteine. Die Bestimmung der DNA-Konzentration der eingesetzten Plasmide erfolgte ebenfalls mittels NanoDrop über die Absorption bei 260 nm.

Lagerung der Proteine

Die Proteine HlyC und HlyC H151A H152A wurden innerhalb von 2 bis 3 Tagen gereinigt und von diesem Zeitpunkt an bei -80°C gelagert. Entfaltetes proHlyA in Harnstoff wurde für maximal 5 Tage bei 4°C und darüber hinaus bei -80°C gelagert. Der ursprünglich eingesetzte Acyl-ACP Rohextrakt wurde bei -80°C gelagert.

3.1.3 Klonierung von HlyC H151A H152A

Zielgerichtete Mutagenese

Für die Herstellung der HlyC Doppelmutante H151A H152A wurde ein komplementäres Primerpaar mit den Mutationen der beiden Nukleotide für die Basenaustausche CAC (His) zu GCC (Ala) im pET28b-hlyC-His entworfen. Anschließend wurde die Plasmidsequenz des Ausgangsplasmides (pET28b-hlyC-His) durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) mit den entworfenen Primern amplifiziert. Das lineare PCR-Produkt mit den entsprechenden Basenaustauschen wurde zur Ligation durch die DNA-Ligase und Amplifizierung in *Escherichia coli* transferiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (Kan). Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 4 aufgelistet.

PCR mit den synthetisierten Primern

Ein 50 μl PCR-Ansatz bestand aus 1 μl Ausgangsplasmid pET28b-hlyC-His ($\approx 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$), 1 μl dNTP Mix (10 mM von jedem Nukleotid), 0,5 μl Vorwärtsprimer (100 pmol/ μl), 0,5 μl Rückwärtsprimer (100 pmol/ μl), 5 μl 10 \times Pfu DNA-Polymerase Puffer mit MgCl_2 , 1 μl Pfu DNA-Polymerase (2,5 U/ μl) und 41 μl H_2O . Der Ansatz wurde für drei verschiedene Annealingtemperaturen in der PCR-Reaktion (T_1 bis T_3) auf $3 \times 15 \mu\text{l}$ aufgeteilt. Die Amplifizierung des Plasmides erfolgte mit folgendem Programm im Gradienten-PCR Gerät: 1. Schritt: 2 min bei 95°C , 2. Schritt (Denaturierung): 30 sec bei 95°C , 3. Schritt (Annealing): 30 sec bei $T_1 = 50,8^{\circ}\text{C}$, $T_2 = 53,1^{\circ}\text{C}$, $T_3 = 56,2^{\circ}\text{C}$, 4. Schritt (Elongation): 21 min bei 72°C , 5. Schritt: 30 min bei 72°C .

Verdau von methylierter DNA

Um die methylierte DNA des Ausgangsplasmides abzubauen, wurde der verbleibende PCR-Ansatz mit dem amplifizierten PCR-Produkt (10 μl), nach dem Kontrollgel, mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Der Reaktionsansatz aus 10 μl PCR-Produkt mit 1 μl DpnI Restriktionsenzym (20 U/ μl), 2 μl 10 \times CutSmart[®] Puffer und H_2O in einem Volumen von 20 μl wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation von *E. coli* mit dem PCR-Produkt

Das über Nacht mit DpnI verdaute PCR-Produkt wurde in chemokompetente *E. coli* XL-1 blue Zellen eingebracht. Dafür wurde ein 50 µl *E. coli* Zellaliquot von -80°C aufgetaut und mit dem kompletten DpnI-Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 50 sec bei 42°C . Anschließend wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert, mit 650 µl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C und einer Schwenkzahl von 650 min^{-1} inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde auf LB-Kan-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Amplifizierung und Isolierung des Plasmides

Einzelne Bakterienkolonien von den Agarplatten wurden in einer 5 ml Kultur in LB-Kan-Medium über Nacht bei 37°C und einer Schwenkzahl von 180 min^{-1} inkubiert. Die Reinigung des amplifizierten Plasmides aus *E. coli* erfolgte am nächsten Tag nach dem Reinigungsprotokoll für rekombinante Plasmide aus dem Plasmid Miniprep Kit. Im letzten Schritt wurde die DNA mit 50 µl H_2O eluiert, wovon 5 µl mittels Agarosegelelektrophorese analysiert wurden.

Sequenzierung der Plasmide

Die isolierten Plasmide wurde zur Sequenzierung an die Firma GATC Biotech AG gesendet. Der verwendete Sequenzierprimer für den pET-Vektor ist in Tabelle 4 aufgeführt.

3.1.4 Expression und Reinigung von HlyC

Transformation von *E. coli*

Es wurden 50 µl chemokompetente *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Plasmid pET28b-*hlyC*-His ($\approx 100\text{ ng}/\mu\text{l}$) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 50 sec bei 42°C . Die Zellen wurden für 5 min auf Eis inkubiert, mit 650 µl LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C und einer Schwenkzahl von 650 min^{-1} inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde auf LB-Kan-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Expression von HlyC in *E. coli*

Eine Vorkultur aus 50 ml LB-Kan-Medium in einem 100 ml Schikanekolben wurde mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte angeimpft und für 18 bis 20 h bei 37°C und einer Schwenkzahl von 200 min^{-1} inkubiert. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) der Vorkultur bestimmt. Die Hauptkultur aus $6 \times 600\text{ ml}$ LB-Kan-Medium in 2 L Schikanekolben wurde mit der Vorkultur auf eine OD_{600} von $\approx 0,05$ angeimpft und bei 37°C und einer Schwenkzahl von 180 min^{-1} bis zu einer OD_{600} von $\approx 0,4$ inkubiert. Die Proteinexpression

wurde mit 1 mM IPTG induziert und erfolgte bei 18°C und einer Schwenkzahl von 180 min⁻¹ für 18 bis 20 h.

Zellernte und Zellaufschluss

Die Hauptkulturen wurden für 15 min bei 4000 g zentrifugiert (SLC-6000 Rotor) und die Zellpellets in jeweils 10 ml eisgekühlten Resuspensionspuffer gelöst (3 bis 4 g Nassgewicht aus 600 ml Kultur). Die Zellen wurden mechanisch in drei Durchläufen durch das Zellaufschlussgerät bei 150 kPa aufgeschlossen. Anschließend wurde die Lösung für 30 min bei 20 000 g und 4°C zentrifugiert (SS-34 Rotor) und der Überstand direkt für die Affinitätschromatographie eingesetzt.

Reinigung durch Affinitätschromatographie

Eine 5 ml HighTrap Chelating HP IMAC-Säule (IMAC, *Immobilized metal ion affinity chromatography*) wurde mit 100 mM NiCl₂ beladen und mit Resuspensionspuffer äquilibriert. Die IMAC wurde an einem ÄKTA Purifier System mit einer konstanten Flussrate von 4 ml/min durchgeführt. Der Überstand nach dem Zellaufschluss und Zentrifugation (≈ 300 ml) wurde auf die mit Puffer äquilibrierte Säule geladen und mit 200 ml IMAC-Waschpuffer gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte durch einen linearen Gradienten von 10 mM Imidazol (0 % IMAC Elutionspuffer) auf 500 mM Imidazol (100 % IMAC Elutionspuffer) über 100 ml. Die Reinheit der eluierten 0,5 ml Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereint und direkt für die Größenausschlusschromatographie eingesetzt.

Reinigung durch Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) wurde mit einer Superdex 75 16/60 Säule im HlyC SEC Puffer durchgeführt. Dabei wurden 10 ml der vereinten IMAC Fraktionen eingesetzt und bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min aufgetrennt. Die Reinheit der aufgefangenen 2 ml Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereint und direkt für den Verdau mit der TEV-Protease, einer Endopeptidase aus dem *Tobacco Etch Virus*, zur Abspaltung der C-terminalen 6×His-Sequenz von HlyC eingesetzt. Die Abspaltung wurde vorgenommen, um eine mögliche Bindung von Fe(III)-Protoporphyrin IX (Häm) an die artifizielle 6×His-Sequenz in den Folgeexperimenten zu unterbinden.

Abspaltung der His-Sequenz durch die TEV-Protease

Der Verdau durch die TEV-Protease wurde über Nacht bei 4°C in einem molaren Verhältnis von 1 : 25. Das entsprechende Volumen TEV-Protease (1 mg/ml) wurde direkt zu den vereinten Fraktionen nach der SEC gegeben. Die eingesetzte TEV-Protease stammt aus

einem institutsinternen Vorrat, der bei -80°C gelagert wurde. Diese wurde nach dem publizierten Protokoll von Kapust *et al.* hergestellt und verfügt über eine N-terminale 6×His-Sequenz [229].

Reverse IMAC nach dem TEV-Protease Verdau

Um das HlyC Produkt ohne C-terminale 6×His-Sequenz vom nicht umgesetzten Protein und der TEV-Protease zu reinigen, wurde eine reverse IMAC bei einer konstanten Flussrate von 2 ml/min durchgeführt. Hierfür wurde der TEV-Protease Reaktionsansatz auf eine neu mit 100 mM NiCl_2 beladene und mit HlyC SEC Puffer äquilibrierte 5 ml HighTrap Chelating HP IMAC-Säule geladen. Die Elution von schwach gebundenem Protein ohne C-terminale 6×His-Sequenz erfolgte in einem Stufengradienten von 0 mM auf 50 mM Imidazol (10 % IMAC Elutionspuffer) mit IMAC Elutionspuffer, während die Elution von stark gebundenem, nicht umgesetzten Protein und der TEV-Protease durch höhere Imidazol-Konzentrationen erfolgte. Die aufgefangenen 1 ml Fraktionen, bei 50 mM Imidazol, wurden mittels SDS-PAGE analysiert und vereint.

Umpufferung in HlyC Reaktionspuffer

Im finalen Schritt der Reinigung erfolgte die Umpufferung von HlyC direkt in den später verwendeten HlyC Reaktionspuffer durch eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 75 16/60 Säule. Dafür wurden 5 ml des Proteins nach der Reinigung durch die reverse IMAC bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min eingesetzt. Die aufgefangenen 2 ml Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen mit einer dominanten Bande bei etwas über der 20 kDa Markerbande wurden vereint und später im *in vitro* Acylierungsassay eingesetzt.

Proteinkonzentration und Lagerung

HlyC ohne C-terminale 6×His-Sequenz in Reaktionspuffer wurde mit einem 10 kDa MWCO (*molecular weight cut off*) Filterkonzentrator konzentriert. Die finale Proteinkonzentration wurde mittels NanoDrop über den Absorptionswert bei 280 nm, dem theoretischen Molekulargewicht und dem theoretischen, molaren Extinktionskoeffizienten des Proteins bestimmt (siehe Tabelle 5). Die später im *in vitro* Acylierungsassay eingesetzte HlyC Konzentration betrug $\approx 0,18$ mg/ml. Die Konzentration des gereinigten Proteins für die, durch die Forschungsgruppe von Frau Prof. Imhof durchgeführten, UV-Vis Messungen betrug $\approx 0,25$ mg/ml. Das Protein wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.1.5 Expression und Reinigung von HlyC H151A H152A

Die Expression und Reinigung von HlyC H151A H152A war nur durch einige Abweichungen von dem in Abschnitt 3.1.4 beschriebenen Protokoll möglich. Die für die HlyC H151A H152A

Doppelmutante vorgenommenen Änderungen werden in diesem Abschnitt erläutert, während unveränderte Bestandteile des Protokolls nicht mehr erwähnt werden. Für den direkten Vergleich der Enzymaktivität von HlyC mit der Enzymaktivität der HlyC Doppelmutante, in Anwesenheit Hämin, wurde HlyC erneut nach dem hier beschriebenen Protokoll gereinigt.

Expression von HlyC in *E. coli*

Für die Reinigung von HlyC H151A H152A war der Zusatz von 1 % Glucose (w/v) im Expressionsmedium nötig, um lösliches Protein aus *E. coli* reinigen zu können. Glucose kontrolliert im pET Expressionssystem die Basalexpression [230]. Die Hauptkultur bestand dementsprechend aus 6 × 600 ml LB-Glucose-Medium. Die Proteinexpression wurde abweichend mit einer finalen Konzentration von 0,1 mM IPTG, anstelle von 1 mM IPTG, induziert. Für die vergleichende Reinigung von HlyC nach dem für die HlyC Doppelmutante abgeänderten Protokoll, wurde die eingesetzte Menge an Zellkultur vor dem Zellaufschluss auf die Hälfte reduziert. Dadurch war eine Reinigung mit vergleichbarer Gesamtproteinmenge möglich.

Reinigung durch Affinitätschromatographie

Bei dem ersten Reinigungsschritt durch die IMAC wurde für HlyC H151A H152A ein weiterer Waschschrift eingeführt und ein steilerer Elutionsgradient verwendet. Nach dem ersten Waschschrift mit 200 ml IMAC Waschpuffer (10 mM Imidazol), erfolgte ein zweiter Waschschrift mit 60 ml 15 % IMAC Elutionspuffer (500 mM Imidazol). Das gebundene HlyC H151A H152A Zielprotein wurde mit einem linearen Gradienten von 15 % auf 60 % IMAC Elutionspuffer mit 20 ml eluiert. Das dadurch höher konzentrierte Protein wurde direkt im zweiten Schritt der Reinigung für die Größenausschlusschromatographie eingesetzt (10 ml der vereinten IMAC Fraktionen).

Umpufferung in HlyC Reaktionspuffer

Im finalen Schritt der Reinigung von HlyC H151A H152A wurde eine Superdex 75 10/300 Säule, anstelle der Superdex 75 16/60 Säule, mit einer Flussrate von 0,35 ml/min verwendet. Dafür wurde 1 ml der vereinten Fraktionen nach der reverse IMAC verwendet und durch die Größenausschlusschromatographie in den HlyC Reaktionspuffer umpuffert. Aufgrund einer geringeren Gesamtproteinmenge wurde hier die Säule mit einem kleineren Säulenvolumen verwendet. Alle weiteren Schritte entsprechen dem in Abschnitt 3.1.4 beschriebenen Protokoll. Die Expression und Reinigung von HlyC H151A H152A und HlyC wurde parallel an denselben oder an direkt aufeinanderfolgenden Tagen mit denselben Materialien durchgeführt.

3.1.6 Massenspektrometrische Analyse der Bande zwischen 10 und 15 kDa

Die nach der Reinigung von HlyC weiterhin vorhandenen dominanten Proteinbanden im SDS-Gel zwischen 10 und 15 kDa und bei ≈ 15 kDa wurden am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf mittels MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization - time of flight analyser*) Massenspektrometrie analysiert. Die entsprechenden Analysen wurden durch das Labor von Prof. Dr. Kai Stühler durchgeführt. Hierfür wurden die aus dem SDS-Gel ausgeschnittene Bande zwischen 10 und 15 kDa aus der Aufreinigung von HlyC und die aus dem SDS-Gel ausgeschnittene Bande bei 15 kDa aus der Aufreinigung von HlyC H151A H152A verwendet.

3.1.7 Expression und Reinigung von proHlyA und Herstellung des Acyl-ACP Rohextraktes

ProHlyA wurde nach dem bereits publizierten Protokoll für die *in vitro* Acylierung von Thomas *et al.* gereinigt [222]. Dabei wurde proHlyA in *E. coli* exprimiert, von diesem sekretiert und mittels SEC aus dem Überstand der Zellkultur gereinigt (3 × 150 ml 2× YT Medium mit 100 µg/ml Ampicillin, Induktion mit 1 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,4). Die Expression von proHlyA erfolgte in *E. coli* BL21(DE) Zellen mit den beiden Plasmiden pSU-*hlyA* und pSK184-*hlyBD* für 4 h bei 37°C. Der Überstand der Zellkultur wurde nach der Zentrifugation (15 min bei 8000 g und 75 min bei 200 000 g) filtriert (0,45 µm), mittels 100 kDa MWCO Filterkonzentratoren konzentriert und über eine Superdex 200 16/60 Säule im proHlyA SEC Puffer aufgetrennt. Für acyl-HlyA wurden, abweichend vom publizierten Protokoll, die festen, aggregierten Bestandteile im Überstand einer 2 L Zellkultur nach 4 h Expression bei 37°C verwendet und über Nacht in 30 ml Acyl-HlyA Solubilisierungspuffer gelöst. Die Expression von acyl-HlyA erfolgte in *E. coli* BL21(DE) mit den beiden Plasmiden pSU-*hlyC-His-hlyA* und pSK184-*hlyBD*. Die Herstellung des Acyl-ACP Rohextraktes entsprach dem publizierten Protokoll [222]. Hierfür wurde eine 2 L Zellkultur mit *E. coli* DH5α Zellen verwendet, die nach 5 h Wachstum bei 37°C und geerntet wurde und deren Zellen in insgesamt 75 ml ACP Puffer gelöst wurden. Der Überstand, nach Zellaufschluss durch drei Durchläufe bei 150 kPa durch das Zellaufschlussgerät und der Ultrazentrifugation für 10 min bei 30 000 g und 4°C und 60 min bei 200 000 g und 4°C, stellt den Acyl-ACP Rohextrakt dar und dient im proHlyA *in vitro* Acylierungsassay als Acylkettendonator. Alle Proteine wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die für das SDS-Gel verwendeten Mengen waren 5 µl von proHlyA nach Entfaltung in Denaturierungspuffer (1 mg/ml), 5 µl von Acyl-HlyA in Solubilisierungspuffer mit unbekannter Konzentration und 20 µl von Acyl-ACP Rohextrakt in ACP Puffer.

3.1.8 Standardmethode: *In vitro* Acylierung basierend auf Thomas *et al.* (2014)

Ausgangspunkt für die folgenden Experimente ist das von Thomas *et al.* publizierte Protokoll zur *in vitro* Acylierung von proHlyA durch HlyC [222]. In diesem werden die zuvor gereinigten und hergestellten Komponenten wie folgt eingesetzt:

1. Schritt: Denaturierung von proHlyA mit Harnstoff und EDTA

Das durch die SEC aus dem Überstand der Zellkultur gereinigte proHlyA in SEC Puffer wird mit einem Filterkonzentrator (MWCO 100 kDa) auf eine Konzentration von 4 mg/ml konzentriert. Anschließend werden 250 µl dieser Lösung mit 710 µl Harnstoff (9 M) und 40 µl EDTA-Stammlösung (0,5 M EDTA pH 8,0) zur Entfaltung über Nacht bei 4°C inkubiert.

2. Schritt: Acylierungsreaktion für 1 h bei 23°C

Für die *in vitro* Acylierung wird ein Reaktionsansatz bestehend aus 10 µl proHlyA in Denaturierungspuffer (1 mg/ml), 1 µl HlyC-His (1 mg/ml) und 64 µl Acyl-ACP Rohextrakt für 1 h bei 23°C inkubiert. Der, bei -80°C gelagerte Acyl-ACP Rohextrakt, wird zuvor für 1 h bei 23°C aufgetaut und anschließend mit einer Endkonzentration von 40 mM EDTA für 2 h bei 23°C inkubiert.

3. Schritt: Hämolyse von Schaferythrozyten für 1 h bei 37°C

Das Schafblut wird in 1 ml Fraktionen aufgeteilt und für 1 min bei 14 000 g zentrifugiert. Anschließend werden die sedimentierten Zellen in 1 ml Schafblut Waschpuffer vorsichtig aufgenommen. Durch ein erneutes Zentrifugieren und Lösen der Zellen in Schafblut Waschpuffer wird der Waschschriff solange wiederholt, bis der Überstand klar ist. Von der Zellsuspension werden 0,5 ml direkt zu dem Acylierungsansatz gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Durch die Bindung der Calciumionen aus dem Schafblut Waschpuffer nimmt HlyA seine native Konformation an und eine weitere Acylierung wird gleichzeitig unterbunden.

4. Schritt: Messung der Hämoglobin-Freisetzung bei 544 nm

Am Ende der Hämolysezeit werden die noch nicht lysierten Blutzellen für 1 min bei 14 000 g zentrifugiert. Anschließend werden 200 µl vom Überstand in eine Kavität der Mikrottestplatte überführt und für die Messung mit H₂O verdünnt. Die durch die Hämolyse freigesetzte Menge an Hämoglobin im Überstand korreliert mit der Absorption bei 544 nm und wird im Plattenphotometer bestimmt. Standardmäßig wurde ab dem zweiten Schritt eine SDS-Positivkontrolle, bestehend aus 1 µl SDS (16 % in H₂O) in 75 µl H₂O, anstelle des 75 µl Acylierungsansatzes mitgeführt. Des Weiteren wurden standardmäßig die folgenden die Negativkontrollen verwendet: Acylierungsansatz ohne proHlyA mit 10 µl proHlyA Denaturierungspuffer anstelle von proHlyA, Acylierungsansatz ohne HlyC mit HlyC Reaktionspuffer anstelle

von HlyC und 75 µl Schafblut Waschpuffer als Referenz für die Hintergrundabsorption der Schafblutzellen.

3.1.9 Vorversuche zur *in vitro* Acylierung durch HlyC

Das in Abschnitt 3.1.8 beschriebene Standardprotokoll zur *in vitro* Acylierung von proHlyA durch HlyC wurde für die Messungen mit Hämin angepasst. Der Acylierungsassay wurde mit einer reduzierten HlyC Gesamtmenge, ohne Zusatz von Acyl-ACP Rohextrakt, einer verkürzten Acylierungs- und Hämolysezeit sowie ohne EDTA im proHlyA Denaturierungspuffer durchgeführt. In allen Vorversuchen zur *in vitro* Acylierung wurde HlyC, nach Abspaltung der C-terminalen 6×His-Sequenz und Umpufferung in den HlyC Reaktionspuffer, mit einer Konzentration von 0,18 mg/ml eingesetzt. Konkret wurden in vier Versuchsreihen folgende Parameter variiert:

Versuchsreihen A) und B) Hier wurde die Gesamtmenge des eingesetzten Enzyms in Anwesenheit (A) und Abwesenheit (B) des Acyl-ACP Rohextraktes optimiert (2. Schritt der Methode). In sechs Acylierungsansätzen wurden ½ µl, 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl oder 5 µl HlyC (0,18 mg/ml in HlyC Reaktionspuffer) und 10 µl proHlyA (1 mg/ml in proHlyA Denaturierungspuffer mit EDTA) mit Acyl-ACP Rohextrakt auf ein Endvolumen von 75 µl aufgefüllt. Der Acyl-ACP Rohextrakt wurde zuvor für 2 h mit 40 mM EDTA bei 23°C inkubiert. In der Versuchsreihe ohne Acyl-ACP Rohextrakt (B) wurde dieses durch den ACP Puffer ersetzt. Die Acylierungsreaktion erfolgte für 1 h bei 23°C, die Inkubation nach Zugabe der gewaschenen Schafblutzellen für 1 h bei 37°C. Ziel der ersten Versuchsreihe war die Optimierung der eingesetzten Enzymmenge aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von HlyC. In der zweiten Versuchsreihe wurde untersucht, ob die mit HlyC koaufgereinigte ACP-Menge für den Assay ausreichend ist und dadurch auf den Zusatz von Acyl-ACP Rohextrakt verzichtet werden kann (siehe Abschnitt 3.2.4 - Ergebnisse der Massenanalyse der Banden zwischen 10 und 15 kDa in der gereinigten HlyC Probe).

Versuchsreihe C) Die Optimierung der Acylierungszeit erfolgte in fünf Ansätzen mit 2 µl HlyC (0,18 mg/ml in HlyC Reaktionspuffer), 10 µl proHlyA (1 mg/ml in proHlyA Denaturierungspuffer mit EDTA) und 63 µl ACP Puffer. Diese wurden unterschiedlich lange bei 23°C inkubiert (10 min, 7 min, 5 min, 2 min, 0 min im 2. Schritt der Methode). Die einzelnen Reaktionen wurden nach der entsprechenden Acylierungszeit durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt und kurz vor Zugabe der Schafblutzellen gemeinsam aufgetaut. Die Zellyse erfolgte für 30 min bei 37°C. Ziel dieser Versuchsreihe war es, eine unvollständige Lyse der Zellen zu erzielen, um später den Einfluss von Hämin auf die Enzymaktivität bestimmen zu können.

Versuchsreihe D) Für die Messung ohne EDTA im proHlyA Denaturierungspuffer wurde bei der Entfaltung von proHlyA das Volumen EDTA (40 μ l) oder das Volumen EDTA (40 μ l) und Harnstoff (710 μ l) durch H₂O ersetzt (1. Schritt der Methode). Die Acylierungsreaktion erfolgte nach den bereits optimierten Bedingungen mit 2 μ l HlyC (0,18 mg/ml in HlyC Reaktionspuffer), 10 μ l proHlyA (1 mg/ml in dem entsprechenden Puffer) und 63 μ l ACP Puffer für 5 min bei 23°C. Die Lyse der Schafblutzellen erfolgte für 30 min bei 37°C. Für die Messungen mit Hämin ist eine EDTA-freie Reaktion vorteilhaft, um eine mögliche Komplexierung des Eisenzentralatoms durch EDTA zu verhindern.

Die freigesetzte Menge an Hämoglobin aus den Schafblutzellen wurde über die dreifache Messung der Absorption bei 544 nm im Überstand bestimmt (4. Schritt der Methode). Als Positivkontrollen dienten in allen Versuchsreihen 1 μ l 16 % SDS in H₂O sowie ein 75 μ l Ansatz mit 10 μ l acyl-HlyA in Solubilisierungspuffer (Konzentration unbekannt), 2 μ l HlyC Reaktionspuffer und 63 μ l ACP Puffer. Als Negativkontrollen dienten ein 75 μ l Reaktionsansatz ohne proHlyA, ein 75 μ l Reaktionsansatz ohne HlyC und ein Ansatz bestehend aus 75 μ l Schafblut Waschpuffer zur Messung der Hintergrundabsorption.

3.1.10 Enzymkinetik von HlyC für proHlyA

Die K_M -Wertbestimmung für proHlyA wurde mit den optimierten Bedingungen aus den Vorversuchen zur *in vitro* Acylierung durchgeführt. Die Acylierungsansätze bestanden aus 2 μ l HlyC ohne C-terminale 6×His-Sequenz (0,18 mg/ml in HlyC Reaktionspuffer), 10 μ l proHlyA (0–5 μ M in Denaturierungspuffer ohne EDTA) sowie 63 μ l ACP Puffer und wurden für 5 min bei 23°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml gewaschener Schafblutzellen erfolgte die Zellyse für 30 min bei 37°C (Protokoll zum Waschen der Schafblutzellen siehe Abschnitt 3.1.8). Folgende proHlyA Konzentrationen wurden gemessen: 0 μ M, 0,05 μ M, 0,10 μ M, 0,25 μ M, 0,50 μ M, 0,75 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 3,5 μ M und 5 μ M. Dafür wurde gereinigtes proHlyA auf > 16 mg/ml einkonzentriert und mit Denaturierungspuffer ohne EDTA auf eine Endkonzentration von 4,16 mg/ml (37,76 μ M) verdünnt. Die Entfaltung erfolgte über Nacht bei 4°C. Für die einzelnen Acylierungsreaktionen wurde proHlyA weiter mit Denaturierungspuffer ohne EDTA verdünnt. Die Acylierungsreaktion jeder proHlyA Konzentration erfolgte in dreifacher Ausführung.

3.1.11 Enzymaktivität von HlyC in Anwesenheit von Hämin

Die Bestimmung der Enzymaktivität in Anwesenheit von Hämin wurde weitestgehend mit den optimierten Bedingungen aus den Vorversuchen zur *in vitro* Acylierung durchgeführt. Die Acylierungsansätze bestanden grundsätzlich aus 2 μ l HlyC ohne C-terminale 6×His-Sequenz (0,18 mg/ml in HlyC Reaktionspuffer), 10 μ l proHlyA (1 mg/ml in Denaturierungspuffer ohne EDTA) sowie 63 μ l ACP Puffer und wurden für 5 min bei 23°C inkubiert. Nach Zugabe von

0,5 ml gewaschener Schafblutzellen erfolgte die Zellyse für 30 min bei 37°C (Protokoll zum Waschen der Schafblutzellen siehe Abschnitt 3.1.8). Für die Messungen mit Hämin wurde das Volumen an ACP Puffer teilweise durch die Hämin-haltige Lösung ersetzt (30 µl) sowie ein vorgelagerter Inkubationsschritt eingeführt.

3.1.11.1 Vorinkubation mit Hämin

Am Tag der Versuchsdurchführung wurde eine neue Hämin-Stammlösung (1 mM Hämin in 30 mM NaOH) hergestellt und deren Absorption bei 385 nm im Einstrahlphotometer überprüft (Zielwert: 0,400). Ausgehend davon wurden, in einem Volumen von 30 µl, die verschiedenen Verdünnungen in 30 mM NaOH mit der gewünschten Endkonzentration an Hämin, bezogen auf den 75 µl Reaktionsansatz, hergestellt. Um die finale Pufferkonzentration im Acylierungsansatz beizubehalten, wurde die zusätzliche Zugabe an Volumen Hämin-Lösung durch den zweifach konzentrierten ACP Puffer kompensiert. Die Vorinkubation von 2 µl HlyC (0,18 mg/ml in HlyC Reaktionspuffer) mit 30 µl Hämin-Lösung in NaOH und 33 µl 2× ACP Puffer (300 mM Tris-HCl pH 7,4 und 300 mM NaCl) erfolgte für 30 min bei 23°C. Nach Zugabe von 10 µl proHlyA (1 mg/ml in Denaturierungspuffer ohne EDTA) erfolgte die Acylierung wie üblich für 5 min bei 23°C.

3.1.11.2 Vorversuche mit Hämin

In den Vorversuchen wurden folgende Hämin-Konzentrationen (bezogen auf den 75 µl Reaktionsansatz) getestet: 0 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM und 100 µM. Als Negativkontrollen dienten die beiden Reaktionsansätze ohne HlyC und ohne proHlyA (jeweils mit dem entsprechenden Proteinpuffer anstelle der Proteine und 30 mM NaOH anstelle von Hämin). Der Ansatz ohne proHlyA wurde zusätzlich mit 100 µM Hämin durchgeführt, um einen möglichen Einfluss einer Eigenabsorption von Hämin bei 544 nm auf das Messergebnis auszuschließen. Als weitere Kontrolle diente acyl-HlyA in An- und Abwesenheit von Hämin, um einen möglichen Einfluss von Hämin auf die Faltung und Aktivität von proHlyA auszuschließen. Dafür wurde ein Ansatz mit 10 µl acyl-HlyA in Solubilisierungspuffer (exakte Konzentration unbekannt, geschätzt ≈ 1 mg/ml) anstelle von proHlyA, einmal mit und einmal ohne 33 µM Hämin, in NaOH verwendet. Außerdem wurden die Messungen mit drei verschiedenen FeCl₂-Konzentrationen (33 µM, 66 µM und 100 µM in NaOH) anstelle von Hämin durchgeführt. Bei den Messungen in den Vorversuchen handelt es sich überwiegend um Einfachbestimmungen.

3.1.11.3 Hauptversuch mit Hämin

Im Hauptversuch zur IC₅₀-Wertbestimmung für Hämin wurden folgende Hämin-Konzentrationen (bezogen auf den 75 µl Reaktionsansatz) gemessen: 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 9,375 µM, 6,25 µM, 5,156 µM, 4,125 µM, 3,125 µM, 1,562 µM, 0,781 µM und 0,391 µM.

Die Acylierungsreaktion mit der jeweiligen Hämin-Konzentration erfolgte in dreifacher Ausführung.

3.1.12 Enzymaktivität von HlyC in Anwesenheit verschiedener PPIX-Derivate

Die Versuche zur Enzymaktivität von HlyC in Anwesenheit von verschiedenen Protoporphyrin IX (PPIX)-Derivaten erfolgten analog zu den Versuchen zur IC_{50} -Wertbestimmung für Hämin (Abschnitt 3.1.11). Aufgrund der limitierten Enzymmenge wurde die Konzentration von HlyC jedoch auf die Hälfte reduziert (2 μ l mit \approx 0,09 mg/ml in Reaktionspuffer). Anstelle von Fe(III)PPIX (Hämin) wurden folgende PPIX-Derivate mit einer Konzentration von 25 μ M, bezogen auf den 75 μ l Reaktionsansatz, eingesetzt: Ga(III)PPIX, Co(III)PPIX, Zn(II)PPIX und PPIX. Die Acylierungsreaktion mit dem jeweiligen PPIX-Derivat erfolgte in dreifacher Ausführung. Die Messwerte für die Reaktion mit Fe(III)PPIX stammen aus der IC_{50} -Wertbestimmung aus dem Abschnitt 3.1.13.

3.1.13 Enzymaktivität von HlyC H151A H152A in Anwesenheit von Hämin

Für den Vergleich der Wirkung von Hämin auf die Acyltransferaseaktivität von HlyC und HlyC H151A H152A mit dem mutierten Häm-Bindemotiv, wurde aufgrund der limitierten Enzymmenge die Konzentration von HlyC auf die Hälfte reduziert (2 μ l mit \approx 0,09 mg/ml von HlyC und 2 μ l mit \approx 0,09 mg/ml HlyC H151A H152A in Reaktionspuffer). Die Messungen von HlyC und HlyC H151A H152A erfolgten parallel an einem Tag mit ansonsten identischen Materialien nach dem in Abschnitt 3.1.11 beschriebenen Protokoll. Die Acylierungsreaktion mit den folgenden Hämin-Konzentrationen erfolgte mit HlyC und HlyC H151A H152A jeweils in dreifacher Ausführung: 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 9,375 μ M, 6,25 μ M, 5,156 μ M, 4,125 μ M, 3,125 μ M, 1,562 μ M, 0,781 μ M und 0,391 μ M.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Klonierung von HlyC H151A H152A

Die Kontrollgele aus der Klonierung der HlyC Doppelmutante H151A H152A sind in Abbildung 1 abgebildet. Parallel dazu wurden die beiden HlyC Einzelmutanten H151A und H152A kloniert. Ein PCR-Produkt war mit den Primern für alle drei HlyC Varianten bei allen drei Annealingtemperaturen ($T_1 = 50,8^\circ\text{C}$, $T_2 = 53,1^\circ\text{C}$, $T_3 = 56,2^\circ\text{C}$) vorhanden. Das am Ende amplifizierte und aus *E. coli* isolierte Plasmid entspricht in seinem Laufverhalten im Agarosegel dem in der PCR eingesetzten Ausgangsplasmid pET28b-*hlyC*-His.

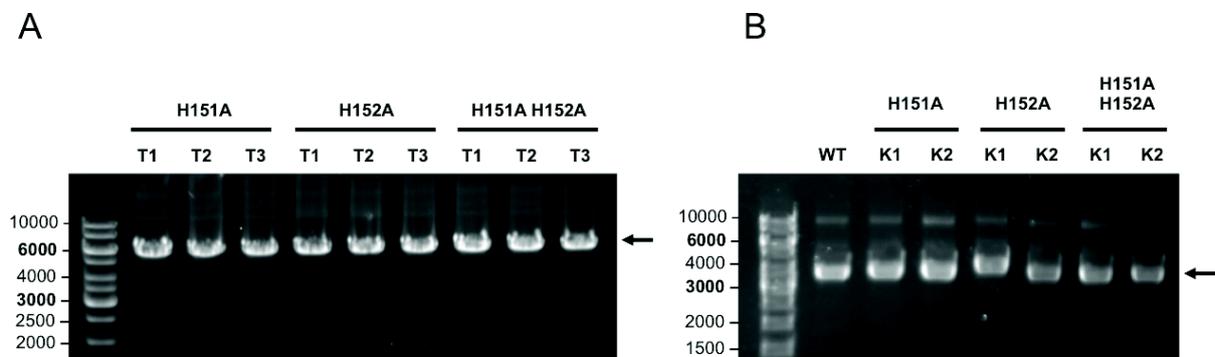


Abbildung 1: Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle des amplifizierten PCR-Produktes (A) und des isolierten Plasmides (B) aus der Klonierung der HlyC H151A H152A Doppelmutante. Die Pfeile markieren das pET28b-*hlyC*-His PCR Produkt (A) und Plasmid (B). T1 bis T3 = Annealingtemperatur 1 bis 3, WT = HlyC Wildtyp im Ausgangsplasmid, K1 und K2 = Klon 1 und Klon 2 der jeweiligen HlyC Mutante.

Die anschließende Sequenzierung der isolierten Plasmide durch die Firma GATC Biotech AG bestätigte die beiden Basenaustausche CAC (His) zu GCC (Ala) an den entsprechenden Positionen in der DNA-Sequenz der HlyC Doppelmutante H151A H152A.

3.2.2 Expression und Reinigung von HlyC

Die Expression und Reinigung von löslichem HlyC aus *E. coli* war durch eine Reduktion der Expressionstemperatur von 37°C auf 18°C möglich. Bei höheren Temperaturen befindet sich das Zielprotein überwiegend in Inklusionskörpern. Die Expression erfolgte über Nacht.

3.2.2.1 Reinigung von HlyC durch IMAC und SEC

Mit dem ersten Reinigungsschritt über die Nickelionen-Affinitätschromatographie (IMAC) wurden die ersten Verunreinigungen aus der Lösung nach Zellaufschluss und Zentri-

fugation entfernt. Die anschließend mittels SDS-PAGE analysierten IMAC Fraktionen sind in Abbildung 2 (links) dargestellt. Am Gel ist eine dominante Bande bei ≈ 21 kDa (entspricht der Größe des HlyC Monomers) und eine weitere starke Bande bei ≈ 40 kDa (entspricht der Größe des HlyC Dimers) zu erkennen. Beide Banden wurden im Western Blot durch einen anti-His Antikörper erkannt (nicht dargestellt). Weiterhin war unter reduzierenden Bedingungen keine Bande bei ≈ 40 kDa zu beobachten (nicht dargestellt). Im zweiten Reinigungsschritt über die SEC wurden weitere Verunreinigungen abgetrennt. Das entsprechende SDS-Gel mit den analysierten SEC Fraktionen ist in Abbildung 2 (rechts) dargestellt. Die Ausbeute an HlyC zu diesem Zeitpunkt betrug $\approx 0,35$ mg aus 1 L Flüssigkultur.

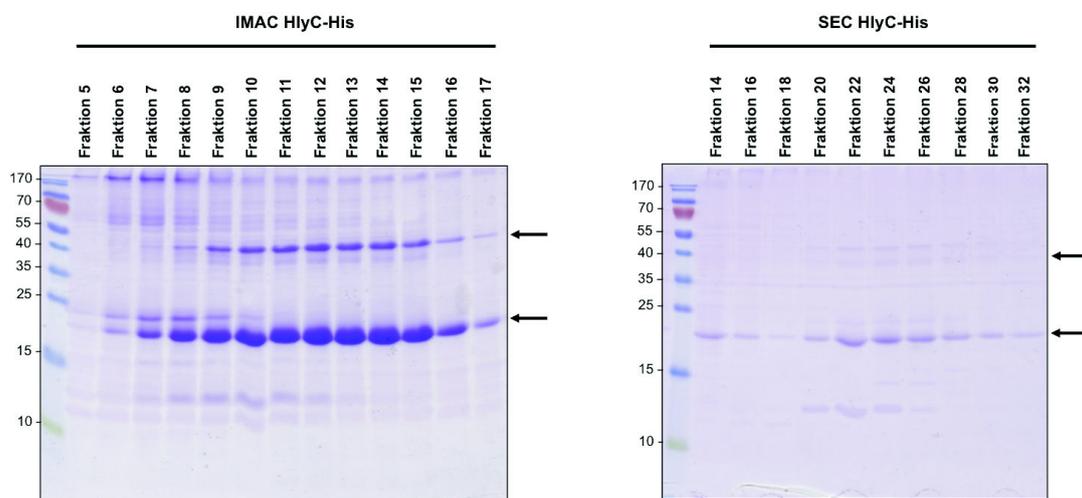


Abbildung 2: SDS-Gele des ersten und zweiten Reinigungsschrittes von HlyC-His durch die Nickelionen-Affinitätschromatographie (links) und Größenausschlusschromatographie (rechts). Die Pfeile markieren das HlyC-His Monomer (≈ 21 kDa) und das HlyC-His Dimer (≈ 42 kDa).

3.2.2.2 TEV-Protease Verdau, Reinigung und Umpufferung von HlyC

Die nach der Größenausschlusschromatographie vereinten Fraktionen wurden zur Abspaltung der C-terminalen 6×His-Sequenz durch die TEV-Protease verdaut. Durch die Übernacht-Inkubation mit der Protease bei 4°C wurde ein Großteil des Proteins geschnitten (Abbildung 3 B, Vergleich Spur 1 und 2). Das geschnittene Protein wurde von dem nicht umgesetzten Protein und der TEV-Protease über eine reverse Nickelionen-Affinitätschromatographie gereinigt. Dabei band HlyC schwach an die Säule und wurde mit ≈ 50 mM Imidazol eluiert (10 % IMAC Elutionspuffer), während sowohl das ungeschnittene Protein als auch die TEV-Protease mit ihrer N-terminalen 6×His-Sequenz erst bei höheren Imidazolkonzentrationen eluierten (Abbildung 3 A und 3 B, Spur 3 und 4). Die Identität der unbekanntenen Proteinbande zwischen 10 und 15 kDa wurde mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.4). Das nach Umpuffe-

rung in den HlyC Reaktionspuffer einkonzentrierte und im proHlyA *in vitro* Acylierungsassay eingesetzte HlyC ist in Abbildung 3 C dargestellt. Die Ausbeute an HlyC ohne C-terminale 6×His-Sequenz nach Umpufferung in den HlyC Reaktionspuffer und Konzentrierung betrug $\approx 0,1$ mg aus 1 L Flüssigkultur.

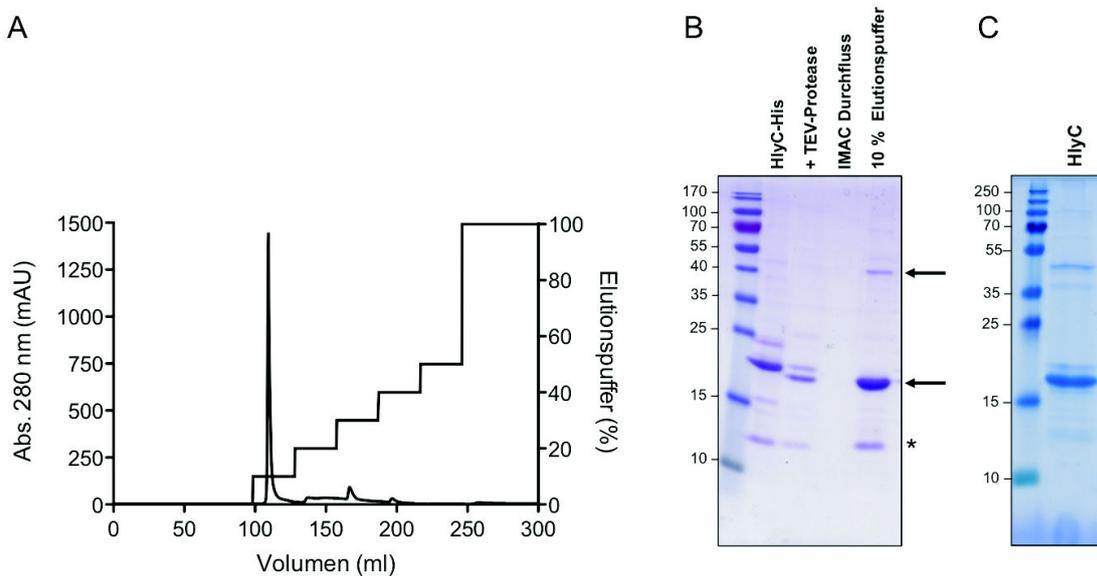
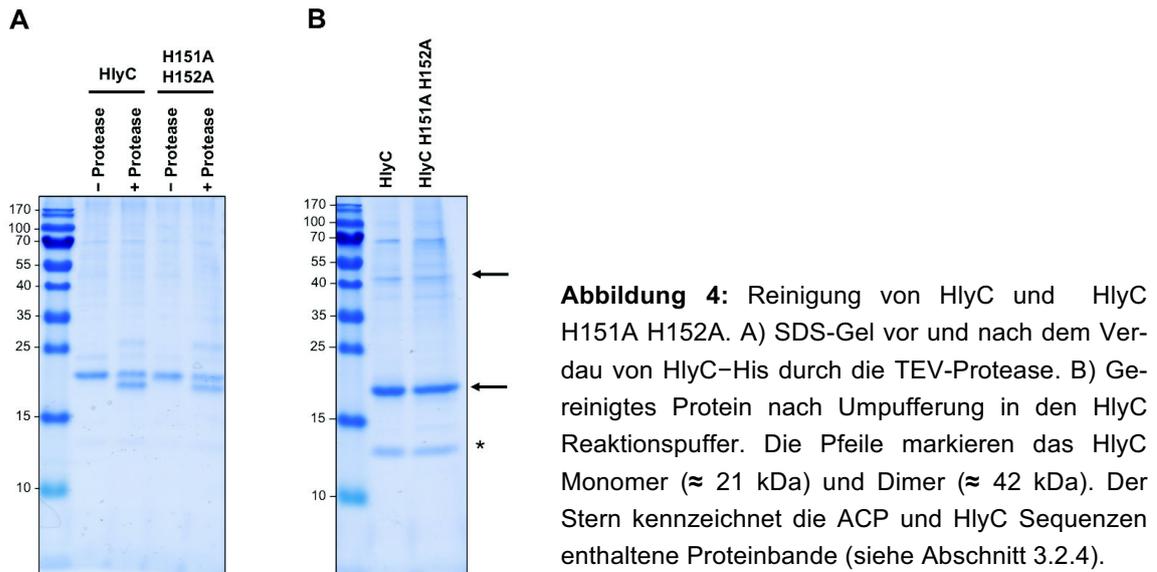


Abbildung 3: Reinigung von HlyC nach Verdau mit der TEV-Protease. A) Chromatogramm der reversen IMAC zur Abtrennung von ungeschnittenem HlyC und der TEV-Protease B) SDS-Gel mit dem Protein vor (HlyC-His) und nach Verdau mit der TEV-Protease (+ TEV-Protease) sowie zwei Fraktionen der reversen IMAC C) SDS-Gel vom gereinigten Protein nach Umpufferung in den HlyC Reaktionspuffer. Die Pfeile markieren das HlyC Monomer (≈ 21 kDa) und das HlyC Dimer (≈ 42 kDa). Der Stern kennzeichnet die Bande, die mittels Massenspektrometrie untersucht wurde und Sequenzen aus ACP und HlyC enthält (siehe Abschnitt 3.2.4).

3.2.3 Expression und Reinigung von HlyC H151A H152A

Im Unterschied zur Expression von HlyC war eine Reinigung von löslichem Protein mit der HlyC Doppelmutante HlyC H151A H152A nach dem ursprünglichen Protokoll nicht möglich. Erst nach Zusatz von Glucose zum Expressionsmedium lag ein Teil des Proteins löslich vor und die Reinigung von HlyC H151A H152A aus dem Überstand nach dem Zellaufschluss war möglich. Weitere Abweichungen waren ein steilerer IMAC-Gradient im ersten Reinigungsschritt und eine SEC-Säule mit einem geringeren Säulenvolumen im finalen Schritt der Reinigung. In Abbildung 4 ist ein SDS-Gel vor und nach dem Verdau von HlyC und HlyC H151A H152A durch die TEV-Protease (A) und ein SDS-Gel der gereinigten und einkonzentrierten Proteine dargestellt (B). HlyC wurde parallel zur HlyC Doppelmutante mit dem abgeänderten Protokoll gereinigt. Da von HlyC im Vergleich zur Doppelmutante deutlich mehr lösliches Protein in den Zellen vorlag, wurde das für die Aufreinigung eingesetzte Gesamtvolumen an Zellkultur für die Reinigung von HlyC halbiert.



Die Ausbeute an HlyC H151A H152A ohne C-terminale 6×His-Sequenz, nach Umpufferung in den HlyC Reaktionspuffer und Konzentrierung, betrug $\approx 0,06$ mg Protein aus 1 L Flüssigkultur. Die Ausbeute für HlyC betrug $\approx 0,1$ mg aus 1 L Flüssigkultur.

3.2.4 Massenanalyse der Bande zwischen 10 und 15 kDa

Die unbekannte Proteinbande im SDS-Gel von HlyC und HlyC H151A H152A zwischen 10 und 15 kDa am Ende der Reinigung wurde zur Identifizierung zur massenspektrometrischen Untersuchung (MALDI-TOF) gegeben. Abhängig davon, welche IMAC und SEC Fraktionen während der Reinigung vereint wurden, war eine weitere Bande bei etwa 15 kDa zu finden. Das Ergebnis der Analyse der aus dem HlyC-Gel stammenden Proteinbande (siehe Abbildung 3 B) ist in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Analyse einer aus der Reinigung von HlyC H151A H152A stammenden Proteinbande bei ≈ 15 kDa ist in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 10: Ergebnis der Massenanalyse der Gelbande zwischen 10 und 15 kDa (durchgeführt im Labor von Prof. Dr. Kai Stühler vom BMFZ an der Universität Düsseldorf)

Bande zwischen 10 und 15 kDa	
Acylgruppen-tragendes Protein aus <i>Escherichia coli</i> (Stamm K12), Genname: <i>acpP</i> , UniProtKB Eintrag P0A6A8	
Peptidsequenz	Anzahl der Peptide im Spektrum
IIGEQLGVK	3
ITTVQAAIDYINGHQA	2
MSTIEER	1
AEKITTQAAIDYINGHQA	1
LVMALEEE	1
QLGVKQEE	1

Hämolyisin C aus <i>Escherichia coli</i> (Stamm UT189 / UPEC), Genname: <i>hlyC</i> , UniProtKB Eintrag Q1R2T4	
Peptidsequenz	Anzahl der Peptide im Spektrum
ANQYALLTR	6
FPDELFR	2
NWPVSLFAINVLP AIR	1
DNYPVAYCSWANLSLENEIK	1

Bei den identifizierten Peptiden der proteaseverdauten Proteine aus dem Gel handelt es sich um Sequenzen von ACP und HlyC aus *E. coli*. Die in dem Spektrum vorkommenden Peptidsequenzen von ACP decken die Aminosäurebereiche 1 bis 22, 43 bis 50 und 60 bis 78 (entspricht der C-terminalen Aminosäure) des Proteins ab. Die Peptidsequenzen von HlyC decken im N-terminalen Bereich des Proteins die Aminosäuren 25 bis 69 und in einem kurzen zentralen Bereich des Proteins die Aminosäuren 111 bis 117 ab. Es wurden mit insgesamt 9 Peptiden aus ACP und 10 Peptiden aus HlyC in etwa gleich viele Peptide für beide Proteine detektiert.

Tabelle 11: Ergebnis der Massenanalyse der Proteinbande bei 15 kDa (durchgeführt im Labor von Prof. Dr. Kai Stühler vom BMFZ an der Universität Düsseldorf)

Bande bei 15 kDa	
Acylgruppen-tragendes Protein aus <i>Escherichia coli</i> (Stamm K12), Genname: <i>acpP</i> , UniProtKB Eintrag P0A6A8	
Peptidsequenz	Anzahl der Peptide im Spektrum
IIGEQLGVK	2
KIIGEQLGVK	1
Hämolyisin C aus <i>Escherichia coli</i> (Stamm UT189 / UPEC), Genname: <i>hlyC</i> , UniProtKB Eintrag Q1R2T4	
Peptidsequenz	Anzahl der Peptide im Spektrum
ANQYALLTR	12
KFPDELFR	8
KKFPDELFR	4
FPDELFR	4
AIRVDPK	2
VSEFHGGKIDK	1
NWPVSLFAINVLP AIR	1
Elongationsfaktor Tu 1 aus <i>Escherichia coli</i> (Stamm K12), Genname: <i>tufA</i> , UniProtKB Eintrag P0CE47	
Peptidsequenz	Anzahl der Peptide im Spektrum
AFDQIDNAPEEK	2
AGENVGVLLR	1
EHILLGR	1
STcTGVEMFR	1
HTPFFK	1

30S ribosomales Protein S9 aus <i>Escherichia coli</i> (Stamm K12), Genname: <i>rpsI</i> , UniProtKB Eintrag P0A7X3	
Peptidsequenz	Anzahl der Peptide im Spektrum
SLEQYFGR	2
GGGISGQAGAIR	1

In dem Spektrum wurden, im Vergleich zu dem ersten Spektrum der Proteinbande zwischen 10 und 15 kDa, weniger Sequenzen aus ACP und mehr Sequenzen aus HlyC identifiziert. Es wurden insgesamt 3 Peptide aus ACP und 32 Peptide aus HlyC detektiert. Darüber hinaus wurden mit dem Elongationsfaktor Tu 1 und dem ribosomalen Protein S9 zwei weitere Proteine aus *E. coli* identifiziert. Die Peptide aus ACP umfassen den im ersten Spektrum ebenfalls gefundenen Aminosäurebereich 10 bis 19. Die HlyC-Peptide decken im N-terminalen Bereich des Proteins ebenfalls die Aminosäuren 25 bis 49 ab. Außerdem wurden mehr Peptide im zentralen Bereich von HlyC um die Aminosäuren 104 bis 124 identifiziert und ein zusätzliches Peptid im C-terminalen Bereich von HlyC gefunden (Aminosäuren 130 bis 140).

3.2.5 Expression und Reinigung von proHlyA und Herstellung des Acyl-ACP Rohextraktes

Die Reinigung von proHlyA und die Herstellung des Acyl-ACP Rohextraktes wurden wie bereits früher beschrieben durchgeführt, während acyl-HlyA direkt aus dem Überstand der Zellkultur verwendet wurde [222]. Die Ausbeute an proHlyA betrug ≈ 30 mg Protein aus 1 L Flüssigkultur. Das SDS-Gel von dem für den Acylierungsassay entfaltenen Protein ist in Abbildung 5 dargestellt (5 μ l von 1 mg/ml proHlyA in Denaturierungspuffer). Die aus dem Gelbild in Abbildung 5 abgeschätzte Konzentration von acyl-HlyA beträgt 4 mg/ml (5 μ l von acyl-HlyA in Solubilisierungspuffer). Zur Illustration ist ebenfalls ein SDS-Gel mit dem im Acylierungsassay ursprünglich eingesetzten Acyl-ACP Rohextrakt abgebildet (20 μ l Rohextrakt in ACP Puffer).

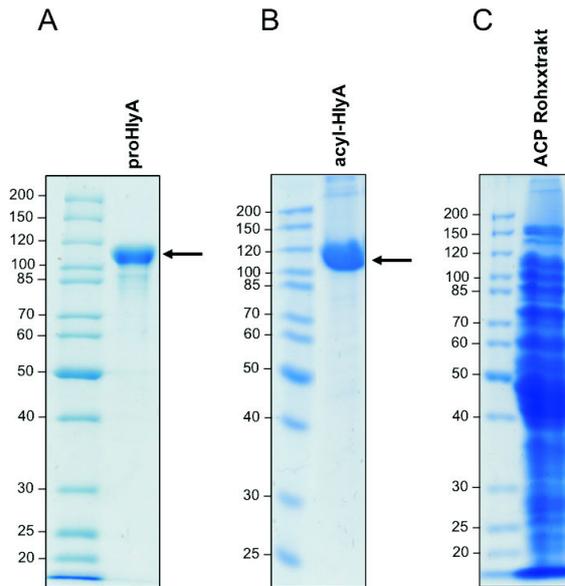


Abbildung 5: SDS-Gele von den im *in vitro* Acylierungsassay eingesetzten, gereinigten Proteinen. A) proHlyA in Denaturierungspuffer B) acyl-HlyA in Denaturierungspuffer und C) Rohextrakt aus *Escherichia coli* als Quelle für acyl-ACP. Die Pfeile markieren proHlyA und acyl-HlyA.

3.2.6 Vorversuche zur *in vitro* Acylierung durch HlyC

In den Vorversuchen wurde die bereits früher beschriebene *in vitro* Acylierungsmethode für die Messungen mit Hämin angepasst [222]. Dabei wurde die HlyC Gesamtmenge mit und ohne Acyl-ACP Rohextrakt, die Acylierungs- und Hämolyszeit sowie die Entfaltung von proHlyA im Denaturierungspuffer optimiert. Die Absorption im Überstand der einzelnen Reaktionsansätze wurde dreifach photometrisch bei 544 nm bestimmt (Messwerte 1 bis 3). In der ersten Versuchsreihe (A) wurde die eingesetzte HlyC Gesamtmenge von 5 bis 0,5 μl HlyC (0,18 mg/ml in HlyC Reaktionspuffer) optimiert. In der zweiten Versuchsreihe (B) wurde der Acyl-ACP Rohextrakt durch den ACP Puffer ersetzt. Die Rohdaten zu den beiden Versuchsreihen sind in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12: Absorptionswerte ($A_{544\text{nm}}$) zu den Versuchsreihen A und B aus den Vorversuchen zur *in vitro* Acylierung durch HlyC

Reihe A	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Reihe B	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3
SDS	1,727	1,729	1,722	SDS	1,727	1,729	1,722
Acyl-HlyA	1,736	1,730	1,730	Acyl-HlyA	1,736	1,730	1,730
5 μl HlyC	1,593	1,599	1,603	5 μl HlyC	1,654	1,646	1,660
4 μl HlyC	1,633	1,630	1,628	4 μl HlyC	1,553	1,544	1,552
3 μl HlyC	1,599	1,595	1,592	3 μl HlyC	1,657	1,642	1,642
2 μl HlyC	1,661	1,655	1,652	2 μl HlyC	1,714	1,702	1,682
1 μl HlyC	1,653	1,638	1,643	1 μl HlyC	1,198	1,178	1,172
0,5 μl HlyC	1,635	1,627	1,651	0,5 μl HlyC	0,959	0,951	0,949
Ohne HlyA	0,063	0,065	0,070	Ohne HlyA	0,063	0,065	0,007
Ohne HlyC	0,164	0,170	0,176	Ohne HlyC	0,164	0,170	0,176
Waschpuffer	0,119	0,124	0,121	Waschpuffer	0,119	0,124	0,121

In der dritten Versuchsreihe (C) wurde die Acylierungszeit von 10 bis 0 min optimiert. In der vierten Versuchsreihe (D) wurde proHlyA in Denaturierungspuffer ohne EDTA und ohne EDTA und Harnstoff verwendet. Die Absorption im Überstand der einzelnen Reak-

tionsansätze wurde dreifach oder einfach bestimmt (Messwerte 1 bis 3). Die Rohdaten zu den beiden Versuchsreihen sind in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13: Absorptionswerte (A_{544nm}) zu den Versuchsreihen C und D aus den Vorversuchen zur *in vitro* Acylierung durch HlyC

Reihe C	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Reihe D	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3
SDS	0,822	0,805	0,800	SDS	1,141	-	-
Acyl-HlyA	0,954	0,948	0,941	Acyl-HlyA	0,678*	-	-
10 min	0,938	0,924	0,919	+Harnstoff +EDTA	1,173	-	-
7 min	0,832	0,832	0,830	+Harnstoff -EDTA	0,688	-	-
5 min	0,772	0,769	0,767	-Harnstoff -EDTA	0,309	-	-
2 min	0,595	0,604	0,603	Ohne HlyA	0,183	-	-
0 min	0,139	0,159	0,156	Ohne HlyC	0,185	-	-
Ohne HlyA	0,202	0,159	0,155	Waschpuffer	0,183	-	-
Ohne HlyC	0,151	0,124	0,117				
Waschpuffer	0,119	0,124	0,121	* Messwert in der Auswertung nicht berücksichtigt			

Für die Auswertung der Messwerte (A_{544nm}) aus den ersten drei Versuchsreihen (A bis C) wurde die 1 : 16 Verdünnung des Überstandes in H_2O verwendet. Für die Auswertung der Messdaten aus der letzten Versuchsreihe (D) wurde die 1 : 64 Verdünnung des Überstandes in H_2O verwendet. Alle Messwerte wurden um den Mittelwert der entsprechenden Hintergrundabsorption (= 75 μ l Schafblut Waschpuffer, n = 3) korrigiert und auf die SDS-Positivkontrolle normiert (Mittelwert aus n = 3, entspricht 100 % Hämolyse). Das Ergebnis ist in Abbildung 6 dargestellt.

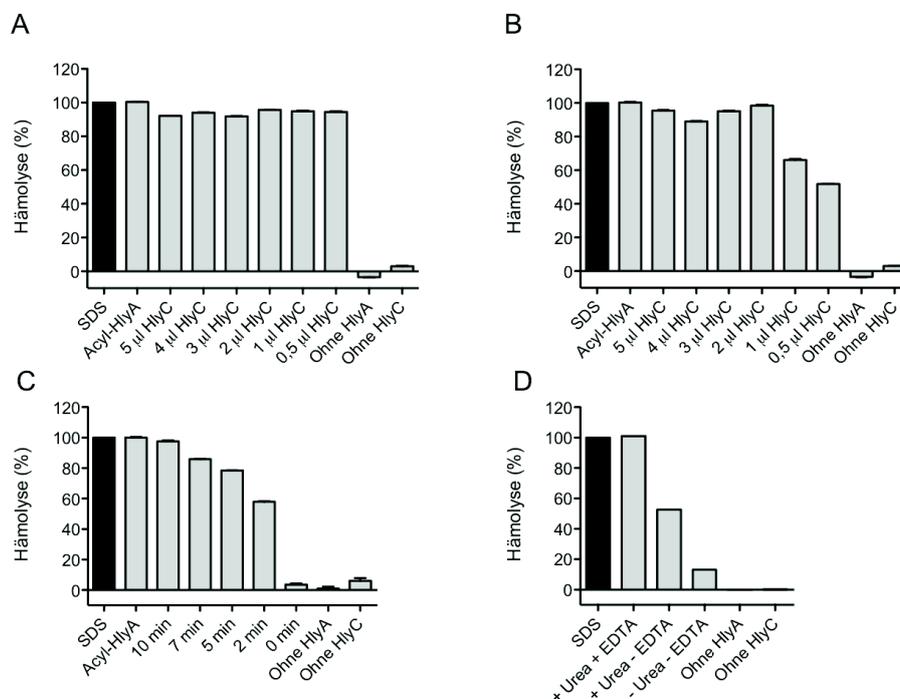


Abbildung 6: Vorversuche zur *in vitro* Acylierung durch HlyC. Optimierung der eingesetzten HlyC-Menge mit Acyl-ACP Rohextrakt (A) und ohne Acyl-ACP Rohextrakt (B), Optimierung der Acylierungszeit (C) und Vergleich der Acylierung mit und ohne EDTA im proHlyA Denaturierungspuffer (D).

Versuchsreihe A) Das eingesetzte Volumen HlyC bis einschließlich 0,5 μl (0,18 mg/ml in HlyC Reaktionspuffer) reicht in Anwesenheit von Acyl-ACP Rohextrakt für die vollständige Lyse der Schaferythrozyten aus. Die Acylierungszeit betrug 1 h bei 23°C und die Hämolysezeit 1 h bei 37°C.

Versuchsreihe B) In Abwesenheit von Acyl-ACP Rohextrakt ist ab einem Volumen von 1 μl HlyC (0,18 mg/ml in HlyC Reaktionspuffer) eine unvollständige Hämolyse zu beobachten. Mit 0,5 μl HlyC reduziert sich die hämolytische Aktivität in etwa auf die Hälfte. Die Acylierungszeit betrug, wie in der ersten Versuchsreihe, 1 h bei 23°C und die Hämolysezeit 1 h bei 37°C. Für die weiteren Messungen wurden 2 μl HlyC (0,18 mg/ml in HlyC Reaktionspuffer) ohne Zusatz von Acyl-ACP Rohextrakt verwendet.

Versuchsreihe C) Mit 2 μl HlyC (0,18 mg/ml in HlyC Reaktionspuffer) in Abwesenheit von Acyl-ACP Rohextrakt nimmt die relative hämolytische Aktivität mit der Verkürzung der Acylierungszeit von 10 auf 2 min um rund 40 % ab. Die Hämolysezeit betrug 30 min bei 37°C. Für die späteren Aktivitätsmessungen in Anwesenheit von Häm in wurde eine Acylierungszeit von 5 min festgelegt.

Versuchsreihe D) Um eine vollständige Hämolyse unter den festgelegten Versuchsbedingungen zu erzielen, ist die Entfaltung von proHlyA in Denaturierungspuffer mit EDTA und Harnstoff nötig. Bei der Entfaltung von proHlyA in Denaturierungspuffer ohne EDTA reduziert sich die hämolytische Aktivität in etwa auf die Hälfte. Mit gefaltetem proHlyA ohne EDTA und ohne Harnstoff im Puffer verbleibt eine hämolytische Restaktivität von etwa 10 %. Für die weiteren Messungen wurde proHlyA in Denaturierungspuffer ohne EDTA verwendet.

Zusammengefasst wurden für die weiteren Versuche folgende Bedingungen festgelegt: In der Acylierungsreaktion wurden 2 μl HlyC ohne C-terminale 6×His-Sequenz mit einer Konzentration von 0,18 mg/ml in HlyC Reaktionspuffer eingesetzt. Auf den Zusatz von Acyl-ACP Rohextrakt wurde verzichtet, da das Substrat mit HlyC koaufgereinigt werden konnte (siehe Abschnitt 3.2.4). Die Acylierungszeit wurde von 1 h auf 5 min reduziert. Die Hämolysezeit wurde von 1 h auf 30 min reduziert. Des Weiteren wurde bei der Entfaltung von proHlyA auf den Zusatz von EDTA im Denaturierungspuffer verzichtet.

3.2.7 Enzymkinetik von HlyC für proHlyA

Die K_M -Wertbestimmung für proHlyA erfolgte nach den in den Vorversuchen zur *in vitro* Acylierung festgelegten Bedingungen (siehe Abschnitt 3.2.6). Einzige Abweichung war die Substratkonzentration von proHlyA im Ansatz (0 bis 5 μM). Von jeder proHlyA-

Konzentration wurde im Überstand von drei unabhängigen Ansätzen die Absorption bei 544 nm bestimmt. Die Messwerte sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Absorptionswerte ($A_{544\text{nm}}$) zur K_M -Wertbestimmung für proHlyA

Reaktionsansatz	Messwert (Ansatz 1)	Messwert (Ansatz 2)	Messwert (Ansatz 3)
ProHlyA 0 μM	0,136	0,104	0,188
ProHlyA 0,05 μM	0,443	0,446	0,429
ProHlyA 0,10 μM	0,578	0,635	0,527
ProHlyA 0,25 μM	0,866	0,832	0,693
ProHlyA 0,50 μM	1,022	1,010	0,876
ProHlyA 0,75 μM	1,190	0,957	0,975
ProHlyA 1,00 μM	1,191	1,060	0,959
ProHlyA 2,00 μM	1,183	1,040	1,012
ProHlyA 3,50 μM	1,104	1,005	0,956
ProHlyA 5,00 μM	1,227	1,081	0,988
SDS (0,21 %)	1,029	1,013	-
Waschpuffer (75 μl)	0,211	0,164	-

Für die Auswertung der Messwerte ($A_{544\text{nm}}$) wurde die 1 : 32 Verdünnung des Überstandes in H_2O verwendet. Die Werte wurden auf den höchsten Absorptionswert und den Absorptionswert der Hintergrundmessung (75 μl Schafblut Waschpuffer, Mittelwert aus $n = 2$) normiert. Für die Auswertung wurden die Substratkonzentrationen bis 2,0 μM berücksichtigt. Die K_M -Wertbestimmung erfolgte in GraphPad Prism® (Version 5.0a) unter Verwendung der Michaelis-Menten Gleichung. Das Ergebnis ist in Abbildung 7 dargestellt.

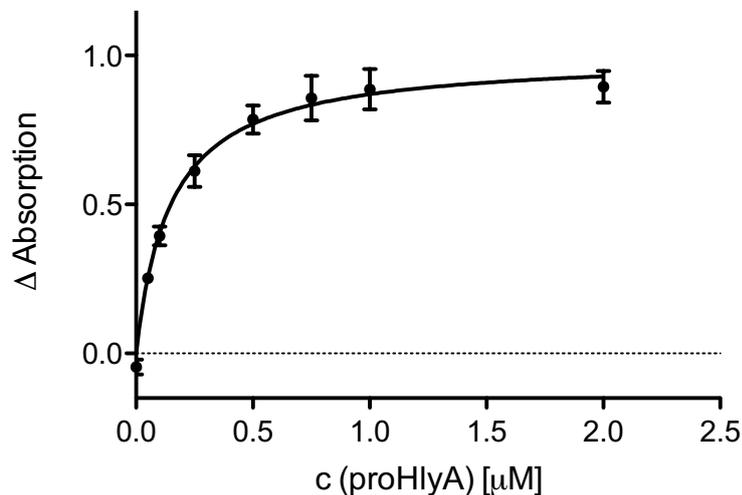


Abbildung 7: Enzymkinetik von HlyC für proHlyA unter den optimierten Bedingungen des *in vitro* Acylierungsassays für die Messungen mit Hämin. Die horizontale Linie beim Absorptionswert von Null entspricht dem Wert der Hintergrundmessung mit Schafblut Waschpuffer.

Die Auswertung ergibt einen K_M -Wert von $0,14 \pm 0,04 \mu\text{M}$ für proHlyA und eine v_{max} von $0,998 (0,656 \Delta \text{ Absorption} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1} (\text{HlyC}))$. Der R^2 -Wert für die Auswertung beträgt 0,95.

3.2.8 Enzymaktivität von HlyC in Anwesenheit von Hämin

3.2.8.1 Vorversuche mit Hämin

Die Versuchsbedingungen entsprachen überwiegend den in den Vorversuchen zur Acylierung ohne Hämin festgelegten Bedingungen (siehe Abschnitt 3.2.6). Ein zusätzlicher, vorgelagerter Inkubationsschritt von HlyC mit Hämin, vor dem Start der Acylierungsreaktion, wurde eingeführt. Bei den Messungen handelt es sich, abgesehen von der SDS-Messung ($n = 2$) und der Hintergrundmessung ($n = 2$), um Einfachbestimmungen. Die Messwerte zu den Vorversuchen mit Hämin sind in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Absorptionswerte (A_{544nm}) zu den Vorversuchen mit Hämin

Reaktionsansatz	Messwert
SDS (0,21 %), MW aus $n=2$	0,864
Hämin 0 μM	1,195
Hämin 5 μM	1,293
Hämin 10 μM	0,292
Hämin 25 μM	0,113
Hämin 100 μM	0,113
Ohne HlyC, Hämin 0 μM	0,134
Ohne proHlyA, Hämin 0 μM	0,125
Ohne proHlyA, Hämin 100 μM	0,125
Acyl-HlyA, Hämin 0 μM	1,857
Acyl-HlyA, Hämin 100 μM	1,912
Nur Hämin 33 μM	0,139
FeCl_2 33 μM	0,810
FeCl_2 66 μM	0,910
FeCl_2 100 μM	0,697
Waschpuffer, MW aus $n=2$	0,117

Für die Auswertung wurden die Messwerte (A_{544nm}) der 1 : 64 Verdünnung des Überstandes in H_2O verwendet. Die Absorptionswerte wurden um den Wert der Hintergrundmessung (75 μl Schafblut Waschpuffer, Mittelwert aus $n = 2$) korrigiert. Anschließend wurden die Werte auf die SDS-Positivkontrolle (1 μl 16 % SDS in H_2O , Mittelwert aus $n = 2$, entspricht 100 % hämolytischer Aktivität) normiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt.

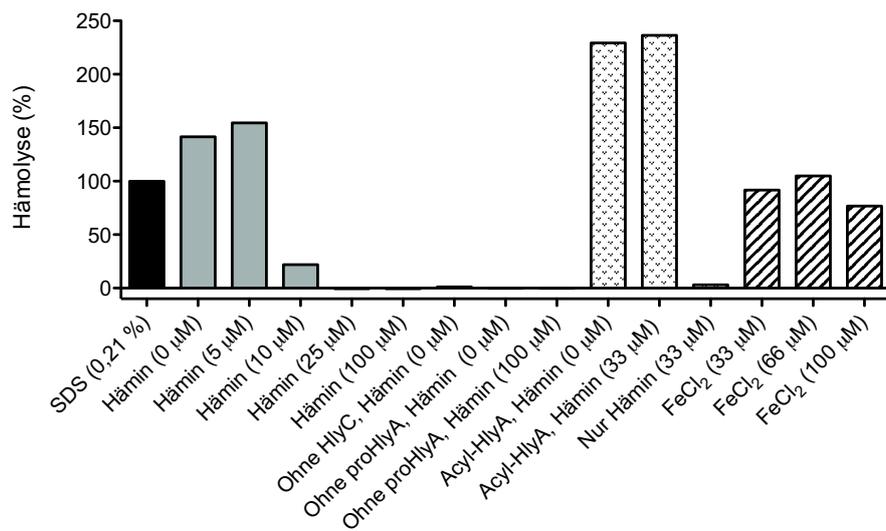


Abbildung 8: Vorversuche zur *in vitro* Acylierung durch HlyC in Anwesenheit von Hämin. Alle Messwerte wurden auf die SDS-Positivkontrolle normiert. Mögliche Ursachen für die hohen Hämolysewerte im Vergleich zur SDS-Kontrolle werden in der Diskussion in Abschnitt 6.1.4 erläutert.

In Anwesenheit von 0 und 5 µM Hämin im Acylierungsansatz wird eine vollständige Lyse der Schaferythrozyten erreicht. Bei 10 µM Hämin ist eine stark abgeschwächte Hämolyse zu beobachten. Bei noch höheren Häminkonzentrationen (25 und 100 µM) ist keine hämolytische Aktivität mehr zu beobachten. Die Kontrollen ohne HlyC und ohne proHlyA im Acylierungsansatz weisen keine hämolytische Aktivität auf. Aus dem Vergleich der Kontrollen ohne proHlyA in Abwesenheit (0 µM Hämin) und Anwesenheit von Hämin (100 µM) sowie der Kontrolle mit Hämin alleine (33 µM) geht hervor, dass die Eigenabsorption von Hämin bei 544 nm vernachlässigt werden kann. Die hämolytische Aktivität von wieder gefaltetem acyl-HlyA in Abwesenheit (0 µM Hämin) und Anwesenheit von Hämin (33 µM) unterscheidet sich kaum. Dementsprechend konnte eine Beeinflussung von HlyA durch Hämin ausgeschlossen werden. Zusammengefasst kann ab 10 µM Hämin von einer Hemmung der Acyltransferaseaktivität von HlyC ausgegangen werden. Die Messungen mit FeCl₂ in verschiedenen Konzentrationen anstelle von Hämin zeigen keinen vergleichbaren Rückgang der Hämolyse (Hämolyse bei 33 µM FeCl₂: 91,7 %, bei 66 µM FeCl₂: 105,0 %, bei 100 µM FeCl₂: 76,8 %).

3.2.8.2 Hauptversuch mit Hämin

Die IC₅₀-Wertbestimmung für Hämin erfolgte nach den in den Vorversuchen zur *in vitro* Acylierung festgelegten Bedingungen (siehe Abschnitt 3.2.6). Einzige Abweichung war die Vorinkubation von HlyC mit Hämin im ACP Puffer vor dem Start der Acylierungsreaktion durch die Zugabe von proHlyA. Im Hauptversuch wurden im Konzentrationsbereich

von 0 bis 100 μM Hämin insgesamt 13 verschiedene Konzentrationen gemessen (bezogen auf den 75 μl Acylierungsansatz).

Tabelle 16: Absorptionswerte ($A_{544\text{nm}}$) zur IC_{50} -Wertbestimmung für Hämin

Reaktionsansatz	Messwert (Ansatz 1)	Messwert (Ansatz 2)	Messwert (Ansatz 3)
Hämin 100 μM	0,124	0,110	0,097
Hämin 50 μM	0,119	0,112	0,096
Hämin 25 μM	0,086	0,137	0,107
Hämin 12,5 μM	0,076	0,140	0,133
Hämin 9,375 μM	0,218	0,227	0,225
Hämin 6,25 μM	0,207	0,245	0,379
Hämin 5,156 μM	0,844	0,866	0,716
Hämin 4,125 μM	1,466	1,373	1,058
Hämin 3,125 μM	1,094	1,429	2,014
Hämin 1,562 μM	1,303	1,336	1,509
Hämin 0,781 μM	1,529	1,141	1,594
Hämin 0,391 μM	1,286	1,358	1,934
Hämin 0 μM	1,476	1,244	1,662
SDS (0,21 %)	1,466	1,123	-
Waschpuffer (75 μl)	0,098	0,188	-

Von jeder Häminkonzentration wurde im Überstand von drei unabhängigen Ansätzen die Absorption bei 544 nm bestimmt. Die Messwerte sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Für die Auswertung der Messwerte ($A_{544\text{nm}}$) wurde die Verdünnung 1 : 32 des Überstandes in H_2O verwendet. Von den Werten wurde die Absorption des Hintergrundes (75 μl Schafblut Waschpuffer, Mittelwert aus $n = 2$) abgezogen. Anschließend wurden die Werte auf die Aktivität des ungehemmten Enzyms (0 μM Hämin) normalisiert. Die IC_{50} -Wertbestimmung erfolgte in GraphPad Prism[®] (Version 5.0a) unter Verwendung der Funktion $Y=100/(1+10^{(X-\text{Log}(\text{IC}_{50}))})$ (log(inhibitor vs. normalized response)) mit $n = 1$.

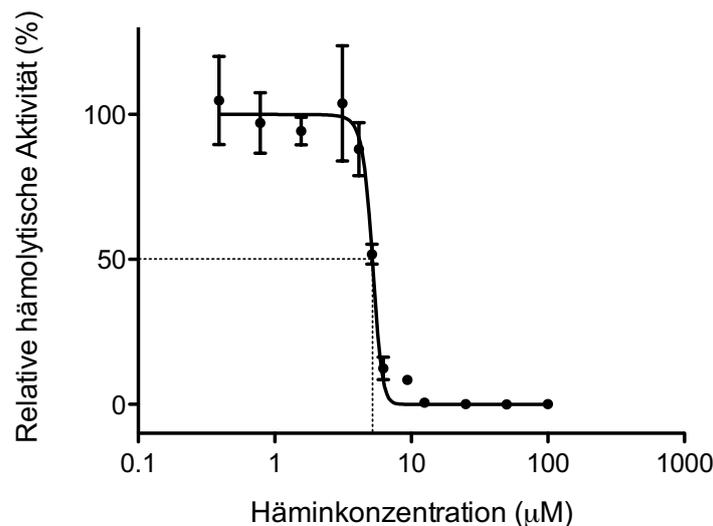


Abbildung 9: Hämin-abhängige Inhibition der Acyltransferaseaktivität von HlyC.

Die Auswertung ergibt einen IC_{50} -Wert für Hämin von $5,19 \pm 0,12 \mu\text{M}$. Der R^2 -Wert für die Auswertung beträgt 0,926.

3.2.9 Enzymaktivität von HlyC in Anwesenheit verschiedener PPIX-Derivate

Neben Hämin (Fe(III)PPIX) wurde die Wirkung von weiteren PPIX-Derivaten auf die Acyltransferaseaktivität von HlyC untersucht (Ga(III)PPIX, Co(III)PPIX, Zn(II)PPIX und PPIX ohne Zentralatom). Die Acylierungsreaktion wurde in Anwesenheit von 25 μM des jeweiligen Derivates anstelle von Hämin durchgeführt. Einzige Änderungen zu den Versuchsbedingungen davor war die Halbierung der Enzymkonzentration (2 μl von 0,09 mg/ml HlyC in Reaktionspuffer). Von jedem PPIX-Derivat wurde im Überstand von drei unabhängigen Ansätzen die Absorption bei 544 nm bestimmt. Die Messwerte sind in Tabelle 17 angegeben.

Tabelle 17: Absorptionswerte ($A_{544\text{nm}}$) zur Untersuchung von verschiedenen PPIX-Derivaten

	Messwert (Ansatz 1)	Messwert (Ansatz 2)	Messwert (Ansatz 3)
SDS (0,21 %)	0,994	1,000	1,464
Ungehemmte Reaktion	1,018	1,093	1,148
Fe(III)PPIX	0,216*	0,133*	0,140*
Ga(III)PPIX	0,087	0,109	0,110
Co(III)PPIX	0,136	0,130	0,150
Zn(II)PPIX	0,180	0,173	0,176
PPIX	0,284	0,279	0,300
Waschpuffer (75 μl)	0,223	0,214	0,213

* Messwerte aus der IC_{50} -Wertmessung für Hämin aus dem Abschnitt 3.2.10

Für die Auswertung der Messwerte ($A_{544\text{nm}}$) wurde die 1 : 32 Verdünnung des Überstandes in H_2O verwendet. Die Werte wurden um die Absorption der Hintergrundmessung (75 μl Waschpuffer, Mittelwert aus $n = 3$) korrigiert. Anschließend wurden die Werte auf den Absorptionswert der ungehemmten Reaktion und den niedrigsten Absorptionswert normalisiert. Die Messwerte für Fe(III)PPIX stammen aus der IC_{50} -Wertbestimmung für Hämin aus dem Abschnitt 3.2.10.

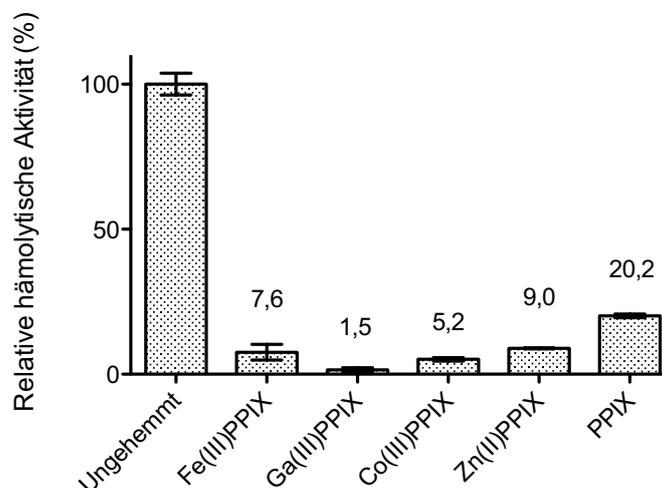


Abbildung 10: Inhibition der Acyltransferaseaktivität von HlyC durch verschiedene PPIX-Derivate.

Die Anwesenheit aller PPIX-Derivate führt zu einer starken Reduktion der hämolytischen Aktivität. Es ist bei allen Derivaten von einer Hemmung der Enzymaktivität von HlyC auszugehen. Die Derivate mit zwei- und dreiwertigen Kationen (Zn(II)-PPIX, Ga(III)-PPIX und Co(III)-PPIX) hemmen die Acyltransferaseaktivität vergleichbar stark zu Hämin (Fe(III)Cl-PPIX). Die Hemmung von HlyC durch PPIX alleine ist etwas schwächer als die Hemmung durch Hämin.

3.2.10 Enzymaktivität von HlyC H151A H152A in Anwesenheit von Hämin

Der Vergleich der Enzymaktivität von HlyC und HlyC H151A H152A erfolgte nach den in den Vorversuchen zur *in vitro* Acylierung festgelegten Bedingungen (siehe Abschnitt 3.2.6) und dem zusätzlichen Vorinkubationsschritt von HlyC mit Hämin (siehe Abschnitt 3.2.8). Einzige Abweichung war die Halbierung der Enzymkonzentration von 0,18 mg/ml auf 0,09 mg/ml HlyC/HlyC H151A H152A im Reaktionsansatz. Im Konzentrationsbereich von 0 bis 100 μM Hämin wurden insgesamt zehn verschiedene Konzentrationen (bezogen auf den 75 μl Reaktionsansatz) mit HlyC und HlyC H151A H152A gemessen. Von jeder Häminkonzentration wurde im Überstand von drei unabhängigen Ansätzen die Absorption bei 544 nm bestimmt. Die Messwerte sind in Tabelle 18 angegeben.

Tabelle 18: Absorptionswerte ($A_{544\text{nm}}$) zur IC_{50} -Wertbestimmung für Hämin mit HlyC und der HlyC Doppelmutante H151A H152A

	HlyC			HlyC H151A H152A		
	Messwert (Ansatz 1)	Messwert (Ansatz 2)	Messwert (Ansatz 3)	Messwert (Ansatz 1)	Messwert (Ansatz 2)	Messwert (Ansatz 3)
Hämin 100 μM	0,228	0,115	0,146	0,124	0,113	0,158
Hämin 50 μM	0,210	0,116	0,150	0,138	0,126	0,171
Hämin 25 μM	0,216	0,133	0,140	0,163	0,135	0,202
Hämin 12,5 μM	0,257	0,139	0,152	0,531	0,224	0,306
Hämin 6,25 μM	0,623	0,669	0,609	0,814	0,744	0,921
Hämin 3,125 μM	0,799	0,978	0,828	1,001	1,028	1,066
Hämin 1,562 μM	0,863	0,976	1,285	0,953	1,041	1,226
Hämin 0,781 μM	0,929	0,906	1,238	0,939	1,043	1,250
Hämin 0,391 μM	1,023	0,859	1,331	0,928	1,051	1,203
Hämin 0 μM	1,018	1,093	1,148	0,931	1,128	1,226
Ohne HlyA	–	–	–	0,202	0,192	0,171
Ohne HlyC	–	–	–	0,225	0,201	0,182
SDS (0,21 %)	0,994	1,000	1,464	–	–	–
Waschpuffer (75 μl)	0,223	0,214	0,213	–	–	–

Für die Auswertung der Messwerte wurde die 1 : 32 Verdünnung des Überstandes in H_2O verwendet. Von den Werten wurde die Absorption des Hintergrundes (75 μl Schafblut Waschpuffer, Mittelwert aus $n = 3$) abgezogen. Anschließend wurden die Werte auf die Aktivität des ungehemmten Enzyms (0 μM Hämin) normalisiert. Die K_M -Wertbestimmung erfolgte in GraphPad Prism[®] (Version 5.0a) unter Verwendung der

QTiPlot Funktion $((A-B)/(1+(x/IC50)^s))+B$. Eine Übereinstimmung mit dem Hill Koeffizienten (s) von 1 war nicht möglich.

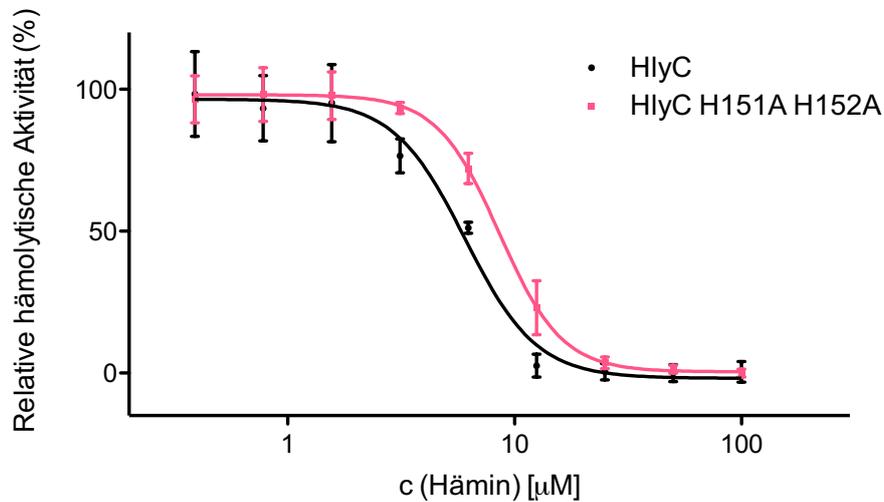


Abbildung 11: Vergleich der Hemmung von HlyC (schwarz) und HlyC H151A H152A (rot) durch Häm.

Die Enzymaktivität von HlyC H151A H152A ohne das postulierte Häm-Bindemotiv wird ebenfalls durch Häm gehemmt. Die Inhibition der Acyltransferaseaktivität von HlyC H151A H152A tritt bei etwas höheren Häminkonzentrationen ein als wie die Inhibition von HlyC. Die Auswertung ergibt für die HlyC Doppelmutante H151A H152A einen **IC₅₀-Wert von $8,62 \pm 0,70 \mu\text{M}$ für Häm** und einen Hill-Koeffizienten von $\approx 3,0$ (R^2 -Wert: 0,959). Die Auswertung für HlyC ergibt einen **IC₅₀-Wert von $6,17 \pm 0,72 \mu\text{M}$ für Häm** und einen Hill-Koeffizienten von $\approx 3,0$ (R^2 -Wert: 0,921). Für die sich unterscheidenden Absorptionen von HlyC und HlyC H151A H152A, bei den Häminkonzentrationen 3,12 μM , 6,25 μM und 12,5 μM , wurde in GraphPad Prism[®] ein einfacher T-Test durchgeführt (Abbildung 12) [231]. Dafür wurden die Absorptionen aus Tabelle 18 um den Wert der Hintergrundmessung (75 μl Schafblut Waschpuffer, Mittelwert aus $n = 3$) korrigiert und in Abbildung 12 dargestellt. Außerdem wurde zum Vergleich die ungehemmte (0 μM Häm) Reaktion mitgeführt.

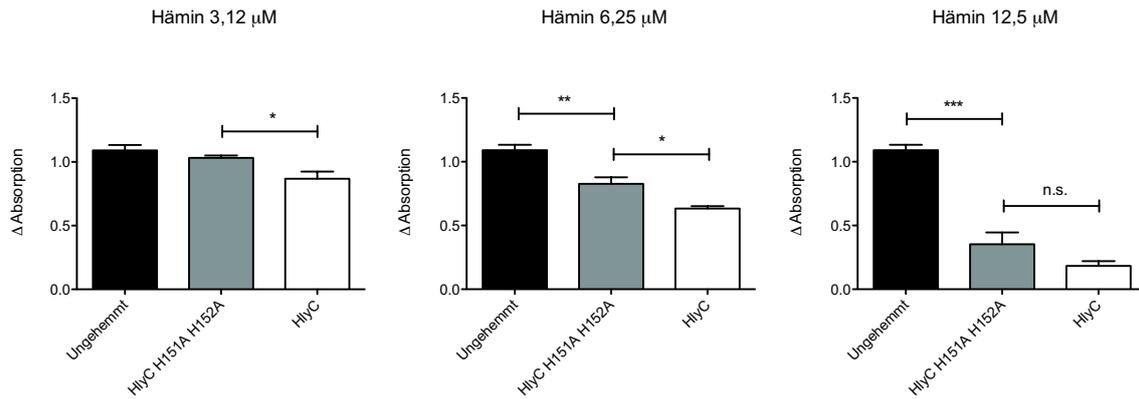


Abbildung 12: Vergleich der Aktivität von HlyC und HlyC H151A H152A bei drei verschiedenen Häminkonzentrationen.

Der Vergleich von HlyC H151A H152A mit HlyC ergibt bei der Häminkonzentration 3,12 µM ein p-Wert von 0,0494 (*), bei der Häminkonzentration 6,25 µM einen p-Wert von 0,0242 (*) und bei der Häminkonzentration von 12,5 µM einen p-Wert von 0,1595 (nicht signifikant). Die Signifikanz des Unterschiedes ist somit bei 6,25 µM Häminkonzentration am größten. Der Vergleich der ungehemmten Reaktion mit HlyC H151A H152A ergibt bei der Häminkonzentration 3,12 µM einen p-Wert von 0,3816 (nicht signifikant), bei der Häminkonzentration 6,25 µM einen p-Wert von 0,0072 (**) und bei der Häminkonzentration von 12,5 µM einen p-Wert von < 0,0001 (***). Zusammengefasst nimmt die Absorption mit zunehmender Häminkonzentration im Vergleich zur ungehemmten Reaktion immer stärker ab. Ein deutlicher Unterschied zwischen der HlyC Doppelmutante H151A H152A und HlyC Wildtyp konnte nicht festgestellt werden.

4 Kapitel 2: Kristallisation von HlyA

In diesem Kapitel wird die Kristallisation von HlyA zur Bestimmung der dreidimensionalen Raumstruktur des Proteins durch die Röntgenstrukturanalyse behandelt. Im Fokus steht die Kristallisation von proHlyA.

Inhaltsverzeichnis

4	<u>Kapitel 2: Kristallisation von HlyA</u>	62
4.1	Material und Methoden	63
4.1.1	Allgemeine Materialien	63
4.1.2	Allgemeine Methoden	69
4.1.3	Expression und Reinigung von proHlyA	71
4.1.4	Kristallisation von proHlyA	72
4.1.5	Röntgenstrukturanalyse	78
4.2	Ergebnisse	80
4.2.1	Expression und Reinigung von proHlyA	80
4.2.2	Kristallisation von proHlyA	81
4.2.3	Röntgendiffraktion der proHlyA Kristalle	86
	Anhang: Kristallisation von OpuBC mit verschiedenen Substraten	88

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Allgemeine Materialien

Chemikalien, Geräte und andere Materialien

Die in diesem Kapitel eingesetzten Chemikalien, Biochemikalien, Geräte und anderen Materialien sind in den Tabellen 1 und 2 aufgelistet.

Tabelle 1: Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalien	Abkürzung, Summenformel	Reinheit/ Qualität	Hersteller
2-Methyl-2,4-pentandiol	MPD	> 99 %	Sigma-Aldrich
2-Propanol	C ₃ H ₈ O	für die HPLC	Carl Roth
Agar Agar, Pulver, hohe Gelstärke	(C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n	reinst	Serva
Ammoniumperoxidsulfat	APS, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	zur Analyse	Carl Roth
Ampicillin Natriumsalz	Amp, C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S	≥ 97 %	Carl Roth
Calciumchlorid Dihydrat	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich
Coomassie® Brilliant Blau R250	CBB-R250, C ₄₅ H ₄₄ N ₃ NaO ₇ S ₂	n. a.	Serva
Essigsäure	C ₂ H ₄ O ₂	technisch	unbekannt
Ethanol	EtOH, C ₂ H ₆ O	technisch	unbekannt
Glycin	C ₂ H ₅ NO ₂	zur Analyse	VWR
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	IPTG, C ₉ H ₁₈ O ₅ S	≥ 99 %	Carl Roth
IZIT Farbstoff (Methylenblaulösung zum Anfärben von Proteinkristallen)	C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S	n. a.	Hampton Research
Kaliumacetat	C ₂ H ₃ KO ₂	zur Analyse	AppliChem
Kanamycinsulfat	Kan, C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ · H ₂ SO ₄	≥ 750 I.E./mg	Carl Roth
Methanol	CH ₄ O	reinst	Sigma-Aldrich
Milchpulver, fettarm	–	für Blotting	Carl Roth
Mineralöl	–	für IR Spektroskopie	Sigma Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-ethyldiamin	TEMED, C ₆ H ₁₆ N ₂	zur Analyse	Merck
Natriumazid	NaN ₃	≥ 99 %	Fisher Scientific
Natriumchlorid	NaCl	zur Analyse	Fisher Scientific
Natriumdodecylsulfat	SDS, C ₁₂ H ₂₅ O ₄ S · Na	≥ 99,0 %	Serva
Pentaerythritolpropoxylat (5/4 PO/OH)	C[CH ₂ [OCH ₂ CH(CH ₃)] _n OH] ₄	n. a.	Sigma-Aldrich

Rotiphorese® Gel aus 30%iger, wässriger Acrylamidstammllösung und 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 : 1	Acrylamidlösung	n. a.	Carl Roth
Salzsäure	HCl	reinst	Sigma-Aldrich
Stickstoff, tiefkalt flüssig	N ₂ flüssig	n. a.	unbekannt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃	zur Analyse	VWR
Tween® 20 (Polysorbat 20)	–	zur Analyse	Sigma-Aldrich
Western Lightning® Ultra chemilumineszenz Substrat	Western Blot Substrat	n. a.	Perkin Elmer
Biochemikalien	Abkürzung	Anmerkung	Hersteller/Herkunft
Anti-HlyA Antikörper, polyklonal	α-HlyA AK	aus dem Kaninchen, Serum	Karl Kuchler, Wien
Anti-Kaninchen-HRP sekundärer Antikörper, IgG (H+L)	α-Kaninchen AK	aus der Ziege	Thermo Fisher Scientific
Hefeextrakt für die Bakteriologie	Hefeextrakt	mikrogranuliert	Carl Roth
PageRuler™ Proteinmarker	Proteinmarker	10-200 kDa	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Proteinmarker	Proteinmarker	10-170 kDa	Thermo Fisher Scientific
Trypton/Pepton aus Casein für die Mikrobiologie	Trypton/Pepton Casein	pankreatisch verdaut	Carl Roth

Tabelle 2: Geräte und andere Materialien

Gerätebezeichnung	Hersteller, Firmensitz
ÄKTA™ Purifier Flüssigkeitschromatographiesystem bestehend aus Box-900, UPC-900, P-900, Frac-920 und CU-950	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Autoklav Systec VX-120 und VX-150	Systec GmbH, Linden, DE
Avanti® J-26xP Zentrifuge für JA-10 Rotor	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Binokular Stemi 2000c + KL1500 LCD mit AxioCam ICc3 TV2/3"	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Inkubationsschüttler Multitron Standard und Ecotron	Infors AG, Bottmingen, CH
Inkubator für Zellkulturen bei 37°C	Heraeus GmbH, Hanau, DE
Laborwaage ABT I20-5DM (42 g; 120 g ± 0,00002 g; 0,0001 g)	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Laborwaage Modell EW 2200-2NM (max: 2200 g ± 0,01 g)	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Lumia Imaging System: Chemi Genius ² Bio Imaging System	Synoptics (Syngene), Cambridge, UK
Milli-Q Wasseraufbereitungsanlage	Merck (Millipore) KGaA, Darmstadt, DE
NanoDrop™ ND-1000 Spektralphotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Optima™ L-90K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

pH-Meter pHenomenal pH1000L	VWR, Radnor, PA, USA
Pipettensatz Pipetman Classic® mit variablen Volumen 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl und 2 µl	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettierroboter NT8 für 96-well Kristallisationsplatten	Formulatrix, Bedford, MA, USA
RockImager 1000 mit Zoomfunktion im sichtbaren Licht und im UV-Licht sowie integrierter Kamera und Software	Formulatrix, Bedford, MA, USA
Spannungsquelle Consort EV215 für SDS-Gele	Cleaver Scientific, Warwickshire, UK
Spektrophotometer Ultrospec10 zur Bestimmung der Zelldichte	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Stereolupe Discovery V8 SteREO Acromat S + VisiLED MC1000	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Trans-Blot®SD Semi-dry Elektrophoretische Transferzelle	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Vakuumpumpe Typ MZ2C NT 2AK	Vacuubrand GmbH + CO KG, Wertheim, DE
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R für 15 ml und 50 ml Röhren	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Modell Centrifuge 5415D für 1,5 ml Reagiergefäße	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifugenrotor JA-10 10,000 rpm inklusive Zentrifugenbecher	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Zentrifugenrotor Ti-45 inklusive Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Andere Materialien	Hersteller
Amersham™ Hybond P 0.45 PVDF Blotmembran	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Amicon Ultra Filtereinheiten für die Zentrifuge MWCO 100 kDa	Merck (Millipore) KGaA, Darmstadt, DE
Deckgläschen MD4-04 silikonisiert, 22 mm Durchmesser, rund	Molecular Dimensions, Newmarket, UK
Einwegpipettenspitzen, Agarschalen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Flaschenaufsatzfilter Nalgene®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glasflaschen und Glaskolben Duran® 500 ml und 300 ml	Schott AG, Mainz, DE
HighLoad™ Superdex™ 200 prep grade Säule	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Kristallisationsplatten 24-well <i>hanging-drop</i> , vorgefettet	Crystalgen, Commack, NY, USA
Kristallisationsplatten Croning 3553, 96-well <i>sitting-drop</i>	Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA
Kristallisationsplatten Cryschem 24-well <i>sitting-drop</i>	Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA
Kristallisationsscreens (siehe Abschnitt 4.1.5)	Unterschiedliche Hersteller
Küvetten aus Polystyrol, 1 cm Schichtdicke	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Magnetische Stäbe, Zangen und sonstiges Kristallisations- zubehör	MiTEGen, Ithaca, NY, USA
Membranfilter Supor®-200, 0,2 µm und 0,45 µm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Messzylinder 500 ml, 250 ml, 100 ml, 50 ml	VITLAB GmbH, Grossostheim, DE
Polymerschlaufen MicroMounts™ und MicroLoops™ (10–500 µm)	MiTEGen, Ithaca, NY, USA
Reagiergefäße (1,5 ml) und Röhren (15 ml und 50 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE

Spritzen und Einmalkanülen 10 ml und 1 ml	Unterschiedliche Hersteller
Sterile Einwegpipetten 50 ml, 20 ml, 10 ml und 5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Whatman® Filterpapier	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Zentrifugenbecher für die Zellkultur 0,5 L	Hitachi-Koki, Chiyoda, Tokyo, JP

Standardpuffer, Stammlösungen und Nährmedien

Die in diesem Kapitel verwendeten Puffer, Stammlösungen und Nährmedien sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammensetzung von Puffern, Stammlösungen und Nährmedien

Puffer	Zusammensetzung	Nährmedien	Zusammensetzung
ProHlyA SEC-Puffer (ohne Calcium)	50 mM Tris-HCl pH 7,5 (20°C) 150 mM NaCl	2× YT Medium (1 L)	10 g Hefeextrakt 16 g Trypton/Pepton 5 g NaCl
ProHlyA SEC-Puffer (mit Calcium)	50 mM Tris-HCl pH 7,5 (20°C) 150 mM NaCl 5 mM CaCl ₂ oder 10 mM CaCl ₂	LB Agar (1 L)	5 g Hefeextrakt 10 g Trypton/Pepton 5 g NaCl 5 g Agar Agar
Acyl-HlyA SEC-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 (20°C) 150 mM NaCl 10 mM CaCl ₂	Die Nährmedien wurden für 20 min bei 121 °C steril autoklaviert. Die Puffer wurden durch einen 0,45 µm Membranfilter filtriert.	
Stammlösung	Zusammensetzung	Stammlösung	Zusammensetzung
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in H ₂ O Arbeitskonzentration: 100 µg/ml	IPTG	1 M in H ₂ O Arbeitskonzentration: 1 mM bis 0,1 mM (variabel)
Kanamycin (Kan)	30 mg/ml in H ₂ O Arbeitskonzentration: 30 µg/ml	Die Stammlösungen wurden durch einen 0,2 µm Sterilfilter filtriert.	

Escherichia coli Stämme, Plasmide und Primer

Die für die Expression und Sekretion von proHlyA und HlyA verwendeten *E. coli* Stämme und Plasmide sind in Tabelle 4 beschrieben.

Tabelle 4: Escherichia coli Stämme und Plasmide

<i>E. coli</i> Stamm	Hersteller	Verwendung
<i>E. coli</i> BL21(DE)	Stratagene California, La Jolla, CA, USA	Expression von proHlyA und acyl-HlyA
<i>E. coli</i> DH5α	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™)	Amplifizierung der Plasmide

Plasmid	Selektion	Promotor	Beschreibung
pSU- <i>hlyA</i> (6960 bp)	Amp	lac	Plasmid für die Expression von proHlyA basierend auf der Sequenz mit dem UniProt Datenbank Eintrag P08715 [225]. Zusammen mit dem Plasmid pSK184- <i>hlyBD</i> wird proHlyA von <i>E. coli</i> sekretiert. Das pSU- <i>hlyA</i> Plasmid stammt von Soloaga <i>et al.</i> [226].
pSU- <i>hlyC</i> -His- <i>hlyA</i> (7572 bp)	Amp	lac	Plasmid für die Expression von proHlyA und HlyC, wobei proHlyA durch HlyC in <i>in vitro</i> acyliert wird. Zusammen mit dem Plasmid pSK184- <i>hlyBD</i> wird acyl-HlyA von <i>E. coli</i> sekretiert. Das pSU- <i>hlyC</i> -His- <i>hlyA</i> Plasmid stammt von Thomas <i>et al.</i> [222].
pSK184- <i>hlyBD</i> (6033 bp)	Kan	lac	Plasmid für die Expression der T1SS Transporterproteine HlyB und HlyD. Das Plasmid stammt von Bakkes <i>et al.</i> [227].

Proteine und deren Eigenschaften

Die Aminosäuresequenz von HlyA und die, mit dem Programm *ExpASy ProtParam* ermittelten, theoretischen Eigenschaften des Proteins (ohne Berücksichtigung einer möglichen Acylierung von K564 und K690) sind in Tabelle 5 zusammengefasst [228]. Die Sequenz basiert auf dem plasmidkodierten Protein aus dem UPEC-Stamm UTI89 mit dem UniProt Datenbank Eintrag P08715 [225].

Tabelle 5: Eigenschaften und Aminosäuresequenz von proHlyA

	proHlyA
Aminosäuren (Anzahl)	1024
Molekulargewicht (Da)	110144,62
Theoretischer, isoelektrischer Punkt (pI)	5,32
Extinktionskoeffizient bei 280 nm in H ₂ O (M ⁻¹ cm ⁻¹)	81600,00

10	20	30	40	50	60
MTTITTAQIKSTLQSAKQSAANKLHSAGQSTKDALKKAAEQTRNAGNRLILLIPKDYKGG					
70	80	90	100	110	120
GSSLNDLVRTADELGIQVYDEKNGTAITKQVFGTAEKLIIGLTERGVTIIFAPQLDKLLQK					
130	140	150	160	170	180
YQKAGNILGGGAENIGDNLGKAGGILSTFQNFLGTALSSMKIDELIKKQKSGGNVSSSEM					
190	200	210	220	230	240
AEASIELINQLVDTVASLNNVNSFSQQLNTLGSVLSNTKHLNGVGNKLQNLPLNDNIGA					
250	260	270	280	290	300
GLDTVSGILSAISASFILSNADADTRTKAAAGVELTTKVLGNVKGKISQYIIAQRAAQGL					

310	320	330	340	350	360
STSA	AAAGLI	ASAVTLAIS	PLSFLSIADK	FKFRANKIEE	YSQRFKKLG
YD	GD	SL	LA	AF	HKE
370	380	390	400	410	420
TGAID	ASLTTI	STVLA	SVSSGIS	AAATTS	LVGAPV
S	AL	VG	AV	TGI	I
SG	ILE	ASK	Q	AM	FEH
430	440	450	460	470	480
VASK	MADVIA	AEWEK	KHGK	NYFEN	GYDAR
H	AA	FL	ED	NFK	IL
SQ	YN	KEY	S	V	ERS
VL	IT	Q	Q	H	
490	500	510	520	530	540
DTLIG	ELAGV	TRNGD	KTLSG	KSYID	YEEG
K	R	L	E	K	P
D	E	F	Q	K	V
F	D	P	L	K	N
I	D	L	S	D	S
K	S	S			
550	560	570	580	590	600
TLLK	FVTP	LLTP	GEEI	RERR	QSGKY
E	Y	I	T	E	L
L	V	K	G	V	D
K	W	T	V	K	G
V	Q	D	K	G	A
V	Y	D	S	N	L
I	Q	H	A		
610	620	630	640	650	660
SVGNN	QYREI	RIESH	LGDG	DDKV	FLSAG
S	A	N	I	Y	A
G	K	G	H	D	V
V	V	Y	D	K	T
D	T	G	Y	L	T
I	D	G	T	K	A
T	E				
670	680	690	700	710	720
AGNY	TVTR	VLGG	DVKVL	QEVV	KEQEV
S	V	G	K	R	T
E	K	T	Q	Y	R
S	Y	E	F	T	H
I	N	G	K	N	L
T	E	T	D	N	L
S	V	E			
730	740	750	760	770	780
ELIG	TTRAD	KFFG	SKFT	DI	FHGAD
G	D	D	L	I	E
G	N	D	G	N	D
R	L	Y	G	D	K
G	N	D	T	L	S
G	G	N	G	D	D
Q	L	Y	G	G	D
790	800	810	820	830	840
GNDK	LIGG	AGNN	YLN	GGD	GDDE
L	Q	V	Q	G	N
S	L	A	K	N	V
L	F	G	G	K	G
N	D	K	L	Y	G
S	E	G	A	D	L
L	L	D	G	G	E
G	D	D			
850	860	870	880	890	900
LLK	GGY	GNDI	YRYL	SGY	GHHI
I	I	D	D	D	G
G	K	E	D	K	L
S	L	A	D	I	D
F	R	D	V	A	F
K	R	E	G	N	D
L	I	M	Y	K	A
E	G	N	V		
910	920	930	940	950	960
LSI	GKNG	ITFR	NWFE	KESG	DISN
H	Q	I	E	Q	I
F	D	K	S	G	R
I	I	T	P	D	S
L	K	K	A	L	E
Y	Q	Q	R	N	N
K	A	S	Y	V	
970	980	990	1000	1010	1020
GND	ALAY	GSQ	DLN	PLINE	I
S	K	I	I	S	A
A	G	S	F	D	V
K	E	E	R	T	A
A	S	L	L	Q	L
S	G	N	A	S	D
F	S	Y	G	R	N
S	I	T	L		
1024					
TT	S	A			

4.1.2 Allgemeine Methoden

SDS-PAGE

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden SDS-haltige Gele mit 10 % Acrylamid hergestellt. Die Zusammensetzung der SDS-Gele sowie die dafür benötigten Puffer sind in Tabelle 6 angegeben. Die Mengenangaben beziehen sich auf die Herstellung von 10 Gelen mit den jeweiligen Abmessungen 10,5 × 7,5 × 0,1 cm.

Tabelle 6: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel der 10%igen SDS-Gele

Komponente	Sammelgel (4,5 %)	Trenngel (10 %)
Trenngelpuffer (ml)	0	18,75
Sammelgelpuffer (ml)	8,75	0
H ₂ O (ml)	21,00	31,25
30 % Acrylamidlösung in H ₂ O (ml)	6,00	25,00
TEMED (µl)	70	70
10 % APS (µl)	210	300
Zusammensetzung Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 6,8 mit 0,4 % SDS (w/v)	
Zusammensetzung Sammelgelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,85 mit 0,4 % SDS (w/v)	

Die weiteren, zur Auftrennung und zur Färbung der Proteine im SDS-Gel verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 7 angegeben. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 20 µl der zu analysierenden Probe mit 5 µl des 5× SDS Ladepuffers versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Davon wurden jeweils 20 µl auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 160 V für 1 h 30 min in 1× Elektrophorese Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie Färbelösung und Entfärbelösung gefärbt und entfärbt. Als Proteinmarker diente der ungefärbte 10–200 kDa Proteinmarker (siehe Tabelle 1).

Tabelle 7: Puffer und Färbelösungen für die SDS-PAGE

Puffer	Zusammensetzung	Färbelösung	Zusammensetzung
5× SDS Ladepuffer	10 ml Sammelgelpuffer 10 ml SDS (16 % in H ₂ O) 20 ml Glycerin (100 %) 10 ml H ₂ O 40 mg Bromphenolblau	Coomassie Färbelösung	50 % EtOH (v/v) 10 % Essigsäure (v/v) 0,1 % CBB-R250 (w/v)
10× Elektrophorese Laufpuffer	1,9 M Glycin 0,25 M Tris 1,0 % SDS (w/v) pH 8,3 (ohne Einstellen)	Coomassie Entfärbelösung	30 % EtOH (v/v) 7 % Essigsäure (v/v)

Western Blot

Zum Nachweis der HlyA Proteinidentität wurde ein Western Blot durchgeführt. Für den Nachweis wurden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch mittels *Semi-dry* Western Blot Apparatur auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde zuvor für 5 min in Methanol aktiviert und anschließend, zusammen mit dem Filterpapier, in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer der Proteine erfolgte für 50 min bei konstant 100 mA. Anschließend erfolgte eine Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen der Membran durch die Inkubation mit Blockierpuffer über Nacht bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit jeweils 50 ml TBS-T Puffer für 10 min wurde die Membran für 1 h mit dem primären anti-HlyA Antikörper für bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit jeweils 50 ml TBS-T Puffer für 10 min gewaschen und für 1 h mit dem sekundären anti-Kaninchen-HRP Antikörper inkubiert. Im abschließenden Waschschritt wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBS-T Puffer und zweimal für 10 min mit TBS Puffer gewaschen. Nach fünfminütiger Inkubation der Membran mit dem Western Blot Chemilumineszenzsubstrat erfolgte die Detektion im Lumi Imager System für 5 min. Die verwendeten Puffer und Antikörper-Verdünnungen sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: Puffer und Antikörper für den Anti-HlyA Western Blot

Puffer	Zusammensetzung	Puffer/Antikörper	Eingesetzte Konzentration
Transferpuffer (1 L)	100 ml Elektrophorese Laufpuffer (10×) aus Tabelle 7 200 ml Methanol 700 ml H ₂ O	Blockierpuffer	5 % Milchpulver (w/v) 0,05 % NaN ₃ (w/v) in TBS-T Puffer
TBS Puffer	20 mM Tris-HCl pH 8,0 250 mM NaCl	Primärer Antikörper	Anti-HlyA Antikörper 1:8000 in TBS-T Puffer
TBS-T Puffer	20 mM Tris-HCl pH 8,0 250 mM NaCl 0,1 % Tween [®] 20 (v/v)	Sekundärer Antikörper	Anti-Kaninchen-HRP Antikörper 1:50 000 in TBS-T Puffer

Bestimmung der Proteinkonzentration

Gereinigtes proHlyA und acyl-HlyA wurden mit 100 kDa MWCO Filterkonzentratoren bis zur gewünschten Endkonzentration einkonzentriert. Das Volumen der Proteinlösung im oberen Teil des Filterröhrchens wird dabei durch Zentrifugation immer weiter reduziert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels NanoDrop über den Absorptionswert bei 280 nm anhand der, in Tabelle 5 angegebenen, Werte für das Molekulargewicht und den Extinktionskoeffizienten von proHlyA. ProHlyA wurde maximal bis zu einer Proteinkonzentration von 8 mg/ml einkonzentriert und acyl-HlyA maximal bis zu einer Konzentration von 4 mg/ml.

Lagerung der Proteine

ProHlyA und acyl-HlyA wurden nach der Reinigung im SEC-Puffer mit einer Konzentration von ≤ 1 mg/ml für maximal 3 bis 4 Tage bei 4°C gelagert. Für die Kristallisationsversuche wurde jeweils das Protein neu exprimiert und gereinigt. Das konzentrierte Protein wurde spätestens am Folgetag für die Kristallisationsexperimente eingesetzt.

4.1.3 Expression und Reinigung von proHlyA

ProHlyA und acyl-HlyA wurden in Anlehnung an das bereits publizierte Protokoll für die *in vitro* Acylierung von Thomas *et al.* exprimiert und gereinigt [222]. Dabei wurden die Proteine in *E. coli* überexprimiert und in den Überstand sekretiert. Anschließend wurde HlyA mittels SEC aus dem Überstand der Zellkultur gereinigt und für die Kristallisationsversuche eingesetzt.

Transformation von *E. coli*

Es wurden 50 μ l chemokompetenter *E. coli* BL21(DE3) Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 μ l pSU-HlyA Plasmid (≈ 100 ng/ μ l) und 2 μ l pSK184-hlyBD Plasmid (≈ 50 ng/ μ l) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 50 sec bei 42°C. Die Zellen wurden dann für 5 min auf Eis inkubiert, mit 650 μ l LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C und einer Schwenkzahl von 650 min^{-1} inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (Kan) und Ampicillin (Amp) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Expression von acyl-HlyA wurden die beiden Plasmide pSU-hlyC-His-hlyA und pSK184-hlyBD verwendet.

Expression und Sekretion von HlyA in *E. coli*

Eine Vorkultur aus 50 ml 2 \times YT Medium, mit 100 μ g/ml Amp und 30 μ g/ml Kan in einem 100 ml Schikanekolben, wurde mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte angeimpft und für 18 bis 20 h bei 37°C und einer Schwenkzahl von 200 min^{-1} inkubiert. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) der Vorkultur bestimmt. Die Hauptkultur, bestehend aus 3 \times 150 ml 2 \times YT Medium mit Amp und Kan in 150 ml Schikanekolben, wurde mit der Vorkultur auf eine OD_{600} von $\approx 0,05$ angeimpft und bei 37°C und einer Schwenkzahl von 180 min^{-1} bis zu einer OD_{600} von $\approx 0,5$ inkubiert. Die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert und erfolgte bei 37°C und einer Schwenkzahl von 180 min^{-1} in Anwesenheit von 5 oder 10 mM CaCl_2 im Expressionsmedium für 1 h und 30 min. Das Expressions- und Reinigungsprotokoll für acyl-HlyA entspricht im Wesentlichen dem hier angegebenen Protokoll für proHlyA. Änderungen betrafen lediglich das Zellkulturvolumen und die Expressionsdauer. Acyl-HlyA wurde aus dem Zellkulturüberstand von insgesamt 6 \times 150 ml 2 \times YT Medium nach 4 h Expression gereinigt.

Vorbereitung des Zellkulturüberstandes für die Reinigung

Nach der Expression wurden die Zellen der Hauptkultur bei 8000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vereint und erneut bei 42 000 g und 4°C für 1 h und 15 min zentrifugiert. Der Überstand nach dem Ultrazentrifugationsschritt wurde durch einen 0,45 µm Membranfilter filtriert und mit 100 kDa MWCO Filterkonzentratoren auf ein finales Volumen von 5 ml konzentriert. Der konzentrierte Zellkulturüberstand mit dem sekretierten Protein wurde für 30 min bei 20 000 g und 4°C zentrifugiert und anschließend direkt für die Reinigung durch die SEC eingesetzt.

Reinigung von HlyA durch die Größenausschlusschromatographie

Die Reinigung von sekretiertem proHlyA und acyl-HlyA aus dem Überstand der Zellkultur erfolgte mittels SEC an einem GE ÄKTA-System. Dabei wurde der konzentrierte Überstand nach Zentrifugation über eine Superdex 200 16/60 Säule aufgetrennt. Der Lauf erfolgte bei 4°C in dem entsprechenden SEC-Puffer bei einer Flussrate von 0,5 ml/min und der Sammlung von 0,5 ml Fraktionen. Nach der Analyse der einzelnen Fraktionen durch die SDS-PAGE wurden ausgewählte Fraktionen vereint und einkonzentriert.

4.1.4 Kristallisation von proHlyA

Die Kristallisation von HlyA erfolgte anhand der Dampfdiffusionsmethode [232]. Dabei wird in einem Tropfen ein definiertes Volumen Proteinlösung mit einem definierten Volumen Kristallisationslösung (= Fällungsmittellösung, Reservoirlösung) vermengt und in einem abgeschlossenen System zusammen mit einem verhältnismäßig großen Volumen Kristallisationslösung in einem Reservoirbecken gelagert [232]. Bei der sogenannten *sitting-drop* Methode befindet sich der Proteintropfen in einer kleinen, erhöht liegenden Vertiefung über dem Reservoirbecken während sich bei der sogenannten *hanging-drop* Methode der Proteintropfen hängend an der Unterseite eines Deckgläschen, mit dem das Reservoirbecken abgeschlossen wird, befindet [232]. Aufgrund der geringeren Fällungsmittelkonzentration im Proteintropfen erfolgt durch Verdampfung und Kondensation (Dampfdiffusion) ein Nettotransfer von Wassermolekülen aus dem Proteintropfen in die Reservoirlösung. Die Protein- und Fällungsmittelkonzentration im Tropfen wird dadurch bis zur Einstellung eines Gleichgewichts erhöht [232]. In der überstättigten Lösung bilden sich in der sogenannten Nukleationsphase unter Umständen Kristallkeime aus. Aus der Bindung von Protein im Kristall resultiert eine weitere Verringerung der Proteinkonzentration (die Präzipitanzkonzentration bleibt konstant) und es kommt in der sogenannten Wachstumsphase zur Größenzunahme von bereits vorhandenen Kristallen [232]. Konkurrenzreaktionen zur Kristallisation sind die Denaturierung des Proteins und die Bildung von amorphem Präzipitat. Wichtige Kristallisationsparameter sind die Reinheit und Konzentration der Proteinlösung, die Zusammensetzung und Konzentration der Kri-

stallisationslösung, das ursprüngliche Volumenverhältnis von Protein- zu Kristallisationslösung im Tropfen sowie pH-Wert und Temperatur [232]. Als Fällungsmittel und Stabilisatoren in den Kristallisationslösungen werden Salze wie zum Beispiel Ammoniumsulfat (AS), hochmolekulare Verbindungen wie zum Beispiel Polyethylenglycol (PEG) und 2-Methyl-2,4-Pentandiol (MPD) und organische Lösungsmittel eingesetzt [233]. Ebenso sind unter Umständen bestimmte Additive zur Stabilisierung und Gewährung einer konformationellen Homogenität des Proteins zur Kristallisation nötig [232].

Initiale Kristallisationsexperimente

In den ersten Kristallisationsversuchen mit proHlyA und acyl-HlyA wurden kommerziell erhältliche Kristallisationsscreens eingesetzt (siehe Tabelle 9). Diese enthalten jeweils 96 verschiedene Kristallisationslösungen mit unterschiedlichen Fällungsmitteln, Salzen, Alkoholen und Zusätzen in unterschiedlichen Konzentrationen.

Tabelle 9: Initiale Kristallisationsscreens

Nr.	Screen (Anzahl der Bedingungen)	Hersteller	Zusammensetzung
1	Nextal Classics I (96)	Qiagen	<i>Sparse-matrix</i> Screen basierend auf der Arbeit von Jancarik und Kim (1991) [234].
2	Nextal Classics II (96)	Qiagen	Klassische Bedingungen mit neuen Reagenzsystemen wie neutralisierte, organische Säuren und hohe Salzkonzentrationen in Kombination mit niedrigen Polymerkonzentrationen, Ergänzung zum Classics I Screen
3	Nextal ComPAS (96)	Qiagen	Erfolgreiche Bedingungen aus der BMCD (<i>Biological Macromolecule Crystallization Database</i>), basierend auf der Arbeit von Gilliland und Tung (1994) [235], beinhaltet Polymere, Alkohole und Salze als Fällungsmittel
4	Nextal Cryos (96)	Qiagen	Hoch konzentrierte Chemikalienlösungen zur Evaluierung der Wirkung der Komponenten auf die Proteinlöslichkeit, basierend auf der Arbeit von Jancarik und Kim (1991) [234].
5	Nextal JCSG Core I (96)	Qiagen	Insgesamt 384 Bedingungen in den vier Screens Core I–IV als Ergebnis der Analyse von 500 000 Hochdurchsatz-Kristallisationsansätzen am JCSG (<u>J</u> oint <u>C</u> enter for <u>S</u> tructural <u>G</u> enomics) [236].
6	Nextal JCSG Core II (96)	Qiagen	Siehe Screen Nummer 5
7	Nextal JCSG Core III (96)	Qiagen	Siehe Screen Nummer 5

8	Nextal JCSG Core IV (96)	Qiagen	Siehe Screen Nummer 5
9	Nextal JCSG+ (96)	Qiagen	Optimierter <i>sparse-matrix</i> Screen mit klassischen PEG- und Salzbedingungen, neutralisierten, organischen Säuren (Formiat, Acetat, Citrat, Succinat, Malat, Malonat) sowie organischen und polyalkoholischen Bedingungen im pH-Wertbereich von 4,0 bis 10,0
10	Nextal Mb Class I (96)	Qiagen	Zusammensetzung basierend auf den erfolgreichsten Bedingungen aus der Literatur für die Kristallisation von Membranproteinen
11	Nextal Mb Class II (96)	Qiagen	Siehe Screen Nummer 10
12	Nextal MPD (96)	Qiagen	Bedingungen mit MPD als Fällungsmittel in Kombination mit verschiedenen Salzen und pH-Werten. MPD verringert die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels und fördert elektrostatische Protein-Protein-Interaktionen [233]
13	Nextal PACT (96)	Qiagen	Zusammensetzung und Bedingungen basierend auf der Arbeit von Newman <i>et al.</i> (2005) [237].
14	Nextal Protein Complex (96)	Qiagen	Screen für Proteinkomplexe, basierend auf der Arbeit von Radaev und Sun (2002) [238], mit Bedingungen aus der BMCD [235] und anderen Proteindatenbanken
15	Nextal PEGs I (96)	Qiagen	Bedingungen mit PEG-Polymeren unterschiedlicher Molekulargewichte als Fällungsmittel, PEG fördert Protein-Protein-Interaktionen durch sogenanntes <i>molecular crowding</i> [233] [239].
16	Nextal PEGs II (96)	Qiagen	Siehe Screen Nummer 15
17	MD MIDAS (96)	Molecular Dimensions	Bedingungen für Proteine, Protein-Protein-Komplexe und Protein-Nukleinsäurekomplexe mit pH-Werten und Salzkonzentrationen im physiologischen Bereich und alternativen Polymeren als Fällungsmittel zur Ergänzung von PEG- und Salzscreens, basierend auf der Arbeit von Grimm <i>et al.</i> (2010) [240].
18	MD MemGold (96)	Molecular Dimensions	Bedingungen aus der PDB, die 130 verschiedene, alpha-helikale Membranproteinstrukturen abdecken, basierend auf der Arbeit von Newstead <i>et al.</i> (2008) [241].
19	MD MemGold2 (96)	Molecular Dimensions	Bedingungen für alpha-helikale, prokaryontische und eukaryontische Membranproteine, basierend auf der Arbeit von Newstead <i>et al.</i> (2008) [241] und Parker <i>et al.</i> (2012) [242].

20	MD MemPlus (48)	Molecular Dimensions	Ergänzung zu den MemGold Screens mit Bedingungen aus der PDB für beta-Faltblatt Membranproteine, Porine und aktive, äußere Membrantransporter
21	MD MemSys (48)	Molecular Dimensions	Ermöglicht ein Screening von pH-Wertbereichen, Fällungsmitteln und Salzen zusammen mit detergenshaltigen Proteintropfen

In den initialen Kristallisationsversuchen wurden 0,1 µl Proteinlösung mit einer Proteinkonzentration von 4 bis 6,5 mg/ml in SEC-Puffer mit 5 mM Calcium mit 0,1 µl Kristallisationslösung gemischt und in der *sitting-drop* Methode mit 70 µl Kristallisationslösung im Reservoir bei 12°C gelagert. Kurz vor dem Ansetzen der Kristallisationsplatten wurde das Protein für 30 min bei 20 000 g und 4°C zentrifugiert. Die Protein- und Kristallisationslösungen in den 96-well Platten wurden mit dem NT8 Pipettierroboter pipettiert und im RockImager 1000 System bei 12°C gelagert. Die Auswertung der Kristallisationsversuche erfolgte nach 12 h, 24 h, 2 Tagen, 3 Tagen 5 Tagen, 8 Tagen, 13 Tagen und 21 Tagen durch die automatische Aufnahme von vergrößerten Fotos der Proteintropfen. Für die Kristallisationsversuche mit proHlyA wurden die Kristallisationsscreens Nummer 1 bis 21 eingesetzt, für die Kristallisationsversuche mit acyl-HlyA wurden die Screens Nummer 3, 5 bis 8, 15, 16, 18 und 19 eingesetzt.

Optimierung der Kristallisationsbedingungen

Erfolgversprechende Kristallisationsbedingungen aus den initialen Kristallisationsversuchen wurden in einem größeren Volumen in 24-well Platten wiederholt und optimiert. Beispielhaft werden hier die Optimierungen der proHlyA Kristallisationsbedingung E8 aus dem Nextal CompAS Screen (Nummer 3) und die proHlyA Kristallisationsbedingung E2 aus dem MD MIDAS Screen (Nummer 17) beschrieben. Für die Optimierung der ersten Bedingung wurde gereinigtes proHlyA mit einer Konzentration von 6 mg/ml in SEC-Puffer mit 5 mM Calcium eingesetzt, für die Optimierung der zweiten Bedingung wurde proHlyA mit einer Konzentration von 6,5 mg/ml in SEC-Puffer mit 10 mM Calcium eingesetzt. Ausgangspunkt waren die beiden initialen Kristallisationsbedingungen mit entweder 0,2 M MgCl₂, 15 % 2-Propanol (v/v) und 0,1 M Hepes pH 7,5 (Bedingung E8 aus dem CompAS Screen) oder 35 % Pentaerythritolpropoxylat (5/4 PO OH) (v/v) und 0,2 M Kaliumacetat (Bedingung E2 aus dem MIDAS Screen). Für die Optimierung der ersten Bedingung wurden die MgCl₂-Konzentration in 0,05 M-Schritten zwischen 0,1 M und 0,3 M sowie die 2-Propanolkonzentration in 5%-Schritten zwischen 5 % und 25 % in 24-well *sitting-drop* Platten variiert. MgCl₂ wurde in einem weiteren Kristallisationsversuch jeweils durch CaCl₂ ersetzt. Für die Optimierung der zweiten Bedingung wurden in 24-well *sitting-drop* und *hanging-drop* Platten die Pentaerythri-

tolpropoxylatkonzentration in 3 %-Schritten zwischen 26 % und 47 % sowie die Kaliumacetatkonzentration in 0,05 M-Schritten zwischen 0,15 M und 0,3 M variiert. In den Proteintropfen wurden entweder 1 µl Proteinlösung mit 1 µl Kristallisationslösung, 1 µl Proteinlösung mit 2 µl Kristallisationslösung oder 2 µl Proteinlösung mit 1 µl Kristallisationslösung gemischt und mit 500 µl Kristallisationslösung im Reservoirbecken bei 4°C, 12°C und 20°C gelagert. Die visuelle Inspektion der Kristallisationsansätze erfolgte am nächsten Tag, nach 2 bis 3 Tagen, nach 1 Woche, nach 2 Wochen und 4 nach Wochen unter einer Stereolupe.

Weitere Optimierung mit Additiven und Detergenzien

Zur weiteren Optimierung der Bedingung E8 aus dem Nextal ComPAS Screen (Nummer 3) wurde die Kristallisationslösung aus 0,2 M MgCl₂, 15 % 2-Propanol (v/v) und 0,1 M HEPES pH 7,5 verwendet. Es wurden Proteintropfen mit einer proHlyA Konzentration von 6 mg/ml in SEC-Puffer mit 5 mM Calcium, bestehend aus 0,4 µl Proteinlösung, 0,4 µl Kristallisationslösung und 90 nl Additivlösung aus dem Additiv Screen HTTM, mit 80 µl Kristallisationslösung im Reservoir in einer 96-well *sitting-drop* Kristallisationsplatte mit dem NT8 Pipettierroboter angesetzt und anschließend im RockImager 1000 System bei 12°C gelagert. Die Auswertung der Kristallisationsversuche erfolgte nach 12 h, 24 h, 2 Tagen, 3 Tagen, 5 Tagen, 8 Tagen, 13 Tagen und 21 Tagen durch die automatische Aufnahme von hochaufgelösten Fotos der Proteintropfen. Eine weitere 96-well *sitting-drop* Platte wurde mit 90 nl Detergenzlösung aus dem Detergent Screen HTTM anstelle der Additivlösung pipettiert. Die verwendeten Screens sind in Tabelle 10 angegeben. Zur weiteren Optimierung der Bedingung E2 aus dem MD MIDAS Screen (Nummer 17) wurde, vor dem Ansetzen der 24-well *hanging-drop* Platten, 0,001 % bis 0,1 % Tween20 (v/v) zur Proteinlösung gegeben und die Proteinkonzentration auf 8 mg/ml erhöht.

Tabelle 10: Additiv Screen und Detergent Screen für die Optimierung der proHlyA Kristalle

Nr.	Screen (Anzahl der Bedingungen)	Hersteller	Zusammensetzung
1	Additive Screen HT TM HR2-138 (96), zur Optimierung der Kristallgröße und Kristallqualität	Hampton Research Aliso Viejo, CA, USA	Enthält Salze, Aminosäuren, Dissoziationsmittel, Linker, Polyamine, Osmolyte, Chaotrope, Kofaktoren, Reduktionsmittel, Chelatoren, Polymere, Kohlenhydrate, amphiphile Detergenzien, nicht-flüchtige und flüchtige, organische Substanzen
2	Detergent Screen HT TM HR2-406 (96), zur Optimierung der Proteinlöslichkeit und Proteinstabilität	Hampton Research Aliso Viejo, CA, USA	Enthält ionische, nicht-ionische und zwitterionische Detergenzien, nicht-detergensartige Sulfobetaine und synthetische Lipide zur Unterbindung einer unspezifischen Aggregation des Proteins durch hydrophobe Interaktionen

Eigenschaften von Proteinkristallen

Proteinkristalle zeichnen sich durch ebene Oberflächen und scharfe Kanten aus, die die periodische Anordnung der Moleküle im Kristall widerspiegeln. Eigenschaften von Proteinkristallen sind die Doppelbrechung von polarisiertem Licht, eine geringe Härte sowie eine große Empfindlichkeit gegenüber Temperaturschwankungen und pH-Wertänderungen [232]. Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung von Protein- und Salzkristallen ist die Anregung der Kristalle mit UV-Licht oder die Anfärbung der Kristalle mit dem Methylenblau-Farbstoff IZIT. Bedingungen mit Kristallen oder kristallinen Strukturen aus den initialen Kristallisationsversuchen, die ein UV-Signal erzeugten, wurden weiter optimiert. Eine eindeutige Aussage zur Unterscheidung von Protein- und Salzkristallen liefert nur das Diffraktionsbild.

Bewertung von Proteinpräzipitaten

Häufig befinden sich in den Proteintropfen nach einigen Tagen verschiedene Formen von Präzipitaten. In manchen Fällen kann aus dem Präzipitat, über die Zeit oder durch eine leichte Variation der Kristallisationsbedingung, Kristallwachstum entstehen oder angeregt werden. Ein strukturiertes Präzipitat mit einer Doppelbrechung von polarisiertem Licht, das sich teilweise wieder auflösen lässt, ist positiv einzustufen, während ein starkes, nicht auflösbares und häufig dunkel gefärbtes Präzipitat als negativ einzustufen ist.

Klassifizierung von Kristallisationsversuchen

Eine Bewertung der Proteintropfen aus den Kristallisationsversuchen kann entsprechend einem 10-Punkte Schema vorgenommen werden (Abbildung 1) [243]. Proteintropfen, die mit ansteigender Punktzahl bewertet werden, sind zunehmend positiv einzustufen. Die visuelle Inspektion der Tropfen erfolgte unter einer Stereolupe.

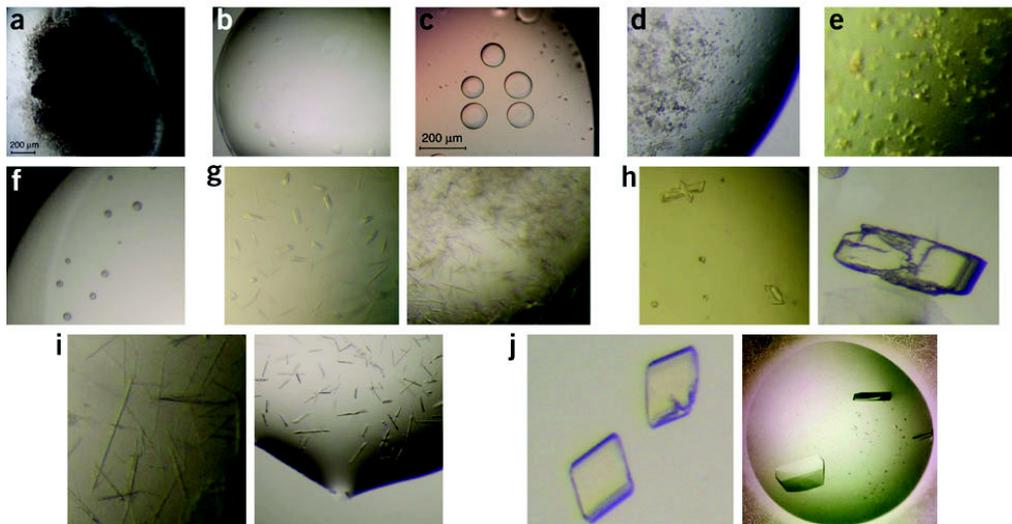


Abbildung 1: Schema zur Klassifizierung von Kristallisationsversuchen. (a) Starkes, braunes oder flockiges Präzipitat (1 Punkt), (b) klarer Tropfen (2 Punkte), (c) Phasentrennung oder leichtes Präzipitat (3 Punkte), (d) granuliertes Präzipitat (4 Punkte), (e) mikrokristallines Präzipitat (5 Punkte), (f) Sphärolithe (6 Punkte), (g) Mikrokristalle (7 Punkte), (h) viele, verwachsene Kristalle (8 Punkte), (i) kleine, nadelförmige oder plättchenartige Kristalle (9 Punkte), (j) einzelne, gut geformte Kristalle (10 Punkte). Die Abbildung ist entnommen aus [243].

4.1.5 Röntgenstrukturanalyse

Bei der Röntgenstrukturanalyse wird die Beugung von Röntgenstrahlen durch einen Proteinkristall untersucht. Die Art und Position der Atome im Proteinkristall bestimmen, wie die Röntgenstrahlen im Molekül gebeugt werden und ob und wie die gebeugten Wellen konstruktiv interferieren [232]. So entsteht ein individuelles Beugungsmuster am Detektor, aus dem, durch die Aufnahme einer Vielzahl von Bildern aus unterschiedlichen Orientierungen des Kristalls, im sogenannten Drehkristallverfahren dreidimensionale Elektronendichtekarten berechnet werden können [244]. Die periodische Anordnung der Proteinmoleküle im Kristall wird zur Verstärkung der sehr schwachen Diffraktion von einzelnen Atomen benötigt [232].

Vorbereitung der Kristalle für die Röntgendiffraktionsanalyse

Zur Aufnahme von Kryo-Diffraktionsbildern bei 100 K wurden die Kristalle aus den Tropfen der *24-well* Kristallisationsplatten mit Hilfe von Polymerschlaufen "gefischt" und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zu den Proteintropfen aus der Bedingung E8 aus dem ComPAS Screen wurden zuvor wenige Mikroliter Mineralöl pipettiert, welches als Gefrierschutz fungiert. Für die Aufnahmen der Kryo-Diffraktionsbilder der Kristalle aus der Bedingung E2 aus dem MIDAS Screen mit Pentaerythritolpropoxylat und Kaliumacetat wurde kein zusätzlicher Gefrierschutz verwendet.

Röntgenstrahl-Diffraktion der Kristalle

Die Untersuchung der Kristalle mittels Röntgenstrahlen erfolgte überwiegend an der Messstation der Strahllinie ID23-1 am ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) bei 100 K [245]. Nach der Fixierung der Polymerschleife am Goniometerkopf und Justierung des Kristalls im Strahlengang wurde der Kristall mit Röntgenstrahlung beschossen und das Beugungsmuster durch einen CCD-Detektor aufgezeichnet. Die Wellenlänge der ID23-1 Strahllinie beträgt fix 0,873 Å und besitzt eine Stärke von 14,2 keV auf einer Fläche von etwa $7,5 \times 5,0 \mu\text{m}^2$ [245]. Einzelne Kristalle wurden unter Verwendung von Standardeinstellungen auch an den ESRF Strahllinien ID23-2 und ID29 getestet [246] [247]. Die Messungen erfolgten im Zeitraum von Juni 2014 bis April 2016 mit der zum Zeitpunkt der Messung aktuellen MX Software vor Ort [248]. Von jedem Kristall wurden initial zwei Diffraktionsbilder in 0° und 90° Orientierung aufgenommen. Aufgrund der unzureichenden Diffraktion der Kristalle wurden keine vollständigen Datensätze mit Diffraktionsaufnahmen aus weiteren Orientierungen aufgenommen.

Beurteilung der Diffraktionsbilder

Die Ablenkung der Röntgenstrahlung durch den Proteinkristall erfolgt in diskrete Richtungen und erzeugt ein regelmäßiges Beugungsbild [232]. Die Diffraktionsreflexe liegen auf definierten, konzentrischen Reihen mit einem fixen Abstand zueinander. Die Anordnung und die Regelmäßigkeit der Diffraktionsreflexe im Diffraktionsbild spiegeln die innere Symmetrie des Kristallaufbaues wieder (Dimension und Translationssymmetrie der Einheitszelle) [232]. Punktreihen im Ursprung des Beugungsbildes (reziproker Raum) entsprechen langen Abständen im Kristall (realer Raum), weshalb robuste Informationen über den Kristallaufbau im inneren Bereich und Detailinformationen über den Kristallaufbau im äußeren Bereich des Diffraktionsbildes zu finden sind [232]. Die Intensität der Diffraktionsreflexe hingegen kann stark variieren und enthält die Informationen zum Inhalt der Einheitszelle und somit zur Struktur des Moleküls [232]. Salzkristalle unterscheiden sich von Proteinkristallen durch ihre vergleichsweise kleinen Elementarzellen und sind im Beugungsbild eindeutig abgrenzbar [232].

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Expression und Reinigung von proHlyA

Durch die Reinigung des sekretierten Proteins aus dem Überstand der *E. coli* Kultur mittels SEC wurde das Expressionsmedium entfernt und das Protein in einen definierten Puffer überführt (Abbildung 2 A). Bereits nach der Sekretion war in dem, dunkelbraun gefärbten, Zellkulturüberstand nur eine dominante Proteinbande im SDS-Gel zwischen der 100 und 120 kDa Markerbande zu erkennen (nicht abgebildet). Nach der Reinigung lag das Protein in einem Puffer mit 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 und 5 oder 10 mM CaCl₂ vor.

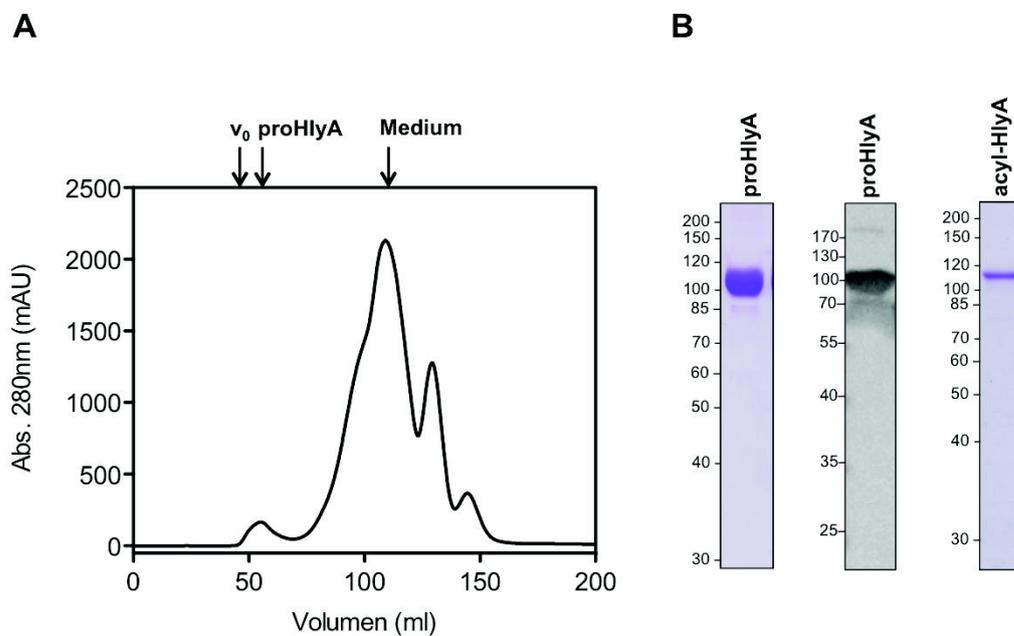


Abbildung 2: Reinigung von proHlyA für die Kristallisation. A) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie zur Reinigung von sekretiertem proHlyA aus dem Zellkulturüberstand, Säule: Superdex200TM 16/60, Flussrate: 0,5 ml/min, v_0 = Ausschussvolumen B) SDS-Gel mit gereinigtem proHlyA, anti-HlyA AK Western Blot und SDS-Gel mit gereinigtem acyl-HlyA.

Die zwischen 50 und 60 ml aufgefangenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und vereint (Abbildung 2 B). In den danach aufgefangenen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE kein Protein nachgewiesen. Die Gelbande zwischen der 100 und 120 kDa Markerbande wurde durch den anti-HlyA Antikörper im Western Blot nachgewiesen und stimmt mit dem Molekulargewicht von HlyA überein (110 kDa). Eine zweite, sehr schwache Bande oberhalb der 170 kDa Markerbande im Western Blot stimmt mit dem Molekulargewicht eines HlyA Dimers überein (220 kDa). Im SDS-Gel der vereinten Fraktionen zwischen 50 und 60 ml nach der Reinigung von acyl-HlyA ist ebenfalls nur eine einzige

Bande zwischen der 100 und 120 kDa Markerbande zu erkennen. Die Ausbeute an gereinigtem proHlyA aus dem Zellkulturüberstand betrug bis zu 30 mg aus 1 L Flüssigkultur. Die Ausbeute an acyl-HlyA betrug mit demselben Expressions- und Reinigungsprotokoll bis zu 1,5 mg aus 1 L Flüssigkultur.

4.2.2 Kristallisation von proHlyA

Die initialen Kristallisationsversuche mit proHlyA ergaben mehrere Bedingungen mit Kristallen oder kristallartigen Strukturen in den Tropfen (Tabelle 11). Diese können im Wesentlichen in zwei Gruppen eingeteilt werden: Einerseits befinden sich darunter Kristallisationslösungen mit Alkoholen als Fällungsmittel und andererseits befinden sich darunter Kristallisationslösungen mit Polymeren als Fällungsmittel. In der Gruppe der Alkohole sind zwei sehr ähnliche Lösungen mit 2-Propanol und $MgCl_2$ sowie zwei Lösungen mit Ethanol mit beziehungsweise ohne $MgCl_2$, und außerdem zwei Lösungen mit tert-Butanol mit beziehungsweise ohne $CaCl_2$. In der Kristallisationslösung mit tert-Butanol ist als Puffersubstanz Tris mit einem pH-Wert von 8,5 enthalten, während bei den meisten anderen Lösungen mit Alkoholen als Puffersubstanz HEPES mit einem pH-Wert von 7,5 enthalten ist. In der Gruppe der Polymere befindet sich eine Kristallisationslösung mit PEG 3350 und eine weitere mit Jeffamine M-600. In beiden Lösungen ist als Puffersubstanz HEPES mit einem pH-Wert von 7,0 enthalten. Zwei weitere Kristallisationslösungen enthalten Pentaerythritolpropoxylat (5/4 PO/OH) mit beziehungsweise ohne Kaliumacetat. In diesen Tropfen war jeweils ein einzelner, definierter Kristall zu finden. Alle in Tabelle 11 dargestellten Kristalle und kristallinen Strukturen aus den initialen Kristallisationsversuchen zeigten ein deutliches Signal unter dem UV-Licht. Eine Beurteilung und Klassifizierung der proHlyA Tropfen aus den initialen Kristallisationsversuchen kann nach einem 10-Punkte Schema vorgenommen werden [243]. In Tabelle 12 werden die Ergebnisse der in Tabelle 11 abgebildeten Tropfen beschrieben.

Tabelle 11: ProHlyA Tropfen aus den initialen Kristallisationsversuchen

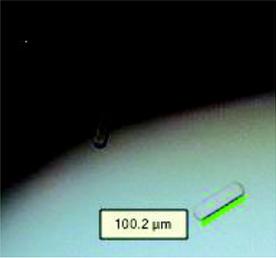
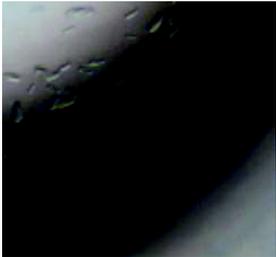
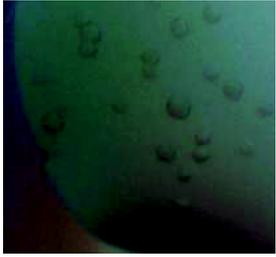
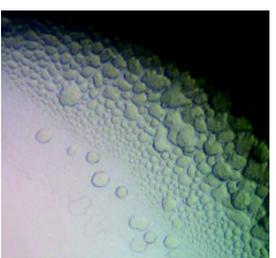
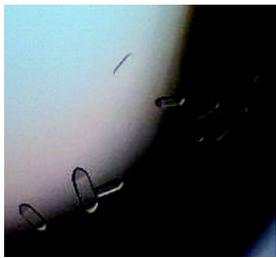
	<p>ComPAS E8*</p> <p>0,2 M MgCl₂ 0,1 M HEPES pH 7,5 15 % 2-Propanol (w/v)</p>		<p>Classics I B11</p> <p>0,1 M Tris pH 8,5 25 % tert-Butanol (v/v)</p>
	<p>ComPAS E12*</p> <p>0,1 M MgCl₂ 0,1 M HEPES pH 7,5 25 % 2-Propanol (w/v)</p>		<p>Classics II C12</p> <p>0,191 M NaCitrat pH 7 0,1 M HEPES pH 7,0 2 % PEG 3350 (w/v)</p>
	<p>ComPAS F4</p> <p>0,1 M CaCl₂ 0,1 M Tris pH 8,5 25 % tert-Butanol (w/v)</p>		<p>Core IV F5</p> <p>1 M HEPES pH 7,0 30 % Jeffamine M-600 (v/v)</p>
	<p>Core II B9</p> <p>0,2 M MgCl₂ 0,1 M HEPES pH 7,5 15 % Ethanol (v/v)</p>		<p>Midas C7</p> <p>0,1 M Tris-HCl pH 8,0 50 % Pentaerythritol-propoxylat (5/4 PO/OH) (v/v)</p>
	<p>Classics I A12</p> <p>1,5 M NaCl 10 % Ethanol (v/v)</p>		<p>Midas E2*</p> <p>0,2 M Kaliumacetat 35 % Pentaerythritol-propoxylat (5/4 PO/OH) (v/v)</p>

Tabelle 12: Auswertung der initialen Kristallisationsversuche mit proHlyA

Bedingung	Punkte	Kristallform	Kristallgröße	Wachstum
ComPAS E8	10 Punkte	Einzelne, dünne, rechteckige Kristalle mit leicht abgerundeten Ecken	Länge bis zu 100 µm	nach 21 Tagen
ComPAS E12	7 Punkte	Mikrokristalle aus anfangs leichtem Präzipitat	Länge 40 µm	nach 13 Tagen
ComPAS F4	7 Punkte	Mikrokristalle	Länge 40 µm	nach 5 Tagen
Core II B9	10 Punkte	Einzelne, dünne, rechteckige Kristalle mit spitz zulauenden Ecken	Länge bis zu 100 µm	nach > 21 Tagen
Classics I A12	8 Punkte	Viele, kleine, längliche Kristalle	Länge bis zu 50 µm	nach 8 Tagen
Classics I B11	10 Punkte	Einzelner, länglicher Kristall mit leicht abgerundeten Ecken	Länge 130 µm	nach 21 Tagen
Classics II C12	6 Punkte	Sphärulithe, rundliche Strukturen	Durchmesser 30 µm	nach > 21 Tagen
Core IV F5	3 Punkte	Phasentrennung mit runden Strukturen	Durchmesser 30 µm	nach 2 Tagen
MIDAS C7	10 Punkte	Phasentrennung mit einem einzelnen, pyramidenförmigen Kristall	Länge 200 µm	nach 21 Tagen
MIDAS E2	10 Punkte	Leichtes Präzipitat mit einem einzelnen, pyramidenförmigen Kristall	Länge 200 µm	nach 13 Tagen

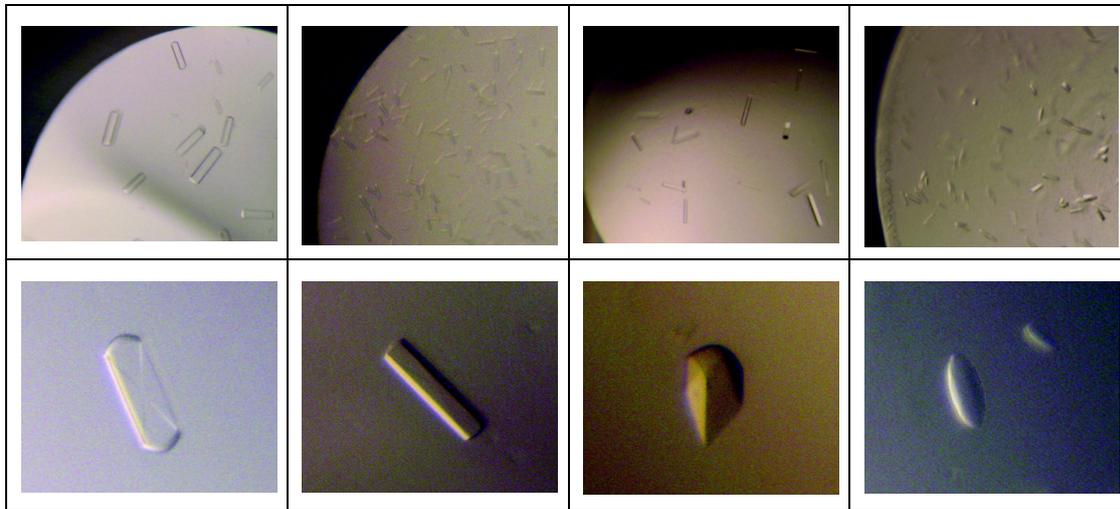
Die Kristallisationsversuche mit acyl-HlyA ergaben keine kristallartigen Strukturen in den Tropfen. Das gereinigte Protein war bis zu einer maximalen Konzentration von 4 mg/ml konzentrierbar, wobei ein Großteil des Proteins bereits während des Konzentrierens ausfiel. In einem überwiegenden Teil der Tropfen war nach einem Tag mittelstarkes bis starkes Präzipitat zu beobachten.

Optimierung von zwei Kristallisationsbedingungen

Beispielhaft werden hier die Ergebnisse der Optimierung der Kristallisationsbedingung E8 aus dem ComPAS Screen, mit 0,2 M MgCl₂, 15 % 2-Propanol (v/v) und 0,1 M Hepes pH 7,5, sowie der Optimierung der Kristallisationsbedingung E2 aus dem MIDAS Screen mit 35 % Pentaerythritolpropoxylat 5/4 PO/OH (v/v) und 0,2 M Kaliumacetat, beschrie-

ben. In Tabelle 13 sind ausgewählte Tropfen (oben) und Kristalle (unten) aus verschiedenen Optimierungsansätzen der ersten Kristallisationsbedingung dargestellt.

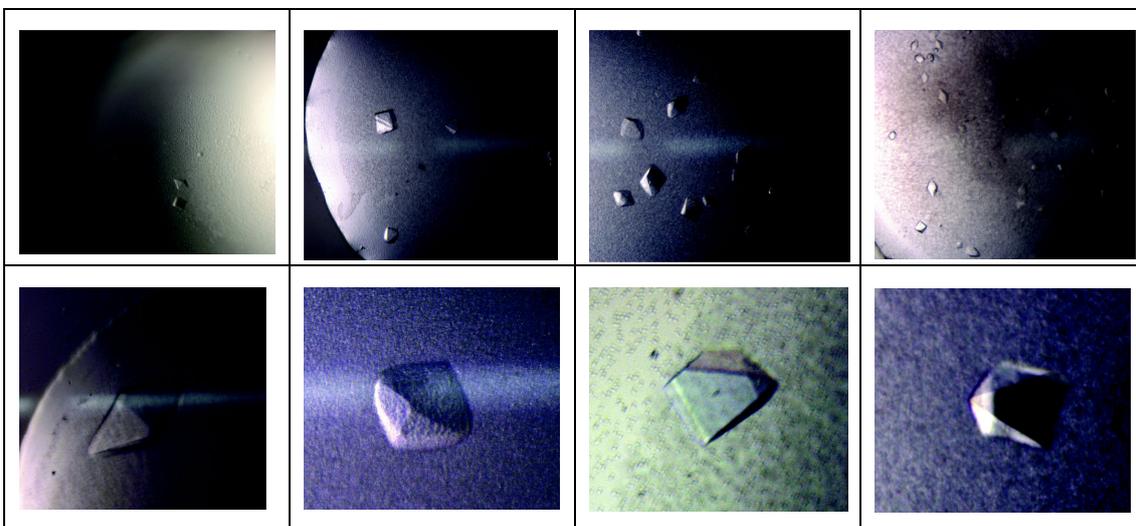
Tabelle 13: Optimierung der proHlyA Kristallisationsbedingung mit 2-Propanol und MgCl₂



Die Kristallisationslösung, bestehend aus 0,2 M MgCl₂, 15 % 2-Propanol (v/v) und 0,1 M HEPES pH 7,5 im ersten Tropfen von links entspricht der zu optimierenden Ausgangsbedingung. Die Proteinkonzentration betrug 5,6 mg/ml in einem Puffer aus 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 und 5 mM CaCl₂. Die 24-well *sitting-drop* Platten wurden mit 1 µl Proteidlösung und 1 µl Kristallisationslösung sowie 500 µl Kristallisationslösung im Reservoir bei 12°C gelagert. Ein Kristallwachstum war zwischen Tag 18 und Tag 21 zu beobachten und führte zu mehreren, einzelnen Kristallen mit einer maximalen Länge von 300 µm. Die Erhöhung der 2-Propanolkonzentration auf 20 % bei ansonsten identischen Bedingungen im zweiten Tropfen von links führte zu vielen, deutlich kleineren Kristallen. Die Erhöhung der MgCl₂-Konzentration auf 0,3 M bei ansonsten identischen Bedingungen im dritten Tropfen von links führte zu schmalen, länglichen Kristallen. Bei der Lagerung der Kristallisationsplatte mit 0,3 M MgCl₂ und 20 % 2-Propanol bei 4°C waren viele kleine und weniger definierte, kristallartige Strukturen zu beobachten (vierter Tropfen von links). Ausgewählte Kristalle in der unteren Reihe von Tabelle 13 stammen aus unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen und variieren in ihrer Länge zwischen 100 und 300 µm. Der erste Kristall von links ist flach und weist abgerundete Ecken sowie die Zeichnung eines Kreuzes auf seiner Oberfläche auf. Der Kristall stammt von der Bedingung mit 0,2 M MgCl₂, 10 % 2-Propanol und 0,1 M HEPES pH 7,5 bei 12 °C. Der zweite Kristall von links ist im Vergleich dazu schmaler, zeigt eine schwächere Abrundung an den Ecken und weist keine Zeichnung auf der Oberfläche auf. Der Kristall stammt aus der Bedingung mit 0,23 M MgCl₂, 15 % 2-Propanol und 0,1 M HEPES pH 7,5 bei 12°C. Der dritte Kristall von links besteht aus einem runden und einem spitz zulaufenden Ende.

Dieser Kristall entstand aus der Ausgangsbedingung durch den Zusatz von Spermine tetra HCl aus dem Additiv Screen HT™ bei 12°C. Mit dem Zusatz von anderen Additiven und Detergenzien unter Verwendung der Ausgangsbedingung wurden einzelne, ähnliche Kristalle sowie andere, hier dargestellte Kristallformen beobachtet. Nahezu ovale Kristalle mit zwei spitz zulaufenden Enden befanden sich in einer Kristallisationsplatte mit der Ausgangsbedingung bei 4°C (vierter Kristall von links). In Tabelle 14 sind ausgewählte Tropfen (oben) und Kristallformen (unten) aus der Optimierung der zweiten Kristallisationsbedingung mit 35 % Pentaerythritolpropoxylat 5/4 (v/v) und 0,2 M Kaliumacetat dargestellt.

Tabelle 14: Optimierung der proHlyA Kristallisationsbedingung mit Pentaerythritolpropoxylat 5/4



Der erste Tropfen von links zeigt die Ausgangsbedingung mit 1 µl Kristallisationslösung, bestehend aus 0,2 M Kaliumacetat und 35 % Pentaerythritolpropoxylat, 1 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 6 mg/ml in einem Puffer aus 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 und 10 mM CaCl₂, sowie 500 µl Kristallisationslösung im Reservoir einer 24-well *sitting-drop* Platte bei 12°C. Leichtes Präzipitat und zwei kleine Kristalle waren nach 15 Tagen zu beobachten. Der zweite Tropfen von links zeigt die Kristallisationslösung der Ausgangsbedingung bei 20°C in einer 24-well *hanging-drop* Platte mit einer Proteinkonzentration von 6,5 mg/ml. Im Vergleich zu davor waren im Tropfen stärkeres Präzipitat und mehrere, größere Kristallen zu beobachten. Im dritten Tropfen von links nahm die Anzahl an Kristallen weiter zu. Hier wurde die Konzentration von Pentaerythritolpropoxylat auf 38 %, bei ansonsten identischen Bedingungen entsprechend dem zweiten Tropfen von links, erhöht. Im vierten Tropfen wurde die Konzentration von Kaliumacetat auf 0,3 M erhöht und die Proteinlösung mit 0,1 % Tween20 versetzt. Das Präzipitat im Tropfen nahm dadurch weiter zu und die Kristallgröße zugunsten der Anzahl der Kristalle ab. Ausgewählte Kristalle aus unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen sind in der

unteren Reihe von Tabelle 14 dargestellt. Die Größe der Kristalle reichte von 200 bis 400 μm . Der erste Kristall von links zeigt die pyramidenartige Form des ersten Kristalls des initialen Kristallisationsversuches und hat eine Länge von 200 μm . Der Kristall stammt aus einer *24-well hanging-drop* Platte bei 20°C mit 0,2 M Kaliumacetat und 38 % Pentaerythritolpropoxylat. Die Proteinkonzentration betrug 6,5 mg/ml. Der zweite Kristall von links zeigt eine ähnliche Form mit stärker abgerundeten Ecken. Der Kristall entstand aus einer Kristallisationslösung mit 41 % Pentaerythritolpropoxylat und 0,2 M Kaliumacetat. Der dritte Kristall von links weist scharfe Kanten und eine von den vorherigen Kristallen leicht abweichende Form auf. In diesem Kristallisationsansatz wurde die Proteinkonzentration auf 8 mg/ml erhöht und die Proteinlösung mit 0,001 % Tween20 versetzt. Der Kristall war nach 11 Tagen bei 20°C mit einer Kristallisationslösung aus 33 % Pentaerythritolpropoxylat und 0,2 M Kaliumacetat gewachsen. Der vierte Kristall von links stammt aus derselben Kristallisationsplatte. Einzige Änderung war die Zusammensetzung der Kristallisationslösung, bestehend aus 38 % Pentaerythritolpropoxylat und 0,3 M Kaliumacetat. Das Kristallfoto des letzten Kristalls mit einer Länge von 200 μm wurde nach 11 Tagen aufgenommen. In den bei 4°C gelagerten Kristallisationsplatten war kein Kristallwachstum zu beobachten. Die größten Kristalle entstanden mit einer Proteinkonzentration von 8 mg/ml nach 10 bis 20 Tagen durch die *hanging-drop* Dampfdiffusionsmethode bei einer Temperatur von 20°C.

4.2.3 Röntgendiffraktion der proHlyA Kristalle

Die Diffraktion der proHlyA Kristalle aus der ersten Kristallisationsbedingung mit MgCl_2 und 2-Propanol war im Wesentlichen vor und nach der Optimierung der Bedingung gleich. Diffraktionsreflexe waren bis zu einer atomaren Auflösung von $\approx 18 \text{ \AA}$ im Kristall zu beobachten. Andere Kristalle wiederum zeigten keine Diffraktionsreflexe. Das Beugungsbild mit den am weitesten vom Zentrum entfernt liegenden Reflexen entsprechend einer atomaren Auflösung von $\approx 6,6 \text{ \AA}$ stammt aus der Optimierung der zweiten proHlyA Kristallisationsbedingung mit Pentaerythritolpropoxylat und Kaliumacetat und ist in Abbildung 3 exemplarisch dargestellt.

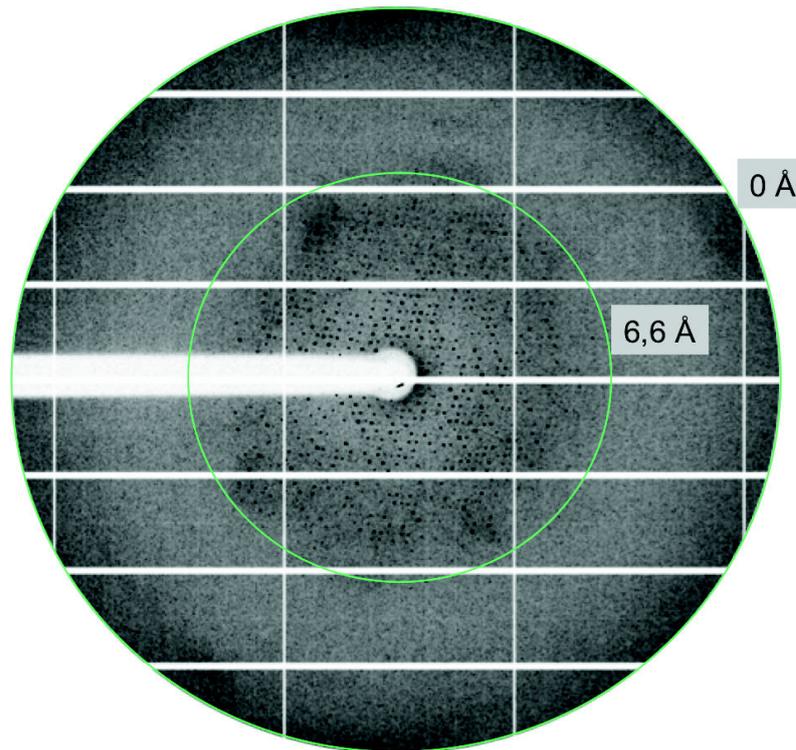


Abbildung 3: Diffraktionsbild eines proHlyA Kristalles. Die geordneten Diffraktionsreflexe im Inneren des Beugungsbildes sind charakteristisch für Proteinkristalle. Diffraktionsreflexe sind nach außen hin bis zu einer atomaren Auflösung von 6,6 Å im Kristall erkennbar. Das Beugungsbild wurde an der Strahllinie ID23-1 am ESRF im November 2015 aufgenommen.

Der dem Beugungsbild zugrunde liegende Kristall stammt aus einer Kristallisationslösung mit 38 % Pentaerythritolpropoxylat und 0,3 M Kaliumacetat und einer Proteinlösung mit 8 mg/ml proHlyA in 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 und 10 mM CaCl₂ nach dem Zusatz von 0,001 % Tween20. In dem Kristallisationsexperiment wurde 1 µl Proteinlösung mit 1 µl Kristallisationslösung gemischt und mit 500 µl Kristallisationslösung im Reservoir einer *24-well hanging-drop* Platte bei 20°C gelagert. Der dazugehörige Kristall ist in Tabelle 14 dargestellt (vierter Kristall von links). Der Kristall wurde nach vier Wochen aus dem Tropfen gefischt und in flüssigem Stickstoff für die Aufnahme von Kryodatenätzen schockgefroren. Die Diffraktionsreflexe im Zentrum des Beugungsbildes sind geordnet und liegen dicht aneinander. Die äußersten, erkennbaren Reflexe im Beugungsbild entsprechen einer atomaren Auflösung von ungefähr 6,6 Å im realen Raum. Eine weitere Prozessierung der Daten zur Berechnung einer dreidimensionalen Elektronendichtekarte war nicht möglich. Andere Kristalle aus dem selben Proteintropfen und der selben Kristallisationsplatte mit leicht veränderten Konzentrationen an Pentaerythritolpropoxylat und Kaliumacetat wurden parallel dazu gemessen und zeigten keine vergleichbar starke Diffraktion.

Anhang: Kristallisation von OpuBC mit verschiedenen Substraten

Das extrazelluläre, Substrat-bindende Protein OpuBC ist Bestandteil eines ABC-Transport-systems in der Zellmembran des Gram-positiven Bakteriums *Bacillus subtilis*, das dem Import von kleinen Molekülen mit osmoregulatorischen Eigenschaften dient [249]. Die dreidimensionale Raumstruktur von OpuBC mit seinem natürlichen Substrat Cholin wurde 2011 von Pittelkow *et al.* gelöst [250]. In Kooperation mit der Forschungsgruppe von Herrn Prof. Erhard Bremer aus dem Fachbereich für Biologie der Philipps-Universität Marburg und basierend auf der vorangegangenen Arbeit wurden in dieser Arbeit die dreidimensionalen Raumstrukturen von OpuBC D74T mit unterschiedlichen Substraten durch die Röntgenstrukturanalyse gelöst. Durch den Aminosäureaustausch D74T in OpuBC wird der Transport von Substraten nahe verwandter Transportsysteme wie Glycin Betain, L-Carnitin oder Cholin-O-Sulfat möglich (nicht publizierte Daten, Prof. Erhard Bremer). OpuBC D74T wurde mit der bereits bekannten Kristallisationsbedingung für OpuBC Wildtyp mit fünf verschiedenen Liganden kokristallisiert [250]. Das gereinigte Protein sowie die Substrate wurden zur Verfügung gestellt.

I. Material und Methoden

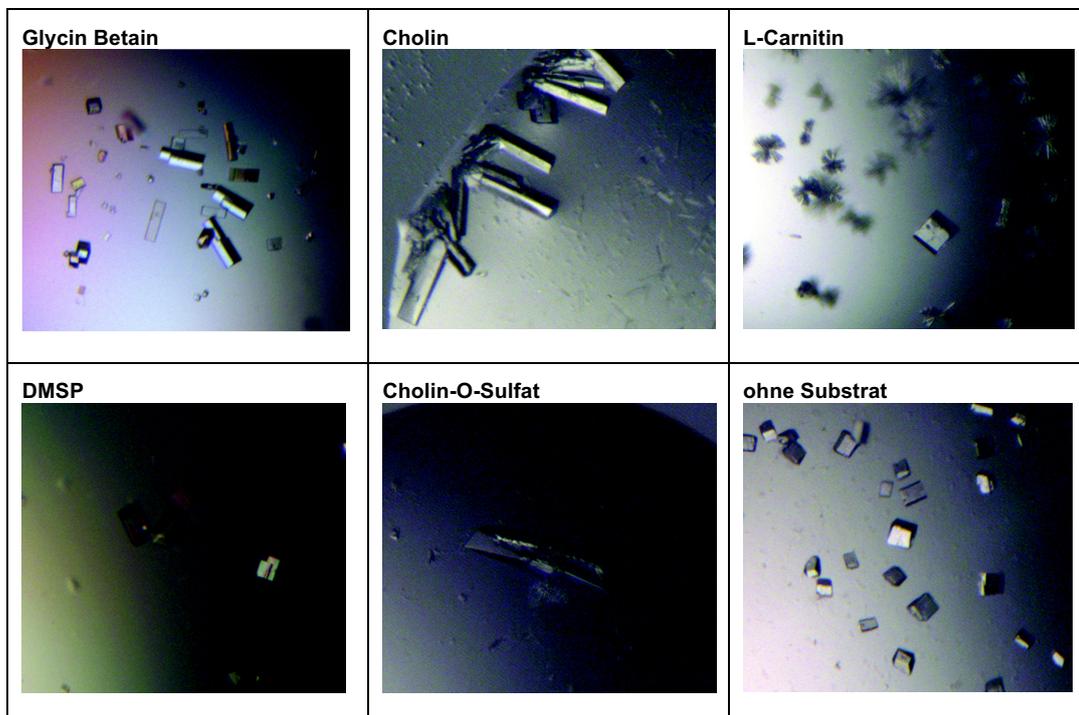
Das gereinigte Protein wurde auf 10 mg/ml konzentriert und mit 15 mM Glycin Betain, 50 mM Cholin, 15 mM L-Carnitin, 15 mM Dimethylsulfoniopropionat (DMSP) oder 15 mM Cholin-O-Sulfat für 30 min auf Eis vorinkubiert. Die Kristallisation erfolgte durch die *hanging-drop* Dampfdiffusionsmethode bei 12°C. Dabei wurde 1 µl Proteinlösung mit 1 µl Kristallisationslösung gemischt und mit 500 µl Kristallisationslösung im Reservoir gelagert. Die Kristallisationslösung variierte zwischen 150 und 225 mM Kaliumacetat und 20 % und 27,5 % Polyethylenglycol 3350 (w/v) in Abhängigkeit der Substrate. Ein Kristallwachstum war bei allen Substraten nach spätestens fünf Tagen zu beobachten. Nach zwei Wochen wurden die Kristalle nach dem Zusatz von Ethylenglycol in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die nativen Datensätze von OpuBC D74T mit den Liganden Glycin Betain, L-Carnitin und DMSP wurden an der Strahllinie ID23-2 am ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) aufgenommen, die nativen Datensätze von OpuBC D74T mit den Liganden Cholin und Cholin-O-Sulfat an der Strahllinie ID23-1 am ESRF [245] [246] [248]. Die automatische Prozessierung der Daten erfolgte durch die Software vor Ort [251] [252]. Die initialen Phasen wurden durch *Molecular Replacement* mit dem Programm *Phaser* bestimmt [253]. Als Grundlage diente die Kristallstruktur von OpuBC Wildtyp mit Cholin mit dem PDB Eintrag 3R6U [250]. Für den Modellbau und zur Verfei-

nerung der Strukturen wurden die Programme *Coot*, *REFMAC5* und *Phenix* verwendet [254] [255] [256]. Für die Strukturen von OpuBC D74T mit Cholin und Cholin-O-Sulfat wurde der *ARP/wARP* Webservice herangezogen [257]. Die Koordinaten der Liganden DMSP und Cholin-O-Sulfat wurden mit Hilfe des Ligandenservers *PRODRG* erstellt, während die Koordinaten von Glycin Betain, Cholin und L-Carnitin aus vorhandenen PDB-Einträgen abgerufen wurden [258]. Die Modellinhalte und die Statistiken der Modellverfeinerungen wurden mit den Programmen *Coot* und *Phenix* erhalten und sind in Tabelle 16 zusammengefasst [254] [255] [256].

II. Ergebnisse

Die Kristalle von OpuBC D74T im Komplex mit den fünf verschiedenen Substraten sind in Tabelle 15 dargestellt. Die finalen, dreidimensionalen Raumstrukturen des aktiven Zentrums von OpuBC D74T mit den verschiedenen Substraten sind in Abbildung 4 dargestellt. Zur Darstellung der Proteinstrukturen wurde das Programm *PyMOL* verwendet [259].

Tabelle 15: OpuBC D74T Kristalle mit verschiedenen Substraten



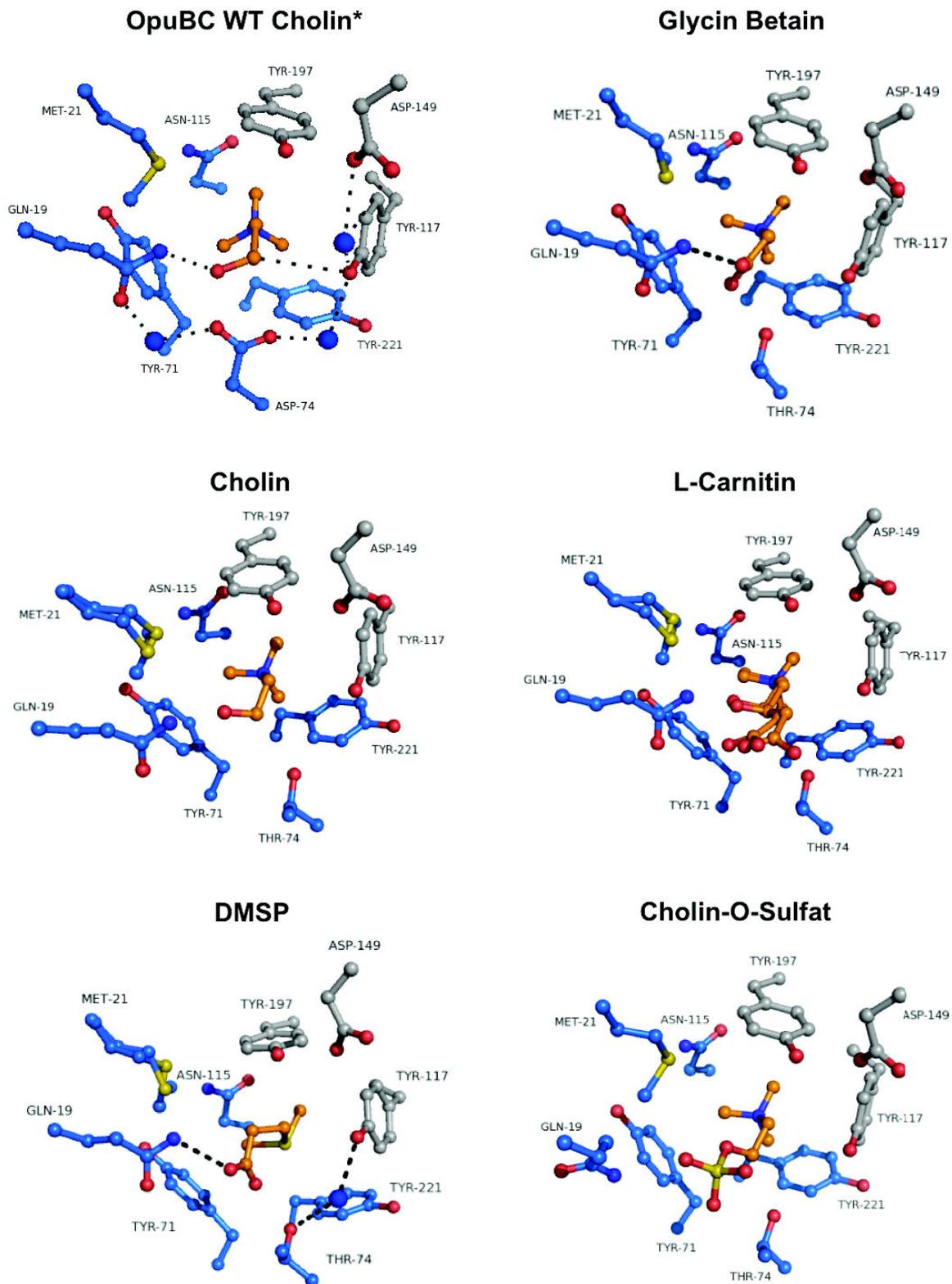


Abbildung 4: Aktives Zentrum von OpuBC D74T mit unterschiedlichen Substraten. *Die Struktur von OpuBC Wildtyp (WT) mit Cholin stammt von Pittelkow *et al.* mit dem PDB Eintrag 3R6U [250].

Tabelle 16: Statistiken zur Strukturverfeinerung und Angaben zum Modellinhalt von OpuBC D74T mit unterschiedlichen Substraten

	OpuBC D74T mit Glycin Betain	OpuBC D74T mit Cholin	OpuBC D74T mit L-Carnitin	OpuBC D74T mit DMSP	OpuBC D74T mit Cholin-O-Sulfat
Raumgruppe	<i>P 1 21 1</i>	<i>P 1 21 1</i>	<i>P 1 21 1</i>	<i>P 1 21 1</i>	<i>C 1 2 1</i>
Einheitszelle					
a, b, c (Å)	29,7; 66,2; 63,6	29,6; 66,3; 126,5	29,7; 66,6; 127,0	29,8; 65,9; 63,6	116,8; 47,8; 51,6
α , β , γ (°)	90,0; 94,1; 90,0	90,0; 91,6; 90,0	90,0; 91,8; 90,0	90,0; 92,1; 90,0	90,0; 112,9; 90,0
Datensammlung und -prozessierung					
Röntgenstrahlquelle	ESRF-ID23-2	ESRF-ID23-1	ESRF-ID23-2	ESRF-ID23-2	ESRF-ID23-1
Wellenlänge (Å)	0,8726	0,9730	0,8726	0,8726	0,9730
Auflösungsbereich (Å)	45,8–1,42 (1,47–1,42)	42,1–1,5 (1,55–1,5)	32,2–1,5 (1,55–1,5)	32,9–1,6 (1,66–1,6)	47,6–1,7 (1,76–1,7)
Multiplizität	7,1 (6,9)	6,46	4,4 (4,3)	4,9 (4,7)	6,7 (6,9)
Totale Reflektionen	321508 (30619)	528090 (51450)	349766 (34033)	158818 (15149)	191737 (19766)
Einmalige Reflektionen	45559 (4452)	77957 (7783)	79124 (7903)	32423 (3238)	28815 (2858)
Vollständigkeit (%)	98,19 (97,27)	99,31 (99,29)	99,83 (99,90)	99,88 (99,97)	99,05 (98,65)
I/σ	10,25 (2,23)	25,69 (12,01)	9,21 (4,07)	12,39 (3,66)	32,96 (13,32)
R_{merge}^a	0,127 (0,7707)	0,04877 (0,1426)	0,1069 (0,2932)	0,08388 (0,3918)	0,03674 (0,1421)
Strukturverfeinerung					
Effektive Auflösung (Å)	45,8–1,42	42,1–1,5	32,2–1,5	32,9–1,6	47,6–1,7
R_{arbeit}^b (%)	0,1784 (0,2858)	0,1503 (0,1495)	0,1622 (0,1823)	0,1661 (0,1961)	0,1934 (0,2313)
R_{frei}^c (%)	0,2149 (0,3348)	0,1520 (0,1365)	0,1933 (0,2118)	0,2081 (0,2693)	0,1973 (0,2618)
RMSD Bindungen					
Bindungslänge (Å)	0,023	0,009	0,006	0,021	0,007
Bindungswinkel (°)	2,13	1,22	1,06	2,01	1,09

	OpuBC D74T mit Glycin Betain	OpuBC D74T mit Cholin	OpuBC D74T mit L-Carnitin	OpuBC D74T mit DMSP	OpuBC D74T mit Cholin-O-Sulfat
B-Faktoren					
Wilson B-Faktor	11,21	8,22	8,71	12,46	18,89
Durchschnittlicher B-Faktor	15,10	11,37	12,84	16,04	8,81
Makromoleküle	13,91	9,95	10,65	14,94	8,17
Ligand	10,21	7,43	10,90	22,57	6,04
Wasser	24,03	20,33	23,31	24,98	18,20
Ramachandran Plot					
begünstigt (%)	98,20	99,24	99,27	97,84	99,63
erlaubt (%)	1,44	0,76	0,73	2,16	0,37
Ausreißer (%)	0,36	0	0	0	0
Modellinhalt					
Monomere in der asymmetrischen Einheit	1	2	2	1	1
Aminosäurereste	280	536	555	280	269
Ligand	1	2	2	1	1
Wasser	301	713	957	279	164
Kollisionen	3,81	3,14	2,73	6,64	2,21

Die Kristallparameter und Statistiken der Datensammlung stammen aus der automatischen Prozessierung [251]. Die Statistiken zur Verfeinerung und die Angaben zu den Modellinhalten wurden durch die Programme *Phenix* und *Coot* erhalten [254] [256].

^a R_{merge} ist definiert als $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$.

^b R_{arbeit} ist definiert als $R_{\text{arbeit}} = \frac{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|}{\sum_{hkl} F_{\text{obs}}}$.

^c R_{frei} berechnet wie R_{arbeit} , jedoch mit 5 % zufälligen Reflexionen, die bei allen Verfeinerungsschritten ausgeschlossen wurden.

Die Daten in den runden Klammern beziehen sich auf die am höchsten aufgelöste Schale.

5 Kapitel 3: Glykanbindung durch HlyA

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Untersuchung der Bindung von HlyA an spezifische Oberflächenglykane von Wirtszellen. Die Experimente mit fluoreszenzmarkiertem proHlyA zur zuckerabhängigen Bindung an Nierenepithelzelllysate sowie die Experimente zur Glykosphingolipidbindung in GUVs erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Thorsten Eierhoff aus der Forschungsgruppe von Herrn Jun.-Prof. Winfried Römer in Freiburg.

Inhaltsverzeichnis:

5 Kapitel 3: Glykanbindung durch HlyA	93
5.1 Material und Methoden	94
5.1.1 Allgemeine Materialien	94
5.1.2 Allgemeine Methoden	101
5.1.3 Klonierung von verschiedenen proHlyA-Cys Varianten.....	103
5.1.4 Expression und Reinigung der proHlyA-Cys Varianten	104
5.1.5 Expression und Reinigung von HlyC und Herstellung des Acyl-ACP Rohextraktes.....	105
5.1.6 <i>In vitro</i> Acylierungsassay zur Aktivitätsüberprüfung der Proteine.....	106
5.1.7 Markierung von proHlyA-Cys mit Alexa-Fluorophoren	107
5.1.8 ProHlyA Fluoreszenz-Blot mit Nierenepithelzelllysate.....	107
5.1.9 ProHlyA Glykosphingolipidbindung in GUVs (<i>giant unilamellar vesicles</i>).....	109
5.1.10 ProHlyA Glykan Array zur Identifizierung von Zuckerinteraktionen.....	110
5.2 Ergebnisse	111
5.2.1 Klonierung von verschiedenen proHlyA-Cys Varianten.....	111
5.2.2 Expression und Reinigung der proHlyA-Cys Varianten	111
5.2.3 <i>In vitro</i> Acylierungsassay zur Aktivitätsüberprüfung der Proteine	112
5.2.4 Markierung von proHlyA-Cys mit Alexa-Fluorophor	114
5.2.5 ProHlyA Fluoreszenz-Blot mit Nierenepithelzelllysate.....	115
5.2.6 ProHlyA Glykosphingolipidbindung in GUVs (<i>giant unilamellar vesicles</i>).....	117
5.2.7 ProHlyA Glykan Array zur Identifizierung von Zuckerinteraktionen	118

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Allgemeine Materialien

Chemikalien, Geräte und andere Materialien

Die in diesem Kapitel eingesetzten Chemikalien, Biochemikalien, Geräte und anderen Materialien sind in Tabelle 1 und 2 aufgelistet.

Tabelle 1: Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalien	Abkürzung, Summenformel	Reinheit/Qualität	Hersteller
1,4-Dithiothreitol	DTT	≥ 99 %	Carl Roth
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES, C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	für die Molekularbiologie	Fisher Scientific
Agar Agar, hohe Gelstärke	(C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n	Pulver, reinst	Serva
Agarose Standard Gelstärke ≥ 1100 g/cm ²	Agarose	für die DNA/RNA-Elektrophorese	Carl Roth
Albumin Fraktion V, proteasefrei	BSA	≥ 98 %	Carl Roth
AlexaFluor [®] 488 C5 Maleimid, lypophilisiert	Alexa 488, A488	≥ 90 % HPLC	Life Technologies
AlexaFluor [®] 647 C2 Maleimid, lypophilisiert	Alexa 647, A647	≥ 90 % HPLC	Life Technologies
Aluminiumsulfat 18-Hydrat	Al ₂ (SO ₄) ₃ • 18 H ₂ O	reinst	AppliChem
Ammoniumperoxidsulfat	APS, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	zur Analyse	Carl Roth
Ampicillin Natriumsalz	Amp, C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S	≥ 97 %	Carl Roth
Calciumchlorid Dihydrat	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	Ultra, ≥ 99,5 %	Fluka
Cholesterin	C ₂₇ H ₄₆ O	≥ 98 %	Avanti Polar Lipids
Coomassie [®] Brilliant Blau G250	CBB-G250, C ₄₇ H ₄₈ N ₃ NaO ₇ S ₂	n. a.	Serva
D(+)-Saccharose	Saccharose	≥ 99,5 %	Carl Roth
Dimethylsulfoxid	DMSO	n. a.	Life Technologies
Essigsäure	C ₂ H ₄ O ₂	technisch	unbekannt
Ethanol	EtOH, C ₂ H ₆ O	technisch	unbekannt
Ethidiumbromid, 10 mg/ml Lösung in H ₂ O	EtBr, C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃	für die Molekularbiologie	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz	EDTA, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈	zur Analyse	AppliChem
Glycin	C ₂ H ₅ NO ₂	zur Analyse	VWR
Glykosphingolipid Ceramid-trihexosid	Gb3, C ₆₀ H ₁₁₃ NO ₁₈	≥ 98 %	Matreya Lipids

Glykosphingolipid FSL-LE ^a (tri)	FSL-LewA, C ₇₀ H ₁₂₅ N ₃ NaO ₂₅ P	n. a.	Sigma-Aldrich
Glykosphingolipid Monosialogangliosid GM1 (NH ₄ ⁺ Salz)	GM1, C ₇₃ H ₁₃₁ N ₃ O ₃₁ • NH ₃	≥ 98 %	Matreya Lipids
Harnstoff	CH ₄ N ₂ O	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich
Imidazol	C ₃ H ₄ N ₂	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	IPTG, C ₉ H ₁₈ O ₅ S	≥ 99 %	Carl Roth
Kaliumchlorid	KCl	reinst	AppliChem
Kanamycinsulfat	Kan, C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ • H ₂ SO ₄	≥ 750 I.E./mg	Carl Roth
L-Glutathion, reduziert	GSH	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
Lipid 18:1 (Δ9-Cis) PC (1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine)	DOPC, C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	≥ 99 %	Avanti Polar Lipids
Magnesiumchlorid Hexahydrat	MgCl ₂ • 6 H ₂ O	≥ 98 %	Fisher Scientific
N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-ethylendiamin	TEMED, C ₆ H ₁₆ N ₂	zur Analyse	Merck
Natrium Deoxycholat	Na-Deoxycholat	≥ 97 %	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	NaCl	zur Analyse	Fisher Scientific
Natriumdodecylsulfat	SDS, C ₁₂ H ₂₅ O ₄ S • Na	≥ 99 %	Serva
Natriumhydroxid (Plätzchen)	NaOH	zur Analyse	AppliChem
Nickel(III)-chlorid Hexahydrat	NiCl ₂ • 6 H ₂ O	≥ 98 %	Carl Roth
Phosphataseinhibitor Natrium Orthovanadat	Na ₃ VO ₄	≥ 90 %	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure, 85 %	H ₃ PO ₄	zur Analyse	Fisher Scientific
Proteaseinhibitor Aprotinin	C ₂₈₄ H ₄₃₂ N ₈₄ O ₇₉ S ₇	n. a.	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitor Leupeptin	C ₂₀ H ₃₈ N ₆ O ₄ • ½ H ₂ SO ₄	≥ 90 %	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitor Pefabloc [®] SC	C ₈ H ₁₀ FNO ₂ S • HCl	≥ 97 %	Sigma-Aldrich
Rotiphorese [®] Gel aus 30%iger wässriger Acrylamidstammllösung und 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 : 1	Acrylamidlösung	n. a.	Carl Roth
Salzsäure	HCl	reinst	Sigma-Aldrich
Texas Red [®] DHPE	C ₇₄ H ₁₁₇ N ₄ O ₁₄ PS ₂	≥ 90 % HPLC	Life Technologies
Tris-((2-carboxyethyl)phosphin) Hydrochlorid	C ₉ H ₁₆ ClO ₆ P, TCEP	≥ 98 %	AppliChem
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃	zur Analyse	VWR
Xylencyanol FF	C ₂₅ H ₂₇ N ₂ O ₇ S ₂ • Na	Spuren möglich	Serva
Biochemikalien	Abkürzung	Anmerkung	Hersteller/Herkunft
Cholera Toxin B-Untereinheit, Alexa Fluor [®] 488 Konjugat	CtxB	rekombinant	Thermo Fisher Scientific

Complete™ Proteaseinhibitormischung: Pankreasextrakt, Thrombolyse, Chymotrypsin, Trypsin, Papain	Proteaseinhibitormix	EDTA-frei	Roche Diagnostics
Deoxynukleotidmix aus 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP	dNTP Mix	für die Molekularbiologie	New England BioLabs
Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder	DNA-Marker	0,5 µg/µl	Thermo Scientific
Gibco™ Dulbecco's Balanced Salt Solution (DPBS)	DPBS	Zusammensetzung siehe Abschnitt 5.1.8	Thermo Fisher Scientific
Gibco™ Dulbecco's Balanced Salt Solution mit Calcium und Magnesium (DPBS++)	DPBS++	Zusammensetzung siehe Tabelle 3	Thermo Fisher Scientific
Gibco™ Trypsin-EDTA 0,25%ige Lösung, phenolrot	Trypsin-EDTA Lösung	Zusammensetzung siehe Abschnitt 5.1.8	Thermo Fisher Scientific
Hefeextrakt für die Bakteriologie	Hefeextrakt	mikrogranuliert	Carl Roth
Lektin PA-IIL (<i>IecB</i>) mit Alexa Fluor®647 markiert	LecB	rekombinant	Aus dem Labor von Anne Imberty, nach [260]
Lektin PA-IL (<i>IecA</i>) mit AlexaFluor®488 markiert	LecA	rekombinant	Aus dem Labor von Anne Imberty, nach [195]
<i>Madin-Darby canine kidney</i> (MDCK) Zelllinie, MDCK.2 Zellen	MDCK Zellen	nicht modifiziert	Aus dem Labor von Winfried Römer
PageRuler™ Proteinmarker	Proteinmarker	10-200 kDa	Thermo Scientific
PageRuler™ Proteinmarker	Proteinmarker	10-170 kDa (vorgefärbt)	Thermo Scientific
Pfu DNA Polymerase	DNA-Polymerase	2,5 U/µl (rekombinant)	Thermo Scientific
Pfu DNA Polymerase Puffer	DNA-Polymerase Puffer	mit MgSO ₄ , 10×	Thermo Scientific
Plasmid Miniprep Kit NucleoSpin®	Plasmid Miniprep Kit	–	Macherey-Nagel
PNGaseF aus <i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	PNGaseF	rekombinant, ≥ 500 U/ml	Sigma-Aldrich
Restriktionsenzym DpnI	DpnI	20 U/µl	New England BioLabs
Restriktionsenzym-Puffer CutSmart®	CutSmart® Puffer	10×	New England BioLabs
Schafblut	–	Vollblut, defibriniert	Thermo Scientific
Trypton/Pepton aus Casein für die Mikrobiologie	Trypton/Pepton Casein	pankreatisch verdaut	Carl Roth

Tabelle 2: Geräte und andere Materialien

Gerätebezeichnung	Hersteller, Firmensitz
ÄKTA™ Purifier Flüssigkeitschromatographiesystem bestehend aus Box-900, UPC-900, P-900, Frac-920 und CU-950	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Autoklav Systec VX-120 und VX-150	Systec GmbH, Linden, DE
AvantiRJ-26xP Zentrifuge	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Geldokumentationssystem	BioRad, Hercules, CA, USA
Inkubationsschüttler Multitron Standard und Ecotron	Infors AG, Bottmingen, CH
Inkubator für Zellkulturen bei 37°C	Heraeus GmbH, Hanau, DE
JA-10 Rotor 10,000 rpm	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Konfokalmikroskop Nikon Eclipse Ti-E mit A1R Konfokallaser-scanner, 60 Å Öobjektiv, N.A. 1.49	Nikon Instruments, Melville, NY, USA
Laborwaage ABT I20-5DM (42 g; 120 g ± 0,00002 g; 0,0001 g)	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Laborwaage Modell EW 2200-2NM (max: 2200 g ± 0,01 g)	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Lumia Imaging System: Chemi Genius ² Bio Imaging System	Synoptics (Syngene), Cambridge, UK
Milli-Q Wasseraufbereitungsanlage	Merck (Millipore) KGaA, Darmstadt, DE
NanoDrop™ ND-1000 Spektralphotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen DE
Optima™ L-90K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Optima™ L-90K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
PCR Gerät π Gradient Thermocycler	Analytic Jena AG (Biometra), Jena, DE
pH-Meter pHenomenal pH1000L	VWR, Radnor, PA, USA
Fusion FX zur Fluoreszenzdetektion	Vilber Lourmat, Marne-laVallée, FR
Pipettensatz mit variablen Volumen: Pipetman Classic® 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl und 2 µl	Gilson, Middleton, WI, USA
Sorvall Zentrifugenrotor SLC-6000 und Zentrifugenrotor SS-34	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spannungsquelle Consort EV215 für SDS-Gele	Cleaver Scientific, Warwickshire, UK
Spannungsquelle EPS 500/400 für Agarosegele	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Spektrophotometer Ultrospec10 zur Bestimmung der Zelldichte	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Trans-Blot®SD Semi-dry Elektrophoretische Transferzelle	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
UV-Vis Spektrophotometer GENESYS™ 10S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vakuumpumpe Typ MZ2C NT 2AK	Vacuubrand GmbH + CO KG, Wertheim, DE
Vertikale Elektrophoresezelle	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Wechselspannungsquelle TG315 Funktionsgenerator	Aim-TTi, Huntingdon, UK

Zellaufschlussgerät Microfluidics System M-110P	Microfluidics, Westwood, MA, USA
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R für 15 ml und 50 ml Röhren	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Modell Centrifuge 5415D für 1,5 ml Reagiergefäße	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifugenrotor Ti-45 inklusive Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Geldokumentationssystem Gel Doc™ EZ	BioRad, Hercules, CA, USA
Andere Materialien	Hersteller
Amicon Ultra Filtereinheiten für die Zentrifuge MWCO 100 kDa	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Bechergläser Duran® 500 ml, 100 ml, 50 ml	Schott AG, Mainz, DE
Filterpapier für Western Blot	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Flaschenaufsatzfilter Nalgene®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glasflaschen und Glaskolben Duran® 500 ml und 300 ml	Schott AG, Mainz, DE
Glasröhrchen 10 ml für Fraktionssammler	Hersteller unbekannt
Hamilton™ Mikroliterspritze aus Glas, 10 µl	Hamilton Company, Reno, NV, USA
HighLoad™ Superdex™ 200 prep grade Säule	GE Healthcare, Boston, MA, USA
HighTrap® Chelating HP Affinitätssäule	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Küvetten aus Polystyrol, 1 cm Schichtdicke	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Küvetten aus Quarzglas, 10 mm Schichtdicke	Hellma Analytics, Müllheim, DE
Membranfilter Supor®-200 0,2 µm und 0,45 µm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Messzylinder 500 ml, 250 ml, 100 ml, 50 ml	VITLAB GmbH, Grossostheim, DE
Nitrozellulose Membran, 0,45 µm	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Objektträger 75 × 26 mm, gebrauchsfertig	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Parafilm® M	Bemis Company, WI, Neenah, USA
PD10 Säulen mit 8,3 ml Sephadex™ G-25 Medium	GE Healthcare, Boston, MA, USA
Polyacrylamidgel 12%ig mit 10 Probestaschen, gebrauchsfertig	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Polyacrylamidgel Reagenzien für den proHlyA Fluoreszenz-Blot: SDS-Ladepuffer, Elektrophoreselaufpuffer und Färbelösung	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Reagiergefäße (1,5 ml) und Röhren (15 ml und 50 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Spritzen und Einmalkanülen 10 ml und 1 ml	Unterschiedliche Hersteller
Sterile Einwegpipetten 50 ml, 20 ml, 10 ml und 5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Sterilfilter Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
VITREX Wachsplatte	Vitrex Medical A/S, Herlev, DK
Weitere Materialien: Einwegpipettenspitzen, Agarschalen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Zentrifugenbecher für die Zellkultur 0,5 L und 1 L	Hitachi-Koki, Chiyoda, Tokyo, JP

Standardpuffer, Stammlösungen und Nährmedien

Die in diesem Kapitel verwendeten Puffer, Stammlösungen und Nährmedien sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammensetzung von Puffern, Stammlösungen und Nährmedien

Puffer	Zusammensetzung	Nährmedien	Zusammensetzung
ProHlyA SEC-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 (20°C) 150 mM NaCl 5 mM CaCl ₂	LB-Medium (1 L) In Anlehnung an [223]	5 g Hefeextrakt 10 g Trypton/Pepton 5 g NaCl
ProHlyA Markierungspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,2 (4°C) 150 mM NaCl 5 mM CaCl ₂	2× YT Medium (1 L)	10 g Hefeextrakt 16 g Trypton/Pepton 5 g NaCl
Gibco® DPBS++ (von Thermo Fisher Scientific, gebrauchsfertig)	0,90 mM CaCl ₂ 0,50 mM MgCl ₂ 2,67 mM KCl 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 137,9 mM NaCl 8,06 mM Na ₂ HPO ₄	LB Agar (1 L)	5 g Hefeextrakt 10 g Trypton/Pepton 5 g NaCl 5 g Agar Agar
CFG Bindepuffer für den Glykan Array	20 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl 2 mM CaCl ₂ 2 mM MgCl ₂ 0,05 % Tween®20 1 % BSA	Stammlösung	Zusammensetzung
		IPTG	1 M in H ₂ O Arbeitskonzentration: 1 mM oder 0,1 mM
HlyC IMAC-Puffer A und B	20 mM HEPES pH 8,0 (20°C) 150 mM KCl 20 % Glycerin (v/v) 10 oder 500 mM Imidazol	Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in H ₂ O Arbeitskonzentration: 100 µg/ml
HlyC Dialysepuffer	20 mM HEPES pH 8,0 (20°C) 300 mM KCl	Kanamycin (Kan)	30 mg/ml in H ₂ O Arbeitskonzentration: 30 µg/ml
ACP Puffer	150 mM Tris-HCl pH 7,4 (10°C) 150 mM NaCl	Die Nährmedien wurden für 20 min bei 121°C steril autoklaviert. Die Stammlösungen wurden durch einen 0,2 µm Sterilfilter und die Puffer durch einen 0,45 µm Membranfilter filtriert.	

Escherichia coli Stämme, Plasmide und Primer

Die für die Expression von proHlyA verwendeten *E. coli* Stämme und Plasmide sind in Tabelle 4 beschrieben.

Tabelle 4: *Escherichia coli* Stämme, Plasmide und Primer

<i>E. coli</i> Stamm	Hersteller		Verwendung
<i>E. coli</i> BL21(DE)	Stratagene California, La Jolla, CA, USA		Expression von proHlyA und der proHlyA-Cys Varianten
<i>E. coli</i> DH5α	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™)		Amplifizierung der Plasmide und Herstellung des Acyl-ACP Rohextraktes
<i>E. coli</i> XL1-blue	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™)		Ligation und Amplifizierung der PCR-Produkte in der Klonierung der proHlyA-Cys Varianten
Plasmid	Selektion	Promotor	Beschreibung
pSU- <i>hlyA</i> (6960 bp)	Amp	lac	Plasmid für die Expression von proHlyA basierend auf der Sequenz mit dem UniProt Datenbank Eintrag P08715 [225] und Ausgangsplasmid für die Klonierungen der proHlyA-Cys Varianten. Zusammen mit dem Plasmid pSK184- <i>hlyBD</i> wird proHlyA von <i>E. coli</i> sekretiert. Das pSU- <i>hlyA</i> Plasmid stammt von Soloaga <i>et al.</i> [226].
pSK184- <i>hlyBD</i> (6033 bp)	Kan	lac	Plasmid für die Expression der T1SS Transporterproteine HlyB und HlyD. Das Plasmid stammt von Bakkes <i>et al.</i> [227].
pET28b- <i>hlyC</i> -His	Kan	T7	Plasmid für die Expression von HlyC-His
Primer	Sequenz		T _m
HlyA-A7C	5'-AATGACAACAATAACCACTTGCCAAATTAAGCACACTG-3' 5'-CAGTGTGCTTTTAATTTGGCAAGTGGTTATTGTTGTCATT-3'		62°C
HlyA-A181C	5'-TGTCAGTTCTTCTGAGATGTGCGAAGCGAGTATTGAGCTA-3' 5'-TAGCTCAATACTCGCTTCGCACATCTCAGAAGAACTGACA -3'		66°C
HlyA-A401C	5'-TAAGCGCGCTGGTAGGCTGCGTTACGGGGATAATTTTC-3' 5'-GAAATTATCCCCGTAACGCAGCCTACCAGCGCGCTTA-3'		69°C
Die Primer wurden als unmodifizierte Oligonukleotide bei der MWG-Biotech AG (Ebersberg, DE) bestellt und auf eine Endkonzentration von 100 pmol/μl in H ₂ O verdünnt.			
Sequenzierprimer für das pSU- <i>hlyA</i> Plasmid	Primer pQE-FP: 5'-CGGATAACAATTTACACAG-3' Primer HlyA_2: 5'-AACAAATATCACACGAG-3' Primer HlyA_3: 5'-ATCCAATACAAAGCACC-3' Die Primer wurden für die Plasmidsequenzierungen durch die GATC Biotech AG (Konstanz, DE) verwendet.		

Proteine und deren Eigenschaften

Die theoretischen Eigenschaften von proHlyA beziehungsweise der proHlyA-Cys Varianten wurden basierend auf der Aminosäuresequenz von proHlyA mit dem Programm *Expasy ProtParam* ermittelt und sind in Tabelle 5 zusammengefasst [228]. Die Sequenz basiert auf dem plasmidkodierten Protein aus dem UPEC-Stamm UT189 mit dem UniProt Datenbank Eintrag P08715 [225].

Tabelle 5: Theoretische Eigenschaften von proHlyA beziehungsweise der proHlyA-Cys Varianten

	proHlyA-Cys
Aminosäuren (Anzahl)	1024
Molekulargewicht (Da)	110144,62
Theoretischer isoelektrischer Punkt (pI)	5,32
Extinktionskoeffizient bei 280 nm in H ₂ O (M ⁻¹ cm ⁻¹)	81600,00

5.1.2 Allgemeine Methoden

SDS-PAGE

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden SDS-haltige Gele mit 10 % Acrylamid hergestellt. Die Zusammensetzung der SDS-Gele sowie die dafür benötigten Puffer sind in Tabelle 6 angegeben. Die Mengenangaben beziehen sich auf die Herstellung von 10 Gelen mit den jeweiligen Abmessungen 10,5 × 7,5 × 0,1 cm.

Tabelle 6: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel der 10%igen SDS-Gele

Komponente	Sammelgel (4,5 %)	Trenngel (10 %)
Trenngelpuffer (ml)	0	18,75
Sammelgelpuffer (ml)	8,75	0
H ₂ O (ml)	21,00	31,25
30 % Acrylamidlösung in H ₂ O (ml)	6,00	25,00
TEMED (µl)	70	70
10 % APS (µl)	210	300
Zusammensetzung Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 6,8 mit 0,4 % SDS (w/v)	
Zusammensetzung Sammelgelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,85 mit 0,4 % SDS (w/v)	

Die weiteren in der SDS-PAGE zur Auftrennung und zur Färbung der Proteine im Gel verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 7 angegeben. Für den in Abschnitt 5.1.8 beschriebenen proHlyA Fluoreszenzblot wurden die Materialien und gebrauchsfertigen Polyacrylamidgelreagenzien von Bio-Rad verwendet (siehe Tabelle 2). Für die SDS-PAGE wurden jeweils 20 µl der zu analysierenden Probe mit 5 µl des nicht reduzierenden 5× SDS Ladepuffers versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Davon wurden jeweils 20 µl auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 160 V für 1 h 30 min in 1× Elektrophorese Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel mit kolloidalen Coomassie Färbelösungen gefärbt und mit Entfärbelösung und H₂O entfärbt. Als Proteinmarker diente der 10–200 kDa ungefärbte oder der 10–170 kDa vorgefärbte Proteinmarker (siehe Tabelle 1).

Tabelle 7: Puffer und Färbelösungen für die SDS-PAGE

Puffer	Zusammensetzung	Färbelösung	Zusammensetzung
5× SDS Ladepuffer	10 ml Sammelgelpuffer 10 ml SDS (16 % in H ₂ O) 20 ml Glycerin (100 %) 10 ml H ₂ O 40 mg Bromphenolblau	Kolloidale Coomassie Färbelösung [261]	5 % Aluminiumsulfat (w/v) 10 % EtOH (v/v) 0,02 % CBB-G250 (w/v) 2 % Phosphorsäure (v/v)
10× Elektrophorese Laufpuffer	1,9 M Glycin 0,25 M Tris 1,0 % SDS (w/v) pH 8,3 (ohne Einstellen)	Kolloidale Coomassie Entfärbelösung [261]	10 % EtOH (v/v) 2 % Phosphorsäure (v/v)

Agarosegelelektrophorese

Für die Klonierungen der HlyA-Cys Varianten A7C, A181C und A401C wurde ein 1%iges Agarosegel in TAE-Puffer verwendet. Die Auftrennung der PCR-Produkte und Plasmide erfolgte bei 110 V für 50 min in TAE Laufpuffer (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

DNA Ladepuffer	Zusammensetzung	Laufpuffer/Färbelösung	Zusammensetzung
5× DNA Ladepuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 30 % Glycerin (v/v) 1 mM EDTA pH 8,0 0,25 % Bromphenolblau (w/v) 0,25 % Xylencyanol FF (w/v)	50× TAE Puffer	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA (pH 8,0)
		EtBr Lösung	1 µg/ml in H ₂ O Endkonzentration

Das Gel wurde anschließend für 30 min in EtBr-Lösung geschwenkt und die Fluoreszenz im Chemi Genius² Imaging System detektiert. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 8 angegeben. Der verwendete DNA-Marker (1 kb) ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels NanoDrop über den Absorptionswert bei 280 nm anhand des in Tabelle 5 angegebenen Molekulargewichtes und Extinktionskoeffizienten ermittelt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration der eingesetzten Plasmide erfolgte ebenfalls mittels NanoDrop über den Absorptionswert bei 260 nm.

Lagerung der Proteine

Nicht markiertes proHlyA wurde nach der Reinigung bei -80°C gelagert und vor der Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen aufgetaut. Fluoreszenzmarkiertes Protein wurde für

maximal eine Woche bei 4°C verwendet und ansonsten bei -80°C gelagert. Gereinigtes HlyC sowie der Acyl-ACP Rohextrakt wurden ebenfalls bei -80°C gelagert.

5.1.3 Klonierung von verschiedenen proHlyA-Cys Varianten

Zielgerichtete Mutagenese

Für die spezifische Markierung von proHlyA mit Fluoreszenzfarbstoffen wurde an drei verschiedenen Positionen im Protein ein Alanin gegen ein Cystein ausgetauscht. Die Wildtyp-Sequenz von HlyA enthält kein Cystein. Für die Herstellung der Cysteinmutanten A7C, A181C und A401C wurde jeweils ein komplementäres Primerpaar mit den gewünschten Basenaustauschen entworfen. Zunächst wurde damit das Ausgangsplasmid pSU-hlyA in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Anschließend wurde das lineare PCR-Produkt zur Ligation und Amplifizierung in *Escherichia coli* transferiert. Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 4 aufgelistet.

PCR mit den synthetisierten Primern

Ein 50 µl PCR-Ansatz, aus 1 µl Ausgangsplasmid pSU-hlyA (100 ng/µl), 1 µl dNTP Mix (10 mM von jedem Nukleotid), 0,5 µl Vorwärtsprimer (100 pmol/µl), 0,5 µl Rückwärtsprimer (100 pmol/µl), 5 µl 10× Pfu DNA-Polymerase Puffer mit MgCl₂, 1 µl Pfu DNA-Polymerase (2,5 U/µl) und 41 µl H₂O, wurde für jedes Primerpaar angesetzt und für drei verschiedene Annealingtemperaturen in der PCR-Reaktion (T₁ bis T₃) aufgeteilt. Die Amplifizierung der Plasmide erfolgte im Gradienten-PCR Gerät mit folgendem Programm: 1. Schritt: 2 min bei 95°C, 2. Schritt (Denaturierung): 30 sec bei 95°C, 3. Schritt (Annealing): 30 sec bei T₁ bis T₃, 4. Schritt (Elongation): 25 min (3 min/kb) bei 72°C, 5. Schritt: 30 min bei 72°C. Die Annealingtemperaturen betragen für HlyA A7C T₁ = 59°C, T₂ = 62°C, T₃ = 66°C, für HlyA A181C T₁ = 63°C, T₂ = 66°C, T₃ = 69°C und für HlyA A401C T₁ = 66°C, T₂ = 69°C und T₃ = 72°C.

Verdau von methylierter DNA

Um die methylierte DNA des Ausgangsplasmides abzubauen, wurden die verbleibenden PCR-Ansätze mit dem amplifizierten PCR-Produkt nach dem Kontrollgel durch das Restriktionsenzym DpnI verdaut. Die Reaktionsansätze aus 10 µl PCR-Produkt, 1 µl DpnI Restriktionsenzym (20 U/µl), 2 µl 10× CutSmart® Puffer und 6 µl H₂O wurden dafür über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation von *E. coli* mit den PCR-Produkten

Die über Nacht mit DpnI verdauten PCR-Produkte wurden in chemokompetente *E. coli* XL-1 blue Zellen transferiert. Dafür wurde jeweils ein 50 µl *E. coli* Zellaliquot von -80°C aufgetaut und mit dem kompletten DpnI-Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte

für 50 sec bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert, mit 650 µl LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C und einer Schwenkzahl von 750 min⁻¹ inkubiert. Ein Teil der transformierten Zellen wurde auf LB-Kan-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Amplifizierung und Isolierung der Plasmide

Einzelne Bakterienkolonien von den Agarplatten wurden in einer 5 ml Flüssigkultur aus LB-Kan-Medium über Nacht bei 37°C und einer Schwenkzahl von 180 min⁻¹ inkubiert. Die Reinigung der amplifizierten Plasmide aus *E. coli* erfolgte am nächsten Tag durch das Reinigungsprotokoll für rekombinante Plasmide aus dem Plasmid Miniprep Kit. Im letzten Schritt wurde die DNA mit 50 µl H₂O eluiert, wovon 5 µl für die Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der amplifizierten Plasmide verwendet wurden.

Sequenzierung der Plasmide

Die isolierten Plasmide wurden zur Sequenzierung an die GATC Biotech AG gesendet. Die verwendeten Sequenzierprimer für das pSU-*hlyA* Plasmid sind in Tabelle 4 angegeben.

5.1.4 Expression und Reinigung der proHlyA-Cys Varianten

ProHlyA Wildtyp und die proHlyA-Cys Varianten wurden in Anlehnung an das bereits publizierte Protokoll für proHlyA von Thomas *et al.* exprimiert und gereinigt [222]. Dabei wurden die Proteine in *Escherichia coli* überexprimiert und in den Überstand sekretiert. Anschließend wurde proHlyA-Cys mittels Gelfiltrationschromatographie aus dem Überstand der Zellkultur gereinigt und für die Markierungsreaktion eingesetzt.

Transformation von *E. coli*

Es wurden 50 µl chemokompetente *E. coli* BL21(DE3) Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µl pSU-*hlyA*-Cys Plasmid (≈ 100 ng/µl) und 2 µl pSK184-*hlyBD* Plasmid (≈ 50 ng/µl) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 50 sec bei 42°C. Die Zellen wurden für 5 min auf Eis inkubiert, mit 650 µl LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C und einer Schwenkzahl von 650 min⁻¹ inkubiert. Ein Teil der transformierten Zellen wurde auf LB-Kan-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Expression und Sekretion von proHlyA-Cys

Eine Vorkultur, aus 50 ml 2× YT Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Kanamycin in einem 100 ml Schikanekolben, wurde mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte angeimpft und für 18 bis 20 h bei 37°C und einer Schwenkzahl von 200 min⁻¹ inkubiert. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte der Vorkultur bei 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. Die Hauptkultur, bestehend aus 3 × 150 ml 2× YT Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Kanamycin

in drei 150 ml Schikanekolben, wurde mit der Vorkultur auf eine OD_{600} von $\approx 0,05$ angeimpft und bei 37°C und einer Schwenkzahl von 180 min^{-1} bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert und erfolgte für 3 h bei 37°C und einer Schwenkzahl von 180 min^{-1} . Zeitgleich zur Induktion wurde das Expressionsmedium mit 10 mM CaCl_2 versetzt.

Vorbereitung des Zellkulturüberstandes für die Reinigung

Nach der Expression wurden die Zellen der Hauptkultur bei 8000 g für 15 min zentrifugiert und der vereinte Überstand erneut bei 42 000 g und 4°C für 1 h 15 min zentrifugiert. Der Überstand nach dem Ultrazentrifugationsschritt wurde durch einen $0,45\ \mu\text{m}$ Membranfilter filtriert und mit 100 kDa MWCO Filterkonzentratoren auf ein finales Volumen von 5 ml einkonzentriert. Der einkonzentrierte Zellkulturüberstand mit dem sekretierten Protein wurde für 30 min bei 20 000 g und 4°C zentrifugiert und anschließend direkt für die Reinigung durch die Größenausschlusschromatographie eingesetzt.

Reinigung von HlyA durch die Größenausschlusschromatographie

Die Reinigung der sekretierten proHlyA-Cys Varianten erfolgte durch die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) an einem GE ÄKTA-System. Dabei wurde der einkonzentrierte Überstand nach Zentrifugation über eine Superdex 200 16/60 Säule aufgetrennt. Der Lauf erfolgte in proHlyA SEC-Puffer mit 5 mM CaCl_2 bei einer Flussrate von $0,7\text{ ml/min}$ und 4°C sowie der Sammlung von 0,5 ml Fraktionen. Nach der Analyse der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE wurden ausgewählte Fraktionen vereint und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

5.1.5 Expression und Reinigung von HlyC und Herstellung des Acyl-ACP Rohextraktes

Für den proHlyA *in vitro* Acylierungsassay wurde HlyC mit dem bereits in Kapitel 1 beschriebenen Protokoll gereinigt (Abschnitt 3.1.4). Zunächst wurde das pET28b-hlyC-His Plasmid in *E. coli* BL21(DE3) Zellen transferiert (Protokoll siehe Abschnitt 5.1.4). Anschließend wurde eine Vorkultur aus 50 ml LB-Kan-Medium mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C und einer Schwenkzahl von 200 min^{-1} inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur, bestehend aus $6 \times 600\text{ ml}$ LB-Kan-Medium, auf eine OD_{600} von $\approx 0,05$ angeimpft und bei 37°C und einer Schwenkzahl von 180 min^{-1} inkubiert. Die Proteinexpression wurde bei einer OD_{600} von $\approx 0,4$ mit 1 mM IPTG induziert und erfolgte bei 18°C und einer Schwenkzahl von 180 min^{-1} für 18 bis 20 h. Die Hauptkulturen wurden für 15 min bei 4000 g zentrifugiert und die Zellen in HlyC Puffer mit Proteaseinhibitor gelöst. Die Zellen wurden durch das Zellaufschlussgerät bei 150 kPa aufgeschlossen und anschließend

für 30 min bei 20 000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Flussrate von 4 ml/min über ein GE ÄKTA-System auf eine mit NiCl₂ beladene 5 ml HighTrap Chelating HP IMAC-Säule geladen. Nach einem Waschschrift mit 200 ml HlyC Puffer, 10 mM Imidazol enthaltend, wurde das gebundene Protein mit einem linearen Gradienten über 100 ml von 10 mM Imidazol auf 500 mM Imidazol eluiert. Ausgewählte Elutionsfraktionen wurden vereint, über Nacht in HlyC Dialysepuffer dialysiert und anschließend mit einem 10 kDa MWCO Filterkonzentrator auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml einkonzentriert. Des Weiteren wurde ein *E. coli* Rohextrakt mit Acyl-ACP, als Acylkettendonator in der Acylierungsreaktion, nach dem bereits publizierten Protokoll von Thomas *et al.* hergestellt [222]. Dafür wurde eine 2 L *E. coli* DH5α Zellkultur nach 5 h Wachstum bei 37°C geerntet und die Zellen in insgesamt 75 ml ACP Puffer resuspendiert. Der Überstand nach dem Zellaufschluss durch drei Durchläufe bei 150 kPa durch das Zellaufschlussgerät und Zentrifugation für 10 min bei 30 000 g und 60 min bei 200 000 g bei 4°C stellt den Acyl-ACP Rohextrakt dar.

5.1.6 *In vitro* Acylierungsassay zur Aktivitätsüberprüfung der Proteine

Für die Aktivitätsüberprüfung der gereinigten proHlyA-Cys Varianten sowie für das später über das Cystein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte proHlyA wurde der bereits früher beschriebene *in vitro* Acylierungsassay von Thomas *et al.* (2014) verwendet [222]. Eine detaillierte Beschreibung des Assays befindet sich in Kapitel 1 (Abschnitt 3.1.8). Für den Assay wurde denaturiertes proHlyA mit einer Konzentration von 1 mg/ml in einem Puffer aus 37,5 mM NaCl, 1,25 mM CaCl₂ und 12,5 mM Tris-HCl pH 7,4 sowie 6,4 M Harnstoff und 20 mM EDTA eingesetzt. Ein Acylierungsansatz, bestehend aus 10 µl proHlyA in Denaturierungspuffer (1 mg/ml), 2 µl HlyC-His (0,5 mg/ml) und 63 µl Acyl-ACP Rohextrakt, wurde für 1 h bei 23°C inkubiert. Der Acyl-ACP Rohextrakt wurde zuvor mit 40 mM EDTA versetzt und für 2 h bei 23°C inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml gewaschene Schaferythrozyten in Schafblut Waschpuffer mit dem Acylierungsansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Waschen der Schaferythrozyten erfolgte durch mehrere Zyklen aus Zentrifugation für 1 min bei 14 000 g und Resuspendierung der Zellen in Schafblut Waschpuffer, bestehend aus 155 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 2 mM MgSO₄ und 10 mM Tris-HCl pH 7,5. Am Ende der Hämolysezeit wurden die nicht lysierten Zellen für 1 min bei 14 000 g abzentrifugiert und die Hämoglobinfreisetzung durch die Messung der Absorption bei 544 nm im Überstand gemessen. Als Positivkontrolle diente eine 0,21%ige SDS-Lösung in H₂O. Als Negativkontrollen wurden ein Acylierungsansatz ohne proHlyA und ein Acylierungsansatz ohne HlyC verwendet. Als Referenz für die Hintergrundabsorption diente ein Ansatz mit 75 µl Schafblut Waschpuffer. Der *in vitro* Acylierungsassay wurde mit proHlyA Wildtyp, proHlyA-Cys7, proHlyA-Cys181, proHlyA-Cys401 und dem, über Cystein 7 mit Alexa 488 oder Alexa 647, markierten proHlyA durch-

geführt. Für die Messungen mit den fluoreszenzmarkierten Proteinen wurde eine Versuchsreihe ohne HlyC zur Messung der Hintergrundfluoreszenz mitgeführt.

5.1.7 Markierung von proHlyA-Cys mit Alexa-Fluorophoren

Die Markierungsreaktionen mit den Alexa-Fluorophoren A488 und A647 wurden basierend auf der Anleitung des Herstellers für Thiol-reaktive Fluoreszenzfarbstoffe durchgeführt. Für die Markierungsreaktionen wurden insgesamt 15 ml gereinigtes proHlyA-Cys7 mit einer Konzentration von 0,52 mg/ml eingesetzt. Nach Zugabe von 10-fach molarem Überschuss an TCEP (0,74 M Stammlösung in H₂O mit pH ≈ 7,0) wurde das Protein für 6 h auf Eis inkubiert. Danach wurde das Protein mit einem 100 kDa MWCO Filterkonzentrator auf ein Volumen von 2,5 ml einkonzentriert und über eine PD10-Säule in proHlyA Markierungspuffer umgepuffert. Von den lyophilisierten Fluoreszenzfarbstoffen Alexa 488 und Alexa 647 wurde jeweils eine 5 mM Stammlösung in DMSO vorbereitet. Nach der Umpufferung von proHlyA-Cys7 in Markierungspuffer wurde das Protein mit einem 100 kDa MWCO Filterkonzentrator auf 6 mg/ml konzentriert und auf zwei Ansätze mit 450 µl aufgeteilt. Nach Zugabe eines 15-fachen molaren Überschusses an Alexa 488 beziehungsweise Alexa 647 Fluoreszenzfarbstoff wurden die Konjugationsreaktionen für 20 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit einem 5-fachen Farbstoffüberschuss an GSH (6,5 mM Stammlösung in DPBS++ Puffer) gestoppt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis wurden die Reaktionsansätze für die Reinigung des markierten Proteins über eine PD10-Säule mit DPBS++ Puffer auf 2,5 ml aufgefüllt und mit 3,5 ml DPBS++ Puffer von der Säule eluiert. Des Weiteren wurden die markierten Proteine mit einem 100 kDa MWCO Filterkonzentrator einkonzentriert und dabei mit insgesamt 50 ml DPBS++ Puffer gewaschen. Zur Berechnung der finalen Proteinkonzentration sowie der Markierungseffizienz wurde die Absorption bei 280 nm und 494 nm oder 650 nm einer 1 : 10 Verdünnung in H₂O bestimmt. Die entsprechenden Formeln zu den Berechnungen sind im Ergebnisteil (Abschnitt 5.2.4) angegeben. Weiterhin wurde die Fluoreszenz der markierten Proteine nach Auftrennung im SDS-Gel durch ein BioRad Geldokumentationssystem nachgewiesen.

5.1.8 ProHlyA Fluoreszenz-Blot mit Nierenepithelzelllysate

Adhärente Nierenepithelzellen der MDCK-Zelllinie (*Madin-Darby canine kidney*) wurden entweder mit einer 0,25%igen Trypsin und EDTA-haltigen Lösung oder mit PBS ohne Trypsin und ohne EDTA vorbehandelt (Zusammensetzung siehe Tabelle 9). Anschließend wurden die adhärennten Zellen aus den 15 cm Petrischalen in insgesamt 400 µl RIPA Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 9) aufgenommen und das Zelllysate bei -20°C weggefroren. Am nächsten Tag erfolgte ein Verdau der beiden Zelllysate mit PNGaseF. Dafür wurden jeweils 45 µl Zelllysate mit 5 µl PNGaseF (0,5 U/µl) oder mit 5 µl H₂O für 3 h bei 37°C inkubiert.

Danach wurden die vier unterschiedlich vorbehandelten Zelllysate (mit und ohne Trypsin beziehungsweise mit und ohne PNGaseF) mit jeweils 10 µl β-Mercaptoethanol-haltigem 6 × SDS-Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 99°C aufgeköcht. Ein 12%iges SDS-Gel mit insgesamt 10 Probenkammern wurde mit 20 µl der jeweiligen Probe wie folgt beladen: 1 = ohne Trypsin und ohne PNGaseF Behandlung, 2 = ohne Trypsin und mit PNGaseF Behandlung, 3 = mit Trypsin und ohne PNGaseF Behandlung, 4 = mit Trypsin und mit PNGaseF Behandlung. Die Probenkammern 5 bis 8 wurden in derselben Reihenfolge erneut mit 20 µl der jeweiligen Probe beladen. Als Proteinmarker wurde der PageRuler™ 170 kDa Marker verwendet. Die Auftrennung der Zelllysate erfolgte bei 140 Volt für 2 h. Anschließend wurde das Gel in der Mitte geteilt und die eine Hälfte mit Coomassie Färbelösung gefärbt und die andere Hälfte für den proHlyA Fluoreszenz-Blot verwendet.

Tabelle 9: Verwendete Puffer für den proHlyA Fluoreszenz-Blot

Gibco™ Trypsin-EDTA Lösung (gebrauchsfertig)	Gibco™ DPBS (gebrauchsfertig)
5,333 mM KCl	2,667 mM KCl
0,441 mM KH ₂ PO ₄	1,471 mM KH ₂ PO ₄
4,167 mM NaHCO ₃	137,931 mM NaCl
137,931 mM NaCl	8,060 mM Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O
0,336 mM Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	
5,556 mM D-Glucose	
0,913 mM EDTA-4Na · 2H ₂ O	
0,025 mM Phenolrot	
0,105 mM Trypsin	
RIPA (radioimmunoprecipitation assay) Puffer	
20,0 mM Tris pH 8,0	
0,5 % Na-Deoxycholat (w/v)	
13,7 mM NaCl	
10,0 % Glycerin (w/v)	
0,1 % SDS (w/v)	
2,0 mM EDTA	
200,0 µM Pefabloc® SC	
11,0 µM Leupeptin	
0,8 µM Aprotinin	
1,0 mM Na-Orthovanadat	

Für den Blot erfolgte zunächst ein Transfer der Proteine mittels *Semi-dry* Western Blot Apparatur auf eine Nitrozellulose-Membran für 1 h bei 20 mA. Anschließend wurden die unspezifischen Bindestellen der Membran durch die Inkubation mit 2,5 g BSA in 50 ml DPBS++ für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit DPBS++ wurde die Membran über Nacht mit insgesamt 200 µg proHlyA-A647 in 10 ml

DPBS++ bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran erneut mehrmals mit DPBS++ gewaschen und die Fluoreszenz bei 647 nm im Fusion-Detektionsgerät detektiert. Aufgrund der starken, unspezifischen Signale in allen Spuren auf der Membran wurde der Versuch mit einer 1 : 10 und einer 1 : 100 Verdünnung des noch nicht mit Trypsin behandelten Zelllysates in RIPA Puffer wiederholt. Das verdünnte Zelllysate wurde erneut mit PNGaseF verdaut, durch die SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die proHlyA-A647 Proteinkonzentration, mit der die Membran anschließend überschichtet wurde, blieb dabei unverändert.

5.1.9 ProHlyA Glykosphingolipidbindung in GUVs (*giant unilamellar vesicles*)

Für die Lipidmischungen, aus denen die GUVs (*giant unilamellar vesicles*) hergestellt wurden, wurden folgende Stammlösungen in Chloroform oder Chloroform-H₂O Gemischen eingesetzt: 5 mg/ml DOPC, 10 mg/ml Cholesterin und jeweils 1 mg/ml der Glykosphingolipide Gb3, GM1 und FSL-LewA. Die Zusammensetzung der Lipidmischungen mit 5 mol% des jeweiligen Glykosphingolipides und 20 mol% Cholesterin sind in Tabelle 10 angegeben. Von den Lipidmischungen wurden jeweils zweimal 7,5 µl auf einen Objektträger aufgetragen. Anschließend wurde aus zwei Objektträgern und Vitrex-Wachs eine mit 0,1 mg/ml Saccharose-lösung gefüllte abgeschlossene Kammer gebildet. Für die Elektroformation der GUVs wurde an die Objektträger eine Wechselspannung mit 11 Hz und 2 V für mindestens 3,5 h angelegt und danach die gebildeten GUVs aus den Kammern entnommen.

Tabelle 10: Zusammensetzung der Lipidmischungen für die GUVs

	Gb3 Mischung	GM1 Mischung	FSL-LewA Mischung
Glykosphingolipid (µl)	22,0	26,0	26,0
Cholesterin (µl)	4,7	4,0	4,1
DOPC (µl)	20,0	18,0	18,0
DHPE Texas Red (µl)	1,4	1,2	1,2
Chloroform (µl)	513,0	422,0	454,0

Als Positivkontrollen für die einzelnen Glykosphingolipidmischungen dienten das Lektin LecA für die Mischung mit Gb3, die B-Untereinheit des Cholera-toxins (CtxB) für die Mischung mit GM1 und das Lektin LecB für die Mischung mit FSL-LewA. Weiterhin wurden Beobachtungskammern aus zwei aneinander gelegten Objektträgern und geschmolzenem Parafilm vorbereitet. Die Beobachtungskammern wurden mit Saccharoselösung gespült und mit 200 µl Proteinlösung sowie 15 µl der geernteten GUVs gefüllt. Für die erste Beobachtung unter dem Konfokalmikroskop wurde proHlyA-A488 in DPBS++ mit einer Konzentration von 7,7 µg/ml eingesetzt, für alle weiteren Beobachtungen wurde proHlyA-A488 mit einer Konzentration von 77 µg/ml verwendet. Im Anschluss wurden die gefüllten Beobachtungskammern nach einer Inkubationszeit von 1,5 h bei Raumtemperatur erneut unter dem Konfokalmikroskop

betrachtet. Außerdem wurden die Beobachtungen mit 84 µg/ml proHlyA-A647 wiederholt. Als Positivkontrollen wurden die Lektine PA-IL und PA-IIL sowie die B-Untereinheit des Toxins CtxB aus *Vibrio cholerae* mit jeweils einer Konzentration von etwa 0,2 µg/ml eingesetzt.

5.1.10 ProHlyA Glykan Array zur Identifizierung von Zuckerinteraktionen

Der Glykan Array mit proHlyA-A488 wurde durch das Konsortium für funktionelle Glykomik (CFG, *Consortium for Functional Glycomics, Boston, USA*) durchgeführt. Dabei wurde proHlyA-A488 mit CFG Bindepuffer auf Konzentrationen von 5 µg/ml, 50 µg/ml und 200 µg/ml verdünnt und in dem CFG Glykan Array der Version 5.3 eingesetzt. Der Glykan Array besteht aus 600 unterschiedlichen, immobilisierten Mono- und Polysacchariden. Die Bindung des Proteins wurde nach der Inkubation der Zuckeroberfläche mit dem Protein über die Fluoreszenz von proHlyA nachgewiesen.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Klonierung von verschiedenen proHlyA-Cys Varianten

Für die spätere Markierung von proHlyA mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa 488 oder Alexa 647 wurde an drei verschiedenen Positionen im pSU-*hlyA* Plasmid ein für Alanin kodierendes Basentriplett durch ein für Cystein kodierendes Basentriplett ersetzt. Das Cystein an der entsprechenden Position stellt jeweils das einzige Cystein in der Proteinsequenz von HlyA dar. Die PCR zur Amplifizierung des Plasmides mit den entsprechenden Mutationen war für alle drei proHlyA-Varianten (A7C, A181C und A401C) bei mindestens einer der Annealingtemperaturen erfolgreich. Nach dem Verdau der methylierten DNA im PCR-Ansatz und Amplifizierung der neuen Plasmide in *E. coli*, wurde im Kontrollgel für die neuen Plasmide dasselbe Laufverhalten wie für das Ausgangsplasmid beobachtet. Die anschließende Sequenzierung der isolierten Plasmide, durch die Firma GATC Biotech AG, bestätigte den Basenaustausch GCA (Ala) oder GCT (Ala) zu TGC (Cys) an der gewünschten Position in der DNA-Sequenz des pSU-*hlyA* Plasmides.

5.2.2 Expression und Reinigung der proHlyA-Cys Varianten

Alle drei proHlyA-Cys Varianten wurden nach dem Protokoll für proHlyA Wildtyp in Anlehnung an das Protokoll von Thomas *et al.* (2014) in *E. coli* exprimiert und sekretiert [222]. Eine Probe der vereinten Fraktionen von proHlyA-Cys7 nach der Reinigung durch die SEC ist im SDS-Gel in Abbildung 1 zu sehen. Die Hauptbande zwischen der 100 und 120 kDa Markerbande stimmt mit dem Molekulargewicht von monomerem HlyA (110 kDa) überein. Eine schwache Bande oberhalb der 200 kDa Markerbande, entsprechend dem doppelten Molekulargewicht von HlyA, ist nur unter nicht reduzierenden Bedingungen (ohne DTT im SDS-Probenpuffer) zu erkennen. Die Ausbeute an proHlyA-Cys7 lag mit 20 mg aus 1 L Flüssigkultur im Bereich der Ausbeute von proHlyA Wildtyp. Die beiden anderen Proteine, proHlyA-Cys181 und proHlyA-Cys401, wurden ebenfalls sekretiert. Die Ausbeute für proHlyA-Cys181 betrug 22 mg, die Ausbeute für proHlyA-Cys401 betrug 25 mg aus 1 L Flüssigkultur. In Abbildung 1 ist des Weiteren ein SDS-Gel mit proHlyA nach der Markierung mit den Alexa Fluoreszenzfarbstoffen A488 und A647 über das Cystein an Position 7 dargestellt. In diesen Proben ist die Bande oberhalb der 200 kDa Markerbande unter nicht reduzierenden Bedingungen nur noch schwach zu erkennen. Weiterhin ist kein Abbau des Proteins zu beobachten. Nach der Markierung und Auftrennung der Proteine im SDS-Gel konnte eine Fluoreszenz für beide Proteine im Gel

auf der Höhe der proHlyA Bande nachgewiesen werden, weshalb von einer erfolgreichen Konjugation der Fluoreszenzfarbstoffe mit dem Protein ausgegangen werden kann. Die Filtereinstellungen bei der Detektion des mit Alexa 647 Farbstoff markierten proHlyAs waren nicht optimal und die Bande ist nur sehr schwach zu erkennen.

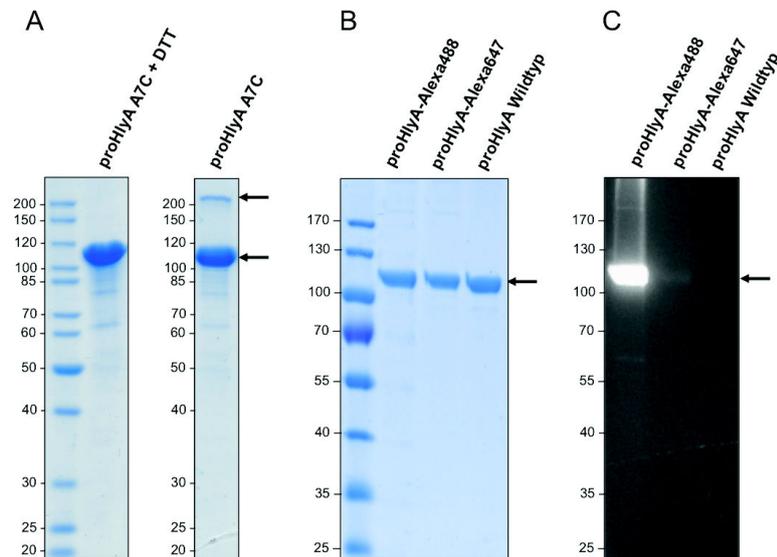


Abbildung 1: Reinigung und Markierung von proHlyA mit Alexa-Fluorophoren. A) SDS-Gel mit gereinigtem proHlyA-Cys unter reduzierenden (links) und nicht reduzierenden Bedingungen (rechts). B) Das über das Cystein an Position 7 mit Alexa-488 oder Alexa-647 markierte Protein nach der Reinigung. C) Fluoreszenz von proHlyA Alexa-488 und proHlyA Alexa-647 im SDS-Gel im Vergleich zum unmarkierten Protein.

5.2.3 *In vitro* Acylierungsassay zur Aktivitätsüberprüfung der Proteine

Um einen Einfluss der Cysteine oder der Fluoreszenzfarbstoffe auf die Aktivität von proHlyA auszuschließen, wurde das Protein *in vitro* acyliert und anschließend die hämolytische Aktivität auf Schaferythrozyten getestet. In dem dafür eingesetzten *in vitro* Acylierungsassay von Thomas *et al.* (2014) wurde proHlyA mit Harnstoff und EDTA denaturiert und durch die Acyltransferase HlyC in Anwesenheit von *E. coli* Rohextrakt als Acylkettendonator acyliert [222]. Nach der Inkubation des Acylierungsansatzes mit gewaschenen Schafblutzellen in einem Puffer zur Rückfaltung des Proteins, wurde die Freisetzung von Hämoglobin durch die Absorptionsmessung des Zentrifugationsüberstandes bei 544 nm gemessen. In Tabelle 11 sind die Absorptionswerte der 1 : 64 Verdünnungen des Überstandes in H₂O für proHlyA Wildtyp, proHlyA-Cys7, proHlyA-Cys181 und proHlyA-Cys401 angegeben. Für die Auswertung wurden die Messwerte um die Absorption der Hintergrundmessung (75 µl Waschpuffer, Mittelwert aus n = 2) korrigiert und auf den

Absorptionswert von proHlyA Wildtyp normiert (Mittelwert aus n = 3, entspricht 100 % hämolytischer Aktivität). Das Ergebnis ist in Abbildung 2 A dargestellt.

Tabelle 11: Absorptionswerte (A_{544nm}) zum Aktivitätsvergleich der proHlyA-Cys Varianten

	Messwert (Ansatz 1)	Messwert (Ansatz 2)	Messwert (Ansatz 3)
SDS (0,21 %)	1,151	1,022	1,046
ProHlyA Wildtyp	1,055	1,156	1,240
ProHlyA A7C	1,197	1,185	1,154
ProHlyA A181C	1,156	0,964	0,725
ProHlyA A401C	0,919	0,873	0,839
Ohne proHlyA	0,128	0,155	–
Ohne HlyA	0,130	0,163	–
Waschpuffer (75 μ l)	0,092	0,101	–

Die Absorptionswerte der 1 : 64 Verdünnungen des Überstandes in H₂O für die Messungen mit dem über das Cystein an Position 7 fluoreszenzmarkierten proHlyA sind in Tabelle 12 angegeben. Für die Auswertung wurden von den Absorptionswerten für proHlyA Wildtyp, proHlyA-A488 und proHlyA-A647 die Absorptionswerte der jeweiligen Hintergrundmessung ohne HlyC (jeweils Mittelwert aus n = 3) abgezogen. Von den Absorptionswerten der Kontrollen ohne HlyA und ohne HlyC wurde der Absorptionswert der Hintergrundmessung mit 75 μ l Waschpuffer (Mittelwert aus n = 3) abgezogen. Die Werte wurden anschließend auf den Wert für proHlyA Wildtyp normiert (Mittelwert aus n = 3, entspricht 100 % hämolytischer Aktivität). Das Ergebnis ist in Abbildung 2 B dargestellt.

Tabelle 12: Absorptionswerte (A_{544nm}) zum Aktivitätsvergleich von markiertem proHlyA

	Messwert (Ansatz 1)	Messwert (Ansatz 2)	Messwert (Ansatz 3)
SDS (0,21 %)	1,071	1,111	1,165
ProHlyA Wildtyp	1,107	0,987	1,163
ProHlyA-Alexa488	1,014	1,022	1,041
ProHlyA-Alexa647	1,050	1,010	0,998
ProHlyA Wildtyp, ohne HlyC	0,204	0,225	0,234
ProHlyA-Alexa488, ohne HlyC	0,148	0,188	0,113
ProHlyA-Alexa647, ohne HlyC	0,237	0,220	0,110
Ohne HlyA	0,164	0,272	0,192
Ohne HlyC	0,150	0,158	0,196
Waschpuffer (75 μ l)	0,117	0,128	0,238

Die Aktivitätsvergleiche der proHlyA-Cys Varianten sowie der markierten Proteine mit proHlyA Wildtyp sind in Abbildung 2 zusammen dargestellt. Die Ergebnisse der Markierungsreaktion werden im nächsten Abschnitt (Abschnitt 5.2.4) behandelt. Im Aktivitätsvergleich zeigt proHlyA-Cys7 dieselbe hämolytische Aktivität wie proHlyA Wildtyp (Abbildung 2 A). Die hämolytischen Aktivitäten von proHlyA-Cys181 und proHlyA-Cys401 sind im Vergleich zu proHlyA Wildtyp leicht reduziert. Die verminderte Aktivität kann durch eine unvollständige Acylierung des Proteins oder einen Rückgang der Hämolysefähigkeit verursacht werden.

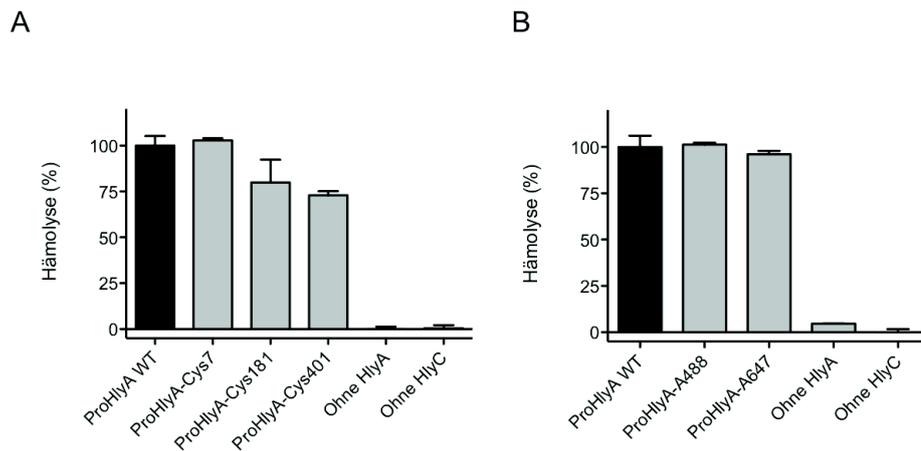


Abbildung 2: Hämolysische Aktivität der verschiedenen proHlyA-Varianten. A) Vergleich der proHlyA-Cys Varianten mit proHlyA Wildtyp. B) Vergleich von Alexa-Fluorophor-markiertem proHlyA mit proHlyA Wildtyp.

Für die Konjugationsreaktion mit den Alexa-Fluoreszenzfarbstoffen wurde proHlyA-Cys7 eingesetzt. Die hämolysischen Aktivitäten von proHlyA-A488 und proHlyA-A647 sind vergleichbar mit der hämolysischen Aktivität von proHlyA Wildtyp (Abbildung 2 B).

5.2.4 Markierung von proHlyA-Cys mit Alexa-Fluorophor

Die Proteinkonzentration und die Markierungseffizienz von markiertem proHlyA-Cys7 wurde über die Bestimmung der Absorption der verdünnten Proteinlösung bei 280 nm und bei 494 nm (für proHlyA-A488) oder 650 nm (für proHlyA-A647) berechnet (Tabelle 13). Für die Berechnung der molaren Proteinkonzentration wurde folgende Formel verwendet: $((A_{280\text{nm}} - (A_{494\text{nm}} \text{ oder } A_{650\text{nm}} \times \text{Spezifischer Korrekturfaktor})) \times \text{Verdünnungsfaktor}) / \text{Extinktionskoeffizient für HlyA bei 280 nm in H}_2\text{O}$. Die molare Proteinkonzentration wurde über das Molekulargewicht von HlyA in die Massenkonzentration mit der Einheit mg/ml umgerechnet. Für die Berechnung der Markierungseffizienz wurde folgende Formel verwendet: $(A_{494\text{nm}} \text{ bzw. } A_{650\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor}) / (\text{Extinktionskoeffizient für das Fluorophor bei 494 nm oder 650 nm} \times \text{molare Proteinkonzentration})$. Die theoretischen Angaben für das Molekulargewicht von HlyA und den Extinktionskoeffizienten von HlyA bei 280 nm in H₂O, wurden basierend auf der Aminosäuresequenz, mit dem Programm *EXPASy ProtParam* ermittelt [228]. Die theoretischen Angaben für die spezifischen Korrekturfaktoren und die Extinktionskoeffizienten von den Fluoreszenzfarbstoffen A488 und A647 wurden von den Herstellerangaben übernommen. Die Angaben und Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Berechnung der Proteinkonzentration und der Markierungseffizienz für proHlyA-A488 und proHlyA-A647. Die Absorptionswerte bei 280 nm und 494 nm oder 650 nm wurden experimentell bestimmt.

	ProHlyA-A488	ProHlyA-A647
Molekulargewicht HlyA (Da)	110145	110145
Extinktionskoeffizient von HlyA bei 280 nm in H ₂ O (M ⁻¹ cm ⁻¹)	81600	81600
Absorptionswert bei 280 nm	0,0640	0,0660
Absorptionswert bei 494 nm (A488) oder 650 nm (A647)	0,0630	0,1300
Spezifischer Korrekturfaktor für das jeweilige Fluorophor	0,11	0,03
Verdünnungsfaktor der gemessenen Proteinlösung	10	10
Proteinkonzentration (mg/ml)	0,77	0,84
Extinktionskoeffizient von A488 bei 494 nm (M ⁻¹ cm ⁻¹)	71000	–
Extinktionskoeffizient von A647 bei 650 nm (M ⁻¹ cm ⁻¹)	–	239000
Markierungseffizienz (Anteil)	1,27	0,71

Die Auswertung ergibt für das mit Alexa 488 markierte Protein eine Proteinkonzentration von 0,77 mg/ml und eine Markierungseffizienz von 127 % und für das mit Alexa 647 markierte Protein eine Proteinkonzentration von 0,84 mg/ml und eine Markierungseffizienz von 71 %. In Abbildung 1 im vorangegangenen Abschnitt (Abschnitt 5.2.2) ist das SDS-Gel nach der Konjugationsreaktion und Reinigung der beiden Proteine abgebildet.

5.2.5 ProHlyA Fluoreszenz-Blot mit Nierenepithelzelllysat

Zur Untersuchung einer zuckerabhängigen Bindung von proHlyA an glykosylierte Oberflächenproteine von Nierenepithelzellen wurde zunächst ein Zelllysat aus MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Anschließend wurde die Membran mit proHlyA überschichtet und die Bindung von proHlyA an die (glykosylierten) Proteine über die proHlyA Fluoreszenz detektiert. Durch den Vergleich des Bandenmusters von unbehandeltem Zelllysat mit Zelllysat das zuvor mit dem Enzym PNGaseF zur Abspaltung von N-gekoppelten Proteinglykosylierungen behandelt wurde, sollen potentielle Protein-Zucker-basierte Interaktionspartner von proHlyA identifiziert werden. Als Negativkontrolle dienten die zuvor mit Trypsin behandelten Zellen. Das SDS-Gel mit dem aufgetrennten Zelllysat sowie die Detektion von proHlyA auf der Membran sind in Abbildung 3 dargestellt. Aufgrund des starken Bandenmusters mit dem unverdünnten Zelllysat wurde das Experiment mit einem 1 : 10 und einem 1 : 100 verdünnten Zelllysat wiederholt.

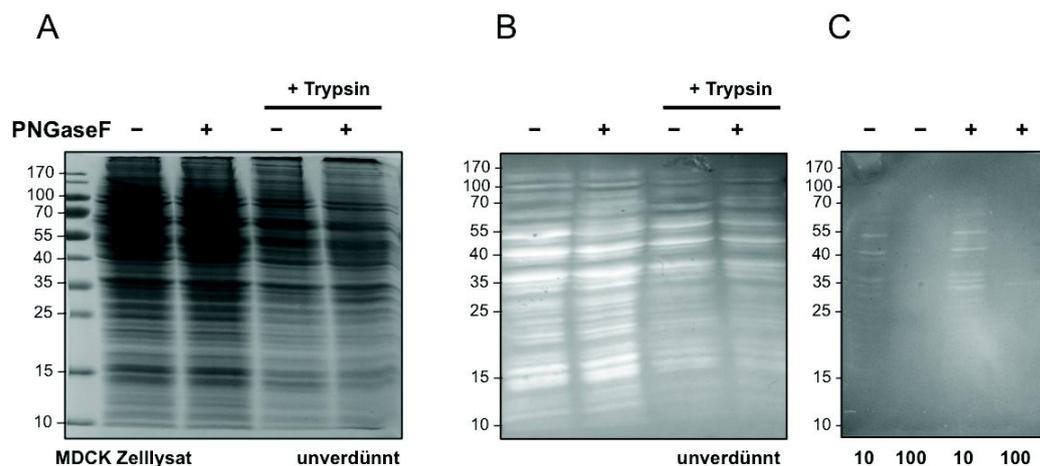


Abbildung 3: Ergebnisse des proHlyA Fluoreszenz-Blots. A) Coomassie-gefärbtes Gel mit den aufgetrennten MDCK Zelllysaten zur Kontrolle. B) Überschichtung des geblotteten Gels mit proHlyA-A488 und Detektion von gebundenem proHlyA über die Fluoreszenz des Proteins. C) Wiederholung des proHlyA Fluoreszenz-Blots aus B mit den 1 : 10 und 1 : 100 verdünnten MDCK Zelllysaten.

Das MDCK Zelllysate zeigt im Coomassie-gefärbten SDS-Gel eine Vielzahl von Proteinbanden (Abbildung 3 A). Das Bandenmuster im PNGaseF-behandelten Zelllysate unterscheidet sich nicht von dem des unbehandelten Zelllysates. Die Banden in den Trypsin-behandelten Zellen sind insgesamt schwächer als die Banden der unbehandelten Zellen. Im proHlyA Fluoreszenz-Blot sind ebenfalls eine Vielzahl unterschiedlich starker Banden zu erkennen (Abbildung 3 B). Abgeschwächte Banden sind in den Proben der Negativkontrolle mit den Trypsin-behandelten Zellen zu erkennen. Zur Identifizierung einer möglichen zuckerabhängigen Bindung von proHlyA an glykosylierte Oberflächenproteine der Zellen sind insbesondere Banden der nicht trypsinierten Zellen welche durch die Behandlung mit PNGaseF verschwinden von Interesse. Ein möglicher Kandidat ist die vergleichsweise starke Bande in Spur 1 knapp unter der 55 kDa Markerbande (Abbildung 3 B). Diese Bande ist in Spur 2 mit dem PNGaseF-behandelten Zelllysate schwächer als in Spur 1. Die Bande ist allerdings auch in den Proben der Trypsin-behandelten Zellen in Spur 3 und 4 vorhanden. Im proHlyA Fluoreszenz-Blot mit den 1 : 10 verdünnten Zelllysaten sind deutlich weniger Banden ersichtlicher als bei den unverdünnten Zelllysaten (Abbildung 3 C). Das Bandenmuster nach der PNGaseF Behandlung entspricht im Wesentlichen dem Bandenmuster der unbehandelten Zellen. Bei den 1 : 100 Verdünnungen der Zelllysate wurde, bis auf eine unspezifische Bande in Spur 4 bei der 35 kDa Markerbande, keine Fluoreszenz detektiert. Kontrollexperimente zur tatsächlichen Abspaltung der N-Glykosylierungen von den Proteinen durch die PNGaseF sowie zur Vollständigkeit des Verdauens mit Trypsin sind nicht verfügbar.

5.2.6 ProHlyA Glykosphingolipidbindung in GUVs (*giant unilamellar vesicles*)

Um die Bindung von proHlyA an Glykosphingolipide zu testen, wurden drei verschiedene Lipidmischungen mit den Glykosphingolipiden Gb3, GM1 und FSL-LewA für die Herstellung von GUVs verwendet. Die Bindung von fluoreszenzmarkiertem proHlyA an die Lipidvesikel wurde unter dem Konfokalmikroskop beobachtet. In Abbildung 4 A sind beispielhaft die Aufnahmen der Inkubation von proHlyA-A488 mit den GUVs der Glykosphingolipide Gb3, GM1 und FSL-LewA dargestellt.

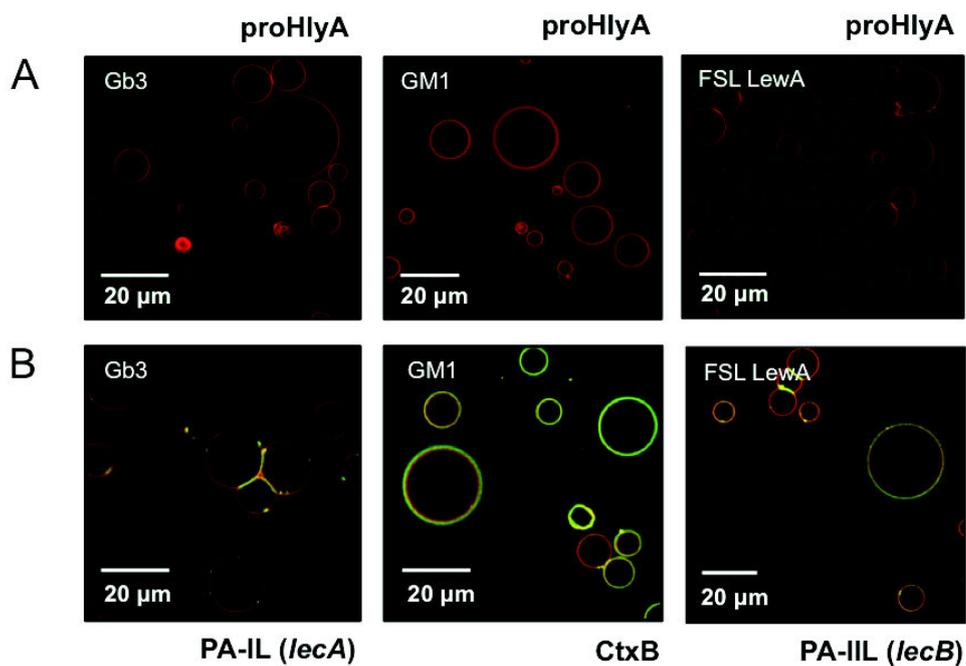


Abbildung 4: Ergebnisse der Bindungsexperimente mit proHlyA-A488 und verschiedenen Glykosphingolipiden in GUVs. A) ProHlyA-A488 (grün) in Anwesenheit der Glykosphingolipide Gb3, GM1 oder FSL-LewA in GUVs (rot). B) Kontrollversuche mit den Proteinen PA-IL und Gb3, CtxB und GM1 sowie PA-IIL und FSL-LewA.

In grüner Farbe ist die Proteinlösung und in roter Farbe sind die Lipidvesikel erkennbar. In keiner der Aufnahmen ist eine Verstärkung des grünen Signals oder eine Überlagerung des grünen Signals mit dem roten Signal in unmittelbarer Umgebung der GUVs oder in den Membranen der GUVs zu erkennen. Dementsprechend wurde keine Bindung von proHlyA an die Lipide und Glykosphingolipide der GUVs beobachtet. In Abbildung 4 B sind die Positivkontrollen mit bekannten, glykosphingolipidbindenden Proteinen dargestellt. In der ersten Aufnahme ist die Bindung von PA-IL an Gb3, in der zweiten Aufnahme die Bindung von CtxB an GM1 und in der dritten Aufnahme die Bindung von PA-IIL an FSL-LewA durch die Überlagerung der grünen und roten Signale an den Grenzflächen der GUVs zu erkennen.

5.2.7 ProHlyA Glykan Array zur Identifizierung von Zuckerinteraktionen

Zur weiteren Analyse einer möglichen Zuckerbindung von proHlyA wurde durch das Konsortium für funktionelle Glykomik (CFG, *Consortium for Functional Glycomics*, Boston, USA) der Glykan Array der Version 5.3 mit dem markierten Protein durchgeführt. Der Glykan Array besteht aus 600 unterschiedlichen, immobilisierten Einfach- und Mehrfachzuckern aus Säugetierzellen in 6-fach Replikaten. Die Bindung von proHlyA wurde über die Fluoreszenz des Proteins detektiert. Die Bindung von proHlyA wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (5 µg/ml, 50 µg/ml und 200 µg/ml) in CFG Bindepuffer getestet. Dabei sind Fluoreszenzsignale von bis zu 50 000 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU, *relative fluorescence units*) für glykanbindende Proteine nicht unüblich [262]. Mit 5 µg/ml proHlyA-A488 war kaum eine Bindung des Proteins an die immobilisierten Zucker zu erkennen. Die beiden Zucker mit den höchsten relativen Fluoreszenzsignalen waren die mit den Nummern 142 und 597 aus dem Glykan Array. Mit 50 µg/ml proHlyA zeigten einzelne weitere Zucker eine etwas stärkere Fluoreszenz als die Hintergrundfluoreszenz (Nummer 142, 147, 496, 513, 539, 580 und 597). In der Analyse mit 200 µg/ml proHlyA sind diese noch deutlicher zu erkennen und zusammen mit dem grafischen Ergebnis des Glykan Arrays 5.3 mit 200 µg/ml proHlyA in Abbildung 5 dargestellt. In der Auswertung wurde das jeweils höchste und niedrigste Signal der 6-fach Replikate nicht berücksichtigt. Die Abbildung zeigt die mittleren Fluoreszenzintensitäten aus $n = 4$ für jeden Zucker. Mit der höchsten proHlyA-A488 Konzentration (200 µg/ml) nimmt die Signalstärke insgesamt zu. Die höchsten Fluoreszenzsignale liegen im Bereich von 700 RFU. In allen Zuckern ist der Einfachzucker Galactose vorhanden. Weiterhin kommen häufig die Einfachzucker GlcNAc und GalNAc vor. Eine Gemeinsamkeit in den 30 Glykanen mit den höchsten relativen Fluoreszenzsignalen ist ebenfalls das Vorhandensein von Galactose. Außerdem kommt in allen bis auf eine Zuckerverbindung GlcNAc vor. Galactose und GlcNAc sind in jeweils 75 % aller Zuckerverbindungen des Glykan Arrays vorhanden.

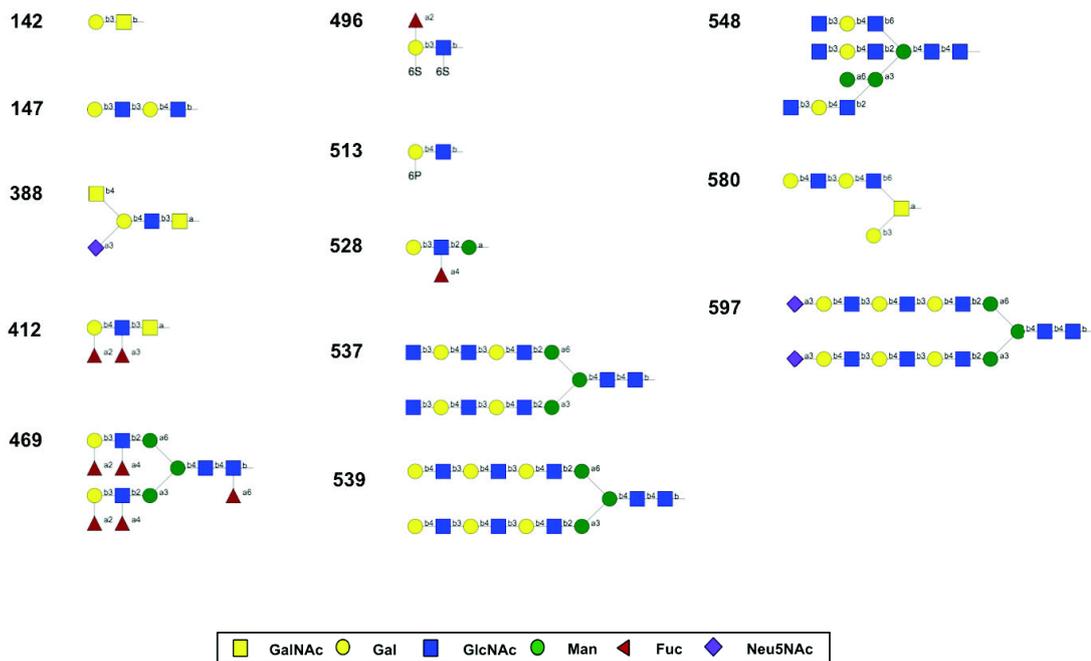
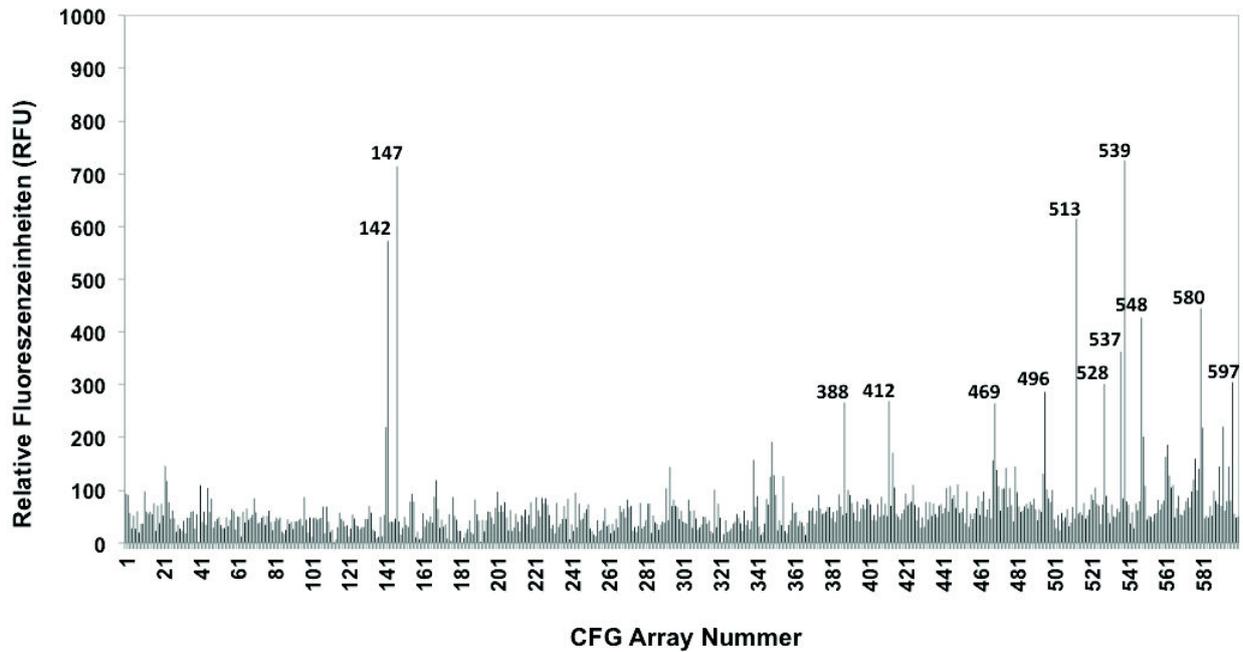


Abbildung 5: Ergebnis des CFG Glykan Arrays mit 200 µg/ml proHlyA-A488 (oben). Symbolische Nomenklatur der 13 gekennzeichneten Zuckerstrukturen mit a = α und b = β (unten). Symbolische Nomenklatur übernommen aus [263].

In Tabelle 14 sind die 30 Zucker mit den höchsten Fluoreszenzsignalen aus der Analyse mit 200 µg/ml proHlyA tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 14: Ergebnis des CFG Glykan Arrays 5.3 mit 200 µg/ml proHlyA-A488. Angegeben sind die 30 Zucker mit den höchsten, mittleren Fluoreszenzsignalen und deren Standardabweichung.

Array Nummer	IUPAC der Glykane	Mittelwert RFU	STA
539	Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp12	726	92
147	Galb1-3GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb-Sp0	714	54
513	(6P)Galb1-4GlcNAcb-SP0	615	96
142	Galb1-3GalNAcb-Sp8	573	46
580	Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-3)GalNAca-Sp14	445	22
548	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp24	427	13
537	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp12	363	58
597	Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp12	305	312
528	Fuca1-4(Galb1-3)GlcNAcb1-2 Mana-Sp0	302	41
496	Fuca1-2(6S)Galb1-3(6S)GlcNAcb-Sp0	287	94
412	Fuca1-2Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb1-3GalNAca-Sp14	269	21
388	GalNAcb1-4(Neu5Aca2-3)Galb1-4GlcNAcb1-3GalNAca-Sp14	266	24
469	Fuca1-2Galb1-3(Fuca1-4)GlcNAcb1-2Mana1-6(Fuca1-2Galb1-3(Fuca1-4)GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp19	265	22
592	Neu5Aca2-6Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-3)GalNAca-Sp14	221	8
141	Galb1-3GalNAca-Sp16	220	220
581	Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3)GalNAca-Sp14	219	71
549	Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Mana1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp24	202	11
349	GlcNAcb1-2Mana1-6(GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp22	192	51
562	Galb1-3GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-3GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(Galb1-3GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	187	63
414	GalNAca1-3(Fuca1-2)Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb1-3GalNAcb-Sp14	171	14
561	Galb1-3GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-3GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(Galb1-3GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	164	9
577	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-	160	31

	4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24		
339	GlcNAca1-4Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb1-3Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb-Sp0	158	23
468	Fuca1-2Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb1-2Mana1-6(Fuca1-2Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	157	9
22	6S(3S)Galb1-4(6S)GlcNAcb-Sp0	146	3
480	Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	146	19
590	Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-3)GalNAca-Sp14	145	10
595	Neu5Aca2-6Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Neu5Aca2-6Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3)GalNAca-Sp14	145	52
294	4S(3S)Galb1-4GlcNAcb-Sp0	144	15
475	Neu5Aca2-6Galb1-4GlcNAcb1-6GalNAca-Sp14	142	24

6 Diskussion

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Acylierung, Struktur und Funktion von HlyA aus uropathogenen *Escherichia coli*. HlyA wird als Protoxin produziert und durch die Acyltransferase HlyC posttranslational modifiziert. Nach erfolgter Sekretion aus den Bakterien in das umliegende Gewebe nimmt das Protein seinen aktiven Faltungszustand an und wirkt auf unterschiedliche Zielzellen des Wirtsorganismus ein.

Das erste Kapitel dieser Arbeit befasste sich mit der Wirkung von Häm auf die Enzymaktivität von HlyC. Häm besitzt neben seiner bestens bekannten Funktion als prosthetische Gruppe auch eine regulatorische Funktion, welche durch eine transiente Bindung an Proteine realisiert wird. Das Ziel war die Untersuchung der Acyltransferaseaktivität von HlyC in An- und Abwesenheit von Hämin. Dafür wurde HlyC rekombinant hergestellt und gereinigt, wobei durch ein verändertes Expressions- und Reinigungsprotokoll die Koaufrreinigung des Substrates acyl-ACP mit HlyC möglich war. Durch die Optimierung eines bereits früher verwendeten *in vitro* Acylierungsassays und die anschließenden Messungen der Enzymaktivität in Anwesenheit von Hämin, konnte erstmalig eine Hemmung der Acyltransferaseaktivität von HlyC gezeigt werden. Die Hemmung von HlyC durch Hämin wird hier vor dem Hintergrund der Hämolysfunktion von HlyA diskutiert und ein neues Modell zur Regulation der Eisenhomöostase in hämolysierenden Bakterien aufgestellt.

Das zweite und dritte Kapitel dieser Arbeit beschäftigten sich mit der Aufklärung von strukturellen und funktionellen Eigenschaften von HlyA im Kontext der Interaktion des Toxins mit seinen Zielzellen. Zunächst werden hier die Herausforderungen der Kristallisation von proHlyA und HlyA sowie der daraus resultierenden Limitationen für die Röntgenstrukturanalyse aus dem zweiten Kapitel dieser Dissertation diskutiert. Anschließend wird auf die Ergebnisse aus den Experimenten zur Identifizierung einer möglichen Glykanbindung durch proHlyA aus dem dritten Kapitel eingegangen. Mit dem gereinigten und mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Protoxin konnte keine spezifische Zuckerbindung festgestellt werden. Mögliche Ursachen und Erklärungen hierfür werden im letzten Abschnitt erörtert.

6.1 Acylierung von proHlyA durch die Acyltransferase HlyC

Die Acyltransferasefunktion von HlyC wurde Mitte der 1980er Jahre entdeckt und in einen essentiellen Zusammenhang mit der Hämolysefunktion von HlyA gebracht [43] [52]. Die Acylierung erfolgt dabei posttranslational durch den Transfer von gesättigten Fettsäuren von dem Acylgruppen-tragenden Protein acyl-ACP auf zwei spezifische Lysinseitenketten des Protoxins [55] [56]. Unklar ist weiterhin, in welchen stöchiometrischen Verhältnissen und in welcher Reihenfolge die drei an der Reaktion beteiligten Komponenten HlyC, proHlyA und acyl-ACP miteinander interagieren [61]. Aus der vor kurzem aufgeklärten, dreidimensionalen Struktur der bakteriellen Acyltransferase ApxC, konnte die Dimerstruktur von HlyC abgeleitet werden [61]. Des Weiteren werden in proHlyA unabhängig voneinander zwei spezifische, durch 127 Aminosäuren voneinander getrennte Lysinreste, in einem weitestgehend ungefalteten Zustand des Proteins, acyliert [56] [222]. Denkbar wäre daher eine Acylierung von zwei Lysinen aus einem oder von zwei Lysinen aus zwei unterschiedlichen proHlyA Molekülen durch ein HlyC Dimer. Eine Regulation der Acyltransferaseaktivität von HlyC und homologen Enzymen auf Proteinebene ist bisher nicht bekannt.

6.1.1 Ein verändertes Expressions- und Reinigungsprotokoll für HlyC ermöglicht die Koaufrreinigung von ACP

Der in unserem Institut bisher eingesetzte *in vitro* Assay zur Acylierung von proHlyA benötigte den Zusatz von Rohextrakt aus *Escherichia coli* zur Bereitstellung von acyl-ACP. Versuche zur Herstellung und Reinigung von acyl-ACP sind aufwendig und wurden bisher nicht unternommen. *In vivo* werden dafür die beiden Enzyme Holo-ACP Synthase und Acyl-ACP Synthetase benötigt, wobei erstere die prosthetische Gruppe Phosphopantethein (4'-PP) von acetyl-Coenzym A auf das Apoprotein überträgt und letztere die Bindung von Acylgruppen an 4'-PP katalysiert, wodurch schließlich acyl-ACP generiert wird [90] [91] [92]. Eine alternative Option, die sich im Rahmen dieser Arbeit ergab, war die Koaufrreinigung von acyl-ACP und HlyC. Die Expression von HlyC erfolgte, im Gegensatz zu dem früher beschriebenen Herstellungsprotokoll nach Thomas *et al.* (2014), in Abwesenheit des Substrates proHlyA und bei einer niedrigeren Expressionstemperatur [222]. Durch die Verwendung eines pET-Expressionssystems in *E. coli* BL21(DE3) und der Reduktion der Expressionstemperatur konnte die Bildung von Einschlusskörpern mit dem überexprimierten Protein vermieden und ein Teil von HlyC in Lösung gehalten werden [264]. Nach der Reinigung des löslichen Proteins durch eine Nickelionen-

Affinitätschromatographie, über die C-terminale His-Sequenz von HlyC und eine anschließende Größenausschlusschromatographie war eine zusätzliche Proteinbande zwischen der 10 kDa und 15 kDa Markerbande im SDS-Gel zu erkennen. Die Intensität der Bande nahm nach der Abspaltung der C-terminalen His-Sequenz und den weiteren Reinigungsschritten, über eine reverse Nickelionen-Affinitätschromatographie und eine abschließende Größenausschlusschromatographie, verhältnismäßig zur HlyC Bande bei 20 kDa im SDS-Gel weiter zu. Durch die massenspektrometrische Analyse der tryptisierten Proteine aus der ausgeschnittenen Gelbande konnten in einer ersten Analyse zehn Peptide aus HlyC und neun Peptide aus ACP identifiziert werden (Tabelle 1). In einer weiteren Analyse der zusätzlichen Gelbande bei 15 kDa aus einer anderen Aufreinigung von HlyC, wurden 32 Peptide aus HlyC, drei Peptide aus ACP und zwei Peptide aus zwei weiteren *E. coli* Proteinen identifiziert. Während die Peptide aus der ersten Analyse die gesamte Aminosäuresequenz von ACP abdeckten, befanden sich in der zweiten Analyse überwiegend N-terminale Peptide von ACP. Die Peptide von HlyC stammten großteils aus den zentralen Bereichen des Proteins.

Tabelle 1: Prozentuale Anteile an der Gesamtzahl der identifizierten Peptide

	HlyC	ACP	Andere Proteine
Bande zwischen 10 und 15 kDa	53 %	47 %	0 %
Bande bei 15 kDa	73 %	7 %	20 %

Eine Aussage über die an der Bindung von acyl-ACP an HlyC beteiligten Aminosäuren von HlyC kann aus den identifizierten Peptiden nur bedingt getroffen werden. An der starken Bindung von acyl-ACP an HlyC während der gesamten Reinigung scheinen demnach überwiegend die Aminosäuren rund um das postulierte, aktive Zentrum von HlyC (Aminosäuren His24, Asn35, Asp93, Arg121) beteiligt zu sein [61]. Aus dem N-terminalen Bereich von HlyC bis einschließlich der Aminosäure 25, dessen α -Helix im Homologiemodell als Dimerinteraktionsfläche dient, wurden keine Peptide gefunden (Abbildung 1) [61]. Ebenso wurden in den Analysen keine Peptide aus dem C-terminalen Bereich von HlyC gefunden (Aminosäuren 140 bis einschließlich 170), in dessen α -Helix das postulierte Häm-Bindemotiv mit den Aminosäuren 147 bis 155 liegt [61] [108]. Die massenspektrometrische Analyse der Bande zwischen 10 und 15 kDa lässt, aufgrund der Anzahl der identifizierten Peptide, die Annahme eines 1 : 1 stöchiometrischen Bindungsverhältnisses von HlyC : acyl-ACP zu. Dieses konnte durch die zweite Analyse der Bande bei 15 kDa jedoch nicht bestätigt werden. Das Laufverhalten der zusätzlichen Bande zwischen 10 und 15 kDa im SDS-Gel hängt stark von den Fraktionen ab, die während der einzelnen Reinigungsschritte vereint werden. Weiterhin bestätigte die Ko-

aufreinigung von acyl-ACP frühere Forschungsergebnisse, wonach HlyC in Abwesenheit des Substrates proHlyA zunächst in der Lage ist, acyl-ACP zu binden und anschließend in Anwesenheit des Substrates zur Acylierung desselben imstande ist [94]. Eine sequenzieller Reaktionsmechanismus, bei dem HlyC mit gebundenem acyl-ACP auf proHlyA trifft und einen ternären Komplex bildet, oder ein Reaktionsmechanismus, bei dem in einem ersten Zwischenschritt ein stabiles acyl-HlyC Zwischenprodukt entsteht, sind zwei mögliche Erklärungen für die Beobachtung der Bindung von acyl-ACP an HlyC. Beide Erklärungen stehen im Einklang mit den bisher postulierten Reaktionsmechanismen für HlyC [68] [94]. Die in diesem Zusammenhang bereits früher diskutierte Frage, ob es sich bei der Bindung von ACP an HlyC um ein Artefakt in Abwesenheit von proHlyA handelt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

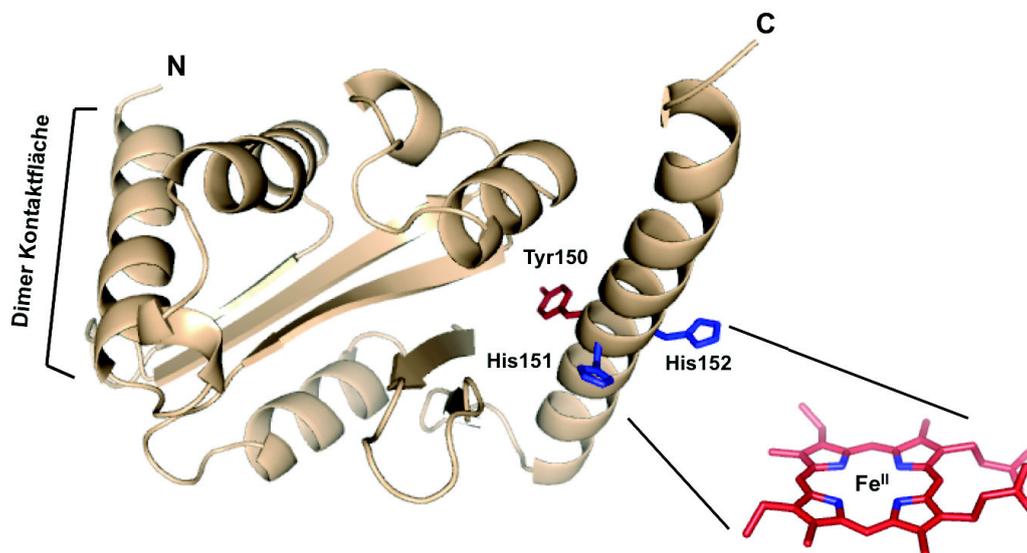


Abbildung 1: Homologiemodell für HlyC

Dargestellt sind die Interaktionsfläche von zwei HlyC Molekülen im N-terminalen Bereich des Proteins sowie der postulierte Interaktionsbereich mit Häm mit den potentiell Eisen-koordinierenden Aminosäuren Tyr150, His151 und His152 im Häm-bindenden Nonapeptid im C-terminalen Bereich des Proteins [61] [108].

6.1.2 Enzymkinetik von HlyC für das Substrat proHlyA und Implikationen für den Reaktionsmechanismus

Zur Bestimmung der Enzymkinetik von gereinigtem HlyC und dem koaufgereinigten acyl-ACP wurde der bereits veröffentlichte *in vitro* Acylierungsassay von Thomas *et al.* (2014) ohne Zusatz von *Escherichia coli* Rohextrakt verwendet [222]. Der Transfer von Acylgruppen vom Acylgruppen-tragenden Protein acyl-ACP auf das Substrat proHlyA

durch die Acyltransferase HlyC wurde bereits früher vollständig durch eine Michaelis-Menten Kinetik beschrieben [94]. Der im Zuge dieser Arbeit ermittelte Wert für die Michaelis-Menten Konstante (K_M) von HlyC für proHlyA beträgt $0,14 \pm 0,04 \mu\text{M}$ und liegt in dem bereits früher beschriebenen Wertebereich. Der Literaturwert für den Transfer von Myristinsäure (C_{14}) liegt für proHlyA bei $0,94 \mu\text{M}$, der Literaturwert für den Transfer von Palmitinsäure (C_{16}) liegt bei $0,027 \mu\text{M}$ [94] [95]. Die Länge der Acylgruppen des kogereinigten acyl-ACPs aus *Escherichia coli* ist unbekannt, basierend auf früher publizierten Daten zur *in vivo* Acylierung kann jedoch von einer Mischung unterschiedlicher Fettsäuren mit einem überwiegenden Anteil an C_{14} -Gruppen ausgegangen werden [59]. Die Abweichung in Richtung einer stärkeren Bindung durch den hier bestimmten K_M -Wert für proHlyA von dem publizierten Wert für Myristinsäure kann durch eine Mischung verschiedener Acylgruppen erklärt werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} für die Übertragung von Acylgruppen auf proHlyA wurde in dem hier verwendeten Aktivitätsassay nur indirekt, über die Absorption der aus der Acylierung resultierenden, hämolytischen Aktivität von HlyA, bestimmt und wird hier nicht weiter diskutiert. Die Beschreibung der Acylgruppentransferaseaktivität von HlyC durch die Michaelis-Menten Analyse wurde früher im Zusammenhang mit einem Reaktionsmechanismus, bei dem die beiden Substrate acyl-ACP und proHlyA simultan mit dem Enzym reagieren, bevor es zu einer Freisetzung der Produkte kommt, interpretiert [94]. Die Kinetik des gereinigten HlyCs mit dem gebundenen, koaufgereinigten acyl-ACP deckt sich mit dem bereits früher beschriebenen Verhalten des Proteins bei externer Zugabe von acyl-ACP. Dementsprechend wurde der HlyC–acyl-ACP Komplex ohne zusätzliche Zugabe von acyl-ACP für die weiteren Messungen der Enzymaktivität in Anwesenheit von Hämin eingesetzt.

6.1.3 Ein optimierter *in vitro* Acylierungsassay zur Aktivitätsmessung von HlyC in Anwesenheit von Hämin

Die Grundlage für die Messungen der Acyltransferaseaktivität in Anwesenheit von Hämin bildete der *in vitro* Acylierungsassay von Thomas *et al.* (2014) [222]. Für die Messungen mit Hämin wurden einige Änderungen im Protokoll vorgenommen. Die Möglichkeit der Koaufrreinigung von acyl-ACP und HlyC ermöglichte die Durchführung des Assays in Abwesenheit des Acyl-ACP Rohextraktes aus *Escherichia coli*, wodurch eine ausreichende Spezifität des Assays für die Messungen mit Hämin sichergestellt werden konnte. Bis zu einer eingesetzten HlyC–acyl-ACP Gesamtmenge von $0,36 \mu\text{g}$ wurde ohne Zusatz von acyl-ACP eine vollständige Lyse von $0,5 \text{ ml}$ Schaferythrozyten erreicht, während sich die hämolytische Aktivität mit geringeren Mengen reduzierte. Dabei wird ange-

nommen, dass eine reduzierte, hämolytische Aktivität aus einer verminderten Acylierung des Protoxins resultiert, welche mit geringeren HlyC–acyl-ACP Gesamtmengen wahrscheinlich durch die limitierte Bereitstellung von acyl-ACP verursacht wurde. Wird zur Vereinfachung der Anteil an acyl-ACP in der eingesetzten HlyC–acyl-ACP Proteingemessung nicht berücksichtigt, wurden in den weiteren Messungen 0,23 μM HlyC in dem 75 μl Acylierungsansatz eingesetzt. Vom Substrat proHlyA wurden mit 1,21 μM proHlyA im 75 μl Acylierungsansatz ein in etwa fünffacher, molarer Überschuss an Substrat eingesetzt, wobei bereits ab 9,5 pM HlyA von einer 50%igen, hämolytischen Aktivität des Toxins auszugehen ist [18]. Nimmt man weiterhin eine 1 : 1 Bindung von acyl-ACP an HlyC und eine einfache oder zweifache Acylierung von proHlyA durch HlyC–acyl-ACP an, so werden mit einem Acylierungsansatz 17,42 pmol einfach oder 8,71 pmol zweifach acylierte HlyA-Moleküle bereitgestellt. Bei der Reduktion der eingesetzten HlyC–acyl-ACP Gesamtmenge in dem Reaktionsansatz auf ein Viertel, nahm die hämolytische Aktivität um etwa die Hälfte ab. Für die weiteren Messungen mit Hämin wurde mit einer HlyC–acyl-ACP Gesamtmenge von 0,36 μg die geringste Enzymmenge ausgewählt, mit der gerade noch eine vollständige Hämolyse zu erreichen war. In einem zweiten Optimierungsschritt wurde die Acylierungszeit angepasst. Um die Messung einer stimulierenden oder inhibierenden Wirkung von Hämin auf die Acyltransferaseaktivität von HlyC zu ermöglichen, wurde die ursprüngliche Acylierungszeit von 1 h reduziert. Für die Messungen mit Hämin wurde eine Acylierungszeit von 5 min gewählt, da hier noch keine vollständige Lyse der Zellen zu beobachten war und dadurch eine Aktivitätsmessung ermöglicht. Die Hämolysezeit wurde auf 30 min reduziert, da darüber hinaus keine Zunahme der Hämolyse mehr zu beobachten war. Weiterhin wurde im letzten Schritt auf den Zusatz von EDTA im proHlyA Denaturierungspuffer verzichtet, um eine Komplexbildung des Eisen-Zentralatoms von Hämin durch EDTA auszuschließen. Da proHlyA in einem weitestgehend ungefalteten Zustand acyliert wird und erst die Bindung von Calciumionen in der RTX-Domäne die native Faltung des Proteins bewirkt, wurde der Acylierungsassay von Thomas *et al.* (2014) ursprünglich mit entfaltetem proHlyA in Denaturierungspuffer mit EDTA und Harnstoff durchgeführt [42] [222]. Der Rückgang der hämolytischen Aktivität ohne EDTA im Denaturierungspuffer um die Hälfte im Vergleich zu dem vollständig denaturierten Protein aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, sowie die hämolytische Restaktivität von 10 bis 20 % ohne EDTA und ohne Harnstoff im Denaturierungspuffer, stimmen daher mit dem bisherigen Kenntnisstand weitestgehend überein. Da außerdem das Eisen-Zentralatom von Hämin in der Lage ist, His-basierte Sequenzmotive zu koordinieren, wurde der *in vitro* Acylierungsassay mit HlyC nach der Abspaltung der für die Reinigung benötigten, C-terminalen His-Sequenz durchgeführt

[108]. Dadurch sollte eine unspezifische Bindung von Hämin an diese Sequenz unterbunden werden.

6.1.4 Inhibierung der Enzymaktivität von HlyC durch Hämin und andere Häm-Derivate

Die Acyltransferase HlyC wird in *Escherichia coli* durch einen gemeinsamen Promotor in etwa äquimolaren Mengen zum Substrat proHlyA exprimiert [135] [265]. Eine Regulation der Acyltransferaseaktivität von HlyC auf Proteinebene ist bisher nicht bekannt. Basierend auf einem in HlyC vorhandenen Sequenzmotiv, wurde in der vorliegenden Arbeit in Kooperation mit der Forschungsgruppe von Frau Prof. Imhof, von der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Häm als möglicher, regulatorischer Faktor der Enzymaktivität von HlyC untersucht [108] [266]. Häm wird von Bakterien durch komplexe Transportsysteme aktiv aufgenommen und ist eine essentielle Nährstoffquelle für Eisen [112] [117]. Das postulierte Häm-bindende Motiv in HlyC wurde durch eine *ExPASy Prosite Scan* basierte Proteindatenbanksuche mit zuvor erstellten Konsensussequenzen zur Häm-Bindung gefunden [108] [267]. Dieses Vorgehen hat bereits früher zur Vorhersage und Bestätigung der Häm-Bindung an die humane Dipeptidylpeptidase 8, an das Ferrous iron transport Protein B (FeoB) aus *E. coli* und an die Chloramphenicol Acetyltransferase aus *E. coli* geführt [106] [108] [268]. Die Bindung von Hämin an das postulierte Häm-Bindemotiv FKQYHHELI im C-terminalen Bereich von HlyC wurde, im Vorfeld zu den hier beschriebenen Untersuchungen, durch eine Änderungen im UV-Vis Differenzspektrum von Hämin in Anwesenheit des synthetisierten Nonapeptides gezeigt [108]. Weiterhin wurde die Bindung von Hämin an das gesamte Protein mit dem von uns bereitgestellten, gereinigten HlyC durch UV-Vis Spektroskopie nachgewiesen und dabei ein K_D -Wert von $\approx 10 \mu\text{M}$ bestimmt (noch nicht publizierte Daten). Eine Abnahme der intrinsischen Fluoreszenz von $0,8 \mu\text{M}$ HlyC nach Zugabe von Hämin ($0 - 20 \mu\text{M}$) durch statisches und dynamisches Fluoreszenzquenching lieferte einen weiteren Hinweis auf die Bindung von Hämin an HlyC (noch nicht publizierte Daten). Mit dem von uns bereitgestellten, gefalteten proHlyA wurde hingegen mittels UV-Vis Spektroskopie keine Hämin-Bindung beobachtet (noch nicht publizierte Daten). Entsprechend dieser, durch die Forschungsgruppe von Frau Prof. Imhof durchgeführten, Vorversuche zur Häminbindung an HlyC sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein möglicher Einfluss der Bindung auf die Acyltransferaseaktivität von HlyC untersucht werden. Die Messungen der Enzymaktivität wurden mit dem in Abschnitt 3.1.9 beschriebenen, optimierten *in vitro* Acylierungsassay realisiert [222]. Die Enzymaktivitäten von HlyC Wildtyp und HlyC H151A

H152A, ohne die potentiellen Koordinationsstellen H151 und H152 wurden mit unterschiedlichen Hämin-Konzentrationen bestimmt. Hämin (Fe(III)-Protoporphyrin IX) wurde ausgewählt, da freies Häm, nach der Freisetzung aus den Proteinen, im Organismus überwiegend in seiner oxidierten Form als Hämin vorliegt [98]. Darüber hinaus wurden einzelne Messungen mit weiteren Häm-Derivaten durchgeführt.

Veränderte Enzymaktivität von HlyC nach Zugabe von Hämin in den Vorversuchen: Für die Aktivitätsmessungen von HlyC in An- und Abwesenheit von Hämin wurde ein zusätzlicher, vorgelagerter Inkubationsschritt von HlyC mit Hämin (0 – 100 μM) eingeführt. Die Konzentrationsangaben für Hämin beziehen sich jeweils auf den 75 μl Acylierungsansatz mit proHlyA. Die Positivkontrolle mit 0,21 % SDS in H_2O zeigte in den Vorversuchen trotz vollständiger Lyse der Zellen eine im Vergleich zu den Messungen mit acyl-HlyA niedrigere Absorption. Dies ist auf eine Assay-bedingte (längere) Inkubation der lysierten Zellen mit den Proteinen zurückzuführen, wodurch im Vergleich zur Inkubation mit SDS eine dunklere Färbung des Überstandes zu beobachten war. Besonders hohe Absorptionswerte im Vergleich zur SDS-Positivkontrolle wurden durch eine intensive Färbung des Überstandes mit den acyl-HlyA Kontrollen erreicht. Die exakte Ursache hierfür ist unbekannt, liegt aber möglicherweise in Reaktionen von Komponenten aus den lysierten Zellen mit den (unterschiedlichen) Puffersubstanzen im Acylierungsansatz. Im Hauptversuch mit Hämin wurden identische Reaktionsansätze verglichen – einzige Abweichung war die in 30 μl NaOH gelöste Hämin-Konzentration. Die Hintergrundabsorption durch die geringe Eigenabsorption von Hämin im Messbereich bei 544 nm wurde in den Vorversuchen für alle Hämin-Konzentrationen bestimmt, konnte jedoch im Hauptversuch vernachlässigt werden. Bei den Negativkontrollen mit 33 μM Hämin, ohne HlyC, ohne proHlyA oder ohne proHlyA in Anwesenheit von 100 μM Hämin, war keine hämolytische Aktivität zu beobachten. Ebenso zeigte 33 μM Hämin alleine keine Auswirkungen auf die Rückfaltung und die hämolytische Aktivität von acyl-HlyA. Die eingesetzte acyl-HlyA Konzentration lag dabei bei 9 bis 10 μM . Entsprechend der Vorversuche zur Messung der Enzymaktivität von HlyC in Anwesenheit von Hämin kann ab einer Hämin-Konzentration von 10 μM im Acylierungsansatz (entspricht 25 μM Hämin während der Vorinkubation von HlyC mit Hämin) von einer Inhibition der Acyltransferaseaktivität ausgegangen werden. Weiterhin ist bis einschließlich 66 μM Fe^{2+} von keiner Enzyminhibition auszugehen. Von zentraler Bedeutung für die Hemmung des Enzyms ist daher wahrscheinlich der Protoporphyrinring von Hämin. Mögliche Ursachen und Folgen der Hemmung von HlyC durch Hämin werden in den nächsten Abschnitten weiter erläutert und diskutiert.

IC₅₀-Wertbestimmung für die Hemmung der Enzymaktivität von HlyC durch Hämin: Im Hauptversuch wurde mit 0,23 μM HlyC ein IC_{50} -Wert für Hämin von $5,19 \pm 0,12 \mu\text{M}$, bezogen auf den 75 μl Acylierungsansatz, bestimmt (Abbildung 2). Dies entspricht einem IC_{50} -Wert von 12,97 μM , bezogen den 30 μl Ansatz während der Vorinkubation von HlyC mit Hämin. Der Wert liegt nahe an dem K_D -Wert für die Bindung von Hämin an HlyC von $\approx 10 \mu\text{M}$, der zuvor durch die Forschungsgruppe von Frau Prof. Imhof mittels UV-Vis Spektroskopie bestimmt wurde (noch nicht publizierte Daten).

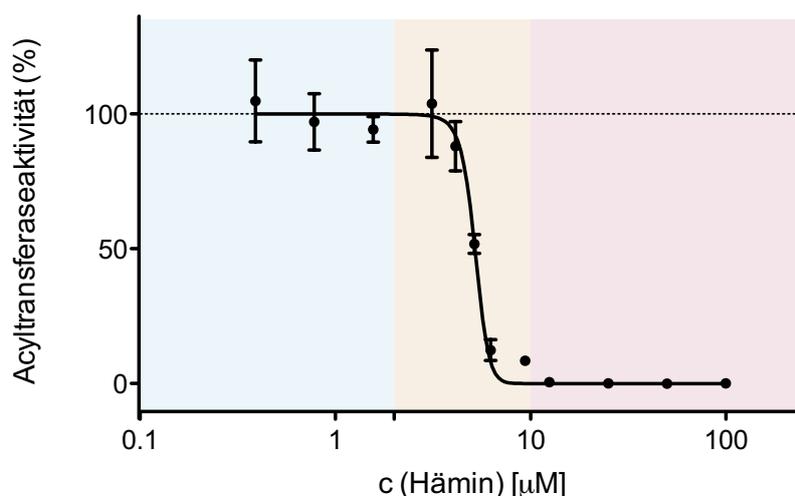


Abbildung 2: Hemmung der Acyltransferaseaktivität von HlyC durch Hämin

Es gilt die Annahme, dass die aus der *in vitro* Acylierung von proHlyA resultierende, hämolytische Aktivität der enzymatischen Aktivität von HlyC entspricht.

Die Messungen zur dosisabhängigen Hemmung von HlyC durch Hämin wurden mit 0,23 μM HlyC durchgeführt. Dabei ist bei Hämin-Konzentrationen von < 1 bis 2 μM von keiner Hemmung der Acyltransferaseaktivität auszugehen (blau hinterlegter Bereich in Abbildung 2), wohingegen bei Hämin-Konzentrationen von $> 10 \mu\text{M}$ von einer Hemmung des Enzyms auszugehen ist (rot hinterlegter Bereich). Der mit $5,19 \pm 0,12 \mu\text{M}$ bestimmte IC_{50} -Wert für Hämin liegt im Bereich physiologisch vorkommender Hämin-Konzentrationen. Diese liegen im Blutplasma im Bereich von 2 μM bis 12 μM und können während einer Infektion von Mäusen mit HlyA produzierenden hämolytischen *Escherichia coli* Konzentrationsbereiche von bis zu 60 μM erreichen [116]. Die Häm-Konzentrationen während einer Infektion mit nicht hämolytischen *Escherichia coli* liegen mit durchschnittlich 20 μM darunter [116]. Die intrazelluläre, freie Eisen-Menge in *Escherichia coli* wurde früher mit $1,1 \times 10^4$ Fe pro Zelle angegeben und entspricht umgerechnet in etwa einer Konzentration von 17 μM , bezogen auf das mit 10^{-15} L angenommene Gesamtvolumen einer *Escherichia coli* Zelle [269] [270]. Dem in Abbildung 2 dar-

gestellten Kurvenverlauf aus der IC_{50} -Wertbestimmung von Hämin für HlyC liegt des Weiteren ein Hill-Koeffizient von eins zugrunde, wodurch sich ein 1 : 1 Bindungsverhältnis von HlyC zu Hämin ableiten lässt. Dies deckt sich soweit mit unserer Erwartung für das postulierte Häm-Bindemotiv in HlyC.

Vergleich der Enzymaktivität von HlyC Wildtyp und HlyC H151A H152A sowie mögliche weitere Koordinationsstellen im postulierten Häm-Bindemotiv: Da in den vorangegangenen Experimenten eine Hemmung der Acyltransferaseaktivität von HlyC durch Hämin festgestellt werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob die Hemmung von HlyC durch Hämin tatsächlich aus der Bindung von Hämin an das vorgeschlagene HlyC Sequenzmotiv FKQYH¹⁵¹HELI resultiert [108]. Zur Bestätigung der potentiellen Koordinationsstelle H¹⁵¹ sowie der angrenzenden, möglicherweise ersatzweise dafür eintretenden, Koordinationsstelle H¹⁵² wurden beide Aminosäuren in HlyC jeweils durch die Aminosäure Alanin ersetzt. Anschließend wurde untersucht, ob sich die enzymatische Aktivität der Mutante in Anwesenheit von Hämin weiterhin so verhält wie die von HlyC Wildtyp. Tritt mit der Mutante keine Inhibition durch Hämin auf, kann das postulierte Bindemotiv als ursächlich für die Hemmung angesehen werden. Die Voraussetzung, dass beide Proteine in Abwesenheit des Inhibitors aktiv sind, war gegeben und die Messungen in Anwesenheit von Hämin konnten durchgeführt werden. Dementsprechend war auch mit HlyC H151A H152A eine Koaufräumung von acyl-ACP möglich. Ein deutlicher Unterschied in der enzymatischen Aktivität in Anwesenheit von Hämin zwischen HlyC Wildtyp und HlyC H151A H152A konnte jedoch nicht festgestellt werden. In den parallel durchgeführten IC_{50} -Wertbestimmungen für Hämin wurde mit HlyC Wildtyp ein IC_{50} -Wert von $6,17 \pm 0,72 \mu\text{M}$ und mit HlyC H151A H152A ein IC_{50} -Wert von $8,62 \pm 0,70 \mu\text{M}$ bestimmt. Die in dem Assay eingesetzten HlyC–acyl-ACP Gesamtmengen wurden für beide Proteine aufgrund einer limitierten Verfügbarkeit halbiert. Die immer noch vergleichsweise starke Hemmung der Enzymaktivität von HlyC H151A H152A durch Hämin konnte die potentielle Koordinationsstelle im postulierten Bindemotiv daher nicht als ursächlich für die Inhibition bestätigen. Nur eine schwach signifikante, schwächere Hemmung der HlyC Doppelmutante war mit den Hämin-Konzentrationen $3,12 \mu\text{M}$ und $6,25 \mu\text{M}$ zu beobachten, weswegen davon auszugehen ist, dass die Aminosäuren H151 und H152 eine untergeordnete Rolle in der Hemmung von HlyC durch Hämin spielen. Weiterhin liegt den beiden Kurvenverläufen, im Gegensatz zur ersten Bestimmung mit HlyC Wildtyp, ein Hill-Koeffizient von ≈ 3 zugrunde, wodurch auf weitere Häm-Bindestellen in HlyC geschlossen werden kann. Eine Erklärung für die deutlichen Unterschiede im Kurvenverlauf zwischen der ersten und zweiten IC_{50} -Wertbestimmung mit HlyC Wildtyp kann an dieser Stelle nicht abgege-

ben werden. Mögliche experimentell bedingte Ursachen, wie beispielsweise eine nicht exakt eingehaltene, fünfminütige Acylierungszeit, können mitunter nicht ausgeschlossen werden. Da die drei Aminosäuren Cys, His und Tyr potentiell in der Lage sind, eine koordinative Bindung zum Häm-Eisenatom einzugehen und häufig die zentralen Koordinationsstellen in anderen, transient Häm-bindenden und Häm-regulierten Proteinen bilden, sind diese im HlyC Sequenzalignment in Abbildung 3 farblich hervorgehoben [108] [268]. Das Sequenzalignment wurde aus der Publikation von Greene *et al.* (2015) übernommen und umfasst homologe, bakterielle, Toxin-aktivierende Acyltransferasen, deren funktionelle Substituierbarkeit *in vivo* bereits teilweise belegt wurde [61].

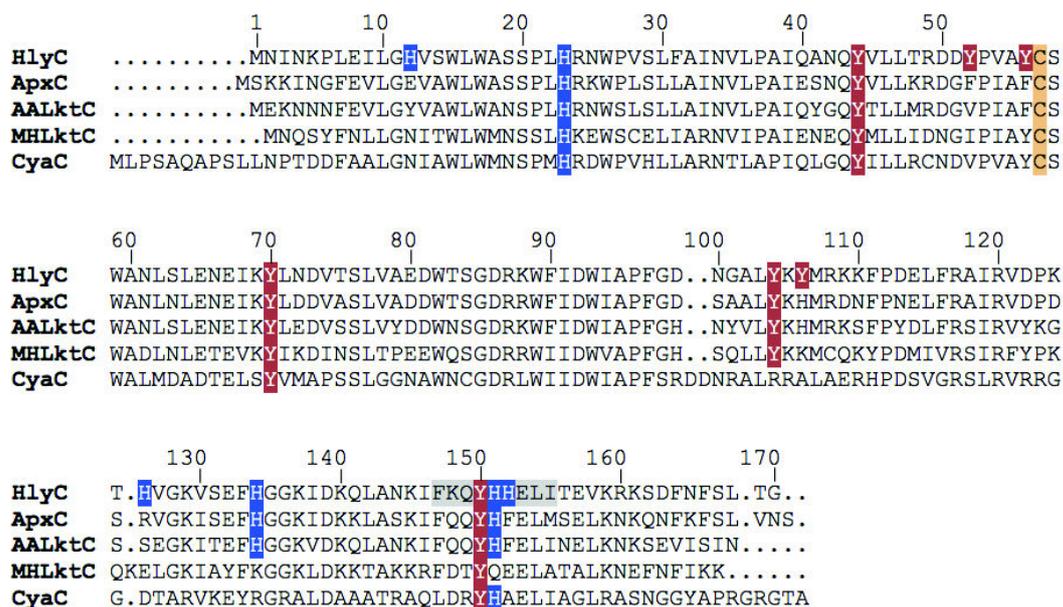


Abbildung 3: Sequenzalignment von HlyC mit homologen, Toxin-aktivierenden Acyltransferasen

Farblich hervorgehoben sind alle Aminosäuren aus HlyC, die potentiell in der Lage sind eine koordinative Bindung zum Eisen-Zentralatom von Häm/Hämin einzugehen. In grau hinterlegt ist das postulierte und in dieser Arbeit untersuchte Häm-Bindemotiv mit den zwei möglichen Koordinationsstellen H151 und H152. Auch eine Hemmung der anderen, hier dargestellten Enzyme durch Hämin ist prinzipiell denkbar. Das Alignment wurde von Greene *et al.* übernommen [61].

Aufgrund eines entscheidenden Einflusses der die Koordinationsstelle umgebenden Aminosäuren auf das tatsächliche Auftreten einer Bindung von Hämin, stellt die konservierte Aminosäure Y150 im vorgeschlagenen C-terminalen Häm-Bindemotiv möglicherweise eine weitere, potentielle Koordinationsstelle dar. Diese Koordinationsstelle ist entsprechend dem, auf ApxC-basierten, Strukturmodell von HlyC ebenfalls weiterhin leicht zugänglich für Hämin (Abbildung 1) [61]. Frühere Mutationsstudien mit HlyC zeigten außerdem, dass eine Substitution der Aminosäure Y150 mit Glycin mit einem drastischen Aktivitätsverlust des Enzyms einher geht, wodurch die Bedeutung dieser Aminosäure unterstrichen wird [65]. Eine Y150A Mutante von HlyC eignet sich aufgrund dieser Daten

jedoch voraussichtlich nicht für die Aktivitätsmessungen mit Hämin. Die durch die Forschungsgruppe von Frau Prof. Imhof zusätzlich durchgeführten UV-Vis spektroskopischen Untersuchungen mit HlyC H151A H152A zeigten ebenfalls weiterhin eine Bindung von Hämin an das Protein (noch nicht publizierte Daten).

Einfluss weiterer Häm-Derivate auf die Enzymaktivität von HlyC: Neben Hämin (Fe(III)-Proto-porphyrin IX) wurde die Wirkung weiterer Häm-Derivate auf die Acyltransferaseaktivität von HlyC untersucht. In Anwesenheit von 25 μM Ga(III)-PPIX, 25 μM Co(III)-PPIX oder 25 μM Zn(II)-PPIX war jeweils eine Restaktivität von unter 10 % im Vergleich zur ungehemmten Reaktion zu beobachten. Die Aktivität in Anwesenheit von 25 μM Fe(III)-PPIX lag mit 7,6 % ebenfalls unter 10 % der ungehemmten Reaktion. Physiologisch kommen die untersuchten Häm-Derivate beispielsweise in Folge eines Eisenmangels in Erythrozyten (Zn(II)-PPIX) oder als Häm-Abbauprodukte (Ga(III)-PPIX und Co(III)-PPIX) vor [271] [272]. Entgegen unserer Erwartung zeigte in den Versuchen auch PPIX alleine eine deutliche Hemmung der HlyC Acyltransferaseaktivität, obgleich diese Hemmung schwächer war als die der anderen Häm-Derivate. In Anwesenheit von 25 μM PPIX lag die enzymatische Aktivität von HlyC noch bei 20 % der ungehemmten Reaktion. Eine Erklärung über die Bindung von Cys, His und Tyr an die zentrale Koordinationsstelle des Hämins wird dadurch erschwert. Mit bis zu 66 μM Fe^{2+} alleine ist hingegen, wie bereits in den Vorversuchen festgestellt, von keiner Hemmung der Enzymaktivität auszugehen.

Mögliche Implikationen für den Reaktionsmechanismus von HlyC: Wird weiterhin von dem ursprünglich vorgeschlagenen Häm-Bindemotiv in HlyC ausgegangen und dieses als ursächlich für dessen Hemmung angenommen, können weitere Spekulationen angestellt werden. Zunächst ist die zusätzliche, C-terminale α -Helix ein exklusives Merkmal bakterieller, Toxin-aktivierender Acyltransferasen, deren Funktion bisher unbekannt ist [61]. Zudem scheint Tyr150 in dem vorgeschlagenen Sequenzmotiv von essentieller Bedeutung für die Aktivität des Enzyms zu sein, obwohl dieses nicht im aktiven Zentrum des Enzyms liegt [61] [65]. Da für die inhibitorische Wirkung von Hämin der Protoporphyrinring von zentraler Bedeutung ist, wird möglicherweise in Anwesenheit des Hemmstoffes die Substratbindung unterbunden. Wie bereits früher von Stanley *et al.* diskutiert, interagiert die hydrophile, Lysin-reiche, C-terminale Hälfte von HlyC möglicherweise mit der basischen Oberfläche von ACP und den geladenen Aminosäuren rund um die zu modifizierenden Lysine in proHlyA [94]. Außerdem beeinflussen verschiedene Aminosäureaustausche in der C-terminalen Hälfte von HlyC tatsächlich die Erkennung von proHlyA [273]. Dementsprechend wurde durch die Bindung von Häm im C-terminalen, α -helikalen Bereich von HlyC die Substraterkennung und/oder die Substratbindung von

proHlyA möglicherweise negativ beeinflusst. Für eine Unterbindung der Bindung von acyl-ACP an HlyC hingegen müsste Häm, entsprechend der hier durchgeführten Versuche, in der Lage sein, das koaufgereinigte acyl-ACP vollständig aus dem HlyC–acyl-ACP Komplex zu verdrängen. Nur so wäre die hier beobachtete, vollständige Inhibierung der Acylierung von proHlyA zu erreichen. Dies wird allerdings aufgrund der starken Bindung von acyl-ACP an HlyC während der gesamten Reinigung als eher unwahrscheinlich erachtet.

6.1.5 Ein neues Modell zur Relevanz der Hemmung von HlyC durch Hämin vor dem Hintergrund der Hämolyse

Vor dem Hintergrund der Hämolysefunktion von HlyA kann, zusammen mit der neu gewonnenen Erkenntnis der Hemmung der Enzymaktivität von HlyC durch Hämin, ein neues Modell zur Regulation der Protoxinaktivierung aufgestellt werden (Abbildung 4). Dieses kann im Sinne eines Regulationsmechanismus zur Eisenhomöostase in hämolytischen Bakterien interpretiert werden und liefert mögliche neue Ansatzpunkte für therapeutische Strategien zur Einschränkung der zytotoxischen Wirkungen von HlyA auf Wirtszellen, die möglicherweise auch auf andere, verwandte Hämolytine übertragen werden können. Dem Modell liegt die Annahme zugrunde, dass HlyA von *Escherichia coli* zur Hämolyse und der damit verbundenen Freisetzung von Eisen, welches einen essentiellen Nährstoff für Bakterien darstellt, produziert wird. Freies Eisen (Fe^{2+}) ist jedoch reaktiv und liegt physiologisch hauptsächlich gebunden in Proteinen, beispielsweise als prosthetische Gruppe in Form von Häm in Hämoglobin, vor [112]. In diesem Sinne kann die hemmende Wirkung von Häm/Hämin auf die Toxinaktivierung von HlyA als eine Art Schutzmechanismus der Bakterien vor einer überschüssigen Eisenfreisetzung durch die Hämolyse interpretiert werden. Das Modell in Abbildung 4 stellt den Zusammenhang zwischen der Hämolyse durch HlyA und der Inhibierung von HlyC durch Hämin dar.

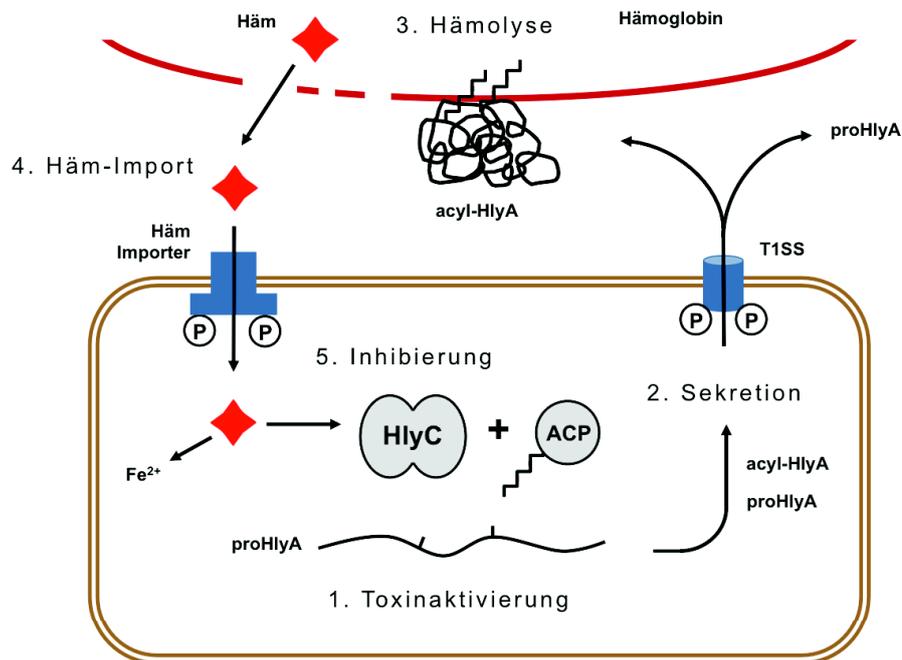


Abbildung 4: Modell zur Toxinaktivierung und Inhibierung von HlyC durch Hämin

Das Modell zeigt den Zusammenhang zwischen der Hämolysen durch HlyA und der Inhibierung von HlyC durch Häm/Hämin. In braun ist schematisch eine *E. coli* Zelle dargestellt, in rot ist eine Erythrozytenmembran angedeutet. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Im ersten Schritt wird in Abwesenheit von Häm oder in Anwesenheit geringer Häm-Konzentrationen (< 1 bis $3 \mu\text{M}$) von einer vollständigen Aktivierung des Protoxins in *Escherichia coli* ausgegangen. Diese erfolgt durch die Übertragung von Acylgruppen von dem Acylgruppen-tragenden Protein (ACP) auf zwei spezifische Lysinseitenketten in proHlyA durch die intrazelluläre Acyltransferase HlyC [52] [55] [56]. Im nächsten Schritt wird acyl-HlyA in einem immer noch weitestgehend ungefalteten Zustand durch das HlyA Typ 1 Sekretionssystem sekretiert und nimmt extrazellulär durch die Bindung von Calciumionen in der RTX-Domäne seinen nativen Faltungszustand an [42] [133]. Acyl-HlyA interagiert daraufhin mit unterschiedlichen Zielzellen und ist unter anderem in der Lage, Erythrozyten des Wirtsorganismus zu lysieren. Der Interaktionsmechanismus von HlyA mit den Zielzellmembranen ist hierbei nicht im Detail bekannt und Aussagen zu den durch HlyA gebildeten Poren sind häufig nicht eindeutig. Im Zuge der Hämolysen werden große Mengen an gebundenem Häm aus Hämoglobin freigesetzt, woraufhin freies Häm durch spezialisierte Transportsysteme von den Bakterien aktiv aufgenommen wird und das daraus gewonnene Eisen dem Eisenmetabolismus zugeführt wird [117]. Überschreitet die intrazelluläre Häm-Konzentration in *Escherichia coli* einen gewissen Schwellenwert im Bereich von wenigen μM , wird die Acyltransferaseaktivität von HlyC durch Häm

inhibiert. Aus der Hemmung resultiert eine unvollständige Aktivierung von proHlyA und die Zellen sekretieren verstärkt das hämolytisch inaktive Protoxin [43]. Eine Funktion von proHlyA in Bezug auf die Interaktion mit Wirtszellen oder anderen Mikroorganismen ist bisher jedoch nicht bekannt. Abgesehen von der hier erstmalig beschriebenen Regulation der Enzymaktivität von HlyC durch Hämin wurde in der Literatur eine limitierte Toxinaktivierung durch eine begrenzte Verfügbarkeit von acyl-ACP in *Escherichia coli* diskutiert [94]. Die Regulation der Eisen- und Hämaufnahme in *Escherichia coli* sowie die Expression verschiedener Virulenzgene in Bakterien erfolgt häufig durch den Transkriptionsfaktor Fur [128].

6.2 Kristallisation und Strukturanalyse von proHlyA

Um Klarheit in den molekularen Wirkmechanismus von HlyA zu bringen, wurde in dieser Dissertation mit einem strukturellen Ansatz auf die Herstellung einer Struktur-Funktionsbeziehung abgezielt. Die dreidimensionale Raumstruktur von HlyA ist bis heute nicht bekannt und es gibt, abgesehen von dem Bereich rund um die RTX-Domäne, kein zuverlässiges oder vollständiges Homologiemodell für das Proteintoxin [32]. Die Methode der Wahl zur Untersuchung der dreidimensionalen Raumstruktur des 110 kDa großen Proteins war die Röntgenstrukturanalyse. Dafür werden im ersten Schritt qualitativ hochwertige Kristalle des Proteins benötigt, deren Beugungseigenschaften anschließend im Röntgenstrahlengang untersucht werden. Diese Arbeit beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit der Kristallisation von proHlyA und der Optimierung der proHlyA Kristallqualität. Zunächst werden hier die Anforderungen an ein zu kristallisierendes Protein und die damit einhergehenden Herausforderungen bei der Kristallisation von proHlyA diskutiert. Die hier dargelegten Kriterien basieren auf einer Auswahl aus den Unterlagen zur Vorlesung Strukturbiochemie I von Prof. Johann Brandstetter aus dem Jahr 2011 an der Paris-Lodron-Universität Salzburg. Im Anschluss werden mögliche Lösungsvorschläge zur Erzeugung von Kristallen mit einem höheren Ordnungsgrad des Proteins erörtert. Die Reinigung des sekretierten Proteins erfolgte direkt aus dem Zellkulturüberstand einer *Escherichia coli* Flüssigkultur. Zur Erreichung des gewünschten Reinheitsgrades bei vollständigem Erhalt der strukturellen Integrität des Proteins wurde die Größenausschlusschromatographie eingesetzt. Der für die Auftrennung und Umpufferung von proHlyA gewählte Laufpuffer diente zugleich als Kristallisationspuffer. Hinsichtlich der Eignung des Proteins zur Kristallisation sind folgende Punkte zu beachten: **(I)** Pufferzusammensetzung: Der proHlyA Kristallisationspuffer mit 50 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl und 5 bis 10 mM CaCl₂ weist eine geringe Komplexität auf und ist in der Lage, das Pro-

tein stabil in Lösung zu halten. Der Zusatz von CaCl_2 sollte die native Faltung des Proteins gewähren. Andere, für die Kristallisation des Proteins möglicherweise besser geeignete, Pufferzusammensetzungen können an dieser Stelle jedoch nicht ausgeschlossen werden. **(II)** Ausreichende Proteinmengen: Mit dem standardmäßig verwendeten Expressions- und Reinigungsprotokoll für proHlyA wurden durch eine Proteinpräparation mit über 10 mg/ml ausreichende Mengen für die Kristallisation bereitgestellt. **(III)** Homogenität des Proteins: **a)** Die Reinheit von proHlyA in dem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel mit über 95 % gilt im Allgemeinen als ausreichend für die Kristallisation. **b)** Eine direkte Methode zur Aktivitätsüberprüfung von proHlyA gibt es nicht; möglich ist jedoch eine Entfaltung und *in vitro* Acylierung sowie die Detektion der aus der anschließenden Rückfaltung des Proteins resultierenden, hämolytischen Aktivität. **c)** Da eine Isoformen-Reinheit von acyl-HlyA durch die heterogene *in vivo* Acylierung mit Acylgruppen unterschiedlicher Länge nicht sichergestellt werden kann, wurde in den Kristallisationsversuchen überwiegend proHlyA eingesetzt. Außerdem sind flexible Elemente, wie beispielsweise die langen Acylgruppen von acyl-HlyA, im Allgemeinen unvorteilhaft für die Ausbildung von Proteinkontakten im Kristall. Des Weiteren nahm die Aggregationsneigung des Proteins durch die zusätzliche Hydrophobizität der Acylierung stark zu. **d)** Durch die Reinigung von proHlyA aus dem Zellkulturüberstand konnte eine Proteolyse des Proteins durch Fremdproteasen nahezu vollständig vermieden werden. Eine ein- bis zweiwöchige Lagerung des gereinigten Proteins bei 4°C war ohne die Beobachtung von Abbauprodukten in dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel möglich. **(IV)** Monodispersität der Probe: In der Regel kann ein Protein nur in einem definierten Oligomerisierungszustand auskristallisieren. Basierend auf dem Profil des Laufverhaltens von proHlyA während der Größenausschlusschromatographie muss jedoch von einer Überlagerung mehrerer Oligomerisierungszustände ausgegangen werden. Das Retentionsvolumen legt eine Mischung aus Homodimeren und höheren Oligomeren nahe. Weitere Analysen zum Oligomerisierungszustand wurden nicht durchgeführt; die Beobachtung von Dimeren und Oligomeren von HlyA in Zielmembranen wurde bereits früher beschrieben [222] [160]. **(V)** Konzentrierbarkeit des Proteins: Mit zunehmender Proteinkonzentration nimmt generell auch die Kristallisationswahrscheinlichkeit eines Proteins zu. Für proHlyA wurden stabile Proteinkonzentrationen von bis zu 8 mg/ml erreicht. Zur Verbesserung der Proteinlöslichkeit wurden ebenfalls die Detergenzien aus einem kommerziell erhältlichen Detergensscreen eingesetzt. **(VI)** Konstruktdesign: **a)** Das für das Zielprotein ausgewählte Kristallisationskonstrukt soll einer oder mehrerer Faltungsdomänen des Proteins entsprechen. Für die Kristallisation von proHlyA wurde das aus mehreren Faltungsdomänen bestehende, unmodifizierte Wildtyp Protein verwendet [42]. **b)** Flexible

Segmente, die häufig an den flankierenden Termini von Proteinen zu finden sind, wurden im proHlyA Kristallisationskonstrukt nicht entfernt. c) Der Zusatz von CaCl_2 im Proteinpuffer sollte die konformationelle Homogenität der vorhergesagten RTX-Domäne im N-terminalen Bereich des Proteins sicherstellen und idealerweise das gesamte Protein stabilisieren. Außerdem wurden die Additive aus einem kommerziell erhältlichen Additivscreen zur Stabilisierung eingesetzt. Darüber hinaus sind oftmals stabilisierende Pufferbedingungen mit beispielsweise 1 M NaCl für die Kristallisation vorteilhaft. Zusammengefasst konnten mit dem eingesetzten proHlyA Kristallisationskonstrukt im Rahmen der vorliegenden Arbeit mehrere Kristallisationsbedingungen für das Protein gefunden werden. Die Qualität der Kristalle war jedoch für die Aufklärung der dreidimensionalen Raumstruktur des Proteins durch die Röntgenstrukturanalyse nicht ausreichend. Einen möglichen Fortschritt in der Verbesserung der Kristallqualität könnte die Erzielung einer monodispersen Proteinlösung bedeuten. Dies könnte beispielsweise über die Wahl der Pufferzusammensetzung, insbesondere in Bezug auf den pH-Wert, die Ionenstärke und die Dielektrizitätskonstante, oder durch den Zusatz spezifischer Detergenzien gelingen. Die Neigung zur Oligomerisierung und Aggregation von proHlyA liegt möglicherweise an den hydrophoben Aminosäureabschnitten im N-terminalen Bereich des Proteins, die basierend auf früheren Untersuchungen und Vorhersagen eine oder mehrere Transmembrandomänen in den Zielzellen bilden [29]. Ein weiterführender Lösungsansatz wäre demnach der Entwurf neuer proHlyA Kristallisationskonstrukte. Für das Konstruktdesign müssten die Grenzen der Faltungsdomänen im Protein gefunden und verkürzte Kristallisationskonstrukte, beispielsweise ohne die flankierenden Termini oder die hydrophoben Faltungsdomänen im N-terminalen Bereich des Proteins, kristallisiert werden. Hinweise zu den Domänengrenzen von sogenannten Mosaikproteinen können zum Beispiel durch eine sogenannte limitierte Proteolyse, bei der vorzugsweise leicht zugängliche und flexible Strukturelemente des Proteins gespalten werden, oder durch verschiedene bioinformatische Analysen gewonnen werden [274]. Bioinformatische Ansätze basieren häufig auf bekannten, homologen Strukturen des Zielproteins und stehen für HlyA nur sehr begrenzt zur Verfügung. Dementsprechend wären für die Struktur von HlyA auch Kristallisationsversuche mit homologen Toxinen aus verwandten Organismen durchaus interessant. Diese Strategie war beispielsweise durch die Kristallisation der bakteriellen Toxin-aktivierenden Acyltransferase ApxC aus *Actinobacillus pleuropneumoniae* für die Strukturaufklärung von HlyC erfolgreich [61]. Aufgrund der funktionellen Homologie und der hohen Sequenzidentität (> 70 %) der beiden Proteine, konnte aus der dreidimensionalen Raumstruktur von ApxC das in dieser Dissertation mehrmals her-

angezogene Homologiemodell für HlyC erstellt werden [61]. Für HlyA müssten allerdings geeignete, homologe Proteine für die Kristallisation erst noch gefunden werden.

6.3 Untersuchungen zur Glykanbindung durch proHlyA

Die teilweise hochkomplexen Glykosylierungsmuster eukaryontischer Zellen entstehen sowohl während der Differenzierung von Zellen im Individuum als auch in Abhängigkeit der stammesgeschichtlichen Entwicklung verschiedener Arten [185]. Beispielsweise nimmt die Glykosylierung von Glykophorin A humaner, erythroider Vorläuferzellen aus dem Knochenmark im Laufe ihrer Differenzierung zu [275]. Demgegenüber stehen die zahlreichen Zielzellen von HlyA, die sich sowohl im Individuum je nach Zelltyp als auch zwischen verschiedenen Organismen hinsichtlich ihrer Anfälligkeit für das Toxin unterscheiden. Beispielsweise zeigen Erythrozyten aus dem Python eine vollständige Resistenz für HlyA während Erythrozyten aus verschiedenen Säugetierspezies unterschiedlich stark lysiert werden [276]. Der erste auf Erythrozyten gefundene Rezeptor für HlyA war das bereits eingangs erwähnte, stark glykosylierte Glykophorin A [166]. Später wurde im Zusammenhang mit den Untersuchungen des homologen RTX-Toxins CyaA aus *Bordetella pertussis* eine Bindung von HlyA an die N-Glykosylierungen des β_2 -Integrinrezeptors CD11a/CD18 auf Lymphozyten postuliert [169]. Die häufig endständig auf N-gekoppelten Glykanen von Proteinen vorkommende N-Acetylneuraminsäure konnte später als Rezeptor für HlyA jedoch ausgeschlossen werden [203]. Um eine mögliche, spezifische Zuckerbindung von HlyA an andere Zuckereinheiten zu untersuchen und gegebenenfalls potentielle neue Interaktionspartner zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit fluoreszenzmarkiertes proHlyA eingesetzt. Dabei wurde, basierend auf bereits publizierten Daten, von einer Bindung von proHlyA an die Zielzellen ausgegangen, wohingegen für die Zelllyse demnach die Acylierung von HlyA erforderlich ist [162] [163] [164]. Basierend auf dieser Annahme sowie aus Gründen der Komplexitätsreduzierung und der Beschränkung der vorliegenden Untersuchungen auf die Bindung des Proteins an Zucker, wurden die Experimente mit dem Protoxin durchgeführt. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass nicht nur HlyA, sondern auch proHlyA eine mögliche, zuckerbindende Faltung aufweist. Für die direkte Detektion des Proteins in den Experimenten wurde proHlyA über ein künstlich eingeführtes, N-terminales Cystein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Aufgrund der hohen Anzahl an Lysin im Protein wurde eine Markierung über die primären Amine des Proteins ausgeschlossen. Neue Erkenntnisse über die möglicherweise an das Protein bindenden Glykane könnten ebenfalls für die Kristallisation des Proteins von Vorteil sein.

6.3.1 ProHlyA Fluoreszenz-Blot zur Analyse einer zuckerabhängigen Bindung an Nierenepithelzellen

Mit dem Ziel neue Hinweise auf eine zuckerabhängige Bindung von HlyA an Oberflächenproteine von Zielzellen zu finden, wurde mit proHlyA ein Fluoreszenz-Blot durchgeführt. Dieser wurde in Anlehnung an sogenannte Lektin-Blots, welche standardmäßig zur Identifizierung und Überprüfung einer zuckerabhängigen Bindung von Lektinen verwendet werden, durchgeführt [277]. Dabei wurden die, über eine SDS-PAGE aufgetrennten und auf eine Membran transferierten, Proteine eines Zelllysates vor und nach Abspaltung der N-Glykosylierungen von den Proteinen durch das Enzym PNGaseF zusammen mit proHlyA inkubiert. Über die Fluoreszenz des markierten proHlyAs konnte das gebundene Protein detektiert werden. Für den Blot wurden in den hier vorgestellten Versuchen lysierte MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) Epithelzellen eingesetzt, wobei im ersten Versuch viele unspezifische Banden detektiert wurden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine unspezifische Interaktion der hydrophoben, N-terminalen Proteinabschnitte von proHlyA mit den aufgetrennten und denaturierten Proteinen auf der Membran sein. Eine nach der Behandlung des Zelllysates mit PNGaseF vergleichsweise geringere Intensität zeigte eine Bande bei 55 kDa. Da diese Bande jedoch ebenfalls im Zelllysate der zur Unterscheidung von Oberflächenproteinen und intrazellulären Proteinen zuvor mit Trypsin behandelten Zellen auftaucht, ist hierbei eher nicht von einer Bindung an ein auf der Zelloberfläche exponiertes Protein auszugehen. Dementsprechend wurde keine massenspektrometrische Analyse der entsprechenden Proteinbande aus dem SDS-Gel zur Identifizierung des Proteins vorgenommen. In einem zweiten Versuch wurde das eingesetzte Zelllysate stärker verdünnt und erneut mit PNGaseF behandelt, wodurch im anschließenden Blot weniger proHlyA Banden detektiert wurden. Neue Hinweise auf eine zuckerabhängige Bindung von proHlyA konnten dadurch nicht gewonnen werden. Experiment bedingt müssen die hier getroffenen Aussagen jedoch kritisch betrachtet werden: Positivkontrollen zur vollständigen Abspaltung der N-Glykosylierungen von den Proteinen durch das Enzym PNGaseF und zum Verdau der Oberflächenproteine auf den Zellen durch Trypsin liegen nicht vor. Des Weiteren sollte die Detektionsgrenze des Blots, insbesondere nach der weiteren Verdünnung des Zelllysates, ermittelt werden. Eine zusätzliche Herausforderung stellt unter anderem die Erkennung von abgeschwächten Bindungen an die deglykosylierten Proteine dar. Abgesehen von dem erwähnten Optimierungsbedarf bietet die Methode jedoch auch zahlreiche weitere Möglichkeiten zur Identifizierung bisher unbekannter, zuckerbasierter Interaktionspartner. Beispielsweise können einfache Konkurrenzexperimente durch eine Vorinkubation von

proHlyA mit verschiedenen Glykanen durchgeführt werden oder die Zelllysate beliebiger Zelllinien getestet werden. Darüber hinaus sind intrazelluläre Rezeptoren für HlyA aufgrund des fakultativ intrazellulären Vorkommens von uropathogenen *Escherichia coli* möglicherweise doch von Interesse und könnten beispielsweise durch die hier vorgestellte Methode identifiziert werden [213]. Da die in diesem Experiment eingesetzten Epithelzellen nicht den für HlyA postulierten β_2 -Integrinrezeptor CD11a/CD18 besitzen, wurde auf der Höhe des Integrins keine zuckerabhängige Bindung von proHlyA beobachtet [169] [278]. Die zuckerabhängige, lytische Aktivität von HlyA wurde ursprünglich mit Lymphozyten beobachtet und durch eine mögliche Bindung von HlyA an die, apikal auf den Epithelzellen jedoch nicht vorkommenden, glykosylierten Integrinrezeptoren erklärt [169]. Neue, zuckerabhängige Rezeptoren auf den Nierenepithelzellen für proHlyA konnten mit den hier beschriebenen Experimenten nicht identifiziert werden.

6.3.2 Untersuchungen zur Bindung von proHlyA an Glykosphingolipide

Zur Überprüfung einer möglichen Bindung von proHlyA an glykosylierte Lipide in einer Lipid-umgebung wurden verschiedene Glykosphingolipide in GUVs (*giant unilamellar vesicles*) zusammen mit dem Protein inkubiert. Die Beobachtung einer möglichen Bindung in Echtzeit erfolgte unter dem Konfokalmikroskop und wurde durch die Fluoreszenzmarkierung der GUVs und die Fluoreszenzmarkierung von proHlyA realisiert. GUVs weisen aufgrund ihres mittleren Durchmessers von 1 bis 100 μm im Vergleich zu Liposomen eine geringere Membrankrümmung auf und eignen sich besonders gut zur Simulation humaner Zellmembranen [279]. Glykosphingolipide wie beispielsweise Sphingosine kommen in den Zellmembranen von Erythrozyten verschiedener Säugetierspezies in unterschiedlicher Konzentration vor [280]. Exakte Angaben zu den in bestimmten Zelltypen vorkommenden Glykolipiden oder Glykoproteinen sind jedoch nur begrenzt verfügbar. Die Auswahl der hier verwendeten Glykosphingolipide basiert daher auf den, in den Glykosylierungen von Integrinen vorkommenden, Zuckereinheiten Galactose, N-Acetylglucosamin, Mannose und N-Acetylneuraminsäure sowie auf den häufig von Pathogenen erkannten Glykokonjugaten auf den humanen Zelloberflächen aus N-Acetylneuraminsäure und Fucose [169] [192]. Für die Untersuchungen wurden die in Abbildung 5 dargestellten Glykosphingolipide Globotriaosylceramid (Gb3), Monosialogangliosid (GM1) und das Blutgruppenantigen Lewis^a (FSL-LewA) mit jeweils 5 mol% in den GUVs eingesetzt. Als Positivkontrollen für die verschiedenen Lipidzusammensetzungen dienten das Lektin PAL-I (*IecA*) aus *Pseudomonas aeruginosa* für die Bindung an Gb3, die B-Untereinheit des Toxins CtxB aus *Vibrio cholerae* für die Bindung an GM1 und das

Lektin PAL-II (*lecB*) ebenfalls aus *Pseudomonas aeruginosa* für die Bindung an FSL-LewA [193] [195] [197]. Da mit allen drei Positivkontrollen eine deutliche Bindung an die GUVs zu beobachten war, kann von der Existenz der jeweiligen Glykosphingolipide in den für die Versuche mit proHlyA verwendeten GUVs ausgegangen werden. Weitere in den Lipidmischungen vorhandene Komponenten waren 72,5 mol% DOPC, 20 mol% Cholesterin und 2,5 mol% des Fluoreszenzfarbstoffes Texas Red DHPE. Die Bindung von acyl-HlyA an Cholesterin wurde bereits in einer früheren Untersuchung gezeigt, ist jedoch für proHlyA nicht bekannt [165]. Für die drei ausgewählten Glykosphingolipide konnte in dieser Untersuchung jedoch keine Bindung von proHlyA gezeigt werden. Eine spezifische Bindung von proHlyA an die in den Glykosphingolipiden vorkommenden Zuckereinheiten wird dementsprechend als eher unwahrscheinlich erachtet. Weiterhin war keine Bindung von proHlyA an DOPC und Cholesterin zu beobachten.

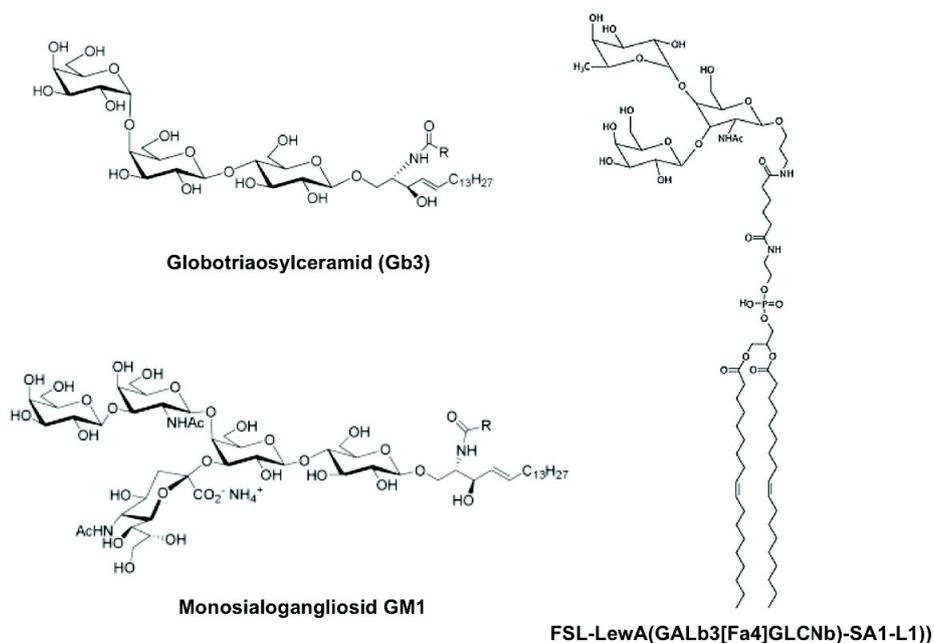


Abbildung 5: Mit den Glykosphingolipiden Gb3, GM1 und FSL-LewA wurde keine Bindung von proHlyA beobachtet. Die Strukturen stammen aus den Angaben des Herstellers.

Unter der Voraussetzung und Annahme einer korrekten Faltung des eingesetzten Proteins, werden möglicherweise andere, nicht in den getesteten GUVs vorhandene, Zuckerstrukturen erkannt. Eine weitere, mögliche Erklärung wäre, dass die Acylierung für die Faltung des Proteins oder für die Bindung des Proteins an die Zellmembranen von größerer Bedeutung ist als bisher angenommen. Literaturdaten zur Bindung von proHlyA oder HlyA an Glykosphingolipide existieren bisher nicht. Eine Wiederholung des Experimentes mit konkreteren Hinweisen auf die möglicherweise durch proHlyA erkannten

Zucker und eine dementsprechende Auswahl an Glykosphingolipiden ist prinzipiell denkbar.

6.3.3 Glykan Array zur Identifizierung von proHlyA Zuckerinteraktionen

Um weitere Anhaltspunkte auf mögliche, zuckerbasierte Interaktionspartner von proHlyA zu bekommen, wurde durch das Konsortium für funktionelle Glykomik (CFG, *Consortium for Functional Glycomics*, Boston, USA) mit dem von uns bereitgestellten, fluoreszenzmarkierten proHlyA der CFG Glykan Array der Version 5.3 durchgeführt. Dabei wurden mit der höchsten getesteten proHlyA Konzentration von 200 µg/ml (0,9 µM) nur sehr schwache Bindungen des Proteins an die 600 immobilisierten Zuckerstrukturen des Glykan Arrays beobachtet. Niedrigere Proteinkonzentrationen lieferten insgesamt noch schwächere Signale. Ein eindeutiges, zuckerbindendes Strukturmotiv für proHlyA konnte daraus nicht abgeleitet werden. Die einzige Gemeinsamkeit der Glykane, deren Fluoreszenzsignale sich von der Hintergrundfluoreszenz unterschieden, war das Vorhandensein von Galactose und GlcNAc. Evolutionär gesehen handelt es sich hierbei um sehr ursprüngliche und in den meisten Glykanen vorkommende Zuckereinheiten [189]. Zusammen mit den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente können nun mehrere Erklärungen zur Glykanbindung durch proHlyA abgegeben werden: (1) ProHlyA benötigt für eine Bindung unter Umständen zusätzlich zu den Zuckern einen spezifischen Proteinrest oder eine spezifische Lipidumgebung, welche in den Experimenten davor nicht zur Verfügung standen. (2) Bei der zuckerabhängigen Bindung von proHlyA an die Zielzellen handelt es sich um eine komplexe Bindung, wobei nur durch eine multivalente Bindung hohe Bindungsaffinitäten erreicht werden. (3) ProHlyA bindet faltungsbedingt nicht an die getesteten Zucker und nimmt nur in Anwesenheit der Acylgruppen eine an die Oberflächenglykane von Zellen bindende Konformation an. (4) ProHlyA bindet nur schwach und unspezifisch an die Glykosylierungen auf den Zellen und die Bindung spielt bei der Interaktion von HlyA mit den Zielzellen nur eine untergeordnete Rolle. Zudem gibt es in der Fachliteratur nur einen einzigen konkreten Hinweis auf eine zuckerabhängige Aktivität von HlyA [169]. Dabei wurde gezeigt, dass Lymphozyten nach der Behandlung mit Glykosidasen eine vergleichsweise höhere Resistenz für das Toxin aufweisen als die unbehandelten Zellen [169]. Die hier dargestellten Ergebnisse stehen deshalb nicht notwendigerweise in einem Widerspruch mit den publizierten Daten. Klare Hinweise auf eine zuckerabhängige Bindung von proHlyA an seine Zielzellen wurden im Rahmen dieser Dissertation jedoch nicht gefunden.

7 Referenzen

1. Barber, A.E., et al., *Strengths and Limitations of Model Systems for the Study of Urinary Tract Infections and Related Pathologies*. Microbiol Mol Biol Rev, 2016. **80**(2): p. 351-67.
2. Welch, R.A., *Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria*. Mol Microbiol, 1991. **5**(3): p. 521-8.
3. Linhartova, I., et al., *RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism*. FEMS Microbiol Rev, 2010. **34**(6): p. 1076-112.
4. Dudgeon, L.S., E. Wordley, and F. Bawtree, *On Bacillus coli Infections of the Urinary Tract, especially in Relation to Haemolytic Organisms*. J Hyg (Lond), 1921. **20**(2): p. 137-64.
5. Kayser, H., *Ueber Bakterienhämolsine, im Besonderen das Colilysin*. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, 1903. **42**(1): p. 118-138.
6. Robinson, G.L., *The haemolysin of Bacterium coli*. J Gen Microbiol, 1951. **5**(4): p. 788-92.
7. Lovell, R. and T.A. Rees, *A filterable haemolysin from Escherichia coli*. Nature, 1960. **188**: p. 755-6.
8. Welch, R.A., et al., *Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal E. coli infections*. Nature, 1981. **294**(5842): p. 665-7.
9. Goebel, W. and J. Hedgpeth, *Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1982. **151**(3): p. 1290-8.
10. Berger, H., et al., *Cloning of the chromosomal determinants encoding hemolysin production and mannose-resistant hemagglutination in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1982. **152**(3): p. 1241-7.
11. Bhakdi, S., et al., *Escherichia coli hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores*. Infect Immun, 1986. **52**(1): p. 63-9.
12. Chaturvedi, U.C., et al., *Cytotoxicity of filtrates of haemolytic Escherichia coli*. J Med Microbiol, 1969. **2**(3): p. 211-8.
13. Cavaliere, S.J. and I.S. Snyder, *Cytotoxic activity of partially purified Escherichia coli alpha haemolysin*. J Med Microbiol, 1982. **15**(1): p. 11-21.
14. Keane, W.F., et al., *Mechanism of Escherichia coli alpha-hemolysin-induced injury to isolated renal tubular cells*. Am J Pathol, 1987. **126**(2): p. 350-7.
15. Gadeberg, O.V., I. Orskov, and J.M. Rhodes, *Cytotoxic effect of an alpha-hemolytic Escherichia coli strain on human blood monocytes and granulocytes in vitro*. Infect Immun, 1983. **41**(1): p. 358-64.
16. Suttorp, N., et al., *Effects of Escherichia coli hemolysin on endothelial cell function*. Infect Immun, 1990. **58**(11): p. 3796-801.
17. Jonas, D., et al., *Cytocidal effects of Escherichia coli hemolysin on human T lymphocytes*. Infect Immun, 1993. **61**(5): p. 1715-21.
18. Velasquez, F.C., et al., *Induction of eryptosis by low concentrations of E. coli alpha-hemolysin*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1848**(11 Pt A): p. 2779-88.
19. Wiles, T.J., et al., *Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(4): p. 1427-38.
20. Grimminger, F., et al., *Subhemolytic doses of Escherichia coli hemolysin evoke large quantities of lipoxygenase products in human neutrophils*. J Biol Chem, 1991. **266**(22): p. 14262-9.
21. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(1): p. 142-201.
22. Chen, S.L., et al., *Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of Escherichia coli: a comparative genomics approach*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(15): p. 5977-82.
23. Mulvey, M.A., J.D. Schilling, and S.J. Hultgren, *Establishment of a persistent Escherichia coli reservoir during the acute phase of a bladder infection*. Infect Immun, 2001. **69**(7): p. 4572-9.
24. Ludwig, A., et al., *Mutations affecting pore formation by haemolysin from Escherichia coli*. Mol Gen Genet, 1991. **226**(1-2): p. 198-208.
25. Oropeza-Wekerle, R.L., et al., *Haemolysin-derived synthetic peptides with pore-forming and haemolytic activity*. Mol Microbiol, 1992. **6**(1): p. 115-21.
26. Buchan, D.W., et al., *Protein annotation and modelling servers at University College London*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Web Server issue): p. W563-8.

27. Buchan, D.W., et al., *Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Web Server issue): p. W349-57.
28. Valeva, A., et al., *Putative identification of an amphipathic alpha-helical sequence in hemolysin of Escherichia coli (HlyA) involved in transmembrane pore formation*. Biol Chem, 2008. **389**(9): p. 1201-7.
29. Benz, R., et al., *The deletion of several amino acid stretches of Escherichia coli alpha-hemolysin (HlyA) suggests that the channel-forming domain contains beta-strands*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e112248.
30. Felmler, T. and R.A. Welch, *Alterations of amino acid repeats in the Escherichia coli hemolysin affect cytolytic activity and secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5269-73.
31. Baumann, U., et al., *Three-dimensional structure of the alkaline protease of Pseudomonas aeruginosa: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif*. EMBO J, 1993. **12**(9): p. 3357-64.
32. Bumba, L., et al., *Calcium-Driven Folding of RTX Domain beta-Rolls Ratchets Translocation of RTX Proteins through Type I Secretion Ducts*. Mol Cell, 2016. **62**(1): p. 47-62.
33. Hege, T. and U. Baumann, *Protease C of Erwinia chrysanthemi: the crystal structure and role of amino acids Y228 and E189*. J Mol Biol, 2001. **314**(2): p. 187-93.
34. Meier, R., et al., *A calcium-gated lid and a large beta-roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from Serratia marcescens*. J Biol Chem, 2007. **282**(43): p. 31477-83.
35. Ostolaza, H., A. Soloaga, and F.M. Goni, *The binding of divalent cations to Escherichia coli alpha-haemolysin*. Eur J Biochem, 1995. **228**(1): p. 39-44.
36. Gangola, P. and B.P. Rosen, *Maintenance of intracellular calcium in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1987. **262**(26): p. 12570-4.
37. Schmidt, R.F., F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31., überarbeitete und aktualisierte Auflage ed. 2010: Springer Medizin Verlag Heidelberg. 979.
38. Ludwig, A., et al., *The repeat domain of Escherichia coli haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca²⁺-dependent binding to erythrocytes*. Mol Gen Genet, 1988. **214**(3): p. 553-61.
39. Boehm, D.F., R.A. Welch, and I.S. Snyder, *Calcium is required for binding of Escherichia coli hemolysin (HlyA) to erythrocyte membranes*. Infect Immun, 1990. **58**(6): p. 1951-8.
40. Bakas, L., et al., *Calcium-dependent conformation of E. coli alpha-haemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1368**(2): p. 225-34.
41. Sanchez-Magraner, L., et al., *Interdomain Ca(2+) effects in Escherichia coli alpha-haemolysin: Ca(2+) binding to the C-terminal domain stabilizes both C- and N-terminal domains*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1798**(6): p. 1225-33.
42. Thomas, S., et al., *Equilibrium folding of pro-HlyA from Escherichia coli reveals a stable calcium ion dependent folding intermediate*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1844**(9): p. 1500-10.
43. Nicaud, J.M., et al., *Characterisation of HlyC and mechanism of activation and secretion of haemolysin from E. coli 2001*. FEBS Lett, 1985. **187**(2): p. 339-44.
44. Mackman, N., et al., *Release of a chimeric protein into the medium from Escherichia coli using the C-terminal secretion signal of haemolysin*. EMBO J, 1987. **6**(9): p. 2835-41.
45. Jarchau, T., et al., *Selection for transport competence of C-terminal polypeptides derived from Escherichia coli hemolysin: the shortest peptide capable of autonomous HlyB/HlyD-dependent secretion comprises the C-terminal 62 amino acids of HlyA*. Mol Gen Genet, 1994. **245**(1): p. 53-60.
46. Stanley, P., V. Koronakis, and C. Hughes, *Mutational analysis supports a role for multiple structural features in the C-terminal secretion signal of Escherichia coli haemolysin*. Mol Microbiol, 1991. **5**(10): p. 2391-403.
47. Zhang, F., D.I. Greig, and V. Ling, *Functional replacement of the hemolysin A transport signal by a different primary sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4211-5.
48. Yin, Y., et al., *Structural analysis and comparison of the C-terminal transport signal domains of hemolysin A and leukotoxin A*. FEBS Lett, 1995. **366**(1): p. 1-5.
49. Zhang, F., et al., *Secretion and circular dichroism analysis of the C-terminal signal peptides of HlyA and LktA*. Biochemistry, 1995. **34**(13): p. 4193-201.
50. Kenny, B., S. Taylor, and I.B. Holland, *Identification of individual amino acids required for secretion within the haemolysin (HlyA) C-terminal targeting region*. Mol Microbiol, 1992. **6**(11): p. 1477-89.

51. Chervaux, C. and I.B. Holland, *Random and directed mutagenesis to elucidate the functional importance of helix II and F-989 in the C-terminal secretion signal of Escherichia coli hemolysin*. J Bacteriol, 1996. **178**(4): p. 1232-6.
52. Hardie, K.R., et al., *In vitro activation of Escherichia coli prohaemolysin to the mature membrane-targeted toxin requires HlyC and a low molecular-weight cytosolic polypeptide*. Mol Microbiol, 1991. **5**(7): p. 1669-79.
53. Issartel, J.P., V. Koronakis, and C. Hughes, *Activation of Escherichia coli prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation*. Nature, 1991. **351**(6329): p. 759-61.
54. Rottig, A. and A. Steinbuchel, *Acyltransferases in bacteria*. Microbiol Mol Biol Rev, 2013. **77**(2): p. 277-321.
55. Hughes, C., et al., *Activation of Escherichia coli prohemolysin to the membrane-targeted toxin by HlyC-directed ACP-dependent fatty acylation*. FEMS Microbiol Immunol, 1992. **5**(1-3): p. 37-43.
56. Stanley, P., et al., *Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of Escherichia coli hemolysin*. Science, 1994. **266**(5193): p. 1992-6.
57. Ludwig, A., et al., *Analysis of the in vivo activation of hemolysin (HlyA) from Escherichia coli*. J Bacteriol, 1996. **178**(18): p. 5422-30.
58. Stanley, P., et al., *Independent interaction of the acyltransferase HlyC with two maturation domains of the Escherichia coli toxin HlyA*. Mol Microbiol, 1996. **20**(4): p. 813-22.
59. Lim, K.B., et al., *Escherichia coli alpha-hemolysin (HlyA) is heterogeneously acylated in vivo with 14-, 15-, and 17-carbon fatty acids*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36698-702.
60. Stanley, P., V. Koronakis, and C. Hughes, *Acylation of Escherichia coli hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(2): p. 309-33.
61. Greene, N.P., et al., *Structure of a bacterial toxin-activating acyltransferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(23): p. E3058-66.
62. Trievel, R.C., et al., *Crystal structure and mechanism of histone acetylation of the yeast GCN5 transcriptional coactivator*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 8931-6.
63. Dyda, F., D.C. Klein, and A.B. Hickman, *GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000. **29**: p. 81-103.
64. Vetting, M.W., et al., *Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases*. Arch Biochem Biophys, 2005. **433**(1): p. 212-26.
65. Trent, M.S., L.M. Worsham, and M.L. Ernst-Fonberg, *HlyC, the internal protein acyltransferase that activates hemolysin toxin: roles of various conserved residues in enzymatic activity as probed by site-directed mutagenesis*. Biochemistry, 1999. **38**(29): p. 9541-8.
66. Trent, M.S., L.M. Worsham, and M.L. Ernst-Fonberg, *HlyC, the internal protein acyltransferase that activates hemolysin toxin: role of conserved histidine, serine, and cysteine residues in enzymatic activity as probed by chemical modification and site-directed mutagenesis*. Biochemistry, 1999. **38**(11): p. 3433-9.
67. Trent, M.S., L.M. Worsham, and M.L. Ernst-Fonberg, *HlyC, the internal protein acyltransferase that activates hemolysin toxin: the role of conserved tyrosine and arginine residues in enzymatic activity as probed by chemical modification and site-directed mutagenesis*. Biochemistry, 1999. **38**(27): p. 8831-8.
68. Worsham, L.M., et al., *Insights into the catalytic mechanism of HlyC, the internal protein acyltransferase that activates Escherichia coli hemolysin toxin*. Biochemistry, 2001. **40**(45): p. 13607-16.
69. Dodds, A.W., et al., *The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4*. Nature, 1996. **379**(6561): p. 177-9.
70. Ludwig, A., M. Vogel, and W. Goebel, *Mutations affecting activity and transport of haemolysin in Escherichia coli*. Mol Gen Genet, 1987. **206**(2): p. 238-45.
71. Majerus, P.W., A.W. Alberts, and P.R. Vagelos, *The Acyl Carrier Protein of Fatty Acid Synthesis: Purification, Physical Properties, and Substrate Binding Site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1964. **51**: p. 1231-8.
72. Vanaman, T.C., S.J. Wakil, and R.L. Hill, *The complete amino acid sequence of the acyl carrier protein of Escherichia coli*. J Biol Chem, 1968. **243**(24): p. 6420-31.
73. Rock, C.O. and J.E. Cronan, Jr., *Re-evaluation of the solution structure of acyl carrier protein*. J Biol Chem, 1979. **254**(19): p. 9778-85.
74. Rock, C.O. and S. Jackowski, *Regulation of phospholipid synthesis in Escherichia coli. Composition of the acyl-acyl carrier protein pool in vivo*. J Biol Chem, 1982. **257**(18): p. 10759-65.

75. Magnuson, K., et al., *Regulation of fatty acid biosynthesis in Escherichia coli*. Microbiol Rev, 1993. **57**(3): p. 522-42.
76. Anderson, M.S. and C.R. Raetz, *Biosynthesis of lipid A precursors in Escherichia coli. A cytoplasmic acyltransferase that converts UDP-N-acetylglucosamine to UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine*. J Biol Chem, 1987. **262**(11): p. 5159-69.
77. Vanden Boom, T. and J.E. Cronan, Jr., *Genetics and regulation of bacterial lipid metabolism*. Annu Rev Microbiol, 1989. **43**: p. 317-43.
78. Jordan, S.W. and J.E. Cronan, Jr., *A new metabolic link. The acyl carrier protein of lipid synthesis donates lipoic acid to the pyruvate dehydrogenase complex in Escherichia coli and mitochondria*. J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 17903-6.
79. Therisod, H., A.C. Weissborn, and E.P. Kennedy, *An essential function for acyl carrier protein in the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides of Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(19): p. 7236-40.
80. Bohin, J.P., *Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria*. FEMS Microbiol Lett, 2000. **186**(1): p. 11-9.
81. Shen, B., et al., *Purification and characterization of the acyl carrier protein of the Streptomyces glaucescens tetracenomycin C polyketide synthase*. J Bacteriol, 1992. **174**(11): p. 3818-21.
82. Heaton, M.P. and F.C. Neuhaus, *Role of the D-alanyl carrier protein in the biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid*. J Bacteriol, 1994. **176**(3): p. 681-90.
83. Byers, D.M. and E.A. Meighen, *Acyl-acyl carrier protein as a source of fatty acids for bacterial bioluminescence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(18): p. 6085-9.
84. Overath, P. and P.K. Stumpf, *Fat Metabolism in Higher Plants. 23. Properties of a Soluble Fatty Acid Synthetase from Avocado Mesocarp*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 4103-10.
85. Larrabee, A.R., et al., *Acyl carrier protein. V. Identification of 4'-phosphopantetheine bound to a mammalian fatty acid synthetase preparation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **54**(1): p. 267-73.
86. Crosby, J. and M.P. Crump, *The structural role of the carrier protein--active controller or passive carrier*. Nat Prod Rep, 2012. **29**(10): p. 1111-37.
87. Roujeinikova, A., et al., *X-ray crystallographic studies on butyryl-ACP reveal flexibility of the structure around a putative acyl chain binding site*. Structure, 2002. **10**(6): p. 825-35.
88. Roujeinikova, A., et al., *Structural studies of fatty acyl-(acyl carrier protein) thioesters reveal a hydrophobic binding cavity that can expand to fit longer substrates*. J Mol Biol, 2007. **365**(1): p. 135-45.
89. Majerus, P.W., A.W. Alberts, and P.R. Vagelos, *Acyl Carrier Protein. Iv. The Identification of 4'-Phosphopantetheine as the Prosthetic Group of the Acyl Carrier Protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **53**: p. 410-7.
90. Lambalot, R.H. and C.T. Walsh, *Holo-[acyl-carrier-protein] synthase of Escherichia coli*. Methods Enzymol, 1997. **279**: p. 254-62.
91. Ray, T.K. and J.E. Cronan, Jr., *Activation of long chain fatty acids with acyl carrier protein: demonstration of a new enzyme, acyl-acyl carrier protein synthetase, in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(12): p. 4374-8.
92. Beld, J., K. Finzel, and M.D. Burkart, *Versatility of acyl-acyl carrier protein synthetases*. Chem Biol, 2014. **21**(10): p. 1293-9.
93. Rock, C.O. and J.L. Garwin, *Preparative enzymatic synthesis and hydrophobic chromatography of acyl-acyl carrier protein*. J Biol Chem, 1979. **254**(15): p. 7123-8.
94. Stanley, P., et al., *An ordered reaction mechanism for bacterial toxin acylation by the specialized acyltransferase HlyC: formation of a ternary complex with acylACP and protoxin substrates*. Mol Microbiol, 1999. **34**(5): p. 887-901.
95. Trent, M.S., L.M. Worsham, and M.L. Ernst-Fonberg, *The biochemistry of hemolysin toxin activation: characterization of HlyC, an internal protein acyltransferase*. Biochemistry, 1998. **37**(13): p. 4644-52.
96. Worsham, L.M., K.G. Langston, and M.L. Ernst-Fonberg, *Thermodynamics of a protein acylation: activation of Escherichia coli hemolysin toxin*. Biochemistry, 2005. **44**(4): p. 1329-37.
97. Ajioka, R.S., J.D. Phillips, and J.P. Kushner, *Biosynthesis of heme in mammals*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(7): p. 723-36.
98. Kuhl, T. and D. Imhof, *Regulatory Fe(II/III) heme: the reconstruction of a molecule's biography*. Chembiochem, 2014. **15**(14): p. 2024-35.
99. Shen, J., et al., *Iron metabolism regulates p53 signaling through direct heme-p53 interaction and modulation of p53 localization, stability, and function*. Cell Rep, 2014. **7**(1): p. 180-93.

100. Ishikawa, H., et al., *Involvement of heme regulatory motif in heme-mediated ubiquitination and degradation of IRP2*. Mol Cell, 2005. **19**(2): p. 171-81.
101. Igarashi, J., et al., *Elucidation of the heme binding site of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase and the role of the regulatory motif in heme sensing by spectroscopic and catalytic studies of mutant proteins*. J Biol Chem, 2008. **283**(27): p. 18782-91.
102. Tang, X.D., et al., *Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels*. Nature, 2003. **425**(6957): p. 531-5.
103. Atamna, H. and W.H. Frey, 2nd, *A role for heme in Alzheimer's disease: heme binds amyloid beta and has altered metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(30): p. 11153-8.
104. Lechardeur, D., et al., *Discovery of intracellular heme-binding protein HrtR, which controls heme efflux by the conserved HrtB-HrtA transporter in Lactococcus lactis*. J Biol Chem, 2012. **287**(7): p. 4752-8.
105. Draganova, E.B., et al., *Heme Binding by Corynebacterium diphtheriae HmuT: Function and Heme Environment*. Biochemistry, 2015. **54**(43): p. 6598-609.
106. Schubert, E., et al., *Spectroscopic studies on peptides and proteins with cysteine-containing heme regulatory motifs (HRM)*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2015. **148**: p. 49-56.
107. Brewitz, H.H., et al., *Role of the Chemical Environment beyond the Coordination Site: Structural Insight into Fe(III) Protoporphyrin Binding to Cysteine-Based Heme-Regulatory Protein Motifs*. Chembiochem, 2015. **16**(15): p. 2216-24.
108. Brewitz, H.H., et al., *Heme interacts with histidine- and tyrosine-based protein motifs and inhibits enzymatic activity of chloramphenicol acetyltransferase from Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1860**(6): p. 1343-53.
109. Dunkle, J.A., et al., *Structures of the Escherichia coli ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(40): p. 17152-7.
110. Biswas, T., et al., *The structural basis for substrate versatility of chloramphenicol acetyltransferase CATI*. Protein Sci, 2012. **21**(4): p. 520-30.
111. Fenton, H.J.H., *Oxidation of tartaric acid in presence of iron*. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1894. **65**: p. 899-910.
112. Wandersman, C. and P. Delepelaire, *Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores*. Annu Rev Microbiol, 2004. **58**: p. 611-47.
113. Subashchandrabose, S. and H.L. Mobley, *Back to the metal age: battle for metals at the host-pathogen interface during urinary tract infection*. Metallomics, 2015. **7**(6): p. 935-42.
114. Henderson, J.P., et al., *Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic Escherichia coli*. PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000305.
115. Wilson, B.R., et al., *Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential*. Trends Mol Med, 2016. **22**(12): p. 1077-1090.
116. Martins, R., et al., *Heme drives hemolysis-induced susceptibility to infection via disruption of phagocyte functions*. Nat Immunol, 2016. **17**(12): p. 1361-1372.
117. Braun, V. and K. Hantke, *Recent insights into iron import by bacteria*. Curr Opin Chem Biol, 2011. **15**(2): p. 328-34.
118. Higgins, C.F., *ABC transporters: from microorganisms to man*. Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 67-113.
119. Shikama, K., *Standard free energy maps for the hydrolysis of ATP as a function of pH, pMg and pCa*. Arch Biochem Biophys, 1971. **147**(1): p. 311-7.
120. Locher, K.P., *Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters*. Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(6): p. 487-93.
121. Tong, Y. and M. Guo, *Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes*. Arch Biochem Biophys, 2009. **481**(1): p. 1-15.
122. Runyen-Janecky, L.J., *Role and regulation of heme iron acquisition in gram-negative pathogens*. Front Cell Infect Microbiol, 2013. **3**: p. 55.
123. Krewulak, K.D. and H.J. Vogel, *TonB or not TonB: is that the question?* Biochem Cell Biol, 2011. **89**(2): p. 87-97.
124. Torres, A.G. and S.M. Payne, *Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. Mol Microbiol, 1997. **23**(4): p. 825-33.
125. Nobles, C.L., et al., *A dual component heme biosensor that integrates heme transport and synthesis in bacteria*. J Microbiol Methods, 2015. **118**: p. 7-17.
126. Hagan, E.C. and H.L. Mobley, *Haem acquisition is facilitated by a novel receptor Hma and required by uropathogenic Escherichia coli for kidney infection*. Mol Microbiol, 2009. **71**(1): p. 79-91.
127. Stojiljkovic, I. and D. Perkins-Balding, *Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria*. DNA Cell Biol, 2002. **21**(4): p. 281-95.

128. Frechon, D. and E. Le Cam, *Fur (ferric uptake regulation) protein interaction with target DNA: comparison of gel retardation, footprinting and electron microscopy analyses*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **201**(1): p. 346-55.
129. Nikaido, H. and M. Vaara, *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability*. Microbiol Rev, 1985. **49**(1): p. 1-32.
130. Ames, G.F., *Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution*. Annu Rev Biochem, 1986. **55**: p. 397-425.
131. Chen, J., *Molecular mechanism of the Escherichia coli maltose transporter*. Curr Opin Struct Biol, 2013. **23**(4): p. 492-8.
132. Zhang, P., *Structure and mechanism of energy-coupling factor transporters*. Trends Microbiol, 2013. **21**(12): p. 652-9.
133. Kanonenberg, K., C.K. Schwarz, and L. Schmitt, *Type I secretion systems - a story of appendices*. Res Microbiol, 2013. **164**(6): p. 596-604.
134. Noegel, A., et al., *Plasmid cistrons controlling synthesis and excretion of the exotoxin alpha-haemolysin of Escherichia coli*. Mol Gen Genet, 1979. **175**(3): p. 343-50.
135. Felmler, T., S. Pellett, and R.A. Welch, *Nucleotide sequence of an Escherichia coli chromosomal hemolysin*. J Bacteriol, 1985. **163**(1): p. 94-105.
136. Wang, R.C., et al., *Analysis of the membrane organization of an Escherichia coli protein translocator, HlyB, a member of a large family of prokaryote and eukaryote surface transport proteins*. J Mol Biol, 1991. **217**(3): p. 441-54.
137. Pimenta, A.L., et al., *Antibody analysis of the localisation, expression and stability of HlyD, the MFP component of the E. coli haemolysin translocator*. Mol Gen Genet, 1999. **261**(1): p. 122-32.
138. Wandersman, C. and P. Delepelaire, *ToIC, an Escherichia coli outer membrane protein required for hemolysin secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4776-80.
139. Costa, T.R., et al., *Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(6): p. 343-59.
140. Biemans-Oldehinkel, E., M.K. Doeven, and B. Poolman, *ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains*. FEBS Lett, 2006. **580**(4): p. 1023-35.
141. Schmitt, L., et al., *Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains*. J Mol Biol, 2003. **330**(2): p. 333-42.
142. Zaitseva, J., et al., *H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB*. EMBO J, 2005. **24**(11): p. 1901-10.
143. Thanabal, T., et al., *Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from E.coli: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore*. EMBO J, 1998. **17**(22): p. 6487-96.
144. Koronakis, V., J. Eswaran, and C. Hughes, *Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 467-89.
145. Koronakis, V., E. Koronakis, and C. Hughes, *Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of Escherichia coli hemolysin protein across both bacterial membranes*. EMBO J, 1989. **8**(2): p. 595-605.
146. Benabdelhak, H., et al., *A specific interaction between the NBD of the ABC-transporter HlyB and a C-terminal fragment of its transport substrate haemolysin A*. J Mol Biol, 2003. **327**(5): p. 1169-79.
147. Lecher, J., et al., *An RTX transporter tethers its unfolded substrate during secretion via a unique N-terminal domain*. Structure, 2012. **20**(10): p. 1778-87.
148. Pimenta, A.L., et al., *Mutations in HlyD, part of the type 1 translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the secreted toxin*. J Bacteriol, 2005. **187**(21): p. 7471-80.
149. Lenders, M.H., et al., *Directionality of substrate translocation of the hemolysin A Type I secretion system*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12470.
150. Koronakis, V., et al., *Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export*. Nature, 2000. **405**(6789): p. 914-9.
151. Andersen, C., et al., *Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11103-8.
152. Pei, X.Y., et al., *Structures of sequential open states in a symmetrical opening transition of the TolC exit duct*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(5): p. 2112-7.
153. Richmond, T.J. and F.M. Richards, *Packing of alpha-helices: geometrical constraints and contact areas*. J Mol Biol, 1978. **119**(4): p. 537-55.
154. Gilson, L., H.K. Mahanty, and R. Kolter, *Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V*. EMBO J, 1990. **9**(12): p. 3875-84.

155. Satchell, K.J., *MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins*. Infect Immun, 2007. **75**(11): p. 5079-84.
156. Kim, J.S., et al., *Crystal Structure of a Soluble Fragment of the Membrane Fusion Protein HlyD in a Type I Secretion System of Gram-Negative Bacteria*. Structure, 2016. **24**(3): p. 477-85.
157. Ostolaza, H. and F.M. Goni, *Interaction of the bacterial protein toxin alpha-haemolysin with model membranes: protein binding does not always lead to lytic activity*. FEBS Lett, 1995. **371**(3): p. 303-6.
158. Sanchez-Magraner, L., et al., *Membrane insertion of Escherichia coli alpha-hemolysin is independent from membrane lysis*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5461-7.
159. Hyland, C., et al., *Membrane Interaction of Escherichia coli Hemolysin: Flotation and Insertion-Dependent Labeling by Phospholipid Vesicles*. Journal of Bacteriology, 2001. **183**(18): p. 5364-5370.
160. Herlax, V., et al., *Relevance of fatty acid covalently bound to Escherichia coli alpha-hemolysin and membrane microdomains in the oligomerization process*. J Biol Chem, 2009. **284**(37): p. 25199-210.
161. Mate, S.M., et al., *Boundary region between coexisting lipid phases as initial binding sites for Escherichia coli alpha-hemolysin: a real-time study*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(7): p. 1832-41.
162. Eberspacher, B., F. Hugo, and S. Bhakdi, *Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of Escherichia coli hemolysin*. Infect Immun, 1989. **57**(3): p. 983-8.
163. Bauer, M.E. and R.A. Welch, *Association of RTX toxins with erythrocytes*. Infect Immun, 1996. **64**(11): p. 4665-72.
164. Valeva, A., et al., *Binding of Escherichia coli hemolysin and activation of the target cells is not receptor-dependent*. J Biol Chem, 2005. **280**(44): p. 36657-63.
165. Vazquez, R.F., et al., *Novel evidence for the specific interaction between cholesterol and alpha-haemolysin of Escherichia coli*. Biochem J, 2014. **458**(3): p. 481-9.
166. Cortajarena, A.L., F.M. Goni, and H. Ostolaza, *Glycophorin as a receptor for Escherichia coli alpha-hemolysin in erythrocytes*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 12513-9.
167. Cortajarena, A.L., F.M. Goni, and H. Ostolaza, *A receptor-binding region in Escherichia coli alpha-haemolysin*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 19159-63.
168. Lally, E.T., et al., *RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30463-9.
169. Morova, J., et al., *RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5355-60.
170. Bakas, L., et al., *Reversible adsorption and nonreversible insertion of Escherichia coli alpha-hemolysin into lipid bilayers*. Biophys J, 1996. **71**(4): p. 1869-76.
171. Soloaga, A., et al., *Insertion of Escherichia coli alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment*. Mol Microbiol, 1999. **31**(4): p. 1013-24.
172. Verza, G. and L. Bakas, *Location of tryptophan residues in free and membrane bound Escherichia coli alpha-hemolysin and their role on the lytic membrane properties*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1464**(1): p. 27-34.
173. Benz, R., *Channel formation by RTX-toxins of pathogenic bacteria: Basis of their biological activity*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1858**(3): p. 526-37.
174. Menestrina, G., et al., *Permeability increase induced by Escherichia coli hemolysin A in human macrophages is due to the formation of ionic pores: a patch clamp characterization*. J Membr Biol, 1996. **149**(2): p. 113-21.
175. Benz, R., et al., *Pore formation by the Escherichia coli hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates*. Infect Immun, 1989. **57**(3): p. 887-95.
176. Ludwig, A., R. Benz, and W. Goebel, *Oligomerization of Escherichia coli haemolysin (HlyA) is involved in pore formation*. Mol Gen Genet, 1993. **241**(1-2): p. 89-96.
177. Jorgensen, S.E., et al., *Calcium accumulation in human and sheep erythrocytes that is induced by Escherichia coli hemolysin*. Toxicon, 1983. **21**(5): p. 717-27.
178. Sanchez, S., et al., *Alpha hemolysin induces an increase of erythrocytes calcium: a FLIM 2-photon phasor analysis approach*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e21127.
179. Skals, M., et al., *Alpha-hemolysin from Escherichia coli uses endogenous amplification through P2X receptor activation to induce hemolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 4030-5.
180. Uhlen, P., et al., *Alpha-haemolysin of uropathogenic E. coli induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells*. Nature, 2000. **405**(6787): p. 694-7.

-
181. Skals, M., et al., *Escherichia coli* alpha-hemolysin triggers shrinkage of erythrocytes via K(Ca)_{3.1} and TMEM16A channels with subsequent phosphatidylserine exposure. *J Biol Chem*, 2010. **285**(20): p. 15557-65.
 182. Dhakal, B.K. and M.A. Mulvey, *The UPEC pore-forming toxin alpha-hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways*. *Cell Host Microbe*, 2012. **11**(1): p. 58-69.
 183. Nagamatsu, K., et al., *Dysregulation of Escherichia coli alpha-hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(8): p. E871-80.
 184. Sandermann, H., *Membranbiochemie: Eine Einführung*. 1983: Springer Berlin Heidelberg. 144.
 185. Moremen, K.W., M. Tiemeyer, and A.V. Nairn, *Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(7): p. 448-62.
 186. Varki, A., *Essentials of Glycobiology*. 1999: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 187. Cummings, R.D., *The repertoire of glycan determinants in the human glycome*. *Mol Biosyst*, 2009. **5**(10): p. 1087-104.
 188. Varki, A., *Nothing in glycobiology makes sense, except in the light of evolution*. *Cell*, 2006. **126**(5): p. 841-5.
 189. Bishop, J.R. and P. Gagneux, *Evolution of carbohydrate antigens--microbial forces shaping host glycomes?* *Glycobiology*, 2007. **17**(5): p. 23R-34R.
 190. Haltiwanger, R.S. and J.B. Lowe, *Role of glycosylation in development*. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: p. 491-537.
 191. Varki, A., *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*. *Glycobiology*, 1993. **3**(2): p. 97-130.
 192. Imberty, A. and A. Varrot, *Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates*. *Curr Opin Struct Biol*, 2008. **18**(5): p. 567-76.
 193. Merritt, E.A., et al., *Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide*. *Protein Sci*, 1994. **3**(2): p. 166-75.
 194. Cioci, G., et al., *Structural basis of calcium and galactose recognition by the lectin PA-IL of Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters*, 2003. **555**(2): p. 297-301.
 195. Blanchard, B., et al., *Structural basis of the preferential binding for globo-series glycosphingolipids displayed by Pseudomonas aeruginosa lectin I*. *J Mol Biol*, 2008. **383**(4): p. 837-53.
 196. Perret, S., et al., *Structural basis for the interaction between human milk oligosaccharides and the bacterial lectin PA-III of Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J*, 2005. **389**(Pt 2): p. 325-32.
 197. Wu, A.M., et al., *Interactions of the fucose-specific Pseudomonas aeruginosa lectin, PA-III, with mammalian glycoconjugates bearing polyvalent Lewis(a) and ABH blood group glycotopes*. *Biochimie*, 2006. **88**(10): p. 1479-92.
 198. Pang, L., et al., *FimH antagonists: structure-activity and structure-property relationships for biphenyl alpha-D-mannopyranosides*. *ChemMedChem*, 2012. **7**(8): p. 1404-22.
 199. Dhakal, B.K., R.R. Kulesus, and M.A. Mulvey, *Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic Escherichia coli*. *Eur J Clin Invest*, 2008. **38 Suppl 2**: p. 2-11.
 200. Gamage, S.D., C.M. McGannon, and A.A. Weiss, *Escherichia coli serogroup O107/O117 lipopolysaccharide binds and neutralizes Shiga toxin 2*. *J Bacteriol*, 2004. **186**(16): p. 5506-12.
 201. Moss, J., et al., *Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Ganglioside specificity and ADP-ribosyltransferase activity*. *J Biol Chem*, 1981. **256**(24): p. 12861-5.
 202. Zalem, D., et al., *Biochemical and structural characterization of the novel sialic acid-binding site of Escherichia coli heat-labile enterotoxin LT-IIb*. *Biochem J*, 2016. **473**(21): p. 3923-3936.
 203. Munksgaard, P.S., et al., *Sialic acid residues are essential for cell lysis mediated by leukotoxin from Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 2014. **82**(6): p. 2219-28.
 204. Duk, M., et al., *Isolation and characterization of glycophorin from nucleated (chicken) erythrocytes*. *Arch Biochem Biophys*, 2000. **375**(1): p. 111-8.
 205. Scholfield, C.R., *Composition of soybean lecithin*. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1981. **58**(10): p. 889-892.
 206. Foxman, B., *Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs*. *Dis Mon*, 2003. **49**(2): p. 53-70.
 207. Flores-Mireles, A.L., et al., *Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options*. *Nat Rev Microbiol*, 2015. **13**(5): p. 269-84.
 208. Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley, *Pathogenic Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2004. **2**(2): p. 123-40.

209. Yamamoto, S., et al., *Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by Escherichia coli*. J Urol, 1997. **157**(3): p. 1127-9.
210. Chattopadhyay, S., et al., *High frequency of hotspot mutations in core genes of Escherichia coli due to short-term positive selection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(30): p. 12412-7.
211. Hannan, T.J., et al., *Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic Escherichia coli bladder infection*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(3): p. 616-48.
212. Rowe, M.C., H.L. Withers, and S. Swift, *Uropathogenic Escherichia coli forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron*. FEMS Microbiol Lett, 2010. **307**(1): p. 102-9.
213. Rosen, D.A., et al., *Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection*. PLoS Med, 2007. **4**(12): p. e329.
214. Mysorekar, I.U. and S.J. Hultgren, *Mechanisms of uropathogenic Escherichia coli persistence and eradication from the urinary tract*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(38): p. 14170-5.
215. Zhang, L., B. Foxman, and C. Marrs, *Both Urinary and Rectal Escherichia coli Isolates Are Dominated by Strains of Phylogenetic Group B2*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(11): p. 3951-3955.
216. Moreno, E., et al., *Relationship between Escherichia coli strains causing acute cystitis in women and the fecal E. coli population of the host*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(8): p. 2529-34.
217. Smith, Y.C., et al., *Hemolysin of uropathogenic Escherichia coli evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice*. Infect Immun, 2008. **76**(7): p. 2978-90.
218. Bhakdi, S., et al., *Potent leukocidal action of Escherichia coli hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes*. J Exp Med, 1989. **169**(3): p. 737-54.
219. Bhakdi, S. and E. Martin, *Superoxide generation by human neutrophils induced by low doses of Escherichia coli hemolysin*. Infect Immun, 1991. **59**(9): p. 2955-62.
220. Bhakdi, S., et al., *Effects of Escherichia coli hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release*. J Clin Invest, 1990. **85**(6): p. 1746-53.
221. Gur, C., et al., *Natural killer cell-mediated host defense against uropathogenic E. coli is counteracted by bacterial hemolysinA-dependent killing of NK cells*. Cell Host Microbe, 2013. **14**(6): p. 664-74.
222. Thomas, S., S.H. Smits, and L. Schmitt, *A simple in vitro acylation assay based on optimized HlyA and HlyC purification*. Anal Biochem, 2014. **464**: p. 17-23.
223. Bertani, G., *Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli*. J Bacteriol, 1951. **62**(3): p. 293-300.
224. Thomas, S., *Molecular functionality of the uropathogenic RTX Toxin Haemolysin A from Escherichia coli 2014*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Elektronische Veröffentlichung.
225. Boutet, E., et al., *UniProtKB/Swiss-Prot, the Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase: How to Use the Entry View*. Methods Mol Biol, 2016. **1374**: p. 23-54.
226. Soloaga, A., et al., *Purification of Escherichia coli pro-haemolysin, and a comparison with the properties of mature alpha-haemolysin*. Eur J Biochem, 1996. **238**(2): p. 418-22.
227. Bakkes, P.J., et al., *The rate of folding dictates substrate secretion by the Escherichia coli hemolysin type 1 secretion system*. J Biol Chem, 2010. **285**(52): p. 40573-80.
228. Walker, J.M., *The Proteomics Protocols Handbook*. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, ed. H.C. Gasteiger E., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. 2005: Humana Press.
229. Kapust, R.B., et al., *Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency*. Protein Eng, 2001. **14**(12): p. 993-1000.
230. Novy, R.M., B., Novagen Inc., *Use of glucose to control basal expression in the pET System*. inNovations. **13**.
231. Student, *The probable error of a mean*. Biometrika, 1908. **VI**(1).
232. Rhodes, G., *Crystallography made crystal clear - A guide for users of macromolecular models*. Third Edition ed. Complementary science series. 2006: Academic Press, Elsevier Inc. 306.
233. Drenth, J., *Principles of protein X-ray crystallography*. Third Edition ed. 2010: Springer-Verlag.
234. Jancarik, J. and S.H. Kim, *Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins*. J Appl Crystallogr, 1991. **24**: p. 409-411.
235. Gilliland, G.L., et al., *Biological Macromolecule Crystallization Database, Version 3.0: new features, data and the NASA archive for protein crystal growth data*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1994. **50**(Pt 4): p. 408-13.
236. Lesley, S.A. and I.A. Wilson, *Protein production and crystallization at the joint center for structural genomics*. J Struct Funct Genomics, 2005. **6**(2-3): p. 71-9.

237. Newman, J., et al., *Towards rationalization of crystallization screening for small- to medium-sized academic laboratories: the PACT/JCSG+ strategy*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2005. **61**(Pt 10): p. 1426-31.
238. Radaev, S. and P.D. Sun, *Crystallization of protein-protein complexes*. J Appl Crystallogr, 2002. **35**: p. 674-676.
239. Hall, D. and A.P. Minton, *Macromolecular crowding: qualitative and semiquantitative successes, quantitative challenges*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1649**(2): p. 127-39.
240. Grimm, C., et al., *A crystallization screen based on alternative polymeric precipitants*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 6): p. 685-97.
241. Newstead, S., S. Ferrandon, and S. Iwata, *Rationalizing alpha-helical membrane protein crystallization*. Protein Sci, 2008. **17**(3): p. 466-72.
242. Parker, J.L. and S. Newstead, *Current trends in alpha-helical membrane protein crystallization: an update*. Protein Sci, 2012. **21**(9): p. 1358-65.
243. Benvenuti, M. and S. Mangani, *Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography*. Nat Protoc, 2007. **2**(7): p. 1633-51.
244. Polanyi, M., E. Schiebold, and K. Weissenberg, *Über die Entwicklung des Drehkristallverfahrens*. Physik, 1923.
245. Nurizzo, D., et al., *The ID23-1 structural biology beamline at the ESRF*. J Synchrotron Radiat, 2006. **13**(Pt 3): p. 227-38.
246. Flot, D., et al., *The ID23-2 structural biology microfocus beamline at the ESRF*. J Synchrotron Radiat, 2010. **17**(1): p. 107-18.
247. de Sanctis, D., et al., *ID29: a high-intensity highly automated ESRF beamline for macromolecular crystallography experiments exploiting anomalous scattering*. J Synchrotron Radiat, 2012. **19**(Pt 3): p. 455-61.
248. Gabadinho, J., et al., *MxCuBE: a synchrotron beamline control environment customized for macromolecular crystallography experiments*. J Synchrotron Radiat, 2010. **17**(5): p. 700-7.
249. Kappes, R.M., et al., *Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 1999. **32**(1): p. 203-16.
250. Pittelkow, M., et al., *The crystal structure of the substrate-binding protein OpuBC from Bacillus subtilis in complex with choline*. J Mol Biol, 2011. **411**(1): p. 53-67.
251. Monaco, S., et al., *Automatic processing of macromolecular crystallography X-ray diffraction data at the ESRF*. J Appl Crystallogr, 2013. **46**(Pt 3): p. 804-810.
252. Delageniere, S., et al., *ISPyB: an information management system for synchrotron macromolecular crystallography*. Bioinformatics, 2011. **27**(22): p. 3186-92.
253. McCoy, A.J., et al., *Phaser crystallographic software*. J Appl Crystallogr, 2007. **40**(Pt 4): p. 658-674.
254. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
255. Murshudov, G.N., et al., *REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2011. **67**(Pt 4): p. 355-67.
256. Adams, P.D., et al., *PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 2): p. 213-21.
257. Langer, G., et al., *Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7*. Nat Protoc, 2008. **3**(7): p. 1171-9.
258. Schuttelkopf, A.W. and D.M. van Aalten, *PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 8): p. 1355-63.
259. *The PyMOL molecular graphics system*. Version 1.3. Schrödinger, LLC.
260. Gilboa-Garber, N., *Pseudomonas aeruginosa lectins*. Methods Enzymol, 1982. **83**: p. 378-85.
261. Dyballa, N. and S. Metzger, *Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels*. J Vis Exp, 2009(30).
262. Heimbürg-Molinaro, J., et al., *Preparation and analysis of glycan microarrays*. Curr Protoc Protein Sci, 2011. **Chapter 12**: p. Unit12 10.
263. Agravat, S.B., et al., *GlycoPattern: a web platform for glycan array mining*. Bioinformatics, 2014. **btu559**.
264. Baneyx, F. and M. Mujacic, *Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(11): p. 1399-408.
265. Juarez, A., et al., *Expression and regulation of the plasmid-encoded hemolysin determinant of Escherichia coli*. Mol Gen Genet, 1984. **197**(2): p. 196-203.
266. Brewitz, H.H., G. Hagelueken, and D. Imhof, *Structural and functional diversity of transient heme binding to bacterial proteins*. Biochim Biophys Acta, 2017. **1861**(3): p. 683-697.

-
267. Kuhl, T., et al., *Determination of hemin-binding characteristics of proteins by a combinatorial peptide library approach*. *Chembiochem*, 2011. **12**(18): p. 2846-55.
268. Kuhl, T., et al., *Analysis of Fe(III) heme binding to cysteine-containing heme-regulatory motifs in proteins*. *ACS Chem Biol*, 2013. **8**(8): p. 1785-93.
269. Yan, Y., et al., *Intracellular free iron and its potential role in ultrahigh-pressure-induced inactivation of Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2013. **79**(2): p. 722-4.
270. Kubitschek, H.E. and J.A. Friske, *Determination of bacterial cell volume with the Coulter Counter*. *J Bacteriol*, 1986. **168**(3): p. 1466-7.
271. Labbe, R.F. and R.L. Rettmer, *Zinc protoporphyrin: a product of iron-deficient erythropoiesis*. *Semin Hematol*, 1989. **26**(1): p. 40-6.
272. Marks, G.S., *Heme oxygenase: the physiological role of one of its metabolites, carbon monoxide and interactions with zinc protoporphyrin, cobalt protoporphyrin and other metalloporphyrins*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 1994. **40**(7): p. 863-70.
273. Guzman-Verri, C., F. Garcia, and S. Arvidson, *Incomplete activation of Escherichia coli hemolysin (HlyA) due to mutations in the 3' region of hlyC*. *J Bacteriol*, 1997. **179**(18): p. 5959-62.
274. Gao, X., et al., *High-throughput limited proteolysis/mass spectrometry for protein domain elucidation*. *J Struct Funct Genomics*, 2005. **6**(2-3): p. 129-34.
275. Gahmberg, C.G., M. Ekblom, and L.C. Andersson, *Differentiation of human erythroid cells is associated with increased O-glycosylation of the major sialoglycoprotein, glycophorin A*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(21): p. 6752-6.
276. Larsen, C.K., et al., *Python erythrocytes are resistant to alpha-hemolysin from Escherichia coli*. *J Membr Biol*, 2011. **244**(3): p. 131-40.
277. Sato, T., *Lectin-probed western blot analysis*. *Methods Mol Biol*, 2014. **1200**: p. 93-100.
278. Lee, J.L. and C.H. Streuli, *Integrins and epithelial cell polarity*. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 15): p. 3217-25.
279. Walde, P., et al., *Giant vesicles: preparations and applications*. *Chembiochem*, 2010. **11**(7): p. 848-65.
280. Oulevey, J., E. Bodden, and O.W. Thiele, *Quantitative determination of glycosphingolipids illustrated by using erythrocyte membranes of various mammalian species*. *Eur J Biochem*, 1977. **79**(1): p. 265-7.

8 Abkürzungsverzeichnis

AasS	<u>A</u> cy <u>l</u> - <u>A</u> CP <u>S</u> ynthetase
ABC	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette
ACP	<u>a</u> cy <u>l</u> - <u>c</u> arrier <u>p</u> rotein
ACPS	Holo- <u>A</u> CP <u>S</u> ynthase
Amp	<u>A</u> mpicillin
AP	<u>A</u> lkalische <u>P</u> rotease
AS	<u>A</u> minosäure
ATP	<u>a</u> denosine-5'- <u>t</u> riphosphate
CAT	<u>C</u> hloramphenicol <u>A</u> cetyltransferase
CFG	<u>C</u> onsortium for <u>F</u> unctional <u>G</u> lycomics
CLD	<u>C</u> 39- <u>l</u> ike <u>d</u> omain
Co(III)-PPIX	<u>C</u> obalt(III)- <u>P</u> rotoporphyrin IX
CoA	<u>C</u> oenzym <u>A</u>
CtxB	<u>c</u> holera <u>t</u> oxin <u>s</u> ubunit <u>B</u>
DNA	<u>d</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<u>e</u> thylenediaminetetraacetic <u>a</u> cid
EHEC	enterohämorrhagische <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
ETEC	enterotoxische <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
Fe(II)-PPIX	Eisen(II)- <u>P</u> rotoporphyrin IX, Häm
Fe(III)-PPIX	Chloreisen(III)- <u>P</u> rotoporphyrin IX, Hämin
g	Erdbeschleunigung, Gramm
Ga(III)-PPIX	<u>G</u> allium(III)- <u>P</u> rotoporphyrin IX
GAG	<u>G</u> lucosaminoglykan
Gb3	<u>G</u> lobotriaosylceramid 3
GBP	<u>G</u> lykan- <u>b</u> indendes <u>P</u> rotein
GNAT	<u>G</u> CN5-ähnliche <u>N</u> - <u>A</u> cetyltransferasen
GUV	<u>g</u> iant <u>u</u> nilamellar <u>v</u> esicles
Häm	Häm b, Eisen(II)-Protoporphyrin IX
Hämin	Chloreisen(III)-Protoporphyrin IX
HlyA	<u>H</u> ämolysin <u>A</u>
HlyB	<u>H</u> ämolysin <u>B</u>
HlyC	<u>H</u> ämolysin <u>C</u>
HlyD	<u>H</u> ämolysin <u>D</u>

HRM	<u>H</u> äm- <u>r</u> egulierendes <u>M</u> otiv
HRP	<u>H</u> äm- <u>r</u> eguliertes <u>P</u> rotein
IBC	<i><u>i</u>ntracellular <u>b</u>acterial <u>c</u>ommunities</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IMAC	<i><u>i</u>mmobilized <u>m</u>etal <u>a</u>ffinity <u>c</u>hromatography</i>
IUPAC	<i><u>I</u>nternational <u>U</u>nion of <u>P</u>ure and <u>A</u>pplyed <u>C</u>hemistry</i>
Kan	<u>K</u> anamycin
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	<u>k</u> ilo <u>D</u> alton
kJ	<u>k</u> ilo <u>J</u> oule
K _m	Michaelis-Menten Konstante
L	<u>L</u> iter
LewA	Blutgruppenantigen Lewis ^a
LFA-1	<i><u>l</u>ymphocyte <u>f</u>unction-associated <u>a</u>ntigen 1</i>
MALDI	<i><u>m</u>atrix <u>a</u>ssisted <u>l</u>aser <u>d</u>esorption <u>i</u>onization</i>
MARTX	<i><u>m</u>ultifunctional <u>a</u>utoprocessing <u>r</u>epeats-in <u>t</u>oxin</i>
MDCK	<i><u>M</u>adin-<u>D</u>arby <u>c</u>anine <u>k</u>idney</i>
MFP	<u>M</u> embran <u>f</u> usions <u>p</u> rotein
mg	<u>M</u> illigramm
ml	<u>M</u> illiliter
MW	<u>M</u> ittel <u>w</u> ert
MWCO	<i><u>m</u>olecular <u>w</u>eight <u>c</u>ut <u>o</u>ff</i>
NBD	<i><u>n</u>ucleotide <u>b</u>inding <u>d</u>omain</i>
nl	<u>N</u> anoliter
OD ₆₀₀	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte bei 600 nm
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>e</u> lektrophorese
PCR	<i><u>p</u>olymerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction</i>
PDB	<u>P</u> rotein <u>d</u> aten <u>b</u> ank
PFT	<i><u>p</u>ore-<u>f</u>orming <u>t</u>oxin</i>
PPIX	<u>P</u> rotoporphyrin <u>I</u> X
QIR	<i><u>q</u>uirescent <u>i</u>ntracellular <u>r</u>eservoirs</i>
RFU	<i><u>r</u>elative <u>f</u>luorescence <u>u</u>nits</i>
RTX	<i><u>r</u>epeats-in <u>t</u>oxin</i>
<i>S. aureus</i>	<i><u>S</u>taphylococcus <u>a</u>ureus</i>
SDS	<i><u>s</u>odium <u>d</u>odecyl <u>s</u>ulfate</i>
SEC	<i><u>s</u>ize <u>e</u>xclusion <u>c</u>hromatography</i>
STA	<u>S</u> tandard <u>a</u> bweichung

T1SS	Typ 1 Sekretionssystem
TAAT	Toxin-aktivierende Acyltransferase
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TMD	Transmembrandomäne
TOF	<i>time of flight</i>
UPEC	uropathogene <i>Escherichia coli</i>
v_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WT	Wildtyp
Zn(II)-PPIX	Zink(II)-Protoporphyrin IX
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar

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

Zuckereinheit	Abkürzung
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GlcAc	Glucuronsäure
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gluc	Glucose
Neu	Neuraminsäure
NeuAc	N-Acetylneuraminsäure
NeuGc	N-Glycolylneuraminsäure
SA	Sialinsäure

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit vom 15. Juni 2013 bis Ende April 2017 bei Prof. Dr. Lutz Schmitt an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt. An dieser Stelle möchte ich all jenen Personen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt: Danke, dass du diese Dissertation ermöglichst, die fairen Rahmenbedingungen dafür geschaffen und mir die Freiheit gelassen hast, vor allem an den Projekten zu arbeiten, die mich besonders interessierten.

Bei Herrn Prof. Dr. Walter Däubener bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates und das Interesse an meiner Forschungsarbeit.

Ein großer Dank gilt ebenfalls Dr. Sander Smits – vielen Dank für deine Ideen, deine Unterstützung, insbesondere bei den Kristallisationsexperimenten und den Strukturanalysen, sowie für das kritische Lesen und Hinterfragen meiner Arbeit.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Typ 1 Sekretionsgruppe, Sven, Michael, Kerstin, Tobias, Olivia und Isabelle, möchte ich mich für das laufende Interesse an meiner wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Vorgängerin, Dr. Sabrina Thomas, für die Einführung in das Forschungsprojekt sowie die Hilfestellung beim Erlernen des *in vitro* Acylierungsassays.

Für die freundliche und angenehme Arbeitsumgebung im Büro und im Labor möchte ich mich bei Marianne, Katharina, Kalpana, Sakshi, Kerstin und Olivia bedanken.

Bei Dr. Diana Kleinschrodt und Iris Fey bedanke ich mich für die Unterstützung bei den Klonierungen. Ebenfalls möchte ich mich an dieser Stelle bei Martina für die Unterstützung bei den praktischen Dingen im Laboralltag bedanken.

Mein Dank gilt außerdem allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Lehrstuhl für Biochemie I – danke für die nette Arbeitsatmosphäre und die vielen leckeren, selbstgebackenen Kuchen, Torten und Muffins!

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Dr. Astrid Port und Stefanie Kobus von der X-Ray Facility der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die Hilfestellung beim Ansetzen der Kristallisationsplatten und bei den Messungen am Synchrotron.

Für die nette Zusammenarbeit im HlyC Kooperationsprojekt möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Diana Imhof und Dr. Henning Brewitz vom Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn bedanken. Die Zusammenarbeit hat mir sehr viel Spass gemacht. Danke Henning, für die gemeinsame Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche.

Bei Herrn Jun.-Prof. Dr. Winfried Römer möchte ich mich für die Idee mit dem HlyA Blot und die Ermöglichung der Durchführung der Experimente in seinem Labor in Freiburg bedanken. Ein großer Dank gilt dabei Dr. Thorsten Eierhoff – vielen Dank, dass du dir die Zeit für die Experimente genommen hast.

Ich danke der Jürgen Manchot Stiftung für die Finanzierung meines Promotionsprojektes im Rahmen der MOI II Graduiertenschule. Ebenfalls bedanke ich mich bei der wissenschaftlichen Koordinatorin der Graduiertenschule, Frau Dr. Inge Krümpelbeck, für die Abwicklung sämtlicher organisatorischer Angelegenheiten.

Am Schluss bleibt mir noch, mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben zu bedanken. Meinen Eltern, Josef und Rosa, danke ich für die Unterstützung während meines gesamten Studiums. Bei meinen Freunden und Verwandten bedanke ich mich für den immer wieder sehr herzlichen Empfang in meiner Heimat.

Vor allem aber danke ich dir, Michael, für deine Nähe und dafür, dass du immer an mich geglaubt und mich unerlässlich ermutigt hast.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Sandra Peherstorfer

Curriculum vitae

Persönliches

Name Sandra Peherstorfer
Geburtsort Linz, Österreich

Studium

Jun 2013 - derzeit **Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**
Promotionsstudium unter der Betreuung von Lutz Schmitt
Titel der Dissertation: *Untersuchungen zur Acylierung, Struktur und Glykanbindung des RTX-Toxins Hämolysin A aus Escherichia coli*
Voraussichtlicher Abschluss: Juni 2017

Nov 2011 - Jun 2013 **Paris-Lodron-Universität Salzburg**
Master of Science in Genetik
Titel der Masterarbeit: *Structural and Functional Characterization of the Human Blood Coagulation Factor IX Activation Peptid*

Okt 2008 - Nov 2011 **Paris-Lodron-Universität Salzburg**
Bachelor of Science in Genetik

Sep 2002 - Jun 2007 **Handelsakademie Rohrbach**
Erwerb der Hochschulzugangsberechtigung

Stipendium

Jun 2013 - Dez 2016 Vollstipendium der Jürgen Manchot Stiftung im Rahmen der Graduiertenschule Molecules of Infection (MOI) II

Sprachen

Deutsch, Englisch, Französisch